

怀地黄 SRAP 扩增体系的建立与引物的筛选

周春娥, 谷凤平, 路淑霞, 段红英, 周延清*

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为建立适合怀地黄 SRAP-PCR 分子标记技术体系, 通过单因子实验分别研究了 DNA 模板浓度、TaqDNA 聚合酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度以及 dNTP 浓度对怀地黄 SRAP 扩增反应的影响, 确立了适合怀地黄 SRAP 最佳反应体系为: 在 25 μ L 的反应体系中, 模板 DNA 量 20 ng/25 μ L、2.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.32 μ mol/L 的上下游引物、0.30 μ mol/L 的 dNTP 以及 2.5 U Taq 酶, 并利用确定的体系从 88 个引物组合中筛选出 12 对适合怀地黄 SRAP-PCR 反应的引物。

关键词: 怀地黄; 分子标记; 扩增体系优化; SRAP; 引物的筛选

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0256-05

Establishment of SRAP amplification system for *Rehmannia glutinosa* and primer screening

ZHOU Chun-E, GU Feng-Ping, LU Shu-Xia,

DUAN Hong-Ying, ZHOU Yan-Qing*

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

Abstract: The single factor design was used to optimize SRAP amplification system of 22 *Rehmannia glutinosa* lines in five factors (the concentration of template DNA, Taq DNA polymerase, primer, Mg^{2+} and dNTP). SRAP amplification system was established as follows: 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.30 mmol/L dNTP mixture, 2.5 U Taq DNA polymerase, 0.32 μ mol/L each primer, 20 ng template DNA and 2.5 μ L 10 X PCR buffer in 25 μ L SRAP reaction system were the best suitable PCR system. 12 primers were collected from 88 primers using the optimized amplification system above.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; molecular marker; optimization of amplification protocol; SRAP; primer screening

怀地黄 (*Rehmannia glutinosa*) 是驰名中外的四大怀药之一。因产于河南怀庆府而得名。河南每年都有大量地黄产品销往国内外市场、出口东南亚和日本等国。地黄已成为河南产区重要的经济来源之一。所以, 国内外市场对怀地黄的品质、纯度和地道性提出更高要求。然而, 目前市场上地黄产品来源较复杂, 优劣品种混杂; 仍采用传统的形态特征和系谱来源对其分类研究和遗传分析已不太准确(周俊英, 2002)。为准确鉴定和使用怀地黄药材, 克服传统鉴定方法不易区分品种的不足, 为其新品种选

育和育种提供分子依据, 本实验利用 SRAP 分子标记技术对 22 个怀区地黄材料进行种质多样性鉴定。目前应用于地黄的遗传标记有 RAPD、SSR 等(陈京荔等, 2002; 周延清等, 2004a, 2004b, 2005), 主要用于种质资源评价、遗传图谱的构建、重要性状的标记定位以及基因定位克隆等方面。相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP), 是由加利福尼亚大学蔬菜系 Genyi 和 carLOS Quiro 于 2002 年提出的一种基于 PCR 的标记技术 (Li & Quiros, 2001)。它是针对基因外显子

收稿日期: 2008-12-22 修回日期: 2009-08-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目 (2006AA100109) [Supported by National High-Tech Research Development Plan (2006AA100109)]

作者简介: 周春娥 (1977-), 女, 山西寿阳人, 硕士, 主要从事植物细胞工程与基因工程方面的研究, (E-mail) zhouchune1800@163.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence)

GC 含量丰富而启动子、内含子 AT 含量丰富的特点来设计引物对 ORFs(openreading frames)进行扩增。目前,SRAP 已在马铃薯、小麦、油菜、棉花、西瓜、柑橘、茼蒿、芹菜、黄瓜、辣椒、菠萝、丹参、药用石斛、毛木耳、坛紫菜、黄瓜等植物中研究应用(徐晴等,2005;任羽等,2004;武志朴等,2005;樊泓泓等,2008;许晓燕等,2008;潘俊松等,2008)。但 SRAP 应用于怀地黄的研究未见文献报道。本研究探讨了 SRAP 对怀地黄的适应性,并建立了适合怀地黄的扩增体系,为怀地黄基因图谱的构建及分子标记打下坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

用于 SRAP 分析的怀地黄材料见表 1

表 1 供试地黄品种的名称及来源

Table 1 List of varieties and origin of *Rehmannia glutinosa*

编号 Number	品种名称 Name	来源 Origin	编号 Number	品种名称 Name	来源 Origin
1	金状元	武陟	12	野生 2 号	新乡
2	金黄后	武陟	13	85-5	武陟
3	串地龙	武陟	14	武陟 1 号	武陟
4	小黑英	武陟	15	武陟 2 号	武陟
5	9104	温县	16	武陟 3 号	武陟
6	9302	温县	17	武陟 4 号	武陟
7	北京 1 号	武陟	18	武陟 5 号	武陟
8	北京 2 号	武陟	19	武陟 6 号	武陟
9	北京 3 号	武陟	20	武陟 7 号	武陟
10	农家	武陟	21	武陟 8 号	武陟
11	野生 1 号	武陟	22	武陟 9 号	武陟

优化反应体系所用的地黄为北京 3 号。验证优化条件所用的地黄为以上 22 个品种,其中 9104,9302 取自温县农科所,野生 2 号取自生物系花园,其余品种均取自武陟四大怀药农科所。

1.2 方法

(1)DNA 提取:按 2×CTAB 方法提取基因组 DNA,DNA 浓度及纯度用 GeneQuant ProDNA/RNA(GE Heahhcare)进行检测。稀释至所需浓度后,-20℃保存。(2)基本扩增反应体系:10×Reaction Buffer(含 15 mmol/L Mg^{2+})2.5 μ L,dNTP Mixture(2.5 mmol/L each)2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)0.5 μ L,引物(10 μ mol/L)0.8 μ L,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/L)0.6 μ L,模板 DNA(57 ng/ μ L)1 μ L,最后用 ddH₂O 将总体积补至 25 μ L。(3)

扩增反应体系优化实验:根据香菇及相关作物研究报道,设计 Mg^{2+} 浓度(1.5、2、2.5、3 和 3.5 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶(0.5、1、1.5、2、2.5 U/25 μ L)、引物浓度(0.24、0.28、0.32、0.36,和 0.40 μ mol/L)、模板 DNA 浓度(20、30、40、50、60、700 ng/25 μ L)、dNTP mixture 浓度为 0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 μ mol/L。5 种因素不同水平梯度进行相关实验。SRAP 扩增反应在杭州大河科技有限公司 XP 基因扩增仪上进行。94℃预变性 3 min,然后前 5 个循环为 94℃变性 1 min,35℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,后 35 个循环仅将退火温度升为 50℃,最后 72℃延伸 7 min。用 Me6 和 Em2 引物组合进行 PCR 扩增以确定最佳反应体系。取 10 μ LSRAP 扩增产物与 2 μ L 溴酚蓝混合后在含有 EB(0.5 g/mL)2.0%的琼脂糖凝胶(1×TAE)上电泳,扩增图谱采用 OLYMPUS 数码相机在紫外 270 nm 下拍摄。(4)引物的筛选:本研究所用引物为 8 条正向引物和 11 条反向引物,如表 2 所示,一共可组合成 88 对引物,利用优化实验所确定出的最佳体系筛选出最佳引物对。

2 结果与分析

2.1 SRAP-PCR 反应体系的优化实验

Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂,反应混合物中 Mg^{2+} 浓度对 PCR 反应的特异性和扩增效率均有影响。5 种 Mg^{2+} 浓度下试验结果(图 1)表明, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时,扩增结果基本一致,条带清晰,两者比较,2.0 mmol/L 时,特异性条带扩增效果更亮。2.5 mmol/L 和 3.0 mmol/L 时条带增多。由此确定 2.5 mmol/L 为此扩增体系的最佳浓度。

Taq DNA 聚合酶的用量过大会造成浪费,并且会导致非特异性扩增;用量过小,会影响扩增效率,降低扩增产物的产量。因此,本试验对 Taq DNA 聚合酶的用量设 5 个处理进行了比较,扩增后的电泳检测结果如图 2 所示,泳道 3、4、5 中仅有少数几条主带,说明这 3 个泳道 Taq DNA 聚合酶用量过低;泳道 1 和 2 条带清晰明亮,主带较前 3 个泳道明显增多。而当 Taq DNA 聚合酶用量为 2.5 U 时,扩增条带进一步增多达到最多,清晰度也最好,主带也明显增多。因此确定 SRAP 扩增反应体系中 Taq DNA 聚合酶的用量为 2.5 U 比较合适。

表 2 所用引物序列
Table 2 List of primers sequences

引物组合 Primers	引物序列 Sequences	引物组合 Primers	引物序列 Sequences
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
		Em9	GACTGCGTACGAATTCGA
		Em10	GACTGCGTACGAATTCAG
		Em11	GACTGCGTACGAATTCCA

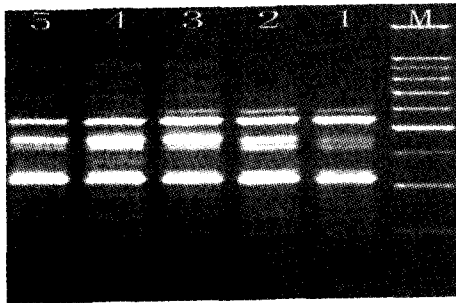


图 1 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
(test strain No. 9, 下同)

Fig. 1 Effect of different Mg^{2+} concentrations on SRAP products from *Rehmannia glutinosa*

M. marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus), the same below; 1, 2, 3, 4, 5; Mg^{2+} concentrations were 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol/L

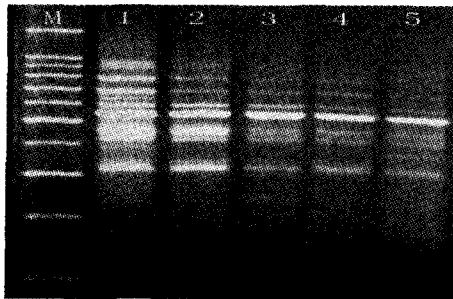


图 2 Taq 酶浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Fig. 2 Effect of different Taq DNA polymerase concentrations on SRAP products from *Rehmannia glutinosa*

1, 2, 3, 4, 5. Taq DNA polymerase were 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 U/25 μ L

引物用量少, 与模板 DNA 结合效率低, 产物的产量就会受到影响。引物用量过大, 会增加非特异

性结合的机率; 也会增加引物之间形成引物二聚体的概率; 本试验对 5 个引物用量不同的试样扩增后的电泳结果如图 3 所示, 北京 3 号在供试 5 个引物浓度下, 均能扩增出一定的条带, 随着引物浓度的升高, 扩增条带由弱到强, 当引物浓度为 0.32 μ mol/L 时, 反应稳定, 条带清晰。考虑到引物浓度过高会增加引物二聚体的形成机率, 故将引物浓度确定为 0.32 μ mol/L 为宜。

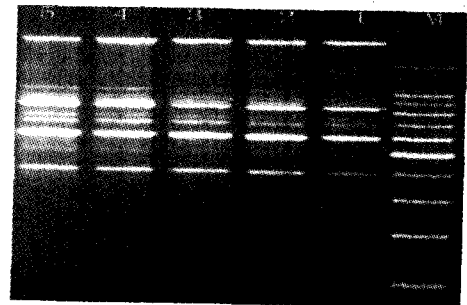


图 3 引物浓度对 SRAP 扩增结果的影响

Fig. 3 Effect of different primer concentrations on SRAP products from *Rehmannia glutinosa*

1, 2, 3, 4, 5. Primer concentrations were 0.24, 0.28, 0.32, 0.36, 0.40 μ mol/L

模板 DNA 对 PCR 结果有重要作用, 它的用量关系着产物的产量和特异性。本试验对 6 个用量不同的模板 DNA 扩增后的电泳结果 (图 4) 表明, 在 25 μ L 体系中加入模板 DNA 浓度从 20~70 ng 均有清晰的电泳条带出现, 其结果稍有不同, 加入模板 DNA 70 ng 时, 出现一条大约 2 000 bp 的一条带, 但条带不清晰, 随着用量的减少, 逐渐模糊, 但其它条带变得清晰, 用量为 20 ng 时条带最为清晰, 因此认为加入模板 DNA 浓度为 20 ng/25 μ L 时, SRAP

条带数丰富、清晰且稳定,故确定为最适浓度。

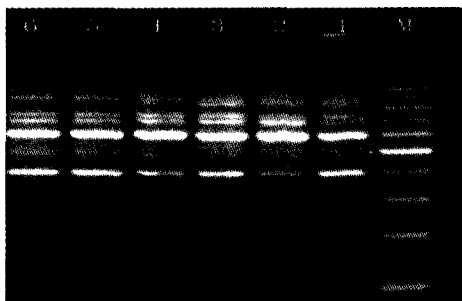


图 4 模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 4 Effect of genetic DNA concentrations on SRAP amplification products from *Rehmannia glutinosa*

1,2,3,4,5,6. DNA concentrations were 70,60,50,40,30,20 ng DNA/25 μ L

dNTP 为 PCR 中 Taq DNA 聚合酶提供底物,使得产物得以延伸。本试验对 dNTP 用量不同的 5 个试样扩增后的电泳检测结果如图 5 所示,5 个泳道中均有条带出现,dNTP 浓度为 0.30 mmol/L 时,电泳条带最为清晰。随着浓度的升高,一部分 dNTP 竞争了 Mg^{2+} 而使 Taq DNA 聚合酶活性下降出现条带缺失的现象。因此我们确定 dNTP 浓度为 0.30 mmol/L 较为适宜。

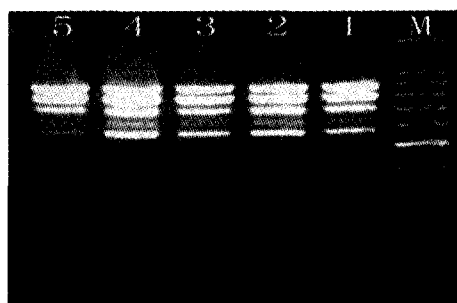


图 5 dNTP 浓度对 SRAP 扩增结果的影响
Fig. 5 Effect of dNTP concentrations on SRAP amplification products from *Rehmannia glutinosa*

1,2,3,4,5. dNTP concentrations were 0.15,0.2,0.25,0.30,0.35 mmol/L

2.2 SRAP-PCR 反应体系的确立

从结果稳定性和经济性出发,确立怀地黄 SRAP 扩增最佳反应体系模板 DNA 20 ng, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L,引物 0.32 μ mol/L,dNTP 浓度 0.30 mmol/L,Taq DNA 聚合酶 2.5 U,反应总体积为 25 μ L。

以上述确定条件,用 Me8 和 Em6 组合引物在 22 个供试地黄品种中进行扩增验证(图 6)。可见扩增谱带清晰,品种间有不同程度的多态性。

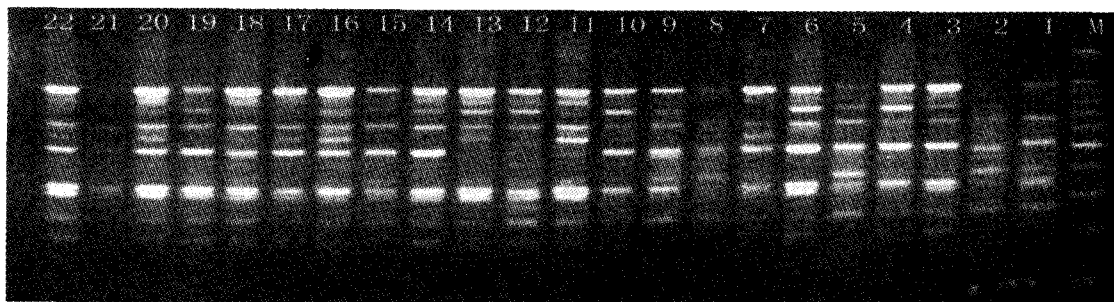


图 6 Me8 和 Em6 引物组合的 SRAP 扩增谱带

Fig. 6 SRAP products from 22 *Rehmannia glutinosa* varieties using primers Me8 and Em6(1-22 showed in table 1)

2.3 SRAP 分子标记引物的筛选

采用 8 条正向引物与 11 条反向引物,一共有 88 个引物组合,利用优化体系筛选出的引物一共有 12 对(表 3),部分引物筛选结果(图 7,8)。从图 7 看出,Me8/Em5,Me8/Em6,Me8/Em7 这 3 对引物扩增中的条带比较多而且清晰;从图 8 看出 Me5/Em1,Me5/Em3,Me5/Em4,Me6/Em1,Me6/Em2,Me6/Em3 这 6 对引物条带也比较多。所以这 9 对引物可以用于怀地黄 22 个品种 SRAP 遗传多样性的研究,另外通过

其他组合中又筛选出 3 对引物(图略),一共是 12 对引物。

4 讨论

影响 PCR 扩增效果的技术环节主要包括扩增程序、DNA 的提取、扩增体系和扩增产物的检测。通常,扩增程序对 PCR 扩增效果影响较大,但是由于 SRAP 引物具有通用性,不同作物采用的引物组合往

往是相同的,因此扩增程序对 SRAP-PCR 扩增结果影响不大。目前在 SRAP-PCR 中使用的扩增程序有

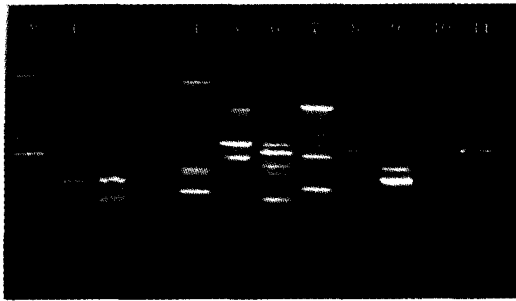


图7 Me8和Eml-11引物组合的SRAP扩增谱带
Fig.7 SRAP products using primers Me8 and Eml-11

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11. Me8/Eml1, Me8/Eml2,
Me8/Eml3, Me8/Eml4, Me8/Eml5, Me8/Eml6, Me8/Eml7,
Me8/Eml8, Me8/Eml9, Me8/Eml10, Me8/Eml11

2种。第1种是Li & Quiros(2001)提出的退火变温法,即最初5个循环的退火温度设为35℃,后30个循环的退火温度升高为50℃。第2种是Budak

等(2004)所使用的程序:94℃变性1min,47℃退火1min,72℃延伸1min(35个循环),72℃5min。前者因为后30个循环中所用的退火温度比后者高,扩增结果更稳定。本试验采用的扩增程序与第1种相近,最初退火温度为35℃的循环数仍为5,随后退火温度为50℃的循环数则设定为35,获

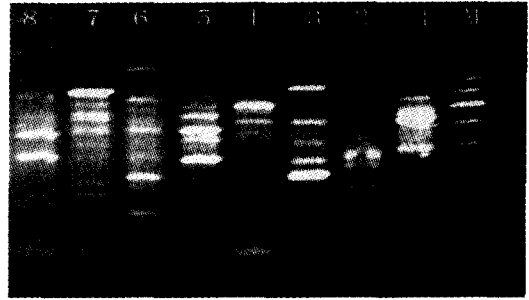


图8 引物筛选的扩增谱带
Fig.8 SRAP products of selecting primers

1,2,3,4,5,6,7,8. Me5/Eml1, Me5/Eml2, Me5/Eml3, Me5/Eml4,
Me6/Eml1, Me6/Eml2, Me6/Eml3, Me6/Eml4

表3 筛选取出的引物序列

Table 3 List of the selected primer sequences

引物组合 Primers	上游引物序列 Sequences	下游引物序列 Sequences
Me1/Em3	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGAC
Me2/Em8	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTCTG
Me2/Em5	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAAC
Me5/Eml1	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAAT
Me5/Em3	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTGAC
Me5/Em4	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTCAA
Me6/Eml1	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTAAT
Me6/Em2	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTTGC
Me6/Em3	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTGAC
Me8/Em5	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTGCA
Me8/Em6	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTGCA
Me8/Em7	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTCAA

得了较理想的试验结果。

SRAP标记是基于PCR标记系统的,故PCR扩增体系中DNA、 Mg^{2+} 、引物、dNTP Mixture、Taq DNA聚合酶等各组分的用量会影响扩增结果。本试验在优化SRAP扩增体系时也发现, Mg^{2+} 、引物、Taq DNA聚合酶作为PCR扩增的原料,有一个相对适宜的用量范围,浓度过低,不能满足扩增要求,浓度过高,组间可能会产生竞争,影响扩增效果。在对模板DNA进行优化时发现SRAP扩增对模板DNA的浓度要求不高,在实验中发现甚至4ng的模板都可扩增出条带。这与任羽等(2004)、武志朴(2005)的研究结果基本一致,说明SRAP分子标记

对DNA模板要求不高。

SRAP一般使用PAGE电泳检测PCR产物,本试验采用琼脂糖凝胶电泳检测,亦获得较丰富的多态性。本试验优化的SRAP扩增反应体系在22个供试地黄品种中均获得稳定、清晰谱带,品种间表现不同程度多态性。SRAP标记系统建立为该技术在地黄等四大怀药遗传多样性、系统发育和育种研究的广泛应用奠定了良好的基础。

参考文献:

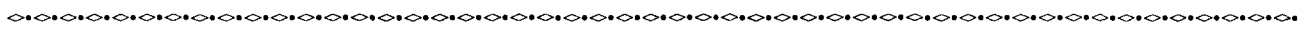
潘俊松,王刚,李效尊,等. 2005. 黄瓜SRAP遗传连锁图的构建
(下转第273页 Continue on page 273)

mm×250 mm, 5 μm)半制备色谱柱上,以甲醇-水为流动相,流速为 4 mL/min,采用梯度洗脱方式,在较短的时间内(26 min)一次可从牛耳朵中制备分离得到 5 种苯乙醇苷类单体,高效液相色谱分析表明所制备的 5 种化合物的纯度均高于 98%。该方法具有操作方便、高效、经济的特点,制备的 5 种苯乙醇苷类单体均可作为对照品。

参考文献:

广西壮族自治区中医药研究所. 1986. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社
 江苏新医学院. 1977. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社
 Damtoft S, Jensen SR. 1994. Three phenylethanoid glucosides of unusual structure from *Chirita sinensis* (Gesneriaceae)[J]. *Phytochemistry*, **37**(2):441-443
 He ZD(贺震旦), Yang CR(杨崇仁). 1989. The advances of phenylpropanoid glycosides in plants(植物中苯丙素甙类成分的研究进展)[J]. *Nat Prod Res Develop*(天然产物与开发), **2**:29-41
 Henrik F, Tommy LH, Søren RJ. 1998. A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuroides*[J]. *Phytochemistry*, **47**(6): 1 161-1 162
 Jing H(靖会), Zuo JF(佐建锋), Li JS(李教社). 2006. The ad-

vances in study on pharmacological of phenylpropanoid glycosides (苯乙醇苷类化合物的药理研究进展)[J]. *Lishizhen Medicine Materia Medica Res*(时珍国医国药), **17**(3):440-441
 Lei L, Yang FQ, Zhang TY, et al. 2001. Preparative isolation and purification of acteoside and 2'-acetylacteoside from *Cistanches salsa* (C. A. Mey) G. Beck by counter current chromatography [J]. *J Chromatography A*, **912**:181-185
 Li L, Tsao R, Liu ZQ, et al. 2005. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatography A*, **1 063**:161-169
 Li L, Tsao R, Yang R, et al. 2008. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Food Chemistry*, **108**:702-710
 Miyase T, Ishino M, Akahori C, et al. 1991. Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*[J]. *Phytochemistry*, **30**(6):2 015-2 018
 Nan HH(南海函), Yin H(尹浩), Zhang X(张偲). 2008. Phenylethanoid glycosides from *Clerodendrum inerme* (许树中苯乙醇苷类化合物的研究)[J]. *Nat Product Res Develop*(天然产物与开发), **20**:1 008-1 011
 Shimomura H, Sashida Y, Ogawa K. 1987. Iridoid glucosides and phenylethanoid glycosides in *Ajuga* species of Japan[J]. *Phytochemistry*, **26**(7):1 981-1 983



(上接第 260 页 Continue from page 260)

及始花节位的基因定位[J]. 自然科学进展, **15**(2):167-172
 Budak H, Shearman RC, Gaussoin RE, et al. 2004. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of Turfgrass species[J]. *Hort Sci*, **39**:955-958
 Chen JL(陈京荔), Huang LQ(黄璐琦), Shao AJ(邵爱娟), et al. 2002. RAPD analysis on different varieties of *Rehmannia glutinosa* (地黄不同品种的 RAPD 分析)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **27**(7):505-507
 Fan HH(樊洪泓), Li TC(李廷春), Qiu J(邱婧), et al. 2008. Studies on genetic diversity of medicinal *Dendrobium* by SRAP(药用石斛遗传多样性的 SRAP 标记研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **339**(1):6-10
 Li G, Quiros CF. 2001. 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 Applied Genetics*, **103**:455-461
 Ren Y(任羽), Wang DY(王得元), Zhang YD(张银东), et al. 2004. Optimization of SRAP-PCR in hot pepper (*Capsicum annuum*) (辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), **2**(5):689-693
 Wu ZP(武志朴), Yang WX(杨文香), Liu DQ(刘大群), et al. 2005. Establishment of SRAP technique system in wheat genome (小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究)[J]. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), **28**(3):665-669
 Xu XY(许晓燕), Yu MY(余梦瑶), Luo X(罗霞), et al. 2008.

Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by AFLP and SRAP(利用 AFLP 和 SRAP 标记分析 19 株木木耳的遗传多样性)[J]. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), **21** (1):121-124
 Xu Q(徐晴), Zhang GH(张桂华), Han YK(韩毅科), et al. 2008. Construction and analysis of the molecular genetic linkage map for cucumber (黄瓜远缘群体分子遗传连锁图谱的构建和分析)[J]. *Agric Boreal Sin* (华北农学报), **23**(1):45-49
 Zhou JY(周俊英). 2002. Chromosome studies of *Rehmannia glutinosa* of traditional Chinese medicine (中药地黄的染色体研究) [J]. *Shandong Sci* (山东科学), **15**(1):20-22
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2004a. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDS and ISSRS (利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性)[J]. *Hereditas* (遗传), **26**(6):922-928
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2004b. Optimization of ISSR-PCR amplification in *Huai Rehmannia glutinosa* (怀地黄 ISSR 扩增条件优化的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **24**(1):6-11
 Zhou YQ(周延清), Jing JZ(景建洲), Li ZY(李振勇), et al. 2005. ISSR identification of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* in Huai zone (怀地黄酒遗传多样性的 ISSR 鉴定)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), **36**(2):257-261