

七叶一枝花 ISSR-PCR 反应体系的建立

田风光, 何颖飞, 段承俐

(浙江农林大学 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: 利用单因素试验和正交设计试验相结合的方法, 优选七叶一枝花 *Paris polyphylla* 稳定的简单重复序列间扩增-聚合酶链式反应(ISSR-PCR)反应体系。最终建立了稳定性高, 重现性好, 检测多态性能力强的 ISSR-PCR 最佳反应体系, 即 25.0 μL 反应体系中各因素的浓度分别为: dNTPs 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶 $0.75\times16.67 \text{ nkat}$ (0.75 U), 引物 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 DNA 40 ng, 引物 ISSR2 最适退火温度为 52°C 。研究结果为后续的七叶一枝花种质资源鉴定和遗传多样性研究奠定了技术基础。图 8 表 2 参 22

关键词: 植物学; 七叶一枝花; ISSR-PCR; 反应体系

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2014)06-0983-07

An ISSR-PCR reaction system for *Paris polyphylla*

TIAN Fengguang, HE Yingfei, DUAN Chengli

(The Nurturing Station for the Key Laboratory of Subtopical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to select a stable inter-simple sequence repeat-polymerase chain reaction (ISSR-PCR) system for *Paris polyphylla*, a single factor experiment and an orthogonal design were combined and applied in this study. Concentrations for parameters were determined in a 25.0 μL system. Results revealed an optimized reaction system with concentrations of $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.75\times16.67 \text{ nkat}$ (0.75 U) *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primer, and 40 ng DNA template. The optimal annealing temperature was 52°C for primer ISSR2. This study of an ISSR-PCR reaction system with high stability, repeatability, and detective polymorphism ability has laid a technical foundation for germplasm resource identification and genetic diversity analyses of *P. polyphylla*. [Ch, 8 fig. 2 tab. 22 ref.]

Key words: botany; *Paris polyphylla*; ISSR-PCR; reaction system

七叶一枝花 *Paris polyphylla* 是百合科 Liliaceae 重楼属 *Paris* 多年生草本植物, 为中国特有的名贵药材重楼的基源植物之一, 以根茎入药, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效, 民间多用于治疗无名肿毒和毒蛇咬伤, 以及流行性腮腺炎、扁桃体炎、乳腺炎、咽喉肿痛、跌打伤痛、惊风抽搐等症^[1]。现代药理研究表明, 重楼还具有抗癌止血、祛痰抑菌、止咳平喘、镇静镇痛、抗早孕杀灭精子和抗细胞毒等功效, 是中国云南白药、宫血宁、百宝丹、热毒清、季德盛蛇药、抗病毒颗粒、总皂苷片等许多著名中成药的主要原料, 具有广阔的开发利用前景^[2-3]。据《浙江植物志》和《浙江省药用资源名录》记载, 七叶一枝花作为浙江的珍贵野生药材资源, 在浙江各地均有分布^[4-5]。但长期以来, 掠夺式的过度采挖以及生态环境的恶化, 严重危及七叶一枝花的自然生长与繁衍, 其野生种群的自我更新能力也受到极大破坏。目前浙江多处七叶一枝花资源已非常稀少, 难以寻见, 濒于灭绝的境地^[6-10]。因此, 七叶一枝花

收稿日期: 2014-01-19; 修回日期: 2014-03-24

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究项目(2012C22078)

作者简介: 田风光, 从事重楼的资源调查及评价研究。E-mail: 812464428@qq.com。通信作者: 段承俐, 副教授, 从事药用植物资源评价与利用研究。E-mail: chengliduan@hotmail.com

的研究工作逐步为人们重视，主要包括基于16S rDNA和28S rDNA基因间隔序列(ITS序列)亲缘关系、药理活性、化学成分分析、快繁及人工栽培技术等研究^[11-14]。ISSR(Inter-simple sequence repeat, 简单重复序列间扩增)是由Zietkiewicz等^[15]于1994年创建的一种基于聚合酶链式反应(PCR)的新型分子标记，它能快速高效灵敏地检测出基因组DNA的多态性，并具有良好的重复性，操作简便、成本低、DNA用量小、安全性较高等特点，而被广泛应用于品种鉴定、遗传关系及遗传多样性、基因标记、植物基因作图、指纹图谱的建立等多方面的研究^[16]。近年来，ISSR技术迅速在药用植物的种源鉴定、种质遗传多样性分析、亲缘关系分析、药用植物辅助育种等研究中得到应用，取得了较好的效果，也越来越受到研究者的重视^[17-18]。ISSR是基于PCR反应的一种分子标记，影响反应的因素较多，不同物种所需的各种技术参数也存在一定差异。为了在七叶一枝花研究中获得稳定可靠、重复性好的分析结果，本研究利用单因素试验初筛和正交设计实验筛选结合的方法，对影响PCR反应的dNTPs, *Taq*DNA聚合酶，引物，模板DNA和镁离子(Mg^{2+})浓度及引物退火温度等技术参数进行优化筛选，以建立适合七叶一枝花ISSR-PCR的最佳反应体系和反应条件，为后续的种源鉴定及遗传多样性评价奠定基础。

1 材料

试验材料为采于浙江省临安市东天目山海拔867 m野生七叶一枝花新鲜叶片，洗净，保存于-80 °C超低温冰箱中。试验所用ISSR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成，PCR反应试剂三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)和*Taq*DNA聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司，利用Eppendorf AG PCR仪进行反应扩增。

2 方法

2.1 基因组DNA提取与测定

采用改良的4×十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[19]提取七叶一枝花的总DNA，然后用10.0 g·kg⁻¹的琼脂糖凝胶电泳检测其质量，用ND-1000分光光度计对DNA的浓度进行测定。根据测定结果，用灭菌去离子水将DNA浓度稀释至100 mg·L⁻¹，并保存至-20 °C以备用。

2.2 ISSR-PCR反应体系的优化

采用上海生工合成的ISSR引物，通过筛选，选择引物ISSR2(5'-GACAGACAGACAGACA-3')用于七叶一枝花反应系统的优化。

2.2.1 单因素试验设计 采用单因素设计方法，参考北重楼 *Paris verticillata*，黑籽重楼 *Paris thibetica*等^[20-22] ISSR-PCR反应条件，对七叶一枝花ISSR反应体系中的*Taq*DNA聚合酶，模板DNA，dNTPs，引物， Mg^{2+} ，退火温度等6种主要因子设置不同浓度水平进行分析(25.0 μL反应体系中各成分优化设计方案见表1)。

表1 七叶一枝花ISSR-PCR反应的单因素优化设计

Table 1 Single factors design of ISSR-PCR for *Paria polyphylla*

<i>Taq</i> 酶/(×16.67 nkat)	DNA 模板/ng	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	引物/(μmol·L ⁻¹)	Mg^{2+} /(mmol·L ⁻¹)	退火温度/°C
0.25	10	0.05	0.2	1.0	46
0.50	20	0.10	0.3	1.5	48
0.75	30	0.15	0.4	2.0	50
1.00	40	0.20	0.5	2.5	52
1.25	50	0.25	0.6	3.0	54
1.50	60	0.30	0.7	3.5	56

2.2.2 正交设计试验优化 在单因素试验的基础上，采用正交设计方法，选择各因素之间的优化组合。

2.3 PCR扩增与扩增产物的检测

PCR扩增程序为：95 °C预变性5 min；94 °C变性40 s；52 °C退火45 s；72 °C延伸90 s；40次循环；72 °C延伸7 min；4 °C保存。PCR反应产物检测采用15 g·kg⁻¹的Tris-乙酸(TAE)琼脂糖凝胶，使用杭州

纽龙生物科技有限公司生产 DNA Marker II Plus, 用 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭(EB)染色, 以 $1 \times \text{Tris-乙酸(TAE)}$ 为电泳缓冲液在 150 V 电压下电泳 $20 \sim 25 \text{ min}$, 于 Alphalmager HP 凝胶成像系统进行拍照分析。

3 结果分析

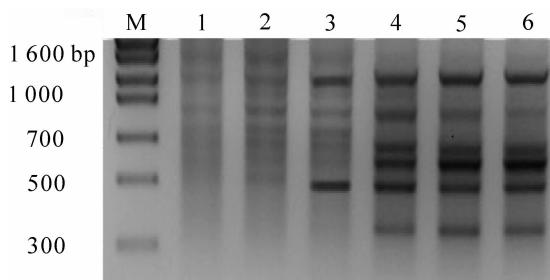
3.1 七叶一枝花总 DNA 的提取

用改良 CTAB 法所提的七叶一枝花 DNA 的吸光度 $D(260/280)$ 值为 $1.8 \sim 2.0$, 表明 DNA 纯度较好, 电泳检测发现条带完整, 无 RNA 污染, 说明该法适合七叶一枝花 DNA 的提取, 所提 DNA 质量较好, 适用于 ISSR-PCR 扩增。

3.2 七叶一枝花 ISSR-PCR 反应体系的单因素试验优化

3.2.1 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)浓度对 ISSR-PCR 的影响 dNTPs 是 PCR 反应的原料, 不同 dNTPs 浓度对七叶一枝花 PCR 扩增结果会产生影响(图 1)。由图 1 可看出: 当 dNTPs 浓度为 $0.05 \sim 0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增出的条带较为模糊, 这主要是因 dNTPs 浓度过低引发 PCR 产物合成率下降所致; 随着 dNTPs 浓度的增加, 扩增条带逐渐明亮清晰, dNTPs 浓度在 $0.20 \sim 0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最佳; 当 dNTPs 浓度增加到 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 条带趋于消失。过高不但造成浪费, 而且会降低 Mg^{2+} 的有效浓度和产生错误掺入从而会产生非特异性扩增。

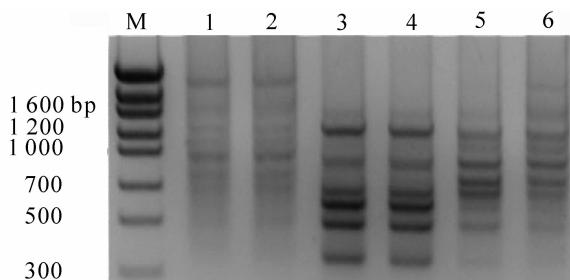
3.2.2 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 不同浓度的 *Taq*DNA 聚合酶对 PCR 扩增效果产生了明显影响(图 2), *Taq* 酶在 $0.25 \times 16.67 \text{ nkat}$ (0.25 U)和 $0.50 \times 16.67 \text{ nkat}$ (0.5 U)时虽有扩增, 但条带非常微弱, 难以辨识, 说明酶量过少影响了扩增效率; 当其浓度在 $0.75 \times 16.67 \text{ nkat}$ (0.75 U)和 $1.0 \times 16.67 \text{ nkat}$ (1.0 U)时扩增效果较好, 条带清晰可辨; 而当酶浓度在 $1.25 \times 16.67 \text{ nkat}$ (1.25 U)以上时, 条带亮度和清晰度下降, 且有错误扩增出现。



1~6 分别为 $0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs

图 1 不同 dNTPs 浓度 ISSR-PCR 反应扩增结果

Figure 1 Amplification result of different concentrations of dNTPs on ISSR-PCR



1~6 分别为 $0.25 \times 16.67, 0.50 \times 16.67, 0.75 \times 16.67, 1.00 \times 16.67, 1.25 \times 16.67, 1.50 \times 16.67 \text{ nkat}$ *Taq* 酶

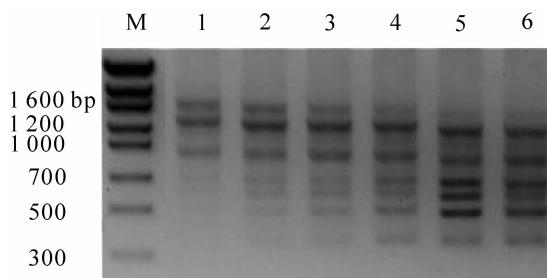
图 2 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度 ISSR-PCR 扩增结果

Figure 2 Result amplification of different concentrations of *Taq* DNA polymerase on ISSR-PCR

3.2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 不同引物浓度对七叶一枝花 PCR 扩增的结果如图 3 所示。由图 3 可以看出: 引物浓度对 ISSR-PCR 有很大影响, 引物浓度过低时仅能扩增出 3 条大片段的条带, 随着引物浓度的增加, 小于 1000 bp 的条带逐渐显现, 在浓度为 $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右时, 条带清晰可辨, 扩增效果最好。而浓度为 $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带重又变得模糊不清, 引物浓度过高还会增加引物之间形成二聚体的概率。

3.2.4 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 反应的影响 在 $25.0 \mu\text{L}$ 的 ISSR-PCR 反应体系中, 七叶一枝花模板 DNA 在 $10, 20, 30, 40, 50, 60 \text{ ng}$ 时的扩增结果见图 4。模板 DNA 在 $10 \sim 60 \text{ ng}$ 范围内均能扩增出数量相同但清晰度不同的条带, 说明模板用量对 PCR 扩增的条带数影响相对较小, 但用量过低或过高都会影响条带的清晰度, 模板用量过高, 还会出现条带拖尾现, 模板用量为 $40 \sim 60 \text{ ng}$ 较好。本研究用量在 40 ng 时扩增出的条带最为清晰可辨。

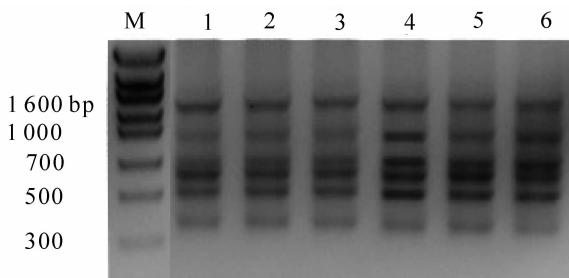
3.2.5 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 不同镁离子(Mg^{2+})浓度对七叶一枝花 PCR 扩增的结果如图 5



1~6分别为0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6,
0.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物

图3 不同引物浓度ISSR-PCR反应扩增结果

Figure 3 Amplification result of different concentrations of prime on ISSR-PCR



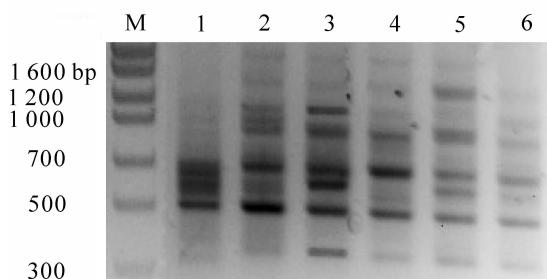
1~6分别为10, 20, 30, 40, 50, 60 ng模板DNA

图4 不同模板DNA浓度ISSR-PCR扩增结果

Figure 4 Amplification result of different concentrations of DNA template on ISSR-PCR

所示。 Mg^{2+} 浓度对PCR扩增效果影响很大，浓度过高可降低PCR扩增的特异性，出现非特异性扩增；浓度过低会降低Taq DNA聚合酶的活性，使PCR扩增产物量减少且条带亮度较弱。试验发现当 Mg^{2+} 浓度在2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时扩增效果最好。

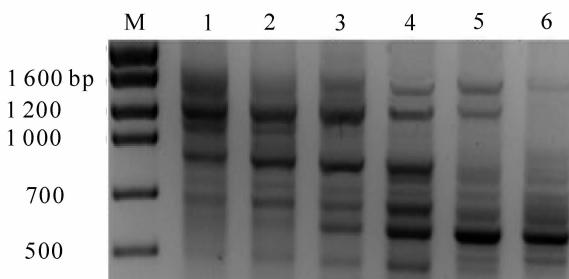
3.2.6 引物ISSR2最佳退火温度的选择 引物的一个重要参数是熔解温度(T_m)，手工计算 T_m 值方法为： $T_m=2\times(A+T)+4\times(G+C)\text{ }^\circ\text{C}$ ，退火温度一般设定比引物的 T_m 低5 $^\circ\text{C}$ 。本次试验设置了46, 48, 50, 52, 54, 56 $^\circ\text{C}$ 等6个不同温度梯度，对引物ISSR2的退火温度进行优化，其PCR电泳结果见图6。由图6可以看出：退火温度对七叶一枝花ISSR-PCR反应影响较大，当退火温度在46~48 $^\circ\text{C}$ 时，小片段扩增数量大大降低，并且扩增出的片段模糊不清，当退火温度在52~56 $^\circ\text{C}$ 时大片段扩增条带数大大降低，由此可以看出退火温度过低或过高都对PCR扩增不利，并会引起错配现象的发生。当退火温度在52 $^\circ\text{C}$ 时扩增出的条带较清晰，且多态性好。因此，通过直观的分析方法确定引物ISSR2的最适退火温度为52 $^\circ\text{C}$ 。



1~6分别为3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0,
0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁离子浓度

图5 不同 Mg^{2+} 浓度ISSR-PCR反应扩增结果

Figure 5 Amplification result of different concentrations of Mg^{2+} on ISSR-PCR



1~6分别为46, 48, 50, 52, 54, 56 $^\circ\text{C}$ 退火温度

图6 不同退火温度ISSR-PCR反应扩增结果

Figure 6 Amplification result of different annealing temperature on ISSR-PCR

3.3 七叶一枝花ISSR-PCR反应体系的正交优化

考虑到各因素之间的交互作用，在单因素试验的基础上筛选出Taq酶，dNTPs，引物和镁离子(Mg^{2+})4个因素较好的3个水平再进一步进行正交试验。表2显示的是采用正交设计的9个处理组合。

图7为七叶一枝花ISSR-PCR正交试验扩增结果。由图7可以看出，9个处理组合均能扩增出条带，但条带之间的效果存在一定差异。

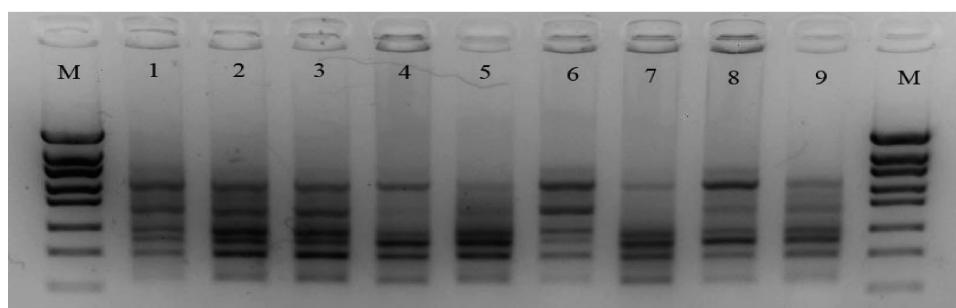
对9个组合进行3次重复试验，根据电泳条带数量、清晰度和背景深度3个指标，对正交试验的9个组合满分10分制进行打分，9个组合3次重复的分数依次为7.0, 8.0, 7.0; 8.0, 9.0, 8.0; 9.0, 9.0, 9.0; 7.0, 8.0, 8.0; 6.0, 7.0, 7.0; 8.0, 8.5, 8.0; 7.0, 7.0, 7.0; 8.0, 8.0, 8.0和7.0, 8.0, 8.0。将其进行极差分析见表2。极差R值分析可知，4个因素对反应体系影响从大到小的顺序依次为 Mg^{2+} ，dNTPs，Taq DNA聚合酶和引物；综合平均分值可以看出2号组合综合得分最高，条带

数较多且清晰明亮, 是较为理想的组合。从扩增的效果及成本投入综合考虑, 确定 2 号组合为最佳选择: 即 ISSR-PCR 25.0 μL 反应体系中, dNTPs 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq*DNA 聚合酶 0.75×16.67 nkat (0.75 U), 引物 0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 40 ng。

表 2 七叶一枝花 ISSR-PCR 反应体系优化正交设计表

Table 2 Optimized orthogonal design of ISSR-PCR reaction system for *Paria polyphylla*

序号	<i>Taq</i> 酶/(×16.67 nkat)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	引物/(μmol·L ⁻¹)	$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	平均分
1	0.75	0.15	0.5	1.5	7.33
2	0.75	0.20	0.6	2.0	9.00
3	0.75	0.25	0.7	2.5	8.33
4	1.00	0.15	0.6	2.5	7.66
5	1.00	0.20	0.7	1.5	6.67
6	1.00	0.25	0.5	2.0	8.17
7	1.25	0.15	0.7	2.0	7.00
8	1.25	0.20	0.5	2.5	8.00
9	1.25	0.25	0.6	1.5	7.33
均值 1	8.220	7.330	7.833	7.110	
均值 2	7.500	7.667	7.773	7.833	
均值 3	7.443	8.167	7.557	8.220	
极差	0.777	0.837	0.276	1.110	



1~9 分别为表 2 中的 9 个组合。引物为 ISSR2

图 7 正交设计试验 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

Figure 7 Amplification result of orthogonal design of ISSR-PCR reaction system for *P. polyphylla*

利用以上获得的 ISSR-PCR 最佳反应体系进行可靠性检测, 对七叶一枝花野外采集的 4 个居群的 21 个样品进行 PCR 扩增, 结果见图 8。ISSR2 引物在 21 个样品中均能扩增出清晰可辨、稳定可靠、多态性高的条带, 证明该体系适合七叶一枝花样品的 ISSR-PCR 扩增。

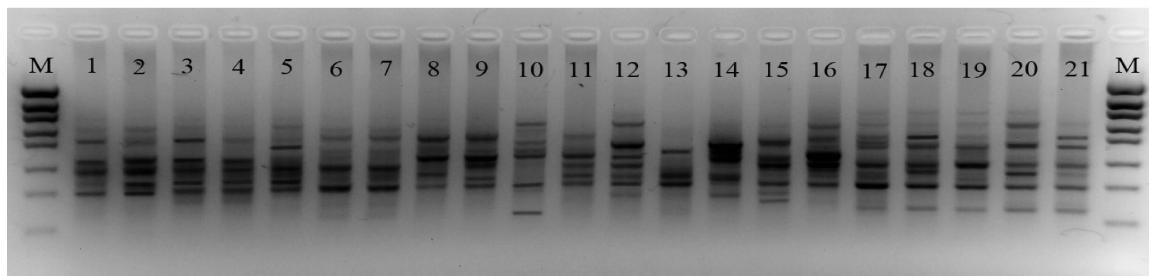


图 8 引物 ISSR2 对七叶一枝花 21 个样品的 ISSR-PCR 扩增结果

Figure 8 ISSR-PCR amplification result of 21 *P. polyphylla* samples by prime ISSR2

4 讨论

ISSR 分子标记技术是基于稳定而可靠的 PCR 反应体系的一种技术, ISSR-PCR 反应易受 *Taq*DNA 聚

合酶，模板DNA，dNTPs，引物，镁离子(Mg^{2+})浓度及退火温度等多种因素的影响。七叶一枝花是重楼属植物，虽然同属其他植物也进行过ISSR分析研究，但所建立的反应体系却各不相同^[20-22]，说明物种不同，最适的反应条件也存在差异，有必要针对特定物种建立最适的ISSR-PCR反应体系。

本研究在单因素多水平筛选的基础上，进行正交设计试验，既考虑了各因素的最佳条件，又兼顾了因素之间的交互作用，从而筛选出重复性好、多态性高的七叶一枝花最佳ISSR-PCR反应体系，即25.0 μL 体系中dNTPs 0.2 mmol·L⁻¹，TaqDNA聚合酶0.75×16.67 nkat(0.75 U)，引物0.6 $\mu mol\cdot L^{-1}$ ， Mg^{2+} 2.0 mmol·L⁻¹，模板DNA 40 ng，引物ISSR2最适退火温度为52℃。该体系的建立为后续的七叶一枝花种质资源鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 胡光万, 雷立公. 出自深山的良药——重楼[J]. 植物杂志, 2002(3): 16.
HU Guangwan, LEI Ligong. *Paris*: a good meclicine from remote mountains [J]. *Plants*, 2002(3): 16.
- [3] 张树潘. 重楼属植物的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2007, 19(6): 4-7.
ZHANG Shupan. Research progress on chemical constituents and pharmacological effect of genus *Paris* [J]. *Strait Pharm J*, 2007, 19(6): 4-7.
- [4] 周志修, 陈亮, 楼炉煥, 等. 浙江龙王山自然保护区药用植物资源[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(4): 378-383.
ZHOU Zhixiu, CHEN Liang, LOU Luhuang, et al. Medicinal plants from Mount Longwang Nature Reserve in Zhejiang [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2000, 17(4): 378-383.
- [5] 张若蕙, 周世良, 徐耀良, 等. 桃花岛及朱家尖岛森林植物的初步调查[J]. 浙江林学院学报, 1988, 5(2): 145-166.
ZHANG Ruohui, ZHOU Shiliang, XU Yaoliang, et al. A preliminary survey of forest plants on Taohua isle and Zhujiajian isle [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1988, 5(2): 145-146.
- [6] 韦福民, 张方钢, 陈子林. 大盘山自然保护区珍稀濒危植物现状及其保护策略[J]. 浙江林业科技, 2007, 27(3): 69-74.
WEI Fuming, ZHANG Fanggang, CHEN Zilin. Current situation and protection measures of rare and endangered plants in Dapanshan Nature Reserve [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2007, 27(3): 69-74.
- [7] 王健敏, 张文妹, 陆中华. 浙江中药材产业优势、主要问题及发展对策[J]. 浙江农业科学, 2005(6): 423-427, 433.
WANG Jianmin, ZHANG Wenmei, LU Zhonghua. Advantage in the industry of Chinese herbal medicine material, key problem and the development countermeasure in Zhejiang [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2005(6): 423-427, 433.
- [8] 陈珍, 鲍四伟, 蒋明, 等. 浙江省天台山野生药用植物区系分析[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(3): 36-40.
CHEN Zhen, BAO Siwei, JIANG Ming, et al. Floristic analysis of wild medicinal plant resources of Mount Tiantai in Zhejiang Province [J]. *J Southwest For Univ*, 2011, 31(3): 36-40.
- [9] 金明龙, 冯利平. 浙江新昌县药用植物资源研究[J]. 广西植物, 2005, 25(6): 544-548.
JIN Minglong, FENG Liping. Resources of medicinal plants in Xinchang County, Zhejiang Province [J]. *Guishaia*, 2005, 25(6): 544-548.
- [10] 王国明, 徐树华, 叶志军, 等. 舟山群岛珍稀濒危植物的分布与保护[J]. 浙江林学院学报, 1998, 15(2): 181-186.
WANG Guoming, XU Shuhua, YE Zhijun, et al. Distribution and protection of rare plants in Zhoushan Islands [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1998, 15(2): 181-186.
- [11] 蒋向辉, 余朝文, 许栋, 等. 七叶一枝花基于ITS序列的DNA条形码构建研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 21(12): 3295-3296.
JIANG Xianghui, SHE Chaowen, XU Dong, et al. Construction of DNA barcodes of *Polyphylla* based on ITS sequences [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2011, 21(12): 3295-3296.

- [12] 王强, 徐国钧, 蒋莹. 重楼类中药镇痛和镇静作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, **15**(2): 45 – 48.
WANG Qiang, XU Guojun, JIANG Ying. Analgesic and sedative effects of the Chinese drug rhizoma *Paridis* [J]. *China J Chin Mat Med*, 1990, **15**(2): 45 – 48.
- [13] 袁晓, 袁萍, 严海燕, 等. 野生珍稀药用植物七叶一枝花的成分含量分析[J]. 武汉植物学研究, 2004, **22**(6): 575 – 577.
YUAN Xiao, YUAN Ping, YAN Haiyan, et al. Analysis on the constituents of wild rare Chinese medicinal plant *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara [J]. *Wuhan Bot Res*, 2004, **22**(6): 575 – 577.
- [14] 宋发军, 黄宗华. 七叶一枝花组织培养和种子萌发条件的研究[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2013, **32**(2): 51 – 54.
SONG Fajun, HUANG Zonghua. Study on tissue culturing and seed germination conditions of *Paris polyphylla* [J]. *J South-Centr Univ Nat Sci Ed*, 2013, **32**(2): 51 – 54.
- [15] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger printing by simple sequence repeats (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176 – 183.
- [16] 朴红梅, 李万良, 穆楠, 等. ISSR 标记的研究与应用[J]. 吉林农业科学, 2007, **32**(5): 28 – 30.
PIAO Hongmei, LI Wanliang, MU Nan, et al. Research and application of ISSR markers [J]. *J Jilin Agric Sci*, 2007, **32**(5): 28 – 30.
- [17] 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]. 中国民族民间医药杂志, 2010(1): 41 – 42.
LI Ting, LIN Wenjin, XU Rongqing, et al. Application of ISSR method in medicinal plant germplasm [J]. *Chin J Ethnomed & Ethnopharm*, 2010(1): 41 – 42.
- [18] 周洁, 王忠华. DNA 分子标记技术在药用植物上的应用[J]. 科技创新导报, 2011(4): 41 – 43.
ZHOU Jie, WANG Zhonghua. Application of DNA molecular marker in medicinal plants [J]. *Sci Technol Innov Her*, 2011(4): 41 – 43.
- [19] DOYLE J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[C]// HEWITT G M, JOHNSTON A. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 283 – 293.
- [20] 张龙进, 白成科. 正交设计优化北重楼 ISSR-PCR 体系[J]. 植物研究, 2011, **31**(1): 105 – 108.
ZHANG Longjin, BAI Chengke. Optimization of ISSR-PCR System for *Paris verticillata* [J]. *Bull Bot Res*, 2011, **31**(1): 105 – 108.
- [21] 陈照, 叶睿超, 张瑞, 等. 黑籽重楼种内形态标记和 ISSR 标记的遗传分化研究[J]. 时珍国医国药, 2009, **20**(10): 2647 – 2649.
CHEN Zhao, YE Ruichao, ZHANG Rui, et al. Analysis of genetic differentiation based on ISSR and morphological markers in *Paris thibetica* [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2009, **20**(10): 2647 – 2649.
- [22] 何俊, 杨柏云, 陈少风, 等. 多叶重楼遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 云南植物研究, 2007, **29**(4): 388 – 392.
HE Jun, YANG Boyun, CHEN Shaofeng, et al. Assessment of genetic diversity of *Paris polyphylla* (Trilliaceae) by ISSR markers [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2007, **29**(4): 388 – 392.