

DNA 分子标记技术在四大怀药研究中的应用概况

周延清, 周 鹏, 郭静佩, 张永华, 陈艳梅, 张 喻, 杨德勇, 许 春

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: DNA 分子标记技术是比形态标记、细胞标记和生化标记理想的遗传标记技术, 已经广泛应用于动植物和微生物的诸多研究中。但是它在四大怀药中的应用相对较少。因此, 对几种 DNA 分子标记技术在四大怀药的遗传多样性、指纹图谱、居群遗传结构、品种鉴定和真伪品鉴别等方面的研究成果和新进展进行了综述, 以期对四大怀药的深入研究提供参考。

关键词: DNA 分子标记; 四大怀药; 遗传多样性; 品种鉴定; 指纹图谱

中图分类号: S632.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)02-0021-05

Applications of DNA Molecular Marker Techniques in Four Huaiqing Chinese Medicines

ZHOU Yan-qing, ZHOU Peng, GUO Jing-pei, ZHANG Yong-hua,

CHEN Yan-mei, ZHANG Yu, YANG De-yong, XU Chun

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: DNA molecular marker technology is a more ideal genetic marker technology than morphological marker, cytological marker and biochemical marker. It has been widely used in different fields, such as in zoology, botany and microbiology, but rarely applied to four Huaiqing Chinese medicines up to date. In this paper, we reviewed some research achievements and progresses in the assessment of genetic diversity, fingerprinting, local population genetic structure, variety and authenticity identification of four Huaiqing Chinese medicines in order to provide some references for the further study of the four Huaiqing Chinese medicines and its scientific researchers.

Key words: DNA molecular marker; four Huaiqing Chinese medicines; genetic diversity; variety identification; fingerprinting

四大怀药是指盛产于今河南省博爱县、沁阳县、武陟县、温县、孟县等地的怀山药、怀地黄、怀菊花和怀牛膝的总称, 因这几个县在古代隶属于怀庆府, 故此而得名。这些地区也因其得天独厚的地理环境和气候条件, 造就了四大怀药独特的有效成分和疗效, 保证了其道地药材的道地性^[1]。以前, 四大怀药的研究应用形态学标记、细胞学标记与生化标记技术, 但是它们主要是针对形态、染色体和基因的表达产物进行的, 受环境、标记数量、时间等因素的影响较

大^[2]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, DNA 分子标记技术也迅猛的发展, 并日趋成熟。由于 DNA 分子标记具有数量多、DNA 用量少、多态性高、特异性强、准确可靠等优点, 且不受生育阶段、季节、环境等因素限制, 已逐渐用于四大怀药遗传多样性、分类、种质资源鉴定等方面的研究^[2]。基于此, 主要综述 DNA 分子标记技术在四大怀药上的最新研究成果和进展, 以期对“四大怀药”的深入研究提供参考。

收稿日期: 2011-09-20

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究与计划项目(092300410009); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011A180022); 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心开放课题基金(2010-11); 河南师范大学(国家)大学生创新性实验计划资助(2009279)

作者简介: 周延清(1963-), 男, 河南邓州人, 教授, 博士, 主要从事遗传学教学与科研工作。E-mail: yqzhou@htu.cn

1 DNA 分子标记在怀地黄研究中的应用

国外,DNA 分子标记技术在地黄研究中的应用始于 1997 年。当年,Choi^[3]用 RAPD 标记技术评价了地黄愈伤组织再生植株的遗传多样性,Hatano^[4]用 RAPD 标记技术鉴定茎尖快速繁殖地黄品种和 F₁ 代杂种。国内,DNA 分子标记技术应用于地黄研究报道始于 2002 年。当年,陈京荔等^[5]报道,使用 RAPD 标记技术对包括怀地黄品种在内的 19 个不同的地黄品种的遗传多样性和亲缘关系进行了研究,并且将这 19 个地黄品种分为北京系列、85-5 系列、狮子头系列、郭里茂 4 个类型,得出了地黄类内具有较近的亲缘关系的结论,为怀地黄育种材料的选择提供了参考。后来,又有一些研究者用 DNA 标记技术研究地黄,包括怀地黄。例如,祁建军^[6]对取自河南、北京、陕西、山西、山东等地的 86 份地黄种质遗传多样性进行了 RAPD 和 AFLP 分析,建立起指纹图谱,得出 AFLP 标记技术明显优于 RAPD 的结论,初步确定了地黄的核心种质,为地黄的种质更新、品种鉴定和杂交育种奠定了坚实的基础。王艳等^[7]采用 RAPD 和 ISSR 技术研究了野生地黄群落之间的遗传差异类型,比较了 RAPD 和 ISSR 技术在分析野生地黄种质遗传多样性中的优劣,得出了在检测遗传差异性方面,ISSR 优于 RAPD。李宏庆等^[8]采用 ISSR 技术从物种水平上对地黄 14 个自然居群、1 个栽培居群和属内近缘种 5 个居群的遗传多样性与遗传结构进行了研究,发现地黄居群内的遗传多样性水平较低;遗传变异主要发生在居群内,居群间的遗传分化显著,其遗传分化水平介于异交物种和自交物种之间;地黄居群间的基因交流程度有限;自然居群间遗传距离与地理距离之间没有明显相关性;推测河南商丘的地黄为野生地黄的可能性最大。吴志刚等^[9]采用 RAPD 技术对 16 个栽培品种、2 个野生居群共 54 个不同品种地黄的亲缘关系和遗传特点进行了研究,把 54 个样品分成了 3 类,发现类群 2 未表现明显的遗传分化,且地黄品种间的遗传分化大于品种内。周延清等^[10]对怀地黄的 ISSR 扩增条件进行了探究,通过单因子试验方法,建立了适宜于怀地黄 ISSR 分析的扩增体系,对取自温县的 8 个地黄品种和 2 个地黄脱毒品系进行了遗传多样性分析,将怀区地黄的 8 个品种 2 个品系分成了 2 类,一类包括组培 85-5、大田 85-5、组培 9302、大田 9302、金状元和金白地黄,另一类群包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄,并且用

一个 ISSR6 引物构建了 10 个供试地黄品种的指纹图谱,得出了 ISSR 标记适合于构建怀区地黄的 DNA 指纹图谱、品种鉴定和遗传多样性分析的结论。然而,一种标记往往有其局限性,为了能更好地提高结果的可靠性常常必须将各种技术联合。周延清等^[11]对上述 10 个地黄品种进行了 RAPD 和 ISSR 分析,分别筛选出了 17 条 RAPD 引物和 10 条 ISSR 引物用于 RAPD 和 ISSR 分析,发现这 2 种标记对其聚类结果极为相似但不完全相同,ISSR 在多态性和重复性方面优于 RAPD;周延清等^[12]又对怀地黄 85-5 品种内 16 个单株基因组 DNA 遗传多样性进行了 RAPD 和 ISSR 分析,发现怀地黄 85-5 品种内存在遗传差异,但遗传多样性比地黄品种间的低。最近,周延清等^[14-15]以怀地黄 DNA 为模板,通过单因子试验建立了怀地黄 SRAP 分子标记的最佳体系,对 23 个不同怀地黄品种进行了 SRAP 分析,用引物组合 me8/em5 和 me5/em4 构建了怀地黄 23 个品种的 DNA 指纹图谱,发现 SRAP 标记技术比 RAPD 和 ISSR 标记技术稳定可靠,重复性好,可以用于怀地黄的分子标记研究,为怀地黄品种鉴定、遗传多样性分析、分子标记辅助育种和质量综合评价等研究奠定了基础。

2 DNA 分子标记在怀山药研究中的应用

DNA 分子标记技术作为一种新兴的技术,在国际上已被广泛应用于山药的研究中。国外,1996 年,Asemotal 等^[16]采用 RAPD 技术对具有重要经济价值的 5 个牙买加山药品种的 11 个样本进行了分析,得出多态性条带能准确区分不同品种,但不能区分种间关系的结论。2000 年,Dansi 等^[17]运用 12 条引物对 23 份几内亚山药进行了 RAPD 分析,发现任何一个引物都不能区分所有品种,但一些引物组合能区分 23 个品种。2003 年,Mignouna 等^[18]以非洲中部和西部的白山药为材料,对 AFLP、RAPD、SSR 3 种技术的优劣进行了比较,发现 AFLP 在亲缘关系、品种鉴定和遗传多样性分析方面具有较高的分辨率。2006 年,Tostain 等^[19]对热带地区山药的 SSR 标记进一步研究,找到了 16 个新的 SSR 的标记位点,并通过分析不同的山药品种建立一个丰富的微卫星标记库。2009 年,Sonibare 等^[20]运用 AFLP 技术对取自非洲西部和中部 6 个国家的 53 份山药种质进行分析,得出 AFLP 在山药遗传多样性分析方面具有较高多态性的结论。国内,2007 年,孙华钦等^[21]以 3 种薯蓣 9 个类群的叶

绿体 psbA-trnH 片段序列为材料,用软件 MEGA3.0 进行排列比对分析,找出 3 种薯蓣的特征差异位点以用作设计识别 3 种薯蓣的寡核苷酸片段。在此基础上,建立了能够识别黄山药、穿龙薯蓣和盾叶薯蓣的 STS 分子标记。2009 年,华树妹等^[22]运用 SRAP 技术对 34 份福建山药种质进行了遗传多样性分析,将 34 份种质分为普通山药、田薯、扁山药和福建大薯 4 类,为山药引种育种、资源研究及保护提供可靠依据。2009 年,周升茂等^[23]采用 RAPD 技术对取自广西等地的 6 份山药进行了分析,发现种间的遗传距离大于种内的,证实了白色和粉红色性状可作为山药变种等级的分类依据,圆柱形和扁块形则可作为山药品种种群等级的分类依据。然而,怀山药分子标记技术研究还较少。2005 年,周延清等^[24-26]用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对 28 个怀山药品种的遗传多样性和亲缘关系进行了分析,并建立了相应的指纹图谱。王东等^[27-28]采用 RAPD 技术,对包括怀山药在内的 49 份山药进行了遗传多样性分析,找出了不同品种、不同产地山药的遗传多样性,作为种内基因测序的初步筛选,并分析了怀山药与其他产地山药的 rDNA-ITS 区序列的差异,为利用 ITS 区序列的差异鉴别不同产区的山药提供了依据。2007 年,李明军等^[29]对怀山药基因组 DNA 的提取和 RAPD 反应体系进行了探究,认为 CTAB 微量法提取的 DNA 基因组适宜于 RAPD 分析,并通过单因子试验最终建立了适合怀山药的 RAPD 反应体系。

3 DNA 分子标记在怀牛膝研究中的应用

DNA 分子标记技术在怀牛膝中的应用尚处于起始阶段。2002 年,郑喜珍等^[30]运用 RAPD 技术对 4 种 10 个中韩牛膝类样品遗传关系进行了研究,把供试样品分为 4 组,其中韩国牛膝与怀牛膝没有明显的遗传分化,认为韩国牛膝是怀牛膝的一个变种。2004 年,王淑美等^[31]利用特异性 PCR 技术对取自河南、安徽、山东等地牛膝的 rDNA-ITS 区进行扩增、测序,得到了核糖体 DNA 中的 ITS 及 5.8S rDNA 完全序列,18S 和 26S rDNA 部分序列,共约 650 bp,通过序列比对发现,不同产地牛膝基因变异不大,种间有明显差异,且差异均在 ITS 区内,得出此方法可用于牛膝种间及真伪品种鉴别,但不能用于鉴别道地药材的结论。2008 年,赵永亮等^[32]采用 RAPD 和 AFLP 技术对川牛膝、头花杯苣及它们的杂交品种 7 个样品进行了多态性和聚类

分析,发现采自同一地方的川牛膝具有最近的亲缘关系,表明在川牛膝中,DNA 的差异性与地域有较大关系,从 DNA 分子水平上支持了药材具有道地性的观点。2010 年,田孟良等^[33]运用 RAPD 技术对收集的包括怀牛膝在内的 19 个牛膝种群进行分析,将 19 个种群分为 3 类:川牛膝、怀牛膝、红牛膝,并建立了相应的指纹图谱,还依据多态性带谱 F300 成功地将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记,得到的 SC-320 标记可以快速而稳定地在川牛膝与怀牛膝中鉴定出怀牛膝。随后,官于^[34]利用特异性 PCR 技术对 19 个川牛膝种群的 rDNA-ITS 区域碱基序列进行克隆、测序、序列比对,发现 17、18 号材料 ITS 区序列与怀牛膝的 ITS 区相同,其余 17 个材料均与川牛膝 ITS 区序列相同或相似,得出 ITS 能鉴别出川牛膝与怀牛膝,而无法准确地鉴别亲缘关系较近的牛膝品种的结论。

4 DNA 分子标记在怀菊花研究中的应用

DNA 分子标记技术已被广泛应用于菊花的研究中,并取得了丰富的成果,近几年的报道也较多。2007 年,刘建辉等^[35]利用 AFLP 技术对 65 个菊花品种进行了遗传多样性分析,发现多数瓣型相同的菊花种质较早的聚在一起,地域来源与聚类结果也有一定程度的相关性,花色与聚类结果无明显的相关性。同年,陈发棣等^[36-38]以菊属野生种和不同类型菊花品种为试验材料,通过正交试验建立了菊属 ISSR 反应体系,并采用 ISSR 技术对 85 份菊花品种进行了遗传多样性分析,将 85 个品种分成 6 个类群,发现聚类结果与品种瓣型相关。2008 年,戴思兰等^[39]采用 RAPD 技术对中国传统的 5 对菊花芽变品种和 2 对形态相似品种进行了分析,建立了稳定的 RAPD 体系,得出了 RAPD 分析方法可以应用到菊花芽变及相似品种鉴定中的结论。2009 年,刘蕤等^[40]采用 ISSR 技术对菊属 10 个野生种和 12 个栽培品种进行分析,结果表明,各野生种间基因差异比较显著,多态性强于栽培品种。推断出平瓣是菊花的基本瓣形。随后,刘蕤等^[41]又采用 RAPD 技术对上述材料进行了遗传关系和遗传多样性分析,得出栽培菊花基本可以按照花茎聚类的结论。2010 年,秦贺兰等^[42]运用 SRAP 技术对小菊粉色花芽变进行了研究,发现造成小菊粉色花芽变的原因很可能是染色体结构的变异。2009 年,张飞等^[43]利用雨花落英和奥运含笑及其 12 株 F_1 群体为材料,通过正交试验,建立了菊花的 SRAP 反应体

系。2010 年,同时运用 RAPD、ISSR、AFLP 对中国的雨花落英和奥运含笑及其 142 株 F_1 群体进行了分析^[43-45],建立了其连锁遗传图谱,随后,他们又采用 SRAP 技术丰富了这一结论,为进一步构建菊花的 QTL 图谱和分子标记辅助育种奠定了基础。

2006 年,徐文斌等^[46]采用 RAPD 技术对 22 种药用菊花种质进行了遗传多样性分析,将供试材料分为 5 类,其中小毫菊、怀小白菊和怀大白菊可聚为一类,与戴思兰等^[39]的小毫菊是怀菊的一个变种的观点相吻合,并且最终构建了药用菊花类型间的关系图,为药用菊花的系统分类、资源合理保护利用、品种的选育奠定了理论基础。2008 年,秦民坚等^[47]采用 ISSR 分子标记技术对包括怀菊花在内的来源于不同地区的 19 份药用菊花种质、4 份野生菊花种质、1 份菊花脑种质和 1 份杂交菊花种质进行了遗传关系分析,将 25 份种质分成两大组,即野菊、菊花脑和杂交菊花归为一组,19 份药用菊花种质归为一组;其中 19 份药用菊花种质又可根据原产地进一步分成两组,南方菊花品系和北方菊花品系,其中怀菊花属于北方菊花品系,与传统的分类结果一致,为菊花的规范化栽培提供了依据。

5 展望

四大怀药是我国传统的名贵药材,具有重要的药用价值、经济价值和保健作用,并且具有巨大的潜在市场空间,因此,对四大怀药进行研究和开发具有非常重要的意义。DNA 分子标记技术,作为一种新兴的仍在继续发展的技术手段,以其便捷、高效、稳定、可靠、特异性强等优点已经逐渐应用于四大怀药的研究中。但是,迄今,在四大怀药的研究中已经使用的 DNA 分子标记技术还比较少,仅局限于 RAPD、ISSR、ITS、AFLP、SRAP 等几种技术,研究也大多局限于遗传多样性评价、分类、鉴定、居群结构分析、诊断茎尖快速繁殖品种等方面。今后,随着新的分子标记技术,尤其是功能性分子标记的不断涌现和应用,更多分子标记技术将会用于四大怀药的特异性状或基因的 MAS、遗传图谱的构建、重要性状基因标记、绘制基因组转录图谱、新基因克隆及其差异表达分析等方面。

参考文献:

[1] 刘跃红,闫小珍,焦振法,等.焦作气候生态环境对四大怀药生长的影响[J].气象,2007,33(5):106-110.
[2] 周延清,杨清香,张改娜,等.生物遗传标记与应用[M].北京:化学工业出版社,2008.

[3] Choi H S. Evaluation of genetic diversity of callus-derived plantlets of *Rehmannia glutinosa* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)[J]. Agric Development Research,1997,2:143-147.
[4] Hatano M. Genetic diagnosis of *Rehmannia* species micropropagated by tip tissue culture and an F_1 hybrid by RAPD analysis[J]. Plant Breeding,1997,116(6):589-591.
[5] 陈京荔,黄璐琦,邵爱娟,等.地黄不同品种的 RAPD 分析[J].中国中药杂志,2002,27(7):506-508.
[6] 祁建军.地黄种质遗传关系及根际土壤微生物多样性研究[D].北京:中国协和医科大学,2007.
[7] 王艳,祁建军,李学东,等.野生地黄种内遗传多样性的 RAPD、ISSR 分析[J].中国中药杂志,2008,33(22):2591-2594.
[8] 李宏庆,赵楠.地黄居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].河南科学,2009,27(11):1386-1391.
[9] 吴志刚,刘璐琦,王敏,等.地黄不同品种遗传关系的 RAPD 分析[J].中国中药杂志,2007,32(18):1865-1869.
[10] 周延清,贾敬芬,景建洲,等.怀地黄 ISSR 扩增条件优化的研究[J].西北植物学报,2004,24(1):6-11.
[11] 周延清,贾敬芬,景建洲,等.利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性[J].遗传,2004,26(6):922-928.
[12] 周延清,牛敬媛,田苗苗,等.怀地黄 85-5 品种内遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J].河南师范大学学报,2006,34(3):137-139.
[13] 周春娥,谷凤平,周延清,等.怀地黄 SRAP 扩增体系的建立与引物的筛选[J].广西植物,2010,30(2):256-260.
[14] 周延清,谷凤平,周春娥,等.怀地黄 SRAP 分子标记体系的建立与 DNA 指纹图谱的构建[J].河南师范大学学报,2009,37(3):175-178.
[15] Zhou Yanqing, Gu Fengping, Zhou Chune, et al. Genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* cultivars based on sequence-related amplified polymorphism markers [J]. Scientia Horticulturae,2010,125(4):789-794.
[16] Asemota H N, Ramser J, López-Peralta C, et al. Genetic variation and cultivar identification of *Jamaican yam* germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Euphytica,1996,92(3):341-351.
[17] Dansi A, Mignouna H D. Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA [J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2000,47(6):619-625.
[18] Mignouna H D, Abang M M. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and

- SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germ-plasm characterization[J]. *Annals of Applied Biology*, 2003, 142(3): 269-276.
- [19] Tostain S, Scarcelli N. Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 173-175.
- [20] Mubo A S, Robert A, Dirk C A. Genetic diversity of *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax using amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and cpDNA [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(3): 320-334.
- [21] 孙华钦, 罗科. 识别黄山药、穿龙薯蓣和盾叶薯蓣的分子标记建立[J]. *应用与环境生物学*, 2007, 13(2): 180-183.
- [22] 华树妹, 涂前程, 雷伏贵, 等. 福建山药种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(2): 195-200.
- [23] 周升茂. 山药不同基因型地下块茎糖类和酚类物质形成、调控及相关基因分离的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [24] 周延清. 三种经济作物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 分析、FAD 基因克隆和农杆菌介导的遗传转化[D]. 西安: 西北大学, 2005.
- [25] 周延清, 贾敬芬, 郝建国, 等. 用 ISSR 标记技术分析山药品种遗传多样性[J]. *实验生物学报*, 2005, 38(4): 324-330.
- [26] Zhou Yanqing, Zhou Chune, Tu Rongtao. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars[J]. *Life Science Journal*, 2008, 5(4): 6-12.
- [27] 王东. DNA 分子标记技术对不同产地的山药分析与鉴别的研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2005.
- [28] 王东, 白雁, 陈志宏. 不同产地山药 rDNA-ITS 序列的比较[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(1): 54-55.
- [29] 李明军, 徐鑫. 山药基因组 DNA 的提取和 RAPD 反应条件的优化[J]. *河南师范大学学报*, 2007, 35(1): 140-143.
- [30] 郑喜珍, 郭宝林, 阎玉凝. 用 RAPD 方法研究中韩牛膝类药材的遗传关系[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(6): 421-422.
- [31] 王淑美, 梁生旺, 冯卫生, 等. 牛膝的 rDNA ITS 序列分析[J]. *中草药*, 2004, 35(5): 559-562.
- [32] 赵永亮, 傅体华, 范巧佳, 等. 川牛膝 RAPD 和 AFLP 标记的多态性聚类分析[J]. *安徽农业科学*, 2008, 16(16): 6682-6686.
- [33] 田孟良, 官宇, 杨华, 等. 基于 RAPD 标记的 SCAR 分子标记技术鉴定川牛膝及其混淆品[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(8): 953-956.
- [34] 官宇. 遗传多样性的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- [35] 刘建辉, 吴在生, 左志锐, 等. 65 个菊花栽培品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *南京林业大学学报*, 2007, 31(5): 67-70.
- [36] 陈发棣, 缪恒彬, 房伟民, 等. 菊属 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. *江苏农业科学*, 2007(5): 95-97.
- [37] 陈发棣, 缪恒彬, 赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. *园艺学报*, 2007, 34(5): 1243-1248.
- [38] 陈发棣, 缪恒彬, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3735-3740.
- [39] 戴思兰, 田赟, 雒新艳, 等. 菊花芽变和相似品种的 RAPD 分析[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(6): 1223-1232.
- [40] 刘蕤, 杨际双. 菊属植物遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(1): 60-65.
- [41] 刘蕤, 杨际双. 菊属 11 个野生种和 12 个栽培品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 874-882.
- [42] 秦贺兰, 姚士才, 张西西, 等. 小菊花色芽变品系的 SRAP 鉴定[J]. *北方园艺*, 2010(2): 111-113.
- [43] 张飞, 陈发棣. 菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. *植物资源与环境学报*, 2009, 18(3): 44-49.
- [44] Zhang Fei, Chen Fadi. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(3): 422-428.
- [45] Zhang Fei, Chen Fadi. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) [J]. *Mol Breeding*, 2011, 27(1): 11-23.
- [46] 郭巧生, 徐文斌, 王长林. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(1): 18-21.
- [47] 秦民坚, 吕琳, 贺丹霞, 等. 不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2008, 17(1): 7-12.