

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201707013

引文格式: 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 ZY, QU JP, YANG ZJ, et al. ISSR analysis on genetic relationships among seven species in *Campanula* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(6): 818–824

七种风铃草属植物亲缘关系的 ISSR 分析

包志远^{1,3}, 曲继鹏², 杨在君^{1*}, 路璐⁴, 廖明莉¹, 周梦霞¹, 彭正松^{1,2}

(1. 西华师范大学 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637009; 2. 西昌学院 农业科学学院, 四川 西昌 615013; 3. 浙江建院建筑规划设计院, 杭州 310004; 4. 西华师范大学 环境科学与环境工程学院, 四川 南充 637009)

摘要: 为了解四川风铃草属植物的资源丰富度和遗传进化情况, 该研究利用 ISSR 分子标记, 探究了四川 7 种风铃草属植物的亲缘关系, 为风铃草属植物的分子标记辅助鉴定、资源保护、花卉品种的开发与育种提供理论基础。结果表明: 40 条 ISSR 引物中有 28 条引物能够扩增出清晰的条带, 扩增总条带数为 164, 其中有 98.8% 的扩增条带具有多态性, 供试的 7 种风铃草属植物遗传相似性系数在 0.421~0.945 之间, 其中钻裂风铃草与藏滇风铃草的遗传相似度最高为 0.945, 说明它们之间的亲缘关系很近。此外, ISSR 分子标记聚类结果表明, 7 种风铃草属植物可以明显聚为 4 大类: 西南风铃草、灰毛风铃草、灰岩风铃草为一类; 紫斑风铃草与流石风铃草各成一类, 这两种在形态上与其它各种风铃草差异较大; 最后是钻裂风铃草与藏滇风铃草为一类。

关键词: 风铃草属, ISSR 分子标记, 遗传多样性

中图分类号: S688 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)06-0818-07

ISSR analysis on genetic relationships among seven species in *Campanula*

BAO Zhiyuan^{1,3}, QU Jipeng², YANG Zaijun^{1*}, LU Lu⁴,
LIAO Mingli¹, ZHOU Mengxia¹, PENG Zhengsong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation / Ministry of Education, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China; 2. School of Agricultural Sciences, Xichang College, Xichang 615013, Sichuan, China; 3. Zhejiang Jianyuan Architectural Design and Urban Planning Institute, Hangzhou 310004, China; 4. College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, Sichuan, China)

Abstract: Genetic relationships among seven species in *Campanula* L. were investigated by inter-simple sequence repeat molecular markers (ISSR). The results showed that 28 of 40 primers can be amplified to clear bands. All the 28 ISSR primers amplified 164 bands, and the proportion of polymorphic fragment was 98.8%. The value of genetic similarity

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目(16JC0022); 西华师范大学英才基金(17YC355) [Supported by the Foundation of Science & Technology Department of Sichuan Province (16JC0022); Talent Fund of China West Normal University (17YC355)]。

作者简介: 包志远(1992-), 男, 安徽六安人, 硕士, 主要从事园林植物资源研究, (E-mail) 13990780923@163.com。

*通信作者: 杨在君, 博士, 教授, 主要从事分子标记开发与辅助育种研究, (E-mail) yangzaijun1@126.com。

(GS) indexes of seven species based on the ISSR data varied from 0.421 to 0.945, and the highest genetic similarity was 0.945 between *C. aristata* and *C. modesta*, which indicated that they had closely relative relationship. Cluster analysis showed that all the species could be divided into four groups: *C. colorata*, *C. cana* and *C. calcicola* in the first group, *C. calcicola* in the second group, *C. crenulata* in the third group, and *C. aristata* and *C. modesta* in the last group. This study provides reference for the molecular marker assisted identification, resource conservation, flower variety development and breeding of *Campanula*.

Key words: *Campanula* L., ISSR molecular marker, genetic diversity

风铃草属 (*Campanula* L.), 是桔梗科植物中种类最多的一个属, 包含了一年生植物和多年生植物共 580~600 种, 主要分布于北半球, 其中以地中海流域作为主要分布点 (Sáez & Aldasoro, 2003)。中国分布有 19 种, 主要分布于西南山区 (四川植物志编辑委员会, 1999; 中国植物志编辑委员会, 1990)。风铃草属植物的花冠似铃铛, 花单生或多朵组成聚伞花序, 花瓣 5 枚, 瓣大, 颜色大多呈现蓝紫色或蓝色, 可作为观赏类花卉应用于园林景观。目前对于风铃草属植物的研究主要集中在物种的鉴定及分类 (Birol, 2004; Yildirim & Senol, 2014)、自交不亲和 (Good-Avila et al, 2008; Good-Avila & Stephenson, 2003; Caser et al, 2010) 和传粉机制等方面 (Schlindwein et al, 2005; Paulo et al, 2015)。关于风铃草属植物亲缘关系的研究至今尚未见报道。而开展风铃草属植物亲缘关系的研究对该属植物的鉴定、园林花卉品种的选育和杂交育种等工作具有重要的意义。

ISSR (inter-simple sequence repeat), 即简单序列重复区间扩增, 是 1994 年由 Zietkiewicz et al (1994) 创建的一种分子标记技术, 现已广泛应用于植物研究中。ISSR 的基本原理就是以短重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 为引物, 来扩增两个序列相同但方向相反微卫星重复序列之间的 DNA 片段 (刘君等, 2012; 卢家仕等, 2013; Phong et al, 2011)。ISSR 引物设计不需要像 SSR 那样需要预先获知基因组序列, 而是通过在 SSR 的 3' 或 5' 端锚定 1~4 个随机简并核苷酸作为引物。相对于其它分子标记而言, ISSR 分子标记操作简单、快捷, 同时兼备 AFLP、SSR 和 RAPD 等分子标记方法的优点 (Lisek & Rozpara, 2010; Sharma et al, 2015; Jabbarzadeh et al, 2013)。ISSR 标记以其高多态性, 已被广泛应用

于遗传多样性、亲缘关系、系统进化以及 SSR 引物开发等方面的研究 (Wang et al, 2013; 王惠梅等, 2015)。本研究利用 ISSR 分子标记技术对分布于四川的 7 种风铃草植物的亲缘关系进行了研究, 旨在了解四川风铃草属植物的资源丰富度和遗传进化情况, 为风铃草属植物的分子标记辅助鉴定、资源保护、花卉品种的开发与育种提供理论基础和参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

2016 年 6—8 月, 分别在四川风铃草属植物的主要分布区康定、稻城、乡城和城口等地采集了 7 种风铃草属植物。每个物种随机选取 20 个个体的新鲜叶片混合, 硅胶迅速干燥后保存备用。实验材料的具体信息如表 1 所示。

1.2 方法

1.2.1 7 种风铃草植物 DNA 的提取 利用多糖多酚植物 DNA 提取试剂盒 (钟鼎生物, 江苏) 分别提取 7 种风铃草叶片的基因组 DNA。具体操作参考试剂盒的说明书进行。DNA 的质量和完整性用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度。提取的 DNA 储存在 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 PCR 反应体系建立及引物筛选 选取 40 条 ISSR 引物序列, 引物由上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 反应总体系为 10 μ L, 包括 5 μ L 2 \times TaqPCR MasterMix (TIANGEN, 北京); 3 μ L ddH₂O; 1 μ L (10 ng \cdot μ L⁻¹) 引物; 1 μ L 基因组 DNA。PCR 的扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 40~70 °C (退

表 1 实验材料以及来源
Table 1 Materials and sources

| 物种 Species | 采集地点 Location | 海拔 Altitude (m) | 植物生境 Plant habitat |
|------------------------------------|---|-----------------------|-------------------------|
| 西南风铃草 <i>Campanula colorata</i> | 康定雅拉乡三道桥 Sandaoqiao, Yala Township, Kangding | 2 719.8~2 740.8 | 林下草地 Understory lawn |
| 灰毛风铃草 <i>C. cana</i> | 康定雅拉乡中谷 Zhonggu, Yala Township, Kangding | 3 078.9~3 128.4 | 公路边沟渠 Roadside ditch |
| 钻裂风铃草 <i>C. aristata</i> | 康定折多山 Zheduo Mountain, Kangding | 3 720.4~4 083.8 | 高山草甸 Alpine meadow |
| 藏滇风铃草 <i>C. modesta</i> | 康定雅拉乡大炮山 Dapao Mountain, Yala Township, Kangding | 3 210.6~3 225.7 | 路边草地 Roadside lawn |
| 流石风铃草 <i>C. crenulata</i> | 稻城周边的山坡 Hillside around Daocheng County | 3 765.4~3 783.6 | 高山草甸 Alpine meadow |
| 紫斑风铃草 <i>C. punctata</i> | 城口县修齐镇 Xiuqi Township, Chengkou County | 803.7~816.2 | 路边边坡 Roadside slope |
| 灰岩风铃草 <i>C. calcicola</i> | 乡城县城周边山坡 Hillside around Xiangcheng County | 2 626.5~2 928.5 | 路边边坡 Roadside slope |

火温度根据具体引物而定)退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 总共 45 个循环;循环完成后 72 °C 继续延伸 5 min, 最后 4 °C 保存。并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 的扩增产物进行检测,用凝胶成像系统拍照并保存图片。

1.2.3 数据的统计与分析 根据凝胶成像系统成像的结果,在图谱同一位置上有电泳条带的赋值为 1,反之则为 0,最终的统计结果表现为 0 和 1 的矩阵图。利用 Anderson et al(1993)方法计算出 *PIC* 的值,即多态性信息量 (polymorphism information content, *PIC*)。计算公式:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1} P_{ij}^2$$

式中, P_{ij} 表示标记 i 的第 j 个带型出现的频率, *PIC* 值的大小与多态性的高低密切相关, *PIC* 值越大,表明多态性越高,其最大值为 1,最小值为 0。

利用聚类分析软件 NTSYS2.1 计算材料之间的遗传相似系数 (*GS*),分析材料间的遗传差异,并通过 UPGMA 方法对 7 种风铃草属植物进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 分子标记多态性分析

从 40 个 ISSR 引物中筛选出 28 个 (70%) 能在

风铃草属植物中扩增出清晰条带的引物,各引物的扩增总条带数、多态性条带数、多态性比率、多态信息量见表 2。28 个引物总共扩增出 164 条条带,每个引物所扩增的条带数范围为 3~10 条,平均 5.9 条。164 个条带中,有 162 个条带具有多态性,多态性条带百分率达到 98.8%。其中,引物 UBC856 扩增出的条带数最多,为 10 条;引物 UBC827、UBC829、UBC847 扩增出来的条带数最少,均为 3 条。按照 Anderson et al(1993)的方法计算了各引物所扩增的位点多态性信息量 (*PIC*) 的值。*PIC* 值的范围为 0.571~0.954,均值为 0.785。*PIC* 值在 0.7 以下的只有引物 UBC827、UBC828、UBC847,其中最小的为引物 UBC827,其值为 0.571。*PIC* 值最大的为引物 UBC829,其值高达 0.954。其中,引物 UBC846 的扩增结果见图 1。

2.2 遗传差异分析

风铃草属植物各种间的遗传相似系数 (*GS*) 见表 3,其变化范围为 0.421~0.945,变化范围较大。其中,西南风铃草与灰毛风铃草、藏滇风铃草与钻裂风铃草的遗传相似性很高,遗传距离很小,*GS* 值分别为 0.823 和 0.945。紫斑风铃草、流石风铃草以及灰岩风铃草与其它风铃草之间的 *GS* 值都较小,说明这三种风铃草与其它风铃草的遗传距离

表 2 ISSR-PCR 扩增产物多态性

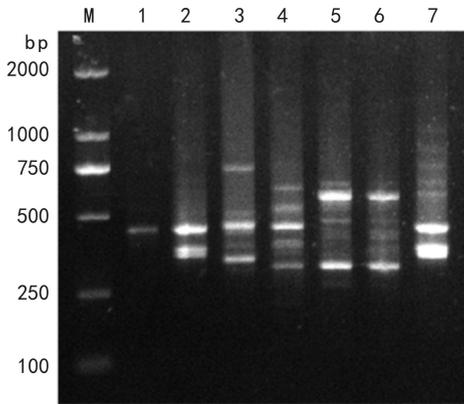
Table 2 Polymorphic amplified products of ISSR-PCR

| 引物名称 Primer name (UBC) | 扩增总条带数 Total No. of amplified band | 多态性条带数 No. of polymorphic band | 多态性比率 Percentage of polymorphic band (%) | 多态信息量 <i>PIC</i> |
|------------------------------|--|-----------------------------------|---|---------------------|
| 808 | 6 | 5 | 83.33 | 0.759 |
| 809 | 7 | 7 | 100.00 | 0.828 |
| 811 | 6 | 6 | 100.00 | 0.827 |
| 816 | 7 | 7 | 100.00 | 0.825 |
| 819 | 6 | 6 | 100.00 | 0.750 |
| 822 | 6 | 6 | 100.00 | 0.801 |
| 823 | 8 | 8 | 100.00 | 0.848 |
| 825 | 6 | 5 | 83.33 | 0.776 |
| 826 | 7 | 7 | 100.00 | 0.837 |
| 827 | 3 | 3 | 100.00 | 0.571 |
| 828 | 4 | 4 | 100.00 | 0.694 |
| 829 | 3 | 3 | 100.00 | 0.954 |
| 830 | 4 | 4 | 100.00 | 0.740 |
| 834 | 5 | 5 | 100.00 | 0.777 |
| 840 | 5 | 5 | 100.00 | 0.777 |
| 846 | 9 | 9 | 100.00 | 0.853 |
| 847 | 3 | 3 | 100.00 | 0.594 |
| 848 | 6 | 6 | 100.00 | 0.786 |
| 849 | 6 | 6 | 100.00 | 0.806 |
| 850 | 5 | 5 | 100.00 | 0.764 |
| 851 | 5 | 5 | 100.00 | 0.777 |
| 854 | 7 | 7 | 100.00 | 0.793 |
| 855 | 5 | 5 | 100.00 | 0.727 |
| 856 | 10 | 10 | 100.00 | 0.885 |
| 857 | 7 | 7 | 100.00 | 0.805 |
| 858 | 7 | 7 | 100.00 | 0.840 |
| 860 | 5 | 5 | 100.00 | 0.796 |
| 873 | 6 | 6 | 100.00 | 0.791 |
| 合计 Total | 164 | 162 | | |
| 平均 Mean | 5.9 | 5.8 | 98.81 | 0.785 |

较大,亲缘关系较远,这也符合它们的形态学特征。其中紫斑风铃草与钻裂风铃草的 *GS* 值最小为0.421,说明它们之间的亲缘关系最远。

2.3 聚类分析

利用 ISSR 遗传相似性矩阵按 UPGMA 方法进行聚类分析,构建了 7 种风铃草属植物的聚类图



注: M. 2 000 bp markers; 1. 西南风铃草; 2. 灰毛风铃草;
3. 紫斑风铃草; 4. 流石风铃草; 5. 钻裂风铃草;
6. 藏滇风铃草; 7. 灰岩风铃草。

Note: M. 2 000 bp markers; 1. *Campanula colorata*; 2. *C. cana*;
3. *C. punctata*; 4. *C. crenulata*; 5. *C. aristata*;
6. *C. modesta*; 7. *C. calcicola*.

图 1 引物 UBC846 对 7 种风铃草属植物的扩增结果

Fig. 1 Amplified results using UBC846 for seven species of *Campanula*

(图 2)。图 2 聚类结果显示,当遗传相似性系数为 0.50 时,7 个物种可以聚为两大类,其中西南风铃草、灰毛风铃草、紫斑风铃草以及灰岩风铃草为第一大类;钻裂风铃草、藏滇风铃草以及流石风铃草为第二大类。从图 2 还可发现,在不同的遗传相似性水平上,第一大类和第二大类又可以继续分出亚类,例如:当遗传相似性系数为 0.54 时,第一大类分出了两个亚类,第一大亚类为西南风铃草、灰毛风铃草以及灰岩风铃草,第二大亚类为紫斑风铃草。当遗传相似性系数为 0.59 时,第二大类也分出了两个亚类,第一大亚类为流石风铃草,第二大亚类为藏滇风铃草和钻裂风铃草。当遗传相似性系数为 0.95 时,七种风铃草全部被区分开。

3 讨论与结论

风铃草属植物种类较多,但在中国的分布较少,仅有 19 种,其中四川也只分布有 9 个种(四川植物志编辑委员会, 1999; 中国植物志编辑委员会, 1990)。本研究在实验材料的采集过程中发现,

表 3 7 种风铃草的遗传相似系数矩阵

Table 3 Genetic similarity matrix based on ISSR polymorphism in seven species of *Campanula*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1.000 | | | | | | |
| 2 | 0.823 | 1.000 | | | | | |
| 3 | 0.542 | 0.476 | 1.000 | | | | |
| 4 | 0.573 | 0.567 | 0.482 | 1.000 | | | |
| 5 | 0.476 | 0.421 | 0.470 | 0.561 | 1.000 | | |
| 6 | 0.494 | 0.451 | 0.488 | 0.567 | 0.945 | 1.000 | |
| 7 | 0.652 | 0.610 | 0.512 | 0.494 | 0.494 | 0.512 | 1.000 |

注: 1. 西南风铃草; 2. 灰毛风铃草; 3. 紫斑风铃草; 4. 流石风铃草; 5. 钻裂风铃草; 6. 藏滇风铃草; 7. 灰岩风铃草。

Note: 1. *Campanula colorata*; 2. *C. cana*; 3. *C. punctata*;
4. *C. crenulata*; 5. *C. aristata*; 6. *C. modesta*; 7. *C. calcicola*.

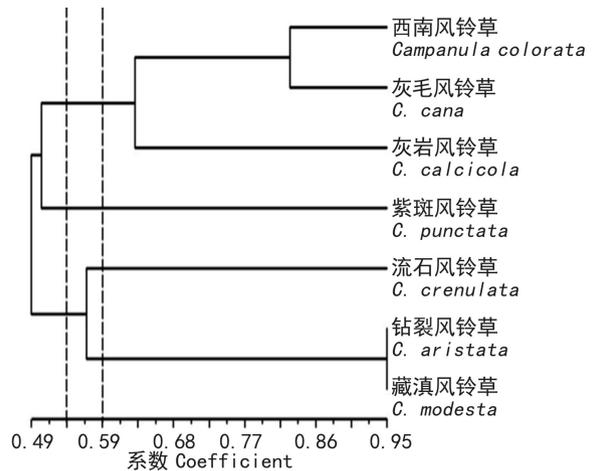


图 2 7 种风铃草的 ISSR 标记聚类结果

Fig. 2 Cluster results of seven species of *Campanula* by ISSR markers

风铃草属植物生长海拔普遍较高,除紫斑风铃草外,其它种均分布在海拔 2 500 m 以上的高山草甸。这些高山草甸是当地牧民的主要放牧区,风铃草属植物也是牦牛、马等家畜的食物,因此风铃草属植物受家畜的干扰很大,加之其生长海拔高、环境恶劣,风铃草属植物的生存环境受到极大的威胁。目前,采集该属植物的标本越发困难,因此

开展该属植物资源调查、亲缘关系研究和引种栽培等研究迫在眉睫。ISSR 标记具有多态性水平高、DNA 用量少、特异性强、稳定可靠等优点,已广泛应用于植物亲缘关系的分析(林乐静等, 2015; 谢伟玲等, 2017; 陈宗游等, 2017)。本研究从 40 条 ISSR 引物中筛选出 28 条能在 7 种风铃草属植物中扩增出清晰且多带性高的条带,它们可以直接应用于这 7 种风铃属植物的亲缘关系分析。

28 条引物扩增出的总条带数为 164,其中有 98.8% 的扩增条带具有多态性,遗传相似性系数在 0.421~0.945 之间,且物种间遗传相似性系数变化较大。这表明 ISSR 可以较好地反应风铃草属植物种间的亲缘关系。供试的 7 种风铃草属植物中,钴裂风铃草与藏滇风铃草,西南风铃草与灰毛风铃的亲缘关系较近。可能是因为钴裂风铃草与藏滇风铃草,西南风铃草与灰毛风铃草的生存环境非常相似且分布区域存在重叠,在长期的自然演变过程中种质相互渗透造成的。聚类结果表明,7 种风铃草属植物可以明显地聚为 4 大类。西南风铃草、灰毛风铃草、灰岩风铃草聚为一类,这 3 个物种具有相似的形态特征,如根胡萝卜状,叶小、边缘有锯齿、背面有毡毛,花冠多呈紫色等(中国植物志编辑委员会, 1990);紫斑风铃草与流石风铃草各自单独成一类,这两种在形态上与其它各种风铃草差异较大;最后是钴裂风铃草与藏滇风铃草为一类。这也说明了形态特征相似的物种往往具有较近的亲缘关系。通过聚类结果,可以发现 7 种风铃草 ISSR 分子标记的聚类结果与传统的分类的结果基本一致。这进一步证实 ISSR 分子标记可以对依靠表型为主的经典植物分类方法起到一个补充作用(Nagaraju et al, 2002)。

风铃草属植物的花冠似铃铛、花大且颜色丰富,具有极高的观赏价值。我国风铃草属植物资源并不丰富,且较多集中于川西地区,加上人为干扰影响,对原始生态环境的破坏,风铃草属资源受到了严重的威胁。因此,需要积极开展风铃草属植物的野生资源调查、引种驯化研究,并在此基础上进一步通过杂交育种培育出观赏价值高的新品种。一般而言,亲本之间亲缘关系越远,杂交后代杂种优势越明显,但杂交成功率也越低。因此,育

种者充分掌握材料的遗传背景信息、有针对地选配亲本是风铃草属杂交育种的重要内容。本研究通过 ISSR 分子标记技术对风铃草属植物的亲缘关系进行了客观的分析,为该属植物的杂交育种和分子标记辅助鉴定奠定了基础。

参考文献:

- ANDERSON JA, CHURCHILL GA, AUTRIQUE JE, et al, 1993. Optimizing parental selection for genetic linkagemaps [J]. *Genome*, 36: 181-186.
- BIROLM, 2004. Additional records of *Raphanus* L. and *Campanula* L. for the flora of Turkey [J]. *Turkish J Bot*, 28(1): 603-607.
- CASER M, SCARIOT V, ARENS P, 2010. Consequences of geographical habitats on population structure and genetic diversity in *Campanula* spp. [J]. *Inter J Plant Biol*, 1(1): 22-29.
- CHEN ZY, HUANG XY, TANG H, et al, 2017. ISSR analysis on genetic diversity for germplasm resources of *Rubus suavis-simus* [J]. *Acta Horti Sin*, 4(1): 161-169. [陈宗游, 黄夕洋, 唐辉, 等, 2017. 广西甜茶种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *园艺学报*, 4(1): 161-169.]
- Editorial Committee of Chinese Flora, 1990. *Flora of China* (Vol. 73) [M]. Beijing: Science Press. [中国植物志编辑委员会, 1990. 中国植物志(第 73 卷) [M]. 北京: 科学出版社.]
- Editorial Committee of Sichuan Flora, 1999. *Flora of Sichuan* (Vol. 10) [M]. Chengdu: Sichuan People's Press. [四川植物志编辑委员会, 1999. 四川植物志(第 10 卷) [M]. 成都: 四川人民出版社.]
- GOOD-AVILA SV, MAJUMDER D, AMOS H, 2008. Characterization of self-incompatibility in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae) through genetic analyses and microscopy [J] *Botany*, 86(1): 1-13.
- GOOD-AVILA SV, STEPHENSON AG, 2003. Parental effects in a partially self-incompatible herb *Campanula rapunculoides* L. (Campanulaceae): influence of variation in the strength of self-incompatibility on seed set and progeny performance [J]. *Am Nat*, 161(4): 615-630.
- JABBARZADEH J, KHOSH-KHUI M, SALEHI H, et al, 2013. Assessment of genetic relatedness in roses by ISSR markers [J]. *World Appl Sci J*, 28(12): 2085-2090.
- LISEK A, ROZPARA E, 2010. Identification of pear cultivars with RAPD and ISSR markers [J]. *J Fruit Orn Plant Res*, 18: 17-22.
- LIN LJ, LIN L, ZHU ZY, 2015. ISSR analysis of the genetic relationships among 25 *Acer* plants germplasm resources [J]. *Guihaia*, 35(1): 9-14. [林乐静, 林立, 祝志勇, 2015. 25 份槭属优良种质资源亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *广西植物*, 35(1): 9-14.]

- LIU J, ZHAO Q, YANG ZM, 2012. ISSR molecular markers analysis of 9 *Bermudagrass* cultivation varieties [J]. Acta Pratac Sin, 21(6): 159–165. [刘君, 赵琴, 杨志民, 2012. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定分析 [J]. 草业学报, 21(6): 159–165.]
- LU JS, PU ZY, LU WL, et al, 2013. ISSR analysis on genetic diversity of germplasm resources in *Dendrobium* SW. from different habitats [J]. Chin Trad Herb Drugs, 44(1): 96–100. [卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等, 2013. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 44(1): 96–100.]
- NAGARAJU J, KATHIRVEL M, KUMAR RR, et al, 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers [J]. Proceed Nat Acad Sci USA, 99(9): 5836–5841.
- PAULO M P, MANFRED A, STEFAN D, 2015. Visual and olfactory floral cues of *Campanula* (Campanulaceae) and their significance for host recognition by an oligolectic bee pollinator [J]. PLoS ONE, 10(6): 1–20.
- PHONG DT, HIEN VT, TANG DV, 2011. Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam [J]. Genet Mol Res, 10(4): 2382–2393.
- SÁEZ L, ALDASORO JJ, 2003. A taxonomic revision of *Campanula* L. subgenus *Sicyocodon* (Feer) Damboldt and subgenus *Megalocalyx* Damboldt (Campanulaceae) [J]. Bot J Linn Soc, 141(2): 215–241.
- SCHLINDWEIN C, WITTMANN D, MARTINS CF, et al, 2005. Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? [J]. Plant Syst Evol, 250(3): 147–156.
- SHARMA V, SHARMA TR, RANA JC, et al, 2015. Analysis of genetic diversity and population structure in Horsegram (*Macrotyloma uniflorum*) using RAPD and ISSR markers [J]. Agric Res, 4(3): 221–230.
- WANG HM, WU GL, JIANG SL, et al, 2015. Genetic diversity of *Zizania latifolia* Griseb. from poyang lake basin based on SSR and ISSR analysis [J]. J Plant Genet Resourc, 16(1): 133–141. [王惠梅, 吴国林, 江绍琳, 等, 2015. 基于 SSR 和 ISSR 的鄱阳湖流域野生茼蒿资源的遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 16(1): 133–141.]
- WANG ZY, LIAO L, YUAN XJ, et al, 2013. Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers [J]. Biochem Syst Ecol, 46: 108–115.
- XIE WL, CHAI SF, JIANG YS, et al, 2017. ISSR analysis on genetic diversity of *Keteleeria calcarea* [J]. Guihaia, 37(1): 36–41. [谢伟玲, 柴胜丰, 蒋运生, 等, 2017. 黄枝油杉遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 广西植物, 37(1): 36–41.]
- YILDIRIM H, 瘙罌 ENOL GS, 2014. *Campanula alisan-kilincii* (Campanulaceae), a new species from eastern Anatolia, Turkey [J]. Turk J Bot, 38(1): 22–30.
- ZIEKIENL CZ E, RAFASHL A, LABUDA D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 20(2): 176–183.