

淫羊藿属植物 PCR-RFLP 遗传多样性研究

杜明凤^{1,2}, 李明军³, 陈庆富^{1*}

1. 贵州师范大学生命科学学院 植物遗传育种研究所, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州师范大学 研究生处, 贵州 贵阳 550001

3. 贵州省林业调查规划院, 贵州 贵阳 550003

摘要: 目的 建立淫羊藿植物 PCR-RFLP 标记系统关系图。方法 对主要来自于四川、贵州的 17 种淫羊藿植物进行了系统的 PCR-RFLP 标记。结果 在 8 个引物的 PCR-RFLP 标记分析中, 有 7 个标记能得到 1 条清晰的谱带; 利用 12 种限制性内切酶对 7 个标记的扩增产物消化后, 在 84 种引物/酶组合中, 共检测到 129 条酶切片段, 其中 44 条具有多态性; 遗传相似系数为 0.550~0.988, 平均为 0.821。结论 该属植物遗传关系与其地理分布关系密切。

关键词: 淫羊藿属; PCR-RFLP; 遗传多样性; 引物; 谱带

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0562-06

PCR-RFLP genetic diversity of plants in *Epimedium* L.

DU Ming-feng^{1,2}, LI Ming-jun³, CHEN Qing-fu¹

1. Institute of Plant Genetics and Breeding, School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

2. Department of Postgraduate, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

3. Guizhou Province Forestry Survey and Planning Institute, Guiyang 550003, China

Abstract: Objective To establish the phylogenetic map of plants in *Epimedium* L. based on PCR-RFLP data. **Methods** Seventeen species from *Epimedium* L. native to Sichuan and Guizhou provinces etc. were studied by means of PCR-RFLP Marker. **Results** Among the eight PCR-RFLP Markers, seven (87.5%) could produce one distinct band with no polymorphism detected by direct electrophoresis in 2% agrose gels. After the amplified products were digested by 12 restriction enzymes, a total of 129 bands were detected in 84 PCR-RFLP primer/enzyme combinations. And 44 polymorphic bands accounting for 34.1% have polymorphism. The genetic similarity coefficient (*G_s*) among 17 species from *Epimedium* L. showed the range from 0.550 to 0.988, with the mean of 0.821. **Conclusion** It is clear that there are some relationships between the genetic property and its geographic distribution.

Key words: *Epimedium* L.; PCR-RFLP; genetic diversity; phylogeny; primers; bands

淫羊藿为小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 *Epimedium* L. 植物。《神农本草经》记载其“主阴痿绝伤、径中痛、益气力、强志”。中国是淫羊藿属植物的分布中心, 约占世界总数的 80%。淫羊藿属是较难处理的一个类群, 有些新的种类可能过分强调了某些差异, 而忽视了物种自身的变异范围, 极大地增加了种类间的复杂性^[1]。目前, 该属的种间系统关系演化研究, 主要集中在形态学、地理分布、孢粉学等方面, 且彼此之间争议很大, 其研究证据远不能阐述该属的系统进化关系, 并且关于该属植物分子标记方面的研究报道甚少。

植物叶绿体基因组 (cpDNA) 比较保守, 其基

因组序列和结构进化速度较慢^[2], 是物种鉴定^[3-5]和种间分子进化以及系统发育^[6]的理想工具。目前, 细胞质基因组 PCR-RFLP 分析已在小麦^[7]、小米^[8]等植物系统发育、遗传进化和物种鉴定中得以应用。本研究对我国贵州、四川等省的 17 种淫羊藿属植物的 PCR-RFLP 分子标记进行系统研究, 以便为该属物种的分类鉴定、遗传多样性、起源进化等研究提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品均为贵州师范大学植物遗传育种研究所采集, 具体来源见表 1, 由中国医学科学院药用植物

收稿日期: 2011-10-15

基金项目: 贵州省中药现代化专项 (黔科合农字[2005]5052 号)

作者简介: 杜明凤 (1979—), 女, 硕士, 主要从事植物遗传研究。Tel: 18985418540 E-mail: dmf1979@126.com

*通讯作者 陈庆富 Tel: (0851)6780646 E-mail: cqf1966@163.com

表 1 样品来源

Table 1 Sources of plants in *Epimedium* L.

样品	种名	产地	样品	种名	产地
1	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市开阳县	28	天平山淫羊藿 <i>E. myrianthum</i>	贵州施秉云台山景区
2	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市师大白云校区后山	29	单叶淫羊藿 <i>E. simplicifluom</i>	贵州沿河县梅溪
3	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市云岩区	30	巫山淫羊藿 <i>E. wushanese</i>	贵州雷公山
4	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	四川峨眉山峭罗口	31	巫山淫羊藿 <i>E. wushanese</i>	贵州凯里市雷山县桃子寨
5	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	四川峨眉山大峨村大弯	32	巫山淫羊藿 <i>E. wushanese</i>	贵州省贵阳市植物园
6	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市龙洞堡	33	巫山淫羊藿 <i>E. wushanese</i>	贵州龙里县大草原
7	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市龙洞堡柏杨基地	34	柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i>	四川青城山后金边岩
8	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市乌当一山坡	35	柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i>	四川雅安市胡家山
9	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市花溪马玲	36	柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i>	四川农大都江堰分校
10	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市花溪平桥	37	柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i>	四川都江堰青城山九龙观
11	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市青岩	38	柔毛淫羊藿 <i>E. pubescens</i>	四川青城山前山脚
12	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳花溪小碧乡营盘古堡	39	少花淫羊藿 <i>E. pauciflorum</i>	四川茂县静州乡水磨坝
13	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州沿河县黑水乡鸽子坝	40	少花淫羊藿 <i>E. pauciflorum</i>	四川茂县静州乡水磨组小沟黄大兴
14	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市花溪林布寨	41	少花淫羊藿 <i>E. pauciflorum</i>	四川汶川县雁门乡通山村
15	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州贵阳市开阳县双牛镇	42	绿药淫羊藿 <i>E. chlorandrum</i>	四川宝兴县灵关镇河口村
16	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州省贵阳市植物园	43	无距淫羊藿 <i>E. ecalcaratum</i>	四川宝兴县龙洞镇苏村
17	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州安顺市平坝县天台山	44	时珍淫羊藿 <i>E. lishihchenii</i>	贵州铜仁市 264
18	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州大方县普地乡	45	时珍淫羊藿 <i>E. lishihchenii</i>	贵州铜仁市 269
19	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州龙里谷龙乡	46	时珍淫羊藿 <i>E. lishihchenii</i>	贵州铜仁市 270
20	粗毛淫羊藿 <i>E. acuminatum</i>	贵州德江县平原乡火车站村火石坝	47	时珍淫羊藿 <i>E. lishihchenii</i>	贵州铜仁市
21	黔岭淫羊藿 <i>E. leptorrhizum</i>	贵州务川县石子坝	48	宝兴淫羊藿 <i>E. davidii</i>	四川茂县生态战实验场
22	黔岭淫羊藿 <i>E. leptorrhizum</i>	贵州贵阳市相宝山	49	普定淫羊藿 <i>E. pudingense</i>	贵州贵阳市开阳县花梨乡张家湾
23	黔岭淫羊藿 <i>E. leptorrhizum</i>	贵州罗甸县	50	水城淫羊藿 <i>E. shuichengense</i>	贵州六盘水市钟山区
24	黔岭淫羊藿 <i>E. leptorrhizum</i>	贵州贵阳市天河潭	51	箭叶淫羊藿 <i>E. sagittatum</i>	贵州贵阳市植物园
25	罗甸淫羊藿 <i>E. luodianense</i>	贵州罗甸县天坑	52	高山淫羊藿 <i>E. alpinum</i>	德国慕尼黑
26	天平山淫羊藿 <i>E. myrianthum</i>	贵州施秉县云台山	53	<i>E. pubigerum</i>	德国慕尼黑
27	天平山淫羊藿 <i>E. myrianthum</i>	贵州施秉县杉木河			

研究所郭宝林教授鉴定，凭证标本存于贵州师范大学植物遗传育种研究生长室。

1.2 方法

1.2.1 DNA 样品提取 PCR-RFLP 属于特异性扩增，以基因组总 DNA 进行叶绿体 PCR-RFLP 分析，采用 CTAB 法提取淫羊藿 DNA。以居群为单位，将居群内不同植株的幼叶等量称取，约 1 g 新鲜幼叶于液氮中研磨成细粉状；加入已预热的 2×CTAB（含 1% β-巯基乙醇），60 °C 恒温 45 min；离心取上清液，加等体积酚-氯仿-异戊醇（25：24：1），8 000 r/min 离心 10 min 至界面澄清；取上清液加 2 倍体积的无水乙醇，于 -20 °C 下静置 2 h，沉淀出 DNA；用 75% 乙醇将沉淀清洗后自然干燥，TE（20 μg/mL RNase）溶解。利用琼脂糖凝胶电泳进行紫外灯观察，测定 DNA 质量。

1.2.2 PCR-RFLP 分析 （1）PCR 反应程序：不同的 RFLP 引物具有不同的退火温度（*T_m*），每次 PCR 反应程序的 *T_m* 值应根据具体引物作相应的改

动。基本程序为：预变性 94 °C、10 min；扩增循环 94 °C、1 min，*T_m*、1 min，72 °C、2 min，40 个循环；延伸 72 °C、10 min。（2）PCR 产物检测：取 5 μL PCR 扩增产物，与 1 μL 0.125% 溴酚蓝混匀，点入 1.0% 琼脂糖凝胶（含 0.1 μg/mL EB）中，在电压 80 V，电流 40 mA 的电泳条件下，以 0.5×TBE 电极缓冲液为介质电泳 1 h，凝胶置于 300 nm 紫外分析仪下观察。检测每个引物对不同材料的扩增产物是否为一条特异性谱带。（3）酶切反应及产物检测：酶切反应体系为 20 μL，将配制好的反应体系置于预热的沸水浴锅中，根据不同酶的酶解温度，酶解 4 h。20 μL 酶切产物与 4 μL 溴酚蓝（0.125% 溴酚蓝，40% 蔗糖水溶液）混匀，点入 2.0% 琼脂糖凝胶（含 0.1 μg/mL EB）中，在电压 80 V，电流 40 mA 的电泳条件下，以 0.5×TBE 电极缓冲液为介质电泳 2 h，凝胶置于 300 nm 紫外分析仪下观察并照相。

1.2.3 数据处理 酶切产物电泳后在凝胶的同一迁移率上，有带赋值为“1”（强带和弱带同记），无带

赋值为“0”，得到原始数据矩阵，计算多态性比率（多态性比率=居群多态性谱带数/居群谱带总数）。遗传相似系数（genetic similarity coefficient, G_s ）按公式 $G_s = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 计算。式中 N_{ij} 表示两居群的共有谱带， N_i 、 N_j 分别是两居群各自谱带的数量。利用 UPGMA（unweighted pair-group method with arithmetic mean），算术平均的不加权的成对分组方法对居群进行系统聚类分析，得到淫羊藿 53 个居群的亲缘关系树型图。聚类分析使用 NTSYS-pc 2.10 e 软件完成。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 片段多态性

用 8 个植物细胞质基因组通用引物对 17 个种 53 个居群淫羊藿进行 PCR 扩增。除 1 种叶绿体引物 *rbcL-accD* 未检测到扩增产物，其余 7 种引物包括 6 个叶绿体引物 *trnK-matK*、*trnK-trnK*、*rbcL-rbcL*、*trnL-trnF*、*trnD-trnT*、*trnC-trnD* 和 1 个线粒体引物 *ndhF: F1-R1318*，其 PCR 产物电泳显示均无多态性（图 1）。然后用 12 种限制性内切酶对这 7 个引物的 PCR 产物进行酶切，在所有的 84 个引物/酶组合中，有 30 个引物/酶组合能得到清晰稳定的 PCR-RFLP 标记（表 2）。其中只有 5 个引物/酶组合能检测到多态性（图 2, 3），占 16.7%，剩余引物/酶组合不

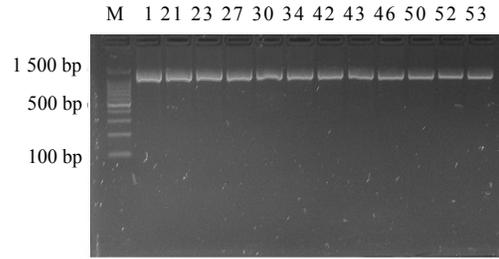


图 1 PCR-RFLP 标记的扩增图谱

Fig. 1 Amplification results of PCR-RFLP Marker

能揭示居群间的差异。30 种引物/酶组合中，共检测到 129 条 DNA 片段，其中 44 条具有多态性，占 34.1%。说明淫羊藿属植物的细胞质基因组之间存在遗传差异，但差异很小。

2.2 遗传相似系数

将 30 个引物/酶组合所获得的扩增产物，计算淫羊藿属植物 PCR-RFLP 标记的 G_s 。所有居群间的 G_s 值变异范围为 0.550~0.988，平均值为 0.821。样品 13 与 14 的 G_s 值最大，达 0.988，两者遗传变异最小；样品 31 与 52 的 G_s 值最小（0.550），两者亲缘关系最远。此外，中国与德国产的 2 种淫羊藿的 G_s 值变化范围为 0.550~0.763， G_s 平均值为 0.687，彼此相差较大，说明淫羊藿属细胞质基因组间的遗传差异与地理分布有一定关系。

表 2 淫羊藿属 17 种植物的 PCR-RFLP 标记数

Table 2 PCR-RFLP marker number in plants of 17 species from *Epimedium* L.

限制性内切酶	条带	引物						
		<i>trnK-matK</i>	<i>trnK-trnK</i>	<i>rbcL-rbcL</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnD-trnT</i>	<i>trnC-trnD</i>	<i>ndhF: F1-R1318</i>
ScrF I	总数	—	—	6	—	—	—	—
	多态带	—	—	5	—	—	—	—
Hinf I	总数	10	10	—	3	4	4	2
	多态带	8	9	—	0	0	0	0
EcoR I	总数	3	4	—	—	2	4	—
	多态带	0	0	—	—	0	0	—
EcoR V	总数	—	18	—	—	—	—	—
	多态带	—	16	—	—	—	—	—
Hha I	总数	4	4	—	—	—	—	—
	多态带	0	0	—	—	—	—	—
Xba I	总数	—	1	—	—	—	4	—
	多态带	—	0	—	—	—	0	—
Hind III	总数	—	—	—	—	1	—	—
	多态带	—	—	—	—	0	—	—
Dra I	总数	9	3	—	—	—	2	—
	多态带	6	0	—	—	—	0	—
Ha II	总数	—	—	—	—	3	—	—
	多态带	—	—	—	—	0	—	—
Kpn I	总数	—	—	—	—	—	—	1
	多态带	—	—	—	—	—	—	0
Afa I	总数	—	—	—	3	1	6	2
	多态带	—	—	—	0	0	0	0
Taq I	总数	—	4	—	4	3	—	4
	多态带	—	0	—	0	0	—	0

“—”-未知
“—”-unkown



图 2 引物/酶组合 trnk-trnk+EcoR V 对淫羊藿植物基因组 DNA 的扩增图谱

Fig. 2 Amplification fingerprints of trnk-trnk+EcoR V primer/enzyme combination on DNA in plants of *Epimedium L.*

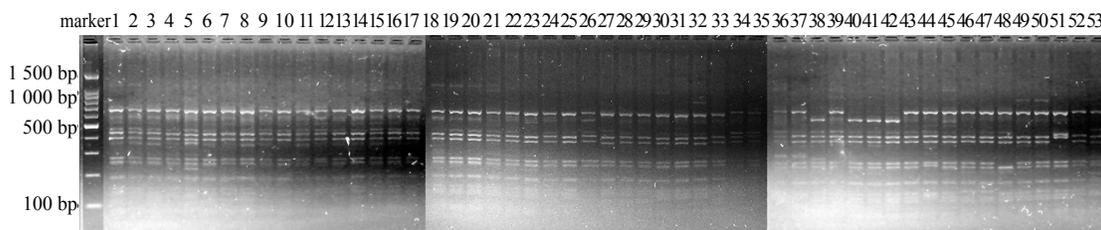


图 3 引物/酶组合 trnk-trnk+Hinf I 对淫羊藿植物基因组 DNA 的扩增图谱

Fig. 3 Amplification fingerprints of trnk-trnk+Hinf I marker/enzyme combination on DNA in plants of *Epimedium L.*

2.3 PCR-RFLP 标记分析淫羊藿属植物系统关系

根据 G_S 矩阵, 采用 UPGMA 法构建淫羊藿属 53 个居群的遗传关系聚类图, 结果见图 4。从图中

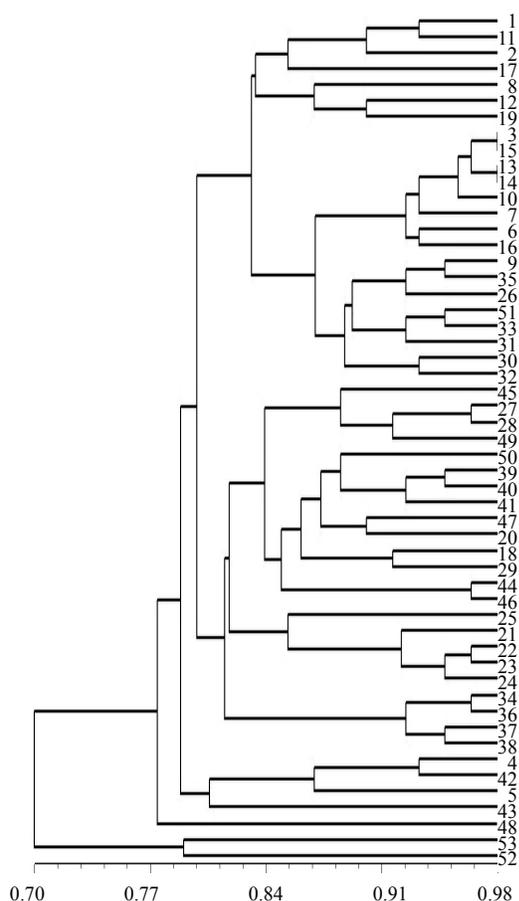


图 4 淫羊藿属植物 PCR-RFLP 标记系统聚类图
Fig. 4 Dendrogram of plants in *Epimedium L.* by UPGMA based on PCR-RFLP bands

可知, 中国种自然地聚为了一个大类, 与来自德国的 2 个种明显地区分开来。当取阈值为所有居群间的 G_S 平均值即 $T=0.821$ 时, 所有居群聚为 9 类。

1 类和 2 类分别是样品 52 和 53。两个材料均来自于德国慕尼黑, 与中国种类的亲缘关系最远。两者 G_S 值较低 (0.763), 被划分为 2 个类。

3 类只有样品 48。来源于四川成都, 与其他种类的遗传关系较远, 是首先与 52、53 相聚的中国种类。

4 类仅有样品 43。43 来自于四川宝兴县, 从形态形状上看, 介于大花与小花之间, 且是所有供试材料中唯一花瓣无距的种类。

5 类包括样品 42 和粗毛淫羊藿的两个居群 4 和 5。它们的形态特征相似, 叶背都密被粗短伏毛, 同为圆锥花序, 花药都是绿色的, 且地理分布一致。

6 类有样品 34、36、37、38。除了样品 35 以外, 其余的居群被很好地归为了一类。从居群间的 G_S 值中可看到, 柔毛淫羊藿与其他中国种类的遗传距离相对较远。

7 类包括样品 21、22、23、24、25。从聚类图中得知, 黔岭淫羊藿居群亲缘关系很近, 很好的聚在一起, 并与罗甸淫羊藿形成独立的 1 类。

8 类来源较杂, 包括了样品 18、20、26、27、28、29、39、40、41、49、50、44、45、46、47。其中小花种类天平山淫羊藿与普定淫羊藿形成 1 个分支, 其余种类形成了另一个分支。这一类中, 除了少花淫羊藿来自四川外, 其余种类均来自贵州的不同地区。

9 类包括了 30、31、32、33、35、51 和粗毛淫羊藿的所有贵州居群。除了 35 来自四川以外，其余都来自于贵州。

当阈值取相同种类的居群间 G_S 最小值即 $T=0.900$ 时，几乎可将所有的种类分开，与传统的经典分类结论相似。粗毛淫羊藿中的 17 个居群被划分成 6 类，巫山淫羊藿、时珍淫羊藿、黔岭淫羊藿被分别划分为 2 类，暗示其种内在细胞质基因组中有一定的遗传分化。同时，普定淫羊藿与天平山淫羊藿、绿药淫羊藿与样品 4 仍划分为一类，提示两者的亲缘关系非常近。

3 讨论

研究表明，PCR-RFLP 标记分析对植物细胞质基因组即 cpDNA、mtDNA 等特定区域可以检测到多态性^[7]。Parani 等^[4]在红树科 (Rhizophoraceae) 和 7 种细米 (small milletspecies) cpDNA 的 PCR-RFLP 研究中，检测到种间变异，但没有检测到种内多态性。张利等^[9]利用 9 个细胞质基因组 PCR-RFLP 标记不仅可检测到仲彬草属 *Kengyilia* Yen et Yang 种间多态性，还能检测到种内多态性。Nakai^[10]于 1996 年对 8 种淫羊藿属植物进行了 PCR-RFLP 分析，研究结果可将箭叶淫羊藿与其余 7 种日本产淫羊藿区分开来。目前为止，尚未发现关于中国种类淫羊藿的 PCR-RFLP 报道。本研究对主要来自于四川、贵州等地的 17 种 53 个居群淫羊藿进行了 PCR-RFLP 标记研究。其聚类结果将德国种类和中国种类明显区分开来，提示该属种类的遗传关系与地理分布有密切关系，此结果与李明军等^[11]的 RAPD 分析结果相一致，为淫羊藿属植物系统学研究提供有价值的资料。

从本研究 PCR-RFLP 标记可以看出，RAPD 和 PCR-RFLP 两种方法都可应用于淫羊藿属植物系统关系的研究，但在揭示淫羊藿属植物的遗传关系时 2 种方法出现了异同。相同的是两者都首先将德国产的 2 个种 *E. pubigerum* 和高山淫羊藿与剩余的 15 个中国种类区分开来，提示该属的遗传关系与地理分布密切相关；都最先将 2 个来自四川的粗毛淫羊藿居群 (样品 4、5) 划分出来作为独立的一个分支；都能揭示黔岭淫羊藿、巫山淫羊藿、时珍淫羊藿等几种植物的种内遗传分化；两者均能区分无距淫羊藿、宝兴淫羊藿、柔毛淫羊藿、粗毛淫羊藿等物种，且两种聚类图所反映出的这几个物种在系统关系上的位置相对稳定并且较为一致。不同的是 (1) RAPD

标记中，水城淫羊藿、绿药淫羊藿、天平山淫羊藿、罗甸淫羊藿、普定淫羊藿、箭叶淫羊藿被划分为一类；而 PCR-RFLP 标记中，这几个种类彼此间遗传关系较远而被划分为不同类。从形态学角度来看，箭叶淫羊藿、天平山淫羊藿、普定淫羊藿这 3 个种无论从花序、花型、叶型等方面都非常相似，支持了 RAPD 结果；同时，罗甸淫羊藿与黔岭淫羊藿的叶背都附着长柔毛，且都为总状花序，又支持了 PCR-RFLP 结果。(2) RAPD 标记中，巫山淫羊藿、少花淫羊藿及时珍淫羊藿这 3 个种较亲缘，并与普定淫羊藿的遗传距离相近，被划分为 1 个大类；而 PCR-RFLP 标记中，巫山淫羊藿与粗毛淫羊藿亲缘，少花淫羊藿与时珍淫羊藿、水城淫羊藿亲缘，它们与柔毛淫羊藿的遗传距离都较远而被划分为不同的类群。从形态学上看，这几个种无论在叶形、花序、花型等方面都有明显差异，表明了这几个种在形态分类和分子水平上的变异可能不一致。

两种方法出现差异的原因：第一，17 种供试材料中只有 7 个种由 3 个以上的居群组成，而剩余 10 个种类只有 1 个居群组成，使得样本抽样本身存在误差，因而导致两种标记结果存在差异；第二，两种标记分别反映核、质遗传变异性及其所产生的多态性带数目不同，所提供的信息必然不同，其聚类结果也相应存在差异。第三，两种方法分别从不同角度和不同方面揭示了部分关系，尚不能形成整体完整的系统关系。对此可能需要更多的来自不同水平的遗传标记才能更正确地反映其系统关系位置。

从 G_S 来看，李明军等^[11] RAPD 标记揭示的物种多态性高于叶绿体基因组 (cpDNA) 的 PCR-RFLP 标记，说明在揭示淫羊藿种间遗传差异时，RAPD 比 PCR-RFLP 有效。同时也提示了该属的叶绿体基因组比较保守，遗传变异较小。PCR-RFLP 标记将大多数同一种类的不同居群基本被划分为一类，这与形态学^[12]、细胞学等^[13] 分析结果基本一致；与 Degani 等^[14] 和马朝芝^[15] 的研究结果有相似之处。

参考文献

- [1] 郭宝林. 淫羊藿属植物的分子系统学研究 [D]. 北京: 中国医学科学院药用植物研究所, 1999.
- [2] Wolfe K H, Sharp P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs [J]. *Process Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 9054-9058.

- [3] Parducci L, Szmidt A E. PCR-RFLP of cpDNA in the genus *Abies* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 802-808.
- [4] Parani M, Lakshmi M, Ziegenhagen B, et al. Molecular phylogeny of Mangrove VII. PCR-RFLP of *trnS-psbC* and *rbcL* gene regions in 24 mangrove and mangrove associate species [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 454-460.
- [5] 隋春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1178-1184.
- [6] Schilling E. Phylogenetic analysis of *Hellanthus* (Asteraceae) based on chloroplast DNA restriction, site date [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 925-933.
- [7] Wang G Z, Matsuoka Y, Tsunewaki K. Evolutionary features of chondriome divergence in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* shown by RFLP analysis of mitochondrial DNAs [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 221-231.
- [8] Parani M, Rajesh K, Lakshmi M, et al. Species identification in seven small millet species using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism of *trnS-psbC* gene region [J]. *Genomics*, 2001, 44: 495-499.
- [9] 张利, 周永红, 郑有良, 等. 仲彬草属物种细胞质基因组 PCR-RFLP 分析 [J]. *草业学报*, 2006, 15(3): 115-122.
- [10] Nakai R, Shoyama Y, Shiraishi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(1): 67-70.
- [11] 李明军, 杜明凤, 陈庆富. 淫羊藿属植物的 RAPD 遗传多样性研究 [J]. *种子*, 2011, 30(6): 45-49.
- [12] 郭宝林, 肖培根. 中药淫羊藿主要种类评述 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(4): 303-307.
- [13] 盛茂银, 陈庆富. 六种贵州淫羊藿属植物的核型分析 [J]. *广西植物*, 2007, 27(3): 440-443.
- [14] Degani C, Rowland L J, Saunders J A, et al. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data [J]. *Euphytica*, 2001, 117: 1-12.
- [15] 马朝芝. 甘蓝型油菜遗传多样性和杂种优势的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2002.