

珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定

谢明璐, 侯北伟, 韩 丽, 马艳红, 丁小余*

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 本研究利用磁珠富集法开发了 60 对铁皮石斛的 SSR 引物, 从中筛选出 15 对多态性位点丰富、带型清晰、重复性好的引物。利用筛选出的 SSR 引物对铁皮石斛野生居群材料进行了遗传分析, 共鉴定出等位变异 92 个, 平均每个 SSR 位点等位变异数为 6.1 个; 表观杂合度 (H_o) 范围是 0.60~0.85, 平均值为 0.72; 期望杂合度 (H_e) 范围是 0.49~0.85, 平均值为 0.74。平均每个 SSR 位点多态信息含量 (PIC) 为 0.702, 变化范围为 0.437~0.829。利用 15 对 SSR 引物对 20 种石斛试验材料进行跨种扩增, 检测出有 13 对 SSR 引物具有种间通用性。此外, 还利用所筛选的 4 对 SSR 引物检测了集约化种植过程中的铁皮石斛组培苗的种质纯度, 结果显示: 所开发的 SSR 标记可用于铁皮石斛组培苗的品种纯度鉴别。

关键词: 铁皮石斛; 微卫星标记开发; 通用性检测; 纯度鉴定

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0667-06

Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm

XIE Ming-lu, HOU Bei-wei, HAN Li, MA Yan-hong, DING Xiao-yu*

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Simple sequence repeat (SSR) was used to investigate the genetic diversity and structure of *Dendrobium officinale*. A total of 15 primer pairs with stable and repeatable polymorphism were screened out from 60 SSR primer pairs developed by the method of microsatellite enrichment by magnetic beads. Forty-eight samples of *Dendrobium officinale* were analyzed in genetic polymorphism. These loci were polymorphic and displayed 3 to 9 alleles per locus with a mean number of 6.1. The observed and expected heterozygosities ranged from 0.60 to 0.85 and from 0.49 to 0.85 respectively. The polymorphic information content (PIC) of each SSR locus varied from 0.437 to 0.829 with an average of 0.702. Fifteen primer pairs were used in *Dendrobium* cross-species amplification and totally 13 primer pairs were proved to have the transferability in *D. officinale* related species. In addition, 500 tissue culture plantlets of *D. officinale* were tested for purity identification by means of PCR amplification with four SSR primer pairs. The results showed that SSR technique is a feasible, simple and inexpensive method for determining adulterants in germplasm identification.

Key words: *Dendrobium officinale*; microsatellite development; transferability detection; purity identification

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 为兰科 (Orchidaceae) 第二大属多年生草本植物, 全球约有 1 000 余种, 主

要分布于亚洲热带和大洋洲地区^[1]。铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为我国特有的石斛属药用植物, 早在《神农本草经》中就有记载, 具有滋阴生津、润肺明目、抗癌防老等功效^[2]。近年来, 由于铁皮石斛保健品和药品的大规模开发, 不但使其野生资源遭受毁灭性的破坏, 而且还导致了铁皮石斛混淆品的泛滥, 因此亟须建立有效的铁皮石

收稿日期: 2010-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870234); 国家基础人才培养基金资助项目 (J0730650); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008431).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85891605, E-mail: dingxynj@263.net

斛种质鉴别的可靠手段^[3-6]。目前石斛属植物已有很多成功的分子鉴别方法。丁小余等^[7]建立了枫斗类石斛的 rDNA ITS 区全序列数据库, 利用该数据库对枫斗类石斛待检种准确鉴别; 邵世光等^[8]通过对枫斗类石斛 cpDNA *psbA-trnH* 序列的测定, 成功鉴别了待检种; 刘静等^[9]对 12 种石斛的 *matK* 基因全序列进行测定, 可以对石斛不同种及种内不同居群 (品种) 进行鉴别。

准确鉴别药用植物的种质是实施药材良好农业规范 (good agricultural practices, GAP) 的关键, 必须依靠先进、简便、可靠的分子标记技术^[10]。SSR (simple sequence repeat) 分子标记又称微卫星 (microsatellite) 标记, 由 1~6 个核苷酸的重复单位组成, 为长达几十甚至上百个核苷酸的串联重复序列, 广泛分布于整个基因组的不同位置上^[11]。在植物基因组中, 由于微卫星寡核苷酸的重复次数在同一物种的不同基因型间具有差异且相对稳定保守, 因而 SSR 标记呈现高度多态性, 可用于植物种质的鉴别^[12, 13]。本文拟开发、筛选铁皮石斛的 SSR 标记, 并对铁皮石斛组培苗的种质纯度进行鉴定, 为铁皮石斛种质的 GAP 生产及保护奠定基础。

材料与方法

实验材料 铁皮石斛分布于我国的广东、广西、云南、贵州、浙江、安徽等省的原始森林及自然保护区。本文中检测铁皮石斛 SSR 标记遗传多样性的实验材料取自贵州居群的 48 份铁皮石斛野生样本; 检测 SSR 引物通用性的材料则取自广西、贵州、云南等省 (表 1); 种质纯度检测材料取自本实验室的集约化种质保存基地, 拟对来自福建的某种质 (FJ02) 的纯度进行检测, 共在苗床随机取样 500 个样 (株), 对其进行种质纯度的分子检测。

DNA 提取 引物开发材料利用 Dneasy Plant

Mini Kit (Qiagen) 试剂盒提取高质量的模板 DNA。铁皮石斛居群材料、种质鉴定材料以及石斛属其他实验材料分别取各样本经硅胶干燥的叶片, 利用 CTAB 法提取基因组 DNA。

构建 SSR 富集文库 用限制性内切酶 *Sau3A I* (TaKaRa) 对基因组进行部分酶切, 在 EB 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 切取 200~800 bp 的片段, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, AXYGEn) 回收纯化。将纯化产物与生物素标记的探针 (GTG)₁₀、(CT)₁₅ (上海生工合成) 杂交。建立 25 μ L 杂交体系: 模板 DNA 200 ng、0.2 μ mol·L⁻¹ 的生物素探针和 0.2 μ mol·L⁻¹ 的 6 $\times$ SSC。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 70 $^{\circ}$ C 杂交 1 h, 温度以每秒 0.1 $^{\circ}$ C 的速度递减到 52 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C 保温。利用磁珠 (Promega) 固定杂交产物, 并在磁场中多次洗脱, 以洗去未杂交的部分。随后向与探针结合的 DNA 中加入 50 μ L TE 缓冲液, PCR 仪上 96 $^{\circ}$ C 变性 6 min。最终, 保留的 DNA 溶解在 1 $\times$ TE 缓冲液中, 经 PCR 恢复为双链。PCR 产物和 Takara 公司 TA 克隆载体 (pMD18-T Vector) 链接, 转入感受态细胞 (*Escherichia coli* DH5 α)。至此, SSR 富集文库就已构成。

引物设计 用蓝白斑法筛选阳性克隆^[14], 选择合适的片段送华大基因 (Beijing Genomics Institute) 测序。获得的 DNA 序列使用 DNAMAN Version 5.2.9 和 Primer Premier 5.0 进行引物设计, 引物由上海生工 (Sangon) 合成。

PCR 扩增 PCR 反应在 Mastercycler Pro (Eppendorf) 上进行。PCR 反应为 10 μ L 反应体系 (Takara), 含 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol·L⁻¹ KCl; 2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂; 200 μ mol·L⁻¹ dNTPs; 0.2 μ mol·L⁻¹ 引物; 50 ng 模板 DNA 和 1 U rTaq 酶。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环。

Table 1 The name and origin of the 20 samples of *Dendrobium* species

Voucher number	Species	Locality	Voucher number	Species	Locality
1	<i>D. huoshanense</i>	Anhui	11	<i>D. chrysanthum</i>	Guizhou
2	<i>D. hancockii</i>	Yunnan	12	<i>D. wardianum</i>	Yunnan
3	<i>D. fimbriatum</i>	Guangxi	13	<i>D. loddigesii</i>	Guangxi
4	<i>D. dixanthum</i>	Yunnan	14	<i>D. aphyllum</i>	Guizhou
5	<i>D. falconeri</i>	Yunnan	15	<i>D. crepidatum</i>	Yunnan
6	<i>D. cariniferum</i>	Yunnan	16	<i>D. nobile</i>	Yunnan
7	<i>D. gratiosissimum</i>	Yunnan	17	<i>D. moniliforme</i>	Jiangxi
8	<i>D. primulinum</i>	Yunnan	18	<i>D. hercoglossum</i>	Yunnan
9	<i>D. devonianum</i>	Yunnan	19	<i>D. williamsonii</i>	Hainan
10	<i>D. thyrsiflorum</i>	Yunnan	20	<i>D. guangxiense</i>	Guizhou

后, 72 °C 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。将扩增产物先在 1% 琼脂糖凝胶电泳上检测 PCR 扩增效果, 并在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 银染检测。

数据统计与分析 观察各 SSR 位点在供试样本间 PCR 扩增条带的差异, 清晰带赋值为“1”, 无扩增带的赋值为“0”, 用 Excel 软件统计整理。采用 Simpson 指数计算多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)^[15]。利用 Popgen32 和 Cervus2.0 软件^[16, 17], 计算微卫星位点的等位基因数 (Na)、有效等位基因数 (Ne)、观测杂合度 (Ho)、期望杂合度 (He)、哈温平衡 (HWE) 及连锁平衡 (LD)。

结果

通过铁皮石斛 SSR 富集文库的建立及蓝白斑筛

选, 本实验共获得并合成了 60 对 SSR 引物。利用 60 对引物初步扩增了随机选取的铁皮石斛贵州居群的 48 个样本, 经过对扩增产物的稳定性、多态性及清晰度等方面的筛选, 共选取了 15 对 SSR 引物用于本实验的研究。

1 铁皮石斛 SSR 引物的遗传多态性检测

利用选取的 15 对多态性好的引物 (表 2), 对贵州居群 48 个样本基因组 DNA 进行 SSR-PCR 扩增。15 对引物共检测到 92 个等位变异, 每个位点变化范围为 3~9 个, 平均每个 SSR 位点等位变异数为 6.1 个, XML006 最高, XML010 最低, 扩增片段的大小在 100~400 bp 之间。通过 Nei 氏算法^[18]得出的表观杂合度 (Ho) 范围是 0.60~0.85, 平均值为 0.72, XML014 最高, XML001 和 XML002 最低; 期望杂合

Table 2 Fifteen microsatellite loci of *Dendrobium officinale* and their amplification information

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Size / bp	Na	Ne	H _O	H _E	P _{HWE}	PIC	GenBank Accession No.
XML001	F: CGTGTGCGTATAACGGCACA R: GGTCCGAAAGGTGGTACATC	(CA) ₁₄	199-213	6	2.9	0.60	0.66	0.537	0.610	FJ914496
XML002	F: GGTACAAGGTTCGAGTCT R: CATACTGTCGACCACATC	(TG) ₁₁	128-140	5	2.3	0.60	0.57	0.793	0.536	FJ799920
XML003	F: GTGACATAGCAAAGAGAC R: CCAGAATGAGCTCAATCA	(CT) ₂₃	156-178	7	3.2	0.70	0.69	0.945	0.660	GQ174288
XML004	F: CACATATGATAACAGGAGCA R: TTGGATGATTGCAGCCACT	(GA) ₂₈	130-152	7	4.4	0.80	0.77	0.003	0.740	GQ174289
XML005	F: GCCATCATTATCCCTATC R: TCTCTCCCTAGCTCTCTC	(GT) ₁₁	178-192	4	3.5	0.75	0.72	0.851	0.664	GQ174290
XML006	F: GAGAAGCCTTCAAATGAC R: ACCCTCACGTTTCAATCT	(GA) ₁₈ (AGA) ₇ (AG) ₂₁	320-346	9	5.5	0.70	0.82	0.154	0.795	GQ174291
XML007	F: AGTGCAAGAGAGAGATAGAG R: ACGAGACAGGATGAAGAGAT	(GT) ₇ (CA) ₁₄	339-357	6	5.1	0.75	0.80	0.103	0.776	GQ174292
XML008	F: TGCATATAGCTGCACACGT R: CAGTCACACGAGACAGGATG	(CA) ₁₂	170-182	5	3.3	0.70	0.69	0.452	0.638	GQ180864
XML009	F: TTGAGGGTCGTGAGGTTCT R: TTTGGCAATTGCTGCACCG	(GA) ₁₇	139-153	4	3.7	0.75	0.73	0.508	0.687	GQ222213
XML010	F: CTACGTCGACGGACGAAT R: GGTCTAGACGATCCTGTT	(TC) ₇	142-150	3	2.0	0.65	0.49	0.238	0.437	GQ222214
XML011	F: CGTTCACTACTTTCCCTC R: AGATAGAGGTAGAGAGAG	(TC) ₂₀ (TC) ₅	204-220	7	5.8	0.80	0.83	0.114	0.804	GQ861088
XML012	F: ACGATCGCAAGCCTCTCCAC R: GTTGGGTGGATCCGTCAGG	(AG) ₂₇ (GA) ₁₂	215-235	8	6.5	0.80	0.85	0.106	0.828	GQ861089
XML013	F: CTCGCTAGCTCTCTTTCTC R: CTATGAATGCCAGAGGAG	(CT) ₈ (CT) ₁₄	122-138	6	4.5	0.65	0.78	0.349	0.751	GQ861090
XML014	F: AGTCAACCACACATGAGGAG R: TCACGTTTCAATCTCTGCTG	(GA) ₁₈ (AGA) ₇ (AG) ₁₉	330-355	8	6.5	0.85	0.85	0.396	0.829	GQ861091
XML015	F: GTCCAGGCCTTGCTCTTTC R: CTATTGTCGGTGACAGTC	(TC) ₁₇ (TC) ₁₉	321-339	7	5.1	0.65	0.81	0.223	0.780	GQ861092

F: Forward primer; R: Reverse primer; Na: Number of alleles; Ne: Effective number of alleles; H_O: Observed heterozygosities; H_E: Expected heterozygosities; P_{HWE}: Possibilities to fit to Hardy-Weinberg equilibrium using χ^2 test; PIC: Polymorphism information content

度 (H_E) 范围是 0.49~0.85, 平均值为 0.74, XML012 和 XML014 最高, XML010 最低。用 Popgen32 软件检测这些位点的哈温平衡和连锁不平衡, 在这些位点中除了 XML004 以外并没有发现显著的哈温平衡偏离 ($P < 0.05$), 无连锁不平衡 (表 2)。这些数据说明以上的 15 个 SSR 位点具有足够的潜力在铁皮石斛居群水平上得到应用。

本实验中 15 个 SSR 位点的多态信息含量平均值为 0.702, 按照 Bostein 的理论^[19], 有 1 个位点为中度多态位点 ($0.25 < PIC < 0.5$), XML010 位点 PIC 最低为 0.437; 其他 14 个均为高度多态性位点 ($PIC > 0.5$), XML014 位点的 PIC 最高为 0.829。15 个 SSR 位点有 14 个均为高度多态性位点, 表明这些位点均可作为有效的遗传标记用于铁皮石斛居群间遗传多样性评估和系统发生关系的研究。该结果和杂合度分析结果相一致, 表明铁皮石斛 SSR 引物遗传多态性较高。

2 铁皮石斛 SSR 引物的同属通用性检测

将这 15 对铁皮石斛的 SSR 引物对 20 种石斛属植物的试验材料分别取 3 个样本进行跨种扩增, 根据电泳结果优化反应体系。在来自铁皮石斛的 15 对引物中, 除 XML004、XML007 在石斛种间无相应大小范围的 SSR 扩增产物外, 其他 SSR 引物在 20 个石斛属种材料上能全部或部分扩增出清晰的 SSR 条带并在种间存在一定的多态性, 其中有 9 对 (60%) 引物在所有供试材料上都能扩增出条带, 扩增结果见表 3。说明这些从铁皮石斛基因组开发的 SSR 引物可以在这些物种的 SSR 分析中通用, 通用率达到了

86.7%。

3 基于 SSR 标记的铁皮石斛种质纯度鉴定

基于铁皮石斛 SSR 引物在居群样本中表现的高度多态性及引物的属间通用性, 从 15 对引物中选取 4 对分辨率较高的引物 (XML003、XML005、XML006、XML008) 用于种质组培苗的 SSR 鉴定。随机抽取福建某居群种质 (FJ02) 的 500 株组培苗, 对其 4 个 SSR 位点的带型进行统计。品种纯度检验结果按公式计算: $P = (N_T - N_D) / N_T \times 100\%$ 。公式中, P 为品种纯度; N_T 为供检株数; N_D 为判定为异品种的株数。

由示意图 (图 1) 可以明显区分出种质品种和混杂株, 图 a、b、c、d 分别为相同单株用引物 XML003、XML005、XML006、XML008 的检测结果。箭头所标出的泳道为掺杂的异品种单株。若某单株出现多个 SSR 位点的带型差异, 可确定为混杂植株; 剔除混杂植株后, 某单株的个别 SSR 位点的带型与其他样本不同, 可能是 SSR 位点不纯所致。在用 SSR 标记进行种质纯度鉴定时, 利用单一引物难以区分亲缘关系较近的混杂株, 必需进行多个位点的检测, 将 SSR 位点不纯造成的株间带型差异与种质混杂相区别, 才能获得正确的结果^[20]。

本实验中通过 4 对引物的组合使用, 检测出 3 个特殊单株在这 4 个 SSR 位点均存在带型差异, 497 个单株的带型完全相同, 因此可以确定在 500 株中有 497 株是同一种质品种, 其他 3 株为机械操作导致的混杂株, 品种纯度为 99.4%, 该鉴定结果在组培苗成长后已得到形态学验证。

Table 3 Transferability of SSR primers among closely related species of *Dendrobium officinale*

Primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
XML001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XML005	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
XML006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XML008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML010	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
XML011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML012	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
XML013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XML014	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
XML015	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Number 1–20 denote 20 samples of *Dendrobium* species as show in table 1. “+” indicates successful amplification of PCR product, “-” indicates non-successful amplification of PCR product

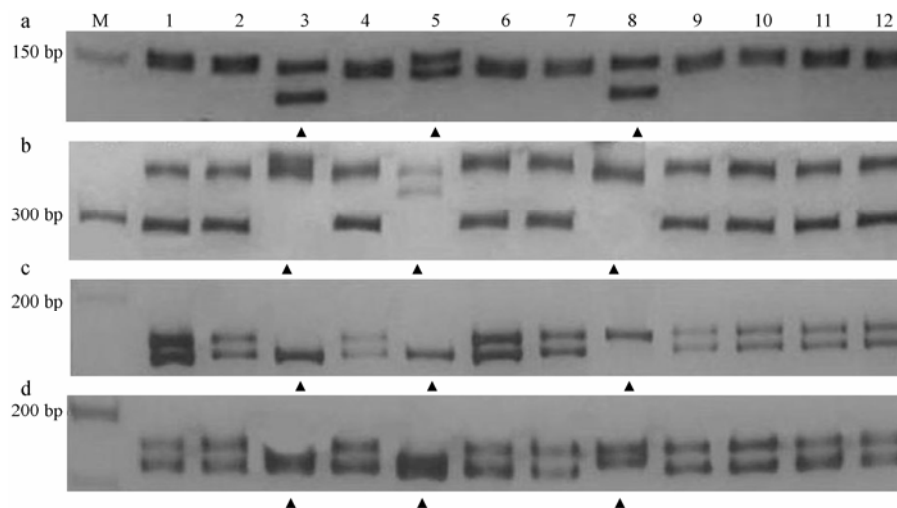


Figure 1 The detection electrophoresis results of artificial population purity of *D. officinale*. M: DNA marker; 1–12: Samples of Fujian germplasm (FJ02) and adulterants; ▲: Stands for detected adulterants; a: XML003; b: XML005; c: XML006; d: XML008

讨论

近年来, 微卫星标记由于其高度的多态性, 已经作为比较理想的分子标记广泛应用于动植物以及医学研究的诸多领域^[21, 22]。它具有在基因组中分布广泛、含量丰富、高变异性、共显性、高重复性等特点, 对 DNA 模板要求很低, 每个 SSR 位点可以设计一对引物用于特异性扩增^[23]。由于 SSR 标记具有一定的特异性, 因而存在引物开发的问题^[24]。根据 Kendall^[25]的统计分析, SSR 侧翼序列的突变不会影响多态性, 大多数 SSR 的 PCR 产物长度的变化可能取决于 SSR 序列的高度突变率, 选择适合用于 SSR 引物设计的序列是关键。本文中 SSR 标记包含了二核苷酸、三核苷酸和混合型重复片段, 在 SSR 引物的多态性位点检测中, 产生等位基因数目多的位点往往是片段重复次数多的 SSR (XML0012) 和混合型重复片段 SSR (XML006、XML014)。因此, 为了提高引物的多态性, 本文在引物设计时首先考虑了包含多重片段重复的 SSR 标记, 取得了较好的效果。

研究表明, 微卫星侧翼序列在属内种间和有较近亲缘关系的属间有一定的保守性, 甚至有部分微卫星位点在亲缘关系较远的分类群间也有保守性^[26]。微卫星侧翼序列的保守性使得在某一物种中开发出的微卫星引物应用于相关的近缘物种成为可能, 而且已经在实践上得以验证^[27–29]。

本研究在石斛不同的种属间同样证实了 SSR 引物的通用性, 这对可用于石斛属植物资源研究的 SSR 标记数量和扩大该类标记的应用范围具有重要的参考价值, 可以节省很多的时间和精力^[30]。在高等植物中, 利用某种植物的已知微卫星引物去扩增同

属植物或同一科中不同属植物获得成功的例子在不断增加^[31, 32]。本文研究发现铁皮石斛基因组开发的 SSR 引物在石斛属中的通用率达到了 86.7%, 为石斛属其他植物运用 SSR 标记进行研究提供了参考。

国内外对珍稀铁皮石斛的需求愈来愈大, 许多企业纷纷开展了不同规模的集约化生产。在人工种植过程中, 人为的机械混杂可能会导致铁皮石斛种质的混杂, 迫切需要寻求可靠、简便的方法对其种质进行鉴定。传统的形态学鉴定方法很难根据幼苗性状表型判断其纯度, 通过 SSR 分子标记, 可为铁皮石斛的真实性和品种纯度鉴定提供遗传学依据。

本文首次将 SSR 标记用于铁皮石斛种质纯度鉴定和真实性判别, 利用 SSR 标记鉴定了 500 株组培苗, 其纯度为 99.4%。不仅满足了种质纯度鉴定的简便、快速、准确的要求, 而且大大降低了检测成本, 为铁皮石斛 GAP 的种质检测提供了简便可靠的检测方法。

References

- [1] Bao XS, Shun QS, Chen LZ. The Medicinal Plants of *Dendrobium (Shi-hu)* in China (中国药用石斛) [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001: 1–40.
- [2] The State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典, 2000 版) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 70.
- [3] Ding XY, Xu LS, 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: 868–873.

- [4] Ding G, Ding XY, Shen J, et al. Genetic diversity and molecular authentication of wide population of *Dendrobium officinale* by RAPD [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 1028–1032.
- [5] Shen J, Ding XY, Liu DY, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating population of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29: 420–422.
- [6] Zhang T, Xu LS, Wang ZT, et al. Molecular identification of medicinal plants: *Dendrobium chrysanthum*, *Dendrobium fimbriatum* and their morphologically allied species by PCR-RFLP analyses [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 728–733.
- [7] Ding XY, Wang ZT, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium species* of “Fengdou” and authentication by analysis of their sequences [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 567–573.
- [8] Shao SG, Han L, Ma YH, et al. Analysis and authentication of cpDNA *psbA-trnH* regions of *Dendrobium species* of Fengdous [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1173–1178.
- [9] Liu J, He T, Chun Z, et al. Analysis and authentication of chloroplast matK gene sequences of *Herba Dendrobii* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1051–1055.
- [10] Sucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants [J]. Planta Med, 2008, 74: 603–623.
- [11] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93: 1071–1077.
- [12] Plaschke J, Ganalm W, Roder MS. MS Detection of genetic diversity in closely elated breed wheat using microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1001–1007.
- [13] Russell JR. Discrimination between barley genotype using microsatellite markers [J]. Genome, 1997, 40: 442–450.
- [14] Wehmeier UF. New multifunctional Escherichia coli-Streptomyces shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates [J]. Gene, 1995, 165: 149–150.
- [15] Anderson JA, Churchill GA, Sutrigue JE, et al. Optimizing parental selection for genetic linkagemaps [J]. Genome, 1993, 36: 181–186.
- [16] Kimura M, Crow JF. The number of alleles that can be maintained in a finite population [J]. Genetics, 1964, 49: 725–738.
- [17] Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. J Hered, 1995, 86: 248–249.
- [18] Nei M. Molecular Evolutionary Genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [19] Bostein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage maps in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314–331.
- [20] Shi HB, Wang LX, Li HB, et al. Division of seeds motley and SSR loci impurity in wheat cultivar using SSR markers [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2006, 4: 513–519.
- [21] Li G, Hu W, Qin R, et al. Simple sequence repeat analyses of interspecific hybrids and MAALs of *Oryza officinalis* and *Oryza sativa* [J]. Genetica, 2008, 134: 169–180.
- [22] Reif JC, Warburton ML, Xia XC, et al. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113: 177–185.
- [23] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1069–1076.
- [24] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1–16.
- [25] Kendall MD. Rank Correlation Methods [M]. 3rd ed. London: Charles Griffin, 1970.
- [26] Morris DB, Richard KR, Wright JM. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic studies of salmonids [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1996, 53: 120–126.
- [27] Fitzsimmons NN, Moritz C, Moore SS. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution [J]. Mol Biol Evol, 1995, 12: 432–440.
- [28] MacRitchie D, Sun GL. Evaluating the potential of barley and wheat microsatellite markers for genetic analysis of *Elymus trachycaulus* complex species [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 720–724.
- [29] Treuren RV, Kuttinen H, Karkkainen K, et al. Evolution of microsatellites in *Arabidopsis petraea* and *Arabidopsis lyrata*, outcrossing relatives of *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Biol Evol, 1997, 14: 220–229.
- [30] Ma KH, Kim NS, Lee GA, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119: 1247–1254.
- [31] Gonzalez-Martinez SC, Gonzalez-Martinez SC, Collada C, et al. Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 103–111.
- [32] Hodgetts RB, Aleksuik MA, Brown A, et al. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 1252–1258.