

## 苦豆子 ISSR 标记的遗传多样性分析

阳 翠<sup>1,2</sup>, 刘 萍<sup>1\*</sup>, 刘姝蓉<sup>1</sup>, 郭 蒙<sup>1</sup>

1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021

2. 四川省植物工程研究院, 四川 内江 641200

**摘要:** 目的 通过对产自宁夏、甘肃、青海、新疆和内蒙的苦豆子遗传多样性和亲缘关系的分析, 为野生苦豆子资源的驯化和保护等提供依据。方法 采用 ISSR 分子标记技术, 对 22 个苦豆子居群的 DNA 进行扩增, 对其扩增条带进行遗传多样性分析, 在所得遗传距离的基础上进行 UPGMA 聚类 and 主成分分析 (PCA), 并绘制亲缘关系树状聚类图。结果 51 条 ISSR 引物共检测到 433 个位点, 每条引物 5~12 个, 平均 8.49 个; 平均多态性位点百分率 (PPB) 93.30%; Nei's 遗传多样性指数 ( $H$ ) 和 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 分别为 0.335 1、0.499 8; 遗传距离变幅范围 0.173 6~0.650 2。结论 22 个苦豆子居群间具有较高的遗传多样性, 各居群间遗传距离与地理距离没有明显关系。

**关键词:** 苦豆子; 种质资源; ISSR 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1323-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.023

## Genetic diversity analysis on *Sophora alopecuroides* based on ISSR markers

YANG Cui<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LIU Jiao-rong<sup>1</sup>, GUO Meng<sup>1</sup>

1. College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2. Sichuan Academy of Botanical Engineering, Neijiang 641200, China

**Abstract: Objective** To analyze the genetic polymorphism and relationship of *Sophora alopecuroides* from Ningxia, Gansu, Qinghai, Xinjiang, and Inner Mongolian in China, and to offer some information for the domestication and protection of wild *S. alopecuroides* germplasm. **Methods** ISSR primers were used to analyze the genetic diversity of 22 populations of *S. alopecuroides*. Cluster analysis of the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) and principal component analysis (PCA) were carried out based on the molecular data obtained, and a dendrogram was constructed. **Results** Totally 433 alleles were amplified using the 51 ISSR primers. The number of alleles in per primer range was 5—12, with an average of 8.49. The average percentage of polymorphic loci (PPB) was 93.30%. The Nei's gene diversity ( $H$ ) and Shannon's information index ( $I$ ) were 0.335 1 and 0.499 8, respectively. The genetic distances range was 0.173 6—0.650 2. **Conclusion** The genetic polymorphism among 22 populations of *S. alopecuroides* is relatively abundant and there are no direct relationship between genetic distance and geographical distribution in them.

**Key words:** *Sophora alopecuroides* L.; germplasm resource; ISSR molecular markers; genetic diversity; cluster analysis

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 又名草本槐、苦豆根, 是豆科 (Leguminosae) 槐属 *Sophora* L. 多年生草本植物, 主要分布于我国内蒙古、宁夏、甘肃、青海、新疆和西藏<sup>[1]</sup>。苦豆子为根茎地下芽植物, 其根蘖萌发力强, 生长快, 常生长在荒漠、半荒漠沙地和草原边缘地带以固定沙土, 具有较强的耐旱、耐寒、耐盐碱和抗风防蚀的能力, 是我国北方地区生态系统中重要的生态草<sup>[2]</sup>。苦豆子的全草、根、种子均可入药, 全株味极苦、性寒, 具有

清热解毒、抗菌消炎作用, 民间用其根治喉痛、咳嗽、痢疾及湿疹等<sup>[3]</sup>。近些年的研究表明, 苦豆子中除含有 24 种单体生物碱外, 还含有木脂素、二苯乙烯、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖类成分, 其主要活性成分氧化苦参碱和苦参碱具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、抗肝纤维化等药理活性<sup>[4-5]</sup>。

简单重复序列区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 分子标记技术通过利用基因组中有关 SSR 序列的信息, 结合 RAPD 技术优

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660017); 宁夏大学自然科学基金资助项目 (NDZR10-5)

作者简介: 阳 翠 (1985—), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 从事植物种质资源研究。E-mail: yangcui134@sina.com

\*通信作者 刘 萍 Tel: (0951)2061874 E-mail: liupingmy@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1120.009.html>

点, 克服了 SSR 和 RAPD 标记技术的某些缺点, 具有多态性高、稳定性好、不需预知基因序列和技术成本低等特点, 被广泛用于物种分类、品种鉴定、居群遗传学研究、遗传图谱构建等领域, 是研究植物遗传多样性常用的分子生物学技术和方法<sup>[6-10]</sup>。目前, 关于苦豆子的研究更多地集中在生物学特性、化学成分、药理作用和种子培养等方面<sup>[11-13]</sup>。本研究采用 ISSR 分子标记技术, 对不同地理来源的 22 个苦豆子居群从 DNA 水平分析其遗传多样性, 旨在从分子水平探明苦豆子资源的现状, 为野生苦豆子资源的驯化栽培、利用和保护提供理论依据。

### 1 材料与仪器

依据苦豆子的地理分布特点, 样品分别采集自宁夏、甘肃、青海、新疆、内蒙古 22 个居群的种子作为供试材料, 在采集的同时调查、记录其生长环境和土壤类型, 材料保存于 -70 °C 的超低温冰箱中备用。各居群编号及来源见表 1。

UV—VIA 型紫外反射透射仪 (北京六一仪器厂); Taq 酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

表 1 苦豆子居群编号及来源

居群编号	采集地	居群编号	采集地
1	宁夏盐池县冯记沟乡	12	宁夏盐池县惠安堡镇
2	宁夏陶乐县马太沟乡	13	宁夏灵武市宁东镇
3	宁夏永宁县望远乡	14	宁夏吴忠市红寺堡镇
4	宁夏盐池县杨柳堡乡	15	青海西宁
5	宁夏盐池县苏步井乡	16	内蒙古五原
6	宁夏中卫县迎水桥镇	17	内蒙古鄂托克前旗
7	宁夏平罗县头闸镇	18	甘肃张掖
8	宁夏中宁县莫嘴林场	19	新疆吉木萨尔
9	宁夏银川市西夏区	20	新疆若羌
10	宁夏贺兰县常信乡	21	新疆乌鲁木齐
11	宁夏盐池县青山乡	22	新疆拜城

### 2 方法

#### 2.1 总 DNA 提取、PCR 扩增和电泳检测

改良 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取总 DNA, 紫外分光光度法检测质量, 并调整终质量浓度为 100 ng/μL。ISSR 反应体系 (20 μL): 10×缓冲液 2.0 μL, Mg<sup>2+</sup> 6 mmol/L, 引物 30 μmol/L, DNA 模板 10 ng, dNTP 1 mmol/L, Taq 酶 2 U, 补加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应在 Bio-Rad 公司的 PTC—200 型 PCR 循环仪上进行。反应程序为: 94 °C 预变性 120 s; 94 °C 变性 20 s, 42~63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 38 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 0.5×TBE、2.0% 琼脂糖凝胶 (含 50 μg/mL 溴化乙锭) 中电泳 50~60 min、电压 4~5 V/cm,

UV—VIA 型紫外反射透射仪观察并照相。

#### 2.2 引物筛选

以居群 6、19 的 DNA 为模板对 150 条 ISSR 引物 (北京奥科生物公司合成) 逐一进行筛选。将多态性好、条带清晰的引物再重复扩增 1 次, 如果能够清晰、稳定重复出现多态性, 记录其编号, 备用。

#### 2.3 数据统计与分析

根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 在相同迁移位置上, 将稳定出现的条带记为 “1”, 无带或不易分辨的弱带记为 “0”, 获得 “1, 0” 原始矩阵。通过 POPGENE 32 软件对供试居群的 Hardy-Weinberg 平衡进行显著性检验, 并计算多态位点百分率 (PPB)、观测等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、Nei’s 基因多样性 ( $H$ )、Shannon 信息指数 ( $I$ ) 和 Nei’s (1972) 遗传距离 ( $GS_{ij}$ )<sup>[15]</sup>。

用 NTSYS 2.1 软件对 Nei’s 遗传距离进行 UPGMA (unweight pair-group method with arithmetic average) 聚类分析, 构建各居群之间亲缘关系树状图; 用 DCENTER 程序进行遗传距离矩阵转换, 并用 EIGEN 程序求特征值和特征向量进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。

### 3 结果与分析

#### 3.1 不同引物检测的位点数和多态性

从 150 条 ISSR 引物中共筛选出 51 条带型清晰、多态性好的引物, 对 22 个苦豆子居群的 DNA 进行扩增, 电泳得到指纹图谱, 所有样品扩增条带均在 100~2 000 bp (图 1)。不同引物扩增的位点数不同, 同一引物对 22 个居群扩增的条带类型和位点数也不一样, 特别是居群 5 与其他居群的带型差异较大 (表 2)。51 条引物在供试的 22 个居群中共检测到 433 个位点, 其中多态性位点 404 个, PPB 值

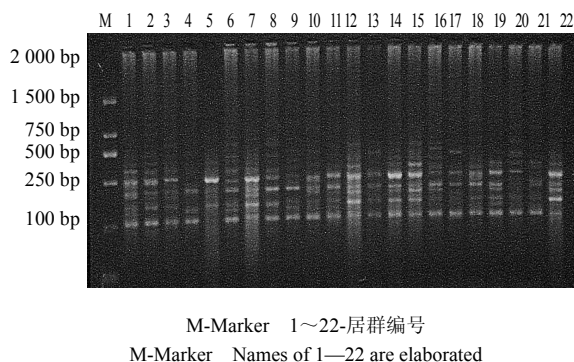


图 1 引物 30 对 22 个苦豆子居群的扩增结果  
Fig. 1 Amplification of Primer 30 in 22 populations of *S. alopecuroides*

表2 ISSR的苦豆子扩增结果和遗传多样性分析

Table 2 Amplification and genetic diversity analysis of *S. alopecuroides* by ISSR

编号	引物序列 (5'-3')	退火温度 / °C	扩增总位点	多态性位点	PPB / %	H	I
1	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52	12	9	75.00	0.459 1	0.650 1
2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	53	9	9	100.00	0.349 4	0.521 1
3	CACACACACACACACAA	54	6	6	100.00	0.311 3	0.477 1
4	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	56	5	5	100.00	0.449 6	0.639 3
5	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	56	10	8	80.00	0.343 5	0.520 9
6	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	56	9	9	100.00	0.320 5	0.492 8
7	GAGAGAGAGAGAGAGACT	56	11	8	77.80	0.362 1	0.537 6
8	GAGAGAGAGAGAGAGACC	56	8	8	100.00	0.348 7	0.523 8
9	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56	8	8	100.00	0.340 9	0.515 4
10	CTCTCTCTCTCTCTGA	52	7	7	100.00	0.405 0	0.583 2
11	GTGTGTGTGTGTGTGCC	56	5	5	100.00	0.303 3	0.467 7
12	TCTCTCTCTCTCTCGT	52	7	7	100.00	0.396 1	0.582 1
13	ACACACACACACACACTA	52	7	7	100.00	0.353 6	0.532 7
14	ACACACACACACACACTG	52	8	7	87.50	0.372 5	0.548 8
15	ATGATGATGATGATGATG	53	10	10	100.00	0.439 3	0.630 0
16	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	63	8	7	87.50	0.339 4	0.508 4
17	GACAGACAGACAGACA	53	8	6	75.00	0.363 0	0.542 5
18	CCCTCCCTCCCTCCCT	56	7	7	100.00	0.425 0	0.612 9
19	GATAGATAGACAGACA	42	9	9	100.00	0.374 2	0.557 7
20	CTTCACTTCACTTCA	42	5	5	100.00	0.378 5	0.550 9
21	GGAGAGGAGAGGAGA	51	9	8	88.90	0.414 3	0.601 7
22	GGGTGGGGTGGGGTG	57	11	10	90.90	0.280 6	0.431 4
23	AGGCTCTCTCTCTCTCT	52	7	7	100.00	0.466 4	0.659 0
24	CGGCACACACACACACA	56	8	8	100.00	0.279 4	0.437 7
25	GGGACACACACACACAC	56	9	8	88.90	0.367 3	0.547 4
26	CATGGTGTTGGTCATTGTTCCA	56	11	11	100.00	0.405 0	0.592 2
27	GAGAGAGAGAGAGAGATC	56	8	8	100.00	0.318 7	0.485 0
28	GAGAGAGAGAGAGAGATG	56	10	9	90.00	0.382 9	0.562 8
29	AGAGTTGGTAGCTTTGATC	56	9	6	66.70	0.334 7	0.497 8
30	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	52	8	8	100.00	0.301 7	0.462 1
31	ACACACACACACACACCA	52	7	7	100.00	0.356 5	0.536 9
32	ACACACACACACACACCT	57	10	10	100.00	0.404 6	0.591 3
33	GGGCACACACACACACA	57	8	7	87.50	0.361 9	0.537 1
34	GGCCACACACACACACA	57	11	11	100.00	0.397 8	0.584 6
35	CGCCACACACACACACA	52	9	9	100.00	0.399 9	0.578 1
36	GCGACACACACACACAC	57	12	12	100.00	0.370 9	0.551 0
37	CGGCTCTCTCTCTCTCT	52	7	6	85.70	0.349 2	0.520 1
38	CGCCTCTCTCTCTCTCT	52	6	6	100.00	0.419 4	0.606 6
39	GGCCTCTCTCTCTCTCT	57	10	9	90.00	0.343 0	0.517 8
40	CCCAGAGAGAGAGAGAG	57	9	9	100.00	0.264 0	0.419 9
41	CGCAGAGAGAGAGAGAG	57	12	11	91.70	0.274 2	0.432 3
42	CCGGAGAGAGAGAGAGAGA	57	9	9	100.00	0.259 9	0.410 5
43	GCGTCTCTCTCTCTCTC	51	11	10	90.90	0.347 5	0.520 9
44	GGGTCTTCTTCTTCTTC	51	9	8	88.90	0.258 3	0.415 9
45	CCCGTGTGTGTGTGTGT	51	8	8	100.00	0.334 7	0.508 1
46	GCGGTGTGTGTGTGTGT	57	11	10	90.90	0.316 5	0.478 8
47	CCCTGTGTGTGTGTGTG	51	5	5	100.00	0.386 0	0.566 3
48	CGCTGTGTGTGTGTGTG	51	6	6	100.00	0.330 6	0.491 1
49	AGCCTCTCTCTCTCTCT	52	9	6	66.70	0.340 2	0.509 6
50	AGGTCTCTCTCTCTCTC	52	8	8	100.00	0.367 8	0.547 1
51	ACGTCTCTCTCTCTCTC	52	7	7	100.00	0.276 2	0.445 9
总计			433	404			
平均			8.49	7.92	93.30	0.355 8	0.530 2

为 66.7%~100%，平均 93.30%。每条引物扩增的位点数 5~12 个，平均每条引物检测到 8.49 个，其中多态位点 7.92 个，说明所选用的 51 条引物多态性较高。22 个苦豆子在居群水平上的  $N_a$  和  $N_e$  分别为 1.935 3 和 1.573 1,  $H$  在 0.258 3 (44)~0.466 4 (23) 变动, 平均 0.355 8;  $I$  在 0.410 5 (42)~0.659 0 (23) 变动, 平均 0.530 2。可见, 不同地理来源的苦豆子居群其 DNA 有差异, 并且表现出较高的遗传多样性水平。

### 3.2 苦豆子 ISSR 的遗传多样性和亲缘关系

本研究中, 22 个苦豆子居群间 ISSR 标记的遗传距离在 0.173 6~0.650 2, 平均为 0.431 5, 其中居群 12 与居群 13 的亲缘关系最近, 遗传距离为 0.173 6; 居群 7 与居群 18 的亲缘关系最远, 遗传距离为 0.650 2 (表 3)。对 22 个苦豆子居群的遗传距离进行配对分析, 发现居群 5 的平均遗传距离在 22 个居群中最大为 0.504 8, 表明居群 5 与其他 21 个居群的遗传差异最大, 亲缘关系相对较远。

表 3 22 个苦豆子居群的遗传距离配对分析

Table 3 Pairwise analysis on genetic distance among 22 populations of *S. alopecuroides*

居群	遗传距离			居群	遗传距离		
	平均值	最大值	最小值		平均值	最大值	最小值
1	0.387 1	0.533 4 (4)	0.280 8 (2)	12	0.396 8	0.615 4 (4)	0.173 6 (13)
2	0.399 4	0.479 8 (18)	0.280 8 (1)	13	0.411 2	0.637 0 (4)	0.173 6 (12)
3	0.443 7	0.525 6 (21)	0.363 6 (8)	14	0.410 8	0.502 4 (4, 18, 21)	0.330 9 (12)
4	0.501 8	0.645 8 (5)	0.380 4 (3, 8)	15	0.390 6	0.464 9 (4)	0.305 5 (12)
5	0.504 8	0.645 8 (4)	0.390 6 (13)	16	0.424 1	0.602 7 (5)	0.321 3 (19)
6	0.438 3	0.561 3 (5)	0.340 6 (18)	17	0.424 6	0.565 4 (4)	0.350 4 (14)
7	0.442 6	0.650 2 (18)	0.299 3 (1)	18	0.455 6	0.650 2 (7)	0.340 6 (6)
8	0.452 5	0.598 5 (5)	0.363 6 (3)	19	0.440 8	0.615 4 (5)	0.302 4 (6)
9	0.416 9	0.521 7 (4)	0.334 2 (1)	20	0.396 0	0.506 2 (5)	0.318 2 (21)
10	0.430 5	0.569 5 (21)	0.308 7 (1)	21	0.457 8	0.628 3 (5)	0.318 2 (20)
11	0.448 4	0.590 1 (5)	0.357 0 (19)	22	0.418 3	0.549 3 (4)	0.305 5 (14)

括号内数字为该遗传距离对应的居群编号

Numbers in bracket represent variety number corresponding to genetic distance

### 3.3 基于 ISSR 分子标记的聚类分析

依据各居群间的 Nei's (1972) 遗传距离, 对 22 个苦豆子居群进行 UPGMA 聚类, 在遗传距离 0.515 2 处可将其聚为 6 大类, 见图 2。

第 I 类全部由宁夏居群组成, 包括居群 1、2、9 和 10。第 II 类分为 3 个亚类, 其中第 1 亚类、第 3 亚类各由一个居群 (宁夏居群 7 和内蒙居群 17) 构成, 第 2 亚类由 3 个宁夏居群 (居群 12、13、14)、1 个青海居群 (居群 15) 和 1 个新疆居群 (居群 22) 组成。第 III 类和第 VI 类均分别由一个居群构成 (居群 5 和 6), 这 2 个居群与其他居群的遗传距离均相对较远。第 IV 类由 3 个宁夏居群组成, 包括居群 3、4 和 8。第 V 类分为 2 个亚类, 其中第 1 亚类只有 1 个宁夏居群 11, 第 2 亚类则分别由 1 个内蒙居群 (居群 16)、1 个甘肃居群 (居群 18) 和 3 个新疆居群 (居群 19、20 和 21) 组成。

聚类分析显示来自宁夏的各居群和来自其他省

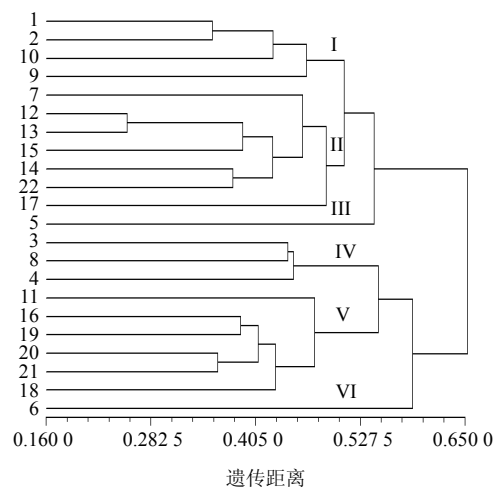


图 2 22 个苦豆子居群的 UPGMA 聚类分析  
Fig. 2 UPGMA cluster analysis of 22 populations of *S. alopecuroides*

份的各居群相互交织, 表明野生苦豆子居群间的遗传距离与其生长的实际地理位置间没有直接的关

系, 研究结果与苦豆子的 RAPD 分析结果相一致<sup>[16]</sup>。

### 3.4 基于 ISSR 分子标记的主成分分析 (PCA)

对 ISSR 标记的数据进行 PCA 分析, 结果显示第 1 主成分解释的变异为 30.56%, 第 2 主成分解释的变异为 14.50%, 第 3 主成分解释的变异为 9.50%, 3 个主成分累积解释的变异为 54.56%, 基本能够反映苦豆子不同居群间亲缘关系的信息。图 3 通过不同层面、不同方向更加直观、清晰地揭示出 22 个苦豆子居群间的亲缘关系。PCA 支持 UPGMA 聚类结果, 22 个苦豆子居群被分为 5 大类群, 除第 IV 类中包括了居群 6 外, 其余 4 类主成分分析的结果与 UPGMA 聚类结果完全一致。

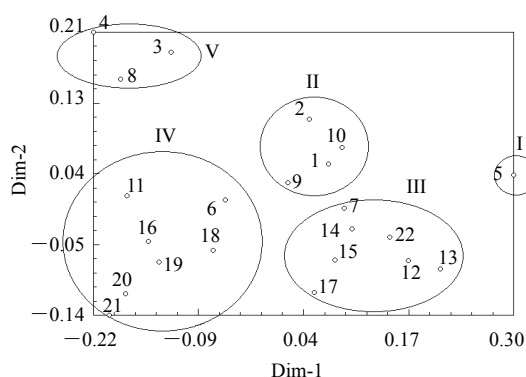


图 3 22 个苦豆子居群 ISSR 标记的二维主成分坐标图

Fig. 3 Principal coordinates graph of 22 populations of *S. alopecuroides* tagged by ISSR

## 4 讨论

从分子水平上来说, 遗传距离的变幅越大, PPB、*H* 和 *I* 越高, 遗传多样性水平越高, 同时也说明该物种的遗传背景越复杂。本研究中 PPB、*H* 和 *I* 均显示所参试的 22 个苦豆子居群拥有较高的遗传多样性。

聚类分析和主成分分析结果均显示, 不同来源的苦豆子居群在聚类图上相互交错分布, 即使是来自宁夏盐池县的 5 个居群, 也被分聚在了 5 个类群中。可见, 供试居群的遗传关系相似程度与其地理分布的远近没有明显的关系。苦豆子是以无性繁殖为主兼种子繁殖的植物, 各居群间的基因交流少, 不同地理来源的苦豆子居群由于生长环境和地理位置的差异, 在不同微环境中的适合度不同, 因而产生了较大的遗传变异和分化。

综上所述, 不同苦豆子居群间的差异主要由遗传因素决定, 本研究结果与 RAPD 及等位酶分析均证实了这一点。朱金霞等<sup>[17]</sup>的研究显示来自不同地

理环境的苦豆子种子中主要药用成分氧化苦参碱和总黄酮的量差异较大, 间接地表明其药用成分的高低与其遗传因素有关, 也与其所处的地理环境有一定的相关性。本研究结果对苦豆子有效成分的提取、利用及科学合理地驯化、栽培有一定的意义。

## 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 (第 40 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 李爱华, 孙兆军. 苦豆子资源开发现状及前景初探 [J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2000, 21(4): 354-356.
- [3] 邢世瑞, 段金廛. 宁夏中药资源 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1987.
- [4] 李 葳, 刘晓彦, 刘 娅. 苦参素抗肝纤维化作用的临床观察 [J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 585-586.
- [5] 廖春燕, 梁 健, 杨 燕, 等. 苦豆子的药理及应用概述 [J]. 中国民族民间医药, 2009(3): 6-8.
- [6] Pradeep R M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [7] Moreno S, Martin J P, Ortiz J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm [J]. *Euphytica*, 1998, 101: 117-125.
- [8] 李喜凤, 邱天宝, 张红梅, 等. 蒲公英遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2025-2029.
- [9] 杨美玲, 唐 红. 紫斑牡丹遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(4): 693-697.
- [10] 熊忠臣, 史艳财, 漆小雪, 等. 壮药战骨种质资源遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2040-2044.
- [11] 胡晓文, 杨 磊, 王彦荣. 人工模拟水热条件下苦豆子 2 种群硬实破除研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(9): 1875-1879.
- [12] 梁 磊, 王晓燕, 张绪慧, 等. 苦豆子生物碱抗结肠腺癌细胞株 SW620 的作用筛选 [J]. 中药材, 2008, 31(6): 866-869.
- [13] 王 进, 罗光宏, 颜 霞, 等. 干旱胁迫对苦豆子种子吸胀萌发和幼苗生长的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1807-1811.
- [14] 黄丽霞, 罗 静, 李文超, 等. 不同方法从苦豆子中提取 DNA 的效果比较研究 [J]. 宁夏农林科技, 2009(3): 8-10.
- [15] Nei M. Genetic distance between populations [J]. *Am Nat*, 1972, 106(949): 283-292.
- [16] 阳 翠, 张晓岗, 杨玉蓉, 等. 苦豆子种质资源遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 草业科学, 2012, 29(11): 1692-1697.
- [17] 朱金霞, 刘 萍. 不同生境苦豆子种子中氧化苦参碱和总黄酮含量的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 848-849.