

网络出版时间:2017-05-10 13:39

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.06.031

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170510.1339.062.html

不同荆芥种质资源的 AFLP 标记和 ITS 序列分析

马艳芝

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

【摘 要】【目的】利用 AFLP 标记和 ITS 序列分析方法,对 11 份荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)种质进行分析鉴定,为荆芥种质资源鉴定和利用提供理论依据。【方法】以 11 份荆芥幼苗为材料,提取基因组 DNA,利用 6 种引物组合对其进行 AFLP 标记分析。利用 ITS 引物对荆芥样品进行 PCR 扩增、测序,利用 DNAMAN 软件分析 11 份种质的 ITS 序列,对其进行鉴定。【结果】荆芥 AFLP 标记多态性不高,选用的 6 个引物组合扩增出条带 241 条,多态性条带 154 条,多态性比率为 63.90%;对供试材料 AFLP 数据结果进行聚类,亲缘关系较近或引种频繁地区荆芥种质资源聚类在一起。ITS 序列分析结果表明,供试的 11 份荆芥材料的 ITS 序列完全相同,表明荆芥种质间 ITS 序列保守性较强。【结论】同时利用 AFLP 标记和 ITS 序列分析对荆芥种质资源进行鉴定,可以有效提高检测的准确性。

【关键词】荆芥;AFLP;ITS;种质资源

【中图分类号】Q943

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2017)06-0228-07

Diversity of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. based on AFLP and ITS sequence analysis

MA Yanzhi

(Department of Life Sciences, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to identify and analyze 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. germplasms using AFLP and ITS sequence analysis, which would provide theoretical basis for resource identification and utilization. 【Method】Eleven *Schizonepeta tenuifolia* Briq. cultivars were selected and DNA was extracted from seedlings. Six primer sets were used to conduct AFLP PCR amplification. ITS sequences of the cultivars were then obtained, and the DNAMAN software was employed to align the ITS sequences. 【Result】A total of 241 DNA bands were amplified from the 6 primer combinations including 154 polymorphic bands with the polymorphic ratio of 63.90%, which was not high. Based on AFLP data, clustering analyses on the 11 materials were carried out. Germplasm resources were clustered together based on close relationship or introduction frequent area. ITS sequence analysis showed that there was no difference among the 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. cultivars, indicating that the ITS sequences of *Schizonepeta tenuifolia* cultivars were highly conservative. 【Conclusion】Simultaneous application of AFLP and ITS sequence analysis remarkably improved the accuracy of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. identification.

Key words: *Schizonepeta tenuifolia* Briq.; AFLP; ITS; genetic diversity

〔收稿日期〕2016-03-22

〔基金项目〕河北省教育厅项目(ZC2016004);唐山市科技局项目(15130266a)

〔作者简介〕马艳芝(1977—),女,河北唐山人,副教授,硕士,主要从事药用植物与生物技术研究。E-mail:mayanzhiwx@163.com

荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)的地上部分可入药,是中国八大祁药之一。它具有解热、镇痛、抗炎、抗病原微生物、止血和抗氧化等作用,常用于感冒发热、头痛、咽喉肿痛、麻疹、风疹等。荆芥在全国大部分地区均有种植,主要分布在河北、江苏、浙江、江西、湖北、湖南和东北三省等地,其中以河北安国和浙江萧山所产荆芥最为有名^[1]。目前市场上流通的荆芥品种主要是河北安国生产的北荆芥,以及部分生长在江苏、浙江、江西、湖北和湖南等省份的南荆芥。荆芥价格随市场波动变化较大,许多传统种植区已经弃种,这对荆芥种质资源造成了极大的破坏。虽然荆芥自然分布广泛,但由于不同地区之间相互引种,致使种质亲缘关系不清,同时由于各地荆芥习称不同、民间用药的历史和习惯不同,也导致荆芥在使用和栽培中产生种质混乱现象,因此荆芥种质资源研究是一个比较复杂的问题。目前越来越多的分子生物学技术用于中药种质资源的鉴定工作^[2-9],这大大提升了中药种质资源鉴定的准确度。

AFLP (Amplified fragment length polymorphism)是由 Vos Pieter 等^[10]发展起来的一种检验 DNA 多态性的新方法,它结合了 RFLP 和 RAPD 的优点,具有标记多态性丰富、不受环境影响、用量小、灵敏度高、快速高效等特点,因此被广泛用于遗传多样性研究^[11]。高等植物中的 rRNA 基因(rDNA)是高度重复的串联序列单位,由 18S rDNA、26S rDNA、5.8S rDNA 及位于三者之间的基因内

转录间隔区 ITS 序列 (Internal transcribed spacer) 组成,联结在一起作为一个转录单位,其中 ITS 区由被 5.8S rDNA 所分隔的 ITS1 和 ITS2 2 个片段组成^[12]。ITS 序列因其变异较快、高度重复、可以提供丰富的变异位点和信息点等优点,被广泛用于植物系统进化和种质鉴定研究^[13-14]。但目前关于荆芥种质资源的 AFLP 和 ITS 序列鉴定的研究较少,仅见刘红彬等^[14]利用 ITS 全序列分析国内 5 个不同产地及不同国家裂叶荆芥的亲缘关系和系统进化,结果呈现 ITS 序列的一致性,表明国内 5 个不同产地裂叶荆芥为同一个种;高峰^[15]利用 ISSR 分子标记技术进行荆芥种质资源的遗传多样性研究,认为荆芥遗传多样性较低。本研究拟利用 AFLP 标记和 ITS 序列分析技术,对 11 份荆芥种质进行分类与鉴定,以期对荆芥种质鉴定和资源利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的荆芥种子材料共 11 份,分别取自河北、安徽、浙江等省,材料名称为当地习称,详见表 1,其中 1 号和 3 号为春播品种,其他均为夏播品种。春播品种表现为春季播种,当年 7 月可以采收荆芥穗;夏播品种适宜在夏季播种,当年 9 月采收荆芥穗。目前普遍认为河北安国和浙江萧山荆芥品质最好。

表 1 供试荆芥材料名称及来源
Table 1 Names and origins of tested *Schizonepeta tenuifolia* Briq. materials

材料编号 No. of materials	名称 Name	来源 Origin
1	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	河北安国 Anguo, Hebei province
2	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	河北安国 Anguo, Hebei province
3	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	河北玉田 Yutian, Hebei province
4	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	河北玉田 Yutian, Hebei province
5	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	安徽亳州 Bozhou, Anhui province
6	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	浙江萧山 Xiaoshan, Zhejiang province
7	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	山西省 Shanxi province
8	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	甘肃省 Gansu province
9	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	新疆 Xinjiang province
10	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	江苏省 Jiangsu province
11	荆芥 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	四川省 Sichuan province

试验所用试剂为分析纯,购自上海生工生物工程有限公司;限制性内切酶采用 NEB 公司的 *EcoR* I -HF 和 *Mse* I ;T4 DNA Ligase 为 Promega 公司产品。电泳采用北京六一厂 DYY-7C 型电泳仪和 DYC-34A 型电泳槽进行,目标条带用天根生化科技有限公司琼脂糖凝胶回收试剂盒。T-载体采用大连

宝生物公司 pMD20-T 载体,大肠杆菌感受态细胞 DH5α 来自北京全式金生物技术有限公司。*rTaq* 酶和 dNTP 购自大连宝生物公司 (<http://www.takara.com.cn>)。

1.2 荆芥 DNA 的提取

荆芥幼苗于春播、夏播荆芥苗期(四叶期)采集,

参照 CTAB 法提取荆芥幼苗 DNA。

1.3 AFLP 扩增及检测

荆芥 AFLP 扩增及检测方法参照梁丹等^[16]的方法。AFLP 中所用引物序列如表 2 所示。

表 2 预扩增和选择性扩增引物序列

Table 2 Sequences of pre-amplification and selective amplification primers for AFLP analysis

名称 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
E-F	CTCGTAGACTGCGTACC
E-R	AATTGGTACGCACTCTAC
M-F	GACGATGAGTCTCTGAG
M-R	TACTCAGGACTCAT
E-00	GACTGCGTACCAATTC
M-00	GATGAGTCCTGAGTAA
E-AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC
E-ACA	GACTGCGTACCAATTACACA
E-AGG	GACTGCGTACCAATTACAGG
E-ATC	GACTGCGTACCAATTATC
M-CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACCTT
M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACCTA
M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACCTC

1.3.1 酶切 取 11 份荆芥样品的 DNA 进行双酶切,酶切体系为:10×CutSmart Buffer 3 μL,荆芥 DNA 800 ng, *EcoR* I -HF 1.5 μL 和 *Mse* I 1.5 μL,加 ddH₂O 至总体积 30 μL。37℃酶切 3 h,65℃灭活 20 min。酶切产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测,保障酶切完全。

1.3.2 合成及连接 *EcoR* I 接头(5 μmol/L)合成体系:总体积 50 μL,上游接头 E-F(100 μmol/L) 2.5 μL,下游接头 E-R(100 μmol/L) 2.5 μL,TE 45 μL。*Mse* I 接头(50 μmol/L)合成体系:总体积 50 μL,上游接头 M-F(100 μmol/L) 25 μL,下游接头 M-R(100 μmol/L) 25 μL。接头合成程序为 95℃ 5 min,然后每循环降低 1℃,直至降至 20℃。然后将 *EcoR* I 接头、*Mse* I 接头与 DNA 样品酶切产物进行连接,连接体系为:10×T4 DNA Ligase buffer 2 μL,DNA 酶切产物 10 μL,*EcoR* I 接头(5 μmol/L) 1 μL,*Mse* I 接头(50 μmol/L) 1 μL,T4 DNA Ligase 1 μL,加 ddH₂O 至总体积 20 μL,4℃连接过夜。

1.3.3 预扩增 预扩增体系为:10×PCR buffer 2 μL,*rTaq* 酶 0.2 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,连接产物 4 μL,E-00(10 μmol/L) 0.5 μL,M-00(10 μmol/L) 0.5 μL,加 ddH₂O 至总体积 20 μL。预扩增程序:94℃预变性 2 min;94℃变性 20 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃延伸 10

min,4℃保存。

1.3.4 选择性扩增 将预扩增产物稀释 10 倍后进行选择性扩增,本试验采用 6 种不同的引物组合进行扩增,分别为:E-AAC/M-CAT、E-AAC/M-CAG、E-ACA/M-CTT、E-ACA/M-CTA、E-AGG/M-CAA 和 E-ATC/M-CTC。扩增体系为:10×PCR buffer 2 μL,*rTaq* 酶 0.2 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,预扩增产物 7 μL,加 ddH₂O 至总体积 20 μL。选择性扩增程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 20 s,66℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,10 个循环,每个循环退火温度降低 1℃;94℃变性 20 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,20 个循环;然后 72℃延伸 10 min。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上进行初步检测,在 200~500 bp 有扩增条带。然后 PCR 产物经变性后,在 6%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测,80 W 恒功率电泳 90~120 min,银染显色,记录条带。

1.4 ITS 序列分析

1.4.1 ITS 引物及 PCR 扩增 ITS 引物参考武莹等^[17]报道的序列,ITS-F:5'-GGAAGTAAAAGTCGT AACAAGG-3',ITS-R:5'-GCTGCGTTCTTCANTC GATGC-3'。PCR 反应在 BioRad 公司 MyCycler PCR 仪上进行。PCR 反应体系总体积为 50 μL,其中 2×PCR Mix 25 μL,模板 DNA 80 ng,上、下游引物(20 mmol/L)各 1 μL,用 ddH₂O 补充反应体系至 50 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;然后 94℃变性 1 min,53℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 7 min,10℃保温。

1.4.2 ITS 产物检测、回收和测序 为了提高分辨率,PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。1×TAE 电泳缓冲液,210 V 电泳 45 min。电泳完毕后用 EB 浸泡染色约 10 min,凝胶成像系统下照相,记录电泳结果。

目标条带用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收。T-载体采用 pMD20-T 载体,连接体系为 T-载体 1 μL,回收产物 2.5 μL,ddH₂O 1.5 μL,Solution I 5 μL,16℃连接 30 min。连接后的载体利用热激法转化,转化后的大肠杆菌 DH5α 涂布在含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养基(酵母提取物 5 g,胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,琼脂粉 6 g,加蒸馏水至 1 L)上,并进行蓝白斑筛选。每个 LB 平板挑取 6 个阳性克隆进行测序,序列测定由深圳华大科技公司完成,序列分析采用 DNAMAN 软件进行。

2 结果与分析

2.1 11 份荆芥材料的 AFLP 检测结果

2.1.1 AFLP 扩增结果及多态性分析 本试验采用 E-AAC/M-CAT、E-AAC/M-CAG、E-ACA/M-CTT、E-ACA/M-CTA、E-AGG/M-CAA 和 E-ATC/M-CTC 6 种不同的引物组合进行扩增,结果(图 1)

表明,荆芥 AFLP 扩增条带有差异,出现了多态性条带。对图 1 的扩增结果进行统计,结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,6 对引物组合扩增出的条带数在 29~52,共扩增出条带 241 条,多态性条带有 154 条,多态性比率在 63.90%,说明供试荆芥材料的遗传多样性不是很高。

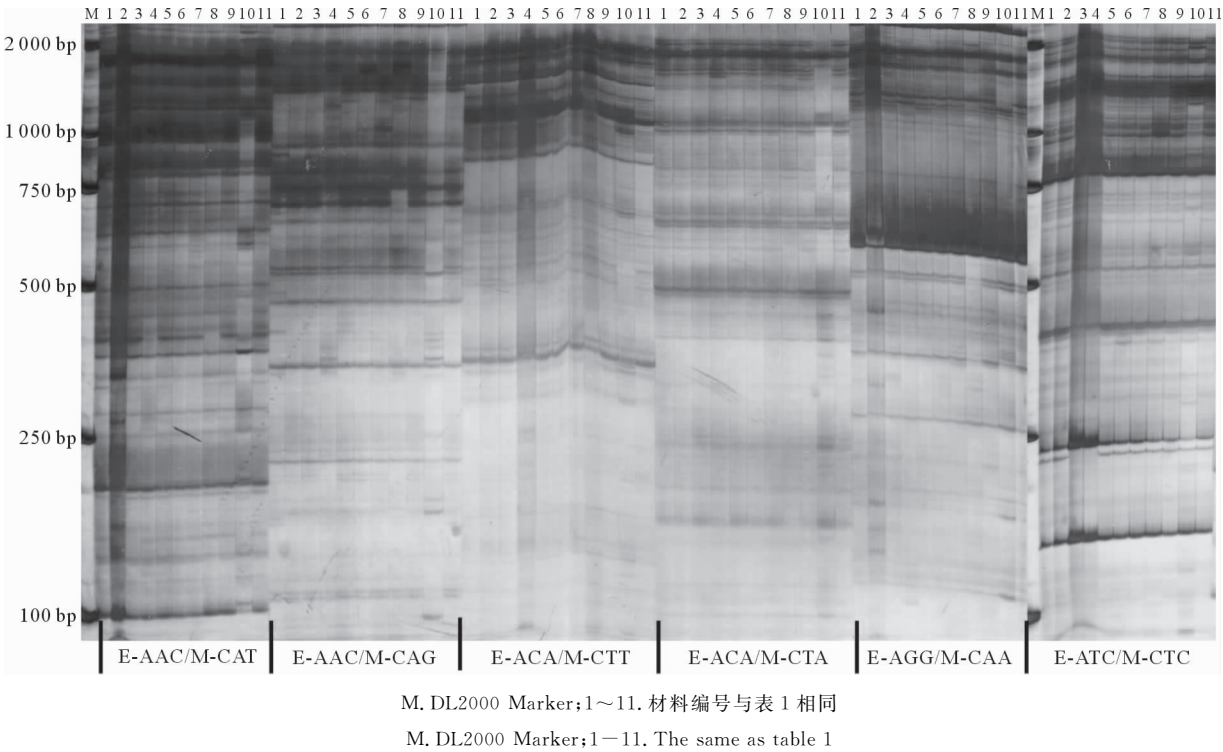


图 1 11 份荆芥材料的 AFLP 扩增结果

Fig. 1 AFLP result of 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. samples

表 3 6 对 AFLP 引物组合对 11 份荆芥材料的扩增结果
Table 3 Total and polymorphic AFLP markers amplified by 6 pairs of primers with DNA of 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. materials

引物组合 Primer combination	扩增条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率/% Polymorphic percentage
E-AAC/M-CAT	30	14	46.67
E-AAC/M-CAG	52	41	78.85
E-ACA/M-CTT	29	13	44.83
E-ACA/M-CTA	50	30	60.00
E-AGG/M-CAA	36	26	72.22
E-ATC/M-CTC	44	30	68.18
合计 Total	241	154	63.90

2.1.2 供试材料的聚类结果 根据 AFLP 扩增结果,利用数据处理软件进行数据处理,得到供试材料间的遗传距离如表 4 所示,并进行了聚类分析,结果见图 2。遗传距离较小即亲缘关系较近的为来自河北安国的 1 号和 2 号材料,遗传距离为 0.163 9,来

自河北玉田的 3 号和 4 号材料遗传距离为 0.196 1,安徽亳州和浙江萧山的 5 号和 6 号材料遗传距离为 0.139 1,从聚类图上也能看到这 3 组分别首先聚在一起;前两组分别是各自地区的春播和夏播品种,说明其各自亲缘关系近,而 AFLP 在一定程度上能反映出其亲缘关系。遗传距离较远的为河北玉田的 3 号和 4 号与来自江苏省的 10 号,同时来自江苏省的 10 号与供试的其他 10 份材料遗传距离都较远。

在遗传距离为 0.29 时,供试材料分为 4 类,Ⅰ类包括 1、2、5、6、7、9、11 号,Ⅱ类为 8 号,Ⅲ类为 3 和 4 号,Ⅳ类为 10 号。第Ⅰ类含有的材料较多,来自河北安国、安徽亳州、浙江萧山、山西省、新疆、四川省,虽然产地南北各异,却聚类在一起,这可能是因为它主要为荆芥质量较好地区(河北安国、浙江萧山)或中药材产业发展国内领先地位(安徽亳州),在这三地附近药材产区引种也都来自于这些地区,种

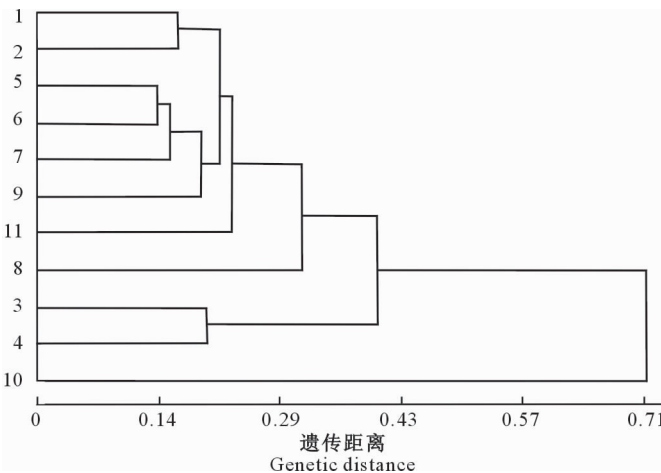
质资源引种频繁,所以亲缘关系较近。3 号和 4 号材料为河北玉田材料,来自北京同仁堂河北中药材科技有限公司,其材料单独聚在一起,可能与他们自己选种育种有关。来自甘肃的 8 号和来自江苏的

10 号各单独聚在一起,可能由于此二者与其他地区种质资源交流不频繁,引种后自种自繁有关。而 10 号荆芥与其他材料亲缘关系都较远,应引起相关育种专家的关注。

表 4 11 份荆芥材料基于 AFLP 的遗传距离

Table 4 Euclidean distances among 11 <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq. materials based on AFLP analysis										
材料编号 No. of material	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	0.163 9									
3	0.333 3	0.362 9								
4	0.398 4	0.401 6	0.196 1							
5	0.163 9	0.238 1	0.308 3	0.376 0						
6	0.184 9	0.201 7	0.319 0	0.414 6	0.139 1					
7	0.187 0	0.259 8	0.344 3	0.421 9	0.158 3	0.147 8				
8	0.296 0	0.312 0	0.464 0	0.464 0	0.325 4	0.308 3	0.292 7			
9	0.203 3	0.248 0	0.387 1	0.437 5	0.190 1	0.181 0	0.198 3	0.295 1		
10	0.664 1	0.709 0	0.815 4	0.842 1	0.679 4	0.690 5	0.645 7	0.744 2	0.661 4	
11	0.230 8	0.277 3	0.423 7	0.500 0	0.247 9	0.209 1	0.194 7	0.341 9	0.196 4	0.678 0

注:1~11 材料编号与表 1 相同。
Note: Number 1—11 are the same as table 1.



1~11. 材料编号同表 1

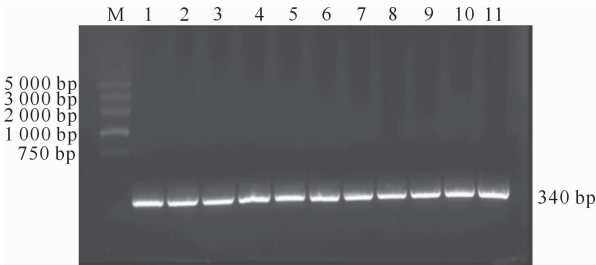
1—11. The same as table 1

图 2 基于 AFLP 的 11 份荆芥材料聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. materials tested based on RAPD

2.2 11 份荆芥材料的 ITS 分析结果

利用 ITS 引物对 11 份荆芥样品进行 PCR 扩增,结果表明扩增特异性强,得到 1 条清晰条带(图 3)。将条带进行切胶回收、转化,每个样品挑 6 个阳性克隆进行测序,然后将测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blast 检索比对,结果显示与荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)18S 核糖体 RNA 基因序列相似性达 99%,说明此条带为荆芥样品的 ITS 扩增条带。利用 DNAMAN 软件对 11 份荆芥样品的 ITS 序列进行比对分析,显示荆芥的 ITS 序列为 340 bp,但这 11 份荆芥材料的 ITS 序列间无差异,说明荆芥材料的 ITS 序列保守性非常高。



M. Marker DL5000;1~11. 材料编号与表 1 相同
M. Marker DL5000;1—11. The same as table 1

图 3 11 份荆芥材料的 ITS 引物扩增结果

Fig. 3 Amplification of ITS primers of 11 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. samples

3 讨 论

荆芥植物种类多,分布广泛,以前人们多从形态学、植物化学等方面对其进行鉴定。由于荆芥表型特征相似度高,生产上对于荆芥种质的划分主要是从地域(产地)或者从播期(春播或秋播)来进行区分,传统方法很难对其进行准确判断,这给荆芥种质资源鉴定和利用造成了较大困难。随着分子生物学技术的发展,人们越来越多地从分子水平对荆芥种质进行鉴定和分析。但如果种质材料间差异较小,只利用一种分子检测手段有时也很难获得理想结果,例如刘红彬等^[14,18]研究认为,来自河北安国、湖北随州、安徽阜阳、山西临汾和江苏江都的荆芥材料 18S rDNA 序列无差异;来自中国 5 省及日本、韩国的材料 ITS 序列也完全相同,与来自美国的材料相似性也高达 99%,这与本研究得到的结果是一致的。本研究 11 份荆芥样品分别来源于河北、安徽等 8 个省区,通过 ITS 序列分析发现,供试的 11 份材料 ITS 序列完全相同,表明荆芥 ITS 序列保守性较强或者亲缘关系非常近。对于荆芥而言,单纯利用 ITS 序列不能进行供试种质资源的鉴定。

AFLP 多态性较丰富,能进行种质资源多样性及亲缘关系鉴定。前人曾利用 AFLP 分子标记技术进行了部分药用植物鉴定和指纹图谱分析。本研究对 11 份市场流通的南北荆芥种质资源进行 AFLP 分子标记鉴定,供试材料多态性并不是很高,为 63.90%;高峰^[15]采用 ISSR 分子标记技术对荆芥种质资源的遗传多样性研究认为多态性较低(50.9%),与本研究结果较一致。本研究中来自同一地区河北安国的 1 号和 2 号及来自河北玉田的 3 号和 4 号材料各自首先聚在一起,亲缘关系较近,说明 AFLP 标记能在很大程度上显示种质资源的亲缘关系。但聚类结果中来自河北安国、安徽亳州、浙江萧山、山西省、新疆、四川省等地的种质资源,虽然产地南北各异,却聚类在了一起,这可能是因为这些地区的种质资源引种频繁,亲缘关系较近。同时也说明,不能简单地利用地域界限来对荆芥种质进行划分,因为荆芥自然分布广泛,且不同地区之间相互引种,致使种质亲缘关系不清。由于各地荆芥习称不同、民间用药的历史和习惯不同,也导致荆芥在使用和栽培中产生种质混乱的现象。因此,应该应用多种手段进行荆芥种质资源的种质鉴定,同时加强资源管理,为荆芥规范化栽培提供保障。

[参考文献]

- [1] 赵立子,魏建和. 中药荆芥最新研究进展 [J]. 中国农学通报, 2013,29(4):39-43.
Zhao L Z, Wei J H. Latest research and development of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013,29(4):39-43.
- [2] 梁之桃,秦民坚,王峥涛,等. 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定 [J]. 中草药, 2002,33(12):1117.
Yao Z T, Qin M J, Wang Z T, et al. Identification of *Bupleurum* L. plants by RAPD technology [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002,33(12):1117.
- [3] 隋 春,魏建和,陈士林,等. 柴胡 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2008,19(8):1837-1839.
Sui C, Wei J H, Chen S L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system of *Bupleurum chinense* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008,19(8):1837-1839.
- [4] Azevedo A L, Costa P P, Machado M A, et al. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Bra-chiaria ruiziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers [J]. Genet Mol Res, 2011,10(4):3530-3538.
- [5] Phong D T, Hien V T, Thanh T T, et al. Comparison of RAPD and ISSR makers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in vietnam [J]. Genet Mol Res, 2011,10(4):2382-2393.
- [6] Zhang X G, Han T, He Z G, et al. Genetic diversity of *Centella asiatica* in China analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) makers: combination analysis with chemical diversity [J]. J Nat Med, 2012,66(1):241-247.
- [7] 王跃虎,魏建和,张东向,等. 利用 Taguchi 方法优化荆芥 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 分子植物育种, 2007,5(F11):177-181.
Wang Y H, Wei J H, Zhang D X, et al. Optimization for ISSR-PCR system of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. using taguchi methods [J]. Molecular Plant Breeding, 2007,5(F11):177-181.
- [8] 隋 春,魏建和,王跃虎,等. 柴胡栽培种质遗传混杂的 ISSR 分析 [J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2007,24(7):227-230.
Sui C, Wei J H, Wang Y H, et al. Diversities study on Intra-and Inter-*BupLeurum* cultivated germplasms using ISSR molecular markers [J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition), 2007,24(7):227-230.
- [9] 张永刚,韩 梅,刘翠晶,等. RAPD 分析野生和栽培柴胡亲缘关系 [J]. 南京中医药大学学报, 2012,28(6):574-576.
Zhang Y G, Han M, Liu C J, et al. Genetic relationship analysis of wild and cultivated *Bupleurum* with RAPD marker [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2012,28(6):574-576.
- [10] Vos P, Hoger R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995,23(21):4407.
- [11] 张 瑞,唐铭霞,翁 周,等. 重楼属植物 AFLP 实验体系的建立 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2006,43(5):1105-1109.
Zhang R, Tang M X, Weng Z, et al. Application of AFLP

technique on the genetic diversity of *Paris* [J]. Journal of Si-chuan University (Natural Science Edition), 2006, 43 (5): 1105-1109.

[12] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.

Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1999, 37(4): 407-416.

[13] Neves S S, Watson M F. Phylogenetic relationships in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. Ann Bot, 2004, 93: 379-398.

[14] 刘红彬,顾小龙,张海红,等. 基于 ITS 序列的不同产地裂叶荆芥系统发育分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1073-1077.

Liu H B, Gu X L, Zhang H H, et al. Phylogenetic analysis of *Schizonepeta tenuifolia* from different producing areas based on ITS sequences [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(6): 1073-1077.

[15] 高峰. 荆芥种质资源评价与种子质量标准研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.

Gao F. Study on resources enaluation and seed quality standards of *Nepeta cataria* L. [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2007

[16] 梁丹,吴勇,曾燕如,等. 香榧 AFLP 实验体系的建立 [J]. 福建林业科技, 2007, 34(2): 93-96, 105.

Liang D, Wu Y, Zeng Y R, et al. Establishment of an AFLP system in *Torreya grandis* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2007, 34(2): 93-96, 105.

[17] 武莹,刘春生,刘玉法,等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 732-734.

Wu Y, Liu C S, Liu Y F, et al. ITS sequence identification of *Radix bupleuri* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(10): 732-734.

[18] 刘红彬,张丹参. 5 省裂叶荆芥 18S rDNA 全序列测定与系统发育分析 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(18): 170-171.

Liu H B, Zhang D S. Sequencing and phylogenetic analysis of 18S rDNA of *Schizonepeta tenuifolia* from five provinces [J]. Agricultural Science of Guangdong Province, 2012, 39 (18): 170-171.

(上接第 227 页)

[19] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.

Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinobacterial systematics [M]. Beijing: Science Press, 2007.

[20] 何建清,岳海梅,张格杰. 慈巴沟自然保护区土壤放线菌区系分析及其生物活性测定 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 83-89.

He J Q, Yue H M, Zhang G J. Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Cibagou Nature Reserve soil [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(8): 83-89.

[21] 王启兰,曹广民,姜文波,等. 青海高寒草甸土壤放线菌区系研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 733-736.

Wang Q L, Cao G M, Jiang W B, et al. Study on actinomycetes population of alpine meadow soil in Qinghai [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 733-736.

[22] 何建清,张格杰,张新军,等. 西藏色季拉山土壤放线菌的区系 [J]. 山地学报, 2008, 26(4): 503-508.

He J Q, Zhang G J, Zhang X J, et al. Study on actinomycetes distribution of Serkyimla mountainin Tibet [J]. Journal of Mountain Science, 2008, 26(4): 503-508.

[23] 蔡艳,薛泉宏,陈占全,等. 青藏高原东部几种自然土壤放线菌的生态分布 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 378-383.

Cai Y, Xue Q H, Chen Z Q, et al. Ecological distribution of soil actinomycetes in eastern part of the Qinghai plateau [J]. China J Appl Environ Biol, 2004, 10(3): 378-383.