

快速筛选高纯合度天麻PCR-RFLP鉴定方法

谢莹¹, 华中一², 赵玉洋², 周骏辉², 李晓琳², 袁媛^{2*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立一种快速筛选高纯合度天麻种质材料的方法,为其纯系育种和杂交育种奠定基础。**方法:**以本课题组前期天麻全基因组测序和群体重测序为基础,利用单核苷酸多态性(SNP)位点开发20个限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)标记,并采用聚合酶链式反应(PCR)-RFLP法对15份天麻种质的20个RFLP标记进行限制性内切酶实验,根据20个RFLP标记位点酶切条带数目,计算15份天麻种质的纯合度,进而对天麻种质纯合度进行评估;在此基础上,利用基因组重测序技术对评估结果进行验证。**结果:**利用PCR-RFLP法筛选获得10份纯合度>95%的种质材料,其中3份种质材料的纯合度为95%,7份种质材料的纯合度为100%;利用基因组重测序法筛选获得9份纯合度>95%的种质材料,其中8份种质材料与PCR-RFLP法检测结果一致。**结论:**该文所建立的用于筛选高纯合度天麻种质的PCR-RFLP法精确度为80%,准确率为89%。该方法实验操作简便、检测效率高,且成本显著低于基因组重测序技术,为天麻纯系育种提供了技术支撑,也为其他中药材品种选育研究提供了借鉴。

[关键词] 天麻; 单核苷酸多态性(SNP)位点; 限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)标记; 纯合度

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0113-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221212

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220714.1911.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-15 12:24

Rapid Screening of *Gastrodia elata* with High Purity by PCR-RFLP Identification

XIE Ying¹, HUA Zhongyi², ZHAO Yuyang², ZHOU Junhui², LI Xiaolin², YUAN Yuan^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-Di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid screening method for germplasm materials of *Gastrodia elata* with high purity, and lay a foundation for pure line breeding and cross breeding. **Method:** Based on the whole genome sequencing and population resequencing of *G. elata*, 20 restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers were developed by single nucleotide polymorphism (SNP) sites. The polymerase chain reaction (PCR)-RFLP method was used to carry out restriction endonuclease experiments on 20 RFLP markers of 15 *G. elata* germplasms. According to the number of enzymatic bands at 20 RFLP marker sites, the purity of 15 germplasms was calculated and evaluated. On this basis, genome resequencing technology was used to verify the assessment results. **Result:** Ten germplasm materials with purity greater than 95% were screened out by PCR-RFLP method, 3 of which had 95% purity and 7 had 100% purity. Nine germplasm materials with purity greater

[收稿日期] 2022-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目(81891013, 81891010); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A041//CI2021B014); 国家科技性基础资源调查专项(2018FY100800); 中央本级重大增减支项目(2060302); 青年岐黄学者项目; 东城区优秀人才培养项目(2021-dchrcpyzz-7)

[第一作者] 谢莹, 在读硕士, 从事中药资源与鉴定学研究, E-mail: xy08032021@163.com

[通信作者] *袁媛, 研究员, 博士生导师, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com

than 95% were screened out by genome resequencing methods, and 8 of them were consistent with the results of PCR-RFLP. **Conclusion:** The PCR-RFLP method established in this study for screening *G. elata* germplasms with high purity precision of RFLP markers has 80% precision and 89% accuracy. The method is simple, efficient, and significantly less expensive than genome resequencing method, which provides technical support for pure line breeding of *G. elata* and references for breeding of other Chinese medicinal materials.

[Keywords] *Gastrodia elata*; single nucleotide polymorphism (SNP) sites; restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers; purity

天麻^[1],性甘、平,归肝经,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效^[2-3]。现代研究表明,天麻具有镇静催眠、镇痛、抗炎、抗眩晕、抗惊厥、防止衰老等作用^[4-5]。2019年天麻被列入“按照传统既是食品又是中药材的物质”管理的试点品种^[6],可制成天麻酒、天麻鲜湿面条、天麻豆渣蛋糕、天麻片等保健膳食^[7]。随着国内外对天麻的需求量日益增长,野生天麻已不能满足市场需求,因此目前市售天麻以人工栽培为主,然而天麻以无性繁殖为主,经人工多年栽培后,种质退化现象严重,严重制约了天麻产业进一步发展^[8]。杂交育种是防治种质退化应用最广泛的手段之一^[9-10]。杂交育种是指通过将亲本双方的优良性状集中到杂交后代中使其相较于亲本更具优势的育种方法。其中,选择合适的亲本是利用杂交育种获得优良新品种的前提,而遗传稳定性是评价亲本的重要指标^[11]。尽管目前天麻杂交育种已较为普遍,但仍缺乏可稳定遗传的天麻纯系品种作为亲本,导致天麻繁育后代遗传特性不稳定^[12]。

获得纯系品种的方法主要包括单倍体育种、纯系育种等^[13-14],其中单倍体育种是利用植物组织培养技术诱导产生单倍体植株,再通过某种手段使染色体组加倍(如用秋水仙素处理),从而使植物恢复正常染色体数;而纯系育种是从现有群体中选择具有优良性状的种质材料^[15],通过后代鉴定,保纯繁育,育成新品种^[16]。目前,天麻组织培养技术存在生长慢、成活率低等问题^[17],尚无法满足单倍体育种的要求。另一方面,天麻现有栽培群体的遗传多样性较丰富^[18-19],这使得从栽培种质材料中筛选纯合度高的种质进行纯系育种,进而获得纯系品种作为杂交育种亲本具有可行性^[20]。通过从栽培群体中高效、便捷筛选出高纯合度种质材料,将有利于加速中药材纯系育种的进程。因此,急需寻找一种低廉、快速、能够有效评估天麻纯合度的方法。

本研究基于天麻群体重测序数据筛选获得的单核苷酸多态性(SNP)位点开发了20个可用于天

麻纯合度评估的限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)标记,并建立了一种快速筛选高纯合度天麻种质材料的方法。同时使用聚合酶链式反应(PCR)-RFLP法和基因组重测序对15份天麻种质的纯合度进行评估,结果表明本研究建立的PCR-RFLP法可准确获得种质材料的纯合度。与基因组重测序技术相比,PCR-RFLP法实验操作简便、检测效率高,且可有效降低90%的检测成本^[21],解决了高纯合度天麻大规模筛选的技术瓶颈。该方法为天麻纯系育种和杂交育种奠定了基础,对其他中药材品种选育也具有借鉴意义。

1 材料

1.1 植物样品 天麻种质材料分别收集自贵州大方(1批)、云南昭通(4批)、湖北英山(5批)和湖北宜昌(5批)4个天麻主产区^[22],由金艳副研究员鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎,材料保存于中国中医科学院中药资源中心。

1.2 试剂 Hi-DNAsecure Plant Kit 高效植物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号W9907], 2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix(北京聚合美生物科技有限公司,批号21KB0808), 6×loading buffer、2000 bp DNA Marker(大连Takara公司,批号分别为P30925、P51018); Xho I 酶、EcoR I 酶、Hind III 酶、Xba I 酶、Sal I 酶、rCutSmart Buffer(美国New England Biolabs公司,批号分别为10020678、10107912、10079084、10116146、10116250、10118973), SYBR Safe DNA 凝胶染料(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号2399638A), 琼脂粉(西班牙Biowest公司,批号111860)。

1.3 仪器 Veriti™ 型PCR仪(美国Applied Biosystem公司), PowerPac™ 型电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司); HE99X-15-1.5 型电泳槽(美国Hoefler公司); Nanodrop 2000 型微量核酸定量分析仪(美国Thermo Scientific公司)。

2 方法

2.1 RFLP标记筛选 基于本课题组前期已获得天麻基因组和151个天麻种质材料重测序数据,使用Genome Analysis Toolkit进行SNP检测并筛去具有以下任一情况的SNP位点:①SNP位于插入/缺失变异上下游5 bp以内;②缺失率>30%;③最小等位基因频率<5%。在获得14、267、316个SNP位点的基础上,计算151个天麻种质的纯合度和各SNP位点的纯合度。对于种质纯合度,利用plink软件的“--het”功能计算每个种质材料的总位点数和纯合位点数,以纯合位点数/总位点数×100%作为种质材料的纯合度。对SNP位点纯合度,利用plink软件的“--hardy”功能计算每个位点纯合样本数,以纯合样本数/总样本数×100%作为SNP位点的纯合度。以1%为步长,5%为区间长度,将不同杂合度的SNP位点进行分组,使用自编脚本从每组中每次随机抽取20个SNP位点评估每个种质材料的纯合度,并与使用每个种质材料全部SNP位点计算的纯合度比较,计算在每5%区间鉴定结果一致的样本比例,上述过程使用bootstrap法自助抽样1 000次。使用自编脚本,利用Biopython包中的Restriction模块检测SNP位点和其侧翼序列是否存在限制性内切酶识别位点。若SNP位点处于限制性内切酶识别位点且其侧翼序列不包含相应的限制性内切酶识别位点,则该SNP位点可用作RFLP标记。本研究检测了EcoR I、Hind III、Xba I、Xho I、Sal I等限制性内切酶的识别位点。

2.2 基因组DNA提取 取鲜天麻样品,粉碎后,取粉末10 mg,利用Hi-DNAsecure Plant Kit高效植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。用Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪测定其DNA浓度,并根据吸光度 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 判断DNA质量。

2.3 PCR扩增 使用特异性引物对样品DNA进行PCR扩增。PCR反应体系25 μL ,其中包含2×M5 Supper FastTaq PCR MasterMix 13 μL ,正向引物1 μL ,反向引物1 μL ,DNA模板1 μL ,加无菌水补足至25 μL ,反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,35个循环;产物末端72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。PCR反应结束后,取反应产物5 μL ,加入6×Loading Buffer 1 μL ,混匀后于核酸染料染色的2.0%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察、成像。

2.4 PCR产物酶切 取PCR产物进行RFLP分析,

酶切反应体系为25 μL ,包含10×Buffer 2.5 μL ,PCR产物15 μL ,限制性内切酶(10 U· μL^{-1}) 0.5 μL ,ddH₂O 7 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应120 min。取酶切产物5 μL ,加入6×Loading Buffer 1 μL ,混匀后于核酸染料染色的2.0%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观测、成像。

2.5 基因组重测序 对提取的基因组DNA,使用Covaris随机打断成350~500 bp的DNA小片段,回收500 bp左右的DNA片段进行文库构建,文库构建合格后采用DNBSEQ-T7测序平台对插入片段进行双末端测序。获得的原始测序数据经fastp软件质控和过滤后,以天麻基因组(登录号GWHBHOU00000000,保存于国家基因组科学数据中心<https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh>)为参考基因组,利用BWA软件进行比对。进一步利用samtools软件对比对结果进行重复序列标记、排序,然后利用GATK软件中的HaplotypeCaller和GenotypeGVCFs程序分别检测SNP和基因型,使用bcftools对获得的SNP位点进行质控。

2.6 天麻种质纯合度评估 对于PCR-RFLP法,使用如下公式计算纯合度 $H=(1-n/m)\times 100\%$;H代表纯合度,n代表凝胶成像中出现3条带的RFLP位点数,m代表总RFLP位点数。

对于基因组重测序法,基于获得的SNP和基因型信息,使用plink软件的“--het”功能计算每个种质材料的总位点数和纯合位点数,以纯合位点数/总位点数×100%作为种质材料的纯合度。

3 结果

3.1 RFLP标记筛选 利用重测序数据分析表明,使用杂合度7%~12%的SNP位点评估天麻种质材料纯合度正确率最高。随机挑选20个杂合度为7%~12%的SNP位点对天麻种质材料纯合度进行鉴定,鉴定准确率为100%。在上述SNP位点两侧序列中查找酶切位点EcoR I、Hind III、Sal I、Xba I、Xho I,发现37个具有酶切位点的SNP,可开发为RFLP标记。其中具有EcoR I标记11个,Hind III标记3个,Sal I酶标记1个,Xba I酶标记4个,Xho I标记1个,见表1。

3.2 RFLP标记检测 PCR-RFLP检测结果可能出现1条带、2条带、3条带的情况,其中1条带和2条带代表种质材料在该标记位点是纯合的;3条带则代表种质材料在该标记位点是杂合的。使用上述筛选出20个RFLP标记位点对15份天麻种质材料进行DNA提取、特异性引物扩增及限制性内切酶酶

表1 20个RFLP标记的引物及其产物长度

Table 1 20 of RFLP-labeled primers and their product lengths

No.	上游 5'-3'	下游 5'-3'	限制性内切酶	产物长度/bp	酶切产物长度/bp
E1	CTGCCAGCTACTAAGTGCCA	TCCGTCGCGTGTAAGTATGATC	<i>EcoR</i> I	710	438 272
E2	ATCCCGTCGCCAAAAGAGTT	CCAGCAGCACCAGGTCTAAA	<i>EcoR</i> I	584	392 192
E3	GAACCTTCTGCGCCAAAAGG	GGGGAGTTTGTAACGACCCA	<i>EcoR</i> I	590	359 231
E4	TTTCTTTTGAACCGGCGTGC	TATTCTCAGGCCGTTGGGT	<i>EcoR</i> I	573	408 165
E5	AAGAGCTCTGATTGCCAGT	GCCAAAATGACCAAAATACCCC	<i>EcoR</i> I	416	245 171
E6	ATGCTGGTTAGGAGGCAACC	TCCTTGACCTTATCCCCACCT	<i>EcoR</i> I	494	312 182
E7	CCTAGTCATCCAAACATAGGCA	GGCCAACAGGTGACAAAACC	<i>EcoR</i> I	458	279 179
E8	TGAGAGAACCAGTGATGTCA	TGGCAGCAATTTGATTCTCAA	<i>EcoR</i> I	466	346 120
E9	TTGCTTGGTGCTTGGTGGA	GATCGAGCCTAGCTTGGGAT	<i>EcoR</i> I	400	260 140
E10	ACCATGTGATGAAGCAAATGCA	CGAGCATTGCCACACCTTTT	<i>EcoR</i> I	514	328 156
E11	GGATTGCCTCCCAACTAATGC	CACCTCAAGTGCATCTACCTCA	<i>EcoR</i> I	522	329 193
H1	ACATGCCTCCTCCTAGTGGT	GGGCTGTTGCTGCTTTTAGT	<i>Hind</i> III	501	306 195
H2	ATCCTAAGCATGGTGGGACC	ACCCACATGGAAGGCTTCAA	<i>Hind</i> III	653	460 193
H3	GCCCGAGACCAATACTCACA	ACTTCCACTTGTCCGCTTGT	<i>Hind</i> III	536	133 403
S1	TCAAACGAGCTGAAGAGGCA	TCGTGAGATTGGGTTGTAAGCT	<i>Sal</i> I	564	387 177
X1	GATTCGAGATTCCGCGGGAT	GAGGCCGATAAGCGAAGGAA	<i>Xba</i> I	649	349 300
X2	GGTTGGATTAGTGTGAGTGA	GGGCTTTAAGATGCTAAACCCT	<i>Xba</i> I	585	297 288
X3	CAAACGAGACTCTCCCTC	ATTCTGGGTGCTACGAGCG	<i>Xba</i> I	531	309 222
X4	TGTGTAGTGACATTCAGGGT	TCAATTTGGACTCCATTTGGCT	<i>Xba</i> I	547	310 237
X5	AATCGAACCCGGGTCTGTAC	TACGAGAAGGTTCTCGGA	<i>Xho</i> I	530	343 187

切反应。

由图1可知,种质1、3、4、5、7、8、12的20个标记位点均只出现1条带或2条带的情况。种质2在标记位点H1出现3条带;种质6在标记位点E2、E6、E10、X5出现3条带;种质9在标记位点X5出现3条带;种质10在标记位点E2、H1、X5出现3条带;种质11在标记位点H1出现3条带;种质13、14在标记位点E3、E6、E7出现3条带;种质15在标记位点E2、E3、X5出现3条带;在除上述位点外,各种质在其他位点均只出现1条带或2条带的情况。

3.3 天麻种质纯合度评估 PCR-RFLP法评估结果表明,15份天麻种质纯合度分布在80%~100%,其中10份种质纯合度>95%,分别是种质1、2、3、4、5、7、8、9、11、12;4份种质纯合度为85%,分别是种质10、13、14、15;而种质6纯合度为80%。

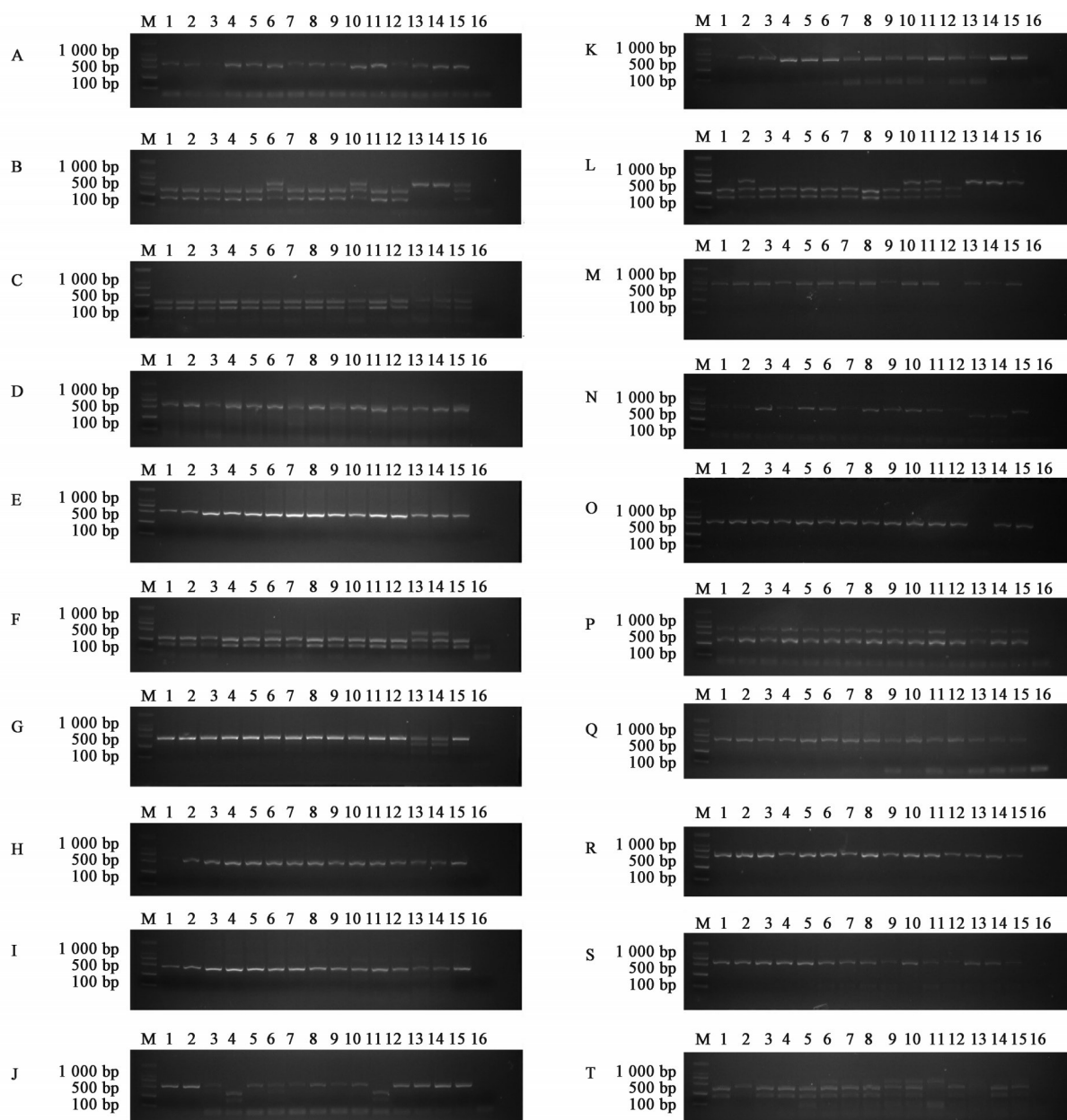
基因组重测序法评估结果表明,15份天麻种质的纯合度分布在68%~99%,其中9份种质纯合度大于95%,分别是种质1、2、3、4、6、7、8、9、12;5份种质的纯合度为70%~80%,分别是种质10、11、13、14、15;而种质5的纯合度为68%。两种评估方法结果

中纯合度均>95%的天麻种质共8份,包括种质1、2、3、4、7、8、9、12。见表2。

4 讨论

本研究开发了20个可用于天麻纯合度评估的RFLP标记,并从15份天麻种质材料中筛选获得10份高纯合度种质材料(纯合度≥95%)。以基因组重测序为对照,所建立的天麻种质纯合度RFLP标记法精确度为80%,准确率为88.9%,具有较高的可靠性。在实际应用中,可以将RFLP标记法与基因组重测序结合使用。首先使用低成本的RFLP分析从大量样品中初步筛选高纯合度的种质材料,再对初筛获得的种质材料进一步重测序,进行精确评估,最终获得可用于纯系育种的材料。

近30年来,中药材育种已取得长足的进步,截至2019年,已选育出537个新品种^[23]。但与农作物相比,中药材育种还停留较初级的研究阶段。种质资源研究是中药材育种的基础,其数量和质量决定了中药的育种水平^[24]。其中遗传背景混杂是目前中药育种亟需突破的关键瓶颈^[25-26]。与基因组重测序法相比,本研究建立的快速筛选高纯合度天麻的



注: A~K. 标记位点 E1~E11; L~N. 标记位点 H1~H3; O. 标记位点 S1; P~T. 标记位点 X1~X5; 1~15. 15份不同天麻种质; 16. 空白(ddH₂O为模板); M. DL 2000 Marker

图1 不同引物酶切结果

Fig. 1 Digestion results of different primers

表2 15份天麻种质的纯合度

Table 2 Heterozygous rate of 15 *Gastrodia elata* samples

编号	产地	RFLP评估/%	基因组重测序评估/%	编号	产地	RFLP评估/%	基因组重测序评估/%
1	湖北宜昌	100	97	9	贵州大方	95	98
2	湖北宜昌	95	97	10	贵州大方	85	78
3	湖北宜昌	100	98	11	贵州大方	95	75
4	云南昭通	100	98	12	贵州大方	100	96
5	云南昭通	100	68	13	湖北英山	85	76
6	云南昭通	80	99	14	湖北宜昌	85	75
7	云南昭通	100	99	15	湖北宜昌	85	79
8	云南昭通	100	99				

分子鉴定方法,具有经济性好、检测快速的特点,能够快速筛选高纯度天麻,对天麻纯系育种研究具有重要意义。该方法也对开发其他中药材高纯度种质资源筛选方法,获得遗传稳定育种材料具有重要的借鉴意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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,2020:59-60.

[2] 柳威,邓林华,祁东利,等. 天麻及其有效成分的药理作用概述[J]. 中药药理与临床,2021,37(4):12,240-244.

[3] 李仰华,南铁贵,钱润,等. 菌材物种调查及其与天麻产量和质量相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(19):29-34.

[4] 许廷生,陆龙存,黄子冬. 天麻有效成分的药理作用分析与临床应用研究进展[J]. 中医临床研究,2020,12(21):3.

[5] 刘天睿,李仰华,韩鹏杰,等. 一种大豆秸秆蜜环菌培养基及其生产条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(15):100-106.

[6] 岳世彦,周荣荣,南铁贵,等. 粉葛与葛根中主要化学成分的含量比较[J]. 中国中药杂志,2022,47(10):2689-2697.

[7] 单锋,周良云,蒋长顺,等. 天麻的食用历史及发展建议[J]. 中国食品药品监管,2021(3):110-115.

[8] 江曙,段金廛,陶金华,等. 天麻退化机制及其防治技术体系的研究思路与方法[J]. 中草药,2011,42(1):201-204.

[9] 梁彤. 天麻优良杂交组合筛选及繁育技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2020.

[10] WANG H, WANG Y, ZHAO H. How to accelerate the process of plant genetic modification[J]. J Hebei Agric Sci,2013,7:50-56.

[11] 孙文忠. 有性杂交育种亲本选配的原则[J]. 麦类文摘. 种业导报,2006(4):45.

[12] 王少柏,周铨. 天麻杂交种的优势[J]. 云南植物研究,1997,19(4):380-380.

[13] 孙莹莹,罗睿,杜禹珊,等. 药用植物杂交育种技术研究进展[J]. 中药材,2016,39(2):442-446.

[14] MICHEL S, AMETZ C, GUNGOR H, et al. Genomic assisted selection for enhancing line breeding: Merging genomic and phenotypic selection in winter wheat breeding programs with preliminary yield trials [J]. Theor Appl Genet,2017,130(2):363-376.

[15] 钱润,李慧,华中一,等. 栽培天麻农艺性状的数量分类学研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(13):3085-3090.

[16] ZHENG Z, WANG H B, CHEN G D, et al. A procedure allowing up to eight generations of wheat and nine generations of barley per annum [J]. Euphytica,2013,191:311-316.

[17] LI H, SINGH R P, BRAUN H, et al. Doubled haploids versus conventional breeding in CIMMYT wheat breeding programs[J]. Crop Sci,2013,53:74-83.

[18] 王齐,周天华,王佳,等. 镇巴天麻的遗传多样性与SSR指纹图谱分析[J]. 分子植物育种,2022,doi:46.1068.S.20210127.1645.010.

[19] 丁家玺. 天麻种质资源的DNA指纹图谱研究[D]. 西安:陕西理工大学,2019.

[20] 余文霞,雷胄熙,袁媛,等. 铁皮石斛种质资源DNA身份证的构建及遗传相似性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):16-21.

[21] WETTERSTRAND K A. DNA sequencing costs: Data from the NHGRI genome sequencing program (GSP) Available[EB/OL]. (2022-03-27)[2022-05-30]. <http://www.genome.gov/sequencingcostsdata>.

[22] 李慧,钱润,田娜,等. 红天麻、乌天麻及其杂交天麻的PCR鉴别[J]. 中国中药杂志,2020,45(15):3666-3671.

[23] 黄璐琦,肖培根,王永光. 中药资源持续发展的研究核心与关键——分子生药学与中药资源生态学[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):233.

[24] 黄璐琦,赵润怀. 中国中药材种业发展报告[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[25] 许玲,何秋伶,梁宗锁. 药用植物育种现状、存在的问题及对策[J]. 科技通报,2021,37(8):1-7.

[26] 焦连魁,李向东,王继永,等. 甘草等6种重点中药材新品种选育及推广情况分析[J]. 中国现代中药,2021,23(8):1463-1475.

[责任编辑 顾雪竹]