

# 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

甘 娜<sup>1,2</sup> 谭向红<sup>1</sup> 陈其兵<sup>1</sup> 魏育明<sup>2</sup> 郑有良<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014; <sup>2</sup>四川农业大学小麦研究所, 成都 611830; <sup>3</sup>四川师范大学地理与资源科学学院, 成都 610066)

**摘 要:** 利用 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。在 50 个 RAPD 引物分析中, 有 36 个引物 (72.0%) 能揭示材料间的多态性, 材料间遗传相似系数为 0.503~0.765, 平均 0.598, 根据遗传相似系数进行聚类分析表明, RAPD 标记能将所有材料区分开。在 7 个叶绿体基因组 (cpDNA) 的 PCR-RFLP 分析中, 6 个标记 (87.5%) 可扩增出 1 至多条清晰的谱带; 扩增产物经 7 种限制性内切酶消化后, 6 个标记的 19 种引物-酶组合共检测到 53 条 DNA 片段, 其中多态性片段有 37 条, 占 69.8%; 材料间遗传相似系数变化范围为 0.571~0.949, 平均值为 0.766。在 8 个线粒体基因组 (mtDNA) 的 PCR-RFLP 标记分析中, 只有 3 个 (37.5%) 标记能得到 1 条清晰的谱带; 利用 7 种限制性内切酶对 3 个标记的扩增产物消化后, 在 10 种标记-酶组合中, 共检测到 33 条酶切片段, 其中 21 条 (63.6%) 具有多态性; 遗传相似系数为 0.634~1.000, 平均 0.829。这些结果表明, RAPD 标记揭示的大花蕙兰遗传多样性最高, 其次为 cpDNA PCR-RFLP 标记, 而 mtDNA PCR-RFLP 标记揭示的遗传多样性最低。

**关键词:** 大花蕙兰; RAPD; PCR-RFLP; cpDNA; mtDNA

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 02-0349-07

## Genetic Diversity in *Cymbidium* Based on RAPD Markers and PCR-RFLP Analyses of Organellar DNAs

Gan Na<sup>1,2</sup>, Tan Xianghong<sup>1</sup>, Chen Qibing<sup>1</sup>, Wei Yuming<sup>2</sup>, and Zheng Youliang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; <sup>2</sup>Triticeae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611830, China; <sup>3</sup>Faculty of Geography and Resources Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** The genetic diversity among 20 *Cymbidium* accessions was investigated by RAPD markers and PCR-RFLP analyses of organellar DNAs. In RAPD analyses, the amplified products of 36 primers (72.0%) were polymorphic. The RAPD-based genetic similarity (GS) among 20 *Cymbidium* accessions ranged from 0.503 to 0.765, with the mean of 0.598. Based on genetic similarity matrix resulting from RAPD markers, the genetic relationships among 20 *Cymbidium* accessions were estimated by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) clustering analysis. It was found that all 20 *Cymbidium* accessions could be distinguished by RAPD markers. In cpDNA PCR-RFLP analyses, 6 out of 7 markers (87.5%) could produce one or more than one distinct bands by direct electrophoresis in 2% agarose gels. After the amplified products were digested by 7 restriction enzymes, a total of 53 bands were detected in 19 cpDNA PCR-RFLP marker/enzyme combinations, among which 37 bands (69.8%) were polymorphic. The cpDNA PCR-RFLP-based genetic similarity (GS) among 20 *Cymbidium* accessions ranged from 0.571 to 0.949, with the mean of 0.766. Of the 8 mtDNA PCR-RFLP markers, 3 markers (37.5%) could produce one distinct band with no polymorphism detected by direct electrophoresis in 2% agarose gels. After the amplified products were digested by 7 restriction enzymes, a total of 33 bands were detected in 10 mtDNA PCR-RFLP marker/enzyme combinations,

收稿日期: 2005-06-16; 修回日期: 2005-10-24

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (RT0453); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金项目 (200357)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: gmb@sicau.edu.cn)

among which 21 bands (63.6%) were polymorphic. The mtDNA PCR-RFLP-based genetic similarity (GS) among 20 *Cymbidium* accessions ranged from 0.634 to 1.000, with the mean of 0.829. These results suggested that relatively higher level of genetic polymorphism in *Cymbidium* could be detected by RAPD markers, whereas relatively lower level genetic polymorphism could be estimated by mtDNA PCR-RFLP markers.

**Key words:** *Cymbidium*; RAPD; PCR-RFLP; cpDNA; mtDNA

大花蕙兰是兰科兰属 (*Cymbidium*) 多年生附生性兰草本植物。关于大花蕙兰的栽培技术、繁殖方法等方面已有较多研究<sup>[1,2]</sup>, 但兰属植物变异性大, 中间类型多, 且至今未能解决其分类和系统学的问题, 给进一步杂交培育新品种带来不便。近年来, RAPD技术已被应用于兰花等观赏植物的分类及进化等方面的研究<sup>[3~7]</sup>。植物细胞质基因组包括叶绿体基因组 (cpDNA) 和线粒体基因组 (mtDNA)<sup>[8]</sup>。相对于核基因组来说, 其遗传模式为简单的单亲遗传, 较少发生重组, 偶尔发生突变, 序列和结构进化速度较慢, 可作为物种鉴定和研究种间分子进化以及系统发育的理想工具<sup>[9,10]</sup>。本研究采用 RAPD和细胞质基因组 PCR-RFLP技术, 对大花蕙兰 20个不同的品种的品种鉴定和遗传多样性进行系统评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验材料为 20个大花蕙兰品种 (图 2), 其中 1~3号由四川省农业科学院园艺研究所提供, 4~20号由绵阳鲜绿果蔬有限责任公司从日本向山兰园株式会社引进的 17个品种。

### 1.2 DNA的提取

取新鲜叶片约 3 g, 在液氮中研磨成粉末, 转入 50 mL离心管中, 加入 15 mL预热至 65 的 2 × CTAB提取缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2% CTAB, 2% PVP, 10 mmol/L EDTA, 0.2% β-巯基乙醇), 65 水浴保温 1~2 h, 其间倒转离心管数次, 取出离心管冷却至室温。加入等体积氯仿/异戊醇 (24/1) 混匀, 3 500 r/min离心 12 min。取上清液加入 1/10体积的 10%的 CTAB, 轻摇混匀, 加等体积氯仿/异戊醇 (24/1) 混匀, 3 500 r/min离心 12 min, 取上清液加 0.6倍体积的异丙醇, 沉淀 DNA, 用针头勾出 DNA沉淀, 用 70%乙醇冲洗 2~3次。空气中干燥后用 TE溶解备用<sup>[11]</sup>。

### 1.3 RAPD扩增反应

利用上海生工生物工程公司生产的 50个 10聚体随机引物对材料进行扩增筛选, 共筛选出谱带清晰的引物 36个。反应在 PTC-220型 PCR仪上进行。反应总体积 25 μL, 含 20~30 ng模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μmol/L 引物, 1 U Taq DNA 聚合酶 (上海 Promega), 1 × PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 5 mmol/L KCl)。扩增程序是 94 预变性 3 min后进行 50个循环扩增反应, 每循环为 94 变性 1 min, 36 复性 1 min, 72 延伸 2 min; 最后 1次为 72 延伸 10 min。取 20 μL扩增产物, 与 5 μL溴酚蓝 (0.25%溴酚蓝, 40%蔗糖水溶液) 混匀, 点入含 0.5 μg/mL EB的 1%琼脂糖凝胶中, 以 1 ×TAE缓冲液为介质在 5 V/cm电场强度下电泳 1~2 h。取出凝胶在 Amersham Pharmacia Biotech公司 ImageMaster VDS凝胶成像仪上观察照相并记录。

### 1.4 PCR-RFLP反应

利用 7个叶绿体和 8个线粒体基因组通用引物对材料进行扩增筛选, 结果仅 6个叶绿体引物和 3个线粒体引物可扩增出稳定而明显的产物, 其名称、序列、扩增区域与片段大小及参考文献出处列于表 1。引物由上海生工生物工程公司合成。反应总体积 25 μL, 含 100 ng模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 65 ng引物, 1 U Taq DNA 聚合酶 (上海 Promega), 1 ×PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 5 mmol/L KCl)。扩增程序是 94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 55 复性 1 min, 72 延伸 3 min, 40个循环; 最后延伸温度 72 , 10 min。

表 1 叶绿体和线粒体 PCR-RFLP 标记引物序列及来源

Table 1 The primer sequences and source for cpDNA and mDNA PCR-RFLP markers

引物 Primer	序列 Sequence	类型 Type	扩增区域 Amplified area	长度 Length (kb)	文献 Reference
<i>tmL-tmR</i>	5'-CGAAATCGGTA GACGCTACG-3' 5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3'	cpDNA	基因及基因间区 Gene and inter-gene region	1.0	[12]
<i>tmT-tmL</i>	5'-CATTACAAA TGCGA TGC'TCT-3' 5'-TCTACCGA TTTCGCCA TA TC-3'	cpDNA	基因及基因间区 Gene and inter-gene region	0.8	[12]
<i>tmD-tmT</i>	5'-ACCAA TTGAAC TACAA TCCC-3' 5'-CTACCACTGA GTTAAAA GGG-3'	cpDNA	基因及基因间区,含 <i>tmE</i> 和 <i>tmY</i> 基因 Gene and inter-gene region, including <i>tmE</i> and <i>tmY</i>	1.2	[13]
<i>tmH-tmK</i>	5'-ACGGGAA TTGAACCCGCGCA-3' 5'-CCGACTA GTTCCGGGTTCGA	cpDNA	基因及基因间区,含 <i>psbA</i> 基因 Gene and inter-gene region, including <i>psbA</i>	1.8	[13]
<i>tmS-tmM</i>	5'-GAGAGA GAGGGA TTCGAACC-3' 5'-CA TAACCTTGA GGTACACGGG-3'	cpDNA	基因及基因间区,含 <i>ycf 9</i> 和 <i>tmG</i> 基因 Gene and inter-gene region, including <i>ycf 9</i> and <i>tmG</i>	1.3	[13]
<i>tmS-psbC</i>	5'-GGTTCGAA TCCC'TCT'C'TC-3' 5'-GGTCGTGACCAA GAAACCAC-3'	cpDNA	基因及基因间区 Gene and inter-gene region	1.5	[14]
<i>nad 1B- nad 1C</i>	5'-GCA TTACGA TCTGCA GCTCA-3' 5'-GGA GCTCGA TTAGTTCTGCG-3'	mDNA	基因及基因间区 Gene and inter-gene region	1.2	[13]
<i>18S-5S rRNA</i>	5'-GTGTTGCTGA GACA TGCGCC-3' 5'-ATA TGGCGCAA GACGA TTCC-3'	mDNA	基因及基因间区 Gene and inter-gene region	1.2	[13]
<i>cox1</i>	5'-CTAACCACAA GGA TA TTGGGAC-3' 5'-A GTTCTCCAAA GTATGAAAGGC-3'	mDNA	基因 Gene	1.5	[15]

在扩增产物中加入 1 U 的限制性内切酶 *Hinf*、*EcoR*、*Hind*、*BamH*、*EcoR321*、*BsuR1*、*EcoR881*和 *HpaII*, 37 酶解 1 h。然后在含有 0.5% EB 的 2%琼脂糖凝胶电泳分离中以 1 ×TAE 缓冲液为介质电泳。以 5 V/cm 的电压电泳 2~3 h 后, 用 Amersham Pharmacia Biotech 公司 ImageMaster VDS 凝胶成像仪上观察、成像并记录。

1.5 数据分析

扩增产物按有带记为 1, 无带记为 0, 计算材料间遗传相似系数 (GS)<sup>[16]</sup>。根据 GS 值或遗传距离 (1-GS) 按不加权重成对群算术平均法 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic means cluster analysis) 进行遗传相似性聚类。统计分析在 NTSYS-PC 软件系统下进行。

2 结果与分析

2.1 RAPD 结果与分析

2.1.1 扩增片段多态性 RAPD 扩增结果表明, 36 个引物的扩增产物均能揭示材料间多态性, 其中图 1 为引物 OPB-8 的扩增结果。36 个引物共得到 214 条扩增 DNA 片段 (表 2), 平均每个引物能产生 5.9 条, 其中 199 条 (93.0%) 具多态性。不同引物的扩增带数变幅从 2 条到 10 条不等, 长度大小为 200~3 000 bp。

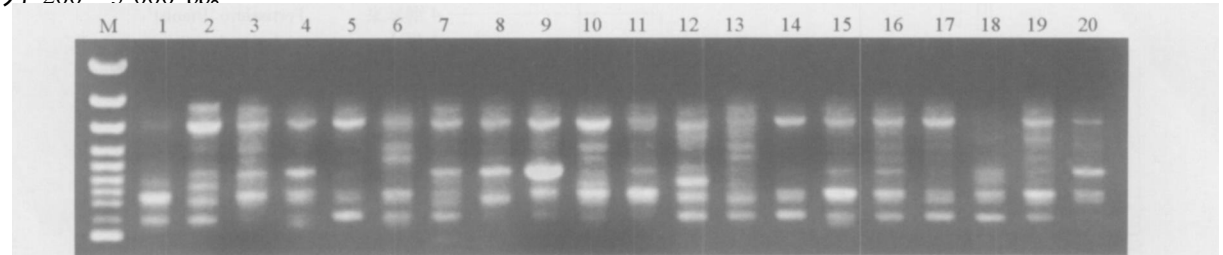


图 1 RAPD 引物 OPB-8 对 20 份大花蕙兰材料基因组 DNA 的扩增图谱

1~20: 材料序号同图 2, M: PUC19/MSP DNA marker 下同。

Fig 1 The genomic fingerprints of 20 *Cymbidium* accessions amplified with primer OPB-8 in RAPD analysis

1-20: The accession number as in Fig. 2, M: PUC19/MSP DNA marker The same below.

表 2 RAPD 随机引物序列及其扩增结果

Table 2 The sequences of 36 random primers and their amplification results

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequences(5'-3')	条带总数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands	引物 Primers	序列 (5'-3') Sequences(5'-3')	条带总数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands
OPB1	GTTCGCTCC	6	6	OPH18	GAA TC GGCCA	7	7
OPB3	CA TCCCCCTG	5	5	OPH19	CTGACCA GCC	4	4
OPB4	GGACTGGA GT	4	4	OPH20	GGGAGACA TC	11	11
OPB5	TGCTCTGCCC	2	1	OPP1	GTAGCACTCC	6	6
OPB7	GGTGACGCAG	8	8	OPP2	TCGGCACGCA	6	5
OPB8	GTCCACACGG	5	4	OPP3	CTGATACGCC	8	8
OPH3	AGACGTCCAC	8	8	OPP4	GTGTCTCA GG	10	9
OPH4	GGAA GTCGCC	9	9	OPP5	CCCCGGTAAC	7	7
OPH5	AGTCGTCCCC	5	5	OPP6	GTGGGCTGAC	5	5
OPH7	CTGCA TC GTG	10	10	OPP7	GTCCA TGCCA	3	2
OPH9	TGTAGCTGGG	4	4	OPP8	ACA TC GCCCA	3	3
OPH10	CCTACGTCAG	6	6	OPP9	GTGGTCCGCA	6	5
OPH11	CTTCCGCA GT	8	8	OPP14	CCA GCCGAAC	4	4
OPH12	ACGCGCA TGT	6	5	OPP15	GGAA GCCAAC	4	3
OPH14	ACCA GGT TGG	2	2	OPP16	CCAAGCTGCC	7	7
OPH15	AA TGCGCAG	6	5	OPP17	TGACCCGCCT	10	10
OPH16	TC TCA GCTGG	5	4	OPP18	GGCTTGCCCT	4	2
OPH17	CACTCTCCTC	3	1	OPP19	GGGAAGGACA	6	5
合计 Total						214	199

2.1.2 遗传相似系数 36条 RAPD 引物所扩增出的 214条 DNA 条带均用于计算大花蕙兰 20个品种间的遗传相似系数 (GS)。结果表明, GS值变化范围为 0.503 ~ 0.765, 平均值为 0.598。其中 ‘幸运彩虹’和 ‘幸运霞光’遗传相似性最高, 而 ‘璀璨’与其余 19个品种间的遗传相似性相对较低。

2.1.3 聚类分析 根据 RAPD 遗传相似系数按 UPGMA 法聚类生成 20个材料间的亲缘关系树状图 (图 2)。以平均遗传相似系数 0.598为阈值, 可将其划分为 4类。从图 2可以看出, RAPD 标记能将所有供试的 20份材料相互区分开。其中, ‘璀璨’与其它材料间差异较大, 单独聚为 1类。‘火红天

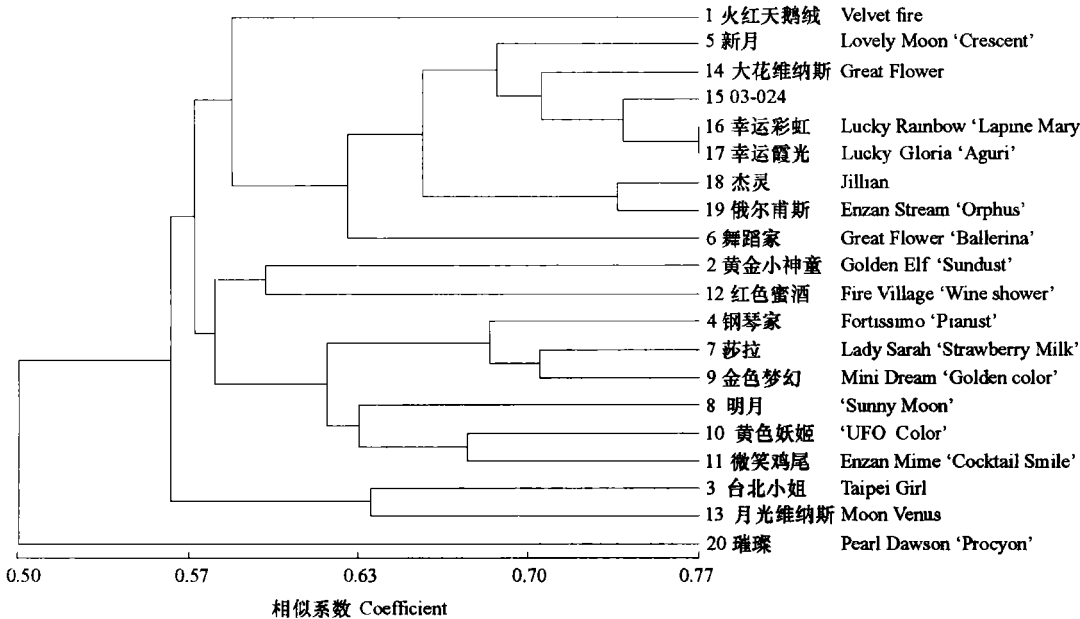


图 2 20份大花蕙兰材料基于 RAPD 遗传相似系数聚类图  
Fig. 2 The dendrogram resulting from RAPD based-genetic similarity matrix in 20 Cymbidium accessions

鹅绒 、‘新月 ’、‘大花维纳斯 ’、‘幸运彩虹 ’、‘幸运霞光 ’、‘杰灵 ’、‘舞蹈家 ’和 ‘俄尔甫斯 ’很明显地聚为 1 类。‘黄金小神童 ’、‘红色蜜酒 ’、‘钢琴家 ’、‘莎拉 ’、‘金色梦幻 ’、‘明月 ’、‘黄色妖姬 ’和 ‘微笑鸡尾 ’也明显聚为 1 类；而 ‘台北小姐 ’和 ‘月光维纳斯 ’则聚为另 1 类。

2.2 叶绿体基因组 (cpDNA) PCR-RFLP 分析

2.2.1 多态性 利用 7 个叶绿体基因组 (cpDNA) 的 PCR-RFLP 标记对 20 份大花蕙兰进行了分析，其结果列于表 3。6 个引物 (占 85.7%) 可扩增出 1 至多条清晰谱带 (图 3, A)，利用 *Hinf* 、*EcoR* 、*Hind* 、*BamH* 、*EcoR321*、*BsuR1*、*EcoR881*等 7 种限制性内切酶消化后，6 个标记的 19 种引物 酶组合共检测到 53 条 DNA 片段。其中，多态性片段有 37 条，占 69.8%。图 3, B 为 *trnL-trnR* 扩增产物的 *EcoR* 酶切结果。

表 3 6 个叶绿体基因组 PCR-RFLP 标记对 20 份大花蕙兰的检测结果  
Table 3 The detection results for 6 cpDNA PCR-RFLP in 20 *Cymbidium* accessions

引物 Primer	<i>Hinf</i> I		<i>EcoR</i> I		<i>Hind</i> III		<i>BamH</i> I		<i>EcoR321</i>		<i>BsuR1</i> ( <i>Hae</i> III)		<i>EcoR881</i>	
	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism
<i>trnL-trnR</i>			8	8	2	2			5	5				
<i>trnT-trnL</i>			3	2					3	2	1	0		
<i>trnH-trnK</i>	3	2	4	2			3	1			4	3		
<i>trnS-psbC</i>							3	1	1	0			1	0
<i>trnD-trnT</i>							2	2	2	2			5	5
<i>trnS-trnM</i>							1	0	1	0			1	0

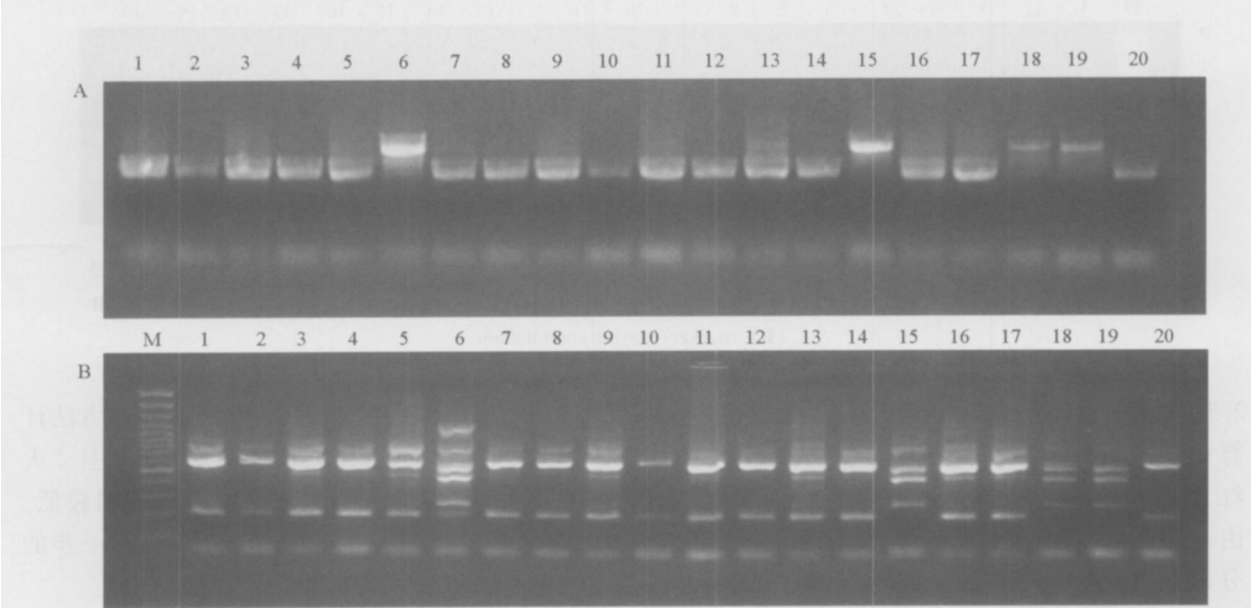


图 3 引物 *trnL-trnR* (A) 和引物/酶组合 *trnL-trnR/EcoR* (B) 对 20 份大花蕙兰材料基因组 DNA 的扩增图谱  
Fig 3 The genomic fingerprints of 20 *Cymbidium* accessions resulting from *trnL-trnR* (A) and *trnL-trnR/EcoR* (B) marker/enzyme combination

2.2.2 遗传相似系数 利用 6 个叶绿体基因组的 PCR-RFLP 标记扩增产物按 Nei 的方法计算相似系数 (GS)，20 份大花蕙兰间 GS 值变化范围为 0.571 ~ 0.949，平均值为 0.766。其中 ‘幸运彩虹 ’和 ‘金色梦幻 ’遗传相似性最高，‘舞蹈家 ’、‘杰灵 ’、‘微笑鸡尾 ’、03-024 与其余 16 个品种的遗传相似性相对较低。由于叶绿体基因组 (cpDNA) PCR-RFLP 分析中谱带较少，提供的信息量有限，所以不做进一步的分析。

2.3 线粒体基因组 (mtDNA) PCR-RFLP分析

2.3.1 多态性 利用 8个线粒体基因组 (mtDNA) 的 PCR 标记对 20份大花蕙兰进行分析, 其结果列于表 4。其中, 3个引物 (占 37.5%) 可扩增出 1条清晰谱带 (图 4, A)。利用 *Hinf*、*EcoR*、*Hind*、*BamH*、*HpaII*、*BsuR1*和 *EcoR881*等 7种限制性内切酶消化后, 3个标记的 10种引物/酶组合共检测到 33条 DNA 片段, 其中多态性片段有 21条 (占 63.6%)。图 4, B 为 18S-5SrRNA/*HpaII* 的扩增和酶切结果。

表 4 3个线粒体基因组 PCR-RFLP 标记对 20 份大花蕙兰的检测结果  
Table 4 The detection results for 3 mtDNA PCR-RFLP in 20 *Cymbidium* accessions

名称 Primer	<i>Hinf</i> I		<i>EcoR</i> I		<i>Hind</i> III		<i>BamH</i> I		<i>HpaII</i>		<i>BsuR1</i> ( <i>Hae</i> III)		<i>EcoR881</i>	
	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism	总数 Total	多态性 Polymorphism
cox1									6	6				
nad1B-nad1C 6	5		6	3			2	2						
18S-5S rRNA 1	0		2	1	1	0			4	1	4	3	1	0

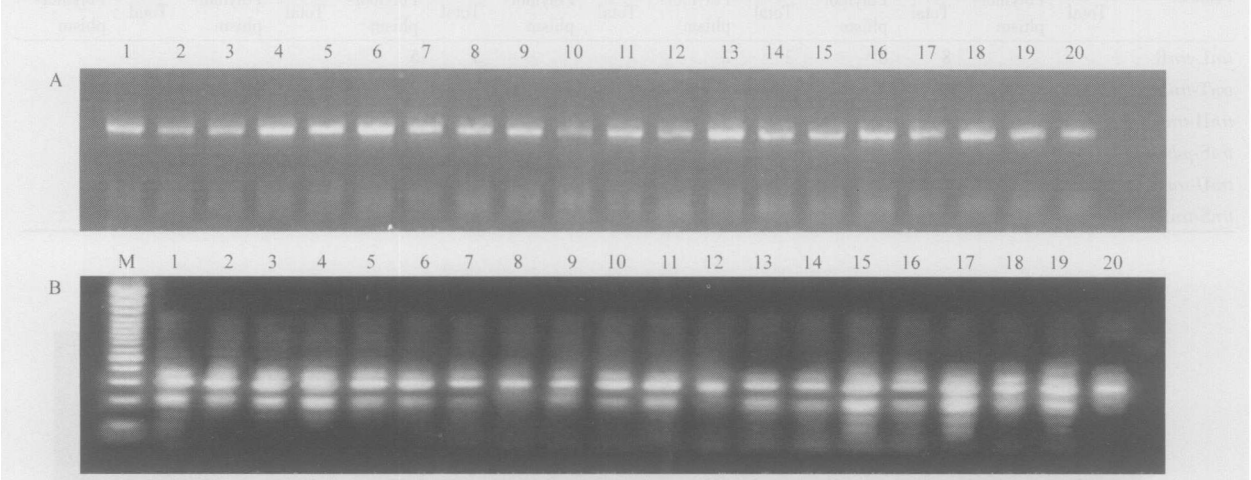


图 4 引物 18S-5S rRNA (A) 和 18S-5SrRNA/*HpaII* (B) 引物/酶组合对 20份大花蕙兰材料基因组 DNA 的扩增图谱  
Fig 4 The genomic fingerprints of 20 *Cymbidium* accessions resulted from 18S-5SrRNA (A) and 18S-5SrRNA/*HpaII* (B) marker/enzyme combination

2.3.2 遗传相似系数 利用 3个线粒体基因组的 PCR-RFLP标记扩增产物按 Nei (1979) 的方法计算相似系数 (GS), 20份大花蕙兰间 GS值变化范围为 0.634 ~ 1.000, 平均值为 0.829。其中 ‘火红天鹅绒’ 和 ‘新月’ 间遗传相似性最高, 而 ‘璀璨’ 与其它 19个材料的遗传相似性相对较低。由于线粒体基因组 (mtDNA) PCR-RFLP分析中谱带较少, 提供的信息量有限, 所以不做进一步的分析。

3 讨论

从遗传距离来看, RAPD标记揭示的材料间的多态性高于叶绿体基因组 (cpDNA) PCR-RFLP标记, 而叶绿体基因组 (cpDNA) PCR-RFLP标记又高于线粒体基因组 (mtDNA) PCR-RFLP标记。这说明大花蕙兰的叶绿体和线粒体基因组比较保守, 遗传多样性较低, 不能作为聚类分析的依据。

RAPD遗传相似系数划分的类群将 ‘璀璨’ 单独聚为 1类。‘璀璨’ 花深绿红心, 属于绿花系品种。RAPD遗传相似系数划分的类群也将 ‘舞蹈家’、‘幸运霞光’、‘俄尔甫斯’、03-024和 ‘火红天鹅绒’ 聚为 1类。它们都是红花系品种, 且除 ‘火红天鹅绒’ 外都是 12月至翌年 2月 (早花型) 的

粉红色大花型品种。这些结果说明此标记划分的类群同花色、花期和花朵类型有一定的关系。但是, RAPD 标记都没有将 ‘莎拉’ 和 ‘璀璨’ 这两个垂吊品种单独聚为 1 类。同时, RAPD 标记也没有将芳香的品种 ‘黄金小神童’、‘台北小姐’、‘红色蜜酒’ 和 ‘璀璨’ 单独聚为 1 类。这表明根据遗传相似系数划分的类群与大花惠兰的直立型和垂吊型没有直接联系, 与其是否具有花香也没有直接联系。

## 参考文献:

- 1 刘 园, 王四清. 大花惠兰 (*Cymbidium hybridum*) 的研究动向. 园艺学报, 2005, 32 (4): 748 ~ 752  
Liu Y, Wang S Q. Advances of *Cymbidium hybridum*. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (4): 748 ~ 752 (in Chinese)
- 2 徐宏英, 赵玉明, 谢海军, 王 芳. 大花惠兰组培快繁影响因素分析. 园艺学报, 2002, 29 (2): 183 ~ 185  
Xu H Y, Zhao Y M, Xie H J, Wang F. Analysis on factors affecting in vitro propagation of large-flowered hybrids of *Cymbidium*. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (2): 183 ~ 185 (in Chinese)
- 3 梁红健, 刘 敏, 钟志宇, 吴应祥, 李文彬. 中国部分兰花的品种 RAPD 分析. 园艺学报, 1996, 23 (4): 365 ~ 370  
Liang H J, Liu M, Zhong Z Y, Wu Y X, Li W B. Identification and classification of Chinese *Cymbidium* with RAPD. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23 (4): 365 ~ 370 (in Chinese)
- 4 陈向明, 郑国生, 孟 丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析. 园艺学报, 2002, 29 (1): 78 ~ 80  
Chen X M, Zheng G S, Meng L. The RAPD analysis of the *Rosa* genus plant of *R. nigosa*, *R. chinensis* and *R. davurica*. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (1): 78 ~ 80 (in Chinese)
- 5 施苏华, 唐绍清, 陈月琴, 屈良鹄, 张宏达. 11 种金花茶植物的 RAPD 分析及其系统学意义. 植物分类学报, 1998, 36 (4): 317 ~ 322  
Shi S H, Tang S Q, Chen Y Q, Qu L H, Zhang H D. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on random amplified polymorphic DNA. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1998, 36 (4): 317 ~ 322 (in Chinese)
- 6 陈向明, 郑国生, 张圣旺. 牡丹栽培品种的 RAPD 分析. 园艺学报, 2001, 28 (4): 370 ~ 372  
Chen X M, Zheng G S, Zhang S W. RAPD analysis of tree peony cultivars. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (4): 370 ~ 372 (in Chinese)
- 7 孙彩云, 张明永, 叶秀 秀, 梁承邨, 夏快飞. 利用 RAPD 和同工酶研究中国兜兰属种间亲缘关系. 园艺学报, 2005, 32 (2): 268 ~ 272  
Sun C Y, Zhang M Y, Ye X L, Liang C Y, Xia K F. The relationship of *Paphiopedilum* species in China by RAPD and isozyme. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (2): 268 ~ 272 (in Chinese)
- 8 Talbert L E, Blake N K, Chee P M, Blake T K, Magyar G M. Evaluation of " sequence-tagged-site " PCR products as molecular markers in wheat. Theor Appl Genet, 1994, 87: 789 ~ 794
- 9 Roy J K, Prasad M, Varshney R K, Balyan H S, Blake T K, Dhaliwal H S, Singh H, Edwards K J, Gupta P K. Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a sts on 7D of bread wheat showing an association with preharvest sprouting tolerance. Theor Appl Genet, 2000, 100: 336 ~ 341
- 10 Chen H B, Martin J M, Lavin M, Talbert L E. Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence-tagged-site PCR markers. Crop Sci, 1994, 34: 1296 ~ 1632
- 11 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002. 742 ~ 744  
Wang G L, Fang H J. Genetic engineering of plants. Beijing: Science Press, 2002. 742 ~ 744 (in Chinese)
- 12 Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1105 ~ 1109
- 13 Demesure B, Sodzi N, Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. Molecular Ecology, 1995, 4: 129 ~ 131
- 14 Parani M, Lakshmi M, Ziegenhagen B, Fladung M, Senthikumar P, Parida A. Molecular phylogeny of mangrove. PCR-RFLP of *tmS-psbC* and *rbcL* gene regions in 24 mangrove and mangrove-associate species. Theor Appl Genet, 2000, 100: 454 ~ 460
- 15 Wang G Z, Matsuoka Y, Tsunewaki K. Evolutionary features of chondriome divergence in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* shown by RFLP analysis of mitochondrial DNAs. Theor Appl Genet, 2000, 100: 221 ~ 231
- 16 Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269 ~ 5273