

· 药材与资源 ·

不同产地老鹳草遗传多样性 ISSR 分析

尹海波¹, 王吉华¹, 涂秀文¹, 朱明慧¹, 姜海燕¹, 钟 鸣²

1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847

2. 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁 沈阳 110866

摘要: 目的 从 DNA 水平对老鹳草种质进行遗传多样性分析, 并建立老鹳草稳定的 ISSR-PCR 反应体系。方法 采用正交试验设计及单因素梯度优化相结合的方法确定老鹳草 ISSR-PCR 反应体系, 对我国 20 个主要分布区的老鹳草进行 ISSR-PCR 扩增与检测, 扩增结果转化为“0”、“1”矩阵后, 利用 Popgene32 及 Ntspc-2.1 软件对数据进行处理计算遗传距离, 并采用 UPGMA 聚类法构建亲缘关系树状图。结果 15 条引物共得到 207 条清晰可辨的扩增条带, 其中有 197 条呈现多态性, 占 94.6%, 遗传距离变化范围在 0.201 8~0.939 4。20 份样品分为 2 大类, 聚类较为复杂, 大多种质遗传多样性与地理位置及生态环境具有一定的关系。结论 我国老鹳草植物的遗传多样性十分丰富, 为筛选优质种质奠定了遗传基础。

关键词: 老鹳草; ISSR; 遗传多样性; 正交试验; 多态性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3206-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.020

ISSR analysis on genetic diversity of *Geranium wilfordii* from different habitatsYIN Hai-bo¹, WANG Ji-hua¹, TU Xiu-wen¹, ZHU Ming-hui¹, JIANG Hai-yan¹, ZHONG Ming²

1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

2. Key Laboratory of Agriculture Biotechnology Liaoning Province, Shenyang 110866, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of *Geranium wilfordii* from different habitats at DNA molecular level and to establish the ISSR-PCR system of *G. wilfordii*. **Methods** Using orthogonal design test combined with the single factor gradient optimization method, the geranium ISSR-PCR system of *G. wilfordii* was determined. *G. wilfordii* from 20 germplasmic resources was amplified and analyzed by ISSR-PCR. After translating the amplification results into “0” and “1” matrix, the genetic distances were calculated by Popgene32 and Ntspc-2.1 software and the systematic diagram of genetic relationship was clustered by UPGMA method. **Results** A total of 207 bands were detected using 15 primers, among which 197 (94.6%) were polymorphic bands. The genetic distances were changed from 0.201 8 to 0.939 4. The genetic relationship of *G. wilfordii* was more complex. The 20 samples were divided into two kinds, and the correlation between the most germplasm and its geographic origin had a certain relationship. **Conclusion** The significant polymorphism and genetic diversity are observed among *G. wilfordii* germplasm resources which could provide a wealth of genetic basis for the germplasm high quality.

Key words: *Geranium wilfordii* Maxim.; ISSR; genetic diversity; orthogonal test; polymorphism

老鹳草属于我国传统中药, 为牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.、老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 或野老鹳草 *G. carolinianum* L. 的干燥地上部分, 前者习称“长嘴老鹳草”, 后两者习称“短嘴老鹳草”^[1]。其中老鹳草为药材主要来源, 在我国河北、江苏及东北三省等地均有分布。目前有关老

鹳草的研究多集中于化学成分分析、分离及临床应用等方面, 鲜见 DNA 分子水平的研究。

ISSR 分子标记是利用真核生物基因组广泛存在的简单重复序列 (SSR) 设计引物 (一般为 16~18 个碱基序列), 无需克隆和测序, 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶或较高浓度的琼脂糖凝胶电泳分离获

收稿日期: 2013-05-28

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目 (2009A498); 杏林青蓝工程杰出人才基金 (115065)

作者简介: 尹海波 (1973—), 辽宁沈阳人, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为种质资源鉴定及中药的品质评价。

Tel: 15998530628 (0411)87586004 E-mail: yhb0528@sina.com

得扩增指纹图谱, 而本实验 PCR 产物片段大小在 10 bp 以上, 应用琼脂糖凝胶电泳分离, 其 DNA 模板用量少, 多态性丰富, 实验稳定性高, 多应用于显性标记, 现在广泛应用于种质资源鉴定、遗传多样性、分子标记育种等多方面^[2]。

本研究以来源于我国不同分布区的 20 份老鹳草种质为实验材料, 采用 ISSR 分子标记方法^[3], 以 PCR 技术为基础对其进行遗传多样性研究, 旨在探讨我国老鹳草地理种源的遗传变异特点, 为该药材种质资源的进一步收集利用及新种质的筛选提供分子水平上的参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

20 份老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 种质资源, 分别采自辽宁、吉林、黑龙江、河北、北京、山东等地 (表 1), 由辽宁中医药大学药学院药用植物教研室王冰教授鉴定, 凭证标本保存于辽宁中医药大学药学院药用植物教研室。根据均匀分布、随机取样的原则, 每个产地均选取 10 株成熟植株, 在植株上采集当年萌发的幼嫩叶片, 硅胶干燥后置低温干燥处保存。ISSR 引物参考加拿大 UBC 大学提供的引物序列, 由北京赛百盛生物工程技术有限公司合成。

表 1 样品来源信息

Table 1 Information of sample sources

编号	产地	经度 (E)	纬度 (N)	海拔 / m	生长环境
1	辽宁沈阳北陵	123°42'	41°85'	55.3	林下草丛
2	山东潍坊	118°30'	36°45'	525.3	山坡林缘草丛
3	河北承德	117°61'	40°43'	827.2	林下草丛
4	吉林集安	125°89'	41°52'	453.6	山坡
5	辽宁抚顺新宾	125°03'	41°71'	374.8	林下草丛
6	辽宁昌图县	124°11'	42°74'	142.9	林下草丛
7	北京延庆	115°83'	40°50'	770.6	林下草丛
8	辽宁大连庄河冰峪沟	122°97'	39°98'	234.6	林下草丛
9	山东烟台	121°72'	37°26'	264.8	林下草丛
10	辽宁大连庄河天门山	122°90'	41°14'	367.8	林下草丛
11	辽宁沈阳东陵	123°59'	41°83'	92.8	林下草丛
12	河北围场	117°75'	41°93'	844.1	林下草丛
13	辽宁本溪桓仁	125°52'	41°33'	375.0	林下草丛
14	吉林白山	126°50'	41°64'	349.9	林下草丛
15	吉林敦化	127°85'	42°78'	551.2	林下草丛
16	吉林长白	127°27'	41°50'	842.0	路边草丛
17	吉林通化	125°94'	41°73'	370.9	林下草丛
18	吉林临江	126°74'	41°75'	432.5	林缘草丛
19	黑龙江尚志	127°66'	45°40'	439.3	林下草丛
20	吉林延吉	129°16'	43°13'	375.9	路边草丛

1.2 试剂

PCR 反应相关试剂购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.3 仪器

数显恒温水浴锅 HH—6 (国华电器有限公司), 台式高速离心机 D—78532 Tuttlingen (德国 Hettich 公司), BIO-RAD PTC—200 型 PCR 仪 (德国), NanoDrop 微量分光光度计 (ND—1000) BFQ,

PALLPL5243 超纯水仪, MP 200A 分析天平, BIO-RAD 凝胶成像分析仪等。

2 方法

2.1 DNA 基因组提取与检测

采用天根生化科技有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒 (目录号: DP305) 提取药材 DNA, 其 DNA 浓度和纯度经 NanoDrop 微量分光光度计 (ND—1000) BFQ^[4], 并用 1% 琼脂糖电泳检测,

凝胶成像系统 (GelDoc™, Bio-Rad) 观察并照相, 用无菌双蒸水稀释到 10 ng/μL, -20 °C 冰箱保存。

2.2 ISSR-PCR 扩增及产物检测

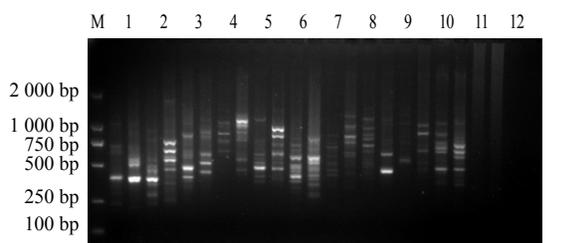
ISSR-PCR 扩增在 Bio-Rad PTC-200 型 PCR 仪上进行。ISSR-PCR 反应体系: 20 μL 反应体系中含有引物浓度 0.3 μmol/L, Taq 酶浓度 0.5 U, dNTP 0.3 mmol/L, Mg²⁺浓度 2.4 mmol/L, DNA 模板 30 ng; ISSR-PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 36 个循环: 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 完成最后一个循环后, 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。扩增产物在含有溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 当溴酚蓝指示剂距离琼脂糖凝胶前沿 1~2 cm 时, 停止电泳, 在紫外凝胶成像系统观察照相并记录实验结果。

2.3 引物的筛选

利用所提取的基因组 DNA, 随机选用 11、14 号种质作为 PCR 反应模板对 100 条引物进行筛选, 从中选出 15 条扩增产物多态性好、背景清晰、反应稳定的引物用于全部样本的 ISSR 分析, 部分引物筛选见图 1。

2.4 数据处理

ISSR 标记数据统计将反映在电泳图谱上, 不同



1~12-UBC835、UBC841、UBC842、UBC855、UBC857、UBC886、UBC887、UBC840、UBC847、UBC848、UBC893、UBC894

图 1 引物筛选

Fig. 1 Primers selection

产地同一位点出现的清晰条带记为“1”, 没有条带则记为“0”, 建立 0/1 数据矩阵。应用 Popgene32 软件计算其群体间遗传多样性参数、Shannon 信息指数(*I*)、Nei's 基因多样性指数(*H*)、遗传距离(GD)及遗传一致性等; 利用 NTsys2.10e 软件系统计算材料间遗传相似系数(Gs), 根据 Gs 值按不加权成对群算术平均法(UPGMA)构建不同产地种质间亲缘关系树状聚类图。

2.5 ISSR-PCR 反应程序的优化与建立

2.5.1 正交试验设计反应体系 按照 L₉(3⁴)正交表形成 9 个组合的实验方案, 随机选取 12、18 号种质(河北围场、吉林临江)的 DNA 模板 30 ng, 选取 2 条引物 UBC811、UBC857 进行 4 因素 3 水平的正交试验, 见表 2。

2.5.2 单因素试验 通过正交试验设计初选 PCR 反应体系最优条件的基础上, 考察单因素是否对优化后的条件有影响。随机选取辽宁大连产种质进行单因素试验, 分别对引物浓度、dNTP 浓度、Taq 酶、Mg²⁺浓度、DNA 模板量进行设置, 并通过验证性试验考察反应体系的稳定性及不同产地种质对反应条件的适应性。

2.5.3 PCR 扩增与产物检测 选用引物 UBC811、UBC857 为 ISSR-PCR 反应体系优化的引物, 反应体系按照正交试验 L₉(3⁴)进行实验。扩增程序及产物检测同“2.2”项所述方法。

3 结果与分析

3.1 老鹤草 ISSR-PCR 反应体系的建立

3.1.1 正交试验结果 分别用河北围场、吉林临江产的材料对应引物 UBC811、UBC857 进行正交试验, 其结果以河北围场为例, 见图 2。从图中可以看出 4 号实验方案使药材在不同引物中的扩增效果最好,

表 2 正交试验 L₉(3⁴)

Table 2 L₉(3⁴) Orthogonal test

序号	因素			
	引物浓度 / (μmol·L ⁻¹)	Taq 酶用量 / U	dNTP 浓度 / (mmol·L ⁻¹)	Mg ²⁺ 浓度 / (mmol·L ⁻¹)
1	0.1	0.5	0.1	1.2
2	0.1	1.0	0.3	1.8
3	0.1	1.5	0.5	2.4
4	0.3	0.5	0.3	2.4
5	0.3	1.0	0.5	1.2
6	0.3	1.5	0.1	1.8
7	0.5	0.5	0.5	1.8
8	0.5	1.0	0.1	2.4
9	0.5	1.5	0.3	1.2

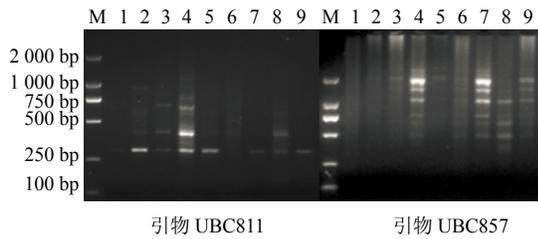


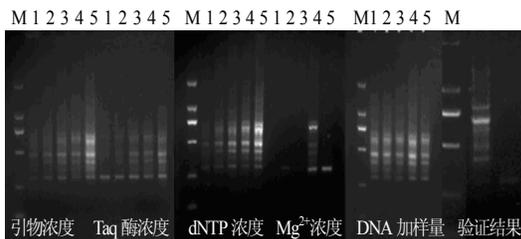
图2 正交设计 ISSR-PCR 反应体系扩增结果
Fig. 2 Amplification of ISSR-PCR system by orthogonal design

其中7号实验方案在引物最好，其中 UBC857 中扩增效果明显，但不适用于引物最好，其中 UBC811，所以从实验的适应性看，方案4为最佳反应体系。

3.1.2 单因素试验结果 PCR 扩增条带随引物、dNTP 浓度、Taq 酶浓度增加而变清晰明亮，DNA 模板加样量对反应无明显影响，Mg²⁺浓度与正交试验结果一致。验证性试验：采用单因素试验结果对4号实验方案进行优化，优化后的实验方案为引物浓度 0.3 μmol/L，Taq 酶浓度 1.25 U，dNTP 0.3 mmol/L，Mg²⁺浓度 2.4 mmol/L，从图3可以看出，优化后的实验方案不稳定，适应性不强，而4号实验方案稳定且条带清晰，最终选择原方案进行 PCR 实验的扩增。

3.2 基因组 DNA 扩增产物的多态性分析

本实验筛选出 15 条谱带清晰、重复性及稳定性好，多态性显著的引物用于全部 DNA 样品的 ISSR



引物浓度泳道 1~5-0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 / μmol·L⁻¹
Taq 酶泳道 1~5-0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 U
dNTP 浓度泳道 1~5-0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol·L⁻¹
Mg²⁺浓度泳道 1~5-1.2、1.5、1.8、2.1、2.4 mmol·L⁻¹
DNA 模板量 1~5-10、20、30、40、50 ng
primer with different concentration 1—5: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol·L⁻¹
Taq polymerases levels 1—5: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 U
dNTP concentration 1—5: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol·L⁻¹
Mg²⁺ concentration 1—5: 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 mmol·L⁻¹
template DNA concentration 1—5: 10, 20, 30, 40, 50 ng

图3 单因素不同梯度对 ISSR-PCR 反应的影响
Fig. 3 Effect of single factor at different gradients on ISSR-PCR

多态性检测，部分引物（UBC857、UBC813）扩增结果见图 4、5。根据 ISSR 扩增条带统计结果（表 3）可以看出 15 条引物共扩增出 207 条 DNA 片段，其相对分子质量在 250~2 000 bp，其中多态性条带 197 条，多态性百分率为 94.6%，不同引物扩增出的清晰条带数在 7~22 条，平均每个引物扩增出的片段条数为 13.8 条，扩增的多态性条带数为 6~21 条，每个引物的多态性百分率为 80%~100%，平均每个 ISSR 引物扩增出的多态性条带数目为 13.1 条。条带最多的是引物 UBC886，共 22 条；条带最少的是引物 UBC811，共 7 条；其中引物 UBC807、UBC810、UBC813、UBC817、UBC841、UBC842、UBC849、UBC887 多态率高达 100%。其种群间平均 H 和 I 分别为 0.423 和 0.611。从统计数据上可以看出老鹳草不同种质之间 ISSR 多态性水平较高。

3.3 遗传多样性和聚类分析

根据 Gs 的计算方法，从而得到 ISSR 标记扩增产物结果的相似性系数矩阵并结合 UPGMA 法，建立老鹳草种质资源的亲缘关系树形图（图 6）；20 个老鹳草种质之间的遗传一致度（genetic identity）变化范围在 0.411 2~0.812 7，GD 变化范围在 0.201 8~0.939 4；其中同来源于辽宁的 5 与 6 之间遗传距离最小，为 0.201 8，其次是 2 与 3（0.220 6），12 与 20 遗传距离最大为 0.939 4，其次 5 与 13（0.888 8）。通过实验结果提示相同产地的不同老鹳草种质之间

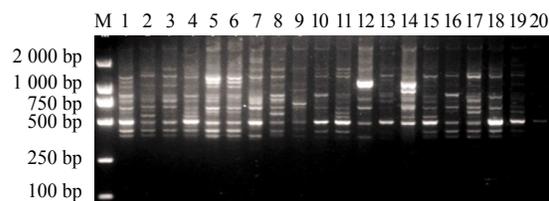


图4 引物 UBC857 对 20 份老鹳草样品的扩增谱带
Fig. 4 Amplification bands of 20 batches of *G. wilfordii* by Primer UBC857

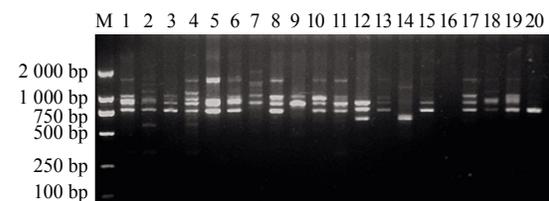


图5 引物 UBC813 对 20 份老鹳草样品的扩增谱带
Fig. 5 Amplification bands of 20 batches of *G. wilfordii* by Primer UBC813

表 3 ISSR 引物扩增结果及多态性

Table 3 Amplification results and polymorphism of ISSR primers

引物	5'-3'DNA 片段	DNA 谱带数	多态性条带数	多态位点比率 / %	H	I
UBC807	(AG) ₈ T	12	12	100	0.423	0.608 0
UBC810	(GA) ₈ T	15	15	100	0.449	0.640 0
UBC811	(GA) ₈ C	7	6	85.7	0.425	0.615 0
UBC813	(CT) ₈ T	15	15	100	0.411	0.598 0
UBC817	(CA) ₈ A	12	12	100	0.430	0.618 0
UBC834	(AG) ₈ YT	13	12	92.3	0.440	0.629 0
UBC841	(GA) ₈ YC	9	9	100	0.382	0.566 0
UBC842	(GA) ₈ YG	12	12	100	0.344	0.520 2
UBC847	(CA) ₈ RC	15	12	80.0	0.461	0.653 0
UBC848	(CA) ₈ RG	9	8	88.9	0.400	0.585 0
UBC849	(GT) ₈ YA	20	20	100	0.374	0.556 0
UBC857	(AC) ₈ YG	16	15	93.8	0.440	0.631 0
UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	22	21	95.5	0.442	0.562 0
UBC887	DVDTCTCTCTCTCTCTC	18	18	100	0.453	0.644 0
UBC891	CCGACTCGAGNNNNNN ATGTGG	12	10	83.3	0.453	0.644 0
平均		13.8	13.1	94.6	0.423	0.611 0

R (A/G), Y = (C/T), V = (G/A/C), D = (G/T/C), N = (A/G/C/T)

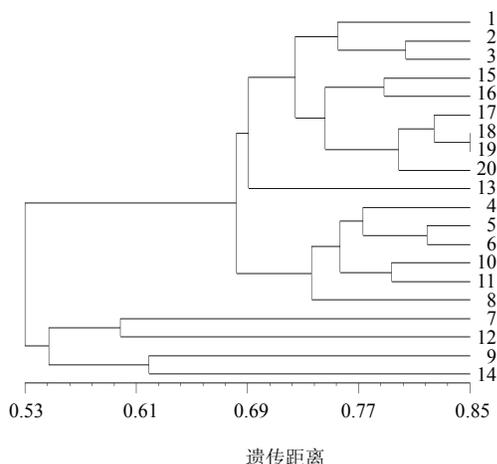


图 6 20 份老鹳草样品的聚类结果

Fig. 6 Clustering results of 20 batches of *G. wilfordii*

具有较近的亲缘性并同时存在着一定的遗传变异性；不同产地老鹳草种质之间的遗传距离较大，但个别地理距离较远的样品间遗传距离却较近，提示可能由于我国气候复杂多样，雨热同期^[5]以及资源所处生态环境不同等因素的影响，造成不同种质之间具有较高的遗传一致性。

通过亲缘关系树形图可见，20 个种质主要聚为 2 大类，7、12、9、14 号种质为一类与上述分析具

有一致性；其余种质来源聚为一类，其中 4（吉林）、5、6、10、11、8 号聚为一亚类以辽宁为主，4 号地理位置、生态环境与 5、6 号近似聚为一小类，1~3 号、15~20 号聚为一亚类，1、2、3 号聚为一小类，2（山东）、3（河北）号地理位置接近生态环境相似而聚为一小类，15~20 号聚为一小类，13 号单为一类。通过聚类分析可以看出不同产地老鹳草种质间的遗传多样性与地理位置及生态环境具有一定的关系，居群间地理位置差异越大，其遗传信息差异相对越大，虽然存在少数特例，但仍遵循相对普遍的遗传规律。

4 讨论

4.1 PCR 反应的确定

PCR 反应易受反应体系、扩增程序及循环周期等因素的影响^[6]。引物浓度一般控制在 0.2~1.0 μmol/L，在 25 μL 反应体系中，DNA 聚合酶用量一般在 0.125~1.25 U，当引物浓度过高时产生的非特异性产物及引物二聚体会与靶序列竞争 DNA 聚合酶和 dNTP 底物，从而使特异性产物扩增量降低；dNTP 浓度过高易导致错误掺入，过低则降低产率；Mg²⁺能够增强蛋白酶的稳定性，过低则降低酶活性，过高则酶催化非特异性条带的扩增^[7-9]，同时与

dNTP 具有一定的相关性, Mg^{2+} 至少应比 dNTP 总浓度高出 0.2~2.5 mmol/L 为宜。

4.2 退火温度考察

通过设置 PCR 仪,使退火温度在 8 排实验槽中呈 50~60 °C(A=60 °C, B=59.4 °C, C=58.3 °C, D=56.3 °C, E=53.9 °C, F=52 °C, G=50.7 °C, H=50 °C) 梯度变化, A~D 退火温度较高, 扩增谱带特异性较差, 非特异性产物条带明显, G、H 温度较低, 扩增谱带弥散故不利于扩增反应, 可以看出 E、F 扩增谱带相对清晰, 通过仔细观察与反复实验并结合引物自身特点, 最后选用 52 °C 为其退火温度。

4.3 ISSR 引物选择及 DNA 模板应用

引物(G+C)量在 40%~60%为宜, 过低则引物解链温度低, 易于从模板上解离, 扩增效果不佳, 过高则解链温度升高, 易于与非特异性序列杂交出现非特异性扩增条带; 考虑到老鹳草种质间的遗传差异性, 及不同引物对不同种质 DNA 模板产生的不同适应性, 为了筛选得到稳定并具有一定普遍适用性的引物, 本实验随机选取 2 个来源的老鹳草种质进行引物的筛选并最终确定了 15 条引物进行 ISSR-PCR 反应, 选用了多个 DNA 模板, 针对不同的引物优化老鹳草 ISSR-PCR 反应体系, 并最终建立分辨率高、稳定性强、适用性好的反应体系。

近年来分子生物学技术广泛应用于农业及种植业^[10-11], 而随着中药资源开发利用的扩大化, 对中药资源的研究上升到分子领域, 分子生物学技术开始应用于药材的遗传多样性、亲缘关系^[12-13]等方面的研究, 中药资源的多样性是我国生物多样性的重要组成部分, 其物种多样性及基因多样性, 是其功能、用途多样性的物质基础, 是深度开发利用中药资源的重要依据。

本实验以不同产地老鹳草种质为研究对象, 侧重于药材不同居群间的遗传多样性研究, 并建立了稳定性强、普遍适用性好的 ISSR-PCR 反应体系, 利用 ISSR-PCR 技术对 20 个老鹳草种质进行定性分析, 通过各引物对药材 DNA 模板的扩增情况来看, 不同居群间的老鹳草存在明显差异, 并具有很高的遗传多样性。在亲缘关系上, 遗传距离越小, 遗传

一致性越大, 药材间的亲缘关系也就越近^[14], 从聚类结果可以看出老鹳草不同种质之间存在“大杂居, 小聚居”的遗传模式, 与地理位置生态环境具有一定的联系但不绝对, 可能与药用植物本身对环境的适应能力或药用植物通过遗传变异适应异质生境^[5]有关。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李 婷, 林文津, 徐榕青, 等. ISSR 技术在药用植物种质研究中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 41(2): 41-42.
- [3] Zietkiewicz E. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20: 176-183.
- [4] 刘 娟, 张沙沙, 朱金玲, 等. 老鹳草基因组 DNA 提取及检测 [J]. 中小企业管理与科技, 2008, 22: 102.
- [5] 黄璐琦, 郭兰萍. 中药资源生态学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- [6] 欧立军, 颜 旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353-357.
- [7] 李 嵘, 王喆之. 丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化 [J]. 广西植物, 2008, 28(5): 599-603.
- [8] 刘小莉, 普春霞, 杨耀文, 等. 药用植物胡黄连 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1520-1521.
- [9] 魏丹红, 徐 红, 王燕燕. 金钗石斛遗传多样性研究的 ISSR-PCR 反应体系建立与优化 [J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(4): 64-68.
- [10] 刘本英, 李友勇, 唐一春, 等. 云南茶树资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 作物学报, 2010, 36(3): 391-400.
- [11] 曾艳玲, 谭晓风, 张党权, 等. 基于 ISSR 分子标记的桉树遗传分析 [J]. 种子, 2010, 20(1): 24-27.
- [12] 张 瑾, 谈献和, 王康才, 等. 江苏不同产地半夏遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(2): 130-132.
- [13] 高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 363-366.
- [14] 卜 静, 王冬梅, 李登武. 不同产地野生玉竹种植资源多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1824-1828.