

贝母属药用贝母总 DNA 提取方法的比较研究

詹羽姣¹, 盛萍^{1,2*}, 张鹏葛¹, 安露莎¹, 张焯¹(1.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 比较筛选最适于贝母属药用贝母的总 DNA 提取方法。方法 利用试剂盒法、改良的 CTAB 法、改良的 SDS 法提取贝母属药用贝母的总 DNA; 通过核酸蛋白检测仪及琼脂糖凝胶电泳方法检测其浓度和纯度; 进行 ISSR-PCR 扩增检测所得总 DNA 质量。结果 3 种方法均可提取出产量较高的基因组 DNA, 但试剂盒法相较提取的总 DNA 纯度最高, 质量最好, 并且均能扩增出丰富清晰的条带, 稳定性高, 操作简单耗时短。改良的 CTAB 法、SDS 法提取的总 DNA 纯度、质量均次于试剂盒法, 操作复杂耗时长, 不适用于下游的分子生物学实验。结论 试剂盒法为贝母属药用贝母总 DNA 提取的最佳方法, 其所得样品适用于 PCR 及其他分子生物学研究。

关键词: 贝母属; 总 DNA 提取; ISSR

中图分类号: R285.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0915-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.003

Comparative Research on Genomic DNA Extraction Methods from Medicinal *Fritillaria* L.

ZHAN Yujiao¹, SHENG Ping^{1,2*}, ZHANG Pengge¹, AN Lusha¹, ZHANG Xuan¹(1.School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To choose the most suitable extraction method of total DNA in medicinal *Fritillaria* L.. **METHODS** Using the kit method, modified CTAB method, modified SDS method total DNA of *Fritillaria* L. were extracted; the potency and purity of the total DNA were detected by nucleic acid protein detector and agarose gel electrophoresis method; ISSR-PCR amplification detection obtained DNA quality. **RESULTS** Higher yield of genomic DNA can be extracted from the plant *Fritillaria* L. by 3 kinds of methods. But compared with the total DNA, kit method was the highest, best quality of the extracted, it could amplify the bands rich and clear, and high stability, simple operation and short time. The purity and quality of total DNA extracted by modified CTAB method or SDS method were inferior those by kit method. Moreover, CTAB method or SDS method was complex and time-consuming operation, not for downstream molecular biology experiments. **CONCLUSION** The kit method is the best way to extract total DNA from medicinal plants of *Fritillaria* L., and can be used directly in PCR and other biological research.

KEY WORDS: *Fritillaria* L.; total DNA extraction; ISSR

贝母属(*Fritillaria* L.)为百合科多年生草本植物, 大多数种类鳞茎供药用, 有清热润肺, 止咳祛痰的功效, 早在汉代的《神农本草经》中就有记载, 列为中品。该属全世界约有 130 种, 我国有贝母属植物 61 种, 50 个变种, 5 变型, 其中具药用价值的植物有 20 余种, 主要分布于四川、新疆、甘肃、湖北、安徽、浙江等省^[1-3]。中国药典 2010 年版收载的贝母药材有川贝母、浙贝母、伊贝母、平贝母, 其中伊贝母包括新疆贝母(*Fritillaria walujewii*. Rege.)、伊犁贝母(*F. Pallidif lora* Schrenk)2 种植物的干燥鳞茎^[4]。而实际上, 新疆的其他 6 种[贝母如黄花贝(*F. verticillaea* Willd)、

小花贝母(*F. meleagris* L.)等]的干燥鳞茎也同时作为伊贝母入药使用。

贝母属植物种间性状交叉普遍^[5], 由于自然条件和地形多变, 其某些器官变异尤为突出, 给传统形态分类法带来很大冲击^[6]。目前, 对贝母 DNA 分子研究方面的工作已有报道^[7-10]。而如何有效地提取高质量的植物 DNA 是进行任何分子生物学工作的前提和基础^[11-12]。目前, 用 RAPD、DNA 测序技术鉴定贝母类中药材已有报道^[5-6,13-14], 但对总基因 DNA 的提取方法多使用改良的 CTAB 法和改良的 SDS 法^[8,15-17], 而此 2 种方法对操作技术要求较高, 耗时较长, 不宜于大样本量的提取, 现

基金项目: 国家自然科学基金(81160544)

作者简介: 詹羽姣, 女, 硕士生 Tel: 15022908398
E-mail: 361923756@qq.com

E-mail: 564506995@qq.com

*通信作者: 盛萍, 女, 博士, 教授 Tel: (0991)4362253

今试剂盒法性价比高, 操作简便且耗时短稳定性高, 可大批量提取。因此本实验以贝母属药用贝母为材料, 比较改良的 CTAB 法、改良的 SDS 法和试剂盒法的提取效果, 从各方面综合评价 3 种提取方法, 旨在建立贝母属药用植物总 DNA 有效、高质量的提取方法, 为贝母属药用植物的分子标记研究提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

实验材料于 2012 年 5 月和 6 月从新疆不同产地采集, 随机选取样品植株, 采集幼嫩叶置于硅胶袋中迅速干燥, 然后置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。鳞茎药材粉碎过筛, 备用。试验样品经新疆裕民县贝母试验站站长段咸珍及新疆医科大学盛萍教授鉴定, 凭证标本存放于新疆医科大学中医学院中药资源教研室。其种类、产地及编号见表 1。

表 1 贝母属药用贝母材料种类及来源信息表

Tab. 1 Information of the sources and species of medicinal *Fritillaria* L.

编号	种类	采集地
1	新疆贝母(<i>Fritillaria walujewii</i>) (干燥叶片)	新疆玛纳斯清水河泉水子沟
2	新疆贝母(<i>F. walujewii</i>)(干燥叶片)	新疆乌苏四棵树白杨沟
3	新疆贝母(<i>F. walujewii</i>)(干燥叶片)	新疆新源县那拉提
4	伊犁贝母(<i>F. pallidiflora</i>)(鳞茎粉末)	新疆温泉王志林 4 年生
5	伊犁贝母(<i>F. pallidiflora</i>)(干燥叶片)	新疆伊犁赛里木湖
6	伊犁贝母(<i>F. pallidiflora</i>)(干燥叶片)	新疆巩留县莫乎尔乡
7	黄花贝母(<i>F. verticillata</i>)(干燥叶片)	新疆塔城地区
8	大白花贝母(<i>F. verticillata</i> var. <i>albidoiflora</i>)(干燥叶片)	新疆塔城地区
9	托里贝母(<i>F. tortifolia</i>)(干燥叶片)	新疆塔城地区
10	滩贝母 (<i>F. karelinii</i>) (鳞茎粉末)	新疆塔城地区
11	额敏贝母(<i>F. meleagroides</i>)(干燥叶片)	新疆塔城地区
12	裕民贝母(<i>F. yuminensis</i>)(干燥叶片)	新疆塔城地区
13	川贝母(<i>F. cirrhosa</i> Don.)(鳞茎粉末)	新疆奇康哈博维药股份有限公司
14	平贝母(<i>F. ussurensis</i> Maxim.) (鳞茎粉末)	新疆奇康哈博维药股份有限公司
15	浙贝母(<i>F. thunbergii</i> Miq.)(鳞茎粉末)	新疆奇康哈博维药股份有限公司

1.2 试剂

DP305 Plant Genomic DNA Kit(离心柱型)试剂盒(北京天根, 批号: DP305); 改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取缓冲液(2% CTAB, $1.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl (pH 8.0),

$0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA(pH 8.0)4 mL, 0.2% β -巯基乙醇 0.2 mL, 10% PVP 10 g, 80 mL ddH₂O 溶解, 再定容至 100 mL, 灭菌)、改良的十二烷基硫酸钠(SDS)提取缓冲液(4% SDS 4 g, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL, $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 10 mL, $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 10 mL, 0.5% β -巯基乙醇 0.5 mL (使用前加入), 80 mL ddH₂O 溶解, 再定容至 100 mL, 灭菌), 氯仿、异戊醇等均为分析纯。

1.3 仪器设备

DK-8D 恒温水浴锅(上海实验仪器厂有限公司); K5500 核酸蛋白测定仪(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); Anke TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂); Bio-Rad C1000 PCR 扩增仪(BIO-RAD 美国); WD-9413B 琼脂糖凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)等。

2 方法

2.1 总 DNA 提取方法

2.1.1 天根离心柱型试剂盒法 DNA 提取步骤按其试剂盒提供的方法进行, 将所得溶液收集到离心管中, 至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。为提取效果好, 鳞茎粉末提取时在试剂盒提供的方法步骤三中需加入氯仿 700 μL 、异戊醇 29 μL , 充分混匀, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 重复此操作步骤 1 次。

2.1.2 改良的 CTAB 法 在 1.5 mL EP 管中加入 800 μL $2\times$ CTAB 提取缓冲液(提前已 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热 30 min); 0.1 g 样品叶片加入液氮研磨至极细粉末转至预热的缓冲提取液 EP 管中; 迅速反复颠倒混匀, 于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中恒温 30~45 min, 期间颠倒混匀数次; 取出样液冷却至室温, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 移取上清液至新的 EP 管中; 加入和上清液等体积的三氯甲烷/异戊醇 (24:1), 轻缓颠倒混匀至混合物, 室温下 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清液至另一个干净灭菌的离心管中, 重复此操作步骤 2~3 次, 直至两相液面干净为止; 加入上清液 0.1 倍体积的 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠和 0.6 倍体积预冷的异丙醇, 轻缓颠倒混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30~60 min; $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 得 DNA 沉淀(样品粉末在此步后将 DNA 沉淀, 在室温下用含 $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase 的 ddH₂O 溶解并消化 30 min)。在 DNA 沉淀中加入 200 μL 70%乙醇, 轻弹离心管, 使沉淀溶解。 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3~5 min, 弃上清液, 保

留沉淀；用无水乙醇重复此步骤 1 次；将有 DNA 沉淀的离心管置于室温下干燥；加 100 μL TE 缓冲液溶解；置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.1.3 改良的十二烷基苯磺酸钠法(改良的 SDS 法) 提取方法步骤与改良的 CTAB 法相同，在 1.5 mL EP 管中加入 800 μL 10% SDS 提取缓冲液。

2.2 核酸蛋白测定仪检测浓度

分别取 2 μL 3 种不同方法提取的总 DNA，用核酸蛋白测定仪检测其浓度及纯度。

2.3 电泳检测 DNA 的完整性

取 1 μL 6 \times Loading Buffer 与 300 ng DNA 样品充分混匀点样于含有 0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ep(100 \times)的 0.8% 的琼脂糖凝胶，于 1 \times TBE 溶液中电泳，用凝胶成像系统检测并拍照。

2.4 ISSR-PCR 扩增检测结果

从 74 条引物中筛选出 2 条条带清晰且明亮的引物 UBC844(CTCTCTCTCTCTCTCTC) 和 UBC895 (AgAgTTggTAgCTCTTgATC)(所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成，参照加拿大哥伦比亚大学公布的第 9 套 ISSR 引物序列。)进行 PCR 扩增。以提取的总 DNA 为模板，经优化后确定反应体系为 50 μL : 5 μL 10 \times Buffer、2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 、0.30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物、0.75 U Taq 酶、1.0 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA、33.35 μL ddH₂O。扩增程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s，40 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳，在凝胶成像系统下观察并拍照。

3 结果

3.1 核酸蛋白测定仪检测 DNA 的纯度和浓度结果

由于核酸及其衍生物的紫外吸收高峰在 260 nm，OD₂₆₀ 值为 1，相当于大约 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的双链 DNA，40 $\mu\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的单链 DNA。蛋白质的最

大吸收在 280 nm，多糖的最大吸收在 230 nm。纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.8 左右。当 >1.8，则可能有 RNA 污染；当 <1.8，可能有蛋白质的污染^[12]。3 种方法提取的贝母属 11 种药用植物总 DNA 的纯度(A_{260}/A_{280})及浓度见表 2。由表可见，3 种方法提取的总 DNA 纯度顺序为试剂盒法>改良 SDS 法>改良 CTAB 法；3 种方法提取的总 DNA 浓度顺序为改良 CTAB 法>SDS 法>试剂盒法。

表 2 3 种不同方法提取贝母属药用贝母总 DNA 纯度和浓度比较

Tab. 2 The comparison of total DNA purity and concentration extracted from medicinal *Fritillaria* L. by 3 kinds of different methods

编号	试剂盒法		改良的 CTAB 法		改良的 SDS 法	
	A_{260}/A_{280}	$C/\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	$C/\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	$C/\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
1	1.83	153.8	1.86	2 017.8	1.68	377.4
2	1.83	98.6	1.99	256.2	1.69	301.3
3	1.87	119.6	1.92	461.0	1.75	320.6
4	1.81	131.9	1.65	5019.4	1.70	332.1
5	1.87	101.1	2.09	842.9	1.85	270.6
6	1.85	72.6	1.96	415.4	1.65	348.5
7	1.85	130.3	1.85	1589.3	1.86	163.2
8	1.86	54.7	1.79	932.4	1.44	370.8
9	1.87	152.7	2.03	357.1	1.87	1 552.8
10	1.77	52.2	2.02	254.0	2.01	268.7
11	1.91	62.3	2.17	402.5	2.15	311.4
12	1.88	72.7	1.74	533.9	1.90	193.6
13	1.67	13.6	1.94	458.4	1.92	145.1
14	1.85	26.0	2.04	935.5	1.86	69.8
15	1.66	4.6	2.18	599.6	2.09	93.4

3.2 电泳检测 DNA 的完整性结果

琼脂糖凝胶电泳检测 3 种不同提取方法对提取总 DNA 效果的影响，结果见图 1。结果表明，3 种方法均得到了质量较好、纯度较高的条带，而试剂盒法提取的总 DNA 条带亮度、纯度最高；改良的 CTAB 法、改良的 SDS 法略有弥散、有污染。

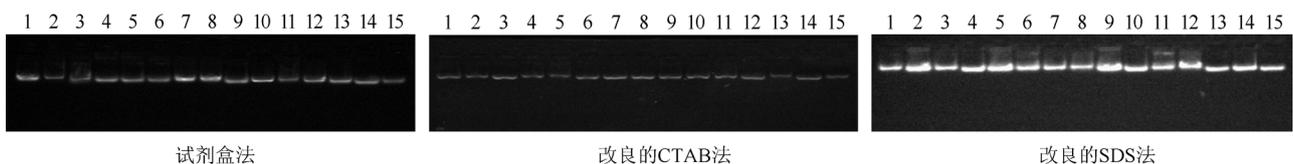


图 1 3 种不同方法提取的贝母属药用贝母 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图
样品编号同表 1。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of medicinal *Fritillaria* L. DNA extraction of 3 kinds of different methods
The sample numbers as in Table 1.

3.3 ISSR-PCR 扩增检测结果

ISSR-PCR 分析不同提取方法对提取基因组 DNA 效果的影响见图 2 和图 3。引物 UBC844 对试剂盒提取的 DNA 扩增结果只有前 1 和 2 号样品的条带较弱；对改良 CTAB 法提取的扩增结果只有 1、2、3、8、9 号样品有条带；对改良 SDS 法提取的 11-15 号样品无扩增条带。引物 UBC895 对试剂盒法提取的总 DNA 扩增结果均有较为丰富且清晰的条带；对改良的 CTAB 法提取的虽可扩

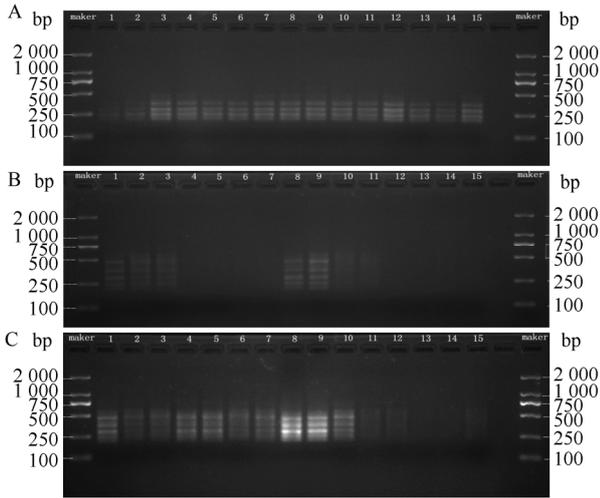


图 2 引物 UBC844 对 3 种方法提取的贝母属药用贝母基因组 DNA 的 ISSR 扩增电泳图谱

A-试剂盒法；B-改良的 CTAB 法；C-改良的 SDS 法；Maker-DL2000 DNA Marker；空白处为阴性对照。

Fig. 2 Amplification results of the UBC844 primers for medicinal *Fritillaria* L. DNA extraction of 3 kinds of different methods

A-kit method; B-improved CTAB method; C-improved SDS method; Marker-DL2000 DNA Marker; The space for the negative control.

表 3 3 种不同提取方法对贝母属药用贝母总 DNA 的提取比较

Tab. 3 The comparison of total DNA's extraction from medicinal *Fritillaria* L. by 3 different methods

提取方法	试剂盒法	改良的 CTAB 法	改良的 SDS 法
$A_{260/280}(\bar{X})$	1.80	1.95	1.83
$C/\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}(\bar{X})$	82.1	1005.0	341.3
ISSR 分析	均可扩增出条带，且丰富明亮清晰	均可扩增出条带，部分清晰明亮	均可扩增出条带，清晰明亮，但不稳定
DNA 纯度	纯度高，无降解	纯度较高	纯度较高
操作时间	省时，1.5 h 左右	费时，6 h 左右	费时，6 h 左右
稳定程度	稳定度较好	稳定度较低	稳定度较低
成本高低	较其他两种高，但可接受，性价比高	低	低
复杂程度	操作简单，对实验人员要求较低	操作繁琐，要求较高	操作繁琐，要求较高
环保方面	环保	气味大，不环保	气味大，不环保

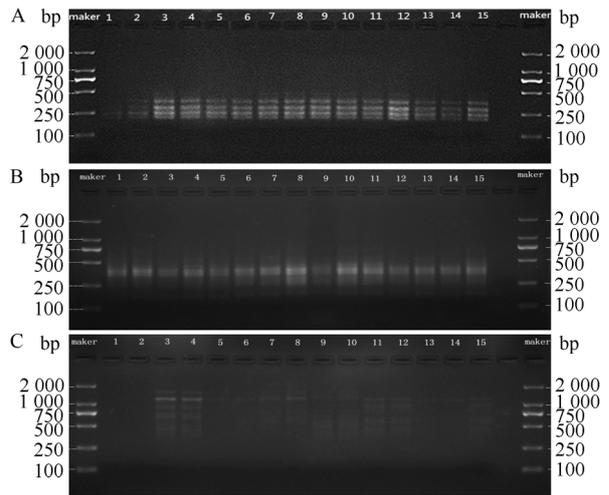


图 3 引物 UBC895 对 3 种方法提取的贝母属药用贝母基因组 DNA 的 ISSR 扩增电泳图谱

A-试剂盒法；B-改良的 CTAB 法；C-改良的 SDS 法；Maker-DL2000DNA Marker；空白处为阴性对照。

Fig. 3 Amplification results of the UBC895 primers for medicinal *Fritillaria* L. DNA extraction of 3 kinds of different methods

A-kit method; B-improved CTAB method; C-improved SDS method; Marker-DL2000 DNA Marker; The space for the negative control.

增出条带，但条带模糊弥散，对改良的 SDS 法扩增较不好。综合比较 2 条引物对 3 种不同方法提取的 11 种药用贝母的扩增结果得出，试剂盒法对 11 种不同种类的贝母都能够扩增出条带，且清晰丰富，提取效果稳定最佳。

综合核酸蛋白测定仪检测、电泳检测、ISSR-PCR 扩增检测及多方面综合比较，核酸蛋白测定仪检测不同提取方法对提纯 DNA 效果的影响具体见表 3。

4 讨论

对比 3 种方法对干燥叶片和药材鳞茎粉末的总 DNA 提取效果,发现改良的 CTAB 法对鳞茎粉末中总 DNA 提取的浓度最高,但 $A_{260/280}$ 值也较高,说明有不同程度的污染。对比干燥叶片与药材鳞茎粉末的提取,鳞茎粉末需加入更多的 β -巯基乙醇以防止过氧化物对分离物的破坏分解,且易在抽提过程中产生过多泡沫,需加入氯仿 700 μ L 异戊醇 29 μ L(24:1)。鳞茎粉末中含有大量的淀粉,提取纯度会受到影响,故建议选用干燥叶片提取,干燥叶片较鳞茎提取效果好。

改良的 CTAB 法和改良的 SDS 法操作耗时较长,操作过程复杂,对于一些蛋白、RNA 等杂质去除较难,提取过程中产生丰富气泡,影响提取效果。改良的 CTAB 法的 $A_{260/280}$ 值多分布于 1.90~2.20;改良的 SDS 法的 $A_{260/280}$ 值多分布于 1.60~1.75 和 1.90~2.10;说明均有不同程度的污染及降解,虽然浓度测量值较高,但不能真实的反应提取基因组 DNA 的准确浓度。试剂盒法操作简单,试剂较少,操作得当几乎不产生气泡。 $A_{260/280}$ 值集中分布在 1.85 左右,提取纯度高;通过电泳检测可看出试剂盒法所得总基因组条带明亮清晰无弥散;改良的 CTAB 法较暗;改良的 SDS 法条带出现拖尾和严重弥散,说明改良的 CTAB、SDS 法所得的基因组 DNA 纯度不理想;ISSR-PCR 检测,引物 UBC844、UBC895 对试剂盒法提取的基因组均可扩增出清晰丰富明亮的条带;对改良的 CTAB 法 UBC844 引物扩增条带中 4~7、12~15 号样品条带难辨识;对改良的 SDS 法 2 条引物的扩增结果只有部分有丰富的条带。综合比较 2 条引物的扩增情况,均可看出相较试剂盒法,改良的 CTAB、SDS 法对 DNA 的提取纯度相对不高且稳定性不好。

综上所述,试剂盒法从贝母属药用贝母干燥叶片及药材鳞茎中提取的总基因组 DNA 片段大,纯度高,质量稳定可靠。综合考虑操作时间、操作过程及 DNA 质量结果,得出试剂盒法是最理想的贝母属药用贝母基因组 DNA 的提取方法,且价格适当,性价比高,可适用于大样本量的基因组总 DNA 提取。

REFERENCES

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第 14 卷, 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] YAO D Z, MIN H, HE H H, et al. Determination and comparison of total alkaloids content of *Fritillariae thunbergii* Bulbus from different habitats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(10): 1249-1251.
- [3] WANG S H, QIAO J F. Comparison of total polysaccharide in *Fritillariae thunbergii* Bulbus from different habitats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(10): 1256-1258.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 132.
- [5] 刘晶, 胡恺, 李珊, 等. 贝母类药材鉴定的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1279-1282.
- [6] WANG G P, FAN C Z, LI X J, et al. Research on authentication methods of *Fritillaria* L. in Xinjiang [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2012, 14(9): 51-54.
- [7] 赵鑫, 凯撒·苏莱曼, 朱国强, 等. 伊贝母植物 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 78-79.
- [8] WANG G P, FAN C Z, LI X J, et al. DNA extraction and optimization of ISSR-PCR reaction system for *fritillaria walujewii* [R]. Seed(种子), 2012, 31(8): 27-30.
- [9] WANG G P, FAN C Z, LI X J, et al. Genetic diversity analysis on plants in *Fritillaria* L. From Xinjiang based on ISSR [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2013, 44(7): 887-890.
- [10] CAI Z H, LI P, DONG T T. Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR Analysis [J]. Planta Med, 1999, 65(4): 360-364.
- [11] 杨宁, 白雪, 刘效瑞, 等. 几种分子标记技术的比较及其在中药材鉴定中的应用[J]. 生物学通报, 2011, 46(8): 1-4
- [12] CHEN L J, CAO D X, QI X, et al. Comparative study of methods for isolation of total DNA from *Schisandra chinensis* [J]. China J Tradit Chin Med Pharmacy(中华中医药杂志), 2012, 27(9): 2435-2437
- [13] WANG W, LUO G H, GONG B Q, et al. RAPD reaction system optimize research in four regions of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C.Hsia [J]. Guangdong Agricult Sci(广东农业科学), 2011, 47(7): 149-160.
- [14] LI M, ZHAO X. RAPD analysis of three species of *Fritillaria* in southern China [J]. J Zhejiang Univ Technol(浙江工业大学学报), 2012, 40(6): 634-638.
- [15] LI K Q, WU W, ZHENG Y L, et al. Genetic diversity of *Fritillaria*. from Sichuan province based on ISSR [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(17): 2149-2154.
- [16] TAN Y, ZHANG L H, LI M C, et al. Identification of Chinese Herb *Fritillaria cirrhosa* D.Don by DNA fingerprint [J]. Chin Pharm(中国药理学杂志), 2011, 46(1): 14-16.
- [17] WANG M, TAN Y, ZHANG L H. Comparative study of different extraction methods for the isolation of DNA from traditional Chinese medicine *Fritillaria* [R]. J Beihua Univ(北华大学学报), 2011, 12(6): 662-225.

收稿日期: 2015-01-09