

基于 SSR 标记的风兰品种资源遗传多样性分析与 DNA 指纹图谱构建

何月秋^{1,2}, 丁楚蔚³, 林立^{1,2}, 胡康婷^{1,2}, 陈志³, 葛武国⁴

(1. 宁波城市职业技术学院, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波市观赏植物遗传育种与重点实验室, 浙江 宁波 315100; 3. 浙江省农业科学院, 杭州 310021; 4. 宁波莘园农业科技有限公司, 浙江 宁波 315010)

摘要: 为探清风兰品种资源的遗传背景并构建可精准鉴定的 DNA 指纹图谱, 该研究通过转录组测序开发筛选出 20 对 SSR 多态性引物, 对 99 份风兰种质进行聚类与遗传多样性分析。结果表明: (1) 20 对引物共检测到 214 个等位基因, 平均等位基因数 (N_a) 10.7, 平均期望杂合度 (H_e) 0.678 4, 平均多态性信息含量 (PIC) 0.634 8, 表明风兰栽培群体具有较高的遗传多样性。(2) 99 份风兰种质的遗传距离介于 0~3.919 7 之间, 平均遗传距离为 0.920 3, 部分品种可能为同物异名或遗传背景高度一致的克隆材料。(3) 聚类分析和主坐标分析将 99 份种质划分为 15 个类群, 各类群在花色、根型等表型特征上呈现明显聚集趋势, 且类群遗传多样性差异与类群规模、品种起源密切相关。(4) 在遗传多样性分析的基础上, 构建了基于 SSR 等位基因大小编码的数字指纹体系, 并生成二维码, 包含品种名、叶形、叶色、花色、根色、开花时间及数字指纹编号, 实现 92 个品种 (区分率 92.9%) 的精准分子鉴定。该指纹图谱为风兰品种权保护、市场鉴定及育种亲本选配提供了可靠工具, 为风兰种质资源保护与品种创新奠定了分子基础。该研究完成了 99 份风兰种质的遗传分析与 SSR 指纹库构建, 为该领域的系统研究提供了重要数据支撑。

关键词: 风兰, SSR 标记, 遗传多样性, DNA 指纹, 聚类分析, 品种鉴定

中图分类号: Q949

文献标识码: A

Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Neofinetia falcata* varieties based on SSR markers

HE Yueqiu^{1,2}, DING Chuwei³, LIN Li^{1,2}, HU Kangting^{1,2}, CHEN Zhi³, GE Wuguo⁴

(1. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 2. Ningbo Key Laboratory of Ornamental Plant Genetics, Breeding and Utilization, Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo 315000, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 4. Ningbo Shen Yuan Agricultural Technology Co., Ltd., Ningbo 315010, Zhejiang, China)

Abstract: To reveal the genetic background and germplasm characteristics of *Neofinetia falcata*, and to establish an accurate DNA fingerprint construction, 20 pairs of polymorphic SSR markers developed from transcriptome sequencing were used to evaluate the genetic diversity and relationships of 99 accessions. The results were as follows: (1) A total of 214 alleles were detected across the 20 primer pairs, with an average number of alleles per locus (N_a) of 10.7, an average expected heterozygosity (H_e) of 0.678 4, and an average polymorphism information content (PIC)

基金项目: 宁波市奉化区农业与社会发展科技计划项目 (202402106)。

第一作者: 何月秋(1975—), 博士, 教授, 研究方向为观赏植物开发与利用, (E-mail) heyueqiu@nbcc.cn。

of 0.634 8, indicating a relatively high level of genetic diversity within the cultivated population. (2) The genetic distances among the 99 germplasms ranged from 0 to 3.919 7, with an average of 0.920 3, suggesting that some varieties might be synonyms or clonal materials with highly consistent genetic backgrounds. (3) Cluster analysis and principal coordinate analysis divided the 99 germplasms into 15 groups, showing evident aggregation trends in phenotypic traits such as flower color and root type; moreover, the genetic diversity of these groups was closely related to group size and varietal origin. (4) Based on the genetic diversity analysis, a digital fingerprinting system encoding SSR allele sizes was constructed, and corresponding QR codes containing variety name, leaf shape, leaf color, flower color, root color, flowering time, and digital fingerprint number were generated, enabling accurate molecular identification of 92 varieties (distinguishing rate of 92.9%). This fingerprint database provides a reliable tool for variety rights protection, market authentication, and parental selection in breeding, thereby laying a molecular foundation for the conservation and innovative utilization of *Neofinetia falcata* germplasm resources. This study systematically presents the genetic analysis and SSR fingerprint library construction of 99 *Neofinetia falcata* germplasms, providing important data support for systematic research in this field.

Keywords: *Neofinetia falcata*, SSR markers, genetic diversity, DNA fingerprint, cluster analysis, variety identification

风兰 (*Neofinetia falcata*), 又称轩兰、仙草兰, 属兰科 (Orchidaceae) 风兰属 (*Neofinetia*) 的稀有附生兰 (杨柏云等, 1997; 王卫东等, 2014)。风兰具有较高观赏价值, 在市场备受青睐 (Sascha et al., 2012)。作为国家Ⅱ级重点保护野生植物, 风兰主要分布于江西、四川、福建、浙江等地的溪谷密林 (林立等, 2017)。目前, 国内市场流通的风兰主要可分为两类: 一类是价格昂贵的日韩引进园艺品种 (截至 2025 年日本富贵兰协会登录的品种已达 238 个)。此外, 作为兰科植物的国际登录机构, 英国皇家园艺学会 (RHS) 亦有风兰属园艺品种的登录记录, 反映出该属在全球范围内的园艺关注度; 另一类是价格相对低廉的国产原生种, 包括野生采集和组培繁殖 (李春华和李柯澄, 2019)。市场需求对我国野生风兰资源构成严重威胁, 有关风兰的基础研究与管理均存在明显短板: 近缘属植物分类混淆、资源保存分散、民间命名混乱、亲缘关系不明等问题, 严重制约了资源的有效利用与品种创新 (张瑛等, 2010)。因此, 系统开展风兰遗传多样性研究并构建 DNA 指纹图谱库, 已成为实现其品种鉴定、科学保护与高效育种的紧迫基础工作。

分子标记是一种能够精准揭示生物个体或种群间 DNA 差异的遗传标记。其中, 简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 因其多态性高、共显性等优点, 已成为植物遗传多样性分析与遗传图谱构建的核心工具 (Varshney et al., 2005; Sun et al., 2025; Zhao et al., 2025)。在兰科植物中, SSR 标记已广泛应用于蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)、大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*)、美花石斛 (*Dendrobium loddigesii*)、春兰 (*Cymbidium goeringii*)、建兰 (*C. ensifolium*) 等类群的种质鉴定、亲缘关系分析和分子身份证构建 (张水明等, 2012; Cai et al., 2012; Lee et al., 2012; Liu et al., 2014; 沈竑哲等, 2022; Juan et al., 2023)。近年来, 基于 SSR 标记的 DNA 指纹图谱在蝴蝶兰原生种质 (肖文芳等, 2026)、雪茄烟 (王琰琰等, 2021) 等作物中成功建立, 实现了品种的精准分子鉴定。然而, 针对风兰这一珍稀兰科植物, 基于多态性分子

标记、面向栽培种质开展的系统性遗传多样性分析、亲缘关系解析及 DNA 指纹图谱构建，目前仍鲜有报道，有关研究多集中于形态分类与组织培养（华文，2020；丁长春等，2020；齐璐璐等，2022）。Matsuba 等（2015）构建了风兰细菌人工染色体（BAC）文库并用于分子细胞遗传学分析，但未涉及群体遗传多样性与品种亲缘关系的系统解析。Park 等（2018）虽基于 SSR 标记对韩国野生风兰种群开展了遗传评价，发现其遗传多样性较低、存在遗传瓶颈，但研究对象仅限于野生种群，未覆盖数量众多、遗传背景复杂的园艺栽培品种。因此，针对风兰栽培种质开展系统的遗传多样性评估与 DNA 指纹图谱构建，已成为支撑其资源保护与可持续利用的紧迫任务，而目前相关研究仍较为零散，缺乏系统性的数据支撑。

综上，尽管已有研究为风兰保护提供了初步线索，但面向数量众多、命名混乱的栽培品种，其遗传多样性水平如何，品种间的亲缘关系如何划分，能否建立一套可靠的分子指纹体系以实现精准鉴定，这 3 个科学问题仍未得到系统解答。为此，本研究以 99 份风兰栽培种质为对象，依托 SSR 分子标记技术，开展遗传多样性分析、聚类分析与指纹图谱构建，旨在回答上述问题，为风兰品种权保护、市场真伪鉴定及分子标记辅助育种提供关键技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料均来自宁波莘园农业科技有限公司，共计 99 份风兰种质材料（表 1），于 2025 年 8 月中旬采集无病害幼嫩和成熟叶片，液氮中暂存后放入-80 °C 冰箱中备用。

表 1 99 份风兰种质资源名称

Table 1 Names of 99 *Neofinetia falcata* germplasm resources

编号 No.	品种名称 Cultivar Name	编号 No.	品种名称 Cultivar Name	编号 No.	品种名称 Cultivar Name
1	‘太极仙’ <i>N. falcata</i> ‘Taegeuksun’	34	‘红华殿’ <i>N. falcata</i> ‘Benikaden’	67	‘翠华殿’ <i>N. falcata</i> ‘Suikaden’
2	‘富贵殿’ <i>N. falcata</i> ‘Fukiden’	35	‘朱天王虎’ <i>N. falcata</i> ‘Shutenno Tora’	68	‘秋红锦’ <i>N. falcata</i> ‘Shuukou Nishiki’
3	‘西出都’ <i>N. falcata</i> ‘Nishidemiyako’	36	‘紫织’ <i>N. falcata</i> ‘Shiori’	69	‘金楼阁’ <i>N. falcata</i> ‘Kinkakurou’
4	‘西鹤’ <i>N. falcata</i> ‘Saikaku’	37	‘红天狗’ <i>N. falcata</i> ‘Benitengu’	70	‘白鸟’ <i>N. falcata</i> ‘Shiratori’
5	‘银世界’ <i>N. falcata</i> ‘Ginsekai’	38	‘卑弥呼’ <i>N. falcata</i> ‘Himiko’	71	‘青轴富岳’ <i>N. falcata</i> ‘Seijiku Fugaku’
6	‘玉锦’ <i>N. falcata</i> ‘Tamanishiki’	39	‘青海’ <i>N. falcata</i> ‘Seikai’	72	‘大江丸缟’ <i>N. falcata</i> ‘Oemarushima’
7	‘真鹤’	40	‘建国’	73	‘绀散’

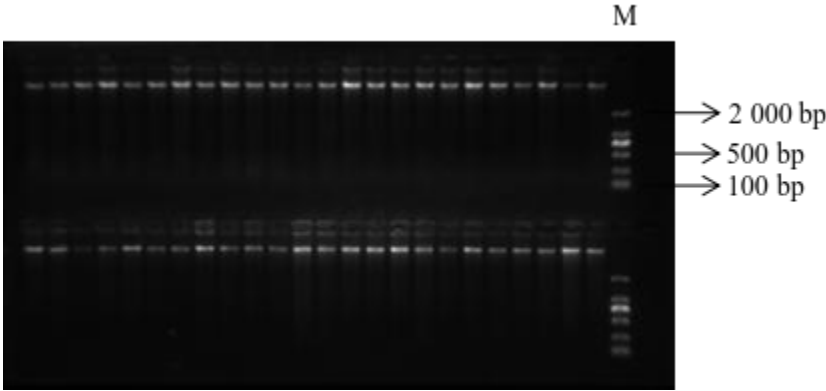
	<i>N. falcata</i> ‘Manazuru’		<i>N. falcata</i> ‘Kenkoku’		<i>N. falcata</i> ‘Konsan’
	‘古都’		‘贯雪’		‘朝鲜铁’
8	<i>N. falcata</i> ‘Koto’	41	<i>N. falcata</i> ‘Kansetsu’	74	<i>N. falcata</i> ‘Chousen
					Tetsu’
	‘古都之雪’		‘桃山锦’		‘红水晶’
9	<i>N. falcata</i> ‘Kotoyuki’	42	<i>N. falcata</i> ‘Momoyamanishiki’	75	<i>N. falcata</i>
					‘Kousuishou’
	‘日向猛虎’		‘桃山香’		‘懂’
10	<i>N. falcata</i> ‘Hyugamoko’	43	<i>N. falcata</i> ‘Seijyu’	76	<i>N. falcata</i> ‘Dou’
					‘宝生殿’
	‘天明’		‘圣寿’		<i>N. falcata</i>
11	<i>N. falcata</i> ‘Cheonmyung’	44	<i>N. falcata</i> ‘Seijyu’	77	‘Houshouden’
					‘神曲’
	‘奄美冠白’		‘豆叶缟’		<i>N. falcata</i> ‘Shinkyoku’
12	<i>N. falcata</i> ‘AmamiKanpaku’	45	<i>N. falcata</i> ‘Mameba Gashima’	78	
	‘高千穗之缟’		‘天宫殿’		‘允庆丸’
13	<i>N. falcata</i> ‘Takachiho no	46	<i>N. falcata</i> ‘Tenkyuden’	79	<i>N. falcata</i> ‘Inkei Maru’
	Shima’				
	‘湖东之剑’		‘海王丸’		‘信玄’
14	<i>N. falcata</i> ‘Kotokonotsurugi’	47	<i>N. falcata</i> ‘Kaiousmaru’	80	<i>N. falcata</i> ‘Shingen’
	‘金广锦’		‘黑豹’		‘红玄’
15	<i>N. falcata</i> ‘Kogahonishiki’	48	<i>N. falcata</i> ‘Kurohyo’	81	<i>N. falcata</i> ‘Kougen’
					‘黑龙宝’
	‘宝锦’		‘翠扇’		<i>N. falcata</i>
16	<i>N. falcata</i> ‘Takaranishiki’	49	<i>N. Falcata</i> ‘Suisen’	82	‘Kokuryuuhou’
					‘红牡丹’
	‘织姬’		‘金福’		<i>N. falcata</i> ‘Benibotan’
17	<i>N. falcata</i> ‘Orihime’	50	<i>N. falcata</i> ‘Kimpuku’	83	‘紫宸殿’
	‘幽谷锦’		‘晃贵殿’		<i>N. falcata</i> ‘Shishinden’
18	<i>N. falcata</i> ‘Yuganishiki’	51	<i>N. falcata</i> ‘Koukiden’	84	‘源照寺’
	‘樱锦’		‘绿云’		<i>N. falcata</i> ‘Genshouji’
19	<i>N. falcata</i> ‘Sakura Nishiki’	52	<i>N. falcata</i> ‘Ryokuun’	85	‘都羽二重’
					<i>N. falcata</i>
	‘秋之舞姬’		‘吟风白缟’		‘Miyakohabutae’
20	<i>N. falcata</i> ‘Akinomaihime’	53	<i>N. falcata</i> ‘Ginфу Shirogashima’	86	‘伯令’
					<i>N. falcata</i> ‘Hakurei’
	‘贵妇人’		‘寿光’		‘红岗’
21	<i>N. falcata</i> ‘Kifujin’	54	<i>N. falcata</i> ‘Jukou’	87	<i>N. falcata</i> ‘Koukou’
	‘翠宝’		‘绀波流’		‘公主’
22	<i>N. falcata</i> ‘Suihou’	55	<i>N. falcata</i> ‘Konharyuu’	88	<i>N. falcata</i> ‘Hime’
	‘满天’		‘凤玉’		‘花簪’
23	<i>N. falcata</i> ‘Manten’	56	<i>N. falcata</i> ‘Hougyoku’	89	<i>N. falcata</i> ‘Hana
					kanzashi’
	‘黎明’		‘花衣’		‘真月’
24	<i>N. falcata</i> ‘Reimei’	57	<i>N. falcata</i> ‘Hanagoromo’	90	<i>N. falcata</i> ‘Shingetsu’
	‘红扇’		‘浚河牡丹’		
25	<i>N. falcata</i> ‘Beniougī’	58	<i>N. falcata</i> ‘Shungawa Botan’	91	

	‘万华镜’		‘雪中松’		‘龙泉锦’
26	<i>N. falcata</i> ‘Mangekyou’	59	<i>N. falcata</i> ‘Setsuchuu Matsu’	92	<i>N. falcata</i>
					‘Ryuzennishiki’
	‘火影’		‘八千代’		‘杨贵姬’
27	<i>N. falcata</i> ‘Hwayeong’	60	<i>N. falcata</i> ‘Yachiyo’	93	<i>N. falcata</i> ‘Yokihime’
	‘旭升’		‘剑王’		‘翠月湖’
28	<i>N. falcata</i> ‘Asahizakari’	61	<i>N. falcata</i> ‘Kenou’	94	<i>N. falcata</i> ‘Cuiyuehu’
	‘曼珠沙华’		‘秋宝’		‘童话’
29	<i>N. falcata</i> ‘Manjushage’	62	<i>N. falcata</i> ‘Shuuhou’	95	<i>N. falcata</i> ‘Douwa’
	‘丰明殿’		‘黄云龙’		‘银雪岭’
30	<i>N. falcata</i> ‘Houmeiden’	63	<i>N. falcata</i> ‘Kiunryuu’	96	<i>N. falcata</i> ‘Ginsetsurei’
	‘紫金天’		‘日月光’		‘武藏’
31	<i>N. falcata</i> ‘Shikinten’	64	<i>N. falcata</i> ‘Nichigetsukou’	97	<i>N. falcata</i> ‘Musashi’
	‘朱天童子’		‘金银罗莎’		‘梦幻之缟’
32	<i>N. falcata</i> ‘Shutendoji’	65	<i>N. falcata</i> ‘Kinginrasha’	98	<i>N. falcata</i>
					‘Mugenoshima’
	‘豆天红梅’		‘雷山’		风兰
33	<i>N. falcata</i> ‘Mameteng	66	<i>N. falcata</i> ‘Raizan’	99	<i>N. falcata</i>
	Koubai’				

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取与检测

采用北京博友顺生物技术有限公司的磁珠试剂盒，提取 99 份样品的基因组 DNA。取 3 μL DNA 样品，使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，最终将 DNA 稀释至 50 ng·μL⁻¹，-20 °C保存（图 1）。



泳道从左到右依次为品种 1–24（上）和 25–48（下）；M. DNA marker（DL2 000）。
Lanes from left to right correspond to varieties 1–24 (upper panel) and 25–48 (lower panel); M. DNA marker (DL2 000).

图 1 部分风兰种质 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 DNA agarose gel electrophoresis results of partial *Neofinetia falcata* germplasm

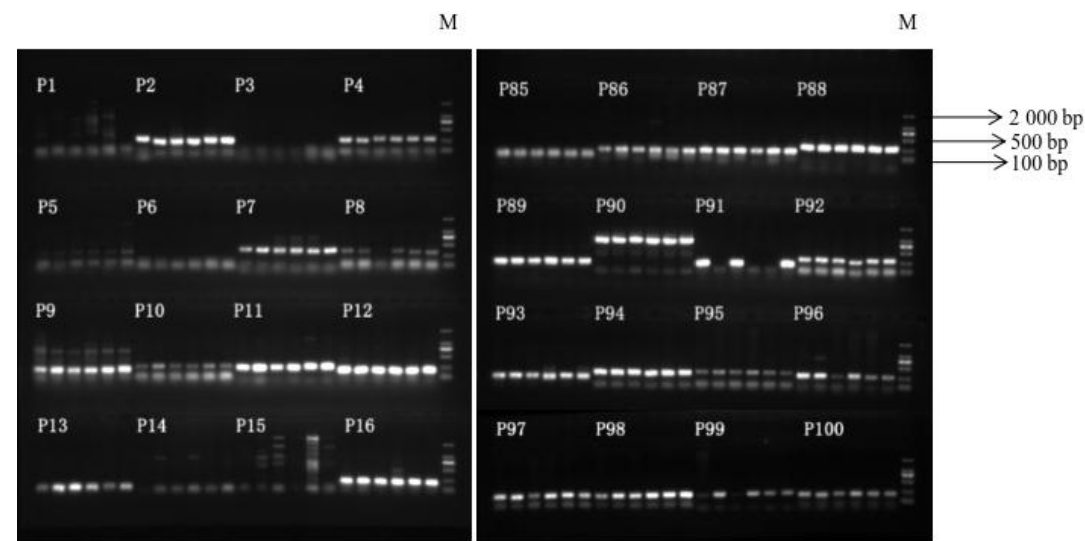
1.2.2 转录组测序与 SSR 引物设计

以野生植株为供试材料，采集成熟叶片后用干冰保存寄送至上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组测序，测序平台为 Illumina Novaseq 6000，重复测序 3 次。原始数据经过过滤和质检后

获得 Clean reads; 使用 Trinity v2.8.5 软件对 Clean reads 进行 De novo 组装, 得到 Unigene 序列; 运用 MISA v1.0 软件对所有 Unigene 进行 SSR 位点搜索, 随机选取含有 SSR 位点的 Unigene 序列, 采用 Primer 3.0 软件设计 100 对 SSR 候选引物。

1.2.3 引物筛选及毛细管电泳

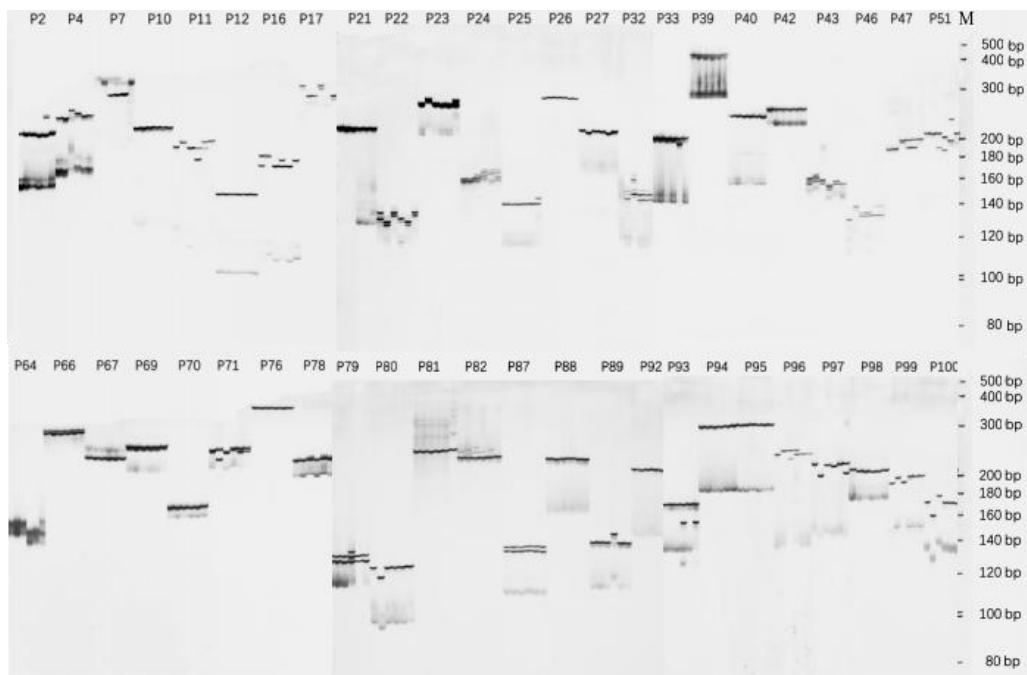
以‘日向猛虎’‘红天狗’‘青海’‘红扇’‘湖东之剑’和‘富贵殿’6个预选品种的 DNA 为模板, 对 100 对候选引物进行 PCR 扩增与初筛(附表 1)。在引物筛选阶段, 各引物的退火温度不同。利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳对所有引物的 PCR 扩增产物进行初筛(图 2), 选取条带清晰、亮度一致的样本。再将这些筛选出的样本进行 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以进一步验证引物的多态性(图 3)。最终依据扩增条带的清晰度、多态性丰富度及稳定性, 筛选出 20 对核心 SSR 引物用于后续群体遗传分析(表 2)。PCR 反应体系(共 20 μL): ddH₂O 7 μL , 2 $\times$ Easy Tag PCR Super Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.5 μL , DNA 模板 2 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 复性 35 s (各引物的退火温度详见表 2), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 S, 共 35 个循环; 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min。使用 3730 XL 测序仪(美国 ABI 公司)对 PCR 产物进行毛细管电泳, 利用 Genemarker V2.2.0 软件分析原始峰图, 确定各样本在不同位点的等位基因大小。



P1-P16, P85-P100 为引物; 泳道从左到右依次为风兰品种 10、37、39、25、14 和 2; M. DNA marker (DL2 000)。Primers used: P1-P16, P85-P100; Lanes from left to right correspond to *Neofinetia falcata* varieties 10, 37, 39, 25, 14, and 2; M. DNA marker (DL2 000).

图 2 部分候选引物初筛电泳检测结果

Fig. 2 Preliminary screening of candidate primer pairs by agarose gel electrophoresis



P 为引物；泳道从左到右依次为风兰品种 10、37、39、25、14 和 2；M. DNA marker（DL500）。
Primers are denoted as P. Lanes from left to right correspond to *Neofinetia falcata* varieties 10, 37, 39, 25, 14, and 2; M. DNA marker (DL 500).

图 3 PAGE 检测结果

Fig. 3 PAGE analysis results

1.2.4 遗传多样性分析

基于 20 对核心 SSR 引物在 99 份风兰种质中扩增的等位基因分型数据，采用 Popgene v1.32 软件计算以下群体遗传多样性参数：每位点的等位基因数 (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)、Nei's 基因多样性指数 (H) 以及 Shannon's 信息指数 (I)。同时，利用 PowerMarker 软件计算每位点的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)，对引物多态性水平进行划分，评估群体内的遗传变异水平。

1.2.5 群体亲缘关系分析

基于 Nei's (1972) 标准遗传距离，利用 Mega 7.0 软件，采用非加权组平均法构建系统发育树，以可视化展示 99 份风兰种质间的亲缘关系与分组情况。计算各类群的核心遗传多样性参数及与核心类群间的遗传距离。同时以遗传距离矩阵为基础，利用 GenAlEx 软件进行主坐标分析 (PCoA)。

1.2.6 SSR 指纹图谱构建

为实现风兰种质的精准分子鉴定，参考王琰琰等(2021)的方法，构建每份种质的唯一数字指纹编码。具体方法为：将各样本的等位基因片段大小按固定顺序编码为数字串，形成核心指纹数据。SSR 引物依次编为 A、B、C.....。记录每份材料对应 SSR 引物的扩增条带数据，产物为单一条带时只记录条带大小（省去单位 bp），若扩增产物含有多条带，则以“~”连接数字，无扩增条带则以不表示，以此将不同品种编码为由字母和数字组成的带型编号。此后，提交在线软件

(<http://cli.im/>) 生成二维码，并将品种名称、植物学分类及指纹带型编号等信息一并录入。以此构建风兰种质的 SSR 指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 多态性 SSR 引物筛选

利用‘日向猛虎’‘红天狗’‘青海’‘红扇’‘湖东之剑’和‘富贵殿’6 个品种从 100 对预选引物中筛选出 20 对多态性好、谱带清晰的 SSR 引物（表 2）。扩展的 SSR 序列中，二核苷酸重复是主导类型（75%），尤其是（AG）_n 重复出现频率最高，六核苷酸重复也占一定比例（20%），三核苷酸重复较少（5%）。扩增预期长度介于 140~300 bp 之间。

表 2 20 对 SSR 引物序列信息

Table 2 Sequence information of 20 SSR primers

序号 Number	引物 Primer	重复基元 Repeat motifs	正向序列(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence (5'-3')	平均 GC 含量 Average GC content (%)	退火温度 Annealing temperature (°C)
1	P4	(CT) ₁₅	CACACACCGTGTTCCT TGTC	ACTTTGGAAGCAGAAA GCGA	50.0	60
2	P11	(AG) ₁₅	CCTTATAGGCCCTTTC AGCC	AGAAGAACCCAATCCC ATCC	52.5	60
3	P16	(AG) ₂₄	TCGACACCGGAGACT CTTCT	TTTATCGTTCTGCTCTC GGC	52.5	60
4	P17	(CA) ₂₅	TCAATCTATAAGCAAG CCACGA	AGCTGTTTCTACAATGG GCA	43.0	60
5	P22	(TC) ₂₆	AGCTGAGGGAGACAG AGCAC	ATGTGAGAGAGCGGGA GAGA	57.5	60
6	P23	(AG) ₂₀	GTTATGCCAGGGAAG AGCTG	AAGATGGATGGGTACA AGCG	52.5	62
7	P24	(GA) ₁₅	GAAAATCCACGCTTCT CCTG	TGAAGCTGCTGCATCTC AAT	47.5	62
8	P27	(TA) ₁₅	GGTGCTTGATCCACTC CAAT	TCAATGCCTCAACCAAA ACA	45.0	60
9	P43	(GA) ₂₃	TTGCTCAACCTCTTAC CTTTCA	GGTGCATGTGCCTTATT TGA	43.0	60
10	P51	(CT) ₁₆	CTGGGAGAAAGAAGA CGGTG	CAACCAAATCTCCTAAC AAGAAA	44.9	60
11	P52	(AG) ₂₃	TCTCTCTTCCCTTCCC CTC	GAGCTTCTCCCTTCGGC TAT	55.0	60

12	P53	(AG) ₁₆	TCAGCGGCTAAGTTTT CCAC	TATCTCGTGGATCTCGT CCC	52.5	62
13	P58	(CA) ₁₅	CAGTCTACCCAAGGA CCCAA	TCATCCAGGTATCTCCA GCC	55.0	60
14	P59	(AG) ₃₁	CCTTCTCTATGCTGGA TCGC	TTCAACGGCTGTCAGAA GTG	52.5	60
15	P63	(TC) ₂₁	ACTGGGTTCCAGATGC TGAC	ACAGTCCTCCAACAGA CCGA	55.0	62
16	P71	(CTT) ₁₀	GGCTATTTGGGAATGC AGAA	AGTTTTCACCTCATGGC TGG	47.5	60
17	P96	(CACCTC) ₅	CCTCTCCCTCTCCAAC TCCT	AAGCACGATTCCATTCT TGG	52.5	58
18	P97	(GGGGAA) ₅	ACATCCTTCAATCGAA ACCG	GAAGCCTCGGAAAGCA ACTA	47.5	60
19	P99	(AGAGGA) ₅	ATCAAGTGATTGCGG GAAAC	TCAAGTCCACCTTCGAA ACA	45.0	58
20	P100	(CCCTAA) ₅	CTTCGTCCTCGACAA GAGG	TTCTGCCCTCGTCTGGT AGT	55.0	60

2.2 99 份风兰种质的遗传多样性

采用 20 对引物在 99 份风兰种质中扩增，共检测到 214 个等位基因位点，每对引物的等位基因数 (N_a) 为 4~26 个，平均为 10.7 个 (表 3)。所有引物中，P58 和 P59 产生的等位基因数目最多，有 26 个，P43 次之 (21 个)，等位基因数目最少的为 P63，仅有 4 个。有效等位基因数 (N_e) 在 1.668 3 (引物 P27)~11.887 2 (引物 P59) 之间，平均为 4.461 4。引物的多态性信息含量 (PIC) 在 0.366 6~0.910 6 之间，平均值为 0.634 8。所选 20 对引物中，16 对引物的 PIC 值>0.5，属于高度多态性引物，引物 P22、P11、P27 和 P63 的 PIC 值略低于 0.5，属于中度多态性引物，表明所选引物多态性普遍较高。风兰群体的平均 Shannon's 信息指数 (I) 为 1.533 1，最高值为 2.816 5 (引物 P58)，最低值为 0.750 6 (引物 P63)。观察杂合度 (H_o) 介于 0.060 6~0.626 3，平均为 0.340 9，期望杂合度 (H_e) 变化范围为 0.402 6~0.920 5，平均为 0.678 4。遗传多样性指数 (H) 变幅在 0.400 6~0.915 9 之间，平均为 0.675 0，表明风兰种质的遗传多样性水平较高。

表 3 20 对 SSR 引物在 99 份风兰种质中的多态信息

Table 3 Polymorphism of 20 SSR primers in the 99 *Neofinetia falcata* germplasm samples

引物 Primer	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基 因数 Effective number of alleles (N_e)	Shannon's 信息 指数 Shannon's information Index (I)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	Nei's 遗传 多样性 Nei's gene diversity index (H)	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)
--------------	---	--	---	--	--	---	---

P4	15.0	5.548 3	1.990 4	0.505 1	0.823 9	0.819 8	0.797 0
P11	9.0	2.072 3	1.163 2	0.404 0	0.520 1	0.517 4	0.494 6
P16	7.0	3.087 9	1.270 8	0.363 6	0.679 6	0.676 2	0.617 4
P17	6.0	2.720 2	1.163 9	0.060 6	0.635 6	0.632 4	0.573 3
P22	10.0	2.895 0	1.340 1	0.333 3	0.657 9	0.654 6	0.593 8
P23	10.0	2.505 4	1.296 0	0.383 8	0.603 9	0.600 9	0.564 9
P24	9.0	3.692 2	1.518 2	0.222 2	0.732 9	0.729 2	0.686 4
P27	6.0	1.668 3	0.860 0	0.252 5	0.402 6	0.400 6	0.379 7
P43	21.0	11.765 9	2.705 1	0.444 4	0.919 7	0.915 0	0.909 2
P51	16.0	7.720 4	2.351 1	0.424 2	0.874 9	0.870 5	0.859 8
P52	7.0	3.460 8	1.433 0	0.434 3	0.714 7	0.711 0	0.661 4
P53	10.0	4.080 3	1.735 7	0.252 5	0.758 8	0.754 9	0.731 3
P58	26.0	11.880 0	2.816 5	0.232 3	0.920 5	0.915 8	0.910 6
P59	26.0	11.887 2	2.798 6	0.626 3	0.920 5	0.915 9	0.910 4
P63	4.0	1.922 3	0.750 6	0.282 8	0.482 2	0.479 8	0.382 8
P71	7.0	2.535 5	1.127 3	0.404 0	0.608 7	0.605 6	0.546 9
P96	9.0	2.778 1	1.333 1	0.393 9	0.643 3	0.640 0	0.598 0
P97	5.0	1.715 1	0.759 8	0.262 6	0.419 1	0.416 9	0.366 6
P99	6.0	2.560 3	1.057 8	0.131 3	0.612 5	0.609 4	0.529 8
P100	5.0	2.731 6	1.190 8	0.404 0	0.637 1	0.633 9	0.583 0
平均值	10.7	4.461 4	1.533 1	0.340 9	0.678 4	0.675 0	0.634 8
Mean							
value							

2.3 99 份风兰种质间遗传距离

基于 SSR 分子标记计算品种间的 Nei's 遗传距离，99 份风兰种质的遗传距离介于 0~3.919 7，平均为 0.920 3；其中，‘黑龙宝’（No.82）与风兰原种（No.99）之间遗传距离最大（3.919 7），亲缘关系最远；多组品种间遗传距离为 0，包括‘西出都’（No.3）、‘古都’（No.8）与‘古都之雪’（No.9）；‘西鹤’（No.4）、‘银世界’（No.5）、‘玉锦’（No.6）、‘真鹤’（No.7）之间，这 4 个品种均为‘西出都’的进化品种；‘天明’（No.11）和‘绀波流’（No.55）；‘宝锦’（No.16）、‘源照寺’（No.85）、‘龙泉锦’（No.92）之间；‘朱天童子’（No.32）与‘雷山’（No.66）、风兰原种（No.99）与‘圣寿’（No.44）、‘白鸟’（No.70），

表明这些品种可能为同物异名或遗传背景高度一致的克隆材料。

2.4 99 份风兰种质间聚类分析

基于 Nei's 遗传距离的聚类分析结果（图 4）显示，99 份风兰种质在 0.62 的相似度阈值下可划分为 15 个类群。其中，类群I包含风兰原种（No.99）及‘白鸟’（No.70）等 4 个经典品种，为风兰资源中的基础代表性类群；类群II、类群III为单一品种类群 [‘曼珠沙华’（No.29）、‘丰明殿’（No.30）]，属于宝石根类经典优秀品种，遗传背景独立且独特；类群V（19 个）、类群VI（14 个）、类群XV（19 个）为包含品种数量最多的类群；类群V以宝石根白花、泥根白花为主，聚集了大量重点杂交品种，遗传多样性较高；类群VI均为白花类型，涵盖‘西出都’的多个进化品种，品种间遗传关联紧密；类群XV以泥根为主且花色丰富（包含色花、红花、粉花、白花），变异特征较为集中。

15 个类群的遗传多样性参数及类群间遗传距离如表 4 所示，聚类类群的遗传分化特征，与聚类划分结果高度契合。聚类划分的 15 个类群遗传多样性差异与类群规模、品种起源密切相关：高多态性类群（V、XV）的 H_e 和 PIC 均高于其他类群，且与基础类群I的遗传距离分别为 0.541 7、0.512 1，表明其虽起源于基础类群，但经过长期杂交改良后边遗传变异显著增加；类群VI的 H_e （0.534 8）和 PIC（0.511 1）相对较低且与类群V的遗传距离仅为 0.430 4，说明该类群品种间遗传关联紧密，基因交流范围较窄；单一品种类群（II、III）的 H_e 和 PIC 均接近 0，与其他类群的遗传距离均大于 0.7，体现其遗传背景的独立性；其余中等规模类群（IV、VIII、X等）的 H_e 和 PIC 均处于中等水平，与核心类群（V、XV）的遗传距离集中在 0.423 3~0.591 3 之间，表明其与核心类群存在一定遗传关联，是核心类群的重要补充。

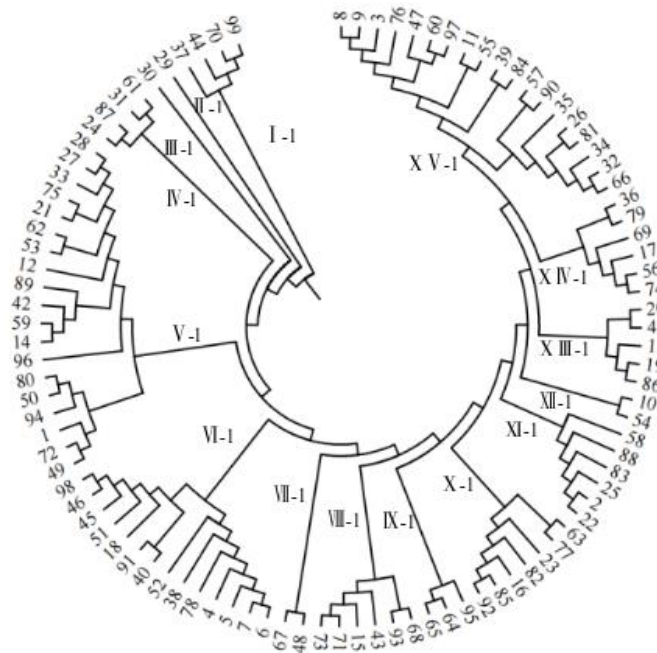


图 4 基于 SSR 标记的 99 份风兰种质资源聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of 99 *Neofinetia falcata* germplasm resources based on SSR markers

表 4 风兰 15 个聚类类群的核心遗传多样性参数及类群间遗传距离

Table 4 Core genetic diversity parameters and inter-group genetic distances of 15 clustered groups of *Neofinetia falcata*

类群 Group	种质数量 Number of germplasms	等位基 因数 Number of alleles (N_a)	有效等位 基因数 Effective number of alleles (N_e)	观测杂合 度 Observed heterozyg osity (H_o)	期望杂合 度 Expected heterozyg osity (H_e)	多态性信息 含量 Polymorphis m information content (PIC)	遗传距离 Genetic distance		
							I	V	XV
I	4	3.950 0	3.215 6	0.312 5	0.660 9	0.633 5	0.000 0	0.541 7	0.512 1
II	1	1.150 0	1.150 0	0.150 0	0.075 0	0.065 6	1.061 4	0.914 7	0.732 1
III	1	1.250 0	1.250 0	0.250 0	0.125 0	0.109 4	0.922 8	0.843 1	0.833 8
IV	4	3.500 0	2.707 5	0.500 0	0.581 2	0.555 4	0.597 4	0.460 2	0.490 9
V	19	6.300 0	3.789 3	0.403 8	0.630 3	0.611 8	0.541 7	0.000 0	0.325 7
VI	14	4.350 0	2.900 1	0.285 7	0.534 8	0.511 1	0.518 3	0.430 4	0.355 2
VII	2	1.800 0	1.630 0	0.225 0	0.306 2	0.277 9	0.735 5	0.558 5	0.490 8
VIII	6	2.550 0	2.012 6	0.250 0	0.419 4	0.391 1	0.657 5	0.492 5	0.398 9
IX	3	2.350 0	2.041 3	0.283 3	0.411 1	0.383 1	0.553 2	0.583 0	0.338 8
X	7	3.200 0	2.541 8	0.364 3	0.461 2	0.437 3	0.600 4	0.591 3	0.362 5
XI	6	3.950 0	2.848 9	0.391 7	0.527 1	0.507 3	0.618 3	0.423 3	0.302 7
XII	2	1.700 0	1.610 0	0.150 0	0.281 2	0.253 7	0.604 1	0.658 3	0.350 9
XIII	5	3.000 0	2.159 8	0.240 0	0.431 0	0.409 6	0.666 0	0.508 1	0.311 0
XIV	6	3.050 0	2.484 6	0.233 3	0.456 9	0.430 1	0.562 3	0.415 4	0.262 0
XV	19	4.850 0	2.813 3	0.413 2	0.547 4	0.525 5	0.512 1	0.325 7	0.000 0

2.5 主坐标分析

基于 Nei's 遗传距离矩阵的主坐标分析 (PCoA) 结果显示, 前 2 个主坐标 (PC1、PC2) 的累计变异解释率达 63.9% (PC1 贡献率 35.2%, PC2 贡献率 28.7%), 可有效反映种质间的遗传分化格局且与聚类分析结果高度吻合 (图 5)。PCoA 二维散点图中, 15 个聚类类群呈现出清晰的空间分布特征: 品种最多的类群V、VI、XV分别形成独立聚集区——类群V

种质间空间距离较近（遗传多样性较高但遗传关联紧密），类群VI散点重叠度高（品种间遗传距离小），类群XV散点离散度略高于类群V、VI（变异特征集中）。单一品种类群II（‘曼珠沙华’No. 29）、类群III（‘丰明殿’No. 30）表现为独立散点，分别位于 PC2 正轴、负轴的远端，与其他类群的空间距离显著，验证了其遗传背景的独立性；基础类群I（4 个经典品种）分布于中轴区域，散点聚集度中等，符合其基础代表性类群地位。空间距离越近类群，遗传距离越小，例如类群V与类群VI的散点区相邻，平均遗传距离仅 0.28。综上，PCoA 结果不仅直观呈现了 99 份风兰种质的遗传分化格局，更从空间维度验证了聚类分析的类群划分合理性，为风兰种质的遗传多样性评价及类群界定提供了分子水平的双重支撑。

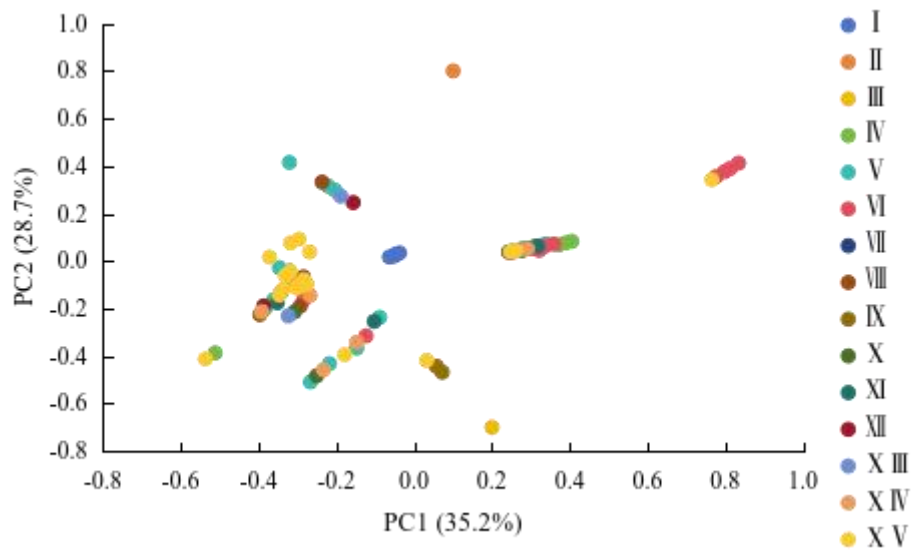


图 5 99 份风兰种质的主坐标分析

Fig. 5 Principal coordinate analysis (PCoA) of 99 *Neofinetia falcata* germplasm samples

2.6 指纹图谱

采用 20 对 SSR 引物可以将 99 个风兰品种中的 92 个完全区分开，‘西出都’的 3 个进化品种——‘西鹤’（No. 4）、‘玉锦’（No. 6）和‘真鹤’（No. 7），‘古都’（No. 8）与‘古都之雪’（No. 9），‘宝锦’（No. 16）与‘龙泉锦’（No. 92）这些相同或极近品种需进一步筛选鉴别（暂时在其相同指纹编号后依次添加由小到大的数字）。通过在线网站（<http://cli.im/>），基于每份种质的唯一数字指纹编号，构建了 99 个风兰品种的 DNA 指纹图谱（附表 2）。扫描二维码可获知风兰的品种名、叶形、叶色、花色、根色、开花时间及数字指纹编号（图 6）。



图 6 部分风兰品种的二维码

Fig.6 QR codes of part *Neofinetia falcata* varieties

3 讨论与结论

3.1 风兰种质资源遗传多样性分析

本研究利用 20 对 SSR 引物对 99 份风兰种质进行评估, 结果显示群体遗传多样性水平较高 (平均 $N_a=10.7$, $H_e=0.6784$, $H=0.6750$, $PIC=0.6348$), 其中 P58、P59、P43 等引物表现出极高的多态性 ($PIC>0.9$), 是品种鉴定的核心标记。本研究材料的遗传多样性指标显著高于 Park 等(2018)报道的韩国野生风兰种群 ($N_e=2.15$, $H=0.42$, $I=0.83$)。造成这一差异的内在原因一方面是人工选育与种质交流对变异的富集——99 份材料涵盖日韩园艺品种、国产原生种及人工杂交后代, 包括对花色、根型、叶艺等观赏性状的长期人工选育, 不仅保留了优良基因型, 也通过杂交引入了新的遗传组合, 累积了丰富的等位基因变异; 另一方面也与中国本土 (如宁波) 独特的低海拔野生种群所提供的遗传背景有关 (孙吉晶, 2008; 林立等, 2017; 华文, 2020)。同时, 本研究通过转录组测序开发的 20 对 SSR 引物在 99 份风兰种质中共检测到 214 个等位基因, 平均等位基因数达 10.7 个, 包含 16 对高度多态性引物, 鉴别能力强, 可有效支撑风兰种质的遗传多样性分析与指纹图谱构建。因此, 尽管野生风兰面临生境破碎与过度采挖的威胁, 但人工栽培群体通过跨地域引种与杂交, 有效保存并丰富了其遗传变异, 为品种创新与风兰属遗传资源保护奠定了关键基础。

3.2 品种间亲缘关系与类群划分的遗传基础

基于 Nei's 遗传距离的聚类分析将 99 份种质划分为 15 个类群, 类群划分与花色、根型、叶型等表型性状高度关联: 类群I集中了风兰原种及‘白鸟’等经典品种, 遗传背景相对保守, 与风兰属原始形态特征高度契合 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999), 说明该类群受人工干预较少; 类群VI以白花品种为主, 类群XV涵盖色花、红花等多种花色类型且根型以泥根为主, 体现了育种中对观赏性状的定向选择。主坐标分析 (PCoA) 前两主坐标累计解释 63.9% 的遗传变异, 进一步验证了类群划分的合理性。Young 等(2023)基于叶绿体 *matK* 与核 ITS 序列对风兰属及其近缘属进行系

统发育分析时亦指出,该属物种及品种的遗传聚类结果与其关键的形态特征(如叶形、根型)具有显著关联,这与本研究中“类群划分与表型特征聚集”的结论相互印证。

此外,部分品种间遗传距离为0(如‘西出都’与其进化品种),提示这些品种可能为同物异名、姊妹系或遗传背景极为接近的克隆材料。这一命名混乱现象在兰科植物中普遍存在(Hinsley et al., 2018),其根本原因在于无性繁殖的普及和民间命名缺乏统一规范。本研究首次通过SSR标记结合聚类与PCoA分析,更精准地揭示了品种间的亲缘关系,为品种整理与规范命名提供了直接的分子依据;同时,也弥补了此前风兰亲缘关系研究零散、缺乏系统性的不足(张瑛等, 2010)。清晰的类群划分不仅有助于理解风兰从原生种到园艺品种的演化历程,也为后续核心种质库的构建与杂交亲本的选配提供了遗传学分组参考,避免近缘杂交导致的后代衰退。

3.3 SSR 指纹图谱的构建与应用前景

本研究基于20对核心SSR引物,成功构建了99份风兰种质的数字指纹编码系统,并生成对应的二维码信息库,区分率达92.9%。该图谱可将92个品种完全区分,其余7个品种因遗传背景高度相似,需进一步通过高分辨率标记或表型细致鉴定。针对风兰品种鉴定长期依赖易受生长阶段和环境影响的形态特征这一瓶颈,本研究构建的SSR指纹图谱提供了客观、稳定的解决方案。相较于传统方法,分子指纹鉴定具有准确性高、重复性好的优势(朱旭东等, 2014)。与RAPD等显性标记相比,SSR标记的共显性特性可更准确鉴别纯合/杂合状态(Zhao et al., 2025),如鉴别“西出都”与其进化品种的细微遗传差异,为品种权保护提供更可靠的依据。同时,本研究进一步整合了二维码信息技术,将品种名称、叶形、花色、根色等表型信息与分子指纹关联,使查询更为直观便捷,更适配风兰作为观赏植物的实际应用场景。

该指纹图谱具有突出的应用价值,主要体现于以下3个方面:市场规范——快速鉴别高价品种真伪,遏制以次充好等市场乱象;资源管理——对接表型数据库,实现品种信息数字化,化解传统记载与栽培实际不符的困境;育种实践——指导亲本选配与杂交后代真实性鉴定,提升育种效率。此外,通过比对栽培品种与野生种群的指纹特征,还可追溯种质来源,为打击非法采挖、加强野生资源保护提供分子证据。综上,本研究构建的指纹图谱与应用体系,直接回应当前风兰市场中品种真伪难辨、种质管理混乱等现实问题,为实现栽培品种的精准分子鉴定提供了可靠的技术方案。

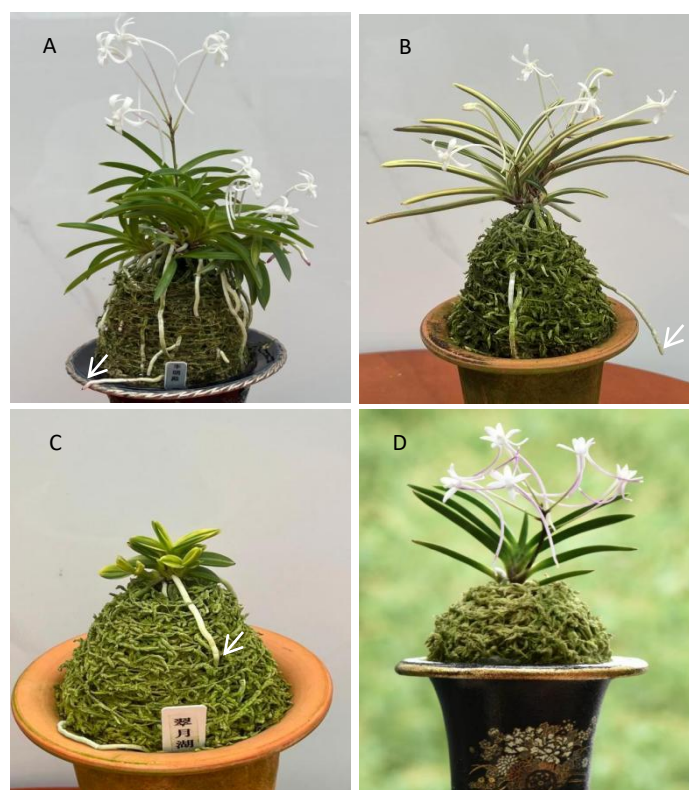
3.4 研究局限与展望

本研究系统完成了风兰栽培种质的遗传分析与SSR指纹库构建,为该领域的系统研究提供了重要数据支撑,应用价值突出。但样本仍以园艺品种为主,未来需补充野生种质以全面评估遗传本底;同时,SSR标记对极近品种的区分能力有限。未来研究可在3个方向深化:一是结合SNP等高通量标记进行精细解析,提升鉴别精度;二是基于本研究的遗传框架,开展重要性状的关联分析;三是推动分子标记辅助育种,系统支撑风兰资源的保护与创新利用。

参考文献:

- Cai X Y, Feng Z Y, Hou B W, et al., 2012. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 43: 42-47.
- Chinese academy of sciences flora of China editorial committee, 1999. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 19 [M]. Beijing: Science Press: 380-384. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1999. 中国植物志: 第 19 卷 [M]. 北京: 科学出版社: 380-384.]
- Ding C C, Wang Y Z, Huang H Y, et al., 2020. Study of regeneration and efficient induction of buds in *Neofinetia falcata* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 34(10): 2209-2218. [丁长春, 王元忠, 黄衡宇, 等, 2020. 风兰丛芽高效诱导及植株再生研究 [J]. 核农学报, 34(10): 2209-2218.]
- Hinsley A, De boer H J, Fay M F, et al., 2018. A review of the trade in orchids and its implications for conservation [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 186(4): 435-455.
- Hua W, 2020. Interspecific hybridization of *Neofinetia* species [J]. China Flowers & Horticulture, (8): 54-55. [华文, 2020. 风兰属间杂交种 [J]. 中国花卉园艺, (8): 54-55.]
- Juan H N, Fang F G, Wei E T, et al., 2023. The novel developed microsatellite markers revealed potential hybridization among *Cymbidium* species and the interspecies sub-division of *C. goeringii* and *C. ensifolium* [J]. BMC Plant Biology, 23(1): 492-492.
- Lee G D, Koh C J, Chung W K, 2012. Determination and application of combined genotype of simple sequence repeats (SSR) DNA marker for cultivars of *Cymbidium goeringii* [J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 30(3): 278-285.
- Li C H, Li K C, 2019. Propagation and greenhouse production of *Neofinetia* species [J]. China Flowers & Horticulture, (6): 30-33. [李春华, 李柯澄, 2019. 风兰属植物繁殖与温室生产 [J]. 中国花卉园艺, (6): 30-33.]
- Lin L, He Y Q, Yi J, 2017. Analysis of medicinal and nutritional components in wild *Neofinetia falcata* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 44(2): 58-61. [林立, 何月秋, 易军, 2017. 野生风兰的药用和营养成分分析 [J]. 福建林业科技, 44(2): 58-61.]
- Liu X, Huang Y, Li F, et al., 2014. Genetic diversity of 129 spring orchid (*Cymbidium goeringii*) cultivars and its relationship to horticultural types as assessed by EST-SSR markers [J]. Scientia Horticulturae, 174: 178-184.
- Matsuba A, Fujii, M, Lee, S S, et al., 2015. Molecular cytogenetic use of BAC clones in *Neofinetia falcata* and *Rhynchostylis coelestis* [J]. The Nucleus, 58(3): 207-213.
- Park S H, Lee S Y, Kim C K, et al., 2018. Genetic diversity and population structure of endangered *Neofinetia falcata* in South Korea based on microsatellite analysis [J]. Journal of Species Research, 7(3): 238-244.
- Qi L L, Yuan H L, Dong Y X, et al., 2022. Study on the effect of environmental factors on tissue culture tube plantlet of *Neofinetia falcata* [J]. Horticulture & Seed, 42(10): 30-31. [齐璐璐, 袁华玲, 董玉祥, 等, 2022. 环境因子对大叶风兰组培试管苗移栽培养的影响研究 [J]. 园艺与种苗, 2022, 42(10): 30-31.]
- Sascha D, Nicholas Z, Minsung K, 2012. Mutant flower morphologies in the wind orchid, a novel orchid model species [J]. Plant Physiology, 158(4): 1542-1547.
- Shen H Z, Li C N, Fu Q J, et al., 2022. Analysis of germplasm resources by simple sequence

- repeat markers in *Cymbidium hybridum* [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 48(1): 21-28. [沈站哲, 李春楠, 傅巧娟, 等, 2022. 大花蕙兰种质资源的简单重复序列标记分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 48(1): 21-28.]
- Sun J J, 2008. Establishing an orchid resource protection zone [N]. Ningbo Daily, 002. [孙吉晶, 2008. 设立兰花资源保护区 [N]. 宁波日报, 002.]
- Sun, Y Q, Chen, J H, Zhang, Y C, et al., 2025. Establishment and application of DNA molecular fingerprint of kernel-used apricots using capillary electrophoresis with fluorescence-labeled simple sequence repeats (SSR) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 72(Suppl 1): 657-672.
- Varshney R K, Graner A, Sorrells M E, 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 23(1): 48-55.
- Wang W D, Song Y Q, Ren Y, et al., 2014. A new orchidaceae record in Shanxi province—*Neofinetia* and *Neofinetia richardsiana* Christenson [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34(6): 1286-1287. [王卫东, 宋要强, 任毅, 等, 2014. 陕西省兰科植物新记录—风兰属及短距风兰 [J]. 西北植物学报, 34(6): 1286-1287.]
- Wang Y Y, Wang J, Liu G X, et al., 2021. Construction of SSR fingerprint database and genetic diversity analysis of cigar germplasm resources [J]. Acta Agronomica Sinica, 47(7): 1259-1274. [王琰琰, 王俊, 刘国祥, 等, 2021. 基于 SSR 标记的雪茄烟种质资源指纹图谱库的构建及遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 47(7): 1259-1274.]
- Xiao W F, Chen H M, Lv F B, et al., 2026. Analysis on genetic diversity and construction of molecular identities for 43 samples of *Phalaenopsis* original species [J]. Journal of China Agricultural University, 31(2): 104-115. [肖文芳, 陈和明, 吕复兵, 2026. 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, 31(2): 104-115.]
- Yang B Y, Yang N S, 1997. *In vitro* propagation of *Neofinetia falcata* [J]. Plant Physiology Communications, 33(2): 125-129. [杨柏云, 杨宁生, 1997. 风兰的离体繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 33(2): 125-129.]
- Young K K, Sang J J, Ki J K, 2023. Phylogenetic position of *Neofinetia* and *Sedirea* (Orchidaceae) and their species identification using the chloroplast matK and the nuclear ITS sequences [J]. Korean Journal of Plant Taxonomy, 53(2): 105-116.
- Zhang S M, Chen C, Gong L Y, et al., 2012. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from *phalaenopsis* ESTs [J]. Acta Horticulturae Sinica, 39(6): 1191-1198. [张水明, 陈程, 龚凌燕, 等, 2012. 蝴蝶兰 EST 资源 SSR 标记分析与开发 [J]. 园艺学报, 39(6): 1191-1198.]
- Zhang Y, Qian H, Tu F, 2010. Cultivation and management of *Neofinetia falcata* [J]. China Flowers & Horticulture, (12): 25. [张瑛, 钱桦, 屠峰, 2010. 风兰栽培管理 [J]. 中国花卉园艺, (12): 25.]
- Zhao M, Qu Y J, Zhang J N, et al., 2025. Genetic structure analysis and DNA fingerprint construction of 293 (*Nelumbo* spp.) accessions based on SSR markers [J]. Scientia Horticulturae, 346: 114175-114175.
- Zhu X D, Shangguan L F, Sun X, et al., 2014. Progress on cultivar identification of crop using DNA markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(30): 234-240. [朱旭东, 上官凌飞, 孙欣, 等, 2014. DNA 标记在植物品种鉴定上的应用现状 [J]. 中国农学通报, 30(30): 234-240.]



A. 丰明殿（类群III，中型草，先明瓷白艺，白花，宝石根）；**B.** 西出都（类群XV，复纶艺，白花，泥根）；**C.** 翠月湖（类群V，豆叶，缟艺，青根）；**D.** 万华镜（类群XV，绿叶，粉花，泥根）。

A. *N. falcata* ‘Houmeiden’ (Group III, medium-sized plant, pre-illuminated porcelain-white variegation, white flower, jewel root); **B.** *N. falcata* ‘Nishidemiako’ (Group XV, fukurin (edge) variegation, white flower, mud root); **C.** *N. falcata* ‘Cuiyuehu’ (Group V, mameba (bean-leaf), striped variegation, green root); **D.** *N. falcata* ‘Mangekyou’(Group XV, green leaf, pink flower, mud root).

附图 1 风兰表型特征图片

Supplementary Fig. 1 Phenotypic characteristics of *Neofinetia falcata*

附表 1 100 对引物信息

Supplementary Table 1 Information of 100 primers

引物编号 Primer No.	正向序列(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence (5'-3')	扩增片段长度 Product size (bp)	重复基元 Repeat motifs
P1	AAGGATTAATGGAGAGCGCA	GAAGGAGAAGGAAACCCCTG	280	(TC) ₁₆
P2	AGGGGACCACTCTCTCCATT	GCTGTGTTTGGCTTAGGAGC	227	(TG) ₁₅
P3	CCATTTTCATGATCACACGGT	GCGGGATCATTTTATGAGAAAG	247	(AG) ₂₁
P4	CACACACCGTGTTCTTGTC	ACTTTGGAAGCAGAAAGCGA	226	(CT) ₁₅
P5	TGTTCAAATATCCACCCACTG	TGTGTTGTTGTGTATTCGTTGTG	262	(CT) ₁₈
P6	CCATCTCCTTAACGCCAAAA	CTCCTCTTCTCCACAAACG	142	(GA) ₂₃

P7	AACGCTCGCCATGTTCTAAT	CAGCTATTTGCGTTTCTTTGG	276	(GA) ₁₅
P8	CATGGTGAATTTGGCAAGTG	CCATAATCTCCTCATACCACAACA	253	(GA) ₂₀
P9	CCCCAAAGTGTTGGCTTGTT	AAAATATGTTGCAGCAGCCC	161	(TC) ₁₆
P10	ATTGTTCTGGACTACAAGGCG	TAACAACGCATTTGGCTCAG	244	(TC) ₂₃
P11	CCTTATAGGCCCTTTCAGCC	AGAAGAACCCAATCCCATCC	191	(AG) ₁₅
P12	ACTGGACAGACCTTGATCGC	GGTCTCAGCTCCTCCTCCTT	193	(TC) ₃₀
P13	CCTCCATCTCCTCCTTTTCC	TGAGCTCCACTCGACTCATTT	137	(TC) ₁₆
P14	CCTTGCTCTGATCTCCTTCG	CTTCTCGCTATTTCGTCTGGG	273	(CT) ₁₅
P15	ATTTCTCCTCGGGTCCAAGT	GAGAGGCGTTTGAGGTCATC	166	(AG) ₂₄
P16	TCGACACCGGAGACTCTTCT	TTTATCGTTCTGCTCTCGGC	205	(AG) ₂₁
P17	TCAATCTATAAGCAAGCCACGA	AGCTGTTTCTACAATGGGCA	268	(CA) ₂₅
P18	CAAGCAATAAAGCCTTCCCA	CATGTCCATCCTTAAAGGCG	274	(AG) ₁₈
P19	TGCTCTCCTTCCTGCAACTT	TCTGCACCTTTGGGAGACTT	180	(GA) ₂₀
P20	CTGTGCGTTCTCTGGTCTCA	ATTAGCAAGCCTAGTCGCCA	172	(TC) ₂₁
P21	TTAGAGAAGGGAACCAGCCA	GAAGAGATTTGAGGGCGTTG	241	(CT) ₂₂
P22	AGCTGAGGGAGACAGAGCAC	ATGTGAGAGAGCGGGAGAGA	156	(TC) ₂₆
P23	GTTATGCCAGGGAAGAGCTG	AAGATGGATGGGTACAAGCG	275	(AG) ₂₀
P24	GAAAATCCACGCTTCTCCTG	TGAAGCTGCTGCATCTCAAT	170	(GA) ₁₅
P25	GAAGACGAAGAGCTCCAACC	AAAACCGACGGAGAAGGAGT	164	(GA) ₂₂
P26	AATGCCTGTGGAACCTTTTGC	GCCCCGAATGTTTATTTGAA	278	(TG) ₁₅
P27	GGTGCTTGATCCACTCCAAT	TCAATGCCTCAACCAAAACA	231	(TA) ₁₅
P28	CAACCTCAGCATCGCATAGA	GACCTCCGGTCTCTCTTCCT	274	(CT) ₂₆
P29	AGAAGAAGCCGCATCACTGT	ATGATGATGTAGCGTGCCAA	223	(AG) ₁₅
P30	TTCCTCTTCTCCATCTCCTC	GCAGTTGAGCTTGGTGATGA	278	(TC) ₂₁
P31	TCTATGTTTCTCTCTAACTGTGCATT	AGCGGCCTAATTAGCTGTTG	162	(TC) ₂₀
P32	CCCAATGGATTCTCCACATT	CTCGGAAGAAGTAACGTGCG	165	(TC) ₁₅
P33	GTTGCTTGCCTGTTTCCTCTC	GCAAGATTCTGTCAACGGT	206	(TC) ₁₅
P34	GTACGGAGGTCGGTTGTTGT	GAAACTCTCTGAACCGTCCG	214	(CT) ₂₁
P35	TGAAAGAATCATTTTTATCTGCAT	ACTCTTCTGTGCAGGCCATT	173	(TC) ₂₄
P36	AAACCCTTCAATGCATCCAG	GTCCGGTTTCCATCTCACTG	165	(TC) ₁₅
P37	ACGTGTAAATGCCTCCCAAA	CGAGGAAAATAGGCGACAAA	229	(GA) ₂₂
P38	CGAAGAAGCTCTTTCATCCG	TGTTTTGACGCCTTCTTCCT	277	(TC) ₁₇
P39	CCGAACACGATTGCTTCTTT	GAAGAGCTTCCGTCTGCATC	277	(CT) ₁₉
P40	CCTCTCTTCTGCTGAGCGAC	CCTTCGCTGCTCTCCAAATA	239	(AG) ₁₉
P41	GTGGAAACTACCTCAGCCCA	CATGTCAACCTTCCCGTTTT	280	(TC) ₂₃
P42	TGGTGACTTTGTGACTTGGG	TTAACCCGCAACCTTTAAGC	229	(GA) ₁₅
P43	TTGCTCAACCTCTTACCTTTCA	GGTGCATGTGCCTTATTTGA	157	(GA) ₂₃
P44	TGCCCTTGGCACAAATATCA	GCACCACAGAAAGGTATCCAA	279	(AT) ₁₅
P45	AAATTTGACAAGTCACCATCACA	TGATAGGGAAGCAGCTCATGT	280	(GA) ₁₈
P46	TGCCCTACTCCATTCTCTC	TGCGTTCAAGTGCTAAGACG	150	(CT) ₂₂
P47	TTCCAACCCCATAGAGCATC	TGCTCTGTTGAGGACAATGG	182	(AG) ₂₀
P48	CGAGGTCGGGTTGAAGACTA	GCAGATACCGAAAACGAAGC	121	(GA) ₁₇
P49	TAAGCCAGCCTTGACGCTAT	AGCGCCTCCCATCTATTTTT	209	(TC) ₃₄

P50	CAAGTCAACTCAGACGGGGT	TTTATTTAGGGAAGAAGGCCG	260	(AG) ₂₆
P51	CTGGGAGAAAGAAGACGGTG	CAACCAAATCTCCTAACAAGAAA	174	(CT) ₁₆
P52	TCTCTCTTCCCTTCCCCCTC	GAGCTTCTCCCTTCGGCTAT	203	(AG) ₂₃
P53	TCAGCGGCTAAGTTTTCCAC	TATCTCGTGGATCTCGTCCC	225	(AG) ₁₆
P54	CTGCTCGAGATTGTGTCCAA	TGCCAGACAGAAGCAATGAC	256	(CT) ₁₅
P55	TTTTCTTTTCCATGGCTTCA	ATTCCTAGAGGGATGCGGTT	129	(CT) ₂₄
P56	GGAATAGAAGAACTGCAGAATAAAA	CAGGAGTGGGAGCACTGATT	248	(AG) ₂₁
P57	CACACAAAGCATCCAACCAC	AGCGCTCTTTATGTTGTGGC	177	(CA) ₁₅
P58	CAGTCTACCCAAGGACCCAA	TCATCCAGGTATCTCCAGCC	219	(AG) ₃₁
P59	CCTTCTCTATGCTGGATCGC	TTCAACGGCTGTCAGAAGTG	256	(CT) ₂₀
P60	CCACCAACTTCTCTCGCTCT	GGTTCATGGTTCATATGGC	162	(CT) ₁₉
P61	CCCTGACCTGAGCGAACTTA	CCCTCTCTTTCTCACCCTTTC	241	(CA) ₁₅
P62	CCCTTTGCTTCAAAATTCCA	CTTGCACTGGGATGAAGGTT	205	(CT) ₁₉
P63	ACTGGGTTCCAGATGCTGAC	ACAGTCCTCCAACAGACCGA	223	(TC) ₂₁
P64	ACCTCTCTGCGTCAAAATGG	GCAACGGAGCAGCTAGAGAT	177	(AG) ₃₀
P65	ATGTGATTGAGAAGGGCTCG	GCCCTAAGAATCTTCCGAGA	217	(CT) ₂₅
P66	CTGGATTCATGATTTTGGGG	GCACAGAACCAGCAGTTGAA	273	(TCT) ₁₀
P67	GAGAAGACTGCACCCGAAAG	TCGTCTCATCTCTTCTCAATTCTC	216	(GAG) ₁₀
P68	GAAAAGAAACCCCTCCGGTA	CATTTTGCAATGGTTTCGTG	268	(TAA) ₁₁
P69	AAAATGGACTTGCACCCTTG	AGTACAGAAAGCAGGAGCGG	233	(TGC) ₁₀
P70	AACGCCGATCTTATGCTGTT	ACACCTCCGGAGAGTAGGAA	178	(TTA) ₁₃
P71	GGCTATTTGGAATGCAGAA	AGTTTTCACCTCATGGCTGG	226	(CTT) ₁₀
P72	TAAAGCAGCGGCTAATTCGT	TCGCAGCACCTAATTCATTG	268	(GAA) ₁₁
P73	GGAACAGTTACTTGCCAGCC	GAAAACTCTTGTCCAACTTTATTTC	184	(TTA) ₁₀
P74	ATGGAGCAGATCCACCAAAG	GACTCTCTAGGAGCACCCCC	157	(AGG) ₁₁
P75	ATCTCTACGCAAATGCCGTC	AAGAAGTGGCGTGGCTAGAA	251	(TCC) ₁₁
P76	GAAGGGGGATGAACTGGAAT	CAAAGAGAGGACGTACGCAA	224	(CGG) ₁₀
P77	ACCACCGTGATCCAACCTCTC	GAGCCGCAGACAAATTTTCAT	265	(GCC) ₁₁
P78	TCACCTGTCAGTCGCTTACG	TTCCCGACCCAATATCTCTG	229	(TCT) ₁₃
P79	TGTTGCCTCATGTGACGATT	GCCAGCAGACCCTATACCAA	165	(TCT) ₁₂
P80	AGCGATGGATCCACTAATCG	AGTGGTAGAGGACGCCAGAA	163	(AGG) ₁₁
P81	TCACACCAGCACCATTTGTT	GCAGGGAGTCAGAGCAATTC	277	(ATC) ₁₀
P82	ACAGCCATATATGCAAGCCC	GAAAACTCTTGTCCAACTTTATTTC	258	(TAT) ₁₀
P83	AGCACCATCCACCTCAAGTC	AAGAGGTGTACCATTTGCGG	231	(CCA) ₁₂
P84	TGAATTTCTTGAGTGCTCATCC	AGCAAAGGGTGAATCTGCAT	258	(TCA) ₁₀
P85	TTGCTATAATTATCCCCGCTGA	CGAAATGCAGTTCTCAATGG	136	(CAA) ₁₉
P86	AAAGCTCATATTTATGCTCTAAATCAA	ATGAGCAGCAGGACCTCACT	150	(AAT) ₁₀
P87	GAATCTTTCGCGGCTATTTG	ATCGGAGGAGCACAAAAATG	169	(GGA) ₁₀
P88	AAAGGATGTTGGAGCCCTTT	TAGCTGACCACAGTTAGCGG	272	(CAA) ₁₅
P89	TGGAAAAGGCATCATCATCA	CAACAAGACGCAATGGAGAA	180	(ACA) ₁₀
P90	AAACTTCCCACGAACACAGG	GTGGCAAAGGGAAGTGAAAA	245	(AAG) ₁₀
P91	CTCGTCTTCTCCTCCGTTG	CGCTTCGATGGATTGTTAT	200	(TCT) ₁₄
P92	GGTTCTTCGCAAGCAACTTC	CTATAGGTCGGAGGTGGCAA	251	(CCACCT) ₇

P93	CTCTCATGGGAGGAACCAAA	GAGAGGTGTCTTGAGCCGAC	176	(CAACCA) ₅
P94	AAGGTGTTGCACATGGATGA	ACTTGGAGCTCACTCCCCTT	275	(CCACAT) ₅
P95	TCATGAAAATTGCTCTGGCA	GGTGATCATGTTCTTGAGGG	263	(CATCAC) ₅
P96	CCTCTCCCTCTCCAACCTCT	AAGCACGATTCCATTCTTGG	210	(CACCTC) ₅
P97	ACATCCTTCAATCGAAACCG	GAAGCCTCGGAAAGCAACTA	212	(GGGGAA) ₅
P98	CCCAAATTACACAACAAGCG	ATGCCACAGATTTGAAAGGC	218	(TAAAA) ₆
P99	ATCAAGTGATTGCGGGAAAC	TCAAGTCCACCTTCGAAACA	197	(AGAGGA) ₅
P100	CTTTCGTCCTCGACAAGAGG	TTCTGCCCTCGTCTGGTAGT	170	(CCCTAA) ₅

附表 2 99 份风兰种质资源的 SSR 指纹编号
Supplementary Table 2 SSR fingerprinting of 99 *Neofinetia falcata* germplasm resources

品种编号 Germplasm No.	SSR 指纹图谱 SSR fingerprinting
1	A232~235B177C175~185D269E99~115F259~261G171H217~220I127J179~183K155~175L325~332M192N260O199P236Q218R216S195T154~160
2	A235~237B201~203C181D269E145F259~267G169~175H220I147J185~193K163~171L325M196N260O199~207P230~236Q224R204~216S195T166
3	A237~248B181~193C175~181D269E145F259~267G167H220I145~152J185K171L325M198N260~268O199~207P236Q224~255R204~216S189T166~172
4	A241B193~197C185D286E145F259G169H220I152~170J169~191K167~171L323M200N274~278O199~207P233~236Q232R210~216S195T166~172~1
5	A241B193~197C185D286E145F259G169H220I152~170J169~191K167~171L323M200N274~278O199~207P233~236Q232~243R210~216S195T166~172
6	A241B193~197C185D286E145F259G169H220I152~170J169~191K167~171L323M200N274~278O199~207P233~236Q232R204~210S195T166~172~2
7	A241B193~197C185D286E145F259G169H220I152~170J169~191K167~171L323M200N274~278O199~207P233~236Q232R204~210S195T166~172~3
8	A237~248B181~193C175~181D269E145F259~267G167H220I145~152J185K171L325M198N260~268O199~207P236Q224R216S189T166~172~1
9	A237~248B181~193C175~181D269E145F259~267G167H220I145~152J185K171L325M198N260~268O199~207P236Q224R216S189T166~172~2
10	A235B193C175~185D286E141~145F259G167H220I154J193K173L323M200N264~272O199~207P233Q224R216S189T166
11	A235B193C185D269E139~145F259G167H220I160J185K163~171L325M192N264~270O207P230Q224R216S183T154~166
12	A224~235B193C175~185D269~271E145F261G167H220~224I127~150J169~179K155~175L323M194N256~260O199~207P233~236Q224R216S183~195T160
13	A235B193C181D269E145F259G167H220I164J179K173L327M196~233N260O199P233~236Q224R204S189T154~172
14	A237B193~201C175D269E139F259G167~175H217I150~152J185K171L334M198N260~266O207P230~236Q224R216S195T166
15	A246B193~201C185D288E145F267G169H220I156J169K167L325M200N264O207P236Q218~224R204~216S189T172
16	A237B193C181~185D288E139~145F249~259G169H220I145~176J189K163~171L332~334M190~214N268~272O199~207P230~236Q218~232R216S189T166~1
17	A235~250B181~193C181D269E139F259G169H220I152J177~185K163L325M233~258N254~268O199P230~236Q224R204~216S195T172
18	A237B193C185D271E139F267G175H220I166~172J191K163~171L323M220N260O199P236Q224R204S195T166~172
19	A235~237B193C181D288E145F259G167H220I145~156J185~189K163L327M212~227N260~272O199P236Q224~232R216S189T166~172
20	A235B193C175D288E141~145F259~267G171H220I150~154J185K163~167L327M206N286O207P236Q224R216S189T166~172
21	A219~232B193~197C175~185D269E99~115F259~261G169H220I127J167~169K155~167L329M194~216N244~256O199~207P236Q206~224R216S195~207T154~160
22	A226~250B181~201C175~181D286E145F259~261G167~175H217~220I154J175~193K163~171L325M206~231N260~290O199~207P236Q224~237R216S195T166
23	A239B193C181~185D288E139F259G169H220I152J193K171L325M227N252~270O199P230~236Q224~232R204S189T166
24	A232~246B193C185D286E145F259G157~169H217~220I170J193K163L334M210N246~270O199P230~236Q224R216S189T154~172
25	A241B181~193C175~181D288E125~141F259G169~175H220I147J175~189K171L325M194N260~280O199P236Q224~232R216S195T166
26	A230~232B177~193C175~181D286E139~145F249~259G167~171H215~220I154~164J177~185K163~167L325~329M196~229N238~260O199~207P230~233Q224~232R216S183~195T166~172
27	A232B193~197C175D269E139F261~267G169H220~222I127~150J179~183K163L329M204~238N254~260O199~207P236Q224R204~216S195
28	A232B193~197C175~187D258~269E139F261G169H220I133J173~179K167L329M192~196N256~260O199~207P236Q206~224R204~216S195T160
29	A235B177C181D286E141F259~267G167H220I172J185K171L329M202~240N268O207P233Q224~232R216S189T154
30	A219~237B193C181D288E139F259G171H217~220I154J179~185K163L334~336M196N264~268O199P233Q237R204S195T166

31	A232~246B193C187D286E125F267G167~171H220~222I156J165K155~171L325M196N260~270O199P217Q224~232R216S195T160
32	A230~237B193~201C181~185D269E139~145F249~259G167~171H215I154~164J177~189K163~171L325~336M229N260~264O199P230Q224~232R216S189~195T166
33	A232B193C175~187D269E139F263G157~167H220~222I133J165~183K163~167L325~329M202N254~258O207P230~236Q218~224R204~216S195T160
34	A230~232B193~201C175~185D269E139~145F259~269G167H215I145~164J177~189K163~173L325M218~229N262~274O199P230~236Q224R216S189T166
35	A232B193~201C185D269E139~145F249~259G167~171H220I145~164J177K163L325M202N262~274O199P236Q232R216S189T166
36	A235B193C181D269E125F259G169H220I145~168J189K163~171L336M202N262O199P236Q224R204~216S189T166
37	A232B201C185D269E139F267G167H217I156J193K163~171L336M204N256~272O199P217~236Q232R204S195T154
38	A230B193C185D286E139F259~267G169H220I145J187K163~167L323M206N260O207P233Q212R210~216S195T166
39	A235~246B193C175D269E145F259G167~171H220I152~184J177~193K171L332M200N270O199~207P230Q218~232R216S189T172
40	A237B177C181D286E139~145F259G167H220I145~172J189K171L325M200N262~280O207P236Q224R216S195T172
41	A235~243B193C175~185D286E145F267G169H217~220I158~166J185K163L325M218N268O199P236Q224R216S189T172
42	A232~235B197C175D269E139F249~259G157~169H220~222I123J177~185K155~175L325M204~240N246~258O199P236Q206~224R216S183~195T160~166
43	A235~246B201C175~181D269E139~145F249~267G169H220I152~156J191K163~167L325M204N266O207P230~236Q218R216S189T172
44	A232~248B201C181~185D286E139F269G157H220I166~174J187K171L334M227N260~264O199P236Q232R216S189T166
45	A232~235B193C185D286E139F259G175H215~220I152J187K171L325M240N270~286O199P236Q224R229S195T154~166
46	A232B193C185D286E139F259G175H215~220I152~166J187K171L325M240N270~286O199P236Q224R216S195T154
47	A232B193C175~181D269E145F249~259G159~169H220I152J179~193K163~167L323~325M192~200N256~268O199~207P230~236Q206~224R216S189T154~166
48	A232~243B201C185D288E139F249~267G167H220I150J185K163L325M198N264O199P233~236Q218R204~216S189T166~172
49	A235~239B201C175~185D269E141~145F259~267G171H217~220I143~152J187K163L325M200N256~264O199P230~236Q218R216S195T166~172
50	A235~241B193C185D269E139F259~267G169H220I145J193K171L336M200N284O207P236Q218R216S195T166
51	A232~239B193C175~185D286E139F259G157~169H220I164J167K171L325M244N260~268O199P233~236Q224R204~216S195T166
52	A237B193C175~185D269E145F259G175H220I168J189K167~171L323M196N268O207P230Q232R204S195T166
53	A232~235B177~193C175D269E139F261~269G167H220~224I127J175K163L329M194~202N256O207P236Q218~224R216~223S183T160
54	A235B193C185D269E139~145F267G167H215I154J185K171L334~338M190N274O199P233Q224R216S189T166
55	A235B193C185D269E139~145F259G167H220I160~168J185K163~171L325M192N264~270O199~207P230~233Q224R216S183T154~166
56	A237~252B193C185D269E139~145F259G167H220I168~172J189K171L332~334M204N254~264O199P230~233Q224R216S195T172
57	A232B193C185D269E141F259G167H220I164J185K163L332M200N252O199P230Q224R216S189~197T154~166
58	A237~246B181~193C181~185D269E143F267G163H217~220I147J169~177K163~175L325M216N254O199P236Q224R204~216S189~195T166
59	A232~237B177~201C175~187D269E139F249~259G167H217~220I150J173~185K167~173L325M198N238~260O199~207P230~236Q218~224R216S183~195T154~166
60	A232~246B193~201C185D269E139~145F259~267G169H220I152~174J185K171L325M200N256~260O199~207P230~236Q224~255R216S195T166~172
61	A232~237B191~193C183~185D250~271E141F259~261G169H220~222I168J165~175K155~171L321~325M210N254~256O199P217~230Q218~224R204~216S183~195T160~166
62	A232B193C175D269~271E125~139F249~259G167H222~224I127~158J167~179K167~175L329M192~202N256O199~207P236Q206~224R216S183~213T147~154
63	A235~246B193C181D288E141F259G171H220I154J189K163~167L323M198N256~264O207P233~236Q232R216S183~195T166
64	A232B193~197C183~185D269E139~145F259G169~177H220I158J179~185K167L325M190N270O199P230Q232R204S189T160~172
65	A241B193C185D288E139~145F259G167H217I147~158J185K163~171L325M202N268O199P230Q232R204~216S189T166~172
66	A237B193~201C181~185D269E139~145F249~259G157~167H215~220I154~164J177~185K163~167L325~336M229N260~264O199P230Q224R216S195T166
67	A232B193~197C185D288E139F267G169~175H220I170J185K163L325~327M202N260O199P233Q224~232R216S183T172
68	A235B175~201C185D286E145F246~267G167H220I154J165~169K167L325M204N288O207P228~236Q224R204~216S189T166~172
69	A232B193C181~185D269E139~145F259G169~175H217I152J185K171L336M208N304O199P233Q224~263R216S195T166
70	A235B193C185D288E145F259G175H217I174J193~197K171L323~336M192~204N272~286O199P230Q224R216S189T154~166
71	A235~246B193C185D269E145F259G171H220I152J169K163~167L325M204N290O207P236Q218~224R204S189T166
72	A232~246B193C181~185D269E141~145F249~259G167H220I166J187K163L334M200N266O199P236Q218R216S195T166
73	A246B193C185D269E145F259~267G171H220I152~156J169K167L325M200N266O207P236Q218~224R204~216S189T166~172

74	A246B193C181D269E145F259G167H217~220I152J185K171L332~334M198~210N256~262O199P233~236Q224R204~216S195T172
75	A232~235B177~193C175D269~271E99~115F263G169H220I127J165~179K163~175L329M204N238~246O207P236Q206~224R216S195T154~160
76	A237B193C181D269E145F259G167H220I160J185K163L323M198N274O199P236Q224R216S189T166
77	A235B193C181D288E141F259G167H220I154~170J189K163L323M242N260O199P230Q232R216S183T166
78	A235B181~193C185D286E145F259G169H220I156~170J169~189K163~167L325~334M196~204N272~290O199P230~236Q218R204S195T166~172
79	A235~246B193C175D269E145F259G169H220I152J185K163L332M238N250O199P233Q224R204~216S189T166
80	A235B193C181D269E139F267G175H220I170J189K163L327M200N264~294O207P236Q224R216S195T166
81	A230~237B193~201C175~181D286E145F249~269G167~175H215~220I145~164J177~185K163~171L325~334M231N238~260O199P230~233Q218~224R216S189~195T166
82	A232~246B181~193C185D288E139F259~267G169H220I168~172J189~193K171L323~332M248N270~276O207P230~236Q224~232R216S189T166
83	A232~235B193C181D288E145F249G171~175H220I154~172J191K167~171L325~334M214N260~264O199P236Q224R216S195T166~172
84	A232~246B193C181~185D269E125~139F259G167H220I147~154J177~185K175L323~325M200N268O199~207P230~236Q218~224R204~210S189T172
85	A237B193C181~185D288E139~145F249~259G169H220I145~176J189K171L332~334M190~214N268~272O199~207P230~236Q218~232R216S189T166
86	A235~237B193C181D286~288E139~145F259G167H220I156J185~191K163L327M227N260~266O199P236Q224R216S195T172
87	A232~235B191~193C175~185D286E99~115F259~263G167H217~222I170J165~173K163~175L321~323M210N244~270O207~219P230~236Q224R216S195T160~172
88	A230~246B193C181D286E145F259G169~175H220I154J185K163L325M198N272O199P236Q212~218R204~210S183T166
89	A232B193~197C175D286E139F259~265G167H220I133J165~183K163~167L325~334M196N256~268O199~219P230~233Q218~224R216S183~195T154~166
90	A230~232B193C181D269E145F259G167H215~220I164J199K163L332M202~206N264O199P230Q224R216S189T166
91	A237~246B193~201C181D286E139F259G173H220I152J181K171L323M192~200N264O199P230~236Q232~237R216S195T166~172
92	A237B193C181~185D288E139~145F249~259G169H220I145~176J189K163~171L332~334M190~214N268~272O199~207P230~236Q218~232R216S189T166~2
93	A237~246B193~201C185D288E145F249G167H220I154J169~187K163~167L325M204N264~290O199P236Q224~232R216S189T166
94	A235B193C185D269E139F259G171H220I154J185K167L332M229N250O207P236Q218R216S195T172
95	A232~250B193C175D269E139~145F259G157H217~220I145~154J187~193K171L325M200N260~268O199P230Q232R204S183T166
96	A235~246B177~191C187D269E115~129F267G169H220I158J169~191K163L325~334M204N244~260O199~207P236Q206~224R216S183T160
97	A235B193C185D269E145F267G169H220I152J189~193K163~171L325M200N272O207P230~236Q224R216S189T166
98	A232~235B193C185D286E139F259G175H215I152~166J187K171L325M204N270~286O199P236Q224R216S195T154~166
99	A217B175~189C195~203D269E154~161F257~276G167~171H243I125~154J173K199L308~332M200~210N232~256O223P213~226Q206~212R204~210S195T160~172
