

## 采用 ISSR 和 SRAP 技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性

李小侠<sup>1,2</sup>, 陶正明<sup>1,2\*</sup>, 吴志刚<sup>2</sup>, 潘晓军<sup>1</sup>, 林新春<sup>3</sup>, 范传颖<sup>1,2</sup>, 包晓青<sup>1,2</sup>

1. 温州医学院, 浙江 温州 325035

2. 浙江省亚热带作物研究所, 浙江 温州 325005

3. 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300

**摘要:** 目的 评价浙南忍冬属 *Lonicera* L. 药材遗传多样性。方法 采用 ISSR 和 SRAP 分子标记技术检测 5 种忍冬属药材遗传多样性, NTSYS 软件处理数据, UPGMA 构建聚类图; Mantel 检测法对 2 种标记进行相关性检验; 用引物分辨率 (RP)、多态性条带比率 (PPB) 等参数对标记效率进行评价。结果 16 条 ISSR 引物和 22 对 SRAP 引物分别扩增出 232、215 条带; UPGMA 可将 5 种忍冬属药材聚为 2 大类, 一类为金银花基原植物, 另一类则为山银花基原植物, 两种标记技术相关系数 ( $r$ ) 为 0.970 3。结论 ISSR 和 SRAP 均可有效地分析忍冬属药材资源的遗传多样性, 且 ISSR 标记技术优于 SRAP。

**关键词:** 忍冬属; 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析; ISSR; SRAP

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2030-06

## Evaluation on genetic diversity among species of *Lonicera* L. in southern Zhejiang Province by ISSR and SRAP

LI Xiao-xia<sup>1, 2</sup>, TAO Zheng-ming<sup>1, 2</sup>, WU Zhi-gang<sup>2</sup>, PAN Xiao-jun<sup>1</sup>, LIN Xin-chun<sup>3</sup>, FAN Chuan-ying<sup>1, 2</sup>, BAO Xiao-qing<sup>1, 2</sup>

1. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

2. Institute of Subtropical Crop in Zhejiang Province, Wenzhou 325005, China

3. Nurturing Station, Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Lin'an 311300, China

**Abstract: Objective** To study the genetic diversity among species of *Lonicera* L. in southern Zhejiang Province. **Methods** Genetic diversity among five species in *Lonicera* L. was estimated by ISSR and SRAP techniques. Data were analyzed by NTSYS and the system diagram of genetic relationship was constructed by UPGMA. Mantel test was used to determine the correlation of ISSR and SRAP analyses. Labeling efficiency was evaluated by using different parameters such as resolution of primer (RP) and polymorphic bands (PPB). **Results** A total of 232 and 215 bands were amplified respectively by using 16 ISSR primers and 22 primer combinations of SRAP. Five species of *Lonicera* L. were clustered into two groups, one is the original plant of *Lonicerae Japonicae Flos*, and the other is the original plant of *Lonicerae Flos*. The correlation coefficient ( $r$ ) between ISSR and SRAP was 0.970 3. **Conclusion** ISSR and SRAP could be used to effectively analyze the genetic diversity among species of *Lonicera* L. and ISSR is more efficient than SRAP.

**Key words:** *Lonicera* L.; molecular labeling; genetic diversity; cluster analysis; ISSR; SRAP

忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand. -Mazz.、红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *L. confusa* (Sweet) DC. 是我国忍冬属药材主要来源, 这些植物的花蕾均被作为大宗药材金银花使用。但鉴于多基原植物药材在成分和药效方面的差异性, 有学者主张按一物一名原则逐步

分列<sup>[1]</sup>。据此, 《中国药典》2005 年版进行了重大修改, 规定忍冬是金银花的唯一来源, 灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬则被作为山银花使用。此外, 《中国药典》2010 年版<sup>[2]</sup>又将黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 列入山银花的基原植物。在这一背景下, 为从遗传信息上寻找两类

收稿日期: 2012-04-06

作者简介: 李小侠 Tel: (0577)88526876 E-mail: lixiaoxia2010@163.com

\*通讯作者 陶正明 Tel: (0577)88526876 E-mail: zmtao2002@yahoo.com.cn

药材的区别,近几年学者针对金银花和山银花的遗传多样性进行了部分研究工作<sup>[3-5]</sup>,但至今,对于5种忍冬属药材遗传多样性整体性评价未见报道,特别是浙南地区分布忍冬属多种药材资源栽培历史已久,但其遗传多样性尚不清楚。

ISSR、SRAP等分子标记技术已被广泛用于检测生物遗传多样性水平<sup>[6]</sup>。ISSR标记技术克服了RFLP和RAPD的限制<sup>[7]</sup>,具有多态性水平高、操作简单、重复性好和稳定性高等特点,SRAP<sup>[8]</sup>技术则是一种新型标记系统,具有简便、产率高、可显示大量共显性标记等优势。通常,单一的分子标记技术常受到扩增区域限制、引物扩增能力差异、模糊显性标记主观计入等因素影响,尚不能完全评价生物遗传多样性。多种标记技术的结合应用相比单一标记更加科学。如曲绍轩等<sup>[9]</sup>、Lin等<sup>[10]</sup>利用ISSR、SRAP、RAPD、AFLP等多种分子标记技术对银耳菌株、雷竹进行了遗传多样性评价,并利用数学模型对引物质量进行了评价,结果表明利用多种标记技术可使实验得到的数据更加可靠,并可从中筛选出较优的标记技术。因此,本研究利用ISSR和SRAP两种标记技术对5种忍冬属药材遗传多样性进行研究,并通过数学模型对两种分子标记技术的标记效率进行比较,以科学、全面评价浙南忍冬属药材的多样性,以期为浙南地区忍冬属药材的品种改良、品种鉴定提供科学依据。

1 材料

材料采自忍冬属5种药用植物,野外采集植物叶

片,迅速用硅胶干燥,备用。所有实验样本经浙江省亚热带作物研究所陶正明副研究员鉴定,见表1。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

样本号	样品名称	产地
RD1	忍冬	浙江文成
RD2	忍冬	浙江文成
HZ1	灰毡毛忍冬	浙江文成
HZ2	灰毡毛忍冬	浙江文成
HXJ1	红腺忍冬	浙江永嘉
HXJ2	红腺忍冬	浙江永嘉
HXQ1	红腺忍冬	浙江乐清
HXQ2	红腺忍冬	浙江乐清
HH1	黄褐毛忍冬	贵州兴义
HH2	黄褐毛忍冬	贵州兴义
HN1	华南忍冬	广东广州
HN2	华南忍冬	广东广州

2 方法

2.1 基因组DNA提取

采用CTAB法提取DNA,用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。DNA浓度检测仪测定其质量浓度和质量分数,统一稀释至20 ng/μL,备用。

2.2 引物筛选及PCR扩增

分别从56条ISSR引物和60对SRAP引物中筛选出扩增条带清晰、多态性明显的16条ISSR引物和22对SRAP引物,引物序列见表2。

经本实验优化后的PCR体系均适用于ISSR-PCR和SRAP-PCR。反应体系总体积20 μL:

表2 引物序列

Table 2 Sequences of primers

引物 (SRAP)	序列	引物 (ISSR)	序列
上游引物 5'-3'		UBC 877	(TgCA)4
ME6	TgAgTCCAAACCggTgT	UBC 822	(TC)8A
ME8	TgAgTCCAAACCggTAA	UBC 833	(AT)8Yg
ME9	TgAgTCCAAACCggTCC	UBC 842	(gA)8Yg
ME10	TgAgTCCAAACCggTgC	UBC 856	(AC)8YA
ME7	TgAgTCCAAACCggTgT	UBC 867	(ggC)5
下游引物 5'-3'		UBC 875	(CTAG)4
EM1	gACTgCGgTA CgA ATTCAA	UBC 858	(Tg)8Rg
EM2	gACTgCGgTA CgA ATTCTg	UBC 880	(ggAgA)3
EM3	gACTgCGgTA CgA ATTCgA	UBC 881	(ggggT)3
EM4	gACTgCGgTA CgA ATTCCA	UBC 891	HVH(Tg)7
EM5	gACTgCGgTA CgA ATTAAT	UBC 810	(GA)8T
EM7	gACTgCGgTA CgA ATTTgC	UBC 823	(TC)8C
EM8	gACTgCGgTA CgA ATTTgA	UBC 806	(CA)8A
EM9	gACTgCGgTA CgA ATTgAC	UBC 831	(gT)8YC
EM10	gACTgCGgTA CgA ATTgCA	UBC 832	(AC)8YC

10×缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6μL, Taq (5 U/μL) 0.2 μL, DNA 模板 (20 ng/μL) 3 μL, 引物 (10 mmol/L) 1 μL, 在 SRAP-PCR 中引物用量使用上下游引物各 1 μL。

经实验优化后确定的 ISSR-PCR 扩增程序为: 1 个循环的 94 °C 预变性 3 min; 35 个循环的 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 45 s, 72 °C 复性 90 s; 最后 72 °C 延伸 7 min。SRAP-PCR 扩增程序为: 1 个循环的 94 °C 预变性 5 min; 5 个循环的 94 °C 变性 30 s, 36 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 60 s; 35 个循环的 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 60 s; 最后 72 °C 延伸 5 min。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离(以 150 V 恒压电泳 30 min), EB 染色, 以 2 000 DL Marker 作为标准, 电泳结束后在 GIS-2010 凝胶成像系统下观察并记录成像。

### 2.3 数据采集与分析

从凝胶成像系统得到的电泳谱带中, 选取清晰可辨的电泳条带, 以“1”和“0”记录条带的有或者无, 在相同片段位置上存在扩增带时, 赋值为“1”, 不存在时赋值为“0”, 将图形资料转换成数据资料。运用 NTSYS-pc2.0 软件, 根据 Dice<sup>[11]</sup>相似系数法计算品种间的遗传相似性, UPGMA 进行聚类分析; 利用 Matel 检验进行相关性检测, 用以比较两种标记方法所得出结果的一致程度。

使用多态性条带比率 (PPB)、引物分辨力 (RP) 以及标记指数 (marker index, MI) 等参数对 ISSR 和 SRAP 两种标记技术进行评估<sup>[12-13]</sup>。RP 值的计算公式为  $RP = \sum Ib$ , 其中 Ib (information band) 的计算公式为  $Ib = 1 - (2 \times |0.5 - P_i|)$ ,  $P_i$  代表样品第  $i$  个扩增位点所占的比例。MI 描述了两个功能, 一是多态性指数 (diversity index, DI), 二是有效多元比率 (effective multiplex ratio, EMR)。DI 值计算公式是  $DI = 1 - \sum P_i^2$ , EMR 在数值上表示为平均多态性条带数量。

### 3 结果与分析

#### 3.1 ISSR、SRAP 多态性分析及 DNA 指纹分析

在 ISSR 研究中 (表 3), 各引物扩增条带的片段大小范围较大, 为 100~2 000 bp; 共扩增得到 232 条 DNA 条带, 其中多态性条带 201 条, 各引物检测到的 PPB 为 73.3%~100.0%, 其中以引物 UBC806 扩增多态性比率最高; 各 RP 大小在 4.67~10.67, 平均为 7.00, 其中引物 UBC833 分辨力最高, 扩增出 18 条多态性条带。总体分析, 16 个引物的 RP 水平均较高, ISSR 标记在 5 种忍冬属药材基因组中能提供较多的信息量。在 SRAP 研究中 (表 4), 扩增条带的片段大小在 100~1 700 bp, 相对 ISSR 扩增范围较窄。所有引物共扩增得到 215 条可区分的 DNA 条带, 其中多态性带 154 条。各引物可扩

表 3 ISSR 引物扩增结果

Table 3 Amplification results of ISSR primers

引物	总条带数	多态性条带数	PPB / %	片段大小 / bp	RP
UBC 877	15	13	86.7	250~1 700	7.67
UBC 822	10	9	90.0	100~1 500	4.67
UBC 833	20	18	90.0	150~1 500	10.67
UBC 842	21	19	90.5	200~2 000	9.34
UBC 856	12	9	75.0	100~1 500	5.00
UBC 867	16	14	87.5	100~1 500	7.99
UBC 875	11	10	90.9	150~1 200	7.33
UBC 858	15	13	86.7	250~1 800	6.67
UBC 880	18	15	83.3	200~1 800	8.67
UBC 881	16	14	87.5	400~1 800	6.67
UBC 891	15	11	73.3	200~1 200	6.00
UBC 810	15	13	86.7	100~1 600	7.33
UBC 823	14	11	78.6	100~1 800	5.67
UBC 806	13	13	100.0	200~1 800	7.67
UBC 831	10	8	80.0	300~2 000	4.67
UBC 832	11	11	100.0	300~2 000	6.00
平均	14	12	86.6	—	7.00
总计	232	201	—	—	112.02

表 4 SRAP 引物扩增结果  
Table 4 Amplification of SRAP primers

引物	总条带数	多态性条带数	PPB / %	片段大小 / bp	RP
ME6/EM3	11	7	63.6	100~1 600	4.00
ME6/EM4	11	7	63.6	100~1 600	4.33
ME6/EM9	7	4	57.1	150~1 500	2.33
ME7/EM2	7	5	71.4	150~1 000	2.33
ME7/EM4	9	6	66.7	100~1 200	2.34
ME7/EM5	9	6	66.7	100~1 000	2.34
ME7/EM10	7	5	71.4	100~1 100	3.00
ME8/EM7	10	9	90.0	150~ 750	4.67
ME8/EM8	10	7	70.0	100~1 000	3.67
ME8/EM9	7	3	42.9	200~ 800	1.33
ME8/EM10	9	6	66.7	100~ 750	2.67
ME9/EM4	7	3	42.9	200~1 100	1.33
ME10/EM4	12	8	66.7	200~1 100	3.34
ME9/EM7	6	3	50.0	100~ 600	1.00
ME9/EM3	12	9	75.0	100~1 700	7.33
ME9/EM8	8	6	75.0	100~1 000	3.33
ME9/EM9	13	11	84.6	100~1 000	6.00
ME9/EM10	14	11	78.6	100~ 900	7.00
ME10/EM1	7	6	85.7	200~1 100	2.67
ME8/EM4	12	8	66.7	100~1 100	3.67
ME10/EM5	12	12	100.0	100~1 000	9.00
ME10/EM8	15	12	80.0	100~1 100	5.67
平均	9	7	71.6	—	3.79
总计	215	154	—	—	83.36

增出的多态性条带数量相差较大, 检测的 PPB 从 42.9%~100.0%, 其中以引物 ME10/EM5 多态性比率最大。各 RP 大小在 1.00~9.00, 平均为 3.79, 以引物 ME10/EM5 分辨力最高, SRAP 标记同样揭示较多的忍冬属基因组内信息量, 但从扩增的多态性位点上看不出 ISSR。

16 条 ISSR 引物和 22 对 SRAP 引物分别对 5 种忍冬属药材模板 DNA 进行了 PCR 扩增, 建立了相应的 DNA 指纹图谱 (图 1)。ISSR 中引物 UBC833 分辨力最高, 对忍冬属药材基因组 DNA 扩增效果最好, SRAP 中引物 ME9/EM10 扩增条带最清晰, 并且有 11 条多态性条带, RP 达到 7.00, 表明 ISSR 引物和 SRAP 引物建立的指纹图谱完全可以清楚区分开 5 种忍冬属药材。

### 3.2 聚类分析

本研究分别使用 ISSR 和 SRAP 标记结合后所形成的聚类图 (图 2)。结果表明, ISSR 和 SRAP 所形成的聚类结果基本一致; 从两种分子标记结合后所形成的聚类图可看出, 12 份样本划分为 A 和 B

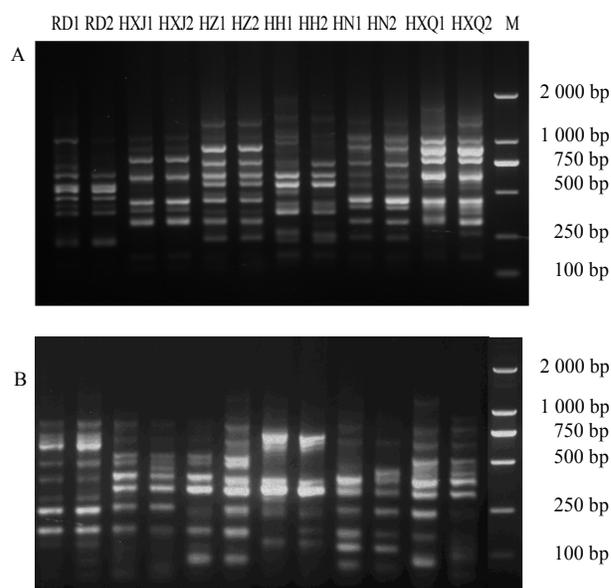


图 1 样品的 ISSR 引物 UBC833 (A) 与 SRAP 引物 ME9/EM10 (B) 扩增图谱

Fig. 1 Amplification profiles of samples by ISSR primer UBC833 (A) and SRAP primer ME9/EM10 (B)

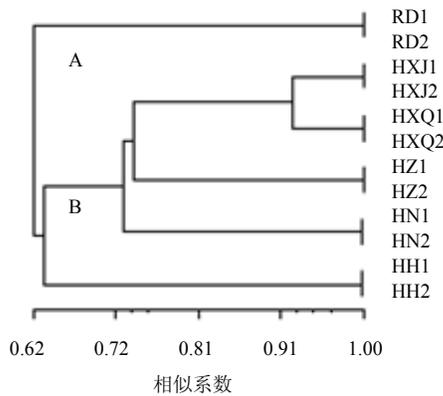


图 2 样本的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of samples

两大类群，A 类由忍冬构成，B 类则包含红腺忍冬、灰毡毛忍冬、黄褐毛忍冬以及华南忍冬。在 B 类中又可以划分两类，在遗传相似系数为 0.63 处，黄褐毛忍冬单独聚为一类，其余聚为一类。红腺忍冬、华南忍冬和灰毡毛忍冬 3 个种中，灰毡毛忍冬在遗传相似系数约 0.73 处与前两者分开。来自乐清和永

嘉的红腺忍冬在遗传相似系数约 0.93 处聚在一起，表明二者之间几乎没有遗传差异。

### 3.3 ISSR 与 SRAP 标记技术的比较

本实验为分析 ISSR 和 SRAP 两种标记技术对忍冬属药材种质的相关程度，利用 Mantel 检测<sup>[14]</sup>检验两种标记的相关性，分析表明  $r=0.970\ 26$ ，两种分子标记对 5 种忍冬属药材的遗传相似性呈极显著正相关。

RP、DI、PPB 等是评价引物的重要参数，而引物的质量反映了分子标记技术的标记效率<sup>[10]</sup>。由表 5 可知，ISSR 产生多态性条带的平均水平是 86.6%，高于 SRAP；从 RP 的值来看，ISSR 的 RP 平均水平是 7.00，而 SRAP 为 3.79；从 DI 来看，ISSR 均是 1.69，而 SRAP 是 1.03，ISSR 略高于 SRAP。综合上述数据，ISSR 检测忍冬属药材遗传多样性要优于 SRAP。根据以上方法对两种分子标记的标记效率进行了评价，为今后在忍冬属植物遗传多样性研究中适宜分子标记技术的选择提供科学依据。

表 5 ISSR 与 SRAP 标记效率的比较

Table 5 Comparison on ISSR and SRAP labeling efficiency

标记技术	引物数	总条带数	多态性条带数	平均每个引物产生条带数量	PPB / %	RP	EMR	DI
ISSR	16	232	201	14	86.6	7.00	12	1.69
SRAP	22	215	154	9	71.6	3.79	7	1.03

## 4 讨论

### 4.1 忍冬属药材分类与经典分类的关系

5 种忍冬属药材在徐炳声等<sup>[15]</sup>编著的《中国植物志》中均被归为忍冬属忍冬组内缠绕亚组，尽管在一个亚组内，它们在形态学上仍旧存在一些差异。李建军等<sup>[16]</sup>对金银花和山银花的性状差异进行分析，从花的颜色来看，金银花的花呈淡黄，而山银花呈黄棕色或灰棕色，较金银花颜色深；从萼筒形状来看，金银花呈球形，而山银花呈倒卵状椭圆形或椭圆形；从花蕾的直径来看，金银花花蕾直径大于山银花。黄丽华等<sup>[17]</sup>对 8 种忍冬属药用植物叶片表皮特征进行了研究，表明忍冬叶片在腺毛、气孔外拱盖表面特征上与黄褐毛忍冬和红腺忍冬存在差异。《中国药典》2005 年版将金银花和山银花分列，并将药用成分木犀草苷作为金银花与山银花区别的有效手段，这从一定意义上说明金银花与山银花在药用价值方面存在差异，本研究聚类结果显示忍冬在遗传相似系数为 0.63 处与其余分开，单独聚为一类，这一结果与形态学差异相一致，在遗传差异上

与其他药材相差较大。

此外，本实验对山银花 4 种原植物聚类显示，B 类山银花一支可以划分两类，在遗传相似系数为 0.63 处，黄褐毛忍冬首先独立出来与其余分开，从分子水平上反映出黄褐毛忍冬与其他山银花基原植物存在一定差异。根据李建军等<sup>[16]</sup>对山银花形态上的研究：黄褐毛忍冬萼筒形状呈倒卵状椭圆形，而灰毡毛忍冬、红腺忍冬和华南忍冬萼筒形状均为椭圆形；从萼齿形状来看，黄褐毛忍冬呈条状披针形，而其余 3 者成三角形或披针形，这与 DNA 水平揭示的结果相一致。红腺忍冬、华南忍冬和灰毡毛忍冬虽然聚为一支，但也存在遗传差异，灰毡毛忍冬与其余两个种在遗传相似系数为 0.73 处分开，而红腺忍冬与华南忍冬遗传相似系数为 0.75。三者的形态特征也存在明显差异<sup>[2]</sup>：灰毡毛忍冬腺毛较少，与红腺忍冬和华南忍冬多腺毛形成对比；华南忍冬萼筒有毛，与红腺忍冬和灰毡毛忍冬无毛形成对比；从花的表面来看，华南忍冬密被糙毛及腺毛，与灰毡毛忍冬和红腺忍冬疏毛形成对比。由以上结论得

出, 5种药材虽然在《中国植物志》中同归为缠绕亚组, 但显示出了较高的遗传多样性。

#### 4.2 浙南地区忍冬属药材开发建议

忍冬、灰毡毛忍冬、红腺忍冬在浙南地区栽培历史已久, 本实验选取产自贵州黄褐毛忍冬和广州的华南忍冬进行研究, 从山银花多样性水平来看, 采集自贵州的黄褐毛忍冬与红腺忍冬、灰毡毛忍冬、华南忍冬遗传距离较大, 而后3者内遗传多样性水平不高, 所以, 建议浙南地区应该从贵州引种黄褐毛忍冬, 丰富该地区忍冬属药材遗传多样性。据文献报道<sup>[18]</sup>, 黄褐色毛忍冬生长适应性强, 具有花多且大、产量较高、其化学成分和药理作用均与正品金银花相似, 同时黄褐毛忍冬是《中国药典》2010年版新收录的山银花植物来源, 建议浙南地区引种黄褐毛忍冬后从药理作用、药材质量等方面研究黄褐毛忍冬与忍冬之间的差异, 进一步挖掘黄褐毛忍冬的药用价值, 以缓解因金银花价格高、产量低、需求大等造成的市场压力。

#### 参考文献

- [1] 汪 冶, 文惠玲, 梅树模. 《中国药典》2005年版金银花和山银花品种分列的商榷 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 151.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 王晓明, 谢碧霞, 李俊彬. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(6): 14-18.
- [4] 杨 飞, 张 敏, 彭兴扬. 金银花五个品系的 RAPD 分析及 DNA 指纹图谱的建立 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 235-238.
- [5] 陈大霞, 李隆云, 吴叶宽. 灰毡毛忍冬自然群体遗传多样性的 SRAP 研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 143-147.
- [6] 严华军, 吴乃虎. DAN 分子标记技术及其在植物遗传多样性研究中的应用 [J]. 生命科学, 1996, 3(8): 32-36.
- [7] Bornet B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: reproducible and specific tools for genome fingerprinting [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2001(19): 209-210.
- [8] 任 羽, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性, 一种新的分子标记技术 [J]. 中国农业通报, 2004, 20(4): 11-13.
- [9] 曲绍轩, 高 山, 黄晨阳. SRAP、ISSR 和 RAPD 分子标记技术在银耳菌株鉴别上的应用 [J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 1-5.
- [10] Lin X C, Lou Y F, Zhang Y Z, et al. Identification of genetic diversity among cultivars of *Phyllostachys violascens* using ISSR, SRAP and AFLP markers [J]. *Bot Rev*, 2008, 74(1): 1-12.
- [11] Dice L R. Measures of the amount ecologic association between species [J]. *Ecology*, 1945, 26: 297-302.
- [12] Powell W M, Margenta C, Andre M, et al. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breeding*, 1996, 2: 225-238.
- [13] Prevost A, Wiklison A M. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 107-112.
- [14] Mantel N. The detection of disease clustering and generalized regression approach [J]. *Cancer Res*, 1976, 27: 209-220.
- [15] 徐炳声, 胡嘉琪, 王汗津. 中国植物志 (第 72 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [16] 李建军, 李军芳, 李景原. 金银花与山银花的性状差异与鉴别方法 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(4): 134-137.
- [17] 黄丽华, 陈 讯. 忍冬属药用植物叶表面扫描电镜观察 [J]. 贵州科学, 2005, 23(1): 54-57.
- [18] 聂 蕊, 程若敏, 陈少容. 黄褐毛忍冬研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17239-17240.