

大花蕙兰种质资源亲缘关系的 RAPD 分析

李冬梅^{1,2}, 叶庆生², 朱根发¹

(¹广东省农业科学院花卉研究所, 广州 510640; ²华南师范大学生命科学学院/广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘要: 【目的】从分子水平研究大花蕙兰品种资源之间的遗传亲缘关系, 为大花蕙兰种质资源的保存和利用及其杂交亲本的选配提供依据。【方法】利用 RAPD 标记方法对来自日本、韩国、中国 and 美国的 48 个大花蕙兰品种和 2 个国产兰属原生种的种质资源亲缘关系进行了检测。【结果】从 100 个 10 碱基随机引物中筛选出 20 个多态性高的引物, 共扩增出 258 条 DNA 带, 其中 253 条为多态带 (占 98.1%), 平均每个引物扩增多态性带 12.6 条。50 份种质之间的相似系数变化范围为 0.364~0.817, 平均相似系数为 0.581。基于 RAPD 的扩增结果建立的 UPGMA 亲缘关系聚类图, 50 份种质在相似系数 0.592 处被划分为 5 大类群。【结论】供试 50 份种质间的遗传亲缘关系与其来源地、花色、花枝类型和杂交系谱有一定的相关性。RAPD 技术能很好的用于大花蕙兰品种亲缘关系的研究。

关键词: 大花蕙兰; 亲缘关系; RAPD; 聚类分析

Analysis on the Genetic Relationships of Hybrid *Cymbidium*'S Germplasm Resources With RAPD Markers

LI Dong-mei^{1,2}, YE Qing-sheng², ZHU Gen-fa¹

(¹Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640; ²College of Life Science, South Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631)

Abstract: 【Objective】This study researched the genetic relationships of hybrid *Cymbidium*'s germplasm resources at molecular levels, and further obtained information for germplasm storage, utilization, and breeding selection parents for breeding. 【Method】The random amplified polymorphic DNA marker(RAPD) was assessed to detect the genetic relationships among 48 hybrid *Cymbidium* cultivars from Japan, Korea, China and USA, and 2 species of native *Cymbidium*. 【Result】20 primers were screened from 100 random decamer primers, and a total of 258 DNA bands were amplified, 253 of which (98.1%) were polymorphic. The average number of polymorphic DNA bands amplified by each primer was 12.6. Genetic similarities among the cultivars and species were estimated based on the amount of band sharing ranged from 0.364 to 0.817 with an average of 0.581. According to the data, a dendrogram of genetic relationship which was constructed using UPGMA method showed that all the tested cultivars and species were classified into five cluster groups with the similarity coefficient of 0.592. 【Conclusion】It revealed that the genetic relationships among tested accessions were to some extent related with their origin, flower color, branch type and genealogy. It further indicated that RAPD technique is a useful tool for the studying of genetic relationships among hybrid *Cymbidium* cultivars.

Key words: Hybrid *Cymbidium*; Genetic relationship; RAPD; Cluster analysis

0 引言

【研究意义】大花蕙兰 (Hybrid *Cymbidium*) 为兰科兰属 (*Cymbidium*) 植物的杂交种, 多数具有独占春、虎头兰、美花兰、黄蝉兰、地旺兰等血统。由

于其株型高大优美、花大色艳, 因此具有很高的观赏价值和经济开发前景。而目前中国的大花蕙兰品种主要靠进口, 系统的育种研究刚开展不久, 大大制约了中国大花蕙兰产业的发展。研究和掌握不同大花蕙兰品种资源之间的遗传关系, 不仅是其品种资源保护和

收稿日期: 2005-12-28; 接受日期: 2007-01-12

基金项目: 广东省科技攻关重大专项 (2003A201040) 和广州市农业局招标项目 (GK0302105)

作者简介: 李冬梅 (1980-), 女, 湖北随州人, 硕士, 研究方向植物发育分子生物学及其调控。E-mail: lidongmei2000@tom.com。通讯作者朱根发 (1968-), 男, 江西瑞金人, 博士, 研究员, 研究方向花卉育种、生物技术和产业化生产技术。Tel: 020-87593419; E-mail: zhugf@tom.com

利用的依据, 而且还是其杂交育种亲本选配的理论基础, 因此, 其意义重大。【前人研究进展】近年来, 国内外学者用形态标记^[1,2]和同工酶标记^[3]对大花蕙兰的分类进行了研究。关于大花蕙兰 RAPD 标记的研究, Obara-Okeyo 等^[4]对 36 个大花蕙兰栽培种进行了品种鉴定和遗传分析; 孙彩云等^[5]分析了中国兰属的 28 个原生种和部分种的不同品种及 3 个杂交种间的亲缘关系; 甘娜等^[6]用 RAPD、叶绿体和线粒体基因组 PCR-RFLP 标记系统评价了大花蕙兰 20 个品种的遗传多样性。【本研究切入点】迄今为止对来源于不同国家和地区的不同类型的大花蕙兰品种资源之间的遗传亲缘关系研究方面尚未定论, 对其开展利用和研究工作带来了一定的困难, 随着 RAPD 标记研究的发展, 该方法已被广泛用于遗传图谱的构建、基因定位克隆、品种鉴定和遗传亲缘关系等的研究^[7~10]。【拟解决的关键问题】本研究利用前期研究建立的 RAPD 技术体系^[11], 旨在对来源于不同国家和地区的代表性 48 个大花蕙兰品种及 2 个国产兰属原生种之间的遗传亲缘关系进行 RAPD 分析, 以期为大花蕙兰种质资源的保存与利用, 及其杂交育种中亲本的选配提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种的试样采集于广东省农业科学院花卉研究所大花蕙兰圃, 其品种名及编号详见表 1。于 2004 年 9 月中旬采取幼嫩叶片, 装入冰盒, 带回实验室后用灭菌 ddH₂O 洗涤除去尘渣等杂物, 室温晾干叶片上的 ddH₂O 后分装保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和浓度测定 按照文献[11]的方法。

1.2.2 PCR 扩增 对购自上海博亚公司的 100 条 10 碱基随机引物进行了筛选, 从中选取扩增条带清晰、多态性和重复性好的 20 条引物用于 PCR 扩增。扩增反应在 PTC-100 型热循环仪 (MJ Research 公司) 上进行, PCR 体系按照文献[11]。每个引物对 50 个品种重复扩增 3 次。

1.2.3 电泳检测 PCR 产物和溴酚兰混合均匀, 点入 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg·ml⁻¹ 溴化乙锭) 中, 电泳 (0.5×TBE、5V·cm⁻¹) 1.5 h 后, 将凝胶置于 SYNGENE 凝胶成像系统中观察并照相。

1.2.4 数据记录与分析 DNA Marker 为 λDNA/EcoR I +Hind III (分子量标记范围为 564~21 228

bp), 以 3 次重复出现的 DNA 带作为统计对象, 有电泳带记为 1, 无电泳带记为 0, 得到原始 0, 1 矩阵图。利用 NTSYSpc-2.10e 软件中的 SIMQUAL 程序求 Dice 相似系数矩阵; 用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图; 用 MXCOMP 程序对聚类结果和相似系数矩阵之间的相关性进行 Mantel 检验。

2 结果与分析

2.1 DNA 扩增结果及多态性分析

利用筛选的重复性好、多态性明显的 20 个引物, 对 50 份试材基因组总 DNA 进行 PCR 扩增。共扩增出 258 条 DNA 带, 其中多态性 DNA 带 253 条, 占总带数的 98.1%。平均每个引物产生 12.9 条带和 12.6 条多态带 (表 2)。不同引物对 48 个大花蕙兰品种及 2 个国产兰属原生种 PCR 扩增的多态率达 90.9%~100%。不同引物扩增的 DNA 片段的大小为 250~3 500 bp, 尤其以 600~1 600 bp 之间居多。不同引物得到了各自不同的 RAPD 产物图谱; 同一引物, 不同供试材料间扩增带也不相同。这充分表现了大花蕙兰遗传背景的复杂性和 DNA 的多态性。引物 BA425 和 BA439 扩增的结果如图 1。

2.2 供试材料特有的 RAPD 标记

供试的 50 个品种及类型中, ‘欲望’ (No.28) 在 BA440-450 bp、‘大风’ (No.29) 在 BA65-2 050 bp、‘阿尔比’ (No.32) 在 BA425-3 000 bp 处都分别有特异扩增带。除特异性扩增产物外, 还观察到特异性缺失带, U4 (No.42) 在 BA193-1 300 bp 处缺失条带。这些特异性扩增带和特有缺失带可作为大花蕙兰品种鉴定的重要分子依据。

2.3 亲缘关系聚类分析

48 个大花蕙兰品种及 2 个国产兰属原生种之间的 dice 相似系数变化范围为 0.364~0.817, 平均相似系数为 0.581, 其中相似性最高的两个品种 ‘浪漫’ (No.16) 和 ‘美丽红唇’ (No.17), 相似系数为 0.817, 而 ‘欲望’ (No.28) 和 ‘青云’ (No.49) 之间的相似性程度最低, 仅为 0.364。将聚类结果转换成协表征矩阵, 对协表征矩阵和相似系数矩阵的相关性进行 Mantel 检验。结果表明, 两种矩阵显著相关, 相关系数 $r=0.876$, 说明聚类结果较好地体现了大花蕙兰品种之间的遗传关系。

基于 RAPD 的扩增结果, 用 UPGMA 法进行聚类分析, 得到供试品种亲缘关系树状图。在等值线 L

表 1 供试大花蕙兰品种和国产兰属原生种的来源及特性

Table 1 Origin and character of hybrid *Cymbidium* cultivars and native species of *Cymbidium* used in this study

编号和品种名	花枝类型	花色	来源	编号和品种名	花枝类型	花色	来源
No. and cultivars	Branch type	Flower colour	Origin	No. and cultivars	Branch type	Flower colour	Origin
1 瀑布 C. Sarah Jean	下垂	白色	日本	26 黄金虎 C. Morning	直立	黄花	日本
'Ice Cascade'	Pendent	White	Japan	Moon'Great Tiger'	Upright	Yellow	Japan
2 开心果 C. Darothy	下垂	咖啡色	日本	27 一级棒 C. Mini	直立	绿花	日本
Stockstill'Forgotten Fruit'	Pendent	Coffee	Japan	Sarah'Ichilian'	Upright	Green	Japan
3 红宝石 C. Ruby Shower	下垂	紫红色	日本	28 欲望 C. Lura	直立	绿花	日本
'Murasakin Okimi'	Pendent	Purple red	Japan	Song'Aphrodite'	Upright	Green	Japan
4 武士	下垂	咖啡色	日本	29 大风 C. Maureen	下垂	不详	中国台湾
C. Toriston	Pendent	Coffee	Japan	Carter'Dafeng'	Pendent	Unknown	Taiwan, China
5 红瀑布	直立	红色	日本	30 阿瑟王	直立	不详	美国
C. Mistque	Upright	Red	Japan	C. King Auther	Upright	Unknown	America
6 金桃	下垂	黄绿色	日本	31 春山 C. Lucky	直立	红色	日本
C. Sarah Jean'Peach'	Pendent	Yellow green	Japan	Glori'Chusane'	Upright	Red	Japan
7 奶油球 C. Sunshine	下垂	黄绿色	日本	32 阿尔比 C. Engun	下垂	黄绿色	日本
Falls'Butter Ball'	Pendent	Yellow green	Japan	Sarah'Allion'	Pendent	Yellow green	Japan
8 新月	直立	黄花红唇	日本	33 小沙拉 C. Mini	直立	绿花	日本
C. Lovely Moon'Crescent'	Upright	Yellow with red lips	Japan	Sarah'Jillian'	Upright	Green	Japan
9 金色海滩 C. Lovely	直立	黄花红唇	日本	34 向往	直立	绿花红唇	日本
Fantasy'Luna Beach'	Upright	Yellow with red lips	Japan	C. Pleiades'Memory'	Upright	Green with red lips	Japan
10 金杯	直立	黄花红唇	日本	35 绿宝石	直立	绿花	日本
C. Hiroshima 'Golden Cup'	Upright	Yellow with red lips	Japan	C. 'Queen Emeraldns'	Upright	Green	Japan
11 钢琴家 C. Fortissimo	直立	淡绿	日本	36 纹瓣兰	下垂	粉红色	原生种
Pianist 'Sunny Moon'	Upright	Light green	Japan	C. aloifolium	Pendent	Pink	Wild species
12 幸运阿里	直立	粉红	日本	37 U1 (未知)	不详	不详	日本
C. Lucky Gloria'Aguri'	Upright	Pink	Japan	(Unknown)	Unknown	Unknown	Japan
13 幸运星 C. Lucky	直立	粉红	日本	38 U2 (未知)	不详	不详	日本
Gloria'Fukunokami'	Upright	Pink	Japan	(Unknown)	Unknown	Unknown	Japan
14 幸运之花 C. Lucky	直立	粉红	日本	39 U3 (未知)	直立	黄花红唇	韩国
Flower'Anmitsu Hime'	Upright	Pink	Japan	(Unknown)	Upright	Yellow with red lips	Korean
15 绿河 C. Sakaki	直立	黄色	日本	40 C. Ladybird	直立	黄花	韩国
River'Tonton Tomoe'	Upright	Yellow	Japan		Upright	Yellow	Korean
16 浪漫 C. Stellar	直立	桃红色	日本	41 宝石 C. Ruby	下垂	红色	日本
Festival'Sherry Romance'	Upright	Pink	Japan	Sarah'Gem Stone'	Pendent	Red	Japan
17 美丽红唇 C. Fire	直立	深红色	日本	42 U4 (未知)	直立	红色	韩国
Starter'Perfect Rouge'	Upright	Dark red	Japan	(Unknown)	Upright	Red	Korean
18 微笑 C. Joy Polis	直立	深红色	日本	43 U5 (未知)	直立	绿色	韩国
'Smile Shower'	Upright	Dark red	Japan	(Unknown)	Upright	Green	Korean
19 金融家	直立	黄绿色	日本	44 U6 (未知)	直立	黄花	韩国
C. Financier'Odette'	Upright	Yellow green	Japan	(Unknown)	Upright	Yellow	Korean
20 月神	直立	绿色	日本	45 金凤	直立	黄绿花	中国台湾
C. Palm Lime'Luna'	Upright	Green	Japan	C.'Jinfeng'	Upright	Yellow green	Taiwan,China
21 新世纪	直立	红色	日本	46 韩国夫人	直立	淡黄褐纹	韩国
C. Rose Wine'Sinseiki'	Upright	Red	Japan	C.'Lady Korea'	Upright	Light yellow brown	Korean
22 红公主	直立	红色	日本	47 韩国小姐	直立	暗红色	韩国
C. Princes'Nobuko'	Upright	Red	Japan	C.'Miss Korea'	Upright	Dark red	Korean
23 亚历山大	直立	红色	日本	48 韩国桃花	直立	暗红桃红唇	韩国
C. Blooming'Alexander'	Upright	Red	Japan	C.'Korea Peach'	Upright	Dark red with pink lip	Korean
24 仙境	直立	粉红	日本	49 青云	直立	绿花	韩国
C. Harf Moon'Wanderland'	Upright	Pink	Japan	C.'Qing yun'	Upright	Green	Korean
25 UFO	直立	黄花红唇	日本	50 多花兰	直立	红褐色	原生种
C. UFO Color	Upright	Yellow with red lips	Japan	C. floribundum	Upright	Red brown	Wild species

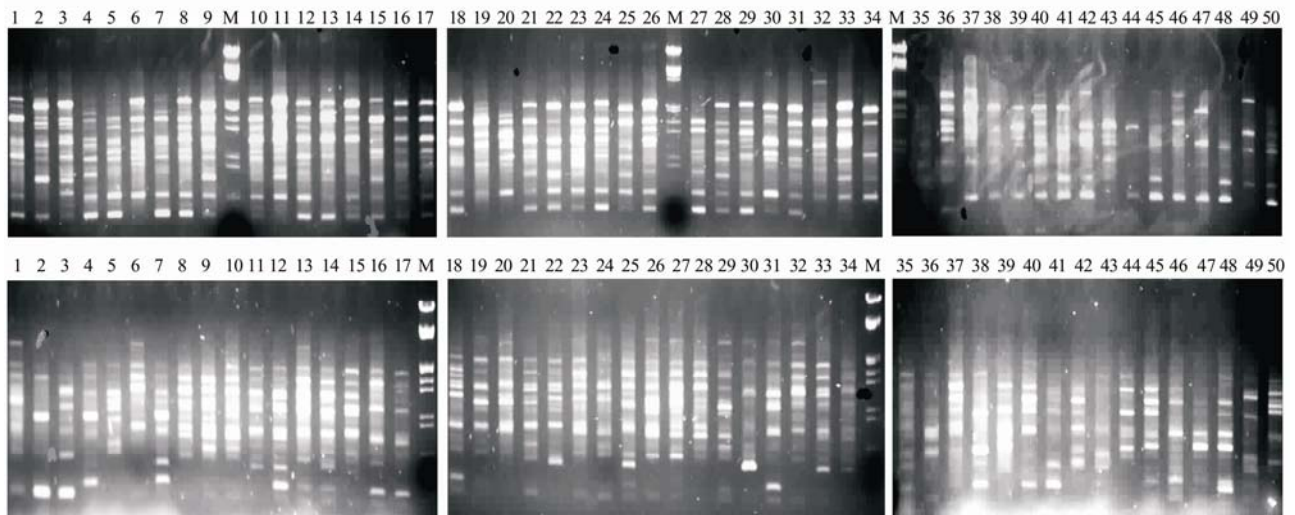
(Coefficient=0.592)处,可将供试品种分为 I、II、III、IV和V 5 个类群(图 2)。第 I 类群仅 No.36,为国产兰属原生种;第 II 类群包括 45、46、47 和 48 号,均具墨兰亲缘,除 No.45 来自中国台湾外,其它均是韩国品种;第 III 类群包括 37、39、40、42 和 44 号,除 U₁(No.37)为日本品种外,其它都是韩国品种;第 IV 类群包括 35、38、41、43、49 和 50 号,来源比较复杂,但 No.41 和 No.49 均具原生种多花兰(No.50)亲缘;第 V 类群包括 34 个品种,除 No.29 来源于中国台湾和 No.30 来源于美国外,其余的品种均来自日本。第 V 类群在等值线 M 处又可进一步划分为 11 个亚类:第 1 亚类仅‘瀑布’(No.1),是花枝下垂型白花品种;第 2 亚类包括 5、

6、8、9、10 和 11 号等 6 个品种,主要是花枝直立型黄花系品种;第 3 亚类包括 21、22、23、24、25、26、27、30 和 31 号等 9 个品种,该亚类品种的花枝均为直立型,花色有红、黄和绿色;第 4 亚类包括 12、13、14、15、16、17 和 18 号等 7 个品种,均是花枝直立型的红花粉红花系品种;第 5 亚类包括 19 和 20 号,都是花枝直立型绿花系品种;第 6 亚类包括 2 和 3 号,都是花枝下垂型品种;第 7 亚类包括 4 和 7 号,都是花枝下垂型品种;第 8 亚类仅有 28 号,是花枝直立型绿花系品种;第 9 亚类即 29 号,是具有墨兰亲缘的中国台湾品种;第 10 亚类即 32 号,是下垂型黄绿花系品种;第 11 亚类包括 33 和 34 号,均是花枝直立型绿花系品种。

表 2 20 个 RAPD 引物的碱基序列及扩增结果

Table 2 The sequences of 20 RAPD primers selected and the amplification results

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences	谱带总数(多态性 谱带) Total bands (Polymorphic bands)	多态带百分率 Polymorphic ratio (%)	引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences	谱带总数(多态性 谱带) Total bands (Polymorphic bands)	多态带百分率 Polymorphic ratio (%)
BA11	GTAGACCCGT	12(12)	100	BA198	CTGGCGAACT	14(14)	100
BA65	GATGACCGCC	12(11)	91.7	BA199	GAGTCAGCAG	13(13)	100
BA66	GAACGGACTC	14(13)	92.9	BA425	ACTGAACGCC	15(15)	100
BA67	GTCCCGACGA	12(12)	100	BA439	GTCCGTACTG	16(16)	100
BA68	TGGACCGGTG	13(13)	100	BA440	GGTGCTCCGT	12(12)	100
BA69	CTCACCGTCC	11(11)	100	BA483	GGTCACCTCA	11(11)	100
BA79	GTTGCCAGCC	14(14)	100	BA484	AGTGCCTGA	11(10)	90.9
BA184	CACCCCCTTG	16(16)	100	BA494	GGACGCTTCA	13(13)	100
BA187	TCCGATGCTG	12(12)	100	BA498	CCCCCTATCA	15(14)	93.3
BA193	GTCGTTCTG	11(11)	100	BA500	TCGCCAGTC	11(10)	90.9



泳道 1~50 编号同表 1 Lane 1-50. The same code number as in Table 1; M: λ DNA/EcoR I +Hind III DNA marker

图 1 引物 BA425 (上) 和 BA439 (下) 的扩增结果

Fig. 1 Results of PCR amplification using primers BA425(up) and BA439 (down)

3 讨论

3.1 RAPD 聚类与品种杂交系谱

RAPD 标记聚类结果表明种质间的亲缘关系与其来源地和杂交系谱有一定的相关性。来自韩国的‘韩国夫人’(No.46)、‘韩国小姐’(No.47)和‘韩国桃花’(No.48)这3个品种之间的亲缘关系密切,而这3个品种同中国台湾的‘金凤’(No.45)之间的亲缘关系也较近,这些品种均具墨兰的基因,被聚为一类。

来源于日本的品种大部分聚于第V类群,都表现出较近的亲缘关系。其中8、9、10和24号4个品种

均源于黄花系谱,在该系谱中,‘新月’(No.8)的两亲本分别是‘金色海滩’(No.9)和‘金杯’(No.10),这与RAPD聚类图中的亲缘关系相符,且‘新月’与‘金色海滩’的亲缘关系更近。‘仙镜’(No.24)的亲本之一是‘金杯’,这两个品种在RAPD聚类图中却分属不同的亚类群,亲缘关系相对较远,这可能源于‘仙镜’获得了另一亲本更多的遗传性状,从而导致其与‘金杯’的亲缘关系较远。

在垂花系谱中,品种1、6、27、32和33号都具有*C. Sleeping Beauty*和*C. purnilum*的基因;在RAPD聚类图中,这些品种虽都聚在第V类群,却分属不同的亚类群。推测这些品种在种间杂交和回交的育种进

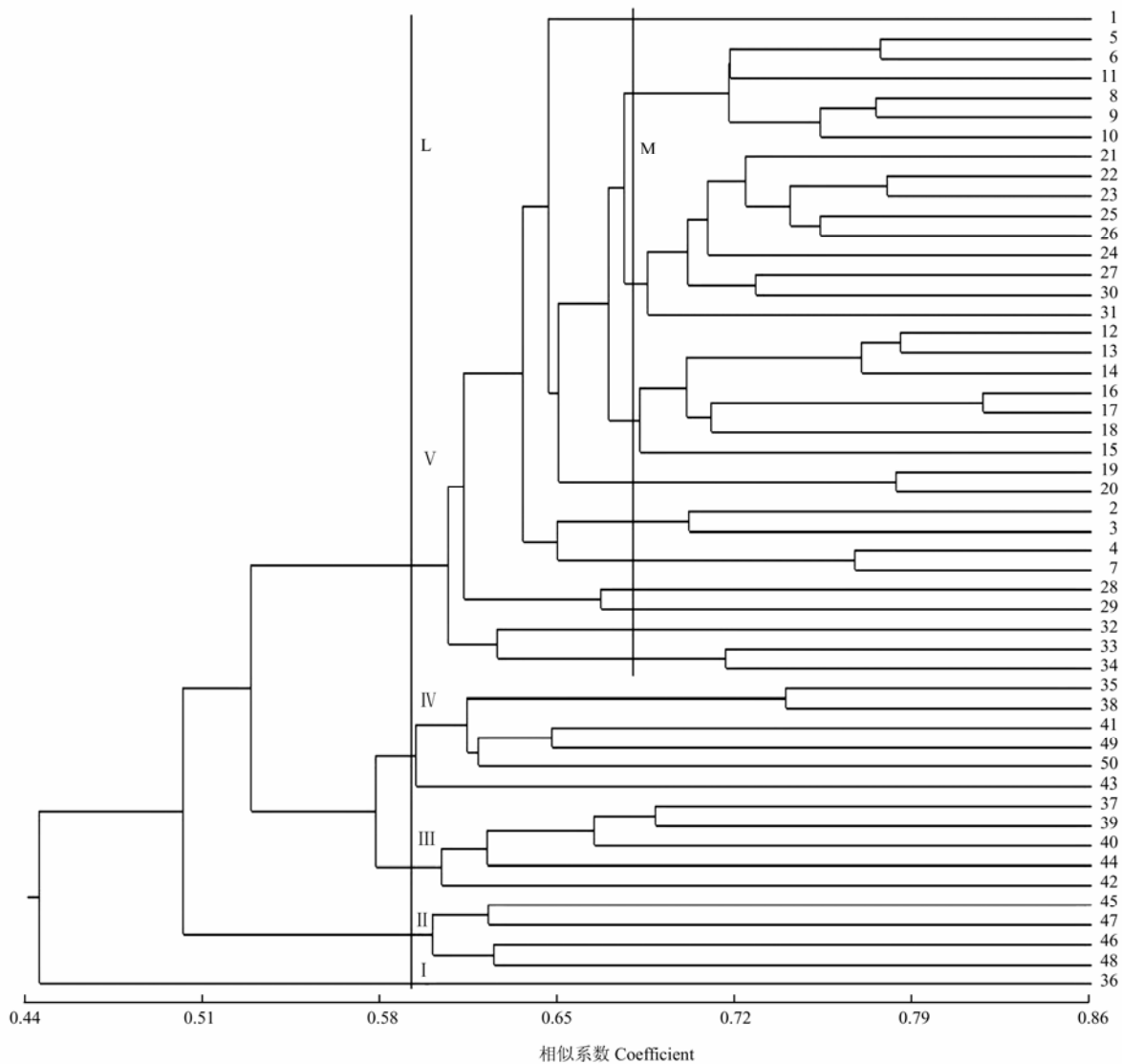


图2 依据UPGMA法建立的50份种质的聚类图(品种编号同表1)

Fig. 2 Dendrogram constructed for 50 accessions based on UPGMA methods (the same code number as in Table 1)

程中, 可能改变了遗传信息, 从而在 DNA 水平上检测到它们存在的变异, 至于产生变异的机理, 需要进一步探讨。

3.2 RAPD 聚类与品种形态分类

大花蕙兰的形态分类可根据其植物学形状如花色、花枝和开花时期等的不同而有不同的分类结果, 如按花色可分为红花粉红花系、白花系、黄花系、绿花系和变异奇花系等; 按花枝的长向可分为直立型和下垂性; 按开花的时期可分为早花型、中花型和晚花型^[2]。在 RAPD 标记聚类分析结果中, 第 V 类群中的第 4 亚类均为花枝直立型红花粉红花系品种、第 5 亚类和第 11 亚类都是花枝直立型绿花系品种、第 6 亚类和第 7 亚类均是花枝下垂型品种。这些与形态分类的一致性证实了花色和花枝作为大花蕙兰的形态分类标准具有一定的科学性。

在 RAPD 标记聚类结果中, 第 V 类群第 2 亚类中‘红瀑布’ (No.5) 为红色花系品种, 却与其它 5 个黄绿花系品种聚在一起。在垂花品种中, 除 1、6、32 和 41 号分别聚在不同的亚类外, 2 和 3 号、4 和 7 号却聚在一类。这些与形态分类不完全一致的可作为形态分类的有益补充。

3.3 遗传多样性

RAPD 分析在不同物种基因组的随机扩增 DNA 片段多态性中表现不一样, 如枣为 59.55%^[12], 桂花为 71.9%^[13], 美人蕉为 62.7%^[14]。而其在在大花蕙兰的研究中, Obar-Okeyo 等^[4]和甘娜等^[6]分别报道为 78%和 93.0%, 本研究通过对国内外 48 个大花蕙兰品种及 2 个国产兰属原生种的 RAPD 分析, 发现其多态性为 98.1%。这可能与所选用的材料和引物有关, 本研究所用的材料和引物与 Obar-Okeyo 等^[4]和甘娜等^[6]所用的不同。Obar-Okeyo 和甘娜 RAPD 分析所用的品种均为日本品种, 本试验采用了来源于日本、韩国、中国和美国的品种。本研究所揭示的大花蕙兰基因组 DNA 的多态性明显偏高, 推测造成的原因可能为: (1) 分布于不同国家和地区的原生种的多样性造成了大花蕙兰遗传背景的复杂性; (2) 大花蕙兰品种在长期的人为和自然选择的杂交选育形成过程中, 不断丰富其遗传基础, 这是其形成众多品种的分子基础; (3) 染色体水平上的变异, 也大大丰富了大花蕙兰各品种之间的差异。

4 结论

筛选出 20 条多态性和重复性较高的引物, 对 48

份来自日本、中国、韩国和美国的大花蕙兰品种和 2 份国产兰属原生种的基因组 DNA 进行了 RAPD 检测, 获得了 253 条多态性带, 多态率为 98.1%。与同类报道^[4、6]比较, 所用种质数量多和来源较广, 获得的多态性高, 具有较强的代表性。

根据本研究结果, 用 UPGMA 法聚类分析 RAPD 数据, 50 份种质在 dice 相似系数 0.592 处被划分为 5 大类群。RAPD 标记聚类结果表明受试品种间的亲缘关系与其来源地、花色、花枝类型和杂交系谱有一定的相关性。RAPD 技术能很好地用于大花蕙兰品种亲缘关系的研究。

References

- [1] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书. 北京: 中国林业出版社, 1998: 100-102.
Chen X Q, Ji Z H. *The Orchids of China*. Beijing: Chinese Forestry Press, 1998, 100-102. (in Chinese)
- [2] 朱根发. 大花蕙兰. 广州: 广东科技出版社, 2004: 1-48.
Zhu G F. *Cymbidium Hybrids*. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004: 1-48. (in Chinese)
- [3] Obara Okeyo P, Fujii K, Kako S. Enzyme polymorphism in *Cymbidium* orchid cultivars and inheritance of leucineaminopeptidase. *HortiScience*, 1997, 32: 1267-1271.
- [4] Obara-Okeyo P, Kako S. Genetic diversity and identification of *cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 1998, 99: 95-101.
- [5] 孙彩云, 张明永, 叶秀舜, 梁承邳, 夏快飞. 中国兰属植物种间及品种间亲缘关系的 RAPD 分析. 园艺学报, 2005, 32: 1121-1124.
Sun C Y, Zhang M Y, Ye X L, Liang C Y, Xia K F. Studies on relationships between species, and cultivars of *Cymbidium* using RAPD. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32: 1121-1124. (in Chinese)
- [6] 甘娜, 谭向红, 陈其兵, 魏育明, 郑有良. 应用 RAPD 标记和细胞质基因组 PCR-RFLP 技术研究大花蕙兰的遗传多样性. 园艺学报, 2006, 33: 349-355.
Gan N, Tan X H, Chen Q B, Wei Y M, Zheng Y L. Genetic diversity in *Cymbidium* based on RAPD markers and PCR-RFLP analysis of organellar DNAs. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33: 349-355. (in Chinese)
- [7] Matsumoto S, Fukui H. Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. *Scientia Horticulturae*, 1996, 67: 49-54.
- [8] Dirlwanger E, Pronier V, Parvery C, Rothan C, Guye A, Monet R. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using

- morphological and molecular markers. *Theoretical and Applied Geneics*, 1998, 97: 888-895.
- [9] Giovanni C D, Dell'Orco P, Bnuno A, Ciccarse F, Lotti C, Ricciardi L. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. *Plant Science*, 2004, 166: 41-48.
- [10] Fracaro F, Zacaria J, Echeverrigaray S. RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, 33: 409-417.
- [11] 李冬梅, 朱根发, 叶庆生. 大花蕙兰 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(1): 25-30.
- Li D M, Zhu G F, Ye Q S. Genomic DNA extraction and RAPD protocols for *Cymbidium hybridium*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2006, 14(1): 25-30. (in Chinese)
- [12] 彭建营, 束怀瑞, 孙仲序, 彭士琪. 中国枣种质资源的 RAPD 分析. *园艺学报*, 2000, 27(3): 171-176.
- Peng J Y, Shu H R, Sun Z X, Peng S Q. RAPD analysis of germplasm resources on Chinese date. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(3): 171-176. (in Chinese)
- [13] 尚富德, 伊艳杰, 张 彤. 河南 17 个桂花品种的 RAPD 分析. *园艺学报*, 2004, 31: 685-687.
- Shang F D, Yi Y J, Zhang T. The RAPD analysis of 17 *Osmanthus fragrans* cultivars in Henan province. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31: 685-687. (in Chinese)
- [14] 黄国涛, 欧阳底梅, 向其柏, 朱伟华, 张寿洲. 美人蕉种质资源的 RAPD 分析. *园艺学报*, 2005, 32: 273-277.
- Huang G T, Ouyang D M, Xiang Q B, Zhu W H, Zhang S Z. RAPD analysis of germplasm resources on *Canna*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 27: 273-277. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)