

基于 SSR 标记的西南地区野生带叶兜兰资源遗传多样性分析

徐言^{1,2}, 陈之光², 徐玉凤², 葛红², 杨树华², 赵鑫², 寇亚平²,
于晓南^{1*}, 贾瑞冬^{2*}

1. 北京林业大学园林学院/花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室/国家花卉工程技术研究中心/城乡生态环境北京市实验室, 北京 100083; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业农村部花卉生物学与种质创制重点实验室(北方), 北京 100081

摘要: 带叶兜兰 [*Paphiopedilum hirsutissimum* (Lindl. ex Hook. f.) Stein] 具有较高的观赏价值, 是中国珍稀濒危保护植物。为了研究中国西南地区野生带叶兜兰资源的遗传特性, 促进野生带叶兜兰资源的保护和利用, 本研究利用 SSR 分子标记技术对中国西南地区广西、云南、贵州 3 省(区) 收集的 6 个居群 190 份带叶兜兰资源进行遗传多样性和群体遗传结构分析。结果表明: 从 115 对引物中共筛选出 10 对扩增效果好的引物, 10 对 SSR 引物在 190 份带叶兜兰中共检测到 50 个等位基因, 平均每个位点等位基因 (N_a) 为 5 个, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 2.4835 个; 平均 Shannon 信息指数 (I) 为 0.8592, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.4518; 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.4387, 平均 Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.4370, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.3996。6 个野生带叶兜兰居群的 N_a 为 2.8000~4.3000, N_e 为 1.9655~2.4060, H_o 为 0.3891~0.4839, H_e 为 0.3795~0.4683, Shannon 信息指数 (I) 为 0.6584~0.8369, Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.3648~0.4382。广西雅长 (GYC) 和贵州万峰湖 (QWF) 居群具有较高的遗传多样性 ($h=0.4382$, $h=0.4276$), 广西木论 (GML) 居群具有最低的遗传多样性 ($h=0.3648$)。分子方差分析 (AMOVA) 结果表明, 遗传变异主要发生在居群内个体间 (94%), 而居群内遗传分化很小 (6%)。基于遗传距离构建的 UPGMA 聚类分析结果显示, 6 个居群遗传距离较小, 居群间遗传距离和地理位置不完全相关。Structure 和主坐标分析结果表明, 居群间存在均质化现象, 无明显类群划分。综上, 带叶兜兰资源遗传多样性较为丰富, 研究结果可为中国西南地区野生带叶兜兰资源的保护和利用提供理论依据。

关键词: 带叶兜兰; 野生居群; SSR 标记; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Genetic Diversity of Wild *Paphiopedilum hirsutissimum* Populations in Southwest China with SSR Markers

XU Yan^{1,2}, CHEN Zhiguang², XU Yufeng², GE Hong², YANG Shuhua², ZHAO Xin², KOU Yaping²,
YU Xiaonan^{1*}, JIA Ruidong^{2*}

1. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University / Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding / National Engineering Research Center for Floriculture / Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 100083, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Flower Crops (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China

Abstract: *Paphiopedilum hirsutissimum* (Lindl. ex Hook. f.) Stein is a rare and endangered plant in China with high ornamental value. In order to explore the genetic characteristics of wild *P. hirsutissimum* resources in Southwest China, and contribute to the protection and utilization of the wild resources, this study used SSR molecular marker to analyze

收稿日期 2022-12-20; 修回日期 2023-01-31

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFD1200200)。

作者简介 徐言 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰花种质资源与遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 于晓南 (YU Xiaonan), E-mail: yuxiaonan626@126.com; 贾瑞冬 (JIA Ruidong), E-mail: jiaruidong@caas.cn。

the genetic diversity and population genetic structure of 190 *P. hirsutissimum* resources which collected from six populations in Guangxi, Yunnan and Guizhou provinces in Southwest China. In this study, the results showed that ten pairs of primers with good amplification effect were selected from 115 pairs of primers, and 50 alleles were detected by 10 pairs of SSR primers of 190 *P. hirsutissimum*. The average number of alleles (N_a) was five and the average number of effective alleles (N_e) was 2.4835. The average Shannon information index (I) was 0.8592. The average observed heterozygosity (H_o) was 0.4518 and the average expected heterozygosity (H_e) was 0.4387. The average polymorphic information content (PIC) was 0.3996 and the average Nei's expected heterozygosity (h) was 0.4370. In this six wild *P. hirsutissimum* populations, the number of alleles (N_a) was from 2.8000 to 4.3000. The number of effective alleles (N_e) was from 1.9655 to 2.4060. The observed heterozygosity (H_o) was from 0.3891 to 0.4839. The expected heterozygosity (H_e) was from 0.3795 to 0.4683. The Shannon information index (I) was from 0.6584 to 0.8369, and the Nei's expected heterozygosity (h) was from 0.3648 to 0.4382. In the six wild populations, the genetic diversity of Guangxi Yachang (GYC) and Guizhou Wanfeng Lake (QWF) populations was generally higher ($h=0.4382$, $h=0.4276$), while the genetic diversity of Guangxi Mulun (GML) population was relatively low ($h=0.3648$). Analysis of molecular variance (AMOVA) results showed that genetic variation mainly occurred among individuals within the population (94%), while genetic differentiation within populations was very small (6%). UPGMA cluster analysis based on genetic distance showed that the genetic distance of the six *P. hirsutissimum* populations was very small, there was no obvious group division and the genetic distance was not completely related to the geographical location. The results of Structure and principal coordinate analysis were consistent with those of UPGMA cluster analysis. Structure and principal coordinate analysis results showed that there was homogenization among the populations, and there was no obvious group division. In summary, the genetic diversity of *Paphiopedilum hirsutissimum* resources is relatively rich, which can provide a theoretical basis for the protection and utilization of wild *P. hirsutissimum* resources in Southwest China.

Keywords: *Paphiopedilum hirsutissimum*; wild populations; SSR; genetic diversity; genetic structure

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.009

带叶兜兰 [*Paphiopedilum hirsutissimum* (Lindl. ex Hook. f.) Stein] 为兰科 (Orchidaceae), 杓兰亚科 (Subfam. Cypripedioideae) 兜兰属 (*Paphiopedilum* Pfitz.) 植物, 自然花期 3—5 月, 主要分布于中国、印度东北部、越南、老挝和泰国, 其中在中国分布于广西北部至西部、贵州西南部、云南东南部等地^[1]。由于生境破坏、过度采集和非法贸易等情况严重, 使带叶兜兰野生资源遭受严重的威胁。目前带叶兜兰野生种已被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》(CITES) 附录 I 的保护范围, 绝对禁止在国际上贸易^[2-4]。它还被收录于《中国高等植物红色名录》, 评估等级为易危 (VU), 且有野生带叶兜兰居群呈现破碎化现象的报道^[5-6]。此外带叶兜兰是一个变异幅度很大的种, 在花的结构上有很多变化^[1]。因此, 利用分子技术对带叶兜兰野生资源及其遗传状况进行研究具有重要的意义。

分子标记技术在兰科植物研究中已被广泛使用。在兜兰属植物研究中, 有基于 ITS 序列^[7-8]、RAPD^[9]和 SRAP^[10]标记的种间亲缘关系及其分类归属研究, 有基于 cpDNA^[11]分子标记的系统进化研究, 有基于转录组数据开发 SSR 引物^[12-13]的研究, 以及基于 SRAP^[14-16]、ISSR^[16-18]和 SSR^[12]

标记的遗传多样性研究, 其中关于带叶兜兰的研究报道较少, 仅见基于 SRAP 标记对广西木论自然保护区的 40 份野生带叶兜兰资源^[14]和基于 SSR 标记对广西雅长自然保护区的 32 份野生带叶兜兰资源进行遗传多样性研究的报道^[12]。中国西南地区的云南、贵州和广西 3 个省 (区) 均为中国带叶兜兰的主要分布地区, 而只有以上 2 篇研究广西地区带叶兜兰单居群遗传多样性的文献, 涉及的采集样本均有一定的地域局限性, 且未涵盖多居群和群体结构研究, 不足以反映中国带叶兜兰资源的遗传水平。

SSR 简单重复序列 (SSR) 又称为微卫星 (microsatellites) 或者串联重复序列 (STR), 由 1~6 个碱基为重复单位组成的短串联重复序列, 它广泛、丰富且随机地分布于真核生物基因组中^[19]。SSR 标记具有数量多、分布广、多态性高、重复性好、共显性和易检测等特点, 已经成为研究种群遗传多样性和遗传结构的最有效分子标记之一^[20]。

本研究以云南、贵州和广西的 6 个野生带叶兜兰居群为研究材料, 在已发表的带叶兜兰表型多样性研究的基础上^[21], 利用 SSR 标记技术对其进行遗传多样性分析和群体结构分析, 并综合分析表型数据和分子数据, 以期为中国西南地区野

生带叶兜兰的资源保护工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

根据网上搜索、相关文献记载和实地踏查情况,采集来源于带叶兜兰天然分布区内广西、云南和贵州 3 省(区)的 6 个野生居群,共计 190

份样品,具体采样信息见表 1 和图 1。其中在广西木论(GML)和云南柳井(YDZ)居群带叶兜兰分布范围较窄,数量较少,因此采集到的样本数量也相对较少。采样标准为居群间的地理距离大于 10 km,株间距大于 10 m,且无病虫害。每个单株采集新鲜叶片放入装有变色硅胶的塑料自封袋中,干燥备用。

表 1 6 个居群的采样信息
Tab. 1 Sample information of six populations

居群(简称) Population system (abbreviation)	采样地点 Collection site	样品数量 Sample quantity	样品编号 Sample No.
GML	广西壮族自治区环江县木论乡	13	GML 01-13
GYC	广西壮族自治区乐业县雅长乡	39	GYC 01-39
YDZ	云南省文山州文山县柳井彝族乡	9	YDZ 01-09
YFD	云南省文山州西畴县法斗乡	40	YFD 01-40
QWF	贵州省安龙县万峰湖镇	58	QWF 01-58
QJS	贵州省兴义市桔山镇	31	QJS 01-31

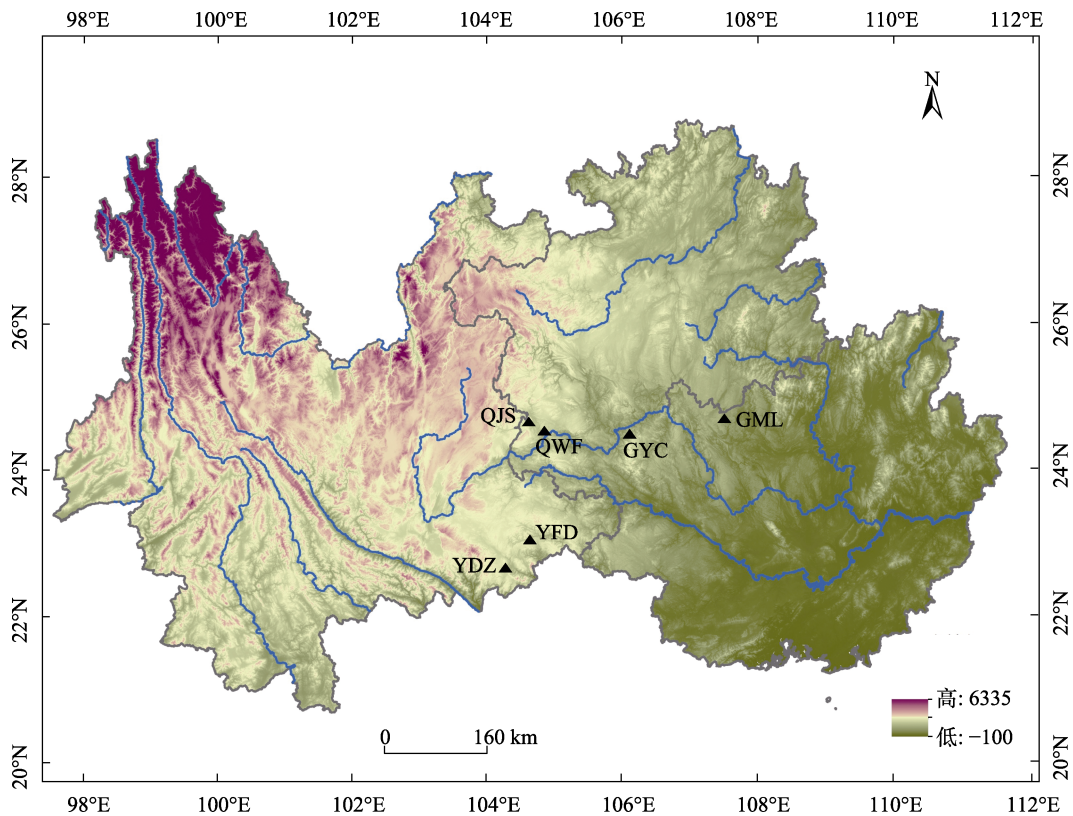


图 1 样品采集点分布图

Fig. 1 Geographic distribution of sample locations

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 的提取参照本实验室改良后的亨利兜兰基因组 CTAB 提取方法进行^[22]。获取的基因组 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度和完整性,并用 Nanodrop 2000 微量

分光光度计(Thermo, 美国)检测浓度和质量,将合格的 DNA 样品保存于 -20°C ,备用。

1.2.2 SSR 引物筛选 参考本实验室基于亨利兜兰转录组数据开发的引物^[22],从 115 对引物中共筛选出 10 对扩增效果好的 SSR 引物(表 2)。引

表 2 10 对 SSR 引物信息
Tab. 2 Information of ten SSR primers

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C	重复单元 Repeat motif	片段长度 Size range/bp
DY011	F: CGAAGCACGGGTCTCTTTCT R: ACCACCGACATTACCTGCAG	60.0	TTC (7)	107
DY356	F: TGCAGATGAGCCCATGCATT R: TCACGCCTGTATTTCTGCGT	60.2	GAA (6)	260
DY376	F: GGCACTTACAGCAAGGCTCT R: GAGACCTGGGCCCATCAAAA	60.1	CTG (6)	102
DY383	F: ACGCGGCAAAAATGATGAGG R: AGGAGGGTTCATGCAGTAGT	58.9	TCA (6)	100
DY413	F: CAGGCTCCAAAACAAGGCAC R: GGGACTGGGGAGTAAAAGGC	60.0	CAG (7)	263
DY669	F: CAAACCTCGCTCGGAAGACT R: AGGGTTTCTATCGCTTGGCC	60.0	TCGAC (6)	259
DY687	F: GCTGCCAATTCGAATGGAGG R: GCTGCCGATTCTCCTTCCTT	59.9	GGC (6)	203
DY716	F: AGCTATGAGGAAGTGCCTG R: TGTGACATGATCCGTGGCA	60.1	GGC (6)	182
DY800	F: AGCTTGAAGTACTTGGGGGC R: TCCACCTTCTCCTCCTCACT	59.6	TGG(8)	146
DY877	F: GCGGATTGACCTCTGCTGAT R: TCGGCTTTGGTTGCTGAGAT	60.1	CGC (6)	217

物由生工生物工程（上海）股份有限公司北京分公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及测序 在 C1000 Touch 实时定量 PCR 仪（Bio-Rad, 美国）上进行反应，PCR 反应体系（20 μL ）：10 \times buffer 2.0 μL ，dNTPs 1.5 μL ，上、下游引物各 2.0 μL ，Ex *Taq* 0.2 μL ，DNA 3.0 μL ，ddH₂O 9.3 μL 。PCR 扩增反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s，循环 10 次；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s，循环 15 次；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s，循环 10 次；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，合格后送至上海天昊生物公司进行基于二代测序技术的 SSR 基因分型。

1.3 数据处理

采用 Excel 2010 软件统计并整理 SSR 基因分型数据。利用 Genalex 6.501^[23]和 PopGene 1.32^[24]软件计算多态性位点比率（PPB）、等位基因数（ N_a ）、有效等位基因数（ N_e ）、Shannon 信息指数（ I ）、观测杂合度（ H_o ）、期望杂合度（ H_e ）、Nei's 基因多样性指数（ h ）、Nei's 遗传距离（ G_d ）、遗传相似性（ G_i ）和基因流（ N_m ）等。利用 PIC-Calc 软件计算多态信息含量（PIC）。利用 Genalex 6.501^[23]软件进行基于遗传距离的主成分分析（PCoA）和分子方差分析（AMOVA）。利用 Mega 7.0^[25]软件的非加权平均法（UPGMA）进行聚类分析，并构建基于遗传距离的聚类图。利用

Structure 2.3.4^[26]软件进行遗传结构分析，设置 K 值为 1~10，对不同的 K 值进行 10 次重复运算。使用马尔可夫链法（Markov's Chain Monte Carlo, MCMC），设 burn-in 为 100 000 次，run-length 为 100 000 次迭代，之后用在线软件 Structure harvester（http://taylor0.biology.ucla.edu/structure_harvester/）根据 ΔK 峰值位置来确定最佳分组群，并绘制群体结构分析图。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性

利用 10 对 SSR 引物对 190 份带叶兜兰材料进行 SSR 多态性分析（表 3）。由表 3 可知，共检测到 50 个 N_a ， N_a 在 2~9 之间，平均每个 SSR 标记 5 个等位基因。 N_e 为 1.0269~6.7468，平均值为 2.4835。 I 在 0.0843~2.0272 之间，平均值为 0.8592。 H_o 在 0.0265~0.8677 之间，平均值为 0.4518。 H_e 在 0.0263~0.8540 之间，平均值为 0.4387。 h 在 0.0262~0.8518 之间，平均值为 0.4370。PIC 在 0.0260~0.8346 之间，平均值为 0.3996。参照 BOTSTEIN 等^[27]提出的衡量基因变异程度高低的 PIC 指标，有 4 个位点（DY383、DY687、DY716、DY800）是高度多态性位点（PIC>0.50），4 个位点（DY356、DY376、DY413、DY669）是中度多态性位点（0.25<PIC \leq 0.50），2 个位点（DY011、DY877）是低度多态性位点（PIC \leq 0.25）。

表 3 10 对 SSR 引物的多态性分析

Tab. 3 Polymorphism analysis of ten SSR primers

位点 Locus	观测等位基因数 N_a	有效等位基因 数 N_e	Shannon 信息指 数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	基因多样性指 数 h	多态信息含量 PIC
DY011	4	1.0269	0.0843	0.0265	0.0263	0.0262	0.0260
DY356	4	1.3741	0.5840	0.2707	0.2730	0.2723	0.2588
DY376	4	1.4707	0.6174	0.3457	0.3209	0.3200	0.2966
DY383	9	6.7468	2.0272	0.8360	0.8540	0.8518	0.8346
DY413	2	1.9886	0.6903	0.4811	0.4985	0.4971	0.3736
DY669	5	1.3824	0.5774	0.2919	0.2774	0.2766	0.2592
DY687	5	2.9327	1.1811	0.6667	0.6664	0.6590	0.5916
DY716	7	3.6963	1.4146	0.8677	0.7314	0.7295	0.6817
DY800	5	3.1602	1.2554	0.6878	0.6854	0.6836	0.6202
DY877	5	1.0567	0.1603	0.0437	0.0538	0.0537	0.0532
均值	5	2.4835	0.8592	0.4518	0.4387	0.4370	0.3996

2.2 居群遗传多样性

带叶兜兰各野生居群遗传多样性检测结果见表 4。6 个居群的多态性位点比率 (PPB) 在 70%~100% 之间, 平均值为 88.33%。 N_a 在 2.8000~4.3000 之间, 平均值为 3.3833。 N_e 为 1.9655~2.4060, 平均值为 2.1901。 I 在 0.6584~0.8369 之间, 平均值

为 0.7425。 H_o 在 0.3891~0.4839 之间, 平均值为 0.4465。 H_e 在 0.3795~0.4683 之间, 平均值为 0.4205。 h 在 0.3648~0.4382 之间, 平均值为 0.4008。表明 6 个带叶兜兰居群的遗传多样性丰富, 其中广西木论 (GML) 遗传多样性最低, 广西雅长 (GYC) 和贵州万峰湖 (QWF) 遗传多样性较高。

表 4 基于 10 对 SSR 引物的带叶兜兰 6 个居群的遗传多样性

Tab. 4 Genetic diversity for the six populations of *P. hirsutissimum* based on ten SSR primers

居群 Population	多态性比率 PPB/%	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Shannon 信息指 数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	基因多样性指 数 h
GML	70	2.8000	2.1056	0.6584	0.3891	0.3795	0.3648
GYC	100	3.9000	2.2820	0.8245	0.5070	0.4452	0.4382
YDZ	90	2.9000	1.9655	0.6753	0.4222	0.3981	0.3742
YFD	90	3.2000	2.2494	0.7453	0.4839	0.4683	0.4135
QWF	100	4.3000	2.4060	0.8369	0.4132	0.4329	0.4276
QJS	80	3.2000	2.1323	0.7143	0.4633	0.3988	0.3864
均值	88.33	3.3833	2.1901	0.7425	0.4465	0.4205	0.4008

2.3 居群遗传分化

带叶兜兰居群的分子方差分析 (AMOVA) 结果表明, 带叶兜兰居群间的遗传变异仅有 6%, 而居群内的遗传变异有 94%, 绝大部分遗传变异发生在各居群的内部 (表 5)。说明野生带叶兜兰资源的遗传多样性以居群内的变异为主, 居群内分化程度较高, 而居群间遗传分化较小。

2.4 聚类和主坐标分析

遗传距离和遗传相似性是衡量居群亲缘关系的重要指标, 6 个居群间的 Nei's 遗传距离 (G_d) 和遗传相似性 (G_i) 见表 6。6 个居群间 G_d 在

0.0169~0.1330 之间, G_i 在 0.8755~0.9832 之间。其中 GML 和 YDZ 居群间的 G_d 最大 (0.1330), GYC 和 QWF 居群间的 G_d 最小 (0.0169)。GYC 和 QWF 居群间的 G_i 最大 (0.9832), GML 和 YDZ 居群间的 G_i 最小 (0.8755)。

根据居群间的 Nei's 遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类分析 (图 2), 结果显示, 广西雅长 (GYC) 和贵州万峰湖 (QWF) 首先聚为一支, 再依次和贵州桔山 (QJS)、云南法斗 (YFD)、云南柳井 (YDZ) 聚集, 最后和广西木论 (GML) 聚集。结果表明居群间遗传距离与地理距离无显

表 5 带叶兜兰群体间分子方差分析 (AMOVA)

Tab. 5 Molecular variance analysis (AMOVA) among *P. hirsutissimum* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	均方和 SS	均方偏差 MS	方差组分 Variance components	变异百分比 Percentage of variation/%	<i>P</i>
居群间	5	64.978	12.996	0.284	6	<0.001
居群内	184	828.037	4.500	4.500	94	<0.001
总计	189	893.016		4.784	100	

表 6 带叶兜兰居群间的遗传距离 (G_d) 和遗传相似性 (G_i)

Tab. 6 Nei's genetic distance (G_d) and genetic identity (G_i) of *P. hirsutissimum*

居群 Population	GML	GYC	YDZ	YFD	QWF	QJS
GML		0.9107	0.8755	0.9209	0.8926	0.8862
GYC	0.0936		0.9458	0.9597	0.9832	0.9613
YDZ	0.1330	0.0557		0.9285	0.9508	0.9604
YFD	0.0824	0.0412	0.0742		0.9750	0.9592
QWF	0.1136	0.0169	0.0505	0.0253		0.9751
QJS	0.1208	0.0395	0.0404	0.0416	0.0252	

注：对角线下方为 Nei's 遗传距离 (G_d)，对角线上方为 Nei's 遗传相似性 (G_i)。

Note: Below diagonal is Nei's genetic distance (G_d), and above diagonal is Nei's genetic identity (G_i).

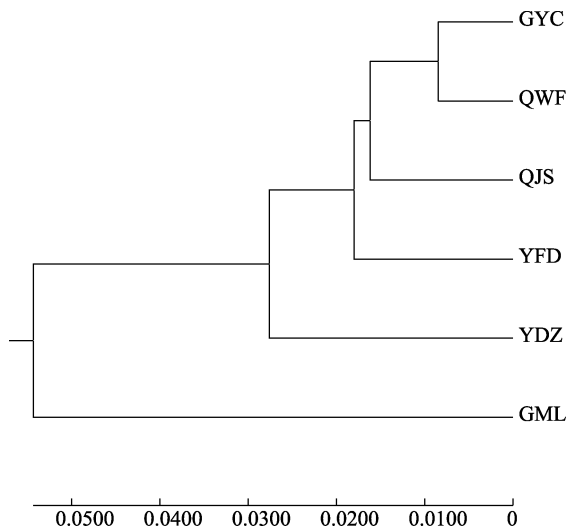


图 2 基于 Nei's 遗传距离的带叶兜兰居群的聚类图

Fig. 2 Cluster of the population of *P. hirsutissimum* based on Nei's genetic distance

著相关性。

为进一步研究群体间的遗传关系，对 190 份带叶兜兰进行主坐标分析 (PCoA)。其中第一主成分和第二主成分分别可以解释总变量的 31.63% 和 10.07% (图 3)。主坐标结果表明带叶兜兰居群间均质化明显，居群内存在着种质混杂现象。

2.5 居群遗传结构

利用 Structure 的贝叶斯聚类方法对 6 个带叶兜兰居群进行遗传结构分析，根据 EVANNO 等^[28]的方法用最大似然值 ΔK 来确定 K 值。Structure

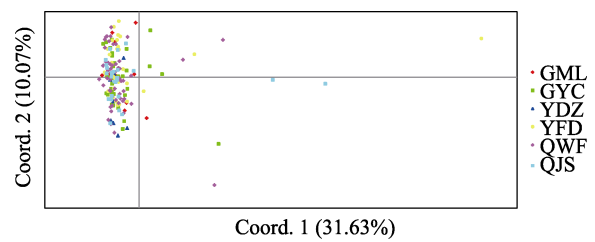


图 3 基于 Nei's 遗传距离的主坐标分析图

Fig. 3 Principal coordinate analysis diagram based on Nei's genetic distance

分析结果显示 K 在 1~10 之间， K 为 2 时， ΔK 取得最大值 (图 4)，表明 6 个居群 190 个个体的基因型分为 2 种。2 种基因型在每个居群中分布比例相似，不能按照不同基因池区分 (图 5)，表明带叶兜兰居群间均质化，可能由于较高基因流导致。

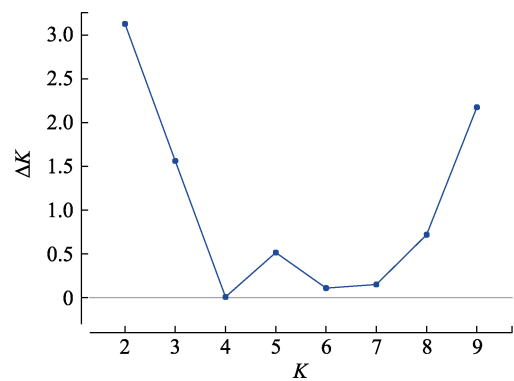


图 4 ΔK 分布图

Fig. 4 Distribution of ΔK

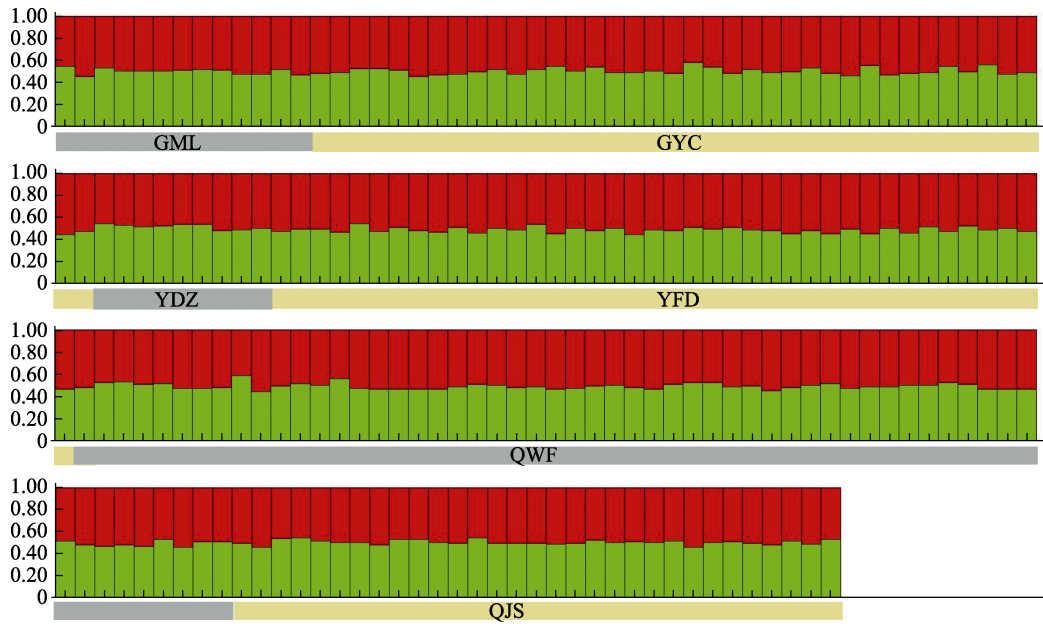


图 5 带叶兜兰居群 Structure 聚类结果 ($K=2$)

Fig. 5 Clustering results of *P. hirsutissimum* ($K=2$)

3 讨论

3.1 带叶兜兰居群的遗传多样性

遗传多样性是体现一个物种进化潜力和抵抗外界环境变化的能力,遗传多样性水平越高,物种适应环境变化的能力越强,反之越弱^[29]。本研究所选的 6 个居群是本实验室从 2013 年开始,通过查阅文献、网上搜索和多年实地踏查所收集到的所有居群,其中贵州万峰湖 (QWF)、贵州桔山 (QJS)、云南法斗 (YFD) 和云南柳井 (YDZ) 这 4 个居群均是首次对其进行研究报道。

本研究对 6 个带叶兜兰居群的 SSR 检测结果表明,在物种水平 ($I=0.8592$, $h=0.4370$) 和居群水平 (PPB=83.33%, $I=0.7425$, $h=0.4008$) 上均具有丰富的遗传多样性。与以往的兜兰属植物遗传多样性研究相比,高于朱亚艳等^[10]利用 SRAP 标记分析的 8 种兜兰的遗传多样性 (PPB=80.26%, $I=0.4241$, $h=0.2879$),略高于李宗艳等^[17]利用 ISSR 标记分析的 7 个硬叶兜兰居群的遗传多样性 (PPB=96.04%, $I=0.4889$, $h=0.3244$),略高于 HUANG 等^[16]利用 ISSR 和 SRAP 标记分析的 15 个硬叶兜兰居群的遗传多样性 (ISSR: PPB=80.28%, $I=0.4236$; SRAP: PPB=70.67%, $I=0.3301$),也高于秦惠珍等^[18]利用 ISSR 标记分析的 8 个白花兜兰居群的遗传多样性 (PPB=78.33%, $I=0.4191$, $h=0.2808$)。高丽霞等^[14]利用 SRAP 标记分析的广西木论自然保护区的 40 份野生带叶兜兰的遗传多样性 (PPB=24.22%,

$I=0.1582$, $h=0.1282$) 低于本研究中同位于广西木论县木论自然保护区的广西木论 (GML) 的遗传多样性 (PPB=70%, $I=0.6584$, $h=0.3648$),推测可能与本研究采用的 SSR 标记具有更高的多态性和保护区的保护有关。CHEN 等^[12]利用 SSR 标记分析的广西雅长自然保护区的 32 份野生带叶兜兰的遗传多样性 ($N_a=2.9300$, $N_e=2.2200$, $H_e=0.5313$) 略高于本研究中同位于广西雅长自然保护区的广西雅长 (GYC) 的遗传多样性 ($N_a=3.9000$, $N_e=2.2820$, $H_e=0.4452$)。本研究对 6 个带叶兜兰居群的研究也显示了广西木论 (GML) 的遗传多样性最低,广西雅长 (GYC) 的遗传多样性较高,推测可能和位于雅长自然保护区的带叶兜兰居群较大,而位于木论自然保护区的居群较小有关。本研究与上述近缘或相同物种的多项指标比较表明,带叶兜兰整体遗传多样性丰富,高于硬叶兜兰和白花兜兰。

3.2 带叶兜兰居群的遗传结构

遗传分化是反映遗传结构的重要指标。本研究通过 AMOVA 分析显示,94% 的遗传分化发生在居群内,居群间遗传分化很小 (6%),即带叶兜兰主要遗传变化来自居群内的个体间变异。李宗艳等^[17]利用 ISSR 标记对 7 个硬叶兜兰居群进行 AMOVA 分析显示,硬叶兜兰居群内 (60.4%) 的遗传变异大于居群间 (39.60%)。HUANG 等^[16]利用 ISSR 和 SRAP 标记对 15 个硬叶兜兰居群进

行 AMOVA 分析, ISSR 标记结果显示硬叶兜兰居群内 (69%) 遗传变异大于居群间 (31%), SRAP 标记结果也显示硬叶兜兰居群内 (75%) 遗传变异大于居群间 (25%)。秦惠珍等^[18]利用 ISSR 分子标记对 8 个白花兜兰居群进行 AMOVA 分析显示白花兜兰居群内 (87.53%) 遗传变异大于居群间 (12.47%)。多项指标表明多数兜兰属植物的遗传变异均以居群内的遗传变异为主。这一结果可能与兜兰具有欺骗性授粉的特征有关, 欺骗性授粉的物种比向传粉者提供回报的物种具有更高的基因流动, 且兜兰种子细小也有利于远距离传播^[11]。此外, 评价居群的遗传结构需要结合物种的繁育系统和传粉方式等因素进行综合分析, 目前尚无带叶兜兰繁育和传粉的相关报道, 后续应加强对这方面的研究来进一步阐明其遗传结构的形成原因。

遗传结构是评价遗传资源的关键。本研究通过 UPGMA 聚类、PCoA 分析和 Structure 群体结构分析对带叶兜兰资源进行划分, 3 种分析方法得到的结果相似, 均显示 6 个野生带叶兜兰居群无明显的类群划分, 居群间存在基因渐渗的现象且均质化明显。这可能会降低物种的长期适应性进化能力, 增加在不断变迁的环境中因随机事件而灭绝的风险。推测很可能因为现存的各个居群起源于相同的祖先居群, 由于在历史中发生生境片段化, 造成这一连续分布的祖先居群残留成目前多个分散的居群。

3.3 表型多样性和遗传多样性关联分析

本研究与本实验室王文晓等^[21]的带叶兜兰表型多样性分析结果相比, 其中有 5 个居群采样地点均与王文晓等文中相对应 (王文晓等文中的 YDZ 居群采样地由云南省马关县斗嘴乡更正为云南省文山州柳井彝族乡斗咀村, 居群字母简称 YDZ 不变)。王文晓等根据 18 个表型性状变异系数分析显示, 5 个野生居群内变异系数由高到底为云南法斗 (YFD) > 贵州万峰湖 (QWF) > 广西雅长 (GYC) > 云南柳井 (YDZ) > 广西木论 (GML), 本研究根据遗传多样性分析结果显示, 6 个野生居群遗传多样性由高到低为广西雅长 (GYC) > 贵州万峰湖 (QWF) > 云南法斗 (YFD) > 贵州桔山 (QJS) > 云南柳井 (YDZ) > 广西木论 (GML), 二者结果部分相似; 但王文晓等根据巢氏方差分析表型分化系数显示, 居群间的表型分化大于居群内, 而本研究根据 AMOVA 分

析遗传分化系数显示, 居群内的遗传分化远远大于居群间; 聚类结果也不同, 王文晓等按照表型性状 Q 型聚类将居群划分为 3 类, 云南法斗 (YFD) 和云南柳井 (YDZ) 为一类群, 广西雅长 (GYC) 和广西木论 (GML) 为一类群, 贵州万峰湖 (QWF) 为一类群, 其结果大致同地理位置及生境相符。这种利用表型性状检测植物遗传变异和多样性的方法简便易行, 能够短期内基本了解植物的遗传变异水平^[30]。但植物形态学特征受环境影响较大, 在不同生境下营养和生殖性状均会出现差异, 因此存在一定的局限性^[31]。而利用 SSR 分子标记技术是从 DNA 水平上反映个体间的遗传变异现象, 不受生长发育和时间的制约, 避免环境干扰, 成本低, 检测效率高, 能更准确地反映类群间的亲缘关系^[32]。基于 SSR 技术, 本研究聚类结果表明, 不同居群的带叶兜兰的遗传结构未严格按照地理距离划分, 这一结果与本实验室硬叶兜兰 13 个居群遗传多样性分析结果类似, 广西木论 (GML) 居群和其他居群遗传距离最远 (数据尚未发表)。其原因可能是: (1) 由于贵州万峰湖 (QWF) 居群位于 5 个居群的中间位置, 与其他居群有相对较大的基因流交流, 基因重组的空间和机会更大, 更容易扩大种群的遗传多样性水平; (2) 贵州万峰湖 (QWF) 和广西雅长 (GYC) 居群分别位于红水河水系的上下游, 通过红水河水系增加了这 2 个居群间的基因交流, 因此这 2 个居群间关系最近。

3.4 带叶兜兰资源保护

遗传多样性是种质资源保护与评价的重要指标^[33]。通过对中国西南地区的 6 个带叶兜兰居群的遗传多样性进行研究, 结果表明带叶兜兰具有相对丰富的遗传多样性, 但居群间存在均质化现象。在 6 个居群中, 贵州万峰湖 (QWF) 居群和位于广西雅长自然保护区的广西雅长 (GYC) 居群遗传多样性较高, 应作为核心种群重点保护, 可见选择在广西雅长作为全国唯一一个国家级兰科植物自然保护区, 在带叶兜兰的保护上其意义重大。由于带叶兜兰居群内个体间的遗传变异较高, 因此也要加强对居群内部每个个体的保护, 以保持最大遗传变异基因库为目标。

此外, 通过全基因组重测序和简化基因组测序等高通量测序技术开发分子标记, 已广泛应用于大田作物和蔬菜中, 这也给兰科植物起源和进化带来新的研究方向^[34]。如简化基因组测序技术

有不参考基因组就可以进行大量 SNPs 开发的优势,目前在兰科植物中石斛属^[35]、蝴蝶兰属^[36]上已有应用,但尚无新型分子标记技术应用于兜兰属植物的报道。为了更好地保护兜兰属植物,今后可以利用新型高通量测序技术开发新的标记技术,加强与邻国的交流,增加越南、老挝、印度、泰国等国家野生居群采样,以全面了解带叶兜兰资源的遗传状况。

参考文献

- [1] 刘仲健, 陈心启, 陈利君, 雷嗣鹏. 中国兜兰属植物[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 93-95.
LIU Z J, CHEN X Q, CHEN L J, LEI S P. The genus *Paphiopedilum* in China[M]. Beijing: Science Press, 2009: 93-95. (in Chinese)
- [2] 罗毅波, 贾建生, 王春玲. 中国兰科植物保育的现状和展望[J]. 生物多样性, 2003, 11(1): 70-77.
LUO Y B, JIA J S, WANG C L. A general review of the conservation status of Chinese orchids[J]. Biodiversity Science, 2003, 11(1): 70-77. (in Chinese)
- [3] 王英强. 中国兜兰属植物生态地理分布[J]. 广西植物, 2000, 20(4): 289-294.
WANG Y Q. The geography of Chinese species of *Paphiopedilum*[J]. Guihaia, 2000, 20(4): 289-294. (in Chinese)
- [4] 杨颖婕, 黄家林, 胡虹, 张石宝. 中国兜兰属植物种质资源保护和利用研究进展[J]. 西部林业科学, 2021, 50(5): 108-112, 119.
YANG Y J, HUANG J L, HU H, ZHANG S B. Progress on conservation and utilization of *Paphiopedilum* species in China[J]. Journal of West China Forestry Science, 2021, 50(5): 108-112, 109. (in Chinese)
- [5] 覃海宁, 杨永, 董仕勇. 中国高等植物受威胁物种名录[J]. 生物多样性, 2017, 25(7): 696-744.
QIN H N, YANG Y, DONG S Y. Threatened species list of China's higher plants[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(7): 696-744. (in Chinese)
- [6] 冯昌林, 邓振海, 蔡道雄, 吴天贵, 贾宏炎, 白灵海, 赵祖壮, 苏勇. 广西雅长林区野生兰科植物资源现状与保护策略[J]. 武汉植物学研究, 2012, 30(3): 285-292.
FENG C L, DENG Z H, CAI D X, WU T G, JIA H Y, BAI L H, ZHAO Z Z, SU Y. Current status and conservation strategies of wild orchid resources in Guangxi Yachang Forests[J]. Wuhan Botanical Research, 2012, 30(3): 285-292. (in Chinese)
- [7] 张罗霞, 李宗艳. 部分兜兰属植物基于 ITS 基因的序列分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(1): 33-34, 36-39, 35.
ZHANG L X, LI Z Y. Sequence analysis of some *Paphiopedilum* plants based on ITS gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(1): 33-34, 36-39, 35. (in Chinese)
- [8] CHOCHAI A, LEITCH I J, INGROUILLE M J, FAY M F. Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2012, 170(2): 176-196.
- [9] CHUNG S Y, CHOI S H, KIM M J, YOON K E, LEE G P, RYU K H. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 109(2): 153-159.
- [10] 朱亚艳, 王港, 侯娜, 王莲辉. 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(自然科学), 2017, 37(1): 10-14.
ZHU Y Y, WANG G, HOU N, WANG L H. Genetic diversity analysis of wild *Paphiopedilum* species in the south of Guizhou[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2017, 37(1): 10-14. (in Chinese)
- [11] GUO Y Y, LUO Y B, LIU Z J, WANG X Q. Reticulate evolution and sea-level fluctuations together drove species diversification of slipper orchids (*Paphiopedilum*) in South-East Asia[J]. Molecular Ecology, 2015, 24(11): 2838-2855.
- [12] CHEN L, DONG H, WANG J W, LI L N, XU M. Microsatellites characteristics analysis and SSR marker development for *Paphiopedilum hirsutissimum* based on transcriptome sequencing[J]. Plant Genetic Resources, 2018, 16(4): 394-396.
- [13] XU Y F, JIA R D, ZHOU Y H, CHEN H, ZHAO X, GE H. Development and characterization of polymorphic EST SSR markers for *Paphiopedilum henryanum* (Orchidaceae)[J]. Applications in Plant Sciences, 2018, 6(5): 1-6.
- [14] 高丽霞, 覃国乐, 易桂萍. 带叶兜兰遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1734-1738.
GAO L X, QIN G L, YI G P. Genetic diversity analysis of *Paphiopedilum hirsutissimum* by SRAP marker[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(10): 1734-1738. (in Chinese)
- [15] LI Z, LI J, LI M. Effect of human disturbance on genetic structure of rare and endangered *Paphiopedilum micranthum* implied the habitat status[J]. Tropical Conservation Science, 2020, 13(12): 3299-3319.
- [16] HUANG J L, LI S Y, HU H. ISSR and SRAP markers reveal genetic diversity and population structure of an endangered slipper Orchid, *Paphiopedilum micranthum* (Orchidaceae)[J]. Plant Diversity and Resources, 2014, 36(2): 209-218.
- [17] 李宗艳, 管名媛, 李静, 李名扬. 基于 ISSR 的硬叶兜兰居群遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2016, 36(7): 1351-1356.

- LI Z Y, GUAN M Y, LI J, LI M Y. Genetic diversity of *Paphiopedilum micranthum* detected by ISSR data[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(7): 1351-1356. (in Chinese)
- [18] 秦惠珍, 盘波, 赵健, 邹蓉, 韦霄, 唐凤鸾. 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, ZHOU R, WEI X, TANG F L. ISSR genetic diversity analysis of small population wild plant *Paphiopedilum*[J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(6): 1134-1140. (in Chinese)
- [19] 王玲玲, 陈东亮, 黄丛林, 邢震. SSR 分子标记技术在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(36): 123-126, 130.
- WANG L L, CHEN D L, HUANG C L, XING Z. Application of SSR molecular marker technique in plant research[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(36): 123-126, 130. (in Chinese)
- [20] BALLOUX F, NICOLAS L M. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 55-65.
- [21] 王文晓, 程浩, 徐玉凤, 葛红, 杨树华, 赵鑫, 武荣花, 贾瑞冬. 带叶兜兰 5 个野生居群表型多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(5): 1196-1206.
- WANG W X, CHENG H, XU Y F, GE H, YANG S H, ZHAO X, WU R H, JIA R D. Phenotypic diversity analysis of five wild *Paphiopedilum hirsutissimum* populations[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(5): 1196-1206. (in Chinese)
- [22] 贾瑞冬, 徐玉凤, 葛红, 周妍慧, 杨树华, 赵鑫. 亨利兜兰 EST-SSR 标记引物、其开发方法及其应用: 107365874B[P]. 2020-04-07.
- JIA R D, XU Y F, GE H, ZHOU Y H, YANG S H, ZHAO X. EST-SSR primers development and application in *Paphiopedilum henryanum*: 107365874B[P]. 2020-04-07. (in Chinese)
- [23] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 2010, 6(1): 288-295.
- [24] KRAWCZAK M, NIKOLAUS S, VON E H, CROUNCHER P J P, EI M N, SCHREIBER S. PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships[J]. Community Genetics, 2006, 9(1): 55-61.
- [25] HALL B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(5): 1229-1235.
- [26] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 155(2): 945-959.
- [27] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, DAVIS R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 311-314.
- [28] EVANNO G S, REGNAUT S J, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [29] 田星, 李中霁, 刘小莉, 李国栋. 基于 SSR 分子标记的灯盏花遗传多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 136-143.
- TIAN X, LI Z J, LIU X L, LI G D. Genetic diversity analysis of *Erigeron breviscapus* based on SSR markers[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(18): 136-143. (in Chinese)
- [30] 焦振彬, 罗毅波. 群体表型性状研究揭示环境与遗传因素对霍山石斛表型的影响及物种分类[J]. 生物多样性, 2021, 29(8): 1073-1086.
- JIAO Z B, LUO Y B. Effects of environmental and genetic factors on phenotypic traits and species classification of *Dendrobium huoshanense*[J]. Biodiversity Science, 2021, 29(8): 1073-1086. (in Chinese)
- [31] 赵洋, 穆雪, 李春艳, 汪卫星. 猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.) 植物亲缘关系研究进展[J]. 果树学报, 2019, 36(9): 1214-1228.
- ZHAO Y, MU X, LI C Y, WANG W X. Research advances on the genetic relationships of kiwifruit (*Actinidia* Lindl.)[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(9): 1214-1228. (in Chinese)
- [32] 刘少荣, 杨扬, 田红丽, 易红梅, 王璐, 康定明, 范亚明, 任洁, 江彬, 葛建镛, 成广雷. 基于农艺及品质性状与 SSR 标记的青贮玉米品种遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2021, 47(12): 2362-2370.
- LIU S R, YANG Y, TIAN H L, YI H M, WANG L, KANG D M, FAN Y M, REN J, JIANG B, GE J R, CHENG G L. Genetic diversity analysis of silage corn varieties based on agronomic and quality traits and SSR markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(12): 2362-2370. (in Chinese)
- [33] 宋杰, 李世峰, 刘丽娜, 李树发, 解玮佳, 关文灵. 云南含笑天然居群的表型多样性分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(2): 272-279.
- SONG J, LI S F, LIU L N, LI S F, XIE W J, GUAN W L. Phenotypic diversity of natural populations of *Michelia yunnanensis*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(2): 272-279. (in Chinese)
- [34] 熊燕, 张金柱, 董婕, 王力, 高鹏, 姜琬, 车代弟. 简化基

- 基因组测序技术在观赏植物中的应用研究进展[J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1194-1202.
- XIONG Y, ZHANG J Z, DONG J, WANG L, GAO P, JIANG W, CHE D D. A review of reduced-representation genome sequencing technique and its applications in ornamental plants[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(6): 1194-1202. (in Chinese)
- [35] 王趁芳, 黄守程, 周玉丽, 王晓鹏, 刘爱荣, 侯北伟, 叶梅荣. 基于测序基因分型技术的 3 种石斛兰遗传关系分析[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(10): 19-24.
- WANG C F, HUANG S C, ZHOU Y L, WANG X P, LIU A R, HOU B W, YE M R. Analysis of the genetic relationships among 3 *Dendrobium* species based on genotyping by sequencing[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2021, 40(10): 19-24. (in Chinese)
- [36] 肖文芳, 李佐, 陈和明, 吕复兵. 基于 SLAF-BSA 技术的蝴蝶兰花底色关联 SNP 分子标记开发与验证[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(9): 92-100.
- XIAO W F, LI Z, CHEN H M, LYU F B. Identification and validation of single-nucleotide polymorphism markers linked to flower ground color in *Phalaenopsis* by using combined specific-locus amplified fragment sequencing and bulked segregant analysis[J]. Journal of China Agricultural University, 2021, 26(9): 92-100. (in Chinese)