

- [15] 邵建, 刘艳丽, 李笑然, 等. 莲子的化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(10): 1661-1664.
- [16] Sakamoto Y, Ono M. The relative signs of NMR proton-carbon coupling constants in quinolines [J]. *J Mol Struct*, 2012, 1013: 61-66.
- [17] 刘培, 冯煦, 董云发, 等. 北柴胡茎叶化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2103-2104.
- [18] 安亮, 何侃, 张沿军, 等. 双边栝楼果实化学成分研究[J]. 中南药学, 2015, 13(1): 37-39.
- [19] 尹伟, 宋祖荣, 刘金旗, 等. 香橼化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2091-2094.
- [20] 林建斌, 赵立春, 郭建忠, 等. 金荞麦地上部分化学成分的研究[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1841-1844.

## 白及遗传多样性的 ISSR 分析

郭艳<sup>1</sup>, 洪建聪<sup>1</sup>, 陈铤铍<sup>1</sup>, 高承贤<sup>1</sup>, 丁志山<sup>2</sup>, 金波<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学医学技术学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** 目的 对白及遗传多样性进行 ISSR 分析。方法 以全国 50 批不同产地来源的白及为实验材料, 采用 ISSR 分子标记方法进行各材料间的遗传距离分析。结果 10 个 ISSR 引物共扩增出 117 个条带, 平均每个引物产生 11.7 个条带, 其中多态性条带 111 条, 平均多态性百分率为 94.9%。通过聚类分析, 50 份白及样品在遗传系数 0.57 的水平上共聚类为 2 大类群。结论 不同产地的白及具有较丰富的遗传多样性, ISSR 可有效应用于白及的遗传多样性研究。

**关键词:** 白及; 遗传多样性; ISSR; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)09-2020-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.027

## ISSR analysis on genetic diversity of *Bletillae Rhizoma*

GUO Yan<sup>1</sup>, HONG Jian-cong<sup>1</sup>, CHEN Ni-pi<sup>1</sup>, GAO Cheng-xian<sup>1</sup>, DING Zhi-shan<sup>2</sup>, JIN Bo<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 2. College of Medical Technology, Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

**KEY WORDS:** *Bletillae Rhizoma*; genetic diversity; ISSR; cluster analysis

白及又称白芨、紫兰等, 兰科多年生草本植物 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。集庭院观赏和药用双重功能于一体, 其假鳞茎可供药用, 具收敛止血、消肿生肌功效<sup>[1]</sup>, 同时还有较强的抗氧化、抗衰老作用, 可用于保健、护肤及美容养颜等<sup>[2-3]</sup>。另外, 白及中含有丰富的白及多糖胶, 在食品中可作为增稠剂, 在化妆品等行业也有较好的应用<sup>[4-6]</sup>, 具有重要的经济价值。因种类不同白及花色和形状等也会不同, 可被分为白及 *Bletilla striata*、小白及 *Bletilla formosana*、黄花白及 *Bletilla ochracea*V 和华白及 *Bletilla sinensis*, 主要产于江苏、浙江、江西、安徽、云南、贵州等地区<sup>[7]</sup>。野生白

及的种子发育不完整, 且种子表面包被 1 层种皮, 对于仅有种胚的种子的发芽是极大的障碍, 使得野生白及种子很难在自然条件下发芽<sup>[8]</sup>。目前野生白及已被列为国家珍稀濒危药用植物, 因受药材道地性观念的影响, 野生白及与栽培白及市场价格悬殊, 导致人们对野生白及过度采挖<sup>[9]</sup>。开展野生白及种质资源分析和保护工作刻不容缓, 但从形态特征上很难将不同种源的野生白及进行确切的归类, 给种质资源保育工作带来了一定的困难<sup>[10-11]</sup>。

DNA 分子标记技术作为鉴定作物品种的主要方法之一, 在遗传连锁图谱的构建、遗传关系鉴定方面的应用已较为成熟。简单序列重复间区扩增

收稿日期: 2017-10-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81503329); 科技厅公益性应用项目 (2015C32084)

作者简介: 郭艳 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为微生物与生化药学。Tel: 15757195144, E-mail: 1329203968@qq.com

\* 通信作者: 金波, 女, 副教授, 从事分子遗传学研究。Tel: (0571) 86613666, E-mail: jinbo@zemu.edu.cn

(ISSR) 是一种新型分子标记, 它可以在植物基因组序列未知的情况下就可进行引物设计, 且重复性好、多态性丰富、实验稳定性较高<sup>[12]</sup>, 已成功应用于杂交后代鉴定分析、植物遗传多样性分析等众多研究领域<sup>[13-44]</sup>。与以往的分子标记相比, ISSR是检测高度串联重复序列间序列多态性的分子标记技术<sup>[15]</sup>, 可以提供更丰富的基因组 DNA 信息。

本研究采用 ISSR 分子标记技术对采自不同地区的 50 份白及遗传多样性进行研究, 探究各白及间的遗传背景, 分析其遗传多样性, 为白及的选育、保护和开发、构建白及 DNA 指纹图谱奠定基础。

### 1 仪器与材料

FFG02HSD PCR 仪 (英国 Techne 公司); ZF-

90 型暗箱式紫外透射仪 (上海顾村电光仪器厂); ultrospec3300pro 微量核酸测量仪 (英国 Amersham 公司); DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂); 冷冻台式高速离心机 (德国 Heraeus 公司)。异丙醇 (杭州双林化工试剂厂, 分析纯); 氯仿 (迪耳药业有限公司, 分析纯); ISSR Primers (上海生工生物工程技术有限公司); Taq 酶 (宝生物工程有限公司); dNTP (宝生物工程有限公司); CTAB 提取液 (自制); 酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 混合物 (自制); 5 × TBE 电泳缓冲液 (自制)。

实验所用白及采自河南、安徽、湖北等省。由浙江中医药大学丁志山教授鉴定为正品, 具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	拉丁名	描述	编号	产地	拉丁名	描述
1	安徽黄山市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	26	四川宜宾市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花
2	安徽宣城市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	27	四川广元市	<i>Bletilla sinensis</i>	白花
3	安徽宣城市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	28	四川巴中市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
4	安徽六安市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	29	云南丽江市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花
5	安徽铜陵市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	30	云南丽江市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花
6	安徽大别山	<i>Bletilla striata</i>	紫花	31	云南文山市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
7	湖北荆门市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	32	云南红河州	<i>Bletilla striata</i>	紫花
8	湖北荆门市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	33	河南省南阳市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
9	湖北黄冈市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	34	河南卢氏县	<i>Bletilla striata</i>	紫花
10	湖北黄冈市 2 号	<i>Bletilla ochracea</i> V	黄花	35	贵州赤水市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
11	湖北黄冈市 3 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	36	贵州遵义市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
12	湖北襄阳市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	37	贵州六盘水市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
13	湖北襄阳市 2 号	<i>Bletilla sinensis</i>	白花	38	江西萍乡市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
14	湖北武穴市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	39	江西宜春市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
15	湖北随州市	<i>Bletilla sinensis</i>	白花	40	广西钦州市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
16	湖北宜昌市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	41	广西桂林市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
17	湖北十堰市	<i>Bletilla sinensis</i>	白花	42	广西河池市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
18	陕西汉中市 1 号	<i>Bletilla sinensis</i>	白花	43	重庆市綦江区	<i>Bletilla striata</i>	紫花
19	陕西汉中市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	44	湖南张家界	<i>Bletilla striata</i>	紫花
20	陕西汉中市 3 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	45	浙江龙泉市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花
21	陕西汉中市 4 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	46	浙江龙泉市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花
22	陕西安康市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	47	浙江台州市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
23	陕西安康市 2 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	48	浙江丽水市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
24	陕西商洛市	<i>Bletilla striata</i>	紫花	49	浙江杭州市	<i>Bletilla striata</i>	紫花
25	四川宜宾市 1 号	<i>Bletilla striata</i>	紫花	50	浙江金华市	<i>Bletilla striata</i>	紫花

### 2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 取健康白及的嫩叶, 根据改进的十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 法来提取白及基因组 DNA<sup>[16]</sup>, 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的完整性, 选择泳带清晰、无拖尾、无降解的样品。

2.2 ISSR-PCR 引物筛选 以 33 号白及样品的

DNA 提取物为模板, 进行 ISSR 引物筛选, 筛选出扩增条带明显, 多态性好的引物。

2.3 ISSR-PCR 扩增 ISSR 引物按照参考文献<sup>[17-19]</sup>由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。根据要求将其稀释至 10 μmol/L 于 -20 °C 低温冰箱保存备用。PCR 反应相关试剂购于大连宝生物公司。以文献为基础, 优化 ISSR 的 PCR 扩增

体系。白及 ISSR-PCR 反应体系含 10 × Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL、5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、10 μmol/L ISSR 引物 1 μL、DNA1 μL，双蒸水补足总体积至 20 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min，94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，共 35 个循环，循环结束后 72 °C 延伸 5 min，最后 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。根据结果对显示的条带位置作基因分型。

2.4 数据采集与统计分析 每份样品结果记为“1”和“0”，其中“1”代表带赋值，“0”代表无

赋值，最后生成二进制矩阵。利用 Excel 表求相似系数矩阵、遗传距离指数及平均遗传相似系数<sup>[20]</sup>，用 NTsys-pc 2.1 软件按非加权配对算术平均法 (UP-GMA) 建立各地区样品间的亲缘关系聚类图。

### 3 结果与分析

3.1 DNA 提取结果 用改良的 CTAB 法提取 50 份白及样品鲜嫩叶片的基因组 DNA，结果见图 1，电泳条带清晰，未被蛋白质污染，也无降解，基因组 DNA 纯度较高。所提 DNA 的质量能满足后续 PCR 扩增反应。

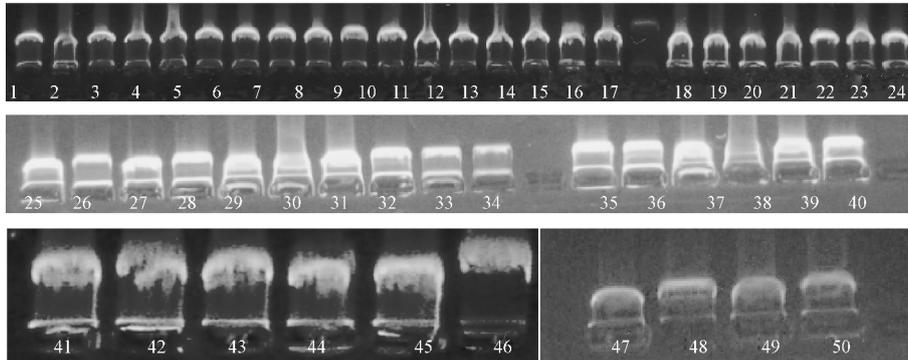
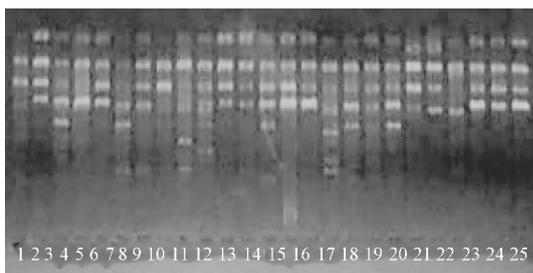


图 1 50 批样品 DNA 电泳图  
Fig. 1 Electrophoretogram of fifty batches of samples

3.2 ISSR-PCR 扩增结果 用优化后的反应体系以 33 号样品 DNA 为模板，进行 ISSR 引物筛选。从 45 条引物中挑选了 10 条扩增条带清晰、重复性高、多态性高的 ISSR 引物 (见图 2)，用于 50 批白及样品的 PCR 扩增及多态性研究，引物序列见表 2。10 条引物进行扩增总共得到 117 个条带，平均每个引物产生 11.7 个条带，其中多态性谱带 111 条，多态性比率为 94.9%。UBC807 引物的 ISSR-PCR 结果示例见图 3，表明白及样品的遗传多样性较为丰富。



注: 1-25 为引物 UBC801-825  
图 2 引物筛选结果

Fig. 2 Results of primer screening

3.3 聚类分析 用 NTsys-2.1 软件对 10 条引物的扩增结果进行聚类分析 (见图 4~5)，表明 50 种

表 2 ISSR 引物及扩增产物水平

Tab. 2 ISSR primers and levels of amplified products

编号	序列	编号	序列
UBC807	AGAGAGAGAGAGACT	UBC818	CACACACACACACAG
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGC	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAC	UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAA	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAYT
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	UBC857	ACACACACACACACTG

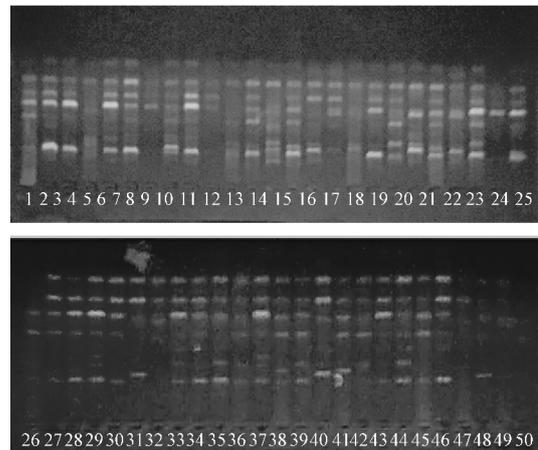


图 3 50 批样品的 ISSR UBC807 扩增图谱  
Fig. 3 ISSR amplification of primer UBC807 for fifty batches of samples

白及样品在遗传系数 0.57 的水平上共聚类为 2 大类群 I 和 II。II 类为 50 号样品，采自浙江金华磐安县安文镇，与其他样品的遗传距离较远。I 类包括 49 份样品，可在相似性系数 0.67 标准时，将其中样品进一步分为五小类，第一类仅有 20 号，为陕西留坝县野生（紫花）家种样品；第二类由 24 号陕西商洛市样品和 22 号陕西安康市 1 号样品组成；第三类由 17、6、43、7、26、37、48、8、30、13、39、49、28、42、16、11、36、21、40、25、32、33、23、5 号组成；第四类由 44、35、15、4 号组成；第五类由 1、9、41、29、2、12、38、47、31、18、10、27、46、14、45、3、19、34 号组成。其中 8 号湖北荆门市 2 号样品和 30 号云南丽江市 2 号样品的遗传相似系数最接近，其遗传相似系数为 0.87。在育种时，为达到杂种优势最大，应选取遗传关系相对较远的材料作为亲本。

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.000 0							
2	0.882 8	1.000 0						
3	0.619 7	0.647 9	1.000 0					
4	0.704 2	0.732 4	0.605 6	1.000 0				
5	0.521 1	0.577 5	0.591 5	0.535 2	1.000 0			
6	0.563 4	0.619 7	0.698 1	0.605 6	0.547 9	1.000 0		
7	0.619 7	0.732 4	0.698 1	0.605 6	0.704 2	0.718 3	1.000 0	
8	0.647 9	0.704 2	0.718 3	0.662 0	0.647 9	0.774 6	0.698 1	1.000 0
9	0.774 6	0.718 3	0.788 6	0.619 7	0.633 8	0.704 2	0.675 1	0.768 6
10	0.704 2	0.704 2	0.662 0	0.662 0	0.563 4	0.662 0	0.577 5	0.662 0
11	0.605 6	0.605 6	0.619 7	0.591 5	0.718 3	0.563 4	0.704 2	0.676 1
12	0.718 3	0.831 0	0.647 9	0.647 9	0.633 8	0.563 4	0.704 2	0.704 2
13	0.605 6	0.698 1	0.563 4	0.647 9	0.718 3	0.647 9	0.732 4	0.768 6
14	0.768 6	0.732 4	0.746 5	0.605 6	0.563 4	0.605 6	0.662 0	0.698 1
15	0.732 4	0.704 2	0.533 8	0.698 1	0.587 0	0.521 1	0.585 6	0.633 8
16	0.577 5	0.662 0	0.676 1	0.647 9	0.746 5	0.647 9	0.704 2	0.647 9
17	0.549 3	0.633 8	0.619 7	0.591 5	0.698 1	0.816 9	0.788 7	0.647 9
18	0.704 2	0.788 7	0.605 6	0.662 0	0.563 4	0.662 0	0.718 3	0.633 8
19	0.718 3	0.718 3	0.676 1	0.647 9	0.605 6	0.676 1	0.563 4	0.732 4
20	0.563 4	0.676 1	0.605 6	0.633 8	0.676 1	0.577 5	0.549 3	0.577 5

图 4 部分样品相似度 (1~8、1~20)

Fig. 4 Similarities of partial samples (1~8、1~20)

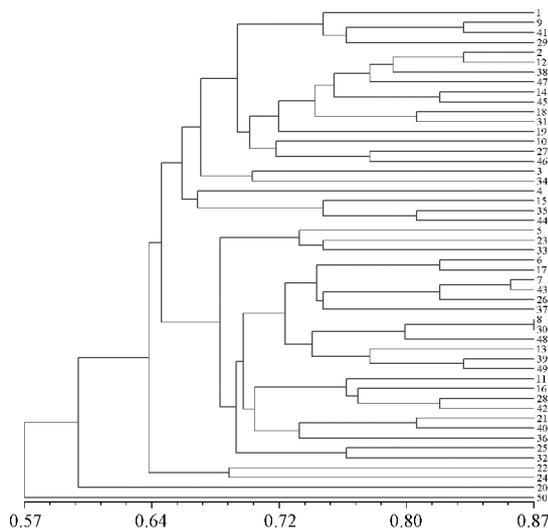


图 5 50 批样品聚类树状图

Fig. 5 Dendrogram of fifty batches of samples

#### 4 讨论

濒危物种遗传多样性水平通常较低<sup>[21]</sup>，但有

研究发现，一些遗传多样性水平保持在较高水平的物种也是濒危物种。基于中国生物多样性保护策略及行动计划（2011 年—2013 年），近年已经对濒危物种实施了针对性加强的保护和生境修复的措施，并增加了法律的执行力<sup>[22-24]</sup>。白及保护管理的主要目的之一是保护白及的遗传多样性。采集全国各地多种白及嫩叶作为样品，利用非编码区微卫星位点（ISSR）的多态性对其遗传多样性进行研究。ISSR 分子标记之所以能成为一种理想的种群内及种群间遗传多样性研究方法之一，是因为其能够揭示物种基因组内的多态性位点<sup>[18]</sup>。而在非编码区微卫星位点中，10 个 ISSR 引物获得的多态性比率为 94.9%，表明采集的白及遗传多样性较为丰富。通过比较几种与其生活特性相似的兰科植物<sup>[25-27]</sup>，白及同样具有较高的遗传多样性水平。结果显示遗传多样性低并不是造成其成为濒危物种的原因。

分子标记技术不受环境和植物发育期的影响，是揭示 DNA 序列多态性和检测基因变异的理想研究方法<sup>[28]</sup>。简单重复序列区间 ISSR 是以 PCR 为基础，为许多生物尤其是植物，提供一个可靠的标记系统，扩增 2 个已知相反方向的微卫星重复序列区间的 DNA<sup>[29-30]</sup>。尽管 ISSR 标记同时具有 RAPD 和 SSR 的优点，但它不能辨别杂合基因型和显性纯合基因型，属于显性遗传标记，这无疑妨碍了它在居群遗传学中的深入应用。

对采集的样品聚类分析得知，来自不同省份的白及样品亲缘关系可以很近，且与白及花色无关，如 8 号湖北荆门市 2 号样品和 30 号云南丽江市 2 号样品，两者虽采自不同地区，但相似度最接近，因此推测 8 号和 30 号样品虽然采自不同地区。且 8 号湖北荆门市 2 号样品为家种样品，而 30 号云南丽江市 2 号样品为野生样品。但目前种植品种网上交流很多，可能属于同一种属的白及，只是因为生长的土壤、养料、温度、水分差异，导致遗传性状产生了变化，具体原因需进一步探究。同时发现采集自同一省份同一地区的白及样品亲缘关系也会相距甚远，如 20 号样品（陕西汉中市 3 号样品）在 I 类中独成一类，与同样来自于陕西汉中市市的 18、19 号样品亲缘关系相差甚远，可能 20 号样品为家种样品，在对其进行移植栽培时以及它长期的生长过程中，因其种子以及花粉的散布，可能出现种内种间的杂交现象，导致种内甚至种间基因交流。在采样采访时发现，由于物流方便，种植白及的地区间交流非常方便，有不少白及种植药农均从

云南等地采购白及种质。此外,根据聚类图,除了某些省份课题组只采集了一个地区的白及样品外,发现平均每个省份的白及样品都可被聚类成2~3类,以湖北省陕西省的白及类别最多,因此推测这2个省份的白及由于白及种植户间交流密切,白及移栽以及交叉种植情况严重,可能拥有较高的遗传变异特性。因此,对拥有较高遗传变异的地区,应适当采用隔离措施,优先考虑给予保护,这样有助于优良种质进行保存。性状互补的种质也可考虑通过种间杂交进行品质的改良。

利用 ISSR 技术对常见的白及进行遗传多样性研究,了解现有白及的亲缘关系,利于对现有优良种质资源研究,为构建白及的遗传连锁图谱奠定基础。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 95.

[2] 芮海云, 吴国荣, 陈景耀, 等. 白及中性多糖抗氧化作用的实验研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2003, 26(4): 94-98.

[3] 刘光斌, 黄忠, 黄长干, 等. 天然植物白及胶的功能及在化妆品中的应用[J]. 日用化学品科学, 2005, 28(8): 22-24.

[4] 芮海云, 吴国荣, 陈景耀, 等. 白及中性杂多糖的分离纯化与结构分析[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(1): 30-33.

[5] 张宇思, 姚正颖, 刘金香, 等. 基于原球茎液体培养的白及快速繁殖研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 59-62, 331.

[6] 孔令姍. 白及多糖的提取与功效研究[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2015.

[7] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[8] 余磊磊, 周京龙, 高中南, 等. 野生白及再生体系的建立及抗性筛选[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 43-46.

[9] 李伟平, 何良艳, 丁志山. 白及的应用及资源现状[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 158-160.

[10] Fu L K, Jin J M. China plant red data book: rare and endangered plants (Vol. 1) [M]. Beijing: Sci Press, 1992: 328.

[11] 蒋瑞彬, 徐旭栋, 蓝小明, 等. 野生白及 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 353-355, 463.

[12] 吴则东, 江伟, 马龙彪. 分子标记技术在农作物品种鉴定上的研究进展及未来展望[J]. 中国农学通报. 2015, 31(33): 172-176.

[13] 侯渝嘉, 何桥, 梁国鲁, 等. 茶树杂交后代的 ISSR 分析[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28

(2): 267-270.

[14] 吴学尉, 崔光芬, 吴丽芳, 等. 百合杂交后代 ISSR 鉴定[J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 749-754.

[15] 王东娜, 牟长城, 高卓. 胡桃楸天然种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 经济林研究, 2011, 29(2): 22-29.

[16] 张妙彬, 潘丽晶, 范干群, 等. 富含多糖的转基因石斛基因组 DNA 提取方法[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 209-214.

[17] 杨立昌, 邓辉, 乙引, 等. 药用石斛 ISSR 分子标记研究[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1841-1844.

[18] 白成科, 文苗苗, 于凤, 等. 基于 ISSR 分子标记技术构建黄芩核心种质的方法研究[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1689-1694.

[19] Verma S, Rana T S. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* (L.) Spreng., as revealed by ISSR analysis[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2011, 39(2): 139-144.

[20] 艾华水, 黄路生. 利用 Excel 电子数据表计算遗传相似系数的方法[J]. 生物信息学, 2005, 3(3): 116-120.

[21] 孙林, 耿其芳. 珍稀濒危植物遗传多样性研究方法及其影响因素[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(13): 3793-3798.

[22] 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 123-140.

[23] Foster S A. The evolutionary process: a critical study of evolutionary theory by Verne Grant[M]. New York: *Q Rev of Biol*, 1993.

[24] Soltis P S, Soltis D E. Genetic variation in endemic and wide-spread plant species: examples from *Saxifragaceae* and *Polystichum* (Dryopteridaceae) [J]. *Aliso*, 1991, 13(1): 215-223.

[25] Ye M R, Hou B W, Luo J, et al. Genetic diversity and conservation of the endangered herb *Dendrobium moniliforme* based on amplified fragment length polymorphism markers [J]. *Sci Hort*, 2015, 189: 51-58.

[26] Wang H Z, Wu Z X, Lu J J, et al. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Genetica*, 2009, 136(3): 391-399.

[27] Li X X, Ding X Y, Chu B H, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP[J]. *Genetica*, 2008, 133(2): 159-166.

[28] Akhare A, Sakhare S, Kulwal P, et al. RAPD profile studies in *Sorghum* for identification of hybrids and their parents [J]. *Int J Inter Biol*, 2008, 3(1): 18-24.

[29] Ghosh J. Molecular diversity analysis of flower colour variants of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. using intersimple sequence repeats[J]. *The Bioscan*, 2013, 8(3): 969-974.

[30] Choudhary R S, Zagade V S, Khalakar G D, et al. ISSR based genotypic differentiation of grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *The Bioscan*, 2014, 9(2): 823-828.