

其具有操作简便、统计结果可靠的特点,可为麦冬化学计量学分类及其质量评价提供有效参考。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010
- [2] 谭小燕,罗乔齐,马郑红,等. 不同产地麦冬¹H-NMR 模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(5): 792-797
- [3] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, et al. Fingerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifolis Flos* by RP-HPLC[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156
- [4] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1638-1641
- [5] 王文燕,赵强,张铁军,等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1810-1814
- [6] 王文燕,赵强,张铁军,等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983
- [7] 逢楠楠,毕开顺,闫宝庆,等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 818-821
- [8] 陈有根,戴俊东,古海峰. 麦冬药材及其提取物中甲基麦冬黄酮 A 和 B 的 HPLC 法测定[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1640
- [9] 梅孟勤,尹建元,陶婵娜,等. HPLC 法测定麦冬须根中甲基麦冬黄酮 A、B 的含量[A]. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集[C] 北京: 中国药学会, 2007
- [10] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003
- [11] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J]. 山东教育学院学报, 2007(6): 23-26
- [12] 李蓉,李宇. 基于主成分分析与聚类分析方法的我国西部地区划分问题的研究[J]. 科技广场, 2006(3): 66-67

主产区远志种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

李佳¹, 房敏峰¹, 周天华¹, 杨佳¹, 刘夙², 赵桂仿^{1*}

(1 西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069;

2 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要:目的 对主产区远志种质资源进行遗传多样性研究。方法 利用 ISSR 分子标记分析来自于主产区陕西、山西和河北 3 个省的 10 个居群的远志种质资源的遗传多样性。结果 12 条 ISSR 引物扩增出 276 条带, 其中有 271 条为多态性条带, 聚类分析结果表明, 地理来源相同的野生居群和栽培居群先行聚合。野生和栽培远志居群的遗传变异主要发生在居群间, 栽培居群的遗传多样性略低于野生居群, 二者均不符合距离隔离模型。结论 聚类分析结果与栽培居群多为就地取材的事实相符。造成远志这种遗传变异型式的原因在于其本身的繁殖生物学特性以及当前的粗放栽培模式。

关键词:远志; 种质资源; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1881-05

ISSR Analysis for genetic diversity of *Polygala tenuifolia* in its main production area

LI Jia¹, FANG Minfeng¹, ZHOU Tianhua¹, YANG Jia¹, LIU Su², ZHAO Guifang¹

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Objective To discuss the genetic diversity of *Polygala tenuifolia* in its main production area. **Methods** The genetic diversity of ten populations of *P. tenuifolia* from its main production area Shaanxi, Shanxi, and Hebei Provinces, was analyzed using ISSR markers. **Results** Twelve selected ISSR primers generated a total of 276 fragments, 271 of which were polymorphic fragments. The cluster analysis showed that wild and cultivated populations from the same geographical area were clustered first. Genetic variation of both wild and cultivated populations occurred mainly among populations, and the genetic diversity of cultivated populations was lower than wild ones, but both of them were not consistent with the isolation-by-distance model. **Conclusion** The results of cluster analysis agree with the fact that cultivated populations are derived directly from wild ones nearby. It was its own reproductive biological features and the current extensive cultivation that resulted in the genetic pattern of *P. tenuifolia*. Such analyses can offer necessary molecular biological reasons for the utilization and seed breeding of *P. tenuifolia*.

①收稿日期: 2010-02-25

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT); 陕西省重大科技专项(2006ZK10G3); 陕西省教育厅产业化培育项目(07JC17)

作者简介: 李佳(1984-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 主要从事分子资源植物学方面的研究。

Tel: 13927435825 15910862290 E-mail: doudou1984923413@126.com

* 通讯作者 赵桂仿 Tel: (029) 88305207 Fax: (029) 88303572 E-mail: gfzhao@nwu.edu.cn

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; germplasm resources; ISSR; genetic diversity

远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 又名细叶远志, 属远志科远志属, 为中药远志的主要、道地原植物, 产于全国各地。中药远志为大宗常用药材, 具有安神益智、交通心肾、祛痰和消肿之功效, 用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳痰不爽、疮疡肿毒和乳房肿痛^[1]。近年来市场对中药远志的需求逐年增长, 主产区山西、陕西和河北的野生资源由于采挖过度, 几近枯竭, 市场供应基本为栽培药材。目前, 对远志的研究主要集中在化学成分和生物学特性等方面^[2], 遗传多样性研究报道较少^[3]。王光志等^[4]曾采用 RAPD 技术对远志和同属另一种西伯利亚远志(卵叶远志) *P. sibirica* L. 的遗传多样性进行了初步分析。简单重复序列间隔区(inter simple sequence repeat, ISSR)是在微卫星基础上发展起来的一种新的分子标记技术^[5], 除了具有 DNA 分子标记的特点外, 还有一些独特的优点, 如与 SSR 标记相比, 无需事先知道靶序列^[6], 可以

产生丰富的多态性片段^[7]; 与 RAPD 标记相比, 由于较高的退火温度和更长的引物序列, 扩增带的可靠性和重复性更好^[8]; 与 AFLP 标记相比, 花费更少; 另外, 模板需要量少, 实验操作相对简单, 结果记录方便^[9]。本研究以远志 10 个居群 188 份样本为材料, 利用 ISSR 标记技术, 对远志在栽培和野生状态下的遗传多样性进行分析, 探索野生和栽培环境对远志遗传多样性的影响, 对远志种质有利基因的开发和栽培种遗传基础的拓展具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料: 实验材料采自商品远志主产区山西、陕西、河北 3 省, 共 10 个居群, 188 份样本, 经西北大学王玛丽教授鉴定, 材料来源和居群编号见表 1, W 代表野生居群, C 代表栽培居群。野外采集新鲜健康的植物幼嫩叶片, 用变色硅胶迅速干燥, 带回实验室整理保存备用。在采集的同时记录了相关的地理参数。所用植物材料均采于 2007 年。

表 1 野生和栽培远志居群的地理数据和遗传多样性信息

Table 1 Accession data and genetic diversity for wild and cultivated populations of *P. tenuifolia*

居群代号	采样地点	纬度(N)	经度(E)	样本数	遗传多样性指数 ^a		
					PPB/ %	<i>h</i>	<i>I</i>
WHY	陕西合阳	35° 07'	110° 17'	20	55.07	0.1895	0.2854
WYC	山西运城	34° 56'	110° 34'	20	52.54	0.1763	0.2665
WXJ	山西新绛	35° 36'	110° 07'	13	37.32	0.1315	0.1962
WPY	山西平遥	37° 12'	112° 16'	20	47.46	0.1570	0.2372
WTX	河北唐县	38° 53'	114° 46'	20	40.22	0.1287	0.1958
居群平均值					40.22	0.1287	0.1958
物种水平					93.84	0.2917	0.4431
CHY	陕西合阳	35° 07'	110° 17'	20	39.49	0.1333	0.2002
CYC	山西运城	34° 56'	110° 34'	20	45.29	0.1570	0.2351
CXJ	山西新绛	35° 36'	111° 07'	20	46.38	0.1543	0.2326
CPY	山西平遥	37° 12'	112° 16'	20	41.30	0.1327	0.2018
CAG	河北安国	38° 24'	115° 19'	15	52.54	0.1646	0.2517
居群平均值					45.00	0.1484	0.2243
物种水平					85.51	0.2427	0.3731

^a 基于 1 000 次排列检验的显著性水平, 表 3 同

^a significant level based on arrange inspection of 1 000 times, Table 3 is same

1.2 基因组 DNA 提取: 选取 0.05 mg 的干燥叶片, 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计(Eppendorf Biophotometer)下检测其浓度, 最后用 0.1×TE 溶液稀释, 标定到 25 ng/μL, 于 -20 °C 冰箱储存备用。

1.3 引物筛选与 PCR 扩增: 所用引物参照英属加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司 (http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/

Primers_Oct2006.pdf) 公布的第 9 套 ISSR 引物序列, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。每个居群随机选取 2 个 DNA 模板在 10 μL 的反应体系中进行扩增筛选, 从 80 条引物中选取了 12 条扩增条带明亮清晰, 重复性好的引物(表 2)用于全部 10 个居群的样本分析。PCR 扩增反应在 PTC-200(MJ Research, 美国) PCR 仪中进行, 反应体系为: 25 ng DNA 模板, 1.0 μL 10×buffer(含 1.0 mmol/L MgCl₂), 0.3 mmol/L dNTP, 0.4 μmol/L

引物和 0.6 U Taq DNA 聚合酶, 以 ddH₂O 补足体系至 10 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 35 个循环: 94 °C 变性 45 s, 最适退火温度下退火(温度随引物而定, 见表 2, 其中 Y = (C + T), H = (A + T + C), V = (G + A + C); N_L 为统计位点数目; N_{PL} 为统计多态位点数目; T_A 为最适退火温度) 45 s, 72 °C 延伸 60 s; 循环结束后 72 °C 延伸 7 min。

表 2 12 条引物的序列

Table 2 Sequence of primers

引物代号	序列(5'~3')	N_{PL}/N_L	$T_A/°C$
UBC807	(AG) ₈ T	18/18	56
UBC808	(AG) ₈ C	14/17	59
UBC810	(GA) ₈ T	16/17	53
UBC811	(GA) ₈ C	19/20	58
UBC834	(AG) ₈ YT	14/17	54
UBC841	(GA) ₈ YC	17/19	58
UBC842	(GA) ₈ YG	15/17	59
UBC851	(GT) ₈ YG	16/18	58
UBC873	(GACA) ₄	15/17	57
UBC881	(GGGGT) ₃	19/20	58
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTG	19/20	50
UBC899	GATGGTGTGGTCATTGTTCCA	18/20	50

1.4 产物检测: 扩增产物用 1×TBE 配制的 2.0% 琼脂凝胶电泳分离, 溴化乙锭(0.5 μg/mL EB) 染色, 在 100 V 电压下电泳 1.5 h, 用 DL2000 作为 Marker(润德生物工程技术服务有限公司提供)。电泳结束后在紫外凝胶成像系统(BioRad Laboratories, 英国)中观察、记录、保存图像。

1.5 数据统计分析: ISSR 为显性标记, 同一引物扩增产物中, 电泳率一致的条带被认为具有同源性, 按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带记为 1, 无带记为 0, 形成 0-1 矩阵输入计算机。用 POPGENE(version 1.32) 软件统计分析遗传多样性和遗传结构的参数: 多态位点百分率(Percentage of

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

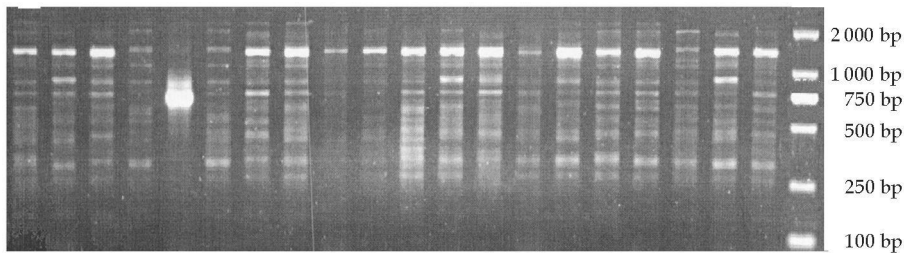


图 1 引物 UBC899 对 WPY 居群 20 个个体的扩增结果

Fig 1 Twenty ISSR amplification patterns for population WPY using Primer UBC899

2.2 居群的遗传结构: 分子变异分析结果显示, 栽培和野生远志居群间的遗传分化指数(F_{st}) 分别为 0.5089 和 0.5406, 即遗传变异发生在居群间的比率分别为 50.89% 和 54.06%, 栽培居群略低于野生

polymorphic bands, PPB), Shannon 表型多样性指数(I), Nei 基因多样性指数(h), Nei 遗传距离(G_D) 和遗传一致度(G_I), Nei 遗传分化指数(G_{st}) 和基因流(N_m)。基因流(N_m) 与 Nei 基因分化指数(G_{st}) 之间存在等式关系: $N_m = (1/G_{st} - 1)/4$ 。以上所有指标的计算均在 Hardy-Weinberg 平衡假设条件下进行。

根据 Nei 的无偏差遗传距离, 利用 MEGA(version 4.0) 软件对居群进行 UPGMA 聚类分析。用 GENALEX(version 6.1) 软件包, 构建欧式平方距离, 在此基础上对居群进行主成分分析(PCA) 来检测居群的遗传相似性。用 Arlequin(version 3.0) 软件包, 基于样品间的欧式平方距离, 对其进行分子等级分析(analysis of molecular variance, AMOVA) 来估计遗传变异在居群间和居群内的分布。另外, 研究还进一步利用 TFGPA(version 1.3) 软件进行 Mantel 检验, 检测居群间遗传距离与地理距离之间的关系。

2 结果

2.1 物种和居群水平的遗传多样性: 用 2.0% 琼脂糖分离 ISSR 扩增结果, 能产生清晰的条带(图 1)。12 条引物能在 188 份样本中扩增出 276 条带, 平均每条引物扩增出 23 个条带, 其中 271(98.19%) 条带具多态性。野生远志在物种水平上多态性高(PPB = 93.84%); 在居群水平上遗传多样性最高和最低的分别是陕西合阳居群(PPB = 55.07%) 和山西新绛居群(PPB = 37.32%), 平均为 46.52%。栽培远志在物种水平上的 PPB 值为 85.51%; 在居群水平上遗传多样性最高和最低的分别是河北安国居群(PPB = 52.54%) 和陕西合阳居群(PPB = 39.49%), 平均为 45.00%(表 1)。

居群(表 3)。POPGENE 分析结果也表明野生居群的遗传分化程度($G_{st} = 0.4654$) 略高于栽培居群($G_{st} = 0.3893$)。野生居群和栽培居群的 N_m 分别为 0.5742 和 0.7843, 说明远志经过栽培后, 遗传分化

降低, 基因流增加。10 个远志居群中 CXJ 居群与 WXJ 居群的遗传距离最近, 为 0.187 7; CAG 居群和 WHY 居群最远, 为 0.508 6(表 4)。

表 3 远志 10 个居群 ISSR 变异的 AMOVA

Table 3 Hierarchical analyses AMOVA for ISSR variation surveyed in ten populations of *P. tenuifolia*

变异来源	自由度	离均差平方和	变异组分	变异百分率/%	P 值 ^a
远志(野生)					
居群间	4	2 187.361	25.27	54.06	< 0.001
居群内	88	2 114.123	24.02	45.94	< 0.001
远志(栽培)					
居群间	4	1 792.904	20.51	50.89	< 0.001
居群内	90	1 955.117	21.72	49.11	< 0.001

表 4 远志 10 个居群遗传一致度 I(对角线以上)和遗传距离 D(对角线以下)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance D (below diagonal) among ten populations

居群	WHY	WYC	WXJ	WPY	WTX	CHY	CYC	CXJ	CPY	CAG
WHY		0.699 7	0.741 0	0.673 2	0.657 7	0.779 0	0.660 2	0.731 1	0.645 2	0.601 3
WYC	0.357 1		0.763 7	0.663 1	0.688 5	0.658 0	0.813 4	0.686 3	0.633 3	0.623 4
WXJ	0.299 8	0.269 6		0.693 6	0.675 1	0.681 0	0.722 9	0.828 8	0.634 6	0.657 6
WPY	0.395 7	0.410 8	0.365 8		0.694 1	0.695 0	0.627 5	0.653 6	0.806 2	0.709 0
WTX	0.419 0	0.373 3	0.392 9	0.365 1		0.656 0	0.649 2	0.695 2	0.681 4	0.811 3
CHY	0.249 7	0.418 7	0.383 8	0.364 3	0.421 8		0.633 2	0.693 9	0.660 9	0.658 8
CYC	0.415 2	0.206 5	0.324 5	0.466 1	0.432 0	0.457 0		0.698 5	0.647 5	0.646 0
CXJ	0.313 2	0.376 5	0.187 7	0.425 3	0.363 5	0.365 0	0.358 8		0.603 0	0.639 0
CPY	0.438 1	0.456 8	0.454 8	0.215 4	0.383 7	0.414 0	0.434 6	0.505 8		0.753 7
CAG	0.508 6	0.472 6	0.419 1	0.343 9	0.209 1	0.417 0	0.437 0	0.447 8	0.282 8	

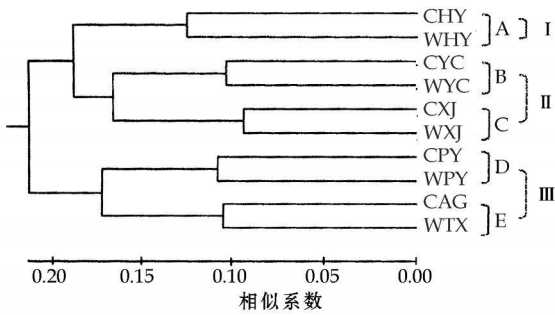


图 2 远志 10 个居群的 UPGMA 树

Fig 2 UPGMA Dendrogram of ten populations of *P. tenuifolia*

3 讨论

3.1 野生和栽培居群的遗传关系分析: UPGMA 树和 PCA 图都显示, 相近来源地的野生和栽培居群先聚在一起, 这与各地栽培远志的种子大都就近取材的事实是一致的。

3.2 野生和栽培居群的遗传多样性: 与本项研究同时, 笔者另对全国 20 个远志野生居群(包括本研究涉及到的 5 个)的遗传多样性做了分析(待发表), 得出的基本结论是, 野生远志较高的种内遗传多样性主要取决于其广泛的地理分布; 其居群内的遗传多样性也高于具有类似生活型而生境破碎化的其他物

种。3.3 聚类分析: UPGMA 树(图 2)显示, 相近来源地的野生居群和栽培居群先聚在一起(其中河北安国的栽培居群与邻近的唐县野生居群聚合), 形成 5 小群。它们再聚成 2 支、3 组, 第 1 支包含 2 组, 即 HY 小群单独为 I 组, YC 和 XJ 小群聚为 II 组; 第 2 支包含 1 组, 即由 PY 和 TX(AG)小群聚合而成的 III 组。PCA 分析结果(图 3)与 UPGMA 聚类树基本一致: 相近来源地的野生和栽培居群先聚为 5 小群; 沿着 X 坐标轴方向, 它们再形成 2 区域, 第 1 区域包含 I 组和 II 组, 第 2 区域包含 III 组。另外, Mantel 检验表明 5 个野生居群的遗传距离与其地理距离之间无显著相关性($P > 0.05$)。

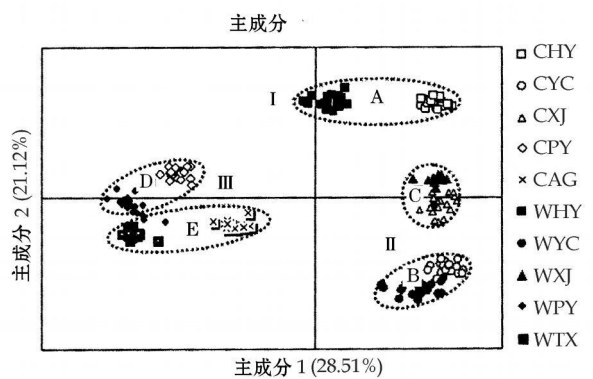


图 3 野生和栽培远志 10 个居群 188 个个体的 PCA 图
Fig 3 PCA of 188 individuals from ten wild and cultivated populations of *P. tenuifolia*

种。本项研究对栽培居群的遗传多样性和遗传结构分析表明, 栽培居群的遗传多样性低于野生居群的遗传多样性, 这主要与以下几方面的因素有关:(1) 远志用种子繁殖, 选种是其栽培的第一步, 而选种不可避免会造成遗传多样性的下降;(2) 生境整齐均一、高密度栽培的田间生境通常比破碎的野外生境更利于基因交流, 因此栽培驯化时间越长, 栽培居群的遗传多样性越低。本项研究涉及的栽培远志居群, 如陕西合阳、山西运城和平遥居群均有较长的栽

驯化历史,这可以解释其较低的遗传多样性。

虽然如此,栽培居群仍然保持了相当的遗传多样性。其原因分析可能是:(1)目前的远志栽培较粗放,未开展足够的育种工作;从遗传角度来看,现在栽培的远志实际上处于半野生状态,栽培远志居群相当于野生远志居群在人工露地种植环境下的延续。(2)远志的营养繁殖不发达,分蘖能力有限,虫媒传粉,自交不育,这些特点使得远志的繁育系统在野生环境和栽培环境下区别不大,因此对其遗传多样性的变化影响也不大。(3)远志的结实率不高,因此每年新播下的远志种子必然来自众多的母株,这也增加了遗传多样性;如果每年新播的种子仅仅来源于少量母株,一两代之后遗传多样性就会有极大下降。

在本项研究涉及的栽培远志居群中,山西新绛和河北安国的遗传多样性反而高于邻近的野生居群,除了上述可能的原因之外,还可能有各自的独特原因:与其他野生居群相比,新绛的野生居群生境破碎化严重,导致样本采集个体数过少,因此对其遗传多样性有可能低估。安国位于华北平原北部中心地区,长期的农业开垦已使原先可能存在的野生远志资源绝迹,其栽培用的种子系从唐县和平遥引入;种子引进的多元化丰富了该地区栽培种的遗传多样性,从而使之高于唐县的远志野生居群。

另外,在对全国20个野生远志居群的遗传多样性进行分析后还发现,野生远志的遗传分化符合经典的距离隔离模型^[10],但是对本研究所涉及的野生居群进行相关性检验之后,发现遗传距离与相应的地理距离并无相关性(尽管聚类关系基本和地理关系相符)。这说明在地理范围较狭的时候,远志的遗传分化与距离隔离模型有较大偏差,前一分析体现出来的与模型的符合须在较大的地理尺度上才能体现出来。

3.3 对远志育种的建议:本项研究结果从遗传学上证实,目前的远志栽培多为就地取种,在遗传上相当于在人工环境上让远志进行半野生生长,类似于对野生远志的迁地保护,这在作物栽培上属于较原始粗放的方式。现在已经有不少关于远志栽培技术的文献报道^[11-14],主要关注播种、催苗和田间管理环节,但优秀种质资源的缺乏却是制约远志产业发展的更大瓶颈。

对于今后的远志育种,有如下建议:第一,远志营养繁殖不发达,结实率不高,严重影响了远志栽培规模的扩大。应当选育有较强营养繁殖能力或较高结实率的品种。第二,至少从清代后期开始,陕西中东部、山西南部一直被视为远志的道地产地,但据考证,在历史上远志实际上并无明确的道地产地^[15]。因此,对于远志的道地性是以遗传型的表现为主,还是以生态饰变为主,需要通过移植实验等手段进行确定。由于野生远志居群分布广泛,如果证明其道地性有较多的环境影响因素,在育种时充分利用其分布区范围内的种质资源,而不仅是道地产地的种质资源。第三,由于栽培远志居群仍有较高的遗传多样性,因此远志的育种材料可以优先在栽培居群中遴选。第四,野生远志资源较高的遗传多样性表明,其资源开发的潜力可观。现存的野生远志居群应予以有效保护,以供今后育种取材之用。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 滕红梅. 药用远志的结构发育与主要药用成分积累关系的研究[D]. 西安:西北大学, 2009
- [3] 房敏峰, 张文娟, 滕红梅, 等. 远志质量控制及资源评价研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 644-648
- [4] 王光志, 万德光. 远志种质资源遗传多样性随机扩增多态性DNA分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1834-1835
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183
- [6] Godwin I D, Aitker E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1524-1528
- [7] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat genetics [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408-417
- [8] Wolfe A D, Liston A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology [A]. Soltis D E, Soltis P S, Döve J J. *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing* [C]. Boston: Kluwer Acad Theoretical and Applied Genetics, 1998
- [9] 李苗苗. 樱亚属植物分子亲缘地理及中国樱桃自然居群遗传多样性研究[D]. 西安:西北大学, 2009
- [10] Wright S. Isolation by distance [J]. *Genetics*, 1943, 28: 114-138
- [11] 赵云生, 李占林, 王勇. 不同处理对远志出苗率的影响[J]. 山西农业科学, 2002, 30(2): 58-59
- [12] 李衡森, 许同印, 杨霞. 远志栽培技术简介[J]. 中草药, 2002, 33(3): 271-272
- [13] 刘汉珍, 张树杰. 远志的人工栽培技术[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(1): 55-56
- [14] 冯亦平, 郭吉刚, 王玉庆. 远志保护地栽培技术研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版, 2007, 27(2): 168-170
- [15] 刘凤. 明清中国药材市场的初步研究[D]. 北京:北京大学, 2207.