

• 药材与资源 •

金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化

张福生, 郭顺星*

中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 针对台湾金线莲 ISSR 反应的特点, 建立一个稳定性高、重现性好, 适合金线莲 ISSR 遗传差异分析的反应体系。方法 确立金线莲 ISSR 初始反应体系并对引物进行初筛; 设定反应体系中各因子的不同浓度并进行 PCR 扩增, 依据稳定性高、重现性好的原则, 对该反应体系进行调整与优化, 最终建立稳定可靠的 ISSR 反应体系。结果 首次建立了金线莲 ISSR 反应的最适体系 (25 μ L): 1 $\times$ PCR buffer, 2 mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTP Mixture, 0.2 μ mol/L 引物, 1 U *Taq* 酶, DNA 模板约 20 ng; 扩增程序: 94 $^{\circ}C$ 充分变性 7 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}C$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 45 个循环后, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。结论 所建立的金线莲 ISSR 反应体系具有稳定性高、重现性好、标记位点清晰、检测多态性能力强等特点, 可以较好地应用于野生金线莲的居群差异研究及经长期组培繁殖后金线莲无菌苗的遗传变异研究。

关键词: 台湾金线莲; ISSR; 兰科; 遗传变异; 种质资源

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0137-06

Establishment and optimization of ISSR reaction system for *Anoectochilus formosanus*

ZHANG Fu-sheng, GUO Shun-xing

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To establish a stable, reproducible, and suitable reaction system of *Anoectochilus formosanus* for ISSR analysis of genetic differences according to the ISSR-PCR characters in plants of *Anoectochilus* Bl. **Methods** The initial ISSR reaction system in plants of *Anoectochilus* Bl. was established and then the primers were screened. After that, PCR amplifications were carried out until the different concentrations of the factors in the ISSR reaction system were designed, and based on the principle of high stability and reproducibility, the stable and reliable ISSR reaction system was eventually established after a series of adjustment and optimization of the reaction system. **Results** The optimal ISSR reaction system in plants of *Anoectochilus* Bl. was reported for the first time, and the volume of 25 μ L contained approximately 20 ng template DNA, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.2 mmol/L deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 2 mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTP Mixture, and 0.2 μ mol/L primer within 1 $\times$ reaction buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl]. The reaction mixtures were denatured at 94 $^{\circ}C$ for 7 min and subjected to 45 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 45 s at 52 $^{\circ}C$, 2 min at 72 $^{\circ}C$, and a final extension step of 10 min at 72 $^{\circ}C$ and eventually stored at 4 $^{\circ}C$. **Conclusion** The ISSR-PCR systems established for studying on the plants of *Anoectochilus* Bl. show the characters of stable reaction system, better repeatability, clear marker site, and reliable abundant polymorphisms. It is suitable for the study on genetic diversity in plants of *Anoectochilus* Bl. in difference wild populations and genetic variation of its sterile seedlings after long time tissue culture.

Key words: *Anoectochilus formosanus* Hayata; inter simple sequence repeats (ISSR); Orchidaceae; genetic variation; germplasm resources

金线莲为兰科 (Orchidaceae) 开唇兰属地生型多年生草本植物, 民间全草入药, 属珍稀濒危药用植物, 主要包括福建金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.、台湾金线莲 *A. formosanus* Hayata 和

恒春金线莲 *A. koshunensis* Hayata^[1], 其中又以福建金线莲与台湾金线莲的药用居多。该类植物主要分布于中国西南部至南部等地, 日本、斯里兰卡、印度和尼泊尔等国也有少量分布; 其生态分布比较特

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070300); 国家高技术研究发展“863”计划 (2008AA09Z405)

*通讯作者 郭顺星 Tel: (010)62829619 E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

殊, 适应性较窄, 常生于常绿阔叶林下或竹林下枯枝落叶阴湿处, 一般呈稀疏、散带分布, 很少成片密生。因其疗效确切, 在民间素有“药王”、“金草”之美誉; 也因福建金线莲与台湾金线莲的性味功效极为相似, 台湾民间常把两者混淆使用^[2]。该类植物在民间治疗范围较广, 具有清热凉血、祛风利湿、强心、固肾、利尿、平肝、降血压等功效^[3]; 现今金线莲主要用于治疗高血压、糖尿病、心脏病、肾炎以及肝脏、肺部等多系统的疾病^[2, 4-6]。此外, 金线莲也是一种观赏价值极高的室内观赏珍品, 因此该类植物具有广阔的开发与利用前景。但因其生长习性独特、天然蕴藏量极为稀少, 再加上人为的肆意采挖, 造成其野生资源的极度匮乏和价格的居高不下^[7]。

作为国内较早开展金线莲研究的实验室之一, 本实验室先后进行了金线莲的组织培养、人工栽培, 野生金线莲的化学成分, 金线莲内生真菌的分离、内生真菌与其菌根的相互作用及作用机制, 金线莲类植物鉴别等多方面的研究^[7-12]。国内外对金线莲的研究除部分有关药理活性外, 其他内容仍主要集中在本草考证、商品调查、组培繁殖及人工栽培等方面。

大量研究表明, 野生植物不同居群间差异明显, 存在着遗传多样性; 而且无菌苗经长时间组培繁殖后会发生一定的遗传变异^[13-16]。为了阐明以上问题, 本实验首次采用 inter simple sequence repeats (ISSR) 分子标记技术对野生金线莲的居群差异和经长期组培繁殖后金线莲无菌苗的遗传变异^[17]分别进行研究, 且在研究中发现 ISSR 反应各因子浓度的改变会直接影响到其实验结果的稳定性与重现性。为此, 在实验开展之前首先对金线莲 ISSR 的反应体系进行了优化, 并最终建立了金线莲 ISSR-PCR 反应的可靠体系, 为深入开展金线莲的种质资源居群差异及组培苗的遗传变异研究提供理论支持, 也为金线莲资源的可持续开发与利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用材料台湾金线莲 *A. formosanus* Hayata 采集于福建省, 由本实验室郭顺星研究员鉴定, 经表面消毒等一系列处理后进行常规组织培养, 保存于本实验室。

1.2 仪器与试剂

高转速低温离心机 (Eppendorf), 凝胶成像系

统 (Bio - Rad), 微量分光光度计 (Bio - Rad), 电泳仪 (北京六一仪器厂), 梯度 PCR 仪 (Eppendorf), 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司), Tris 碱 (Amresco), EDTA (Amresco), PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司), DL2000 DNA marker (Tiangen 公司), 琼脂糖 (Biowest), EB (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司), ISSR 引物 (生工生物工程 (上海) 有限公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 基因组 DNA 的提取与检测

根据 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤进行实验材料总 DNA 的提取, 同时采用分光光度法定量检测其浓度。

1.4 ISSR-PCR 初始反应条件及扩增程序

参考相关文献方法^[18-19], 确定金线莲 ISSR-PCR 初始反应条件为: 总体积 25 μ L, 包含 1 $\times$ PCR buffer, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 160 μ mol/L dNTP Mixture, 0.2 μ mol/L 引物, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶, DNA 模板约 20 ng (取自台湾金线莲), 其余用 ddH₂O 补齐。扩增程序为: 94 $^{\circ}C$ 充分变性 7 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}C$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min, 45 个循环后, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。反应结束后, 产物置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱保存。

1.5 实验设计

以台湾金线莲的基因组 DNA 为模板, 用 ISSR-PCR 初始反应体系及扩增程序对 50 条引物进行了初筛。结果发现, 有 34 条引物具有扩增的多态性条带, 但多数条带的带型不够清晰, 有时还会出现拖尾及非特异性条带的扩增。因此, 在此初始反应体系的基础上采用单因素实验设计, 对影响金线莲 ISSR-PCR 反应的各个因素分别设置了不同的处理: (1) dNTP: 80、160、200、240、320、400 μ mol/L; (2) 引物: 0.16、0.2、0.24、0.3、0.36、0.4、0.5 mmol/L; (3) Mg^{2+} : 1.2、1.5、1.8、2、2.2、2.5、3 mmol/L; (4) *Taq* DNA 聚合酶: 1、1.5、2、2.5、3 U; (5) DNA 模板: 10、20、30、40、50 ng; (6) 退火温度: 根据 T_m 值 (解链温度) = 4 (G+C) + 2 (A+T), 确定 T_m 值并以该值为基准上下浮动 6 $^{\circ}C$, 确定出退火温度的优化范围 ($T_m \pm 6$) $^{\circ}C$, 之后在梯度 PCR 仪上进行 12 个温度的梯度扩增; (7) 循环次数: 按照 PCR 常规扩增次数, 设置 3 个处理, 即 38、45 和 50 次。

1.6 ISSR-PCR 产物鉴定

在 1 $\times$ TBE 电泳缓冲液中, 以 D2000 为 Marker,

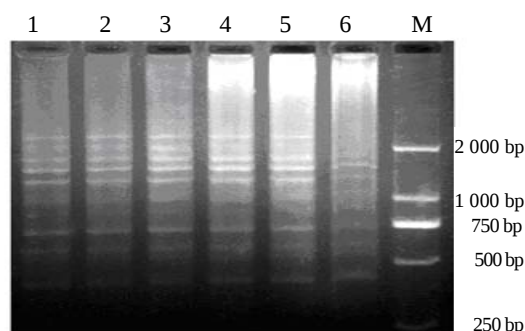
用 1.5% 的凝胶 (含 EB), 以 5 V/cm 电压分离 PCR 产物, 在凝胶成像仪上拍照并进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 初始反应体系的调整

2.1.1 dNTP 浓度的选择 dNTP 是 PCR 扩增反应中磷酸基团的主要原料, dNTP 的浓度对 PCR 反应有着至关重要的影响; 当 dNTP 浓度 ($>200 \mu\text{mol/L}$) 较高时, 可加快 PCR 的反应速度, 但同时也会增加碱基的错误掺入率与实验成本; 当 dNTP 浓度较低 ($<50 \mu\text{mol/L}$) 时, 则会导致 PCR 的产率下降; 因此, dNTP 的浓度常控制在 $50 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 为最佳^[18]。

本实验对 dNTP 的 6 个不同浓度分别进行了 PCR 扩增, 如图 1 所示, 当 dNTP 在低浓度 (80、160 $\mu\text{mol/L}$) 时, PCR 的产率较低, 所扩增出的条带较模糊; 当 dNTP 的浓度较高 (240~400 $\mu\text{mol/L}$) 时, PCR 产物的非特异性扩增又会增加; 只有当 dNTP 的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, PCR 的扩增位点才足够的清晰, 且扩增稳定、重现性强, 故本实验最终选定 dNTP 的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。



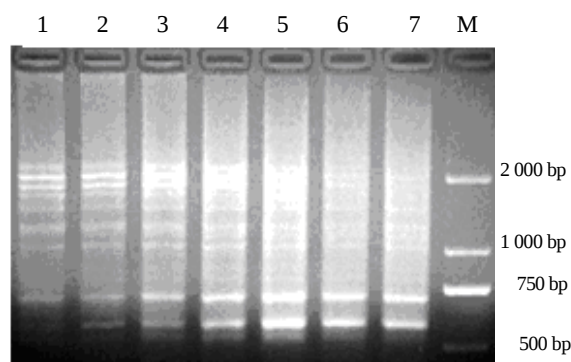
1~6-dNTP 的浓度分别为 80、160、200、240、320、400 $\mu\text{mol/L}$, 由 IS 4 扩增, M-marker
1—6-80, 160, 200, 240, 320, and 400 $\mu\text{mol/L}$ dNTP (Primer IS 4)

图 1 不同浓度 dNTP 的 ISSR-PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of dNTP

2.1.2 引物浓度的调整 引物浓度会对 PCR 所扩增的带型产生明显的影响, 浓度过低时 PCR 产率会大大降低, 甚至不能扩增; 浓度过高时 PCR 所扩增的条带会变得模糊, 还会产生新的位点, 非特异性扩增增加。为了减少非特异性条带的扩增, 提高实验的重现性, 本实验确保 PCR 产率的前提下, 采用了较低引物浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 结果稳定, 重现性较好 (图 2)。

2.1.3 Mg^{2+} 浓度的调整 Mg^{2+} 作为 ISSR-PCR 反应中的一个主要因素, 其浓度的变化对整个 PCR 反应



1~7-引物的浓度分别为 0.16、0.2、0.24、0.3、0.36、0.4、0.5 mmol/L
1—7-0.16, 0.2, 0.24, 0.3, 0.36, 0.4, and 0.5 mmol/L Primer IS 4

图 2 引物 (IS 4) 不同浓度的 ISSR-PCR 扩增电泳图

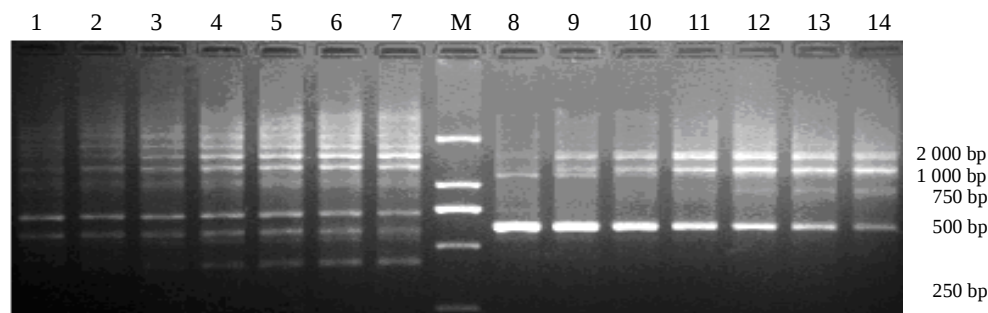
Fig. 2 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of Primer IS 4

中的 *Taq* DNA 聚合酶的活性、引物的退火温度以及 PCR 扩增条带的特异性都有一定的影响。

本实验分别以 7 个不同浓度的 Mg^{2+} 对引物 IS 4、UBC 834 进行了 PCR 扩增。结果表明, 在相同的反应条件下进行 PCR 扩增时, 不同的引物所需要的最适 Mg^{2+} 浓度有时会相同, 如引物 IS 4 与 UBC 834 的最适 Mg^{2+} 浓度均为 2 mmol/L, 此时的 PCR 产率较高且所扩增出的条带也较为清晰 (图 3)。

2.1.4 *Taq* 酶的用量 在 PCR 反应中, 不同生产厂家及不同生产批次的 *Taq* 酶在用量及性能上都有着较大的差异, 酶质量的好坏直接关系到反应的稳定性与重现性; 而且酶的用量在 PCR 反应中也是一个重要的影响因素, 浓度过低则不能扩增, 浓度太高又会产生非特异性扩增且增加成本。本实验在确定了 dNTP, 引物及 Mg^{2+} 浓度之后, 又设置了 6 个 *Taq* 酶量的梯度。结果表明 (图 4), 在 25 μL 体系中, 加入 1 U *Taq* 酶就可以获得重现性好而又清晰的条带, 而随着 *Taq* 酶用量的不断加大, 扩增的条带也逐渐变得越来越模糊且会出现一些非特异性条带。鉴于 *Taq* 酶的成本较高, 所以在确保实验结果稳定可靠的前提下, 选择了 1 U *Taq* 酶为最终的用量。

2.1.5 DNA 模板浓度的选择 DNA 模板量也是影响 ISSR-PCR 扩增效果的主要因素之一。模板量过低, 无扩增产物或产物少而不稳定; 量过高, 又会导致扩增条带的模糊和非特异性产物的出现。图 5 显示, 25 μL 体系中, DNA 模板量在 20~50 ng 都能扩增出相同的带型, 20~40 ng 时扩增出的带型最为清晰; 当模板量大于 40 ng 时扩增出的带型开始变得模糊。所以基于相同带型下模板用量最少的



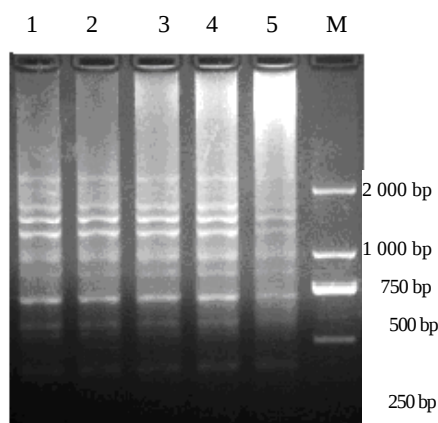
1~7-Mg²⁺浓度分别为 1.2、1.5、1.8、2、2.2、2.5、3 mmol/L, 由 IS 4 扩增;

8~14-Mg²⁺浓度分别为 1.2、1.5、1.8、2、2.2、2.5、3 mmol/L, 由 UBC 834 扩增

1—7-1.2, 1.5, 1.8, 2, 2.2, 2.5, and 3 mmol/L Mg²⁺ (Primer IS 4); 8—14 - 1.2, 1.5, 1.8, 2, 2.2, 2.5 and 3 mmol/L Mg²⁺ (Primer UBC 834)

图 3 不同 Mg²⁺浓度的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 3 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of Mg²⁺

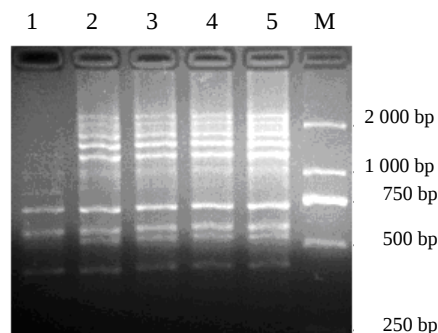


1~5-Taq 酶分别为 1、1.5、2、2.5、3 U, 由 IS 4 扩增

1—5-1, 1.5, 2, 2.5, and 3 U Taq (Primer IS 4)

图 4 不同单位 Taq 酶的 ISSR-PCR 扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of Taq polymerase



1~5-DNA 模板分别为 10、20、30、40、50 ng, 由 IS4 扩增

1—5-concentrations of DNA template are 10, 20, 30, 40, and 50 ng (Primer IS 4)

图 5 不同浓度 DNA 模板的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 5 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of DNA template

原则, 最终采用的 DNA 模板量约为 20 ng。

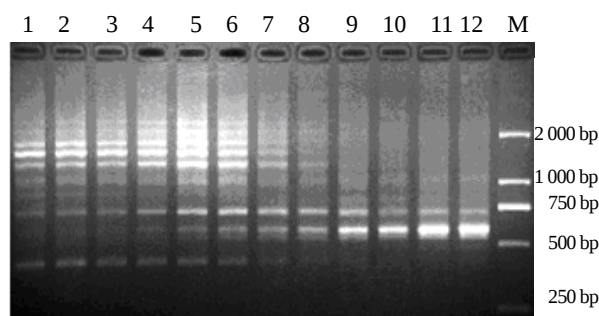
2.2 ISSR-PCR 初始反应参数的调整

2.2.1 退火温度对 ISSR-PCR 的影响 退火温度为引物和模板结合时的温度参数, 它是影响 PCR 特异性的较重要因素。以引物 IS 4 [A (CA) 8G] 为例, 其 T_m 为 54 °C, 其退火温度的优化范围为 48~60 °C。如图 6 所示, 退火温度在 50.6~53.7 °C 时, 所扩增的带型基本一致, 依据就高不就低的原则 (在 T_m 值的允许范围内选择较高的复性温度, 来减少引物和模板间的非特异性结合, 从而提高了 PCR 反应的特异性), 引物 IS 4 的退火温度应为 53.7 °C, 这与其 T_m 值相当而高于理论上的退火温度 (T_m 值下浮 5~10 °C), 与文献报道结果一致^[18]。其余引物如 UBC 815、834、822、853 等, 退火温度仍主要集中在 52 °C; 可见在 PCR 反应中, 同一物种随引物的不同, 退火温度也会发生改变。

2.2.2 循环次数对 ISSR-PCR 的影响 PCR 循环次数的多少决定着扩增产物量的高低, 循环次数太少则产物量极低; 循环次数太多则达到反应平台后, 循环不会使产物明显增加, 反而引起非特异性扩增^[19]。如图 7 所示, 本实验分别进行了 38、45 和 50 次循环的 PCR 扩增, 结果发现扩增 38 次循环时, 扩增产物的带型较少, 产率不高; 而扩增 45 与 50 次循环时, 扩增产物的带型基本一致。基于上述结果, 本实验最终确定 PCR 扩增 45 次循环。

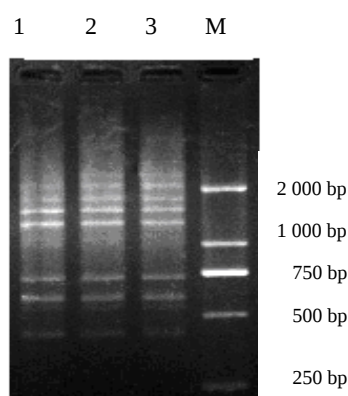
3 结论

通过对 ISSR-PCR 反应体系及反应参数的调整与优化, 筛选出了适合金线莲进行 ISSR-PCR 分析的反应体系: 1×PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH



1~12-退火温度分别为 48、48.6、49.4、50.6、52.2、53.7、54.9、56.3、57.8、58.8、59.5、60 °C，由 IS 4 扩增
1—12-Annealing temperatures are 48, 48.6, 49.4, 50.6, 52.2, 53.7, 54.9, 56.3, 57.8, 58.8, 59.5, and 60 °C (Primer IS 4)

图 6 不同退火温度下的 ISSR-PCR 扩增电泳图
Fig. 6 Electrophoresis of ISSR-PCR with different annealing temperatures



1~3-PCR 循环次数分别为 38、45、50 次，由 IS 4 扩增
1—3-38, 45, and 50 cycles (Primer IS 4)

图 7 不同循环次数下的 ISSR-PCR 扩增电泳图
Fig. 7 Electrophoresis of ISSR-PCR with different cycles

8.3, 50 mmol/L KCl), 2 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP Mixture, 0.2 μmol/L 引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, DNA 模板 20 ng, 总体积为 25 μL; 扩增程序: 94 °C 充分变性 7 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 45 个循环后, 最后 72 °C 延伸 10 min。利用此反应体系及扩增程序, 以台湾金钱莲的基因组 DNA 为模板, 对 50 条 ISSR 引物分别进行了扩增, 依据所扩带型清晰而重复性好的原则, 最终筛选出 17 条引物, 见表 1。

4 讨论

近年来, 分子标记技术作为有效的工到了长足发展, 并被用于多领域的研究当中, 这其中也包括了各种不同类型的 DNA 分子标记技术, 如 ISSR 分子标记技术。ISSR 标记技术是一种在 PCR 中直接

表 1 ISSR 引物序列 (Y= T or C, R= G or A)

Table 1 ISSR Primer sequence (Y= T or C, R= G or A)

引物编码	引物顺序(5'-3')	引物编码	引物顺序(5'-3')
IS 5	A(CA)7CTG	UBC 823	(TC)8C
IS 44	(AC)8GA	UBC 824	(TC)8G
IS 65	(AG)8CC	UBC 827	(AC)7G
IS 74	(ACTG)4	UBC 834	(AG)8YT
UBC 807	(AG)8T	UBC 836	(AG)8YA
UBC 810	(GA)8T	UBC 840	(GA)8YT
UBC 811	(GA)8C	UBC 853	(TC)8RT
UBC 815	(CT)8G	UBC 873	(GACA)4
UBC 822	(TC)8A		

使用 SSR(simple sequence repeats)引物来进行 DNA 扩增的分子标记技术^[20]。目前, 因其操作方便, 经济实惠, 不需要知道任何靶标序列的 SSR 背景信息 (即无需预先克隆和测序), 且具有更高的多态性水平与重现性^[21-26], 该技术已被成功地应用于植物遗传多样性及基因稳定性分析、DNA 指纹图谱绘制、分子生态学研究等众多领域。

本实验结果表明, ISSR 反应对 DNA 模板的用量不是特别的敏感, 在 25 μL 的反应体系中 DNA 量在 20~50 ng 均可获得比较一致的实验结果; 而合适的引物浓度对 PCR 产率及多态性水平扩增都有着关键的影响; 随着梯度 PCR 仪以及降落 PCR 程序使用的逐步增多, ISSR 反应中引物与模板退火温度的确定也变得越来越简单与方便; 相对于反应体系中的其他成分而言, *Taq* 酶的质量直接决定着实验的稳定性与重现性, 因此选择质量上乘的 *Taq* 酶就成了实验开展前的首要任务。

本实验通过对影响 ISSR-PCR 反应的多个因素的系列调整与优化, 建立了适合兰科药用植物金钱莲进行 ISSR 分析的 PCR 反应体系。本实验室将这一反应体系成功地运用于其后开展的一系列有关野生金钱莲居群差异和经长期组培繁殖后金钱莲无菌苗的遗传变异^[17]等实验研究当中, 实验结果证明该 ISSR-PCR 反应体系稳定性高、重现性好, 具有标记位点清晰、检测多态性能力强等特点, 为 DNA 分子标记技术在兰科植物中的广泛应用提供理论基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 17 卷. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 郑 纯, 黄以钟, 季莲芳. 金钱莲文献考证、原植物及商品调查 [J]. 中草药, 1996, 27(3): 169-172.

- [3] 孟志霞, 郭顺星, 于雪梅, 等. 植物生长调节剂对福建金线莲丛生芽增殖的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(23): 1777-1780.
- [4] Mak O T, Huang D D, Law R C S. *Anoectochilus formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism [J]. *Phytother Res*, 1990, 4: 45-48.
- [5] Huang D D, Law R C S, Mak O T. Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1991, 32: 113-119.
- [6] Shih C C, Wu Y W, Lin W J. Antihyperblycemic and antioxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002, 29(8): 684-688.
- [7] 关 璟, 王春兰, 郭顺星. 福建产金线莲中黄酮苷成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1450-1453.
- [8] 唐明娟, 孟志霞, 于雪梅, 等. 内生真菌对离体培养的福建金线莲生长的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1876-1880.
- [9] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬, 等. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 949-950.
- [10] 高微微, 郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛、金线莲生长影响的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(6): 543-545.
- [11] 唐明娟, 孟志霞, 郭顺星. 菌根真菌对人工栽培金线莲糖类和无机元素的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1565-1568.
- [12] Gao C, Zhang F, Zhang J, et al. Identification of *Anoectochilus* based on rDNA ITS sequences alignment and SELDI-TOF-MS [J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(7): 727-735.
- [13] Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement [J]. *Theor Appl Genet*, 1981, 60: 197-214.
- [14] Matthes M, Singh R, Cheah S C, et al. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 971-979.
- [15] Huang W J, Ning G G, Liu G F, et al. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers [J]. *Biol Plant*, 2009, 53: 159-163.
- [16] Qiu Y X, Zong M, Yao Y, et al. Genetic variation in wild and cultivated *Rhizoma Corydalis* revealed by ISSRs markers [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 94-98.
- [17] Zhang F S, Lu Y L, Dong H L, et al. Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* HAYATA, a medicinal plant [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(3): 384-388.
- [18] 沈 洁, 丁小余, 丁 鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 II ISSR 指纹标记方法的建立与优化 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291-294.
- [19] 冯富娟, 王凤友, 刘 彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素 [J]. 植物学通报, 2004, 21(3): 326-331.
- [20] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [21] Yang W, Oliveira A C, Godwin I, et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums [J]. *Crop Sci*, 1996, 36: 1669-1676.
- [22] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [23] Parsons B J, Newbury H J, Jackson M T, et al. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types [J]. *Mol Breeding*, 1997, 3: 115-125.
- [24] Wolfe A D, Liston A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology [A]. Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J. *Plant Molecular Systematics II* [M]. New York: Chapman Hall, 1998.
- [25] Wolfe A D, Xiang Q Y, Susan R K. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1107-1125.
- [26] Ye C J, Yu Z W, Kong F N, et al. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2005, 23: 167-177.