

分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用进展

杨春芳¹, 曾 阳¹, 郭凤霞², 王文颖¹, 李锦萍^{1*}, 刘力宽^{1*}

1. 青海师范大学生命与地理科学学院 青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室, 青海 西宁 810008

2. 浙江大学城市学院医学院 中药研究与开发实验室, 浙江 杭州 310015

摘 要: 獐牙菜属植物主产于中国, 以其重要的药用价值而被研究者所青睐。分子标记技术近年来发展迅速, 作为一种有效的现代手段被广泛用于药用植物的各个研究领域。首次系统综述了随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、简单重复序列区间 (SSR)、ISSR 和 DNA 条形码在獐牙菜属植物体细胞杂交、遗传多样性、种质资源鉴定和系统发育构建等方面研究的应用现状, 以期为獐牙菜属植物及相关属植物的研究提供一定的参考。

关键词: 獐牙菜属; 分子标记; 遗传多样性; 系统进化; 体细胞杂交

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)15-3238-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.032

Application progress of molecular markers in research in plants of *Swertia* L.

YANG Chun-fang¹, ZENG Yang¹, GUO Feng-xia², WANG Wen-ying¹, LI Jin-ping¹, LIU Li-kuan¹

1. College of Biological and Geographical Science, Key Laboratory of Medicinal Animal and Plant Resources in Qinghai-Tibetan Plateau in Qinghai Province, Xining 810008, China

2. School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China

Abstract: *Swertia* L. plants distributed widely in China, and favored with its outstanding medicinal value by the researchers. Molecular marker technology has been developing rapidly in recent years, as a kind of effective modern method. It was used widely in various fields of medicinal plants. The application status of the molecular markers including RAPD, SSR, ISSR and DNA barcoding on somatic hybridization, genetic diversity study, germplasm resources identification and phylogenetic analysis of *Swertia* L. were systematically reviewed in this paper for the first time, to provide reference for studies on *Swertia* L. and plants in other genus.

Key words: *Swertia* L.; molecular markers; genetic diversity; system evolution; somatic hybridization

分子标记 (molecular markers) 是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 直接反映了 DNA 水平的遗传变异和遗传多态性。目前, 分子标记技术的发展经历了以限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 为主的第 1 代, 以简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 为主的第 2 代, 以单核苷酸多态性 (single

nucleotide polymorphisms, SNP) 为主的第 3 代, 发展至以多样性芯片技术 (diversity arrays technology, DArT)、靶位区域扩增多态性 (target region amplified polymorphism, TRAP) 和限制性内切酶位点标签 (restriction-site associated DNA, RAD) 为主的第 4 代分子标记^[1]。较之前常用的形态标记、细胞标记和生化标记, 分子标记以独特的分子手段显现出明显优势, 被广泛用于农业、药用植物的农作、园艺、生物学、植被保护、中药学、特种医学等各个领域, 研究内容涉及遗传育种、遗传多样性、

收稿日期: 2016-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360068); 青海省科技厅自然基金项目 (2017-ZJ-742); 青海师范大学中青年科研基金项目 (15ZR04); 教育部春晖计划 (Z2016090); 青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室项目 (2017-ZJ-Y13)

作者简介: 杨春芳 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中藏药生物化学与分子生物学研究工作。Tel: 13195792927 E-mail: 1832007543@qq.com

***通信作者** 李锦萍 (1974—), 女, 硕士生导师, 副教授, 博士学位, 研究方向为资源生理生态学及资源化学研究。

Tel: 13139077708 E-mail: 2008lj@163.com

刘力宽 (1969—), 男, 硕士生导师, 副研究员, 博士学位, 研究方向为系统进化与资源评价。

Tel: 13109764615 E-mail: 2008llk@163.com

抗病性、品种鉴定等多个方面^[2-5]。

龙胆科獐牙菜属 *Swertia* L. 植物全球有 150 种,我国产 79 种,其中青海产 11 种 2 变种,为一年生或多年生草本植物^[6]。该属植物大多有药理作用,如《中国药典》2015 年版一部中提到的青叶胆全草入药,有清肝利胆、清热利湿功效^[7]。此外,

以川西獐牙菜为主的獐牙菜属植物均具有独特的药用价值,被开发成为各种药物用于临床治疗。因獐牙菜属植物和花锚属等相关属植物形态相似,且多具药理作用,被当做“藏茵陈”使用。獐牙菜属具有药理作用的主要物种分布情况及功效见表 1^[8-9]。

查阅近 15 年来的相关文献发现,对獐牙菜属植

表 1 獐牙菜属主要药用植物分布及功效

Table 1 Main distribution and functions of plants from *Swertia* L.

种名	主产地	分布地	功效
二叶獐牙菜 <i>S. bifolia</i> Batal	青海玉树、称多、玛沁、久治、泽库、天峻等地	我国西藏、四川、甘肃西南部、陕西(太白山)	平肝、强心、养血、调经
歧伞獐牙菜 <i>S. dichotoma</i> L.	青海尖扎、同仁、泽库、大通、湟源、民和、互助等地	我国西北、华北、东北及四川北部、湖北、河南;哈萨克斯坦、俄罗斯、蒙古	清热、健胃、利湿
北方獐牙菜 <i>S. diluta</i> (Turcz.) Benth. et Hook. f.	青海门源	我国四川北部、甘肃、陕西、山西、河北、内蒙古、黑龙江、辽宁、吉林、河南、山东;俄罗斯、蒙古、朝鲜、日本	清热解毒、利湿健胃
抱茎獐牙菜 <i>Swertia franchetiana</i> H. Smith	青海玉树、称多、玛沁、泽库、共和、西宁、大通等地	西藏、四川、甘肃西南部	清肝利胆、健胃
川西獐牙菜 <i>S. mussotii</i> Franch.	青海囊谦、玉树、称多、班玛	西藏、云南、四川	清肝利胆、退黄、利水消肿
祁连獐牙菜 <i>S. przewalskii</i> Pissjauk.	青海祁连、门源	青海特产	清热解毒、凉血止血
四数獐牙菜 <i>S. tetraptera</i> Maxim.	青海杂多、囊谦、玉树、称多、班玛、玛沁、久治等地	西藏、四川、甘肃	清热解毒、凉血止血
华北獐牙菜 <i>S. wolfgangiana</i> Grun.	青海玉树、曲麻莱、称多、玛多、玛沁、久治、同仁等地	西藏、四川、甘肃、山西、湖北西部	清热解毒、凉血止血

物的研究主要集中在其化学成分、药理作用及临床应用方面^[10-14],分子标记方面研究较少,仅刘黄刚等^[15]研究獐牙菜属植物亲缘关系及资源评价时提到与遗传分子标记学相关的部分内容。自 20 世纪 90 年代初以来,随着市场需求的逐渐增大,獐牙菜属植物被过度滥采,资源遭到严重破坏,现已导致蕴藏量大大减少^[16-17]。因此,用先进的分子标记技术对獐牙菜属植物进行种质鉴定、遗传多样性等研究,从而在保持物种基原性的基础上加强对獐牙菜属植物的保护迫在眉睫。本文系统阐述了分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用进展,并从分子角度对獐牙菜属植物的研究做出了进一步的展望。

1 RAPD 技术在獐牙菜属植物研究中的应用

RAPD 技术以 DNA 为模板,以一系列随机短核苷酸片段为引物,进行 PCR 扩增,单一引物与反

向重复序列结合,由于引物结合位点 DNA 序列的改变及片段长度、数量的差异,扩增产物经凝胶电泳分离,多态性片段就会被扩增出来。RAPD 具有多态性丰富、操作简便、灵敏度高、不需预先知道待扩增基因核苷酸顺序、费用较低等优点,可用于研究物种亲缘关系、种质资源遗传多样性、遗传图谱构建、基因定位、资源鉴定等^[18]。

RAPD 技术起步较早,在獐牙菜属植物中的研究主要集中在体细胞杂交、遗传多样性和种质鉴定 3 个方面。体细胞杂交因克服了不同物种间远缘杂交的非亲和性而在植物育种方面逐渐兴起,尤其不对称融合方法的应用实现了目的基因的转移,达到改良物种的目的。獐牙菜属植物种类较多,如川西獐牙菜为高寒地区青藏高原特有种,以专治肝胆疾病而著名,但近年来野生资源逐渐匮乏。为缓解供需压力,体细胞杂交技术在獐牙菜属植物研究中得

到应用,通过培养药效成分量较高的体细胞杂交种,对川西獐牙菜等植物进行改良。查阅相关文献发现獐牙菜属植物体细胞杂交方面的研究主要分为形态学、染色体观察和基于分子标记技术的谱带分析。李子东等^[19]和 Wang 等^[20]分别对胡萝卜与川西獐牙

菜、狭叶柴胡与川西獐牙菜不对称体细胞杂交种核质基因组特征进行研究。相比于 RAPD 法在体细胞杂交方面的研究,其在药用植物遗传多样性和种质鉴定方面的研究较晚,且多集中在印度等国。RAPD 技术在獐牙菜属植物研究中的应用情况见表 2。

表 2 RAPD 标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用

Table 2 Application of RAPD marker on research of plants from *Swertia* L.

物种	研究方向	主要研究结果	意义
川西獐牙菜 ^[19-20]	杂交细胞基因特征	杂交细胞均含有双亲特征谱带或新带	杂交细胞的成功融合为后期獐牙菜属植物与其他物种的杂交提供了一定基础;为研究高含量单体有效成分奠定了基础
印度獐牙菜 <i>S. chirayita</i> (Roxb. ex Flemi) Karsten ^[21]	杂交细胞药效成分转移	杂交细胞核基因仍以受体柴胡为主	RAPD 为研究基因特征、基因功能验证、有效成分转移提供了必要研究基础
印度獐牙菜 ^[22]	遗传多样性研究	得到了最适 PCR 反应条件	实验条件为后续 RAPD 实验提供了实验参考;遗传多样性研究结果为尼泊尔印度獐牙菜及其他属内物种的保护和可持续利用研究提供了重要信息;发展了物种基原的分子验证方法
印度獐牙菜 ^[23]	遗传多样性研究	用 26 对随机引物扩增, 285 条条带中 263 条(92.98%) 具有多态性	表明印度獐牙菜在多变环境中具有较强生存和适应能力;为印度獐牙菜的人工栽培和种植提供了可能性;RAPD 法成为研究印度獐牙菜遗传多样性的一种快速有效手段
印度獐牙菜 ^[24]	基原植物鉴定	以 RAPD 为基础获得 SCAR 引物,对印度獐牙菜和穿心莲进行扩增,仅印度獐牙菜产生清晰明亮的特异性条带	从印度獐牙菜和穿心莲的掺杂物中区分出基原植物印度獐牙菜;为简单有效分析市场样本的基原植物提供思路

2 AFLP 技术在獐牙菜属植物研究中的应用

AFLP 技术是一种高效的 DNA 多态性检测技术,其原理是用 2 种限制性内切酶对基因组总 DNA 进行双酶切,酶切形成的不同大小片段与含有黏性末端的人工接头相连,形成具有不同酶切位点的酶切片段,选用特异性引物对其进行选择性扩增,扩增产物经凝胶电泳分离成不同限制性片段长度多态性的过程。AFLP 技术具有高效、DNA 用量少、可靠性好、重复性高、呈典型的孟德尔方式遗传、操作相对简单等优点,被用于遗传图谱构建、遗传多样性检测、种质资源鉴定、目的基因定位、基因表达调控、辅助育种等方面的研究。AFLP 技术随着不断被改进衍生出了选择性扩增 DNA 片段(selective amplified DNA fragments, SADF)等多种相关技术,且各具特色^[25-26]。

目前报道的关于 AFLP 技术在獐牙菜属药用植物中的研究很少,但其具有独特的优势。如 Misra 等^[27]用 AFLP 技术对 6 种獐牙菜属植物进行了 DNA 指纹图谱研究,64 对 AFLP 引物中的 46 对共产生

了 5 312 条条带,6 种獐牙菜属植物各具特异性条带,如印度獐牙菜产生 131 条,狭叶獐牙菜产生 19 条,普兰獐牙菜产生 47 条,心叶獐牙菜产生 94 条。该研究成功区分了 6 种不同的獐牙菜属植物,为鉴定药材真伪、解决药物掺杂问题提供了一定的实验和理论基础。

3 SSR 技术在獐牙菜属植物研究中的应用

SSR 又叫微卫星,指普遍存在于真核生物整个基因组中的短核苷酸重复序列,是目前应用最广泛的分子标记之一。SSR 标记具有共显性(以孟德尔方式遗传)、信息量大(等位基因丰富)、信息含量丰富(多态性高)、所需 DNA 量少(仅需微量组织)、实验操作简单、重复性好、位点两侧序列保守性高等特点和优势。SSR 技术被广泛应用于遗传图谱、基因定位、图位克隆、遗传多样性、遗传变异、品种鉴定、辅助育种等研究^[28-29]。

SSR 分子标记在獐牙菜属中的应用发展相对较慢,直到 2015 年由刘越等^[30]对川西獐牙菜转录组序列进行了 SSR 信息分析,挖掘发现 5 099 条序列

中出现了 5 610 个 SSR 位点, 发生频率为 7.41%, 其中, 出现频率最高的是三核苷酸重复基元, 之后是二核苷酸, 它们的优势重复基元分别是 AAT/TTA 和 AT/TA, 以 5~10 次重复为主, 主要集中在 12~30 bp。以上结果表明在川西獐牙菜转录组中 SSR 较多, 重复类型丰富, 可用性较高, 这为研究獐牙菜 SSR 功能标记提供了丰富的候选序列。此外, Zhang 等^[31]通过 AFLP 法快速分离得到了 24 个 SSR 标记引物, 其中, 12 个引物扩增传统藏药植物椭圆叶花锚的 2 个居群时均显示出多态性, 预期杂合度为 0.191~0.784, 表观杂合度为 0.417~0.917, 而这些引物在獐牙菜叶中成功得到了扩增。这为研究椭圆叶花锚的遗传多样性和遗传结构开发了一套新的微卫星标记, 同时, 也促进了同为龙胆科的獐牙菜属植物遗传方面的研究。

4 ISSR 技术在獐牙菜属植物研究中的应用

ISSR (inter-simple sequence repeats), 是在 SSR 基础上发展起来的一种新型的分子标记技术, 其原理是在真核生物基因组中普遍存在的 SSR 5'或 3'末端锚定 2~4 个随机核苷酸作为引物, 以 SSR 间具有反向排列的一段序列进行扩增。ISSR 分子标记技术比 RAPD、SSR 多态性丰富, 具有简单快捷、易操作、成本低、重复性好、稳定性好、安全性高等优点。ISSR 技术广泛应用于种质资源的鉴定、遗传多样性、亲缘关系分析、遗传图谱构建以及优质基因的发掘和定位等方面^[32-34]。

ISSR 技术在獐牙菜属中的应用相对比较成熟。Zhang 等^[35]分别用 RAPD 和 ISSR 法对青藏高原道地植物祁连獐牙菜 3 个居群 63 个个体进行了遗传多样性检测, 用 RAPD 法得到 94% (156 条) 的多态性条带, 用 ISSR 法得到 96% (222 条) 的多态性条带, AMOVA 分析结果表明居群间存在较大分化, 用 RAPD 和 ISSR 法检测时居群间分化分别占 52% 和 56%, 认为造成居群间较高遗传分化的主要原因可能是居群间隔离及人类活动对植物生境的影响。从以上研究结果可以看出, 用 ISSR 和 RAPD 法分别研究祁连獐牙菜的遗传多样性时, 虽然得出结果一致, 但数据有一定差别, ISSR 法要优于 RAPD 法。Tamhankar 等^[36]为鉴别印度獐牙菜及其掺杂物, 筛选了 16 对引物, 用 ISSR 技术对其中 12 种进行了指纹图谱研究, 发现所有引物均能扩增出不同的 DNA 条带, 只是不同引物扩增分辨能力不同, 条带多态性不同, 此结果说明 ISSR 技术可用来鉴别不

同的种群, 且效率高、结果可靠。杨路存等^[37]采用正交试验与单因素设计相结合的方法, 对 PCR 程序中不同条件进行优化筛选, 建立了 (25 μ L) ISSR-PCR 反应的最佳体系: 3.0 mol/L Mg^{2+} , 250 μ mol/L dNTP, 0.6 μ mol/L 引物, 1 U TaqDNA 聚合酶, 40 ng DNA, 2.5 μ L 10 $\times$ buffer。这一体系的建立为 ISSR 法在四数獐牙菜遗传多样性研究及物种保护方面提供了一定基础。在此基础上, Yang 等^[38]又用 10 对引物对四数獐牙菜 34 个居群进行了 ISSR 指纹图谱研究, 发现居群间多态位点百分率 (PPB) 为 98.9%, Shannon 指数 (I) 为 0.347 5, Nei 的基因多样性指数 (H_e) 为 0.222 7; 居群内 PPB 为 32.7%, I 为 0.177, H_e 为 0.12, 居群间遗传多样性水平较高, 而居群内遗传多样性水平较低。这种遗传结构可能是由强大的遗传漂变、繁殖系统和有限的基因流所造成的。四数獐牙菜居群间显著的遗传分化结果表明, 为了保护四数獐牙菜的遗传多样性和进化进程, 应尽可能地让植株在原生境生长。

5 DNA 条形码技术在獐牙菜属植物研究中的应用

DNA 条形码技术是利用生物体 DNA 中一段保守片段对物种进行快速准确鉴定的新兴技术。随着分子生物学的快速发展, DNA 条形码技术已成为目前最广泛的植物系统学研究手段。这类特定序列中应用较为频繁的有核基因组 DNA (nDNA) 中的 ITS 序列, 叶绿体基因组 DNA (cpDNA) 中的 *rbcL*、*trnL* 和 *matK* 等序列, 线粒体基因组 DNA (mtDNA) 中的 *matK* 序列等, 已应用于悬钩子、蔷薇等植物的分子系统学研究等方面^[39-40]。本文着重介绍 ITS 和 *matK*、*rbcL*、*trnL* 序列在獐牙菜属植物中的应用, 见表 3。

从表 3 可看出, 从 2001 年至今, DNA 序列在獐牙菜属植物中的研究主要围绕 ITS 展开, ITS 分为 2 部分, 5.8 S 和 2 个内部转录间隔区 ITS1 和 ITS2。从不同方法的先后使用可以看出人们对 ITS 的研究越来越透彻, 主要涉及了种质资源鉴定、遗传多样性研究、系统发育树构建 3 方面内容, 此外, 2014 年 Kakiuchi 等^[48]为探究云南 4 种獐牙菜属植物的遗传背景与化学成分是否相关联, 分析了 6 种獐牙菜 (云南 4 种, 河北 2 种) rDNA 序列, 即 ITS1、5.8 S rRNA 和 ITS2 序列, 发现云南 4 种獐牙菜中 2 种遗传背景和化学组成均相似, 其余 2 种与河北省 2 种獐牙菜两两比较, 发现一对獐牙菜遗传背景相近, 化学组成不同, 另 1 对獐牙菜遗传背景相似,

表 3 DNA 序列在獐牙菜属植物研究中的应用

Table 3 Application of gene marker on research of plants from *Swertia* L.

年份	DNA 序列	研究内容	主要研究结果
2001	ITS ^[41]	比较川西獐牙菜及其混淆种序列	序列间存在一定分子差异；其与抱茎獐牙菜序列完全相同，可作为藏茵陈类药材新植物来源
2006	ITS ^[42]	区分川西獐牙菜及其 13 种掺杂物	序列间存在显著差异；为基原鉴别提供了有效的分子标记手段
2010	ITS、rpl16、trnL-trnF ^[43]	四数獐牙菜系统发育分析	其在 3 种系统发育树中均基本与椭圆叶花锚聚在一起；支持将四数獐牙菜从獐牙菜属中分出而归入 <i>Anagallidium</i> Griseb 属的观点
2013	ITS、matK、trnH-psbA、 rbcL ^[44]	獐牙菜亚族 DNA 条形码研究	ITS 与 matK 组合物种鉴别率 100%；推荐以上双条形码组合为獐牙菜亚族植物标准条形码
2014	ITS、matK ^[45]	獐牙菜亚族属间和属内系统关系探讨	獐牙菜属折皱组和獐牙菜组、宽丝组和藏獐牙菜组、口药花属与獐牙菜属多枝组的大籽獐牙菜亲缘关系最近
	ITS2 ^[46]	6 种假龙胆属及 3 种近缘属植物鉴定	系统发育树鉴别出了两种假龙胆属植物；建立了分子鉴定方法
2016	ITS2 ^[47]	龙胆科藏药“蒂达”类 5 种獐牙菜属植物鉴定	除二叶獐牙菜和华北獐牙菜外龙胆科藏药“蒂达”类 11 个种各自聚为一支，表现出良好单系性

化学组成 50% 相似。以上结果说明，尽管遗传背景会对獐牙菜属药用植物成分产生一定的影响，但土壤、气候等环境条件对植株次生代谢产物的生成至关重要。

6 结语与展望

6.1 结语

首先，分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用主要经历了 RAPD、AFLP、SSR、ISSR 和 DNA 条形码 5 个阶段，RAPD 和 DNA 序列标记技术应用广泛，十分成熟。其中，RAPD 技术应用频繁，主要集中在印度等国。AFLP、SSR 和 ISSR 技术应用相对较少，其中 AFLP 技术应用最少，可能由实验成本过高、操作过于复杂等原因造成；DNA 条形码发展迅速，运用最为广泛。研究者可根据自己的研究条件和研究内容选择合适的分子标记应用于獐牙菜属植物的研究。

其次，从分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的领域和内容来说，以研究川西獐牙菜、印度獐牙菜、四数獐牙菜和祁连獐牙菜者居多，研究领域涉及的遗传多样性、系统发育和物种基原、药材鉴别等方面较多，体细胞杂交核基因特征等方面较少。在獐牙菜属中不同分子标记偏向研究不同种类的不同内容，如 RAPD 主要用于研究印度獐牙菜体细胞杂交基因特征、遗传多样性和基原物种鉴定；ISSR 主要用于研究祁连獐牙菜遗传多样性和四数獐牙菜指纹图谱；DNA 条形码主要用于研究川西獐牙菜物

种鉴定、四数獐牙菜系统发育和獐牙菜亚族植物系统发育等。

最后，从分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的意义来说，研究内容具有不同价值，如研究獐牙菜属植物系统发育能将獐牙菜属中的种更准确地定位到其系统位置，从而更好地了解獐牙菜属某些植物的特征及进化历程；研究獐牙菜属植物遗传多样性，一方面能更好地了解并保护其遗传品质，从而提高其药用化学成分的量，发挥獐牙菜属植物更强大的药用价值，另一方面也能实现对獐牙菜属植物更好的保护；研究獐牙菜属植物基原鉴定能更好地保护其基原，从而实现对其可持续利用。

6.2 展望

本文首次系统综述了分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用情况，分子标记技术作为一种新型的技术极大地促进了獐牙菜属植物在系统发育等领域的发展，但獐牙菜属植物种类较多，而分子标记技术种类也很多，在獐牙菜属植物研究中的应用还有待加强，应用前景广阔。只有加快遗传多样性、基原鉴定等方面的研究，才能更好的保护和利用獐牙菜属植物。

参考文献

- [1] 韩磊, 孙欣. 植物分子标记研究进展 [J]. 现代农业科技, 2015(15): 47-48.
- [2] 陈秀华, 于丽娟, 罗黎明, 等. 玉米分子标记辅助育种及标记开发研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2016,

- 18(1): 26-31.
- [3] 周兰英, 王湘南, 陈永忠, 等. 油茶种质遗传多样性的分子标记技术和 EST 文库构建 [J]. 生命科学研究, 2012, 16(6): 557-564.
- [4] 吴超, 夏岩石, 吕永华, 等. 烟草青枯病抗性分子标记的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(4): 937-945.
- [5] 吴则东, 江伟, 马龙彪. 分子标记技术在农作物品种鉴定上的研究进展及未来展望 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(33): 172-176.
- [6] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1996.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [9] 卢学峰, 张胜邦. 青海野生药用植物 [M]. 青海: 青海民族出版社, 2012.
- [10] 任凌燕, 李隆云, 秦松云. 国产獐牙菜属药用植物的研究进展 [J]. 重庆中草药研究, 2001(44): 42-46.
- [11] 李冬梅, 肖怀, 刘光明. 獐牙菜属植物研究进展 [J]. 大理学院学报, 2007, 6(2): 77-80.
- [12] 王伟晶, 白亚东, 陶劲. 藏药獐牙菜属植物的研究进展 [J]. 青海科技, 2011(1): 18-20.
- [13] 井灵, 张玉娟, 陈志. 川西獐牙菜的化学成分及药理研究进展 [J]. 青海农林科技, 2014(4): 55-57.
- [14] 李兆云, 王志远, 肖怀, 等. 獐牙菜属植物研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(30): 51-53.
- [15] 刘黄刚, 张铁军, 王莉丽, 等. 獐牙菜属药用植物亲缘关系及其资源评价 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1646-1650.
- [16] 刘海青, 刘亚蓉, 朱志强. 青海獐牙菜属药用植物资源开发与保护 [J]. 中草药, 1996, 27(2): 112-114.
- [17] 赵纪峰, 刘翔, 王昌华, 等. 珍稀濒危药用植物川西獐牙菜的资源调查 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 845-850.
- [18] 谭云, 李忠海, 黎继烈, 等. RAPD 分子标记技术在植物研究上的应用 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(25): 10236-10238.
- [19] 李子东, 邵菲, 蔡云飞, 等. 胡萝卜与川西獐牙菜不对称体细胞杂种的核/质基因组特征 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(3): 254-260.
- [20] Wang J F, Zhao C Z, Liu C, *et al.* Introgression of *Swertia mussotii* gene into *Bupleurum scorzonnerifolium* via somatic hybridization [J]. *BMC Plant Bio*, 2011, 11(1): 71-80.
- [21] Jiang L, Cai Y F, Xia G M, *et al.* Introgression of the heterologous nuclear DNAs and efficacious compositions from *Swertia tetraptera* Maxim. into *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd. via somatic hybridization [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(3): 737-745.
- [22] Shrestha S, Sijapati J, Rana N, *et al.* Optimization of RAPD-PCR conditions for the study of genetic diversity in Nepal's *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst [J]. *Himalayan J Sci*, 2010, 6(8): 35-40.
- [23] Chhipi Shrestha J K, Bhattarai T, Sijapati J, *et al.* Assessment of genetic diversity in nepalese populations of *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst using RAPD-PCR technique [J]. *Am J Plant Sci*, 2013, 4(8): 1617-1628.
- [24] Yadav A, Ahmad J, Ahmad A. Development of randomly amplified polymorphic DNA-Sequence characterized amplified region marker for authentication of *Swertia chirayita*, an endangered Himalayan plant [J]. *J Plant Mol Biol Biotechnol*, 2012, 3(1): 27-34.
- [25] 刘静. AFLP 分子标记的发展及应用 [J]. 山东农业科学, 2010(5): 10-14.
- [26] 肖硕. AFLP 分子标记技术在中药研究中的应用进展 [J]. 生物技术通报, 2010(12): 69-72.
- [27] Misra A, Shasany A K, Shukla A K, *et al.* AFLP markers for identification of *Swertia* species (Gentianaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2010, 9(3): 1535-1544.
- [28] 王燕龙, 姜言生, 曲志才, 等. SSR 分子标记在作物种质资源鉴定中的应用 [J]. 山东农业科学, 2012, 44(10): 11-18.
- [29] 李珊珊, 孙春玉, 蒋世翠, 等. SSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用 [J]. 吉林蔬菜, 2014(5): 33-38.
- [30] 刘越, 岳春江, 王翊, 等. 藏茵陈川西獐牙菜转录组 SSR 信息分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2068-2076.
- [31] Zhang Z R, Yang J, Sun Y, *et al.* A set of novel microsatellite markers developed for the traditional Tibetan medicinal plant *Halenia elliptica* (Gentianaceae) [J]. *Am J Bot*, 2011, 98(7): 173-175.
- [32] 周亚星, 周伟. ISSR 分子标记技术在作物遗传育种中的应用 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2011, 26(6): 682-684.
- [33] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用 [J]. 种子, 2010, 29(2): 55-59.
- [34] Sarwat M. ISSR: A Reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 862(7): 103-121.
- [35] Zhang D F, Chen S L, Chen S Y, *et al.* Patterns of genetic variation in *Swertia przewalskii*, an endangered endemic species of the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Biochem Genet*, 2007, 45(1/2): 33-50.
- [36] Tamhankar S, Ghate V, Raut A, *et al.* Molecular profiling

- of “Chirayat” complex using inter simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1266-1270.
- [37] 杨路存, 陈桂琛, 等. 四数獐牙菜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化 [J]. 生物技术通报, 2010(9): 123-128.
- [38] Yang L C, Zhou G Y, Chen G C. Genetic diversity and population structure of *Swertia tetraptera* (Gentianaceae), an endemic species of Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Biocheml System Ecol*, 2011, doi: 10.1016/j.bse.2011.08.003.
- [39] 张 丽, 王小蓉, 王 燕, 等. DNA 序列在悬钩子属植物分子系统学研究中的应用进展 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(2): 423-430.
- [40] 郑小艳, 曹家树, 滕元文. DNA 序列分析在植物分子系统学研究中的应用现状——以蔷薇科为例 [J]. 园艺学报, 2009, 36(12): 1827-1836.
- [41] 刘建全, 陈之端, 廖志新, 等. “藏茵陈”原植物及其混淆种类的 ITS 序列比较 [J]. 药学报, 2001, 36(1): 67-70.
- [42] Xue C Y, Li D Z, Lu J M, *et al.* Molecular authentication of the traditional Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(13): 1223-1226.
- [43] 杨路存, 陈桂琛, 周国英. 基于不同 DNA 序列对四数獐牙菜系统位置分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(9): 1773-1779.
- [44] 孙 瑶, 郝厚诚, 薛春迎. 獐牙菜亚族植物 DNA 条形码研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2013, 47(4): 551-557.
- [45] 郝厚诚, 孙 瑶, 薛春迎. 基于 ITS 和 matK 序列的獐牙菜亚族 (龙胆科龙胆族) 分子系统学 [J]. 植物分类与资源学报, 2014, 36(2): 145-156.
- [46] 李振华, 龙 平, 朱 虹, 等. 基于 ITS2 序列鉴定 6 种假龙胆属及 3 种近缘属植物 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(9): 724-729.
- [47] 刘 川, 张雨欣, 刘 悦, 等. 龙胆科藏药“蒂达”类的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 567-571.
- [48] Kakiuchi N, Iwaki N, Mikage M, *et al.* Phylogenetic examination of crude drugs derived from Yunnanese *Swertia* plants [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(1): 206-210.