

## ◆濒危植物遗传多样性◆

## 基于 SSR 的广西同色兜兰和带叶兜兰遗传多样性分析\*

朱显亮<sup>1</sup>, 朱舒靖<sup>1,2</sup>, 邹蓉<sup>1</sup>, 唐健民<sup>1</sup>, 罗亚进<sup>3</sup>, 韦霄<sup>1\*\*</sup>

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与资源持续利用重点实验室, 广西桂林 541006; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541006; 3. 广西雅长兰科植物国家级自然保护区管理中心, 广西百色 533209)

**摘要:** 评估四季开花型同色兜兰(*Paphiopedilum concolor*)和春季开花型带叶兜兰(*P. hirsutissimum*)的遗传多样性和种群结构, 探究不同开花习性兜兰属物种间的遗传分化, 为兜兰的可持续利用和野生资源保护提供理论依据。本研究利用 10 个多态性 EST-SSR 位点对 12 个同色兜兰和带叶兜兰种群的 231 个个体分型, 开展遗传多样性、瓶颈效应、系统发育、遗传结构、遗传分化、距离隔离和环境隔离分析。结果表明, 同色兜兰种群的大多数遗传多样性指标都显著( $P < 0.05$ )低于带叶兜兰; 分子方差分析(AMOVA)结果显示, 两者来自种群间的变异都较少, 且带叶兜兰来自个体内的遗传变异高于同色兜兰。在同色兜兰的两个种群中检测到显著( $P < 0.05$ )瓶颈效应, 而在带叶兜兰全部种群中均未检测到。群体水平的非加权平均(UPGMA)树和个体水平的邻接(NJ)树均显示同色兜兰和带叶兜兰间系统发育关系相对较近, 并各自聚为一支。主坐标分析(PCoA)和 Structure 分析结果均支持系统发育分析结果。此外, 遗传分化系数( $F_{ST}$ )证实两个物种间的种群分化已达到较高水平。狭窄的自然分布和过去的种群瓶颈可能导致了同色兜兰的部分遗传多样性丧失。地理隔离是驱动同色兜兰和带叶兜兰种群遗传分化的主要因素, 而环境隔离的作用较小。

**关键词:** 同色兜兰; 带叶兜兰; 遗传分化; 种群瓶颈; 地理隔离; EST-SSR

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)06-1068-11

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240125.005

兜兰是兰科(Orchidaceae)兜兰属(*Paphiopedilum*)植物的统称, 以其花唇瓣呈兜状闻名, 又因酷似旧时欧洲女子拖鞋, 亦被称为“拖鞋兰”和“仙履兰”。

兜兰属共包括 109 个物种, 其中有 27 个分布在中国<sup>[1]</sup>。该属花形奇特, 并且在生长习性(地生型、石上附生型和树上附生型)、开花时间(春季开花型、夏季

收稿日期: 2023-06-08

修回日期: 2023-08-23

\* 国家重点研发计划项目(2022YFF1300703), 广西自然科学基金项目(2023GXNSFAA026253), 广西林业科技推广示范项目(2023LYKJ03, [2022]GT23), 广西植物功能性植物化学物质研究与可持续利用重点实验室自主项目(ZRJJ2022-2)资助。

## 【第一作者简介】

朱显亮(1996-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事保育生物学研究, E-mail: xianliangzhu2021@126.com。

## 【\*\*通信作者简介】

韦霄(1967-), 男, 博士, 研究员, 主要从事珍稀濒危植物保育研究, E-mail: weixiao@gxib.cn。

## 【引用本文】

朱显亮, 朱舒靖, 邹蓉, 等. 基于 SSR 的广西同色兜兰和带叶兜兰遗传多样性分析[J]. 广西科学, 2023, 30(6): 1068-1078.

ZHU X L, ZHU S J, ZOU R, et al. Genetic Diversity of the *Paphiopedilum concolor* and *P. hirsutissimum* in Guangxi based on SSR [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(6): 1068-1078.

开花型、秋冬季开花型和四季开花型等)和开花类型(单花、双花或多花)等方面呈现丰富的多样性<sup>[2]</sup>。因此,兜兰是具有高观赏价值和经济价值的花卉植物。然而,由于过度采集和非法贸易,大多数野生兜兰的栖息地人为破坏严重,因此其种群和个体数量都在不断减少,濒临灭绝。

同色兜兰(*P. concolor*)是兜兰属中罕见的四季开花型物种,曾自然分布于广西、云南和贵州的部分地区<sup>[3]</sup>,但近期的全国专项调查显示仅在广西西南地区一带见其自然分布<sup>[4]</sup>。带叶兜兰(*P. hirsutissimum*)是春季开花型兜兰,花期在4-5月,主要分布在广西西部至北部、贵州西南部和云南东南部一带<sup>[5]</sup>。在2021年版《国家重点保护野生植物名录》中,同色兜兰和带叶兜兰分别被列为国家一级和二级重点保护野生植物。对于濒危植物而言,了解它们的遗传多样性、种群结构、种群遗传分化等信息对物种保育具有重要意义<sup>[6-8]</sup>。为了有效保护和利用带叶兜兰,先前已经开展了一些保护遗传学方面的研究:高丽霞等<sup>[9]</sup>基于SRAP标记评估了广西木论国家级自然保护区40份野生带叶兜兰资源的遗传多样性;徐言等<sup>[10]</sup>基于SSR标记对中国西南地区190份带叶兜兰资源(其中13份来自广西木论国家级自然保护区,39份来自广西雅长兰科植物国家级自然保护区)进行了遗传多样性、种群结构和表型多样性分析。广西是兰科植物的天然分布中心之一,拥有相对丰富的兰

表1 样品采集信息

Table 1 Sample collection information

物种 Species	采集地点 Collection site	经度 Longitude	纬度 Latitude	种群号 Population ID	采样数 Sampling number
<i>P. concolor</i>	Pairu Village, White-headed Langur Nature Reserve	107°42'E	22°50'N	TS-PR	3
	Huguo Village, Encheng Town, Daxin County, Chongzuo City	107°60'E	22°46'N	TS-HG	30
	Jiuhan Village, Fuxin Town, Tiandeng County, Chongzuo City	107°10'E	22°54'N	TS-JH	10
	Weiping Village, Yalong Town, Dahua County, Hechi City	107°52'E	23°59'N	TS-WP	15
	Minqiang Village, Shanglong Town, Longzhou County, Chongzuo City	106°53'E	22°26'N	TS-MQ	22
<i>P. hirsutissimum</i>	Laya Gorge, Yarchang Nature Reserve	106°19'E	24°48'N	DY-LX	15
	Orchid Germplasm Gene Bank of Yachang Nature Reserve	106°25'E	24°51'N	DY-YC	23
	Xiakairong, Mingmo Station, Mulun Nature Reserve	107°58'E	25°60'N	DY-XKR	30
	Huangjiang Village, Luofu Town, Nandan County, Hechi City	107°21'E	25°50'N	DY-HJ	20

科植物资源,然而先前对广西带叶兜兰资源的遗传多样性评估都集中在自然保护区中的就地保护种群,可能难以反映存活在自然保护区之外的带叶兜兰野生种群的遗传多样性。迄今为止,还未有关于同色兜兰遗传多样性和群体结构方面的报道。此外,对于这两种不同开花习性的兜兰属物种的遗传分化程度也缺少研究。

因此,本研究通过实地调查,广泛收集了分布于广西的231份同色兜兰和带叶兜兰样品,并利用SSR标记开展保护遗传学研究,重点探究不同开花习性的同色兜兰和带叶兜兰的遗传多样性水平、种群结构及其遗传分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在广西采集了同色兜兰5个自然种群的80个样品以及带叶兜兰7个自然种群的151个样品(表1)。为了探究同色兜兰和带叶兜兰的系统发育关系,还采集了同属的其他3个近缘种,分别为长瓣兜兰(*P. dianthum*)、麻栗坡兜兰(*P. malipoense*)和硬叶兜兰(*P. micranthum*),每个近缘种各采集3个样品。由于部分兜兰属物种具有丛生特点,为了避免采集到同一株植株,所有采集植株之间至少间隔10 m。使用变色硅胶分别采集各植株的新鲜叶片样品。

续表

Continued table

物种 Species	采集地点 Collection site	经度 Longitude	纬度 Latitude	种群号 Population ID	采样数 Sampling number
	Jingxi County, Baise City	106°30'E	22°55'N	DY-JX	10
	Poji Town, Tian'e County, Hechi City	107°80'E	25°12'N	DY-PJ	29
	Tianlin County, Baise City	105°39'E	24°31'N	DY-TL	24
<i>P. micranthum</i>	Tianlin County, Baise City	105°39'E	24°31'N	YY-TL	3
<i>P. dianthum</i>	Tianlin County, Baise City	105°39'E	24°31'N	CB-TL	3
<i>P. mali-poense</i>	Tianlin County, Baise City	105°39'E	24°31'N	MLP-TL	3

Note: several populations were not accurate to the towns and villages.

## 1.2 DNA 提取和 SSR 分型

使用改良 CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) 法<sup>[11]</sup>提取了 240 个样品的 DNA, 并利用 1.2% 琼脂糖电泳 (120 V, 20 min) 进行质检。使用 NanoDROP 8000 超微量分光光度计 (赛默飞世尔科技公司) 检测 DNA 的浓度和纯度 ( $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$ , 浓度  $\geq 30$  ng/ $\mu$ L)。利用 10 对高多态性 SSR 引物 (表 2) 对 240 个样品进行分型。10 对高多态性 SSR 引物筛选自 Xu 等<sup>[12]</sup> 在亨利兜兰 (*P. henryanum*) 中开发的 34 对 EST-SSR 引物, 该研究已证明 34 对引物在 7 种兜兰属 (包括同色兜兰和带叶兜兰) 植物中均有较好的扩增效果。PCR 扩增体系: 2  $\times$  Taq PCR Master Mix 5.0  $\mu$ L, DNA 1.0  $\mu$ L ( $\sim 20$  ng), 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L (浓度均为 10 pmol/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 3.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62–52  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应循环 10 次; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应循环 25 次; 72  $^{\circ}$ C 末端延伸 20 min; 4  $^{\circ}$ C 保温。使用 GeneMapper v4.1 软件在 ABI 3730xl DNA 分析仪上读取 SSR 基因型。

## 1.3 方法

### 1.3.1 遗传多样性和瓶颈效应分析

使用 GenAlEx v6.5.1<sup>[13]</sup> 计算位点和群体的遗传多样性指标, 包括观测等位基因数 ( $N_a$ )、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 ( $H_e$ ) 和固定系数 ( $F$ ) 等。利用 R 语言对同色兜兰和带叶兜兰间各群体的遗传多样性指标差异进行  $t$  检验。利用分子方差分析 (AMOVA) 评估种群间、个体间和个体内的总遗传变异。采用 BOTTLENECK v1.2.02<sup>[14]</sup> 软件对各种群进行瓶颈效应分析。根据 Piry 等<sup>[14]</sup> 的建议使用更适合 SSR 标记的两相混合模型 (TPM) 进行检验, 并设置方差 (Va-

riance) 为 12, 步移式突变 (SMM) 占模型检测的比例为 95%, 以及迭代次数为 1 000。由于同色兜兰 TS-PR 种群的采样数量低于 Bottleneck 软件的最低使用标准, 因此在瓶颈效应检验中排除该种群。

### 1.3.2 系统发育关系和遗传结构分析

为了更准确评估同色兜兰和带叶兜兰间的系统发育关系, 在分析中加入了长瓣兜兰、麻栗坡兜兰和硬叶兜兰共 9 个样品的数据, 然后利用 MEGA v6.0<sup>[15]</sup> 的非加权平均 (UPGMA) 法和邻接 (NJ) 法分别构建群体水平和个体水平的系统发育树。

采用不同分析方法检测群体间的遗传结构。首先, 通过 GeneAlEx v6.5.1 计算个体间 Nei 氏遗传距离矩阵, 随后使用主坐标分析 (PCoA) 来计算样品主坐标成分, 并通过主坐标成分来说明个体间遗传聚类。使用 STRUCTURE<sup>[16]</sup> 对全部个体进行贝叶斯聚类分析, 设置假定分群数 ( $K$ ) 为 1–10, Burn-in 周期为 10 000, MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 设为 100 000, 每个  $K$  值重复运行 10 次, 再利用在线工具 Structure Harvester, 根据 Delta  $K$  的最大值确定最佳分群数<sup>[17]</sup>。

### 1.3.3 遗传分化、距离隔离 (IBD) 和环境隔离 (IBE) 分析

利用 Arlequin v3.5.2.2<sup>[18]</sup> 计算同色兜兰和带叶兜兰群体间的遗传分化系数 ( $F_{ST}$ )。根据 12 个种群的地理坐标信息, 利用 R 语言计算种群间的地理距离, 并在 WorldClim 数据库 (<http://worldclim.org/>) 中下载了 19 个气候变量信息, 在国家青藏高原数据中心 (<https://data.tpdc.ac.cn/>) 的 Harmonized World Soil Database v1.1 中下载了 16 个表土理化特性信息作为土壤变量。通过计算 35 个变量间的 Spearman 相关性系数 ( $R$ ) 来去除冗余变量, 当两两变量间的相关性绝对值大于 0.8 时, 仅保留其中 1

个变量,最终确定了 12 个代表性环境变量:年平均气温(BIO1)、昼夜温差月均值(BIO2)、等温性(BIO3)、温度季节性变化标准差(BIO4)、最干月降水量(BIO14)、降水量变异系数(BIO15)、表土含砾量(T\_GRAVEL)、表土黏土分数(T\_CLAY)、表土 USDA 质地分类(T\_USDA\_TEX)、表土水 pH 值(T\_PH\_H<sub>2</sub>O)、表土阳离子交换量(T\_CEC\_CLAY)、表土盐度(T\_ECE)。最后,分别对遗传分化系数、地理距离以及 12 个代表性环境变量进行 Mantel 检验,计算 Spearman 相关性系数,并进行 9 999 次置换检验

表 2 SSR 引物信息以及多态性分析

Table 2 Primer information and polymorphism analyses of the SSR

位点 Locus	重复基序 Repeat motif	上游/下游引物 Upstream/Reverse primer	产物大 小/bp Size range/bp	观测等位 基因数 ( <i>N<sub>a</sub></i> ) Number of observed alleles ( <i>N<sub>a</sub></i> )	有效等位 基因数 ( <i>N<sub>e</sub></i> ) Number of effective alleles ( <i>N<sub>e</sub></i> )	香农信 息指数 ( <i>I</i> ) Shannon infor- mation index ( <i>I</i> )	观测杂 合度( <i>H<sub>o</sub></i> ) Observ- ation hetero- zygosity ( <i>H<sub>o</sub></i> )	期望杂 合度( <i>H<sub>e</sub></i> ) Expected hetero- zygosity ( <i>H<sub>e</sub></i> )	固定系数 ( <i>F</i> ) Fixed index ( <i>F</i> )
DL14	(CTC)6	TTCTTCCCTACCCTTTCCA/ CAGCGGTGTCGTTGATGTT	259 - 267	2.4	1.3	0.453	0.268	0.248	-0.062
DL20	(GCC)6	GGCCAAGTACATGCACCCAT/ TTCCACCTCGGTTATGCAC	290 - 314	2.0	1.3	0.317	0.208	0.185	-0.104
DL21	(CAG)6	GCAAATCCATTACGCCCTGC/ CGACATGGTCTGAGAGGAGC	95 - 219	4.5	2.6	1.093	0.629	0.571	-0.096
DL23	(AGA)6	CTTGGGACTCTTTCCTCGGC/ CCAGGAGGCTCTCAGCTTTC	235 - 270	1.7	1.1	0.147	0.029	0.081	0.528
DL30	(CCG)6	CAGGTTGACAGCAATGTCGC/ GCCGCAGCTTTTCGGATAAG	202 - 208	1.9	1.3	0.291	0.180	0.174	-0.027
DL32	(AAAC)5	AGCGTGTTTGGACTAGAGCA/ TCGGGGATGCACATGGAAAA	249 - 284	2.4	1.9	0.692	0.106	0.409	0.710
DL34	(CGG)6	GGGTGGGGAGAGTAGGAGTT/ GCCACAACCTGTTTTCCCGG	239 - 251	2.4	1.5	0.452	0.234	0.256	0.153
DL36	(CGT)6	CCACGTGTGACAGAATCCCA/ GGCTCCCGACGAGGAATTAC	246 - 255	1.3	1.2	0.154	0.132	0.102	-0.209
DL39	(ATC)6	CCACCAGCTTTCATATCCTCCA/ GCCATGCTGTGCAAAAAGA	223 - 259	2.7	1.9	0.618	0.331	0.341	0.028
DL40	(TCT)6	AAGAAGTGGCTTCCATGGCA/ GCAAAAACCAAGGTGTCGTCC	227 - 242	2.5	1.8	0.603	0.403	0.359	-0.110
Mean				2.4	1.6	0.482	0.252	0.273	0.081

通过比较物种间的平均遗传多样性水平发现,带叶兜兰的 *I* (0.619) 约为同色兜兰 (0.290) 的 2 倍,并且其 *H<sub>o</sub>* (0.335) 和 *H<sub>e</sub>* (0.354) 均极显著 ( $P < 0.001$ ) 高于同色兜兰 ( $H_o = 0.136, H_e = 0.159$ )。在所有种群中,检测到的平均 *N<sub>a</sub>* 和 *N<sub>e</sub>* 分别为 0.9 - 3.2 和 0.8 - 2.0。从固定系数上看,除 DY-XKR 和 TS-JH 种群外,其余种群均表现出杂合缺失 ( $F > 0$ )。此外,瓶颈效应结果显示,同色兜兰的 TS-HG 和 TS-

著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性和种群瓶颈

在 231 个同色兜兰和带叶兜兰样品中,10 个 SSR 位点检测的平均 *N<sub>a</sub>* 为 2.4,平均 *N<sub>e</sub>* 为 1.6。其中,*I* 最高的是位点 DL21 (1.093),最低的是 DL23 (0.147)。*H<sub>o</sub>* 和 *H<sub>e</sub>* 分别为 0.029 - 0.629 和 0.081 - 0.571。各位点的平均 *F* 值为 0.081 (表 2)。

MQ 种群存在显著瓶颈效应 ( $P < 0.05$ ),而带叶兜兰所有种群均不存在显著瓶颈效应 ( $P > 0.05$ ,表 3)。

AMOVA 分析(表 4)显示,带叶兜兰的遗传变异主要来自个体内 (77.5%),同色兜兰个体间 (45.9%) 和个体内 (40.5%) 的遗传变异相当,两个物种来自种群间的变异都较少,带叶兜兰仅 7.4%,同色兜兰仅 13.6%。

表 3 同色兜兰和带叶兜兰种群的遗传多样性和瓶颈效应

Table 3 Genetic diversity and bottleneck effect in populations of *P. concolor* and *P. hirsutissimum*

种群 Population	观测等位基 因数( $N_a$ ) Number of observed alleles ( $N_a$ )	有效等位基 因数( $N_e$ ) Number of effective alleles ( $N_e$ )	香农信息 指数( $I$ ) Shannon information index ( $I$ )	观测杂合度 ( $H_o$ ) Observation heterozygosity ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ ) Expected heterozygosity ( $H_e$ )	固定系数 ( $F$ ) Fixed index( $F$ )	瓶颈效应 <sup>a</sup> Bottleneck effect <sup>a</sup>
TS-HG	2.3	1.3	0.269	0.105	0.130	0.116	*
TS-JH	1.6	1.4	0.260	0.180	0.156	-0.013	NS
TS-MQ	2.5	1.7	0.434	0.132	0.223	0.225	*
TS-PR	0.9	0.8	0.109	0.033	0.072	0.400	-
TS-WP	2.0	1.5	0.376	0.232	0.214	0.050	NS
Mean <sup>b</sup>	1.9 **	1.3 *	0.290 ***	0.136 ***	0.159 ***	0.156 NS	-
DY-HJ	2.4	1.8	0.555	0.310	0.323	0.015	NS
DY-JX	2.5	1.7	0.600	0.330	0.349	0.087	NS
DY-LX	2.9	1.7	0.634	0.353	0.359	0.029	NS
DY-PJ	3.2	1.8	0.650	0.327	0.360	0.028	NS
DY-TL	2.8	2.0	0.722	0.402	0.411	0.017	NS
DY-XKR	2.7	1.7	0.597	0.351	0.348	-0.048	NS
DY-YC	2.8	1.6	0.578	0.271	0.325	0.117	NS
Mean <sup>b</sup>	2.8 **	1.8 *	0.619 ***	0.335 ***	0.354 ***	0.035 NS	-

Note: <sup>a</sup> represents the significance of the bottleneck effect test; <sup>b</sup> represents the significance of the *t*-test; NS, \*, \*\*, and \*\*\* represent the significance of  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively; “-” indicates missing data.

表 4 同色兜兰和带叶兜兰的 AMOVA 分析

Table 4 AMOVA analysis of *P. concolor* and *P. hirsutissimum*

	变异来源 Source of variation	自由度 <i>Df.</i>	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance components	变异百分比/% Percentage of variation/%
<i>P. concolor</i>	Among populations	4	35.4	0.2	13.6
	Among individuals	75	165.3	0.8	45.9
	Within individuals	80	54.0	0.7	40.5
<i>P. hirsutissimum</i>	Among populations	6	54.1	0.2	7.4
	Among individuals	144	331.0	0.3	15.1
	Within individuals	151	250.0	1.7	77.5

## 2.2 系统发育关系及遗传结构

群体水平的 UPGMA 树和个体水平的 NJ 树均显示同色兜兰和带叶兜兰各自聚为 1 支[图 1(a)、(b)],但相比于长瓣兜兰、麻栗坡兜兰和硬叶兜兰,带叶兜兰与同色兜兰的系统发育关系更为接近。在 UPGMA 树中发现,同色兜兰的 TS-JH 和 TS-WP 遗传距离最近,而带叶兜兰中 DY-JX 和 DY-PJ,以及 DY-XKR 和 DY-TL 的遗传距离都较近[图 1(a)]。PCoA 的结果与 NJ 树分析的结果基本一致,可以较

好地区分带叶兜兰与同色兜兰个体,其中,第 1 和第 2 主坐标成分对总变量的解释率分别为 54.8% 和 12.2% [图 1(c)]。

对两个物种的 Structure 分析显示  $K = 2$  的分群结果最佳,此时两个物种的个体被明显分开[图 2(a)、(b)]。同色兜兰和带叶兜兰的独立 Structure 分析显示,两个物种都进一步检测到两种不同的遗传成分[图 2(c)、(d)]。

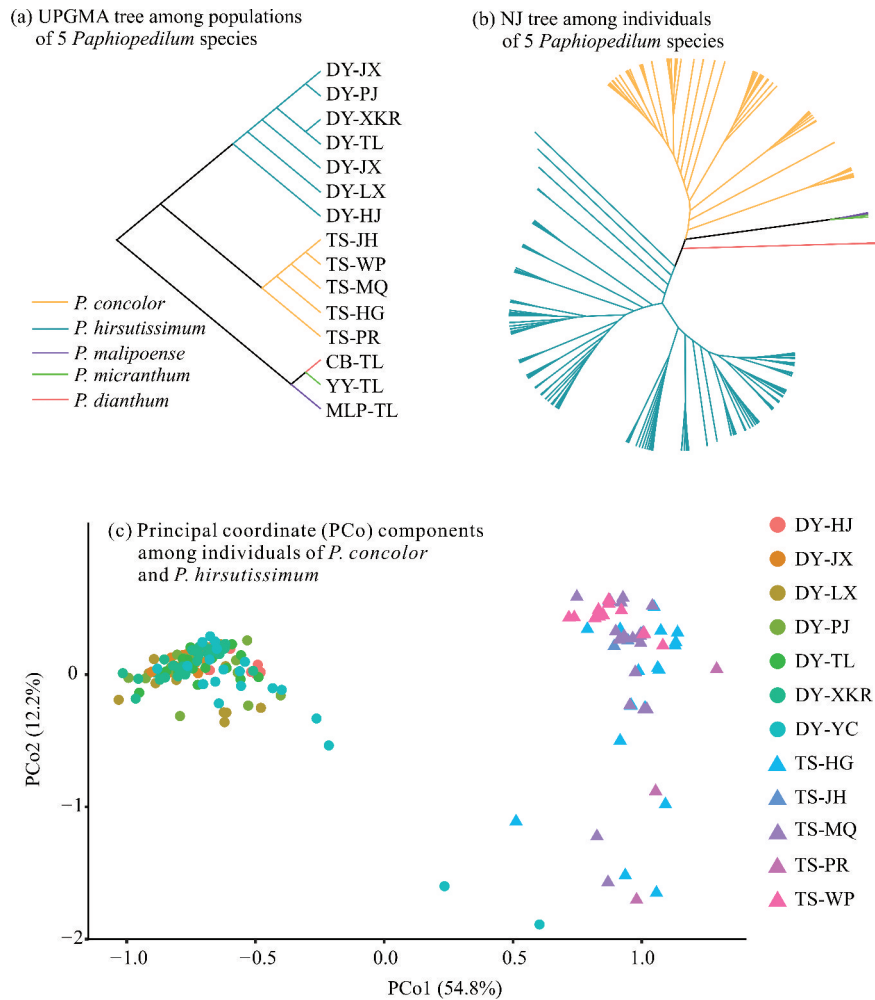


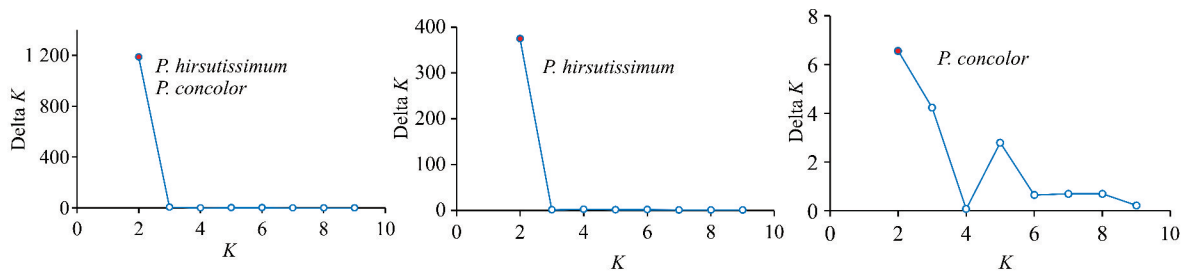
图1 系统发育分析和主坐标分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis and PCoA

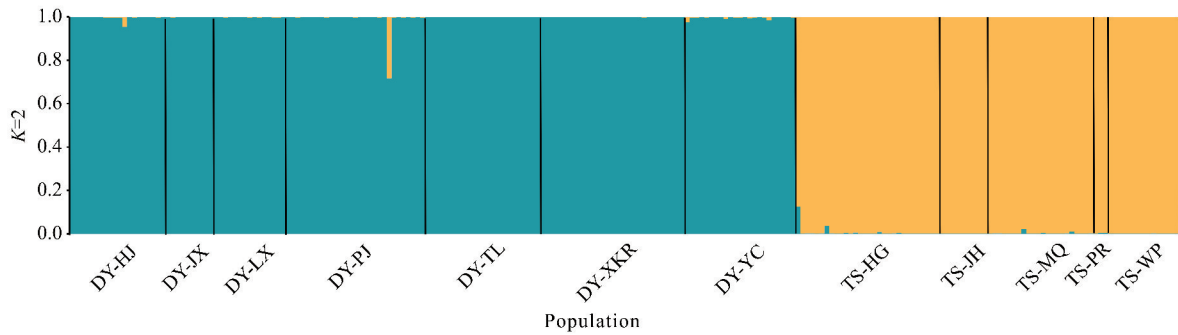
### 2.3 遗传分化、IBD 和 IBE 的检验

遗传分化分析结果[图 3(a)]显示,带叶兜兰两两种群间的平均  $F_{ST}$  为 0.077,同色兜兰两两种群间的平均  $F_{ST}$  为 0.237,而两个物种的种群间的平均  $F_{ST}$  为 0.572,达到了较高的分化水平。为探究遗传分化的驱动因子,分别进行 IBD 检验[图 3(b)]和 IBE 检验[图 3(c)]。其中,IBD 检验显示 12 个种群

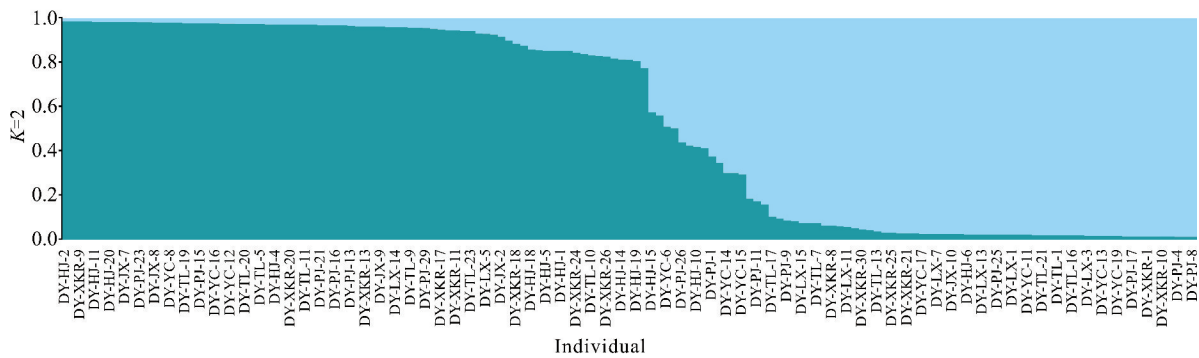
间的地理距离与遗传距离呈现显著正相关( $R = 0.300, P < 0.05$ ),表明地理隔离可能促进两个物种间的遗传分化。然而, $F_{ST}$  与 12 个代表性环境因子间的 Mantle 检验均不显著,表明 IBE 模式在驱动带叶兜兰和同色兜兰的种群分化过程中的作用可能不太明显。



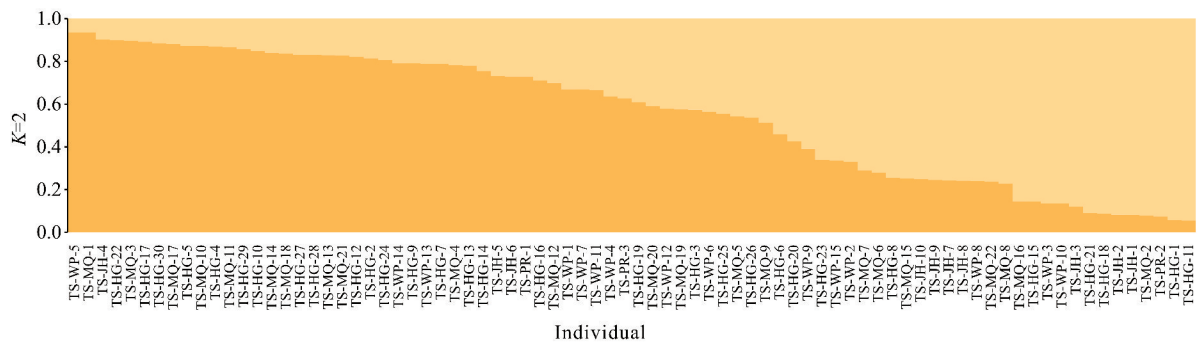
(a) Delta K value distribution of structure analysis



(b) Population structure of *P. hirsutissimum* and *P. concolor*



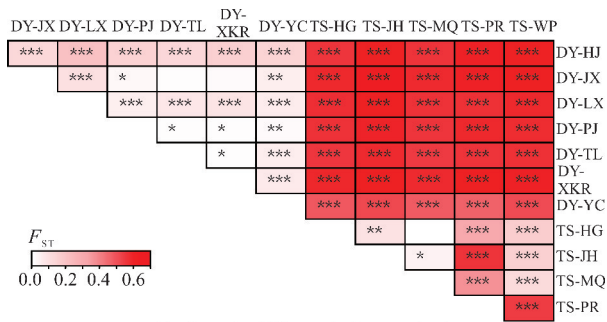
(c) Population structure of *P. hirsutissimum*



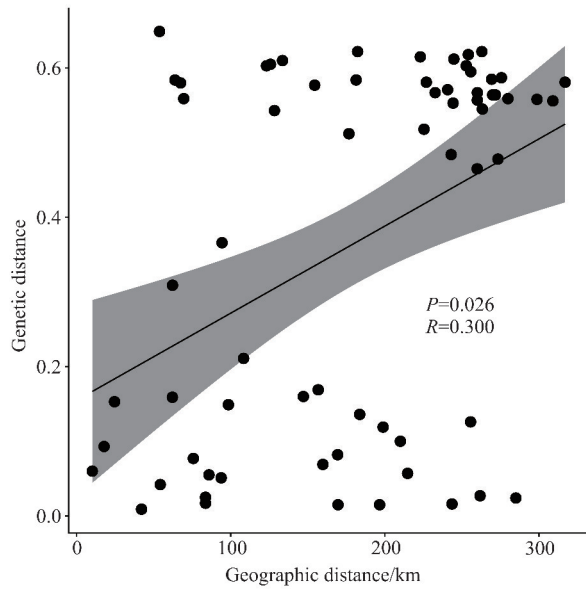
(d) Population structure of *P. concolor*

图2 群体结构分析

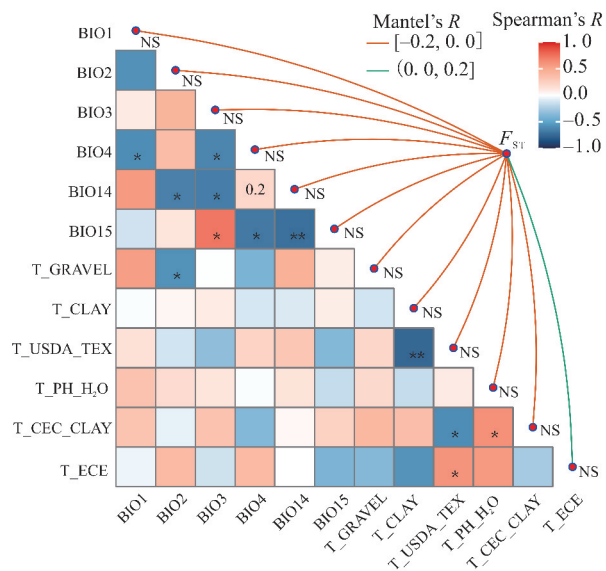
Fig. 2 Population structure analysis



(a) Genetic differentiation analysis



(b) IBD test



(c) IBE test

NS, \*, \*\*, and \*\*\* represent the significance of  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , respectively.

图3 遗传分化分析、IBD检验和IBE检验

Fig. 3 Genetic differentiation analysis, IBD tests and IBE tests

### 3 讨论

本研究利用 10 个多态性 EST-SSR 位点比较了四季开花型同色兜兰和春季开花型带叶兜兰的遗传多样性水平, 并发现前者的遗传多样性水平显著低于后者。物种的遗传多样性可能受到分布范围的影响, 许多狭窄分布的濒危物种的遗传多样性水平都较低<sup>[19,20]</sup>。张央等<sup>[4]</sup> 对全国兰科兜兰属宽瓣亚属 (*Paphiopedium* Subgen. *Brachypetalum*) 植物的一项专项调查研究结果显示, 目前野生同色兜兰的自然分布区域已经缩小到广西西南地区, 因此更狭窄的自然分布范围和更小的有效种群数量可能解释了同色兜兰更低的遗传多样性。带叶兜兰的高遗传多样性可能与其个体间丰富的遗传变异有关, AMOVA 结果显示, 带叶兜兰中来自个体内的遗传变异达 77.5%, 这与徐言等<sup>[10]</sup> 的研究结果类似; 而同色兜兰中来自个体内的遗传变异仅为 40.5%。此外, 物种的遗传多样性水平还可能受到多样化的种群进化历史的影响<sup>[21-23]</sup>。例如, 孙艺琦等<sup>[21]</sup> 发现单叶蔓荆 (*Vitex rotundifolia*) 与蔓荆 (*V. trifolia*) 的种群曾经历过瓶颈效应, 并导致了两者较低的遗传多样性。种群瓶颈的原因主要包括两方面: 一是人工选择压力, 二是奠基者效应<sup>[24]</sup>。通常, 野生植物种群的瓶颈效应主要是由奠基者效应引起的。本研究在同色兜兰的部分种群中检测到了显著的瓶颈效应, 但在带叶兜兰中未检测到, 表明在种群形成历史中曾遭遇的瓶颈效应可能导致同色兜兰丧失部分的遗传多样性。

本研究中带叶兜兰的 DY-YC 种群和 DY-XKR 种群分别与徐言等<sup>[10]</sup> 研究中的 GYC 和 GML 种群来源一致, 但本研究评估的两个就地保护种群的遗传多样性略低于徐言等<sup>[10]</sup> 的评估结果。本研究使用了兼顾两个物种(带叶兜兰和同色兜兰)多态性的 SSR 位点, 因此这些位点在单一物种中的变异可能相对保守, 从而低估了种群杂合度。此外, 不同的采样个体和采样数量也可能影响对种群杂合度的评估。对自然保护区内外的带叶兜兰种群的遗传多样性的比较结果表明, 3 个自然保护区内的就地保护种群的多态性指数(DY-XKR,  $I = 0.597$ ; DY-YC,  $I = 0.578$ ; DY-LX,  $I = 0.634$ ) 符合野生种群的标准 ( $I = 0.555 - 0.722$ ), 就地保护可以较好地保护野生带叶兜兰的遗传多样性。然而, 位于广西崇左白头叶猴国家级自然保护区的同色兜兰种群(TS-PR,  $I = 0.109$ ) 遗传多样性则低于其他 4 个野生同色兜兰种群。因此, 为了更



好地保护同色兜兰的野生资源,建议进一步扩大自然保护区的范围或者结合迁地保护措施。

AMOVA 和遗传分化分析的结果均显示,同色兜兰种群的分化程度要高于带叶兜兰种群。较高的遗传分化通常意味着基因流受限<sup>[25,26]</sup>。兜兰属物种大多采用欺诈性授粉的策略<sup>[27]</sup>,这种传粉策略风险很高,通常严重依赖专一的传粉者;并且自然环境中的兜兰属物种还普遍存在种子萌发困难<sup>[28]</sup>的现象,这些都可能由花粉或者种子介导的基因流受限。与同色兜兰不同,带叶兜兰具有非常强的营养繁殖能力,还可以通过走茎进行营养繁殖<sup>[5]</sup>,这种繁殖方式可以有效促进种群规模的扩大,并有可能增加种群间基因流的机会。

基因流受限可能是由地理隔离或者环境隔离导致的,这与许多濒危或特有植物的处境类似,如地中海高山植物 *Silene ciliata*<sup>[29]</sup>、中国北方濒危的野蔷薇 (*Rosa rugosa*)<sup>[30]</sup>、中国南方特有的篦子三尖杉 (*Cephalotaxus oliveri*)<sup>[31]</sup>等。IBD 和 IBE 的结果表明,地理隔离是影响同色兜兰和带叶兜兰种群遗传分化的主要因素,而环境隔离的影响较小。尽管此前一些研究模拟和分析了中国境内兜兰属植物的地理分布格局,发现一些环境变量如昼夜温差、年平均气温变化范围、最暖季度平均气温、太阳辐射、水蒸气压等对兜兰属植物的自然地理分布格局具有重要影响<sup>[4,32]</sup>,但是本研究并未发现环境变量对同色兜兰和带叶兜兰种群分化具有显著影响。一方面,人为因素的存在可能会削弱 IBE 的影响,特别是考虑到带叶兜兰和同色兜兰野生植株经常遭受非法采摘;另一方面,由于本研究的采样范围局限于广西,在相对小的尺度下 IBE 的作用可能并不明显。因此,对 IBE 模式在兜兰属物种种群分化过程中的作用的进一步探究需要结合更大范围的采样。

同色兜兰是兜兰属中罕见的四季开花型物种,但分布较狭窄。与同色兜兰相比,尽管带叶兜兰花期短,但是其自然分布面积较广,适生区范围较大。因此,通过开展两个物种之间的杂交有望从中选育出一些花期长且适应性强的优良品种,以满足日益增长的市场需求,并且能更好地保护野生兜兰资源。此前对兜兰属物种的杂交研究发现,在带叶兜兰、杏黄兜兰 (*P. armeniacum*)、硬叶兜兰和同色兜兰的 16 种杂交及自交组合类型中,同色兜兰 × 带叶兜兰的杂交结实率最高,达 93.1%<sup>[33]</sup>。一般而言,兰科物种间的亲缘关系越近则杂交亲和性越高<sup>[34]</sup>。而本研究的 NJ

树和 UPGMA 树的结果显示,在 5 个兜兰属物种中,同色兜兰与带叶兜兰间的系统发育关系最近,因此,该结果为同色兜兰和带叶兜兰间的高杂交率提供了有力的系统发育学证据支持。此外,这些系统发育关系信息还可以用于指导今后兜兰属的优良品种选育,例如,在 UPGMA 树中发现同色兜兰的 TS-JH 和 TS-WP 种群与带叶兜兰的 DY-HJ 种群的遗传距离均较为接近,因此,这些种群可以优先作为开展杂交试验的材料。然而鉴于 SSR 位点提供的遗传信息有限,对于兜兰属物种间系统发育关系的进一步阐明还需要借助更全面的基因组信息,如简化基因组或全基因组数据。

#### 参考文献

- [1] 刘仲健,陈心启,陈利君,等. 中国兜兰属植物[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [2] 尹玉莹,房林,李琳,等. 兜兰属植物花期调控研究进展[J]. 热带作物学报,2022,43(4):769-778.
- [3] 刘仲健,张建勇,徐向明,等. 同色兜兰及其亲缘群的研究[J]. 云南植物研究,2000,22(4):390-394.
- [4] 张央,安明态,武建勇,等. 中国兜兰属宽瓣亚属植物地理分布格局及其主导气候因子[J]. 植物生态学报,2022,46(1):40-50.
- [5] 王文晓,程浩,徐玉凤,等. 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.
- [6] 杨磊,曹秋梅,冯纛,等. 珍稀濒危植物阜康阿魏的遗传多样性及遗传结构[J]. 植物研究,2023,43(1):51-58.
- [7] 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, 2014, 36(2): 209-218.
- [8] TONG Y W, DURKA W, ZHOU W M, et al. *Ex situ* conservation of *Pinus koraiensis* can preserve genetic diversity but homogenizes population structure [J]. Forest Ecology and Management, 2020, 465: 117820.
- [9] 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.
- [10] 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/OL]. 热带作物学报,2023;1-11[2023-08-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20230216.1655.008.html>.
- [11] 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 fami-

- ly Leguminosae [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1996, 5(2): 429-438.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] PIRY S, LUIKART G, CORNUET J M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data [J]. *Journal of Heredity*, 1999, 90(4): 502-503.
- [15] 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.
- [16] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [17] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [18] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version 3. 0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2007, 1: 47-50.
- [19] GITZENDANNER M A, SOLTIS P S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners [J]. *American Journal of Botany*, 2000, 87(6): 783-792.
- [20] GONG W, GU L, ZHANG D X. Low genetic diversity and high genetic divergence caused by inbreeding and geographical isolation in the populations of endangered species *Loropetalum subcordatum* (Hamamelidaceae) endemic to China [J]. *Conservation Genetics*, 2010, 11(6): 2281-2288.
- [21] 孙艺琦, 赵露颖, 朱波, 等. 基于 SSR 分子标记的蔓荆子基原植物的遗传多样性及遗传结构分析[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(15): 3824-3831.
- [22] RUAN X X, WANG Z, WANG T, et al. Characterization and application of EST-SSR markers developed from the transcriptome of *Amentotaxus argotaenia* (Taxaceae), a relict vulnerable conifer [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1014.
- [23] WU F Q, SHEN S K, ZHANG X, et al. Inferences of genetic structure and demographic history of *Rhododendron protistum* var. *giganteum*: the world's largest *Rhododendron* using microsatellite markers [J]. *Flora*, 2017, 233: 1-6.
- [24] 余意, 王凌, 孙嘉惠, 等. 基于微卫星群体遗传学的栽培枸杞遗传多样性和遗传结构评价[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(4): 838-845.
- [25] 王天翼, 徐悦, 王罗云, 等. 中国沙棘和云南沙棘的遗传分化及遗传多样性[J]. *林业科学研究*, 2021, 34(4): 13-21.
- [26] 张宏祥, 郑田勇. 生境片段化对新疆野苹果种群遗传结构的影响[J]. *干旱区研究*, 2020, 37(3): 715-721.
- [27] 初美静, 宫子惠, 孙纪霞, 等. 肉饼兜兰传粉生物学及开花进程研究[J]. *种子*, 2019, 38(3): 88-92, 96.
- [28] 张娟娟, 严宁, 胡虹. 三种兜兰属植物种子发育过程及其与无菌萌发的关系[J]. *植物分类与资源学报*, 2013, 35(1): 33-40.
- [29] MORENTE-LÓPEZ J, GARCÍA C, LARA-ROMERO C, et al. Geography and environment shape landscape genetics of Mediterranean alpine species *Silene ciliata* Poir. (Caryophyllaceae) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1698.
- [30] XU J J, ZANG F Q, WU Q C, et al. Analysis of the genetic diversity and molecular phylogeography of the endangered wild rose (*Rosa rugosa*) in China based on chloroplast genes [J]. *Global Ecology and Conservation*, 2021, 28: e01653.
- [31] LIU H J, WANG Z, ZHANG Y L, et al. Geographic isolation and environmental heterogeneity contribute to genetic differentiation in *Cephalotaxus oliveri* [J]. *Ecology and Evolution*, 2023, 13(3): e9869.
- [32] YE P C, WU J Y, AN M T, et al. Geographical distribution and relationship with environmental factors of *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* Hallier (Orchidaceae) taxa in southwest China [J]. *Diversity*, 2021, 13(12): 634.
- [33] 覃艳芬, 朱根发, 彭永宏. 4 种兜兰属植物的杂交结实性研究[C]. *中国观赏园艺研究进展 2011*. 银川: 中国林业出版社, 2011: 227-232.
- [34] 朱根发. 国际兰属植物杂交育种进展[J]. *广东农业科学*, 2005, 32(4): 25-27.

## Genetic Diversity of the *Paphiopedilum concolor* and *P. hirsutissimum* in Guangxi based on SSR

ZHU Xianliang<sup>1</sup>, ZHU Shujing<sup>1,2</sup>, ZOU Rong<sup>1</sup>, TANG Jianmin<sup>1</sup>, LUO Yajin<sup>3</sup>, WEI Xiao<sup>1\* \*</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory of Plant Functional Phytochemicals and Sustainable Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541006, China; 3. Yachang Orchid National Nature Reserve Management Center of Guangxi, Baise, Guangxi, 533209, China)

**Abstract:** Evaluating the genetic diversity and population structure of perpetual blooming *Paphiopedilum concolor* and spring blooming *P. hirsutissimum* and exploring the genetic differentiation among different flowering habit *Paphiopedilum* species will provide a theoretical basis for the sustainable utilization and conservation of wild resources of genus *Paphiopedilum*. In this study, a total of 231 individuals from 12 populations of *P. concolor* and *P. hirsutissimum* were genotyped using 10 polymorphic EST-SSR loci, and then analyses of genetic diversity, bottleneck effect, phylogeny, genetic structure, genetic differentiation, isolation by distance and isolation by environmental were carried out. Our results showed that most indicators of genetic diversity were significantly ( $P < 0.05$ ) lower in the *P. concolor* population than in the *P. hirsutissimum* population, and Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed less variation between populations in both, but higher within-individual genetic variation in the *P. hirsutissimum* than in the *P. concolor*. Significant bottleneck effects ( $P < 0.05$ ) were detected in two populations of *P. concolor*, while none were detected in the *P. hirsutissimum* populations. Both the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic (UPGMA) tree at the population level and the Neighbor Joining (NJ) tree at the individual level showed that the phylogenetic relationships between *P. concolor* and *P. hirsutissimum* were close and each clustered into two clades. Results of principal coordinate analysis (PCoA) and Structure also supported the phylogenetic analysis. In addition, the genetic differentiation coefficient ( $F_{ST}$ ) confirmed that population differentiation between the two species was high. Narrow natural distribution and past population bottlenecks may have contributed to the loss of some genetic diversity in *P. concolor*. Geographic isolation is the main driver of genetic differentiation between populations of *P. concolor* and *P. hirsutissimum*, to a lesser extent, the effect of environmental isolation.

**Key words:** *Paphiopedilum concolor*; *P. hirsutissimum*; genetic differentiation; population bottleneck; geographic isolation; EST-SSR

责任编辑: 陆雁, 陈少凡



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>