植 物 分 类 与 资 源 学 报 2011，33（6）：683～689
Plant Diversity and Resources DOI：10.3724/SP.J.1143.2011.11051

HAT-RAPD 技术在姜科象牙参属植物自然杂交个体鉴定中的应用*

杜光辉[1,2]，李庆军[1**]
（1 中国科学院西双版纳热带植物园，云南 昆明 650223；2 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要： 自然杂交在植物中广泛存在，对植物进化起着重要的作用。研究自然杂交现象，除了传粉、形态等传统手段，还需要分子水平的证据。本研究利用 HAT-RAPD 技术，对姜科象牙参属植物的自然杂交现象进行分析，运用主坐标分析和杂交指数分析对疑似杂交个体进行鉴定，探讨 HAT-RAPD 技术在分析和鉴定杂交个体方面的可行性。结果显示，HAT-RAPD 方法比传统 RAPD 扩增的条带更稳定、清楚、容易统计，同时主坐标分析和杂交指数分析的结果表明，形态介于大花象牙参（*Roscoea humeana*）和早花象牙参（*R. cautleoides*）的个体是两者的杂交后代，且与大花象牙参的亲缘关系更近。以上的结果表明 HAT-RAPD 技术可以用于自然杂交的分析，并且由于其简单、易操作等特点，将成为一种非常适合分析和鉴定杂交个体的分子手段。

关键词： 大花象牙参；早花象牙参；疑似杂交个体；HAT-RAPD；主坐标分析；杂交指数
中图分类号： Q 78 **文献标识码：** A **文章编号：** 2095-0845(2011)06-683-07

Application of HAT-RAPD Technique in Identifying Natural Hybrids of *Roscoea* (Zingiberaceae)

DU Guang-Hui[1,2], LI Qing-Jun[1**]
(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650223, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: Natural hybridization is very common in plants, and plays an important role in plant evolution. Besides the traditional methods including morphological analysis and hand crossing, molecular evidence is needed for studying natural hybridization. In order to analyze natural hybridization in *Roscoea*, HAT-RAPD technique was used to identify putative hybrids from parental species by principal co-ordinate analysis and hybrid index. The results indicated that the bands amplified by HAT-RAPD technique were more stable and reliable than that of RAPD. The result of principal co-ordinate analysis and hybrid index showed that intermediate individuals were the hybrids of *R. humeana* and *R. cautleoides*, and showed closer relationships to *R. humeana*. These results suggested that HAT-RAPD could be used to study natural hybridization. As it is simple and easy to manipulate, HAT-RAPD may prove to be a very effective technique in hybrid identification in the studies of plant evolution.

Key words: *Roscoea humeana*; *R. cautleoides*; Putative hybrids; HAT-RAPD; PCOA; Hybrid index

自然杂交现象在植物中非常普遍，随着群体生物学工作的日益深入，人们发现至少有 25% 的植物在其进化历程中经历了与其它近缘种杂交的过程（Mallet，2007）。杂交可以增加种内遗传多

* 基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-YW-Z-0903）；云南省自然科学基金（2007C111M）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：qjli@xtbg.ac.cn
收稿日期：2011-03-23，2011-04-19 接受发表
作者简介：杜光辉（1982-）男，博士研究生，研究方向为植物进化生态。E-mail：du0425@163.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

样性，提高居群的适合度，加强或打破近缘种间的生殖隔离，更是新种形成的一种重要途径（Rieseberg，1997）。由于杂交在植物进化过程中的重要作用，近年来已经成为植物系统与进化研究的热点（Ellstrand 等，1996；Rieseberg 等，2003）。

要准确地鉴定某一物种是否属于杂种或杂种起源并不容易（Rauscher 等，2002）。近年来，大量传统研究方法如形态学（Albert 等，1997；Mckenzie 等，2004；杜玉娟等，2008）、人工杂交（Motley 和 Carr，1998；张敬丽等，2007）等方法被用于研究自然杂交，但通常不能准确判断杂种，即使已经从形态学或细胞遗传学上确定一个物种是杂种或杂种起源，仍然需要用其他一些证据加以验证（Soltis 等，1992）。随着分子生物学的迅速发展，一些分子生物学方法，如 AFLP、SSR、DNA 测序技术被用来研究和验证杂交种（Szczepaniak 等，2007；袁长春等，2007；李小娟等，2007；Ortego 和 Bonal，2009）。但是在实际应用中，这些技术方法都存在着一定的不足。AFLP 技术步骤多、流程长，所需模版 DNA 的质量要求高，同时还需要限制性内切酶进行酶切，所以操作难度大，很难掌握（付瑜华等，2007）。SSR 标记是共显性标记，可以鉴定杂合体，但是 SSR 引物的设计必须知道微卫星两端序列，引物的开发受到很大的限制（高志红等，2002）。DNA 测序的方法由于其准确性，可以检测到碱基的变异，是目前应用于杂交种分析和鉴定的比较有效的方法。核 DNA 测序鉴定杂交种的方法其原理是：如果两个亲本在相同位点上的碱基不同，那么，在其杂交后代的对应位点上将检测出两种不同的碱基，其中一个来自父本，一个来自母本，因而在原始测序图上，将呈现出这两种碱基的峰的叠加（袁长春等，2004）。叶绿体基因，属于细胞质遗传，通常为母系遗传方式（胡适宜，1997；奇文清等，1999），可以结合核基因片段结果用来区分父母本和确定杂交的方向。但是由于亲本的遗传关系比较近，或者存在基因渗入等原因，造成了某些基因或者片段在亲本之间没有差异（Feliner 等，2002）；或者当一个杂交种已进行许多代的繁衍，亲本之一的基因可能完全从杂种的基因组中消失，将限制 DNA 测序在杂交研究中的应用，达不到检测的目的（Rauscher 等，2002）。同时 DNA 测序所需费用比较高。以上所述各种分子技术都有一定缺点，所以寻找到一种简单有效的分子手段是非常有价值的。

HAT-RAPD（high annealing temperature random amplified polymorphic DNA）技术是 2000 年由 Anuntalabhochai 等（2000）在传统的 RAPD（random amplified polymorphic DNA）技术的基础上发展起来的一项 DNA 水平上的多态性检测技术。该方法主要把传统的 RAPD 的退火温度从 35～37℃提高到 46～48℃，从而提高了实验结果的可靠性和稳定性。同时该方法又具有 RAPD 技术的以下优点：模板 DNA 用量少，纯度低；引物不受物种的限制，具有通用性；在 DNA 分子水平上进行检测，不受环境、季节、组织器官以及发育时期的限制，取样方便；简单容易掌握，操作过程不需要同位素标记、Southern 杂交等复杂的过程，成本花费低等（Williams 等，1990）。HAT-RAPD 方法已经被成功运用到许多热带植物的研究中（Cutler 等，2006，2007；Ruangsuttapha 等，2007；Anuntalabhochai 等，2007），但是在自然杂交种的分析和鉴定方面还未见报道。

象牙参属（*Roscoea*）是姜科中的一个小属，主要沿着喜马拉雅山脉分布于从克什米尔至我国西南的横断山脉这一地区（海拔 1 200～4 880 m），是姜科植物中唯一真正的高山分布类群（Cowley，1982）。其中横断山区尤其是滇西北是其现在的分布中心之一，多种象牙参同域分布现象十分普遍（Cowley，1982）。大花象牙参（*Roscoea humeana*）和早花象牙参（*R. cautleoides*）是象牙参属中关系非常近的两个种（Ngamriabsakul 等，2000）。在云南省丽江市西北的玉龙雪山干海子地区，这两个种同域分布，并且在这两个居群分布的交叉地带，张志强（2008）发现存在形态上居于两者之间的疑似杂交个体，但是没有一个明显的形态性状可以清楚地把疑似杂交个体和亲本区分开，急需一种简单有效的分子手段进行鉴定和分析。

本文试图通过传统的 RAPD 方法和 HAT-RAPD 方法的对比，检验 HAT-RAPD 技术是否比传统的 RAPD 方法更稳定可靠；同时检验能否利用该技术准确地对疑似杂交个体进行分子鉴定，即是否能很好地把杂交个体和亲本区分开，从而可以作为一种简单有效的进行杂交种鉴定和分析的分子技术。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　材料

研究材料采自云南省丽江市玉龙雪山的干海子地区（27°05′ N，100°16′ E；海拔 3 120 m）。分别随机选取大花象牙参、早花象牙参各 20 株和疑似杂交个体 38 株，共 78 份材料，取其幼嫩的叶片（大约 1 g），硅胶干燥保存备用。

1.2　实验方法

总 DNA 提取采用改良的 CTAB 法（Doyle 和 Doyle，1987）。DNA 纯度和浓度分别采用 1.0%（m/v）琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计（Thermo 公司，NanoDrop1000 spectrophotometer）进行检测。

PCR 扩增反应在 PCR 仪（ABI 公司 2720 型）上进行，引物由上海生工合成，参照 Anuntalabhochai 等（2007）的 HAT-RAPD 扩增程序，即：95℃ 预变性 2 min，95℃ 变性 30 s，46℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 45 s，35 个循环后，72℃ 延伸 5 min，最后 4℃ 保存。传统的 RAPD 方法只是退火温度为 37℃，其它参数不变。扩增反应均采用 25 μL 的反应体系：10 ~ 40 ng 模板 DNA，2.5 μL 10×PCR buffer，1.5 mmol · L^{-1} Mg^{2+}，0.2 mmol · L^{-1} dNTPs，4 mmol · L^{-1} 引物和 1.5 U Taq 酶（Takara）。扩增反应完成后，1.5%（m/v）琼脂糖凝胶电泳检测，核酸染料（Goldview）染色后，在凝胶成像系统下拍照，保存统计。

同一引物、同一位点，按照其扩增产物的有（1）无（0）得到二元数据，形成 0，1 矩阵。只筛选物种特异性的条带作为下一步的分析，因为相同的条带对于区分杂交种没有作用。同时由于物种之间的关系比较近，还有基因渗入的问题，所以很难找到只在一个物种出现，而在另一个物种不出现的标准的特异带。根据前人的报道（Allan 等，1997；Neuffer 等，1999），本实验采用只在某一物种普遍存在，同时条带出现的比例大于另一物种 50% 以上的条带作为物种的特异带。

根据统计的条带，主要进行以下两种方法的分析：1. 主坐标分析（principal co-ordinate analysis，PCOA）：运用 GenAlEx6.4 软件（Peakall 和 Smouse，2006），先计算 Nei 遗传距离，再根据 Nei 遗传距离形成主坐标图。2. 杂交指数分析：根据 Fritz（1994）的算术杂交指数的方法，设标准的早花象牙参（指物种特异带都出现，非物种特异带都不出现的理想状态）的指数为 0，标准的大花象牙参的指数为 1，当与标准的早花象牙参有一条带的差异，其杂交指数按比例增加，最大范围到 1，所以杂交个体的指数应该在 0 ~ 1 之间。

2　结果

2.1　HAT-RAPD 与传统 RAPD 的结果比较

图 1 是引物 B1046 分别用传统 RAPD（上）和 HAT-RAPD（下）方法进行扩增，在相同的电泳条件下的结果。从图 1 可以看出，通过 HAT-RAPD 的方法扩增的条带比传统 RAPD 更清楚稳定。用传统 RAPD 方法扩增不出来，或者不清楚的条带，在 HAT-RAPD 中都很清楚、容易统计，这为下一步条带统计和分析带来了方便。

2.2　引物的筛选及特异扩增带

从 216 条 RAPD 引物中，挑选出扩增产物条带清楚、差异明显的引物 27 条（表 1），共计 42 个特异性片段（表 2）。为了提高扩增的稳定性和增加引物的退火温度，筛选出的引物的 GC 含量都在 60%（含）以上（表 1）。在 42 条特异性条带中，大花象牙参有 27 条，早花象牙参 15 条，其中有些条带是严格的物种特异性条带，如引物 OPD-03 在大约 600 bp 处扩增的条带。在疑似杂交个体中，既有父本的特异性条带又有母本的特异性条带，很好地证明了这些个体是杂交后代。

2.3　PCOA 与 Nei 遗传距离分析

通过 PCOA 分析（图 2）可以看出，78 份材料共聚成三类，大花象牙参一类，早花象牙参一类，而疑似杂交个体处于两者之间，且与大花象牙参的亲缘关系较近。第一、第二两个主坐标

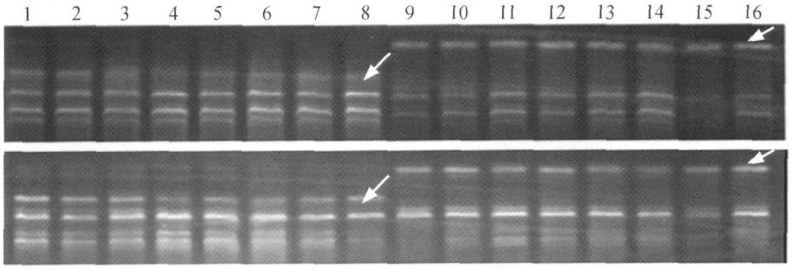

图 1　引物 B1046 分别用传统 RAPD（上）和 HAT-RAPD（下）的扩增结果。箭头表示特异扩增条带；1 ~ 8 为大花象牙参，9 ~ 16 为早花象牙参

Fig. 1　Amplification of primer B1046 by RAPD (upper) and HAT-RAPD (lower) techniques. Arrows show the specific amplified fragment; 1–8 are *R. humeana*; 9–16 are *R. cautleoides*

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 RAPD引物名称、序列及GC含量

Table 1 Primers' name, sequences and GC%

引物名称 Primers	序列（5′~3′）Sequences	GC含量 GC/%	引物名称 Primers	序列（5′~3′）Sequences	GC含量 GC/%
B1046	GTCGGAGCGG	80	OPA 07	GAAACGGGTG	60
OPW 08	GACTGCCTCT	60	OPA 08	GTGACGTAGG	60
OPW 16	CAGCCTACCA	60	OPA 15	TTCCGAACCC	60
OPR 16	CTCTGCGCGT	70	OPA 17	GACCGCTTGT	60
OPT 16	GGTGAACGCT	60	OPB 12	CCTTGACGCA	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	60	OPJ 10	AAGCCCGAGG	70
OPG 13	CTCTCCGCCA	70	OPX 03	TGGCGCAGTG	70
OPD-03	GTCGCCGTCA	70	OPX 11	GGAGCCTCAG	70
S2077	GTTCGCTCCC	70	OPE 02	GGTGCGGGAA	70
S2100	CAAAGGCGTG	60	OPC 01	TTCGAGCCAG	60
S2159	GTCGTGCGGA	70	OPI 16	TCTCCGCCCT	70
OPA 04	AATCGGGCTG	60	OPO 11	GACAGGAGGT	60
OPD 18	GAGAGCCAAC	60	OPO 13	GTCAGAGTCC	60
OPN 06	GAGACGCACA	60			

表2 HAT-RAPD特异片段的大小及在大花象牙参、早花象牙参和疑似杂交个体中的扩增比例

Table 2 The size of HAT-RAPD specific fragments and its amplification ratio in *R. humeana*, *R. cautleoides* and putative hybrids

引物名称 Primer names	片段大小 Fragments' size	大花象牙参 *R. humeana*	疑似杂交个体 Putative hybrids	早花象牙参 *R. cautleoides*	引物名称 Primer names	片段大小 Fragments' size	大花象牙参 *R. humeana*	疑似杂交个体 Putative hybrids	早花象牙参 *R. cautleoides*
B1046	500	1.00	1.00	0.05	OPA 15	550	0.05	0.24	0.75
OPW 08	400	0.05	0.63	0.90		600	1.00	0.95	0.05
	800	0.95	0.76	0.00		650	0.05	0.29	0.70
OPW 16	800	1.00	1.00	0.20	OPA 17	550	0.90	0.89	0.00
OPR 16	1000	0.90	0.53	0.00		750	0.15	0.84	1.00
	1200	0.60	0.53	0.00	OPB 12	400	1.00	1.00	0.00
OPT 16	250	1.00	0.84	0.05		1100	1.00	0.74	0.00
OPB-01	500	0.65	0.63	0.10	OPJ 10	1200	0.85	0.42	0.00
	1600	0.20	0.92	0.90	OPX 03	400	0.40	0.79	1.00
OPG 13	400	1.00	0.95	0.05		500	0.00	0.47	0.80
OPD-03	450	0.15	0.53	0.85		550	0.95	0.53	0.10
	600	1.00	1.00	0.00		600	0.95	0.84	0.00
	1100	0.80	0.39	0.30	OPX 11	450	0.00	0.61	0.85
S2077	650	1.00	1.00	0.05		1400	0.00	0.84	0.80
S2100	1100	0.05	0.76	0.70		1600	0.60	0.63	0.00
S2159	400	0.05	0.58	0.90	OPE 02	850	0.95	0.79	0.05
OPA 04	900	1.00	0.82	0.05	OPC 01	260	1.00	1.00	0.10
OPD 18	650	1.00	0.97	0.20		400	0.00	0.45	0.95
OPN 06	550	1.00	1.00	0.05	OPI 16	800	1.00	0.92	0.10
OPA 07	1700	1.00	0.63	0.20	OPO 11	900	0.05	0.71	0.90
OPA 08	400	1.00	0.95	0.05	OPO 13	600	0.20	0.82	0.95

共解释了80.05%的变异，其中在第一主坐标（66.64%的变异）方向上大花象牙参、早花象牙参和疑似杂交个体能够很好地分开。而Nei遗传距离（表3）显示，大花象牙参和早花象牙参的遗传距离为1.266，疑似杂交个体与两种象牙参之间的遗传距离分别是0.141和0.580，介于两种象牙参之间，且与大花象牙参的遗传距离更近。

2.4 杂交指数分析

通过杂交指数的分析（图3）可以看出，疑似杂交个体的杂交指数都在0~1之间，介于大花象牙参和早花象牙参之间，证明是两者的杂交后代。同时疑似杂交个体的杂交指数都大于0.5，且更偏

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

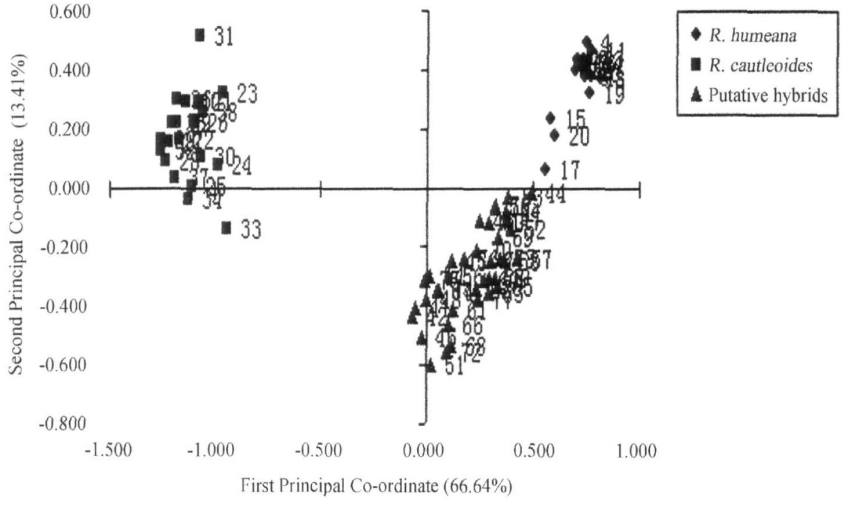

图 2　大花象牙参、早花象牙参和疑似杂交个体 PCOA 分析的散点图

Fig. 2　Plot of *Roscoea* samples by PCO analysis based on HAT-RAPD bands

表 3　大花象牙参、早花象牙参和疑似杂交个体之间的 Nei 遗传距离

Table 3　Pairwise population matrix of Nei genetic distance in *R. humeana*, *R. cautleoides*, and putative hybrids

物种 Species	大花象牙参 *R. humeana*	早花象牙参 *R. cautleoides*	疑似杂交个体 Putative hybrids
大花象牙参 *R. humeana*	0.000		
早花象牙参 *R. cautleoides*	1.266	0.000	
疑似杂交个体 Putative hybrids	0.141	0.580	0.000

向于大花象牙参，说明疑似杂交个体与大花象牙参亲缘关系更近。其中有些杂交个体的杂交指数在 0.65 以上，可能是与大花象牙参的回交后代。

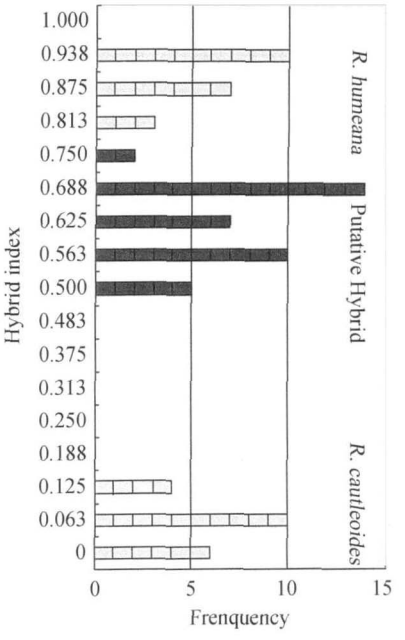

图 3　大花象牙参、早花象牙参和疑似杂交个体参杂交指数频率分布图

Fig. 3　Frequency distribution of hybrid index in *R. humeana*, *R. cautleoides* and putative hybrids

3　讨论

理想的分子标记技术应该同时具有以下几个特点（Agarwal 等，2008）：（1）具有多态性，并且多态性在整个基因组中均匀分布；（2）能够准确地揭示遗传差异；（3）能够产生稳定可靠的条带；（4）简单，快捷，成本低；（5）需要很少的组织和 DNA 样品；（6）与不同表型相联系；（7）不需要预先知道物种的基因和序列。目前，还没有任何一种分子技术可以同时具有上述全部特点。

RAPD 方法有很多的优点，已经成功地应用于分子生态学研究中（Hadrys 等，1994），但是由于其退火温度偏低，导致条带的重复性和稳定性很差，其结果受到很多质疑（Bardakci，2001）。近几年，随着其它分子标记的出现和测序的应用，RAPD 方法已经渐渐被人们抛弃。但是，RAPD 方法简单、易操作、成本低等特点是人们希望利用的。HAT-RAPD 技术就是在 RAPD 方法

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基础上提出的，主要通过提高退火温度，从而使扩增条带稳定、重复性高的一种分子标记。本研究通过 HAT-RAPD 和传统 RAPD 的对比，确实发现 HAT-RAPD 方法扩增的条带更清楚稳定，为下一步的统计分析提供了方便。

传统 RAPD 方法除了退火温度偏低，还有其它两个主要问题：（1）引物长度很短（一般只有10个碱基）（傅俊江等，2000）。针对这个问题，可以选择 GC 含量高的引物，作为 HAT-RAPD 方法的扩增引物。根据已有的报道（Eimert 等，2003；Ruangsuttapha 等，2007），GC 含量高，引物结合更稳定，同时 GC 含量高的引物其退火温度也相应偏高。本实验筛选出的27条引物 GC 含量都在60%（含）以上，保证了引物结合的稳定性，从而使扩增的条带更稳定可靠。（2）RAPD 标记是显性标记，不能区分杂合体（Bardakci，2001）。为了能够很好的把疑似杂交个体和亲本区分开，在实验中只筛选物种特异带，只要父母本的特有带在疑似杂交个体中都能找到，就可以说明其杂交个体的地位。

通过 HAT-RAPD 方法筛选出的特异带，有的是物种的真正的特有带（就是在某一物种的全部个体中出现，而在另一物种个体中都不出现的条带），这些可以进一步转化为共显性的 SCAR 标记而作为区分物种的特有标记。通过 HAT-RAPD 方法发现物种性状相关的特异带而成功转化为 SCAR 标记的例子也有很多（Culter 等，2006，2007）。

根据 HAT-RAPD 方法统计的条带，本实验主要通过主坐标和杂交指数两种方法进行了分析比较，两种方法的结果虽然有一定的不一致，但是主要结果是相同的，都能清楚地区分出杂交个体。除了 PCOA 和杂交指数分析，利用 HAT-RAPD 条带，我们还可以进行很多处理分析，得到不同方面的信息。如利用 NewHybrids 软件（Anderson 和 Thompson，2002）把杂交个体划分为 F_1、F_2 或者回交后代；利用 Structure 软件（Pritchard 等，2000）可以进行居群结构的分析；还可以利用 NTSYSpc 软件进行聚类分析。

通过本实验的分子结果，我们可以确定形态上介于大花象牙参和早花象牙参的个体是两者的杂交后代，并且这些杂交个体与大花象牙参的关系更近。通过一系列方法的改进，使 HAT-RAPD 扩增更稳定，结果更可信；同时证明 HAT-RAPD 方法能够简单有效地从分子水平区分杂交个体和父母本的关系，成为一种鉴定杂交个体的有效分子手段。

〔参 考 文 献〕

张志强，2008. 象牙参属植物的繁殖策略与生殖隔离机制 [D]. 勐腊：中国科学院西双版纳热带植物园（博士学位论文）

Agarwal M，Shrivastava N，Padh H，2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. *Plant Cell Reports*，**27**（4）：617—631

Albert ME，D'Antonio CM，Schierenbeck KA，1997. Hybridization and introgression in *Carpobrotus* spp.（Aizoaceae）in California. I. Morphologica1 evidence [J]. *American Journal of Botany*，**84**（7）：896—904

Allan GJ，Clark C，Rieseberg LH，1997. Distribution of parental DNA markers in *Encelia virginensis*（Asteraceae：Heliantheae），a diploid species of putative hybrid origin [J]. *Plant Systematics and Evolution*，**205**（3-4）：205—221

Anderson EC，Thompson EA，2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data [J]. *Genetics*，**160**（3）：1217—1229

Anuntalabhochai S，Chiangda J，Chandet R *et al.*，2000. Genetic diversity within lychee（*Litchi chinensis* Sonn.）based on RAPD analysis [J]. *Acta Horticulturae*，**575**：253—259

Anuntalabhochai S，Sitthiphrom S，Thongtaksin W *et al.*，2007. Hybrid detection and characterization of *Curcuma* spp. using sequence characterized DNA markers [J]. *Scientia Horticulturae*，**111**（4）：389—393

Bardakci F，2001. Random amplified polymorphic DNA（RAPD）markers [J]. *Turkish Journal of Biology*，**25**（2）：185—196

Cowley EJ，1982. A revision of *Roscoea*（Zingiberaceae）[J]. *Kew Bulletin*，**36**（4）：747—777

Cutler RW，Chundet R，Handa T *et al.*，2006. Development of sequence characterized DNA markers linked to a temperature dependence for flower induction in lychee（*Litchi chinensis* Sonn.）cultivars [J]. *Scientia Horticulturae*，**107**（3）：264—270

Cutler RW，Sitthiphrom S，Marha J *et al.*，2007. Development of sequence characterized DNA markers linked to a temperature insensitivity for fruit production in Longan（*Dimocarpus longan* Lour.）cultivars [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*，**193**（1）：74—78

Doyle J，Doyle JL，1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues [J]. *Phytochemical Bulletin*，**19**（1）：11—15

Du YJ（杜玉娟），Wang YJ（王云瑾），Yang J（杨洁）*et al.*，2008. Morphological analysis of *Hippophae rhamnoides* ssp. sinensis × *Hippophae neurocarpa* ssp. neurocarpa hybrid zone [J]. *Journal of Northwest Normal University*（Natural Science）（西北师范大学学报自然科学版），**44**（3）：73—77

Eimert K，Reutter G，Strolka B，2003. Fast and reliable detection of

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

doubled-haploids in *Asparagus officinalis* by stringent RAPD-PCR [J]. *Journal of Agricultural Science*, **141** (1): 73—78

Ellstrand NC, Whitkus RW, Rieseberg LH, 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93** (10): 5090—5093

Feliner NG, Aguilar JF, Rossello JA, 2002. Reticulation or divergence: the origin of a rare serpentine endemic assessed with chloroplast, nuclear, and RAPD markers [J]. *Plant Systematics and Evolution*, **231** (1-4): 19—38

Fritz RS, Nichols-Orians CM, Brunsfeld SJ, 1994. Interspecific hybridization of plants and resistance to herbivores: hypotheses, genetics, and variable responses in a diverse herbivore community [J]. *Oecologia*, **97** (1): 106—117

Fu JJ (傅俊江), Li LY (李麓芸), Xu X (徐湘) *et al.*, 2000. An improved method for increasing the efficiency of the technique of random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Heredity* (遗传), **22** (4): 251—252

Fu YH (付瑜华), Wang WQ (王文泉), Wang HY (王海燕) *et al.*, 2007. Modification of AFLP technology and its application in tropical crop genetic and breeding research [J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), (2): 98—101

Gao ZH (高志红), Zhang Z (章镇), Han ZH (韩振海), 2002. SSR technique and development of the study in fruit science [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), **19** (5): 281—285

Hadrys H, Balick M, Schierwater B, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology [J]. *Molecular Ecology*, **1** (1): 55—63

Hu SY (胡适宜), 1997. Acytological study of plastid inheritance in angiosperms [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **39** (4): 363—371

Li XJ (李小娟), Wang LY (王留阳), Yang HL (杨惠玲) *et al.*, 2007. Confirmation of natural hybrids between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **29** (1): 91—97

Mallet J, 2007. Hybrid speciation [J]. *Nature*, **446**: 279—283

Mckenzie RJ, Ward JM, Lovis JD *et al.*, 2004. Morphological evidence for natural intergeneric hybridization in the New Zealand Gnaphalieae (Compositae): *Anaphalioides bellidioides* × *Ewartia sinclairii* [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **145** (1): 59—75

Motley TJ, Carr GD, 1998. Artificial hybridization in Hawaiian endemic genus *Labordia* (Logonniaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **85** (5): 650—660

Neuffer B, Auge H, Mesch H *et al.*, 1999. Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization [J]. *Molecular Ecology*, **8** (3): 365—377

Ngamriabsakul C, Newman MF, Cronk QCB, 2000. Phylogeny and disjunction in *Roscoea* (Zingiberaceae) [J]. *Edinburgh Journal of Botany*, **57** (1): 39—61

Ortego J, Bonal R, 2010. Natural hybridisation between kermes (*Quercus coccifera* L.) and holm oaks (*Q. ilex* L.) revealed by microsatellite markers [J]. *Plant Biology*, **12** (1): 234—238

Peakall R, Smouse PE, 2006. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Molecular Ecology Notes*, **6** (1): 288—295

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, **155** (2): 945—959

Qi WQ (奇文清), Yang HJ (杨慧君), Xue YB (薛勇彪) *et al.*, 1999. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **41** (7): 695—699

Rauscher JT, Doyle JJ, Brown AHD, 2002. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex [J]. *Molecular Ecology*, **11** (12): 2691—2702

Rieseberg LH, 1997. Hybrid origins of plant species [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**: 359—389

Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM *et al.*, 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization [J]. *Science*, **301** (5637): 1211—1216

Ruangsuttapha S, Eimert K, Schröder MB *et al.*, 2007. Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54** (7): 1565—1572

Soltis PS, Doyle JJ, Soltis DE, 1992. Molecular data and polyploid evolution in plants [A]. In: Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ eds. *Molecular Systematics of Plants* [M]. New York: Chapman and Hall, 177—201

Szczepaniak M, Cieslak E, Bednarek PT, 2007. Natural hybridization between *Elymus repens* and *E. hispidus* assessed by AFLP analysis [J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **76** (3): 225—234

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **18** (22): 6531—6535

Yuan CC (袁长春), He XB (何雪宝), Yuan QM (袁秋梅) *et al.*, 2007. Genetic relationship between a natural hybrid *Meconopsis* × *cookei* (Papaveraceae) and its parents based on cpDNA trnL-trnF region sequence [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **29** (1): 103—108

Yuan CC (袁长春), Li PX (黎培新), Wang YF (王燕芳) *et al.*, 2004. The confirmation of putative natural hybrid species *Meconopsis*×*cookei* G. Taylor (Papaveraceae) based on Nuclear Ribosomal DNA ITS region sequence [J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), **31** (9): 901—907

Zhang JL (张敬丽), Zhang CQ (张长芹), Wu ZK (吴之坤) *et al.*, 2007. The potential roles of interspecific pollinationin natural hybridization of *Rhododendron* species in Yunnan, China [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **15** (6): 658—665

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net