

## 白及种质资源遗传多样性分析

王洁<sup>1</sup>, 朱锡彭<sup>1</sup>, 王腾斐<sup>1</sup>, 朱建军<sup>2</sup>, 李文俊<sup>3</sup>, 邢丙聪<sup>1</sup>, 郑颖<sup>1</sup>

(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. 成都市农林科学院, 四川 成都 611130)

**摘要:** 【目的】采用简单重复序列间扩增 (ISSR) 和相关序列扩增多态性 (SRAP) 等 2 种标记技术分析不同种源白及 *Bletilla striata* 样本的遗传多样性水平和遗传关系, 为白及种质的鉴定、分类、保护和开发提供理论依据。【方法】从 100 个 ISSR 引物和 238 对 SRAP 引物组合中筛选出多态性高、扩增条带清晰、重复性好的引物进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 用 Popgene 32.0 计算来自浙江、云南、贵州和四川等省 32 个不同种源白及的遗传多样性参数和遗传距离, 用 NTSYS-pc 2.10e 进行聚类分析。【结果】从 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个多态性较好的引物, 共扩增出 188 个条带, 平均每个引物扩增出 17.09 个条带, 其中多态性位点 174 个, 占总扩增片段的 92.20%; 从 238 对 SRAP 引物组合中筛选出 11 对多态性较好的引物组合, 共扩增出 216 个条带, 平均每个引物扩增出 19.64 个条带, 其中多态性位点 202 个, 占总扩增片段的 93.52%。综合 ISSR 和 SRAP 的标记结果发现: 四川白及种源的遗传多样性水平最高, 贵州最低; 非加权组平均法 (UPGMA 聚类) 和主坐标分析 (PCoA 分析) 结果显示: 聚为一类的白及种源大多来自同一省份, 云南省与四川省白及种源的遗传距离较近, 浙江省和贵州省白及种源的遗传距离较近, 说明遗传距离与地理距离存在一定的重合, 但并不呈正相关。【结论】本研究所选白及种源间具有较高的遗传多样性, ISSR 和 SRAP 标记技术均可有效揭示白及的遗传多样性和亲缘关系。图 4 表 4 参 25

**关键词:** 白及; 遗传多样性; 简单重复序列间扩增 (ISSR) 标记; 相关序列扩增多态性 (SRAP) 标记

**中图分类号:** S722      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2023)02-0321-09

## Genetic diversity analysis of *Bletilla striata* germplasm by ISSR and SRAP markers

WANG Jie<sup>1</sup>, ZHU Xipeng<sup>1</sup>, WANG Tengfei<sup>1</sup>, ZHU Jianjun<sup>2</sup>, LI Wenjun<sup>3</sup>, XING Bingcong<sup>1</sup>, ZHENG Ying<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Key Laboratory of Conservation and Innovative Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, 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. Chengdu Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Chengdu 611130, Sichuan, China)

**Abstract:** [Objective] The objective is to analyze the genetic diversity and genetic relationship of 32 *Bletilla striata* samples from different provenances by ISSR and SRAP markers, so as to provide theoretical basis for identification, classification, conservation and development of *B. striata* germplasm. [Method] Primers with high polymorphism, clear amplification bands and good repeatability were selected from 100 ISSR primers and 238 pairs of SRAP primers for polymerase chain reaction (PCR) amplification. Genetic diversity parameters and genetic distance of *B. striata* from 32 different provenances in Zhejiang, Yunnan, Guizhou and Sichuan were

收稿日期: 2021-10-09; 修回日期: 2022-03-31

基金项目: “十四五”浙江省农业(中药材)新品种选育重大科技专项(2021C02074); 浙江省特色中药资源保护与创新利用重点实验室资助项目(2021E10013); 温州市园艺植物育种重点实验室开放项目(ZD202003)

作者简介: 王洁 (ORCID: 0000-0001-6442-3334), 从事中药资源学研究。E-mail: 1360527207@qq.com。通信作者: 郑颖 (ORCID: 0000-0002-8080-2251), 副教授, 博士, 从事中药植物资源保护与利用研究。E-mail: zhengying@zafu.edu.cn

calculated by Popgene 32.0, and cluster analysis was performed by NTSYS-PC 2.10e. [Result] 11 highly polymorphic primers were screened from 100 ISSR primers, and a total of 188 bands were amplified, with an average of 17.09 bands per primer, among which 174 were polymorphic loci, accounting for 92.20% of the total amplified fragments. 11 pairs of highly polymorphic primer pairs were screened from 238 pairs of SRAP primer pairs, and a total of 216 bands were amplified, with an average of 19.64 bands per primer, including 202 polymorphic loci, accounting for 93.52% of the total amplified fragments. Based on ISSR and SRAP markers, the genetic diversity level of *B. striata* population in Sichuan Province was the highest, while that in Guizhou Province was the lowest. UPGMA and PCoA analysis showed that the clustered *B. striata* samples were mostly from the same province. The genetic distance of *B. striata* population between Yunnan Province and Sichuan Province was relatively close, and that between Zhejiang Province and Guizhou Province was relatively close, indicating that there was a certain overlap between genetic distance and geographical distance, but there was no positive correlation. [Conclusion] *B. striata* provenances selected in this study have high genetic diversity. Both ISSR and SRAP markers can effectively reveal the genetic diversity and genetic relationship of *B. striata*. [Ch, 4 fig. 4 tab. 25 ref.]

**Key words:** *Bletilla striata*; genetic diversity; ISSR marker; SRAP marker

白及 *Bletilla striata* 为兰科 Orchidaceae 白及属 *Bletilla* 多年生草本植物, 以其干燥块茎入药, 具有止血<sup>[1]</sup>、促进伤口愈合<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等药理作用。此外, 白及块茎含较多的胶质多糖, 具有抗衰老、美白和抗氧化<sup>[2]</sup>等功能, 因此也被广泛应用于化妆品行业。白及的花色鲜艳美丽, 具有较高的观赏价值<sup>[6]</sup>。由于白及种子无胚乳, 自然萌发率低, 白及的需求量与野生资源的缺乏产生了巨大的冲突<sup>[7]</sup>, 因此开展白及资源的保护及种质资源的研究工作刻不容缓。随着生物技术的发展, 除了形态标记<sup>[8]</sup>、细胞标记<sup>[9]</sup>、生理生化标记<sup>[10]</sup>等传统的标记技术外, 遗传多样性研究出现了新的基于基因组 DNA 水平的标记技术——分子标记。分子标记是在群体中易于跟踪和量化的基因位点, 并且可能与特定基因或性状相关<sup>[11]</sup>。与其他标记相比, 分子标记具有多态性好、数量多以及高共显性、简单稳定、易于追溯等优点<sup>[12]</sup>。简单重复序列间扩增 (ISSR) 和相关序列扩增多态性 (SRAP) 分子标记是针对非特异性序列进行扩增的, 因此对于白及这类基因组序列信息较为匮乏的物种而言是一种快速鉴定的方法<sup>[13]</sup>。邢佳鑫等<sup>[14]</sup>应用简单重复序列 (SSR) 和 ISSR 标记对外观较相似的白及样本进行遗传多样性分析, 探索了快速鉴定白及组培苗真伪的新方法; 洪建聪等<sup>[15]</sup>利用筛选出的 15 对 SRAP 引物组合将 50 份白及样本分成 6 个大类; 陈锦等<sup>[16]</sup>利用 ISSR 和随机扩增多态性 (RAPD) 标记研究白及种质资源的遗传多样性, 结果显示: 白及种源间的遗传差异与地理距离相关, 还发现 ISSR 不受时间和地点的限制, 比 RAPD 有更高的多态性比率, 结果相对更稳定可靠; 孙宇龙等<sup>[17]</sup>通过 SRAP 标记将 12 个白及野生种源聚类成 3 支系, 并发现遗传距离和地理距离间有显著正相关性, 为白及野生资源的就地保护和迁地保护提供了理论依据; WANG 等<sup>[18]</sup>使用 ISSR 标记分析了白及再生植株的克隆保真度, 结果发现: 再生植株与母株的相似度接近 100.0%, 表明通过愈伤组织和原球茎培养的再生植株在遗传上是稳定的。

目前, 同时应用 2 种分子标记技术在分子水平上对白及种质资源进行的相关研究较少。本研究采用 ISSR 和 SRAP 分子标记技术, 对从浙江省、云南省、贵州省和四川省搜集的 32 个白及种源进行亲缘关系及遗传多样性的初步分析, 揭示白及个体间与种源间的遗传分化, 为白及资源的保护和利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2020 年 6—7 月在浙江、云南、贵州、四川等 22 个地区采集 32 个白及种源, 并将采集到的白及叶片洗净擦干, 经液氮速冻后放置 -80 ℃ 超低温冰箱备用。种源基本信息见表 1。

表 1 白及种源信息

Table 1 Source information of *B. striata* samples

编号	种源地	编号	种源地	编号	种源地	编号	种源地
1	浙江温州泰顺	9	云南丽江永胜	17	四川乐山沐川(2)	25	四川汶川水磨(2)
2	浙江台州天台	10	云南普洱思茅	18	四川雅安石棉	26	四川汶川水磨(3)
3	浙江衢州江山	11	云南曲靖会泽	19	四川内江东兴(1)	27	四川都江堰虹口(1)
4	浙江金华磐安	12	贵州遵义正安	20	四川内江东兴(2)	28	四川都江堰虹口(2)
5	浙江宁波象山	13	贵州黔东南安龙	21	四川内江东兴(3)	29	四川成都大邑
6	浙江杭州临安	14	贵州遵义赤水	22	四川内江东兴(4)	30	四川成都彭州(1)
7	云南红河蒙自(1)	15	贵州毕节大方	23	四川内江东兴(5)	31	四川成都彭州(2)
8	云南红河蒙自(2)	16	四川乐山沐川(1)	24	四川汶川水磨(1)	32	四川甘孜康定

## 1.2 仪器与试剂

主要仪器：JXFSTPRP-24L 组织快速研磨仪(中国上海净信实业发展有限公司)、TU-100 恒温金属浴(中国上海一恒科技有限公司)、Colibri 超微量分光光度计(德国 Titertek Berthold 公司)、Centrifuge 5415 R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、Mini-P25 微孔板离心机(中国杭州奥盛仪器有限公司)、T100 Thermal Cycler PCR 仪、PowerPac HC 高电流电泳仪[伯乐生命医学产品(中国上海)有限公司]、JY04S-3C 凝胶成像系统(中国北京君意东方电泳设备有限公司)、B2042BluEye TM 蓝光切胶仪(中国苏州宇恒生物科技有限公司)。

主要试剂：植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(中国上海生工生物股份有限公司)、2×Flash PCR MasterMix(中国北京康为世纪生物科技有限公司)、10×loading buffer、DL 15 000 DNA Marker、DL 2000 DNA Marker(日本 TAKARA 公司)、β-巯基乙醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、乙醇、氯仿、异戊醇等均为中国上海国药集团化学试剂有限公司生产；ISSR 引物和 SRAP 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

## 1.3 方法

1.3.1 白及基因组 DNA 的提取与检测 取洁净干燥的白及嫩叶，采用植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取样本 DNA，并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳法检测完整性，选择条带清晰明亮且无拖尾与杂带的 DNA，用超微量分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度，结合 DNA 浓度及电泳的结果，将较优的 DNA 样品液用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)稀释至 20 mg·L<sup>-1</sup>，放置冰箱-20℃保存备用。

1.3.2 引物的筛选 本研究采用的 ISSR 引物为哥伦比亚大学公布的第 9 套 100 个 ISSR 通用引物序列；SRAP 引物为参考前人<sup>[19-20]</sup>设计的 238 对 SRAP 引物组合，共包含 14 条上游引物(Me1~Me14)和 17 条下游引物(Em1~Em17)。引物的筛选经过初筛和复筛 2 个步骤：从 32 个供试材料中选取 4 个表型性状差异较明显的材料作为样本 DNA，对引物进行初筛，选出扩增产物主带明显、条带清晰的引物。经过引物的初筛后，选择所有样本 DNA 作为模板，针对初筛后的引物进行复筛，选择多态性高、扩增条带清晰、重复性好的引物作为本研究的引物。根据每条引物的退火温度( $T_m$ )±5℃的范围，设置 8 个温度梯度进行聚合酶链式反应(PCR)；根据条带得出每个引物的最适退火温度。

1.3.3 PCR 扩增 ISSR-PCR 扩增体系(20 μL)：1 μL DNA 模板、1 μL 引物(20 mg·L<sup>-1</sup>)、10 μL 2×Flash PCR MasterMix、8 μL ddH<sub>2</sub>O；ISSR-PCR 扩增程序：98℃预变性 30 s；94℃变性 10 s；退火(每个引物的退火温度不同)15 s，72℃延伸 15 s；共 35 个循环，72℃延伸 1 min，4℃保存。

SRAP-PCR 扩增体系(20 μL)：1 μL DNA 模板、1 μL 引物(20 mg·L<sup>-1</sup>)、10 μL 2×Flash PCR MasterMix、7 μL ddH<sub>2</sub>O；SRAP-PCR 扩增程序：98℃预变性 30 s；94℃变性 10 s；退火(每个引物的退火温度不同)15 s，72℃延伸 15 s；共 38 个循环，72℃延伸 1 min，4℃保存。

PCR 扩增产物在含有 Gelred 核酸染料的质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶 1×TAE 缓冲液中，130 V，电泳 50 min 后，经凝胶成像系统(JY04S-3C)拍照保存。

1.3.4 数据统计及分析 人工读取电泳结果数据，并进行统计处理。将条带中清晰可见以及可重复的标记为“1”，同一位置上条带缺失或者弱带标记为“0”，形成“0、1”数据矩阵，分别得到 ISSR、SRAP 及综合两者(SSR+SRAP)的数据。通过 Excel 表格，统计每个引物或每对引物组合扩增的条带以

及多态性条带数, 计算多态位点百分率 ( $P_{PB}$ ), 利用 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 ( $I$ )、种源总基因多样性 ( $H_t$ )、种源内基因多样性 ( $H_s$ )、基因分化系数 ( $G_{st} = 1 - H_s/H_t$ ) 和基因流 ( $N_m$ ) 等遗传多样性参数, 并计算种源间的遗传距离和遗传一致性, 使用 OmicStudio 工具 (<https://www.omicstudio.cn/tool>) 对遗传距离进行主坐标 (PCoA) 分析, 利用 NTSYS-pc 2.10e 软件对种源进行聚类分析, 并绘制非加权组平均法 (UPGMA) 树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 白及基因组 DNA 质量

提取白及基因组 DNA 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并通过超微量分光光度计检测其浓度、纯度, 均符合要求, 可进行下一步试验。

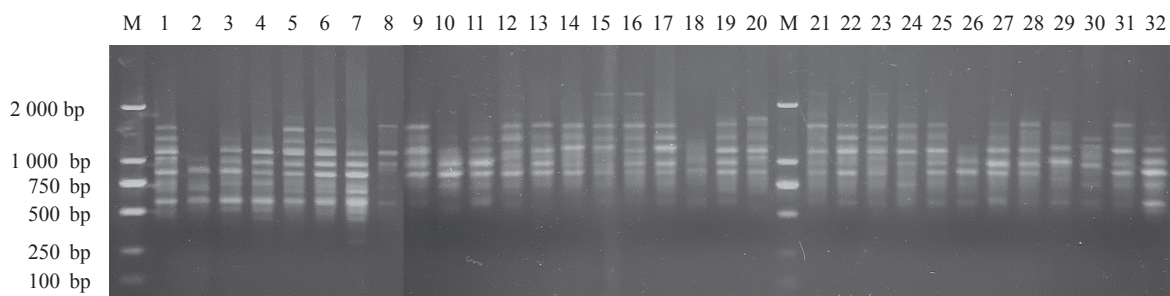
### 2.2 引物的筛选及扩增多态性

2.2.1 ISSR 引物的筛选及扩增多态性 经过 2 次筛选, 共获得 11 条条带清晰、多态性高且重复性好的引物 (表 2)。11 条引物共扩增出 188 条条带, 多态性条带有 174 条,  $P_{PB}$  为 92.20%。11 条引物平均扩增条带数为 17.09 条, 平均多态性条带数为 15.82 条。扩增位点数最多的引物是 UBC876, 扩出了 25 条条带; 其次是引物 UBC868 和 UBC881, 均扩增出 20 条条带; 扩增条带最少的引物是 UBC855, 只扩增出 9 条条带,  $P_{PB}$  为 64.71%~100.00%, 其中, 引物 UBC827、UBC842、UBC855、UBC876、UBC879 和 UBC881 的  $P_{PB}$  为 100%, 均表现出极高的多态性, 占总引物的 54.55%; UBC880 的  $P_{PB}$  最低, 为 64.71%。以引物 UBC876 为例, 它对所采集白及样本的 ISSR-PCR 的扩增结果见图 1。

表 2 ISSR 引物信息及扩增结果

Table 2 ISSR primer information and amplification results

引物编号	ISSR引物	序列 (5'→3')	扩增条 带数/条	多态性条 带数/条	$P_{PB}/\%$	引物编号	ISSR引物	序列 (5'→3')	扩增条 带数/条	多态性条 带数/条	$P_{PB}/\%$
1	UBC823	(TC) <sub>8</sub> C	15	12	80.00	8	UBC876	(GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>	25	25	100.00
2	UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	18	17	94.44	9	UBC879	C(TTCAC) <sub>3</sub>	15	15	100.00
3	UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	16	16	100.00	10	UBC880	(GGAGA) <sub>3</sub>	17	11	64.71
4	UBC842	(GA) <sub>8</sub> (C/T)G	18	18	100.00	11	UBC881	(GGGTG) <sub>3</sub>	20	20	100.00
5	UBC855	(AC) <sub>8</sub> (C/T)T	9	9	100.00		合计		188	174	
6	UBC866	(CTC) <sub>6</sub>	15	12	80.00		平均		17.09	15.82	92.20
7	UBC868	(GAA) <sub>6</sub>	20	19	95.00						



M 为 Marker; 1~32 所代表的种源地见表 1

图 1 引物 UBC876 对所采集白及样本的 ISSR-PCR 扩增结果

Figure 1 Amplification results of *B. striata* with primer UBC876 of ISSR

2.2.2 SRAP 引物的筛选及扩增多态性 经过 2 次筛选, 共获得 11 对条带清晰、多态性高且重复性好的引物组合 (表 3)。11 对引物组合共扩增出 216 条条带, 多态性条带有 202 条, 多态性比率占 93.52%, 11 对引物平均扩增条带数为 19.64 条, 平均多态性条带数为 18.36 条。引物组合 Me13-Em9 扩增位点数最多, 扩出 28 条条带; 其次为引物组合 Me3-Em2 和 Me11-Em10, 均扩增出 22 条条带; 扩增条带最少的引物组合为 Me12-Em6, 仅扩增出 16 条条带。引物的  $P_{PB}$  为 83.33%~100.00%, 其中, 引物组合 Me9-Em13、Me11-Em10 和 Me12-Em6 的  $P_{PB}$  最高, 均为 100.00%, 占总引物的 25.93%; 引物组合 Me11-

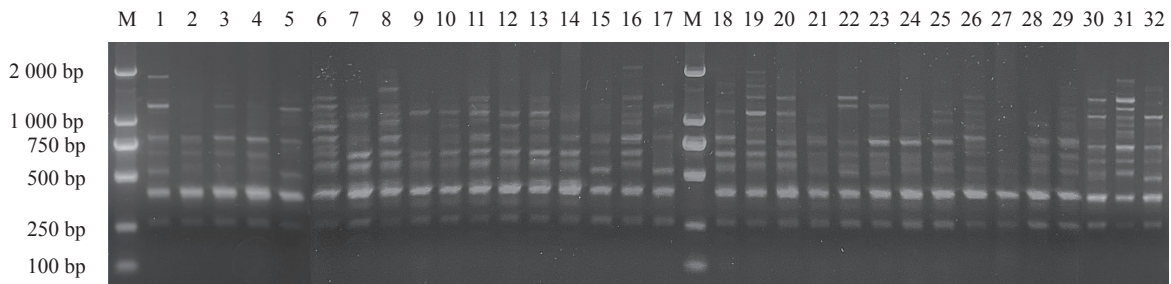
Em12 的  $P_{PB}$  最低，为 83.33%。以引物组合 Me9-Em13 为例，它对部分白及基因组 DNA 的 ISSR-PCR 的扩增结果见图 2。

表 3 SRAP 引物信息及扩增结果

Table 3 SRAP primer information and amplification results

引物编号	SRAP引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增条带数/条	多态性条带数/条	$P_{PB}/\%$	引物编号	SRAP引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增条带数/条	多态性条带数/条	$P_{PB}/\%$
1	Me1-Em12	BATA	DCAT	19	17	89.47	8	Me11-Em12	BACG	DCAT	18	15	83.33
2	Me3-Em2	BAAT	DTGC	22	20	90.91	9	Me12-Em6	BAAA	DGCA	16	16	100.00
3	Me5-Em5	BAAG	DAAC	18	17	94.44	10	Me12-Em7	BAAA	DCAA	17	16	94.12
4	Me6-Em2	BACT	DTGC	19	16	84.21	11	Me13-Em9	BAAC	DCGA	28	27	96.43
5	Me9-Em13	BACA	DCTA	18	18	100.00	合计				216	202	
6	Me9-Em14	BACA	DCTC	19	18	94.74	平均				19.64	18.36	93.52
7	Me11-Em10	BACG	DCAG	22	22	100.00							

说明：B表示TGAGTCCAAACCGG；D表示GACTGCGTACGAATT



M 为 Marker；1~32 所代表的种源地见表 1

图 2 引物组合 Me9-Em13 对所采集白及样本的 SRAP-PCR 扩增结果

Figure 2 Amplification results of *B. striata* with primer combination Me9-Em13 of SRAP

### 2.3 白及遗传距离分析

利用 Popgene 32.0 软件对 32 个白及种源的遗传距离和遗传一致度进行计算，表明在 ISSR 研究中，遗传一致度为 0.5745~0.8989，遗传距离为 0.1065~0.5543。遗传一致度最高的是 21 号四川内江东兴 (3) 和 22 号四川内江东兴 (4) 种源，为 0.8989；它们的遗传距离最小，为 0.1065，说明其亲缘关系较近。遗传一致度最低的是 13 号贵州黔西南安龙和 25 号四川汶川水磨 (2) 种源，它们的遗传一致度均为 0.5745；它们的遗传距离最大，为 0.5543，说明其亲缘关系较远。在 SRAP 研究中，遗传一致度为 0.5231~0.8102，遗传距离为 0.2105~0.5231。遗传距离最小的是 2 号浙江台州天台和 3 号浙江衢州江山种源；遗传距离最大的是 4 号浙江金华磐安和 30 号四川成都彭州 (1) 种源。综合 ISSR 和 SRAP 数据，遗传一致度为 0.5668~0.8119，遗传距离为 0.2084~0.5677；遗传距离最小的是 25 号四川汶川水磨 (2) 和 32 号四川甘孜康定种源，遗传距离最大的是 4 号浙江金华磐安和 11 号云南曲靖会泽种源。

### 2.4 白及遗传多样性分析

将 32 个种源按地区划分为 4 个群体 (浙江、云南、贵州和四川)，使用 Popgene 32.0 软件分析种源的遗传多样性指数 (表 4)。在 ISSR 研究中，32 个种源在物种水平上， $N_a$  为 1.9255， $N_e$  为 1.4619， $H$  为 0.2819， $I$  为 0.4327， $P_{PB}$  为 92.55%。在群体水平上， $N_a$  为 1.5000~1.7926； $N_e$  为 1.3176~1.4393； $H$  为 0.1824~0.2607； $I$  为 0.2717~0.3940； $P_{PB}$  为 50.00%~79.26%。可见，相对于物种水平而言，群体间的遗传多样性水平较低。在 SRAP 研究中，变异水平也是物种大于群体，与 ISSR 研究结果相似。综合 ISSR 和 SRAP 数据，32 个种源在物种水平上， $N_a$  为 1.9307， $N_e$  为 1.4988， $H$  为 0.2971， $I$  为 0.4509， $P_{PB}$  为 93.07%。在群体水平上， $N_a$  为 1.5000~1.8342，平均为 1.6349； $N_e$  为 1.3281~1.4660，平均为 1.3888； $H$  为 0.1877~0.2756，平均为 0.2256； $I$  为 0.2780~0.4163，平均为 0.3369； $P_{PB}$  为 50.00%~83.42%，平均为 63.49%，也是群体间的遗传多样性水平更低。其中，从 ISSR、SRAP 及综合 ISSR 和

SRAP 的研究结果来看,  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$  及  $P_{PB}$  数值最小的均是贵州省种源, 浙江省种源次之, 各数值最大的均是四川种源, 说明四川白及种源具有较高的遗传多样性, 贵州白及种源遗传多样性较低。

## 2.5 非加权组平均法 (UPGMA) 聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 软件将 32 个种源的标记结果进行聚类分析, 得到相应的 UPGMA 树状图 (图 3)。ISSR 的 UPGMA 树状图显示: 32 个种源的种质资源遗传相似系数为 0.650~0.900, 变幅为 0.250。其中, 在遗传相似系数为 0.680 时, 可将 32 个白及种源分为 4 个类群: I 类群包括 26 个种源, 其中浙江种源 6 个, 云南种源 2 个、贵州种源 3 个, 四川种源 15 个; II 类群包括 2 个云南红河蒙自种源; III 类群仅包括 13 号贵州黔西南安龙种源, IV 类群包括 11 号云南曲靖会泽种源、17 号四川乐山沐川 (2) 种源和 24 号四川汶川水磨 (1) 种源共 3 个。在遗传相似系数为 0.738 时, I 类群又可分为 4 个类群 (i、ii、iii、iv 类群) (图 3A)。SRAP 的 UPGMA 树状图显示: 遗传相似系数为 0.630~0.810, 变幅为 0.180。其中, 在遗传相似系数为 0.658 时, 可将样本分为 3 个类群: I 类群包括浙江种源 6 个和贵州种源 4 个; II 类群包括云南种源 4 个和四川种源 10 个; III 类群包括云南曲靖会泽种源和四川种源 7 个 (图 3B)。ISSR+SRAP 的 UPGMA 树状图显示: 遗传相似系数为 0.660~0.810, 变幅为 0.150。其中, 在遗传相似系数为 0.688 时, 可将样本分为 5 个类群: I 类群包括浙江种源 6 个和贵州种源 4 个; II 类群包括云南种源 2 个和四川种源 7 个; III 类群包括 2 个云南红河蒙自种源; IV 类群包括云南曲靖会泽种源和四川种源 7 个; V 类群包括四川种源 3 个 (图 3C)。使用 OmicStudio 工具将 ISSR+SRAP 的标记结果进行 PCoA 分析 (图 4), 结果与 UPGMA 聚类结果基本一致。

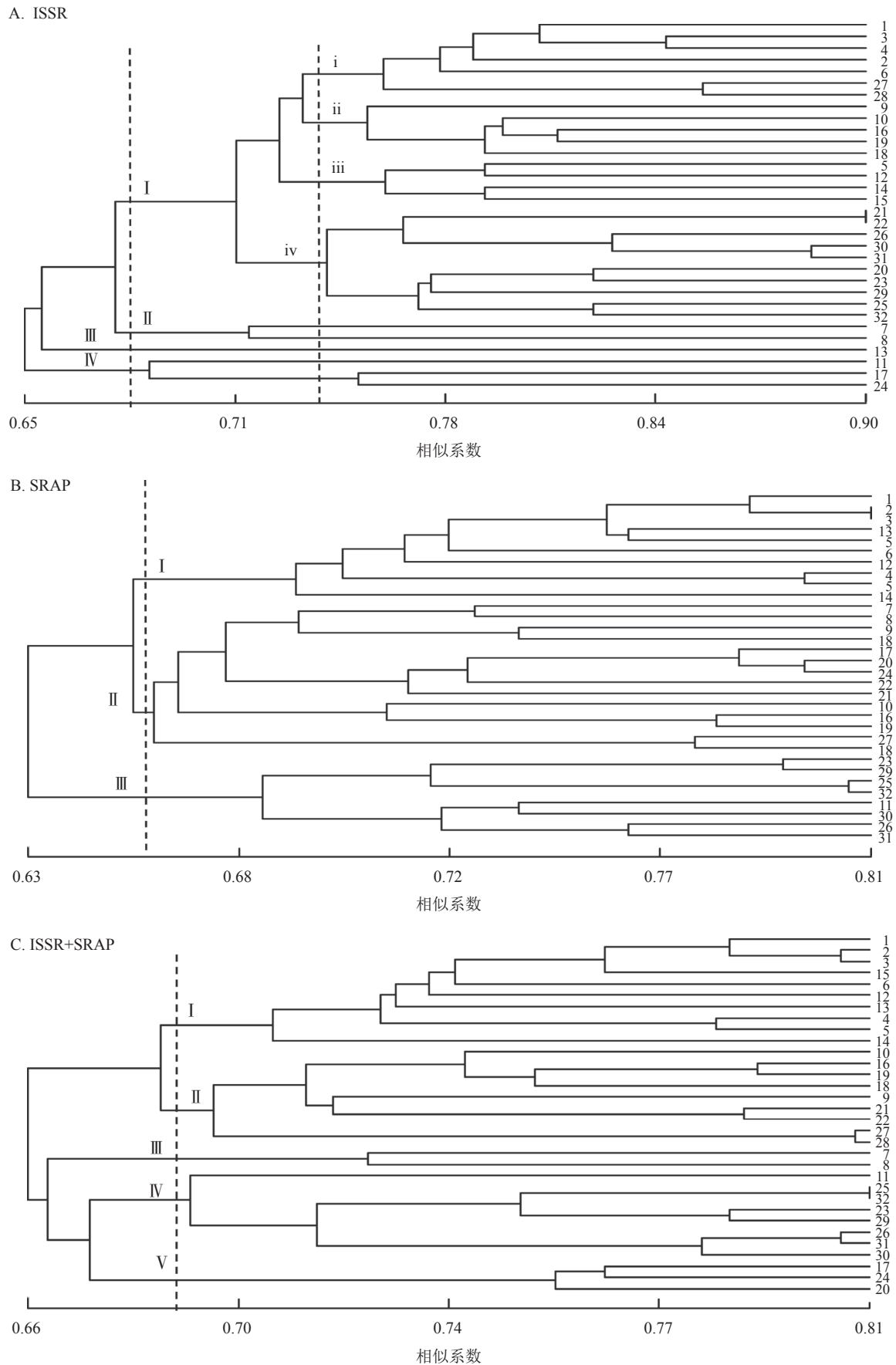
## 3 讨论

陈锦等<sup>[16]</sup>、周天华等<sup>[21]</sup>、和志娇等<sup>[22]</sup>、吴劲松<sup>[23]</sup>、孙宇龙等<sup>[17]</sup> 分别应用 RAPD、SSR、ISSR、扩增片段长度多态性 (AFLP) 和 SRAP 等单一分子标记技术研究了白及种质资源的遗传多样性, 其中每个引物最少扩增得到 1 条多态性条带, 最多的有 19 条,  $P_{PB}$  最低为 46.10%, 最高则达 90.48%。本研究综合了 ISSR 和 SRAP 等 2 种标记方法对 32 个白及种源进行了分析, 筛选出的 11 条 ISSR 引物, 共扩增出 188 条条带, 多态性条带 174 条, 平均每条引物 15.82 条, 最多的达 25 条 (UBC876),  $P_{PB}$  为 92.20%; 筛选出的 11 对 SRAP 引物组合, 共扩增出 216 条条带, 多态性条带有 202 条, 平均每对引物 19.64 条, 最多达 27 条 (Me13-Em9),  $P_{PB}$  为 93.52%。结果充分体现了供试白及种源在分子水平上具有丰富的遗传多样性, 同时也验证了 ISSR 和 SRAP 标记技术在白及种源多态性检测方面的高效率, 且 SRAP 的检测效率略高于 ISSR。综合 ISSR 和 SRAP 数据分析白及遗传多样性指数发现: 四川省白及种源的  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$  及  $P_{PB}$  最大, 云南种源次之, 贵州种源最小, 说明四川白及种源的遗传多样性水平最高, 适应环境能力较强。

和志娇等<sup>[22]</sup> 采用 ISSR 标记对不同种源的野生白及进行遗传多样性评价, 发现不同地理位置和不同海拔采集到的白及个体的遗传距离有差异; 孙宇龙等<sup>[17]</sup> 也发现: 遗传距离和地理距离间有显著正相关性; 洪建聪等<sup>[15]</sup> 和 GUO 等<sup>[24]</sup> 则发现: 白及个体的遗传距离与地理距离无直接关联。本研究综合了 ISSR 和 SRAP 标记数据发现: 21 号四川内江东兴 (3) 种源与 22 号四川内江东兴 (4) 种源、2 号浙江台州天台种源与 3 号浙江衢州江山种源、25 号四川汶川水磨 (2) 种源与 32 号四川甘孜康定种源的遗传距离

表 4 白及的遗传多样性

研究方法	种源地	$N_a$	$N_e$	$H$	$I$	$P_{PB}/\%$
ISSR	浙江	1.5000	1.3215	0.1841	0.2729	50.00
	云南	1.6489	1.4042	0.2328	0.3473	64.89
	贵州	1.5000	1.3176	0.1824	0.2717	50.00
	四川	1.7926	1.4393	0.2607	0.3940	79.26
	群体水平	1.6104	1.3707	0.2150	0.3215	61.04
	物种水平	1.9255	1.4619	0.2819	0.4327	92.55
	SRAP	浙江	1.5833	1.3753	0.2153	0.3191
云南		1.6713	1.4163	0.2432	0.3631	67.13
贵州		1.5000	1.3373	0.1923	0.2835	50.00
四川		1.8704	1.4891	0.2886	0.4357	87.04
群体水平		1.6563	1.4045	0.2349	0.3504	65.63
物种水平		1.9352	1.5309	0.3103	0.4667	93.52
ISSR+SRAP		浙江	1.5446	1.3503	0.2007	0.2976
	云南	1.6609	1.4107	0.2384	0.3558	66.09
	贵州	1.5000	1.3281	0.1877	0.2780	50.00
	四川	1.8342	1.4660	0.2756	0.4163	83.42
	群体水平	1.6349	1.3888	0.2256	0.3369	63.49
	物种水平	1.9307	1.4988	0.2971	0.4509	93.07



1~32 所代表的种源地见表 1

图 3 32 个白及种源的 UPGMA 聚类图

Figure 3 UPGMA cluster map of 32 provenance of *B. striata*

较小,亲缘关系较近;13号贵州黔西南安龙种源与25号四川汶川水磨(2)种源、4号浙江金华磐安种源与11号云南曲靖会泽种源和30号四川成都彭州(1)种源遗传距离较大,亲缘关系较远。总体上同省的样品间遗传距离相对较小,这些在UPGMA聚类图和PCoA分析图上也有比较直观的体现。UPGMA聚类显示:聚为一类的白及种源大多来自同一省份,而在PCoA分析图中,云南种源与四川种源的亲缘关系较近,浙江种源与贵州种源的亲缘关系较近。整体上各个种源间的遗传距离与地理位置呈现出一定的相关性,但又不完全按照地理位置的远近聚类,有些甚至有所交叉。

物种的遗传特性主要受到生态环境、生物学特征、繁殖方式以及各种人为活动的影响<sup>[25]</sup>,野生白及由于长期的异花授粉和自然选择,其遗传背景复杂<sup>[24]</sup>;人工栽培白及则多是从山上采挖假鳞茎进行种植,品种混杂,品质参差不齐。又由于白及对生境的依赖性较高,因此生境的破坏和片段化都会影响其遗传多样性,所以在保护物种多样性时,首先应保护生态环境。本研究的某些白及种源可能是来自不同地区的引种,在土壤、养分、温度和水分等环境条件的作用下,导致地理距离较近的种源遗传性状产生了相似的变异,从而使不同种源间的遗传距离与地理距离存在一定的重合性。总的来说,本研究32个白及种源的遗传多样性水平较高。

## 4 结论

本研究综合利用ISSR和SRAP等2种分子标记技术,对浙江、云南、贵州、四川32个白及种源进行遗传多样性分析。结果显示:种源间具有较高的遗传多样性,且ISSR和SRAP技术均可有效揭示白及的遗传多样性和亲缘关系,运用2种分子标记技术也使得研究的可信度更高。

## 5 参考文献

- [1] CHEN Zhiyan, CHENG Lizeng, HE Yichen, *et al.* Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: a review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, **120**: 2076 – 2085.
- [2] DONG Jianwei, ZHAO Lixing, CAI Le, *et al.* Antioxidant activities and phenolics of fermented *Bletilla formosana* with eight plant pathogen fungi [J]. *Journal Bioscience and Bioengineering*, 2014, **118**(4): 396 – 399.
- [3] WANG Lining, HE Yongzhi, ZHAO Qiduo, *et al.* Phenolic compounds from *Bletilla striata* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2017, **19**(10): 981 – 986.
- [4] DIAO Huajia, LI Xin, CHEN Jiangning, *et al.* *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, **105**(2): 85 – 89.
- [5] ZHANG Guangyuan, QIAO Jin, LIU Xin, *et al.* Interactions of self-assembled *Bletilla striata* polysaccharide nanoparticles with bovine serum albumin and biodistribution of its docetaxel-loaded nanoparticles[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(1): 43 [2022-09-01]. doi:10.3390/pharmaceutics11010043.
- [6] PRIDGEON A M, CRIBB P J, CHASE M W, *et al.* *Genera Orchidacearum, Volume 4, Epidendroideae (Part 1)*[M]. New York: Oxford University Press, 2005.
- [7] CHUNG M Y, CHUNG M G. Pollination biology and breeding systems in the terrestrial orchid *Bletilla striata* [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2005, **252**: 1 – 9.
- [8] JIAO Jie, JIA Xiangrong, LIU Pei, *et al.* Species identification of polygonatirrhizoma in China by both morphological and

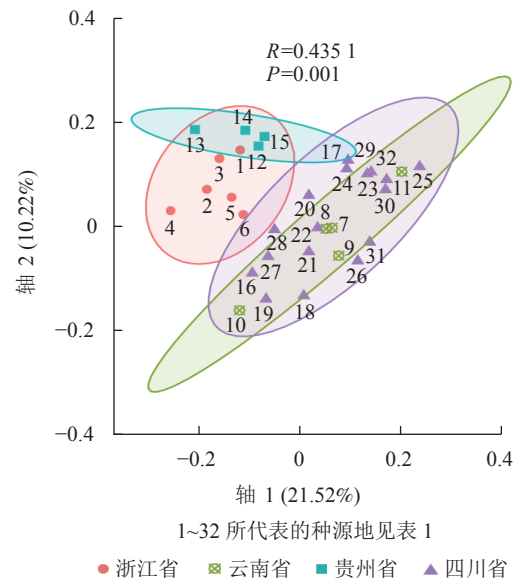


图4 综合ISSR和SRAP标记数据的PCoA分析

Figure 4 PCoA analysis of ISSR and SRAP markers data



- molecular marker methods [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2018, **341**(2): 102 – 110.
- [9] MALLARD B W, TIRALONGO J. Cancer stem cell marker glycosylation: nature, function and significance [J]. *Glycoconjugate Journal*, 2017, **34**(4): 441 – 452.
- [10] 聂新辉, 尤春源, 张大伟, 等. 棉花抗低温生理指标和分子标记鉴定体系研究[J]. *新疆农业科学*, 2013, **50**(1): 8 – 14.  
NIE Xinhui, YOU Chunyuan, ZHANG Dawei, *et al.* Study on the physiological indexes and identifiable system of molecule marker about cotton cold resistance [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2013, **50**(1): 8 – 14.
- [11] HAYWARD A C, TOLLENAERE R, DALTON-MORGAN J, *et al.* Molecular marker applications in plants [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1245**: 13 – 27.
- [12] HADIPOUR M, KAZEMITABAR S K, YAGHINI H, *et al.* Genetic diversity and species differentiation of medicinal plant persian poppy (*Papaver bracteatum* L.) using AFLP and ISSR markers[J/OL]. *Ecological Genetics and Genomics*, 2020, **16**: 100058 [2021-09-01]. doi:10.1016/j.egg.2020.100058.
- [13] 金亮, 郭方其, 付曼曼, 等. 中药材白及分子鉴定研究进展[J/OL]. *分子植物育种*, 2021-07-14 [2021-09-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210713.1319.003.html>.  
JIN Liang, GUO Fangqi, FU Manman, *et al.* Progress on molecular authentication of *Bletilla striata* [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2021-07-14 [2021-09-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210713.1319.003.html>.
- [14] 邢佳鑫, 陈玲, 张希, 等. SSR 和 ISSR 法对白芨的真伪鉴定[J]. *热带农业科学*, 2019, **39**(10): 42 – 47.  
XING Jiaxin, CHEN Ling, ZHANG Xi, *et al.* Authenticity identification of *Bletilla striata* by SSR and ISSR [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2019, **39**(10): 42 – 47.
- [15] 洪建聪, 郭艳, 翟利娜, 等. 野生白及资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. *中草药*, 2019, **50**(8): 1966 – 1971.  
HONG Jiancong, GUO Yan, ZHAI Lina, *et al.* Genetic diversity of wild *Bletilla striata* based on SRAP markers [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, **50**(8): 1966 – 1971.
- [16] 陈锦, 杨侃侃, 王志伟, 等. 利用 RAPD、ISSR 标记分析白芨种质资源遗传多样性的研究[J]. *中国农学通报*, 2017, **33**(12): 137 – 142.  
CHEN Jin, YANG Kankan, WANG Zhiwei, *et al.* Study on genetic diversity of *Bletilla striata* germplasm resources using RAPD and ISSR markers [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, **33**(12): 137 – 142.
- [17] 孙宇龙, 侯北伟, 耿丽霞, 等. 基于 SRAP 标记的白芨遗传多样性和遗传结构评价[J]. *药学报*, 2016, **51**(1): 147 – 152.  
SUN Yulong, HOU Beiwei, GENG Lixia, *et al.* Evaluation of genetic diversity and population structure of *Bletilla striata* based on SRAP markers [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016, **51**(1): 147 – 152.
- [18] WANG C X, TIAN M. Callus-mediated and direct protocorm-like body formation of *Bletilla striata* and assessment of clonal fidelity using ISSR markers [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, **36**(9): 2321 – 2330.
- [19] FERRIOL M, PICÓ B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied of Genetics*, 2003, **107**(2): 271 – 82.
- [20] BUDAK H, SHEARMAN R C, PARMAKSIZ I, *et al.* Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical and Applied of Genetics*, 2004, **108**: 328 – 334.
- [21] 周天华, 黎君, 丁家玺, 等. 白及种质资源及其近缘种的 SSR 指纹图谱研究[J]. *西北植物学报*, 2017, **37**(4): 673 – 681.  
ZHOU Tianhua, LI Jun, DING Jiayi, *et al.* SSR fingerprints of *Bletilla striata* Rchb. f. germplasm and its relatives or congeners [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(4): 673 – 681.
- [22] 和志娇, 吕丽芬, 杨丽云, 等. 白芨种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *西南农业学报*, 2008, **21**(4): 1081 – 1085.  
HE Zhijiao, LÜ Lifen, YANG Liyun, *et al.* Genetic diversity of *Bletilla* Rchb. f. germplasms by ISSR analysis [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2008, **21**(4): 1081 – 1085.
- [23] 吴劲松. 白及属植物 AFLP 遗传多样性分析及鉴定研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2014.  
WU Jinsong. *Analysis and Identification of AFLP Genetic Diversity of Bletilla Rchb. f.* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2014.
- [24] GUO Yan, ZHAI Lina, LONG Hao, *et al.* Genetic diversity of *Bletilla striata* assessed by SCoT and IRAP markers [J/OL]. *Hereditas*, 2018, **155**: 35 [2021-09-01]. doi:10.1186/s41065-018-0074-4.
- [25] HAMRICK J L, GODT M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. *Transaction of the Royal Society of London Series B*, 1996, **351**: 1291 – 1298.