

AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究

索风梅¹, 宋经元¹, 陈士林^{1*}, 王永刚², 梅红芳², Eiji Miki³, Osami Takeda³, 谢彩香¹

- (1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193; 2. 中国医药保健品股份有限公司, 北京 100061; 3. Botanical Raw Materials Research Department, Botanical Raw Materials Division, Tsumura & Co. 3586 Yoshiwara, Amir-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan)

摘要:目的 研究《中国药典》2005 年版收载蓼科大黄属 3 种大黄(唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄)的亲缘关系。方法 对 3 种大黄 44 份样品进行 AFLP 分析,同时利用 NTSYSpc-2.11F 软件分析其亲缘关系。结果 8 对选择性扩增引物中,扩增得到 1 255 条稳定清晰的条带,其中多态性条带 1 209 条,多态性带占总带数的 96.2%。将 44 份大黄样品分为 2 组 2 个亚组。四川若尔盖唐古特大黄聚为第一组,第二组分为两个亚组,分别为药用大黄和掌叶大黄。另外,大黄的 AFLP 分子标记谱带显示,3 种大黄和不同来源的大黄样品间除了具有共有带外,还有一些特异带,说明种间甚至不同来源的样品间有一定程度的特异性。结论 《中国药典》规定的 3 种正品大黄中,药用大黄和掌叶大黄亲缘关系较唐古特大黄近,表明利用 AFLP 技术分析 3 种大黄的亲缘关系可行。

关键词: 大黄; AFLP 分析; 亲缘关系; 蓼科; 大黄属

中图分类号: R282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)02-0292-05

AFLP Analysis on genetic relationship among *Rheum tanguticum*, *Rheum palmatum*, and *Rheum officinale*

SUO Feng-mei¹, SONG Jing-yuan¹, CHEN Shi-lin¹, WANG Yong-gang², MEI Hong-fang²,
EJI Miki³, OSAMI Takeda³, XIE Cai-xiang¹

- (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. China Meheco Corporation, Beijing 100061, China; 3. Botanical Raw Materials Research Department, Botanical Raw Materials Division, Tsumura & Co. 3586 Yoshiwara, Amir-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan)

Abstract : Objective To investigate the genetic relationship of three traditional medicinal rhubarbs (*Rheum tanguticum*, *R. palmatum*, and *R. officinale*). **Methods** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technology and NTSYSpc-2.11F software were used to study and analyze the affinity between 44 wild or cultivated medicinal rhubarbs from different provenances. **Results** The 1 255 bands were amplified by polymerase chain reactions with eight screened and reliable primers. Among them 1 209 (96.2%) bands showed polymorphic. The 44 different rhubarbs were categorized into two groups by cluster analysis. *R. tanguticum* belonged to Group , while *R. palmatum* and *R. officinale* were clustered to Group . In addition, there were some specific bands among all amplification bands. This result indicated the rhubarbs originated from the different species and provenances had specific DNA bands and may be authenticated according to the characteristics. **Conclusion** Compared to *R. tanguticum*, the genetic relationship between *R. palmatum* and *R. officinale* is closer. AFLP Technique is proved to be a very effective method to study the genetic relationships of medicinal rhubarbs.

Key words : rhubarb; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic relationship; Polygonaceae; *Rheum L.*

* 收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 国家中医药管理局中医药行业科研专项(200707007); 中国医药保健品股份有限公司、日本津村与中国医学科学院药用植物研究所合作项目资助

作者简介: 索风梅(1976—), 女, 河北邯郸人, 硕士学位, 主要从事药用植物资源学研究。 Tel: 13641110813 E-mail: sfm78@163.com

* 通讯作者: 陈士林 Tel: (010) 62899700 E-mail: shilinch@implad.ac.cn

大黄是世界上应用广泛的重要植物药之一,日本、韩国、英国等 19 个国家的法定药典将大黄定为可使用的药物。中国的《神农本草经》、《本草纲目》中均有收载。大黄性寒、味苦,有泻火通便、活血祛瘀、利胆退黄之功效。近代研究证明大黄还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、降血压、健胃、利胆、调节免疫等作用^[1]。《中国药典》2005 年版收载的大黄为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 和药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎。大黄属植物在全世界有 60 种,我国多达 45 种,主要分布于青海、西藏、四川、甘肃等地,在青藏高原分布有 23 种^[2]。目前国内外对大黄的众多研究主要集中在化学、药理和资源调查等方面,而对其种间和种内遗传分化和变异的研究则很少。杨美华等^[3,4]用 RAPD 方法对正品和伪品大黄进行指纹图谱的研究,为正品和伪品大黄的基原鉴定提供分子依据;同时通过对 13 种大黄属 26 个居群 49 个植物样本叶绿体 trnL (UAA)/trnF (GAA) 间隔区的测序分析,找到了大黄属分子标记,并由此设计了大黄的特异性 PCR 扩增引物用于鉴别大黄。肖培根等^[5]曾经对大黄属植物亲缘关系、化学成分与疗效间联系性进行了研究,结果表明,除拉萨大黄 *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao 外,本属植物普遍含有蒽醌类衍生物,但具有明显泻下作用、符合药用商品大黄标准的种类仅限制在掌叶组 Sect. Palmata 的植物中,如掌叶大黄、鸡爪大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Regel 和药用大黄等种类,但并没有研究 3 者之间的亲缘关系。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术被认为是迄今为止最为有效的 DNA 指纹技术,因其信息量大、灵敏度高、重复性好等优点,在分子系统学的研究中得到了广泛应用^[6]。它可以一次检测到基因组中很多随机分布的位点,被认为是估计个体间、群体间和种群间遗传距离的有效手段,同时也是研究群体遗传多样性水平和优良育种遗传关系的有力工具^[7]。在栽培植物及野生近缘种的亲缘关系研究中,充分显示出巨大优越性,近年来也逐渐应用于药用植物诸如牡丹、栀子、紫薇等^[8-10]的亲缘关系研究,均取得较好的研究结果。本研究在全面调查大黄资源分布区域的基础上,采用 AFLP 分子标记技术来研究 3 种大黄亲缘关系及种间基因组的相互关系,寻找 3 种大黄的系统进化与起源的分子证据,为科学合理地保护和利用现

有的大黄资源提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料:本实验所使用的实验材料唐古特大黄 C1~C29 采自四川若尔盖野生抚育基地;药用大黄 C30~C37 分别采自四川阿坝松坪沟、酉阳土家族苗族自治县、万源钟亭乡、皮窝乡、平武县阔达乡、阿坝松潘县、天全县小河乡、平武县土城乡;掌叶大黄 C38~C44 采自甘孜州新都桥、阿坝松坪沟、甘肃礼县白关乡、洮坪乡、铨水乡、桥头乡。经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员、中国科学院植物研究所李安仁教授鉴定。取其幼嫩叶片,用纱布擦拭干净,立即放于硅胶袋中,干燥后室温保存备用。

1.2 AFLP 分析方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取:采用 CTAB 法^[11]提取基因组 DNA,并根据实验条件进行了优化。

1.2.2 接头和引物:从 64 对 AFLP 引物中筛选出 8 对带型分布均匀、多态性高且分辨力强的引物进行 AFLP 分析,见表 1。

1.2.3 酶切与连接:本实验参照 Vos Hogers 等^[6]的方法并略有修改,首先采用 NEB (New England BioLabs) 公司提供的两种限制性内切酶 *Mse* 和 *EcoR* 对基因组总 DNA 进行双酶切,然后用 T4DNA 连接酶,将 *Mse* 和 *EcoR* 接头与酶切片断连接起来,酶切连接一步完成,其中酶切体系 (20 μ L) 包括对照模板 DNA:4 (50 ng/ μ L);Adapter:1 μ L;*EcoR* /*Mse*:2 μ L;10 $\times$ Reaction buffer:2.5 μ L;10 mmol/L ATP:2.5 μ L;T4 Ligase:1 μ L;AFLP-Water:7 μ L。混匀离心数秒,37 $^{\circ}$ C 保温 5 h,8 $^{\circ}$ C 保温 4 h,4 $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.4 PCR 预扩增:连接产物用预扩增引物进行预扩增,预扩增的反应体系 (25 μ L 反应体系) 为:酶切连接后模板:2 μ L;Pre-ampmix:1 μ L;dNTPs:1 μ L;10 $\times$ PCR buffer:2.5 μ L;*Taq* DNA polymease:0.5 μ L; H_2O :18 μ L。混匀,离心数秒,然后用 Gene Amp RCR System 9600 (Perkin Elmer, 美国) 进行扩增,其反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;然后进行 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.5 PCR 选择性扩增反应 (25 μ L 体系):用 AFLP-TE 将预扩产物 1:20 稀释,作为选扩模板;在 0.2 mL 离心管中,依次加入:2 μ L 模板;2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer;0.5 μ L dNTPs;1 μ L *EcoR* 引物 (共 8 种);1 μ L *Mse* 引物 (共 4 种);0.5 μ L *Taq* 酶;17.5 μ L H_2O 。然后混匀,离心数秒,按下列参

数 PCR 循环。一轮扩增参数:94 ,30 s;65 ,30 s;72 ,80 s;以后每轮循环温度递减 0.7 ,扩增 12 轮;接着按下列参数扩增 23 轮:94 ,30 s;55 ,30 s;72 ,80 s。

表 1 DNA 接头和 AFLP 引物序列

Table 1 DNA Adapters and primers sequence in AFLP

接头和引物	核苷酸序列
<i>EcoR</i> 接头	5'CTC GTA GAC TGC GTA CG-3' 5'AAT TGG TAC GCA GTC TAG-3'
<i>Mse</i> 接头	5'GAC GAT GAG TCC TGA G-3' 5'TAC TCA GGA CTC AT-3'
<i>EcoR</i> 预扩增引物	
<i>EcoR</i> 选择性扩增引物 (5 ng ·μL ⁻¹)	5'GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
E1	5'GAC TGC GTA CCA ATT CAAG-3'
E2	5'GAC TGC GTA CCA ATT CAAG-3'
E3	5'GAC TGC GTA CCA ATT CACA-3'
E4	5'GAC TGC GTA CCA ATT CACT-3'
E5	5'GAC TGC GTA CCA ATT CACG-3'
E6	5'GAC TGC GTA CCA ATT CACG-3'
E7	5'GAC TGC GTA CCA ATT CAGC-3'
E8	5'GAC TGC GTA CCA ATT CAGG-3'
<i>Mse</i> 预扩增引物	
<i>Mse</i> 选择性扩增引物 (30 ng ·μL ⁻¹)	5'GAC GAG TCC TGA GTA AG-3'
M1	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
M2	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
M3	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
M4	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
M5	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACT A-3'
M6	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
M7	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
M8	5'GAT GAG TCC TGA GTA ACT T-3'

所有 PCR 扩增反应均在 Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer,美国)上进行。

1.2.6 PCR 产物检测:取 1 μL PCR 产物加上 1 μL 内标(GENE-MARK500)和 1 μL 变性液于 95 放置 2 min,冰浴,然后置于 -20 冰箱用于电泳检测。选扩产物的检测条件为:1)预电泳:20~30 min;2)点样;3)电泳:2.5 h(电压 1200 V)。电泳大约 1 h,小片段会先跑到胶的底部,测序仪激光管开始收集条带。电泳结束后,打开胶图即可分析结果。(胶图由测序仪软件自动生成,条带密集处为小片段——胶图下方)。

所使用的电泳仪为北京 DG—双稳数显电泳仪,电泳槽为 DG—3D 大型水平电泳槽,均为北京鼎国生物技术有限责任公司生产。

1.2.7 AFLP 图谱和数据分析:利用 ABI PRISM 377 Sequencer 进行 AFLP 多态性分析,选择 Run Module:GS Run 36F-2400 即可采集到清晰的 AFLP 指纹图谱;再利用 GeneScan3.1 软件将 44 份

样品、8 对引物组合扩增出的电泳图谱转化为相对分子质量数据,再根据图谱中同一位置 DNA 带的有无,转化为 0,1 数据矩阵。

用 NTSYSpc-2.11F 软件进行数据分析,对原始矩阵用 SimQual 程序求 DICE 相似系数矩阵,并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析,并通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 模板质量检测与定量:高质量的基因组 DNA 是 AFLP 实验和数据分析成功的前提。采用优化后的 CTAB 法提取大黄的基因组 DNA,可有效去除多糖和酚类的干扰。通过琼脂糖凝胶电泳检测显示:点样孔杂质少,DNA 无降解,带型整齐,质量浓度在 150 ng/μL 左右,见图 1。经紫外分光光度计检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.80~1.83,计算 DNA 质量浓度与电泳检测相比基本一致。

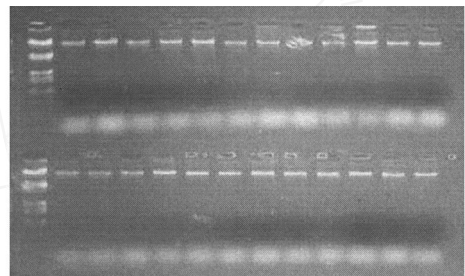


图 1 大黄基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of three traditional medicinal rhubarbs

2.2 酶切连接的结果检验:AFLP 实验过程要经过基因组 DNA 提取、酶切、连接、预扩增、选择性扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳等一系列步骤。其中酶切、连接是否完全直接影响到 AFLP 实验结果的准确性,因此需要对连接结果进行检验,而预扩增电泳结果可间接反映出连接的效果。从图 2 可以看出,DNA 酶切片段凝胶电泳后分散呈均匀的弥散状,扩增片段大多集中在 250~1600 bp,说明酶切较完全,接头连接较好。

2.3 选择性扩增结果及 AFLP 扩增图谱分析:引物具有较好的稳定性和多态性是下一步基因组扩增成败的关键因素,尤其是对于种内的扩增,由于种内个体之间除自然变异外,基因型没有太大的差异,如果没有多态性强、稳定性好的引物很难区别个体内的差异,因此在大量的引物中筛选出合适的组合就显得尤为重要,本实验通过对 64 对引物组合的筛选,选出 8 对具多态性和清晰度都较高的引物组合,共扩增获得 1255 条带,平均每对引物组合产生

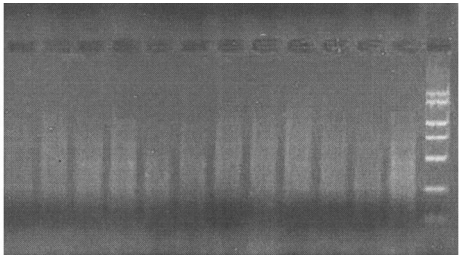


图 2 预扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of AFLP pre-amplification products

156.88 条带,其中 1 209 条带是多态性的,多态位点百分率为 94.4%~99.4%,平均为 96.2%,种间的区分率为 100%,见表 2。可以看出 AFLP 检测大黄的遗传多样性效率很高,具有的多态性位点比较丰富。图 3 显示引物组合 E-AGG/M-CTG 对部分供试样品进行 AFLP 选择性扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。该引物在 44 份大黄样品中共扩增出位点 160 个,其中多态性位点 153 个,占 95.6%。可见大黄种间在 DNA 结构上存在相当大的差异,具有较高的遗传多样性,是 AFLP 技术分析 3 种大黄亲缘关系的基础,可作为鉴定不同品种和不同产地大黄的依据。

表 2 8 对引物对大黄的的选择性扩增的多态性和多态率
Table 2 Polymorphism amplified by eight selected primer combinations from three traditional medicinal rhubarbs

引物组合	扩增谱带数	多态性谱带	多态位点百分率/%
E-AGC/ M-CAA	148	143	96.6
E-AGC/ M-CAG	158	153	96.8
E-AGC/ M-CAT	150	142	94.7
E-AGC/ M-CTG	178	177	99.4
E-AGG/ M-CAA	143	138	96.5
E-AGG/ M-CAG	160	151	94.4
E-AGG/ M-CAT	158	152	96.2
E-AGC/ M-CTG	160	153	95.6
总和	1 255	1 209	
平均	157	151	96.2

2.4 《中国药典》收载 3 种大黄的聚类分析:基于大黄样本间的遗传距离 Nei (1972) 系数进行 UPGMA 聚类分析,可直观分析种间和种内的遗传关系(图 4)。经过比较分析得到如下结果:(1)在系统树状图中,当遗传相似性水平取 0.71 时,可以将品种明显分为 2 组,第 1 组包括的样品数较多,共有 29 份,全部为四川若尔盖的唐古特大黄,第 2 组包括 15 份大黄样品,在相似系数 0.72 处分为两个亚组,来自四川阿坝松坪沟、西阳土家族苗族自治县、万源钟亭乡等不同产地的药用大黄全部聚在一起,甘肃礼县的白关乡、洮

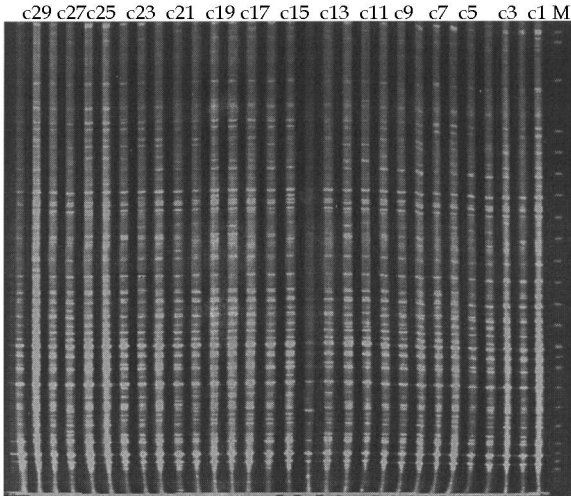


图 3 泳道 1~29 为四川若尔盖野生抚育基地唐古特大黄的 AFLP 扩增谱带(E-AGG/M-CTG)

Fig 3 Banding patterns 1—29 of R. tanguticum amplified by selected primer combination (E-AGG/M-CTG)

坪乡、铨水乡、桥头乡的掌叶大黄先聚在一起,再和甘孜州新都桥的掌叶大黄聚为一组。AFLP 聚类结果表明:药用大黄和掌叶大黄的遗传距离较近,二者先聚在一起,与四川若尔盖的唐古特大黄相距较远,表明药用大黄和掌叶大黄的亲缘关系相对唐古特大黄较近。(2)3 种大黄的亲缘关系和来源有一定相关性,但并不十分明显,其特征可概括为大聚集,小混杂,在聚类图中,不同产地的药用大黄和甘肃礼县的掌叶大黄明显分开,二者又与唐古特大黄分成两组,但在每一组或亚组中,不同来源和产地的大黄有相互混杂的现象,如在药用大黄亚组中,四川阿坝松坪沟和重庆酉阳土家族苗族自治县的样品聚在了一起,而与阿坝其他样品遗传距离相对较远;另外四川阿坝州松坪沟的掌叶大黄却与药用大黄组聚在一起,引起这种结果的可能是由于长期的引种驯化,使其基因型发生改变造成的。(3)从聚类图中还可以看出,3 种大黄的遗传变异极为丰富,即使是来源地相同的大黄也表现较大的遗传变异,如甘肃礼县的掌叶大黄,它们之间的相似系数仅为 0.78~0.82,四川若尔盖的野生抚育唐古特大黄单独聚为一类,其相似系数为 0.73~0.81,均表现出较大的遗传分化,说明大黄的人工选择程度很低。

3 讨论

本研究根据遗传距离对 3 种大黄 44 份样品进行 UPGMA 聚类,结果显示:药用大黄和掌叶大黄聚为一组,表明其遗传距离和亲缘关系较近,这与吴家坤等在国产大黄属的新分类群中的研究结论有一

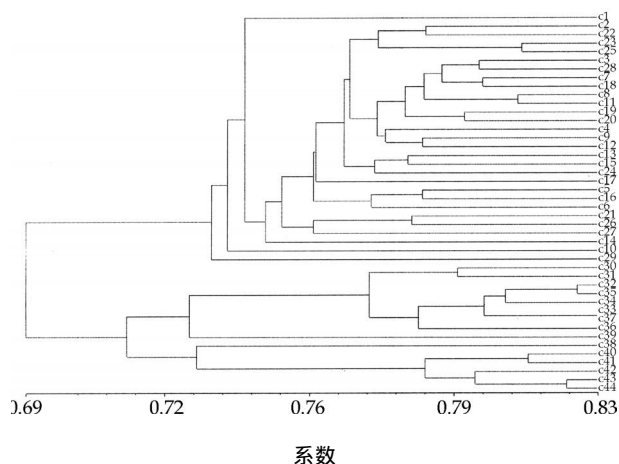


图 4 3 种大黄基于遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig 4 UPGMA Dendrogram of three kinds of rhubarbs based on genetic distances

定的相似性,该研究初步认为药用大黄和掌叶大黄实为一种——即秦岭大黄,是地区性特有种,也可能是掌叶组类群中较原始种系的子遗后裔,其发生演进与古今秦岭植物地理演变密切相关^[12],目前国内外关于大黄亲缘关系的文献较少,肖培根等曾对大黄属植物从化学成分、疗效与亲缘关系的联系性进行了研究,把包括 3 种大黄在内的掌叶组作为一个整体,将它与波叶组、心叶组等 6 个组进行比较研究其亲缘关系^[5]。本研究在此基础上首次应用 AFLP 分析技术对掌叶组内的药典收载 3 种大黄(药用大黄、掌叶大黄和唐古特大黄)的亲缘关系远近进行探讨,进一步证实了应用 AFLP 技术分析药用植物亲缘关系的可行性。

了解大黄遗传变异的空间分布格局对于制定科学的保护和开发策略有着重要的意义。大黄的 AFLP 实验结果表明,44 份不同来源的 3 种大黄样品均能用 AFLP 技术遗传距离的远近较好地区分开来,从大黄的 AFLP 分子标记谱带来看,3 种大黄和不同来源的大黄样品间除了具有共有带外,还有一些特异带,说明种间甚至不同来源的样品间都有一定程度的特异性,可以作为分子鉴定的重要依据。同时对于四川若尔盖的唐古特大黄,由于其遗传变异性系数较大,保护时应充分予以重视以保护特有基因和基因多样性,同时本研究通过 8 对高效的引物,共扩增出 1 255 条带,多态性条带共计 1 209 条,多态位点百分率平均为 96.21%。可见,AFLP 检

测大黄的遗传多样性效率很高,也表明 AFLP 分析产生的总条带数、多态性条带、多态率都明显高于 RAPD、ISSR 等分析方法,表现出高效、快速、准确和多态性丰富等特点,可以作为品种鉴别和亲缘关系的参考依据。

同时,通过本研究可以得出 3 种大黄不同样品间的遗传距离和地理分布并没有显著的相关性,如在掌叶大黄亚组中,四川甘孜州新都桥的大黄与甘肃礼县的大黄明显分开,但在药用大黄亚组中,四川阿坝松坪沟和重庆酉阳土家族苗族自治县的样品聚在了一起,而与阿坝其他药用大黄样品遗传距离相对较远,造成这种结果的原因可能是由于 AFLP 分析是直接从 DNA 分子水平上检测碱基序列的变化,是对整个基因组 DNA 多态性检测的综合结果,而物种的表观性状随海拔等地理环境的变化而具有高度的可塑性或变异性,从而二者的聚类结果出现不同程度的差异。在自然界中,物种的遗传和变异现象非常复杂,需要深入地了解其内在的遗传变异规律,才可以得出较为客观的结论。

参考文献:

- [1] 上官杰. 大黄的研究概况[J]. 中华临床医药, 2003, 4(3): 79-80.
- [2] 李福安, 李建民. 青藏高原大黄资源应用与开发研究进展[J]. 青海医学院学报, 2001, 22(3): 39-41.
- [3] 杨美华, 张大明, 刘健全, 等. 正品和伪品大黄的 RAPD 指纹图谱鉴定研究[J]. 中草药, 2003, 34(6): 557-560.
- [4] Yang M H, Zhang D M, Liu J Q. A molecular marker that is specific to medicinal rhubarb based on chloroplast trnL/trnF sequences[J]. Planta Med, 2001, 67: 784-786.
- [5] 肖培根, 陈碧珠, 王立为, 等. 大黄属植物的亲缘关系、化学成分与疗效间联系性的初步研究[J]. 药学报, 1980(1): 35-41.
- [6] Vos Hegers R, Bleeker M, Reijans M, et al. AFLP: a technique for DNA fingerprinting[J]. Nucl Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [7] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. Tree, 1999, 14(10): 389-394.
- [8] 侯小改, 尹伟伦, 李嘉珏, 等. 牡丹矮化品种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 北京林业大学学报, 2006, 38(5): 73-77.
- [9] 韩建萍, 陈士林, 张文生, 等. 椴子道地性的分子生态学[J]. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2385-2388.
- [10] 王 献, 张启翔, 杨秋生. 利用 AFLP 技术研究紫薇的亲缘关系[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(1): 59-63.
- [11] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [12] 吴家坤, 张登科, 杨永康. 国产大黄属的新分类群[J]. 西北植物学报, 1992, 12(4): 309-315.