

不同产地独蒜兰种质资源的遗传多样性分析

张丽娜¹, 桂阳¹, 王沁¹, 黄万兵¹, 朱英², 朱国胜^{1*}

1. 贵州省现代中药材研究所, 贵州 贵阳 550006

2. 贵州省生物技术研究所, 贵州 贵阳 550006

摘要: 目的 对我国不同产区的 23 份独蒜兰的遗传多样性进行分析, 为后续资源利用奠定基础。方法 利用 ISSR 分子标记技术和类平均法 (UPGMA) 对 23 份独蒜兰资源进行 PCR 扩增和数据分析。结果 从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条多态性较好的引物, 在 23 份独蒜兰资源中扩增出 86 条 DNA 片段, 其中多态性片段 80 条, 多态位点百分率 (PPB) 为 93.0%。23 份独蒜兰资源被划分为 2 个类群, 同一地区来源的大部分资源聚在同一类群或亚类群, 也存在不同地区来源的资源间遗传关系较近的情况。结论 ISSR 标记可为独蒜兰种质资源鉴定、遗传关系分析及品种培育提供一定依据。

关键词: 独蒜兰; ISSR; 种质资源; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)05-0979-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.023

Analysis on genetic diversity of germplasm resources in *Pleione bulbocodioides* from different habitats

ZHANG Li-na¹, GUI Yang¹, WANG Qin¹, HUANG Wan-bing¹, ZHU Ying², ZHU Guo-sheng¹

1. Institute of Modern Chinese Medicinal Materials, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

2. Biotechnology Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and genetic relationship of 23 plant samples in *Pleione bulbocodioides* from different habitats. **Methods** The molecular marker technique of inter-sample sequence repeat (ISSR) and unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) were used to study the genetic diversity and cluster analysis of 23 samples. **Results** Twelve primers with diversity were sieved from 100 ISSR primers. DNA fragments (86) were amplified from 23 samples, and with 93.0% of polymorphic bands. In the cluster dendrogram, the studied samples were clustered into two groups, while the samples from the same region were in the same group and revealed the rule of geographical distribution in the tested materials. **Conclusion** The study provides the foundation for identification and development of plants in *P. bulbocodioides* and guide collection and evaluation of germplasm resources.

Key words: *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe; inter-sample sequence repeat; germplasm resources; genetic diversity; cluster analysis

独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 又名冰球子, 为兰科独蒜兰属多年生植物, 为《中国药典》上收录的山慈菇的基原植物之一, 以干燥假鳞茎入药, 《中国药典》2015 版一部记载其药性甘、微辛, 凉; 归肝、脾经; 清热解毒、化痰散结、用于痈肿疔毒、瘰疬痰核、蛇虫咬伤、癰疽痞块。近年来, 研究表明其有抗癌作用^[1-2], 在贵州一些少

数民族地区为常用苗药、土家药。一些苗家医师将其作为治疗蛇毒和胃癌的良药之一。土家医认为其辛、甘、凉, 止血, 用于肺热咳血、支气管炎、鼻出血、风湿疼痛、咳嗽, 外用治外伤出血、无名肿毒等^[3]。由于独蒜兰价格连年上涨, 稀少的野生独蒜兰资源遭到了极大的破坏, 濒临灭绝。为使医药产业的发展需求得到满足以及独蒜兰野生资源得到

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 [黔科合社字 (2009) 5036 号, 黔科合 SY 字 (2014) 3031-1 号, 黔科合中药字 (2011) 5039 号, 黔科合 SY 字 (2014) 3031-2 号]; 中央补助地方科技基础条件专项基金项目 [黔科条中补地 (2010) 4002]; 贵州省科技计划项目 [黔科合院所创能 (2010) 4002]; 贵州省农业科学院资助项目 [黔农科合 (创新基金) 2012001 号]

作者简介: 张丽娜 (1984—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为中药材资源与育种工作。Tel: (0851)83761127 E-mail: zln1984@126.com

***通信作者** 朱国胜 (1971—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物益生菌及食药真菌研究。Tel: (0851)83762695 E-mail: zgsah@163.com

保护, 培育独蒜兰栽培种是亟待解决的核心问题。笔者所在团队已开展了独蒜兰资源的搜集工作, 为培育独蒜兰优良品种奠定了材料基础。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记技术具有操作简单、无需知道研究对象的基因组序列、检测多态能力强等优点^[4]。目前, ISSR 技术已广泛应用于白檀^[5]、委陵菜^[6]、续断^[7]、石斛^[8]、菰蓝^[9]、大花红景天^[10]等中药种质资源的研究, 为开展独蒜兰种质资源的遗传多样性研究提供了可借鉴的技术和方法。对于独蒜兰资源研究, 主要集中在引种栽培^[11-12]、组培快繁^[13-15]、种子萌发^[16-17]等方面, 而独蒜兰遗传多样性的研究鲜有报道, 于晓娟^[18]用 ISSR 分子标记对独蒜兰属种间样本以及同种不同个体间进行研究, 结果表明独蒜兰同种不同个体之间具有高度的遗传一致性, 不同种间聚类结果和形态学观

察的分类结果有相似之处, 说明 ISSR 可以用于独蒜兰的系统学研究。通过独蒜兰资源收集及初步鉴定, 发现独蒜兰对生境要求严格, 不同居群在生物学特性上存在较大差异。为了解我国不同产地独蒜兰种质资源间的亲缘关系及其遗传多样性, 本研究初步对不同居群的 23 份独蒜兰样品进行 ISSR 分析, 以期从分子水平上准确评价其资源, 为品种选育、资源的保护和有效利用提供一定依据。

1 材料

1.1 材料与仪器

23 份供试材料来源于贵州雷山、云南丽江、云南楚雄、四川凉山等地, 统一种植于贵州省农业科学院药材种质资源圃, 由贵阳中医学院何顺志教授鉴定为兰科独蒜属植物独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe, 样品信息见表 1。

表 1 独蒜兰供试材料信息

Table 1 Information of *P. bulbocodioides* accessions

编号	采集地	海拔/m	经纬度	性状描述
1	云南丽江 1	2 618	26°87.85'N, 100°13.26'E	顶生单花, 花色为紫粉色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣淡黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为淡紫红色圆锥形
2	四川凉山 1	2 495	27°89.37'N, 102°27.22'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
3	四川凉山 2	2 506	27°89.11'N, 102°27.24'E	顶生单花, 花色为紫红色, 花瓣尖端淡黄色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣淡黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
4	四川凉山 3	2 513	27°91.16'N, 102°27.22'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 花瓣尖端白色, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
5	四川凉山 4	2 554	27°89.58'N, 102°26.84'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 花瓣尖端淡黄色, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
6	四川凉山 5	2 559	27°89.43'N, 102°27.49'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为宽椭圆形, 绿色圆锥形球茎
7	四川凉山 6	2 464	26°93.41'N, 102°13.49'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为红色圆锥形
8	四川凉山 7	2 471	26°73.41'N, 102°13.49'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为细长形, 球茎为红色圆锥形
9	云南丽江 2	2 426	26°83.81'N, 100°47.06'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
10	云南丽江 3	2 429	26°83.81'N, 100°47.06'E	顶生单花, 花色为粉红色, 花瓣尖端为白色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
11	云南丽江 4	2 456	26°83.81'N, 100°47.10'E	顶生单花, 花色为粉白色, 唇瓣边缘黄色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为长椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形

续表 1

编号	采集地	海拔/m	经纬度	性状描述
12	云南丽江 5	2 503	26°83.85'N, 108°47.16'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为紫红色长圆锥形
13	贵州雷山 1	1 484	26°38.06'N, 108°06.84'E	顶生双花, 花色为紫粉色, 唇瓣上 5 条褶片, 唇瓣上有深紫红色斑点, 独叶, 叶绿色, 叶片为狭长椭圆形, 球茎为白色短圆锥形
14	贵州雷山 2	1 460	26°37.84'N, 108°06.96'E	顶生单花, 花色为紫粉色, 唇瓣上 5 条褶片, 唇瓣上有深紫红色斑点, 唇瓣中间为黄色, 独叶, 叶绿色, 叶片为狭长椭圆形, 球茎为白色短圆锥形
15	贵州雷山 3	1 460	26°37.86'N, 108°06.96'E	顶生单花, 花色为紫粉色, 唇瓣上 5 条褶片, 唇瓣上有深紫红色斑点, 独叶, 叶绿色, 叶片为狭长椭圆形, 球茎为白色短圆锥形
16	贵州雷山 4	1 476	26°38.06'N, 108°06.96'E	顶生单花, 花色为紫粉色, 唇瓣上 5 条褶片, 唇瓣上有深紫红色斑点, 独叶, 叶绿色, 叶片为狭长椭圆形, 球茎为淡紫红色短圆锥形
17	贵州雷山 5	1 552	26°23.12'N, 108°12.16'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为绿色圆锥形
18	云南楚雄 1	1 995	24°30.03'N, 100°35.86'E	顶生单花, 花色为紫粉色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为红色圆锥形
19	云南楚雄 2	1 924	25°07.93'N, 101°35.48'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为红色圆锥形
20	云南楚雄 3	2 026	24°85.22'N, 100°28.16'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为细长形, 球茎为红色圆锥形
21	云南丽江 6	2 440	26°87.81'N, 100°17.34'E	顶生单花, 花色为粉红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣呈金黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 独叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
22	云南丽江 7	2 464	26°87.85'N, 100°17.33'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣呈金黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 双叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为紫红色圆锥形
23	云南丽江 8	2 397	26°87.85'N, 100°20.03'E	顶生单花, 花色为紫红色, 唇瓣上有 3 条褶片, 唇瓣呈金黄色, 唇瓣上有红褐色斑点, 双叶, 叶色浓绿, 叶片为椭圆形, 球茎为淡紫红色圆锥形

1.2 仪器与试剂

Thermo Fresco 21 离心机(美国 Thermo 公司), Bio Rad C1000 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司), DYY-12 型电泳仪和 DG-31DN 水平电泳槽(北京市六一仪器厂); G: BOX SYNGENE 凝胶紫外成像系统(美国 BIO-RAD 公司), 移液器(德国 Eppendorf)。100 bp DNA Marker、D2000 DNA Marker 和 dNTP、Taq DNA 聚合酶、PCR buffer (含 Mg^{2+}) 等 PCR 试剂(北京天根生化科技有限公司), Agarose G-10 琼脂糖、Gold View 核酸染料、CTAB、EDTA、SDS、Tris、PVP、 β -巯基乙醇(上海生工生物工程股份有限公司), 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的 100 条 ISSR 引物序列和文献中提供的引物序列^[18], 由上海生工合成; 其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 独蒜兰基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法^[19]提取基因组 DNA。

2.2 ISSR-PCR 反应体系

总反应体系为 20 μ L, 内含 10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 1.5 mmol/L, dNTPs 2.5 0.4 mmol/L, 引物 0.2 μ mol/L, DNA 模板(约 50 ng), Taq DNA

聚合酶 U (0.8 U), 在冰上配制反应体系。94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 46~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s (每条引物的退火温度不同, 经梯度 PCR 筛选后确定最佳退火温度), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存结束反应。

2.3 产物检测

DNA 质量检测采用 1%琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物采用 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结束后照相保存。

2.4 数据处理和分析

条带统计方法为有带记为 1, 无带记为 0。分析独蒜兰的多态位点百分率(PPB)、位点多态信息量(PIC)、每个位点的有效等位基因数(N_e), 基因型多样性指数(H')。计算原理与方法参照董玉琛等^[20]的方法。

$PPB = \text{多态性位点数} / \text{扩增总位点数}$

$PIC = 1 - \sum P_i^2$

$N_e = 1 / \sum P_i^2$

$H' = -\sum P_i \ln P_i$

P_i 指第 i 个等位基因变异出现的频率

利用软件 NTSYS-pc2.2 软件分析统计数据, 计算各材料间 Jaccard 遗传相似系数, 并用类平均法

(UPGMA) 对 23 份独蒜兰种质资源构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 扩增结果

从相关文献和网上数据库查找合成的 100 条 ISSR 引物序列中筛选获得 12 条扩增条带清晰、多态性好、重复性好的引物, 引物信息见表 2。利用这些引物对 23 份独蒜兰进行扩增, 共检测出 80 个多态性等位位点, 每条引物检测到 4~15 个位点, 平均为 6.667 个, 扩增片段大多在 200~1 500 bp。引物 UBC-827 和 UBC-822 在独蒜兰种质中的扩增结果如图 1 所示。检测到多态性等位位点最多的是

引物 58R, 共检测到 15 个等位位点, 其次是 UBC-840 和 UBC-815, 各检测到 10 个等位位点。ISSR 引物的 PIC 变幅为 0.678~0.890, 平均为 0.792; 其中, PIC 值高于平均值的 ISSR 引物 7 条, 占全部引物的 58.3%。 N_e 变幅为 3.102~9.066, 平均为 5.302; 其中 N_e 高于平均值的 ISSR 引物 5 条, 占全部引物的 41.7%。 H' 变幅为 1.305~2.429, 平均为 1.711, 12 条 ISSR 引物的 H' 大于 1.00。以上结果表明, 所选用的 12 条引物的多态性较高, 不同资源的 DNA 具有丰富的遗传多样性, 利用 ISSR 分子标记技术能够揭示独蒜兰资源间的遗传差异。

表 2 引物扩增等位位点数和 PIC 值

Table 2 Location of ISSR primers on number of alleles and PIC value

引物	序列 (3'-5')	扩增总位点	多态性位点	PPB/%	PIC	N_e	H'
UBC-864	(ATG) ₆	6	5	83.33	0.788	4.713	1.580
UBC-841	(GA) ₈ YC	4	4	100.00	0.715	3.513	1.321
UBC-840	(GA) ₈ YT	10	10	100.00	0.796	4.895	1.759
UBC-807	(AG) ₈ T	5	5	100.00	0.778	4.513	1.553
58R	CGTCGGGGCAGGTTTACGTC	15	15	100.00	0.887	8.854	2.429
UBC-835	(AG) ₈ YC	6	6	100.00	0.820	5.556	1.753
UBC-811	(GA) ₈ C	5	4	80.00	0.678	3.102	1.305
UBC-815	(CT) ₈ G	10	9	90.00	0.890	9.066	2.254
UBC-822	(TC) ₈ A	6	5	83.33	0.816	5.442	1.739
UBC-824	(TC) ₈ G	5	5	100.00	0.723	3.614	1.362
UBC-813	(CT) ₈ T	7	7	100.00	0.819	5.520	1.775
UBC-827	(AC) ₈ G	7	5	71.43	0.793	4.840	1.698

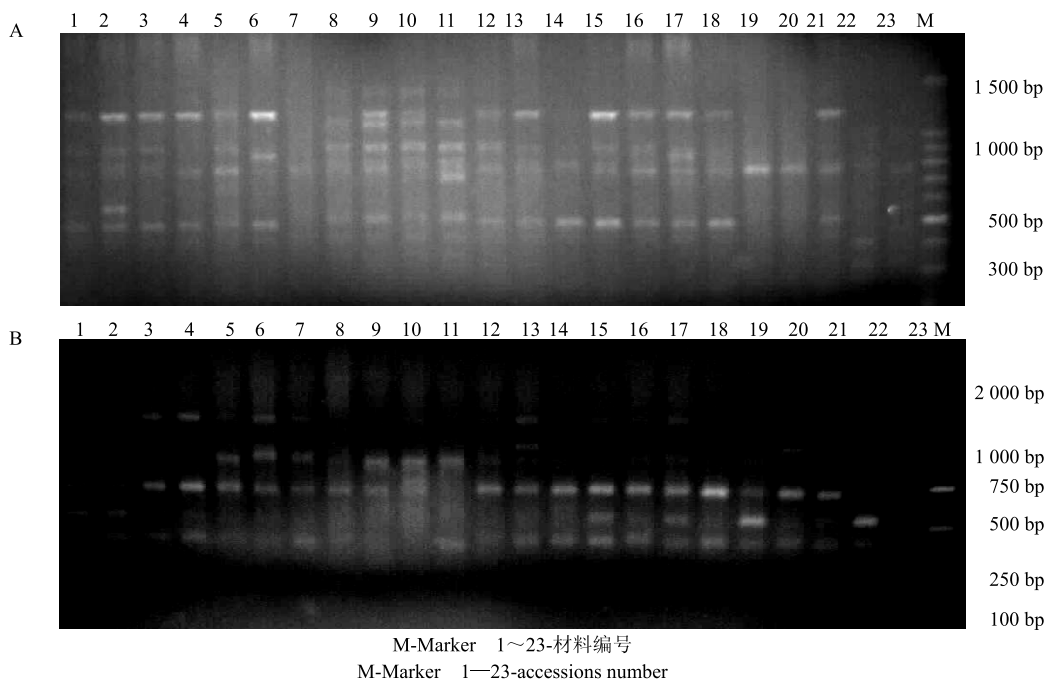


图 1 引物 UBC-827 (A) 和 UBC-822 (B) 对 23 份独蒜兰资源的扩增结果

Fig. 1 ISSR markers amplified by UBC-827 (A) and UBC-822 (B) primer in 23 *P. bulbocodioides* germplasm resources

3.2 遗传相似性分析

经数据统计分析,独蒜兰种质资源的遗传相似系数统计结果见表 3。由表 3 可见,每份独蒜兰种质的遗传相似性系数均值分布在 0.625~0.733,其中均值最小的为 13 号样本,均值最大的为 9 号样本。从两两样本间的遗传相似系数来看,最高值为 0.918(样本编号 14 和 15),次高值为 0.906(样本编号 7 和 8),最小值为 0.506(样本编号 3 和 16)。整体而言,同一来源的资源亲缘关系更近,从居群来看,雷山独蒜兰资源与其他居群的遗传相似性系数最小,说明来自雷山的独蒜兰和其他地区的独蒜兰亲缘关系较远。

3.3 聚类分析

基于 Jaccard 遗传相似系数的聚类分析表明,在阈值 0.65 处,23 份独蒜兰种质资源分为 2 个类群(图 2)。第 I 类群包含 16 份种质资源,其中 7 份云南丽

表 3 供试独蒜兰种质资源的遗传相似性

Table 3 Genetic similarity of tested *P. bulbocodioides* germplasm resources

品种编号	遗传相似性系数		
	平均值	最大值	最小值
1	0.640	0.718 (12)	0.541 (15)
2	0.676	0.776 (6)	0.541 (16)
3	0.666	0.871 (4)	0.506 (16)
4	0.672	0.871 (3)	0.529 (15)
5	0.714	0.871 (6)	0.588 (13)
6	0.722	0.871 (5)	0.600 (13)
7	0.728	0.906 (8)	0.612 (1, 13)
8	0.690	0.906 (7)	0.565 (13, 16)
9	0.733	0.847 (7)	0.624 (13)
10	0.710	0.788 (7)	0.659 (1, 13, 14, 17, 19)
11	0.697	0.800 (6, 9)	0.553 (15)
12	0.683	0.765 (19)	0.612 (8)
13	0.625	0.871 (15)	0.529 (3)
14	0.654	0.918 (15)	0.541 (4)
15	0.648	0.918 (14)	0.518 (3)
16	0.643	0.847 (15)	0.506 (3)
17	0.660	0.718 (12)	0.612 (8, 11, 22)
18	0.679	0.800 (23)	0.588 (14)
19	0.684	0.800 (20)	0.529 (3)
20	0.707	0.812 (22)	0.588 (13)
21	0.663	0.776 (20)	0.529 (13)
22	0.697	0.812 (20)	0.588 (13, 16)
23	0.683	0.800 (18)	0.565 (4)

括号内数字为资源编号

Digital shown in bracket represents germplasm number

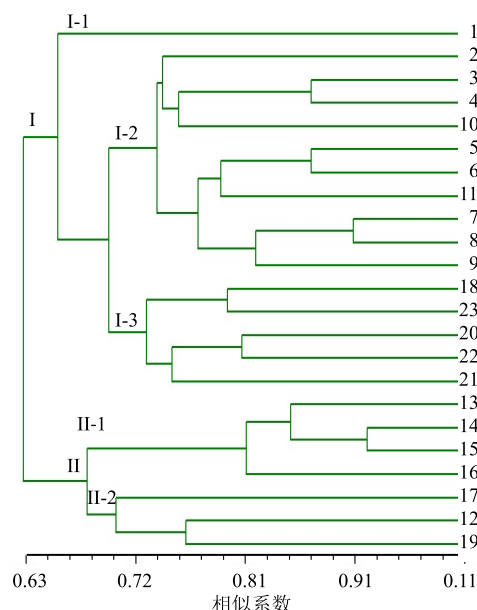


图 2 基于遗传相似性系数构建的 23 份独蒜兰种质的聚类图
Fig. 2 Dendrogram of 23 *P. bulbocodioides* accessions based on genetic similarity coefficient

江样本,7 份四川凉山样本,2 份云南楚雄样本。第 II 类群包含 7 份种质资源,其中 1 份云南丽江样本,1 份云南楚雄样本,5 份贵州雷山样本。第 I 类群又可分为 3 个亚类种质资源,其中第 1 亚类包含 1 份丽江样本,第 2 亚类包含 3 份丽江样本和 7 份凉山样本,第 3 亚类包含 3 份丽江样本和 2 份楚雄样本。第 II 类群又可分为 2 个亚类种质资源,其中第 1 亚类包含 4 份雷山样本,第 2 亚类包含 1 份丽江样本、1 份楚雄样本和 1 份雷山样本。从聚类图中可以看出云南资源广泛分布于各类群,四川资源分布较为集中,贵州资源分布也相对集中。这说明聚类结果和地域来源有一定关系,云南居群的独蒜兰资源遗传多样性更为丰富。

4 讨论

独蒜兰药用价值高,因其对生境要求严格,自身繁殖力低,人工鲜有栽培。近年来,过度的采挖造成野生独蒜兰资源渐趋灭绝,市场上假冒伪劣品也较多,药源质量难以保障^[21-22]。鉴于此,一方面应加强现有野生独蒜兰资源的保护力度;另一方面应尽早开展独蒜兰种质资源的评价和利用工作,以培育出一批适于工厂化生产的优异品种,保障独蒜兰药材市场的供应。对所收集材料进行遗传多样性分析是有效利用和保护独蒜兰种质资源的关键环节,也为开展育种工作奠定基础。

我国独蒜兰种质资源非常丰富,云、贵、川是

其主要分布区域,本研究利用 ISSR 技术从分子水平分析 23 份独蒜兰种质资源的遗传多样性,结果表明我国独蒜兰资源遗传多样性丰富。因独蒜兰主要靠假鳞茎无性繁殖,故各居群间的基因交流少,不同产区因其自然环境的特异,产生较大的遗传变异。另外因各产区立体自然气候特征明显,也导致同一产区的资源多样性较为丰富。聚类结果显示相同地理来源的资源间亲缘关系较近,不同来源地的部分资源间也表现出近缘关系,说明个别种可能在不同省份均有分布。在独蒜兰种质资源鉴定、评价过程中,单以表型辨别资源间的遗传差异存在较大困难,同时,鉴定结果也不够准确。通过表型性状结合分子鉴定,对我国独蒜兰资源进行遗传多样性分析和客观评价,对独蒜兰资源的生物分类、引种驯化和优良栽培种选育具有重要指导意义。

参考文献

- [1] 文 林. 山慈姑的功用 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 65: 343.
- [2] 董海玲, 郭顺星, 王春兰, 等. 山慈姑的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1734-1738.
- [3] 李丹平, 陈雨洁, 万定荣, 等. 鄂西土家族常用兰科植物药 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2009, 28(1): 48.
- [4] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [5] 刘 强, 尹 翔, 杨 艳, 等. 白檀自然居群遗传结构与遗传多样性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(4): 751-758.
- [6] 罗玥倩, 陈丹娜, 李 妍, 等. 6 种委陵菜属药用植物的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2736-2739.
- [7] 李晓玲, 杨 进, 张 雄, 等. 10 份续断属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 450-456.
- [8] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
- [9] 孙稚颖, 姚 辉. 不同产地菰蓝 ISSR 分析与鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3323-3326.
- [10] Lei Y D, Gao H, Tsering T, *et al.* Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats [J]. *Gene Mol Biol*, 2006, 29(2): 339-344.
- [11] 张丽娜, 金吉芬, 张金霞, 等. 不同产地独蒜兰资源栽培比较研究 [J]. 北方园艺, 2013(24): 153-155.
- [12] 张 燕, 李思锋, 黎 斌. 独蒜兰的生物学特性及栽培技术 [J]. 陕西农业科学, 2010(1): 267-268.
- [13] 李洪林, 付志惠, 杨 波. 独蒜兰的离体快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 632.
- [14] 吴丽芳, 张素芳, 杨春梅, 等. 滇独蒜兰的组织培养研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 749-752.
- [15] 黄永会, 朱国胜, 毛堂芬, 等. 云南独蒜兰原球茎诱导与增殖的研究 [J]. 贵州农业科学, 2009, 37(7): 16-18.
- [16] 蓝家望, 桂 阳, 张丽娜, 等. 独蒜兰种子自然萌发特性分析 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(9): 2077-2082.
- [17] 蓝家望, 桂 阳, 张丽娜, 等. 独蒜兰种子的自然萌发特性 (II) [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(6): 59-62.
- [18] 于晓娟. 独蒜兰组织培养及其生物多样性的 ISSR 分析 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [19] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Amer J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.
- [20] 董玉琛, 曹永生, 张学勇, 等. 中国普通小麦初选核心种质的产生 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1): 1-8.
- [21] 张 燕, 李思锋, 黎 斌. 独蒜兰属植物研究现状 [J]. 北方园艺, 2010(10): 232-234.
- [22] 张正海, 李爱民, 魏盼盼. 山慈姑应用现状及研究方向 [J]. 特产研究, 2009, 31(4): 74-77.