

分子鉴定技术在南药研究中的应用进展

朱美玲¹ 王林娜² 胡培³ 林励⁴ 杨光义¹

(1 深圳市宝安中医院(集团),深圳,518000; 2 湖北中医药大学,武汉,430000;

3 湖北医药学院,十堰,442000; 4 广州中医药大学,广州,510000)

摘要 “南药”是我国中药资源的重要组成部分,近年来,南部诸省均积极寻求“南药”道地药材产业之路,但“南药”植物资源种类和数量不清、种质资源难保存、野生资源遭受严重破坏、人工栽培品种品质退化等问题严重制约了“南药”产业的发展。分子鉴定技术是近年来兴起的一种鉴定技术,具有准确性高、重复性好的优点。本文对常用的分子鉴定技术进行了分析总结,从遗传多样性分析、亲缘关系分析、正伪替及多基原鉴定、种质资源评价4个方面对分子鉴定技术在“南药”中的应用进展进行归纳总结,为“南药”产业今后的发展方向提供依据。

关键词 分子鉴定技术;南药;遗传多样性;亲缘关系;种质资源;真伪鉴别

Application of Molecular Identification Technology in “Nanyao”

Zhu Meiling¹, Wang Linna², Hu Pei³, Lin Li⁴, Yang Guangyi¹

(1 Shenzhen Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital (Group), Shenzhen 518000, China; 2 Hubei University of Chinese

Medicine, Wuhan 430000, China; 3 Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 4 Guangzhou

University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

Abstract “Nanyao” is an important component of Chinese medicine resource. In recent years, provinces in the south of China have actively sought the path of the genuine regional drug industry of “Nanyao”, which has been seriously restricted by the existent problems that the species and quantity of “Nanyao” herb resources are not clear, and the germplasm resources are hard to preserve. The wild resources are severely damaged and the quality of cultivated varieties is degraded. Molecular identification technology is a new identification technique that has been widely applied in recent years, with the advantages of high accuracy and good repeatability. In this paper, the commonly used molecular identification techniques were analyzed and summarized, and the application of molecular identification techniques in “Nanyao” was analyzed from four aspects: genetic diversity analysis, genetic relationship analysis, germplasm resources evaluation, and the identification of genuine medicine, substitute, counterfeit species, multi-source one, aiming at providing the basis for the development of “Nanyao” industry.

Key Words Molecular identification technology; “Nanyao”; Genetic diversity analysis; Genetic relationship analysis; Germplasm resources evaluation; Identification

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.067

中医药是中华民族的宝贵财富,“南药”特指生长在我国秦岭以南的中草药。从晋代古籍稽含《南方草木状》(公元304年前后),唐末五代李珣《海药本草》(公元9世纪末至10世纪初),至民国时期萧步丹《岭南采药录》(1932年复印本),胡真《山草药指南》(1942年复印本)^[1]所述大都为中国国内南方的药材,特别是岭南草药,但广义上的“南药”亦涉及东南亚、南非等地的一些药材。就中国国内而言,长江以南的热带、亚热带地区,大体以纬度25°为界,通常是广东(含海南)、广西、福建南部、云南、台湾、港澳等地所产的道地药材,称之为“南药”^[2]。如化橘红、广陈皮、阳春砂、广藿香、巴戟天、沉香、广佛手、何首乌八大“南药”。

国家对“南药”的重视由来已久:1969年,商业部、外贸部、农垦部、林业部、卫生部、财务部六部委联合发文《关于发展南药生产问题的意见》,列出植物类南药34种;1970年首届南药会议在广东湛江召开;国家有关部委曾召开了四届全国南药会议;1975年商业部、农林等部发出《关于发展南药生产十年规划的意见》。近年来,广东、广西、云南、海南、福建等省区都在积极寻求发展“南药”道地药材产业之路,希冀借助“南药”品牌增强各自的中医药产业竞争优势^[3]。为了更好的保障“南药”产业的发展,确保“南药”的质量以及临床用药的安全性和有效性,对“南药”进行基原鉴定,显得尤为重要。中药材传统的鉴定方法主要是依靠老药工的眼看、手摸、鼻闻、

作者简介:朱美玲(1970.12—),女,博士,主任技师,研究方向:分子生物学,E-mail:1930896811@qq.com

通信作者:杨光义(1975.08—),男,博士,主任药师,研究方向:中药资源与药代动力学,E-mail:ygy996@163.com

口尝,以经验鉴别为主,而中药饮片的性状特征不突出,不确定因素太多,而化学特征也会因各个药材特异性强,研究中建立的方法一般不通用。因道地药材以数量遗传性状为主,在基因水平表现为多基因构成的数量遗传,发现道地药材的特定分子特征,对其稳定的遗传特征进行描述,是道地药材今后发展的方向。

DNA 作为遗传信息的直接载体,不受外界因素、生物发育阶段或器官组织差异的影响,既抛开形态相似的表象,又可避免化学特征的过于多变,而从基因水平上提供一种鉴别依据,具有更加准确、可靠的特点;容易找到种级的鉴定特征,甚至可以进行种下等级的鉴定^[4]。黄璐琦^[5]将分子生物学与中药资源研究有机结合,应用 Cytb 序列对蕲蛇和乌梢蛇进行 PCR 扩增鉴别,有效地将二者区分。陈士林等^[6]研究的 ITS2 序列已经被广泛应用于中药鉴定研究中,大量的 ISSR、RAPD、AFLP 技术在中药材遗传多样性方面也已经成熟。2010 年版和 2015 年版《中华人民共和国药典》已正式收录了乌梢蛇、蕲蛇和川贝母 DNA 分子鉴别方法及中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则,标志着中药分子鉴定方法成为继四大经典鉴别方法之后的第五大国家法定鉴定方法^[7]。正逐步成为中药鉴定的主要手段^[8]。本文对常用分子生物学技术及其在南药中的应用进行综述,旨在为“南药”道地药材产业的发展奠定基础。

1 常用的分子鉴定技术

1.1 基于 PCR 的 DNA 指纹图谱技术 DNA 指纹图谱是一个可以反映基因组 DNA 特征的技术,通过 DNA 指纹图谱技术将基因组特征图像化,便可获得生物 DNA 的“指纹”。比较各物种的特异图谱,可了解它们的相似性或差异,从而做出鉴定。

1.1.1 RAPD 技术 RAPD 即随机扩增的多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic, DNA),是由美国的 2 个研究小组于 1990 年同时提出的一种 DNA 分子标记技术。William 等^[9]第一次用任意序列的 10 个碱基的寡糖核苷酸作单引物,以未知系列的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增可获得一组不连续的 DNA 片段。并将这种以随机引物作扩增的技术称为随机扩增的多态性 DNA 标记,扩增产物的多态性反映了基因组的多态性。Welsh 等^[10]用 20~30 个碱基的任意引物,成功获得 DNA 指纹图谱,并命名为任意引物聚合链式反应(Arbitrarily Primed-PCR, AP-PCR)。RAPD 技术具适应性广、简便、快

速、灵敏度高的特点,对受试基因组无特定要求,无需杂交、基因克隆、测序等步骤,自问世以来,科研人员在将其应用于中药材鉴定方面开展了大量的研究工作,现已广泛的应用于生物的品种鉴定、系谱分析及进化关系的研究上^[11]。

1.1.2 ISSR 技术 1994 年 Zietkeiwicz 等^[12]针对广泛存在于真核细胞内的简单系列重复(Simple Sequence Repeat, SSR),设计出简单系列重复区间扩增多态性(Inter-simple Sequence Repeat, ISSR)。其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物,即在 SSR 序列的 3'端或 5'端加上 2~4 个随机核苷酸,在 PCR 反应中,锚定引物可引起特定位点退火,导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片段进行 PCR 扩增。ISSR 标记技术试验操作简单、快速、高效,不需要繁琐的构建基因文库、杂交和同位素显示等步骤,现已广泛应用于药用植物种质资源鉴定、进化与亲缘关系分析、遗传多样性与居群遗传结构检测、遗传作图、基因定位、分子标记辅助育种等方面的研究^[13]。

1.1.3 AFLP 技术 1995 年 Vos 等^[14]发明了一种集 PCR 和 RFLP 优点于一身的扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)。是利用限制性内切酶(单酶切或双酶切)能够把样品基因组 DNA 酶切成大小不同的片段,设计合成双链人工接头与酶切片段相连接。以接头和酶切位点序列的互补碱基再增加 1~3 个选择性碱基作为引物,进行 PCR 扩增。扩增后的不同大小片段需要进行变性,再经含尿素的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,经放射自显影或银染或荧光技术呈现 DNA 指纹图谱^[15]。AFLP 技术具有重复性好、多态性高的优点。但因该技术对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求很高、操作复杂,且费用昂贵,在药材鉴定中的应用没有其他分子标记方法广泛。

1.1.4 SRAP 技术 2001 年 Li 和 Quiros H^[16]发展了一种新型的相关序列扩增多态性(Sequence Related Amplified Polymorphism, SRAP),该标记通过独特的双引物设计对基因的 ORFs(Open Reading Frames)的特定区域进行扩增,上游引物长 17 bp,对外显子区域进行特异扩增。下游引物长 18 bp,对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。SRAP 标记技术具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点。目前已成功地应用于作物遗传多样性分析、

遗传图谱的构建、重要性状的标记以及相关基因的克隆等方面^[17]。DNA 指纹技术具有操作简易、灵敏度高的优点,可为中药鉴定提供更加准确可靠的手段,尤其是它可以在不知道特异 DNA 序列的情况下检测 DNA 的多态性。目前,在绝大多数动、植物中药材 DNA 序列尚不清楚的情况下,DNA 指纹技术在中药品种鉴定研究方面具有广阔的应用前景。

1.2 DNA 测序技术和条形码技术 DNA 测序(DNA sequence)是将基因片段上每一个碱基序列直接展示。利用 DNA 测序获得排序结果,按照排序结果构建的物种亲缘关系可以用于不知名物种的鉴定。具体方法是对样本及已鉴定标本进行测序,绘制出分子系统树,不知名样本会跟进化差异最小的物种组成一个散群(cluster),由此判断样本的真正身份。Bartlett 等^[18]于 1992 年在此逻辑上发展了一套“法证信息核苷酸测序法”(Forensically Informative Nucleotide Sequencing, FINS),1994 年 Forrest 和 Carnegie 对其进行了优化^[19]。“生命条形码联盟”(CBOL)于 2003 年提出线粒体的细胞色素 C 氧化酶亚单位 1 (Cytochrome C oxidase Subunit 1 mitochondrial region, COI)是鉴定昆虫和动物的标准序列,这种生物品种鉴定方法即为 DNA 条形码技术(DNA barcoding)。2008 年该组织又确立了以叶绿体的 *rbcL* 及 *matK* 患者基因为植物的条形码^[20]。目前采用 DNA 条形码对植物类中药进行分子鉴定,多以 ITS2 序列为主,以 *psbA-trnH* 序列为辅;动物类中药鉴定多以 CO 序列为主,ITS2 为辅助序列。

1.3 基于 PCR 的高通量核酸杂交技术 生物芯片(如 DNA chip)或 DNA 微阵列(DNA microarray)是一种高通量的检测平台,在生物芯片上,同时进行海量的核酸杂交实验,观察基因数据。由于中药材的生物来源广,该技术正好为高通量鉴定开辟出一条新道路。Liu 等^[21]利用 18SrRNA 基因序列特异性探针针对半夏 *Pinellia ternate* 及其伪品虎掌(掌叶半夏) *P. pedatisecta* 的鉴定;Zhu 等^[22]利用 18SrRNA 基因序列特异性探针针对人参属植物与生药的鉴定。5SrRNA 间隔区和 26SrRNA 基因 D2、D3 区特异性探针针对贝母属 *Fritillaria* 的鉴定^[23];5SrRNA 间隔区和 ITS2 特异性探针针对石斛属 *Dendrobium* 的成功鉴定^[24-25]。目前采用 DNA 芯片技术成功鉴定的研究虽不多,但也表明 DNA 芯片技术可为植物种属鉴定提供快速、高通量的工具。

2 分子生物技术在南药中的应用

2.1 遗传多样性分析 物种或居群的遗传多样性

大小是长期进化的产物,是其生存适应和发展进化的前提。一个居群或物种遗传多样性越高或遗传变异越丰富,对环境变化的适应能力就越强越;也就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境。朱华等^[26]以同一产地的 2 种青天葵生药样品为实验材料,应用 RAPD 分子标记技术对其种间遗传多样性进行分析,研究表明利用 RAPD 技术可以灵敏地检测出种间遗传多样性,并对二者加以鉴别。杨春勇等^[27]采用 AFLP 分子标记技术分析海南、云南、广东、广西等地 17 份沉香属植物的遗传多样性,从筛选出的 8 对引物中检测到 919 个位点,多态性位点百分率为 86.94%,揭示沉香属植物具有较高的遗传多样性水平。邹颖^[28]采用 SSR 标记对南药益智的 19 个居群共 431 份样品进行遗传多样性研究,结果表明,遗传多样性略高于平均水平,居群内的遗传分化大于居群间的遗传分化,说明益智居群间不存在基因交流障碍,且存在一定程度的近交。杨全等^[29]采用 AFLP 技术对 8 个种源地的高良姜进行遗传多态性分析,发现高良姜种质间存在较高多态性,遗传多样性丰富;为探求各种质间的亲缘关系,合理利用种质资源及优良品种选育奠定理论基础。Wang H 等^[30]用 ISSR 法对益智 7 个居群共 163 个个体进行研究,结果表明广东益智居群和海南五指山益智居群遗传进化比较原始,其中五指山居群具有较高的遗传多样性。对遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史,也能为进一步分析其进化潜力和未来的命运提供重要的资料,尤其有助于物种稀有或濒危原因及过程的探讨。

2.2 伪、替及不同基原的鉴定 中药材种类繁多,常有中药的正、替、伪品混淆使用,以致干扰疗效,甚至导致中药中毒事故;寻找操作方便、可信度高的鉴定方法来鉴别中药材的真伪对于临床安全用药极为重要。杜勤等^[31]对 22 个青天葵样品及伪品进行 RAPD 分析,结果发现干药材中小叶与中叶距离较近,与大叶及毛叶距离远。新鲜叶片中 3 种青天葵为一类,青天葵与其组培品、毛叶与红薯叶距离稍远,与车前草、积雪草距离最远,说明不同品种青天葵间及伪品在分子水平上存在差异,应用此方法可成功鉴别青天葵。黄琼林等^[32-34]基于 DNA 条形码鉴别技术对 3 种青天葵及 4 种混伪品的鉴别作了深入研究,通过 ITS2、*rbcL*、*matK* 条形码序列信息的分析表明,基于这 3 条序列均能直观地区别青天葵及其混伪品种;应用 *matK* 序列能完全鉴别供试的 7 个物种。焦文静^[35]等对砂仁 3 个基原共计 60 份材料

ITS2 序列进行分析比较,发现 3 个不同基原在 135 bp 和 199 bp 处存在稳定 SNP 变异位点,根据这 2 个稳定的 SNP 位点可以快速准确地鉴定砂仁药材 3 个基原。卫滢等^[36]对巴戟天及其 3 种近缘植物的 ITS2 和 psbA-trnH 序列进行 PCR 扩增和测序,发现 ITS2 序列上种间变异大于种内变异,能准确鉴别出全部供试物种;psbA-trnH 序列上种间变异大于种内变异,仅能准确鉴别出海滨木巴戟和羊角藤。应用传统的鉴别方法难以进行“南药”的多基原鉴定及亲缘关系近的正品、替代品的鉴别,分子鉴定技术可从基因水平上对其进行准确区分,为“南药”鉴定提供依据。

2.3 亲缘关系分析 植物在漫长的演化过程中,形成了或远或近的亲缘关系,亲缘相近的种不仅体现在形态上的相似,同时,还体现在生理生化特性上的相似,因而所含的化学成分,作为植物的次生代谢产物,往往也比较相似,也就是说亲缘相近的种生物活性和疗效往往具有很大的相似性^[45]。梁文汇^[37]等采用 ISSR 标记技术研究 11 个肉桂(*Cinnamomum cassia*)家系之间的亲缘关系,结果表明这 11 个份样本亲缘关系相对较近,为解决肉桂资源分类和系统学关系的分歧问题提供了一定的分子学依据。战晴晴等^[38]建立了槟榔 SSR 反应体系,PCR 扩增结果清晰且有较高的多态性,表明该体系适合槟榔的亲缘关系分析,为槟榔种质资源鉴定和遗传多样性的研究奠定了基础。严寒静等^[39]采用 PCR 直接测序法,测定了 10 个种源何首乌的核糖体 DNA ITS 区序列,并结合 GenBank 中相关植物的 ITS 序列应用遗传距离与系统树分析法对不同种源何首乌的亲缘关系进行了分析,结果说明 10 个种源何首乌构成 2 个分支,广西田阳种源自成一支,与其他种源亲缘关系较远。黄琼林等^[40]利用 ISSR-PCR 方法对阳春砂栽培品种长果、圆果和“春选”与海南砂进行基因组多态性分析,结果证明“春选”与海南砂有着较近的亲缘关系,建立基于 ISSR 分析的阳春砂遗传分析方法,为阳春砂的品种鉴别和优良品种选育提供了依据。研究“南药”植物的亲缘关系为“南药”植物资源分类及系统学关系提供依据,对优良品种的选育及开发新的药用植物资源具有重要的指导意义。

2.4 种质资源评价 种质资源又称遗传资源。种质是指生物体亲代传递给子代的遗传物质,它往往存在于特定品种之中。种质资源的范围包括古老的地方品种、新培育的推广品种、重要的遗传材料以及野生近缘植物等,是在遗传、育种、生产上有利用价

值的一切植物材料。丁平等^[41]利用 RAPD 技术对巴戟天 5 个不同农家类型的种质资源进行检测,发现不同农家类型巴戟天种质资源在分子水平上存在明显的遗传差异;赵俊生等^[42]对 21 份化橘红及 3 份近缘种质蜜柚和黄皮的 25 个 SNP 位点进行了基因分型,结果表明,21 个 SNP 位点可将 24 份样本分为 3 类,化州橘红种质单独聚为一类,表明 SNP 分子标记将成为化州橘红种质资源评价及品种鉴定的一项重要工具,为化橘红种质资源鉴定提供了有效的方法和依据。潘坤等^[43]采用了 ISSR 分子标记对 96 份海南高良姜种质进行遗传多样性和亲缘关系分析,结果说明海南高良姜栽培种的遗传多样性较低,此研究可为高良姜种质资源的收集、分类、以及 GAP 基地建设等提供一定的理论依据。对“南药”种质资源的研究为药用植物的栽培、育种、贮运与加工等提供重要的理论依据。

3 展望

“南药”药用植物种质资源丰富,但在开发利用过程中存在种类和数量不清、种质资源难保存、野生资源遭受严重破坏、人工栽培品种品质退化等问题,严重制约了“南药”产业的发展。而解决这些问题的关键是要有一套简便快速、准确有效的鉴定技术,以杜绝假、劣以及混淆品的干扰。

目前,“南药”药用植物研究内容主要包括种质资源的鉴定、亲缘关系的划分及遗传起源与演化等,其最终目的在于优良品种的选育,生产优质中药材,而育种上的突破性进展主要依靠 DNA 分子水平的研究进展。分子鉴定技术正飞速发展,并逐渐渗透到生命科学的各个领域,且被证实是一种评价种属间遗传多样性和亲缘关系的有效方法^[44],为“南药”的研究提供了新思路。

分子鉴定技术可以从基因水平上提供鉴别依据,具有准确度高,重复性好,操作简单方便的优点;将分子生物学技术与“南药”药用植物的研究相结合,必将成为“南药”研究的重要手段。分子生物学技术应用于“南药”的研究还属于起步和发展阶段,因此要实现各“南药”近缘种、混伪品的分子鉴定,全面揭示“南药”遗传多样性及品种间的亲缘关系还需要进一步研究。随着科学的进步和研究的不断深入,相信分子生物学技术必将成为研究“南药”的主流技术,为南药产业更好、更快的发展提供有力的支持与保障。

参考文献

[1]孔祥华. 民国岭南草药著作《岭南采药录》与《山草药指南》整理

- 研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
- [2] 肖伟,刘勇,肖培根. 大南药概念的重要意义[J]. 中国现代中药, 2012, 14(3): 60-61.
- [3] 王宏,陈建南. 给“南药”一个确定的概念[J]. 中国医药导报, 2009, 6(32): 56-57.
- [4] 王川易,郭宝林,肖培根. 中药分子鉴定方法评述[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 237-242.
- [5] 时圣明,潘明佳,王洁,等. 分子鉴定技术在中药中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [6] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:4-7.
- [7] 陈士林. 《中药分子鉴定技术与应用》评介[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 1011.
- [8] 吴沿胜,吴沿友,刘宇婧,等. 前胡及其混伪品的中药鉴定学研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2335-2339.
- [9] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [10] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [11] 姚红伟,张立冬,孙金阳,等. DNA 分子标记技术概述[J]. 河北渔业, 2010, 10(7): 42-46.
- [12] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [13] 王发明,李洁维,叶开玉,等. 41 份葡萄种质遗传多样性的 ISSR 和 SCoT 比较分析[J]. 广西植物, 2017, 37(1): 1-8.
- [14] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [15] 陈玉容,高炳森,彭超,等. 基于 PCR 技术的分子标记在南药益智研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1804-1808.
- [16] Li G, Quiros C F. 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [17] 欧阳钟鸣,赵静,彭正松,等. 中国半夏属植物亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 植物科学学报, 2012, 30(2): 116-121.
- [18] Bartlett SE, Davidson WS. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens[J]. Biotechniques, 1992, 13(4): 518.
- [19] Forrest AR, Carnegie PR. Identification of gourmet meat using FINS (forensically informative nucleotide sequencing) [J]. Biotechniques, 1994, 17(1): 24-26.
- [20] Group C P W. A DNA Barcode for Land Plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(31): 12794.
- [21] Liu Y P, Cao H, Komatsu K, et al. Quality control for Chinese herbal drugs using DNA probe technology[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 36(s1): 475.
- [22] Zhu S, Fushimi H, Komatsu K. Development of a DNA microarray for authentication of ginseng drugs based on 18S rRNA gene sequence [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(11): 3953-3959.
- [23] Tsoi PY, Woo HS, Wong HS, et al. Genotyping and species identification of Fritillaria by DNA chips. Acta Pharm Sin, 2003, 38: 185-190.
- [24] Zhang YB, Wang J, Wang ZT, et al. DNA microarray for identification of the herb of dendrobium species from Chinese medicinal formulations[J]. Planta Med, 2003, 69(12): 1172-1174.
- [25] Sze SC, Zhang KY, Shaw PC, et al. A DNA microarray for differentiation of (Fengdou Shihu) by its 5S ribosomal DNA intergenic spacer region. Biotech Appl Biochem, 2008, 49: 149-154.
- [26] 朱华,傅鹏,王孝勋. 青天葵与毛叶青天葵种间关系的 RAPD 鉴定[C]. 建德: 中华中医药学会中药鉴定学术会议, 2008.
- [27] 杨春勇,李海涛,李学兰,等. 栽培沉香遗传多样性的 ISSR 和 AFLP 分析比较[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 553-559.
- [28] 邹颖. 益智(姜科)遗传多样性和遗传结构的研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2013.
- [29] 杨全,张春荣,陈虎彪,等. 不同种源高良姜遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 330-333.
- [30] Wang H, Liu X, Wen M, et al. Analysis of the Genetic Diversity of Natural Populations of Miquel Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers[J]. Crop Science, 2012, 52(4): 1767.
- [31] 杜勤,魏智强,田军. 基于 RAPD 的青天葵遗传多样性及鉴别研究[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 554-557.
- [32] 黄琼林,马新业,何瑞,等. 基于条形码 ITS2 序列的青天葵及其混伪品分子鉴别[J]. 生物技术通报, 2012, 2(12): 173-179.
- [33] 黄琼林,梁凌玲,何瑞,等. 青天葵及其混伪品的 rbcL 基因序列鉴定研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(9): 1630-1634.
- [34] 黄琼林,梁凌玲,何瑞,等. 应用 matK 基因鉴别青天葵及其常见混伪品[J]. 广西植物, 2014, 34(3): 299-303.
- [35] 焦文静,张鹏,廖保生,等. 基于 SNP 位点鉴定砂仁药材物种[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(2): 295-300.
- [36] 卫滢,詹若挺,梁玲珍,等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列鉴别巴戟天及其 3 种近缘植物[J]. 作物杂志, 2017, 1(5): 55-60.
- [37] 梁文汇,刘凯,黄开顺,等. 肉桂家系遗传背景的 ISSR 分析[J]. 广西林业科学, 2016, 45(1): 35-39.
- [38] 战晴晴,周亚奎,杨云,等. 槟榔 SSR 反应体系的建立[J]. 江西农业学报, 2012, 24(9): 60-62, 68.
- [39] 严寒静,房志坚,余世孝. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 922-927.
- [40] 黄琼林,杨锦芬,詹若挺,等. 基于 ISSR 分析的阳春砂分子鉴别[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(5): 518-521.
- [41] 丁平,徐吉银,楚桐丽. 巴戟天不同农家类型种质资源的 RAPD 分析[J]. 中药材, 2006, 29(1): 1-3.
- [42] 赵俊生,杨晓燕,曾祥有,等. 利用 SNP 分子标记分析化橘红种质资源[J]. 分子植物育种, 2016, 14(5): 1203-1211.
- [43] 潘坤,高炳森,王阿超,等. 基于 ISSR 标记的海南高良姜种质资源遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(8): 2224-2231.
- [44] Guo GY, Yang RW, Ding CB, et al. Phylogenetic relationships between Leymus and related diploid Triticeae species revealed by ISSR markers[J]. Biologia, 2014, 69(8): 986-993.