

# ISSR 标记技术在药用植物资源中的研究进展及应用

任梦云<sup>1, 2</sup> 陈彦君<sup>2</sup> 张盾<sup>2</sup> 杜乐山<sup>1</sup> 刘方<sup>1</sup> 关潇<sup>1</sup> 张银东<sup>2</sup>

(1. 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2. 海南大学农学院, 海口 570228)

**摘要:** 简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是在简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 基础上发展起来的一种新型分子标记技术。目前药用植物研究与开发面临资源枯竭、药效物质不明确及质量难以控制等难题, DNA 分子标记技术, 包括 ISSR 技术为上述难题提供了新的解决办法。比较了几种常用分子标记的优缺点, 最后着重介绍了目前广泛应用于药用植物研究中的 DNA 分子标记 ISSR 的技术原理和特点, 综述了 ISSR 分子标记技术在药用植物的遗传多样性和遗传结构、种质资源鉴定、中药品质鉴定, 以及遗传图谱等方面的研究进展及应用前景, 旨在为药用植物的开发和利用提供参考。

**关键词:** ISSR; 分子标记; 药用植物; 品质鉴定; 基因图谱

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017.04.008

## Application and Research Progress of Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Marker in Medicinal Plants

REN Meng-yun<sup>1, 2</sup> CHEN Yan-jun<sup>2</sup> ZHANG Dun<sup>2</sup> DU Le-shan<sup>1</sup> LIU Fang<sup>1</sup> GUAN Xiao<sup>1</sup> ZHANG Yin-dong<sup>2</sup>

(1. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228)

**Abstract:** Inter-simple sequence repeat (ISSR) has been known as a novel molecular marker technology based on simple sequence repeat (SSR). At present, the research and development of medicinal plants are facing the problems such as unclear drug substance, uncontrollable quality and exhausted resources. DNA molecular marker technology, especially ISSR, has provided a new solution for the above problems. Comparing the merits and demerits of several commonly used molecular markers, finally, we mainly introduced the principles and characteristics of DNA molecular marker ISSR applied in current research of the medicinal plants, and summarized the new advances on ISSR molecular technology and its application prospective in the genetic diversity and structure of medicinal plants, identification of germplasm resources, quality identification of traditional Chinese medicine, and genetic map, aiming at providing better reference for the development and utilization of medicinal plants.

**Key words:** ISSR; molecular markers; medicinal plant; quality identification; genetic map

药用植物是指含有药性成分、具有医疗用途、可用于药物开发利用的植物资源类群<sup>[1, 2]</sup>, 具有极其重要的保护价值和开发潜力<sup>[3]</sup>。中国作为药用植物资源最为丰富的国家之一, 其资源种类达到一万余种<sup>[4]</sup>。药用植物作为传统中药的主要来源, 需进行现代化的研究才能满足人类的需求。目前药用植

物研究的主要内容包括种质资源的鉴定、亲缘关系的划分及遗传起源与演化等, 将分子生物学技术与药用植物研究相结合, 是现代药用植物研究的重要手段。

越来越多的科学研究者应用不同的分子标记技术对中国药用植物进行 DNA 分子水平的鉴定,

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 环境保护部生物多样性保护专项 (2096001006)

作者简介: 任梦云, 女, 博士, 研究方向: 遗传资源分子生物学; E-mail: renmengyun@163.com

通讯作者: 关潇, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 遗传资源与生物安全; E-mail: cynthia815@126.com

张银东, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子生物学; E-mail: 23300558@163.com

张影波等<sup>[5]</sup>利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)两种分子标记对我国药用植物艾纳香(*Blumea balsamifera*)种群的遗传多样性进行分析,结果表明两者都可用于艾纳香(*B. balsamifera*)的遗传多样性分析,但与SRAP相比较,AFLP具有多样性位点多,特征指数高等优点,更适合艾纳香的遗传多样性研究。Fu等<sup>[6]</sup>利用(simple sequence repeat, SSR)标记研究枣种质资源遗传多样性,作者认为这些标记将有助于研究红枣的遗传资源结构,并有助于阐明这一重要作物的进化史。

目前广泛应用的几种分子标记技术,如RAPD是一种较为简单方便的方法,具有快速、灵敏、易检测等特点,但此种分子技术不能区分杂合子和纯合子,在引物应用数目及扩增反应条件等实验技术方面未标准化,稳定性和重复性较差<sup>[7, 8]</sup>。SSR虽然为共显性标记,但引物开发成本较高,且必须事先知道微卫星两翼序列信息才能设计引物,对不同物种需先构建基因文库<sup>[9-11]</sup>。AFLP实验结果可靠,可快速获得大量信息,再现性高,重复性好,但该技术技术难度高、成本高,同时放射性同位素标记会对操作人员造成伤害,因此需要特殊的防护措施和仪器设备<sup>[12-13]</sup>。限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)具有共显性的特点,可区分同一位点的等位基因,实验结果较为稳定可靠,但其对DNA的量以及纯度要求过高,得到的谱带也更为复杂且难于解释<sup>[14-18]</sup>。相对而言,ISSR结合了SSR和RAPD的优点,操作简单,所需DNA模板量少,实验成本低,但在不同植物种群中也有所不同,故在具体操作过程中需要摸索条件进行优化。

自ISSR分子标记技术问世以来,被广泛应用于种质资源遗传多样性与结构研究、遗传图谱构建、种质资源研究等方面<sup>[19-21]</sup>,已成为现代分子生物学研究与应用的主流。本综述主要讨论ISSR分子标记技术在药用植物资源研究上的应用与前景,包括种质资源的鉴定、遗传多样性评价、亲缘关系研究和遗传图谱的构建等几个方面。本文对ISSR标记在药用植物资源上的应用情况进行综述,以期今后的

药用植物分子标记研究提供参考。

## 1 ISSR分子标记在药用植物资源中的研究进展

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)是Zietkeiwicz等<sup>[22]</sup>于1994年提出,是在简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)基础上发展起来的1种新型分子标记技术,其基本原理是以锚定的微卫星DNA为引物,即在SSR序列的3'端或5'端加上2-4个随机核苷酸,通过PCR扩增两侧具有反向排列SSR的一段序列,然后利用电泳技术,根据谱带的有无及相对位置分析其多态性。该技术结合了SSR和RAPD技术的优点,具有操作简单<sup>[23, 24]</sup>、多态性丰富、重复性强、试验稳定性好<sup>[25-28]</sup>、DNA模板用量少和实验成本低等优点<sup>[28]</sup>。

目前分子生物学技术飞速发展,并逐渐渗透到生命科学的各个领域,为药用植物的研究提供了新的借鉴方法,并且已被证实是一种评价种属间遗传多样性和亲缘关系的有效方法<sup>[29]</sup>。由于药用植物种类繁多,对其遗传起源与演化研究有限,目前国内有关药用植物的研究主要集中在以下几个方面。

### 1.1 ISSR分子标记在遗传多样性研究上的应用

遗传多样性是每种生物所固有的特性,可以帮助了解物种的种群遗传结构和多样性水平,为研究物种起源、品种分类、品种保护及临床用药等提供依据<sup>[30]</sup>。遗传多样性的高低是物种生存能力的具体体现,而遗传多样性的研究是保护生物学的核心内容之一,是保护和利用药用植物资源的前提和基础,同时也是研究物种起源和演化的依据<sup>[31, 32]</sup>。近年来,鉴于形态标记和生化标记方法易受环境、组织类别以及发育阶段影响的弊端<sup>[33]</sup>,ISSR分子标记技术被广泛应用于植物遗传多样性和遗传结构的研究中。大量研究表明,ISSR分子标记技术可以用于种群间或种群内遗传多样性分析,了解种群遗传变异的大小、时空分布及其与环境变化和人类活动的关系。这对了解药用植物种群起源、进化历程和现今分布格局,以及开展药用植物种质资源育种和采取科学有效的保护措施均具有指导意义。种群遗传多样性的高低不仅关系到原位和迁地保护策略的制定,而且是物种可持续利用的重要基石。

用于药用植物遗传多样性分析的 DNA 分子标记方法主要有 RAPD 和 ISSR。但实验发现, ISSR 分子标记技术具有较高的多态性条带比例及较多的扩增条带数<sup>[34]</sup>, 且 ISSR 比 RAPD 更有效率<sup>[35]</sup>, 因此本综述着重介绍 ISSR 分子标记技术在遗传多样性分析的应用。Zhang 等<sup>[36]</sup>利用 ISSR 分子标记技术对 87 个油桐(*Vernicia fordii*)样本进行了遗传关系的研究, 作者发现品种的引进可以加进种群间的遗传分化, 研究结果显示样本呈明显的地理分化。Givnish 等<sup>[37]</sup>采用此技术研究桔梗(*Clermontia*)的变异程度, 发现桔梗为杂种, 并非单系群, 为阐明其系统发育及花的演变研究做了补充。同样, ISSR 分子标记技术也用于分析植物的遗传分化程度和遗传结构, 发现遗传变异主要发生在种群内, 根据其遗传变异规律, 可提出有效的保护措施, 比如对苜蓿种质材料的研究<sup>[38]</sup>、台湾杉(*Taiwania cryptomerioides*)的分析等<sup>[39]</sup>。詹羽姣<sup>[40]</sup>和王果平<sup>[41]</sup>都曾采用 ISSR 分子标记对新疆贝母(*Fritillaria walujewii*)或贝母属植物进行遗传多样性分析, 结果显示药用贝母品种整体上有较高的遗传多样性, 这为其资源收集、品种分类以及种质保护提供了理论依据。Liu 等<sup>[42]</sup>利用 ISSR 对来自新疆 3 个地区、10 个种群的刺山柑(*Capparis spinosa*)进行遗传多样性和种群结构分析, 结果表明这 3 个地区的刺山柑基因型具有较高的遗传多样性, 可用于替代育种计划。以上研究表明, ISSR 分子标记技术适于多种药用植物资源的遗传多样性研究。

## 1.2 ISSR 分子标记在种质资源鉴定与亲缘关系研究中的应用

随着生物技术的发展, DNA 分子水平已发展到可以从遗传背景判断种质材料之间的差异, 为种质资源的评价提供更加稳定、可靠的参考依据, 为进一步分子辅助育种奠定基础。ISSR 分子标记技术因其稳定性和高效性等优点, 被应用到药用植物种、属等各个单元的亲缘关系比较。利用 ISSR 分子标记技术研究确定药用植物间的亲缘性关系、绘制系统发育进化树, 有效阐明药用植物物种自然种群、品种间遗传结构的基因流动, 揭示生物的遗传背景差异、物种演化、系统发育和亲缘关系。

ISSR 分子标记技术不仅可用于不同产地药用植物资源的划分, 同样也可用于物种的鉴定与划分, 为育种工作奠定基础<sup>[43]</sup>。任凤鸣等<sup>[44]</sup>运用 ISSR 技术对来自 36 个不同产地的金钱草(*Lysimachia christinae*)种质资源进行遗传多样性进行分析, 结果表明划分的组群与地理分布没有明显相关性, 这说明金钱草(*L. christinae*)种质资源具有较为丰富的遗传多样性。Lu 等<sup>[45]</sup>利用 ISSR 分子标记技术对不同产地的 24 种石斛(*Dendrobium nobile*)种质资源进行遗传多样性分析, 结果表明这 24 种石斛(*D. nobile*)从生境上可分为六组, 且遗传多样性丰富。阳翠等<sup>[46]</sup>采用 ISSR 分子标记技术, 对产自宁夏、甘肃、青海、新疆和内蒙的 22 个苦豆子(*Sophora alopecuroides*)居群进行遗传多样性和亲缘关系分析, 结果表明 22 个苦豆子(*S. alopecuroides*)居群间具有较高的遗传多样性, 且各居群间遗传距离与地理距离没有明显关系, 这为野生苦豆子资源的驯化和保护等提供科学依据。Safaei 等<sup>[47]</sup>利用 ISSR 分子标记技术对 6 个丹参种(*Salvia*)的 39 个植物样本进行研究, 结果表明 ISSR 分子标记技术能应用于形态学研究中的物种鉴定与划分。以上研究表明, ISSR 标记适于多种药用植物种质资源的鉴定和亲缘关系分析。

## 1.3 ISSR 分子标记在中药品质鉴定中的应用

中药材品质鉴定是中药质量控制研究的重要组成部分, 长期以来我国中药材处于品种难以鉴定和质量难以保证的不利局面, 很大程度上限制了中药安全的检测及其向现代化、标准化和国际化的发展<sup>[48]</sup>。目前人们一直在寻找科学而有效的鉴定方法, 随着分子生物学技术的迅速发展, ISSR 分子标记技术已经在该领域取得了不斐的成绩。因此, 采取科学的方法对易混淆生药品种及近缘种进行鉴定具有重要的现实意义。

ISSR 分子标记技术因具有不会受到环境因素影响的优点, 已被广泛应用到药用植物品质鉴定及道地性的研究, 并取得良好效果, 为中药研究者提供 1 种中药品质鉴定的评价标准。周晔等<sup>[49]</sup>运用 ISSR 技术鉴别中药玉竹(*Polygonatum odoratum*)及其掺伪品小玉竹(*P. humile*), 结果显示通过显微鉴



定以及 ISSR 标记可以将玉竹 (*P. odoratum*) 及其主要掺伪品区分开。同时, 运用 ISSR 分子标记技术能有效的区分中药黄精 (*P. sibiricum*) 和卷叶黄精 (*P. cirrhifolium*)<sup>[50]</sup>, 保证了用药的安全。潘清平等<sup>[51]</sup>也采用 ISSR 分子标记技术成功对玉竹的主要栽培品种、野生种及易混淆品黄精 (*P. sibiricum*) 进行了鉴定。Pongsrila 等<sup>[52]</sup>利用 ISSR 技术, 进行兰花品种的鉴定, 成功区分了 14 个种的石斛属植物, 进一步证明了 ISSR 标记在鉴别不同种和不同产地石斛属植物方面的适用性, 为解决石斛道地性判断这一难题提供了新的解决思路, 同时为未来育种数据基因库的构建奠定基础。由此表明, ISSR 分子标记技术可用于多种道地药材的品质鉴定。

#### 1.4 ISSR 分子标记在遗传图谱构建中的应用

遗传连锁图谱研究的目的是寻找足够的多态分子标记, 将所有基因定位到特定染色体的特定区域, 最好是在染色体步查距离内。ISSR 分子标记技术能够揭示高度多态性且标记遍布于整个染色体上, 是绘制遗传连锁图的理想标记。ISSR 不仅应用于种群遗传结构上<sup>[53, 54]</sup>, 在遗传图谱构建<sup>[55, 56]</sup>、目标性状基因连锁<sup>[57]</sup>等方面也有相关报道。

利用 ISSR 分子技术绘制药用植物种质资源的 DNA 指纹图谱, 同时与其品质进行相关性分析, 这可以为进一步的分子辅助育种与药性成分分析奠定基础。战晴晴等<sup>[57]</sup>采用 ISSR 的方法构建了北柴胡 (*Bupleurum chinense*) 的遗传图谱, 从 30 条引物中筛选出了 28 条 ISSR 引物, 共扩增出 154 条多态性条带, 每条引物能扩增出 2-8 条多态性条带, 初步构建出了北柴胡 (*B. chinense*) 的遗传图谱, 该图谱为北柴胡性状基因定位以及分子标记辅助选择育种等研究奠定了基础。杨红兵等<sup>[58]</sup>采用 ISSR 分子标记技术对湖北恩施产的厚朴 (*Magnolia officinalis*) 进行了遗传图谱的构建。Feng 等<sup>[59]</sup>以金钗石斛 (*D. nobile*) 和细茎石斛 (*D. moniliforme*) 为亲本得到 F1 代群体的 90 个单株, 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记进行基因连锁分析, 构建双亲遗传图谱。石斛遗传图谱的构建与研究为石斛药用和园艺性状基因的定位和分子标记辅助选择育种计划提供重要依据。以上说明利用 ISSR 标记进行遗传图谱的构建可行且有效的。

## 2 存在问题及应用前景

我国药用植物种质资源非常丰富, 但药用植物在开发利用过程中存在种类和数量不清、种质资源难保存、野生资源遭受严重破坏、人工栽培品种品质退化等问题, 严重制约了产业发展。对药用植物资源研究的最终目的在于优良品种的选育, 生产优质中药材, 而育种上的突破性的发展主要依靠 DNA 分子水平研究的进展。目前 ISSR 分子标记在药用植物研究上存在着一定的局限性, 一方面作为 DNA 分子标记技术与药用植物其他方面研究的结合还未展开; 另一方面此分子技术对实验人员的技术要求比较高, 而且在后期实验数据的软件分析中缺乏统一标准, 因此 ISSR 分子标记技术在生产广泛推广应用上受到限制。

ISSR 分子标记在生物学上最常见的应用是分析和评估种群间的亲缘关系及其遗传多样性, 因其引物的通用性 ISSR 技术可适用于世界上任何物种。由于且扩增谱带多为显性、呈 Mendel 式遗传<sup>[60]</sup>, 无法区分纯合子和杂合子, 故其在种质材料的基因型判断, 解决交配系统、计算杂合度和父系分析问题上存在明显不足<sup>[61]</sup>。但与传统的形态学及细胞学标记方法相比, ISSR 分子标记不仅可以直接从基因水平检测药用植物分子结构上的变异、反映研究材料本质上的差异、鉴定濒危药用植物, 还可以在亲缘关系研究、濒危物种的保护、品种鉴定、资源评价等方面为药用植物研究进行了完善和补充, 为药用植物提供了新的研究思路<sup>[62-66]</sup>。虽然中国拥有世界上丰富的药用植物种质资源和长久的栽培史, 但有关中药种质资源基因水平的研究尚且不足。随着分子杂交育种技术的不断改良, 新品种的出现, 目前某个单独的标记技术已不足以满足所有物种的鉴定与分析, 多种分子标记技术的组合应用可以明显用于提高物种的鉴别能力, 研究工作者应该针对不同目的、不同物种、不同要求而有所选择。为了更好地研究我国中药资源的遗传多样性和药材道地性, 保护有限的中药资源, 并对其进行合理的开发利用, 中药研究者应积极借鉴 ISSR 分子标记在其他作物成功应用的经验, 并根据不同的研究目的与对象将其与其它多种分子标记技术相结合, 全面的、科学

的对野生中药资源的遗传多样性和遗传结构进行研究<sup>[67]</sup>, 从而加快药用植物资源的分子水平研究的步伐, 促进药用植物种质资源发挥更大的作用。

### 参考文献

- [1] Bremness L. Herbs [M]. London: Dorling Kindersley, 1994.
- [2] 臧敏, 邱筱兰, 姚丽芳, 等. 江西三清山野生药用植物资源分析 [J]. 江苏农业科学, 2015, (2): 358-361.
- [3] 高蕊. 丹东地区野生药用植物资源多样性分析 [J]. 防护林科技, 2016, (8): 58-61.
- [4] Li TSC. Chinese & Related North American Herbs: Phytopharmacology & Therapeutic Values [M]. Boca Raton: CRC press, 2016.
- [5] 张影波, 袁媛, 庞玉新, 等. 艾纳香遗传多样性的 SRAP 和 AFLP 对比分析 [J]. 南京农业学报, 2016, 47 (8): 1261-1267.
- [6] Fu PC, Zhang YZ, Ya HY, et al. Characterization of SSR genomic abundance and identification of SSR markers for population genetics in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Peer J, 2016, 4: e1735.
- [7] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of intersimple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94 (5): 597-602.
- [8] 张民照, 崔桂山, 王进忠, 等. 基于 RAPD 改进的分子标记技术 [J]. 应用昆虫学报, 2008, 45 (6): 979-983.
- [9] 蒋彩虹, 王元英, 孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展 [J]. 中国烟草科学, 2007, 28 (2): 1-5.
- [10] Ghislain M, Spooner DM, Rodríguez F, et al. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2004, 108 (5): 881-890.
- [11] 汪由, 吴禹, 李兆波, 等. SSR 分子标记及其在农作物育种中的应用 [J]. 农业科技与装备, 2011, (2): 17-21.
- [12] John BB, Joseph OO, Gbolagade JS. Molecular variability of *Celosia argentea* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 26 (7): 1-6.
- [13] 王华新, 王永勤, 曹家树, 等. 白菜雄性不育相关新基因 BeMF1 的分离及特征分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41 (4): 1119-1127.
- [14] Hegab AA, Fahmy MM, Mahdy OA, et al. Parasitological and molecular identification of *Theileria* Species by PCR-RFLP Method in Sheep, Egypt. [J]. Int J Adv Res Biol Sci, 2016, 3 (7): 48-55.
- [15] Outram MA, Jones EE, Jaspers MV, et al. Development of a PCR-RFLP method to distinguish species within the *Ilyonectria macrodidyma* complex [J]. New Zealand Plant Protection, 2014, 67: 151-156.
- [16] Pharmawati M, Imaniar EF. PCR-RFLP and Sequencing of trnS/trnFM Fragment of *Enhalus acoriodes* from Sanur Coastal Waters, Bali, Indonesia: A Preliminary Study [J]. Journal of Tropical Life Science, 2016, 6 (2): 118-122.
- [17] 朱国锋, 吴兰, 李思光. RFLP 技术在湖泊微生物多样性研究中的应用 [J]. 环境科学与技术, 2008, 31 (11): 9-12.
- [18] 匡猛, 杨伟华, 许红霞, 等. 分子标记技术在棉花品种鉴定上的研究进展 [J]. 棉花学报, 2009, 21 (4): 330-334.
- [19] Guan Z, Zhang L, Song M, et al. Genetic relationship on several medicinal plants in *Marsdenia* from Yunnan in ISSR marker [J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37 (11): 1550-1552.
- [20] Rampersad SN. Genetic structure of *colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting Papaya inferred by multilocus ISSR markers [J]. Phytopathology, 2013, 103 (2): 182-189.
- [21] 王照兰, 杨持, 赵丽丽, 等. 扁蓿豆不同品系 ISSR 标记遗传差异和遗传多样性 [J]. 中国草地学报, 2010, 32 (1): 11-17.
- [22] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20 (2): 176-183.
- [23] Gupta M, Chyi YS, Romero-severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89: 998-1006.
- [24] Zhan S, Guo Q, Li M, et al. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation [J]. Development, 2010, 137 (23): 4083-4090.
- [25] Azevedo AL, Costa PP, Machado MA, et al. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers [J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10 (4): 3530-3538.
- [26] Mcgregor CE, Lambert CA, Greyling MM, et al. A comparative

- assessment of DNA fingerprinting techniques ( RAPD, ISSR, AFLP and SSR ) in tetraploid potato ( *Solanum tuberosum* L. ) germplasm [ J ]. *Euphytica*, 2012, 113 ( 2 ): 135-144.
- [ 27 ] Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns [ J ]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91 ( 3 ): 439-447.
- [ 28 ] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [ J ]. *植物学报*, 2000, 42 ( 7 ): 741-750.
- [ 29 ] Guo GY, Yang RW, Ding CB, et al. Phylogenetic relationships between *Leymus* and related diploid Triticeae species revealed by ISSR markers [ J ]. *Biologia*, 2014, 69 ( 8 ): 986-993.
- [ 30 ] 陈名红, 熊华斌, 李成云. 分子标记在百合属植物遗传多样性研究中的应用 [ J ]. *生物技术通报*, 2011, ( 12 ): 65-69.
- [ 31 ] Strasburg JL, Sherman NA, Wright KM, et al. What can patterns of differentiation across plant genomes tell us about adaptation and speciation? [ J ]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 2012, 367 ( 1587 ): 364-373.
- [ 32 ] Yu HH, Yang ZL, Sun B, et al. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* ( Magnoliaceae ) assessed with ISSR polymorphisms [ J ]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2011, 39 ( 2 ): 71-78.
- [ 33 ] 王印肖, 徐秀琴, 韩宏伟. 分子标记在品种鉴定中的应用及前景 [ J ]. *河北林业科技*, 2006, ( B09 ): 46-49.
- [ 34 ] Medhi K, Sarmah DK, Deka M, et al. High gene flow and genetic diversity in three economically important *Zanthoxylum* Spp. of Upper Brahmaputra Valley Zone of NE India using molecular markers [ J ]. *Meta Gene*, 2014, ( 2 ): 706-721.
- [ 35 ] Phong DT, Hien VT, Thanh TT, et al. Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* ( Fabaceae ) genotypes in Vietnam [ J ]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10 ( 4 ): 2382-2393.
- [ 36 ] Zhang L, Lu S, Sun D, et al. Genetic variation and geographical differentiation revealed using ISSR markers in tung tree, *Vernicia fordii* [ J ]. *Journal of Genetics*, 2015, 94 : 5-9.
- [ 37 ] Givnish TJ, Bean GJ, Ames M, et al. Phylogeny, floral evolution, and inter-island dispersal in Hawaiian *Clermontia* ( Campanulaceae ) based on ISSR variation and plastid spacer sequences [ J ]. *PLoS One*, 2013, 8 ( 5 ): e62566.
- [ 38 ] 张颖娟, 王斯琴花. 不同苜蓿种质材料的 ISSR 分析及遗传多样性研究 [ J ]. *中国草地学报*, 2014, 36 ( 3 ): 35-39.
- [ 39 ] 李江伟, 杨琴军, 刘秀群, 等. 台湾杉遗传多样性的 ISSR 分析 [ J ]. *林业科学*, 2014, 50 ( 6 ): 61-66.
- [ 40 ] 詹羽姣, 盛萍, 姚蓝, 等. 新疆贝母属 8 种药用贝母遗传多样性 ISSR 分析 [ J ]. *中国野生植物资源*, 2015, 34 ( 4 ): 1-6.
- [ 41 ] 王果平, 樊丛照, 李晓瑾, 等. 基于 ISSR 的新疆贝母属植物遗传多样性研究 [ J ]. *中草药*, 2013, 44 ( 7 ): 887-890.
- [ 42 ] Liu C, Xue GP, Cheng B, et al. Genetic diversity analysis of *Capparis spinosa* L. populations by using ISSR markers [ J ]. *Genetics & Molecular Research*, 2015, 14 ( 4 ): 16476-16483.
- [ 43 ] 周文平, 张惠娟, 王亚飞, 等. 秦艽组 6 种植物的 ISSR 扩增结果分析 [ J ]. *中药材*, 2015 ( 7 ): 1375-1378.
- [ 44 ] 任凤鸣, 金江群, 熊雁翔, 等. 中药金钱草种质资源的 ISSR 遗传多样性研究 [ J ]. *中国药理学杂志*, 2015, 50 ( 15 ): 1277-1281.
- [ 45 ] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [ J ]. *中草药*, 2013, 44 ( 1 ): 96-100.
- [ 46 ] 阳翠, 刘萍, 刘姣蓉, 等. 苦豆子 ISSR 标记的遗传多样性分析 [ J ]. *中草药*, 2013, 44 ( 10 ): 1323-1327.
- [ 47 ] Safaei M, Sheidai M, Alijanpoor B, et al. Species delimitation and genetic diversity analysis in *Salvia* with the use of ISSR molecular markers [ J ]. *Acta Botanica Croatica*, 2016, 75 ( 1 ): 42-52.
- [ 48 ] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [ J ]. *中草药*, 2010, 41 ( 3 ): 491-496.
- [ 49 ] 周晔, 唐铖, 安适之, 等. ISSR 法鉴定中药玉竹与小玉竹 [ J ]. *中医药学报*, 2006, 34 ( 5 ): 7-9.
- [ 50 ] 周晔, 王润玲, 唐铖, 等. ISSR 法鉴定中药黄精与卷叶黄精 [ J ]. *天津医科大学学报*, 2006, 12 ( 2 ): 178-180.
- [ 51 ] 潘清平, 周日宝, 陈玉秀, 等. 玉竹不同品种的 ISSR 分子鉴定 [ J ]. *中国现代中药*, 2008, 10 ( 10 ): 28-30.
- [ 52 ] Pongsrila P, Chomnawang P, Srisamoot N, et al. DNA finger printing analysis of fourteen species of orchids using ISSR technique [ J ]. *KKU Res J*, 2014, 19 ( Suppl ) : 210-216.
- [ 53 ] 毕泉鑫, 金则新, 李钧敏, 等. 枫香自然种群遗传多样性的 ISSR 分析 [ J ]. *植物研究*, 2010 ( 1 ): 120-125.
- [ 54 ] 刘燕, 张道远, 杨红兰. 准噶尔无叶豆 5 个自然居群 ISSR 遗传变异的空间自相关分析 [ J ]. *生物多样性*, 2010, 18 ( 2 ): 129-136.
- [ 55 ] Pivorien O, Akinskien IP, Brazauskas G, et al. Inter-simple sequence repeat ( ISSR ) loci mapping in the genome of perennial

- ryegrass [J]. *Biologija*, 2008, 54 (1): 17-21.
- [56] 战晴晴, 隋春, 魏建和, 等. 利用 ISSR 和 SSR 分子标记构建北柴胡遗传图谱 [J]. *药学报*, 2010 (4): 517-523.
- [57] 王述彬, 吴小丽, 刘金兵, 等. 辣椒抗黄瓜花叶病毒 (CMV) 基因的 ISSR 标记 [J]. *分子植物育种*, 2009, 7 (3): 569-572.
- [58] 杨红兵, 崔光红, 詹亚华, 等. 湖北恩施产厚朴 ISSR 指纹图谱构建 [J]. *中药材*, 2009, 32 (1): 19-22.
- [59] Feng S, Zhao H, Lu J, et al. Preliminary genetic linkage maps of Chinese herb *Dendrobium nobile* and *D. moniliforme* [J]. *Journal of Genetics*, 2013, 92 (2): 205-212.
- [60] Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98 (6): 1125-1131.
- [61] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用 [J]. *生物学通报*, 2004, 39 (2): 19-21.
- [62] Yang CL, Wu XP, Chen BZ, et al. Comparative analysis of genetic polymorphisms among *Monascus* strains by ISSR and RAPD markers [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97 (2): 636-640.
- [63] Haritha G, Sudhakar T, Chandra D, et al. Informative ISSR Markers Help Identify Genetically Distinct Accessions of *Oryza rufipogon* for Use in Yield Improvement [J]. *Rice Science*, 2016, 23 (5): 225-241.
- [64] Le NT, Mien NT, Tien TV, et al. Genetic diversity of Tsai in North Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, 30 (3): 1-6.
- [65] Parveen S, Shahzad A. Application of molecular markers in medicinal climbers [M]. Berlin: Springer International Publishing, 2016: 415-425.
- [66] Purkayastha J. Bioprospecting of Indigenous bioresources of North-East India [M/OL]. Springer Nature, 2016, doi: 10.1007/978-981-10-0620-3.
- [67] 刘靖宇, 宋秀高, 叶夏, 等. 香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析 [J]. *食用菌学报*, 2011, 18 (3): 1-8.

(责任编辑 狄艳红)