



肖文芳,陈和明,吕复兵. 43份蝴蝶兰原生种质的遗传多样性分析和分子身份证构建[J]. 中国农业大学学报,2026,31(02):104-115.

XIAO Wenfang, CHEN Heming, LYU Fubing. Analysis on genetic diversity and construction of molecular identities for 43 samples of *Phalaenopsis* original species[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2026, 31(02): 104-115.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2026.02.09

43份蝴蝶兰原生种质的遗传多样性分析和分子身份证构建

肖文芳 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,广州 510640)

摘 要 为解析蝴蝶兰属原生种质的遗传多样性并构建其分子身份证,本研究选用43份蝴蝶兰原生种质为试验材料,采用TP-M13-SSR分子标记技术对其遗传多样性进行分析,并基于SSR指纹图谱为每份种质构建分子身份证。结果表明:1)基于简化基因组测序数据开发的SSR引物中筛选出的26对引物适用于本试验材料的扩增,其中24对扩增结果呈高多态性;26对引物的平均观测等位基因数(N_a)为2.681,平均有效等位基因数(N_e)为1.894,平均期望杂合度(H_e)为0.323,平均观测杂合度(H_o)为0.279,所有位点均为 $H_e > H_o$,Shannon指数(I)均值为0.581,说明43份蝴蝶兰原生种质的杂合程度极低,遗传多样性不高,这可能与所用实验材料均为原生种或其变型和变种相关。2)本试验筛选出的引物适用于对蝴蝶兰属原生种质进行分类鉴别,43份种质的聚类结果和PCoA分析结果均与目前最新的植物学分类结果基本一致。3)根据扩增结果筛选出6对核心引物,可构建每份种质特有的分子身份证。综上,本研究实现了蝴蝶兰原生种质资源的快速分子鉴定,为后续蝴蝶兰属种质资源的收集保存、鉴别和开发利用奠定了基础。

关键词 蝴蝶兰属; TP-M13-SSR; 遗传多样性; 分子身份证

中图分类号 S682.31

文章编号 1007-4333(2026)02-0104-12

文献标志码 A

Analysis on genetic diversity and construction of molecular identities for 43 samples of *Phalaenopsis* original species

XIAO Wenfang, CHEN Heming, LYU Fubing*

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

Abstract To analyze the genetic diversity of original *Phalaenopsis* germplasms and construct molecular identities, 43 samples were selected as test materials. TP-M13-SSR technology was employed to analyze their genetic diversity and construct molecular identities based on SSR fingerprinting. The results showed that: 1) Among the 26 pairs of SSR polymorphic universal primers screened from those developed SSR primers based on simplified genome sequencing data, 24 pairs showed high polymorphism in the amplification of the experimental materials. The average number of observed alleles (N_a) for the 26 primers was 2.681, the average number of effective alleles (N_e) was 1.894, the average expected heterozygosity (H_e) was 0.323, and the average observed heterozygosity (H_o) was 0.279. All loci showed $H_e > H_o$, and the average Shannon index (I) was 0.581. The results indicate that the level of heterozygosity in the test materials is extremely low, and genetic diversity is not high, which may be related to the fact that all experimental materials were original species, their forms, or varieties. 2) The primers screened in this experiment are suitable for the classification and evaluation of original *Phalaenopsis* germplasms. The clustering results and PCoA analysis of the 43 germplasm samples were consistent with the latest botanical classification of *Phalaenopsis* germplasms. 3) Based on the amplification results, six pairs of core primers were selected to construct unique molecular ID for each germplasm. This study

收稿日期: 2025-04-25; 接受日期: 2025-07-30

基金项目: 广东省科技计划项目(2024B1212060012); 国家重点研发计划(2023YFD230090402); 广州市科技计划项目(2024E04J1267)

第一作者: 肖文芳(ORCID:0000-0002-8394-1396), 副研究员, 主要从事兰花遗传育种研究, E-mail: xiaowenfang@gdaas.cn

通讯作者: 吕复兵(ORCID:0009-0008-5966-8335), 研究员, 主要从事兰花遗传研究, E-mail: lvfubing@gdaas.cn

achieved rapid molecular identification of *Phalaenopsis* germplasm resources, laying a foundation for the subsequent collection, preservation, evaluation, and utilization of *Phalaenopsis* germplasm resources.

Keywords *Phalaenopsis*; genetic diversity; TP-M13-SSR; molecular identities

作为兰科植物中产业化程度最高、最具园艺价值的“洋兰皇后”,蝴蝶兰因其种质资源多样、颜色艳丽、花型奇特、花期长而闻名于世。1704年首次在菲律宾被发掘制成标本并记录于册,1825年正式建立蝴蝶兰属(*Phalaenopsis* Blume, *Phal.*)。目前,发现和鉴定的原生种已多达 75 个,划分为蝴蝶兰亚属、柏氏蝴蝶兰亚属、湿唇兰亚属和羽唇兰亚属,蝴蝶兰亚属又可细分为蝴蝶兰组和裂唇蝴蝶兰组,柏氏蝴蝶兰亚属可细分为柏氏蝴蝶兰组、五唇兰组、落叶蝴蝶兰组和尖囊兰组。蝴蝶兰属植物广泛分布于东南亚地区,以加里曼丹岛和菲律宾群岛为中心,北至中国大陆南部、台湾岛及琉球群岛,南至澳大利亚北部昆士兰州,西至斯里兰卡和印度南部,东至新几内亚。我国境内以云南为中心分布有 22 个蝴蝶兰原生种,其中麻栗坡蝴蝶兰(*Phal. malipoensis*)、短茎萼脊兰(*Phal. subparishii*)、吉氏蝴蝶兰(*Phal. tsii*)、象鼻兰(*Phal. zhejiangensis*)、盈江羽唇兰(*Phal. yingjiangensis*)和腾冲蝴蝶兰(*Phal. tengchongensis*)共 6 个原生种为我国特有种^[1]。

分子标记技术是从基因层面对物种进行分析的一类技术,摒除了传统评价体系基于表型性状易受环境及人为因素等影响的缺陷,能够更精准地对种质资源进行分类鉴评^[2]。目前,基于分子标记技术的 DNA 指纹图谱和分子身份证构建是种质资源规范化、数字化、精准化管理的常用手段,已广泛运用于动植物种质资源保护和新品种鉴评^[3-6]。SSR (Simple sequence repeats) 分子标记是国际植物新品种保护联盟指定的植物 DNA 指纹图谱构建首选

方法^[7],结合荧光测序技术开发出的 TP-M13-SSR (Simple sequence repeat with tailed primer M13) 技术,具有重复性好、通量高的优点,可快速准确地进行检测,在兰科植物中已成功应用于蝴蝶兰的突变体鉴定^[8]、建兰的核心种质构建^[9-10]及石斛兰原生种的鉴评和分子身份证构建^[11]等方面。

本研究拟利用通过简化基因组测序技术开发的蝴蝶兰属内和属间通用 SSR 引物对 43 份原生种质资源进行 TP-M13-SSR 扩增检测,分析其遗传多样性,进行分类鉴评,并筛选核心引物构建分子身份证,旨在为蝴蝶兰属种质资源的分类鉴评、科学保存及深度开发和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究材料为蝴蝶兰属 28 个种的 43 份种质,多为杂交育种的高利用率原生种亲本,涵盖了蝴蝶兰属主要 3 个亚属每个组的代表种质,其中蝴蝶兰组种质 11 份,裂唇蝴蝶兰组种质 22 份,柏氏蝴蝶兰组种质 2 份,五唇兰组种质 1 份,落叶蝴蝶兰组种质 5 份,尖囊兰组种质 1 份,湿唇兰亚属种质 1 份。43 份种质中,麻栗坡蝴蝶兰为我国特有种,仅分布于云南省文山州麻栗坡县,其他种质多分布于东南亚各国,具体种质基本信息见表 1,具体花部形态特征见图 1。所有种质资源均保存于广东省农业科学院环境园艺研究所国家蝴蝶兰种质资源圃内,于 2020 年 5 月采集样品幼嫩健壮的根尖液氮速冻后,保存于-80℃超低温冰箱备用。

表 1 43 份蝴蝶兰种质基本信息

Table 1 Basic information of 43 samples of *Phalaenopsis* original species

分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins	分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins
蝴蝶兰亚属蝴蝶 兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Phalaenopsis</i>	P01	白花蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>amabilis</i>	澳大利亚北 昆士兰、印 度尼西亚、 马来西亚、 菲律宾等	蝴蝶兰亚属裂唇 蝴蝶兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Polychilos</i>	P23	黄花鹿角蝴蝶 兰(变型) <i>Phal. cornu-</i> <i>cervi</i> f. <i>flava</i>	印度、缅甸、 泰国、马来 西亚、苏门 答腊、爪 哇、婆罗洲 等

表1（续）

分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins	分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins
蝴蝶兰亚属蝴蝶 兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Phalaenopsis</i>	P02	香花白花 蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>amabilis</i> ‘Iran Java’	新几内亚	蝴蝶兰亚属裂唇 蝴蝶兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Polychilos</i>	P24	象耳蝴蝶兰 <i>Phal. gigantea</i>	婆罗洲
	P03	蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>aphrodite</i>	菲律宾、中 国台湾等		P25	白花象耳蝴蝶 兰(变型) <i>Phal. gigantea</i> f. <i>decolorata</i>	婆罗洲
	P04	西蕾利蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>schilleriana</i>	菲律宾		P26	盾花蝴蝶兰 <i>Phal. tetraspis</i>	安达曼群 岛、尼科巴 群岛、苏门 答腊岛
	P05	全粉西蕾利 蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>schilleriana</i>	菲律宾		P27	棕色盾花蝴蝶 兰(变型) <i>Phal. tetraspis</i> f. <i>brunneola</i>	安达曼群 岛、尼科巴 群岛、苏门 答腊岛
	P06	桑德蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>sanderiana</i>	菲律宾		P28	紫花贝雷娜蝴 蝶兰(变型) <i>Phal. bellina</i> f. <i>coerulea</i>	马来西亚、 婆罗洲等
	P07	黄花斯塔基蝴 蝶兰(变型) <i>Phal.</i> <i>stuartiana</i> f. <i>nobilis</i>	菲律宾		P29	荧光蝴蝶兰 <i>Phal. violacea</i> ‘Sumatra’	婆罗洲、苏 门答腊、马 来西亚
	P08	小兰屿蝴蝶兰 <i>Phal. equestris</i>	中国台湾、 菲律宾群岛		P30	荧光蝴蝶兰 <i>Phal. violacea</i> ‘YC’	婆罗洲、苏 门答腊、马 来西亚
	P09	白花小兰屿蝴 蝶兰(变型) <i>Phal.</i> <i>equestris</i> f. <i>aurea</i>	中国台湾、 菲律宾群岛		P31	白花荧光 蝴蝶兰(变型) <i>Phal. violacea</i> f. <i>alba</i>	婆罗洲、苏 门答腊、马 来西亚
	P10	蓝唇小兰屿蝴 蝶兰(变型) <i>Phal.</i> <i>equestris</i> f. <i>cyanochila</i>	中国台湾、 菲律宾群岛		P32	紫花荧光 蝴蝶兰 (浅紫变型) <i>Phal. violacea</i> f. <i>coerulea</i>	婆罗洲、苏 门答腊、马 来西亚
	P11	林登蝴蝶兰 <i>Phal. lindenii</i>	菲律宾 吕宋岛		P33	紫花荧光 蝴蝶兰 (全紫变型) <i>Phal. violacea</i> f. <i>coerulea</i>	婆罗洲、苏 门答腊、马 来西亚
蝴蝶兰亚属裂唇 蝴蝶兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Polychilos</i>	P12	版纳蝴蝶兰 <i>Phal. mannii</i>	中国云南、 印度、不丹、 缅甸、尼泊 尔、越南	柏氏蝴蝶兰亚属 柏氏蝴蝶兰组 Subgenus <i>Parishianae</i> , section <i>Parishianae</i>	P34	麻栗坡蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>malipoensis</i>	中国云南 麻栗坡

表 1（续）

分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins	分类 Classification	种质编号 Germplasm Code	学名 Scientific name	分布地 Origins
蝴蝶兰亚属裂唇 蝴蝶兰组 Subgenus <i>Phalaenopsis</i> , section <i>Polychilos</i>	P13	安汶蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>amboinensis</i>	马鲁古群 岛、安汶岛、 苏拉威西岛	柏氏蝴蝶兰亚属 柏氏蝴蝶兰组 Subgenus <i>Parishianae</i> , section <i>Parishianae</i>	P35	罗比蝴蝶兰 <i>Phal. lobbii</i>	中国、不 丹、印度、 缅甸、越南
	P14	绿花蝴蝶兰 <i>Phal. viridis</i>	苏门答腊岛	柏氏蝴蝶兰亚属 五唇兰组 Subgenus <i>Parishianae</i> , section <i>Esmeralda</i>	P36	五唇兰 <i>Phal.</i> <i>pulcherrima</i>	中国喜马 拉雅地区、 印度、婆罗 洲、柬埔寨 、老挝等
	P15	苏门答腊蝴蝶 兰 <i>Phal.</i> <i>sumatrana</i>	苏门答腊、 婆罗洲、马 来西亚、緬 甸、菲律宾 等	柏氏蝴蝶兰亚属 落叶蝴蝶兰组 Subgenus <i>Parishianae</i> , section <i>Aphyllae</i>	P37	滇西蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>stobartiana</i>	中国云南 和海南、緬 甸
	P16	浅纹苏门答腊 蝴蝶兰(变型) <i>Phal.</i> <i>sumatrana</i> f. <i>paucivittata</i>	苏门答腊、 婆罗洲、马 来西亚、緬 甸、菲律宾 等		P38	华西蝴蝶兰 <i>Phal. wilsonii</i>	中国广西、 贵州、四 川、云南和 西藏、越南 等
	P17	康宁蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>corningiana</i>	婆罗洲		P39	小尖囊兰 <i>Phal. taenialis</i>	中国云南、 緬甸、印 度、不丹、 尼泊尔
	P18	美花蝴蝶兰 <i>Phal. pulchra</i>	菲律宾		P40	洛氏蝴蝶兰 <i>Phal. lowii</i>	緬甸、泰国
	P19	巴氏蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>bastianii</i>	菲律宾		P41	红河蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>honghenensis</i>	中国云南、 越南
	P20	羞花蝴蝶兰 <i>Phal. modesta</i>	婆罗洲	柏氏蝴蝶兰亚属 尖囊兰组 Subgenus <i>Parishianae</i> , section <i>Deliciosae</i>	P42	大尖囊蝴蝶兰 <i>Phal. deliciosa</i>	中国海南 和云南、泰 国、越南、 马来西亚、 印度尼西亚 、緬甸等
	P21	象形文字 蝴蝶兰 <i>Phal.</i> <i>hieroglyphica</i>	菲律宾	湿唇兰亚属 Subgenus <i>Hygrochilus</i>	P43	萼脊蝴蝶兰 <i>Phal. japonica</i>	韩国、日本 琉球群岛、 中国云南
	P22	深红鹿角蝴蝶 兰(变型) <i>Phal. cornu— cervi</i> f. <i>sanguinea</i>	印度、緬甸、 泰国、马来 西亚、苏门 答腊、爪哇、 婆罗洲等				



种质编号同表1。下同。
The germplasm code is the same as Table 1. The same below.

图1 43份蝴蝶兰属原生种照片
Fig. 1 Images of 43 *Phalaenopsis* original germplasms

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

采用天根生化科技(北京)有限公司的新型植物基因组DNA提取试剂盒,使用供试蝴蝶兰样品幼嫩健壮的根尖进行基因组DNA提取。提取的DNA样本分别采用NanoDrop分光光度计和1.2%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。

1.2.2 TP-M13-SSR扩增

筛选出26对引物^[12]在不同样品中分别采用FAM和HEX 2种不同颜色的荧光标记合成的引物进行单重PCR扩增。PCR反应体系为10 μL,包括1.2 μL DNA模板(50 ng/μL),0.1 μL TAKARA Taq™ HS 酶(5 U/μL),1.0 μL 10×Buffer I 缓冲液,上下游引物各0.3 μL(5 μM),0.8 μL的dNTP

(2.5 mM), 0.5 μ L 的 TP-M13(5 μ M), 去离子水 5.8 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 30 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 10 个循环; 60 $^{\circ}$ C 30 min。扩增后, 取产物 1.0 μ L 加入 9 μ L 的 ROX-500 分子量内标和甲酰胺混合液 ($V(\text{ROX-500 分子量内标}): V(\text{甲酰胺混合液})=0.5: 8.5$), 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后, 使用 ABI3730XL 检测仪进行毛细管电泳检测, 1 kV 电压进样 10 s 后, 15 kV 电压电泳 30 min。利用 Data Collection 软件收集原始峰值数据后导入 GeneMapper 3.2 软件, 通过与泳道中分子量内标的对比分析计算目标 DNA 片段大小。各荧光标记位点上独立进行 3 次重复毛细管电泳检测, 取 3 次重复的平均值并四舍五入取整, 作为试验材料在该位点上的扩增结果。

1.2.3 数据统计和分析

将整理好的扩增结果数据导入 GenAlEx 6.503 和 PowerMarker V3.25 软件中, 分别计算 26 对引物的遗传参数。使用 NTSYSpc 2.11 进行个体遗传相似系数计算, UPGMA 法进行聚类分析并绘制三维 PCoA 分析图, 采用 Ai 软件进行图形处理。引物有效扩增率计算方法为: 有效扩增率 = (有扩增结果

的样品数/总样品数) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

基于简化基因组测序技术开发出的引物中筛选出在本试验样品中扩增结果较好的 26 对引物, 包括 19 对蝴蝶兰属内通用引物和 7 对蝴蝶兰属与钻喙兰属间通用引物^[12]。由图 2 和表 2 可知, 26 对引物中 7 对引物的有效扩增率达 100%, 其余引物的有效扩增率均超过 75%, 平均有效扩增率达 92.665%。且 26 对引物中有 24 对引物位点呈高多态性 ($\text{PIC} > 0.5$), 剩余 2 对引物呈中等多态性^[13], 说明筛选出的 26 对引物在蝴蝶兰属原生种质中的通用性和多态性较高, 适用于蝴蝶兰属原生种质的鉴评。26 对引物的平均观测等位基因数 (N_a) 为 2.681, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.894, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.323, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.279, 所有位点均为 $H_e > H_o$, Shannon 指数 (I) 均值为 0.581。遗传多样性分析结果表明, 本研究采用的试验材料杂合程度极低, 遗传多样性不高, 这与所用试验材料均为原生种或其变型和变种相关。

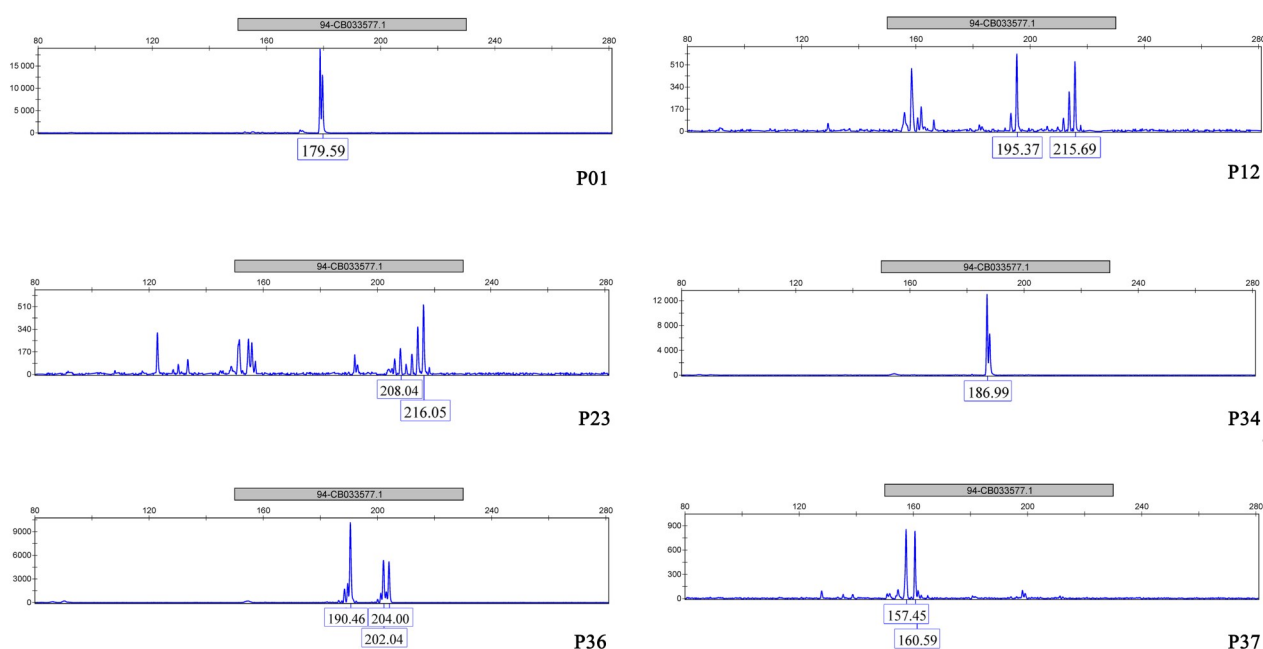


图2 6份代表种质在94-CB033577位点的TP-M13-SSR指纹图谱

Fig. 2 TP-M13-SSR fingerprinting of 6 representative germplasms at 94-CB033577 SSR loci

表2 26对SSR引物的遗传多样性分析
Table 2 Analysis of genetic diversity of 26 SSR primer pairs

编号 Code	引物名称 Primer name	有效扩增率/% Effective amplification rate	观测等位 基因数 <i>N_a</i>	有效等位 基因数 <i>N_e</i>	观测杂 合度 <i>H_o</i>	期望杂 合度 <i>H_e</i>	Shannon 信 息指数 <i>I</i>	多态性信 息含量 PIC
1	6-N10137440	81.395	2.143	1.436	0.078	0.231	0.412	0.721
2	9-N10001991	93.023	2.429	1.930	0.330	0.407	0.654	0.375
3	28-N1001301	95.349	4.000	2.413	0.422	0.412	0.818	0.887
4	31-N10013849	100.000	3.000	1.804	0.236	0.374	0.639	0.767
5	37-N10016842	100.000	2.000	1.734	0.532	0.362	0.525	0.388
6	52-N11200965	90.698	2.857	1.531	0.357	0.320	0.608	0.638
7	68-N2965390	76.744	2.429	1.795	0.510	0.419	0.700	0.758
8	74-N8009753	100.000	3.143	2.354	0.566	0.489	0.849	0.714
9	88-CB034920	88.372	2.143	1.745	0.273	0.248	0.456	0.662
10	90-CB034920	100.000	5.143	3.910	0.349	0.466	1.061	0.914
11	92-CK858704	90.698	1.714	1.542	0.183	0.268	0.401	0.546
12	94-CB033577	90.698	4.000	2.826	0.396	0.441	0.835	0.920
13	97-CB032454	93.023	3.143	2.477	0.552	0.455	0.815	0.746
14	98-CB034003	100.000	3.143	2.006	0.178	0.274	0.577	0.772
15	99-CB034673	97.674	2.286	1.499	0.084	0.181	0.351	0.647
16	101-CB032870	97.674	2.571	1.895	0.350	0.313	0.563	0.606
17	102-CB033385	100.000	1.857	1.482	0.158	0.198	0.348	0.573
18	106-CB035168	76.744	2.286	1.316	0.048	0.256	0.488	0.821
19	01816443-13	93.023	2.429	2.018	0.234	0.335	0.585	0.736
20	018164444-20	100.000	2.000	1.427	0.113	0.216	0.372	0.520
21	018164444-30	93.023	2.000	1.434	0.098	0.211	0.355	0.477
22	018164444-31	83.721	3.143	1.837	0.152	0.234	0.511	0.719
23	018164444-34	97.674	2.714	1.895	0.227	0.344	0.604	0.746
24	018164444-43	83.721	2.143	1.579	0.317	0.334	0.572	0.805
25	018164444-52	93.023	2.571	1.701	0.353	0.271	0.477	0.640
26	U6190	93.023	2.429	1.667	0.169	0.342	0.536	0.685
均值 Mean		92.665	2.681	1.894	0.279	0.323	0.581	0.684

2.2 遗传相似系数、聚类及PCoA分析

根据遗传相似性系数构建UPGMA遗传关系聚类图见图3。43份种质在遗传相似系数为0.61处可分为三大类群。第一类群包含了试验材料中的蝴蝶兰亚属所有种质、柏氏蝴蝶兰亚属五唇兰组和尖囊兰组种质及湿唇兰亚属种质。第一类群又可分为3个小类群:湿唇兰亚属与其他种质的遗传相似性最低,单独为一个小类群;五唇兰组的种质与蝴蝶兰组的种

质遗传相似性更高,聚为一个小类群;尖囊兰组的种质与裂唇兰组的种质遗传相似性更高,聚为一个小类群。第二类群包含了柏氏蝴蝶兰亚属落叶蝴蝶兰组的所有5份种质。第三类群包含了柏氏蝴蝶兰亚属柏氏蝴蝶兰组的所有2份种质。
43份蝴蝶兰属种质的三维PCoA分析结果见图4。PC1、PC2和PC3分别占所有种质总遗传变异的11.18%、6.28%和4.91%。PCoA分析中同

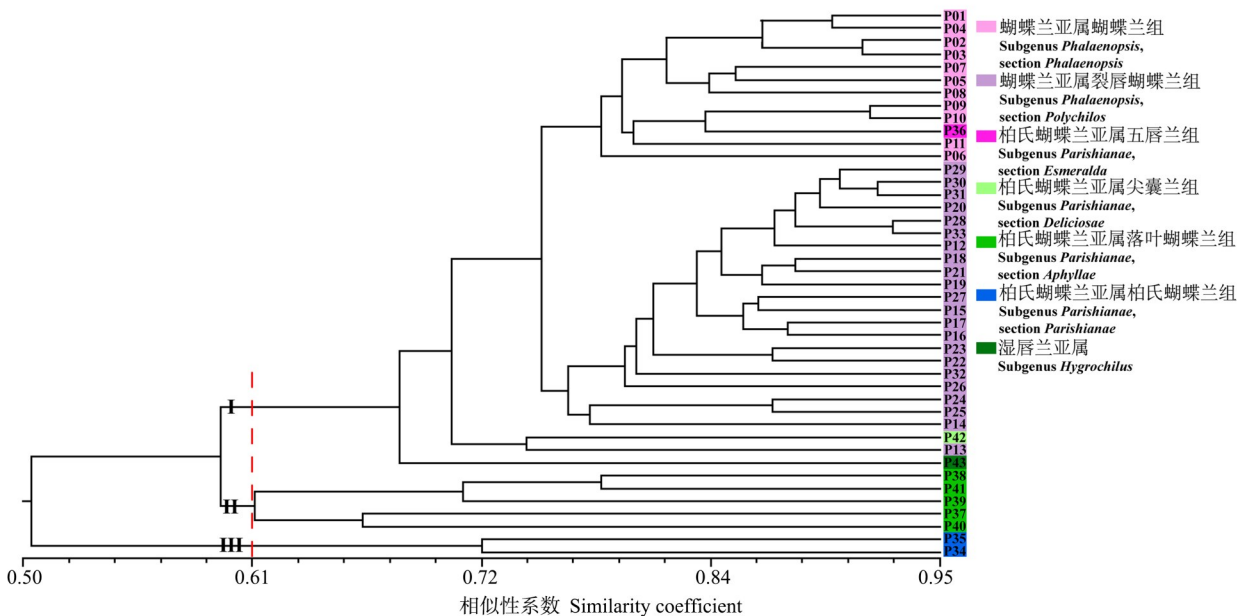


图 3 43 份蝴蝶兰属种质的 UPGMA 聚类树
Fig. 3 UPGMA clustering tree of 43 *Phalaenopsis* germplasms

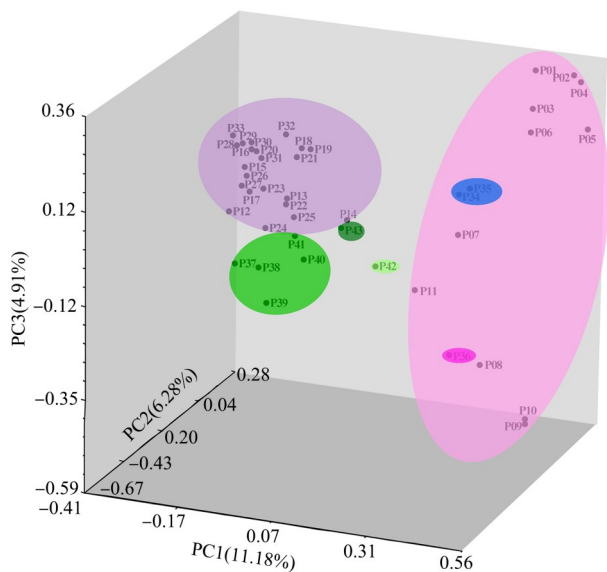


图 4 43 份蝴蝶兰属原生种的 PCoA 分析三维散点图
Fig. 4 Three-dimensional scatter point map of principal coordinates analysis of 43 *Phalaenopsis* original germplasms

一个组的种质均聚为一类,除柏氏蝴蝶兰亚属五唇兰组的种质聚类圈和柏氏蝴蝶兰亚属柏氏蝴蝶兰组的种质聚类圈与蝴蝶兰亚属蝴蝶兰组种质的聚类圈有交叠,其他组的种质聚类圈均独立无交叠。

聚类结果和 PCoA 分析结果均与目前最新的蝴蝶兰属种质植物学分类^[1]结果基本一致,说明本研究结果符合蝴蝶兰属原生种的分类,筛选出

的引物适用于蝴蝶兰属原种种质的亲缘关系鉴定、分类鉴定和分子身份证构建。

2.3 分子身份证构建

根据引物多态性信息含量(PIC)的高低,从1对引物开始逐步增加引物数量筛选可将43份蝴蝶兰属种质全部区分的引物组合,考虑到后续样品的适用性,保证每个种质最少有3个位点的有效扩增信息,最终确定引物组合94-CB033577+90-

CB034920+28-N1001301+106-CB035168+43-N5725511+98-CB034003 用于构建分子身份证。引物的扩增片段按分子量大小排列,从小到大以1~9标注,9个以上的等位基因以大写英文字母标注,若该位点在某个种质中无扩增则记为0,每个引物占两位。例如P01白花蝴蝶兰(*Phal. amabilis*)的分子身份证为33597C332268,所有种质的分子身份证编码如表3所示。

表3 蝴蝶兰属43份种质的分子身份证编码
Table 3 Molecular identity code of 43 *Phalaenopsis* germplasms

种质编号 Germplasm code	分子身份证编码 Molecular ID	种质编号 Germplasm code	分子身份证编码 Molecular ID
P01	33597C332268	P23	GI6611553356
P02	338B999C665A	P24	AC6A6688007A
P03	337AIJ113377	P25	AA66BB331166
P04	338811553366	P26	EE157H007766
P05	44FF00004666	P27	9EAA16555A55
P06	334A11003366	P28	BH1BDD9B7777
P07	44EE55886958	P29	EE1199CC005A
P08	55FF55007735	P30	6611GGCC7989
P09	56CC78005545	P31	CE1C67332256
P10	558CHHCC0077	P32	BJ495588779C
P11	GL796D332226	P33	CE1177005577
P12	AI997CCC0055	P34	668B9F887788
P13	664D55277735	P35	997CDD003377
P14	BEFF7A8C5558	P36	7D997A8A775B
P15	9A3C7C887755	P37	125599445544
P16	8B5A6A332258	P38	005766555566
P17	7F24AC9C6957	P39	00AA44000011
P18	BB3700000066	P40	00666E332226
P19	AA4966555566	P41	006G66555555
P20	7C113B000055	P42	997777338866
P21	BBAA11663366	P43	88HH77887945
P22	KKEE67663366		

3 讨 论

蝴蝶兰属是兰科最具园艺价值的类群,稳居全球盆花销售榜前3位。我国国内20世纪80年代开始试种蝴蝶兰,近年来蝴蝶兰产业发展迅猛,《2024全国花卉产销形势分析报告》显示,2023年全国蝴蝶兰成品花上市量超过1.6亿株。目前我国市场占

有率较高的蝴蝶兰品种主要还是来自中国台湾地区以及欧美国家,但近年来我国国内自主选育的蝴蝶兰新品种也逐渐增多。蝴蝶兰商品品种基本为杂交选育而来,丰富多样的种质资源造就了蝴蝶兰商品品种的多样化,是产业兴旺发达和持续发展的基石,而针对原始育种亲本——原生种质的收集、保存和鉴评则是育种工作的基石。截至2025年6月,

除11个原生种暂未有杂交育种利用记录外,蝴蝶兰属其余的原生种均已被杂交利用。其中,蝴蝶兰亚属蝴蝶兰组的原生种是目前杂交利用率最高的一类,而蝴蝶兰亚属裂唇蝴蝶兰组的路德曼蝴蝶兰、安汶蝴蝶兰和横纹蝴蝶兰是斑纹类品种的重要亲本来源,柏氏蝴蝶兰亚属五唇兰组的五唇兰则是紫红色系蝴蝶兰品种的主要亲本之一。本研究采用的43份蝴蝶兰属原生种质,涵盖了蝴蝶兰属主要3个亚属每个组的代表种质,多为高利用率的杂交育种亲本,材料代表性强。通过TP-M13-SSR检测技术,利用通过简化基因组测序技术开发的26对SSR引物对这43份种质进行遗传多样性分析、分类鉴定及分子身份证构建。26对引物的平均有效扩增率超过90%,且90%以上的引物为高多态性引物,平均PIC达0.684,多态性超过Ko等^[14]通过磁珠富集法开发的针对蝴蝶兰属21个种的28对通用Genomic-SSR引物(PIC为0.63)、Fatimah等^[15]利用NCBI数据库开发筛选出的针对17个蝴蝶兰不同原生种的16对EST-SSR引物(PIC为0.507)及Tsai等^[16]利用蝴蝶兰转录组测序数据开发的用于22个蝴蝶兰原生种分类鉴定的10对通用EST-SSR引物(PIC为0.588)。聚类结果和PCoA分析结果均与目前最新的蝴蝶兰属种质植物学分类结果^[1]基本一致,说明本研究采用的26对引物更适用于蝴蝶兰属原生种质的遗传多样性分析、亲缘关系鉴定和分子身份证构建等,也适用于采用这些高利用率的杂交育种亲本选育而来的商品品种的鉴别。

本研究材料均为蝴蝶兰属原生种或其变型和变种,遗传多样性分析结果表明整体杂合程度极低,遗传多样性不丰富。蝴蝶兰属75个原生种,每个种除其原变种或变型外,大多还存在其他变种或变型,与原变种或变型相比多为花色不同。如本研究中采用的P08为小兰屿蝴蝶兰(原变型),花色为粉红色至紫罗兰色,而P09白花小兰屿蝴蝶兰(变型)为黄唇白花,P10蓝唇小兰屿蝴蝶兰(变型)则为蓝紫唇白花。Frankham^[17]研究表明,小种群或孤立分布的野生种通常具有较低的遗传多样性,针对蝴蝶兰属原生种遗传多样性分析结果与本研究结果类似,遗传多样性同样较低^[15-16]。聚类分析发现,本研究的分类结果与最新的蝴蝶兰属种质植物学分类结果基本一致,但柏氏蝴蝶兰亚属五唇兰组的五唇兰和尖囊兰组的大尖囊蝴蝶兰2份种质与蝴蝶兰

亚属聚为一大支,并未与柏氏蝴蝶兰亚属其他组的种质聚为一支,这可能与蝴蝶兰属植物学分类的不断变化和发展有关。自1825年Blume建立蝴蝶兰属以来,分类学的争议未曾停止,五唇兰和大尖囊蝴蝶兰早期一直被分为独立的五唇兰属和尖囊兰属,随着分类学和分子系统学研究的不断深入,五唇兰和大尖囊蝴蝶兰被归到蝴蝶兰属中作为柏氏蝴蝶兰亚属中的2个种,但蝴蝶兰属的分类系统仍在根据不同的研究成果进行不断修订^[1]。

种质资源对现代种业的发展起到支撑保障作用,随着市场不断追求新、奇、特的发展需求,对兰花新品种的培育提出更高要求,而种质资源储备是新商品开发和产业持续发展的重要基础。目前,全球蝴蝶兰产业兴旺发达,但种质资源的相关研究却相对匮乏,尤其我国大陆地区产业和研究均起步较晚。分子身份证是将扩增图谱运用不同的编码方式数字化,使得种质资源获得唯一的条码,便于资源的分类管理和快速检索。本研究中采用毛细管电泳检测技术建立了一个蝴蝶兰属种质SSR标记分析系统,并采用以片段分子量大小为基础的核心引物组合法构建了43份蝴蝶兰属主要原生种质的分子身份证。针对其他物种^[4-6]和蝴蝶兰属种质^[15-16,18]的指纹图谱和分子身份证构建主要集中于栽培品种或少部分原生种,材料代表性较弱。基于蝴蝶兰属原生种资源丰富,商品品种均为原生种杂交选育,目前在英国皇家园艺学会登录的杂交组合超过40 000个,市场常见商品品种均来自这些杂交组合中的优选单株,品种极为繁多,所以针对少数原生种或栽培品种开发的引物和构建的分子身份证体系普适性较低。本研究选用的43份蝴蝶兰属原生种质涵盖了蝴蝶兰属目前杂交育种利用的主要亲本材料,筛选出的引物在这些原生种质中通用性高,也将适用于绝大部分基于这些原生种质杂交选育而来的商品品种,对于蝴蝶兰属原生种质分类保存、品种鉴定、亲缘关系分析以及后续的新品种产权保护等方面具有重要作用。后续将利用本研究筛选出的引物对蝴蝶兰商品品种进行检测,为商品品种的分类鉴定和新品种鉴别提供分子检测证据。

4 结 论

本研究采用TP-M13-SSR分子标记技术,基于

简化基因组测序技术开发的蝴蝶兰属内和属间通用SSR引物中筛选出26对引物对43份蝴蝶兰属原生种质资源进行扩增检测。26对引物中有24对引物在本试验材料的扩增中呈高多态性,且43份种质基于扩增结果的聚类分析和PCoA分析结果均与目前最新的植物学分类结果基本一致,说明本研究筛选出的引物适用于对蝴蝶兰属原生种质的分类鉴评。根据扩增结果筛选出6对核心引物可以构建每份种质特有的分子身份证。本研究构建了蝴蝶兰原生种质的快速分子鉴定和分子身份证构建体系,为后续蝴蝶兰属种质资源的收集保存、鉴评和开发利用奠定了基础。

参考文献 References

- [1] 刘仲健,王洁雨,奥拉夫·格鲁斯,兰思仁. 世界蝴蝶兰属植物[M]. 北京:高等教育出版社,2021
Liu Z J, Wang J Y, Gruss O, Lan S R. *The Genus Phalaenopsis in World*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2021 (in Chinese)
- [2] 秦宇,郭荣琨,农惠兰,王燕,崔凯,董宁光. 利用SSR荧光标记构建山楂种质分子身份证[J]. 园艺学报, 2024, 51(6):1227-1240
Qin Y, Guo R K, Nong H L, Wang Y, Cui K, Dong N G. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of hawthorn[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(6):1227-1240 (in Chinese)
- [3] 寇帅,李政,李先源,睦顺照,李名扬,李志能. 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
Kou S, Li Z, Li X Y, Sui S Z, Li M Y, Li Z N. Development of SSR primers in *Cymbidium faberi* Rolfe and study on genetic diversity of *Cymbidium* Sw. in Chongqing-Guizhou-Sichuan Region [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(2):338-348 (in Chinese)
- [4] 崔学强,唐璇,黄昌艳,邓杰玲,李秀玲,卢家仕,张自斌. 基于iPBS标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析及DNA指纹图谱构建[J]. 热带作物学报, 2021, 42(2): 317-324
Cui X Q, Tang X, Huang C Y, Deng J L, Li X L, Lu J S, Zhang Z B. Genetic diversity analysis and fingerprinting construction of *Dendrobium* germplasm resources by iPBS marker[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(2): 317-324 (in Chinese)
- [5] 张成才,王亚萍,王开良,常君,任华东,姚小华. 利用SSR构建薄壳山核桃主要品种的分子身份证[J]. 植物遗传资源学报,2022,23(6):1835-1846
Zhang C C, Wang Y P, Wang K L, Chang J, Ren H D, Yao X H. Construction of molecular IDs for major cultivars in pecan (*Carya illinoensis*) using SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(6):1835-1846 (in Chinese)
- [6] 白晓倩,陈于,张仕杰,赵玉强,王武,朱灿灿. 基于表型性状和SSR标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4): 972-984
Bai X Q, Chen Y, Zhang S J, Zhao Y Q, Wang W, Zhu C C. Genetic diversity analysis and fingerprinting of chestnut varieties based on phenotypic traits and SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4):972-984 (in Chinese)
- [7] UPOV. Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction (“BMT Guidelines”)[EB/OL]. [2025-04-20]. https://www.upov.int/edocs/mdocs/upov/en/twv_55/upov_inf_17_2_draft_5.pdf
- [8] 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, Lü 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)
- [9] 陈明望,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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] 肖文芳,李佐,陈和明,吕复兵. 蝴蝶兰属与钻喙兰属通用SSR引物的开发与应用[J]. 园艺学报, 2024,51(5): 1056-1068
Xiao W F, Li Z, Chen H M, Lü F B. Development and application of universal SSR molecular marker primers in *Phalaenopsis* and *Rhynchostylis* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024,51(5): 1056-1068 (in Chinese)
- [13] 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):314-331
- [14] Ko Y Z, Shih H C, Tsai C C, Ho H H, Liao P C, Chiang Y C. Screening transferable microsatellite markers across genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae)[J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(1):48
- [15] Fatimah, Dewi S. Development of sequence-based microsatellite marker for *Phalaenopsis* orchid[J]. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2011, 18(2):71-76
- [16] Tsai C C, Shih H C, Wang H V, Lin Y S, Chang C H, Chiang Y C, Chou C H. RNA-seq SSRs of moth orchid and screening for molecular markers across genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141761
- [17] Frankham R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife[J]. *Conservation Biology*, 1996, 10(6): 1500-1508

[18] 李佐, 肖文芳, 陈和明, 吕复兵. 蝴蝶兰种质资源遗传多样性及核心种质构建[J].

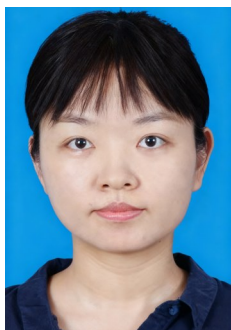
园艺学报, 2025, 52(6): 1519-1529

Li Z, Xiao W F, Chen H M, Lü F B. Genetic diversity and core collection

construction of *Phalaenopsis* germplasm resources[J]. *Acta Horticulturae*

Sinica, 2025, 52(6): 1519-1529 (in Chinese)

责任编辑: 申青苗



第一作者简介: 肖文芳, 硕士研究生, 副研究员。主要从事兰花遗传育种研究。已主持完成省部级等项目 4 项, 参与完成国家级、省部级等项目 30 余项。作为第一培育人获得植物新品种权 1 项, 参与选育获得植物新品种权的蝴蝶兰新品种 30 余项; 获得国家授权发明专利 10 余项, 软件著作权 4 项; 参与选育广东省农作物品种审定的新品种 30 余个; 发表论文 20 余篇。获得神农中华农业科技奖优秀创新团队奖 1 项、河南省科学技术进步奖二等奖 1 项、广东省农业技术推广奖二等奖 1 项。



通讯作者简介: 吕复兵, 博士, 研究员。广东花卉产业联盟秘书长、华中农业大学和仲恺农业工程学院硕士生导师、中国花卉协会兰花分会常务理事、广东省园艺学会常务理事。主要从事兰花遗传育种、繁殖与栽培研究, 在兰花种质资源鉴评与创新利用上取得显著成效, 建立了比较完善的蝴蝶兰遗传育种技术体系。承担国家、省、市等各级科研项目 50 余项。主持和参与取得国家和省部级科技成果奖励 11 项(国家科学技术进步奖二等奖 1 项、神农中华农业科技优秀创新团队奖 1 项、广东省科学技术进步奖一等奖 2 项、福建省科学技术进步奖一等奖 1 项、河南省科学技术进步奖二等奖 1 项、广东省科学技术进步奖三等奖 5 项), 其他科技成果奖励多项。选育通过省级审(评)定的兰花新品种 59 个, 获得国家新品种权的兰花新品种 48 个, 在英国皇家园艺学会登录兰花新杂种 110 余个。发表学术论文 150 余篇, 获得发明专利 21 件、实用新型专利 2 件, 制定国家农业行业标准 1 项, 参编书籍 2 部。