

◆植物科学◆

极小种群野生植物白花兜兰 ISSR 遗传多样性分析*

秦惠珍, 盘波, 赵健, 邹蓉, 韦霄, 唐凤鸾**

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室, 广西桂林 541006)

摘要:为探究极小种群野生植物白花兜兰(*Paphiopedilum emersonii*)的遗传多样性,为其野生资源保护和优良种质资源筛选提供科学依据,采用 ISSR 分子标记技术对白花兜兰 8 个野生种群的 122 份样品进行遗传多样性分析。结果表明:从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出 6 条多态性较高的引物,共扩增出 35 条谱带,其中多态性条带 30 条,平均每条引物总扩增条带数为 5.83 条,多态性比率均值为 87.70%。白花兜兰 8 个野生种群的等位基因数(N_a)均值为 1.783 3,有效等位基因数(N_e)均值为 1.481 7,Shannon's 信息指数(I)均值为 0.419 1,Nei's 基因多样性指数(H)均值为 0.280 8,说明白花兜兰种群的遗传多样性属于中等水平;种群间的遗传分化系数(G_{st})均值为 0.124 7,种群内遗传变异大于种群间遗传分化,遗传变异主要来自种群内个体间;基因流(N_m)为 3.509 3 $>$ 1,表明白花兜兰种群间交流频繁,从而限制了由遗传漂变导致的遗传分化。采用非加权组平均法(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means, UPGMA)进行聚类分析,8 个白花兜兰野生种群分为两大类,第一大类包括环江木论兰花山(HML)和环江木论峒炼山(HMD)两个种群,第二大类包括荔波永康乡家别组(LYZ)、荔波黎明关干排组(LLG)、罗城怀群乡(LH)、宜州龙头乡独山屯(YLD)、宜州刘三姐乡岩田动湖(YLY)和荔波黎明关关吉洞(LLJ) 6 个种群。白花兜兰野生资源具有中等水平的遗传多样性,种群 HML 和种群 HMD 遗传多样性水平高于其他种群,在进行遗传育种时可优先选择。

关键词:白花兜兰 濒危植物 ISSR 遗传多样性 聚类分析

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)06-1134-07

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20220125.001

白花兜兰(*Paphiopedilum emersonii*)为兰科(Orchidaceae)兜兰属(*Paphiopedilum*)中极具观赏价值的濒危类群之一^[1],是我国特有的兰科兜兰属物

种,仅分布于广西和贵州南部极其狭窄的喀斯特地区,生于石灰岩山坡多石之地,海拔 600-700 m,原生境条件严酷、复杂,气候存在特有性,属于极小种群

收稿日期: 2021-10-11 修回日期: 2021-12-17

* 国家自然科学基金项目(31760085),广西科技计划项目(桂科 AD18281077)和广西科学院基本业务费项目(2019YJJ1008)资助。

【作者简介】

秦惠珍(1993-),女,硕士,研究实习员,主要从事濒危植物保育与药用植物栽培研究,E-mail: qhz0122@sina.com。

【**通信作者】

唐凤鸾(1978-),女,本科,副研究员,主要从事生物技术与濒危植物保育研究,E-mail: 1251657759@qq.com。

【引用本文】

秦惠珍,盘波,赵健,等.极小种群野生植物白花兜兰 ISSR 遗传多样性分析[J].广西科学,2022,29(6):1134-1140.

QIN H Z, PAN B, ZHAO J, et al. Genetic Diversity Analysis by ISSR of *Paphiopedilum emersonii*, a Plant Species with Extremely Small Populations [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(6): 1134-1140.

野生植物。白花兜兰由于具有极高的观赏价值和科研价值等,近年来遭到掠夺性采挖,导致其种群数量迅速减少而濒临灭绝^[2,3]。早在1997年,包括白花兜兰在内的所有兜兰属植物就被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 I 中,禁止国际贸易^[4]。在《中国物种红色名录》中,白花兜兰被列入极危种,属于国家 I 级保护植物,具有极高的保护与研究价值。目前,关于白花兜兰的研究主要集中在叶表皮形态特征^[5]、群落结构特征^[6]、繁殖技术^[7-9]、迁地保护^[10]和回归研究^[11]等方面。虽然组织培养技术使白花兜兰移栽成活率达到 95% 以上,但是种群数量少、结实困难、优良种质资源匮乏仍是限制白花兜兰快繁的重要因素。可见要从根本上缓解白花兜兰的濒危现状,重建白花兜兰种群,还需进一步研究白花兜兰现有野生种群的遗传多样性,对遗传多样性较高的种群进行迁地保护或就地保护,以及优良种质资源培育等。因此,研究白花兜兰的遗传多样性对白花兜兰的种质资源保护及分子辅助育种具有重要意义。

表 1 样品采集信息

Table 1 Information of sampling collection

种群 Population	来源地 Place of source	样品数 No. of samples	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔(m) Altitude (m)
HML	Orchid Mountain of Mulun, Huanjiang Maonan Autonomous County	30	107°57' E	25°06' N	633
HMD	Donglian Mountain of Mulun, Huanjiang Maonan Autonomous County	8	108°01' E	25°07' N	585
LH	Huaiqun Township, Luocheng County	14	108°34' E	24°50' N	224
YLY	Yantiandong Lake, Liusanjie Township, Yizhou City	26	108°34' E	24°36' N	437
YLD	Dushan, Longtou Township, Yizhou City	6	108°15' E	24°31' N	310
LYZ	Jiabie, Yongkang County, Libo City	12	108°02' E	25°17' N	535
LLG	Ganpai, Liming Guan, Libo City	14	107°54' E	25°11' N	850
LLJ	Guanji Hole, Liming Guan, Libo City	12	107°35' E	25°10' N	710

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取

白花兜兰总 DNA 用植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取,分别用 1% 琼脂糖凝胶和紫外分光光度计检测所得总 DNA 的浓度和纯度,浓度调整为 40 ng/ μ L, -20℃ 贮存备用。

1.2.2 ISSR 引物的合成与筛选

ISSR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司根据加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, UBC)公布的 100 条通用引物序列([http://](http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers.html)

ISSR 等 DNA 分子标记技术被广泛应用于植物的优良种质资源选育、新品种鉴定和遗传多样性研究等领域。ISSR 分子标记技术具有成本低、多态性高、实验操作简便等优点^[12],在兰科植物的种质资源鉴定、亲缘关系分析和遗传多样性研究等方面已得到广泛应用^[13]。本研究拟采用 ISSR 分子标记技术对白花兜兰 8 个野生种群的 122 份样品进行遗传多样性及种群间亲缘关系分析,以期为白花兜兰的种质资源保护、优良种质资源培育等提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2020 年 8-9 月采集白花兜兰野生种群样品,每个种群根据现存数量采集样品,剪取无病虫害的新鲜叶片,用变色硅胶快速干燥,用密封袋密封带回实验室存放于干燥处,并尽快提取其基因组 DNA,样品采集信息详见表 1。

www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers.html)合成。本试验以 24 份白花兜兰(8 个野生种群,每个种群随机选 3 份)的基因组 DNA 为模板,用 100 条 ISSR 引物进行 PCR 预扩增,从中筛选出扩增产物条带清晰、多态性效果较好的引物,用于后续白花兜兰 8 个野生种群的遗传多样性分析。

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系及程序

结合 Taq 酶特性,参照兰科植物 ISSR 反应体系^[13]加以改进:25 μ L PCR 体系中含 2.5 μ L 10 \times Taq Buffer, 1.0 μ L 引物(10 μ mol/L), 0.4 μ L dNTP (10 μ mol/L), 1.5 μ L Mg²⁺ (25 mmol/L), 0.2 μ L

Taq 酶 (5 U/ μ L), 1 μ L 模板 DNA (40 ng), 用 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 20 s, 52 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min); 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 电泳结束后采用 GONGDS 8000 凝胶成像系统 (美国 UVP 公司) 拍照记录。

1.2.4 数据处理

ISSR-PCR 扩增产物按条带的有无统计, 有条带的记为 1, 无条带的记为 0; 利用 POPGene 32 软件计算遗传多样性指数, 利用 NTsys 2.10e 软件计算遗传相似系数, 利用 NTSYS-pc 软件计算遗传分化系数; 采用非加权组平均法 (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means, UPGMA) 进行聚类

分析, 构建树状聚类图^[14,15]。

2 结果与分析

2.1 ISSR 多态性分析

用初步筛选出的引物对 24 份白花兜兰样品进行复筛, 最终筛选出 6 条多态性较高、扩增效果较为理想的引物 (表 2)。用这 6 条引物对 122 份白花兜兰样品进行 PCR 扩增, 共扩增出总条带 35 条, 其中多态性条带 30 条。平均每条引物总扩增条带数为 5.83 条, 多态性百分数均值为 87.70%, 说明白花兜兰 122 份样品之间遗传多样性较为丰富。引物 807 和引物 809 的部分样品扩增结果如图 1 所示。

表 2 6 个 ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of the six ISSR primers

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 ($^{\circ}$ C) Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	总扩增条带数 No. of total amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性百分数 (%) Percentage of polymorphic (%)
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	54.7	4	4	100.00
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	55.3	7	6	85.71
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	54.6	6	5	83.33
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	55.3	7	6	85.71
826	ACACACACACACACC	52.6	4	4	100.00
829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	53.2	7	5	71.43

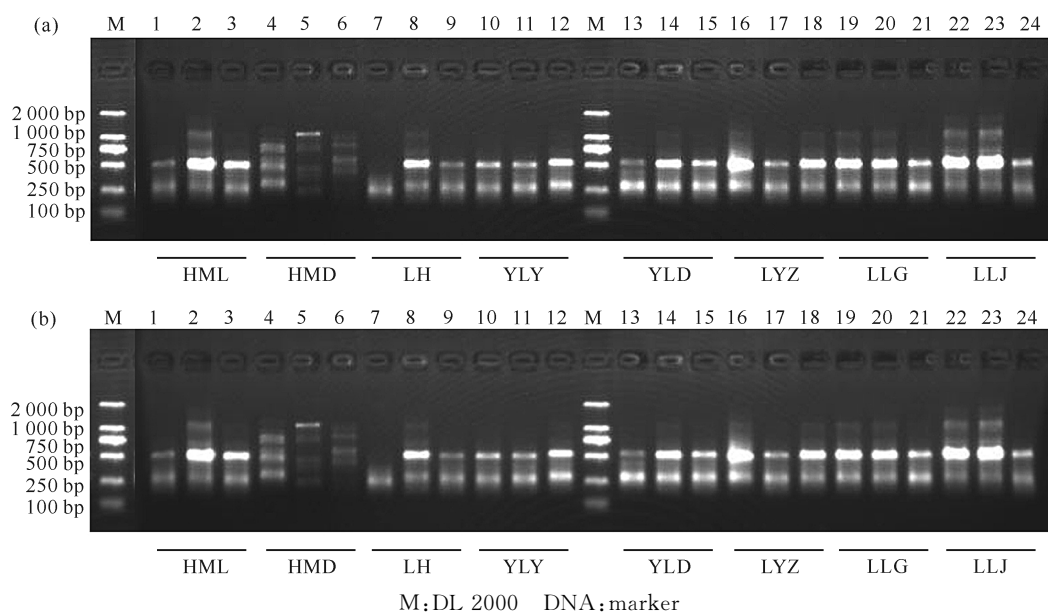


图 1 引物 807 (a) 和引物 809 (b) 对 8 个野生白花兜兰种群 24 份样品的扩增图谱

Fig. 1 Amplification map of primer 807 (a) and 809 (b) for 24 samples from 8 populations of *Paphiopedilum emersonii*

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 种群内的遗传多样性分析

6 条引物对 8 个野生种群的 122 份样品进行 IS-SR-PCR 反应, 共扩增出 35 条谱带, 种群间多态性位点数为 15 - 29, 种群水平的多态性位点百分率 (PPB) 为 50% - 96.67%, 均值为 78.33%; 等位基因数 (N_a) 为 1.500 0 - 1.966 7, 均值为 1.783 3; 有效等位基因数 (N_e) 为 1.316 4 - 1.622 2, 均值为 1.481

7; N_a 与 N_e 在 8 个野生种群中差异不大, 说明 8 个白花兜兰种群其等位基因在群体中分布均匀; Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.187 0 - 0.352 1, 均值为 0.280 8; Shannon's 信息指数 (I) 为 0.278 6 - 0.517 5, 均值为 0.419 1; 8 个野生种群的多态性位点百分率为 50.00% - 96.67%, 均值为 78.33% (表 3)。说明 8 个白花兜兰种群的遗传多样性属于中等水平。

表 3 种群内的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity in the population

种群 Population	多态性位点 Number of polymorphic loci	多态性位点 百分率 (%) PPB (%)	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 信息指数 I
HML	29	96.67	1.966 7 ± 0.182 6	1.600 7 ± 0.313 9	0.348 1 ± 0.145 7	0.517 5 ± 0.185 9
HMD	27	90.00	1.900 0 ± 0.305 1	1.622 2 ± 0.337 3	0.352 1 ± 0.159 3	0.516 6 ± 0.212 0
LH	25	83.33	1.833 3 ± 0.379 0	1.498 7 ± 0.369 9	0.289 8 ± 0.182 9	0.434 2 ± 0.248 0
YLY	23	76.67	1.766 7 ± 0.430 2	1.459 2 ± 0.372 2	0.267 9 ± 0.192 7	0.400 4 ± 0.268 3
YLD	15	50.00	1.500 0 ± 0.508 5	1.316 4 ± 0.365 4	0.187 0 ± 0.201 4	0.278 6 ± 0.292 6
LYZ	24	80.00	1.800 0 ± 0.406 8	1.459 0 ± 0.346 2	0.274 5 ± 0.178 0	0.414 7 ± 0.247 6
LLG	21	70.00	1.700 0 ± 0.466 1	1.434 1 ± 0.376 2	0.253 4 ± 0.197 5	0.377 7 ± 0.279 1
LLJ	24	80.00	1.800 0 ± 0.408 6	1.462 9 ± 0.363 9	0.273 6 ± 0.181 5	0.413 0 ± 0.250 0
Mean	23.5	78.33	1.783 3 ± 0.385 9	1.481 7 ± 0.355 6	0.280 8 ± 0.179 9	0.419 1 ± 0.249 3

2.2.2 种群间遗传变异分析

对白花兜兰的 8 个野生种群的种群间遗传分化水平进行分析, 种群内的遗传多样性 (H_s) 为 0.280 8, 种群间的遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.124 7, 即总的遗传变异中有 12.47% 的变异来自种群间, 87.53% 的变异来自种群内, 表明种群内遗传分化非常大。种群间每代个体的基因流 (N_m) 为 3.509 3, 表明种群间基因交流非常频繁。

0.866 1 - 0.978 6, 种群 LH 与种群 HMD 的种群遗传相似度最小, 为 0.866 1, 种群 LLG 与种群 LYZ 的种群遗传相似度最大, 为 0.978 6, 表明种群 LH 与种群 HMD 的遗传差异最大, 遗传关系最远; 种群 LLG 与种群 LYZ 差异最小, 亲缘关系最近。8 个野生种群的遗传距离为 0.021 6 - 0.143 8, 其中 LLG 与种群 LYZ 遗传距离最近, 为 0.021 6, 种群 LH 与种群 HMD 遗传距离最远, 为 0.143 8 (表 4)。

2.3 种群遗传结构分析

2.3.1 遗传距离与遗传一致度分析

白花兜兰 8 个野生种群的遗传相似度为

表 4 遗传相似度 (右上) 与遗传距离 (左下)

Table 4 Genetic similarity (upper right) and genetic distance (below left)

	HML	HMD	LH	YLY	YLD	LYZ	LLG	LLJ
HML	* * * *	0.942 9	0.939 9	0.956 7	0.933 1	0.942 8	0.942 7	0.928 7
HMD	0.058 8	* * * *	0.866 1	0.895 3	0.876 5	0.891 4	0.884 9	0.899 9
LH	0.062 0	0.143 8	* * * *	0.960 8	0.947 3	0.973 0	0.977 7	0.922 7
YLY	0.044 2	0.110 5	0.039 9	* * * *	0.945 5	0.957 3	0.968 1	0.964 3
YLD	0.069 2	0.131 9	0.054 1	0.056 0	* * * *	0.952 5	0.978 0	0.939 8
LYZ	0.058 9	0.115 0	0.027 4	0.043 7	0.048 7	* * * *	0.978 6	0.927 9
LLG	0.059 0	0.122 2	0.022 6	0.032 4	0.022 3	0.021 6	* * * *	0.942 5
LLJ	0.073 9	0.105 5	0.080 5	0.036 4	0.062 1	0.074 8	0.059 3	* * * *

Note: Genetic similarity is in the upper right corner of the table, and genetic distance is in the below left corner, maximum genetic similarity and maximum genetic distance are shown in bold

2.3.2 聚类分析

基于遗传一致性,采用UPGMA法将白花兜兰8个野生种群样本作聚类分析,结果如图2所示。从图2可以看出,8个白花兜兰野生种群分为两大类,第一大类包括HML和HMD两个种群(38份样品),第二大类包括LYZ、LLG、LH、YLD、YLY、LLJ 6个种群(84份样品)。第二大类再划分成3个亚类,第Ⅰ类包括YLD 1个种群(6份样品),第Ⅱ类包括YLY和LLJ两个种群(38份样品),第Ⅲ类包括LYZ、LLG、LH 3个种群(40份样品)。

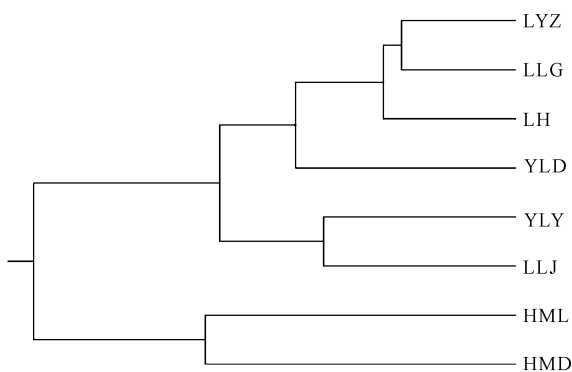


图2 白花兜兰8个野生种群的UPGMA树状聚类图

Fig. 2 Tree cluster diagram of *Paphiopedilum emersonii* with 8 populations

3 讨论

遗传多样性高低是评价种质资源优劣的重要内在因素之一,同时反映物种对环境的适应能力^[16,17]。ISSR分子标记技术在植物的遗传多样性分析、优良种质资源鉴定及种群亲缘关系分析方面具有广泛应用。目前ISSR分子标记技术已应用于蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)、石斛属(*Dendrobium*)、兰属(*Cymbidium*)、开唇兰属(*Anoectochilus*)等兰科植物的遗传多样性、品种鉴定与亲缘关系分析研究^[18-20]。李敏等^[21]利用ISSR分子标记技术分析16个蝴蝶兰品种的亲缘关系,发现来源于日本和台湾的品种聚为一类,其他品种聚为另一类。李永清等^[22]和鹿炎等^[23]利用ISSR分子标记对铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)的种质资源进行遗传多样性和亲缘关系分析,从100条ISSR引物中筛选出9条多态性引物,多态性比率为99.36%, N_a 均值为1.913 0, N_e 均值为1.528 3, H 均值为0.310 0, I 均值为0.465 0。叶炜等^[24]对金线兰(*Anoectochilus roxburghii*)及其近缘种植物进行ISSR遗传多样性研究,从100条ISSR引物中筛选出12条多态性引物,多态性比率为

99.36%, N_a 均值为2.000 0, N_e 均值为1.555 0, H 均值为0.322 0, I 均值为0.484 0。本研究首次采用ISSR分子标记对8个白花兜兰野生种群的遗传多样性进行研究,从100条ISSR引物中筛选出6条具有多态性且条带清晰的引物,PPB均值为78.33%, N_a 均值为1.783 3, N_e 均值为1.481 7, H 均值为0.280 8, I 均值为0.419 1,表明白花兜兰的遗传多样性水平低于铁皮石斛和金线兰。

遗传相似度是判断种内及种间亲缘关系及遗传基础的标准之一^[25],遗传相似度越大,亲缘关系越近。目前ISSR分子标记技术在兰科植物中已广泛应用于金线莲(*A. formosanus*)、春兰(*C. goeringii*)和蝴蝶兰属等植物的遗传多样性、品种鉴定与亲缘关系分析^[23,24]。本研究中8个白花兜兰野生种群的遗传相似度为0.866 1-0.978 6,种群间的遗传相似度均值为0.937 0,且种群间遗传相似度均大于0.8,表明白花兜兰8个野生种群的亲缘关系较近。遗传距离反映不同种群及不同物种间的亲缘关系,遗传距离越小亲缘关系越近^[26],8个白花兜兰野生种群两两间的遗传距离为0.021 6-0.143 8,遗传距离集中且较小,表明白花兜兰野生种群之间遗传分化程度较小,亲缘关系较近。本研究的聚类分析中,HMD和LYZ两个种群的地理距离(5.534 km)最近,但并没有严格按地理位置分布聚类,可能是种群间的基因交流较为频繁所致。

白花兜兰仅分布于广西和贵州喀斯特山坡的悬崖或断岩崖壁上,生存条件恶劣,分布范围狭窄,种群间地理距离近,导致种群间的基因交流频繁,但过大的基因流阻碍了由遗传漂变导致的遗传分化,不利于种群的长期进化与发展。白花兜兰的遗传多样性虽然低于铁皮石斛和金线兰等国家二级保护野生植物,但仍具有较高的遗传多样性,表明遗传多样性并不是白花兜兰致濒的根本原因,其可能原因,一是“兰花热”使得白花兜兰遭受毁灭性的采挖,加之采挖过程中对其生境的破坏使其不能在短时间内得以恢复;二是白花兜兰在自然状态下结实率非常低。根据聚类结果及种群间遗传多样性指数,可知HML和HMD两个种群遗传多样性最高,可作为良种选育的原材料。此外,要加大对白花兜兰野生种质资源及其生境的保护,严禁采挖,同时还要加强对白花兜兰野生种质资源的良种选育,通过组织培养等方式扩大人工培育,从而更好地保护极危植物白花兜兰的野生资源多样性。

参考文献

- [1] 朱亚艳, 王港, 侯娜, 等. 贵州南部野生兜兰 SRAP 遗传多样性分析[J]. 西南林业大学学报, 2017, 37(1): 10-14.
- [2] 王代谷, 邓克云, 魏春杰. 贵州兜兰属植物的现状及展望[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2469-2470.
- [3] 黄暖爱, 黄绵佳. 兰科植物保育研究概况[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36(4): 72-76.
- [4] 龙波, 龙春林. 兜兰属植物及其研究现状[J]. 自然杂志, 2006, 28(6): 341-344.
- [5] 查应琴, 关萍, 陈业, 等. 中国兜兰属 23 种植物叶表皮微形态特征初步研究[J]. 植物科学学报, 2019, 37(6): 709-718.
- [6] 覃文渊, 覃文更, 覃国乐, 等. 河池市兜兰属植物资源及其保护利用初探[J]. 北方园艺, 2012(15): 103-106.
- [7] 田凡, 姜运力, 罗在柒, 等. 白花兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究[J]. 贵州林业科技, 2014, 42(3): 34-38.
- [8] 张梅, 胡瑾, 周艳, 等. 白花兜兰的无菌播种和离体快速繁殖[J]. 种子, 2019, 38(3): 45-49.
- [9] 王莲辉, 魏鲁明, 姜运力, 等. 白花兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(10): 1071-1072.
- [10] 李秀玲, 王晓国, 李春牛, 等. 基于灰色关联分析方法评价 13 种野生兜兰的迁地保护适应性[J]. 植物科学学报, 2015, 33(3): 326-335.
- [11] 周艳, 冯佑鸿, 李依蔓, 等. 濒危植物白花兜兰野外回归研究[J]. 贵州科学, 2018, 36(5): 10-13.
- [12] 邱国俊, 程敏, 郭计华. ISSR 分子标记技术在植物中的应用及其研究进展[J]. 兴义民族师范学院学报, 2020(1): 117-120.
- [13] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 20 份兰科植物的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2252-2257.
- [14] 孙淑英, 吴玉仙, 陈贵林, 等. 黄芪及其代用品 ISSR 鉴定分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(1): 223-229.
- [15] HUA G J, HUNG C L, LIN C Y, et al. MGUPGMA: a fast UPGMA algorithm with multiple graphics processing units using NCCL [J]. Evolutionary Bioinformatics, 2017(13): 1-7.
- [16] 张淑艳, 王铁娟. 准噶尔沙蒿自然种群遗传结构的 ISSR 与 RAPD 分析[J]. 中国草地学报, 2020, 42(3): 1-6.
- [17] 王铁娟, 李伟琼, 张淑艳, 等. 差不嘎蒿自然种群的遗传多样性与遗传分化[J]. 林业科学, 2010, 46(12): 171-175.
- [18] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
- [19] 高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2006(3): 250-257.
- [20] 王宏利, 卜朝阳, 曾艳华, 等. 基于 ISSR 标记的建兰种质资源遗传多样性分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(9): 2526-2534.
- [21] 李敏, 王尧峰, 明凤. 用 ISSR 分子标记技术分析 16 个蝴蝶兰品种的亲缘关系研究[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(1): 60-65.
- [22] 李永清, 叶炜, 江金兰, 等. 铁皮石斛种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1530-1534.
- [23] 鹿炎, 潘栎特, 李会丽, 等. 24 份铁皮石斛种质资源的 ISSR 分析[J]. 激光生物学报, 2019, 28(3): 252-257.
- [24] 叶炜, 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.
- [25] 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1531-1538.
- [26] WANG H Z, FENG S G, LU J J, et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(3): 440-447.

Genetic Diversity Analysis by ISSR of *Paphiopedilum emersoni*, a Plant Species with Extremely Small Populations

QIN Huizhen, PAN Bo, ZHAO Jian, ZOU Rong, WEI Xiao, TANG Fengluan^{**}

(Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

Abstract: In order to explore the genetic diversity of *Paphiopedilum emersonii*, which is a small wild plant population, and provide scientific basis for its wild resource protection and excellent germplasm resource screening, the genetic diversity of 122 samples from 8 wild populations of *P. emersonii* was analyzed by ISSR molecular marker technology. The results showed that 6 primers with high polymorphism were selected from 100 ISSR universal primers. A total of 35 bands were amplified, including 30 polymorphic bands. The average total number of amplified bands per primer was 5.83, and the average rate of polymorphic bands was 87.70%. The average number of alleles (N_a), effective alleles (N_e), Shannon's information index (I) and Nei's gene diversity index (H) were 1.783 3, 1.481 7, 0.419 1 and 0.280 8, respectively. The results indicated that the level of genetic diversity of the *P. emersonii* populations were medium. The mean genetic differentiation coefficient (G_{st}) among populations was 0.124 7. The genetic variation within populations was greater than that among populations. The genetic variation mainly came from individuals within populations. The gene flow (N_m) was 3.509 3 > 1, indicating that the communication between populations were frequent, which limited the genetic differentiation caused by genetic drift. UPGMA cluster analysis showed that the 8 populations of *P. emersonii* were divided into two categories. The first category included population of HML and HMD, and the second category included population of LYZ, LLG, LH, YLD, YLY and LLJ. The results of this study found that the wild resources of *P. emersonii* have a moderate level of genetic diversity. The genetic diversity of population HML and population HMD is higher than that of other populations, which can be preferentially selected in genetic breeding.

Key words: *Paphiopedilum emersonii*; endangered plant; ISSR; genetic diversity; cluster analysis

责任编辑: 陆媛峰



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>