

山东省苍耳资源的种子性状及 ISSR 多样性分析

赵伟华^{1,2}, 聂元冬¹, 韩粉霞¹, 顿宝庆¹, 王 智¹, 李桂英¹

(¹ 中国农业科学院作物科学研究所/生物质能源研究中心/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081;

² 上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心, 上海 200240)

摘要: 为了解山东省苍耳资源的遗传多样性, 本研究从山东不同生态地区收集 29 份苍耳资源, 对其种子性状、含油量以及 ISSR 分子标记多态性进行了分析。结果表明, 山东省不同生态地区苍耳种仁率平均为 32.20%, 变异系数为 26.66%, 多样性指数为 1.94; 含油量平均为 30.03%, 变异系数为 20.85%, 多样性指数为 1.94; 平均百粒重为 9.95 g, 变异系数为 33.46%, 多样性指数为 1.96。21 个 ISSR 引物扩增, 检测出多态性位点共 134 个, 平均每个引物 6.38 个位点, 多态性位点比例达到 98.53%。不同地理生态群组的遗传多样性不同, 鲁中山前区处在山东半岛区与内陆区交界处, 基因交流频繁, 遗传多样性最高; 滨湖区地区受泰山系及南四湖的阻隔, 限制了基因的交流, 遗传多样性最低。将山东的 29 份与河北和山西的各 1 份共 31 份苍耳资源进行聚类分析, 结果表明, 山东省的苍耳资源与邻近省份有一定的基因交流, 但存在自身的进化特点, 已成为明显区别于其他地区的苍耳资源系统。

关键词: 苍耳; 种质资源; ISSR; 遗传多样性; 遗传改良

Diversity Analysis by Seed Traits and ISSR Marker of *Xanthium sibiricum* Patr. Germplasm in Shandong Province

ZHAO Wei-hua^{1,2}, NIE Yuan-dong¹, HAN Fen-xia¹, DUN Bao-qing¹, WANG Zhi¹, LI Gui-ying¹

(¹ National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Biomass Energy Research Center/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: Twenty-nine *Xanthium sibiricum* Patr. germplasm resources from different ecological regions in Shandong province were analyzed for the genetic diversity of seed traits and ISSR molecular markers in order to provide a basis for germplasm research and genetic improvement. The results showed that the average kernel rate was 32.20%, and coefficient of variation was 26.66%, diversity index was 1.94. The average oil content was 30.03%, and coefficient of variation was 20.85%, diversity index was 1.94. The average hundred grain weight was 9.95g and coefficient of variation was 33.46%, diversity index is 1.96. 134 polymorphic loci were detected through 21 ISSR primers amplification with 6.38 loci per primer and the ratio of polymorphic loci was 98.53%. Different geographic and ecological group of *Xanthium* showed different genetic diversity. The highest genetic diversity was found in Luzhong mountain area, located in the junction of Jiaodong peninsula and inland, where gene exchanges took place easily. The lowest gene diversity was found in Lakeside lowland area, where it was blocked by Tai-Yi Mountain and Nansi Lake, the exchange of gene was limited. 29 *Xanthium sibiricum* resources in Shandong province plus one each from Hebei province and Shanxi province, clustering analysis, the results showed that the Siberian cocklebur resources in Shandong province and neighboring provinces had certain genetic exchange, but had own characteristic, and evolved relatively independent genetic resources system.

Key words: *Xanthium sibiricum*; germplasm resources; ISSR; genetic diversity; genetic improvement

收稿日期: 2013-09-04 修回日期: 2013-10-14 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140408.0843.011.html>

基金项目: 国家科技基础性工作专项 (2008FY110400)

第一作者研究方向为能源植物。E-mail: whzhao2013@163.com

通信作者: 李桂英, 主要从事能源作物研究。E-mail: liguiying@caas.cn

苍耳(*Xanthium sibiricum* Patrin), 又称苍耳子、野茄子、粘头婆、猪耳, 菊科一年生草本, 株高 20 ~ 90 cm, 雌雄同株, 花期 7 ~ 8 月, 果期 9 ~ 10 月。原产于美洲和东亚, 现分布于欧洲、美洲的中北部、亚洲及非洲的北部, 常生于山坡、草地、路旁, 广泛分布于我国大部分地区^[1]。苍耳具有极强的适应能力和耐胁迫性, 在荒山、荒野、旱地、盐碱地及其他不适合种植作物的地方都可以生长^[2]。种子含油量 10% ~ 20%, 种仁含油量达 44%, 产量达 2250 kg/hm², 资源量丰富, 是一种有发展潜力的非粮生物柴油能源植物^[3]。苍耳油的组成与大豆类似, 亚油酸含量比大豆油高出 10% 左右, 苍耳子酸值为 4.45 mg KOH/g, 碘值比玉米胚芽油高 9 个单位, 是一种十分理想的食用油, 在黑龙江、吉林、辽宁等省均有生产, 目前主要用于代替大豆油生产油漆^[2,4-5], 也可用于制作油墨、肥皂和高级香料^[6]。苍耳还有多种药用价值, 苍耳的果实苍耳子具有祛风湿、通鼻窍及降血糖等功效^[7-10]。研究发现将苍耳子作为饲料添加剂饲喂生猪, 不仅生长速度快、抗病能力强, 而且肉质好^[11], 作为饲料, 具有广阔的开发前景。

种质资源的遗传多样性是农作物改良和评价的

基础, 也是维持农业生态系统稳定, 持续优质高产的保证^[12-13]。分子标记技术已广泛用于种质资源的遗传多样性研究, 为种质资源核心种质构建以及育种中的亲本选配提供了重要参考依据^[14-15]。ISSR 分子标记技术通常为显性标记, 呈孟德尔式遗传, 具有很好的稳定性和较高的多态性^[16-18], 而且被认为克服了 RFLP 和 RAPD 的许多局限性, 是进行植物种质资源遗传多样性和亲缘关系研究的有力工具^[19-25]。本研究收集了山东省各生境条件下的苍耳种质资源, 并利用 ISSR 分子标记技术进行遗传多样性分析, 以期对苍耳的遗传改良利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

共计 31 份苍耳材料, 其中山东省 29 份, 山西垣曲和河北昌黎各 1 份。29 份山东省苍耳于 2009 年 11 月份果实成熟时, 分别从不同地域选取一个苍耳群落采集种子。此外, 根据山东省植物分布在纬度上变化不明显、经度上变化较大以及山东省植被小区的划分^[26], 将所采集的苍耳资源分为 8 个组群, 如表 1 所示。

表 1 苍耳材料的分组情况表

Table 1 The situation of *Xanthium* materials group

组别 Groups	来源 Sources	代表植被区 Represented vegetation regions
第 1 组群 Group 1	莱州(22)、龙口(16)、牟平(14)	胶东半岛北区 North zone of Jiaodong peninsula
第 2 组群 Group 2	莱西(24)、即墨(2)、胶州(29)	胶东半岛南区 South zone of Jiaodong peninsula
第 3 组群 Group 3	五莲(10)、莒县(5)、沂南(27)、沂水(19)	鲁南山地区 Lunan mountain area
第 4 组群 Group 4	昌邑(15)、安丘(1)、潍坊(7)、诸城(25)	鲁中山前区 Luzhong piedmont zone
第 5 组群 Group 5	禹城(11)、惠民(26)、利津(28)	鲁北黄泛区 Lubei yellow river flood area
第 6 组群 Group 6	平邑(20)、新泰(9)、泰安(13)、淄博(18)	鲁中山地区 Luzhong mountain area
第 7 组群 Group 7	滕州(23)、微山(12)、枣庄(3)、兖州(21)	滨湖洼地区 Lakeside lowland area
第 8 组群 Group 8	聊城(4)、菏泽(17)、济南(6)、平阴(8)	鲁西平原区 Luxi plain

括号内数字为材料编号 The figures in bracket are material code

1.2 试验方法

1.2.1 苍耳种仁率和含油量测定 种仁率测定: 随机挑选一个组群的苍耳种子 100 粒, 称重可得百粒重 m; 用剪刀小心剪开种皮, 取其种仁, 记录空粒数 n, 则空壳率为 n%; 同时, 称取所得种仁的质量 m₁, 则种仁率为 m₁/m。苍耳含油量测定, 采用索氏抽提法, 参照 GB/T 5512 - 2008^[27], 3 次重复。

1.2.2 苍耳 DNA 提取 称取约 100 mg 的苍耳幼嫩叶片组织, 加入液氮充分研磨, 参照植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)

的操作步骤提取苍耳 DNA, 提取完成后用琼脂糖凝胶电泳检测提取情况。

1.2.3 ISSR-PCR 反应条件及程序 ISSR 引物: 用加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 100 个引物分别对苍耳全基因组 DNA 进行扩增, 筛选出多态性好、扩增条带清晰的引物共 21 个(表 2)。

经过 ISSR-PCR 反应体系和参数的优化试验, 确定反应体系如下: 总体系 25 μL, 其中 10 × Taq buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mM) 2.5 μL, dNTP (2.5 mM) 0.5 μL, Primer 1 μL, Taq 酶(2.5 U/μL)

表 2 入选的 21 个 ISSR-PCR 引物

Table 2 21 primers for ISSR-PCR analysis

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	864	ATGATGATGATGATGATG
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	873	GACAGACAGACAGACA
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	880	GGAGAGGAGAGGAGA
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	895	AGACTTGCTAGCTCTTGATC
815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	899	CATGCTGTTGGTCATTGTTCCA
822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	857	ACACACACACACACACYG	900	ACTTCCCACAGGTTAACACA

R = (A,G), Y = (C,T)

0.48 μ L, DNA 模板 3.0 μ L, ddH₂O 15.02 μ L。所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 等购于北京泽星生物科技有限公司。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,40 个循环;每个循环包括:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,53 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s;结束循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增完成后在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 (100 V,50 mA),EB(溴化乙锭)染色 20 min,紫外分析仪上检测扩增产物并照相。

1.2.4 数据的统计与分析 通过 Excel 计算种子空壳率、种仁率及含油量各性状的最大值、最小值、平均数、变异幅度、标准差、变异系数,根据平均数 (\bar{X})、标准差 (σ) 将苍耳材料分为 10 级,从 $\bar{X}-2\sigma$ 到 $\bar{X}+2\sigma$,每 $1/2\sigma$ 为一级,其中第 1 级为 $X_i < \bar{X}-2\sigma$,第 10 级 $X_i \geq \bar{X}+2\sigma$,利用 Shannon-weaver 遗传多样性指数^[28] 衡量苍耳种群遗传性大小,公式为: $H = -\sum p_i \ln p_i$, p_i 为某一性状的第 i 级内材料占总材料数的百分率,Ln 为自然对数^[28]。

ISSR-PCR 电泳条带的读取,按照有带读为 1,无带读为 0,缺失记为 9;利用 Popgene 1.32 软件,对山东省的 29 份苍耳材料进行分析。

表 3 山东省 29 份苍耳的 4 个种子性状的主要参数

Table 3 Main parameters of 4 seed characters in 29 Xanthium in Shandong province

性状 Characters	最小值 Min.	最大值 Max.	平均数 Mean	变异幅度 Range	标准差 SD	变异系数 (%) CV	多样性指数 H
空壳率 (%)	0	9.00	1.38	9.00	1.90	137.15	1.51
种仁率 (%)	14.29	43.44	32.20	29.15	8.58	26.66	1.94
百粒重 (g)	4.52	17.00	9.95	12.48	3.33	33.46	1.96
含油量 (%)	19.94	42.31	30.03	22.37	6.26	20.85	1.94

2 结果与分析

2.1 种子性状的遗传多样性分析

空壳率、种仁率、百粒重和含油量是苍耳种子最重要的性状。这些种子性状的主要参数和遗传多样性指数 (H) 列入表 3。可见,山东省不同生态区苍耳的空壳率、种仁率、含油量、百粒重存在较大变异,空壳率最小的为 0,最大的达到 9.00%,平均 1.38%,变异系数 137.15%,多样性指数为 1.51;种仁率枣庄滕州材料最小为 14.29%,临沂平邑材料最大为 43.44%,平均 32.20%,变异系数为 26.66%,多样性指数 1.94;含油量临沂沂南材料最低为 19.94%,烟台龙口材料最高为 42.31%,平均 30.03%,变异系数 20.85%,多样性指数 1.94。百粒重沂南材料最小为 4.52 g,泰安材料最大为 17.00 g,平均 9.95 g,变异系数为 33.46%,多样性指数为 1.96。上述结果说明山东省苍耳资源种子性状的遗传多样性较高。

相关性分析(表 4)表明,苍耳的种仁率与含油量之间呈极显著正相关,相关系数达到 0.8087,表明种子越饱满含油量越高,可以将种仁率作为苍耳育种的一个指标。

表 4 苍耳种子性状相关性分析

Table 4 The correlation analysis on *Xanthium* seed traits

性状 Characters	空壳率 (%) Rate of empty seed	种仁率 (%) Kernel percentage	含油量 (%) Oil content	百粒重(g) Weight of 100 seeds
空壳率(%)	—	-0.373	-0.163	-0.0412
种仁率(%)		—	0.8087**	0.217
含油量(%)			—	0.214

** :极显著相关 ** :Highly significant correlation

2.2 苍耳遗传多样性的 ISSR 分析

利用 21 个引物扩增(图 1),检测出多态性位点共 134 个,平均每个引物 6.38 个位点,多态性位点比例达到 98.53%。各组群多态性差异很大(表 5),第 4 组群(鲁中山前区)多态性最高,共有多态性位点 113 个,多态性比率达到 83.09%;第 7 组群

(滨湖区地区)多态性最低,多态性位点 52 个,多态性比例只有 38.24%。8 个组群按多态性比例由大到小排序得出:第 4 组群 > 第 8 组群 = 第 5 组群 > 第 6 组群 = 第 3 组群 > 第 1 组群 > 第 2 组群 > 第 7 组群;观察等位基因数(*Na*)的分析结果与多态性比率一致;而根据 Shannon 多样性指数,最高的依然为第 4 组群,达到 0.4684,按照 Shannon 多样性指数、Nei's 基因多样性(*H*)、有效等位基因数(*Ne*)进行大小排列,评价结果基本一致:第 4 组群 > 第 5 组群 > 第 8 组群 > 第 1 组群 > 第 3 组群 > 第 6 组群 > 第 2 组群 > 第 7 组群;由以上分析可以得出:第 4 组群的遗传多样性是最高的,可能与第 4 组群处在山东半岛与内陆区交界处,基因交流频繁有关;而第 7 组群与受泰山系及南四湖的阻隔,限制了基因的交流有关。各组群的遗传多样性存在差异,揭示了山东省的野生苍耳存在较高的遗传多样性。

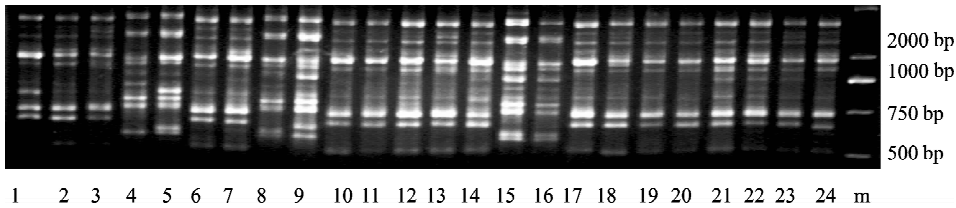


图 1 引物 807 对 1~24 号材料的扩增结果

Fig. 1 Profile of amplification on samples 1-24 using primer 807

表 5 山东省苍耳各组群的遗传变异参数

Table 5 The genetic variation parameters between populations of *Xanthium* in Shandong province

组别 Group	观察等位 基因数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	Nei's 基因 多样性 <i>H</i>	Shannon 多样性 指数 <i>I</i>	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点比率(%) Percentage of polymorphic loci
1	1.6691	1.4679	0.2656	0.3896	91	66.91
2	1.4118	1.3075	0.1705	0.2474	56	41.18
3	1.7059	1.4554	0.2609	0.3876	96	70.59
4	1.8309	1.5439	0.3164	0.4684	113	83.09
5	1.7721	1.5312	0.3034	0.4462	105	77.21
6	1.7059	1.4157	0.2450	0.3698	96	70.59
7	1.3824	1.2941	0.1593	0.2299	52	38.24
8	1.7721	1.5111	0.2984	0.4407	105	77.21
各组群间 Among the groups	0.3426	0.2524	0.2632	1.4000	134	98.53

2.3 山东省苍耳组群的 ISSR 聚类分析

以组群为单位,通过 Popgene 1.32 软件对山东省苍耳的 8 个组群进行 UPGMA 聚类分析(表 6、图 2),遗传相似度最高的为第 3 组群与第 6 组

群,相似度达到 0.9291,从地理上看,第 3 组群与第 6 组群所分布地域为山东的鲁中南植被区。第 2 组群与第 5 组群遗传相似度最低,为 0.7234,可能是因为第 2 组群处在山东半岛的南

部,而第 5 组群处于山东的西北且属于黄河三角洲盐碱地区域,两群组交流较少的原因。通过聚类分析可以分为 5 类:第 I 类第 1 组群与第 4 组群遗传距离相近,优先聚在一起,然后与第 8 组群聚为一类,主要为山东省的平原区;第 II 类第 3

组群与第 6 组群遗传相似度最高,聚为一类,主要是山东省的鲁中南山地植物区;第 5 组群、第 2 组群及第 7 组群各成一类,分别代表黄河三角洲盐碱区、胶东丘陵区及微山湖植被区,基本上与山东省植被小区的划分相吻合。

表 6 Nei's 遗传相似度(上三角)和遗传距离(下三角)

Table 6 Nei's genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal)

组别 Group	1	2	3	4	5	6	7	8
1	—	0.8556	0.8893	0.9255	0.8270	0.8953	0.8878	0.9089
2	0.1559	—	0.8629	0.8248	0.7234	0.8602	0.9096	0.8248
3	0.1173	0.1475	—	0.8676	0.8184	0.9291	0.9043	0.9070
4	0.0775	0.1926	0.1421	—	0.8877	0.8874	0.8237	0.9142
5	0.1899	0.3239	0.2003	0.1191	—	0.8366	0.7341	0.8914
6	0.1106	0.1506	0.0735	0.1194	0.1785	—	0.8617	0.8828
7	0.1190	0.0948	0.1006	0.1940	0.3091	0.1488	—	0.8481
8	0.0955	0.1926	0.0976	0.0897	0.1150	0.1246	0.1647	—

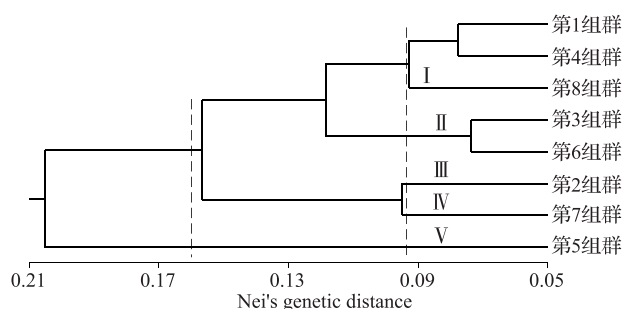


图 2 山东省 8 个苍耳组群的 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 UPGMA cluster analysis for 8 populations of *Xanthium* in Shandong province

2.4 不同来源苍耳的 ISSR 聚类分析

将山东省采集到的 29 份苍耳材料,加上河北昌黎和山西垣曲的苍耳材料共 31 份,利用 NT-SYS-pc 2.1 进行 UPGMA 聚类分析,主要分为 2 个大类(图 3),与组群分类结果类似;2 个山东省外材料与山东省内 20 个样点聚为一类,这说明山东省大部分地区的苍耳材料与邻近省份的苍耳有一定的基因交流;另外山东省内的聊城、莒县、平阴、新泰、昌邑、龙口、诸城、惠民、利津 9 个样点聚成一类,亲缘关系近。可以看出,河北昌黎和山西垣曲 2 份材料很明显的聚为一类后,再与山东省内的其他 20 份材料聚为一类,这说明山东省内苍耳种质资源存有自身的进化特点,已进化成为区别于其他地区的苍耳资源系统。

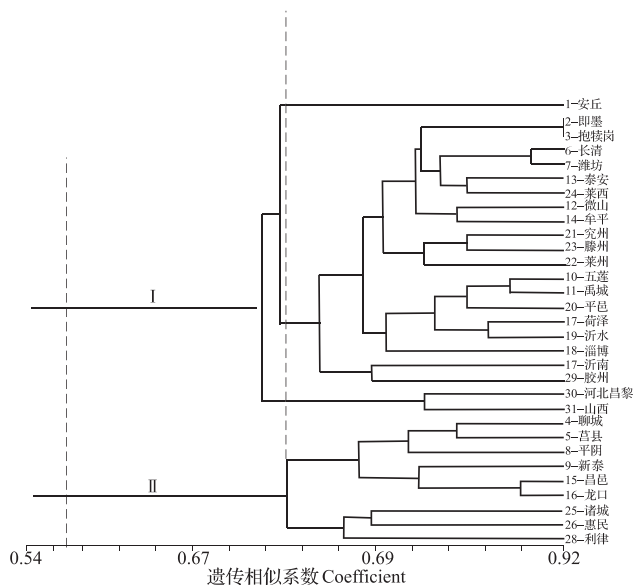


图 3 31 份苍耳材料的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA cluster analysis for 31 kinds of *Xanthium*

3 讨论

植物种子的含油量受环境条件、气候条件、地理条件的影响而有差异^[29-30]。本研究测定结果显示,烟台龙口苍耳种仁含油量最高,为 42.31%,临沂沂南的苍耳材料种仁含油量最低,为 19.94%,差异较大,且种仁率及百粒重也表现类似的规律,这与前人的结论相符。

群体的遗传多样性除了受自然选择、基因流动、

基因突变及遗传漂变等因素影响外,还与物种的生活习性、种子扩散机制、地理分布等有关^[31-32]。本研究的 ISSR 结果显示,各组群 Shannon 多样性指数和 Nei's 相似度分析及多态性位点率差异较大,苍耳的组群内遗传多样性小于组群间遗传多样性,组群内个体遗传变异小于组群间变异。山东省 8 个组群苍耳的遗传相似度高,遗传距离较小,这说明苍耳组群内基因交流程度相对组群间要频繁,其中第 5 组群(鲁北黄泛区)与第 2 组群(胶东半岛南区)及第 7 组群(滨湖洼地区)遗传相似度相对较低,因这 3 个地区的地理位置较远,受高山、海洋阻隔造成;第 4 组群(鲁中山前区)与第 1 组群(胶东半岛北区)、第 3 组群(鲁南山区)与第 6 组群(鲁中山区)遗传相似度最高,其中鲁中山前区与胶东半岛北区地理位置接近,鲁南山区与鲁中山区在山东植被区划中属于鲁中南山地植被区。这说明山东省境内各植物小区之间的苍耳资源存在一定程度的遗传分化。

UPGMA 聚类分析结果显示山东各植物小区苍耳资源亲缘关系的远近不同,从树状图的根部看,可将山东省苍耳分为 2 大类,第 1 组群、第 4 组群、第 8 组群、第 3 组群、第 6 组群、第 5 组群为一类,该类苍耳资源可能由华北平原传入,并经过各自的遗传进化而成为具有各自遗传特性的苍耳资源;第 2 组群和第 7 组群,可能由山东以南省区传入。以单株为单位进行的聚类分析结果显示山东省内各地区苍耳资源交流频繁,亲缘关系较为复杂,例如苍耳的种子能粘附在人及动物身上,可通过人类或动物的活动进行基因交流,当然还涉及到河流、人类和动物活动、地质运动等多方面的原因,应展开类似的调查研究,弄清苍耳植物的基因流动方向和影响苍耳基因交流的因素。总之,山东省苍耳具有较高的遗传多样性,遗传基础丰富,具有较大的育种改良潜力。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志(第 75 卷)[M]. 北京:科学出版社,1979:325
- [2] 李倩,相卫国,郝文芳. 苍耳的研究与应用[J]. 中国农学通报,2005,21(9):116-119
- [3] 危文亮,金梦阳. 42 份非木本油料植物资源的能源利用潜力评价[J]. 中国油脂,2008,33(5):73-76
- [4] 翁新楚,任国谱,董新伟. 富含必需脂肪酸的野生新油源--苍耳籽的研究[J]. 中国油脂,1994,19(5):44-45
- [5] 李嘉麟,刘道芬,孙晓红. 苍耳油制取亚油酸的研究[J]. 化学与粘合,1994(2):87-89
- [6] 胡树慧. 苍耳的利用价值[J]. 特种经济动植物,2001(6):29
- [7] Kamboj A, Saluja A K. Phytopharmacological review of *Xanthium strumarium* L. (Cocklebur)[J]. Int J Green Pharm, 2010, 4:129-139
- [8] 姜克元,黎维勇,王岚. 苍耳子提取液抗病毒作用的研究[J]. 时珍国药研究,1997,8(3):217
- [9] 左祖英,唐恩洁,夏建平. 防风苍耳子水煎剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 川北医学院学报,1997,12(3):9-10
- [10] 母则力,夏东臣,郭坚. 苍耳草膏治疗皮肤癌 38 例临床观察[J]. 甘肃中医学院学报,1999,16(1):24-25
- [11] 赵晨霞,王丽琼. 饲用苍耳保健粉的开发应用[J]. 粮油食品科技,2002,10(5):31-32
- [12] 董玉琛. 生物多样性及作物遗传多样性检测[J]. 作物品种资源,1995(3):1-5
- [13] 徐克章. 生物多样性及其在农田作物生产中的意义和作用[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(2):73-77
- [14] 钱迎倩,马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994:115-119
- [15] 邱芳,伏健民,金德敏,等. 遗传多样性的分子检测[J]. 生物多样性,1998,6(2):153-150
- [16] 孙芳,杨敏生,张军,等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):91-96
- [17] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128:9-17
- [18] 黄文霞,何仪,何觉民,等. 高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):487-490
- [19] Bornet B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 19(3):209-215
- [20] Chen Y, Zhou R, Lin X, et al. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars[J]. Aquat Bot, 2008, 89:311-316
- [21] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:40-45
- [22] Fang D Q, Roose M L, Krueger R R, et al. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95:211-219
- [23] 何予卿,张宇,孙梅,等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123-127
- [24] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. J Am Soc Hort Sci, 1998, 123:612-617
- [25] 李强,刘庆昌,翟红,等. 中国甘薯主要亲本遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 作物学报,2008,34(6):972-977
- [26] 卞文轩. 山东植物地理区划[J]. 山东师范大学学报:人文社会科学版,1959(4):45-59
- [27] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准化管理委员会. 粮油检验粮食中粗脂肪含量测定, 中华人民共和国国家标准 GB/T 5512-2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008
- [28] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication [M]. Chicago: The University of Illinois, 1949:3-14
- [29] 王飞燕,胡启林,贾作忱. 气候条件对油用向日葵籽实含油量的影响[J]. 西北农学报,1996,5(1):63-66
- [30] 王鹏冬,杨新元,白冬梅. 油菜杂交种含油量与地理位置的关系研究[J]. 中国油料作物学报,2002,24(4):38-41
- [31] Owuor E D, Fahima T, Beiles A, et al. Population genetic response to microsite ecological stress in wild barley, *Hordium spontaneum* [J]. Mol Ecol, 1997, 6:1177-1187
- [32] Bauert M R, Kalin M, Baltisberger M, et al. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers[J]. Mol Ecol, 1998, 7:1519-1527