24 份铁皮石斛种质资源的 ISSR 分析

鹿 炎[1#]，潘栎特[1#]，李会丽[1]，林晓霞[1]，周 苹[1]，郭新红[1*]，印丽萍[2*]

(1. 湖南大学生物学院植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室，湖南 长沙 410082；
2. 上海市出入境检验检疫局，上海 200135)

摘 要：本文采用 ISSR 分子标记方法分析了 24 份不同地区来源铁皮石斛种质资源的遗传多样性和亲缘关系。利用筛选出的 7 条 ISSR 引物对铁皮石斛基因组 DNA 进行 PCR 扩增，共获得 92 条 DNA 条带，其中多态性条带 84 条，多态性比率(PPB)为 91.3%。利用 POPGENE 32 软件计算得出平均观察等位基因(Na)为 1.913 0，平均有效等位基因数(Ne)为 1.528 3，平均 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.310 0，平均 Shannon's 信息指数(I)为 0.465 0。利用 NTSYS-pc 软件得出 24 份试验材料的遗传相似系数(GS)范围为 0.478 3～0.913 0，聚类分析结果表明 24 份人工栽培居群的铁皮石斛分为 3 类，暗示铁皮石斛种质具有较为丰富的遗传多样性。该研究为全面掌握铁皮石斛种质资源遗传背景，选育、引种和推广优良铁皮石斛品种奠定了可靠的理论基础。

关键词：铁皮石斛；ISSR；遗传多样性

中图分类号：S567；R282.5　　**文献标志码**：A　　**DOI**：10.3969/j.issn.1007-7146.2019.03.007

The ISSR Analysis of 24 *Dendrobium officinale* Germplasm Resources

LU Yan[1#], *PAN Lite*[1#], *LI Huili*[1], *LIN Xiaoxia*[1], *ZHOU Ping*[1], *GUO Xinhong*[1*], *YIN Liping*[2*]

(1. School of Biology, Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China; 2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: The genetic diversity and genetic relationship of 24 *Dendrobium candidum* germplasms with different yields were studied by ISSR molecular markers in this study. Seven ISSR primers were screened to amplify genomic DNA of *Dendrobium officinale* by PCR. A total of 92 DNA bands were obtained, of which 84 were polymorphic, and the polymorphic ratio (PPB) was 91.3%. By POPGENE 32 analysis, the average of observed number of alleles (Na) is 1.913 0, effective number of alleles (Ne) is 1.528 3, Nei's genetic diversity (H) is 0.310 0 and the Shannon's information index (I) is 0.465 0. The genetic similarity (GS) of twenty four varieties by NTSYS-pc software ranged from 0.478 3 to 0.913 0. Cluster analysis showed that 24 cultivated populations of *Dendrobium officinale* could be divided into three groups. The results showed that the genetic diversity of *Dendrobium officinale* germplasm resources was abundant. It provides a reliable theoretical basis for comprehensively understanding the genetic background, the selection, introduction and promotion of *Dendrobium officinale* in this research.

收稿日期：2019-01-22；**修回日期**：2019-04-17。

基金项目：国家重点研发计划项目(2017YFF0210303)；国家自然科学基金项目(31872866，31540064，31071076)；湖南省重点研发计划项目(2016WK2003，2017SK218)。

作者简介：#并列第一作者。鹿炎，硕士研究生；潘栎特，本科生。

*通讯作者：郭新红，教授，主要从事生物资源学研究。E-mail：gxh@hnu.edu.cn。印丽萍，研究员，主要从事植物检疫研究。E-mail：yinliping@hotmail.com。

Key words: *Dendrobium officinale*; ISSR; genetic diversity

石斛属(*Dendrobium*)是兰科中较大的属之一,也是我国古代文献中最早记载的兰科植物之一,全世界石斛属有 1 000 多种[1]。铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是兰科草本植物,主要分布于河北、安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部、四川西部、青海、云南东南部[1,2]。在中国古代典籍就有记载其茎入药,益胃生津,滋阴清热。铁皮石斛是一种名贵的中草药,含有多糖、生物碱类、酚类、游离氨基酸、芪类物质等生物活性物质[3-5],现代研究表明铁皮石斛具有增强人体免疫力[6]、抗肿瘤[7]、降血糖[8]、抗氧化[9]等药理作用。

DNA 分子标记技术广泛应用于植物的遗传多样性研究、品种鉴别、良种选育及资源分类等。它以个体间核苷酸序列变异为基础,通过查找个体间或种群间存在的差异性 DNA 片段,进而分析个体间或种群间的遗传多样性。其中 ISSR(inter-simple sequence repeat)属于微卫星标记类,是建立在 PCR 反应基础上的分子标记技术[10]。ISSR 标记结合了 SSR(simple sequence repeats)和 RAPD(random amplified polymorphic DNA)标记技术的优点,具有模板用量少,多态性丰富和试验成本低等优点,在植物研究中广泛应用[11]。本文在既往研究的基础之上,对取自全国的 24 份铁皮石斛进行种质资源遗传多样性的 ISSR 分析。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试验材料

试验材料是搜集于全国各地的 24 份铁皮石斛种质资源,种质编号及来源地如表 1 所示。

表 1　24 份铁皮石斛种质资源

Tab. 1　The 24 germplasms resources of *Dendrobium officinale*

Serial number	Germplasm number	Origin
1	ALH-1	Huoshan County, Lu'an City, Anhui Province
2	ALH-2	
3	ALH-3	
4	ALH-4	
5	ZYF-1	Furong Town, Yueqing City, Zhejiang Province
6	ZYF-2	
7	ZYH-1	Hongqiao Town, Yueqing City, Zhejiang Province
8	ZYH-2	
9	ZYH-3	
10	FZ-1	Zhangpu County, Zhangzhou City, Fujian Province
11	FZ-2	
12	ZYD-1	Dajing Town, Yueqing City, Zhejiang Province
13	ZYD-2	
14	JY-1	Yingtan City, Jiangxi Province
15	JY-2	
16	JY-3	
17	YK-1	Kunming City, Yunnan Province
18	YK-2	
19	YK-3	
20	YK-4	
21	HN-1	Xinning County, Hunan Province
22	HN-2	
23	HN-3	
24	HN-4	

1.1.2 主要试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;2 × Taq Master Mix 和 Maker 购于南京诺唯赞生物科技有限公司;ISSR 引物于北京擎科生物科技有限公司合成。

CTAB-free 缓冲液:1 mol/L Tris-HCl(pH = 8.0) 10 mL,0.5 mol/L EDTA-2Na 1 mL,5 mol/L NaCl 5 mL,加 dH_2O 至 100 mL。用高压蒸汽灭菌锅121 ℃灭菌 20 min,室温保存备用。CTAB-free 缓冲液在使用之前加入 2 g 的 PVP-40T。

1.2 试验方法

1.2.1 铁皮石斛基因组 DNA 的提取

首先利用 CTAB-free 缓冲液处理试验材料,然后按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤进行铁皮石斛基因组 DNA 的提取。采用琼脂糖凝胶电泳来检测所提取的全基因组 DNA,并用分光光度计检测其浓度。

1.2.2 PCR 引物筛选及扩增反应

选取来自 3 个不同地区的铁皮石斛,对 University of British Columbia 设计并公布的 100 条 ISSR 引物序列进行初步筛选,选出条带清晰、重复性好的引物,再用所有的铁皮石斛样品进行复筛。

PCR 扩增反应体系总共为 20 μL,分别为:PCR 2 × Taq Master Mix 10.0 μL,ddH_2O 8.0 μL,ISSR 引物 1 μL,DNA 模板 1 μL。

ISSR-PCR 反应程序:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 45 s,退火 1 min(不同引物的退火温度不同);72 ℃延伸 1.5 min,40 个循环;最后 72 ℃延伸5 min,4 ℃保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。试验重复 3 次。

1.2.3 数据统计及分析

对 PCR 产物电泳结果进行统计,同一条引物扩增产物中,电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。在相同的迁移位点有条带的记为“1”,没有条带的记为“0”。用 Excel 软件制作“0”、“1”矩阵,再将矩阵数据用 Popgene 32 和 NTSYS-pc 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量

琼脂糖凝胶电泳结果显示 DNA 条带清晰明亮且无拖尾现象,用分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 值在1.8~2.0 之间,表明所提取的铁皮石斛 DNA 样本较纯,符合试验要求。

2.2 PCR 扩增产物多态性分析

用初步筛选出的引物对 24 份不同产地的铁皮石斛进行复筛,最终筛选出了 7 条条带丰富、多态性好的引物(表 2)。7 条引物共扩增出 92 条清晰条带,其中 84 条条带具有多态性,多态性条带数比达到 91.3%,说明 24 份铁皮石斛之间的遗传多样性丰富。引物 840 扩增结果如图 1 所示。引物 835 和 881 扩增条带最多,达到 18 条。平均每条引物扩增出 13.1 条条带,12 条具有多态性。其中多态性条带数比最高的为 100%(引物 835),最低的只有 40%(引物 834)。

表 2 7 条 ISSR 引物对铁皮石斛基因组 DNA 进行 PCR 扩增的结果

Tab.2 PCR amplification results of genomic DNA in *Dendrobium officinale* by 7 ISSR primers

Primer	Base sequence	Annealing temperature (℃)	Total number of strips	Number of polymorphic bands	Polymorphic band ratio (%)
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	54	12	11	91.7
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	53	5	2	40
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	56	18	18	100
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52	15	14	93.3
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	54	12	11	91.7
881	GGGTGGGGTGGGGTG	61	18	17	94.4
888	BDBCACACACACACACA	49	12	11	91.7
Total			92	84	91.3
Average			13.1	12	91.3

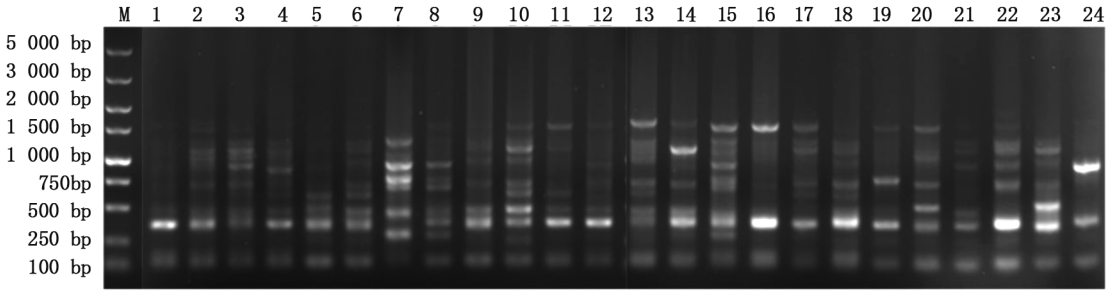


图 1　引物 840 对 24 份铁皮石斛基因组 DNA 进行 PCR 扩增的结果

Fig. 1　PCR amplification results of genomic DNA in *Dendrobium officinale* with 840 primer

2.3　铁皮石斛的遗传多样性分析

利用 NTSYS-pc 软件[12]来计算 24 份铁皮石斛材料的遗传相似系数,得到遗传相似性矩阵。遗传相似系数越大,表明亲缘关系越近;遗传相似系数越小,表明亲缘关系越远。24 份铁皮石斛的遗传相似性系数变化范围在 0.478 3 ~ 0.913 0 之间,变化范围相对较大。其中安徽六安的 ALH-2 和 ALH-3 的遗传相似系数最大(0.913 0),表明两者的亲缘关系最近,遗传差异最小。其次是浙江乐清芙蓉镇的 ZYF-1 和 ZYF-2(0.902 2)。浙江乐清虹桥镇 7 号和江西省鹰潭市 16 号的遗传相似系数最小(0.478 3),表明两者的亲缘关系最远,遗传差异较大。整体上看,24 份铁皮石斛之间具有较为丰富的遗传多样性。

采用 Popgene 32 软件[13-14]分析 PCR 产物的矩阵数据,得到其遗传参数。铁皮石斛在物种水平上的多态性条带比为 91.3%,在种群上的平均值为 36.41%。其中浙江乐清芙蓉镇的多态性条带比例最低,为 9.78%;云南昆明的铁皮石斛多态性条带比例最高,为56.52%。种群平均观测等位基因数(Na)为 1.913 0,最大值为 1.565 2,最小值 1.097 8;种平均有效等位基因数(Ne)为 1.528 3,最大值为1.410 6,最小值为 1.069 2;平均 Nei'S 基因多样性指数(H)为 0.310 0,最大值为 0.225 1,最小值为 0.040 5;平均 Shannona 信息指数(I)为 0.465 0,最大值为0.325 0,最小值为 0.059 2。结果表明 24 份铁皮石斛之间具有较为丰富的遗传多样性。

2.4　聚类分析

根据遗传相似系数矩阵,利用 NTSYS-pc 软件[15,16]进行聚类分析,获得图 2 所示的分子聚类图,从图中可知遗传相似系数在 0.478 3 ~ 0.913 0 之间。从分子聚类图可以看出,以遗传相似系数 0.64 为阈值,可将 24 份铁皮石斛分为三大类群:第Ⅲ类群的资源数量最少,只有两个彼此间遗传距离中等的材料,遗传相似系数为 0.771 7,与第Ⅰ、第Ⅱ类群之间遗传距离最远;第Ⅱ类群共 5 个材料,彼此间遗传距离较近,其中 ALH-2 和 ALH-3 遗传距离最近,遗

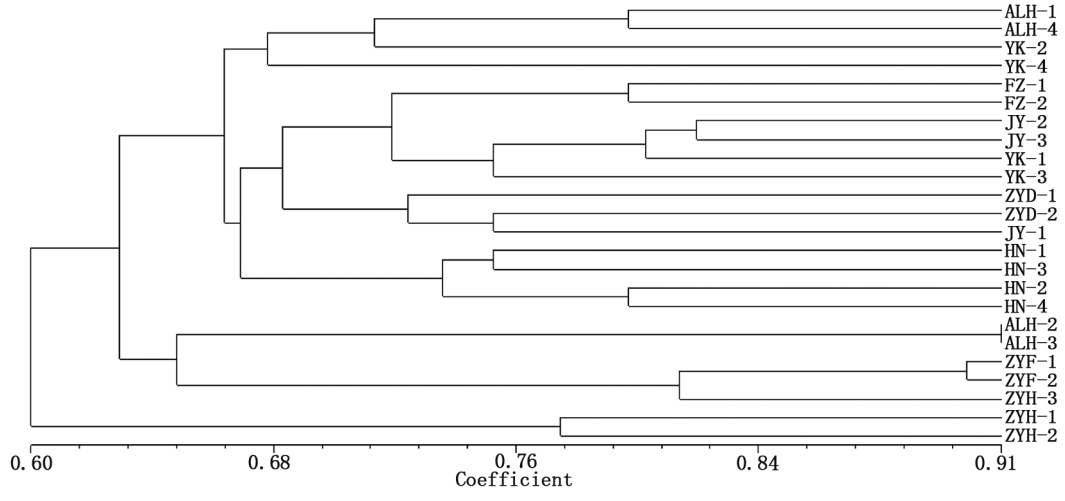


图 2　24 份铁皮石斛种质资源的分子聚类图

Fig. 2　Molecular clustering map of 24 *Dendrobium officinale* germplasm resources

传相似系数为 0.913 0;第Ⅰ类群资源数量最丰富,彼此间遗传距离为 0.070 1 ~ 0.197 0,遗传相似系数在 0.668 2 和 0.802 9 之间。

3 讨论

本试验运用 ISSR 分子标记技术对铁皮石斛种质资源进行分析,利用 7 条 ISSR 引物在铁皮石斛材料中共扩增出 92 条 DNA 条带,其中多态性条带 84 条,多态性比率(PPB)为 91.3%,利用 POPGENE 32 软件计算得出平均观察等位基因(Na)为 1.913 0,平均有效等位基因数(Ne)为 1.528 3,平均 Nei's 基因多样性指数(H)为 0.310 0,平均 Shannon's 信息指数(I)为 0.465 0,铁皮石斛在物种水平上的多态性条带比为 91.3%,在种群上的平均值为 36.41%,表明 24 份铁皮石斛在进化过程中发生了丰富的变异,同时也说明运用 ISSR 分子标记技术能很好地将它们区分开来。POPGENE 32 软件算出的遗传变异分析结果为:总居群基因多样度 ht 为 0.310 2,各居群基因多样度 hs 为 0.144 5,基因分化系数 Gst 为 0.534 2,表明铁皮石斛有 53.42% 的遗传变异来自居群间,46.58% 的遗传变异来自居群内,居群间的遗传分化高于居群内的遗传分化。江金兰等[17,18]利用 ISSR 分子标记技术对福建省泰宁县野生铁皮石斛进行亲缘关系分析,结果表明虽然泰宁野生铁皮石斛各样本源自同一地区,但种群具有丰富的遗传多样性,各样本间呈现较为复杂的遗传结构。泰宁野生铁皮石斛不同群落间虽存在一定的基因交流,但种群间仍有较大的基因差异。李永清等[19]研究发现铁皮石斛基因组中简单重复序列多态性高,遗传多样性丰富,同时表明 ISSR 技术可用于药用石斛多态性检测。

聚类分析的结果表明 24 份铁皮石斛遗传相似系数在 0.478 3 ~ 0.913 0 之间,以遗传相似系数 0.64为阈值,可将其分为三大类群。第Ⅰ类中又可分为两小类,其中一类包括安徽六安和云南昆明的铁皮石斛,另外一类包括福建漳州、浙江乐清大荆镇、江西鹰潭、云南昆明和湖南新宁的铁皮石斛。第Ⅰ类彼此间遗传距离中等(0.070 1 ~ 0.197 0),遗传相似系数在 0.668 2 和 0.802 9 之间。第Ⅱ类中也可分为两小类,其中一类为安徽六安铁皮石斛,另外一类为浙江乐清芙蓉镇和虹桥镇的铁皮石斛,彼此间遗传距离较近,其中 ALH-2 和 ALH-3 的遗传相似系数为 0.913 0,说明两者亲缘关系较近并且遗传差异较小。不同地区的铁皮石斛在分子聚类图中大致趋势和材料来源是一致的,但在个体间还是存在差异,这种差异说明了铁皮石斛种质资源的遗传多样性丰富,有利于物种适应环境。

关于石斛的药用价值,在 2005 版《中国药典》中,只有铁皮石斛、紫皮石斛和刚节石斛三种石斛类植物被主要收录,其中临床以铁皮石斛和紫皮石斛的药用价值最好,其中又以铁皮石斛为最高。许多石斛品种从外观上很难辨别,故采用传统方法鉴别药材较为困难[20]。本文利用 7 条 ISSR 引物在铁皮石斛材料中共扩增出 92 条 DNA 条带,其中多态性条带 84 条,多态性比率为 91.3%,建立了铁皮石斛 8 个居群的指纹图谱标记识别码,极大地提高了居群来源的识别效率。该研究为全面掌握铁皮石斛种质资源遗传背景,选育、引种和推广优良铁皮石斛品种奠定了可靠的理论基础。

参考文献(References):

[1] 吉占和, 心启, 毅波, 等. 中国植物志, 第 19 卷[M]. 北京:科学出版社, 1999: 67-257.
JI Zhanhe, XIN Qi, YI Bo, *et al*. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Volume 19[M]. Beijing:Science Press, 1999: 67-257.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴, 第五册[M]. 北京:科学出版社, 1980.
Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences. The picture index of senior China plant, volume 5[M]. Beijing:Science Press, 1980.

[3] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74-79.
LI Juan, LI Shunxiang, HUANG Dan, *et al*. Advances in the of resources, constituents and pharmacological effects of *Dendrobium officinale*[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(18): 74-79.

[4] 廖鲜艳, 许慧敏, 刘萍, 等. 铁皮石斛"岩上仙"基本营养成分分析[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(5): 61-67.
LIAO Xianyan, XU Huimin, LIU Ping, *et al*. Analysis of basic nutritional components of *Dendrobium officinale*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(5): 61-67.

[5] 马旖旎. 不同区域铁皮石斛成分差异分析与指纹图谱建立研究[D]. 杭州:浙江理工大学, 2017.
MA Yini. Establishment of fingerprints and compounds analysis of *Dendrobium officinale* regions[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2017.

[6] 杨明晶, 俞萍, 陆罗定, 等. 铁皮枫斗西洋参胶囊对小鼠免疫调节功能的影响[J]. 江苏预防医学, 2008, 19(4): 11-13.
YANG Mingjing, YU Ping, LU Luoding, *et al*. Effects of *Dendrobium candicum* capsules on immune responses in mouse[J]. Jiangsu Journal of Preventive Medicine, 2008, 19(4): 11-13.

[7] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(3): 188-189.
MA Guoxiang, XU Guojun, XU Luoshan, *et al*. Inhibitory effects of *Dendrobium chrysotoxutm* and its constiuents on the mouse HePA and ESC[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1994, 25(3): 188-189.

[8] 吴昊姝, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机

制的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(2): 160-130.
WU Haoshu, XU Jianhua, CHEN Lizuan, *et al*. Studies on anti-hyperglycemic effect and its mechanism of *Dendrobium candidum* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2004, 29(2): 160-130.

[9] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPP1a-1 的理化性质及抗肿瘤活性[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 578-583.
HE Tieguang, YANG Litao, LI Yangrui, *et al*. Physicochemical properties and antitumor activity of polysaccharide DCPP1a-1 from suspension-cultured protocorms of *Dendrobium candidum* [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(4): 578-583.

[10] 周宝珍. 分子标记技术在铁皮石斛中的应用分析[J]. 陕西农业科学, 2015, 61(11): 88-91.
ZHOU Baozhen. Application analysis of molecular marking technology in *Dendrobium officinale*[J]. Shanxi Journal of Agricultural Sciences, 2015, 61(11): 88-91.

[11] 任梦云, 陈彦君, 张盾, 等. ISSR 标记技术在药用植物资源中的研究进展及应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(04): 63-69.
REN Mengyun, CHEN Yanjun, ZHANG Dun, *et al*. Application and research progress of inter-simple sequence repeat (ISSR) marker in medicinal plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(04): 63-69.

[12] 郭艳, 洪建聪, 陈铌铍, 等. 白及遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2020-2024.
GUO Yan, HONG Jiancong, CHEN Nipi, *et al*. ISSR analysis on genetic diversity of *Bletillae rhizoma*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(9): 2020-2024.

[13] 杨培奎. 粤东地区橄榄种质资源遗传多样性 ISSR 分析及核心种质初步构建[D]. 汕头:汕头大学, 2010.
YANG Peikui. ISSR analysis and genetic construction of core germplasm of *Canarium album* germplasm resources in eastern Guangdong[D]. Swatow:Shantou University, 2010.

[14] 余青青, 王普昶, 赵丽丽, 等. 7 个燕麦品种的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 生物技术, 2018, 46(19): 34-37.
YU Qingqing, WANG Puchang, ZHAO Lili, *et al*. Genetic diversity analysis of ISSR in 7 *Avena sativa* varieties[J]. Biotechnology, 2018, 46(19): 34-37.

[15] 廖菊阳, 吴林世, 刘艳, 等. 28 种杜鹃亲缘关系 ISSR 分析[J]. 经济林研究, 2018, 36(2): 133-138.
LIAO Juyang, WU Linshi, LIU Yan, *et al*. The ISSR analysis of 28 native Rhodohendron[J]. Nonwood Forest Research, 2018, 36(2): 133-138.

[16] 包志远, 曲继鹏, 杨在君, 等. 七种风铃草属植物亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 广西植物, 2018, 38(6): 818-824.
BAO Zhiyuan, QU Jipeng, YANG Zaijun, *et al*. ISSR analysis on genetic relationships among seven species in Campanula[J]. Guihaia, 2018, 38(6): 818-824.

[17] 江金兰, 叶炜, 李永清, 等. 福建泰宁野生铁皮石斛 ISSR 亲缘关系分析[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(2): 208-213.
JIANG Jinlan, YE Wei, LI Yongqing, *et al*. Genetic relationships among wild *Dendrobium officinale* in Taining, Fujian by ISSR[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2016, 57(2): 208-213.

[18] 江金兰, 叶炜, 李永清, 等. 福建泰宁野生铁皮石斛种群的 ISSR 亲缘关系分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 259-266.
JIANG Jinlan, YE Wei, LI Yongqing, *et al*. Genetic relationships among wild *Dendrobium officinale* populations in Taining, Fujian by ISSR[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2016, 24(3): 259-266.

[19] 李永清, 叶炜, 江金兰, 等. 铁皮石斛种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1530-1534.
LI Yongqing, YE Wei, JIANG Jinlan, *et al*. Analysis of genetic diversity of germplasm resources of *Dendrobium officinale* by ISSR[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(4): 1530-1534.

[20] 沈洁. DNA 序列、ISSR 标记在药用植物种质鉴别中的应用[D]. 南京:南京师范大学, 2005.
SHEN Jie. The applications of DNA sequences and Inter-simple sequence repeats for authenticating herbs[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2015.