

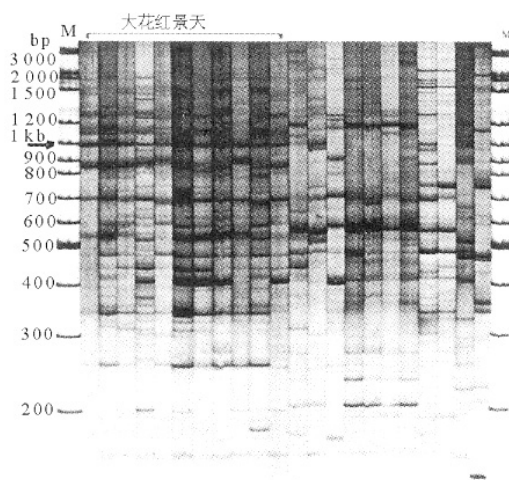


图2 红景天属植物 P_2P_3 组合 DALP 电泳图
(箭头代表大花红景天特征带)

Fig. 2 DALP electrophorogram of $P_2 P_3$ combination with P_3 samples amplification for plants of *Rhodiola* L. (arrow indicates characteristic bands of *R. crenulata*)

子鉴定的 DNA 标记有 10 多种,应用广泛的主要有 RFLP、RAPD、AFLP 和核酸序列分析等。RFLP 在技术上比较费力、成本高、多态性少, RAPD 反应系统不稳定、可靠性差, AFLP 和 ITS 在分子鉴定上优点突出,但是 AFLP 为显性标记、技术难度高, ITS 测序资金耗费大。而 DALP 是共显性标记,能检测出纯和基因型及杂和基因型,提供了完整的遗传信息,技术难度低、耗费小。本实验首次把 DALP 技术

用在传统中药材的鉴定上, DALP 技术的优点克服了传统分子鉴定的缺点,共显性数据提高了数据可信度,有望成为今后中药分子鉴定的首选技术。

致谢:在材料采集中受到和云峰、张时刚、晏婴才等的大力帮助。

References:

- [1] Xu L, Xu H H, Huang S, et al. *New Techniques of Cultivation for Good Agricultural Practice (GAP) and Industrializing Development on the Chinese Rare-medicinal Herbs* (中国名贵药材规范化栽培技术与产业化开发新技术) [M]. Beijing: Beijing University of Medical Sciences and Peking Union Medical College United Press, 2001.
- [2] Institutum Botanicum Kunmingense Academiae Sinicae. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Tomus 8. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Guo Y T, Wang F P, Xiao Z Y. Chemical components from roots of *Rhodiola yunnanensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1993, 5(3): 144-208.
- [4] Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species [J]. *Nucl Acids Res*, 1998, 26: 1458-1465.
- [5] Dolye J J, Dolye J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [6] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, diversity, barbarian and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
- [7] Ren R W, Lu Q, Xu X L. Experience and discussion for improving RAPD stability [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2001, 11(2): 40-41.
- [8] Ling W M. *The Guide of PCR Technology Manipulation and Application* (PCR 技术操作和应用指南) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1993.

ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用

沈颖,徐程*,万小凤,张铭

(浙江大学生命科学院,浙江 杭州 310012)

摘要:目的 采用 ISSR-PCR 方法对石斛属 9 种植物进行鉴别,探讨不同种石斛在 DNA 分子水平上的差异。方法 选取 10 条由 SSR 组成的引物,对 9 种石斛进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分析。结果 10 条引物中有 7 条扩增出多态性条带。每条引物可检测的多态性位点最少 7 个,最多 14 个,扩增片段大小为 220~1 260 bp。其中,引物 UBC-807 和 UBC-864 具有较高的多态性条带比率,均可以独立将所有被测种区分开来。结论 ISSR-PCR 作为一种简便、可靠的分子标记鉴定技术,可以作为石斛属种间鉴别的方法之一。

关键词: ISSR-PCR; 分子标记; 石斛属; 鉴别

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0423-05

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(C03050204)

作者简介: 沈颖(1978—),女,硕士生,研究方向为植物遗传与分子生物学。 Tel: (0571)88273341 E-mail: sheny78@sohu.com

*通讯作者 Tel: (0571)81859020 E-mail: xuc123@zju.edu.cn

Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species

SHEN Ying, XU Cheng, WAN Xiao-feng, ZHANG Ming

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Objective To identify nine species of *Dendrobium* Sw. by inter-simple sequence repeats-polymerase chain reaction (ISSR-PCR) method and to investigate the difference among the species of *Dendrobium* Sw. at DNA molecular level. **Methods** Ten primers constituted by simple sequence repeats (SSR) were tested for PCR and sepharose electrophoresis of the nine species. **Results** Seven of the ten primers amplified polymorphic bands. The number of polymorphic band positions of each primer ranged from 7 to 14, and the size of fragments ranged from 220 to 1 260 bp. The amplification patterns of two primers, namely UBC-807 and UBC-864, were higher in terms of polymorphic and amplified band ratio. Each of them was able to distinguish all the examined species. **Conclusion** ISSR-PCR provides a quick, reliable molecular marker technique for identification of different species of *Dendrobium* Sw.

Key words: inter-simple sequence repeats-polymerase chain reaction (ISSR-PCR); molecular marker; *Dendrobium* Sw.; identification

石斛属(*Dendrobium* Sw.)是兰科第 2 大属,许多种具有重要的药用价值。石斛为传统名贵中药材,具有补肾积精、益胃生津、滋阴清热等功效。由于其种类繁多,历代本草著作称之为医工难辨之种类^[1]。《中华人民共和国药典》规定的石斛来源有铁皮石斛 *D. officinale* Kirmura et Migo、粉花石斛 *D. loddigesii* Rolfe、束花石斛 *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl.、金钗石斛 *D. nobile* Lindl.、流苏石斛 *D. fimbriatum* Hook. 等 5 种。药用石斛及其原植株的鉴定标准参差不齐,以往多从形态及生理生化等方面进行辨别。近年来,随着 PCR 技术的不断发展,DNA 分子标记技术逐渐被应用于中药材的鉴定研究。例如,RAPD 技术已应用于柴胡^[2]、丹参^[3]等的分类及药材道地性研究。

ISSR(inter-simple sequence repeats,简单重复序列中间区域)扩增多态性是由 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种新型微卫星类分子标记技术^[4],其原理是真核生物广泛存在简单重复序列(simple sequence repeats,SSR),如(AT)_n、(GAC)_n等。利用 SSR 设计引物,并在引物的 5'或 3'末端添加几个非重复的锚定碱基,以保证引物与基因组 DNA 中 SSR 的 5'或 3'末端结合。产生的条带相当于一段介于两段反向重复微卫星间的 DNA 序列。与 RAPD 相比,ISSR 标记迅速简便,重复性好,具有更高的多态性^[5,6]。近年来,ISSR 在动、植物亲缘关系及多样性研究、建立 DNA 指纹库、遗传图谱、基因定位、辅助育种等方面应用广泛,已在大车前^[7]、何首乌^[8]、钩钟柳属^[9]以及柑橘属^[10]等种属鉴定研究中取得较好结果。国内对于 ISSR 的研究从 2000 年起步,

万方数据

应用领域主要是水稻^[11~13]、小麦^[14]、大豆^[15]等重要经济作物。目前,大量的研究正在林业、渔业、果树等行业展开。

应用 ISSR 分子标记技术进行石斛种间鉴别,迄今还未见报道。本研究试图将 ISSR 标记应用于 9 种石斛的种间鉴别,并对其在 DNA 分子水平上的差异进行初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料:共选用 9 种石斛(表 1),其中 1~8 由中国科学院昆明植物研究所李树云先生提供并鉴定,9 为本实验室云南产铁皮石斛组培苗。收集新鲜幼嫩的叶片,用硅胶干燥后保存在 -20 ℃ 冰箱中。

表 1 石斛种类

Table 1 Species of *Dendrobium* Sw.

编号	拉丁名	中文名
1	<i>D. loddigesii</i>	美花石斛
2	<i>D. chrysanthum</i>	束花石斛
3	<i>D. aurantiacum</i> var. <i>denneanum</i>	叠鞘石斛
4	<i>D. chrysotoxum</i>	鼓槌石斛
5	<i>D. hancockii</i>	细叶石斛
6	<i>D. lohohense</i>	罗河石斛
7	<i>D. thyrsiflorum</i>	球花石斛
8	<i>D. crepidatum</i>	玫瑰石斛
9	<i>D. officinale</i>	铁皮石斛

1.2 基因组 DNA 的提取:DNA 提取参考 Doyle 等方法^[16],并作适当改进。取 0.2 g 硅胶干燥的叶片(新鲜叶片也可),用研钵研磨至细粉状。将研磨好的粉末迅速转移到 10 mL 离心管,加入 4 mL 预热(65 ℃)的抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、20 mmol/L EDTA、4% CTAB、2% PVP、1.4 mmol/L

NaCl), 并加入 40 μ L β -巯基乙醇, 混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 90 min。水浴后冷却至室温, 加入等体积(4 mL) 酚-氯仿-异戊醇(25 : 24 : 1), 轻微颠转 50 次, 置于碎冰上沉淀约 30 min。然后于 4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清液(如上清液浑浊, 可重复用酚-氯仿-异戊醇抽提 1 次)。转移上清液至离心管中, 加入 0.5 倍体积 5 mol/L NaCl, 再加 2 倍体积无水乙醇, 轻微振荡后, 可见白色沉淀。4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 15 min, 收集沉淀, 用 70%乙醇洗涤 2 次, 室温下干燥。用含有 1 μ L 10 mg/mL RNase(DNase-free) 的 100 μ L 0.1 $\times$ TE 溶解沉淀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。然后用等量酚-氯仿-异戊醇抽提, 方法同上, 最后溶解在 1 mL 0.1 $\times$ TE 缓冲液中。

1.3 ISSR-PCR 反应体系及凝胶电泳: ISSR 引物序列参考加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室(UBCBL)的#9 引物系列, 由上海生工生物技术有限公司合成。引物序列见表 2。

表 2 所用的 ISSR 引物序列及每一条引物扩增片段大小
Table 2 Used ISSR primer sequences and size of fragments resulting from each primer

引物编号	序列	多态性条带数	扩增片段大小/bp
UBC-803	(AT) ₈ C	0	0
UBC-807	(AG) ₈ T	14	220~1 000
UBC-814	(CT) ₈ A	0	0
UBC-818	(CA) ₈ G	9	240~ 880
UBC-820	(GT) ₈ C	7	480~1 260
UBC-862	(AGC) ₆	12	220~ 680
UBC-864	(ATG) ₆	13	220~ 980
UBC-866	(CTC) ₆	8	320~ 880
UBC-868	(GAA) ₆	7	320~1 160
UBC-870	(TGC) ₆	0	0

反应体系: 总体积 25 μ L, 含有约 20 ng 基因组 DNA, 1.0 μ mol/L 引物, 1 $\times$ 反应缓冲液, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 1 U Taq 酶, 用 SDW(灭菌的双蒸水)补充体积至 25 μ L, 反应前每管添加约 15 μ L 液体石蜡, 以防蒸发。另用 SDW 代替模板 DNA 作阴性对照。

PCR 扩增程序: PCR 反应在 MJ PTC-100 扩增仪上进行, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 2 min、45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min 补平, 反应产物在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

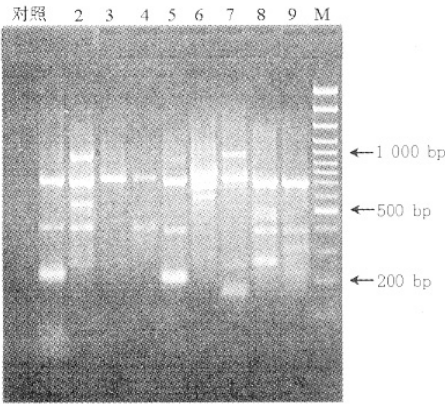
电泳以 0.5 $\times$ TBE 缓冲液(45 mmol/L Tris-硼酸, 1 mmol/L EDTA)配制 1.5%琼脂糖凝胶, 将凝胶放置在含有 0.5 $\times$ TBE 缓冲液的电泳槽(Bio-Rad Sub-Cell GT system)中, 缓冲液没过凝胶表面约 2

mm。PCR 产物上样量 8 μ L, 以上海生工 Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder Plus 标记片段大小, 电压 60 V, 电泳时间约为 4 h。结果由凝胶成像系统(Dolphin-DOC)拍照记录。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 浓度与纯度: 提取的基因组 DNA 经紫外分析检测, $A_{260/280}$ 比值均介于 1.7 与 2.0, 质量浓度在 15~70 ng/ μ L。基因组 DNA 在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 以 λ 基因组为对照, 基因组无降解, 片段大小约为 50 kb。

2.2 扩增产物多态性分析: 引物 UBC-803、UBC-814、UBC-870 无扩增条带, 其余 7 条引物均产生可重复的多态性扩增模式(表 2)。在能产生条带的引物中, 产生多态性条带的数目由 7 到 14 条不等, 而片段的大小 220~1 260 bp 不等。图 1 是引物 UBC-864 对 9 种石斛扩增结果的电泳图。



对照-以 SDW 代替 DNA 模板作为阴性对照 1~9 见表 1
control-SDW substitutes DNA template as negative control
1—9 are shown in Table 1

图 1 引物 UBC-864 扩增被测 9 种石斛的
琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Sepharose electrophorogram of examined nine species of *Dendrobium* Sw. with Primer UBC-864 amplification

应用于检测的 10 条引物中, UBC-807 和 UBC-864 均可以独立区分 9 个不同种质的石斛。从图 1 可知, UBC-864 对于不同种质石斛扩增模式有很大差异, 从而可以将所有被试样品轻易地区分开来。另外, 在 700 bp 左右均有清晰明显的条带, 但条带位置略有差异, 这可能是石斛属进化中比较保守的区域, 对其深入分析可能会揭示更多关于系统进化上的证据。在本研究中, 选择 UBC-864 扩增的部分多态性条带绘制种间区分图(图 2), 可以快速鉴别 9 种石斛。每 1 个分支代表 1 条多态性条带标记, 分支

线以上代表该物种具有此条带,分支线以下则表示缺少这一条带。

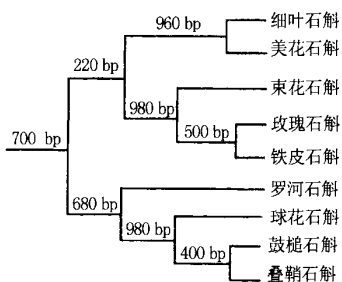


图 2 根据引物 UBC-864 构建的石斛种间区分图

Fig. 2 Identification pattern of examined species of *Dendrobium* Sw. with Primer UBC-864

3 讨论

石斛类植物由于多糖含量高,一般提取过程很难去除干净,可能影响 PCR 扩增。本研究采用高浓度的 CTAB 在高盐(1.4 mol/L NaCl)与核酸形成稳定的复合物,在酚氯仿抽提蛋白质及多糖后的水相中,仍然用高浓度的盐(约 1.7 mol/L NaCl)去多糖,收到较好效果。这一方法在目前的石斛类 DNA 提取的相关报道中未见报道。

ISSR-PCR 实验体系的稳定是至关重要的。模板浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、退火温度、pH 值等诸多因素均会影响实验结果。其中,退火温度影响较大,较低的退火温度将导致适当的错配,从而扩大引物在基因组上配对的随机性,而较高的温度虽然可以提高引物与模板结合的专一性,却会降低引物与模板结合的程度。本研究中,确定以 52 °C 作为所有 10 条引物的退火温度。同时,在数据统计分析时选取明显、清晰并且在多次实验中得到重复的条带进行统计,对于只在少数实验中出现的则不予以统计。PCR 对于 Mg^{2+} 浓度的变化也是非常敏感的。在适宜的 Mg^{2+} 浓度(1.5~2.5 mmol/L)下,扩增结果一致。模板、引物浓度对 PCR 的影响均不大,在适宜的模板质量(10~100 ng)及适宜的引物浓度(0.4~1.5 μ mol/L)下,均具有一致的扩增模式。

本实验首次将 ISSR-PCR 方法引入石斛种间鉴别。实验表明,ISSR 技术具有方法简便、结果稳定、可靠等优点。ISSR 引物可以直接从已有的引物库中进行筛选而无需自行设计,方法简便、快速。ISSR 具有很好的重复性,这主要是由于 ISSR 引物长度一般在 15~22 bp(本实验采用的 10 条引物长度为 17 或 18 bp),具有较高的退火温度。ISSR 标记具有很高的多态性。本研究选取的 10 条引物中,有 7 条引

物产生了多态性条带,其中 2 条引物均可独立区分所有被测样品,使得比较种间差异成为可能。

DNA 分子标记应用于中药鉴定、栽培等方面有着很好的发展前景。目前针对石斛种间鉴别的方法日益增多,例如利用 rDNA 的 ITS 序列,因其进化速率较快,能很好地反应科内、属间及种间的亲缘关系,被广泛应用于植物系统演化及亲缘关系的研究。Lau 等^[17]对 16 种石斛内转录间隔区 ITS2 DNA 测序的结果表明,ITS2 区可作为区分石斛种间、石斛与外类群的分子标记。丁小余等^[18]建立了枫斗类石斛的 rDNA ITS 区碱基全序列数据库,可对枫斗类石斛待检种进行鉴别。这种方法准确可靠,但其不足之处是对每一个被测样品都需要进行测序,费用较高。再如张铭等^[19]曾用 RAPD 技术对 26 种石斛进行聚类分析,并对铁皮石斛特异性条带进行测序,从而设计出一对长度为 20 bp 的铁皮石斛高度特异性的引物。RAPD 方法快速简便,但其重复性差,铁皮石斛特异性引物准确可靠,但仅局限于鉴定铁皮石斛一个种。此外,也有报道指出利用叶绿体的 matK 基因序列区分石斛与其混淆品^[20],这一方法也需要进行测序,如能同时结合其他进化中的一些分子证据,方可作出全面、科学的判断。本实验旨在寻找一种快速简便的石斛种间鉴别方法,ISSR-PCR 方法与 RAPD 同样快速而简便,而准确性大大提高,并且不需要进行测序,尤其适用于多样品之间的鉴别,极大地降低了成本。但 ISSR 标记能否应用于石斛属内亲缘关系的探讨,则需要更深入的研究,需要收集尽可能多的石斛种类,筛选多态性条带丰富的引物,并对大量数据进行科学、有效地整理和分析。

通过本实验可以看到,ISSR 标记在石斛种间鉴别中显示出巨大的应用潜能,随着研究的深入,必将找到更合适的引物,获得更佳的多态性图谱,从而在种间、种下居群间等水平进行快速鉴别,为药材石斛的鉴定和石斛 GAP 种质资源的确立等提供分子水平的证据。

致谢:中国科学院昆明植物研究所李树云先生提供并鉴定部分样本。

References:

- [1] Bao X S, Shun Q S, Chen L Z. *The Medicinal Plants of Dendrobium (Shi-hu) in China* (中国药用石斛) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001.
- [2] Liang Z T, Qin M J, Wang Z T, et al. Identification of *Bupleurum* L. plants by RAPD technology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1117-1119.
- [3] Guo B L, Lin S, Feng Y X, et al. Primary research on genetic relationship among main populations of *Salvia miltiorrhiza* and genuineness of herb [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1113-1116.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting

- by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [5] Nagaoka T, Ogiwara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [6] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 440-449.
- [7] Wolff K, Morgan-Richards M. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 282-286.
- [8] Hollingsworth M L, Hollingsworth P M, Jenkins G I, et al. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1681-1691.
- [9] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kephart S R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1107-1125.
- [10] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1998, 123: 612-617.
- [11] Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. RAPD and ISSR analysis between photoperiod sensitive genic male sterile rice Nongken 58S and its original variety Nongken 58S [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2000, 8(1): 63-66.
- [12] Li J B, Mou T M, Fang X J. Identification and genetic analysis for 12 elite PGMS and TGMS rices based on ISSR markers [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2002, 18(1): 6-9.
- [13] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(7): 741-750.
- [14] Du J K, Yao Y Y, Ni Z F, et al. Genetic diversity revealed by ISSR marker in common wheat, spelt, *compactum* and progeny of recurrent selection [J]. *Acta Genetic Sin* (遗传学报), 2002, 29(5): 445-452.
- [15] Fang X J, Wang J Q, Wang Y S, et al. SSR & ISSR molecular tagging of gene conferring resistance to race 4 of soybean cyst nematode (SCN) for soybean ZDD2226 in China [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2002, (10): 81-85.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [17] Lau D T W, Shaw P C, Wang J, et al. Authentication of medical *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67: 456-460.
- [18] Ding X Y, Xu L S, Xu H, et al. Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied species of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868-873.
- [19] Zhang M, Huang H R, Liao S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-447.
- [20] Teng Y F, Wu X J, Xu H, et al. A comparison of matK sequences between *Herba Dendrobii* (Shihu) and its adulterant species [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(4): 280-283.

霍山石斛种内遗传稳定性的 RAPD 初探

刘石泉, 余庆波, 李小军, 周根余*

(上海师范大学生命与环境科学学院 生物系遗传学实验室, 上海 200234)

摘要:目的 研究霍山石斛荚果内遗传稳定性及荚果间的差异大小。方法 利用从 20 个随机引物筛选出来的 3 个稳定性较好的 10 碱基引物对来自 5 个不同荚果的霍山石斛种群进行 RAPD 检测。结果 5 个荚果内遗传相似系数较大, 在 92.592%~100.00%, 其中 H1、H9、H10、H14 存在一定程度的变异, H23 是一个较为稳定的群体; 5 个荚果间 H1、H9、H10、H23 的遗传距离较小, H14 与其他 4 个荚果的遗传距离则较大。结论 建立霍山石斛稳定的无性快繁体系是切实可行的, 同时说明霍山石斛种内存在一定的变异, H14 与其他荚果的差异最大。

关键词:随机扩增多态性 DNA; 霍山石斛; 荚果; 遗传稳定性

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0427-05

Hereditary stability among species of *Dendrobium huoshanense* by RAPD

LIU Shi-quan, YU Qing-bo, LI Xiao-jun, ZHOU Gen-yu

(Laboratory of Genetics, Department of Biology, College of Life and Environment Science,

Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Objective To study the hereditary stability in the pod and the diversity within the pods of *Dendrobium huoshanense*. **Methods** Three optimal decamer oligonucleotide primers with better stability selected from 20 random primers were used to detect the populations of five different pods of *D. huoshanense* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Results** The coefficient of genetic similarity were higher within five pods at the range of 92.592%—100.00%, the variation presented in the H1, H9, H10, and H14, but H23 was a stable group. There was a smaller genetic distance within the pods H1, H9,

收稿日期: 2004-05-22

基金项目: 上海市高等学校科学技术发展基金资助项目 (03DZ02)

作者简介: 刘石泉 (1969—), 男, 湖南益阳人, 讲师, 在读研究生, 研究方向为药用组织培养及分子检测。 E-mail: lsq205@sina.com

* 通讯作者 Tel: (021)64323698 E-mail: zhoubenyou@sina.com