

## 不同产地白头翁遗传特性及白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量的比较

李立顺, 张子学, 时维静\*, 杨冬梅, 韩 伟  
安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100

**摘要:** **目的** 从遗传特性及化学成分角度研究不同产地白头翁的差异性。**方法** 采用 RAPD 方法, 通过反应体系的优化, 借助于 Nei 法, 对白头翁遗传差异性进行分析; 采用 HPTLC 法和 HPLC 法比较 10 个产地白头翁的化学成分差异。**结果** 在 RAPD 反应体系中, 从 100 个随机引物中筛选出 28 个引物扩增产物具有多态性, 各基因型间的 Nei 相似系数分布在 0.080~0.839, 平均相似系数为 0.432。10 个不同来源的白头翁明显地聚为 A 和 B 两大类群。10 个产地的白头翁样品化学成分 HPLC 色谱图的相似度在 0.757~0.989, 白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的量相差达 10~20 倍; HPTLC 图更直观的比较样品差异, 聚类分析比较与遗传多态性并不完全一致。**结论** 不同地区的白头翁之间遗传多样性较为丰富, 遗传差异存在较明显的地域性; 10 个产地白头翁化学成分的组成和组分的量均存在一定的差异。

**关键词:** 白头翁; RAPD; 遗传多态性; HPTLC; 白头翁皂苷 B<sub>4</sub>

**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)04-0772-06

## Comparison on genetic characteristics and chemical constituents of *Pulsatilla chinensis* from different habitats

LI Li-shun, ZHANG Zi-xue, SHI Wei-jing, YANG Dong-mei, HAN Wei  
Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

**Abstract: Objective** To study differences of *Pulsatilla chinensis* from different habitats. **Methods** Using RAPD method, optimizing PCR reaction system, applying Nei method, genetic characteristics were analyzed. HPTLC and HPLC were used to compare differences in chemical constituents from ten habitats. **Results** Amplification products of twenty-eight primers have polymorphism among 100 random primers in RAPD reaction system. The result of genetic similarity analysis showed that Nei's coefficient ranged from 0.080 to 0.839, and the average Nei's coefficient was 0.432. *P. chinensis* from ten habitats were divided into groups A and B. HPLC similarity of chemical constituents in ten samples was 0.757—0.989. Content of pulchinenoside B<sub>4</sub> was 10—20 times different. HPTLC could be more intuitive for comparison among samples. Results of cluster analysis were not entirely consistent with HPTLC and genetic polymorphism. **Conclusion** *P. chinensis* from different habitats have various genetic diversities, and genetic characteristic show geographical features. Chemical constituents and contents in *P. chinensis* from ten habitats are very different.

**Key words:** *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel; RAPD; genetic polymorphism; HPTLC; pulchinenoside B<sub>4</sub>

白头翁始载于《神农本草经》, 汉代张仲景创立的白头翁汤, 一直沿用至今。中国各地混淆品种达 37 种之多<sup>[1]</sup>, 常见的有蔷薇科委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser., 翻白草 *Potentilla discolor* Bunge, 毛茛科打破碗花花 *Anemone hupehensis* Lemoine, 菊科祁州漏芦 *Rhaponticum uniflorum* DC., 石竹科植物白鼓钉 *Polycarpaea corymbosa* Lam., 以及白头翁属的兴安白头翁 *Pulsatilla dahurica* (Fisch. ex DC)

Spreng., 细叶白头翁 *P. turczaninowii* Kryl. et Serg., 钟萼白头翁 *P. campanella* Fish. 等。《中国药典》2010 年版<sup>[2]</sup> 收录的白头翁为毛茛科植物白头翁 *P. chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根。白头翁分布较广, 主产于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河南、山东、陕西、安徽、江苏等省。全国 17 个不同产地的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量有较大差异<sup>[3]</sup>, 但不同产地的遗传背景, 亲缘关系尚不清楚; 其他化学成分有无差别, 尚未

收稿日期: 2011-11-13

基金项目: 安徽省科技厅科技攻关重点资助项目 (07010300153); 安徽省中药材产业技术研发中心基金资助项目 (ZYC20101503); 安徽科技学院自然科学研究计划项目 (ZRC2011294)

作者简介: 李立顺 (1957—), 男, 安徽霍邱人, 学士, 副教授, 从事中药活性成分及复方应用研究。Tel: (0550)6732184 E-mail: lls3212.163.com

\*通讯作者 时维静 Tel: 13955065780 E-mail: shiwj80@yahoo.com.cn

见研究。本试验采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记方法, 构建基因组的指纹图谱, 通过统计分析, 比较不同地区白头翁遗传多样性, 为白头翁亲缘关系和演化关系的研究提供 DNA 分子水平的证据; 采用高效薄层色谱法 (HPTLC)、高效液相色谱法 (HPLC) 比较不同产地白头翁化学成分白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的差异, 为白头翁优良种质选育提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

LC-20AT 型分析半制备高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Linomat 5 半自动点样仪 (瑞士 CAMAG 公司); TCL Visalizer 薄层色谱成像文件系统 (瑞士 CAMAG 公司); CP225D 准微量天平 (德国塞多利斯公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); PTC-100™ 型 PCR 扩增仪 (美国 MJResearch)。

PCR 扩增所用引物为美国 Operon 公司生产的 10 碱基寡聚核苷酸随机引物; dNTP、Taq 酶购自 Takara 公司; 进口琼脂糖 (北京华越洋生物科技有限公司); 白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 对照品 (批号 111766-200601) 购自中国药品生物制品检定所; 高效硅胶 G 板 (20 cm×10 cm, 青岛海洋化工厂, 批号 20070724); 乙腈为色谱纯 (美国天地试剂公司 TEDIA), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 材料

10 批白头翁样品于 2010 年 7 月分别从安徽皖东地区、山东、河南、内蒙古和长春等丘陵或山区野外采集, 经安徽科技学院食品药品分析检测中心主任时维静教授鉴定为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的根和叶。白头翁鲜叶片及时冷冻保存; 白头翁根 105 °C 杀酶 5 min, 50 °C 干燥备用。具体来源见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 白头翁遗传多样性分析

#### 2.1.1 白头翁总 DNA 提取 采用 SDS 法进行 DNA

表 1 材料来源

编号	来源	编号	来源
1	内蒙古赤峰小南山	6	安徽淮南八公山
2	安徽蚌埠锥子山	7	安徽凤阳红山
3	安徽明光山界	8	山东莱阳中陡山
4	河南三门峡白马峪	9	吉林长春静月山
5	安徽定远桑涧	10	安徽凤阳雷达山

提取, 分别取白头翁新鲜叶片 3 g, 低温下放入研钵中快速加入提取缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol EDTA, 0.5% SDS, 0.2% β-巯基乙醇) 混合研碎, 冷冻离心 (5 000 r/min, 10 min), 取上清液, 于 70 °C 水浴 15 min 迅速冷却至室温, 然后加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1), 轻轻上下摇动 10 min, 离心取上清。同法再提取 1 次, 取上清液加入等体积的异丙醇, 挑取 DNA, 70%乙醇冲洗 3 次, DNA 沉淀自然风干后, TE 缓冲液溶解, -20 °C 下保存备用。

2.1.2 RAPD 体系的优化 影响 RAPD 反应的因素很多, 通常影响 RAPD 扩增稳定性和重复性两个主要因素为 dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 质量浓度<sup>[4]</sup>, 以 10 号样品 DNA 为模板, OpeC<sub>4</sub> 为引物, 进行扩增体系优化, 各处理组合见表 2。扩增产物均加 5 μL 溴酚蓝, 上样 14 μL, 在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 在 0.1 μg/mL 溴化乙锭中染色 30 min, 用凝胶成像系统拍照, 并记录电泳结果。

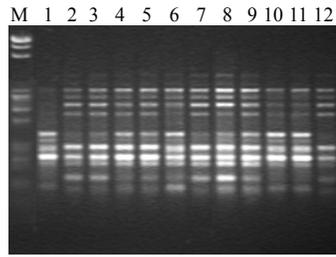
表 2 各处理组合

Table 2 Combinations of different treatments

编号	Mg <sup>2+</sup> / (mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTP / (mmol·L <sup>-1</sup> )	编号	Mg <sup>2+</sup> / (mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTP / (mmol·L <sup>-1</sup> )
1	2.0	0.15	7	3.0	0.15
2	2.0	0.20	8	3.0	0.20
3	2.0	0.25	9	3.0	0.25
4	2.5	0.15	10	3.5	0.15
5	2.5	0.20	11	3.5	0.20
6	2.5	0.25	12	3.5	0.25

2.1.3 白头翁 RAPD 体系优化分析 由图 1 可知, 在一定的浓度范围内, 随着 dNTP、Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加, 扩增带数逐渐增多, 产量逐渐提高; 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度超过 3.0 mmol/L 时, 随着 dNTP 浓度提高扩增带数及其产量有下降的趋势。故确定适宜的 dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 浓度分别为 0.20、3.0 mmol/L。

2.1.4 PCR 扩增体系与引物筛选 引物筛选采用 20 μL 基本反应体系, 其中包含 MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5 μL、10×缓冲液 2.0 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μL、Taq 酶 1 U、引物 (0.2 mmol/L) 2.0 μL、模板 DNA 1.5 μL, 其余用 dd H<sub>2</sub>O 补足。热循环反应程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s、40 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 90 s, 40 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min。从 100 个引物中筛选出 28 个扩增产物稳定多



M-Marker 1~12-各处理组合  
M-Marker 1—12-each combination treatment

图 1 不同 Mg<sup>2+</sup> 和 dNTP 浓度对 RAPD 带型的影响

Fig. 1 Effects of Mg<sup>2+</sup> and dNTP at different concentration on RAPD bands

态性好的进行遗传多样性分析。

**2.1.5 DNA 扩增结果** 从 100 个随机引物中筛选出 28 个有效引物,对 10 个材料进行 RAPD 分析(表 3)。在供试材料中共获得 127 条扩增带产物,其中 86 条具有多样性,约占总数的 66.7%,平均每个引物扩增的 DNA 带数为 4.54 条。说明不同地区的白头翁材料遗传多样性比较丰富(图 2)。

**2.1.6 白头翁的聚类分析** 对 10 批白头翁的 10 个 DNA 样品中扩增的电泳总带数与多态性的数目进行统计。每个样品的扩增条带按有(1)或无(0)记录。根据 Nei 的方法计算样品间的简单遗传相似系数<sup>[5]</sup>

表 3 28 个 RAPD 引物在 10 批白头翁样品的扩增结果

Table 3 Amplification of 28 RAPD primers on ten batches of *P. chinensis*

引物	扩增带数	多态百分率 / %	引物	扩增带数	多态百分率 / %
Ope A <sub>1</sub>	3 (2)	66.7	OpeE <sub>1</sub>	2 (2)	100.0
OpeA <sub>2</sub>	3 (2)	66.7	OpeE <sub>3</sub>	5 (4)	80.0
OpeA <sub>4</sub>	6 (4)	66.7	OpeE <sub>4</sub>	3 (2)	66.7
OpeC <sub>1</sub>	4 (3)	75.0	OpeE <sub>11</sub>	4 (4)	100.0
OpeC <sub>4</sub>	9 (7)	77.8	OpeE <sub>12</sub>	3 (2)	66.7
OpeC <sub>6</sub>	3 (1)	33.3	OpeE <sub>16</sub>	9 (5)	55.6
OpeC <sub>11</sub>	5 (4)	80.0	OpeE <sub>18</sub>	4 (3)	75.0
OpeC <sub>19</sub>	3 (3)	100.0	OpeE <sub>19</sub>	9 (6)	66.7
OpeB <sub>11</sub>	4 (4)	100.0	OpeD <sub>8</sub>	4 (3)	75.0
OpeB <sub>17</sub>	4 (3)	75.0	OpeB <sub>8</sub>	5 (3)	60.0
OpeF <sub>3</sub>	7 (5)	71.4	OpeD <sub>2</sub>	3 (2)	66.7
OpeB <sub>1</sub>	4 (2)	50.0	OpeD <sub>7</sub>	3 (2)	66.7
OpeB <sub>5</sub>	3 (2)	66.7	OpeC <sub>2</sub>	4 (2)	50.0
OpeB <sub>7</sub>	4 (3)	75.0	OpeE <sub>20</sub>	3 (1)	33.3

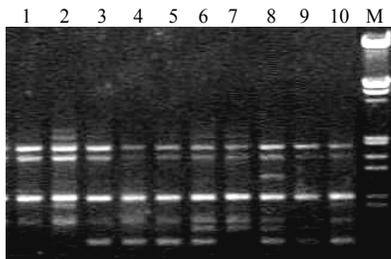


图 2 10 批白头翁 OpeE<sub>16</sub> 引物不同模板 DNA 扩增产物图谱

Fig. 2 Amplification profiles of OpeE<sub>16</sub> primer of ten batches of *P. chinensis* with different DNA templates

$F = 2M_{xy} / (m_x + m_y)$  ( $F$ 表示相似系数,  $M_{xy}$ 表示样品  $x$ 、 $y$ 共有片段总和,  $m_x$ 表示  $x$ 样品片段数,  $m_y$ 表示  $y$ 样品片段数),依据 28 个随机引物所产生的 127 个 RAPD 标记,得出了材料间的 Nei 氏遗传相似性系数矩阵,在此基础上建立遗传关系聚类图(图 3)。

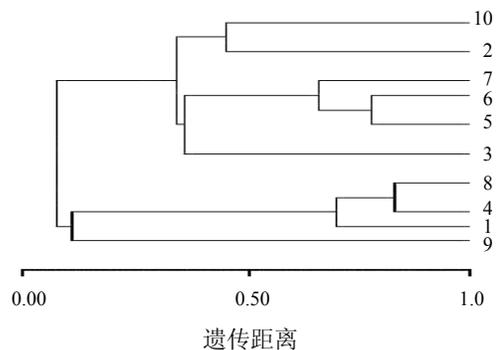


图 3 10 个不同基因型的白头翁 DNA 多态性聚类分析树型图

Fig. 3 DNA polymorphism cluster analysis dendrogram of ten different genotypes of *P. chinensis*

可以看出各个基因型的相似性系数分布平均相似系数为 0.432。说明白头翁基因型之间的遗传多样性较为丰富。10 批不同来源的白头翁材料明显地聚为 A、

B 两大类群。A 群包括 9、1、4、8 号 4 个基因型；B 包括 3、5、6、7、2、10 号 6 个基因型。由分类结果可知，虽然 10 个样品其形态上无明显差异，但其遗传相似系数差异较大，并且在地理分布上有一定的区域性。

## 2.2 白头翁化学成分比较

**2.2.1 供试品溶液的制备** 分别取白头翁干燥根粉碎至 10 目，精密称定 1.00 g 置 30 mL 三角烧瓶中，加甲醇 10 mL，密塞，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，滤过，滤液置 25 mL 量瓶中，用少量甲醇洗涤容器及残渣，洗液并入同一量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 对照品 1.25 mg，置 5 mL 量瓶中加甲醇制成 0.25 mg/mL 的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 溶液。

**2.2.3 HPTLC 分析** 采用 20 cm×10 cm 高效硅胶 G 薄层板，105 °C 下活化 30 min。采用半自动点样仪条带状喷雾点样，带宽 6 mm；供试品点样量为 5 μL，对照品 5、10 μL，点于同一薄层板上。展开剂为正丁醇-醋酸-水（4：1：2），上行展开 8 cm，取出，晾干；喷 10% 硫酸乙醇溶液，置 105 °C 烘箱内，显色至斑点清晰；薄层成像系统分别于 366 nm、白光拍照（图 4），并对 10 个产地白头翁薄层展开条带，按有（1）或无（0）记录，采用 Ntsys 2.10e 软件进行聚类分析，建立化学成分相似性聚类分析树型图（图 5）。

从薄层色谱图可清晰的看出，10 个产地的白头翁化学成分条带的数量和条带的宽窄、颜色深

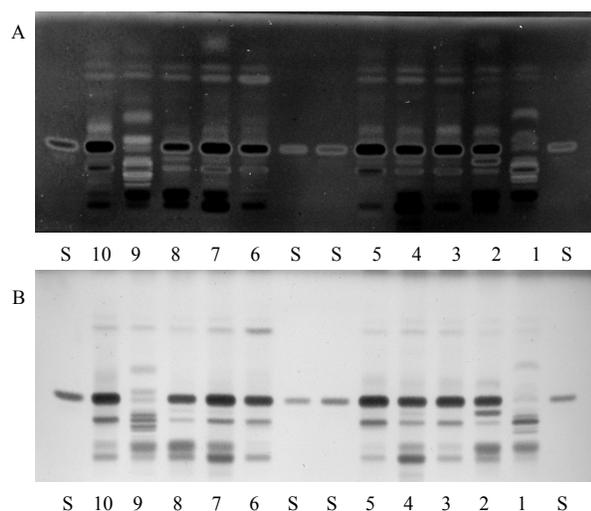


图 4 366 nm (A) 和白光 (B) 下白头翁高效薄层色谱图  
Fig. 4 HPTLC chromatograms of *P. chinensis* at 366 nm (A) and under white light (B)

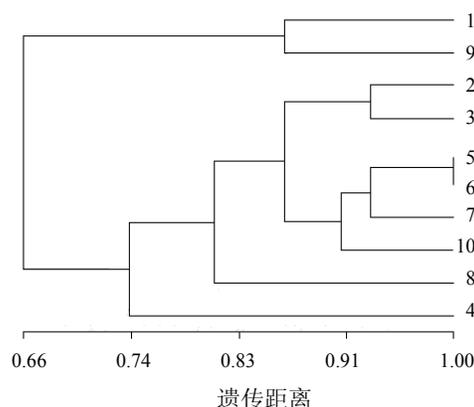


图 5 10 个不同产地白头翁 UPGMA 聚类结果  
Fig. 5 UPGMA cluster analysis on *P. chinensis* from ten different habitats

浅有一定差异，通过聚类分析，相似性系数分布在 0.467~1.000，其中 5、6 号相似系数达 1.000。平均相似系数为 0.839；HPLC 图谱通过相似度计算，平均数相似度和中位数相似度在 0.757~0.989；而白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的量相差 10~20 倍之多，表明 10 个产地野生白头翁中所含的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的量存在较大的差异。

**2.2.4 HPLC 检测**<sup>[6]</sup> 色谱条件：Shim-packC<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-水（28：72）；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 201 nm；柱温 40 °C。

**(1) 标准曲线绘制** 取对照品溶液分别进样 4、8、12、16、20 μL，测定其峰面积，以白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得回归方程为  $Y=62\ 491 X+42.02$ ，相关系数  $r=0.999\ 9$ ，表明 1~5 μg 线性关系良好。

**(2) 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，平行测定 5 次，对照品峰面积的 RSD 为 0.74%，表明精密度良好。

**(3) 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，测定，然后于 4、6、8、12、24 h，各测定 1 次，结果表明，供试品在 24 h 测定结果稳定，白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的峰面积的 RSD 为 0.85%。

**(4) 重现性试验** 精密称取 10 号药材粉末，按对照品制备方法分别处理成 5 份，进样，每次 10 μL，计算白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的量，重现性良好，RSD 为 0.88%。

**(5) 加样回收率试验** 将 10 号样品供试品溶液分成 5 份，分别加入适量的白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 对照品溶液，按“2.2.1”项方法制备，同色谱条件下测定，

计算加样回收率。结果白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的平均回收率为 99.5%，RSD 为 1.12%。

(6) 相似度比较与白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量测定 取“2.2.1”项供试品溶液，在以上色谱条件下，进样 5 μL，采用国家药典委员会制定的用于生成共有模式的《中药指纹图谱相似度计算软件 A 版》，将 10 个产地白头翁图谱数据导入，生成对照图谱，经多点校正，色谱峰匹配，得出平均数和中位数相似度，按回归方程计算得样品中白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量 (表 4)，色谱图见图 6。

### 3 讨论

各种分子标记技术，如扩增片段长度多态性 (AFLP) [7]、RAPD [8]、内部简单重复序列标记

表 4 10 个不同产地白头翁的相似度和白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量  
Table 4 Similarities and contents of pulchinenoside B<sub>4</sub> in *P. chinensis* from ten different habitats

编号	相似度		白头翁皂苷 B <sub>4</sub> / (mg·g <sup>-1</sup> )
	平均数	中位数	
1	0.782	0.757	4.70
2	0.938	0.976	48.48
3	0.922	0.860	50.50
4	0.967	0.984	43.61
5	0.949	0.989	63.76
6	0.949	0.989	64.87
7	0.958	0.945	63.41
8	0.773	0.763	46.08
9	0.785	0.757	3.21
10	0.950	0.902	72.05

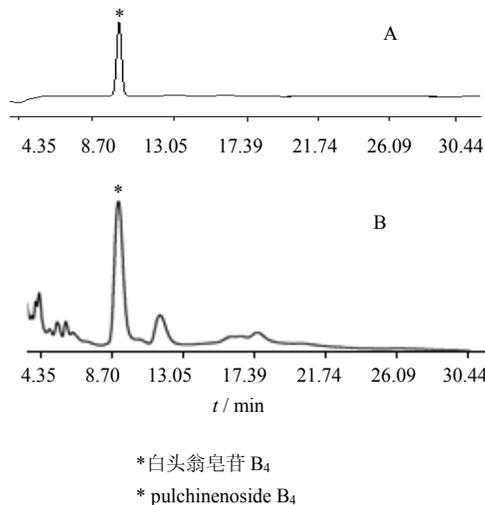


图 6 对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 6 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

(ISSR) [9]、内部转录间隔区 (ITS) [10]、相关序列扩增多态性 (SRAP) [11]、简单重复序列 (SSR) [12] 等先后被借鉴和应用到药用植物种质资源研究。相对于其他几种分子标记，RAPD 标记是在药用植物品种鉴定领域用得最多的分子标记技术 [13]。RAPD 是 1990 年 Williams 等 [14] 在 PCR 基础上发展起来的一种分子标记方法。它可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下，构建基因组的指纹图谱，通过统计分析，可以检测出不同品种间的微小差异，为物种进化和分类提供 DNA 分子水平的证据，对于种、亚种、变种的鉴别及演化关系的研究具有重要意义。RAPD 分析不受实验材料所处的发育期、取样部位和环境条件的影响，方法简便而准确。本研究表明，白头翁材料间的遗传多样性有明显差异，材料间亲缘关系的远近与地理分布有一定的相关性。

液相色谱和薄层色谱技术是对中药材定性、定量分析最常用方法。本实验采用 HPTLC 法可直观比较 10 个产地化学成分不同，将结果展示在同一张图像中。采用 NTSYSpC 软件进行 UPGMA 聚类分析，建立化学成分聚类分析树型图。采用 HPLC 法，多波长色谱比较，201 nm 下，色谱峰强度最大，分离较好。10 个产地色谱图相似度在 0.757~0.989；白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 量 3.21~72.05 mg/g，安徽白头翁的皂苷 B<sub>4</sub> 高出长春达 20 倍，差别很大。

中药材次生代谢产物形成与积累过程非常复杂，受居群遗传和生态环境中各种生物和非生物因素的调控 [15]。本实验结果表明，白头翁化学成分的组成和组分的量与其居群遗传特性有很大的相关性。如安徽省皖东地区的白头翁，遗传相似性和化学成分相似性都比较接近；皖东地区与吉林、内蒙的白头翁遗传相似性差别较大，化学成分的组成和白头翁皂苷 B<sub>4</sub> 的量也有明显的差异。

白头翁遗传特性研究报道不多，白头翁化学指纹图谱也未见有相关文献。本研究可为建立白头翁分子遗传标记方法，从居群和分子水平上揭示不同产地白头翁的生物学实质提供参考。也为白头翁化学指纹图谱的研究提供方法和数据。虽然白头翁都是在 7 月份采集，各地物候期不同，生态因素的适应对白头翁次生代谢产物形成与积累的影响，有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王胜勇, 张 勉, 王峥涛. 白头翁同名异物类药材的数码显微鉴别 [J]. 药学学报, 2004, 39(10): 797-802.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 张振华, 叶文才. 十七种不同产地白头翁的质量考察 [J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(1): 51-52.
- [4] 傅骏华, 李连成, 刘新芝, 等. 玉米 RAPD 程序优化研究及其初步探讨 [J]. 作物学报, 1997, 23(1): 56-61.
- [5] 刘 杰, 莫结胜, 刘公社, 等. 向日葵种质资源的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 研究 [J]. 植物学报, 2001, 43 (2): 151-157.
- [6] 时维静, 张 伟, 王海侠, 等. 正交试验法优选白头翁醇提工艺 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(2): 156-158.
- [7] 黄想安, 董美芳, 阎学燕, 等. 石蒜属种间亲缘关系 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 148-152.
- [8] 王晓慧, 汤晓闯, 杨恩秀, 等. 随机扩增多态性 DNA 标记技术及其在药用植物研究中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 618-620.
- [9] 欧立军, 颜 旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353-357.
- [10] 于华会, 杨志玲, 杨 旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-495.
- [11] 陈大霞, 李隆云, 吴叶宽, 等. 灰毡毛忍冬自然群体遗传多样性的 SRAP 研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 134-138.
- [12] 管俊娇, 虞 泓, 解云峰, 等. 虫草属 EST-SSR 标记系统的建立研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1711-1717.
- [13] 肖哲丽, 柳金凤. 分子标记技术在药用植物研究中的应用 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 300-303.
- [14] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J]. *Nucl Acid Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] 黄璐琦, 高 伟, 周 洁, 等. 系统生物学方法在药用植物次生产物研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 8-12.