

# 基于ISSR分子标记的山梔单株遗传多样性研究

李曜星<sup>1</sup>, 黄楷雯<sup>1</sup>, 黎昱辰<sup>1</sup>, 刘佳艺<sup>1</sup>, 葛璐瑶<sup>1</sup>, 魏祖航<sup>1</sup>, 张宇霖<sup>2</sup>, 曾艳玲<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中南林业科技大学, 林学院, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 湖南 长沙

<sup>2</sup>中南林业科技大学, 生命科学与技术学院, 湖南 长沙

收稿日期: 2023年3月21日; 录用日期: 2023年4月21日; 发布日期: 2023年4月28日

## 摘要

山梔是药食同源的经济林, 主要含有环烯醚萜类、色素、胆碱等活性成分, 是重要的药物资源, 也是化工、食品工业的重要原料, 其中天然梔子黄色素是我国传统染料, 作为天然食品添加剂, 具有较高的经济价值。实验挑选湖南长沙宁乡的优质梔子提取DNA为材料, 筛选出U840为引物, 采用ISSR分子标记方法对其遗传多样性进行分析, 通过NTSYS和POPGEN软件对其进行聚类分析和遗传多样性分析, 得到此居群的种质资源情况, 可为下一步进行湖南山梔其他居群的种质资源研究打下基础, 并为新品种选育提供科学依据和技术支撑。

## 关键词

梔子, 遗传多样性, ISSR-PCR, 种质资源, 聚类分析

# Genetic Diversity Study of *Gardenia jasminoides* Ellis Single Plants Based on ISSR Molecular Marker Analysis

Yaoping Li<sup>1</sup>, Kaiwen Huang<sup>1</sup>, Yuchen Li<sup>1</sup>, Jiayi Liu<sup>1</sup>, Luyao Ge<sup>1</sup>, Zuhang Wei<sup>1</sup>, Yulin Zhang<sup>2</sup>, Yanling Zeng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Cultivation and Technology, Ministry of Education, College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha Hunan

<sup>2</sup>College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha Hunan

Received: Mar. 21<sup>st</sup>, 2023; accepted: Apr. 21<sup>st</sup>, 2023; published: Apr. 28<sup>th</sup>, 2023

文章引用: 李曜星, 黄楷雯, 黎昱辰, 刘佳艺, 葛璐瑶, 魏祖航, 张宇霖, 曾艳玲. 基于 ISSR 分子标记的山梔单株遗传多样性研究[J]. 农业科学, 2023, 13(4): 344-351. DOI: 10.12677/hjas.2023.134047

## Abstract

*Gardenia jasminoides* Ellis is an economic forest of affinal drug and diet, mainly containing iridoids, pigments, choline and other active ingredients. It is an important drug resource and an important raw material for chemical industry and food industry. Among them, natural gardenia yellow pigment is a traditional dye in China, as a natural food additive, has high economic value. In this experiment, high-quality gardenia DNAs from Ningxiang, Changsha, Hunan province were selected as materials, and U840 was selected as primer. Their genetic diversity was analyzed by ISSR molecular marker method. Cluster analysis and genetic diversity analysis were analyzed by NTSYS and POPGEN software to obtain the germplasm resources of this population. It can lay the groundwork for the next research on germplasm resources in other gardenia populations in Hunan, and provide scientific basis and technical support for the breeding of new varieties.

## Keywords

*Gardenia jasminoides* Ellis, Genetic Diversity, ISSR-PCR, Germplasm Resources, Cluster Analysis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

梔子(*Gardenia jasminoides* Ellis)是茜草科的一种常绿灌木, 叶子嫩绿, 花香浓郁[1]。

在我国用做中药材历史悠久, 其主要产于湖南、江西、湖北、浙江及福建等地, 系湖南产地道药材之一。其味苦性寒, 主归心、肺、三焦经, 具有泻火除烦, 清热利尿, 凉血解毒等功效, 临床广泛用于热病心烦, 黄疸尿赤, 血淋涩痛, 血热吐衄, 目赤肿痛, 火毒疮疡等证[2]。

现代研究表明, 梔子主要含有环烯醚萜类[如去乙酰车叶草酸甲酯(deacetyl asperulosidic acid methylester, DAAME)、梔子苷等]、萜类(如西红花苷 I、西红花苷 II、苦番红花素等)、黄酮类(如芦丁等)、三萜类等成分[3], 具有抗炎、调节免疫、抗氧化、治疗心血管系统疾病等药理作用[4] [5]。有研究表明, 不同叶果型梔子植株果内梔子苷和西红花苷含量存在显著差异, 而且同一栽培群体中的梔子植株存在着丰富的遗传多样性[6]。

基于内部简单重复序列(inter-simple sequence repeats, ISSR)是一种显性分子标记, 具有较高的多态性、重复性、稳定性且操作简便等诸多优点, 已广泛应用在埃及小麦(*Egyptian wheat*)、硬粒小麦(*Triticum durum*)、钩刺山羊(*Aegilops triuncialis*)、大麦(*Hordeum vulgare*)等小麦及野生近缘属种的遗传多样性研究[7]。

本实验以湖南长沙宁乡 33 份山梔优良株系为研究对象, 建立 ISSR-PCR 反应体系, 通过 NTSYS 软件和 PopGen 软件进行聚类分析和遗传多样性分析。本研究利用 ISSR 标记分析湖南宁乡山梔遗传多样性, 为湘山梔优良新品种选育提供科学依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 仪器与试剂

#### 2.1.1. 仪器

PCR 仪; 电泳仪; Bio-Rad 凝胶成像系统; 离心机; 专用纯水机。

### 2.1.2. 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司); 引物(生工生物工程股份有限公司合成); 琼脂糖; 核酸染料 GelGreen; PCR 试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司)。

## 2.2. 试验材料

以湖南长沙宁乡 33 份山柃优良株系为试验材料, 采集健康幼嫩叶片若干(挂标签标记该采样植株), 迅速装入塑料自封袋, 带回实验室, 置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存, 供 DNA 提取用。采样点为湖南省长沙市宁乡喻家坳乡涌泉山村( $112^{\circ}14'23''\text{E}\sim 112^{\circ}22'43''\text{E}$ ;  $28^{\circ}9'25''\text{N}\sim 28^{\circ}17'14''\text{N}$ ), 样品隶属于华中(HZ)居群。

## 2.3. 提取方法

### 2.3.1. DNA 提取

按照 SteadyPure 植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书的步骤提取山柃嫩叶的 DNA: 将新鲜的山柃嫩叶样本进行液氮研磨, 并磨好的样本粉末转移至 1.5 mL 离心管中, 然后向其中迅速加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer LS-3 和 10  $\mu\text{L}$  的  $50\times$  DTT Buffer, 再加入 10  $\mu\text{L}$  的 RNase A, 振荡混匀。使离心管于  $56^{\circ}\text{C}$  均匀受热, 10 min。

加入 62.5  $\mu\text{L}$  (Buffer LS-3 的 1/8 体积)的 Buffer PA 充分混匀, 冰上放置 5 min, 12,000 rpm 离心 5 min, 取上清, 加入与上清等体积的 Buffer BS-2, 充分混匀。

转移至 Plant DNA Mini Column 中过柱(注意每次过柱的体积量不要超过 750  $\mu\text{L}$ ), 室温静置 1 min 后, 室温下 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer WA, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 加入 750  $\mu\text{L}$  的 Buffer WB, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 再次加入 750  $\mu\text{L}$  的 Buffer WB, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃滤液; 将 Mini Column 安置于新的 2 mL Collection Tube 上, 12,000 rpm 离心 2 min。

将 Mini Column 安置于新的 1.5 mL 离心管上, 在 Mini Column 膜的中央处加入 50  $\mu\text{L}$  的 Elution Buffer, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA; 为获得更大收量重复洗脱一次。

注意:

尽量使用新鲜的实验材料, 以确保提取的基因组 DNA 不被降解, 长时间保存的样本置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存;

Buffer WB 在使用前已经加入了 63 mL 的 100%乙醇;

洗脱时, 将 Elution Buffer 加热至  $50^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$  使用, 以提高洗脱效率。

### 2.3.2. ISSR-PCR 反应

利用 PCR 仪, 使用相同材料作为模板对不同的 ISSR 引物进行筛选, 得到扩增条带清晰, 利于进行后续遗传分析的引物。再以湖南长沙宁乡山柃优良株系的 DNA 为模板, 选取最佳退火温度  $56.3^{\circ}\text{C}$  和 20  $\mu\text{L}$  的反应体系: 0.35  $\mu\text{L}$  Accurate Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 2.8  $\mu\text{L}$  浓度为 25 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$ , 1.6  $\mu\text{L}$  浓度为 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  浓度为  $10^{-2}$  mmol/L 的引物, 1  $\mu\text{L}$  的模板 DNA, 2  $\mu\text{L}$  的 Buffer 溶液, 最后添水至 20  $\mu\text{L}$ 。ISSR-PCR 的扩增程序为  $94.0^{\circ}\text{C}$ 、1 min;  $98.0^{\circ}\text{C}$ 、10 s;  $56.3^{\circ}\text{C}$ 、15 s;  $68.0^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 共 35 个循环, 最后  $4^{\circ}\text{C}$  保存。反应产物 ISSR 采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳,  $1\times$  TAE 缓冲液, 120 V 跑胶 40 min。电泳结束后紫外凝胶成像系统下观察拍摄, 并保存。

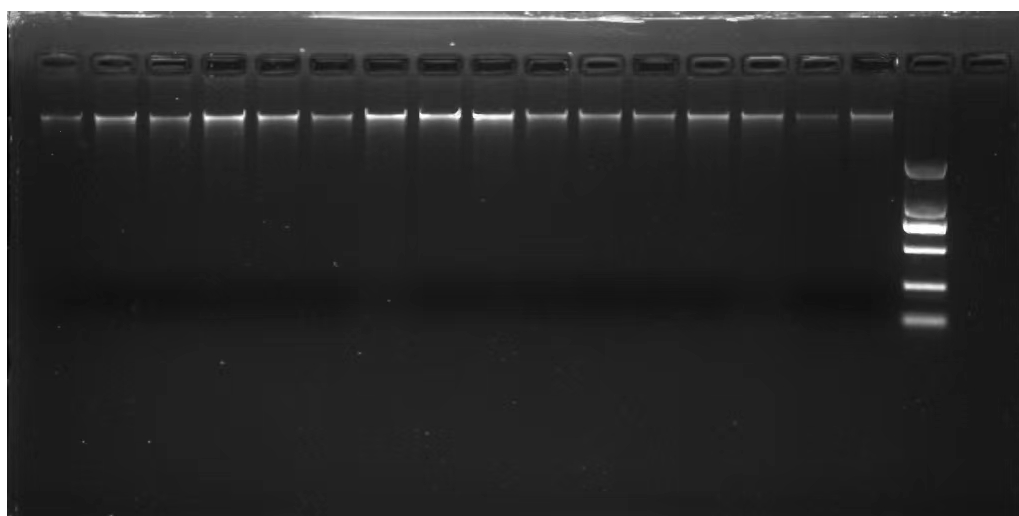
### 2.3.3. 数据分析

采用 NTSYS 软件和 PopGen 软件进行聚类分析和遗传多样性分析。

### 3. 结果分析

#### 3.1. DNA 提取质量检测

用琼脂糖凝胶电泳检测其 DNA 浓度，电泳图单一条带且无明显拖带(图 1)，说明提取的 DNA 质量较好，可用于 ISSR 标记。



**Figure1.** The quality of extracted DNA

**图 1.** DNA 提取质量检测图

#### 3.2. ISSR 引物筛选和最优体系

使用 118 号材料对 U801-U900 共 100 条 ISSR 引物进行筛选，最终选出扩增条带清晰、多态性明显、重复性小的 U840 作为后续试验中的 ISSR 引物，引物序列及结果见表 1。每个引物扩增出的 DNA 条带范围为 0~5 条，扩增产物长度介于 100~2000 bp (图 2)，以 250~2000 bp 的扩增条带居多。

**Table 1.** Primers and amplification results

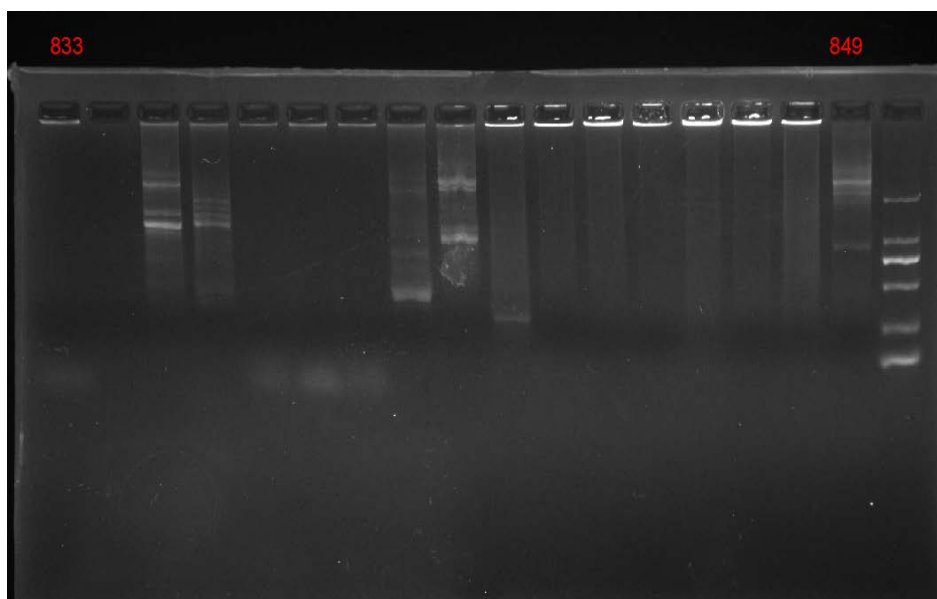
**表 1.** 引物及扩增结果

引物名称	序列	扩增条代数	引物名称	序列	扩增条代数
U801	(AT) <sub>8</sub> T	0	U851	(GT) <sub>8</sub> YG	2
U802	(AT) <sub>8</sub> G	0	U852	(TC) <sub>8</sub> RA	0
U803	(AT) <sub>8</sub> C	0	U853	(TC) <sub>8</sub> RT	0
U804	(TA) <sub>8</sub> A	0	U854	(TC) <sub>8</sub> RG	0
U805	(TA) <sub>8</sub> C	0	U855	(AC) <sub>8</sub> YT	0
U806	(TA) <sub>8</sub> G	0	U856	(AC) <sub>8</sub> YA	4
U807	(AG) <sub>8</sub> T	4	U857	(AC) <sub>8</sub> YG	3
U808	(AG) <sub>8</sub> C	3	U858	(TG) <sub>8</sub> RT	0
U809	(AG) <sub>8</sub> G	2	U859	(TG) <sub>8</sub> RC	0
U810	(GA) <sub>8</sub> T	1	U860	(TG) <sub>8</sub> RA	0
U811	(GA) <sub>8</sub> C	3	U861	(ACC) <sub>6</sub>	0
U812	(GA) <sub>8</sub> A	0	U862	(AGC) <sub>6</sub>	0

## Continued

U813	(CT) <sub>8</sub> T	0	U863	(AGT) <sub>6</sub>	0
U814	(CT) <sub>8</sub> A	0	U864	(ATG) <sub>6</sub>	0
U815	(CT) <sub>8</sub> G	0	U865	(CCG) <sub>6</sub>	0
U816	(CA) <sub>8</sub> T	0	U866	(CTC) <sub>6</sub>	0
U817	(CA) <sub>8</sub> A	0	U867	(GGC) <sub>6</sub>	0
U818	(CA) <sub>8</sub> G	1	U868	(GAA) <sub>6</sub>	0
U819	(GT) <sub>8</sub> A	0	U869	(GTT) <sub>6</sub>	0
U820	(GT) <sub>8</sub> C	0	U870	(TGC) <sub>6</sub>	0
U821	(GT) <sub>8</sub> T	0	U871	(TAT) <sub>6</sub>	1
U822	(TC) <sub>8</sub> A	0	U872	(GATA) <sub>4</sub>	2
U823	(TC) <sub>8</sub> C	0	U873	(GACA) <sub>4</sub>	0
U824	(TC) <sub>8</sub> G	0	U874	(CCCT) <sub>4</sub>	3
U825	(AC) <sub>8</sub> T	0	U875	(CTAG) <sub>4</sub>	0
U826	(AC) <sub>8</sub> C	0	U876	(GATA) <sub>2</sub> (GACA) <sub>2</sub>	0
U827	(AC) <sub>8</sub> G	0	U877	(TGCA) <sub>4</sub>	0
U828	(TG) <sub>8</sub> A	0	U878	(GGAT) <sub>4</sub>	0
U829	(TG) <sub>8</sub> C	0	U879	(CTTCA) <sub>3</sub>	0
U830	(TG) <sub>8</sub> G	0	U880	(GGAGA) <sub>3</sub>	0
U831	(AT) <sub>8</sub> YA	1	U881	(GGGTG) <sub>3</sub>	0
U832	(AT) <sub>8</sub> YC	1	U882	VBV(AT) <sub>7</sub>	0
U833	(AT) <sub>8</sub> YG	0	U883	BVB(TA) <sub>7</sub>	0
U834	(AG) <sub>8</sub> YT	0	U884	HBH(AG) <sub>7</sub>	0
U835	(AG) <sub>8</sub> YC	3	U885	BHB(GA) <sub>7</sub>	0
U836	(AG) <sub>8</sub> YA	2	U886	VDV(CT) <sub>7</sub>	0
U837	(TA) <sub>8</sub> RT	0	U887	DVD(TC) <sub>7</sub>	0
U838	(TA) <sub>8</sub> RC	0	U888	BDB(CA) <sub>7</sub>	0
U839	(TA) <sub>8</sub> RG	0	U889	DBD(AC) <sub>7</sub>	0
U840	(GA) <sub>8</sub> YT	5	U890	VHV(GT) <sub>7</sub>	0
U841	(GA) <sub>8</sub> YC	2	U891	HVH(TG) <sub>7</sub>	0
U842	(GA) <sub>8</sub> YG	1	U892	TAGATCTGATATCTGAATTCCC	2
U843	(CT) <sub>8</sub> RA	0	U893	(NNN) <sub>5</sub>	0
U844	(CT) <sub>8</sub> RC	0	U894	TGGTAGCTCTTGATCA(N) <sub>5</sub>	0
U845	(CT) <sub>8</sub> RG	0	U895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	5
U846	(CA) <sub>8</sub> RT	0	U896	AGGTCGCGCCGC(N) <sub>6</sub> ATG	0
U847	(CA) <sub>8</sub> RC	0	U897	CCGACTCGAG(N) <sub>6</sub> ATGTGG	0
U848	(CA) <sub>8</sub> RG	0	U898	GATCAAGCTT(N) <sub>6</sub> ATGTGG	0
U849	(GT) <sub>8</sub> YA	2	U899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	4
U850	(GT) <sub>8</sub> YC	0	U900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	0

备注: 5'→3', 其中 N = (A, G, C, T), R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T) (I.e.notA), D = (A, G, T) (I.e.notC), H = (A, C, T) (I.e.notG), V = (A, C, G) (I.e.notT)。



**Figure 2.** Analysis of amplification results  
**图 2.** 扩增结果图

经过对 PCR 最优体系的探寻, ISSR-PCR 反应体系确定为(20  $\mu\text{L}$ ): 模板 DNA 30 ng;  $\text{Mg}^{2+}$  3.5 mmol/L; dNTPs 0.2 mmol/L; 引物 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; TaqDNA 聚合酶 1.75 U。选取最佳退火温度 56.3 $^{\circ}\text{C}$ 。

在操作时需向体系中添加: 0.35  $\mu\text{L}$  Accurate Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 2.8  $\mu\text{L}$  浓度为 25 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$ , 1.6  $\mu\text{L}$  浓度为 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  浓度为  $10^{-2}$  mmol/L 的引物, 1  $\mu\text{L}$  的模板 DNA, 2  $\mu\text{L}$  的 Buffer 溶液, 添水至 20  $\mu\text{L}$ 。ISSR-PCR 的扩增程序为 94.0 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 98.0 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s; 56.3 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s; 68.0 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 共 35 个循环, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.3. 遗传差异

采用 PopGen 1.32 软件进行遗传差异分析, 得到表 2, 从表中可看出, 33 份梔子种质资源的 Na、Ne、H 和 I 的值分别为 1.3333、1.1589、0.0974、0.1512, 说明本次实验材料的遗传多样性与代表性较低, 这与本次采用的优选梔子取材地相同的情况比较一致。

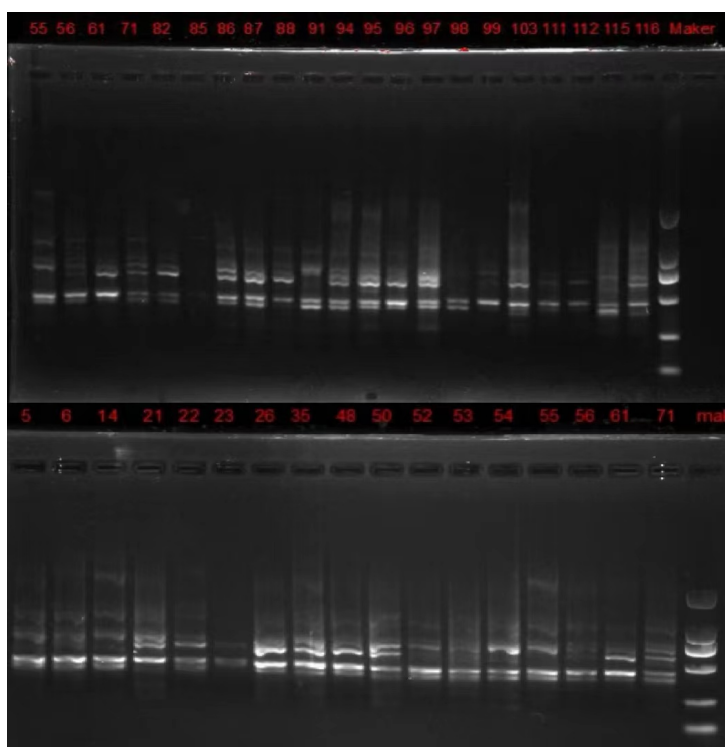
**Table 2.** Primers and amplification results  
**表 2.** 引物及扩增结果

Locus	Sample	Size	Na*	Ne*	H*	I*
1		33	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
2		33	2.0000	1.1700	0.1453	0.2760
3		33	2.0000	1.7835	0.4393	0.6312
4		33	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
5		33	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
6		33	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Mean		33	1.3333	1.1589	0.0974	0.1512
St.Dev			0.5164	0.3135	0.1773	0.2598

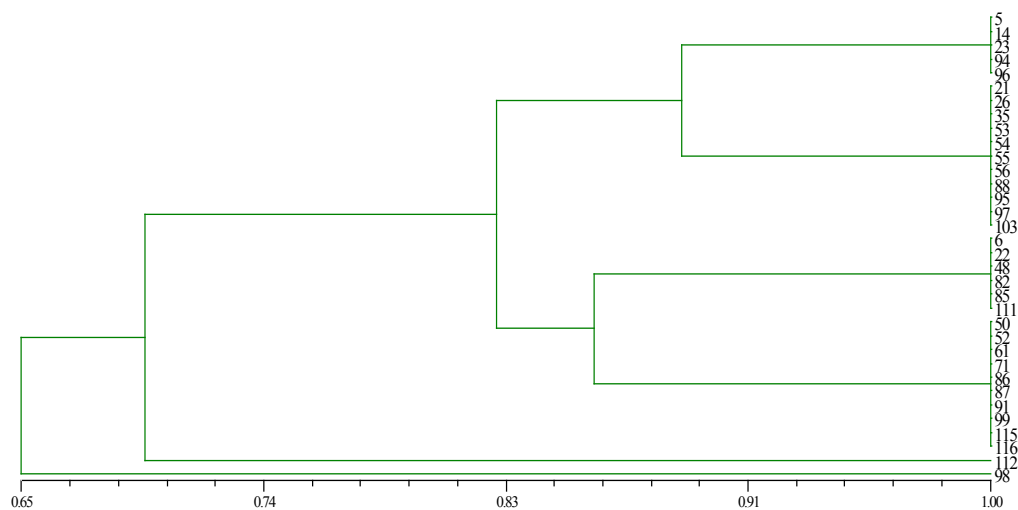
从不同条带来看, 等位基因数( $n_a$ )的范围是 1.0000 到 2.0000, 平均值为 1.3333; 有效等位基因数( $n_e$ )的范围是 1.0000 到 1.7835, 平均值为 1.1589; Nei's 遗传多样性指数范围是 0.1453 到 0.4393, 平均值为 0.0974; Shannon's 多态性指数( $I$ )的范围是 0.2760 到 0.6312, 平均值为 0.1512。

### 3.4. 聚类分析

选用 U840 作为引物对本实验中 33 份山栀优选样品 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 3 所示。



**Figure 3.** Amplification results of high-quality gardenia under optimal system  
**图 3.** 最优体系下优选栀子扩增电泳图



**Figure 4.** Results of the SAHN cluster analysis  
**图 4.** SAHN 聚类分析结果图

从图 3 中可以看出, 33 个优选样品的 NDA 在 500 bp 和 750 bp 长度含量最高、1000 bp 长度次之(除 85 号栀子效果较差); 少部分优选样品含有长度为 2000 bp 的 DNA (如 14 号、35 号、55 号、94 号、95 号、103 号); 没有优选样品含有长度为 100 bp 或 200 bp 的 DNA。图像有些许拖带的原因可能是电压不稳或 TAE 缓冲液污染。

采用 NTSYSpe2.1 软件对 33 份优选样品进行 SAHN 聚类分析。从图 4 中可以看出, 所有栀子样本在阈值 0.65 处分为两支, 其中 98 号优选栀子和其他栀子相似系数最小, 单独成一支。其他的优选栀子样品聚为一支, 在这一支中于约 0.695 处分为两个姊妹支, 其中 112 号优选栀子单独成一支, 其余优选栀子成一大支。这一大支在阈值 0.83 处分为两支, 这两只各自在遗传系数为 0.862 和 0.894 左右处再次分出两亚支。

#### 4. 结论与讨论

本研究以湖南长沙宁乡的优质栀子为材料, 采用 ISSR 分子标记方法对其种质进行分类, 通过 NTSYS 和 POPGEN 软件对其进行遗传多样性分析: POPGEN 分析结果显示同一居群的山栀单株遗传多样性并不大, 这与焦雁翔等[6]采用叶果型分析得出的同一栽培群体遗传多样性丰富的结果不一致。这可能是因为叶果型关注地仅仅为整体植株的某个或某些性状特征, 而分子标记是基于整体植株遗传水平的分析; 聚类结果显示可将优选栀子划分为两类, 98 号独成一支, 其余 33 株虽然聚为一大类, 但 112 号相对而言遗传距离远一些。这些聚类结果可以为后续选择亲缘关系远的亲本作为参考依据, 同时也说明分子标记可以较为精准地实现各试材的亲缘鉴别。

利用遗传距离远的种质作为亲本来产生性状更好的杂交品种对良种选育很有帮助, 在传统的栀子育种中, 常采用形态、物理和化学性状进行分析, 而分子标记手段不受环境、植物生理状态等因素的影响, 具有较好的稳定性。本研究结果可为下一步鉴别山栀各居群间种质资源亲缘关系提供成熟技术体系, 为新品种选育提供科学依据。

#### 基金项目

湖南省大学生创新创业训练计划项目(湘教通[2022]174 号); 湖南省企业科技特派员计划(2021GK5006)。

#### 参考文献

- [1] Yang, Y., Li, L., Tang, J., Li, Y.J., Luo, M.R. (2021) Responses of *Gardenia jasminoides* Ellis Leaf Traits and Anatomical Structures to Drought Stress in Purple Soil. *Agricultural Biotechnology*, **10**, 93-97.
- [2] 王清波. 栀子多元多息指纹图谱的构建[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.
- [3] 孙瑜, 蔡媛, 沈冰冰, 李鹏辉, 邓天好, 彭艳梅. 基于网络药理学及分子对接研究栀子抗缺血性脑卒中的分子机制[J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2352-2359.
- [4] 卜妍红, 陆婷, 吴虹, 孙明慧, 张衡, 邓然, 王言. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(6): 89-93.
- [5] 魏飒, 张海惠, 王玉泉, 吴晓军, 胡喜贵, 茹振钢. 粗山羊草种质遗传多样性及群体结构的 ISSR 分析[J/OL]. *广西植物*: 1-10[2023-01-07]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20221024.1339.004.html>
- [6] 焦雁翔, 唐正中, 唐玉琴, 杨永东, 段小红, 胡开治. 不同叶果型栀子植株果内栀子苷和西红花苷含量分析[J]. *经济林研究*, 2017, 35(3): 193-198.
- [7] 陈吉祥, 尹海波, 王丹, 贾丁丁, 贾春雷, 李博文, 吴伟. 辽产龙胆 ISSR-PCR 反应体系的建立及遗传多样性分析[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(7): 1722-1726.