

2.5 高山红景天原生质体培养与植株再生:将纯化的原生质体密度调到  $2 \times 10^5$  个/mL,在黑暗条件下进行液体浅层培养,经 3 d 可见第 1 次细胞分裂(图 3-2),图 3-3、4 为液体浅层培养 14 d 和 20 d 形成细胞团的情况。在液体浅层培养约 40 d 时,可形成图 3-5 中肉眼可见的愈伤组织。经过 2~3 d 的弱光培养锻炼,将愈伤组织转移到培养基 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 上进行光照培养。继续培养约 45 d 时,愈伤组织生长十分旺盛,并有少量芽体萌发(图 3-6)。挑选鲜绿色愈伤组织转入芽分化培养基 MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 进行芽诱导,待小芽长至 2.0 cm 左右,切下转入 1/2MS 生根培养基上形成完整植株(图 3-7),再生苗移栽温室 1 个月的情况见图 3-8。

### 3 结语

目前,高山红景天的人工栽培需 4~5 年,通过原生质融合的方式获得多倍体种质是提高其药用成分、缩短栽培年限的可行性途径之一。高山红景天的原生质体培养研究在国内外尚未见报道,本研究结果为

高山红景天的多倍体育种等研究提供了科学依据。

### 参考文献:

- [1] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天(*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)茎尖包埋—玻璃化法超低温保存与植株再生[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(3):265-270.
- [2] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天愈伤组织的玻璃化法保存及植株再生[J].北京林业大学学报,2007,29(2):147-151.
- [3] 石铁源,全雪丽,张美淑,等.高山红景天栽培条件探讨[J].中药材,2006,29(2):107-108.
- [4] 石铁源,郑明焕,李熙英,等.高山红景天育苗技术[J].林业科技,2006,31(2):60-62.
- [5] 阎秀峰,王洋,于涛,等.红景天的栽培采收方法[P].中国专利:CN1579134,2004-05-19.
- [6] 阎秀峰,王洋,尚辛亥,等.温室栽培光强和光质对高山红景天生物量和红景天甙含量的影响[J].生态学报,2003,23(5):841-849.
- [7] Kanchanapoom K, Jantaro S, Rakchad D. Isolation and Fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium pompadour* [J]. *Sci Asia*, 2001, 27: 29-34.
- [8] Mandal P, Sikdar S R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Rorippa indica* (L.) Hiern, a wild crucifer [J]. *Curr Sci*, 2003, 85(10): 1451-1454.
- [9] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天叶片愈伤组织诱导与植株再生[J].东北林业大学学报,2007,35(2):33-34.
- [10] 唐克轩.中草药生物技术[M].上海:复旦大学出版社,2005.

## 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化

廖 丽,郭巧生\*

(南京农业大学中药材研究所,江苏 南京 210095)

**摘要:**目的 建立并优化夏枯草 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序,为探讨夏枯草种质间遗传多样性奠定基础。方法 采用单因子试验和正交设计方法,研究  $Mg^{2+}$ 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA、退火温度及循环次数对 PCR 扩增的影响。结果 夏枯草 ISSR-PCR 的最佳反应体系为:在 20  $\mu$ L 的反应体系中含模板 DNA 30 ng,  $Mg^{2+}$  2.2 mmol/L, dNTP 175  $\mu$ mol/L, 引物 0.75  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。在此基础上,从 92 条引物中筛选出 18 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物,并通过梯度 PCR 试验,确定引物最佳退火温度。结论 采用单因子试验和正交设计方法可以快速建立 ISSR-PCR 反应体系,经过 24 份夏枯草种质检验,证明该体系稳定可靠,可用于夏枯草遗传分析。

**关键词:**夏枯草;ISSR-PCR;正交设计;单因子试验

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1131-05

## Establishment of ISSR marker technology and optimization of its system in *Prunella vulgaris*

LIAO Li, GUO Qiao-sheng

(Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** **Objective** To establish and optimize the ISSR-PCR reaction system for *Prunella vulgaris* and lay foundation for its genetic diversity research. **Methods** The single-factor and orthogonal design were applied for optimizing seven factors in the ISSR-PCR reaction system including  $Mg^{2+}$ , dNTP, prim-

\* 收稿日期:2008-10-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772730)

作者简介:廖 丽(1981—),女,江西乐安人,博士研究生。E-mail:fafu301@yahoo.com.cn

\*通讯作者 郭巧生 Tel:(025)84396591 E-mail:gqs@njau.edu.cn

ers, *Taq* DNA polymerase, the template DNA, annealing temperature, and cycles. **Results** The suitable PCR reaction system contained 2.2 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 175  $\mu$ mol/L dNTP, 0.75  $\mu$ mol/L primer, 1.0 U *Taq* DNA polymerase, and 30 ng template DNA in total 20  $\mu$ L reaction solution. On this basis, 18 primers were screened with stable amplification and rich polymorphism from 92 ISSR primers. The optimal annealing temperature for ISSR-PCR reaction was proposed by gradient PCR. **Conclusion** It is a way to establish the ISSR-PCR system for orthogonal design combining with single-factor test. And it is proved to be stable and credible for the result of 24 *P. vulgaris* populations. This optimized ISSR reaction system would provide the basis for the genetic analysis of *P. vulgaris*.

**Key words:** *Prunella vulgaris* L.; ISSR-PCR; orthogonal design; single factor test

夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 为唇形科夏枯草属多年生草本植物,其干燥果穗为我国传统大宗药材。目前夏枯草以野生资源为主,广泛分布于江苏、安徽、浙江、河南等地,复杂的野生环境使其产生丰富的遗传变异。本课题组收集了全国 15 个省(市)种质资源,开展了夏枯草种子萌发、栽培生理、药材内在质量等方面研究<sup>[1,2]</sup>,发现其种内植株形态和内在质量差异显著。因此,从分子水平对夏枯草进行种质鉴定和遗传多样性分析以控制其药材质量变得日益重要。

简单序列重复区间扩增(inter simple sequence repeats, ISSR)是在微卫星技术上发展起来的一种新型分子标记技术,具有多态性高,稳定性好,产物特异性强等特点<sup>[3]</sup>,已被广泛应用于植物的品种鉴定、遗传作图、基因定位、分类与进化等诸多领域<sup>[4~7]</sup>。但其稳定性易受 PCR 体系中 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、引物、dNTP 及扩增程序中退火温度、循环次数等多个因素的影响。因此,本研究采用正交和单因素相结合实验设计,建立夏枯草 ISSR-PCR 最佳反应体系,并对扩增反应中的退火温度、延伸时间以及循环次数进行筛选,获得 ISSR-PCR 反应的最佳扩增程序,为今后夏枯草种源鉴定、遗传多样性、亲缘关系、优良性状标记等奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料与仪器:试验所用的 24 份夏枯草采自江苏、安徽、河南、浙江等主产区,经南京农业大学郭巧生教授鉴定。其中用于体系优化和引物筛选试验源自江苏南京,其他材料均用作体系验证。DNA 扩增采用的是 MJ Research 公司的 PTC-200<sup>TM</sup> PCR 仪。图像分析采用上海培清科技有限公司 JS-380 自动凝胶图像分析仪。ISSR 引物购自上海生兴生物工程公司,dNTP、*Taq* 酶和 DNA Marker 购自上海申能博彩有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取:以夏枯草嫩叶为材料,采用 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[8]</sup>,用 1.0% 琼脂糖电泳和核酸检测仪检测 DNA 质量浓度,并稀释至 30 ng/ $\mu$ L。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计:采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计,对  $Mg^{2+}$ 、dNTP、引物、*Taq* 酶和模板 DNA 进行 5 因素 4 水平筛选,见表 1。根据表 1 制备总体积为 20  $\mu$ L 的反应体系,除表中变化因素外,每管中还含有 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer,引物选用 (AC)<sub>8</sub>TA,PCR 扩增程序为:94 预变性 5 min;94 变性 45 s,退火 45 s,72 延伸 90 s,45 个循环;72 延伸 5 min,4 保存。扩增反应结束后,PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶中含 0.05% 的溴化乙锭,电极缓冲液为 1  $\times$  TAE,电压 5 V/cm 电泳结束后在凝胶成像分析仪上观测分析并照相。

表 1 ISSR-PCR 正交试验设计  $L_{16}(4^5)$

Table 1 Orthogonal design for ISSR-PCR  $L_{16}(4^5)$

| 处理<br>组合 | 因 素                                            |                                              |                                                      |                          |            |
|----------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|------------|
|          | dNTP/<br>( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> ) | 引物/<br>( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> ) | $Mg^{2+}$ /<br>( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> ) | <i>Taq</i> DNA<br>聚合酶/ U | DNA/<br>ng |
| 1        | 125                                            | 0.50                                         | 1.6                                                  | 0.5                      | 15         |
| 2        | 125                                            | 0.75                                         | 1.9                                                  | 1.0                      | 30         |
| 3        | 125                                            | 1.00                                         | 2.2                                                  | 1.5                      | 45         |
| 4        | 125                                            | 1.25                                         | 2.5                                                  | 2.0                      | 60         |
| 5        | 175                                            | 0.50                                         | 1.9                                                  | 1.5                      | 60         |
| 6        | 175                                            | 0.75                                         | 1.6                                                  | 2.0                      | 45         |
| 7        | 175                                            | 1.00                                         | 2.5                                                  | 0.5                      | 30         |
| 8        | 175                                            | 1.25                                         | 2.2                                                  | 1.0                      | 15         |
| 9        | 225                                            | 0.50                                         | 2.2                                                  | 2.0                      | 30         |
| 10       | 225                                            | 0.75                                         | 2.5                                                  | 1.5                      | 15         |
| 11       | 225                                            | 1.00                                         | 1.6                                                  | 1.0                      | 60         |
| 12       | 225                                            | 1.25                                         | 1.9                                                  | 0.5                      | 45         |
| 13       | 275                                            | 0.50                                         | 2.5                                                  | 1.0                      | 45         |
| 14       | 275                                            | 0.75                                         | 2.2                                                  | 0.5                      | 60         |
| 15       | 275                                            | 1.00                                         | 1.9                                                  | 2.0                      | 15         |
| 16       | 275                                            | 1.25                                         | 1.6                                                  | 1.5                      | 30         |

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系单因子试验:依据正交试验结果,选择扩增效果较好的反应体系,在此基础上进行单因素实验,进一步优化影响扩增效果的因素。其中 *Taq* 酶用量设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U 6 个梯度,dNTP 浓度设置 75、125、175、225、275、325  $\mu\text{mol/L}$  6 个梯度, $\text{Mg}^{2+}$  浓度设置 1.0、1.3、1.6、1.9、2.2、2.5  $\text{mmol/L}$  6 个梯度,引物浓度设置 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50  $\mu\text{mol/L}$  6 个梯度,DNA 模板设置 5、10、20、30、40、50、60、80、100、120 ng 共 10 个梯度,除 DNA 模板外,以上均为 2 次重复。每一个最佳条件确定后作为后续研究的一个条件。

1.2.4 ISSR-PCR 反应程序优化:在确定最佳反应体系基础上,对退火温度、延伸时间和循环次数进行优化筛选。根据所选引物序列计算理论退火温度  $T_m$ ,设定退火梯度范围,仪器自动形成 1~12 个梯度,确定最佳退火温度;延伸时间设 4 个处理,分别为 0.5、1、1.5、2 min;延伸温度为 72 $^{\circ}\text{C}$ ;循环次数设 5 个处理,分别为 25、30、35、40 和 45 次。

1.2.5 引物筛选与优化体系应用:选取 6 个模板,根据 ISSR-PCR 的最佳反应体系和扩增条件进行扩增筛选,并随机选取引物 (AGTC)<sub>4</sub>,对我国 24 份夏枯草种质材料进行 DNA 扩增,检测其稳定性。

## 2 结果与分析

2.1 PCR 正交设计直观分析:根据  $L_{16}(4^5)$  正交试验 PCR 产物电泳结果(图 1),对其从高到低依次打分。条带数量丰富、清晰度高记为 16 分,与此相反,最差则记为 1 分。1~16 组合分数依次为:4、3、2、13、7、12、6、5、16、14、11、10、15、9、8、1。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则,同时考虑实验成本,确定第 9 组合为夏枯草 ISSR-PCR 的最佳反应体系。同时,对 *Taq* 酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTP、引物和 DNA 模板 5 因素不同水平间平均值的极差进行统计分析,其分别为 6.25、5、7.25、3.75、3.5,说明对 PCR 反应的影响从大到小依次为:dNTP、*Taq* 酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、引物和 DNA 模板。

### 2.2 单因子试验结果分析

2.2.1 *Taq* 酶用量对 ISSR-PCR 的影响:如图 2 所示,随着 *Taq* 酶用量的增加,扩增谱带的清晰度逐渐增加且趋于稳定。当 *Taq* 酶用量大于 1.0 U 时,扩增条带最为清晰,同时考虑实验成本,确定 1.0 U 为 ISSR 反应体系中 *Taq* 酶的最佳用量。

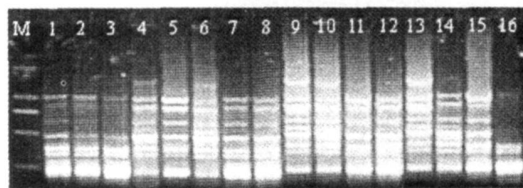
2.2.2 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响:由图 3 可知,dNTP 浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$  时扩增条带弱且不全。

随着浓度的上升,谱带数目增多且逐渐变得更加清晰,当浓度为 175  $\mu\text{mol/L}$  时谱带最清晰,随着浓度的持续上升,谱带清晰度稍微下降。故选择 175  $\mu\text{mol/L}$  为反应体系中的最佳浓度。

2.2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 的影响:如图 4 所示,随着  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加,谱带数目越多且更加清晰,当浓度为 2.2  $\text{mmol/L}$  时谱带最为清晰,与 2.5  $\text{mmol/L}$  之间无差异。故选择 2.2  $\text{mmol/L}$  为最佳浓度。

2.2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响:由图 5 可知,在不同引物浓度下均能扩出条带,随着引物浓度的升高,扩增条带由弱到强,再由强到弱。当浓度为 0.75  $\mu\text{mol/L}$  时,反应稳定且条带清晰,故选择此浓度为最佳。

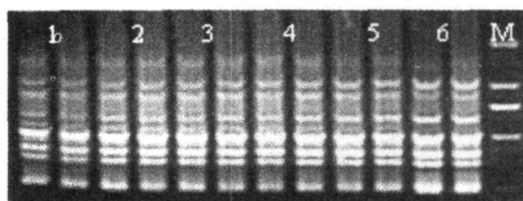
2.2.5 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 的影响:由图



1~16-处理编号同表 1 M-标准分子量 DL2 000 下同  
Treatment No. as showed in Table 1. M-Marker DL2 000,  
all followings are same

图 1 夏枯草 ISSR-PCR 正交试验结果

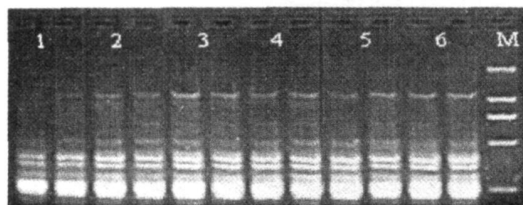
Fig. 1 Electrophoregram of ISSR-PCR products of *P. vulgaris*.



1~6-0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 U

图 2 *Taq* 酶用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 2 Electrophoregram of ISSR-PCR with different levels of *Taq* DNA polymerases

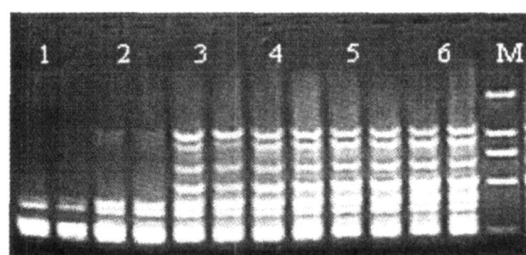


1~6-75、125、175、225、275、325  $\mu\text{mol/L}$

图 3 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentration of dNTP

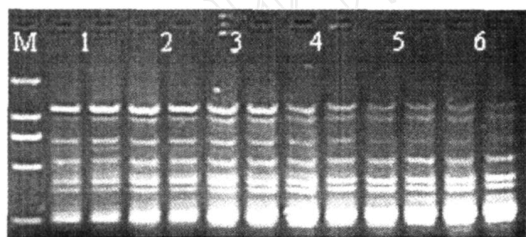
6 可知,模板浓度小于 20 ng 谱带有所缺失,在 20 ~ 50 ng 时谱带多态性高,而超过 50 ng 时,谱带强度减弱,故选择 30 ng 为最佳模板浓度。



1~6-1.0、1.3、1.6、1.9、2.2、2.5 mmol/L

图 4 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR 扩增的影响

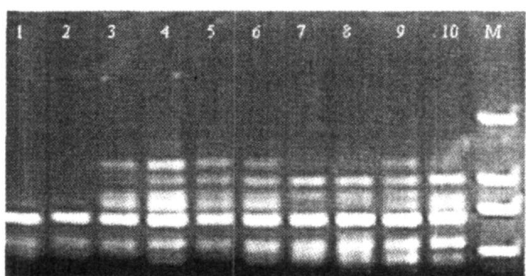
Fig. 4 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentration of Mg<sup>2+</sup>



1~6-0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 μmol/L

图 5 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 5 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentration of primer



1~10-5、10、20、30、40、50、60、80、100、120 ng

图 6 不同模板 DNA 浓度扩增图

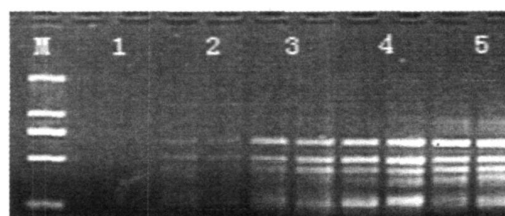
Fig. 6 Electrophoregram of ISSR-PCR with different concentration of template DNA

## 2.3 ISSR-PCR 反应程序优化

2.3.1 循环次数对 ISSR-PCR 的影响:图 7 显示随着循环次数的增加,扩增产物的量也增多,循环次数小于 30 时,几乎没有谱带,而 45 个循环得到的条带强弱合适,清晰可辨,为最佳循环次数。

2.3.2 延伸时间对 ISSR-PCR 的影响:延伸时间的长短与扩增片断的长度呈正相关。由图 8 可知,30 s 延伸时间过短,无法完成扩增造成谱带缺失;在 1.5 min 时,获得稳定扩增,为最佳延伸时间。

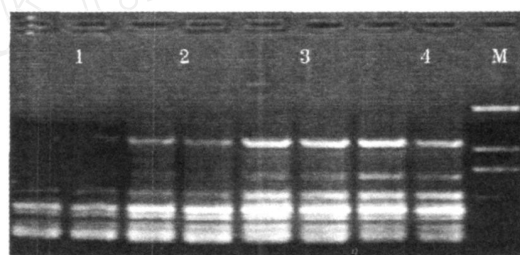
2.3.3 退火温度对 ISSR-PCR 的影响:图 9 为引物



1~5-25、30、35、40、45 次

图 7 循环次数对 ISSR 扩增的影响

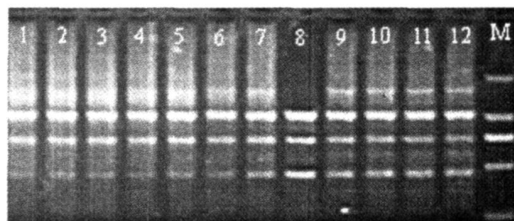
Fig. 7 Electrophoregram of ISSR-PCR with different cycle times



1~4-0.5、1、1.5、2 min

图 8 延伸时间对 ISSR 扩增的影响

Fig. 8 Electrophoregram of ISSR-PCR with different extension time



1~12-40.0、40.5、41.6、42.9、45.0、47.6、50.6、53.1、55.2、53.1、55.2、56.6、57.6、58.0 °C

图 9 引物梯度退火电泳图

Fig. 9 Electrophoregram of annealing temperature of primer

(AC)<sub>8</sub> TG 的梯度退火 PCR,退火温度过低时杂带多;退火温度过高,引物与模板结合差,条带较弱,故 ISSR-5 引物的最适退火温度为 53.1 °C。采用同样的方法得到其余引物的最适退火温度(表 2)。

2.4 ISSR-PCR 正交反应体系应用:应用夏枯草 ISSR 反应的最佳体系,从 92 个 ISSR 引物中筛选出 18 个扩增稳定、多态性高的引物(表 2)。图 10 为以 (AGTC)<sub>4</sub> 为引物运用最优组合对 24 份夏枯草种质材料进行 DNA 扩增图。该图 DNA 谱带清晰、重复性好、多态性高,表明已确立的 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠。

## 3 讨论

ISSR-PCR 反应体系的优化方法多采用正交或单因素设计,正交设计可以更快更有效地分析不同因素的互相作用,但处理水平的设置相对有限,单因

表 2 ISSR 引物和最佳退火温度(  $T_m$  )Table 2 ISSR Primers and optimal annealing temperature (  $T_m$  )

| 引物      | 序列                   | $T_m/$ | 引物      | 序列                   | $T_m/$ | 引物      | 序列                   | $T_m/$ |
|---------|----------------------|--------|---------|----------------------|--------|---------|----------------------|--------|
| ISSR-4  | (AC) <sub>8</sub> AG | 52.6   | ISSR-26 | (AC) <sub>8</sub> CC | 54.9   | ISSR-61 | (AG) <sub>8</sub> GT | 52.6   |
| ISSR-5  | (AC) <sub>8</sub> TG | 53.1   | ISSR-33 | (AG) <sub>8</sub> AT | 50.3   | ISSR-63 | (AG) <sub>8</sub> CT | 52.6   |
| ISSR-10 | (GAA) <sub>6</sub>   | 45.8   | ISSR-42 | (AC) <sub>8</sub> CG | 54.9   | ISSR-68 | (TC) <sub>7</sub> AG | 49.2   |
| ISSR-17 | (GACA) <sub>4</sub>  | 49.2   | ISSR-44 | (AC) <sub>8</sub> GA | 52.6   | ISSR-69 | (TC) <sub>7</sub> TG | 49.2   |
| ISSR-23 | (AC) <sub>8</sub> TA | 50.3   | ISSR-46 | (AC) <sub>8</sub> GG | 54.9   | ISSR-76 | (AGTC) <sub>4</sub>  | 49.2   |

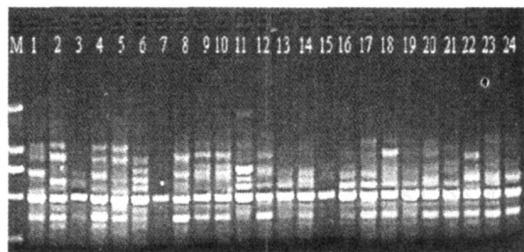


图 10 优化的 ISSR-PCR 反应体系对 24 份夏枯草种质 DNA 扩增结果

Fig 10 Electrophoregram of 24 *P. vulgaris* DNA with optimized ISSR-PCR reaction system

素设计可以较系统和精细地研究各主要因子的影响,但无法探讨因素间互作效应。本实验首先采用正交设计筛选出可扩增出条带的 PCR 反应体系,然后结合单因子设计进一步优化体系,弥补上述实验不足,可以简单快速地建立夏枯草 ISSR-PCR 反应体系,得到稳定且多态性丰富的扩增谱带。

ISSR 是基于 PCR 反应的分子标记技术,在进行 PCR 扩增反应时,引物与模板结合后在 *Taq* 酶作用下进行延伸,*Taq* DNA 聚合酶是  $Mg^{2+}$  依赖性酶,受  $Mg^{2+}$  的浓度影响,而  $Mg^{2+}$  又受 dNTP 的拮抗作用,任何因素浓度过高或过低,都将影响扩增产物的质量,引起错配和非特异性产物扩增,增加引物二聚体的形成几率。本研究显示,ISSR-PCR 反应对模板和引物浓度要求不十分严格,低浓度即有扩增,但对  $Mg^{2+}$  和 dNTP 浓度要求较为严格,低浓度根本无法扩增出条带。通过极差分析,dNTP 对 PCR 反应影响最大,DNA 模板影响最小。因此,最终建立夏枯草 ISSR-PCR 的最佳反应体系为:在 20  $\mu$ L 的反应体系中含 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer,  $Mg^{2+}$  2.2

mmol/L, dNTP 175  $\mu$ mol/L, 引物 0.75  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U 和模板 DNA 30 ng。

在 ISSR-PCR 反应程序中,退火温度、延伸时间和循环次数对其有显著影响,其中退火温度影响最大,温度过低将导致适当的错配,从而扩大引物在基因组上配对的随机性,而温度过高虽可以提高引物与模板结合的专一性,却会降低引物与模板的结合程度<sup>[9]</sup>。本研究显示,夏枯草 ISSR 特异性引物退火温度以 50 ~ 55 为主。通过单因素实验,确定 ISSR-PCR 扩增程序为:94 预变性 5 min;94 变性 45 s,退火 45 s,72 延伸 90 s,45 个循环;72 延伸 5 min,4 保存。

#### 参考文献:

- [1] 张贤秀,郭巧生,王艳茹. 种子引发对夏枯草种子活力影响的初步研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(3):493-495.
- [2] 廖丽,郭巧生,刘丽,等. 夏枯草总黄酮提取方法及其在居群间分布特征研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):651-653.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20(2): 176-183.
- [4] 钱书,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报,2000,42(7):741-750.
- [5] 周延清,景建洲,李振勇,等. 怀地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定[J]. 中草药,2005,36(2):257-261.
- [6] 罗玥佳,伍贤进,彭帅,等. 12 种翻白草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药,2008,39(5):748-751.
- [7] 王翀,周天华,杨雪,等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物[J]. 中草药,2008,39(4):588-591.
- [8] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [9] 沈颖,徐程,万小凤,等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用[J]. 中草药,2005,36(3):423-427.