

基于 iPBS 标记的石斛兰杂交子代真实性鉴定

赵秋菊^{1,2,3}, 崔学强³, 邓杰玲³, 黄昌艳³, 李佳蔚^{1,2*}, 张自斌^{3*}

1. 广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 广西大学林学院广西森林生态与保育重点实验室, 广西南宁 530004; 3. 广西壮族自治区农业科学院花卉研究所, 广西南宁 530007

摘要: 石斛兰为石斛属所有植物的总称, 是兰科植物中重要的花卉资源, 具有极高的观赏和药用价值。杂交育种是培育石斛兰新品种的主要方法, 但石斛兰的育种年限较长, 整个育种周期通常需要几年的时间。种质资源的鉴定是育种工作的基础, 本研究对石斛兰杂交后代株系进行鉴定, 以期对石斛兰杂种后代的早期选择及新品种(系)的快速鉴定提供分子依据, 进一步缩短育种周期, 加快石斛兰育种工作进程。iPBS 标记作为一种新型的分子标记, 无需预先获取 LTR 序列, 相较于其他分子标记具有简单、高效且应用范围广等优点, 本研究采用 iPBS 分子标记技术对广美石斛×黄钻戒石斛的 19 个杂种 F₁ 株系进行杂种真实性鉴定, 并进行遗传多样性和聚类分析。研究结果表明: 从 83 条 iPBS 引物中筛选出 7 条扩增条带清晰、多态性高、重复性好的引物用于石斛兰杂交子代真实性鉴定; 7 条引物共扩增出 69 条条带, 其中多态性条带为 51 条, 多态性比率为 73.91%; 较多的父本遗传信息导入子代个体中, 供试的 19 个杂种 F₁ 株系均能扩增出父本特征性条带, 鉴定为真杂种; 聚类分析表明, 绝大多数杂交后代在亲缘关系上先倾向于父本后倾向于母本; 遗传相似系数分析结果表明, 杂交后代与父本的平均遗传相似系数大于母本, 说明供试杂交后代在遗传上更倾向于父本, 与聚类结果吻合; 该杂交组合子代植株偏父本遗传。研究结果证明, iPBS 分子标记技术可作为石斛兰杂交育种早期杂种筛选鉴定的有效方法。该研究结果为进一步揭示石斛兰种群亲本与子代间的遗传多样性提供科学依据。

关键词: 石斛兰; iPBS 标记; 杂交子代; 真实性鉴定

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Authenticity Identification of Hybrid Progenies of *Dendrobium* Based on iPBS Markers

ZHAO Qiuju^{1,2,3}, CUI Xueqiang³, DENG Jieling³, HUANG Changyan³, LI Jiawei^{1,2*}, ZHANG Zibin^{3*}

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Forest Ecology and Conservation, College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; 3. Flower Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: *Dendrobium* is the general name of all plants in Genus *Dendrobium* Sw. It is an important flower resource in orchid plants and has high ornamental and medicinal value. Crossbreeding is the main method to cultivate new varieties of *Dendrobium*, However, the breeding period of *Dendrobium* is long, and the whole breeding cycle usually takes several years. The identification of germplasm resources is the basis of breeding work. This study of the identification of the hybrid progeny lines of *Dendrobium* is expected to provide molecular basis for early selection of hybrid progeny and rapid identification of new varieties (lines), shorten the breeding cycle and accelerate the progress of *Dendrobium* breeding. As a new type of molecular marker, iPBS marker does not need to obtain the LTR sequence in advance. Compared with other molecular markers, it has the advantages of simplicity, efficiency and wide application. In the study, the authenticity of 19 hybrid F₁ lines of *Dendrobium* Pittero Gold 'Diamond Ring' × *Dendrobium* Btilliant Smile 'Hi-romi' was identified by iPBS molecular marker technology, and perform genetic diversity and cluster analysis. Seven

收稿日期 2022-07-01; 修回日期 2022-08-18

基金项目 广西自然科学基金项目 (No. 2021GXNSFBA075059, No. 2020GXNSFBA297021); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21220056)。

作者简介 赵秋菊 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰科植物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 李佳蔚 (LI Jiawei), E-mail: lijiawei1662020@163.com; 张自斌 (ZHANG Zibin), E-mail: candou154@126.com。

primers with clear amplification bands, high polymorphism and good repeatability were selected from 83 iPBS primers for the authenticity identification of hybrid progenies of *Dendrobium*. A total of 69 bands were amplified by the seven primers, of which 51 were polymorphic, and the polymorphic ratio was 73.91%. The 19 F₁ hybrid lines tested could amplify paternal characteristic bands and were identified as true hybrids. A large number of paternal characteristic bands were amplified in the offspring plants, indicating that more genetic information of *Dendrobium* Pittero Gold ‘Diamond Ring’ was introduced into the offspring individuals, showing obvious paternal inheritance. Cluster analysis showed that the vast majority of the hybrid offspring tended to be paternal first and then maternal. The results of genetic similarity coefficient analysis showed that the average genetic similarity coefficient between the hybrid offspring and the male parent was greater than that of the female parent, indicating that the tested hybrid offspring were more inclined to the male parent in heredity, which was consistent with the clustering results. The variation of genetic similarity coefficient between the two parents and the offspring was small, indicating that the genetic diversity between the offspring of the hybrid combination was not rich. This is not conducive to the emergence of heterosis varieties, in the subsequent experiments, plants with large genetic differences should be selected for hybrid breeding in order to obtain heterosis varieties. The results showed that the iPBS molecular marker technology could be used as an effective method for the screening and identification of early hybrids in *Dendrobium* cross breeding. The results of this study would provide a scientific basis for further revealing the genetic diversity between parents and progeny of *Dendrobium* population.

Keywords: *Dendrobium*; iPBS marker; hybrid progeny; authenticity identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.009

石斛兰 (*Dendrobium*) 为多年生草本植物, 是兰科 (*Orchidaceae*) 石斛属所有植物的总称^[1], 根据花期不同, 可将其分为春石斛和秋石斛两大类。石斛兰的花朵具有独特的“斛状”花形, 色彩绚丽且花期长, 观赏价值极高。除此之外, 石斛兰还具有重要的药用价值, 其中铁皮石斛 (*D. officinale*)、金钗石斛 (*D. nobile*)、霍山石斛 (*D. huoshanense*) 等品种是我国传统中药材, 具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖等功效^[2-3], 其药用价值在《中药本草经》和《本草纲目》等中药典籍均有记载^[4]。

1856 年, 英国的 JOHN DOMINY 等将虾脊兰属的 2 个不同种虾脊兰进行杂交, 将子一代成功培育开花^[5], 至此, 兰花杂交育种开启了新篇章。杂交育种是培育石斛兰新品种的主要方法, 目前, 人类已经成功培育出涉及多达 6 个属的人工属间杂交种^[6]。但石斛兰的育种周期较长, 从筛选亲本到子代培育成熟, 整个繁殖周期通常需要几年的时间, 需花费大量的时间与精力从数个杂交后代中进行选择。为了减少人力物力的浪费, 缩短杂交育种的周期, 杂交子代株系真实性的早期鉴定显得十分重要。辨别杂交子代真实性能更好地筛选优质种, 缩短选种时间, 对石斛兰的育种工作具有重要意义。

早期的杂交子代真实性鉴定主要通过形态学方法、细胞学鉴定和同工酶标记进行鉴定^[7], 但形态学方法易受主观因素影响, 细胞学鉴定要求

技术较高, 同工酶标记也存在位点少、多态性低的缺点。分子标记是继形态学鉴定、细胞学鉴定和同工酶标记之后发展起来的新式鉴定方法, 随着分子生物学的发展, 越来越多的分子标记被应用于杂种子代的鉴定中。近年来, 常应用于杂种子代鉴定工作中的分子标记主要有: ISSR^[8-9]、SSR^[10-11]、SRAP^[12-13]等, 但未见 iPBS 标记应用于鉴定杂种子代真实性的相关报道。iPBS 是一类基于反转录转座子的新型分子标记^[14-15], 相对于其他分子标记, iPBS 标记具有无需预先获得 LTR 序列, 技术手段简单、高效, 应用范围广的特点^[16], 在种质资源鉴定、亲缘关系分析和遗传多样性分析等研究中更具优势。因此, 本研究基于 iPBS 标记, 鉴定广美石斛 (*Dendrobium* Pittero Gold ‘Diamond Ring’) × 黄钻戒石斛 (*Dendrobium* Btilliant Smile ‘Hiromi’) 杂交子代的真实性, 为石斛兰杂交育种亲本的筛选和优质杂种子代的选育提供分子依据, 从而加快石斛兰育种工作进程。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以广美石斛 (*Dendrobium* Btilliant Smile ‘Hiromi’) 为母本, 黄钻戒石斛 (*Dendrobium* Pittero Gold ‘Diamond Ring’) 为父本进行杂交, 通过人工授粉 (无套袋) 得到子一代, 将亲本及其 19 个杂交后代株系 (编号: 1~19) 作为试验材料。供试材料均取自广西壮族自治区农业科学院

花卉研究所石斛兰种质资源圃，父母本及杂交后代株系均剪取幼嫩叶片，立即保存于液氮中，用于提取 DNA。

主要试剂： $2\times$ Easy Taq[®] PCR SuperMix（康为世纪生物科技有限公司），Trans[®] 2K DNA Maker（北京全式金生物技术有限公司）； $50\times$ TAE 缓冲液（国拓生物科技有限公司），琼脂糖[生工生物工程（上海）股份有限公司]。

主要仪器：H1650-W 型常温离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），DYY-6D 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司），GEL DOCXR 全自动凝胶成像系统（上海勤翔科学仪器有限公司），TC-96/G/H(b)C 型 LifeECO 基因扩增仪（杭州博日科技有限公司），HWS-26 型电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 供试样品基因组 DNA 提取采用 EasyPure[®] Genomic DNA Kit（北京全式金生物技术有限公司）试剂盒提取，提取的 DNA 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，并用紫外分光光度计检测其浓度和纯度，提取的 DNA 用 TE 缓冲液稀释浓度至 20 ng/ μ L，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

1.2.2 引物筛选及 iPBS-PCR 扩增 本研究引物选用 KALENDAR 等^[17]发表的 83 个引物，从合成引物中选取扩增条带清晰，稳定性强，多态性高的引物对供试样品 DNA 进行 PCR 扩增（表 1）。PCR 反应体系为 20 μ L，包含 10 μ L $2\times$ Easy Taq[®] PCR SuperMix，8 μ L 无菌水，1 μ L 引物，1 μ L 模板。iPBS-PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min，50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，扩增产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。PCR 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶进行

电泳检测。

1.2.3 杂种子代真实性鉴定 利用筛选出的引物对父母本及杂交后代株系进行 iPBS-PCR 扩增，扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。根据电泳图谱，对比父母本条带，鉴别杂种子代中的真杂种。参照大多数研究的标准，以子一代电泳条带中含有父本特征带的植株鉴定为真杂种，反之为假杂种。为保证最终鉴定结果的准确性，在研究中至少有 2 个或 2 个以上的引物鉴定为真杂种才能判定该子代植株为真杂种^[18]。

1.3 数据处理

观察扩增产物电泳图谱，统计清晰的 DNA 条带，同一迁移位置上，有条带的记为“1”，无条带的记为“0”，经 Excel 软件构建原始“0,1”二元矩阵。利用 NTSYS-pc 2.10e 统计软件进行数据分析，采用 SHAN Clustering 程序进行 UPGMA（算数平均数不加权对组法）聚类分析，构建树状聚类图，并用 DICE 法计算试供材料间的遗传相似系数。

2 结果与分析

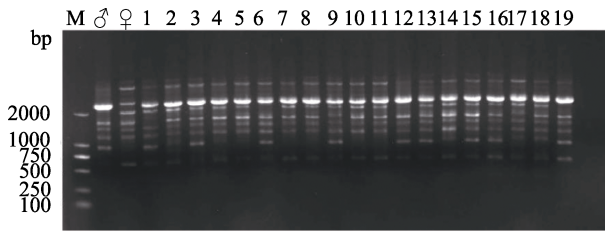
2.1 iPBS 引物扩增多态性分析

从 83 条 iPBS 引物中筛选 7 条扩增条带清晰、多态性高、重复性好的引物对亲本及子代共 21 份石斛兰基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增结果表明（表 1），7 条引物扩增出的总条带为 69 条，多态性条带 51 条，多态性比率为 73.91%，其中引物 2218 扩增条带多态性比率最高，为 100%，引物 2224 和 2255 扩增条带多态性比率最低，为 62.5%。每条引物扩增出的平均条带数为 9.86 条，平均多态性条带为 7.29 条。引物 2224 对 21 份石斛兰基因组 DNA 的扩增结果如图 1 所示。

表 1 引物序列及 PCR 扩增结果

Tab. 1 Sequence of primer and result of PCR amplification

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic band	多态性比率 Polymorphic rate/%
2076	GCTCCGATGCCA	44	16	13	81.25
2081	GCAACGGCGCCA	50	6	4	66.67
2218	CTCCAGCTCCGATTACCA	50	6	6	100.00
2224	ATCCTGGCAATGGAACCA	50	8	5	62.50
2241	ACCTAGCTCATCATGCCA	50	14	11	78.57
2255	GCGTGTGCTCTCATACCA	51	8	5	62.50
2271	GGCTCGGATGCCA	48	11	7	63.64
总计			69	51	
平均			9.86	7.29	73.91



M: DL2000 maker; ♂: 黄钻戒石斛; ♀: 广美石斛; 1~19: 子一代。

M: DL2000 maker; ♂: *Dendrobium* Pittero Gold 'Diamond Ring'; ♀: *Dendrobium* Btilliant Smile 'Hiromi'; 1~19: Offspring.

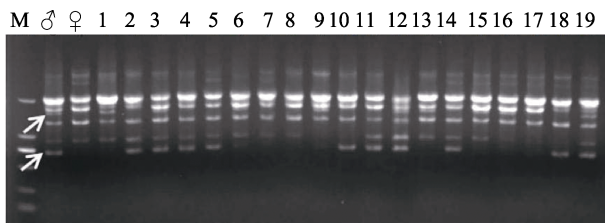
图 1 引物 2224 对 21 份石斛兰样本扩增结果

Fig. 1 Primer 2224 amplification results for 21 *Dendrobium* samples

2.2 杂合后代株系真实性鉴定

利用筛选的 7 条引物对 19 个杂交子代进行真实性鉴定, 对比亲本与子代电泳图谱 (图 2), 以引物 2255 扩增图谱为例, 能扩增出父本特征性条带的即为真杂种, 未扩增出父本特征带或只扩增出母本特征带的子一代植株可能为母本自交后代或者认定为假杂种。结果表明 (表 2), 引物 2081、2241、2255 扩增出具有父本特征性条带的子代个数分别为 10、10、14, 鉴定效率分别为 52.6%、52.6%、73.7%。在引物 2081 和 2241 的鉴定中, 4、10、16 和 17 号均未扩增出父本特征带, 但在引物 2271、2076、2218 和 2224 的进一步鉴定中, 发现 4、10、16、17 这 4 株子代植株都扩增出了父本特征性条带, 鉴定为真杂种。

此外, 在鉴别杂种子代时, 每条引物均能扩增出了 1~2 条父本特征带, 但引物 2076 扩增出的父本特征带最多, 为 4 条。综合 7 条引物的扩增结果来看, 广美石斛与黄钻戒石斛杂交所得的 19 株子代植株均能扩增出父本特征性条带, 即全为真杂种, 7 条 iPBS 引物的鉴定效率高达 100%。



箭头: 父本特征带; M: DL2000 maker; ♂: 黄钻戒石斛, ♀: 广美石斛, 1~19: 子一代。

Arrow: Paternal characteristic band; M: DL2000 maker; ♂: *Dendrobium* Pittero Gold 'Diamond Ring'; ♀: *Dendrobium* Btilliant Smile 'Hiromi'; 1~19: Offspring.

图 2 亲本及子一代的引物 2255 鉴定结果

Fig. 2 Primer 2255 identification results of parental and progeny

表 2 7 条引物杂种鉴定结果

Tab. 2 Hybrid identification results of 7 primers

引物 Primer	父本特征带数 Number of paternal characteristic bands	真杂种数 Numbers of true hybrids	真杂种株系 True hybrids
2076	4	19	1-19
2081	2	10	1、2、5、7、8、9、12、14、15、19
2218	1	19	1-19
2224	2	19	1-19
2241	1	10	3、5、6、7、8、9、11、13、18、19
2255	2	14	1、2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、18、19
2271	2	19	1-19

2.3 亲本与子代的聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 统计软件对遗传矩阵按 UPGMA 进行聚类分析, 构建石斛兰亲本及杂交后代株系的树状聚类图, 分析亲本与杂交后代株系间的遗传关系 (图 3)。结果显示, 在遗传距离 0.82 处, 亲本及 19 株杂交后代株系可分为 5 大类群, 其中, 第 I 类包括父本及 11 个子代植株, 分别为 2、3、5~9、11、13、14、18 号植株, 占供试材料的 52.38%; 第 II 类为包括 4 个子代植株, 分别为 10、15~17 号; 第 III 类为母本及 4 号子代植株, 第 IV 类仅有 19 号子代植株, 第 V 类为 1 号与 12 号子代植株。其中, 父本与 6 号子代的遗传距离最近, 母本与 4 号子代的遗传距离最近; 子一代中, 7 号与 11 号的遗传距离最近。从聚类结果来看, 绝大多数子代植株均聚类在父母亲本之间, 这部分子代植株先聚为 2 个分支, 先与父本聚合为一类, 再与母本聚合, 说明相较于母本, 子一代植株与父本的亲缘关系更近, 表现出倾向父本遗传。

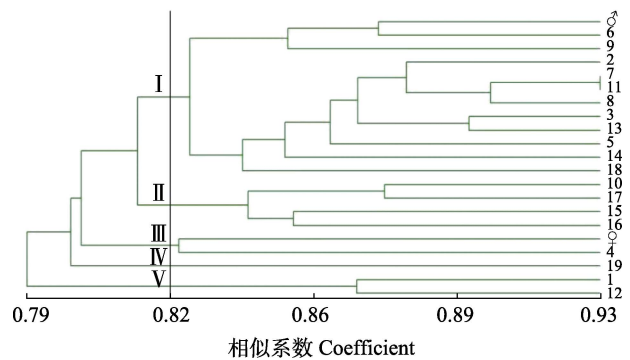


图 3 亲本及子代 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA dendrogram of parents and offspring

2.4 亲本与子代的遗传相似系数分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 统计软件计算 21 份石斛样本间的遗传相似系数, 结果显示, 亲本及子代之间的遗传相似系数变幅为 0.71~0.93。父本黄钻戒石斛与母本广美石斛之间的遗传相似系数仅为 0.71, 是遗传相似系数矩阵中的最低值。根据所得遗传相似系数用 Excel 2010 软件构建亲本及子代的遗传相似系数箱式图 (图 4), 发现父本黄钻戒石斛与子代之间的遗传相似系数在 0.75~0.88 之间, 平均值为 0.83, 其中父本与 4 号子代的遗传相似系数最低, 与 7 号子代的遗传相似系数最高。母本广美石斛与子代之间的遗传相似系数为 0.72~0.84, 平均值为 0.80, 其中母本与 12 号子代遗传相似系数最低, 与 10 号子代遗传相似系数最高。子代间的遗传相似系数为 0.73~0.93, 平均值为 0.82, 其中 18 号子代与 19 号子代遗传相似系数最低, 而 7 号与 11 号子代的遗传相似系数最高。从整个遗传相似系数矩阵来看, 父本与子代间的遗传相似系数比母本与子代间、子代间的更高, 这表明杂交子代更偏向于父本遗传, 这与聚类分析时杂交子代与父本的亲缘关系更近的结果一致。

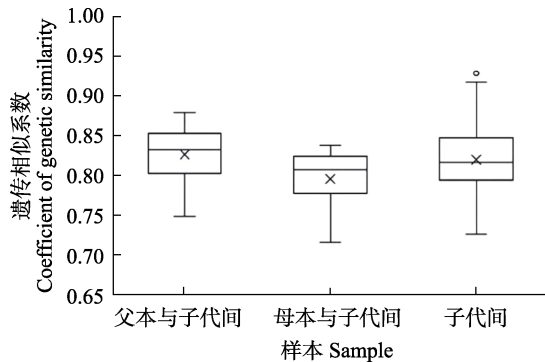


图 4 亲本及子代遗传相似系数箱式图

Fig. 4 Box-type of genetic similarity coefficient of parents and offspring

3 讨论

杂种子代的鉴别工作对于遗传育种十分关键, 它可以通过子代基因型预测子代植株的表型性状, 极大地提高了育种效率, 缩短杂交育种的周期, 有助于发现子代中具有杂种优势的新品种。传统的鉴别方式是形态学鉴定, 但对于一些表型性状差异不大的物种, 光靠形态学鉴定并不准确, 而分子标记技术的发展, 在基因组 DNA 的水平

上, 为鉴别杂种子代的真实性提供了可靠的分子依据。

iPBS 作为新型分子标记, 近年来逐渐被应用于多种物种的种质资源的鉴定以及遗传多样性分析等研究中。在本研究中, 选取清晰、重复性好、多态性高的 7 条引物对试供样本进行 iPBS-PCR 扩增, 共检测到 69 条谱带, 其中多态性条带为 51 条, 多态比例为 73.91%。相较于 ISSR^[19]、SSR^[20]、SRAP^[21-22]、AFLP^[23-24]等分子标记技术对石斛兰扩增的引物多态性, iPBS 分子标记的引物多态性略低, 但仍在 70% 以上, 研究证明, iPBS 分子标记的扩增多态性较好, 可应用于种质资源鉴定、遗传多样性分析以及杂交子代真实性鉴定等研究中。

种质资源的鉴定是育种工作的基础, 对种质间的亲缘关系和遗传多样性进行分析, 有助于选配优质杂交亲本, 选育具有杂种优势的后代株系。遗传相似系数矩阵揭示了子代与亲本之间的相似程度, 两亲本与子代间遗传相似系数为 0.71~0.93, 变幅不大, 表明该杂交组合子代间的遗传多样性并不丰富^[25], 这不利于杂种优势品种的出现, 后续研究中应选取具有较大遗传差异的植株进行杂交育种, 以便获取杂种优势品种。而子代间遗传相似系数数值偏高, 说明该杂交组合子代株系遗传基础趋向偏窄^[26]。聚类分析图直观显示了杂交子代株系与双亲间遗传距离的远近, 大部分子代株系表现为倾父本遗传, 聚类分析鉴定结果与遗传相似系数鉴定结果一致。但 1、12、19 三株子代独立为 2 个分支, 并与父母本以及其余子代植株遗传距离较远, 存在明显的遗传分离现象, 其原因可能是子代发生了较大的基因突变或重组变异^[18, 27]。

本研究中, 子一代植株扩增出大量的父本特征带, 子代偏向父本黄钻戒石斛遗传, 这与大部分研究如林榕燕等^[28]、李玉萍等^[29]的研究中子代株系均表现为倾母本遗传的结果相反, 说明较多的黄钻戒石斛遗传信息被导入子代个体中, 表现出较为明显的倾父本遗传。经 7 条引物共同鉴定, 19 株子代株系均为真杂种, 鉴定效率为 100%, 这与林榕燕等^[26]基于 SSR 标记和 SRAP 标记对文心兰杂交后代进行真实性鉴定的鉴定效率一致, 略高于铁皮石斛^[30]、结缕草^[31]、假俭草^[32]、猕猴桃^[33]等物种的鉴定效率。研究证明, iPBS 标记是鉴别杂种子代真实性的有效手段, 可应用于植物

种质资源的鉴定、亲缘关系的研究以及遗传多样性的分析等研究工作中。虽然一种分子标记可单独鉴别出所有杂种,但由于石斛属植物类群较大且遗传背景较复杂,仅凭一种标记鉴定可能还不够准确,在今后的研究中可增加形态学鉴定或者联合多标记鉴定来辅助进行杂种鉴定。

参考文献

- [1] 罗凯,李泽生,白燕冰,姜艳,姚志军,李桂林. 石斛兰多样性利用及保护现状[J]. 黑龙江农业科学, 2021(8): 85-89.
LUO K, LI Z S, BAI Y B, JIANG Y, YAO Z J, LI G L. Diversity and protection of *Dendrobium*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2021(8): 85-89. (in Chinese)
- [2] 刘杰,陈双雪,何柳,赵婷婷,王冉. 铁皮石斛药用价值研究探索[J]. 中国林副特产, 2021(4): 73-75.
LIU J, CHEN S X, HE L, ZHAO T T, WANG R. Research on the medicinal value of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2021(4): 73-75. (in Chinese)
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of people's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015. (in Chinese)
- [4] 华文. 赏花兼药的石斛兰(上)[J]. 花木盆景, 2020(11): 22-25.
HUA W. The ornamental and medicinal *Dendrobium*(I) [J]. Flower Plant & Penjing, 2020(11): 22-25. (in Chinese)
- [5] 孙芳. 春兰蕙兰杂交育种技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
SUN F. Studis on the crossbreeding between *Cymbidium goeringii* and *Cymbidium faberi*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [6] XIANG N, HONG Y, LAM-CHAN L T. Genetic analysis of tropical orchid hybrids (*Dendrobium*) with fluorescence amplified fragment-length polymorphism(AFLP)[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2003, 128(5): 731-735.
- [7] 朱骏驰,郭印山,刘镇东,李坤,杨晓旭,石广丽,牛早柱,李成祥,郭修武. 利用 SSR 分子标记鉴定葡萄 F₁ 代杂种[J]. 沈阳农业大学学报(自然科学版), 2016, 47(2): 148-152.
ZHU J C, GUO Y S, LIU Z D, LI K, YANG X X, SHI G L, NIU Z Z, LI C X, GUO X W. Identification of the F₁ hybrids of grape using SSR molecular markers[J]. Journal of Shenyang University (Natural Science), 2016, 47(2): 148-152. (in Chinese)
- [8] 娄永峰,方伟,彭九生,廖光庐,林新春. 假毛竹和毛竹正反交杂种的 ISSR 鉴定[J]. 分子植物育种, 2010, 8(5): 958-962.
LOU Y F, FANG W, PENG J S, LIAO G L, LIN X C. Identification on reciprocal cross offspring of *Phyllostachys kwangsiensis* and *P. edulis* by using ISSR markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(5): 958-962. (in Chinese)
- [9] 吴蕊,张秀新,薛璟祺,穆鼎,石颜通. 紫牡丹远缘杂交后代幼苗的形态标记和 ISSR 标记鉴定[J]. 园艺学报, 2011, 38(12): 2325-2332.
WU R, ZHANG X X, XUE J Q, MU D, SHI Y T. Early identification of the descendents from distant hybridization of *Paeonia delavayi* by morphological and ISSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(12): 2325-2332. (in Chinese)
- [10] 周文才,侯静,郭炜,陈赢男,万志兵,尹佟明. 基于 SSR 标记的美洲黑杨杂交子代的鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学), 2015, 39(3): 45-49.
ZHOU W C, HOU J, GUO W, CHEN Y N, WAN Z B, YIN T M. Identification of the true hybrids for *Populus deltoides* by using SSR markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2015, 39(3): 45-49. (in Chinese)
- [11] 王斯琪,唐诗哲,孔德仓,贺润平,刘华波,麻丽颖,刘君,王哲,李颖岳,申连英,庞晓明. 利用 SSR 标记进行枣椰子代苗父本鉴定[J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2133-2141.
WANG S Q, TANG S Z, KONG D C, HE R P, LIU H B, MA L Y, LIU J, WANG Z, LI Y Y, SHEN L Y, PANG X M. Application of SSR markers for the identification of paternal parent for the seedlings of Chinese jujube[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(11): 2133-2141. (in Chinese)
- [12] 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)
- [13] 张明慧,宋玉霞,赵世华,丁捷,张国庆,张勤,刘廷俊. 冬枣×宁梨巨枣的子代 SRAP 鉴定及遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(11): 2194-2200.
ZHANG M H, SONG Y X, ZHAO S H, DING J, ZHANG G Q, ZHANG Q, LIU T J. Identification and genetic diversity analysis of hybridprogeny of *Ziziphus jujuba* Mill.cv. Dongzao and *Ziziphus jujulba* Mill.cv. Ninglijuzao by SRAP molecular markers[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2014, 34(11): 2194-2200. (in Chinese)
- [14] AMITEYE S. Basic concepts and methodologies of DNA

- marker systems in plant molecular breeding[J]. *Heliyon*, 2021, 7(10): e08093.
- [15] KALENDAR R, SCHULMAN A H. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and IPBS[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1115(1115): 233-255.
- [16] 孙蕾倩, 马燕, 李哲, 王宝盛, 么燕君. iPBS 分子标记研究进展[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(1): 232-238.
SUN L Q, MA Y, LI Z, WANG B S, YAO Y J. Research progress of iPBS molecular marker[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(1): 232-238. (in Chinese)
- [17] KALENDAR R, ANTONIUS K, SMÝKAL P, SCHULMAN A H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121(8): 1419-1430.
- [18] 彭婵, 李振芳, 马林江, 黄国伟, 徐红梅, 杨彦伶. 紫薇属种间杂种 SSR 分子鉴定与遗传分析[J]. *北方园艺*, 2020(13): 83-90.
PENG C, LI Z F, MA L J, HUANG G W, XU H M, YANG Y L. Identification and genetic analysis in *Lagerstroemia* interspecific hybrids using SSR markers[J]. *Northern Horticulture*, 2020(13): 83-90. (in Chinese)
- [19] 崔学强, 唐璇, 黄昌艳, 邓杰玲, 李秀玲, 卢家仕, 李先民, 张自斌. 22 种石斛兰遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(9): 3005-3014.
CUI X Q, TANG X, HUANG C Y, DENG J L, LI X L, LU J S, LI X M, ZHANG Z B. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction for 22 *Dendrobium* species[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(9): 3005-3014. (in Chinese)
- [20] 任羽, 王呈丹, 徐世松, 黄少华, 张银东. 石斛兰亲缘关系的 SSR 分析[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(7): 1252-1256.
REN Y, WANG C D, XU S S, HUANG S H, ZHANG Y D. Analysis of genetic relationship of ornamental *Dendrobium* by SSR marker[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, 34(7): 1252-1256. (in Chinese)
- [21] 林榕燕, 叶秀仙, 钟淮钦, 林兵, 黄敏玲. 基于 SRAP 分子标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析[J]. *福建农业学报*, 2018, 33(5): 469-473.
LIN R Y, YE X X, ZHONG H Q, LIN B, HUANG M L. Genetic diversity of *Dendrobium* germplasms accessed by SRAP markers[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33(5): 469-473. (in Chinese)
- [22] 蔡莉, 赵致, 刘红昌, 李金玲, 杨继勇, 邓贤芬. 基于 SRAP 分子标记的金钗石斛遗传多样性研究[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(8): 1975-1978.
CAI L, ZHAO Z, LIU H C, LI J L, YANG J Y, DENG X F. Genetic diversity of *Dendrobium nobile* based on SRAP molecular markers[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 30(8): 1975-1978. (in Chinese)
- [23] 郑勇平, 郑泉, 俞继英, 张瑛, 范文锋. 春石斛杂交育种及亲缘关系的 AFLP 分析[J]. *浙江林学院学报*, 2009, 26(1): 137-141.
ZHEN Y P, ZHEN Q, YU J Y, ZHANG Y, FAN W F. Hybridization breeding and AFLP analysis of relative relationship of *Dendrobium nobile*[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2009, 26(1): 137-141. (in Chinese)
- [24] 宋爽, 周洋帆, 刘正杰, 赵明富, 杨娟, 徐绍娟, 文国松. 利用 ISSR 和 AFLP 标记分析石斛种质资源的遗传多样性[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2016, 31(4): 688-695.
SONG S, ZHOU Y F, LIU Z J, ZHAO M F, YANG J, XU S J, WEN G S. Genetic diversity among *Dendrobium* with known origins based on the ISSR and AFLP markers[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University(Natural Science)*, 2016, 31(4): 688-695. (in Chinese)
- [25] 程永芳, 张明慧, 巩楠, 杨琴, 宋玉霞. 马铃薯种质资源遗传多样性分析及杂交子代 SRAP 鉴定[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(8): 1757-1765.
CHENG Y F, ZHANG M H, GONG L, YANG Q, SONG Y X. Genetic diversity analysis and hybrids identification of *Solanum tuberosum* L. by SRAP molecular marker[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(8): 1757-1765. (in Chinese)
- [26] 林榕燕, 罗远华, 樊荣辉, 叶秀仙, 方能炎, 钟淮钦, 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)
- [27] 孙晓梅, 崔金秋, 王慧聪, 周文强, 王丹, 杨宏光. 芍药属植物杂交亲和性及杂交后代 ISSR 分子鉴定[J]. *北方园艺*, 2016(9): 98-101.
SUN X Y, CUI J Q, WANG H C, ZHOU W Q, WANG D, YANG H G. Hybridization affinity of *Paeonia* plant and ISSR molecular identification of hybrids[J]. *Northern Horticulture*, 2016(9): 98-101. (in Chinese)
- [28] 林榕燕, 陈艺荃, 钟淮钦, 林兵, 叶秀仙. SRAP 标记在秋石斛杂交后代鉴定中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(22): 55-59.
LIN R Y, CHEN Y Q, ZHONG H Q, LIN B, YE X X. Application of SRAP marker in identification of *Dendrobium* hybrid progenies[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 49(22): 55-59. (in Chinese)
- [29] 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)
- [30] 刘玉洋, 徐靖, 何金宇, 刘朋丽, 史钰军, 王慧中, 卢江杰. 铁皮石斛和金钗石斛杂交后代的分子鉴定[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(9): 1709-1713.
- LIU Y Y, XUE J, HE J Y, LIU P L, SHI Y J, WANG H Z, LU J J. Molecular identification of hybrid progenies of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium nobile*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2018, 59(9): 1709-1713. (in Chinese)
- [31] 薛丹丹, 郭海林, 郑轶琦, 陈宣, 刘建秀. 结缕草属植物杂交后代杂种真实性鉴定——SRAP 分子标记[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 72-79.
- XU D D, GUO H L, ZHEN Y Q, CHEN X, LIU J X. Hybrid identification of progenies of *Zoysia* crosses by SRAP marker[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(1): 72-79. (in Chinese)
- [32] 郑轶琦, 宗俊勤, 薛丹丹, 陈宣, 刘建秀. SRAP 分子标记在假俭草杂交后代真实性鉴定中的应用[J]. 草地学报, 2009, 17(2): 135-140.
- ZHEN Y Q, ZONG J Q, XUE D D, CHEN X, LIU J X. Application of SRAP markers to the identification of *Eremochloa ophiuroides* (Munro) hack hybrids[J]. Acta Agrestia Sinica, 2009, 17(2): 135-140. (in Chinese)
- [33] 孙世航, 林苗苗, 齐秀娟, 孙雷明, 钟云鹏, 方金豹. 应用 InDel 标记进行软枣猕猴桃杂交子代真实性鉴定[J]. 果树学报, 2018, 35(1): 32-37.
- SUN S H, LIN M M, QI X J, SUN L M, ZHONG Y P, FANG J B. Application of InDel markers on progeny identification in *Actinidia arguta*[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1): 32-37. (in Chinese)