

· 综述 ·

分子标记技术在甘草中的应用[△]

李珍珍^{1,2}, 郑司浩², 尚兴朴², 邓庭伟², 王继永^{2*}, 赵润怀^{2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 中国中药有限公司, 北京 100195

[摘要] 甘草为我国传统常用大宗中药材, 分布区域广泛, 形态变异幅度大, 种质资源的遗传多样性丰富。甘草的种源混乱及基原鉴定困难一直是困扰甘草产业发展的重要因素。本文概述 RFLP(restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)、基于 PCR 的分子标记如 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)、AFLP(amplification fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)、SSR(simple sequence repeat, 简单重复序列)、ISSR(inter-simple sequence repeat, 内部简单序列重复)等分子标记技术在甘草基原鉴定和遗传多样性中的研究进展, 分析不同分子标记技术的特点及其在甘草中的应用方向, 并对分子标记技术在甘草中的应用前景做出展望。

[关键词] 甘草; 遗传多样性; 分子标记

[中图分类号] R282.71; Q523 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0684-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181218007

Molecular Marker Technology in Application of Glycyrrhizae Radix Identification

LI Zhen-zhen^{1,2}, ZHENG Si-hao², SHANG Xing-pu², DENG Ting-wei², WANG Ji-yong^{2*}, ZHAO Run-huai^{2*}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. China National Traditional Chinese Medicine Co., Ltd, Beijing 100195, China

[Abstract] Glycyrrhizae Radix is a traditional commonly used herbal medicine in China, which distributing widely, owning large range of variation in morphology, and rich genetic diversity in germplasm resources. The confusion of seed resource and difficulty of original identification has been always besetting the development of Glycyrrhizae Radix industry. In this review, the research progress of molecular marker technology, such as RFLP, RAPD, AFLP, SSR and ISSR were summarized in term of original identification and genetic diversity. The characteristics of different molecular marker technology and the direction of application in Glycyrrhizae Radix were analyzed, and proposed the expectation for the application prospect of molecular marker technology in Glycyrrhizae Radix identification.

[Keywords] Glycyrrhizae Radix; genetic diversity; molecular marker

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (也称乌拉尔甘草)、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎, 又名国老、灵通、甜草、棒草^[1]。甘草性味甘平, 具有清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和药性等作用^[2]。随着中医学科的应用普及, 国内外都对甘草的药理作用进行了非常广泛和深入的研究^[3-10]。但不同基原甘草的有效化学成分含量有显

著的差别, 且同一基原不同产地甘草的有效成分也存在差异^[11-16]。

随着分子生物技术在农作物和中药领域的迅速发展及应用^[17-20], 其对甘草的基原鉴定以及遗传多样性的研究层出不穷。相对于甘草传统鉴定方法, 如形态鉴别、显微鉴别、理化鉴别、红外鉴别、指纹图谱鉴别等^[21-24], 分子标记技术显示出迅速准确的鉴别效果; 而在甘草的遗传多样性上, 不同的分

[△] **[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-ZY-45); 国家重点研发计划(SQ2017YFC170424); 国家中药材产业技术体系遗传改良研究室建设(CARS-21); 北京市科技计划课题(Z171100001717028); 中医药公益性行业科研专项(201507002-1-10)

* **[通信作者]** 王继永, 研究员, 研究方向: 濒危药材种质资源保护; Tel: (010)88468089, E-mail: wangjiyong75@163.com
赵润怀, 研究员, 研究方向: 中药资源与中药材生产加工; Tel: (010)88468257, E-mail: zhaorunhuai@sina.com

子标记又各具特点, 本文将对分子标记在甘草中的应用做出综述。

1 分子标记技术概述

分子标记技术是研究反映生物个体、居群以及物种等分类单位间的基因组 DNA 片段差异的技术, 广泛应用于生物基因组探究、生物分子鉴定、生物遗传等研究领域。分子标记的种类主要有: 基于 Southern 杂交技术的分子标记如 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)、基于 PCR 的分子标记如 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)、AFLP (amplification fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)、SSR (simple sequence repeat, 简单重复序列)、ISSR (inter-simple sequence repeat, 内部简单序列重复)、SRAP (sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)、基于 DNA 序析的 SNP (single nucleotide polymorphism, 单核苷多态性) 及 DNA 条形码 (DNA barcoding) 等。

2 分子标记技术在甘草中的应用

2.1 RFLP

RFLP 是 20 世纪 70 年代发展起来的分析 DNA 片段的技术, 既能检测基因组 DNA (genome DNA), 又能够检测核糖体 DNA (ribosome DNA, rDNA) 以及叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA), 结果较稳定, 而且是共显性表达。RFLP 多应用在鉴别菌落和研究菌落的多样性^[25]。谷俊等^[26]采用表型数值分类、16SrDNA PCR-RFLP 分析和 BOX-PCR 指纹图谱分析的方法对北方地区的甘草根瘤菌进行表型、遗传多样性分析, 结果表明, 菌株表现出丰富的遗传多样性。

2.2 RAPD

RAPD 技术不需要专门设计序列的引物, 且引物的 T_m 值比较低, 能保证寡聚核苷酸引物与模板稳定结合, 允许引物和模板适当误配, 因此增大了引物在基因组 DNA 中配对的随机性, 提高了对 DNA 的分析效率。王鸣刚等^[27]以不同地区的 3 种 15 组甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*、*G. inflata*、*G. glebra*) 种子为材料, 研究 RAPD 分子标记在甘草亲缘关系中应用的可行性, 结果显示, 根据 RAPD 聚类分析方法得出 15 组甘草植物之间的亲缘关系与形态学分类结果存在差异。吴霞等^[28]应用 RAPD 技术探讨新疆产

甘草不同地理群体的遗传多样性, 此研究证明了同一产地栽培种与野生种具有相似的遗传特性, 反应了地理环境对遗传特性有一定的影响, 为不同产地甘草的遗传特性比较提供了理论基础。陆嘉惠等^[29]应用 RAPD 技术, 探讨甘草属 (*Glycyrrhiza* L.) 13 种 1 变种 30 个植物类群的遗传差异和几个争议种的分类地位, 结果显示, 基于 RAPD 图谱建立的系统发育图与经典分类学有较好的一致性, 由此说明 RAPD 标记可为甘草属的系统分类探究提供分子生物学依据。张增福等^[30]以甘草种质为试材, 采用正交试验法设计, 对影响 RAPD-PCR 扩增的主要因素 dNTPs、引物、Taq 酶和 DNA 模板进行优化筛选, 建立了适合甘草分子研究的 RAPD-PCR 反应体系, 为不同产地甘草种质的分子学研究提供方法依据。以上研究可见 RAPD 技术在甘草遗传多样性和分类学上起着重要的作用。

2.3 AFLP

AFLP 同时具有 RFLP 技术与 PCR 技术的优点, 即可靠性和高效性。周成明等^[31]采用 AFLP 标记技术研究 4 个来源甘草属植物的遗传基础, 初步探讨了 AFLP 在甘草品系选育中的应用, 结果显示, “民勤 1 号”“喀什 1 号”“阿克苏 1 号”形成了独特的基因构成, 为乌拉尔甘草优良栽培新品种选育研究奠定基础。葛淑俊等^[32]利用 AFLP 分子标记对甘草主产区的 16 个野生种群 320 个单株进行遗传多样性研究, 建立了适合野生甘草遗传多样性分析的稳定的 AFLP 体系, 筛选出 15 对引物组合对 16 个种群 320 个单株共扩增出 759 条谱带。根据各指标显示, 遗传多样性水平从高到低顺序为宁夏、内蒙古、新疆、黑龙江、山西、甘肃酒泉, 此研究得出的信息为甘草遗传多样性的保护和品种选育研究提供参考依据。杨全等^[33]采用 cDNA-AFLP (cDNA amplified fragment length polymorphism)^[34]方法分析 8 种变异类型甘草基因表达的差异, 获得 14 条差异表达基因片段, 并首次克隆了不同变异类型甘草特异表达的基因, 筛选出了优良变异类型, 为新品种选育奠定基础, 同时为甘草功能基因的研究累积参考数据。

2.4 SSR

1974 年, Skinner 等^[35]发现了结构为 $-(T-A-G-G)_n-(A-T-C-C)_n$ 的重复序列。后来研究发现, 这种重复是真核基因组特有的, 并称之为“简单重复”。在众多分子标记中, SSR 多态性丰富、数目

多、分布均匀、具有共显性以及符合孟德尔遗传等优点,且结果稳定^[36-39]。已在许多农作物的起源、遗传图谱建立、多态性分析、品种鉴定以及辅助育种等方面有了广泛的应用,并且此技术稳定可靠。刘越等^[40]在乌拉尔甘草中开发功能性 EST-SSR 分子标记,分析乌拉尔甘草 EST-SSRs 特征,为乌拉尔甘草 EST-SSR 的遗传分布规律提供参考,也为进一步开发乌拉尔甘草功能性 EST-SSR 标记奠定了基础。李晓岚等^[41]通过乌拉尔甘草表达序列标签(EST)数据库搜索甘草属的 SSR 位点,并使用 Primer3.0 软件设计引物,分析来自甘草属 4 个种 22 份材料的 EST-SSR 指纹图谱特征和聚类结果。结果表明,实验中开发的 15 对引物对甘草属具有很好的适用性,为甘草的种间亲缘关系、种内遗传多样性研究以及物种鉴定等提供分子依据。刘亚令等^[42]采用正交设计试验建立了适合甘草 SSR-PCR 反应的最佳体系,利用优化体系对 69 对 SSR 引物进行了筛选,共筛选出 33 对在 4 种药用甘草中均能有效扩增且多态性较好的 SSR 引物,为利用 SSR 标记对甘草属植物的遗传多样性分析、分子辅助育种、指纹图谱构建和物种鉴定及野生资源保护等工作提供技术支撑。

2.5 ISSR

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)也称锚定简单重复序列(anchored inter-simple sequence repeat, ASSR),是以微卫星为引物的 PCR(microsatellite-primed PCR, MP-PCR),或是在 SSR 基础上发展起来的,用 SSR 为引物扩增重复序列之间区的 DNA 分析技术。ISSR 采用的引物具有更强的专一性,与模板结合的强度提高,重复性好,并可揭示比 RFLP、RAPD、SSR 更多的多态性,此技术结合了 RAPD 标记技术与 SSR 标记技术的优点,耗资少,模板用量少,不需要知道靶标序列的 SSR 背景信息,使用通用引物。孙群等^[43]利用 ISSR 分子标记技术对不同种源乌拉尔甘草的遗传多样性进行分析,结果表明,新疆地区乌拉尔甘草遗传多样性最为丰富,其次是西北地区,最低的为东北地区,并证明了基于 ISSR 分子标记划分的组群与地域性没有明显关系。李贝宁等^[44]采用 ISSR 分子标记技术研究来自 4 个产地 155 个甘草个体的遗传多样性,结果表明,各产地野生品基本都能够各自聚为一类,内蒙古、宁夏和甘肃甘草遗传特征较为稳定,陕西甘草的变异幅度较大,说明不同道地产区甘草的遗传多样性具有显著的地域

性特征,且甘草道地药材的形成具有遗传基础。

2.6 DNA 条形码

DNA 条形码是利用具有足够变异的短基因片段对物种进行准确快速鉴定生物身份的识别系统,能够快速有效率地鉴别物种,因此得到非常广泛的应用。刘春生^[45]在研究 3 种药用甘草的 ITS 序列中发现胀果甘草和其他甘草种类有 1 个碱基差异,乌拉尔甘草和其他甘草种类有 3 个碱基差异,并筛选出 2 个上游引物,成功鉴别了乌拉尔甘草和胀果甘草。陈士林^[46]发表了 3 种药用甘草的 ITS2 序列峰图以及条形码 consensus 序列及种间序列变异情况,提出将 ITS2 序列作为甘草的通用 DNA 条形码序列。赵月梅等^[47]分析了刺果甘草与甘草、苦参、黄芪基原植物编码核糖体 RNA 的核基因的 ITS2 序列的 K2P 距离,且基于 K2P 距离构建了系统进化树,都证明了 ITS2 序列可以准确鉴定这几种药材以及不同基原植物,为甘草等药材及其混伪品的鉴别提供了新的研究方法。杨瑞等^[48]利用 PCR 扩增得到了长度为 616 bp 的 ITS 序列和 389 bp 的 psbA-trnH 序列,在 ITS 序列中找到 4 个变异位点,且确定了 2 种 ITS 单倍型,在 psbA-trnH 序列中找到 3 个变异位点,并确定了 4 种 psbA-trnH 单倍型,结合 ITS 和 psbA-trnH 两个序列的分析,确定了 3 种基原甘草的分子鉴定方案。

2.7 其他分子标记在甘草中的应用

分子标记技术种类很多,除了以上常见的分子技术外,也有很多用其他方法对甘草做出了研究和探讨。艾鹏飞等^[49]采用四因素(Taq 酶、Mg²⁺、dNTP、引物)四水平的正交试验设计[L₁₆(4⁴)]对甘草进行 SRAP-PCR 试验,电泳结果采用软件 SPSS 分析,退火温度和引物筛选采用单因子试验,优化了 SRAP-PCR,反应体系为进行甘草资源遗传分析提供了技术支持。宋凤等^[50]采用 SCoT、EST-SSR 分子标记对甘草属 8 个自然居群的 14 个 4 种 1 变种个体进行基因组 DNA 的多态性检测,结果表明,SCoT 和 EST-SSR 两种标记均可揭示甘草属种间与种内的遗传多样性水平以及亲缘关系,是进行甘草属植物自然群体的遗传结构、种间基因渐渗等研究的有效分子标记。其中,SCoT 标记多态性高,信息量大,更适于甘草属植物种质资源的遗传多样性分析,个体间遗传差异检测上 EST-SSR 标记效果更佳,更利于疑难种鉴定及亲本分析。沈湛云等^[51]采用 RT-PCR 技术,扩增出甘草 bAS 编码区序列,运用 DNAMAN 分

析软件找出此序列的 SNP 位点, 分析了甘草 β -香树脂醇合成酶(β -amyrin synthase, bAS) 编码区 SNP 与甘草酸含量之间的相关性。臧艺玫等^[52]采用 PCR-SS-CP 和测序组合技术检测了 6 个产地甘草的 β -香树脂醇合成酶(β -AS) 基因的 SNP, 探索了甘草道地性形成的分子机制, 结果证明了甘草 β -AS 基因 94 位点的 SNP 可能是导致甘草道地性形成的机制之一。

3 展望

由于甘草作为大宗药材之一, 应用广泛, 需求量很大, 人们大量无节制采挖导致野生甘草资源遭到严重破坏, 人工甘草将成为野生甘草的重要替代资源, 导致各地方甘草的种植非常混杂, 种源信息不明, 影响着甘草的质量评价^[53]。近年来, 分子标记技术对甘草的道地性研究、品种鉴定、遗传多态性分析等方面的研究层出不穷, 为甘草基因上的研究做出了很大的贡献^[54]。但在利用此技术研究甘草时会有两个问题, 一是分子技术的重现性和稳定性; 二是实验样品的理想性, 即甘草样品收集时会出现种源信息不准确, 这些问题严重影响着实验分析结果和结论。为了得到全面准确的结果, 已有研究者通过多种方法同时对同一种中药材进行研究^[55-56]。目前, 对甘草的分子标记的引物设计及其反应条件都在不断地改善^[33, 53], 不管是研究样品资源的收集还是技术的改进都具有进一步的发展价值。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86.
- [2] 滕佳林. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:203-204.
- [3] 张利. 甘草的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究,2014,6(10):147-148.
- [4] 于辉,李春香,宫凌涛,等. 甘草的药理作用概述[J]. 现代生物医学进展,2006,6(4):77-79.
- [5] 韩瑶璐,王彬,王政雨,等. 甘草酸药理作用的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(21):2499-2505.
- [6] 高雪岩,王文全,魏胜利,等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,34(21):2695.
- [7] LI S, ZHU J H, CAO L P, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line[J]. Neurol Sci,2014,35(7):1115-1120.
- [8] FENG Y C, WANG K C, CHIANG L C, et al. Water extract of licorice had anti viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines[J]. J Ethnopharmacol,2013,148(2):466-473.
- [9] WU T Y, KHOR T O, SAW C L, et al. Anti-inflammatory/anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by nonpolar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*[J]. AAPS J,2011,13(1):1-13.
- [10] ABE K, IKEDA T, WAKE K, et al. Glycyrrhizin prevents of lipopolysaccharide /D-galacto-samine-induced liver injury through down-regulation of matrix metalloproteinase-9 in mice[J]. JPP,2010,60(1):91-97.
- [11] 杨瑞,李文东,袁伯川,等. 3种不同基原甘草中 18 α -甘草酸及 18 β -甘草酸的含量分析[J]. 药物分析杂志,2016,36(6):1065-1071.
- [12] 杨瑞,李文东,马永生,等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价[J]. 药学学报,2017,52(2):318-326.
- [13] 周姗,袁伯川,杨瑞,等. HPLC 法分析 12 产地甘草中 4 种主要黄酮类化合物的含量[J]. 中华中医药学刊,2017,35(8):1943-1947.
- [14] 马永生,杨瑞,袁伯川,等. 12 产地甘草中 18 α -甘草酸及 18 β -甘草酸的含量分析[J]. 生物技术通讯,2016,27(4):520-524.
- [15] 罗琳,张豆豆,李文斌,等. 不同产地栽培甘草药用部位性状和质量的比较分析[J]. 中药材,2018,41(4):829-833.
- [16] 尚晓娜,宋平顺,杨锡,等. HPLC 梯度波长法同时测定甘肃省不同产地甘草中 6 种成分含量及主成分分析研究[J]. 中国现代中药,2012,14(9):27-31.
- [17] 吴则东,江伟,马龙彪. 分子标记技术在农作物品种鉴定上的研究进展及未来展望[J]. 中国农学通报,2015,31(33):172-176.
- [18] 王艳,李文滨. 2014 年大豆分子标记的研究进展[J]. 大豆科学,2015,34(5):1066-1072.
- [19] 时圣明,潘明佳,王浩,等. 分子鉴定技术在中药中的应用[J]. 中草药,2016,47(17):3121-3126.
- [20] 肖江涛,苗苗,高坤,等. 中国大豆疫霉菌群体遗传结构的 RFLP 分析[J]. 中国农业科学,2011,44(20):4190-4198.
- [21] 崔鸿宾,李佩琼. 中国植物志:第 42 卷第二分册[M]. 北京:科学出版社,1998:169-174.
- [22] 崔淑芬,林焕冰, Lee F S C, et al. 微乳薄层色谱法鉴别甘草的研究[J]. 中草药,2007,38(4):540-542.
- [23] 阿依古丽·塔西,周群,董晓鸥,等. 甘草真伪品的 FTIR 光谱法鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(7):1238-1241.
- [24] 杨天鸣,张璐,付海燕,等. 不同产地甘草的近红外指纹图谱模式识别鉴别方法[J]. 亚太传统医药,2015,11(14):11-14.

- [25] 孙长坡,常晓波,伍松陵,等. 利用 PCR-RFLP 方法鉴别黄曲霉毒素产毒菌株[J]. 中国农业科学,2014,47(18):3675-3683.
- [26] 谷俊,陈文新. 中国北方地区甘草根瘤菌表型及遗传多样性研究[J]. 中国农业科学,2006,39(7):1321-1327.
- [27] 王鸣刚,葛运生,陈亮,等. 甘草亲缘关系的 RAPD 鉴定[J]. 武汉植物学研究,2004,22(4):289-293.
- [28] 吴霞,刘庆华,马永红,等. 新疆产甘草 6 个不同地理群体遗传关系的 RAPD 分析[J]. 中国生化药物杂志,2003,24(4):191-193.
- [29] 陆嘉惠,李学禹,马森,等. 国产甘草属植物的 RAPD 分析及其分类学研究[J]. 西北植物学报,2006,26(3):0527-0531.
- [30] 张增福,董建力,李明. 甘草 RAPD-PCR 反应体系正交优化研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(29):17788-17789.
- [31] 周成明,许彬,张金屯,等. 乌拉尔甘草优良品系选育研究(I)—4 个来源甘草遗传基础的 AFLP 分析[J]. 中草药,2008,38(7):1078-1081.
- [32] 葛淑俊,李广敏,马峙英,等. 甘草野生种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学,2009,42(1):47-54.
- [33] 杨全,魏胜利,王文全,等. 应用 cDNA-AFLP 研究甘草不同变异类型特异表达的基因[J]. 中国中药杂志,2009,34(13):1628-1631.
- [34] BACHEM C W B, HOEVEN R S, BRUIJN S M D, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant J, 1996, 9(5):745.
- [35] SKINNER D M, BEATTIE W G, BLATTNER F R, et al. The repeat sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (-T-A-G-G-) n(-A-T-C-C-) n [J]. Biochemistry, 1974, 13(19):3930-3937.
- [36] BARRENECHE T, BODENES C, LEXER C, et al. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97(7):1090-1130.
- [37] SMULDERS M J M, SCHOOT J V D, ARENS P, et al. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*populus nigra* L.) [J]. Mol Ecol Notes, 2011, 1(3):188-190.
- [38] TAUTZ D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16):6463-6471.
- [39] ANTONI RAFALSKI J, TINGEY S V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellite and machines [J]. Trends in Genetics, 1993, 9(8):275-280.
- [40] 刘越,黄怡鹤,孙洪波,等. 乌拉尔甘草 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(3):398-401.
- [41] 李晓岚,陆嘉惠,谢良碧,等. 4 种甘草属植物 EST-SSR 引物开发及其亲缘关系分析[J]. 西北植物学报,2015,35(3):480-485.
- [42] 刘亚令,宋美玲,侯俊玲,等. 药用甘草 SSR-PCR 反应体系的优化与引物筛选[J]. 时珍国医国药,2017,28(3):740-744.
- [43] 孙群,佟汉文,吴波,等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(1):56-63.
- [44] 李贝宁,南博,刘春生,等. 道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):90-93.
- [45] 刘春生. 甘草的 ITS 序列及特异性 PCR 引物的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2001.
- [46] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:171.
- [47] 赵月梅,侯香莲. 易混伪品刺果甘草与甘草、苦参和黄芪原植物的 ITS2 序列鉴定[J]. 陕西农业科学,2013,59(5):38-40.
- [48] 杨瑞,李文东,马永生,等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价[J]. 药学学报,2017,52(2):318-326.
- [49] 艾鹏飞,苏姗,靳占忠. 甘草 SRAP-PCR 正交试验设计优化及引物筛选[J]. 河北工业科技,2017,34(7):7-11.
- [50] 宋凤,陆嘉惠,韩春,等. SCoT 与 EST-SSR 标记检测甘草属(*Glycyrrhiza* L.) 植物遗传多样性的比较研究[J]. 石河子大学学报,2017,35(2):213-219.
- [51] 沈湛云,刘春生,王学勇,等. 甘草 β -香树脂醇合成酶编码区 SNP 与甘草酸含量的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2014,35(7):813-816.
- [52] 臧艺玫,李妍芄,乔晶,等. 基于 β -香树脂醇合成酶基因 SNP 的甘草道地性机制研究进展[J]. 分子植物育种,2005,3(2):255-260.
- [53] 刘洋洋,刘春生,曾斌芳,等. 甘草种质资源研究进展[J]. 中草药,2013,44(27):3593-3598.
- [54] 肖小河,陈士林,黄璐琦,等. 中国道地药材研究 20 年概论[J]. 中国中药杂志,2009,34(5):519-526.
- [55] 魏晓雨,田义新,赵智灵,等. 不同产地西洋参种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 中草药,2014,45(21):3153-3158.
- [56] 陈振东,郑涛,林秀香,等. 利用 RAPD、ISSR 分子标记分析野牡丹属亲缘关系[J]. 热带作物学报,2016,37(9):1725-1731.