

DOI:10.11937/bfyy.201705023

# 乌腺金丝桃 ISSR 反应体系的构建及其遗传多样性分析

王霞<sup>1,2</sup>, 徐济贵<sup>1,2</sup>, 王欢<sup>1,2</sup>, 高倩倩<sup>1</sup>

(1. 吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林 吉林 132101)

**摘要:**以 14 份乌腺金丝桃为试材, 采用  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计, 建立并优化乌腺金丝桃的 ISSR-PCR 反应体系, 并利用优化的反应体系分析供试材料间的遗传多样性。结果表明: 20  $\mu$ L ISSR-PCR 反应体系中应含有 *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, dNTPs 0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 模板 DNA 45 ng。从 45 条 ISSR 引物中筛选出 11 条多态性引物, 利用筛选的多态引物对 14 份乌腺金丝桃材料进行了 ISSR 遗传多样性分析, 共扩增出 85 条带, 其中多态性条带 57 条, 占 67.06%; 4 个乌腺金丝桃居群的遗传相似系数介于 0.375 1~0.725 2, 平均值为 0.541 6; 通过 UPGMA 进行聚类分析表明, 14 份材料可分为 3 个类群 4 个亚群。乌腺金丝桃居群间遗传多样性水平明显高于居群内, 其遗传距离与地理距离具有一定的相关性。

**关键词:** 乌腺金丝桃; ISSR 反应体系; 遗传多样性**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)05-0096-06

乌腺金丝桃(*Hypericum attenuatum* Choisy.) 属藤黄科金丝桃属多年生草本植物, 别名野金丝桃、赶

山鞭、红旱莲等, 主要生长在山地、林缘、灌丛和草甸草原, 在吉林省主要分布在长白山区。乌腺金丝桃全草入药, 其味甘、性平, 具有抗菌消炎、安神、镇痛、抗心律失常、抗抑郁、利尿、止血以及增强免疫能力等功效<sup>[1-2]</sup>。目前对乌腺金丝桃的研究多集中于化学成分及临床和药理作用方面, 尤其是对其抗肿瘤和抗病毒作用的研究比较活跃, 其种质资源调查方面的研究目前仅见孟祥丽等<sup>[3]</sup>对黑龙江省乌腺金丝

**第一作者简介:** 王霞(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学及天然产物分离。E-mail: wangxhangji@126.com.

**基金项目:** 长白山重点实验室培育资助项目(吉农院合字[2014]第 s004 号)。

**收稿日期:** 2016-11-29

## Reproduction Characteristics and Rule of *Lilium brownie* var. *viridulum*

LI Rungen, ZENG Qiaoling, LUO Xia

(Department of Life Science and Resource Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

**Abstract:** *Lilium brownie* var. *viridulum* from Wanzai was used as test material. The effect of stigma receptivity, hybrid index(OCI) and pollination way on setting seeds was studied, and pollen tube extension was observed by fluorescence. The results showed that *Lilium brownie* var. *viridulum* could be pollinated in a long period of 10 days from the day before that flowering to 10 days later, specially during 4-6 days after blooming. The pollen germinating rate was the highest during 1-3 days after blooming. Pollen-ovule(P/O) was from 3 673 to 4 670 and OCI was 5. Due to the breeding system of the obligate outcrossing, the pollination medium was necessary for *Lilium brownie* var. *viridulum* to lead to the successful pollination. Pollens from the same flowers were accepted and grew seeds. Pollination by cutting stigma contributed to the reproduction.

**Keywords:** *Lilium brownie* var. *viridulum*; breeding system; pollination; pollen tube

桃资源学调查 1 例,而关于乌腺金丝桃遗传多样性的研究则尚鲜见报道。近年来,随着乌腺金丝桃的生物化学成分和药用价值逐渐被人们认识,市场需求量急剧增加,与此同时,随着开荒伐林的范围加大,乌腺金丝桃野生资源遭到了严重破坏,因此乌腺金丝桃优良品种的挖掘、保护和选育成了当前亟需解决的问题。

目前,物种遗传多样性的研究多采用 DNA 分子标记技术手段来完成,它可以直接在 DNA 水平上检测物种间的遗传变异,与传统的形态、细胞、生化标记相比,是一种更为理想的遗传标记形式<sup>[4-5]</sup>。常见的 DNA 分子标记技术有 AFLP、ISSR、RAPD、SSR、SRAP、SCoT 等<sup>[6]</sup>。ISSR DNA 分子标记技术是由加拿大蒙特利尔大学 ZIETKIEWICZ 等<sup>[7]</sup>于 1994 年在 SSR 技术的基础上发明的,其核心技术是 PCR,扩增的片段是 SSR 之间的序列。由于 SSR 序列广泛存在于基因组中,在生物体中变异速度快,因此很容易检测到基因组许多位点的差异。ISSR 分子标记技术结合了 RAPD 技术的优点,克服了 SSR 和 RAPD 等标记技术的一些缺点,具有操作简单、检测快速、灵敏度高、特异性强、成本低,试验重复性强等优点,现已被广泛应用于物种遗传多样性分析、种质

鉴定、遗传图谱构建以及辅助遗传育种等研究领域<sup>[8]</sup>。该试验采用 ISSR 分子标记技术对 4 份乌腺金丝桃居群间及其单株的遗传多样性进行分析,以期为乌腺金丝桃种质资源保存和良种繁育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

共采集 14 份材料,包括吉林省白山市抚松县露水河镇 2 个单株(BS1、BS2),吉林市左家自然保护区 5 个单株(ZJ1、ZJ2、ZJ3、ZJ4、ZJ5),吉林农业科技学院校园 5 个单株(NY1、NY2、NY3、NY4、NY5),黑龙江省海林市 2 个单株(HL1、HL2),其中 NY 是从左家自然保护区移栽到校园内生长 5 年的单株,供试材料生境见表 1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 乌腺金丝桃基因组 DNA 的提取 采用北京艾莱德生物科技有限公司的新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取乌腺金丝桃基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 的完整性,用超微量紫外可见分光光度计分析 DNA 的浓度和纯度,将基因组 DNA 浓度调至  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

表 1 乌腺金丝桃样品生境信息

Table 1 Samples habitat information of *Hypericum attenuatum*

居群 Population	东经 East longitude	北纬 North latitude	海拔 Elevation/m	生境 Biotores
吉林农业科技学院校园(NY)	126°28'25.86"	43°57'10.89"	226	平原
吉林市左家自然保护区(ZJ)	126°06'11.54"	44°02'56.68"	340	山坡、林缘
黑龙江省海林市(HL)	129°22'23.37"	44°35'29.81"	560	草坡
吉林省白山市抚松县露水河镇(BS)	127°47'1.08"	42°31'0.05"	735	草坡

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 为确定乌腺金丝桃 ISSR-PCR 的最佳反应体系,对影响反应体系的 5 个主要因素(*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $\text{Mg}^{2+}$ 、引物和模板 DNA 浓度)按照  $L_{45}$  ( $4^5$ ) 表进行 5 因素 4 水平正交实验(表 2)。以 NY1 基因组为模板,以 UBC836 为引物,采用  $20 \mu\text{L}$  的 ISSR-PCR 反应体系,体系中除含有考察的 5 个组分外,还含有  $1 \times \text{PCR}$  buffer,其余由  $\text{ddH}_2\text{O}$  补充。反应程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min; $94^\circ\text{C}$  变性 1 min, $49.2 \sim 53.6^\circ\text{C}$  (不同引物退火温度不同,见表 3)退火 45 s, $72^\circ\text{C}$  延伸 2 min,42 个循环; $72^\circ\text{C}$  再延伸 10 min; $4^\circ\text{C}$  保温。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,电压为  $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,电泳后在凝胶成像系统观察扩增条带,根据条带强弱、数量以及清晰度寻找最佳反应条件。

1.2.3 引物的筛选及条带统计分析 采用上述优化的 ISSR-PCR 反应体系,根据哥伦比亚大学 UBC 公司公布的 ISSR 引物序列,对生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 45 条引物进行筛选,选出扩增条带清晰、多态性强、可重复的引物用于乌腺金丝桃遗传多样性分析。

### 1.3 项目测定

记录筛选引物 ISSR-PCR 的电泳条带,将其转化成二元数据,有带的记为 1,无带的记为 0。

### 1.4 数据分析

利用 NTSY-pc2.1 软件计算不同来源乌腺金丝桃间的遗传相似系数,应用类平均聚类法(UPGMA)作聚类分析。

表 2

ISSR-PCR 正交实验设计

Table 2

Orthogonal design for ISSR-PCR

水平 Level	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase/U	dNTPs /(mmol · L <sup>-1</sup> )	因素 Factor Mg <sup>2+</sup> /(mmol · L <sup>-1</sup> )	引物浓度 Primer concentration/(μmol · L <sup>-1</sup> )	DNA 模板 DNA template/ng
1	0.5	0.2	1.5	0.2	30
2	0.5	0.3	2.0	0.3	35
3	0.5	0.4	2.5	0.4	40
4	0.5	0.5	3.0	0.5	45
5	1.0	0.2	2.0	0.4	45
6	1.0	0.3	1.5	0.5	40
7	1.0	0.4	3.0	0.2	35
8	1.0	0.5	2.5	0.3	30
9	1.5	0.2	2.5	0.5	35
10	1.5	0.3	3.0	0.4	30
11	1.5	0.4	1.5	0.3	45
12	1.5	0.5	2.0	0.2	40
13	2.0	0.2	3.0	0.3	40
14	2.0	0.3	2.5	0.2	45
15	2.0	0.4	2.0	0.5	30
16	2.0	0.5	1.5	0.4	35

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验结果

由图 1 可知,16 个正交处理组合均有扩增条带,但条带数量、强弱及清晰度差异显著,组合 1、2、7、16 仅有 1 条扩增条带,组合 3、4、6、8、9、10、11、12、13、14、15 有 2~4 条带不等,条带较弱,处理组合 5 扩增效果较好,有 6 条扩增带,多态性高,条带清晰,为最佳反应体系。

### 2.2 引物筛选及扩增产物的多态性

45 条引物中,有 11 条引物可扩增出清晰、明亮、多态性较好的条带,11 条引物的退火温度介于 49.2~53.6℃,平均退火温度为 52.3℃(表 3),11 条引物扩增条带大小 200~1 600 bp 不等(图 1、2),共扩增出 85 条带,多态性条带 57 条,平均每条引物扩增多态性条带数为 5.19 条,多态性条带百分率为 67.06%,其中多态性最高的是引物 UBC807,共扩增出 11 条带,多态条带百分率为 100.00%(图 2)。

表 3

ISSR 引物及其扩增结果

Table 3

ISSR primers and their amplification results

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing emperature/℃	扩增总条带数 No. of bands/条	多态性条带数 No. of polymorphic bands/条	多态条带百分率 Percentage of polymorphic bands/%
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T	52.3	11	11	100.00
UBC816	(CA) <sub>8</sub> T	52.3	6	4	66.67
UBC822	(TC) <sub>8</sub> A	52.5	5	3	60.00
UBC823	(TC) <sub>8</sub> C	53.6	8	5	62.50
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	51.5	9	6	66.67
UBC836	(AG) <sub>8</sub> YA	52.0	11	8	72.73
UBC842	(GA) <sub>8</sub> YG	53.2	6	5	83.33
UBC844	(CT) <sub>8</sub> RC	53.2	8	4	50.00
UBC855	(AC) <sub>8</sub> YT	51.5	6	4	66.67
UBC864	(ATG) <sub>8</sub>	49.2	7	3	42.86
UBC900	ACTTCC(CA) <sub>2</sub> GGTTAA(CA) <sub>2</sub>	53.6	8	4	50.00
总数 Total			85	57	

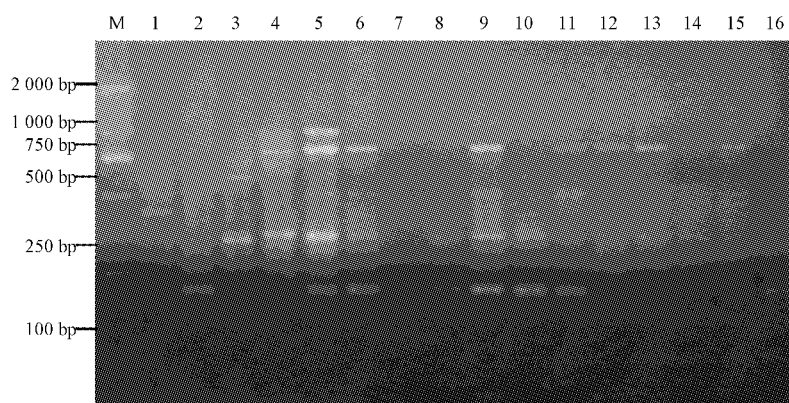
注:R=A/G;Y=C/T。

Note:R=A/G;Y=C/T。

### 2.3 基于 ISSR-PCR 的遗传多样性分析

根据 11 条引物扩增的 ISSR-PCR 电泳条带转化的二元数据计算不同地区乌腺金丝桃的遗传相似

系数和遗传距离,由表 4 可知,4 个地区乌腺金丝桃间遗传相似系数分布在 0.375 1~0.725 2,平均值为 0.541 6,遗传距离在 0.275 2~0.625 4,平均值为



注:M为DNA Marker,下同;1~16为正交实验中的16个处理。

Note:M,DNA Marker,the same below;1-16. The 16 treatments of orthogonal test.

图1 ISSR-PCR 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of ISSR-PCR

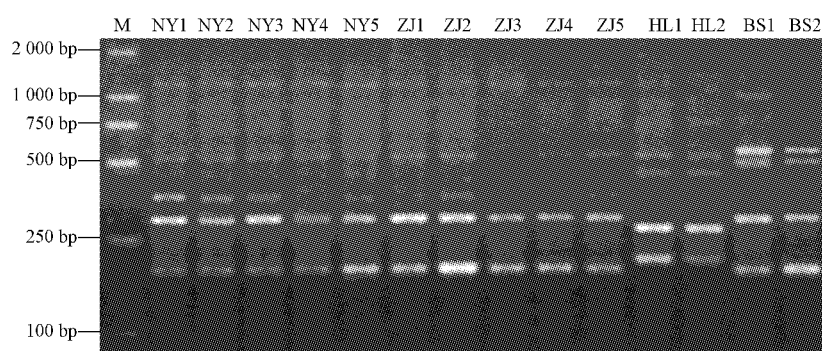


图2 引物 UBC807 的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of primer UBC807

表4 4个乌腺金丝桃居群的遗传相似系数和遗传距离

Table 4 Genetic similarity coefficient and genetic distance of 4 populations of *Hypericum attenuatum*

乌腺金丝桃 <i>Hypericum attenuatum</i>	NY	ZJ	HL	BS
NY	—	0.725 2	0.412 3	0.602 3
ZJ	0.275 2	—	0.522 2	0.612 2
HL	0.588 6	0.478 1	—	0.375 1
BS	0.397 9	0.388 3	0.625 4	—

注:上部分数据为遗传相似系数,下部分为数据为遗传距离。

Note:Updata mean genetic similarity coefficient and underdata mean genetic distance.

0.446 9,NY和ZJ间的遗传相似系数最大(0.725 2),遗传距离最小(0.275 2),HL和BS的遗传相似系数最小(0.375 1),遗传距离最大(0.625 4)。4个乌腺金丝桃居群的UPGMA聚类分析如图3所示,可见乌腺金丝桃可分为3个类群:第1个类群是NY和

ZJ,二者亲缘关系最近,说明由山区移栽到平原驯化并没有引起大的遗传变异;第2个类群是BS,第3个类群是HL,其中BS与第一类的亲缘关系较HL与第一类的亲缘关系近,说明地理位置的远近对乌腺金丝桃的遗传变异有较大影响。

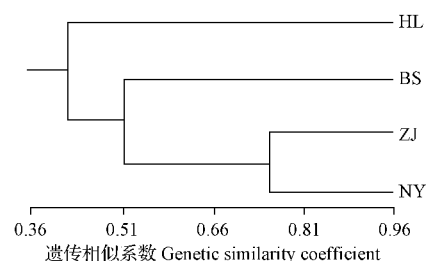


图3 4个乌腺金丝桃居群的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis for 4 populations of *Hypericum attenuatum*

根据样品间的遗传相似系数对 14 个乌腺金丝桃单株进行 UPGMA 聚类分析,由图 4 可知,以 0.497 为阈值,可将 14 份单株分为 3 个类群,第 1 个群又可以分为 2 个亚群,分别由 5 个 NY 单株和 5 个 ZJ 单株组成,第 2 个群由 2 个 HL 单株组成,第 3 个类群由 2 个 BS 单株组成。居群内有些个体遗传相似性很高,如 NY3 与 NY1、HL1 与 HL2 等,也有些单株间遗传相似性较低,如 ZJ4 与 ZJ3 等,说明个体间的遗传变异并不完全由地理距离决定。

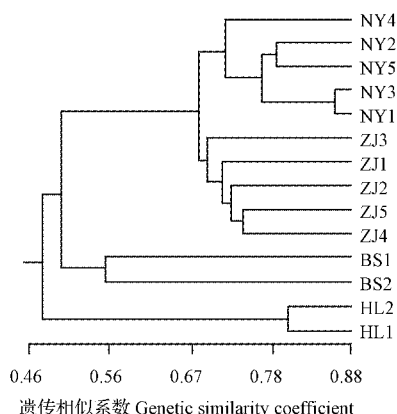


图 4 乌腺金丝桃 14 株个体的聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis for 14 individuals of *Hypericum attenuatum*

表 5

吉林省野生乌腺金丝桃资源调查地点

Table 5

Survey sites of wild *Hypericum attenuatum* resources in Jilin Province

序号 No.	市/州 City/Prefecture	具体地点 Specific location
1	吉林市	船营区锅顶山、左家自然保护区、磐石市牛心镇兴隆村、九站开发区长虫山等、永吉县(五里河镇小河沿村、西洋镇兴隆村)
2	通化市	柳河县(圣水镇康石村、大青山、孤山子镇西大石头村、时家店乡长兴村)、通化县(二密镇、果松镇)
3	白山市	浑江区(北山公园、青山湖)、江源区(通天沟、砬子镇西煤山)、临江市(卧虎山、猫儿山)、七道江村红旗三队、八道江区北山
4	延边朝鲜族自治州	珲春市潘家沟屯、辽源市东丰县车丰镇忠厚村、汪清县(汪清镇、复兴镇)

### 3.3 乌腺金丝桃的遗传变异

为了乌腺金丝桃种质资源的可持续利用与保存和新品种的培育,课程组成员对采集的野生乌腺金丝桃、驯化 5 年的 NY 和黑龙江医药大学馈赠的 HL 4 个居群 14 个单株进行了遗传多样性分析。从 45 条引物中筛选出 11 条多态性强的引物,共扩增出 85 条带,其中多态条带 57 条,多态条带百分率为 67.06%,可见利用 ISSR 技术分析乌腺金丝桃的遗传多样性是有效且可行的。居群内遗传多样性分析表明地理较近的居群遗传距离也比较近,聚类分析也表明,地理位置较近的居群聚在一起,说明乌腺金丝桃的亲缘关系与地理位置有一定的相关性,这可能是由于

## 3 讨论

### 3.1 ISSR-PCR 反应体系的优化

不同物种的 ISSR-PCR 最佳反应体系不同,反应体系的优化是利用 ISSR 分子标记技术分析物种遗传多样性的前提。目前,ISSR-PCR 反应体系的优化方法主要有单因素梯度试验和正交优化实验 2 种,前者操作繁杂,侧重于考察某一单一因素对 PCR 反应体系的影响,后者根据统计学的原理,不仅减少了试验次数,降低了试验成本,同时还兼顾了各因素之间的相互作用,可以快速寻找到 ISSR-PCR 的最佳反应体系<sup>[9-10]</sup>。该试验在前人的研究基础上<sup>[11-14]</sup>,首次采用正交实验对影响乌腺金丝桃 ISSR-PCR 反应体系的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、引物和 DNA 模板的浓度进行 4 水平正交优化实验,获得了最佳的反应体系,即 20  $\mu$ L 反应体系中含有 *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, dNTPs 0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, DNA 模板 45 ng。

### 3.2 长白山区乌腺金丝桃种植资源调查

该试验原旨在利用 ISSR 分子标记技术研究长白山区乌腺金丝桃的遗传多样性,课题组成员先后在吉林省吉林市、通化市、白山市和延边州 24 个地区寻找野生乌腺金丝桃资源(表 5),最终除了在左家自然保护区找到乌腺金丝桃外,只在白山市露水河镇采到 2 株乌腺金丝桃。

地理位置较近,生长环境及气候因子相似或种植资源相似导致,该研究结果与任凤鸣等<sup>[15]</sup>、李卫星等<sup>[16]</sup>的研究结果一致,但与汤正辉等<sup>[17]</sup>、周冬琴等<sup>[18]</sup>的研究结果不同,他们分别发现河南连翘与墨西哥落羽杉居群间的亲缘关系与地理位置远近没有明显的相关性,这说明物种的遗传变异是受多因素影响产生的。14 个单株的聚类分析表明相同居群的单株大多能聚在一起,个别居群内单株间出现遗传变异,可能是由于种群间基因交流较多导致,同时也说明遗传变异与地理位置远近没有严格的相关性。

当然,由于试验所取样本较少,对乌腺金丝桃遗传多样性的分析有一定的影响,下一步将扩大乌腺

金丝桃的取材范围,对乌腺金丝桃的遗传多样性进行更为精确地分析,为乌腺金丝桃种植资源保护、核心种质筛选以及优良新品种培育奠定基础。

### 参考文献

- [1] 李冀,吴全娥,高彦宇,等.鼠海马单胺类神经递质含量 5-HT 及 5-HIAA 的影响[J].中医药信息,2012,29(5):18-20.
- [2] 李冀,曹明明,高彦宇.乌腺金丝桃与丹参配伍对心肌缺血模型动物影响的研究[J].中医药学报,2012,40(1):17-19.
- [3] 孟祥丽,赵玉佳,徐艳敏,等.黑龙江省乌腺金丝桃资源学调查[J].中国野生植物资源,2014,33(3):56-57.
- [4] 张艳艳,郭庆梅,周凤琴,等.分子标记技术在木瓜属种质资源研究中的应用[J].辽宁中医药大学学报,2015,7(12):60-62.
- [5] 白玉.DNA 分子标记技术及其应用[J].安徽农业科学,2007,35(24):7422-7424.
- [6] 牛俊海,黄少华,冷青云,等.分子标记技术在红掌研究中的应用与展望[J].分子植物育种,2015,13(6):1424-1432.
- [7] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2):176-183.
- [8] 王超,张智勇,陈永胜,等. ISSR 分子标记技术及其在蓖麻遗传育种中的应用[J].黑龙江农业科学,2012(9):14-17.

- [9] 邓汉超,王学林,李筠,等.正交优化水稻 ISSR 种质鉴定技术研究[J].中国种业,2012(12):48-50.
- [10] 刘楠楠,薛运波,王志,等.蜜蜂遗传多样性研究的 RAPD-PCR 反应体系的正交优化[J].吉林畜牧兽医,2011,9(32):4-7.
- [11] 吴生,熊宇婷,谢砚,等.正交设计优化翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系[J].中草药,2011,42(5):976-979.
- [12] 靳晓丽,田新会,杜文华.鹰嘴豆 ISSR 应体系的正交优化[J].草地学报,2015,23(6):1303-1309.
- [13] 唐辉,陈宗游,史艳财,等.正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系[J].中草药,2013,44(5):610-615.
- [14] 赵博,李景剑,符支宏,等.正交设计优化大旗瓣凤仙 ISSR-PCR 反应体系[J].南方农业学报,2014,45(2):184-188.
- [15] 任凤鸣,金江群,焦雁翔,等.中药金钱草种质资源的 ISSR 遗传多样性研究[J].中国药理学杂志,2015,50(15):1277-1281.
- [16] 李卫星,花艳敏,张秀萍,等.银杏雄株 ISSR 分子标记及亲缘关系分析[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2015,36(1):101-106.
- [17] 汤正辉,祝亚军,谭晓风,等.河南连翘种群遗传多样性的 ISSR 分析[J].中南林业科技大学学报,2013,33(8):32-37.
- [18] 周冬琴,莫海波,芦治国.基于 SRAP 标记的墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性分析[J].植物资源与环境学报,2012,21(1):36-41.

## Establishment of ISSR Reaction System and Genetic Diversity Analysis of *Hypericum attenuatum* Choisy.

WANG Xia<sup>1,2</sup>, XU Jize<sup>1,2</sup>, WANG Huan<sup>1,2</sup>, GAO Qianqian<sup>1</sup>

(1. College of Biological Engineering, College of Jilin Agriculture Science and Technology, Jilin, Jilin 132101; 2. Key Laboratory of Changbai Mountain Animal and Plant Resources' Utilization and Protection of Universities in Jilin Province, Jilin, Jilin 132101)

**Abstract:** Fourteen *Hypericum attenuatum* were used as materials, the ISSR-PCR reaction system was established and optimized by  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design. The genetic diversity of *Hypericum attenuatum* was analyzed by the optimal reaction system. The results showed that the optimum reaction system contained 1.0 U *Taq* DNA polymerase,  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs,  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$  and 45 ng DNA template respectively in a  $20 \mu\text{L}$  ISSR reaction system. Eleven polymorphic primers which were used to analyze the genetic diversity of *Hypericum attenuatum* were selected from 45 ISSR primers. A total of 85 bands were amplified, of which 57 bands were polymorphic loci and the percentage of total polymorphic loci was 67.06%. The genetic similarity coefficient was 0.375 1—0.725 2 in 4 populations of *Hypericum attenuatum*, and the average was 0.541 6. The clustering analysis was constructed by UPGMA method based on the genetic identity and 14 *Hypericum attenuatum* materials were clustered into 3 main groups and 4 subgroups. The level of genetic diversity of *Hypericum attenuatum* between populations was higher than that within populations and between the genetic distance and geographic distance had a certain correlation.

**Keywords:** *Hypericum attenuatum*; ISSR reaction system; genetic diversity