

吴茱萸遗传多样性的 SRAP 分析

魏宝阳^{1,2}, 曹亮¹, 李顺祥^{1,3*}, 黄丹^{1,3}, 卢向阳²

1. 湖南中医药大学 中药现代化教育厅重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

3. 湖南省中医药研究院 中药新药研究与开发省重点实验室, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 分析不同产区吴茱萸的遗传多样性。方法 应用 SRAP 技术对吴茱萸的遗传背景进行研究, 试剂盒提取吴茱萸幼嫩叶片基因组 DNA, 构建 SRAP 试验体系, 筛选引物并对 35 份样品进行遗传背景的研究, 用 NTSYS-pc 2.1 软件对 SRAP 扩增结果进行聚类分析。结果 从 100 对 SRAP 引物中优选 10 对用于吴茱萸遗传背景的研究, 其中两对引物可有效鉴别吴茱萸品种, 分别为 Me4+Em1 和 Me9+Em10。10 对引物共扩增得到清晰条带 188 条, 其中共有条带 43 条, 多态性条带 145 条, 多态性比率为 77.1%。聚类结果显示在相关系数为 0.52 时, 吴茱萸与密果吴茱萸分居两群; 在相似系数为 0.62 时, 共分为 3 大类群。吴茱萸中的石虎变种比吴茱萸原变种的遗传差异更显著; 石虎品种呈现出较强的地缘相关性, 特别是海拔因素明显。结论 吴茱萸遗传背景差异明显, SRAP 分析可有效鉴别不同品种的吴茱萸, 并检测到地区间的差异。

关键词: 吴茱萸; 石虎; SRAP; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2523-06

SRAP analysis on genetic diversity of *Euodiae Fructus*

WEI Bao-yang^{1,2}, CAO Liang¹, LI Shun-xiang^{1,3}, HUANG Dan^{1,3}, LU Xiang-yang²

1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Modernization, Ministry of Education, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. School of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3. Key Laboratory of New Drug Research and Development of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To research the genetic diversity of *Euodiae Fructus* from different habitats. **Methods** Molecular markers of SRAP was used to investigate the genetic background of *Euodiae Fructus*, and the genomic DNA in the young leaves of *Euodiae Fructus* was extracted by DNA extraction Kit and then the SRAP reaction system was established. We selected SRAP primers and did SRAP analysis on 35 individuals of *Euodiae Fructus*. The NTSYS-pc 2.1 software was used to do cluster analysis. **Results** Optimizing ten out of the original 100 pairs of primers to select the genetic background; Among them two pairs of primers Me4 + Em1 and Me9 + Em10 were detected to efficiently discriminate the primers of *Euodiae Fructus*. The whole ten pairs of primers produced 188 clear bands, among which there were 43 common bands and 145 polymorphic bands, and the PPB was 77.1%. The cluster analysis revealed *Euodia compacta* and *E. rutaecarpa* var. *officinalis* were separated into two populations when the cluster was in correlation coefficient of 0.52, and into three big populations when the coefficient up to 0.62. SRAP analysis revealed that genetic differences in *E. rutaecarpa* var. *officinalis* were more significant than those in *E. rutaecarpa* with a stronger geo-related relevance, especially at different altitudes. **Conclusion** Differences of genetic background of *Euodiae Fructus* are obvious, SRAP analysis method can be used to identify the different species of *Euodiae Fructus* and detect the genetic characteristics of inter-regional differences.

Key words: *Euodiae Fructus*; *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang; SRAP; genetic diversity; cluster analysis

吴茱萸为芸香科植物, 始载于《神农本草经》, 理气止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效。吴茱萸果列为中品, 性热, 味辛、苦; 有小毒。具温中散寒、实中含挥发油、脂肪酸、生物碱等多种化学成分^[1],

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973877); “十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAI09B02); 湖南省科学技术厅科技项目(2011FJ3104); 湖南省高校科技创新团队资助项目(湘教通[2010]212号)

作者简介: 魏宝阳(1974—), 男, 湖南湘乡人, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: xxwbymushroom@163.com

*通讯作者 李顺祥 Tel: (0731)88458229 E-mail: lishunxg@yahoo.com.cn

临床用于治疗偏头痛、湿疹、高血压、溃疡性口腔炎、消化不良等。吴茱萸属植物约有 150 种, 分布于亚洲、非洲东部及大洋洲, 我国约有 20 种 5 变种, 其中作为吴茱萸药用的《中国药典》2010 版一部收录的有 3 种: 吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth.、波氏吴茱萸即疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang。其中石虎和疏毛吴茱萸合称小花吴茱萸, 吴茱萸称大花吴茱萸, 主产贵州、湖南、浙江等省。在有些地区, 一些吴茱萸属的其他品种也作为药用, 如密果吴茱萸、华南吴茱萸等^[2]。

吴茱萸药材全国低纬度地区均有种植, 20 世纪 90 年代末吴茱萸药材价格较高, 因此许多省市开辟种植基地, 但在实地考察中发现各地吴茱萸品种形态变异显著, 果实成熟期差异明显, 种植基地经常栽种一些没有药用价值的非药材品种, 而且许多基地的繁殖方式为直接挖取多年生植株根发出的小树苗, 没有良好的品种优势, 因此对吴茱萸种质资源进行研究, 规范品种使用, 培育优良品种, 合理规划种植区域显得尤为重要。应用于遗传背景分析的分子标记方法有多种, 其中 SRAP 技术是最先由 Li 等^[3]于 2001 年提出并逐步发展起来的技术, 该技术巧妙设计引物, 对 ORF 序列进行扩增^[4], 能够得到重复性好, 多态性丰富的条带, 充分反映品种间的

差异, 已经被应用到药用植物如黄芪、红花、砂仁、栝楼、人参等及农作物青稞^[5-10]等的遗传分析和品质鉴定中, 取得了良好的效果, 但在吴茱萸品种中的应用国内外还无相关报道。本实验应用 SRAP 技术研究吴茱萸不同品种差异, 找到有效的鉴别手段, 分析全国 9 个不同地区吴茱萸植株遗传差异, 探讨不同产地的吴茱萸品质差异与遗传背景差异的关系。

1 材料与仪器

1.1 材料

2009 年 7~9 月采集重庆秀山、彭水、酉阳, 贵州铜仁, 湖南新晃、浏阳、娄底、湘乡, 江西万载吴茱萸样品。用随机采集方法获取样品, 采集部位为枝端嫩叶, 样品经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang, 以及两株密果吴茱萸 *Euodia compacta* Hand.-Mazz., -80 °C 超低温冰箱保存, 样品采集来源见表 1。

SRAP 引物在金思特科技(南京)有限公司合成; Taq DNA Polymerase, 100 bp ladder, dNTP, 植物 DNA 快速提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖为 Biowest Agarose, 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关试剂均为 Amresco 分装, 其他试剂均为国产分析纯。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	名 称	产 地	海拔/m	编号	名 称	产 地	海拔/m
1	吴茱萸	江西万载	110	19	石虎	湖南新晃	418~422
2	吴茱萸	江西万载	110	20	石虎	湖南新晃	418~422
3	石虎	江西万载	99~112	21	石虎	湖南新晃	418~422
4	石虎	江西万载	99~112	22	石虎	湖南新晃	418~422
5	吴茱萸	湖南浏阳	105~115	23	石虎	贵州铜仁	650~672
6	吴茱萸	湖南浏阳	105~115	24	石虎	贵州铜仁	650~672
7	吴茱萸	湖南浏阳	105~115	25	石虎	贵州铜仁	650~672
8	吴茱萸	湖南浏阳	105~115	26	密果吴茱萸	贵州铜仁	672
9	吴茱萸	湖南浏阳	105~115	27	吴茱萸	重庆彭水	482~490
10	石虎	湖南浏阳	105~115	28	吴茱萸	重庆彭水	482~490
11	石虎	湖南浏阳	105~115	29	吴茱萸	重庆彭水	482~490
12	石虎	湖南浏阳	105~115	30	吴茱萸	重庆酉阳	652~661
13	吴茱萸	湖南湘乡	107~113	31	吴茱萸	重庆酉阳	652~661
14	吴茱萸	湖南湘乡	107~113	32	吴茱萸	重庆酉阳	652~661
15	吴茱萸	湖南湘乡	107~113	33	石虎	重庆秀山	532
16	石虎	湖南娄底	160~194	34	石虎	重庆秀山	532
17	石虎	湖南娄底	160~194	35	密果吴茱萸	重庆秀山	501
18	石虎	湖南娄底	160~194				

1.2 仪器

T-Gradient Thermoblock PCR 仪 (Biometra 公司); U410 Ultra Low Temperature Freezer 超低温冰箱 (Premium 公司); D—78532 Tuttlingen 高速冷冻离心机 (Hettich Zentrifugen 公司) Mikro 22R; HVE—50 高温灭菌锅 (Hirayama 公司); PL 5124 Purelab Plus UV/UF PALL 超纯水系统; DYCZ—28D 电泳仪 (北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 吴茱萸基因组 DNA 的提取

利用植物 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 并稍加改进: 将提取缓冲液 700 μL 加入到

约 0.05 g 液氮研磨粉中, 水浴 40 min, 然后用酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)抽提, 并于 20 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 r/min 离心 10 min 得上清液, 再用三氯甲烷-异戊醇(24:1)抽提, 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 用提取缓冲液混合, 然后按试剂盒操作, 并用 70 μL TE 洗脱, 重复洗脱 1 次, 取 3 μL 电泳检测, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存样品。

2.2 SRAP 分析方法

2.2.1 SRAP 引物的筛选 对所合成的 20 条选择性引物 (Me 10 条, Em 10 条) 正反组合共 100 对进行筛选, 选择其中扩增效果较好的引物用于 SRAP 分析。引物见表 2。

表 2 吴茱萸多态分析的 SRAP 引物

Table 2 Polymorphic analysis on *Euodiae Fructus* by SRAP primers

编号	正向引物	编号	反向引物
Me1	TGA GTC CAA ACC GGA TA	Em1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
Me2	TGAGTC CAA ACC GGA GC	Em2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me3	TGAGTC CAA ACC GGA AT	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me4	TGAGTC CAA ACC GGA CC	Em4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Me5	TGAGTC CAA ACC GGA AG	Em5	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me6	TGAGTC CAA ACC GGA CA	Em6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me7	TGAGTC CAA ACC GGA CG	Em7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me8	TGAGTC CAA ACC GGA CT	Em8	GAC TGC GTA CGA ATT CAC
Me9	TGAGTC CAA ACC GGA GG	Em9	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Me10	TGAGTC CAA ACC GGA AA	Em10	GAC TGC GTA CGA ATT CAT

2.2.2 SRAP 分析方法及体系 SRAP 的 PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 20 mmol/L Mg^{2+})2.5 μL , dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL , DNA 模板 (50 ng/ μL) 1.0 μL , Em 上游引物 (10 pmol/ μL) 1.5 μL , Me 下游引物 (10 pmol/ μL) 1.5 μL , Taq DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.5 μL , 无菌去离子水 17.5 μL , 总体积 25 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 32 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 16 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

2.2.3 电泳及显影观察 PCR 扩增产物中加入 10 μL 的变性上样缓冲液 (99%甲酰胺, 0.25%二甲苯青, 0.25%溴酚蓝, 10 mmol/L EDTA)。90 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上冷却, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存产物。

配制 8%聚丙烯酰胺凝胶, 室温凝结 1.5 h, 然后进行梯度电泳, 电泳槽的负极也就是上槽加入 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液, 下槽用 1 倍体积 3 mol/L 的醋酸

钠溶液和 2 倍体积的 1 $\times$ TBE 缓冲液^[11]。用缓冲液将点样孔中的尿素充分冲洗, 先预电泳 20 min, 电压 300 V。然后再冲洗点样孔 1 次并上样, 上样量为 8 μL , 并用 100 Ladder Marker 做参照。电压采用 270 V, 2.5 h 电泳后用银染方法进行染色。

将凝胶从胶板取下, 用去离子水洗涤 2 遍, 再用 10%的乙醇溶液 (1 L 加入 2.5 mL 冰醋酸) 固定 6 min, 然后用去离子水洗涤 1 遍, 用 0.2% AgNO_3 溶液银染 12 min, 去离子水洗涤 2 次, 时间分别为 30 s 和 10 s, 显影液 (1%的 NaOH+甲醛) 显影, 条带清晰后, 蒸馏水洗涤 1 遍, 用 Na_2CO_3 溶液保存, 并对显色后的胶块拍照。

2.3 遗传背景的分析

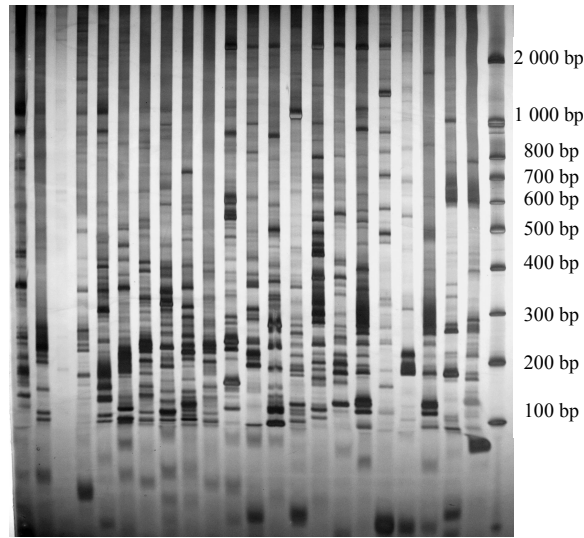
用选择的引物对所有样品进行扩增, 获得扩增的多态图谱, 记录凝胶图谱上 100~1 500 bp DNA 条带的有或无, 条带清晰可辨的记为 “1”, 缺失或模糊不清的记为 “0”, 将观察的结果以 Excel 形式

输入计算机，用 NTSYS-pc 2.1 软件进行数据转换，得到 NTS 数据，按加权配对法（UPGMA）进行 SAHN 聚类分析。聚类结果通过“MxComp”计算得到聚类树 Coph 值和 SM 计算所得 SQ 数据的相关系数。

3 结果与分析

3.1 SRAP 引物筛选

对 100 对引物进行筛选，选择 10 对引物用于吴茱萸遗传背景的研究，引物扩增电泳结果见图 1，其中选择用于吴茱萸多态性分析的引物见表 3。



从左至右分别为 Me1 和 Em1~Em10, Me2 和 Em1~Em10, Me3 和 Em1、Em2 的引物组合，M-100 Ladder
Combinations of Me1 and Em1—Em10, Me2 and Em1—Em10, Me3 and Em1, and Em2 are from left to right, M-100 Ladder

图 1 引物选择

Fig. 1 Primer selecting results

通过对所选择的 10 对引物进行扩增，得到多态良好，带型清晰的图谱，其中“Me4+Em1”引物的扩增结果见图 2。10 对引物共获得清晰条带 188 条，其中共有条带 43 条，多态性条带 145 条，多态性条带比率为 77.1%。在 10 对引物中，多态性条带比率从 50%（Me2+Em7，Me3+Em6）到 93.5%（Me4+Em5），其中有 2 对引物的扩增结果具有非常明亮的特异带，分别为 Me4+Em1，Me9+Em10，前者能明显区分吴茱萸和石虎两个品种，后者能扩增得到铜仁地区样品特异带，能达到地区鉴别的效果。

3.2 SRAP 多态性分析

对图谱统计得到数据表经 NTSYS-pc 2.1 软件分析得到的聚类结果见图 3。MxComp 检测，相关系数值为 0.961，即聚类树构建良好。由聚类结果

表 3 吴茱萸多态分析的引物

Table 3 Primer selected for polymorphic analysis on *Euodiae Fructus*

编号	组 合	总带数	多态带数	多态性比率/%
1	Me1+Em7	12	8	66.7
2	Me2+Em7	24	12	50.0
3	Me3+Em6	12	6	50.0
4	Me4+Em1	28	26	92.9
5	Me4+Em5	31	29	93.5
6	Me7+Em8	11	7	63.6
7	Me9+Em8	14	12	85.7
8	Me9+Em9	4	3	75.0
9	Me9+Em10	22	17	77.3
10	Me10+Em5	30	25	83.3
总计	10 对引物	188	145	93.5

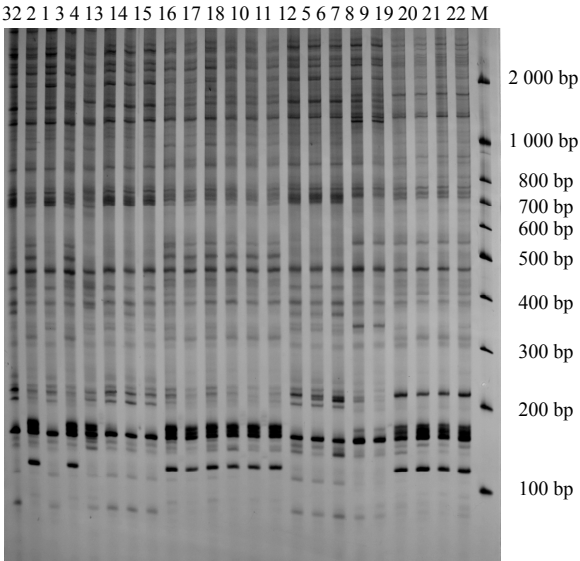


图 2 Me4+Em1 引物组合扩增部分样品的结果

Fig. 2 Amplification of some samples by Me4+Em1 primer combination

可以看出铜仁 4 号（26）和秀山 3 号（35）密果吴茱萸与其他样品在相似度系数 0.52 时最先区分开来，聚集在一起，与吴茱萸样品的遗传差异较大；在 0.58 的水平，吴茱萸原变种和石虎变种的样品分别聚集在两个亚群。其中石虎样品在 0.66 水平聚集为两个类群，分别是江西、娄底、浏阳以及铜仁 1 号（23）为一群；铜仁 2（24）、3 号（25），秀山，新晃为一群。另外新晃、浏阳、娄底、江西等地石虎样品有按产地聚集的趋势。吴茱萸原变种聚类群中，浏阳 4 号（8）和 5 号（9）样品与其他吴茱萸样品在 0.68 的相似系数时分开，单独聚集为一群，表现为较大

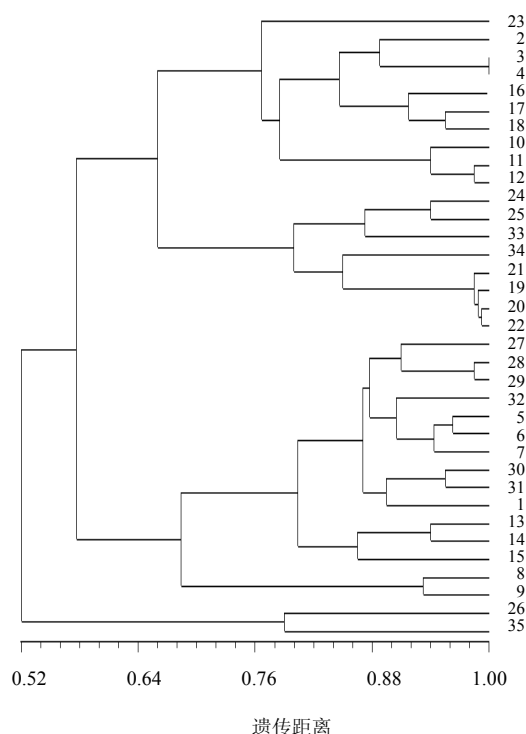


图 3 吴茱萸 SRAP 分子标记聚类结果

Fig. 3 Dendrogram of *Euodiae Fructus* by SRAP molecular markers

的遗传差异,这一基因水平的差异在植物的表型上也有一定的体现,采样时发现浏阳的 4、5 号样品开花时间比其他吴茱萸早 2~3 d,果枝较发散,果柄比其余吴茱萸稍长,果实颜色较淡。在 0.80 的水平,湘乡的吴茱萸样品与剩余样品分开,彭水、酉阳、浏阳、江西的吴茱萸在相关系数较大时较紧密地聚集在一起,且湘乡、彭水、浏阳的样品有按地域不同而聚集的趋势。

从聚类分析结果可知吴茱萸和密果吴茱萸品种间的差异大,在遗传相关系数较小时就能明显区分,而且两个品种的形态差异明显,密果吴茱萸果实较大,直径可达 5~8 mm,各分果瓣分裂较大,种子较大,长约 3~5 mm,宽约 3~4 mm,果实成熟时显红色,气味不浓。而吴茱萸品种样品,果实较小,果瓣分裂较小,成熟时黄色或暗红色者居多,气味较重。

吴茱萸样品由其生长环境的不同而呈现明显的地域相关性,聚类分析揭示海拔相对较低的湖南浏阳、娄底及江西万载的样品聚集为一群,而高海拔的内陆地区的样品即湖南新晃、贵州铜仁、重庆秀山等地的样品也聚集为一群。各产区的样品也有聚集的趋势,如吴茱萸石虎变种的浏阳、娄底、新晃、

江西的样品,吴茱萸原变种的湘乡、彭水、浏阳地区的样品,都有按地域不同而聚集在一起的趋势。产区不同,产区内吴茱萸或石虎的变异大小也不同,从聚类结果可知,石虎样品中铜仁、秀山等地的样品变异较大,铜仁 1 号(23)和铜仁 2(24)、3 号(25)样品分别处于不同的石虎亚群。酉阳吴茱萸遗传差异也较大,浏阳种植基地吴茱萸有两种明显的表型,遗传特性也差异明显。但总体吴茱萸的变异不及石虎。

4 讨论

吴茱萸药材向来以贵州铜仁和湖南新晃等高山地区的品质最好,本课题组研究发现,贵州铜仁、湖南新晃等地吴茱萸果实中的吴茱萸碱和吴茱萸次碱量最高^[12],挥发油成分也较多,气味浓厚^[13]。环境对药材品质的影响毋庸置疑,这也是形成道地性的主要原因。但环境因素对植物遗传特性也产生影响,特定的环境下生存的植物种群其遗传上有差异,这也为分子水平研究吴茱萸道地性提供了可能,从聚类结果可见,各样品有按地区不同而聚集的趋势,体现了遗传和环境的相关性。

吴茱萸药材其原植物来源主要有 3 个品种,但变种及易混品较多,单从植物形态较难鉴别,在实际考察中发现,重庆部分地区,以及铜仁的吴茱萸栽培区将密果吴茱萸作为吴茱萸引种,由于品质差而嫁接石虎,有些地区的品种成熟期明显不一致。而通过对遗传背景差异的分析,应用 SRAP 分子标记技术扩增出特异的条带,可以区分不同品种甚至变种,将易变的植物形态特征转化为比较稳定的遗传特征后,能达到鉴别的效果,而且结果直观,结论可靠。应用该手段辅助品种的选择栽培,控制人工种植中的品种差异,将会给生产带来极大便利。

铜仁、新晃作为公认的吴茱萸道地产区,其遗传变异也很丰富,从系统树可知,铜仁地区的石虎样品分布于两个石虎亚群,表现出丰富的遗传多样性,但新晃的这一特性较弱。另外在 SRAP 的扩增中,发现铜仁的样品有一些特异条带,例如 Me9+Em10 可扩增得到铜仁样品的独特标记,本课题组将进一步研究,以铜仁地区的遗传品质为参考,分析遗传差异之于药材道地性的影响。

参考文献

- [1] Yang X W, Teng J, Zhao B, et al. Studies on absorption and transport of limoninoids from *Fructus Evodiae* in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Chin Herb Med*, 2009,

- 1(1): 53-58.
- [2] 李紫微, 胡莹, 秦松云. 重庆地区吴茱萸属药用植物资源的调查研究 [J]. 资源开发与市场, 2006, 22(5): 471-473.
- [3] Li G, Quiros F C. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [4] Ferriol M, Pic B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.
- [5] 钱丹, 黄璐琦, 崔光红. 不同产地蒙古黄芪遗传关系的 SRAP 分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 382-385.
- [6] 郭庆华, 郭美丽. 与红花苞叶刺性状紧密连锁的 SRAP 分子标记研究 [J]. 药学学报, 2007, 42(7): 794-797.
- [7] 张忠廉, 李学兰, 杨春勇, 等. 砂仁遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 570-574.
- [8] 高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 363-366.
- [9] 许永华, 张爱华, 金慧, 等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [10] 杨平, 刘仙俊, 刘新春. 利用 SRAP 标记研究四川高原青稞育成品种的遗传多样性 [J]. 遗传, 2008, 30(1): 115-122.
- [11] 黄培堂. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Huang D, Li S X, Cai G X, *et al.* Molecular authentication and quality control using a high performance liquid chromatography technique of *Fructus Euodiae* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(2): 312-315.
- [13] LI S X, Cai G X, Huang D, *et al.* Comparative analysis of chemical compositions of essential oils from *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang and *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. [J]. *Planta Med*, 2010, 76(5): 524.