

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00627

# 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析

吴振兴<sup>1</sup>, 王慧中<sup>1</sup>, 施农农<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2</sup>

1. 杭州师范大学生物化学与分子生物学杭州市重点实验室, 杭州 310018;

2. 浙江工商大学食品、生物与环境工程学院, 杭州 310018

**摘要:** 将简单重复序列区间扩增多态标记(inter-simple sequence repeats, ISSR)技术应用于 16 种兰属的遗传多样性分析, 15 个引物共扩增出 836 条带, 其中有 227 条多态带, 多态百分比为 27.2%。UPGMA 聚类结果显示: 春兰与春剑的亲缘关系最近, 而兔耳兰与其他 15 种兰属植物的距离最远。ISSR 聚类结果与传统分类结果基本相似, 表明该技术能在分子水平上对传统兰属分类进行必要补充。

**关键词:** 兰属植物; 遗传多样性; ISSR

## The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR

WU Zhen-Xing<sup>1</sup>, WANG Hui-Zhong<sup>1</sup>, SHI Nong-Nong<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, China;

2. College of Food, Biological and Environmental Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China

**Abstract:** ISSR was applied to detect the relationship between 16 *Cymbidium* species, and 836 bands were amplified with 15 primers, including 227 polymorphic bands. The polymorphic percentage is 27.2%. UPGMA results showed that the genetic distance were closest between *C. goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f. and *C. goeringii* var. *longibracteatum*, and *C. lancifolium* Hook. was far away from the other 15 species. This result is quite similar to the traditional classification, indicating that the technique could supplement some information to traditional taxonomy in the molecular level.

**Keywords:** *Cymbidium*; polymorphism; ISSR

兰属是兰科兰族的萼足兰亚族的一个属, 全世界约有兰属植物 70 种<sup>[1]</sup>, 主要分布于亚洲热带与亚热带地区, 向南到澳大利亚北部。根据 Du Puy 和 Cribb 分类系统, 我国有 49 种兰属植物和一些变种, 产于秦岭以南各省<sup>[2]</sup>。我国兰花的市场交易额巨大, 这是由于兰属植物不仅具有观赏价值, 还具有重要的药用价值<sup>[3]</sup>。

兰属植物在自然界中存在杂交, 也有人通过属间杂交培育出优良品种, 因此该属的分类较为混乱<sup>[4]</sup>。兰属的系统分类以形态学为标准, 而近几年, 利用分子标记技术对该属植物进行遗传多样性研究也有了相关报道。文李等<sup>[5]</sup>应用 RAPD 技术分析兰属植物的 5 个种 2 个变种的 13 个品种的亲缘关系, 结果与传统的形态分类有出入; 王慧中等<sup>[6]</sup>用

收稿日期: 2007-10-10; 修回日期: 2008-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30670199、30770185)、浙江省自然科学基金(编号: X305692、301406)、浙江省科技计划项目(编号: 2006C32016)、杭州市科技计划项目(编号: 2005132H06)和浙江省“151”人才基金项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670199, 30770185), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. X305692, 301406), the Zhejiang Scientific and Technological Program (No. 2006C32016), the Hangzhou Scientific and Technological Program (No. 2005132H06) and the Science Foundation for ‘151’ Talents of Zhejiang Province]

作者简介: 吴振兴(1982-), 男, 浙江人, 硕士研究生, 专业方向: 植物分子遗传学。E-mail: wuzhenxing007@126.com

通讯作者: 王慧中(1962-), 男, 浙江人, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 兰属与石斛属分子生物学研究。E-mail: whz-2005@163.com

RAPD 和 AFLP 技术对兰属 14 种植物进行遗传多样性分析,发现两种标记技术所得数据有差异,但结果基本相似,并与 Du Puy 和 Cribb 分类系统基本一致。

1994 年, Zietkiewicz 等<sup>[7]</sup>建立了 ISSR(inter-simple sequence repeats, 简单重复序列区间扩增多态性)标记技术。该技术稳定性好,多态性高,实验操作简便且快速,还可以揭示基因组水平的某些特征,且呈孟德尔式遗传,因此该技术一经问世就被广泛用于植物分子水平上的研究。Raina 等<sup>[8]</sup>将构建的 ISSR 指纹图谱应用于 *Arachis hypogaea* 的遗传多样性分析、品种鉴定和系统发生关系的研究; Sca-rano 等<sup>[9]</sup>用 ISSR 方法鉴别柑橘体细胞杂合体; Huang 等<sup>[10]</sup>用该技术分析了番薯属的亲缘关系,获得了丰富的多态性条带;李海生等<sup>[11]</sup>使用 ISSR 标记技术对海南海桑进行了遗传多样性分析。Joshi 等<sup>[12]</sup>用该法对 *Swertia chirayita* 微繁殖幼苗的遗传的保守性进行了分析。

本实验采用 ISSR 标记技术对所掌握的 16 种兰属材料进行亲缘关系的分析,希望通过该标记方法研究出兰属植物分类及系统发育的可行性,为兰属植物资源的开发及新种的选育提供分子水平的参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

本实验研究对象为兰属 16 个种(表 1),主要采自杭州花圃和余杭大观山。

表 1 供试的 16 种兰属材料名称

Table 1 Sixteen species of *Cymbidium* tested in experiment

编号 No.	材料名称 Species
1	多花兰 <i>C.floribundum</i> Lindl.
2	文山红柱兰 <i>C.wenshanense</i> Y.S.Wu ex F.Y.Liu
3	夏凤兰 <i>C.aestivum</i> Z.J.Liu et S.C.Chen
4	墨兰 <i>C.sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd.
5	黄蝉兰 <i>C.iridioides</i> D.Don
6	虎头兰 <i>C.hookerianum</i> Rchb.f.
7	蕙兰 <i>C.faberi</i> Rolfe
8	台兰 <i>C.fioribundum</i> var. <i>pumilum</i>
9	兔耳兰 <i>C.lancifolium</i> Hook.
10	寒兰 <i>C.kanran</i> Makino
11	莲瓣兰 <i>C.tortosepalum</i> Fukuyama
12	春兰 <i>C.goeringii</i> (Rchb.f.) Rchb.f.
13	春剑 <i>C.goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>
14	建兰 <i>C.ensifolium</i> (L.) Sw.
15	莎叶兰 <i>C.cyperifolium</i> Wall.ex Lindl.
16	象牙白 <i>C.maguanense</i> F.Y.Liu

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA 提取与定量

按彭锐等<sup>[13]</sup>的方法进行改进并用于基因组 DNA 的提取。

先剪取保存于-74℃中的兰属植物叶片 2.0~2.5 g;立即用液氮研磨至细末,加入 5 mL 预热 CTAB,同时加入 10 μL β-巯基乙醇,65℃预热 1 h;冷却后,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1),颠倒混匀 50 次,放置冰上 20 min;10 000 r/min 4℃离心 10 min;取上清,加入 0.5 倍体积 NaCl,2 倍体积无水乙醇,碎冰上放置 20 min;用玻璃钩捞出絮状沉淀,转入干净的 Eppendorf 管中,用 70%乙醇洗涤 3 次,吸去乙醇;自然干燥,500 μL TE 溶解;加入等体积(500 μL)氯仿/异戊醇(24:1),颠倒混匀 50 次,放置冰上 20 min;10 000 r/min 4℃离心 10 min;取上清,加入 0.5 倍体积 NaCl,2 倍体积无水乙醇,碎冰上放置 20 min;8 000 r/min 4℃离心 10 min,弃上清,70%乙醇洗涤 3 次,吸去乙醇;自然干燥,200 μL TE 溶解。

用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的降解情况,并用 UV-2401PC(岛津)紫外分光光度计检测 DNA 浓度( $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  的值)并定量。将所有的 DNA 分别稀释到 100 ng/μL,作为 PCR 模板,母液于-20℃保存待用。

#### 1.2.2 ISSR 引物的筛选

参考高丽等<sup>[14]</sup>、沈颖等<sup>[15]</sup>、Shen 等<sup>[16]</sup>所使用的 ISSR 引物,共筛选了 50 条引物,从中筛选出 15 条能对兰属材料进行扩增并获得清晰条带的引物(表 2)。

表 2 ISSR 引物序列

Table 2 ISSR primer sequence

编号 No.	引物序列 Primer sequences
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T
UBC811	(GA) <sub>8</sub> C
UBC812	(GA) <sub>8</sub> A
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A
UBC818	(CA) <sub>8</sub> G
UBC820	(GT) <sub>8</sub> C
UBC825	(AC) <sub>8</sub> T
UBC827	(AC) <sub>8</sub> G
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT
UBC862	(AGC) <sub>6</sub>
UBC864	(ATG) <sub>6</sub>
UBC866	(CTC) <sub>6</sub>
UBC868	(GAA) <sub>6</sub>

\*Y=(C, T)

### 1.2.3 ISSR-PCR 分析

PCR 单管总体系: 5  $\mu\text{L}$  重蒸水, 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR 缓冲液, 1  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L), 0.8  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mmol/L), 1  $\mu\text{L}$  微卫星间隔引物 (5  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$  *Taq* 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 总计 10  $\mu\text{L}$ 。

ISSR-PCR 程序参照沈颖<sup>[15]</sup>的方法, 建立了适于兰属材料分析的程序, 其参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 7 min, 45 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min), 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.4 产物的电泳检测以及成像分析

PCR 扩增产物中加入 5  $\mu\text{L}$  上样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 40% 蔗糖水溶液), 用 1.5% 琼脂糖进行电泳。电泳条件为 100 V (4~5 V/cm)。检测结果在凝胶成像系统 (BIO-RAD) 上拍照观察记录。

### 1.3 数据的统计分析

ISSR 产生一系列谱带, 因此属多位点非特异性标记。电泳图谱中的条带根据迁移率携带, 有条带的用“1”记录, 没有条带的用“0”记录。总共分析 15 条引物的扩增结果。通过 NTSYS-pc 软件的 UPMGA 法, 计算出兰属各个物种间的相似性系数, 绘出聚类图。

## 2 结果与分析

15 个 ISSR 引物共扩增到 836 条带, 其中多态性条带有 227 条, 多态性比例为 27.2%。扩增产物长度介于 200~2 000 bp 之间。其中 UBC807、UBC868 的电泳结果见图 1、图 2, 各物种间的遗传相似性系数见表 3, 数据分析聚类图见图 3。

本研究统计所使用的引物中 (表 3), 扩增所得到

的条带总数从 15~81 不等, 其中多态条带数最多的是 UBC811, 共获得 26 条, 最少的为 UBC827, 仅有 1 条。而多态百分比最高的是 UBC840, 达到 38%, 最少的为 UBC827, 仅为 7%。

表 4 中的遗传相似系数与图 3 聚类结果表明, 16 种兰属植物可以分成 3 个部分, 其中多花兰、台兰、夏凤兰、文山红柱兰、黄蝉兰、虎头兰等聚成第 I 类, 此类中多花兰与台兰的亲缘关系最近, 在 0.76 处相聚, 而黄蝉兰与虎头兰次之, 在 0.71 处相聚;

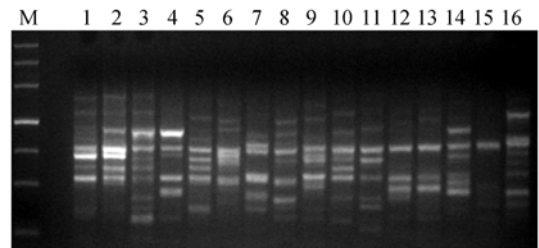


图 1 引物 UBC807 的扩增结果

1~16: 16 个兰属种; M: Marker III。

Fig. 1 ISSR profiles generated by primer UBC807

1~16: 16 species; M: Marker III.

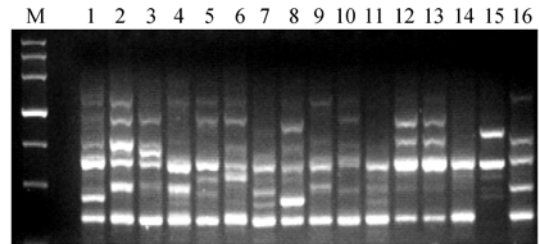


图 2 引物 UBC868 的扩增结果

1~16: 16 个兰属种; M: Marker III。

Fig. 2 ISSR profiles generated by primer UBC868

1~16: 16 species; M: Marker III.

表 3 ISSR 标记条带数统计

Table 3 Numbers of ISSR bands

引物名称 Primer name	条带总数 Total bands	多态条带 Polymorphic bands	多态百分比 Polymorphic percentage (%)	引物名称 Primer name	条带总数 Total bands	多态条带 Polymorphic bands	多态百分比 Polymorphic percentage (%)
UBC807	75	19	25	UBC834	40	10	25
UBC811	81	26	32	UBC835	50	15	30
UBC812	63	14	22	UBC840	56	21	38
UBC817	64	19	30	UBC862	54	15	28
UBC818	33	12	36	UBC864	53	14	26
UBC820	71	16	23	UBC866	64	16	25
UBC825	62	17	27	UBC868	55	12	22
UBC827	15	1	7				

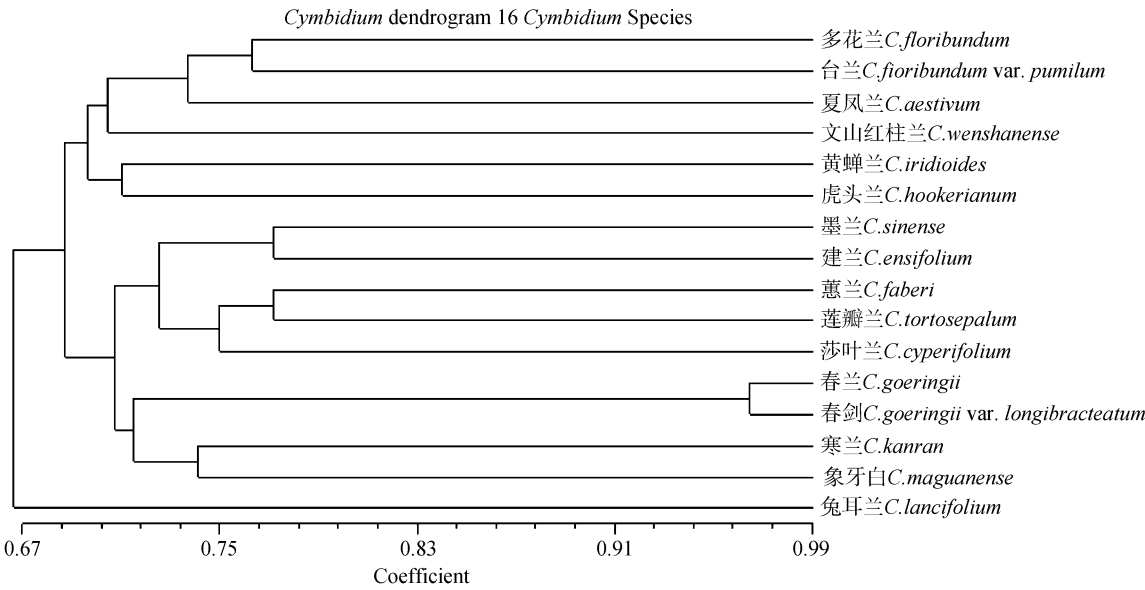


图 3 根据 ISSR 标记计算的遗传相似系数获得的聚类图  
Fig. 3 Dendrograms generated from genetic similarity between species on the basis of ISSR markers

表 4 根据 ISSR 标记计算的各种间遗传相似系数  
Table 4 Genetic similarity between species on the basis of ISSR markers

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.00															
2	0.74	1.00														
3	0.76	0.68	1.00													
4	0.69	0.64	0.65	1.00												
5	0.73	0.68	0.68	0.67	1.00											
6	0.71	0.70	0.64	0.61	0.71	1.00										
7	0.68	0.62	0.62	0.67	0.71	0.65	1.00									
8	0.76	0.70	0.71	0.68	0.72	0.72	0.70	1.00								
9	0.67	0.65	0.63	0.67	0.68	0.65	0.64	0.65	1.00							
10	0.76	0.71	0.70	0.64	0.72	0.68	0.66	0.72	0.66	1.00						
11	0.74	0.69	0.69	0.71	0.74	0.72	0.77	0.74	0.74	0.75	1.00					
12	0.72	0.63	0.67	0.67	0.68	0.68	0.70	0.68	0.64	0.69	0.74	1.00				
13	0.73	0.64	0.67	0.68	0.68	0.69	0.70	0.70	0.65	0.71	0.75	0.96	1.00			
14	0.71	0.64	0.65	0.77	0.70	0.65	0.74	0.73	0.69	0.71	0.76	0.70	0.71	1.00		
15	0.73	0.65	0.69	0.71	0.69	0.68	0.73	0.74	0.68	0.71	0.77	0.72	0.74	0.75	1.00	
16	0.71	0.68	0.68	0.67	0.70	0.64	0.70	0.71	0.71	0.74	0.76	0.72	0.73	0.76	0.71	1.00

墨兰、建兰、蕙兰、莲瓣兰、莎叶兰、春兰、春剑、寒兰、象牙白等则聚成第Ⅱ类，其中春兰与春剑的亲缘关系最近，均在 0.96 处相聚，而墨兰与建兰、蕙兰与莲瓣兰则同时在 0.77 处相聚，寒兰与象牙白则再次之，在 0.74 处相聚；而兔耳兰则远离这两大类，单独成为一支。

3 讨论

3.1 兰属植物的分类研究

在 Du Puy 和 Cribb 分类系统<sup>[17]</sup>中将象牙白划在腋花组，黄蝉兰、虎头兰、文山红柱兰分列在大花组，这两组同属于大花亚属；将建兰、墨兰分为建

兰组, 寒兰, 春兰、春剑分在春兰组, 兔耳兰列为兔耳兰组。

吴应祥<sup>[18]</sup>将德国兰学者 R.Schlechter 与 P.F.Hunt 两人所承认的 8 个兰属组合并成 6 个组。其中春兰、莲瓣兰、春剑、蕙兰、建兰、寒兰、墨兰、莎叶兰属于长苞组; 多花兰、台兰、冬凤兰则属于短苞组; 长柱组中有黄蝉兰、虎头兰、象牙白、文山红柱兰等物种; 兔耳兰隶属宽叶组。

本研究中的 16 种兰属植物在刘仲健等<sup>[19]</sup>分类中可归为 3 个亚属中的 8 个组。其中夏凤兰分在兰亚属的带叶组, 多花兰、台兰隶属于多花组, 其中台兰被认为是多花兰的一个变种; 黄蝉兰、虎头兰属于大花亚属大花组, 而象牙白、文山红柱兰分别属于该亚属的腋花组; 莎叶兰属于建兰亚属的地生腋花组, 而建兰、墨兰、寒兰、春兰、春剑均属于该亚属的建兰组, 蕙兰、莲瓣兰则分在无关节组, 兔耳兰则属于兔耳兰组。

文李等<sup>[5]</sup>利用 RAPD 技术分析后得到建兰与墨兰亲缘关系最近。王慧中等<sup>[6]</sup>利用 RAPD 和 AFLP 聚类结果显示, 寒兰与春兰、春剑聚为一类; 而黄蝉兰、虎头兰以及文山红柱兰较远。张明永等<sup>[20]</sup>研究表明, 兔耳兰偏离出兰属植物分类群, 成为最基部一支。

### 3.2 兰属与石斛属的 ISSR 研究进展

高丽等<sup>[14]</sup>采用 ISSR 分子标记技术对湖北省内的 11 个春兰野生居群共 325 个个体的遗传多样性水平及居群遗传结构进行了研究。11 个 ISSR 引物共检测到 127 个位点, 其中 112 个为多态位点, 占 88.19%。结果表明, 野生春兰各居群间产生遗传分化, 亟待保护。

沈颖等<sup>[15]</sup>采用 ISSR 法对石斛属 9 种植物进行鉴别, 10 条 ISSR 引物中有 7 条扩增出多态性条带, 多态位点从 7~14 个不等, 片段范围 220~1 260 bp, 其中 UBC807 与 UBC864 能将所有被测种区分开来。

沈洁等<sup>[21]</sup>通过筛选引物, 并检测影响铁皮石斛 ISSR 反应体系中各因子在不同浓度下的扩增效果。通过分析非特异性条带的产生原因并进行条件优化, 建立了铁皮石斛稳定且可靠的反应体系。

### 3.3 ISSR 对兰属物种的遗传多样性的研究

引物设计是 ISSR 标记技术的关键步骤<sup>[22]</sup>。ISSR 引物常常为 5' 端或 3' 端加锚(1~4 nt)的二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸的重复序列, 重复次数一般在 4~8 次之间。本研究所用引物都是 3' 端加锚的, 这

样的引物能够扩增出 SSR 之间的片段。由于 SSR 在植物整个基因组当中都有均匀分布, 因此常规的 PCR 方法, 就能获得多态性高且片段长度局限于一定范围内的条带。

实验结果显示, UBC807、UBC840 两种引物扩增条带就能将所有材料区分开; 其他引物中除春兰与春剑有极高的相似性外, 其余 14 个物种的 DNA 指纹图谱也不尽相同。从以上结果可以看出, 本研究筛选的 ISSR 引物对兰属植物的 DNA 指纹图谱构建具有有效性, 分子水平上的多态信息则便于对兰属 16 种植物进行遗传多样性分析。

ISSR 聚类分析显示, 多花兰、台兰、夏凤兰、文山红柱兰聚在一起, 除文山红柱兰外, 其他的与传统分类相似; 而黄蝉兰、虎头兰也聚在一起, 与传统分类相同; 象牙白归到第 II 类中, 这个与传统分类有出入。第 II 类中, 其余几个物种虽在一类, 但莎叶兰、寒兰等关系均与传统分类有差异。而兔耳兰则远离这两大类, 传统分类中它应该更靠近第 II 类。实验结果表明, ISSR 标记对兰属分类与刘仲健等<sup>[19]</sup>在形态上对兰属的分类大体相似, 而某些分组上则有出入。因此, 本实验对兰属在分子水平上的分类研究可提供必要补充。

总之, ISSR 标记技术对兰属的遗传多样性的评估和系统发育关系的分析具一定的有效性, 是一种适于兰属亲缘关系及遗传多样性分析的方法。该研究对兰属种质资源保护与新品种开发都有重要意义。

### 参考文献(References):

- [1] LIU Zhong-Jian, CHEN Xin-Qi, RU Zheng-Zhong, CHEN Li-Jun. Chinese *Cymbidium* Plants. Beijing: Science Press, 2006, 1-20.  
刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 陈利君. 中国兰属植物. 北京: 科学出版社, 2006: 1-20.
- [2] LI Yu-Ge, GUO Wei-Hong, WU Bo-Ji. Studies on karyotypes of four species of *Cymbidium* in China. *Acta Bot Boreal -Occident Sin*, 2002, 22(6): 1438-1444.  
李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥. 4 种国产兰属植物的核型比较研究. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1438-1444.
- [3] FEI Yong-Jun, GUO Yong-Bing, WU Guang-Yu, HUANG Fen-Xiao, LI Bo-Lan. Preliminary study on the ecological characters of population and community of two *Cymbidium* plants in Hubei, China. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2004, 23(2): 129-133.  
费永俊, 郭永兵, 吴广宇, 黄芬肖, 李波兰. 湖北两种



- 兰属植物种群及群落生态特征初步研究. 山地农业生物学报, 2004, 23(2): 129–133.
- [4] HUANG Jia-Ping, DAI Si-Lan. The numerical taxonomy of Chinese *Cymbidium*. *Journal of Beijing Forestry University*, 1998, 20(2): 38–43.  
黄家平, 戴思兰. 中国兰花品种数量分类初探. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 38–43.
- [5] WEN Li, YE Qing-Sheng, WANG Xiao-Jing, PAN Rui-Chi. Analysis of relationship among *Cymbidium* cultivars using RAPD. *Chin J Appl Environ Biol*, 2001, 7(1): 29–32.  
文李, 叶庆生, 王小菁, 潘瑞炽. 利用 RAPD 技术分析兰属品种间的亲缘关系. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 29–32.
- [6] WANG Hui-Zhong, WANG Yu-Dong, ZHOU Xiao-Yun, YING Qi-Cai, ZHENG Kang-Le. Analysis of genetic diversity of 14 species of *Cymbidium* based on RAPDs and AFLPs. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2004, 37(6): 482–486.  
王慧中, 王玉东, 周晓云, 应奇才, 郑康乐. 兰属 14 种植物遗传多样性 RAPD 及 AFLP 分析. 实验生物学报, 2004, 37(6): 482–486.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176–183. [\[DOI\]](#)
- [8] Raina SN, Rani V, Kojima T, Ogihara Y, Singh KP, Devarumath RM. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 2001, 44(5): 763–772. [\[DOI\]](#)
- [9] Scarano MT, Abbate L, Ferrante S. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep*, 2002, 20: 1162–1166. [\[DOI\]](#)
- [10] Huang JC, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea series Batatas*(Convolvaceae) as revealed by ISSR and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050–1060. [\[DOI\]](#)
- [11] LI Hai-Sheng, CHEN Gui-Zhu, SHI Su-Hua. Genetic diversity of *Sonneratia hainanensis* (Sonneratiaceae) detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, 43(2): 67–71.  
李海生, 陈桂珠, 施苏华. 海南海桑遗传多样性的 ISSR 研究. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(2): 67–71.
- [12] Joshi P, Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. *Biologia Plantarum*, 2007, 51 (1): 22–26. [\[DOI\]](#)
- [13] PENG Rui, SONG Hong-Yuan, LI Quan-Sen, WANG Yu. Extraction and characterization of total DNA from *Dendrobium*. *Journal of Chinese Materia Medica*, 2003, 28(12): 1129–1131.  
彭锐, 宋洪元, 李泉森, 王宇. 石斛总 DNA 的提取及鉴定. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1129–1131.
- [14] GAO Li, YANG Bo. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. *Biodiversity Science*, 2006, 14(3): 250–257.  
高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性, 2006, 14 (3): 250–257.
- [15] SHEN Ying, XU Cheng, WAN Xiao-Feng, ZHANG Ming. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, 36 (3): 423–427.  
沈颖, 徐程, 万小凤, 张铭. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用. 中草药, 2005, 36 (3): 423–427.
- [16] SHEN Jie, DING Xiao-Yu, LIU Dong-Yang, DING Ge, HE Jia, LI Xue-Xia, TANG Feng, CHU Bi-Bai. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(3): 420–422. [\[DOI\]](#)
- [17] Du Puy D, Cribb PJ. The genus *Cymbidium*. Poregon: Timber Press, 1998.
- [18] WU Ying-Xiang. Chinese *Cymbidium*. Beijing: Chinese Forestry Press, 1993.  
吴应祥. 中国兰花. 北京: 中国林业出版社, 1993.
- [19] LIU Zhong-Jian, CHEN Xin-Qi, RU Zheng-Zhong, CHEN Li-Jun. Chinese *Cymbidium* Plants. Beijing: Science Press, 2006, 24–26.  
刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 陈利君. 中国兰属植物. 北京: 科学出版社, 2006: 24–26.
- [20] ZHANG Ming-Yong, SUN Cai-Yun, HAO Gang, YE Xiu-Lin, LIANG Cheng-Ye, ZHU Guang-Hua. A preliminary analysis of phylogenetic relationships in *Cymbidium* (Orchidaceae) based on nrITS sequence data. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44 (5): 588–592.  
张明永, 孙彩云, 郝刚, 叶秀琳, 梁承邨, 朱光华. 基于 nrDNA ITS 序列数据的兰属系统发育关系的初步分析(英). 植物学报, 2002, 44 (5): 588–592.
- [21] SHEN Jie, DING Xiao-Yu, DING Ge, LIU Dong-Yang, TANG Feng, HE Jia. Studies on population difference of *Dendrobium officinale* II establishment and optimization of the method of ISSR fingerprinting marker. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(4): 291–294.  
沈洁, 丁小余, 丁鸽, 刘冬扬, 唐凤, 贺佳. 铁皮石斛居群差异的研究 II ISSR 指纹标记方法的建立与优化. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291–294.
- [22] Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 2002, 128: 9–17. [\[DOI\]](#)