

钻喙兰属种质资源鉴评与分子身份证构建

肖文芳, 李 佐, 陈和明, 吕复兵*

广东省农业科学院环境园艺研究所/广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室, 广东广州 510640

摘 要: 钻喙兰属为兰科的一类附生型兰花, 具有较高的观赏价值和经济价值。本研究基于前期收集的钻喙兰属 3 个常见种的 10 份不同种质资源, 采用荧光标记毛细管电泳进行等位变异检测, 筛选出 21 对 SSR 多态性引物, 其中 13 对引物位点呈高多态性, 共扩增出 47 个等位基因, 平均观测等位基因数 (N_a) 为 2.238, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.860。21 个位点的观测杂合度 (H_o) 为 0~0.778, 均值为 0.421, 期望杂合度 (H_e) 为 0.148~0.574, 均值仅 0.340, Shannon 指数 (I) 为 0.096~0.987, 均值为 0.567。10 份种质的聚类结果和 PCoA 分析与传统植物学分类一致, 可将 10 份种质按种划分成 3 个类群。在此基础上筛选出 4 对核心引物构建每份种质的分子身份证。本研究为后续钻喙兰属种质资源的收集保存、鉴评和开发利用奠定基础。

关键词: 钻喙兰属; SSR; 分子身份证

中图分类号: S682.31 文献标志码: A

Identification of Germplasm Resources and Construction of Molecular Identity Card for *Rhynchostylis*

XIAO Wenfang, LI Zuo, CHEN Heming, LYU Fubing*

Environmental Horticulture Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Key Lab of Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract: *Rhynchostylis* is an epiphytic orchid belonging to the Orchidaceae family. It possesses high ornamental and economic value. In this study, based on the collection of 10 different germplasm resources from three common species of *Rhynchostylis*, 21 pairs of SSR polymorphic primers were selected using fluorescent-labeled capillary electrophoresis for allele variation detection. Among them, 13 primer pairs exhibited high polymorphism, resulting in a total of 47 amplified alleles. The average number of observed alleles (N_a) was 2.238, and the average number of effective alleles (N_e) was 1.860. The observed heterozygosity (H_o) of the 21 loci ranged from 0 to 0.778, with a mean of 0.421, while the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.148 to 0.574, with a mean of only 0.340. The Shannon index (I) ranged from 0.096 to 0.987, with a mean of 0.567. The clustering results and PCoA analyses of the 10 germplasm were consistent with the traditional botanical classification, and all the germplasm could be classified into three taxa by species. On this basis, four pairs of core primers were selected to construct a molecular ID for each germplasm. This study lays a foundation for the collection, conservation, identification, development and utilization of the germplasm resources of *Rhynchostylis*.

Keywords: *Rhynchostylis*; SSR; molecular ID

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.007

钻喙兰属 (*Rhynchostylis* Blume) 为兰科、树兰亚科、万代兰族、指甲兰亚族的一类单轴生长型附生兰花, 具花多且密的总状花序, 因此又得名狐狸尾兰。该属目前仅发现和鉴定 5 个原生种,

收稿日期 2023-08-01; 修回日期 2023-09-15

基金项目 广州市科技计划项目 (No. 2024E04J1267); 广东省农业科学院学科团队建设项目 (No. 202127TD); 广东名优花卉种质资源库运行维护项目 (No. 2022-NBN-00-015)。

作者简介 肖文芳 (1985—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 花卉遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 吕复兵 (LYU Fubing), E-mail: 13660373325@163.com。

包括钻喙兰 (*R. retusa*)、海南钻喙兰 (*R. gigantea*)、立梗狐尾兰 (*R. coelestis*)、*R. riefferi* 和 *R. cymifera*, 主要分布于我国的云南省、贵州省、海南岛, 以及印度、斯里兰卡和东南亚各国^[1]。该属植物株型紧凑、花繁色艳且绝大多数具浓烈芳香, 栽培管理简单, 耐热性强, 易杂交, 具有较高的观赏价值和开发应用前景。从 19 世纪中叶开始, 陆续有钻喙兰属的种间杂交种、与近缘兰科植物之间的属间杂交种在英国皇家园艺学会 (Royal Horticultural Society) 登录, 截至 2023 年 6 月, 登录的钻喙兰属原生种 F_1 代杂交组合已达 402 个。泰国作为野生钻喙兰属植物分布的中心地区之一, 是最早开展钻喙兰属植物育种、繁殖及栽培研究的国家之一, 培育的品种在世界各地十分畅销。我国最早于 19 世纪末 20 世纪初由台湾企业从泰国引种栽培钻喙兰属植物, 并进行育种和栽培的相关研究, 目前已培育出四倍体海南钻喙兰等极具特色的新品种, 成为国内外各大兰展的获奖热门品种^[2]。但我国大陆地区的市场尚未打开, 钻喙兰属植物鲜为消费者所知。

除传统杂交育种工作外, 钻喙兰属植物的相关研究主要集中在组培快繁、栽培管理和野生资源分布及鉴定等方面^[3-7], 分子生物学方面仅有极少量利用不同分子标记或简化基因组测序针对单独的种进行遗传多样性等方面的分析。针对海南钻喙兰, 目前仅利用 SRAP 标记技术分析来自海南岛 22 个居群地的 144 份野生资源的遗传多样性^[8], 发现海南钻喙兰的核型公式为 $2n=2x=36m+2sm$ ^[9], 并利用 RT-PCR 结合 RACE 技术从海南钻喙兰中分离得到 2 个仅在生殖器官中表达的 B 类 MADS-box 基因 *RgAP3* 和 *RgPI*^[10]; 针对钻喙兰, 目前仅利用 2 个 RAPD 引物对包括钻喙兰在内的 9 个不同的兰科原生种进行了遗传相似性分析^[11], 利用 13 条 RAPD 引物和 7 条 ISSR 引物对采自印度 7 个不同地区的钻喙兰进行遗传多样性分析^[12], 并利用 ddRAD 技术对包括钻喙兰在内的 4 个兰花原生种进行简化基因组测序和遗传多样性分析^[13]; 针对立梗狐尾兰构建了包含 10 600 个 BAC 克隆的人工细菌染色体^[14]以供后续进行基因组结构分析。

基于钻喙兰属植物本身的优良特性, 及其与蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* Blume)、万代兰 (*Vanda*)、指甲兰 (*Aerides falcata* Lindl.) 等能够进行远缘杂交创制跨属杂交新种质的优势, 近年来受到越

来越多育种工作者的关注, 急需系统性开展钻喙兰属种质资源的开发、保护、保存与鉴评工作。TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13) 技术结合了 SSR 分子标记技术和荧光测序技术, 具有重复性高、结果准确等优点, 在较大程度上解决了传统凝胶电泳分析通量较低、扩增产物检测流程繁琐、数据记录工作量大等一系列问题^[15]。目前 TP-M13-SSR 已在茶花^[16]、百合^[17]、桂花^[18]、荷花^[19]等各类观赏花卉的种质资源鉴定和指纹图谱构建方面得到应用, 在兰科植物中已成功应用于蝴蝶兰的突变体鉴定^[20]、建兰 (*Cymbidium ensifolium*) 的核心种质构建^[21]、石斛兰 (*Dendrobium* Sw.) 原生种的鉴评^[22]等方面。

为充分保护和利用钻喙兰属资源的多样性, 本研究利用自主开发的钻喙兰属基因组 SSR 引物和兰科通用 SSR 引物, 对钻喙兰属常见 3 个种的 10 份种质资源进行分析鉴评, 从 DNA 水平揭示钻喙兰属种质资源的亲缘关系, 分析其遗传多样性并建立种质资源的分子身份证, 为钻喙兰属种质资源的保护及开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种为广东省农业科学院环境园艺研究所收集保存的 10 份钻喙兰属原生种资源, 具体性状信息见表 1, 均种植于广东省农业现代化科技示范区广东省农业科学院环境园艺研究所温室大棚内, 于 2020 年 5 月采集根尖, 于液氮中速冻 15 min 后放入超低温冰箱, 备用。

1.2 方法

根据简化基因组信息开发筛选出 12 对钻喙兰属内和 12 对钻喙兰属与蝴蝶兰属通用引物(待发表), 在不同样品中进行单重 PCR 扩增, 反应体系总体积为 10 μ L, 其中含 50 ng/ μ L DNA 模板 1.2 μ L, 10 $\times$ Buffer I 缓冲液 1.0 μ L, 5 U/ μ L 的 TaKaRa HS *Taq* 酶 0.1 μ L, 5 μ mol/L 的上下游引物各 0.3 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTP 0.8 μ L, 5 μ mol/L 的 TP-M13 0.5 μ L, 去离子水 5.8 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 10 个循环; 60 $^{\circ}$ C, 30 min。

在 96 孔板中, 每孔加入筛选引物的扩增产物 1.0 μ L, ROX-500 分子量内标和甲酰胺混合液 (0.5 : 8.5) 9 μ L, 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后, 利用 ABI

3730XL 检测仪进行检测, 1 kV 电压进样 10 s, 电泳 15 kV, 30 min。将 Data Collection 软件收集的原始数据文件导入到 GeneMapper 3.2 软件中进行分析, 将各峰值的位置与其泳道中的分子量内标予以比较, 计算目标 DNA 片段的准确大小。各荧光标记座位上独立进行 3 次重复的毛细管电泳检测, 取 3 次重复的平均值并四舍五入取整, 作为试验材料在该座位上的数据。

1.3 数据处理

根据扩增数据对 10 份钻喙兰属种质进行遗传多样性分析。运用 GenAlEx 6.503 软件计算引物的等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 指数 (I)、观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e), 并绘制 PCoA 图, 利用 PowerMarker V3.25 软件计算引物的多态性信息含量 (PIC), 利用 NTSYS 2.10 软件进行聚类作图。并根据引物的 PIC 及其在钻喙兰属内不同种间的通用性筛选核心引物, 构建每份种质的分子身份证。

2 结果与分析

2.1 钻喙兰属种质资源概述

钻喙兰属目前已发现和鉴定的原生种共 5 个, 其中 3 个发现较早、分布广泛、杂交利用率较高, 3 个种均已有杂交后代登录, 另 2 个原生种分布范围狭窄、发现较晚, 尚无育种利用和针对性研究。

2.1.1 海南钻喙兰 (*R. gigantea*) 广泛分布于中国海南岛和中国黄海附近岛屿, 缅甸仰光和高附近以及北部的其他地方, 泰国东部地区、西南地区的北碧府, 新加坡及附近岛屿, 老挝的万象平原和波罗芬高地, 柬埔寨的 Camchay 山, 越南胡志明市和广治省附近, 婆罗洲, 印度尼西亚的阿南巴斯岛。该种的主要特点: 花序下垂; 花较大, 花朵平均直径为 3.4 cm; 唇瓣片前部明显 3 裂; 距狭圆锥形, 底端锐尖; 蕊柱足不明显; 芳香; 花期冬季到春季^[23]。山采株的花色主要为白底红点、白底红粗斑及纯白色变种。目前不同品系间已杂交选育出纯红色变形, 且台湾地区利用粗斑带橙色的突变个体已选育出橙色海南钻喙兰, 并利用橙色个体与白色变种进行杂交选育偏绿色的海南钻喙兰。截至 2023 年 6 月, 该种在英国皇家园艺学会登录的杂交 F_1 代有 186 个, 其中海南钻喙兰作为父本的有 156 个, 作为母本的有 30 个, 可见其作为父本的杂交育性显著高于作为

母本的杂交育性。

2.1.2 立梗狐尾兰 (*R. coelestis*) 广泛分布于泰国北部、东北部、西部、西南部的山区和巴蜀省的低海拔地区, 柬埔寨南部, 越南大叻附近的山区, 老挝。该种的主要特点: 花序挺立斜生; 花较小, 花朵平均直径为 2.3 cm; 唇瓣片前部明显 3 裂; 距狭圆锥形, 底端锐尖下弯; 蕊柱足明显; 芳香; 花期春季到夏季^[23]。山采株的花色为白底带蓝紫色晕、蓝紫色唇瓣, 也有白底带紫红色晕的变形和纯白色的变形。目前中国台湾地区利用多倍体育种技术已选育出四倍体的立梗蓝狐尾。截至 2023 年 4 月, 该种已在英国皇家园艺学会登录的杂交 F_1 代有 174 个, 其中立梗狐尾兰作为母本的有 137 个, 作为父本的有 37 个, 其作为父本的杂交育性显著高于作为母本的杂交育性。

2.1.3 钻喙兰 (*R. retusa*) 广泛分布于中国云南省西南部和贵州省, 斯里兰卡, 印度北部和南部, 泰国, 马来西亚, 爪哇岛, 菲律宾吕宋岛的巴丹省、布拉干省、甲米地和黎刹省。该种的主要特点: 花序下垂; 花较小, 花朵平均直径为 2.2 cm; 唇瓣片不明显 3 裂; 距囊状, 两侧压扁, 底端钝圆; 蕊柱足明显; 无香或淡香; 花期冬季到春季^[23]。山采株的花色为白底紫红点, 已选育出纯白色变形。截至 2023 年 4 月, 该种已在英国皇家园艺学会登录的杂交 F_1 代有 46 个, 其中钻喙兰作为母本的仅有 2 个, 作为父本的有 44 个, 其作为父本的杂交育性同样显著高于作为母本的杂交育性。

2.1.4 *R. rieferi* 仅分布于菲律宾。2009 年发现并鉴定为钻喙兰属新种, 尚无育种利用等针对性的相关研究。该种的主要特点: 花序下垂; 花较小; 唇瓣狭窄且小, 急剧上翘; 距较短; 芳香^[24]。

2.1.5 *R. cymifera* 仅分布于印度西南部 Nilambur 的常绿森林中。2018 年发现并鉴定为钻喙兰属新种, 尚无育种利用等针对性的相关研究。该种的主要特点: 花序下垂; 花较小; 斜菱形花瓣; 方形渐变成倒卵形的唇瓣, 先端微凹; 长且尖的距; 球形花粉块; 无香; 花期春季到夏季^[25]。

本研究共采用 6 个不同的海南钻喙兰原生种、3 个不同的立梗狐尾兰原生种和 1 个山采株色钻喙兰原生种, 涵盖钻喙兰属常见 3 个种中目前发现和鉴定的所有变种和变型, 具体性状见表 1。除花色外, 海南钻喙兰与钻喙兰、立梗狐尾兰最主要的性状区别在于花梗的下垂与直立, 而钻喙兰区别于海南钻喙兰和立梗狐尾兰的性状主要

表 1 供试种质资源性状
Tab. 1 Traits of tested germplasm resources

编号 No.	学名 Scientific name	花色 Flower color	花朵大小 Flower size/cm	花朵数 Flower number	花梗姿态 Peduncle attitude	花香 Flower scent	广州地区花期 Flowering time in Guangzhou
R01	海南钻喙兰 <i>R. gigantea</i> ‘Shen’s Suns’	浅黄绿底紫红斑	3.9×3.7	25	半下垂	浓香	1—2 月
R02	海南钻喙兰 <i>R. gigantea</i>	白底紫红大斑	3.5×3.0	25	半下垂	浓香	1—2 月
R03	海南钻喙兰细斑变型 <i>R. gigantea</i> f. <i>maculate</i>	白底浅紫红细点	3.1×3.2	28	半下垂	浓香	1—2 月
R04	海南钻喙兰橘色变种 <i>R. gigantea</i> var. <i>vivaphandhuli</i>	纯橘色	3.0×2.9	20	半下垂	浓香	1—2 月
R05	海南钻喙兰纯白变种 <i>R. gigantea</i> f. <i>alba</i>	纯白	3.2×3.2	20	半下垂	浓香	1—2 月
R06	海南钻喙兰全红变型 <i>R. gigantea</i> f. <i>Chang Daeng</i>	纯紫红	3.2×2.2	20	半下垂	浓香	1—2 月
R07	立梗狐尾兰 <i>R. coelestis</i>	白底尖端蓝紫色	1.9×2.3	23	直立	浓香	5—6 月
R08	立梗狐尾兰纯白变型 <i>R. coelestis</i> f. <i>alba</i>	纯白	2.3×2.0	19	直立	浓香	5—6 月
R09	立梗狐尾兰粉色变型 <i>R. coelestis</i> f. <i>rosea</i>	白底尖端淡粉色	1.6×1.9	21	直立	浓香	5—6 月
R10	钻喙兰 <i>R. retusa</i>	白底浅紫红点	2.2×1.9	105	半下垂	基本无香	5—6 月

在于花香及花朵数，钻喙兰基本无香但花朵数可达百朵，海南钻喙兰和立梗狐尾兰均具浓香但花朵数较少。

2.2 遗传多样性及聚类分析

采用自主开发的 12 对钻喙兰属特异引物和 12 对钻喙兰属与蝴蝶兰属通用引物，对来自 3 个种的 10 份钻喙兰属种质进行检测，其中 3 对引物扩增后不具多态性，其余 21 对引物共扩增出 47 个等位基因（表 2），每对引物扩增出 1~3 个等位基因， N_a 均值为 2.238， N_e 均值为 1.860。24 个位点的 H_o 为 0~0.778，均值为 0.421， H_e 为 0.148~0.574，均值仅 0.340， I 介于 0.096~0.987 之间，均值为 0.567，表明供试种质的杂合程度极低，遗传多样性不高，这与供试种质均为原生种或其变型和变种有关。21 对引物中有 13 对引物位点呈高多态性（ $PIC>0.5$ ）^[26]，证明本研究所筛选出的多数引物适用于钻喙兰属种质鉴评。

根据 Nei’s 遗传距离，对 10 份钻喙兰属种质资源构建 UPGMA 遗传关系聚类图（图 1），如图 1 所示，10 份钻喙兰属种质被分为三大类，同一个种的种质聚为一类，10 份钻喙兰属种质的 PCoA 分析结果显示，PCoA1 和 PCoA2 分别占有钻喙兰属种质总遗传变异的 32.63%和

15.30%；PCoA 分析同样将 10 份种质分为三大类，同一个种的种质聚为一类（图 2）。聚类结果和 PCoA 分析结果与钻喙兰属种质植物学分类结果一致。

2.3 核心引物筛选及分子身份证构建

根据引物多态性信息含量（PIC）及其在钻喙兰属内不同种间的通用性，从 1 对引物开始逐步增加引物数量筛选出可将供试种质全部区分的引物组合，最终确定引物组合 28-N1001301+2-N10002234+43-N5725511 能够将所有样品区分开，但这 3 个引物的通用性均未达到 100%，考虑到后续样品的适用性，增加通用性 100%的 88-N1001036 引物（PIC 仅次于前 3 个引物）作为核心引物，最终确定 28-N1001301+2-N10002234+43-N5725511+8-N1001036 作为今后钻喙兰属种质资源鉴定的核心引物组合，其他引物作为备选。

通过数据化编码构建钻喙兰属种质的分子身份证，其构成包括 2 个部分。第 1 部分为前 2 位字母，表示物种信息，钻喙兰属目前共 5 个种，包括海南钻喙兰（RG）、立梗狐尾兰（RC）、钻喙兰（RR）、*R. riefferi*（RI）、*R. cymifera*（RC）。第 2 部分为后续的数字，代表 4 对核心引物扩增结果，2-N10002234、28-N1001301、43-N5725511、

表 2 21 对多态性引物相关信息
Tab. 2 Characteristics of 21 polymorphic microsatellite makers

引物 Primer	重复基元 SSR motif	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	片段大小 Fragment size/bp	检出率 Dete- ction rate/%	观测等 位基因 数 N_a	有效等 位基因 数 N_e	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态性 信息含 量 PIC	Shan- non 指 数 I
2-N10002234	(AAC)5	F:CCTGCAGGTTAAACAACAACAA; R:ATTTAGACCGTGGGAAGCCT	213~227	70	3.000	2.746	0.333	0.469	0.818	0.866
5-N1001614	(GAA)7	F: TTTGGTGGAGGATGGAGAAG; R: GCTTCCTTGAGGTGAAGAGC	97~106	100	2.000	1.590	0.333	0.213	0.551	0.381
7-N1001895	(TCT)8	F: ATCGCCATTTTGTGCTCTT; R: ATTGAAATGATGGCTTTCGC	172~192	90	2.000	1.667	0.222	0.222	0.354	0.414
14-N1007590	(CT)5	F: TGACATGGAAGTTATGGCATTC; R: TGTCGCAATTCTATGTCAGGA	115~128	100	2.667	1.814	0.667	0.431	0.531	0.709
22-N10009521	(AT)9	F: TGAAGAAAAGGTCTAACAAGCAGA; R: TGAGTTAAAGGAAGAAATGGCCT	126~136	100	2.333	1.686	0.500	0.338	0.566	0.559
25-N101022	(ATT)5	F: TGGACCACCTATCTCAAGGC; R: ACGACATGCTCATGATTCCA	128~133	100	2.000	1.600	0.333	0.315	0.436	0.501
28-N1001301	(ATT)19	F: TCCTTCCAACATTTATTGCTCC; R: TCACATCCTTCAATATTGCCC	135~163	90	1.667	1.556	0.333	0.208	0.820	0.347
28-N1012378	(AAG)7	F: GGAAGAAGGAGGAGGTGAGG; R: TCCTAGAGAAAGAGCTTGGAGC	167~179	100	2.333	2.091	0.667	0.398	0.347	0.653
37-N3601419	(AAG)8	F: AATGGAAAATCTGGCAGCAC; R: TCTCCATCACTTCAATGGCA	181~190	100	2.000	1.857	0.667	0.370	0.692	0.568
42-N8802928	(TA)8	F: CCCAAAACCTTTACTTTTCCAGC; R: CTGTAAAAGCGTACCTGGCA	96~122	100	2.667	2.227	0.444	0.532	0.375	0.843
43-N5725511	(TA)6	F: CTGTAAAAGCGTACCTGGCG; R: AGGACCCCCAACATAACAACA	120~148	90	2.667	2.043	0.444	0.394	0.763	0.684
45-N1438823	(GAA)5	F: ATTTGGCTCAAATCCACCAA; R: ATACCTGAAAGCATGGTGCC	163~194	100	2.000	1.857	0.667	0.370	0.628	0.568
68-N2965390	(AAT)6	F: TCAATGATATCACATTCCTTGACG; R: GCTAGGATTTGTTAATTATTGTGC	98~112	100	1.333	1.060	0.056	0.051	0.409	0.096
74-N8009753	(TTC)10	F: TGTTTGCAGGGAAATTTGTTTCA; R: TCTTCAACTTATGTGATTGCAGG	105~132	100	3.333	2.767	0.667	0.574	0.460	0.987
82-N100023	(AG)6	F: AGGGTGGGAAGGGAGATAAA; R :CTCTGCCTTCTCCATCTCTCA	154~171	100	2.000	1.795	0.778	0.426	0.632	0.612
88-N1001036	(AG)5	F: AGGGAGGGAGTGAGAGAGGA; R: TCCCCTTTTCTATCGCTATC	143~161	100	2.000	1.471	0.389	0.264	0.719	0.420
88-CB033847	(AT)31	F: GCTCCGCTAGCTCTGACAGA; R: CATCCGAGCTGATGAAAGGT	134~140	100	2.667	2.260	0.611	0.458	0.531	0.770
89-N100105	(TA)5	F: TTTCTGCTCTCCATTCCTG; R: TGTCATCTTCTCACTCCCA	97~101	100	2.333	1.649	0.333	0.329	0.553	0.564
90-CB034920	(TGA)12	F: TGTTGGTCTTCGGAAGAAGTAT; R: AGCGCAGATAATAAAATCCTACC	137~167	100	2.667	2.196	0.167	0.394	0.365	0.701
91-N1001523	(AG)8	F: TGATGGAATGAAGTTGAGGGA; R: GGCACATATGCTTTGTGGTG	116~136	100	2.000	1.867	0.222	0.241	0.526	0.443
92-CK858704	(GA)6	F: GAGGCTGAGCAAAAGATTATGAG; R: CGAATCATCGGATTCTTACTCTT	160~163	100	1.333	1.267	0.000	0.148	0.420	0.212
均值					2.238	1.860	0.421	0.340	0.547	0.567

88-N10010364 的扩增片段按分子量大小排列，从小到大以阿拉伯数字 1~9 标注，若该位点在某个种质中无扩增则记为 0，每个引物占 2 位。如 R01 海南钻喙兰（*R. gigantea* ‘Shen’s Suns’）的分子身份证为 RG00334411，RG 代表其为海南钻喙兰这

个种的种质资源，00334411 为其通过核心引物扩增转换而来的专属编码。最终构建的 10 份钻喙兰属种质分子身份证代码均不相同，能够将所有种质区分开，并利用每个种质资源的分子身份证编号，分别制作种质特异的条形码（图 1）。

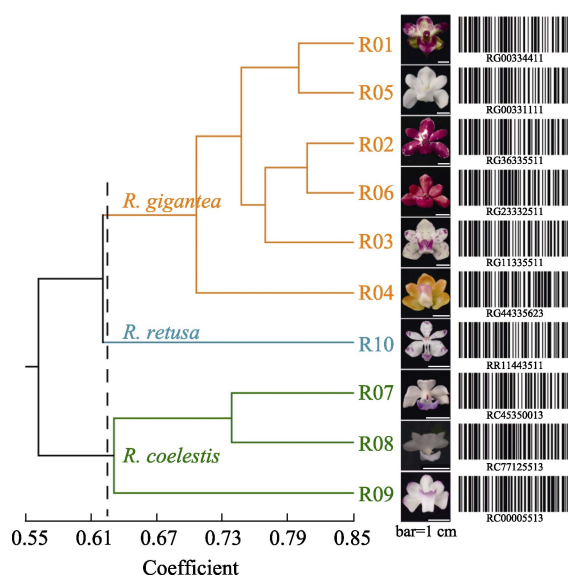


图 1 10 个钻喙兰属种质的 UPGMA 遗传聚类图及分子身份证

Fig. 1 Dendrogram by UPGMA method and molecular identity card of 10 *Rhynchosstylis* germplasms

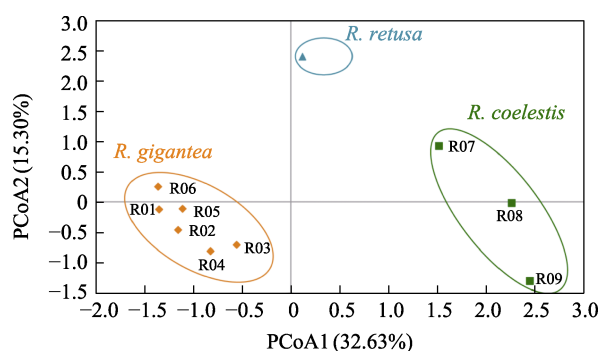


图 2 基于 21 对 SSR 引物的 10 份钻喙兰属种质的主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinate analysis of 10 *Rhynchosstylis* germplasms based on 21 SSR markers

3 讨论

钻喙兰属种质资源虽不丰富,但作为蝴蝶兰属近缘物种,具有易杂交的特性,可与蝴蝶兰进行跨属远缘杂交创制新种质。因钻喙兰属大多数种质具浓香,可作为蝴蝶兰新品种的香味性状亲本来源,目前钻喙兰属常见 3 个种与蝴蝶兰属不同种质均已杂交新品种育成。且钻喙兰属种质具有蝴蝶兰不具备的许多优点,如栽培管理简单粗放、抗性强,海南钻喙兰在广东地区不用低温催花可应春节开花,因此钻喙兰属种质极具开发应用潜力。虽然钻喙兰属的育种工作起步较早,1825 年已在野外发现钻喙兰这个原生种并命名,1935 年在英国皇家园艺学会上登录了第 1 个钻喙

兰与凤蝶兰的跨属杂交种 *Rhynchanthe Bernardii*, 1970 年在英国皇家园艺学会上登录了第 1 个海南钻喙兰与钻喙兰间的种间杂交种 *R. Chorchalood*, 但与蝴蝶兰属、石斛属、万代兰属等其他大属相比,其进展缓慢,目前国内外仅个别兰场栽培了少量单株作为稀有资源进行销售,资源鉴评等相关研究相对十分匮乏,严重制约了钻喙兰属种质的保护和开发利用。

我国作为钻喙兰属野生资源分布区,海南岛分布大量海南钻喙兰,而云南和贵州则分布有钻喙兰野生资源,但目前针对相关资源仅进行了少量的分布调查^[2, 7]、组培快繁和栽培管理^[5-6, 27]等方面的简单研究,资源鉴评方面仅利用 SRAP 标记技术分析了来自海南岛 22 个居群地 144 份野生资源的遗传多样性^[7]。SSR 分子标记是国际植物新品种保护联盟指定的构建植物 DNA 指纹图谱的首选方法^[28],可检测 DNA 序列的差异,稳定性强、可重复性好,已广泛应用于兰科植物的种质鉴评^[20-22, 29]。分子身份证是将目标种质的分子指纹图谱进行编码,形成种质对应的特异编号储存其身份信息,对于数字化管理种质和鉴别具有重要作用,已在石斛兰^[22]、石蒜属^[30]等花卉中成功应用。本研究基于自有资源圃收集保存的钻喙兰属 3 个常见种的 10 份不同种质资源,利用自主开发的 SSR 引物,对其进行遗传多样性分析、亲缘关系分析和分子身份证构建。根据 SSR 分子标记分析的遗传距离系数,利用 UPGMA 方法和 PCoA 分析可以将供试的 10 份钻喙兰属种质按照种划分为 3 个类群,与传统植物分类结果一致。根据引物多态性信息含量及其在钻喙兰属内不同种间的通用性筛选出的 4 对核心引物能够将 10 份钻喙兰属种质完全区分开,为每份种质建立了独有的分子身份证。这充分说明本研究开发筛选的引物适用于钻喙兰属种质的鉴评,可用于野生资源的遗传多样性分析、品种资源的分类鉴定、资源圃的分类管理等,为今后钻喙兰属种质的收集保存和鉴定提供理论基础。

参考文献

- [1] OrchidWiz. OrchidWiz Encyclopedia 7[Z]. OrchidWiz, LLC. 2020.
- [2] 谢佩吾, 许传辉. 钻喙兰属的原生种及主要栽培品种[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2017(10): 30-33.

XIE P W, XU C H. Species and main cultivated varieties of

- Rhynchostylis*[J]. Flower Plant & Penjing, 2017(10): 30-33. (in Chinese)
- [3] KURNIASARI D, ASTUTI, YULIANTI E, SUYITNO, SUGIYARTO L, MERCURIANI I S. Increasing *Rhynchostylis retusa*'s callus formation by immersing explant in ascorbic acid and planting on activated charcoal contained medium[J]. Journal of Physics Conference Series, 2019, 1241(1): 012060.
- [4] SAIKIA P, TALUKDAR M C, DAS P. Response of *Rhynchostylis retusa* L. to mineral nutrients in different growing supports[J]. Research on Crops, 2016, 17(3): 595-598.
- [5] 湛振, 黄明忠, 许敏, 黄素荣, 廖易, 杨光穗. 不同类型栽培基质对海南钻喙兰生长发育的影响[J]. 中国农学通报, 2019, 35(22): 71-76.
- SHEN Z, HUANG M Z, XU M, HUANG S R, LIAO Y, YANG G S. Effects of different matrixes on the growth and development of *Rhynchostylis gigantea*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(22): 71-76. (in Chinese)
- [6] 何虹稣, 杨福孙, 王存, 陈金花. 菌磷互作对海南钻喙兰幼苗生长的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2017, 32(6): 1085-1091.
- HE H S, YANG F S, WANG C, CHEN J H. The interaction of endophytic fungi and different phosphorus levels on growth of *Rhynchostylis gigantea* seedlings[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2017, 32(6): 1085-1091. (in Chinese)
- [7] 颜平, 黄明忠, 杨光穗, 唐燕琼, 尹俊梅. 海南钻喙兰种质资源现状调查[J]. 广东农业科学, 2015, 42(5): 24-30.
- YAN P, HUANG M Z, YANG G S, TANG Y Q, YIN J M. Investigation of *Rhynchostylis gigantea* (Lindley) Ridl. germplasm resources status[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(5): 24-30. (in Chinese)
- [8] 颜平, 黄明忠, 陆顺教, 杨光穗, 唐燕琼, 尹俊梅. 基于 SRAP 标记的海南钻喙兰种质资源遗传多样性分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1677-1682.
- YAN P, HUANG M Z, LU S J, YANG G S, TANG Y Q, YIN J M. Genetic diversity analysis of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.'s germplasm resources based on SRAP markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(9): 1677-1682. (in Chinese)
- [9] 莫饶, 冷青云, 黄明忠, 彭彬, 唐燕琼, 罗远华, 邓小果. 兰科 11 属 14 种植物核型分析[J]. 云南植物研究, 2009, 31(6): 504-508.
- MO R, LENG Q Y, HUANG M Z, PENG B, TANG Y Q, LUO Y H, DENG X G. A karyological study of fourteen species in eleven genera of the Orchidaceae[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2009, 31(6): 504-508. (in Chinese)
- [10] 张俊芳, 李志英, 徐立. 海南钻喙兰 B 类 MADS-box 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 570-574.
- ZHANG J F, LI Z Y, XU L. Cloning and expression analysis of B type MADS-box genes involving in floral development from *Rhynchostylis gigantea*[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(4): 570-574. (in Chinese)
- [11] JUNITA K, LILI S, EVY Y, HERU N, IXORA S M. Molecular identification of several orchid species based on OPA10 and OPA18 RAPD marker[J]. Journal of Physics Conference Series, 2019, 1397(1): 012042.
- [12] PARAB G V, KRISHNAN S. Assessment of genetic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2009, 7(3): 313-319.
- [13] SUBHAS C R, KAUSHIK M, DILIP D S. Assessment of genetic diversity among four orchids based on ddRAD sequencing data for conservation purposes[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2017, 23(1): 169-183.
- [14] ATSUSHI M, MIKI F, SHAN S L, GO S, MAKI Y, YASUHIKO M. Molecular cytogenetic use of BAC clones in *Neofinetia falcata* and *Rhynchostylis coelestis*[J]. Nucleus, 2015, 58(3): 207-210.
- [15] 李会勇, 王天宇, 黎裕, 石云素, 宋艳春, 陆平. TP-M13 自动荧光检测法在高粱 SSR 基因型鉴定中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 68-70.
- LI H Y, WANG T Y, LI Y, SHI Y S, SONG Y C, LU P. Application of the TP-M13 automated fluorescent-labelled system of SSR genotyping in sorghum[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(1): 68-70. (in Chinese)
- [16] 陶乃奇, 张斌, 刘信凯, 周和达, 钟乃盛, 严丹峰, 张敏, 高继银, 张文驹. 利用荧光标记 SSR 鉴别 21 个茶花新品种[J]. 植物学报, 2019, 54(1): 37-45.
- TAO N Q, ZHANG B, LIU X K, ZHOU H D, ZHONG N S, YAN D F, ZHANG M, GAO J Y, ZHANG W J. Identification of 21 new *Camellia* hybrid varieties by fluorescence-labelled simple sequence repeat markers[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2019, 54(1): 37-45. (in Chinese)
- [17] 周俐宏, 石慧, 王志刚, 蔡忠杰. 百合荧光 SSR 标记体系构建及引物筛选[J]. 辽宁农业科学, 2019(5): 1-6.
- ZHOU L H, SHI H, WANG Z G, CAI Z J. Optimization and primers screening of fluorescent labeled SSR-PCR reaction system for *Lily*[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2019(5): 1-6. (in Chinese)
- [18] 段一凡, 王贤荣, 梁丽丽, 李雪霞, 向其柏. 桂花品种 SSR 荧光指纹图谱的构建[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(增刊 1): 1-6.
- DUAN Y F, WANG X R, LIANG L L, LI X X, XIANG Q B. Fingerprinting and identification of *Osmanthus fragrans* cultivars using fluorescence-labeled SSR markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition),

- 2014, 38(Suppl. 1): 1-6. (in Chinese)
- [19] 李青竹, 许俊旭, 王桢, 吉琴, 顾云, 杨柳燕. 利用 SSR 荧光标记构建七十二个莲属荷花品种指纹图谱[J]. 北方园艺, 2020(4): 65-73.
- LI Q Z, XU J X, WANG Z, JI Q, GU Y, YANG L Y. Establishment of seventy-two lotus (*Nelumbo* spp.) cultivars fingerprints using SSR fluorescent markers[J]. Northern Horticulture, 2020(4): 65-73. (in Chinese)
- [20] 肖文芳, 李佐, 陈和明, 吕复兵. 利用 SSR 荧光标记毛细管电泳法检测蝴蝶兰组培突变体[J]. 热带作物学报, 2016, 37(10): 1938-1944.
- XIAO W F, LI Z, CHEN H M, LYU F B. Detection of *Phalaenopsis* in somaclonal variation using fluorescent labeled SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(10): 1938-1944. (in Chinese)
- [21] 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[J]. 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[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(10): 1999-2008. (in Chinese)
- [22] 肖文芳, 李佐, 陈和明, 吕复兵. 基于 TP-M13-SSR 标记的石斛兰种质分子身份证构建[J]. 热带作物学报, 2021, 42(10): 2751-2757.
- XIAO W F, LI Z, CHEN H M, LYU F B. Molecular identity card establishment of *Dendrobium* germplasms by TP-M13-SSR[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(10): 2751-2757. (in Chinese)
- [23] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1993. (in Chinese)
- [24] PEGGY A, WESLEY H. *Rhynchostylis*[J]. Orchids, 2015, 84(2): 86.
- [25] REGY Y, JOSE M, DARIUSZ L S. *Rhynchostylis cymifera* (Orchidaceae), a new species from south western Ghats, India[J]. Jordan Journal of Biological Sciences, 2018, 11(3): 257-259.
- [26] BOTSTEIN D R, WHITE R L, SKOLNICK M H, DAVIS R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Society of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [27] 陈金花, 王存, 黄素荣, 杨光穗. 3 株菌根真菌对海南钻喙兰幼苗生长的影响[J]. 广东农业科学, 2017, 44(4): 46-52.
- CHEN J H, WANG C, HUANG S R, YANG G S. Effects of three kinds of mycorrhizal fungi on growth of *Rhynchostylis gigantea* seedling[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(4): 46-52. (in Chinese)
- [28] International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction//BMT Guidelines[C]. Geneva: UPOV, 2007.
- [29] 陈明堃, 陈璐, 孙维红, 马山虎, 兰思仁, 彭东辉, 刘仲健, 艾叶. 建兰种质资源遗传多样性分析及核心种质构建[J]. 园艺学报, 2022, 49(1): 175-186.
- CHEN M K, CHEN L, SUN W H, MA S H, LAN S R, PENG D H, LIU Z J, AI Y. Genetic diversity analysis and core collection of *Cymbidium ensifolium* germplasm resources[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(1): 175-186. (in Chinese)
- [30] 王黎, 周琪, 高燕会. 石斛属种间杂交种的鉴定和分子身份证构建[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(3): 562-570.
- WANG L, ZHOU Q, GAO Y H. Construction of molecular identification card of *Lycoris* interspecific hybrids[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2022, 39(3): 562-570. (in Chinese)