

基于ISSR标记的96份兰属种质资源遗传多样性分析及指纹图谱构建

魏晓羽, 刘红, 马辉, 别同德, 孙叶
(江苏里下河地区农业科学研究所, 扬州225007)

摘要:为加强我国兰属种质资源的保护利用,本研究通过ISSR分子标记对96份兰属种质进行多样性分析和指纹图谱构建。结果显示,共筛选出11条可扩增清晰条带的多样性引物,在96份材料共检测67条多态性条带,平均多态性条带比例为73.63%;等位基因数(N_a)为1.925,有效等位基因数(N_e)为1.450,Nei's遗传多样性指数(H)为0.277,Shannon多样性指数(I)为0.427,多态性位点百分比(PPL, percentage of polymorphic loci)为92.54%;种群内基因多样性(H_s)为0.1934,基因分化度(G_{st})为0.3009,总遗传多样性指数(H_t)为0.2767,种群间的平均基因流(N_m)为1.1619,种群间的两两遗传分化固定指数值范围为0.002~0.527,平均值为0.325。系统聚类结果表明,兰属种群间遗传分化程度高,8个种群可分为3类,春兰和墨兰为一大类,寒兰、春剑、蕙兰、莲瓣兰、建兰为第二类,杂交种独为一类,与其他两类种群之间的遗传距离较大。主坐标分析表明,莲瓣兰和春兰表现出较远的亲缘关系。本研究筛选出6对引物构建了96个品种的指纹图谱二维码。本研究结果可为今后兰属新品种选育及品种鉴定提供重要依据。

关键词: 兰属; ISSR标记; 遗传多样性; 指纹图谱

Analysis of Genetic Diversity and Fingerprint Construction of 96 *Cymbidium* Based on ISSR Markers

WEI Xiaoyu, LIU Hong, MA Hui, BIE Tongde, SUN Ye
(Institute of Agricultural Sciences for Lixiahe region in Jiangsu, Yangzhou 225007)

Abstract: In order to strengthen the protection and utilization of *Cymbidium* resources in China, ISSR markers were deployed to conduct the genetic diversity and fingerprint construction in this study. A total of 67 bands were detected with 11 primers in 96 samples, and the average of polymorphic bands rate is 73.63%, the number of alleles (N_a) is 1.925, the number of effective alleles (N_e) is 1.450, the genetic diversity of Nei's is 0.277, and the Shannon index (I) is 0.427, the percentage of polymorphic loci (PPL) is 92.54%, the genetic diversity within populations (H_s) is 0.1934, the genetic differentiation coefficient (G_{st}) is 0.3009, the total genetic diversity (H_t) was 0.2767, and the average gene flow among populations (N_m) of *Cymbidium* is 1.1619, the fixation index of pairwise genetic differentiation among populations ranged from 0.002 to 0.527, with an average of 0.325. The systematic clustering results indicate that *Cymbidium* has high degree of genetic differentiation, which was divided into three groups by systematic clustering analysis, *Cymbidium. goeringii* and *C. sinense* were assigned to one category, while *C. kanran*, *C. goeringii* var. *longibracteatum*, *C. faberi*, *C.*

收稿日期: 2023-08-10 修回日期: 2023-09-27 网络出版日期: 2023-11-17

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230810003>

第一作者研究方向为花卉遗传育种, E-mail: weixiaoyu1971@163.com

通信作者: 孙叶, 研究方向为花卉遗传育种, E-mail: sunye9999@126.com

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2023]242); 江苏省农业种质资源保护与利用平台(JSGB2018-1); 2023年省级农业科技自主创新与推广补助项目(扬农[2023]73号); 江苏里下河地区农业科学研究所科研专项基金项目(SJ(22)105)

Foundation projects: Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS [2023] 242); Jiangsu Province Agricultural Germplasm Resources Protection and Utilization Platform (JSGB2018-1); Provincial Agricultural Science and Technology Innovation and Promotion Subsidy Project in 2023 (Yangnong [2023] 73); Institute of Agricultural Sciences of Lixiahe Districts Scientific Research Fund Project (SJ(22)105)

tortisepalum and *C. ensifolium* were in the second category, the hybrids were in a unique category, which has a large genetic distance from the other two categories. Principal coordinate analysis indicated that *C. tortisepalum* and *C. goeringii* showed a distant genetic relationship. 6 pairs of primers were selected to construct fingerprint QR codes for 96 species. Collectively, this study provided an important basis for the breeding and variety identification of *Cymbidium* in the future.

Key words: *Cymbidium*; ISSR marker; genetic diversity; fingerprint

兰属(*Cymbidium* Sw.)是天门冬目(*Asparagales* Link)兰科(*Orchidaceae* Juss.)的主要属之一,其中常见的地生种类,如春兰(*Cymbidium goeringii*)、蕙兰(*C. faberi*)、建兰(*C. ensifolium*)、墨兰(*C. sinense*)、寒兰(*C. kanran*)、莲瓣兰(*C. tortisepalum*)与春剑(*C. goeringii* var. *longibracteatum*)等,又统称为中国兰,在中国作为观赏花卉已有 1000 多年的栽培历史。目前全世界兰属植物共有 86 个种、4 个亚种和 12 个变种,中国现已公开发表的国产兰属物种有 57 个种、2 个亚种和 11 个变种^[1]。由于野生兰生存环境逐渐被破坏,原生种质资源逐渐匮乏^[2],通过人工杂交来培育新品种,逐渐成为兰花育种的新趋势。目前市场上现流通的兰花品种存在命名混乱、系谱信息缺乏、亲缘关系复杂等问题^[3],是限制中国兰产业发展的重要因素之一。通过分子标记技术对兰属种质资源进行系统分类、遗传分析以及构建指纹图谱,可为兰属种质资源杂交育种提供参考依据。

分子标记技术以遗传物质为依据,从物种基因组 DNA 水平直接反映种间和种内的差异,为分类鉴定提供了高效、准确且清晰的方法^[4],包括微卫星分子标记(ISSR, inter-simple sequence repeat)、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD, random amplified polymorphic DNA)、简单重复序列标记(SSR, simple sequence repeats)、相关序列扩增多态性标记(SRAP, sequence-related amplified polymorphism)和目标起始密码子多态性标记(ScoT, start codon targeted polymorphism)等,这些标记主要用于兰花种内、种间及品种间的分类鉴定^[5]、遗传多样性、亲缘关系分析以及种质资源与种群方面的研究。ISSR 分子标记技术操作较为简单,无需测序,实验成本低廉^[6],已广泛应用于兰属的遗传多样性、亲缘关系、居群遗传结构和杂交种质亲缘关系鉴定等研究^[7]。吴振兴等^[8]用 15 个 ISSR 引物在 16 种兰属植物中扩增出 227 条多态条带,并认为春兰与春剑的亲缘关系最近。高丽等^[9]用 11 条 ISSR 引物对湖北省的 11 个春兰居群进行多样性分析,认为春兰的遗传变异程度远高于其他兰科植物。Wang 等^[10]对 50

个春兰品种进行 ISSR 遗传多样性研究,并分别区分出日本和中国血缘的春兰组成。同样在建兰、寒兰、蕙兰上也均有学者通过 ISSR 标记进行多样性分析,王宏利等^[11]通过 6 个 ISSR 引物对 39 份建兰分析,认为 ISSR 标记在建兰的品种间具有丰富的多态性,能够很好地揭示建兰品种间的亲缘关系。江亚雯等^[12]用 ISSR 标记区分出江西省 12 个寒兰居群遗传距离和亲缘关系。帖聪晓等^[13]利用 12 条 ISSR 引物分析得出,江西省蕙兰居群并没有呈现出按照山脉分布的特点,各山脉间蕙兰居群基因交流有限。ISSR 标记在其他兰科作物中也有运用,如白及^[14]、无距虾脊兰^[15]、西藏杓兰^[16]等。但少有学者较全面的结合中国兰属主要种质进行多样性分析。

DNA 指纹图谱广泛应用于品种、品系的鉴别,在种质资源保护利用、种质来源分辨、新品种注册和知识产权保护等方面起到关键作用^[17]。构建 DNA 指纹图谱可利用尽量少的引物区分尽量多的种质资源,以达到提高检测效率、降低成本的目的^[18]。

在兰属种质的多样性研究中,多数学者选择单一一种质如春兰^[9]、寒兰^[12]等进行研究,也有学者选择中国兰属种质进行分析,但其中部分兰属种质数量较少或不具代表性,本研究以 7 个兰属种质资源(春兰、蕙兰、建兰、寒兰、墨兰、春剑、莲瓣兰)以及 1 个兰属杂交种质资源为研究对象,各挑选 12 份种质,进行遗传多样性、居群遗传结构、亲缘关系分析,筛选出具有多态性和分型较好的标记,构建分子指纹图谱,以期为兰属种质资源的分类鉴定、种质创新和新品种选育提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究以 96 份兰属种质资源为材料,共分为 8 个种群,分别为春兰、蕙兰、建兰、墨兰、寒兰、莲瓣兰、春剑和自育杂交种,每个种群各 12 份材料,均来自江苏里下河地区农业科学研究所兰属种质资源圃(表 1)。选取生长健康植株的幼嫩叶片,置于塑封袋中保存,用于 DNA 的提取。

表 1 96 份兰属种质资源

Table 1 List of 96 *Cymbidium* resources

序号 No.	编号 Code	名称 Name	种 Species	序号 No.	编号 Code	名称 Name	种 Species	序号 No.	编号 Code	名称 Name	种 Species
1	C-1	金昌梅	春兰	33	CJ-9	雨露	春剑	65	A-5	金狮蝶	寒兰
2	C-2	中华丽荷	春兰	34	CJ-10	大红荷	春剑	66	A-6	逍遥	寒兰
3	C-3	永富素	春兰	35	CJ-11	金川明玉	春剑	67	A-7	赤壳素	寒兰
4	C-4	红塔宝鼎	春兰	36	CJ-12	彩云	春剑	68	A-8	紫气东来	寒兰
5	C-5	春一品	春兰	37	M-1	白衣神相	墨兰	69	A-9	寒素	寒兰
6	C-6	鹤市	春兰	38	M-2	巨荷	墨兰	70	A-10	红雀	寒兰
7	C-7	史安梅	春兰	39	M-3	兰阳之松	墨兰	71	A-11	青寒兰	寒兰
8	C-8	花蝴蝶	春兰	40	M-4	福隆	墨兰	72	A-12	紫寒兰	寒兰
9	C-9	碧瑶	春兰	41	M-5	富贵金龙	墨兰	73	J-1	红草红荷	建兰
10	C-10	青钱梅	春兰	42	M-6	东方红神荷	墨兰	74	J-2	暮山紫	建兰
11	C-11	永丰梅	春兰	43	M-7	金华山	墨兰	75	J-3	素台北	建兰
12	C-12	魁字	春兰	44	M-8	日向	墨兰	76	J-4	中华水仙	建兰
13	L-1	小雪素	莲瓣兰	45	M-9	天堂鸟	墨兰	77	J-5	红猫蕊蝶	建兰
14	L-2	荷之冠	莲瓣兰	46	M-10	乾坤蝶	墨兰	78	J-6	红君荷	建兰
15	L-3	映山红	莲瓣兰	47	M-11	龙凤彩	墨兰	79	J-7	日月潭之恋	建兰
16	L-4	玉兔	莲瓣兰	48	M-12	金蝶	墨兰	80	J-8	逸红双娇	建兰
17	L-5	满江红	莲瓣兰	49	H-1	金奥素	蕙兰	81	J-9	中岩彩蝶	建兰
18	L-6	太平公主	莲瓣兰	50	H-2	老极品	蕙兰	82	J-10	彩云追月	建兰
19	L-7	胭脂	莲瓣兰	51	H-3	郑孝荷	蕙兰	83	J-11	红月	建兰
20	L-8	心花怒放	莲瓣兰	52	H-4	端蕙梅	蕙兰	84	J-12	倾城	建兰
21	L-9	碧龙红素	莲瓣兰	53	H-5	程梅	蕙兰	85	Z-1	红双喜	杂交种
22	L-10	素蝶	莲瓣兰	54	H-6	解佩	蕙兰	86	Z-2	大友贵	杂交种
23	L-11	剑阳蝶	莲瓣兰	55	H-7	适圆梅	蕙兰	87	Z-3	绯牡丹	杂交种
24	L-12	黑奇素	莲瓣兰	56	H-8	崔梅	蕙兰	88	Z-4	吴凤	杂交种
25	CJ-1	无尘	春剑	57	H-9	江山素	蕙兰	89	Z-5	杨贵素蝶	杂交种
26	CJ-2	边荷锦绣	春剑	58	H-10	扬蕙梅	蕙兰	90	Z-6	桂歌	杂交种
27	CJ-3	红福	春剑	59	H-11	蕊蝶	蕙兰	91	Z-7	江山翠盖	杂交种
28	CJ-4	水晶红素	春剑	60	H-12	庆华梅	蕙兰	92	Z-8	圆宋韩	杂交种
29	CJ-5	西蜀道光	春剑	61	A-1	倩云	寒兰	93	Z-9	蕙蝶	杂交种
30	CJ-6	粉桃	春剑	62	A-2	黑虎蝶	寒兰	94	Z-10	玉韩	杂交种
31	CJ-7	雅女	春剑	63	A-3	仙鹤素	寒兰	95	Z-11	新霞	杂交种
32	CJ-8	玉海棠	春剑	64	A-4	嫦娥	寒兰	96	Z-12	山端	杂交种

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取待试材料生长期的新鲜叶片, 根据孙叶等^[19]的改良 CTAB 法提取 DNA, 在 CTAB 提取液中加入 2% 的 β -巯基乙醇, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 纯度及浓度, 稀释至

20 ng/ μ L, 存于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物筛选及 ISSR-PCR 扩增 ISSR 引物采用哥伦比亚大学 (UBC, The University of British Columbia) 公布的 100 条 ISSR 通用引物序列 UBC801-UBC900, 由生工生物工程(上海)股份有限

公司合成, 根据要求将其稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存备用。

参照孙叶等^[19]、黄晓慧等^[7]的方法, 选用 TaKaRa PCR Ex Taq Kit (宝日医生生物技术(北京)有限公司), ISSR-PCR 扩增反应体系为 25 μL , 其中 1 μL DNA 工作液, 2.5 μL 10 \times Ex Taq Buffer, 1 μL 引物, 0.125 μL Ex Taq, 2 μL dNTP Mixture, 剩余用 ddH₂O 补足。

在每个种群中各挑选两份随机样本, 混合后作为该种群的混样模板, 对 100 条 ISSR 通用引物 UBC801-UBC900 设置 6 个梯度的退火温度, 用于筛选能扩增出清晰条带的引物, 温度梯度为 49 $^{\circ}\text{C}$ 、51 $^{\circ}\text{C}$ 、53 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、57 $^{\circ}\text{C}$ 、59 $^{\circ}\text{C}$, 共筛选出 11 条引物(表 2), 再对 96 份种质材料分别扩增检测。在 Agilent Sure Cyclor 8800 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2.5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s; 49~59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(1 \times TAE 缓冲液, 200 A, 60 min)进行分离, G-red 核酸染料(北京百泰克生物技术有限公司)染色, 在 Biotop 凝胶成像系统(Fluor Shot EVO SC805, 中国)拍照保存。

1.3 数据处理

使用人工读带的方式统计扩增产物的条带数。将电泳图谱中同一迁移位置上有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 以此构建 0、1 数据矩阵。利用 Genalex 6.501 和 Popgen 1.32 软件计算多态性位点比例(PPL, percentage of polymorphic loci)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon 多样性指数(H)、Nei's 基因多样性指数(H)、Nei's 遗传距离(D)、基因流(N_m)、基因分化度(G_{st})、总遗传多样性指数(H_t)、种群内遗传多样性指数(H_s)和遗传分化固定指数(F_{st})等。用 NTSYSpc 软件构建非加权组平均法(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)聚类图, GenAlEx 6.5 开展

PCoA 分析, Excel 绘制主坐标图。

根据引物条带的 0、1 矩阵值, 依次将 11 条引物条带矩阵值组合成相应的数字信息, 利用在线生成二维码软件(<http://cli.im/>)生成 96 份兰属种质的指纹图谱二维码。

表 2 ISSR 引物信息

Table 2 Information of ISSR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG
UBC825	ACACACACACACACT
UBC826	ACACACACACACACC
UBC827	ACACACACACACACG
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG
UBC857	ACACACACACACACYG
UBC864	ATGATGATGATGATGATG
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC

2 结果与分析

2.1 引物的多态性分析

根据电泳结果, 从 100 条引物中挑选出可扩增出清晰条带的 11 条引物(表 3), 能较好的区分 96 份种质。用 11 条引物对 96 个兰属品种进行扩增, 共检测到 67 个多态性条带, 平均多态性条带比例为 73.63%, 11 条引物在 8 个种群中均能检测出多态性条带, 每个引物扩增出的条带在 2~10 个之间。扩增条带数最多的引物是 UBC811, 在莲瓣兰中扩增出 10 个条带, 其中有 9 个多态性条带; 而扩增条带数最少的引物是 UBC826, 在建兰中扩增出 2 条带, 其中 2 个多态性条带。图 1 为用引物 UBC824 扩增到的电泳条带。

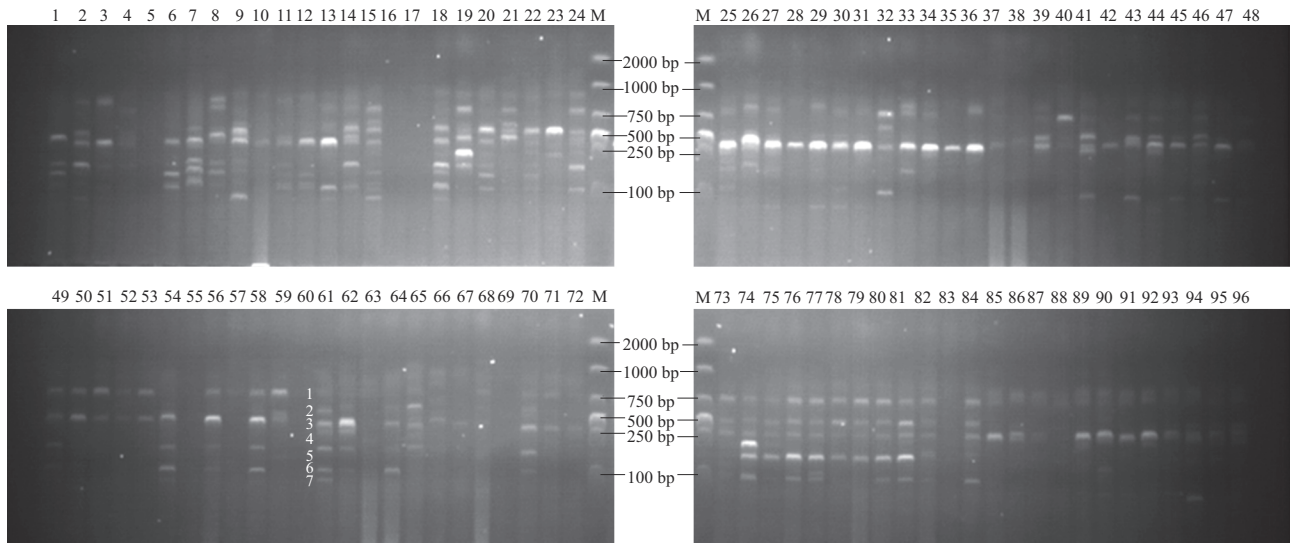
表 3 ISSR 引物扩增产物的多态性

Table 3 Polymorphism of amplification products by ISSR primers

引物 Primers	多态性指标 Polymorphism	寒兰 C. kanran	杂交种 Hybrid	莲瓣兰 C. tortisepalum	墨兰 C. sinense	建兰 C. ensifolium	春兰 C. goeringii	蕙兰 C. faberi	春剑 C. goeringii var. longibracteatum
UBC811	扩增条带数	7	8	10	8	8	8	9	5
	多态性条带数	7	8	9	7	5	8	8	5
	多态性条带比例(%)	100	100	90	87.50	62.50	100	88.89	100

表3(续)

引物 Primers	多态性指标 Polymorphism	寒兰 C. <i>kanran</i>	杂交种 Hybrid	莲瓣兰 C. <i>tortisepalum</i>	墨兰 C. <i>sinense</i>	建兰 <i>C. ensifolium</i>	春兰 <i>C. goeringii</i>	蕙兰 C. <i>faberi</i>	春剑 <i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>
UBC823	扩增条带数	6	6	5	6	5	4	4	5
	多态性条带数	4	5	4	4	4	3	2	5
	多态性条带比例(%)	66.67	83.33	80	66.67	80	75	50	100
UBC824	扩增条带数	7	7	5	4	5	6	6	3
	多态性条带数	7	7	4	4	5	5	3	2
	多态性条带比例(%)	100	100	80	100	100	83.33	50	66.67
UBC825	扩增条带数	4	5	5	4	4	4	4	4
	多态性条带数	3	4	3	2	2	3	3	3
	多态性条带比例(%)	75	80	60	50	50	75	75	75
UBC826	扩增条带数	5	3	5	3	2	3	4	5
	多态性条带数	5	3	4	2	2	3	3	5
	多态性条带比例(%)	100	100	80	66.67	100	100	75	100
UBC827	扩增条带数	5	6	6	5	3	5	6	5
	多态性条带数	3	5	5	2	2	5	4	2
	多态性条带比例(%)	60	83.33	83.33	40	66.67	100	66.67	40
UBC845	扩增条带数	4	4	5	3	5	5	4	5
	多态性条带数	4	4	5	2	5	5	4	4
	多态性条带比例(%)	100	100	100	66.67	100	100	100	80
UBC854	扩增条带数	4	4	4	4	3	3	3	4
	多态性条带数	2	3	3	3	2	1	2	3
	多态性条带比例(%)	50	75	75	75	66.67	33.33	66.67	75
UBC857	扩增条带数	7	7	8	7	7	7	7	8
	多态性条带数	7	7	7	5	6	6	3	6
	多态性条带比例(%)	100	100	87.50	71.43	85.71	85.71	42.86	75
UBC864	扩增条带数	5	6	6	6	5	5	6	6
	多态性条带数	2	3	2	3	2	3	3	3
	多态性条带比例(%)	40	50	33.33	50	40	60	50	50
UBC866	扩增条带数	4	3	4	4	4	4	4	4
	多态性条带数	2	1	1	1	1	1	1	1
	多态性条带比例(%)	50	33.33	25	25	25	25	25	25
合计 Sum	扩增条带数	58	59	63	54	51	54	57	54
	多态性条带数	46	50	47	35	36	43	36	39
	多态性条带比例(%)	79.31	84.75	74.60	64.81	70.59	79.63	63.16	72.22



黑色数字 1~96 为表 1 中 96 份兰属种质资源, 白色数字 1~7 为扩增条带; M: 2000 bp DNA Marker
The black numbers 1~96 are 96 *Cymbidium* resources of table 1, the white numbers 1-7 are amplification bands

图 1 引物 UBC824 在 96 份兰属材料中的扩增产物

Fig.1 Amplification profile of 96 cultivars of *Cymbidium* using primer UBC824

2.2 遗传多样性分析

由表 4 可知, 在物种水平上, 兰属 8 个种群的等位基因数为 1.925, 有效等位基因数为 1.450, Nei's

基因多样性指数为 0.277, Shannon 多样性指数为 0.427, 总多态性位点比例为 92.54%。

表 4 基于 ISSR 分子标记的遗传多样性信息

Table 4 Genetic diversity information based on ISSR molecular markers

种群 Population	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 多样 性指数 I	多态性位点 比例(%) PPL
寒兰 <i>C. kanran</i>	1.687	1.352	0.215	0.330	68.66
杂交种 Hybrid	1.746	1.408	0.240	0.364	74.63
莲瓣兰 <i>C. tortisepalum</i>	1.702	1.374	0.219	0.333	70.15
墨兰 <i>C. sinense</i>	1.522	1.282	0.164	0.248	52.24
建兰 <i>C. ensifolium</i>	1.522	1.287	0.171	0.259	52.24
春兰 <i>C. goeringii</i>	1.642	1.326	0.199	0.305	64.18
蕙兰 <i>C. faberi</i>	1.537	1.264	0.160	0.246	53.73
春剑 <i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>	1.582	1.307	0.180	0.273	58.21
平均 Average	1.618	1.325	0.193	0.295	61.76
物种水平 Species level	1.925	1.450	0.277	0.427	92.54

PPL: Percentage of polymorphic loci

8 个种群的等位基因数为 1.522~1.746, 均值为 1.618; 有效等位基因数为 1.282~1.408, 均值为 1.325; Nei's 基因多样性指数为 0.160~0.240, 均值为 0.193; Shannon 多样性指数为 0.246~0.364, 均值为 0.295。

杂交种种群的多样性最大, 等位基因数为 1.746, 有效等位基因数为 1.408, Nei's 基因多样性指数为 0.240, Shannon 多样性指数为 0.364, 多态性

位点比例为 74.63%。墨兰和建兰的多样性较小, 墨兰的等位基因数为 1.522, 有效等位基因数为 1.282, Nei's 基因多样性指数为 0.164, Shannon 多样性指数为 0.248, 多态性位点比例为 52.24%, 建兰的等位基因数为 1.522, 有效等位基因数为 1.287, Nei's 基因多样性指数为 0.171, Shannon 多样性指数为 0.259, 多态性位点比例为 52.24%。

2.3 种群间的遗传结构分析

根据 Popgen 分析种群间遗传结构(表 5), 基因分化度的范围为 0.0347~0.9016, 基因流的范围为 0.0545~13.9015。兰属种群平均总遗传多样性指数为 0.2767(标准偏差为 0.0251), 种群内遗传多样性指数为 0.1934(标准偏差为 0.0133), 基因分化度为

0.3009, 基因流为 1.1619, 基因流的变化趋势与基因分化度相反, 基因分化度越低, 基因流越大。基因分化度显示, 有 30.09% 的遗传多样性存在于种群间, 而 69.91% 的遗传多样性存在于种群内部。种群间的平均基因流接近 1, 说明各种群间产生了一定程度的遗传分化^[13]。

表 5 种群遗传结构参数

Table 5 Genetic structural parameters of *Cymbidium*

位点 Locus	总遗传多样性指数 H_t	种群内遗传多样性指数 H_s	基因分化度 G_{st}	基因流 N_m	位点 Locus	总遗传多样性指数 H_t	种群内遗传多样性指数 H_s	基因分化度 G_{st}	基因流 N_m
UBC811-1	0.1091	0.0925	0.1517	2.7949	UBC825-4	0.309	0.2847	0.0788	5.844
UBC811-2	0.4746	0.2254	0.5252	0.4521	UBC825-5	0.0731	0.0698	0.0446	10.7139
UBC811-3	0.4791	0.2956	0.383	0.8056	UBC826-1	0.4914	0.2025	0.5879	0.3505
UBC811-4	0.4857	0.2107	0.5662	0.383	UBC826-2	0.2458	0.2339	0.0485	9.7989
UBC811-5	0.3069	0.2257	0.2646	1.3896	UBC826-3	0.2884	0.1714	0.4055	0.7329
UBC811-6	0.4085	0.3445	0.1565	2.6942	UBC826-4	0.3064	0.2264	0.2612	1.4144
UBC811-7	0.3458	0.3053	0.117	3.7724	UBC826-5	0.1995	0.1502	0.2469	1.5248
UBC811-8	0.1652	0.1516	0.0828	5.5413	UBC827-1	0.2987	0.178	0.4041	0.7373
UBC811-9	0.2525	0.2243	0.1117	3.9775	UBC827-2	0.1339	0.1027	0.2333	1.6427
UBC811-10	0.0844	0.0784	0.0709	6.5495	UBC827-3	0.3827	0.3282	0.1424	3.0109
UBC823-1	0.479	0.3509	0.2675	1.3694	UBC827-4	0.3155	0.2742	0.1309	3.3195
UBC823-2	0.4534	0.2572	0.4327	0.6556	UBC827-5	0.2156	0.1708	0.208	1.9039
UBC823-3	0.2022	0.0199	0.9016	0.0545	UBC827-6	0.1809	0.1323	0.2686	1.3612
UBC823-4	0.0834	0.0795	0.0473	10.0785	UBC845-1	0.4823	0.3533	0.2674	1.3696
UBC823-5	0.0649	0.0578	0.1089	4.0908	UBC845-2	0.4918	0.4404	0.1046	4.2803
UBC823-6	0.1665	0.1501	0.0987	4.5666	UBC845-3	0.3046	0.2918	0.0421	11.3629
UBC823-7	0.0873	0.0752	0.1388	3.102	UBC845-4	0.2214	0.2049	0.0745	6.209
UBC824-1	0.4178	0.218	0.4782	0.5456	UBC845-5	0.0627	0.0601	0.0414	11.571
UBC824-2	0.4203	0.1909	0.5457	0.4162	UBC854-1	0	0		
UBC824-3	0.3827	0.2449	0.3601	0.8884	UBC854-2	0.4797	0.3193	0.3344	0.9951
UBC824-4	0.0421	0.0403	0.0445	10.7279	UBC854-3	0.3508	0.3171	0.0962	4.6972
UBC824-5	0.2908	0.251	0.1371	3.1479	UBC854-4	0.2405	0.1579	0.3437	0.9548
UBC824-6	0.3311	0.2896	0.1253	3.4916	UBC857-1	0.3914	0.1381	0.6472	0.2726
UBC824-7	0.0523	0.0505	0.0347	13.9015	UBC857-2	0.349	0.2005	0.4255	0.6751
UBC825-1	0.4974	0.1574	0.6835	0.2315	UBC857-3	0.4817	0.3919	0.1863	2.1833
UBC825-2	0.3045	0.2712	0.1093	4.0732	UBC857-4	0.396	0.3311	0.164	2.5482
UBC825-3	0	0			UBC857-5	0.3748	0.3129	0.165	2.5299

表 5 (续)

位点 Locus	总遗传多样性指数 H_t	种群内遗传多样性指数 H_s	基因分化度 G_{st}	基因流 N_m	位点 Locus	总遗传多样性指数 H_t	种群内遗传多样性指数 H_s	基因分化度 G_{st}	基因流 N_m
UBC857-6	0.4941	0.3793	0.2324	1.6518	UBC864-6	0.3166	0.2931	0.0742	6.2419
UBC857-7	0.3754	0.291	0.2248	1.7239	UBC866-1	0	0		
UBC857-8	0.0834	0.0795	0.0473	10.0785	UBC866-2	0	0		
UBC864-1	0	0			UBC866-3	0.1339	0.1027	0.2333	1.6427
UBC864-2	0.2903	0.1023	0.6475	0.2722	UBC866-4	0.2755	0.2326	0.1557	2.7109
UBC864-3	0.4996	0.1122	0.7755	0.1448	均值 Mean	0.2767	0.1934	0.3009	1.1619
UBC864-4	0.1484	0.0572	0.6144	0.3138	标准差 SD	0.0251	0.0133		
UBC864-5	0.4656	0.4083	0.1229	3.5673					

8 个兰属种群的方差分析结果(表 6)显示,兰属种群内的差异较大,占总差异的 98%,而种群间的

差异较小,只占总差异的 2%,表明兰属种群内的差异为主要差异。

表 6 96 份兰属种群的分子方差分析

Table 6 Analysis of molecular variance(AMOVA)of 96 *Cymbidium* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	方差总和 SS	平均方差 MS	变异组分 Est. Var.	变异百分率(%) PV
种群间 Among Populations	7	3.896	0.557	0.007	2
种群内 Within Populations	88	41.250	0.469	0.469	98
总计 Total	95	45.146		0.476	100

Est. Var.: Variance components; PV: Percentage of variation

当遗传分化固定指数 F_{st} 为 0~0.05 时,认为种群间遗传分化很小;遗传分化固定指数为 0.05~0.15 时,认为种群间存在中等程度的遗传分化;遗传分化固定指数为 0.15~0.25 时,种群间遗传分化较大;而遗传分化固定指数 > 0.25 时,则认为种群间有很大的遗传分化^[16]。对 8 个种群间的遗传分化固定指数进行估计(图 2),8 个种群间的两两遗传分化固定指数值范围为 0.002~0.527,平均值为 0.325($F_{st} > 0.05$),这表明种群间遗传分化程度较大。

2.4 种群间亲缘关系

由表 7 可知,8 个种群的遗传一致度为 0.8376~0.9236,均值为 0.8825;遗传距离为 0.0795~0.1773,均值为 0.1253。最小的遗传距离在建兰和春兰两个种群之间,为 0.0795,最大的遗传距离在寒兰和春剑两个种群之间,为 0.1773。与遗传距离相反,春剑和寒兰种群间的遗传一致度最小,为 0.8376,春兰和建兰种群间的遗传一致度最大,为 0.9236,表明遗传距离越大,遗传一致度越小。

个体聚类(图 3)表明,在遗传距离 0.668 处,可将 96 份兰属种质分为 3 类,其中第 I 类共 23 份种质,包括 10 份莲瓣兰、12 份春剑以及 1 份杂交种质,第 II 类共 6 份种质,全部为寒兰,第 III 类共 67 份种质。其中, J-2(暮山紫)与 J-5(红猫蕊蝶)、J-3(素台北)与 J-9(中岩彩荷)、M-8(日向)与 M-9(天堂鸟)以及 CJ-7(雅女)与 CJ-8(玉海棠)的遗传距离较近,这些种质都属于相同种群。

兰属种群聚类分析(图 4)表明,8 个兰属种群可为 3 类,春兰和墨兰为第 I 类,寒兰、春剑、蕙兰、莲瓣兰、建兰为第 II 类,杂交种独为第 III 类,与其他两类种群之间的遗传距离较大。

主坐标分析结果(图 5)显示,前 3 个主成分占总变量的 16.25%、10.67% 和 8.52%,共占总变量的 35.44%,结果表明兰属种群间多样性较高,这也与上述结果一致。主坐标图中显示,莲瓣兰和春兰分布在主成分 1 的两端,表现出较远的亲缘关系,寒兰、建兰、蕙兰和墨兰在主成分 1 中有较多重叠,亲缘关系较近。

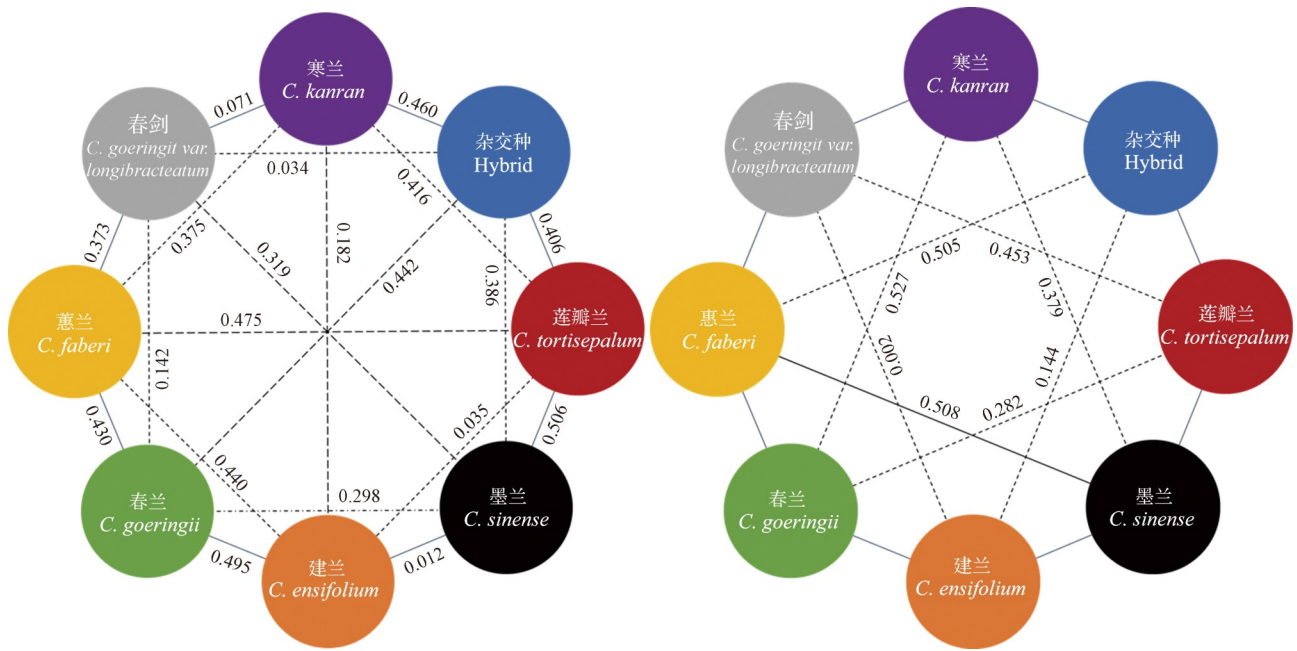


图2 8个种群两两间的遗传分化固定指数(F_{st})

Fig. 2 The F_{st} values of pairwise populations during eight *Cymbidium* cultivars groups

表7 兰属种群间遗传一致度与遗传距离

Table 7 Nei's original measures of genetic identity and genetic distance

种群 Populations	寒兰 <i>C. kanran</i>	杂交种 Hybrid	莲瓣兰 <i>C. tortisepalum</i>	墨兰 <i>C. sinense</i>	建兰 <i>C. ensifolium</i>	春兰 <i>C. goeringii</i>	蕙兰 <i>C. faberi</i>	春剑 <i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>
寒兰 <i>C. kanran</i>		0.9115	0.8854	0.8936	0.9119	0.9119	0.8687	0.8376
杂交种 Hybrid	0.0926		0.9050	0.9000	0.9101	0.9099	0.8953	0.8554
莲瓣兰 <i>C. tortisepalum</i>	0.1217	0.0998		0.9170	0.8504	0.8604	0.8548	0.8815
墨兰 <i>C. sinense</i>	0.1125	0.1053	0.0866		0.8846	0.8632	0.8754	0.8478
建兰 <i>C. ensifolium</i>	0.0922	0.0942	0.1621	0.1226		0.9236	0.8901	0.8569
春兰 <i>C. goeringii</i>	0.0922	0.0944	0.1504	0.1471	0.0795		0.8806	0.8741
蕙兰 <i>C. faberi</i>	0.1408	0.1106	0.1568	0.1331	0.1164	0.1271		0.8542
春剑 <i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>	0.1773	0.1562	0.1261	0.1651	0.1544	0.1346	0.1576	

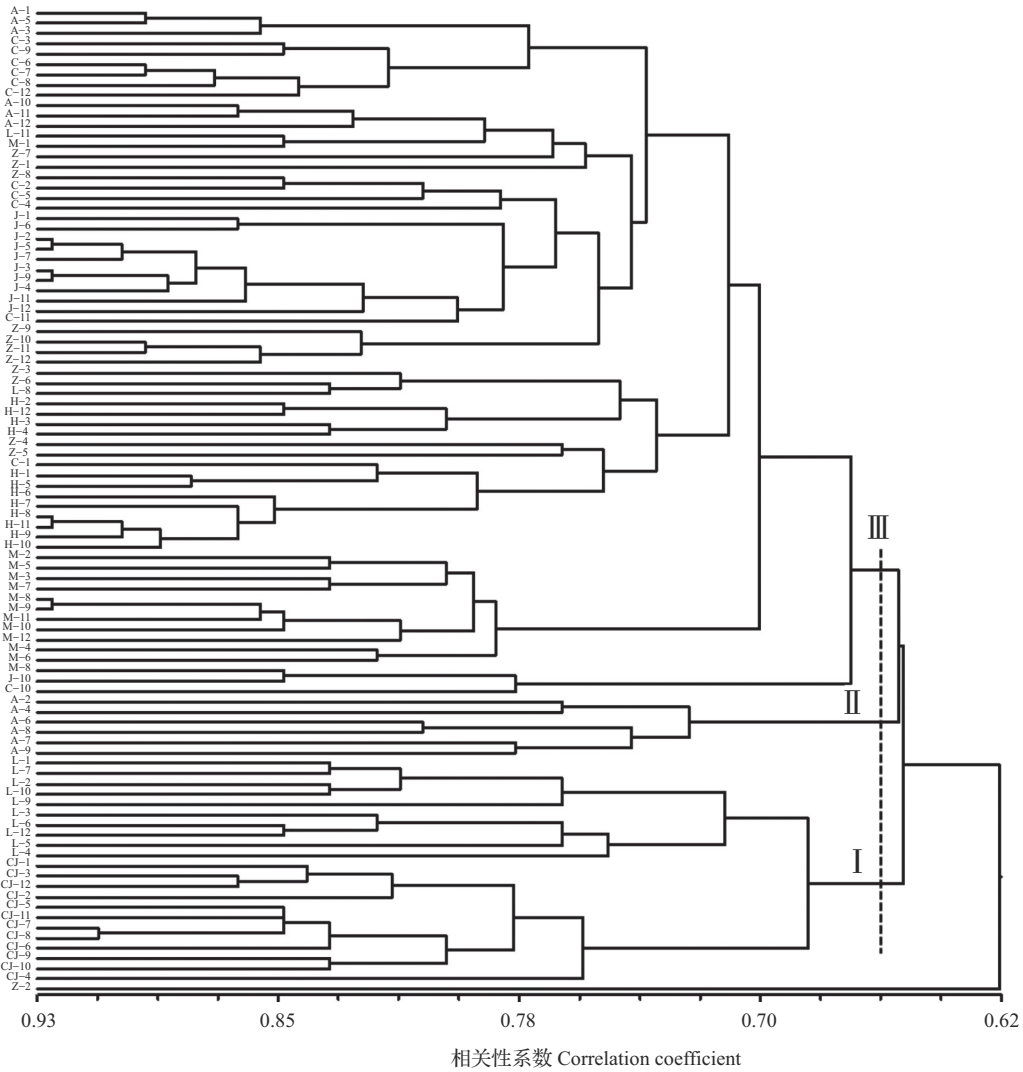
对角线以上为遗传一致度, 对角线以下为遗传距离

Above diagonal is Nei's genetic identity and below diagonal is genetic distance

2.5 指纹图谱构建

从11份引物中筛选出能扩增出5条条带以上且能完全区分所有种质的6条引物, 分别为: UCB811、UCB823、UCB824、UCB827、UCB857、UCB864, 用于指纹图谱的构建。首先建立每份材料的编码信息, 包含种质的属名、种质名称、种质来源以及种质的条带数字信息, 其中条带的数字信息是根据种质在不同引物中的条带位置, 计算该种质在每条引物条带下的0、1矩阵值, 再将该种质6条

引物条带的矩阵值组合成相应的数字信息。以“倩云”为例, 其属名是“寒兰”, 种质名称为“倩云”, 种质来源于浙江, 再与0、1矩阵值组合起来, 它的编码信息为: 寒兰, 倩云, 浙江, 0000000100UCB811, 0110000UCB823, 0010110UCB824, 111000UCB827, 00100110UCB857, 110100UCB864。最后利用在线生成二维码软件 (<http://cli.im/>) 生成96份兰属种质的指纹图谱二维码(图6), 同时二维码底部标注上对应种质名称和种质属名, 便于查找。



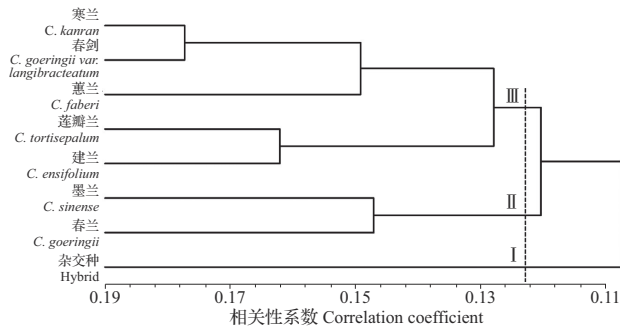
相关系数 Correlation coefficient

编号同表 1

Code is the same as table 1

图 3 96 份兰属种质的 UPGMA 聚类分析

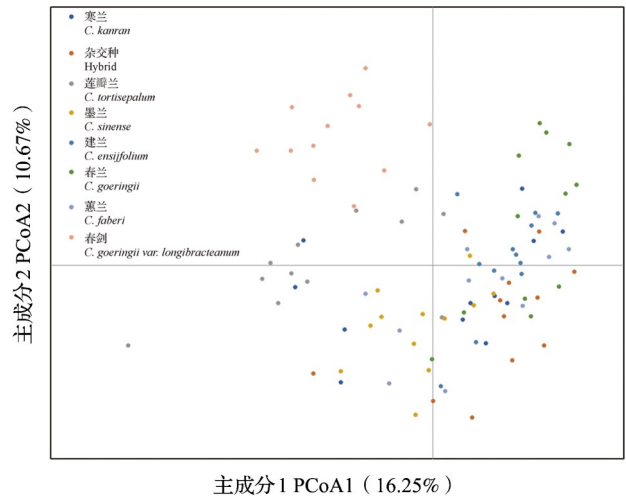
Fig.3 UPGMA clustering of 96 *Cymbidium* cultivars



相关系数 Correlation coefficient

图 4 8 个兰属种群聚类图

Fig.4 UPGMA clustering of 8 *Cymbidium* populations



主成分 1 PCoA1 (16.25%)

主成分 2 PCoA2 (10.67%)

图 5 兰属 8 个种群的主坐标分析

Fig. 5 Principal coordinate analysis of eight *Cymbidium* cultivars groups

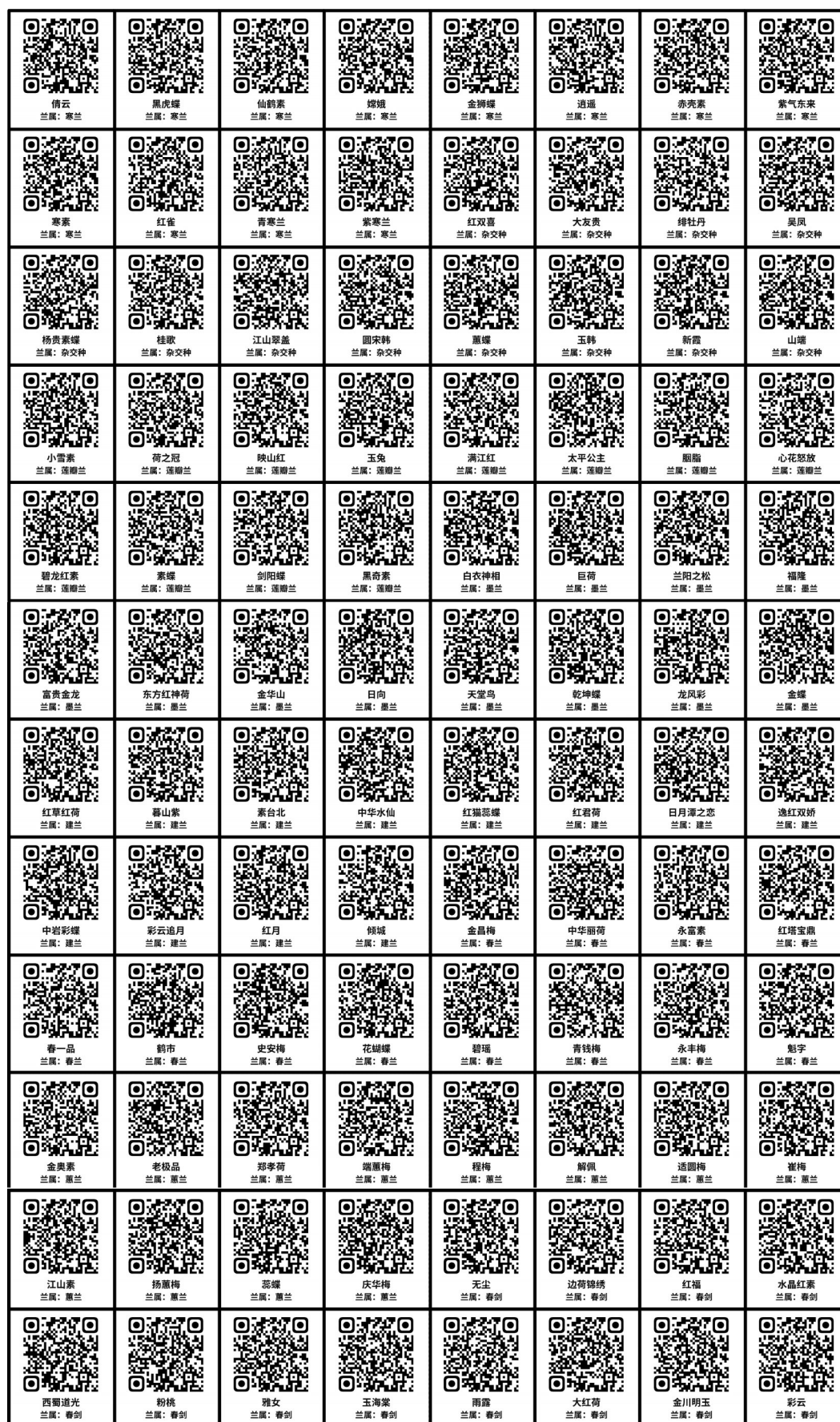


图 6 兰属 96 份种质的二维码

Fig. 6 QR code information of 96 *Cymbidium* germplasm

3 讨论

本研究利用筛选出的 11 条引物在中 96 份材料共检测到 67 个多态性条带。兰属 8 个种群的等位基因数为 1.925, 有效等位基因数为 1.450, Nei's 基因多样性指数为 0.277, Shannon 多样性指数为 0.427, 总多态性位点比例为 92.54%, 其中, 总多态性位点比例高于江西省野生蕙兰^[13] (90.85%) 和湖北省野生春兰^[9] (63.06%); Nei's 基因多样性指数高于江西省野生寒兰^[12] (0.2649) 和浙江省春兰^[10] (0.2241), 低于建兰^[20] (0.584) 等, 说明兰属 8 个种群间的遗传多样性较高, 总体上种群间的遗传多样性高于种群内。可推测出, 兰属种群或因地理位置、生存环境等差异, 在种群间仍保持着较高的遗传多样性, 春兰等种群种质资源表现出丰富的多样性^[21]。

基因流是影响遗传分化的重要因素, Hamrick 等^[22] 研究显示, 基因流 $N_m > 4$ 时, 种群间的基因交换相对充分, 从而抵抗遗传漂变, 防止种群间因遗传漂变而发生遗传分化; 当 $N_m < 1$, 种群间基因交流较少, 种群间因遗传漂变及选择作用而产生遗传分化^[23]。江亚雯等^[12] 认为寒兰 ($N_m = 0.6325$) 是以异交为主的混交类群。高丽等^[9] 认为 11 个春兰居群间一定程度的遗传分化 ($N_m = 0.8828$) 可能是由生境破坏和基因流障碍引起。谢慧敏等^[24] 认为江西省 21 个不同地理位置的春兰居群间遗传分化 ($N_m = 0.9366$) 大于居群内的分化。本研究中, 种群间的平均基因流 N_m 为 1.1619, 接近 1, 说明发生了一定程度的遗传漂变, 各种群间产生了遗传分化。

基因分化度 G_{st} 与 F_{st} 关系密切, 当一个位点只有 2 个等位基因时, 二者相等; 当有多个等位基因时, G_{st} 等于所有等位基因的 F_{st} 的加权平均值^[16], 因此对于 ISSR 标记而言, G_{st} 可与 F_{st} 值进行类比并以此判断种群间遗传分化程度。本研究种群内基因多样性指数 H_s 为 0.1934, 平均遗传分化系数 G_{st} 为 0.3009, 总遗传多样性 H_t 为 0.2767, 8 个种群间的两两 F_{st} 平均值为 0.325 ($F_{st} > 0.05$), 说明种群间遗传分化程度高, 这也与 Popgen 的 F_{st} 计算结果 0.2391 ($F_{st} > 0.05$) 一致。兰属植物多是以异交为主的混交类群^[9], 这与种群间存在一定基因交流的分析结果相符。

彭德镇^[25] 采用 ISSR 分子标记对 390 个春兰的遗传多样性进行了分析, 表明 21 个居群两两之间的遗传一致度和遗传距离的变化范围分别为 0.7769~

0.9685 和 0.0320~0.2971。王宏利等^[11] 通过 UPGMA 法进行聚类分析表明供试材料的遗传相似系数在 0.500~0.953 之间, 揭示了建兰品种间的亲缘关系。本研究 8 个种群的遗传一致度为 0.8376~0.9236, 均值为 0.8825; 遗传距离为 0.0795~0.1773, 均值为 0.1253。吴振兴等^[8] 认为春兰和春剑亲缘关系最近, 墨兰与建兰、蕙兰与莲瓣兰亲缘关系较近。孙叶等^[17] 认为中、日春兰遗传距离较小, 中国春兰蝶花品种和日本春兰品种能分组聚类, 中国春兰正格花品种和中国春兰杂交种聚类在一起。林榕燕等^[26] 对 44 份国兰品种资源进行聚类分析, 其中春兰、春剑、莲瓣兰等品种聚为一类; 墨兰与建兰分别聚为一类。本研究中, Z1 为春兰与豆瓣兰的杂交种, Z2~Z5 为日本选育的春兰, Z6~Z12 为本单位选育的杂交种, 聚类结果中看出, 日本春兰与中国春兰间有遗传距离, 莲瓣兰和春剑的大部分个体被聚类在一起, 春兰、建兰、蕙兰、杂交兰聚类在一起, 部分寒兰单独聚类在一起, 这与主坐标分析结果一致。对兰属种群进行聚类分析, 8 个种群为 3 类, 春兰和墨兰为第 I 类, 寒兰、春剑、蕙兰、莲瓣兰、建兰为第 II 类, 杂交种独为第 III 类, 与其他两类种群之间的遗传距离较大。这与唐源江等^[27]、袁媛等^[28] 认为剑莲兰组与寒蕙兰组亲缘关系最近的结果一致。

本研究利用 ISSR 标记技术对 96 份兰属植物的遗传多样性进行分析并构建指纹图谱, 分析得出兰属种群间的遗传多样性较高, 存在遗传漂变, 并发生遗传分化。基于非加权组平均法, 将春兰和墨兰聚为第 I 类, 寒兰、春剑、蕙兰、莲瓣兰、建兰为第 II 类, 杂交种独为第 III, 与其他两类种群之间的遗传距离较大。研究结果可为兰属资源的保护与开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 徐婉, 林雅君, 赵庄, 周庄. 兰属植物资源与育种研究进展. 园艺学报, 2022, 49(12): 2722-2742
Xu W, Lin Y J, Zhao Z, Zhou Z. Advances in genetic resources and breeding research of *Cymbidium*. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(12): 2722-2742
- [2] 金凤, 李小白, 金亮, 马广莹, 曾庆韬. Genic-SSR 对中国兰的遗传背景分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(1): 183-188
Jin F, Li X B, Jin L, Ma G Y, Zeng Q T. Analysis of genetic background in Chinese *Cymbidiums* by Genic-SSR. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 183-188
- [3] 沈兹哲. 国兰的分子标记开发与应用. 杭州: 浙江大学, 2021
Shen H Z. Development and application of molecular markers in Chinese *Cymbidium*. Hangzhou: Zhejiang University, 2021

- [4] 朱根发, 郭振飞. 重要观赏兰科植物的分子生物学研究进展. 植物学通报, 2004(4): 471-477
Zhu G F, Guo Z F. Progress on molecular biology of main ornamental Orchidaceae. Chinese Bulletin of Botany, 2004 (4): 471-477
- [5] 张成才, 王亚萍, 王开良, 常君, 任华东, 姚小华. 利用SSR构建薄壳山核桃主要品种的分子身份证. 植物遗传资源学报, 2022, 23(6): 1835-1846
Zhang C C, Wang Y P, Wang K L, Chang J, Ren H D, Yao X H. Construction of molecular IDs for major cultivars in Pecan (*Carya illinoensis*) using SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(6): 1835-1846
- [6] 沈奇, 张盾, 臧春鑫, 朱文娟, 齐月, 任梦云, 关潇, 张银东. 基于ISSR分子标记的野生桃儿七遗传多样性研究. 植物遗传资源学报, 2019, 20(1): 129-136
Shen Q, Zhang D, Zang C X, Zhu W J, Qi Y, Ren M Y, Guan X, Zhang Y D. Genetic diversity analysis of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T. S. Ying germplasm accessions using ISSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(1): 129-136
- [7] 黄晓慧, 巫伟峰, 陈春, 张毅智, 汪长水, 徐建球, 陈发兴, 陈孝丑. 中国兰ISSR-PCR反应体系优化及引物筛选. 南方农业学报, 2018, 49(7): 1282-1288
Huang X H, Wu W F, Chen C, Zhang Y Z, Wang Z S, Xu J Q, Chen F X, Chen X C. Optimization and primer screening of ISSR-PCR reaction system for Chinese Orchids. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(7): 1282-1288
- [8] 吴振兴, 王慧中, 施农农, 赵艳. 兰属 *Cymbidium* 植物ISSR遗传多样性分析. 遗传, 2008(5): 627-632
Wu Z X, Wang H Z, Shi N N, Zhao Y. The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR. Hereditas (Beijing), 2008 (5): 627-632
- [9] 高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的ISSR分析. 生物多样性, 2006(3): 250-257
Gao L, Yang B. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. Biodiversity Science, 2006(3): 250-257
- [10] Wang H Z, Wu Z X, Lu J J, Shi N N, Zhao Y, Zhang Z T, Liu J J. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Genetica, 2009, 136(3): 391-399
- [11] 王宏利, 卜朝阳, 曾艳华, 龙蕾宇. 基于ISSR标记的建兰种质资源遗传多样性分析. 热带作物学报, 2021, 42(9): 2526-2534
Wang H L, Bu C Y, Zeng Y H, Long Q Y. Study on genetic diversity of *Cymbidium ensifolium* germplasm based on ISSR marker. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42 (9): 2526-2534
- [12] 江亚雯, 孙小琴, 罗火林, 杨柏云, 熊冬金. 基于ISSR标记的江西野生寒兰居群遗传多样性研究. 园艺学报, 2017, 44(10): 1993-2000
Jiang Y W, Sun X Q, Luo H L, Yang B Y, Xiong D J. Studies on genetic diversity of *Cymbidium kanran* populations from the main mountains in Jiangxi province based on ISSR marker. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(10): 1993-2000
- [13] 帖聪晓, 汤秀菲, 谢慧敏, 杨柏云, 罗火林, 熊冬金. 江西主要山脉野生蕙兰的遗传结构与分化. 分子植物育种, 2023, 21(11): 3669-3680
Tie C X, Tang X F, Xie H M, Yang B Y, Luo H L, Xiong D J. Genetic diversity and differentiation of wild *Cymbidium faberi* Rolfe in the main mountain range of Jiangxi province. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(11): 3669-3680
- [14] 景袭俊, 胡凤荣. 兰科植物分子生物学研究进展. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5835-5848
Jing X J, Hu F R. Research progress on molecular biology of Orchidaceae. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5835-5848
- [15] Qian X, Li Q J, Liu F, Gong M J, Wang C X, Tian M. Conservation genetics of an endangered Lady's slipper orchid: *Cypripedium japonicum* in China. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(7): 11578-11596
- [16] 李菁, 张小飞, 陈珏屹, 吴林钦, 徐玲玲. 基于ISSR分子标记的西藏杓兰种群遗传多样性分析. 西北植物学报, 2020, 40(6): 969-977
Li J, Zhang X F, Chen J Y, Wu L Q, Xu L L. Genetic diversity of *Cypripedium tibeticum* populations revealed by ISSR analysis. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(6): 969-977
- [17] 刘彬, 赵雨露, 杨鑫雷, 张建恒, 孙鑫博, 刘晓清, 温晓敏, 耿艳楼, 李悦有, 穆国俊, 吕玮. 251份藜麦种质资源遗传多样性及分子身份证构建. 植物遗传资源学报, 2022, 23(3): 706-721
Liu B, Zhao Y L, Yang X L, Zhang J H, Sun X B, Liu X Q, Wen X M, Geng Y L, Li Y Y, Mu G J, Lv W. Genetic diversity of 251 germplasm accessions and construction of molecular ID in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(3): 706-721
- [18] 孙泽硕, 蒋冬月, 柳新红, 沈鑫, 李因刚, 屈雨飞, 李永华. 基于SSR标记的42份樱花品种的聚类分析及DNA指纹图谱构建. 园艺学报, 2023, 50(3): 657-668
Sun Z S, Jiang D Y, Liu X H, Shen X, Li Y G, Qu Y F, Li Y H. Cluster analysis and construction of DNA fingerprinting of 42 oriental cultivars of flowering cherry based on SSR markers. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(3): 657-668
- [19] 孙叶, 赵国琦, 袁媛, 张甜, 刘红, 曹宏, 包建忠, 陈秀兰. 96份中、日春兰资源遗传多样性的ISSR分析. 分子植物育种, 2020, 18(5): 1535-1547
Sun Y, Zhao G Q, Yuan Y, Zhang T, Liu H, Cao H, Bao J Z, Chen X L. Genetic diversity ISSR analysis of 96 Chinese and Japanese resources of *Cymbidium goeringii* based on ISSR markers. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(5): 1535-1547
- [20] 艾叶, 陈璐, 谢泰祥, 陈娟, 兰思仁, 彭东辉. 基于SSR荧光标记构建建兰品种核心种质. 园艺学报, 2019, 46(10): 1999-2008

- Ai Y, Chen L, Xie T X, Chen J, Lan S R, Peng D H. Construction of core collection of *Cymbidium ensifolium* cultivars based on SSR fluorescent markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(10): 1999-2008
- [21] 魏晓羽, 刘红, 瞿辉, 李风童, 袁媛, 刘春贵, 马辉, 张甜, 包建忠, 孙叶. 158 份春兰种质资源的表型多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2): 398-411
- Wei X Y, Liu H, Qu H, Li F T, Yuan Y, Liu C G, Ma H, Zhang T, Bao J Z, Sun Y. Phenotypic diversity analysis of 158 *Cymbidium goeringii* germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 398-411
- [22] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 1992, 6(1): 95-124
- [23] Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Bulletin of Mathematical Biology*, 1990, 52(1-2): 241-295
- [24] 谢慧敏, 彭德镇, 陈衍如, 罗火林, 杨柏云, 熊冬金. 江西主要山脉春兰野生居群遗传结构与分化. *植物科学学报*, 2020, 38(1): 123-133
- Xie H M, Peng D Z, Chen Y R, Luo H L, Yang B Y, Xiong D J. Genetic structure and differentiation of wild populations of *Cymbidium goeringii* (Rchb. F.) Rchb. F. in the main mountain range of Jiangxi province China. *Plant Science Journal*, 2020, 38(1): 123-133
- [25] 彭德镇. 江西省野生春兰的 ISSR 遗传多样性研究. 南昌: 南昌大学, 2011
- Peng D Z. Genetic diversity of *Cymbidium goeringii* from Jiangxi province revealed by inter simple sequence repeats. Nanchang: Nanchang University, 2011
- [26] 林榕燕, 罗远华, 樊荣辉, 叶秀仙, 方能炎, 钟淮钦, 黄敏玲. 文心兰杂交后代的 EST-SSR 和 SRAP 分子标记鉴定. *福建农业学报*, 2021, 36(12): 1439-1446
- Lin R Y, Luo Y H, Fan R H, Ye X X, Fang N Y, Zhong H Q, Huang M L. Identification of hybrid progenies from *Oncidium Hybridum* with EST-SSR and SRAP molecular markers. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36(12): 1439-1446
- [27] 唐源江, 曹雯静, 吴坤林. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建. *中国农业科学*, 2015, 48(9): 1795-1806
- Tang Y J, Cao W J, Wu K L. Genetic diversity analysis and molecular identification card construction of chinese *Cymbidium* germplasms based on SRAP markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(9): 1795-1806
- [28] 袁媛, 曹彬, 张咏琪, 陈清西, 陈南川. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析. *热带作物学报*, 2020, 41(5): 929-938
- Yuan Y, Cao B, Zhang Y Q, Chen Q X, Chen N C. Genetic diversity analysis of *Cymbidium* germplasms based on SRAP markers. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(5): 929-938