

独占春×美花兰杂交 F₁ 代基于 SSR 标记的杂种鉴定和遗传多样性分析

韩 豫, 陈 彧, 饶丹丹, 陈显臻, 陈国德

海南省林业科学研究院 (海南省红树林研究院), 海南海口 571100

摘 要: 海南原生种独占春和美花兰属兰花稀缺濒危种, 分别是我国野生植物二级和一级保护植物, 为对其种质资源进行保护和开发利用, 以独占春和美花兰作为亲本进行杂交, 并获得杂交群体。为准确鉴定独占春×美花兰杂交种真实性, 分析杂交 F₁ 代与亲本间的遗传关系, 采用 SSR 标记对独占春和美花兰杂交 F₁ 代 23 个杂交后代进行杂种鉴定、遗传多样性分析和聚类分析。结果表明: 通过 PCR 技术从 48 对引物中筛选出 8 对引物, 运用 SSR 分子标记证实了 23 个杂交后代是真杂种, 杂种真实率为 100%。其中, 引物 Cym45、Hub131 和 Hub8 鉴定的 23 个杂交后代均兼具双亲特异位点, Hub125 鉴定的 23 个杂交后代仅具有父本特异位点, 引物 Cym9 鉴定出 1 个新的位点; 引物 Cym25、Hub125 和 Cym47 呈低度多态性 [多态性信息含量 (PIC) < 0.25], 引物 Cym45、Hub131、Hub8 和 Cym9 呈中高度多态性 (0.25 < PIC < 0.5), 引物 Cym172 的 PIC 为 0.59, 具有高度多态性, 可作为独占春×美花兰杂交后代指纹图谱构建的优选引物; UPGMA 聚类分析结果表明, 当遗传系数为 0.8111 时, 可将受测材料分为 3 类, 亲本各为一类, 杂交后代为一类。杂交后代又可分为 3 个分支, X₇ 为一个分支, X₆ 和 X₂₁ 聚类在一起, 其余 20 个 F₁ 代单株聚类为一簇。表明 SSR 标记应用于海南原生种兰花杂种鉴定和遗传多样性分析切实可行, 可为海南兰花育种、选种提供有效的技术支撑和数据基础。同时, SSR 标记的 PIC 是反映分子标记能力的一个重要指标, 本研究开发的中高度多态性引物 and 高度多态性引物可为海南野生兰花基因文库的构建, 海南野生兰种质资源库的建立和开发奠定基础。

关键词: 独占春; 美花兰; 杂交 F₁ 代; SSR; 杂种鉴定; 遗传多样性

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Identification and Genetic Diversity Analysis of Hybrid Progenies from *Cymbidium eburneum* × *Cymbidium insigne* by SSR

HAN Yu, CHEN Yu, RAO Dandan, CHEN Xianzhen, CHEN Guode

Hainan Academy of Forestry (Hainan Academy of Mangrove), Haikou, Hainan 571100, China

Abstract: *Cymbidium eburneum* and *Cymbidium insigne* are species endemic to Hainan exclusively and belong to the endangered species. 23 F₁ hybrid progenies from *C. eburneum* and *C. insigne* were used to accurately verify hybrids, to clarify the genetic relationships between hybrid progenies and the parents with SSR molecular markers. Eight pairs of primers were screened out from 48 pairs of primers using PCR, and 23 hybrid progenies were confirmed to be true hybrids, with the true rate of hybrid progenies 100%. 23 hybrids populations identified by primers Cym45, Hub131 and Hub8 had both parental specific loci. 23 hybrid populations identified by primers Hub125 had only father specific loci, Cym9 had a new specific loci. Primer Cym25, Hub125 and Cym47 were low polymorphi [polymorphism information content (PIC) < 0.25], primer Cym45, Hub131, Hub8 and Cym9 were middle-highly polymorphi (0.25 < PIC < 0.5). The PIC of primer Cym172 was 0.59, indicating that it was highly polymorphi, and could be used as the preferred primer for fingerprint construction of the progenies of *C. eburneum* × *C. insigne*. UPGMA cluster analysis results showed that when the genetic coefficient was 0.8111, the studied germplasms could be divided into three categories. Among which

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-09-02

基金项目 海南省属科研院所技术创新专项 (No. KYYS-2021-16)。

作者简介 韩 豫 (1982—), 女, 硕士, 林业工程师, 研究方向: 遗传育种和生物技术; E-mail: 422294386@qq.com。

the parents constituted two categories, and the hybrid population belonged to the third. The hybrid population could be divided into three clusters, X₇ was a clade, X₆ and X₂₁ were clustered together, and the other 20 F₁ hybrid populations were the third. This study showed that SSR molecular markers could be used in hybrid identification and genetic diversity analysis of orchids species endemic to Hainan, which could provide an effective foundation and data base for orchid breeding and new species selection in Hainan. At the same time, the PIC of SSR molecular markers was an important indicator reflecting the ability of molecular markers. The middle-highly polymorphic primers and highly polymorphic primers developed in this study could lay a foundation for the construction of Hainan wild orchid gene atlas and the establishment and development of Hainan wild orchid germplasm bank.

Keywords: *Cymbidium eburneum*; *Cymbidium insigne*; hybrid F₁ progenies; SSR; hybrid identification; genetic diversity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.008

海南野生兰花种类丰富, 拥有兰科植物 96 属 302 种^[1], 其中独占春 (*Cymbidium eburneum* Lindl.)、美花兰 (*Cymbidium insigne* Rolfe.) 等是海南特有种, 也是国际上育种常用的起主要遗传作用的品种。因兰花的观赏价值高, 市场需求量大, 海南野生兰花资源被肆意采挖, 野生兰生境遭到严重破坏, 物种多样性降低^[2], 部分兰花种源已属濒危稀缺状态^[3], 美花兰已被列为国家重点一级保护野生植物, 独占春被列为国家重点二级保护野生植物、濒危 (IUCN 标准)。目前, 海南从事野生兰花研究工作主要集中在资源调查^[4-6]、品种收集、遗传多样性分析^[7-8]、杂交育种及组培繁育^[9]等方面, 而针对野生兰保护性开发应用的研究却很少。此外, 美花兰对生长环境要求较高, 不易人工栽培, 对其开发应用效率较低。通过独占春和美花兰杂交育种, 已获得了一批适应性强又具有较高观赏价值的杂交群体。对杂交后代进行杂种真实性鉴定, 可降低育种成本, 缩短育种时间, 同时也为海南野生兰种质资源保存、种质创新、野生兰资源推广应用提供理论和技术支持。

目前, 兰花育种研究普遍采用种间及种内杂交, 导致种源繁多、遗传背景复杂, 易造成“同物异名”和“同名异物”的现象, 这就需要对杂交后代进行鉴定分类。目前杂种鉴定方法主要有形态特征鉴定、细胞遗传学、分子细胞遗传学和分子标记等^[10]。形态特征鉴定方法虽然简单直接, 但是杂交后代性状相近时鉴定难度加大, 且受环境和人为观测的影响。细胞遗传学鉴定方法是通过双亲和杂交后代染色体数目、形态和分裂时配对情况进行鉴定^[11-12], 但此鉴定方法仅适用于染色体倍数相同的后代。分子细胞遗传学的 FISH (fluorescence in situ hybridization) 技术和 GISH (genomic in situ hybridization) 技术在远缘

杂种鉴定方面应用广泛, 其鉴定准确、直观, 但在亲本较近的亲缘关系却难以进行鉴定^[12]。随着分子生物技术的迅速发展, 具有较高的准确性和有效性的分子标记技术, 包括 ISSR、SRAP、SSR、RAPD 等技术已广泛应用于兰科植物、农作物等遗传多态性^[13]、品种鉴定^[14]、遗传指纹图谱等研究方面。李玉萍等^[15]采用 SRAP 分子标记技术对春兰紫萼×大花蕙兰日本绿的 10 个 F₁ 代进行杂种真实性鉴定, 结果表明 10 个 F₁ 代均为真实杂种, 且与母本相似性较高。阮稀^[16]采用 ISSR 分子标记法对春剑皇梅和春兰环球荷鼎杂交的 8 个 F₁ 代进行鉴定, 证实 8 个 F₁ 代为真杂种, 并继承了父本的基因条带。林榕燕等^[17]对文心兰杂交后代进行了 EST-SSR 分子标记鉴定, 结果表明 46 个杂交后代株系均为真杂种, 同时分析发现杂交后代与母本遗传相似系数大于父本。分子标记法的可靠性、准确性, 证明了分子标记法用于海南野生兰杂交后代的鉴定的可行性。

本研究采用 SSR 分子标记鉴定独占春和美花兰杂交 F₁ 代 23 个单株, 分析杂交后代与亲本的亲缘关系, 研究杂交后代的遗传多样性, 为观赏性高的兰花品种选育提供可能, 也为种质资源可持续开发、濒危野生资源保护奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

杂交试验在海南省林业科学研究院云龙科基地兰花圃完成, 以独占春 (*Cymbidium eburneum* Lindl.) 为母本, 美花兰 (*Cymbidium insigne* Rolfe.) 为父本进行杂交, 获得杂交 F₁ 代 23 个单株, 每个单株随机采集 2~3 片无病虫害的新鲜叶片, 用无水乙醇擦拭干净叶片表面, 晾干后贮藏于有硅胶的自封袋中带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取 使用基因组 DNA 提取试剂盒 (武汉纳磁生物科技有限公司) 按说明书提取样品叶片 DNA, 采用微量分光光度计 (Thermo Fisher Nano Drop ONE) 和琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的浓度和纯度, 并将待检测样品 DNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 SSR 引物筛选 根据陈起馨^[18]在构建兰花图谱研究中的引物信息, 选择 48 对引物组合, 在 1% 浓度琼脂糖凝胶上 120 V 电压电泳 20 min, 筛选出多态性好、重复性高的引物组合 8 对, 用于遗传多样性分析。

1.2.3 SSR-PCR 扩增反应 在 Veriti 384 well 型 PCR 仪上进行 SSR-PCR 扩增, 扩增体系总体积为 10 μL , 其中, $2\times\text{Taq}$ PCR Master Mix 5 μL , 10 pmol/ μL F-primer、R-primer 各 0.5 μL , 模板 DNA (20 ng) 1 μL , ddH₂O 3 μL 。扩增反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 10 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,

52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 末端延伸 20 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。最后, 取 2 μL PCR 产物在 1% 浓度琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.3 数据处理

利用 GeneMarker 3.0 分析软件对每对引物扩增的多个等位基因位点进行统一标记, 样品中有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 构建 SSR 标记的 0、1 矩阵。采取 UPGMA 聚类方法, 利用 NTSYS-pc 2.10 计算遗传距离, 并进行聚类分析。利用 GenAlEx 6.502 软件获得遗传多样性信息。

2 结果与分析

2.1 杂交后代的性质鉴定

参考陈起馨^[18]兰花图谱中应用的引物, 从 48 对 SSR 引物中筛选出 8 对引物 (表 1), 利用这 8 对引物对独占春和美花兰杂交 F₁ 代的 23 个单株进行杂种真实性鉴定 (表 2)。引物 Cym45、Hub131 和 Hub8 检测到 23 个单株均兼具双亲特异位点, 引物 Cym25 和 Hub125 检测到 23 个单株仅具父

表 1 SSR 引物序列信息

Tab. 1 Information of pairs of SSR primers

引物 Primer	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	峰值 Peak value	荧光标记 Fluorescent labelled
Hub8	AGACACCTTTCACCTGCCACC	AGTTAACTTTGGCACCGCAT	133~139	5-FAM
Hub125	GGCCTTCAAGGAGAAAAGGAC	AAGCTTTGGATCCTTGCTGA	231~260	5-FAM
Hub131	TGCACAAAGCGATCTCAATC	AGCCCAGGGAAGTTTTTGAT	126~131	5-FAM
Cym9	AAATTAAGGCCCGAAAAACG	TCTCTCTTCGCTCCAGTC	232~255	5-FAM
Cym25	AATGTGCCTTCAGGGATGAG	TGAACGCTTTCAGTGGTCTG	210~222	5-FAM
Cym45	AGATCGTATGACGGGAGTGG	CACCGAAATCCAGGGAGATA	196~217	5-FAM
Cym47	AGCAAGAAGACGGAGAGCTG	AGCGATTGAGCTTCCAAAAA	200~212	5-FAM
Cym172	GCCCTAGCCACTCTGACAAC	ACAGATCGCCGTCGATAAAC	138~171	5-FAM

表 2 不同 SSR 位点在杂交 F₁ 实生苗中的分布情况

Tab. 2 Distribution of different SSR loci in hybrid F₁ seedings

引物 Primer	兼具双亲特异位点 Markers present in both parents	仅具母本特异位点 Markers present only in mother	仅具父本特异位点 Markers present only in father	位点缺失 Markers absent in hybrids	出现新位点 New markers present in hybrids
Cym172	12	0	11	0	0
Cym25	0	0	23	0	0
Cym45	23	0	0	0	0
Cym47	0	23	0	0	0
Cym9	6	0	16	0	1
Hub125	0	0	23	0	0
Hub131	23	0	0	0	0
Hub8	23	0	0	0	0

本特异位点, 引物 Cym172 检测到 12 个单株兼具双亲特异位点, 11 个单株仅具父本特异位点, 鉴定率达 100%; 引物 Cym9 检测到 6 个单株兼具双亲特异位点, 16 个单株仅具父本特异位点, 1 个单株出现新位点, 鉴定率为 95.65%。综合以上 7 个引物的鉴定结果, 受测的 23 个单株均为真杂种, 真杂种率为 100%。

2.2 SSR 扩增遗传多样性分析

由表 3 可知, 利用筛选出的 8 对引物对 23 个 F₁ 代单株进行 SSR 产物扩增 (部分样品在引物 Cym172 的扩增结果见图 1), 共检测出 14 条多态性条带, 平均每个引物 3.11 条; 检测到 25 个等

位基因 (N_a), 其中引物 Cym172 扩增出的等位基因数最多, 扩增出 4 个; 引物 Hub8 扩增出的等位基因数最少, 扩增出 2 个; 平均 N_a 为 3.13 个; 有效等位基因数 (N_e) 变化范围为 1.08~2.85, 平均为 1.76 个; 观测杂合度 (H_o) 变化范围为 0.04~0.96, 平均值为 0.54; 期望杂合度 (H_e) 变化范围为 0.08~0.65, 平均值为 0.36; Shannon 信息指数 (I) 变化差异较大, 变化范围为 0.20~1.18, 其中最大的引物为 Cym172, 最小的引物为 Hub125, 平均值为 0.62; 遗传多样性 (H_s) 平均值为 0.68, 多态性信息含量 (PIC) 变化范围为 0.08~0.59, 平均值为 0.31, 其中只有引物 Cym172

表 3 8 个 SSR 位点遗传多样性信息
Tab. 3 Genetic diversity information of 8 SSR loci

引物 Primer	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Shannon 信息指数 I	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	遗传多样性 H_s	多态性信息 含量 PIC
Cym172	4	2.85	1.18	0.96	0.65	0.83	0.59
Cym25	3	1.08	0.20	0.04	0.08	0.54	0.08
Cym45	3	2.24	0.88	0.96	0.55	0.78	0.45
Cym47	3	1.18	0.32	0.12	0.15	0.58	0.14
Cym9	3	1.57	0.69	0.28	0.36	0.68	0.33
Hub125	3	1.08	0.20	0.04	0.08	0.54	0.08
Hub131	3	2.08	0.78	0.96	0.52	0.76	0.40
Hub8	2	2.00	0.69	0.96	0.50	0.75	0.38
均值	3.13	1.76	0.62	0.54	0.36	0.68	0.31

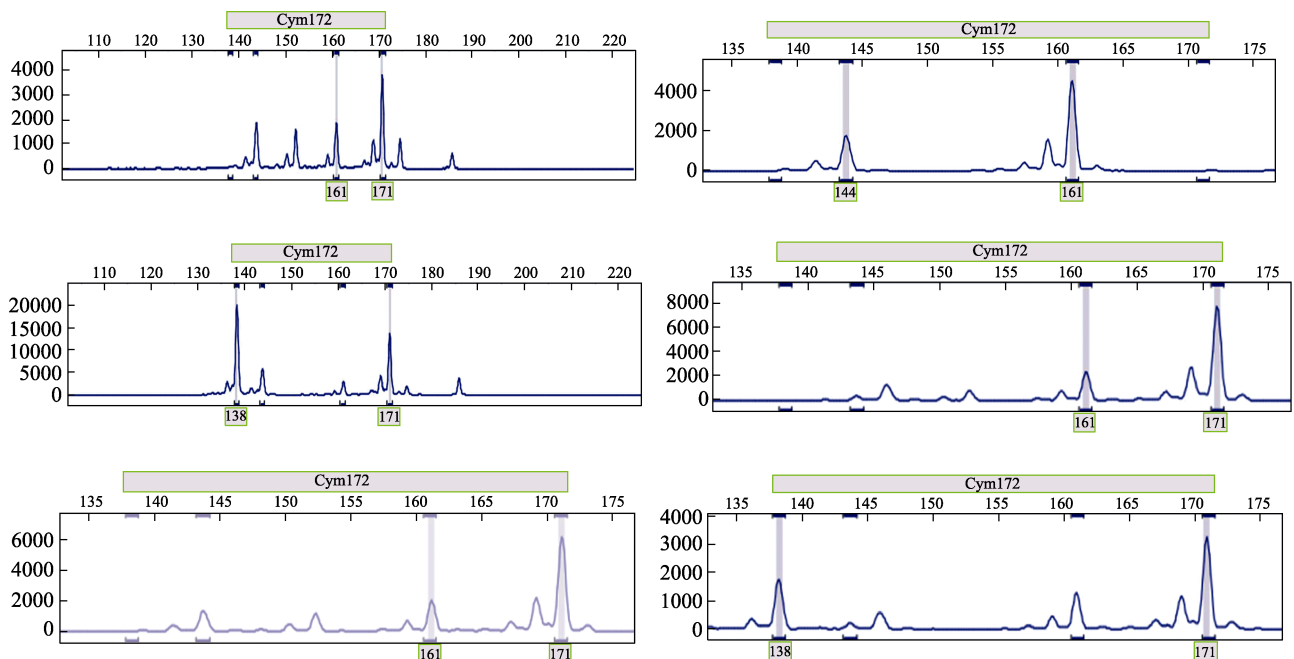


图 1 部分样品在引物 Cym172 的扩增图谱
Fig. 1 Amplification maps of some samples in primer Cym172

呈高度多态性 ($PIC > 0.5$), 引物 Cym45、Hub131、Hub8 和 Cym9 呈中高度多态性 ($0.25 < PIC < 0.5$), 而引物 Cym25、Hub125 和 Cym47 呈低度多态性 ($PIC < 0.25$)。综合多个指数可知, 筛选出的 8 种引物可用于鉴别独占春×美花兰杂交后代。SSR 标记的多态性信息是反映分子标记能力的一个重要参数^[19], PIC 是反映这一信息的重要指标, 可将 Cym172 作为杂交后代指纹图谱构建的优选引物, 依此建立海南野生兰 DNA 图库, 开发更多具有高度和中高度多态性引物, 为海南野生兰种质资源库的建立和开发奠定基础。

2.3 亲本与其 F_1 代聚类分析

对亲本和杂交 F_1 代计算的遗传距离分析可知, 遗传距离最小的是 X_{18} 等 14 个 F_1 单株, 仅为 0.0769, 说明在杂交 F_1 代中样品 X_{18} 等 14 个单株遗传差异较小; 遗传距离最大的是亲本 (分别标记为 D 和 M), 为 0.9583, 说明亲本的遗传表现较大。当遗传距离为 0.1177 时, 将亲本和 23 个杂交 F_1 代单株分为 3 个类群 (图 2)。第 1、2 类均是亲本; 第 3 类是 23 个杂交 F_1 代单株, 即杂交群体。第 3 类又可分为 3 个分支, X_7 为一个分支, X_6 和 X_{21} 聚类在一起, 其余 20 个 F_1 代单株聚类为一簇。

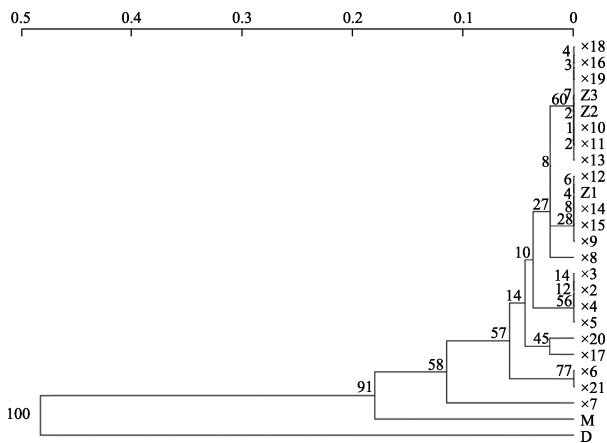


图 2 独占春×美花兰亲本和 F_1 聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of *C. eburneum* × *C. insigne* parents and F_1 progenies

3 讨论

杂交育种是观赏性植物新品种培育的重要途径^[20], 而杂交后代数量较多, 对杂交后代进行杂种鉴定, 从中筛选出所需要的真杂种, 从而提高育种效率、缩短育种周期, 对兰花新品种培育具有重要意义。常用的 RAPD、SSR、ISSR、AFLP

等分子标记已在多种植物杂种鉴定中得到广泛应用^[21]。分子标记是在 DNA 水平上直接反映的, 具有较高的可靠性和稳定性, 不受环境影响, 且能在苗期进行早期鉴定^[22-25]。SSR 标记具有高多态性、共显性遗传、易操作等优点^[21], 可更准确地反映杂种与亲本遗传信息的差异。本研究的 SSR 分析结果显示, 独占春和美花兰杂交后代中既有兼具双亲特异位点, 也有仅具有父本和母本一方的特异位点, 同时也产生了新的特异位点, 说明本研究的杂交后代既有遗传又有变异。通过 SSR 分子标记法, 在独占春和美花兰杂交后代中表现出较高的多态性, 表明 SSR 分子标记法可应用在海南野生兰遗传多样性分析, 可建立适合海南野生兰科植物的 SSR 分子标记反应体系。

兰科植物中, 基于分子标记研究最多的主要是国兰、蝴蝶兰等^[18, 26]。而海南野生兰因其资源的稀缺性和人工培育技术难等原因, 利用分子标记方法研究海南野生兰的报道却很少。本研究采用 SSR 分子标记对独占春和美花兰 F_1 代真实性进行鉴定, 这是对海南野生兰杂交后代的首次鉴定分析, 对资源稀缺的海南野生兰种质的应用奠定基础。本研究从 48 对引物中筛选出的 8 对引物能较好的区分 F_1 代的真实性, 而引物 Cym45、Hub131、Hub8、Cym25、Hub125 和引物 Cym9 鉴定效率分别为 100% 和 95.65%, 说明 23 个杂交后代单株均为真杂种。

分子标记法也应用于兰科植物的遗传关系、遗传多样性分析等多个方面中。王宏利等^[27]采用 ISSR 方法对 39 份建兰品种进行遗传多样性分析, 将其分为 6 个群集。袁媛等^[28]采用 SRAP 方法对 154 份国兰种质资源的亲缘关系进行分析, 分析其遗传相似系数在 0.772~1.000 之间。王晓英等^[29]对兰属 9 个品种进行 AFLP 分析, 遗传相似系数为 0.416~0.606, 发现莲瓣兰品种与春兰品种亲缘关系较近, 而春剑品种与春兰品种亲缘关系较远。杨光穗^[8]利用 SRAP 分子标记研究了 8 种海南野生兰属植物, 将其划分为 4 类。颜平^[30]对 168 份海南钻喙兰进行 SRAP 分析, 其遗传相似系数为 0.486~0.959。本研究仅对杂交后代的真实性进行鉴定分析, 而亲本间的遗传多样性和遗传关系有待于进一步研究。

参考文献

[1] 翟俊文, 彭东辉, 邓传远, 吴沙沙. 台湾岛和海南岛兰科

- 植物区系特征比较[J]. 植物资源与环境学报, 2016, 25(4): 87-95, 109.
- ZHAI J W, PENG D H, DENG C Y, WU S S. Comparison on floristic characteristics of Orchidaceae on Taiwan Island and Hainan Island[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2016, 25(4): 87-95, 109. (in Chinese)
- [2] 张哲. 海南三种蝴蝶兰属植物的保育生物学研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.
- ZHANG Z. Conservation biology of three *Phalaenopsis* (Orchidaceae) species in Hainan Island[D]. Haikou: Hainan Universty, 2018. (in Chinese)
- [3] 丁慎言, 尹俊梅. 海南岛野生兰花图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 4.
- DING S Y, YIN J M. The guide to wild *Cymbidium* in Hainan Island[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 4. (in Chinese)
- [4] 李大强, 宋希强, 张哲, 陈枳衡, 张中扬, 周康. 海南热带雨林国家公园兰科植物重点保护与优先检测策略[J]. 热带生物学报, 2022, 13(2): 136-148.
- LI D Q, SONG X Q, ZHANG Z, CHEN Z H, ZHANG Z Y, ZHOU K. Strategies for conservation and priority monitoring of key orchid plants in Hainan Tropical Rainforest National Park[J]. Journal of Tropical Biology, 2022, 13(2): 136-148. (in Chinese)
- [5] 左永令, 杨小波, 李东海, 吴二煥, 杨宁, 李龙, 张培春, 陈琳, 李晨笛. 环境因子对海南岛野生兰科植物物种组成与分布格局的影响[J]. 植物生态学报, 2021, 45(12): 1341-1349.
- ZUO Y L, YANG X B, LI D H, WU E H, YANG N, LI L, ZHANG P C, CHEN L, LI C D. Effects of environmental variables on the species composition and distribution patterns of wild orchids in Hainan Island[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2021, 45(12): 1341-1349. (in Chinese)
- [6] 黄明忠, 王清隆, 杨光穗. 海南兰科植物 2 新纪录属 7 新记录种[J]. 热带作物学报, 2017, 38(1): 1-3.
- HUANG M Z, WANG Q L, YANG G S. Two genera and seven species of Orchidaceae, newly recorded in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(1): 1-3. (in Chinese)
- [7] 黄明忠. 基于 *matK* 基因和 ITS 序列的海南野生兰科植物 DNA 条形码探讨[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- HUANG M Z. DNA barcoding of Hainan Island orchid species based on *matK* and ITS sequences[D]. Haikou: Hainan Universty, 2010. (in Chinese)
- [8] 杨光穗, 任羽, 王荣香. 利用 SRAP 技术分析海南野生兰属植物的亲缘关系[J]. 热带农业科学, 2011, 31(9): 1-3.
- YANG G S, REN Y, WANG R X. Analysis of genetic relationship of wild *Cymbidium* in Hainan by using SRAP[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2011, 31(9): 1-3. (in Chinese)
- [9] 郭丽霞. 基于远缘杂交技术的海南野生兰花种质创新研究[D]. 广州: 华南热带农业大学, 2007.
- GUO L X. A Study on germplasm enhancement of wild orchids in Hainan based on distant hybridization technique[D]. Guangzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2007. (in Chinese)
- [10] 邓衍明, 贾新平, 梁丽建. 观赏植物远缘杂交后代的鉴定方法[J]. 核农学报, 2016, 30(7): 1308-1315.
- DENG Y M, JIA X P, LIANG L J. Identification of distant hybrid progenies of ornamental plants[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(7): 1308-1315. (in Chinese)
- [11] 邓衍明. 利用属间远缘杂交创造栽培菊花抗逆新种质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 10-18.
- DENG Y M. Creating new germplasm of *Cheryrsanthemum* by using intergeneric hybridization[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010: 10-18. (in Chinese)
- [12] 赵宏波. 东亚春黄菊族系统演化及栽培菊花与矾菊属间杂交研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 15-20.
- ZHAO H B. Phylogeny of tribe *Anthemideae* (Asteraceae) from East Asia and intergeneric cross between *Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. and *Ajania pacifica* (Nakai) K. Bremer & Humphries[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007: 15-20. (in Chinese)
- [13] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(2): 271-282.
- [14] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 148-152.
- GAI S P, GAI W L, HUANG J Y. Comparison of SSR and SRAP marker for varieties identification in maize (*Zea mays* L.)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(3): 148-152. (in Chinese)
- [15] 李玉萍, 罗凤霞, 汤庚国, 史慧梅. 兰花杂交育种中杂种 F₁ 的早期鉴定[J]. 核农学报, 2016, 30(4): 676-684.
- LI Y P, LUO F X, TANG G G, SHI H M. Early identification of hybrid F₁ in cross breeding of *Cymbidium*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(4): 676-684. (in Chinese)
- [16] 阮稀. 春剑和春兰繁育系统及其杂种子代 F₁ 鉴定[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2022.
- RUAN X. Breeding system of *Cymbidium tortisepalum* var. *Longibracteatum* and *Cymbidium goeringii* and identification of F₁ hybrid seed generation[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2022. (in Chinese)

- [17] 林榕燕, 罗远华, 樊荣辉, 叶秀仙, 方能炎, 钟准钦, 黄敏玲. 文心兰杂交后代的 EST-SSR 和 SRAP 分子标记鉴定[J]. 福建农业学报, 2021, 36(12): 1439-1446.
LIN R Y, LUO Y H, FAN R H, YE X X, FANG N Y, ZHONG H Q, HUANG M L. Identification of hybrid progenies from *Oncidium Hybridum* with EST-SSR and SRAP molecular markers[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(12): 1439-1446. (in Chinese)
- [18] 陈起馨. 兰花分子图谱的构建[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
CHEN Q X. A linkage map construction of *Cymbidium* using SSR marker[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [19] 宋芸, 张鑫瑞, 李政, 孙哲, 李澳旋, 杜晓蓉, 乔永刚. 基于 SSR 分子标记的柴胡遗传多样性与遗传结构分析[J]. 药学学报, 2022, 57(4): 1193-1202.
SONG Y, ZHANG X R, LI Z, SUN Z, LI A X, DU X R, QIAO Y G. Genetic diversity and genetic structure analysis of *Bupleurum chinense* DC. based on SSR molecular marker[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2022, 57(4): 1193-1202. (in Chinese)
- [20] 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 魏旭, 何波, 李晓林, 梁国鲁. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4678-4686.
HAN G H, XIANG S Q, WANG W X, WEI X, HE B, LI X L, LIANG G L. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian pummelo by SSR[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(22): 4678-4686. (in Chinese)
- [21] 钟准钦, 林榕燕, 黄敏玲, 林兵, 陈南川. 杂交兰种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 福建农业学报, 2016, 31(11): 1193-1197.
ZHONG H Q, LIN R Y, HUANG M L, LIN B, CHEN N C. SRAP-marker based genetic diversity of *Cymbidium* hybrids[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(11): 1193-1197. (in Chinese)
- [22] 陈瑞丹, 张启翔. 梅花杂交育种中杂种 F₁ 代的早期鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2004, 12(26): 64-69.
CHEN R D, ZHANG Q X. Early identification of F₁ generation in *Armeniaca mume* cross breeding[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2004, 12(26): 64-69. (in Chinese)
- [23] 罗玉兰, 张冬梅. SSR 标记及形态性状鉴定红刺玫和月季杂交 F₁ 后代[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 839-842.
LUO Y L, ZHANG D M. Identification of F₁ hybrids derived from the combinations of rosa and modern rose by SSR markers and morphological traits[J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(6): 839-842. (in Chinese)
- [24] 吴静, 成仿云, 张栋. ‘正午’牡丹的杂交利用及部分杂种 AFLP 鉴定[J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1551-1557.
WU J, CHENG F Y, ZHANG D. Utilizing ‘High Noon’ in the crossing breeding of tree peonies and early identification of some hybrids by AFLP markers[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(8): 1551-1557. (in Chinese)
- [25] 田彦挺, 李际红, 王锦楠, 许东, 王艺玮, 邢世岩. 窄冠型杨树杂交子代 SRAP 鉴定及其遗传变异研究[J]. 核农学报, 2018, 32(5): 875-882.
TIAN Y T, LI J H, WANG J N, XU D, WANG Y W, XING S Y. Identification and genetic variation analysis of narrow crown *Populus* hybrid progeny by SRAP[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(5): 875-882. (in Chinese)
- [26] 龚理, 黄添翼, 王芳, 陈倩淑, 吴少华, 李永裕. 国兰杂交品种(系) SRAP-PCR 反应体系优化及引物快速筛选[J]. 热带作物学报, 2014, 35(5): 925-932.
GONG L, HUANG T Y, WANG F, CHEN Q S, WU S H, LI Y Y. Optimization SRAP-PCR system and quickly screening primers for hybridization cultivars (lines) of Chinese *Cymbidium*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(5): 925-932. (in Chinese)
- [27] 王宏利, 卜朝阳, 曾艳华, 龙蕾宇. 基于 ISSR 标记的建兰种质资源遗传多样性分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(9): 2526-2534.
WANG H L, BU C Y, ZENG Y H, LONG Q Y. Study on genetic diversity of *Cymbidium ensifolium* germplasm based on ISSR marker[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(9): 2526-2534. (in Chinese)
- [28] 袁媛, 曹彬, 张咏琪, 陈清西, 陈南川. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(5): 929-938.
YUAN Y, CAO B, ZHANG Y Q, CHEN Q X, CHEN N C. Genetic diversity analysis of *Cymbidium* germplasms based on SRAP markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(5): 929-938. (in Chinese)
- [29] 王晓英, 王长宪. 兰属品种间遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 农学学报, 2014(10): 69-72.
WANG X Y, WANG C X. Genetic diversity analysis of *Cymbidium* cultivars by AFLP molecular markers[J]. Journal of Agriculture, 2014(10): 69-72. (in Chinese)
- [30] 颜平. 海南钻喙兰种质资源现状调查及其遗传多样性研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.
YAN P. Investigation on germplasm resources and genetic diversity of *Rhynchosstylis gigantea* (Lindl.) Ridl in Hainan[D]. Haikou: Hainan University, 2018. (in Chinese)