

利用 ISSR 与 SRAP 分子标记分析金线莲 种质资源遗传多样性

黄锦春¹, 万思琦¹, 陈 扬¹, 李丽红¹, 张自力¹, 朱建军²,
吴 梅³, 邢丙聪¹, 邵清松¹, 陆晨飞¹

(1. 浙江农林大学 浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 温州科技职业学院
温州市园艺植物育种重点实验室, 浙江 温州 325006; 3. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321000)

摘要: 【目的】研究浙江与福建等地引种、杂交与野生的金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 样品间遗传多样性和亲缘关系, 为金线莲种质资源鉴定及优良新品种(系)选育提供科学依据。【方法】以 48 份新鲜金线莲叶片为材料, 分别采用简单重复序列扩增多态性 (ISSR) 与序列相关扩增多态性 (SRAP) 分子标记技术, 各挑选 11 条(对)多态性好、扩增条带清晰的引物。经琼脂糖凝胶电泳成像后, 统计其扩增条带数, 运用 NTSYS-PC 2.1 和 POPGENE 32 软件进行非加权组平均法 (UPGMA) 聚类分析。【结果】ISSR 分子标记技术共扩增出 86 条条带, 其中多态性条带 84 条, 多态位点百分率为 97.67%; SRAP 分子标记技术共扩增出 88 条条带, 其中多态性条带 86 条, 多态位点百分率为 97.73%, ISSR 和 SRAP 标记均表现出较高的多态性。不同样本间的遗传距离和遗传一致度表明: 浙江省与福建省的金线莲种质混杂严重, 而遗传多样性结果显示: 福建省的金线莲种群遗传多样性更高。此外, 基于 ISSR 和 SRAP 标记的 UPGMA 聚类结果显示: 48 份不同种源的金线莲依亲缘关系的远近可分为四大类, 聚类的划分受到一定地域性的影响, 但各地域的金线莲品种在这四大类中均互有混杂。【结论】金线莲在物种水平上遗传多样性较高, 在各地区、各品种(系)间遗传交流频繁, ISSR 与 SRAP 分子标记技术可以从分子水平上揭示浙江与福建等地金线莲的遗传多样性, 且结合 ISSR 标记与 SRAP 标记的分析结果要优于单一分子标记结果。图 4 表 3 参 24

关键词: 金线莲; 遗传多样性; 分子标记; 种质资源; ISSR; SRAP

中图分类号: S567.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)01-0022-08

Genetic diversity of *Anoectochilus roxburghii* based on ISSR and SRAP molecular markers

HUANG Jinchun¹, WAN Siqi¹, CHEN Yang¹, LI Lihong¹, ZHANG Zili¹, ZHU Jianjun²,
WU Mei³, XING Bingcong¹, SHAO Qingsong¹, LU Chenfei¹

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Resources Protection and Innovation of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Wenzhou Key Laboratory of Horticultural Plant Breeding, Wenzhou Vocational College of Science & Technology, Wenzhou 325006, Zhejiang, China; 3. Agricultural Sciences Academy of Jinhua, Jinhua 321000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to study the genetic diversity and genetic relationship among introduced, crossbred and wild samples of *Anoectochilus roxburghii* in Zhejiang and Fujian Provinces, so as to provide a scientific reference for the identification of germplasm resources of *A. roxburghii* and the breeding of

收稿日期: 2022-07-19; 修回日期: 2022-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173916); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210341058); 浙江农林大学学生科研训练项目 (S202210341017)

作者简介: 黄锦春 (ORCID: 0000-0001-8845-3378), 从事中药资源学研究。E-mail: 2388475507@qq.com。通信作者: 陆晨飞 (ORCID:0000-0003-3853-6006), 讲师, 博士, 从事药用植物资源保护和利用研究。E-mail: luchenfei0716@163.com

new cultivars (lines). [Method] 48 samples of *A. roxburghii* fresh leaves were used as materials, and 11 pairs of primers with good polymorphism and clear amplification bands were selected by ISSR and SRAP, respectively. After agarose gel electrophoresis imaging, the number of amplified bands was counted, and UPGMA clustering analysis was performed using NTSYS-PC 2.1 and POPGENE 32 software. [Result] A total of 86 bands were amplified by ISSR, including 84 polymorphic bands ($P_{PB} = 97.67\%$). A total of 88 bands and 86 polymorphic bands were amplified by SRAP, and the P_{PB} was 97.73%. Both ISSR and SRAP markers showed high polymorphism. The genetic distance and genetic consistency between different samples indicated that the germplasm of *A. roxburghii* in Zhejiang and Fujian was seriously mixed, while the genetic diversity in Fujian was higher. In addition, the UPGMA clustering results based on ISSR+SRAP markers showed that the 48 samples from different provenances could be divided into 4 major groups according to the distance of their genetic relationship. The classification of clusters was affected by certain regions, but the cultivars in each region were mixed in the 4 categories. [Conclusion] The genetic diversity of *A. roxburghii* is relatively high at the species level, and genetic exchanges among regions and cultivars are frequent. The genetic diversity of *A. roxburghii* in Zhejiang and Fujian can be revealed at the molecular level by ISSR and SRAP molecular markers, and the analysis results of ISSR and SRAP markers combined are better than those of single molecular markers. [Ch, 4 fig. 3 tab. 24 ref.]

Key words: *Anoectochilus roxburghii*; genetic diversity; molecular marker; germplasm resources; ISSR; SRAP

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 为兰科 Orchidaceae 开唇兰属 *Anoectochilus* 多年生草本植物, 别名金线草、金线兰等, 主要分布在中国福建、浙江、云南和台湾等地区。金线莲因含有黄酮类、多糖类、生物碱类等成分^[1], 其药用价值日益被重视。由于金线莲对生长环境要求严格, 且野生资源被过度采摘, 导致金线莲已濒临灭绝^[2], 因此有必要开展金线莲资源的保护。种质资源收集和遗传多样性评估是金线莲资源保护的基础研究工作。分子标记可以在 DNA 水平上揭示植物的遗传变异, 是一种稳定可靠的遗传分析方法^[3]。简单重复序列间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 和序列相关扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 主要针对非特异性序列进行扩增, 对于基因组序列信息匮乏的物种较为有效^[4]。目前, 分别利用 ISSR、SRAP 等单一分子标记对金线莲遗传多样性的评价^[5-11] 已取得了一定的进展, 但单一的分子标记技术经常受到扩增区域限制、引物扩增能力差异、模糊显性标记主观计入等因素影响, 不能完全评价生物遗传多样性^[12-13], 而综合运用多种分子标记, 能最大程度优化聚类分析结果^[14-15]。目前, 结合 ISSR 与 SRAP 分子标记技术已经应用于薄荷 *Mentha haplocalyx*^[12]、烟草 *Nicotiana tabacum*^[16-17]、韭菜 *Allium tuberosum*^[18]、栀子 *Gardenia jasminoides*^[19] 等研究。本研究采用 ISSR 与 SRAP 相结合的方法对浙江与福建等地引种、杂交与野生的金线莲样品进行研究, 揭示金线莲个体间与种源间的遗传分化, 为金线莲资源的保护和利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

48 份金线莲新鲜叶片样品详见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 参照 DNA 提取试剂盒说明书提取金线莲的 DNA, 得到的 DNA 用 50 μL 双蒸水 (ddH₂O) 溶解。以 ddH₂O 为对照, 使用超微量分光光度计检测 DNA 溶解液的浓度以及纯度。

1.2.2 金线莲 ISSR 引物筛选及检测 采用哥伦比亚大学公布的第 9 套 100 个 ISSR 通用引物序列, 由北京擎科生物科技有限公司合成。使用 3 个已提取的 DNA 对 100 个 ISSR 引物进行筛选, 反应体系总体积为 20 μL , 其中 2 \times Taq Plus MasterMix 10 μL 、ddH₂O 8 μL 、ISSR 引物 1 μL 、DNA 溶解液 1 μL , PCR 扩增程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 退火 (不同引物退火温度不同) 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 循环

表1 金线莲供试样品信息

Table 1 Tested samples of *A. roxburghii*

编号	样品	来源地	编号	样品	来源地	编号	样品	来源地
1	健君1号	浙江温州	17	尖叶自交辐射选育种	福建福州	33	福建网纹种	福建厦门
2	健君2号	浙江温州	18	红霞变异种	福建厦门	34	福建无网纹种	福建厦门
3	金康1号	浙江金华	19	小叶金线莲	福建福州	35	大福星	福建厦门
4	大圆叶	福建厦门	20	温州文成野生种	浙江温州	36	大圆宝	福建厦门
5	健君1号原种	浙江温州	21	尖叶金线莲	福建泉州	37	红霞	福建厦门
6	戴云山野生种	福建泉州	22	大叶金线莲	福建三明	38	健君1号	浙江温州
7	福建永春黄带种	福建泉州	23	云南金线莲	云南昆明	39	尖叶金线莲	福建三明
8	台湾金线莲	台湾高雄	24	野生无纹	福建厦门	40	庆元无网纹	浙江庆元
9	台湾金线莲	台湾高雄	25	尖叶红杆种	福建福州	41	福建金草繁育种	福建厦门
10	无纹(G)	福建三明	26	尖叶变异筛选种	福建福州	42	小圆叶	福建三明
11	福建金线莲	福建福州	27	尖叶变异筛选种	福建福州	43	银圆宝	台湾高雄
12	大叶(H)	福建三明	28	大叶金线莲	福建三明	44	尖叶自交选育种	福建福州
13	野生种子繁育种	福建三明	29	野生种子繁育种	福建三明	45	尖叶杂交种	福建福州
14	林下尖叶(台州)	浙江台州	30	福建本地银线莲	福建厦门	46	大叶红霞	福建三明
15	林下沙岬本地无纹	浙江金华	31	福建小圆叶	福建厦门	47	尖叶变异筛选种	福建福州
16	野生金线莲	江西萍乡	32	金华本地种	浙江金华	48	无纹金线莲	福建三明

35次;最后72℃延伸1min,4℃保存。对产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,挑选出多态性好、扩增条带清晰的引物对48个DNA样品进行扩增。

1.2.3 金线莲 SRAP 引物筛选及检测 参照 FERRIOL 等^[20]的设计原理建立 SRAP 标记分析体系,由北京擎科生物科技有限公司合成,包含14条上游引物(Me1~Me14)和17条下游引物(Em1~Em17),上下游引物可随机组成238对SRAP引物组合。使用2个已提取的DNA对238对SRAP引物组合进行筛选,PCR体系及扩增程序同上。将挑选出的多态性好、扩增条带清晰的引物对48个DNA样品进行扩增。

1.2.4 数据统计及分析 对PCR扩增产物电泳胶图进行人工读带,对扩增条带按有(1)或无(0)进行统计,形成“0,1”数据矩阵,分别得到ISSR、SRAP及两者综合的数据。利用Excel统计每个(对)引物的总扩增条带数、多态性条带数和多态位点百分率(P_{PB})。使用POPGENE 32.0软件计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's基因多样性指数(H)、Shannon's多态性信息指数(I)、居群总基因多样性(H_t)、居群内基因多样性(H_s)、基因分化系数($G_{st}=1-H_s/H_t$)和基因流(N_m)等遗传多样性相关参数,并计算不同种源间的遗传距离和遗传一致度,使用OmicStudio工具对遗传距离进行主坐标分析(PCoA),使用NTSYS-PC 2.1软件对所采集的金线莲样品进行聚类分析并绘制非加权组平均法(UPGMA)树状图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及扩增多态性

2.1.1 ISSR 引物的筛选及其扩增多态性 经过2次筛选,共获得11条条带较为清楚的引物(表2)。11条引物共扩增出86条条带,其中多态性条带有84条, P_{PB} 平均值为97.67%,平均扩增条带数是7.82个,平均多态性条带数为7.64个。扩增条带数最多的引物是UBC880(13条),其次是UBC861(12条),扩增条带最少的是UBC810(4条)。 P_{PB} 为83.33%~100%,其中,UBC807、UBC810、UBC826、UBC834、UBC841、UBC842、UBC865、UBC68和UBC861的 P_{PB} 为100%,均表现出极高的多态性,占总引物的81.82%;UBC856的 P_{PB} 最低,为83.33%。

2.1.2 SRAP 引物的筛选及其扩增多态性 经过2次筛选,共获得11对条带较为清楚的引物组合(表3)。11对引物共扩增出88条条带,其中多态性条带有86条, P_{PB} 平均值为97.73%,平均扩增条带数是8个,平均多态性条带数为7.82个。扩增条带数最多的引物组合是Me11-Em4(12条);其次是组合Me4-Em13、Me2-Em14和Me13-Em10,扩增出9条条带;扩增条带最少的是Me13-Em16组合,只扩增出6条条带。 P_{PB} 为88.89%~100%,其中,Me11-Em4、Me8-Em7、Me13-Em7、Me13-Em16、Me4-Em14、

表 2 ISSR 引物信息及扩增结果

Table 2 ISSR primer information and amplification results

编号	ISSR引物	序列 (5'→3')	扩增条 带数	多态性 条带数	$P_{PB}/\%$
1	UBC807	(AG) ₈ T	6	6	100
2	UBC810	(GA) ₈ T	4	4	100
3	UBC826	(AC) ₈ C	6	6	100
4	UBC834	(AG) ₈ YT	8	8	100
5	UBC841	(GA) ₈ YC	10	10	100
6	UBC842	(GA) ₈ YG	8	8	100
7	UBC856	(AC) ₈ YA	6	5	83.33
8	UBC865	(CCG) ₆	6	6	100
9	UBC868	(GAA) ₆	7	7	100
10	UBC880	(GGAGA) ₃	13	12	92.30
11	UBC861	(ACC) ₆	12	12	100
平均			7.82	7.64	97.67
合计			86	84	

说明：Y=(C, T); P_{PB} 为多态位点百分率

表 3 SRAP 引物信息及扩增结果

Table 3 SRAP primer information and amplification results

编号	SRAP引物	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	扩增条 带数	多态性 条带数	$P_{PB}/\%$
1	Me11-Em4	BACG	DTGA	12	12	100
2	Me8-Em7	BTGC	DCAA	7	7	100
3	Me13-Em7	BAAC	DCAA	8	8	100
4	Me4-Em13	BACC	DCTA	9	8	88.89
5	Me13-Em16	BAAC	DGAT	6	6	100
6	Me2-Em14	BAGC	DCTC	9	8	88.89
7	Me4-Em14	BACC	DCTC	7	7	100
8	Me5-Em11	BAAG	DCAC	7	7	100
9	Me13-Em10	BAAC	DCAG	9	9	100
10	Me14-Em14	BTCC	DCTC	7	7	100
11	Me3-Em2	BAAT	DTGC	7	7	100
平均				8	7.82	97.73
合计				88	86	

说明：B=TGAGTCCAAACCGG; D=GACTGCGTACGAAT
T; P_{PB} 为多态位点百分率

Me5-Em11、Me13-Em10、Me14-Em14 和 Me3-Em2 组合的 P_{PB} 为 100%，均表现出极高的多态性，占总引物的 81.82%；Me4-Em13 和 Me2-Em14 组合的 P_{PB} 最低，为 88.89%。

2.2 遗传距离和遗传一致度分析

ISSR 研究中遗传一致度为 0.4767~0.9070，遗传距离为 0.0976~0.7408。其中，遗传一致度最高的 1 号与 2 号、3 号与 17 号、14 号与 17 号，均为 0.9070，它们的遗传距离最小，均为 0.0976，说明其亲缘关系较近；遗传一致度最低的是 7 号与 22 号，为 0.4767，其遗传距离最大，为 0.7408，说明其亲缘关系较远。在 SRAP 研究中遗传一致度为 0.4659~0.9545，遗传距离为 0.0465~0.7638。其中，遗传距离最小的是 36 号与 37 号，遗传距离最大的是 10 号与 39 号。综合 ISSR 和 SRAP 的数据后，遗传一致度为 0.5115~0.8793，遗传距离为 0.1286~0.6704。其中，遗传距离最小的是 34 号与 37 号，遗传距离最大的是 10 号与 39 号。

将 48 份样品按照产地来源分为 5 个群体 (浙江、福建、台湾、江西和云南)，利用 POPGENE 32 软件对其遗传距离和遗传一致度进行计算，结果如表 4 所示。使用 OmicStudio 工具将 ISSR+SRAP 的标记结果进行 PCoA 分析，结果如图 1 所示：由于来自台湾 (3 个)、江西 (1 个) 和云南 (1 个) 的样品数目较少，故不作分析。结合表 4 与图 1 可知：浙江省与福建省金线莲种质混杂。

2.3 遗传多样性分析

分析浙江与福建种源的样品，结果如表 5 所示：ISSR 分析显示，43 个种源在物种水平上， N_a 为 1.9651， N_e 为 1.4403， H 为 0.2727， I 为 0.4247， P_{PB} 为 96.51%；在群体水平上， N_a 为 1.7093~1.9302， N_e 为 1.3409~1.4325， H 为 0.2075~0.2668， I 为 0.3207~

表 4 金线莲群体间的遗传一致度与遗传距离

Table 4 Genetic agreement and genetic distance among *A. roxburghii* populations

分子标记	产地	浙江	福建	台湾	江西	云南
ISSR	浙江		0.9577	0.8842	0.8416	0.7285
	福建	0.0433		0.8916	0.7792	0.7336
	台湾	0.1231	0.1148		0.7310	0.6552
	江西	0.1724	0.2495	0.3133		0.5814
	云南	0.3168	0.3098	0.4228	0.5423	
SRAP	浙江		0.9853	0.9480	0.7960	0.8351
	福建	0.0148		0.9531	0.7880	0.8233
	台湾	0.0534	0.0480		0.7796	0.7978
	江西	0.2282	0.2383	0.2490		0.6250
	云南	0.1802	0.1945	0.2259	0.4700	
ISSR+SRAP	浙江		0.9712	0.9160	0.8187	0.7818
	福建	0.0292		0.9229	0.7835	0.7798
	台湾	0.0878	0.0802		0.7555	0.7270
	江西	0.2000	0.2439	0.2804		0.6034
	云南	0.2462	0.2487	0.3188	0.5051	

说明：对角线下方为 Nei's 遗传距离，对角线上方为 Nei's 遗传一致度

0.4147, P_{PB} 为 70.93%~93.02%, 相对于物种水平而言, 群体间的遗传多样性水平较低。SRAP 结果与 ISSR 结果相似。结合 ISSR 与 SRAP 的数据分析: 43 个种源在物种水平上, N_a 为 1.9713, N_e 为 1.3797, H 为 0.2429, I 为 0.3873, P_{PB} 为 97.13%; 在群体水平上, N_a 为 1.7816~1.9425, 平均值为 1.8621; N_e 为 1.3578~1.3607, 平均值为 1.3593; H 为 0.2239~0.2288, 平均值为 0.2264; I 为 0.3488~0.3664, 平均值为 0.3576; P_{PB} 为 78.16%~94.25%, 平均值为 86.21%, 也是群体间的遗传多样性水平更低。其中, 从 ISSR、SRAP 及综合研究结果来看, N_a 、 N_e 、 H 、 I 及 P_{PB} 中基本上是福建省大于浙江省, 说明福建省的金线莲种群遗传多样性更高。

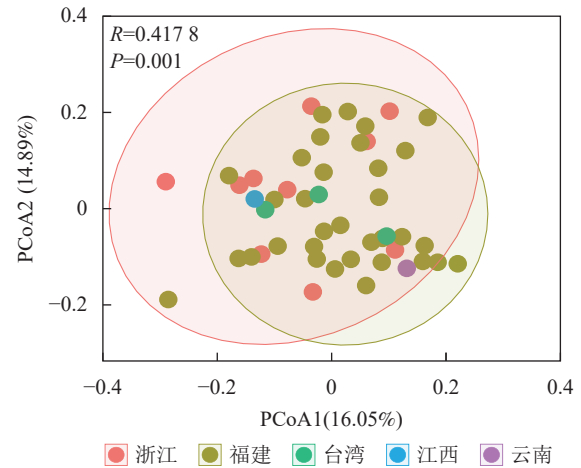


图 1 综合 ISSR 和 SRAP 标记数据的 PCoA 分析

Figure 1 PCoA analysis of ISSR and SRAP markers data

表 5 金线莲遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of *A. roxburghii*

分子标记	产地	等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	Nei's 基因多样性指数 (H)	Shannon's 多态性信息指数 (I)	多态位点百分率 (P_{PB})/%
ISSR	浙江	1.709 3	1.340 9	0.207 5	0.320 7	70.93
	福建	1.930 2	1.432 5	0.266 8	0.414 7	93.02
	群体水平	1.819 8	1.386 7	0.237 2	0.367 7	81.98
	物种水平	1.965 1	1.440 3	0.272 7	0.424 7	96.51
SRAP	浙江	1.852 3	1.380 0	0.239 9	0.376 3	85.23
	福建	1.954 5	1.284 8	0.191 6	0.319 1	95.45
	群体水平	1.903 4	1.332 4	0.215 8	0.347 7	90.34
	物种水平	1.977 3	1.320 6	0.213 8	0.350 8	97.73
ISSR+SRAP	浙江	1.781 6	1.360 7	0.223 9	0.348 8	78.16
	福建	1.942 5	1.357 8	0.228 8	0.366 4	94.25
	群体水平	1.862 1	1.359 3	0.226 4	0.357 6	86.21
	物种水平	1.971 3	1.379 7	0.242 9	0.387 3	97.13

2.4 UPGMA 聚类分析

2.4.1 基于 ISSR 标记的聚类 由图 2 可见: 48 份金线莲样品的遗传相似性系数为 0.62~0.91, 变幅为 0.29。在遗传相似系数为 0.67 处, 48 份金线莲样品被划分为 3 类: 在 I 类中地理位置相同的主要有浙江温州的 1、2、5、38 号以及福建福州的 17、25、26、27、44、45 号, 两地间亲缘关系相对较近; 而 II 类与 III 类中样品的来源组成均较为分散, 无明显特征。

2.4.2 基于 SRAP 标记的聚类 图 3 显示: 48 份金线莲样品的遗传相似性系数为 0.62~0.95, 变幅为 0.33。在遗传相似系数为 0.65 处, 48 份金线莲样品被划分为 2 类, I 类中 1、5、38 号均来自浙江温州, 且品种相似, 故聚为一类; 而在 II 类中, 各个品种难以明显划分出小类, 这也是各地种质较为混乱所带来的结果。与 ISSR 标记相比, SRAP 标记更难划分类别。

2.4.3 基于 ISSR+SRAP 标记聚类 图 4 显示: 48 份金线莲样品的遗传相似性系数为 0.64~0.88, 变幅为 0.24。在遗传相似系数为 0.68 处, 48 份金线莲样品被划分为 4 类, I 类中地理位置相同的主要有浙江温州的 1、2、5、38 号以及台湾高雄的 8、9 号, 两地间可能品种相互引种; II 类中主要为来自福建福州的样品, 包括 17、25、26、27、44、45 号; III 类中地理位置相同的主要有福建厦门的 4、18、24、31、33、34、36、37 号以及福建三明的 12、13、22、28、29、48 号, 两地间品种互引的可能性较大。2 种分子标记结合的方法更易体现样品间亲缘关系、划分类别, 更清楚地体现地理位置对亲缘关系的影响。

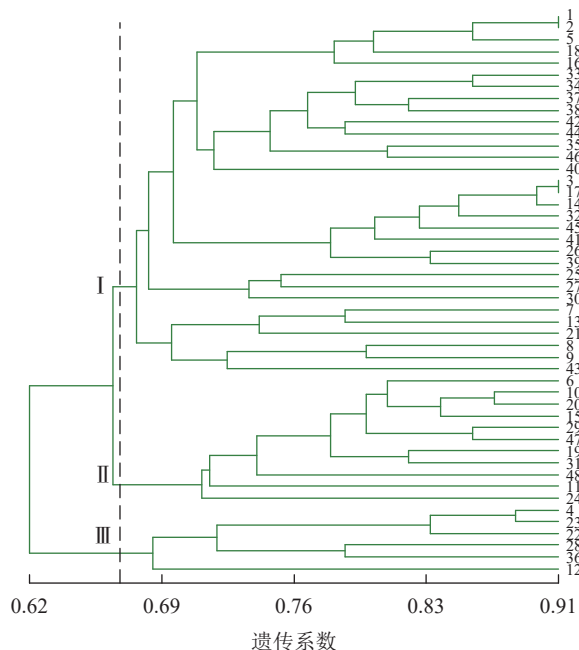


图 2 ISSR 标记的 UPGMA 树状图

Figure 2 ISSR cluster map

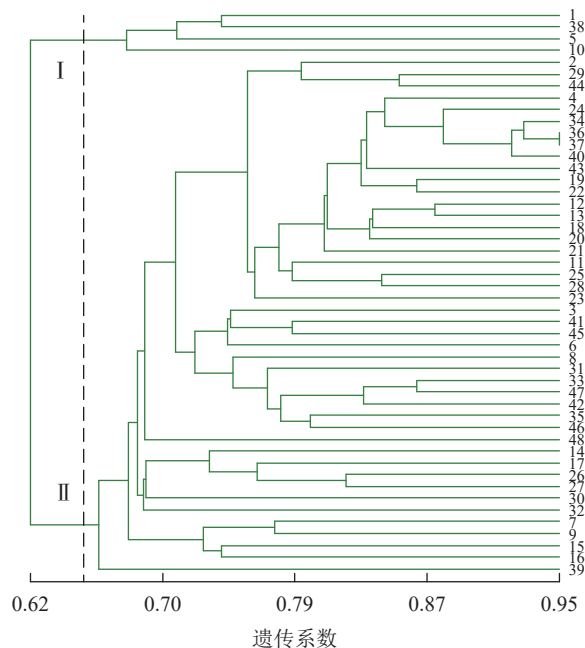


图 3 SRAP 标记的 UPGMA 树状图

Figure 3 SRAP cluster map

3 讨论与结论

本研究利用 ISSR 与 SRAP 对 48 份不同来源金线莲样品进行遗传特性分析，共筛选获得 11 条 ISSR 引物，扩增 86 条条带，其中多态性条带 84 条， P_{PB} 为 97.67%；筛选出的 11 对 SRAP 引物共扩增出了 88 条条带，多态性条带 86 条， P_{PB} 为 97.73%。说明供试金线莲样本具有丰富的遗传多样性，且相较于王剑锴等^[10]筛选出的用于检测金线莲资源遗传特性的 RAPD 分子标记，ISSR 与 SRAP 的标记多态性明显增多，进一步验证了 ISSR 与 SRAP 在金线莲种源多态性检测方面的高效率。

基于 ISSR 与 SRAP 分子标记对金线莲样品的遗传距离与遗传一致度分析发现：遗传距离最小的是 34 号(福建厦门福建无网纹种)与 37 号(福建厦门红霞)，其亲缘关系较近；遗传距离最大的是 10 号(福建三明的无纹 G)与 39 号(福建三明的尖叶)，其亲缘关系较远。从遗传多样性分析结果来看，来自福建的金线莲遗传多样性更高，同时结合金线莲群体间的遗传一致度与遗传距离结果以及 PCoA 分析，可以看出各地间金线莲种质资源十分混杂，其中包含了大量的野生种、半野生种和人工驯化的栽培种及杂交种，这种复杂性导致不同种源间的差异性明显，金线莲种质的遗传多样性增加。浙江省市场内流通的栽培种多为省外引入种^[21-22]，各种质遗传交流频繁，这有利于培育出较优的金线莲品种。

本研究单独使用 ISSR 或 SRAP 的 UPGMA 聚类结果中，均出现各地间种源相互混杂的状况，并未严格按照地理距离的差异进行归类，而 2 种分子标记结合的聚类结果中，金线莲种质资源的聚类与不同地理位置分布的情况有比较高的一致度，表现出了一定地域性分布规律，说明 2 种分子标记方法结合相较于单一分子标记方法能更准确地体现不同地区金线莲的差异性。由于 2 种分子标记所检测的基因座位以及所用的引物等因素存在差异，故两者得到的遗传距离不同，其聚类图也存在差异^[23]，且每种分子

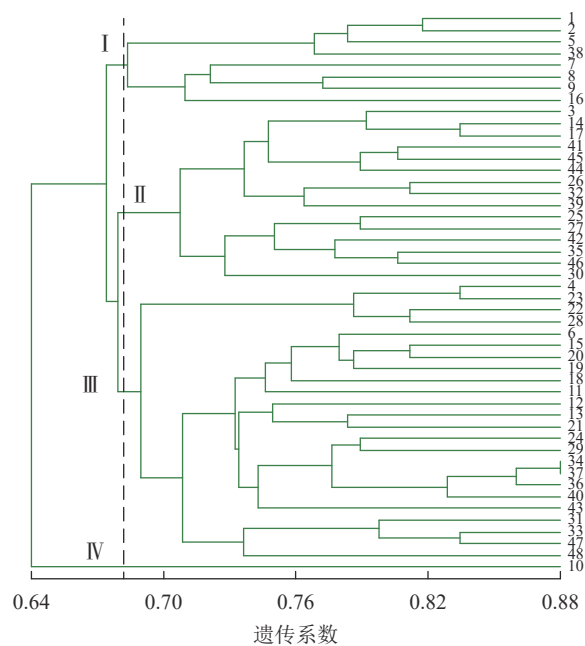


图 4 ISSR+SRAP 标记的 UPGMA 树状图

Figure 4 ISSR+SRAP cluster map

标记方法均有其优势与不足,结合多种标记技术则能更全面、准确地揭示种质遗传特性。因此,本研究结合 ISSR 与 SRAP 能更准确地揭示金线莲资源的遗传多样性和亲缘关系,为金线莲良种培育以及野生金线莲资源保护等方面提供了帮助。此外物种的遗传特性容易受到生态环境、繁殖方式以及各种人为活动的影响,野生金线莲经过长期的自然选择,其遗传背景较为复杂;人工栽培种种源多来自于野生金线莲,品种混杂。同时金线莲在野外萌发所需的自然条件苛刻,加之生境的易碎性对其生存产生很大压力^[24],因此金线莲的遗传多样性受到生态环境极大的影响,所以有必要保护当地的生态环境以维护金线莲物种多样性。

4 参考文献

- [1] 张锦雀,吴晓珊,朱善岚,等.金线莲多糖苯酚-硫酸法测定条件的优化[J].中国医院药学杂志,2010,30(2):113-116.
ZHANG Jinque, WU Xiaoshan, ZHU Shanlan, et al. Optimization of phenol-sulfuric acid determination conditions of polysaccharide in *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl by orthogonal test [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2010, 30(2): 113-116.
- [2] 洪琳,邵清松,周爱存,等.金线莲产业现状及可持续发展对策[J].中国中药杂志,2016,41(3):553-558.
HONG Lin, SHAO Qingsong, ZHOU Aicun, et al. Current status and sustainable development countermeasures of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(3): 553-558.
- [3] LI Qingyuan, SU Xiaojun, MA Huanhuan, et al. Development of genic SSR marker resources from RNA-seq data in *Camellia japonica* and their application in the genus *Camellia* [J/OL]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 9919 [2022-04-02]. doi: 10.1038/s41598-021-89350-w.
- [4] 王洁,朱锡彭,王腾斐,等.利用 ISSR 和 SRAP 标记分析白及种质资源遗传多样性[J/OL].浙江农林大学学报,2022 [2022-04-02]. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20210690.
WANG Jie, ZHU Xipeng, WANG Tengfei, et al. Analysis of genetic diversity of *Bletilla striata* germplasm by ISSR and SRAP markers [J/OL]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022 [2022-04-02]. doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20210690.
- [5] 秦朋.金线莲遗传多样性和有效成分分析[D].福州:福建农林大学,2013.
QIN Peng. *The Analysis of the Genetic Diversity and Effective Components of Anoectochilus* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [6] 叶伟,江金兰,李永清,等.金线兰及近缘种植物遗传多样性 ISSR 分子标记分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(5):1045-1054.
YE Wei, JIANG Jinlan, LI Yongqing, et al. Analysis of genetic diversity in *Anoectochilus roxburghii* and its relative species using ISSR molecular markers [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(5): 1045-1054.
- [7] 赵会贤,黄宛祯,黄丽英.不同产地和不同环境生长的金线莲的 ISSR 遗传特性分析[J].福建医科大学学报,2018,52(5):281-286.
ZHAO Huixian, HUANG Wanzhen, HUANG Liying. ISSR analysis on genetic characteristics of *Anoectochilus roxburghii* from different habitats and growth patterns [J]. *Journal of Fujian Medical University*, 2018, 52(5): 281-286.
- [8] 黄颖桢,陈菁瑛,赵云青,等.金线莲遗传多样性的 ISSR 分析[J].中草药,2014,45(15):2230-2234.
HUANG Yingzhen, CHEN Jingying, ZHAO Yunqing, et al. ISSR analysis on genetic diversity of *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(15): 2230-2234.
- [9] 吴佳溶.不同地理种源金线莲有效成分含量测定及 SRAP 标记[D].福州:福建农林大学,2012.
WU Jiarong. *Determination of Effective Components and SRAP Analysis of Anoectochilus roxburghii in Different Geographical Provenances* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [10] 王剑锴,李明杰,王建明,等.金线莲 RAPD-SCAR 标记的开发和种质遗传多样性评价[J].中草药,2016,47(1):122-129.
WANG Jiankai, LI Mingjie, WANG Jianming, et al. Development of RAPD-SCAR marker for *Anoectochilus roxburghii* and their utilization to assess genetic diversity of germplasm [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(1): 122-129.
- [11] 王海阁,许文,张勋,等.福建野生金线莲种质资源的遗传多样性分析[J].时珍国医国药,2021,32(2):343-348.
WANG Haige, XU Wen, ZHANG Xun, et al. Genetic diversity analysis of germplasm resources of *Anoectochilus herba* in Fujian [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2021, 32(2): 343-348.
- [12] 王少铭,侯颖辉,罗莉斯,等.基于 SRAP 和 ISSR 标记的薄荷种质资源遗传多样性及亲缘关系分析[J].南方农业学报,

- 2018, **49**(11): 2148 – 2154.
- WANG Shaoming, HOU Yinghui, LUO Lisi, *et al.* Genetic diversity and genetic relationship of *Mentha* L. germplasm resources based on SRAP and ISSR markers [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, **49**(11): 2148 – 2154.
- [13] 李小侠, 陶正明, 吴志刚, 等. 采用 ISSR 和 SRAP 技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性[J]. 中草药, 2012, **43**(10): 2030 – 2035.
- LI Xiaoxia, TAO Zhengming, WU Zhigang, *et al.* Evaluation on genetic diversity among species of *Lonicera* L. in southern Zhejiang Province by ISSR and SRAP [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, **43**(10): 2030 – 2035.
- [14] 高傲, 刘宇, 宋庆港, 等. 基于 ISSR 和 SRAP 分子标记的 22 株鸡腿菇遗传多样性和亲缘关系分析[J]. 中国食用菌, 2021, **40**(4): 92 – 98.
- GAO Ao, LIU Yu, SONG Qinggang, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationship analysis of 22 *Coprinus comatus* strains based on ISSR and SRAP molecular markers [J]. *Edible Fungi of China*, 2021, **40**(4): 92 – 98.
- [15] 王艳, 万鲁长, 黄春燕, 等. 采用 ISSR 和 SRAP 综合分析灰树花的遗传多样性[J]. 食用菌学报, 2019, **26**(3): 26 – 36.
- WANG Yan, WAN Luchang, HUANG Chunyan, *et al.* Genetic diversity of *Grifola frondosa* based on integrated ISSR and SRAP analysis [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2019, **26**(3): 26 – 36.
- [16] 祁建民, 梁景霞, 陈美霞, 等. 应用 ISSR 与 SRAP 分析烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 作物学报, 2012, **38**(8): 1425 – 1434.
- QI Jianmin, LIANG Jingxia, CHEN Meixia, *et al.* Genetic diversity and evolutionary analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm resources based on ISSR and SRAP markers [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, **38**(8): 1425 – 1434.
- [17] 马红勃, 祁建民, 李延坤, 等. 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗传连锁图谱构建[J]. 作物学报, 2008, **34**(11): 1958 – 1963.
- MA Hongbo, QI Jianmin, LI Yankun, *et al.* Construction of a molecular genetic linkage map of tobacco based on SRAP and ISSR markers [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, **34**(11): 1958 – 1963.
- [18] 孙楠, 王宇欣, 王平智, 等. SRAP 和 ISSR 分子标记技术在久星系列韭菜遗传多样性的应用[J/OL]. 分子植物育种, 2022[2022-08-19]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220222.1952.019.html>.
- SUN Nan, WANG Yuxin, WANG Pingzhi, *et al.* Application of SRAP and ISSR molecular markers in genetic diversity of Jiaying leek series[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022[2022-08-19]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220222.1952.019.html>.
- [19] 姜武, 吴志刚, 陶正明, 等. 基于 ISSR 和 SRAP 标记的梔子种质遗传多样性研究[J]. 中草药, 2019, **50**(2): 510 – 516.
- JIANG Wu, WU Zhigang, TAO Zhengming, *et al.* Genetic diversity analysis of *Gardenia jasminoides* based on ISSR and SRAP molecular markers [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, **50**(2): 510 – 516.
- [20] FERRIOL M, PICÓ B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, **107**(2): 271 – 282.
- [21] 胡晓东, 林少俊, 邵玲, 等. 广东肇庆地区药材金线莲种质资源调查与生态生物学特性研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, **24**(4): 381 – 388.
- HU Xiaodong, LIN Shaojun, SHAO Ling, *et al.* Germplasm investigation and ecological biology characteristics of medicinal herb *Anoectochilus roxburghii* in Zhaoqing, Guangdong Province, China [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2016, **24**(4): 381 – 388.
- [22] 甘金佳, 蒋水元, 李虹, 等. 广西金线莲野生资源现状及保护策略[J]. 北方园艺, 2016(9): 160 – 164.
- GAN Jinjia, JIANG Shuiyuan, LI Hong, *et al.* Current situation of wild resources and protection strategy of *Anoectochilus roxburghii* in Guangxi [J]. *Northern Horticulture*, 2016(9): 160 – 164.
- [23] 沈程文, 黄建安, 赵世浩, 等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析广东茶树种质资源的遗传多样性[J]. 核农学报, 2010, **24**(5): 948 – 955.
- SHEN Chengwen, HUANG Jian'an, ZHAO Shihao, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Camellia sinensis* germplasm in Guangdong Province by SRAP and ISSR markers [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, **24**(5): 948 – 955.
- [24] 吴梅, 孔向军, 凌丹燕, 等. 浙江地区金线莲种质资源调查与产业保护现状[J]. 浙江农业科学, 2020, **61**(3): 520 – 523, 527.
- WU Mei, KONG Xiangjun, LING Danyan, *et al.* Germplasm resources survey and status of industrial protection for *Anoectochilus roxburghii* in Zhejiang Province [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2020, **61**(3): 520 – 523, 527.