

苎麻种质资源分子身份证构建的初步研究

王晓飞¹, 陈建华¹, 栾明宝¹, 祁建民², 许英¹, 孙志民¹

(¹中国农业科学院麻类研究所, 湖南长沙 410205; ²福建农林大学作物科学学院/生命科学学院, 福州 350002)

摘要:以国内外 42 份苎麻种质资源为材料, 采用 ISSR 引物对供试材料的 DNA 进行扩增, 将琼脂糖凝胶电泳得到的谱带统计结果进行数字化赋值, 用自行编制的 DNA 指纹数据分析器进行数据分析。结果表明, 仅需 7 条引物就可将 42 份供试材料完全区别开。相对其他 DNA 分子标记技术而言, ISSR 操作简单、检测方便、稳定性好、多态性高, 是一种较理想的苎麻分子指纹方法。初步构建了一套包含 42 份苎麻种质资源的分子身份证。

关键词:苎麻; ISSR; 分子身份证

Establishment of Molecular Identification in Ramie Gemplasm s

WANG Xiao-fei¹, CHEN Jian-hua¹, LUAN Ming-bao¹, QI Jian-min², XU Ying¹, SUN Zhimin

(¹ Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205;

² College of Life Sciences, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: ISSR, an effective molecular marker based on microsatellites sequences, is widely used to genetic diversity and cultivars identification research. In this paper, 42 Ramie gemplasm s collected from 5 countries were identified using ISSR molecular marker. According to fragment size of variation, the data numeralized from the amplified bands were analyzed by the software identification analysis. Seven primers could be used to identify all the 42 Ramie gemplasm s. The electrophoresis results of each gemplasm amplified with the 7 primers could be used as a molecular identification of the gemplasm s. A set of molecular identifications were established for 42 Ramie gemplasm s.

Key words: Ramie; ISSR; Molecular Identification

苎麻 (*Boehmeria nivea* L.) 为荨麻科苎麻属优良的多年生韧皮纤维作物。中国苎麻栽培历史在 4000 年以上, 是我国劳动人民最先开发利用的天然纤维作物之一。目前我国苎麻种植面积和原料产量占世界 95% 以上, 是重要的优质纺织原料和出口创汇产品^[1-2]。传统上苎麻一般采用形态性状进行种质鉴定。采用田间调查品种性状的方法, 时间长、费用高; 且苎麻为宿根性多年生植物, 生命周期长, 种质资源间的形态差异性状少, 利用传统的形态学性状鉴定方法区分种质较为困难。随着 DNA 分子标记的不断发展完善, 从分子水平上对种质的遗传特异性快速、准确、经济、不受环境条件影响的鉴定成为可能。

简单序列重复区间扩增多态性 (Inter-simple Se-

quence Repeat Polymorphism, ISSR) 是由 Zietkiewicz 等^[3]于 1994 年提出的, 其原理就是在 SSR 的 3 或 5 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 然后以此为引物, 对两侧具有反向排列的 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增。ISSR 分子标记是一种研究种质资源遗传多样性及亲缘关系的有效技术, 该技术已经应用于银杏^[4]、苦荞^[5]、茶叶^[6]、玉米^[7]、芒果^[8]、槐树^[9]等植物分子鉴定的研究, 并取得了较好的成效。目前, ISSR 分子标记已应用于苎麻遗传多样性、亲缘关系分析等方面^[10-12], 但利用 ISSR 标记构建苎麻种质资源指纹图谱和分子身份证的研究还未见报道。本文用 ISSR 对国内外 42 份苎麻种质资源进行分子指纹图谱的初步分析, 力图构建这些苎麻种质

收稿日期: 2010-03-12 修回日期: 2010-04-02

基金项目: 国家支撑计划 (2006BAD13B04-2); 国家科技基础平台项目 (2005DKA21002-10)

作者简介: 王晓飞, 硕士, 主要从事麻类分子遗传研究

通讯作者: 陈建华, 副研究员, 硕士生导师。E-mail: cjhb@ sina. com

资源的分子身份证,为在分子水平上区分苕麻种质资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试苕麻种质资源共 42 份(表 1),原产地来自

于中国、日本、印度尼西亚、古巴、巴西等 5 个国家。其中国外种质资源 11 份,国内种质资源 31 份。国内种质资源包括部分主栽地区的地方品种和全国各苕麻育种单位育成的品种(品系)。材料均取自长沙国家苕麻种质资源圃,试验在农业部麻类遗传改良与工程微生物重点开放实验室完成。

表 1 供试苕麻种质资源名称来源及类型

Table 1 Ramie varieties and their origins

代号 Code	品种名称 Variety	来源 Source	类型 Type	代号 Code	品种名称 Variety	来源 Source	类型 Type
1	稀节巴	湖南省沅江市	地方品种	22	日本苕麻 5号	日本	引进品种
2	黄壳早	湖南省沅江市	地方品种	23	日本苕麻 8号	日本	引进品种
3	川苕 1号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种	24	牛耳青	全国苕麻劳模黄业菊	育成品种
4	川苕 2号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种	25	湘苕 5号	中国农业科学院麻类研究所	育成品种
5	中苕 1号	中国农业科学院麻类研究所	育成品种	26	周博士不育系	湖南农业大学苕麻研究所	品系
6	咸丰大叶绿	湖北省咸丰县	地方品种	27	红选 1号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种
7	黔苕 1号	贵州省麻类科学研究所	育成品种	28	红选 2号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种
8	川苕 3号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种	29	赣杂 1号	江西省麻类研究所	育成品种
9	芦竹青	湖南省沅江市、汉寿县	地方品种	30	川苕 7号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种
10	四川青苕麻	湖南农业大学苕麻研究所	地方品种	31	大红皮 2号	四川省泸县	地方品种
11	新艾青麻	贵州省麻类科学研究所	地方品种	32	邵阳 12号	湖南农业大学苕麻研究所	地方品种
12	黔苕 2号	贵州省麻类科学研究所	育成品种	33	四川 0号	四川达州地区农业科学研究所	育成品种
13	湘苕 1号	中国农业科学院麻类研究所	育成品种	34	巴西苕麻 8号	巴西	引进品种
14	古巴苕麻	古巴	引进品种	35	巴西苕麻 7号	巴西	引进品种
15	日本苕麻 7号	日本	引进品种	36	资兴麻	湖北省农业科学研究所	地方品种
16	华苕 1号	华中农业大学	育成品种	37	巴西苕麻 3号	巴西	引进品种
17	华苕 2号	华中农业大学	育成品种	38	巴西苕麻 6号	巴西	引进品种
18	湘苕 3号	湖南农业大学苕麻研究所	育成品种	39	湘苕 6号	中国农业科学院麻类研究所	育成品种
19	印尼苕麻 1号	印度尼西亚	引进品种	40	红皮小麻	四川达州地区农业科学研究所	育成品种
20	印尼苕麻 2号	印度尼西亚	引进品种	41	长沙芦筒麻	湖南农业大学苕麻研究所	地方品种
21	印尼苕麻 3号	印度尼西亚	引进品种	42	HB4-2	湖南农业大学苕麻研究所	地方品种

1.2 基因组 DNA 的提取

叶片总 DNA 的提取与检测参考黄小英等^[13]改良的方法,稍加改进。苕麻中有较多的酚类、黄酮类等次生代谢物质,需对提取的基因组 DNA 纯化。纯化后的 DNA 通过电泳检测浓度后,计算样品 DNA 浓度,并稀释到所需浓度。

1.3 ISSR-PCR 分析

ISSR 引物序列由上海生物技术有限公司合成。ISSR-PCR 反应体系:在冰浴条件下建立反应体系,反应体积为 25 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l; dNTP 0.375 μ l; Mg²⁺ 2.5 μ l; ISSR 引物 4 μ l; Taq 酶 0.3 μ l; 模板 DNA 2 μ l; ddH₂O 13.325 μ l,反应体积为 25 μ l。各种反应物的终浓度为: MgCl₂ 2.5mmol, 引物 0.2 μ mol, dNTP

150 μ mol, 1 \times buffer [10mmol Tris · HCl (pH 8.0), 50mmol KCl, 0.1% Triton RX-100], 1.5U Taq 酶。PCR 反应程序为 94 预变性 5min; 94 45s, 52 45s, 72 45s, 34 个循环; 72 5min。以上反应所用的药品及酶均为上海生工产品,所用的 PCR 仪为 Biometra T3 型 PCR 仪。

ISSR-PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离,用溴化乙锭进行染色,用 BD-RAD 公司的 GelDOC1000 型凝胶成像仪观察并照相记录。

1.4 数据统计分析

用筛选出多态性好的 ISSR 引物,对各种质资源的苕麻基因组总 DNA 样品进行 PCR 扩增。清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带的有

无,有带赋值为“1”,无带赋值为“0”。将 ISSR 图谱转换为由 1 和 0 组成的字符串,即构成数字指纹。

采用自行开发的 DNA 指纹分析器建立种质资源分子身份证。该分析器的原理是将输入的字符串比对,进行相关的统计分析,得出不同的品种特异性条带。将数字指纹转换为 EXCEL 文档后,可直接把该 EXCEL 文档导入 DNA 指纹分析器,再输入要分析的品种数量,就可以得到 DNA 指纹分析图谱。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

选用古巴苕麻、中苕 1 号、川苕 7 号、印度尼西亚苕麻 1 号等有代表性的种质基因组 DNA 为模板,对 100 条引物进行多态性引物筛选,选择差异明显且等位基因数目少的 ISSR 标记,能够扩增出稳定的带型且不同材料之间差异明显的 ISSR 引物,从中共选出 7 个多态性丰富、谱带清晰、重复性好的 ISSR 引物 (U807、U815、U818、U822、U823、U827 和 U828) 进行苕麻分子指纹分析。引物编号及序列见

表 2。引物 U828 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

表 2 7 条 ISSR 引物的编号及序列

引物编号 Code of primer	引物序列 Primer's sequence (5 - 3)	重复类型 Repeat unit	退火温度 () Annealing temp.
U807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	(AG) ₈	52.0
U815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	(CT) ₈	55.3
U818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	(CA) ₈	54.3
U822	TCTC TCTC TCTC TCTC TCTC A	(TC) ₈	54.3
U823	TCTC TCTC TCTC TCTC TCTC C	(TC) ₈	52.0
U827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	(AC) ₈	53.0
U828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	(TG) ₈	54.0

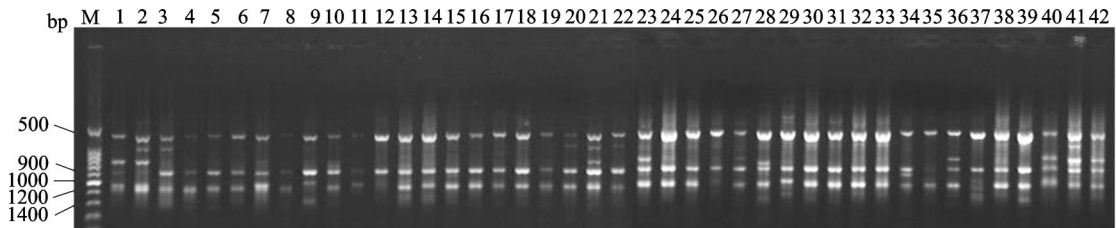


图 1 42 个苕麻种质资源 PCR 扩增产物 (引物 U828)

Fig. 1 The PCR products for 42 Ramie gemplasm s (Primer U828)

2.2 ISSR 扩增结果分析及分子指纹图谱的建立

用所筛选的 7 个 ISSR 多态性引物,对所供试的 42 份苕麻种质资源基因组 DNA 进行 PCR 扩增,共扩增出 49 条带,其中检测出多态性条带共 42 条,平均每条多态性引物扩增出多态性条带 6.00 条,多态性条带比率达 85.71%。

为了建立苕麻分子指纹图谱数据库,首先将样品 ISSR 扩增结果进行数字化处理。在引物 U807、U815、U818、U822、U823、U827 和 U828 的扩增结果中筛选出多态性丰富的 16 个位点,将其位点赋值排列起来,即成为苕麻的“基因分子身份证号码”(表 3)。

表 3 参试苕麻种质资源的分子身份证号码

Table 3 Molecular ID of Ramie gemplasm s used in the experiment

代号 Code	品种名称 Variety	分子身份证号 Fingerprint ID	代号 Code	品种名称 Variety	分子身份证号 Fingerprint ID
1	稀节巴	111000000000100	8	川苕 3 号	0010100000000000
2	黄壳早	1000000000000000	9	芦竹青	1110000000000001
3	川苕 1 号	1010010010010000	10	四川青苕麻	1010000010000000
4	川苕 2 号	1101110011010010	11	新艾青麻	1000100000000000
5	中苕 1 号	0010000010000110	12	黔苕 2 号	1101100000000011
6	咸丰大叶绿	1000000010000100	13	湘苕 1 号	1011000100000000
7	黔苕 1 号	1010000000000011	14	古巴苕麻	0010000010100011

续表

代号 Code	品种名称 Variety	分子身份证号 Fingerprint D	代号 Code	品种名称 Variety	分子身份证号 Fingerprint D
15	日本苕麻 7号	1010001110000000	29	赣杂 1号	1000001010000010
16	华苕 1号	1010000000010000	30	川苕 7号	1100000000000000
17	华苕 2号	1011011101111100	31	大红皮 2号	1001001010000010
18	湘苕 3号	1010011010011100	32	邵阳 12号	1000001010000110
19	印尼苕麻 1号	1010001010011100	33	四川 0号	1000001001000010
20	印尼苕麻 2号	1010000011001100	34	巴西苕麻 8号	0110001000000010
21	印尼苕麻 3号	1000011010100100	35	巴西苕麻 7号	000000001100010
22	日本苕麻 5号	1011010000110000	36	资兴麻	1001000001000010
23	日本苕麻 8号	1010010011000000	37	巴西苕麻 3号	1010000011000000
24	牛耳青	1010011011101000	38	巴西苕麻 6号	1010000001000011
25	湘苕 5号	1001001001000000	39	湘苕 6号	0100001000000011
26	周博士不育系	1001000000100000	40	红皮小麻	1010001000000011
27	红选 1号	1001000000000000	41	长沙芦筒麻	1010001000000010
28	红选 2号	1010100000000010	42	HB4 - 2	1110001000000010

3 讨论

ISSR 分子标记可以用来建立 DNA 分子身份证。在同一物种的各个种质资源间存在大量的多态性标记,某一品种具有区别于其他种质资源的独特标记即一些特异性 DNA 片段的组合就称为该种质资源的“指纹”,各种质资源独特的指纹片段构成该物种的 DNA 指纹库,它具有类似于人的指纹的高度个体特异性和稳定性。把 DNA 指纹库品种特征数字化后,得出字符串形式的结果,其结果可以简单明了地区分苕麻种质资源间的差异,从而可以很有效地鉴定苕麻种质资源。

ISSR 标记无需预先克隆和测序^[15-16],成本低、耗时少、可靠性高,已被证明是目前最有发展前景的分子标记之一。周建林等^[10]在国内首先尝试运用 ISSR 等 3 种标记对 20 个苕麻栽培品种进行了亲缘关系分析,结果每种标记方法都能在苕麻品种间产生多态性的谱带。与 RAMP 和 SSR 比较,ISSR 每个引物产生的 DNA 条带最多,用 ISSR 标记分析,效率最高。蒙祖庆等^[11]以 8 个地方栽培品种为参照,应用 RAPD 和 ISSR 标记从 DNA 水平分析了来自于不同生态区域的 30 份苕麻野生种质的遗传背景。结果表明,RAPD 和 ISSR 标记适用于苕麻野生材料的遗传多样性分析,但 ISSR 比 RAPD 标记更适合苕麻野生种质资源亲缘关系分析。丁明忠等^[12]利用 ISSR 技术对 8 份四川苕麻材料进行分析,构建了供试材料间的遗传相似关系聚类图。说明 ISSR 技术除了可以用于遗传作图、基因定位、进化和系统发育研

究外,还可以用来建立一套品种鉴定体系即品种 ISSR 指纹图,以实现品种保护。目前有超过 100 条 ISSR 引物,基于不同实验可筛选出适当数量的引物。本研究仅用 7 条引物就能鉴别 42 个苕麻材料,且 ISSR 标记带型稳定、操作简单。黔苕 1 号、湘苕 1 号和牛耳青均是以黄壳早为亲本,通过自然变异对其后代进行系统育种选育出的品种。这 4 个品种具有相似的遗传背景,扩增出一个共同的条带,说明 ISSR 标记具有较强的可靠性;但黔苕 1 号和湘苕 1 号各增加了 3 条不同的条带,牛耳青增加了 7 个条带。它们经过遗传性变异,与其亲本黄壳早以及它们之间有一定的遗传差异。该标记也能将它们及其亲本鉴别出来,并足以把亲缘关系很近的材料区分开来。因此利用 ISSR 标记可作为鉴别苕麻种质资源的一种有效方法。本研究选择了 42 个苕麻种质资源,利用 7 个 ISSR 标记就能将供试样品有效区分开,进一步说明 ISSR 标记在苕麻种质资源鉴定中有较高的利用价值。笔者同时还开发出一个软件,用于苕麻分子身份证的建立。该软件不仅可用于本研究选择的苕麻种质资源,同时也可扩大到其他苕麻种质资源分子身份证的建立。

本研究通过 ISSR 分子标记技术,采用 DNA 指纹数据分析器分析软件对国内外 42 份苕麻种质资源进行分析表明,仅需 7 条引物即可将供试种质资源完全区分开,可以得到 42 份苕麻种质资源的分子身份证号码。

(下转第 810 页)

四改良系对玉米粗缩病的抗性较好,5003、478、掖107等 Reid 血缘的自交系或改良系对粗缩病的抗性较差,并发现我国地方农家种中存在抗粗缩病基因。路银贵等^[8]在河北保定对国内外 147 份自交系进行了抗粗缩病自然接种鉴定,由美国 78599 系选育的材料抗粗缩病表现突出,178、P138、沈 137 表现抗,齐 319 表现中抗。陈永坤等^[11]通过对 64 份自交系在山西临汾玉米粗缩病重发区的 2 年 3 种环境下的抗病性鉴定,确定 PB 和塘四平头亚群为抗玉米粗缩病育种的重要种质类群。其中, PB 类群中齐 319、沈 137、黄早四、多黄 29、丹 3130、P138 等为高抗类型, X178 为抗病类型。陈艳萍等^[4]采用网栅集团接种的方法,对 29 份国内常用玉米自交系和部分杂交组合进行了抗病性鉴定研究,筛选出高抗自交系 5 份,抗病系 2 份,结合系谱分析,筛选出的 5 份高抗系和 2 份抗病系均属于 PB 亚群。本研究中 PB 亚群同样表现出较好的抗性,所有属于该亚群的自交系抗性均达到中抗以上水平,但不同材料间及部分材料在不同播期间抗性也存在显著差异。本研究结果表明,玉米自交系间对粗缩病的抗性易受播期环境条件的影响,苗龄越小对 RBSDV 反应越敏感,与钱幼亭等^[9]、高秀美等^[10]的试验结果相一致。

本所培育的新抗源 T877 属于 PB 亚群,在不同年份、不同环境下均表现为高抗玉米粗缩病,与齐 319、P138 等国内优秀抗性自交系相比,具有抗性强且抗性稳定的优点。T877 自交系株高中等,叶色浓

绿,根系发达,长势清秀,高抗大斑病和小斑病、粗缩病等病害,抗倒性强,与 Reid 亚群、塘四平头亚群等均有良好的配合力,利用其作父本育成的苏玉 19 玉米新品种,具有高产、优质、早熟和粗缩病发生率低的特点^[11],已获国家“863 计划资助,同时被列为江苏省玉米主推品种和普通玉米区试对照品种,在近几年粗缩病大发生的年份为江苏省稳定玉米生产发挥了重要作用,由此说明 T877 可作为高配合力、高抗粗缩病的种质资源在玉米育种研究中加以应用。

参考文献

- [1] 陈永坤,李新海,肖木辑,等. 64 份玉米自交系抗粗缩病的遗传变异分析 [J]. 作物学报, 2006, 32 (12): 1848-1854
- [2] 陈艳萍,张彦兵,孟庆长,等. 玉米粗缩病抗性遗传和育种研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2006, 22 (6): 70-73
- [3] 顾国华,徐莉,葛红,等. 南通地区玉米粗缩病发生成因与控制对策 [J]. 大麦与谷类科学, 2007 (4): 48-50
- [4] 陈艳萍,袁建华,孟庆长,等. 玉米自交系粗缩病毒抗性鉴定研究 [J]. 金陵科技学院学报, 2007, 23 (3): 57-60
- [5] 苗洪芹,田兰芝,路银贵,等. 简便易行的玉米粗缩病严重程度分级标准 [J]. 植物保护, 2005, 31 (6): 87-89
- [6] 刘志增,池书敏,宋占权,等. 玉米自交系及杂交种粗缩病抗性鉴定与分析 [J]. 玉米科学, 1996, 4 (4): 68-70
- [7] 王安乐,陈朝辉,邵新胜,等. 玉米自交系材料抗粗缩病鉴定筛选初报 [J]. 玉米科学, 1998, 6 (4): 65-66
- [8] 路银贵,邱垫平,苗洪芹,等. 国外及国内玉米自交系粗缩病抗性鉴定及分析 [J]. 河北农业科学, 2001, 5 (4): 21-25
- [9] 钱幼亭,孙晓平,梁影屏,等. 不同播期对玉米粗缩病发生的影响 [J]. 植物保护, 1999, 25 (3): 23-24
- [10] 高秀美,曹长余,杨胜敏,等. 不同播期对玉米粗缩病发生的影响 [J]. 中国农学通报, 2000, 16 (3): 54-55
- [11] 薛林,蔡志飞. 高产优质早熟大穗型玉米新品种——苏玉 19 [J]. 江苏农业学报, 2003, 19 (3): 132

(上接第 805 页)

参考文献

- [1] 欧阳西荣,唐守伟. 苕麻高产高效栽培与综合利用技术综述 [J]. 中国麻业科学, 2008, 30 (1): 84-88
- [2] 熊和平. 麻类作物育种学 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 46-48
- [3] Zietkiewicz E, Rafalake A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genome, 1994, 20: 178-183
- [4] 沈永宝,施季森,赵洪亮,等. 利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种 [J]. 林业科学, 2005, 41 (1): 202-204
- [5] 赵丽娟,张宗文,黎裕,等. 苦荞种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7 (2): 159-164
- [6] 刘本英,王丽鸳,周健,等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 458-464
- [7] 景建洲,李东亮,张勇,等. 利用 ISSR 标记鉴别玉米品种的初步研究 [J]. 玉米科学, 2007, 15 (6): 16-19
- [8] He X H, Li Y R, Guo Y Z, et al. Identification of closely related mango cultivars by ISSR [J]. 广西植物, 27 (1): 44-47
- [9] 冷言峰,马云芳,何桥,等. 几个槐树植物的 ISSR 鉴定 [J]. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2007, 32 (6): 83-86
- [10] 周建林,揭雨成,蒋彦波,等. 用微卫星 DNA 标记分析苕麻品种的亲缘关系 [J]. 作物学报, 2004, 30 (3): 289-292
- [11] 蒙祖庆,刘立军,彭定祥. 利用 RAPD 和 ISSR 标记分析苕麻野生种质资源的遗传多样性 [J]. 分子植物育种, 2009, 7 (2): 365-370
- [12] 丁明忠,潘光堂,张中华,等. 用 ISSR 分析四川苕麻品种 (系) 间的遗传关系及雄性不育分子标记的建立 [J]. 核农学报, 2008, 22 (2): 183-187
- [13] 黄小英,刘瑛,赖小萍,等. 用 CTAB 法提取苕麻总 DNA 试验 [J]. 江西农业学报, 2001, 13 (4): 40-42
- [14] 刘立军,孙珍夏,彭定祥. 苕麻 ISSR-PCR 体系的优化 [J]. 农业生物技术科学, 2006, 7 (22): 64-67
- [15] 高欢欢,杨军,郭光沁,等. DNA 指纹技术新进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23 (4): 196-199
- [16] 张立荣,徐大庆,刘大群. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种研究中的应用 [J]. 河北农业大学学报, 2002, 25 (1): 90-94