

天门冬质量及 RAPD 遗传多样性研究

徐昌艳¹, 罗忠圣², 曹旭林³, 钱志瑶¹, 李相陵¹, 覃容贵^{1*} (1. 贵州医科大学, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州贵阳 550014; 3. 贵阳市第六人民医院, 贵州贵阳 550005)

摘要 [目的]研究天门冬质量及 RAPD 遗传多样性, 并探索其质量与 RAPD 遗传多样性间相关性。[方法]采用综合评分法, 以总皂苷、多糖、浸出物含量为评价指标对天门冬进行质量评价; 对天门冬 RAPD 反应体系进行优化, 完成不同居群天门冬 RAPD 扩增, 运用 NTSYS 2.10e 软件进行遗传多样性分析及 UPGMA 系统树图构建; 分析天门冬质量与 RAPD 遗传多样性的相关性。[结果]18 份天门冬样品质量差异较大; 18 份天门冬多态性百分率为 89.62%, 遗传相似系数为 0.448 1~0.748 6, 在阈值 0.52 处 18 份天门冬聚为两大类, 其中贵州遵义桐梓天门冬单独分为一类, 其余聚为一类。[结论]天门冬质量与 RAPD 遗传多样性无显著相关性, 所建立的天门冬 RAPD 法可用于其遗传多样性研究, 可为其良种选育、规范化种植奠定基础。

关键词 天门冬; 质量评价; RAPD; 遗传多样性; UPGMA

中图分类号 R 282.71 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)03-0180-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.03.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Quality and RAPD Genetic Diversity of Asparagi Radix

XU Chang-yan¹, LUO Zhong-sheng², CAO Xu-lin³ et al (1. Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550014; 3. Guiyang Sixth Hospital, Guiyang, Guizhou 550005)

Abstract [Objective] The quality and RAPD genetic diversity of Asparagi Radix were studied, and the correlation between the quality and RAPD genetic diversity of Asparagi Radix was explored. [Method] The content of the total saponins, polysaccharide and alcohol-soluble extract in Asparagi Radix was taken as the evaluation index, and the quality of Asparagi Radix was evaluated by the comprehensive scoring method. We optimized the RAPD reaction system of Asparagi Radix, and amplified different populations of Asparagi Radix, based on the RAPD band data, the genetic similarity coefficients were analysed by NTSYS 2.10e, and the UPGMA dendrogram were developed. The correlation between the genetic diversity of RAPD and the quality of Asparagi Radix was analyzed. [Result] The quality of 18 Asparagi Radix samples was very different. The polymorphism rate of 18 Asparagi Radix was 89.62%, and the genetic similarity coefficient was 0.448 1-0.748 6. In the UPGMA analysis, under the threshold of 0.52, 18 samples were divided into two groups, 1 sample from Zunyi County was clustered into one group, while the rest of the 17 samples were clustered into the other group. [Conclusion] There is no significant correlation between the quality and genetic diversity of Asparagi Radix. The established RAPD method of Asparagi Radix can be used for the study of its genetic diversity, which can lay the foundation for the breeding of improved varieties and standardized planting of Asparagi Radix.

Key words Asparagi Radix; Quality evaluation; RAPD; Genetic diversity; UPGMA

天门冬(Asparagi Radix)又名天冬,为《中国药典》(2015年版)载品种^[1],不仅直接供中医临床配方使用,还作为“口炎清颗粒”“二冬膏”“石斛夜光丸”和“羚羊清肺颗粒”等多种中成药的主要原料,且天门冬中提取的天门冬甜素被广泛应用于食品领域。据《中华本草》记载:“贵州、云南、广西等地为天门冬主产区,其中贵州地区产量最大,品质最好”^[2]。贵州地区天门冬主要分布于贵阳、余庆、凤岗、黔西、大方、息烽、天柱、独山、荔波、镇宁、福泉、龙里、榕江、兴义、黎平、沿河等地,遵义凤冈县有大规模种植^[3]。项目组实地调查发现,贵州大方、龙里、息烽、兴义、遵义等地有野生天门冬分布,遵义凤冈县有栽培天门冬;广西桂林、玉林、南宁等地有野生天门冬分布,玉林、南宁等地有栽培天门冬;四川内江地区为文献记载的天门冬种植分布区,但调查发现由于天门冬生长周期长、产地加工方法复杂,该地区已少有农户种植;同属植物羊齿天门冬(*A. filicinus* Buch. -Ham. ex D.

Don)、密齿天门冬(*A. meiocladus* Levl., 异名:小茎叶天冬)及西南天门冬(*A. munitus* Wang et S. C. Chen)的块根在部分地区被误作天门冬入药;且《四川省中药材标准》载的小天冬为密齿天门冬,在贵州省称为“壳天冬”^[4]。项目组前期研究发现天门冬质量主要受其总皂苷含量影响,其次与其多糖和醇溶性浸出物相关^[5]。

RAPD 技术可以利用随机引物对物种基因组 DNA 进行多态性检测,操作简便、反应迅速、所需 DNA 量少,被广泛应用于药用植物遗传多样性研究。物种的遗传多样性决定其进化和适应环境的能力,种内遗传多样性越高,物种对环境变化的适应能力就越强^[6]。因此,该研究收集了贵州、广西、云南等主产区的 18 份天门冬样品,以总皂苷、多糖、醇溶性浸出物含量为指标,采用综合评分法评价不同产地天门冬质量;优化建立天门冬 RAPD 的最佳反应体系,对不同产地天门冬进行 RAPD 遗传多样性和亲缘关系分析,并进行天门冬质量与 RAPD 遗传多样性的相关性分析,以期为天门冬种质资源筛选和良种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 天门冬样品均为自采集,经贵州中医药大学魏升华教授鉴定为百合科植物天门冬[*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.],样品剪取幼嫩叶片后再挖取块根,其中嫩叶

基金项目 贵州省科技厅科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7329);2017 年国家级大学生创新创业训练计划项目(DC201710660019);2019 年国家级大学生创新创业训练计划项目(201910660028)。

作者简介 徐昌艳(1986—),女,贵州兴义人,讲师,硕士,从事中药、民族药资源及新药研究。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事中药、民族药资源及新药研究。

收稿日期 2020-07-03

片洗净,吸水纸吸干表面水分,置于封口袋中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存;块根洗净,置恒温干燥箱 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干,并粉碎过 $60\text{ }\mu\text{m}$ 筛,备用。样品产地详见表1。

DNasecure plan tkit 新型植物基因组提取试剂盒(DP320,北京 TIANGEN 生化科技有限公司);琼脂糖(西班牙);GoldView I 型核酸染色剂、 $50\times$ TAE 缓冲液(北京索莱宝公司);RAPD 随机引物(上海捷瑞生物工程有限公司)。

1.2 不同产地天门冬质量评价 由于天门冬质量主要与其总皂苷、多糖和醇溶性浸出物含量相关,因此该研究根据前期研究建立的天门冬总皂苷、多糖含量测定方法^[5]及《中国药典》(2015年版)中天门冬浸出物项下醇溶性浸出物含量测定方法进行测定,考虑到总皂苷、多糖、浸出物等成分对天门冬药材质量的影响程度,分别赋予总皂苷 60% 、多糖 20% 、醇溶性浸出物 20% 的权重,数据处理中引入综合指标“隶属度”,采用综合评分法评价天门冬质量,综合分=总皂苷隶属度 $\times 60\%$ +多糖隶属度 $\times 20\%$ +浸出物隶属度 $\times 20\%$,其中指标隶属度=(指标值-指标最小值)/(指标最大值-指标最小值),满分为 1.00 ,计算得到综合评分越高,表示此地天门冬质量越好^[7-8]。

1.3 天门冬 RAPD 遗传多样性研究

1.3.1 DNA 提取与检测。按试剂盒法进行天门冬基因组 DNA 提取,并采用琼脂糖凝胶电泳进行天门冬基因组 DNA 的完整性检测,然后采用多功能酶标仪进行天门冬基因组 DNA 浓度及纯度检测。

1.3.2 RAPD 反应体系优化。经文献查阅及预试验,确定天门冬 RAPD 初始反应体系,再对天门冬 RAPD-PCR 扩增中影响较大的因素(DNA 模板浓度、引物浓度、 $2\times$ Taq PCR Mas-

terMix 浓度)进行优化,每次改变 1 个因素时其他条件不变,最终确定天门冬 RAPD 最优反应体系。扩增程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s ,再 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 70 s ,然后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min , 40 次循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min ;得到的产物于 1.6% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离(100 V 电压), 1 h 后从电泳槽中取出,在凝胶成像系统中进行显像观察并记录拍照^[9]。

1.3.3 引物筛选。分别采用 60 条 RAPD 随机引物(含 10 个碱基的寡核苷酸)进行天门冬基因组 DNA 的 RAPD 扩增,优选出扩增条带清晰、稳定性好的引物作为天门冬 RAPD 扩增有效引物。

1.3.4 不同产地天门冬 RAPD 扩增。以 RAPD 优化体系和有效引物分别对 18 份不同产地天门冬进行 PCR 扩增,采用人工读取方式进行条带统计,并计算条带多态性百分率(PPB),采用 NTSYS 2.10e 软件获得不同产地天门冬遗传相似性系数矩阵,并采用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,构建不同产地天门冬的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 不同产地天门冬质量评价 以天门冬总皂苷、多糖、醇溶性浸出物含量为评价指标,引入“隶属度”进行综合评价不同产地天门冬质量,综合评分见表1。由表1可知,不同产地 18 份天门冬综合评分为 $0.1684\sim 0.9150$,其中以 S9(贵州开阳龙岗镇2)综合评分最高,为 0.9150 ,其次是 S13(云南昆明2),综合评分为 0.7888 ,S16(贵州省贵安新区党武镇)综合评分最低,为 0.1684 。表明 18 份不同产地天门冬质量差异较大,其中贵州开阳龙岗镇2产的天门冬质量最好,其次是云南昆明2,而贵州贵安新区党武镇产的天门冬质量最差。

表1 不同产地天门冬质量($n=3$)及 RAPD 扩增 PPB

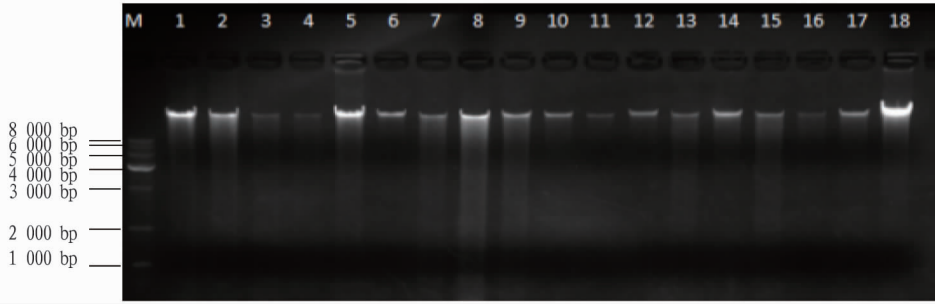
Table 1 The quality of Asparagi Radix from different producing areas ($n=3$) and RAPD amplified PPB

样品编号 Sample No	产地 Producing area	总皂苷含量 Total saponins content//%	浸出物含量 Extract content//%	多糖含量 Polysaccharide content//%	综合评分 Comprehensive score	多态性位点数 Number of polymorphic sites	PPB %
S1	贵州贵阳新场1	0.5421	79.56	20.83	0.5462	95	51.91
S2	贵州贵阳新场2	0.4185	84.33	17.46	0.4019	89	48.83
S3	贵州贵阳新场3	0.6621	84.80	13.08	0.7175	79	43.17
S4	贵州贵阳新场4	0.5914	82.69	7.84	0.5143	82	44.81
S5	广西南宁长岗村	0.4276	85.93	11.36	0.3683	77	42.08
S6	贵州贵阳达古	0.4787	82.56	18.42	0.4732	94	51.37
S7	贵州修文六中	0.5532	83.70	24.38	0.6745	100	54.64
S8	贵州开阳龙岗1	0.6165	81.20	19.35	0.6658	118	64.48
S9	贵州开阳龙岗2	0.6534	90.44	22.71	0.9150	113	61.57
S10	贵州开阳龙岗3	0.5189	88.54	23.72	0.6964	80	43.72
S11	贵州开阳龙岗4	0.4843	88.75	13.46	0.5246	84	45.90
S12	云南昆明1	0.3934	79.71	16.97	0.2819	82	44.81
S13	云南昆明2	0.6265	87.42	19.73	0.7888	121	66.12
S14	云南昆明3	0.4865	84.05	10.45	0.4132	88	48.09
S15	云南昆明4	0.3734	80.26	18.84	0.2840	125	68.31
S16	贵州贵安新区党武	0.2776	83.60	16.41	0.1684	114	62.30
S17	贵州关岭	0.6828	86.53	11.39	0.7565	119	65.03
S18	贵州遵义桐梓	0.4557	91.72	21.28	0.6262	102	55.74

2.2 天门冬 RAPD 遗传多样性研究

2.2.1 基因组 DNA 提取与检测。由图 1 可见,18 份不同产地天门冬的基因组 DNA 电泳条带清晰;且天门冬 OD_{260/280} 值

为 1.70~1.87,浓度为 234.9~253.0 μg/mL,表明提取的天门冬 DNA 纯度高、质量好,可用于后续 RAPD 扩增。



注:M 为 Marker,1~18 为样品 S1~S18

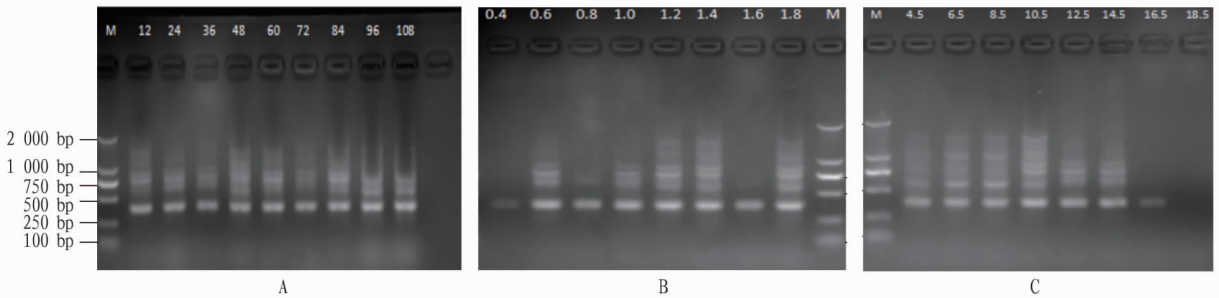
Note:M is Marker,1-18 are samples S1-S18

图 1 天门冬基因组 DNA 检测电泳图

Fig. 1 Electrophoresis diagram of *Asparagus Radix* genomic DNA detection

2.2.2 RAPD 反应体系优化。由图 2 可见,根据扩增条带清晰度、数量、明亮程度对比,选择条带清晰、数量多、明亮的条带,优选出 25 μL 天门冬 RAPD 反应体系中 DNA 模板最适

用量应为 48 ng,引物最适用量应为 1.2 μmol,2×Taq PCR MasterMix 最适用量应为 10.5 μL,ddH₂O 补足。



注:M 均为 Marker,A 为 DNA 模板用量,B 为引物用量,C 为 2×Taq PCR MasterMix 用量

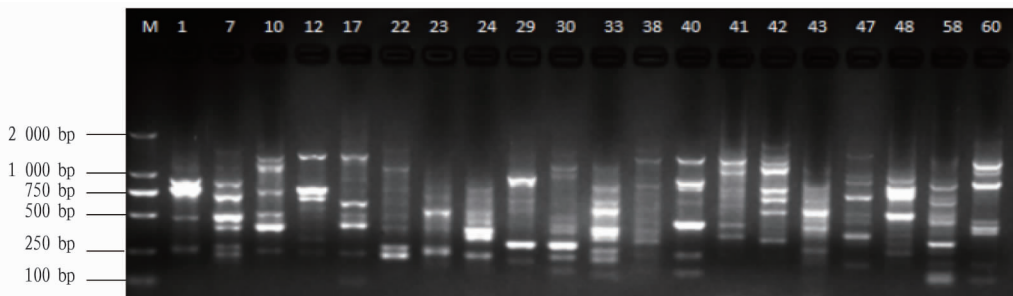
Note:M is the Marker,A is the amount of DNA template,B is the amount of primers,and C is the amount of 2×Taq PCR MasterMix

图 2 各因素对 RAPD 的影响

Fig. 2 The influence of various factors on RAPD

2.2.3 引物筛选。从 60 条 RAPD 随机引物中筛选出的 20 条有效引物进行 RAPD 扩增,扩增效果见图 3,20 条有效引物共扩增出 164 条清晰的多态性条带,其 PPB 为 89.62%,扩

增产物的片段大小为 100~2 000 bp,平均每条引物扩增出 9 条条带,每条有效引物的 PPB 为 77.78%~100.00%,表明天门冬有丰富的多态性。



注:M 为 Marker,其余为有效引物

Note:M is Marker,the rest are effective primers

图 3 有效引物的 RAPD 扩增电泳图

Fig. 3 RAPD amplification electropherogram of effective primers

2.2.4 不同产地天门冬 RAPD 扩增产物的多态性分析。18 份不同产地天门冬样品经 RAPD 扩增出的多态性位点数及 PPB 结果见表 1。其中 S5(广西南宁长岗村)天门冬的 PPB

最低,为 42.08%,S15(云南昆明 4)天门冬的 PPB 最高,为 68.31%,贵州天门冬的 PPB 平均为 53.34%,根据多态性百分率就可以看出广西南宁长岗村的天门冬适应环境的能力

稍弱,云南昆明 4 的天门冬适应环境的能力相对较强。

2.2.5 不同产地天门冬的相似性及聚类分析。18 份不同产地天门冬通过 NTSYS 2.10e 软件进行遗传相似性分析,遗传相似系数矩阵结果见表 2。由表 2 可知,不同产地天门冬的 RAPD 遗传相似系数为 0.448 1~0.748 6,说明不同产地天门

冬之间存在丰富的遗传变异。其中 S8(贵州开阳龙岗 1)样品与 S9(贵州开阳龙岗 2)样品的遗传相似性系数最大,为 0.748 6,表明两者的亲缘关系最近;S11(贵州开阳龙岗 4)样品和 S18(贵州遵义桐梓)样品的遗传相似性系数最小,为 0.448 1,表明两者的亲缘关系最远。

表 2 不同产地天门冬的遗传相似系数

Table 2 Genetic similarity coefficients of *Asparagi Radix* from different producing areas

样品 Sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	
S1	1																		
S2	0.535 5	1																	
S3	0.639 3	0.568 3	1																
S4	0.677 6	0.541 0	0.612 0	1															
S5	0.639 3	0.623 0	0.584 7	0.633 9	1														
S6	0.519 1	0.633 9	0.584 7	0.568 3	0.606 6	1													
S7	0.568 3	0.541 0	0.524 6	0.497 3	0.546 4	0.579 2	1												
S8	0.666 7	0.519 1	0.557 4	0.661 2	0.601 1	0.524 6	0.562 8	1											
S9	0.644 8	0.530 1	0.579 2	0.672 1	0.601 1	0.480 9	0.541 0	0.748 6	1										
S10	0.601 1	0.661 2	0.623 0	0.573 8	0.568 3	0.633 9	0.551 9	0.519 1	0.562 8	1									
S11	0.573 8	0.667 6	0.628 4	0.524 6	0.595 6	0.606 6	0.524 6	0.535 5	0.502 7	0.644 8	1								
S12	0.519 1	0.612 0	0.584 7	0.557 4	0.551 9	0.595 6	0.502 7	0.524 6	0.491 8	0.623 0	0.650 3	1							
S13	0.568 3	0.551 9	0.579 2	0.595 6	0.568 3	0.633 9	0.584 7	0.650 3	0.639 3	0.497 3	0.513 7	0.524 6	1						
S14	0.508 2	0.655 7	0.639 3	0.568 3	0.606 6	0.683 1	0.546 4	0.491 8	0.491 8	0.666 7	0.617 5	0.606 6	0.546 4	1					
S15	0.546 4	0.551 9	0.491 8	0.530 1	0.546 4	0.579 2	0.650 3	0.573 8	0.508 2	0.573 8	0.491 8	0.459 0	0.573 8	0.590 2	1				
S16	0.562 8	0.579 2	0.508 2	0.590 2	0.562 8	0.562 8	0.557 4	0.601 1	0.568 3	0.546 5	0.519 1	0.530 1	0.579 2	0.573 8	0.568 3	1			
S17	0.601 1	0.486 3	0.557 4	0.628 4	0.535 5	0.480 9	0.595 6	0.672 1	0.715 8	0.508 2	0.480 9	0.502 7	0.606 6	0.491 8	0.606 6	0.590 2	1		
S18	0.524 6	0.508 2	0.535 5	0.497 3	0.524 6	0.502 7	0.530 1	0.541 0	0.584 7	0.541 0	0.448 1	0.513 6	0.562 8	0.502 7	0.497 3	0.557 4	0.551 9	1	

根据 18 份不同产地天门冬的遗传相似系数进行 UPGMA 系统树图构建,结果见图 4。在阈值 0.52 时,不同产地天门冬聚为两大类,其中 S18 单独分为第 I 类,其余产地天门冬聚为第 II 类,表明贵州遵义桐梓天门冬与其他产地天门冬的亲缘关系较远,其间存在一定程度的遗传变异;其中第 II 类在阈值为 0.54 时又可分为 2 类,第 I 类包括 S1(贵州贵阳新场 1)、S4(贵州贵阳新场 4)、S5(广西南宁长岗村)、S7(贵州修文六中)、S8(贵州开阳龙岗 1)、S9(贵州开阳龙岗 2)、S13(云南昆明 2)、S15(云南昆明 4)、S16(贵州贵安新区党武)、S17(贵州关岭),其余产地为第 II 类。

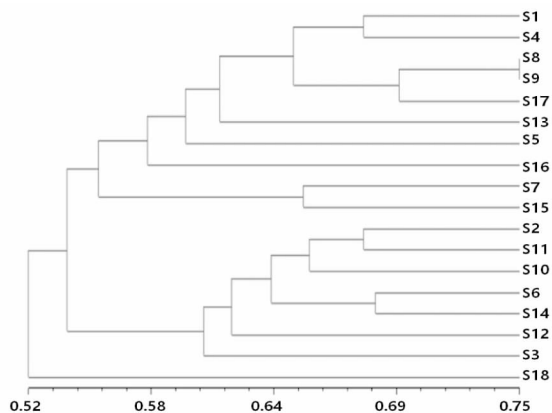


图 4 18 份天门冬样品的 UPGMA 系统树图

Fig. 4 UPGMA tree diagram of 18 *Asparagi Radix* samples

2.3 天门冬质量与 RAPD 遗传多态性的相关性分析 利用

SPSS 20.0 软件,采用双变量相关性法对天门冬质量与 RAPD 遗传多样性多态性百分率 (PPB) 的相关性进行分析,结果发现(图 5),天门冬总皂苷含量与 RAPD 遗传多样性的相关系数为 0.125,对应的显著性为 0.622,在 0.05 水平上不存在显著相关性;天门冬多糖含量与 RAPD 遗传多样性的相关系数为 0.338,对应的显著性为 0.170,在 0.05 水平上不存在显著相关性;天门冬醇溶性浸出物含量与 RAPD 遗传多样性的相关系数为 -0.004,对应的显著性为 0.998,在 0.05 水平上不存在显著相关性;天门冬质量综合评分与其 RAPD 遗传多样性的相关系数为 0.202,对应的显著性为 0.422,在 0.05 水平上不存在显著相关性。因此,初步推断天门冬质量与 RAPD 遗传多态性无显著相关性,质量好的天门冬对环境的适应能力未必强。

3 讨论与结论

由于进行权重的综合评分法中权重具有主观随意性,易导致评价结果的不确定性,因此该试验以总皂苷、多糖、醇溶性浸出物含量为评价指标,引入综合指标“隶属度”,再综合评分进行 18 份不同产地天门冬的质量评价,此评价方法更严谨,评价结果更可靠^[7]。18 份不同产地天门冬中,贵州开阳龙岗镇 2 产的天门冬评分最高,即质量最好,其次是云南昆明 2,而贵州贵安新区党武镇产天门冬质量最差,究其原因可能是贵州贵安新区党武采集地为山坡,土层较薄,具体原因有待进一步研究确定。

高质量的植物基因组 DNA 是 DNA 分子标记鉴定的前

提,前期研究中分别采用 CTAB 法和新型植物基因组 DNA 提取试剂盒法,对天门冬药材和幼嫩叶片的基因组 DNA 提取效果进行比较,发现由于天门冬药材药用部位为块根,其组织可能受烘干或日晒、产地加工等影响,使得天门冬药材基因组 DNA 提取难度大^[10-12]。

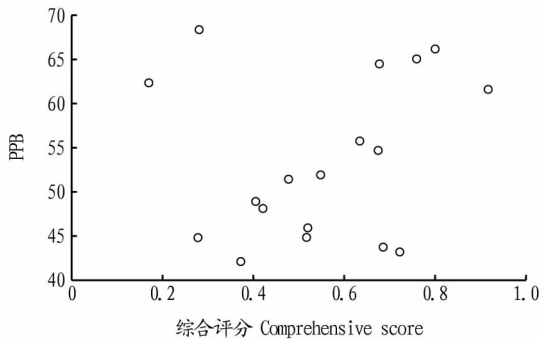


图5 天门冬质量综合评分与 RAPD 遗传多样性 PPB 相关性散点图

Fig. 5 Scatter plot of correlation between *Asparagus Radix* quality comprehensive score and RAPD genetic diversity PPB

该试验中发现影响天门冬 RAPD-PCR 扩增的主要因素是模板 DNA、引物及 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 浓度,其中模板 DNA 浓度过低,分子发生碰撞概率小,PCR 扩增产物将无或少;而 DNA 模板的浓度太大,扩增产量过大,条带数过多,将难以分离,不利于后续条带读取;其次引物浓度过低,将直接影响 PCR 的产率,可能出现无扩增条带的现象。该试验所用 2×Taq PCR MasterMix 中包括 Mg^{2+} 、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs,其浓度直接影响 RAPD 稳定性和多态性^[13]。因此,该试验分别考察了模板 DNA、引物及 2×Taq PCR MasterMix 的浓度对天门冬 RAPD 扩增的影响,建立了天门冬 RAPD-PCR 扩增的最优反应体系。

植物种间或种内个体间遗传相似系数越大,表明亲缘关系越近,遗传差异越小;遗传相似系数越小,则亲缘关系越远,遗传差异越大^[13-15]。不同产地 18 份天门冬的 RAPD 遗传相似系数为 0.448 1~0.748 6,部分贵州不同产地间的天

门冬遗传相似系数小,其间亲缘关系远,而贵州部分地区与云南昆明的天门冬样品间遗传相似系数大,其间亲缘关系近;广西南宁与云南昆明部分天门冬样品间遗传相似系数大,其间亲缘关系近。并经 UPGMA 聚类分析,发现 S18 样品单独分为一类,其余样品聚为一类;在阈值为 0.54 处时,S1、S4、S5、S7、S8、S9、S13、S15、S16、S17 样品聚为一类,其他 7 份样品聚为一类,结果表明,不同居群天门冬之间存在丰富的遗传多样性,天门冬对环境的适应能力很强;且遗传相似系数和聚类分析的结果与样品来源的地理距离并不存在一致性,可能与样品来源地的地形、气候等自然因素有关。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [3] 曾桂萍,刘红昌,张先. 贵州天门冬适生环境的调查研究[J]. 贵州农业科学,2010,38(2):48-50.
- [4] 吕向阳,陈艾萌,刘丹,等. 内江地区天冬栽培技术与加工工艺现状与展望[J]. 现代农业科技,2019(14):77-79.
- [5] 曹旭林,徐昌艳,邓强,等. 商品天冬等级与其活性物质含量的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):55-59.
- [6] 申仕康,刘丽娜,王跃华,等. 濒危植物猪血木人工繁殖幼苗的遗传多样性及对种群复壮的启示[J]. 广西植物,2012,32(5):644-649.
- [7] 陈会英,周衍平. 综合评分法的改进与应用[J]. 农业系统科学与综合研究,1996,12(1):37-41.
- [8] 冯果,曾志乾,吴增光,等. 基于综合评分法的不同产地加工方法对瓜蒌药材质量的影响[J]. 安徽农业科学,2017,45(29):120-123.
- [9] 曹旭林. 天冬等级划分的合理性及其遗传多样性研究[D]. 贵阳:贵州医科大学,2018.
- [10] 欧立军,张人文,谈智文,等. 我国不同地区天门冬核 DNAITS 序列分析[J]. 中草药,2011,42(7):1402-1406.
- [11] 罗焜,马培,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定中的 DNA 提取方法研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2012,14(2):1433-1439.
- [12] 徐昌艳,雷丹丹,曹旭林,等. 天冬药材基因组 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2019,47(8):171-173.
- [13] 王奕华. 青岛文昌鱼遗传多样性的 RAPD 分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2003.
- [14] 尹明华,占学林,徐文慧,等. 三叶青种质资源遗传多样性的随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 浙江农业学报,2018,30(11):1839-1848.
- [15] 李相陵,钱志瑶,范菊娣,等. 半枝莲活性物质含量测定及 RAPD 遗传多样性分析[J]. 中药材,2018,41(7):1571-1576.
- [16] 陈丽丽. 黑龙江省野慈姑对磺酰脲类除草剂的敏感性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [17] Current Status of the International Herbicide-Resistant Weed Database [DB/OL]. [2012-12-03]. <http://www.weedscience.org/Home.aspx>.
- [18] IWAKAMI S, WATANABE H, MIURA T, et al. Occurrence of sulfonylurea resistance in *Sagittaria trifolia*, a basal monocot species, based on target-site and non-target-site resistance[J]. Weed biology and management, 2014, 14(1):43-49.
- [19] 徐凤. 吉林省主要稻区慈姑、雨久花发生状况及慈姑抗药性 ALS 基因突变位点的研究[D]. 延边:延边大学,2014.
- [20] 吴明根,刘亮,时丹,等. 延边地区稻田抗药性杂草的研究[J]. 延边大学学报,2007,29(1):5-9,23.
- [21] 李平生,魏松红,纪明山,等. 野慈姑对 ALS 抑制剂的交互抗药性[J]. 农药,2015,54(5):366-368.
- [22] 李平生,魏松红,纪明山,等. 辽宁省稻田野慈姑对吡嘧磺隆的抗药性[J]. 植物保护学报,2015,42(4):663-668.
- [23] 陈丽丽,何付丽,范丹丹,等. 黑龙江省野慈姑对吡嘧磺隆的敏感性测定[J]. 植物保护,2013,39(6):120-123.
- [24] 刘延,刘华招,高增贵. 野慈姑对吡嘧磺隆抗性的分子机理[J]. 杂草科学,2015,33(3):20-23.
- [25] 吕晓曦,赵长山,李庚,等. 黑龙江省稻田野慈姑对丙嗪磺隆抗性相关研究[J]. 植物保护,2019,45(2):174-177,187.
- [26] 邵珊珊,周兴伟,于洪涛,等. 三种除草剂防治水稻田野慈姑防效对比试验[J]. 黑龙江农业科学,2019(9):67-70.
- [27] 吕晓曦. 黑龙江省野慈姑对丙嗪磺隆抗性相关研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2019.
- [28] 何军艇,姚先进,陆基林,等. 稻田恶性杂草野慈姑发生规律及防治技术措施研究[J]. 现代化农业,2013(6):4-5.

(上接第 149 页)