

◆濒危植物遗传多样性◆

基于 EST-SSR 分子标记的广西海伦兜兰遗传多样性研究^{*}朱舒靖^{1,2}, 邹蓉², 柴胜丰², 唐健民², 唐凤鸾², 陈泰国^{2,3}, 韦霄^{1,2**}

(1. 广西师范大学生命科学院, 广西桂林 541006; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; 3. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541000)

摘要: 海伦兜兰 (*Paphiopedilum helenae*) 具有极高的观赏价值, 为国家一级重点保护野生植物。本研究利用 EST-SSR 分子标记技术对广西海伦兜兰的 5 个居群 (71 个样品) 的遗传多样性和遗传结构进行分析, 旨在为该种质资源的有效保护与利用提供参考依据。结果表明: 海伦兜兰具有中等遗传多样性, 多态位点百分比 (PPB) 为 90% - 100%, 期望杂合度 (H_e) 平均值为 0.451, 香农信息指数 (I) 平均值为 0.801。海伦兜兰绝大多数 (93%) 遗传变异存在于居群内, 仅有 7% 遗传变异存在于居群间, 居群内的遗传变异大于居群间的变异, 基因流 (N_m) 平均值为 4.916。非加权组平均法 (UPGMA)、主坐标分析 (PCoA) 和 Structure 分析结果表明, 聚类并未严格按照地理位置划分, 广西邦亮长臂猿国家级自然保护区靖西市 (JX) 和龙州县下冻镇春秀村 (LZ) 居群的遗传多样性较高, 应作为海伦兜兰重点保护单元进行保护。

关键词: 海伦兜兰; EST-SSR; 分子标记; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)06-1060-08

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240125.004

兰科 (Orchidaceae) 兜兰属 (*Paphiopedilum*) 的所有植物已被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 I 和我国 2021 年版的《国家重点保护野生植物名录》, 同时也是《中华人民共和国野生植物保护条例》的重点保护对象, 备受国际的关注与保护^[1]。海伦兜兰 (*Paphiopedilum helenae*) 是兰科兜兰属植物, 为多年生常绿草本植物, 叶色深绿, 花色金

黄, 观赏价值非常高, 是杂交育种不可多得的种质资源材料, 其经济价值和科研价值极高^[2]。海伦兜兰于 1996 年首次被报道, 发现于越南北部高平省; 而我国于 2005 年在广西西部发现有分布, 并于 2007 年正式报道, 其种群数量非常少, 首次报道时仅发现 35 株。海伦兜兰为地生兰花, 主要生长在石灰岩地区, 分布地海拔较高, 常常分布在近山顶处常绿阔叶林的悬崖

收稿日期: 2023-06-06

修回日期: 2023-07-06

^{*} 广西林业局科技项目 (2023LYKJ03), 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFAA026253), 中国科学院“西部之光”计划 (2022), 广西林业科技推广示范项目 (2023LYKJ03, [2022]GT23) 和广西植物功能物质与资源持续利用重点实验室自主项目 (ZRJJ2022-2) 资助。

【第一作者简介】

朱舒靖 (1997-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事濒危植物保育研究。

【**通信作者简介】

韦霄 (1967-), 男, 研究员, 主要从事濒危植物保护生物学与可持续利用研究, E-mail: wx@gxib.cn。

【引用本文】

朱舒靖, 邹蓉, 柴胜丰, 等. 基于 EST-SSR 分子标记的广西海伦兜兰遗传多样性研究 [J]. 广西科学, 2023, 30(6): 1060-1067.

ZHU S J, ZOU R, CHAI S F, et al. Genetic Diversity of *Paphiopedilum helenae* in Guangxi based on EST-SSR Markers [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(6): 1060-1067.

石缝土壤中^[3]。

自然种群之间和内部的遗传变异对物种的长期生存尤为重要,尤其是濒危物种。了解濒危物种的遗传多样性与变异,有助于揭示其进化机制和濒危原因,对其保护和管理至关重要^[4,5]。因此,对海伦兜兰的遗传多样性与变异进行系统的研究,可为其种质资源、良种选育和保护策略等提供有效参考,避免海伦兜兰植物种质资源濒临灭绝。简单重复序列(SSR)或微卫星 DNA 是由 1-6 个单元核苷酸组成的重复的 DNA 序列,普遍存在于原核生物和真核生物的基因组中^[6]。SSR 标记技术具有多等位基因、共显性、信息量大、相对丰度高、成本低和试验重复性好等特点,在植物遗传分析方面具有广泛的应用前景^[7]。目前,有众多研究者通过 SSR 分子标记对兰科植物的遗传多样性进行了研究,如春兰品种与其园艺关系^[8]、变异品种鉴定^[9]、大花蕙兰(*Cymbidium hybrid*)遗传多样性^[10]、中国兰花的亲缘关系与遗传多样性^[11]等,而关于海伦兜兰遗传多样性与遗传结

表 1 海伦兜兰 5 个居群的详细信息

Table 1 Detailed information of 5 communities of *P. helenae*

采样地 Sampling site	居群 Population	样品数 Sample size	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitud/m
Nonggang Sanlian Station	SLZ	22	106°50'25"E	22°31'01"N	547
Chunxiu Village, Xiadong Town, Longzhou County	LZ	11	106°35'50"E	22°22'46"N	429
Nonggang Minqiang Station 2	MQZ	19	106°54'09"E	22°27'48"N	430
Jingxi County	JX	7	106°29'52"E	22°55'17"N	790
Observation point 8 at Sijiaoshan, Jingxi County	SJS	12	106°28'92"E	22°54'77"N	700

1.2 DNA 提取和 EST-SSR 分型

使用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[12]提取样品的 DNA,并利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行质检。本研究选取 Xu 等^[13]利用亨利兜兰(*P. henryanum*)开发的 34 对引物进行引物筛选,其中大部分引物在兜兰属的 7 个物种中均具有良好的扩增效果^[13]。选取 16 个样本进行引物筛选验证,最终筛选出 10 对扩增成功的、峰形良好的引物开展遗传多样性分析(表 2)。PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳扩增采用 20 μ L 反应体系:1 μ L 模板 DNA(30 ng/ μ L),10 μ L 2 \times TaqPCR Marter Mix,正、反引物各 0.5 μ L(10 μ mol/L),8 μ L ddH₂O 补齐至 20 μ L。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,51-58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存^[14]。使用 GeneMapper v4.1 软

件的研究尚未见报道。因此,本研究采用 EST-SSR 分子标记技术对海伦兜兰遗传多样性与遗传结构进行评估,并提出相应的保护策略,以为为该种质资源的有效保护与利用提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

海伦兜兰采自广西邦亮长臂猿国家级自然保护区的靖西市(JX)、靖西市四角山(SJS)居群,广西弄岗国家级自然保护区的三联站(SLZ)、民强站(MQZ)居群以及广西崇左市龙州县下冻镇春秀村(LZ)居群(表 1),每个居群采集 7-22 个植株(每个植株间距离在 2 m 以上),每个植物选择 2 片健康无病虫害的叶片。将采集植株的新鲜叶片用变色硅胶干燥,共 71 份样本。样品由广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所韦霄研究员鉴定为海伦兜兰(*Paphiopedilum helenae*)。

件在 ABI 3730 xl DNA 分析仪(Applied Biosystems,美国)上读取 SSR 基因型。

1.3 数据分析

1.3.1 遗传多样性与遗传分化

使用 GeneA1Ex v6.5.1^[15]软件计算所有位点和每个居群的观测等位基因(N_a)、有效等位基因(N_e)、香农信息指数(I)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、基因流(N_m)、居群间遗传分化系数(F_{st})和多态位点百分比(PPB),利用 PowerMarker^[16]软件计算所有位点的多态性信息含量(PIC)。

1.3.2 遗传结构分析

采用 3 种方法分析群体间的遗传结构:(1)使用主坐标分析(PCoA)中的主坐标成分来说明个体间的遗传距离;(2)利用 GeneA1Ex v6.5.1 软件进行分子方差分析(AMOVA),研究居群间和居群内的总遗传

变异; (3) 使用 Structure^[17] 对全部个体进行贝叶斯聚类分析, 设置 $K = 1 - 20$, Burn-in 周期为 10 000, MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 设为 100 000,

表 2 SSR 引物信息

Table 2 SSR primer information

位点 Locus	重复基序 Repeat unit	上游引物/下游引物 Upstream primer/Reverse primer	等位基因区间 Allelic interval
DL014	(CTC) ₆	TTCCTTCCCTACCCTTTCCA/CAGCGGTGTCGTTGATGTT	238 - 241
DL020	(GCC) ₆	GGCCAAGTACATGCACCCAT/TTCCACCTCGGTTATGCAC	270 - 293
DL021	(CAG) ₆	GCAAATCCATTTCAGCCCTGC/CGACATGGTCTGAGAGGAGC	193 - 200
DL023	(AGA) ₆	CTTGGGACTCTTTCTCGGC/CCAGGAGGCTCTCAGCTTTC	213 - 250
DL030	(CCG) ₆	CAGGTTGACAGCAATGTCGC/GCCGCAGCTTTTCGGATAAG	177 - 192
DL032	(AAAC) ₅	AGCGTGTTTGGACTAGAGCA/TCGGGGATGCACATGGAAAA	236 - 241
DL034	(CGG) ₆	GGGTGGGGAGAGTAGGAGTT/GCCACAACCTGTTTTCCCGG	211 - 223
DL036	(CGT) ₆	CCACGTGTGACAGAATCCCA/GGCTCCCGACGAGGAATTAC	227 - 242
DL039	(ATC) ₆	CCACCAGCTTTCATATCCTCCA/GCCCATGCTGTGCAAAAAGA	229 - 242
DL040	(TCT) ₆	AAGAAGTGGCTTCCATGGCA/GCAAAAACCAAGGTGTCTGCTCC	208 - 223

1.3.3 系统发育分析

利用 PowerMarker 软件计算两两样品之间的 Nei's 遗传距离, 基于 Nei's 遗传距离矩阵, 采用 MEGA v6^[18] 的非加权组平均法 (UPGMA) 构建所有个体的系统发育树。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 标记多态性

利用 10 对引物对海伦兜兰进行多态性分析, 结果见表 3。由表 3 可知, 71 份样品共检测到 31.8 个观测等位基因, 观测等位基因数为 1.600 (DL034) - 5.600 (DL020), 平均每个位点存在 3.180 个等位基因; 有效等位基因数为 1.177 (DL034) - 4.101 (DL020), 平均值为 2.191; 香农信息指数为 0.208 (DL034) - 1.510 (DL020), 平均值为 0.801; 观察杂合度为 0.153 (DL034) - 0.771 (DL032), 平均值为 0.490; 期望杂合度为 0.124 (DL034) - 0.740 (DL020), 平均值为 0.451; EST-SSR 基因多态性信息含量为 0.154 (DL034) - 0.817 (DL020), 平均值

每个 K 值运行 10 次, 并利用在线工具 Structure Harvester 计算出最佳 ΔK 值, 即为最佳群体分层情况, 根据最佳 K 值作图。

为 0.444。综上, 本研究使用的 EST-SSR 引物大部分多态性良好, 可用于后续试验进行遗传信息分析, 其中引物 DL034 多态性显著低于其他引物。

2.2 遗传多样性分析

海伦兜兰 5 个居群的遗传多样性信息结果见表 4。由表 4 可知, 观测等位基因数为 2.900 (JX、MQZ) - 3.600 (SLZ), 平均值为 3.180。有效等位基因数为 2.020 (SLZ) - 2.316 (JX), 平均值为 2.191。香农信息指数为 0.749 (MQZ) - 0.861 (JX), 平均值为 0.801。观测杂合度为 0.404 (SLZ) - 0.603 (LZ), 平均值为 0.490。期望杂合度为 0.403 (SJS) - 0.503 (JX), 平均值为 0.451。多态位点百分比为 90% - 100%, 平均值为 92%。综上, 海伦兜兰的遗传多样性较丰富, 其中靖西市 (JX, $I = 0.861$, $H_e = 0.503$, $PPB = 90\%$) 和龙州县下冻镇春秀村 (LZ, $I = 0.855$, $H_e = 0.501$, $PPB = 100\%$) 居群的遗传多样性较高, 广西邦亮长臂猿国家级自然保护区的靖西市四角山 (SJS, $I = 0.773$, $H_e = 0.403$, $PPB = 90\%$) 居群的遗传多样性相对较低。

表 3 10 对引物多态性分析

Table 3 Polymorphism analysis of 10 pairs of primer

位点 Locus	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	香农信息指数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态性信息含量 PIC
DL014	2.000	1.329	0.341	0.206	0.210	0.180
DL020	5.600	4.101	1.510	0.763	0.740	0.817
DL021	2.600	1.858	0.703	0.622	0.461	0.384
DL023	3.400	2.594	1.042	0.696	0.614	0.592
DL030	2.600	1.471	0.474	0.195	0.248	0.204
DL032	3.400	2.562	1.010	0.771	0.601	0.522
DL034	1.600	1.177	0.208	0.153	0.124	0.154
DL036	4.400	2.315	1.025	0.516	0.560	0.615
DL039	2.600	1.449	0.510	0.281	0.292	0.294
DL040	3.600	3.049	1.182	0.695	0.664	0.675
Mean	3.180	2.191	0.801	0.490	0.451	0.444

表 4 海伦兜兰 5 个野生居群的遗传多样性水平

Table 4 Genetic diversity levels of 5 wild populations of *P. helenae*

居群 Population	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	香农信息指数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态位点百分比/% PPB/%
JX	2.900	2.316	0.861	0.524	0.503	90
LZ	3.000	2.212	0.855	0.603	0.501	100
MQZ	2.900	2.163	0.749	0.508	0.433	90
SLZ	3.600	2.020	0.764	0.404	0.418	90
SJS	3.500	2.242	0.773	0.409	0.403	90
Mean	3.180	2.191	0.801	0.490	0.451	92

2.3 遗传结构与分化

分子方差分析结果(表 5)表明,海伦兜兰居群间的遗传变异仅占 7%,而居群内遗传变异占 93%,说明海伦兜兰的变异主要发生在居群内,居群内遗传分化程度较高,居群间遗传分化程度较低。由表 6 可知,各居群间遗传分化系数(F_{st})为 0.022 - 0.127,遗传分化程度不高。其中,SJS 与 LZ、SLZ 以及 SLZ 与 LZ 居群之间的 F_{st} 值均小于 0.05,表现出低遗传分化,表明这些居群之间具有较近的亲缘关系;而其他各个地区之间的遗传分化系数均为 0.050 - 0.150,表现出中等遗传分化;SJS 与 JX 的遗传分化系数最高(0.127),表明这两个居群间亲缘关系最远。海伦兜兰居群间 N_m 值为 1.718 - 11.103,平均值为 4.916,基因流水平较高。

利用 Structure 软件中的贝叶斯聚类方法对海伦兜兰群体的遗传结构进行分析,结果如图 1 所示。当 $K = 3$ 时, ΔK 取得最大值,表明海伦兜兰 5 个居群的

基因型可分为 3 种(图 1),但这 3 种基因型在基因池中分布不均且不能按照基因型分布(图 2)。

2.4 系统发育关系分析

基于 Nei's 遗传距离矩阵,采用 UPGMA 对 71 份海伦兜兰样品进行聚类分析(图 3)。结果显示,2 份 JX 和 1 份 MQZ 聚为一支(I);剩余的 5 份 JX、11 份 LZ、11 份 MQZ、22 份 SLZ 和 12 份 SJS 聚为一支

表 5 海伦兜兰群体的分子方差分析

Table 5 AMOVA of *P. helenae* population

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 component	变异百分比/% Percentage of variation/%
Among population	4	30.053	7.513	0.184	7
Within population	137	338.855	2.473	2.473	93
Total	141	368.908		2.658	100

表 6 海伦兜兰 5 个居群间遗传分化系数 (F_{st} , 对角线下方) 和基因流 (N_m , 对角线上方)

Table 6 Genetic differentiation coefficient (F_{st} , below the diagonal) and gene flow (N_m , above the diagonal) among 5 populations of *P. helenae*

居群 population	JX	LZ	MQZ	SLZ	SJS
JX	* * *	3.188	2.058	2.303	1.718
LZ	0.073	* * *	3.342	8.767	11.103
MQZ	0.108	0.070	* * *	2.426	3.199
SLZ	0.098	0.028	0.093	* * *	11.056
SJS	0.127	0.022	0.072	0.022	* * *

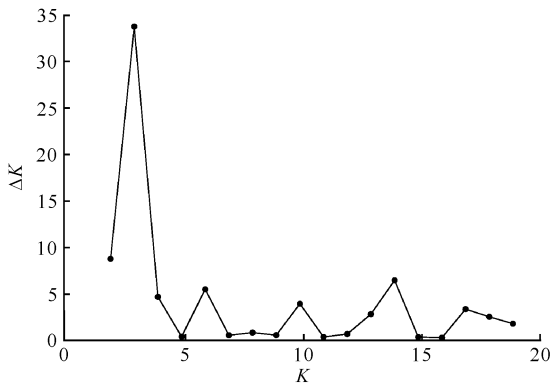


图 1 海伦兜兰各居群群体结构分析的 ΔK 值分布

Fig. 1 Analysis of the population structure of *P. helenae* among different groups ΔK -value distribution

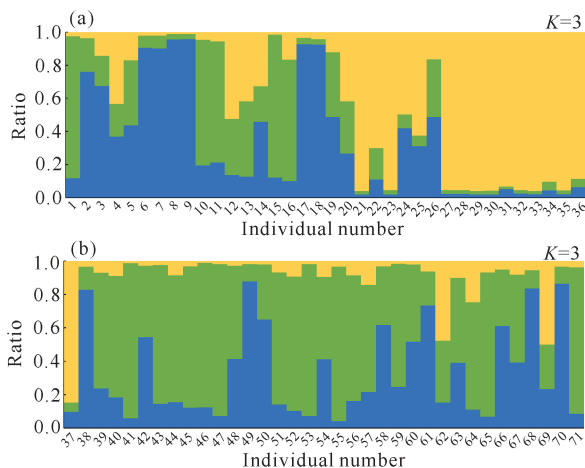


图 2 海伦兜兰群体的遗传结构

Fig. 2 Genetic structure of the *P. helenae* population

(II), II 支又划分为 II -1、II -2, 其中 II -1 包括 4 份 LZ 和 1 份 SLZ, II -2 包括 5 份 JX、8 份 LZ、11 份 MQZ、21 份 SLZ 和 12 份 SJS。LZ 居群少数样品与 SLZ 居群 1 份样品亲缘关系近, JX 居群少数样品与 MQZ 居群 1 份样品亲缘关系较近。主坐标分析结果

显示, 第一主坐标和第二主坐标分别占总遗传变异的 15.57% 和 11.31% (图 4)。综上可知, UPGMA 聚类分析结果与 PCoA 主坐标分析结果基本一致, 即海伦兜兰明显划分为 3 支, 但未按照地理位置明显划分。

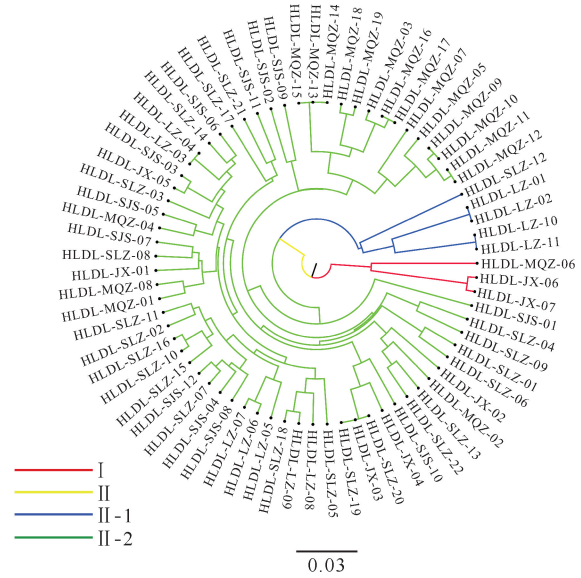


图 3 海伦兜兰种质资源遗传关系的进化树

Fig. 3 Evolutionary tree of genetic relationship of *P. helenae* germplasm resources

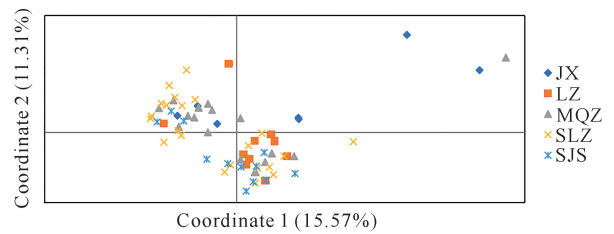


图 4 海伦兜兰群体主坐标分析

Fig. 4 Principal coordinate analysis of *P. helenae* population

3 讨论

3.1 遗传多样性分析

EST-SSR 分子标记技术具有灵活性高、成本低、多态性丰富、重复性好等优势, 利用该技术来分析海伦兜兰的遗传多样性, 其结果更能反映 DNA 水平上真实的遗传变异, 为海伦兜兰的品种选育与保护提供参考依据^[19, 20]。遗传多样性是物种进化潜力和抵抗外界环境变化的一种体现, 物种遗传多样性越丰富, 其适应外界环境的能力越强, 反之则越弱^[21]。本研究表明, 海伦兜兰的微卫星位点均表现出较高的多态性, PIC 平均值为 0.444, 比野生春兰 (*Cymbidium goeringii*) 的多态性 (PIC = 0.805 0) 低^[22]。海伦兜兰的 PPB 平均值为 92%, 高于硬叶兜兰 (*P. micranthum*, PPB = 81.25%)^[23]、贵州南部的 8

种野生兜兰(PPB=80.26%)^[24]和贵州北盘江流域6种兜兰(PPB=84.54%)^[25]的多态性平均水平。此外,海伦兜兰的遗传多样性平均水平($H_e = 0.451$ 、 $I = 0.801$)低于蕙兰(*C. faberi*, $H_e = 0.600$ 、 $I = 1.049$)^[26],高于带叶兜兰(*P. hirsutissimum*, $H_e = 0.420$ 、 $I = 0.742$)^[21]、铁皮石斛(*Dendrobium of ficinale*, $H_e = 0.344$ 、 $I = 0.508$)^[27],表明海伦兜兰具有中等遗传多样性。

植物的遗传多样性通常取决于其繁育系统和生活型,稀有和特有物种的遗传多样性水平低于广布物种,一般而言,分布广、种子由动物传播的多年生草本植物具有较高的遗传多样性^[28,29]。海伦兜兰为地生型草本植物,分布范围有限,种群数量极少^[2],本研究结果显示海伦兜兰具有中等遗传多样性。SJS和SLZ居群遗传多样性相对较低,可能是由于栖息地遭受破坏、长期保持小群体规模和群体破碎化导致遗传多样性丧失^[1,3,30]。杨舒婷等^[31]研究发现,海拔越高,物种的遗传多样性也越高。海伦兜兰对生境的要求极高,分布地区海拔较高,尤其是JX居群位于海拔790 m,人为干扰相对困难,因此保留较高的遗传多样性。

3.2 遗传结构和遗传分化

从遗传结构上来看,海伦兜兰遗传变异仅有7%来自居群间,绝大部分遗传变异发生在居群内,这与徐言等^[21]研究发现的兜兰属植物遗传变异主要发生在居群内的研究结果一致。海伦兜兰具有中等的遗传多样性,群体间遗传变异较低,可能与海伦兜兰具有艳丽的花色而实施欺骗性授粉策略以及具有沙尘状的种子等特征有关,这些特征增加了群体内的基因交流频率^[32]。董丽敏等^[33]研究表明, F_{st} 值为0.00-0.05的群体,各亚群间分化可忽略不计; F_{st} 值为0.05-0.15时,则被视为中度分化; F_{st} 值为0.15-0.25时,则被认为是高度分化。本研究发现,海伦兜兰遗传分化处于中等水平($F_{st} = 0.071$),低于六盘北野生兜兰属植物($G_{st} = 0.536$)^[25]。此外,基因流是影响种群遗传分化的重要因素之一^[34]。海伦兜兰的基因流较高($N_m = 4.916$),较高的基因流可以阻止由遗传漂变引起的种群遗传分化。种群间的基因流动一般受到种子和花粉传播的限制^[35]。兰花的典型特征是种群遗传分化低,这通常归因于兰花多为尘埃状种子,虽然大多数兰花种子通常落在母株附近,但它可以依赖风进行长距离传播^[36]。

3.3 系统发育关系

本研究中UPGMA聚类树、Structure和PCoA的分析结果基本一致,海伦兜兰可分为3支,但并未严格按照地理位置划分,这与秦惠珍等^[37]对白花兜兰(*P. emersonii*)的研究结果一致,说明海伦兜兰5个居群之间遗传分化较小,亲缘关系较近。JX居群与MQZ居群在地理位置上较SJS远,但JX居群与MQZ居群的部分个体优先聚集在一起;同理LZ部分个体优先与SLZ居群部分个体聚集在一起,而不是与同一个保护区内距离较近的MZQ居群聚集在一起。出现这一结果的原因可能是由于各居群间基因交流频繁或是受到人为活动的影响,如海伦兜兰在公开后被非法大量采集,导致海伦兜兰植株在不同地区之间迁移。

4 结论

本研究结果表明,海伦兜兰的遗传多样性($H_e = 0.451$, $I = 0.801$)处于中等水平;JX和LZ这两个居群的遗传多样性较高,应作为重点保护单元进行保护;绝大多数遗传变异存在于居群内,仅有7%的遗传变异存在于居群间,居群内的遗传变异大于居群间的变异。目前,除龙州县下冻镇春秀村的LZ居群外,其他居群(JX、SJS、SLZ和MQZ)均在保护区内。因此,对LZ居群,林业部门应尽快建立保护小区;而对JX、SJS、SLZ和MQZ居群应加强保护区建设,加大管护和巡护力度,避免生境破坏和人为采挖。此外,海伦兜兰分布区狭窄,种群个体数量极少,抗干扰能力弱,为保护其遗传多样性,有必要开展人工授粉,促进种群的有性繁殖,防止物种退化,建议从居群间选择有代表性植株的子代进行迁地保护,最大限度地保护其种群的遗传多样性。

参考文献

- [1] 黄云峰,薛跃规. 中国新分布种海伦兜兰的濒危状况[J]. 植物分类学报, 2007, 45(3): 333-336.
- [2] 唐凤鸾,盘波,赵健,等. 极小种群野生植物海伦兜兰的地理分布及生境调查[J]. 广西科学院学报, 2022, 38(1): 40-44.
- [3] 吴磊,刘全儒. 海伦兜兰[J]. 生物学通报, 2014, 49(5): 34.
- [4] LIU J F, SHI S Q, CHANG E M, et al. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation [J]. International Journal of Molecular Sciences,

- 2013, 14(7):14860-14871.
- [5] LI A, GE S. Genetic variation and conservation of *Changnienia amoena* an endangered orchid endemic to China [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, 258(3/4):251-260.
- [6] LIU S R, AN Y L, LI F D, et al. Genome-wide identification of simple sequence repeats and development of polymorphic SSR markers for genetic studies in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Molecular Breeding*, 2018, 38(5):59.
- [7] AHMAD A, WANG J D, PAN Y B, et al. Development and use of simple sequence repeats (SSRs) markers for sugarcane breeding and genetic studies [J]. *Agronomy*, 2018, 8(11):260.
- [8] LIU X F, HUANG Y, LI F, et al. Genetic diversity of 129 spring orchid (*Cymbidium goeringii*) cultivars and its relationship to horticultural types as assessed by EST-SSR markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 174:178-184.
- [9] LEE H J, PARK H R, LEE A J, et al. Genetic authentication of cultivars with flower-variant types using SSR markers in spring orchid, *Cymbidium goeringii* [J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2020, 61(3):577-590.
- [10] MOE K T, ZHAO W G, SONG H S, et al. Development of SSR markers to study diversity in the genus *Cymbidium* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(4):585-594.
- [11] HUANG Y, LI F, CHEN K S. Analysis of diversity and relationships among Chinese orchid cultivars using EST-SSR markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(1):93-102.
- [12] DOYLE J J, DOYLE J L, BALLENGER J A, et al. The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family Leguminosae [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1996, 5(2):429-438.
- [13] XU Y F, JIA R D, ZHOU Y H, et al. Development and characterization of polymorphic EST-SSR markers for *Paphiopedilum henryanum* (Orchidaceae) [J]. *Applications in Plant Sciences*, 2018, 6(5):e01152.
- [14] 任重, 白倩, 苏淑钗. 基于 SSR 分子标记的中国黄连木遗传多样性分析[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(9):1530-1539.
- [15] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6. 5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19):2537-2539.
- [16] LIU K, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9):2128-2129.
- [17] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(2):945-959.
- [18] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12):2725-2729.
- [19] 张水明, 陈程, 陈芳芳, 等. 16 个蝴蝶兰品种 EST-SSR 遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(3):560-564.
- [20] 黄稚清, 吴林源, 高筱钰, 等. 基于 SSR 标记的紫花凤铃木群体遗传多样性分析[J/OL]. *热带亚热带植物学报*, 2023:1-9(2023-04-03)[2023-06-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1374.Q.20230331.1604.004.html>.
- [21] 徐言, 陈之光, 徐玉凤, 等. 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[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(11):2208-2218.
- [22] 曾艳华, 何荆洲, 龙蕾宇, 等. 广西乐业野生春兰 iPBS 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. *西南农业学报*, 2023, 36(1):11-19.
- [23] 李宗艳, 李静, 曾万标, 等. 滇东南硬叶兜兰核心种质区群体遗传结构[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(3):407-413.
- [24] 朱亚艳, 王港, 侯娜, 等. 贵州南部野生兜兰 SRAP 遗传多样性分析[J]. *西南林业大学学报*, 2017, 37(1):10-14.
- [25] 田力, 安明态, 施金竹. 贵州北盘江流域野生兜兰属植物遗传多样性分析[J]. *西部林业科学*, 2023, 52(2):88-97.
- [26] 寇帅, 李政, 李先源, 等. 蕙兰 SSR 引物开发及渝贵川地区兰属遗传多样性研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(2):338-348.
- [27] 徐蕾, 刘莉, 彭少丹, 等. 利用 SSR 标记研究铁皮石斛的遗传多样性[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(7):1616-1622.
- [28] YUN S A, SON H D, IM H T, et al. Genetic diversity and population structure of the endangered orchid *Pelatanttheria scolopendrifolia* (Orchidaceae) in Korea [J]. *PLoS One*, 2020, 15(8):e0237546.
- [29] TANG R, LIU E X, ZHANG Y Z, et al. Genetic diversity and population structure of *Amorphophallus albus*, a plant species with extremely small populations

- (PSESP) endemic to dry-hot valley of Jinsha River [J]. BMC Genetics, 2020, 21(1): 102.
- [30] QIAN X, WANG C X, TIAN M. Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14 (10): 20399-20413.
- [31] 杨舒婷, 马晓娜, 白晓霖, 等. 极小种群野生植物巴郎山杓兰的 CDDP 遗传多样性分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2022, 59(6): 155-163.
- [32] MANNERS V, KUMARIA S, TANDON P. SPAR methods revealed high genetic diversity within populations and high gene flow of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl (Blue Vanda), an endangered orchid species [J]. Gene, 2013, 519(1): 91-97.
- [33] 董丽敏, 戴亮芳, 白李唯丹, 等. 濒危羊躑躅子代幼苗遗传多样性的 SSR 分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(4): 613-619.
- [34] 陈海玲, 路雪林, 叶泉清, 等. 基于 SSR 标记探讨三种金花茶植物的遗传多样性和遗传结构[J]. 广西植物, 2019, 39(3): 318-327.
- [35] LI X X, DING X Y, CHU B H, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP [J]. Genetica, 2008, 133(2): 159-166.
- [36] CHEN Y Y, BAO Z X, QU Y, et al. Genetic diversity and population structure of the medicinal orchid *Gastrodia elata* revealed by microsatellite analysis [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 54: 182-189.
- [37] 秦惠珍, 盘波, 赵健, 等. 极小种群野生植物白花兜兰 ISSR 遗传多样性分析[J]. 广西科学, 2022, 29(6): 1134-1140.

Genetic Diversity of *Paphiopedilum helenae* in Guangxi based on EST-SSR Markers

ZHU Shujing^{1,2}, ZOU Rong², CHAI Shengfeng², TANG Jianmin², TANG Fengluan²,
CHEN Taiguo^{2,3}, WEI Xiao^{1,2,*}

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 3. College of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi, 541000, China)

Abstract: *Paphiopedilum helenae* has extremely high ornamental value and is a national first-class key protected wild plant. In this study, EST-SSR molecular markers were used to analyze the genetic diversity and genetic structure of 71 samples from 5 populations of *P. helenae* in Guangxi, in order to provide an important reference for the effective protection and utilization of the germplasm resources. The results showed that *P. helenae* has moderate genetic diversity, with a percentage of polymorphic loci (PPB) ranging from 90% to 100%, the average expected heterozygosity (H_e) was 0.451, and the average Shannon information index (I) was 0.801. The vast majority (93%) of genetic variation exists within populations, with only 7% occurring between populations. The genetic variation within populations is greater than that between populations, and the estimated gene flow (N_m) average value was 4.916. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA), Principal Coordinate Analysis (PCoA) and Structure analysis showed that clustering was not strictly based on geographical location. The genetic diversity of Bangliang Gibbon Nature Reserve Jingxi County (JX) and Xialeng Town, Longzhou County (LZ) populations is relatively high, and should be protected as a key unit for *P. helenae*.

Key words: *Paphiopedilum helenae*; EST-SSR; molecular marker; genetic diversity; genetic structure

责任编辑:唐淑芬