

川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan.) RAPD 和 AFLP 标记的多态性聚类分析赵永亮<sup>2</sup>, 傅体华, 范巧佳, 任正隆

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001; 2. 四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室, 四川雅安 625014)

**摘要** [目的] 用 RAPD 和 AFLP 技术对采自主产区不同地域的川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan., 头花杯苋 *Cyathula capitata* (Wall) Moq 及它们的杂交品种杂交牛膝 Hybrid accession 进行多态性和聚类分析研究。[方法] 用酚-氯仿法提取的基因组 DNA, 经 RAPD 及 AFLP 程序扩增后分别用琼脂糖凝胶和 PAGE 电泳检测, 使用 NISYSp-2.10s 软件用 UPGMA 方法对检测结果进行聚类。[结果] RAPD 和 AFLP 技术在分析遗传多样性和品种鉴定方面各有优缺点; 采自同一地方的川牛膝具有最近的亲缘关系, 头花杯苋、杂交牛膝与其他采自各地的川牛膝品种之间的遗传差异较大。[结论] 在川牛膝中, DNA 的差异与地域性有较大关系, 说明药材确有地道性的特征, 从而在 DNA 水平上证明了药用植物上的地道性观点。

**关键词** AFLP; 川牛膝; 遗传多样性; RAPD

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06682-05

### Analysis of Variation of *Cyathula officinalis* Kuan. Germplasm with RAPD and AFLP Marks

ZHAO Yongliang et al (Department of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the polymorphism and cluster analysis of *Cyathula officinalis* Kuan., *Cyathula capitata* (Wall) Moq and their hybrid accession by RAPD and AFLP marks. [Method] General DNA was isolated from the fresh leaves of target plants by phenol-chloroform method. RAPD and AFLP markers were applied and determined by PCR and gel electrophoresis. The determined molecular markers were analyzed through UPGMA method of software NISYSp-2.10s. [Result] RAPD markers were more efficiency than AFLP markers on analysis of DNA polymorphism, but AFLP markers were more efficiency in identification of accessions. The cluster analysis from the RAPD and AFLP data showed that *Cyathula officinalis* Kuan. from the same area, had the most familiar relationship, and *Cyathula officinalis* Kuan., *Cyathula capitata* (Wall) Moq and their hybrid accession shared less familiar genetic relationship. [Conclusion] The relationship between DNA polymorphism in *Cyathula officinalis* Kuan. from different areas revealed by the analysis of RAPD and AFLP suggested that the importance of provenance of medicine herbs.

**Key words** AFLP; *Cyathula officinalis* Kuan.; Genetic diversity; RAPD

牛膝 (*Cyathula officinalis* Kuan.) 为苋科 (Amaranthaceae) 植物, 具有活血去瘀、补肾脏、强筋骨、利尿通淋、引血下行等功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 牛膝所含的牛膝多糖 (Achyranthes bidentata polysaccharides, ABPS) 具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、抗生育、消炎镇痛、降低血糖等作用<sup>[2-5]</sup>。川牛膝为四川著名地道栽培药材之一, 主产区为四川雅安市天全县, 故又名天全川牛膝<sup>[6]</sup>。目前, 在 DNA 水平上的牛膝遗传多样性的研究尚未见报道, 而 RAPD 和 AFLP 可以在对研究对象的遗传背景一无所知的情况下进行分子生物学方面的探索<sup>[7-8]</sup>。为此, 笔者对主产区不同产地和品种的川牛膝进行了 RAPD 和 AFLP 分析, 同时, 分析了地道品种和非地道品种之间的遗传差异, 以找出各品种的特异性扩增条带, 构建中药材的指纹图谱, 建立简便快捷不受环境因素影响的鉴定药材道地性体系, 并寻找与重要农艺性有关的分子标记, 旨在为川牛膝的育种和保护提供依据, 并为遗传作图和基因克隆奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 该研究所用的川牛膝 (*Cyathula officinalis* Kuan.) 为 1977 药典首载以来历届药典所载品种。头花杯苋 [*Cyathula capitata* (Wall) Moq] 俗称麻牛膝、苦麻牛膝, 为川牛膝的膺品。杂交牛膝 (Hybrid accession) 为川牛膝和头花杯苋的杂交种<sup>[6-9]</sup>。所有材料由四川农业大学副教授范巧佳采集提供, 详细情况见表 1。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取。** 种子在室温下发芽至 2 心 1 叶时, 取幼苗真叶用酚-氯仿法提取 DNA<sup>[10]</sup>。提取的 DNA 经 0.8% 琼脂

糖凝胶电泳检测后, 测定 DNA 浓度, 置于 4℃ 下备用。

**1.2.2 RAPD 试验程序。** 随机选用 OPI、OPN、OPW、OPL、OPF、OPU、OPB 共 7 组 140 条 RAPD 引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序参照 Williams 等所用方法<sup>[11]</sup>, 并略有改进。取扩增产物 10 μl 在 1.4% 的琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察并照相。

表 1 试验所用怀牛膝, 头花杯苋及 2 者的杂交种

Table 1 Samples of *Achyranthes bidentata* Blume, *Cyathula capitata* Moq. and their hybrids

品种 Species	编号 Code	产地 Producing area
川牛膝 ( <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.)	N1	乐山永胜乡 (Yongsheng Town, Leshan)
杂交牛膝 (Hybrid accession)	N2	天全大河乡 (Dahetown, Tianquan)
川牛膝 ( <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.)	N3	天全新沟 (Xingoutown, Tianquan)
川牛膝 ( <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.)	N4	天全新沟 (Xingoutown, Tianquan)
川牛膝 ( <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.)	N5	天全紫石乡 (Zishi town, Tianquan)
川牛膝 ( <i>Cyathula officinalis</i> Kuan.)	N6	天全紫石乡 (Zishi town, Tianquan)
头花杯苋 [ <i>Cyathula capitata</i> (Wall) Moq]	N7	西昌米易县 (Miyi Town, Xichang)

**1.2.3 AFLP 试验。** 随机选取 E、M、P 引物组中的 2 个形成引物组合进行酶切、连接和 PCR 扩增反应。样品变性后, 在 85 W 恒功率下用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶分离扩增产物, 最后用银染法进行检测。详细步骤参考 Vos 等所用方法<sup>[8]</sup>。

**1.3 数据统计与分析** RAPD 及 AFLP 的扩增产物以 0.1 统计, 建立 DNA 指纹数据库。若相同迁移率位置有带则赋值

作者简介 赵永亮 (1966-), 女, 河南汝州人, 博士, 副教授, 从事植物功能基因组方面的研究。

收稿日期 2008-03-24

为1,若无带则赋值为0,得到原始数据表征矩阵。使用 NTSYSpc-2.10s 软件用 UPGMA 方法进行聚类,得到聚类树形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 川牛膝 RAPD 试验结果

从 OPI、OPN、OPW、OPL、OPF、

OPU、OPB 共7组140条引物中筛选出30条具有多态性扩增且重复性好的引物,分别是 OPB 4 条, OPL 4 条, OPI 1 条, OPN 3 条, OPU 8 条, OPW 11 条,共扩增出 232 条清晰可辨的条带(表2)。电泳图谱见图1。NTSYS 聚类结果如图2所示。

从图1可以看出,川牛膝 RAPD 扩增片段的大小有较大

表2 川牛膝 RAPD 引物筛选结果

Table 2 Screening results of RAPD primers for *Cyathula officinalis* Kuan.

编号 Code	引物 Primer	总条带数 Total number of bands 条	多态性条带 Polymorphic bands		特异性条带 Specific bands		特异性条带所 区分品系数 Number of the lines differentiated by specific bands	特异性条带所 区分品系名称 Name of the lines differentiated by specific bands
			数目 条 Amount	百分比 % Percentage	数目 条 Amount	百分比 % Percentage		
1	OPB 05	7	7	100.0	1	14.3	1	N2-1
2	OPB 07	6	4	66.7	2	50.0	2	N2-1, N3-1
3	OPB 17	5	4	80.0	0	0	0	
4	OPB 20	7	6	85.7	2	33.3	2	N1-1, N4-1
5	OH-17	6	4	66.7	1	25.0	1	N3-1
6	OPL-03	5	4	80.0	2	50.0	2	N2-1, N3-1
7	OPL-04	6	4	66.7	0	0	0	
8	OPL-05	8	8	100.0	0	0	0	
9	OPN03	5	5	100.0	2	40.0	1	N2-2
10	OPN5	10	8	80.0	2	25.0	1	N2-2
11	OPN12	6	5	83.3	0	0	0	
12	OPU01	12	10	83.3	2	16.7	1	N2-1
13	OPU05	12	10	83.3	2	16.7	1	N2-1
14	OPU07	12	9	75.0	4	33.3	2	N2-2, N3-2
15	OPU08	12	9	75.0	3	25.0	2	N2-2, N3-1
16	OPU13	14	13	92.9	2	15.4	2	N1-1, N5-1
17	OPU17	5	4	80.0	1	20.0	1	N3-1
18	OPU18	5	4	80.0	1	20.0	1	N1
19	OPU19	8	8	100.0	4	50.0	3	N3-2, N2-1, N1-1
20	OPW01	7	5	71.4	1	14.3	1	N2-1
21	OPW09	7	5	71.4	3	42.9	2	N4-2, N2-1
22	OPW10	5	3	60.0	1	20.0	1	N2-1
23	OPW12	10	9	90.0	0	0	0	
24	OPW13	8	7	87.5	2	25.0	1	N3-2
25	OPW14	7	7	100.0	1	14.3	1	N2-1
26	OPW15	7	5	71.4	1	14.3	1	N2-1
27	OPW16	8	5	62.5	3	37.5	1	N3-3
28	OPW17	7	7	100.0	6	85.7	4	N3-1, N2-1, N1-3, N4-1
29	OPW18	5	3	60.0	0	0	0	
30	OPW20	9	8	88.9	3	33.3	2	N1-2, N3-1
总计 Total		231	183	79.2	52	22.5	6	N1-9, N2-22, N3-13, N4-4, N5-1, N6-3
平均值 Average		7.7	6.1		1.7			

注:多态性条带百分比=(多态性条带数/扩增条带总数)×100%;特异性条带指电泳图谱中某品系独有的条带;特异性条带百分比=(特异性条带数/扩增条带总数)×100%;特异性条带所区分的品系名称后所带的数字为该品系所具有的特异性条带数目。下表同。

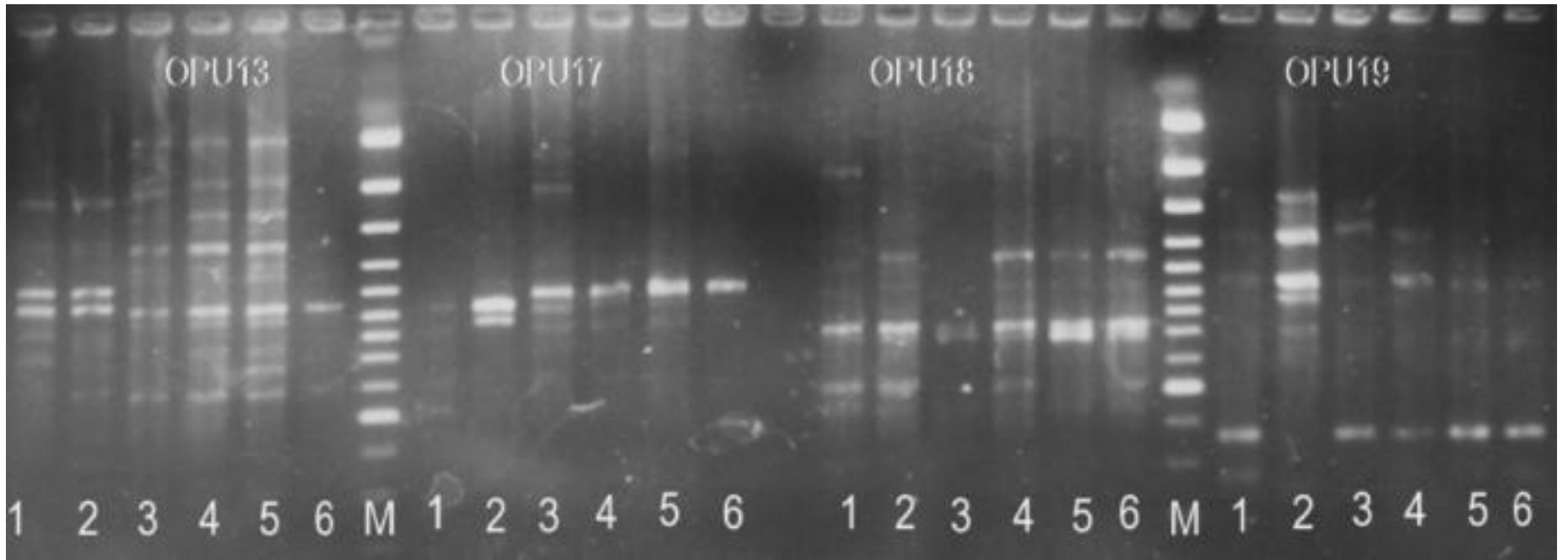
Note: Percentage of polymorphic bands = Number of polymorphic bands/ Total number of amplified bands ×100%; Specific bands are the specific bands of some line in the electrophoretogram; Percentage of specific bands = Number of specific bands/ Total number of amplified bands ×100%;; The number on the back of the name of the lines differentiated by specific bands are the number of specific bands of this line. The same as below.

的差异,有些引物的扩增片段在3 000 ~600 bp( OPU 13),而另一些引物的扩增片段在2 000 ~500 bp( OPU 18)。

从表2 可以看出,川牛膝的 RAPD 的电泳图谱的多态性条带率为79.2%,特异性条带率较高,达22.5%,可以区分出所要分析的所有6个川牛膝品系;引物 OPW17 的特异性条带率最高,达85.7%,其特异性条带可区分 N1、N2、N3、N4 4个样品,可鉴定出的品系数目也是所有引物中最多的;在30条引物所产生的52条特异性条带中,N2 的特异性条带最多

为22条,其次是 N3,共有13条特异性条带。最有效的是 OPU 17、OPU 13 和 OPW 16 3个引物。

从图2 可以看出,采自天全紫石乡的 N5、N6 具有最近的亲缘关系,它们之间的遗传相似系数为0.83;其次是采自金河口永胜乡的 N1 和采自天全新沟的 N4,它们之间的相似系数为0.71;杂交牛膝 N2 与其他采于各地的牛膝品系之间的遗传差异最大,其相似系数只有0.51。纵观聚类图可以看出,通过 RAPD 分析可以把所有样品分为3类,即 N5、N6 为1



注:1~6 分别为 N1~N6;M 为 DNA marker。

Note:1. N1; 2. N2; 3. N3; 4. N4; 5. N5; 6. N6; M stands for DNA marker.

图1 随机引物 OPU-13, OPU-17, OPU-18, OPU-19 扩增牛膝的 DNA 样本电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of DNA samples from *Achyranthes* amplified by random primers OPU-13, OPU-17, OPU-18, OPU-19

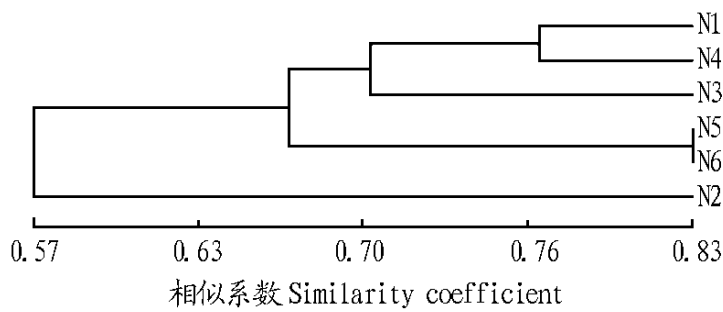


图2 川牛膝 RAPD 聚类结果

Fig.2 RAPD cluster results of *Cyathula officinalis* Kuan.

类, N1、N4、N3 为 1 类, N2 为最后 1 类。这表明川牛膝的遗传多样性与地域和品系间差异有关。

2.2 AFLP 试验结果 通过对 145 对 E/M 引物组合, 92 对

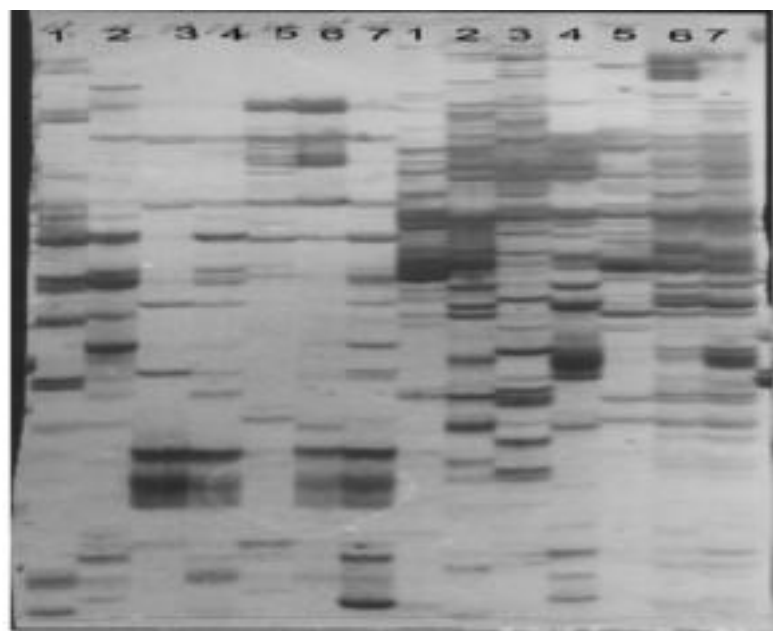
MP 引物组合, 72 对 E/P 引物组合进行筛选, 寻找出 M43/P33、P03/E23、P18/E11、P26/E35、P47/E53、P55/E42、P62/E59、P67/E66、P91/E87 共 9 对重复性好、具多态性的引物组合, 扩增出 445 条清晰可辨的条带。引物筛选结果见表 3, 代表性电泳图谱见图 3。在 AFLP 的分析中增加了头花杯苋 (N7), 为了使分析结果与 RAPD 的结果具有可比性, 将 AFLP 矩阵中的 N7 列删去进行分析, 所得结果见表 4, NTSYS 聚类结果如图 4 所示。

从表 3 可以看出, 9 个 AFLP 引物组合共扩增出 445 条清晰可辨的条带, 平均每个引物组合扩增出的条带数为 49.4, 多态性条带 46.6, 多态性条带率达 94.4%; AFLP 的多态性条

表3 川牛膝 AFLP 引物筛选结果

Table 3 Screening results of AFLP primers for *Cyathula officinalis* Kuan.

引物组合 Primer combination	3'末端特异序列 3'-end specific sequence	总条带数 Total number of bands 条	多态性条带 Polymorphic bands		特异性条带 Specific bands		特异性条带所 区分品系数 Number of the lines differentiated by specific bands	特异性条带所 区分品系名称 Name of the lines differentiated by specific bands
			数目 条 Amount	百分比 % Percentage	数目 条 Amount	百分比 % Percentage		
M43/P33	ATA/AAG	50	47	94.0	9	18.0	5	N1-4, N2-1, N3-1, N4-2, N7-1
P03/E23	G/TA	57	54	95.7	7	12.3	4	N1-2, N3-2, N4-2, N5-1
P18/E11	CT/AA	51	47	92.2	8	15.7	4	N2-5, N4-1, N6-1, N7-1
P26/E35	ACT/TT	40	36	90.0	6	15.0	3	N1-1, N2-4, N6-1
P47/E53	ATT/CCG	51	49	96.2	12	23.5	6	N1-2, N2-3, N3-3, N4-1, N5-2, N7-1
P55/E42	CGA/AGT	61	54	88.5	4	6.6	3	N1-1, N3-2, N5-1
P62/E59	CTT/CIA	47	42	91.5	9	19.2	5	N1-5, N2-1, N3-1, N5-1, N7-1
P67/E66	GAT/GAT	48	48	100.0	18	37.5	6	N1-6, N2-3, N4-2, N5-5, N6-1, N7-1
P91/E87	TTA/TGA	41	38	95.1	10	24.3	5	N1-3, N2-2, N3-2, N5-2, N7-1
总计 Total		445.0	413.0	94.4	83.0	18.7	7	N1-24, N2-21, N3-11, N4-8, N5-12, N6-3, N7-6
平均值 Average		49.4	46.6		9.2			



注:1~7 分别为 N1~N7; 左面 7 个条带为以 P67/ E66 为引物扩增的电泳图谱; 右面 7 个条带为以 P47/ E43 为引物扩增的电泳图谱。

Note: 1. N1; 2. N2; 3. N3; 4. N4; 5. N5; 6. N6; 7. N7; The left 7 bands were the electrophoretogram amplified by primer P67/ E66 and the right 7 bands were the electrophoretogram amplified by primer P47/ E43.

图3 AFLP 引物组合 P67/E66 和 P47/E43 扩增川牛膝的电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of *Cyathula officinalis* Kuan. amplified by AFLP primer combinations P67/E66 and P47/E43

表4 川牛膝 AFLP 引物筛选删除 N7 列后所得结果

Table 4 Screening results of AFLP primers after deleting N7

引物组合 Primer combination	总条带数 条 Total number of bands	多态性条带 Polymorphic bands		特异性条带 Specific bands	
		数目 Amount	条 百分比 Percentage %	数目 Amount	条 百分比 Percentage %
M3/ P33	49	44	89.8	8	16.3
P03E23	57	44	77.2	7	12.3
P18/ E11	50	42	84.0	7	14.0
P26/ E35	40	36	90.0	6	15.0
P47/ E53	50	44	88.0	11	22.0
P55/ E42	61	47	77.0	4	6.6
P62/ E59	46	41	91.5	8	17.4
P67/ E66	47	42	89.3	18	37.5
P91/ E87	41	38	92.7	10	24.3
总计 Total	439.0	378	86.1	77.0	17.5
平均 Average	48.8	42		8.9	

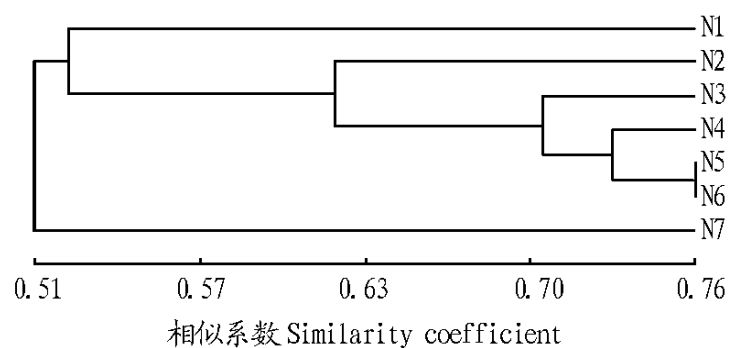


图4 川牛膝 AFLP 聚类结果

Fig. 4 AFLP cluster results of *Cyathula officinalis* Kuan.

C. Degari 等对草莓的 RAPD 和 AFLP 聚类图进行比较研究, 也得出一致的结论<sup>[13]</sup>。

### 3 结论与讨论

**3.1 AFLP 引物及引物组合的筛选** 从筛选出的引物组合来看, 适合川牛膝的引物组合除 1 个 M/P 组合外其余全部是

带数和多态性条带率皆高于 RAPD, 这与 P. C. Shaw 等对兵豆属的研究及 McKill 等对水稻基因组多样性方面的研究结果相一致<sup>[11-12]</sup>。9 个引物组合共扩增出 83 条特异性条带, 特异性条带率为 18.7%, 可以区分出全部 7 个牛膝品系; 引物组合 P67/ E66 扩增出的特异性条带及其可区分的品系数皆最多, 共扩增出特异条带 18 条, 可区分除 N3 以外的其他 6 个牛膝品系。在 83 条特异性条带中, N1 的特异性条带最多, 达 24 条, 其次是 N5 有 12 条。几乎所有的任意 2 个引物组合都可以鉴别出所有样品, 显示了 AFLP 用于构建指纹图谱的优越性。

从表 4 可以看出, 将 AFLP 矩阵中的 N7 列删去后, 川牛膝种内各品系的多态性条带率为 86.1%, 特异性条带率为 17.5%。

从图 4 可以看出, N5、N6 具有最近的亲缘关系, 它们之间的遗传相似系数为 0.76, 这与 RAPD 的聚类结果相一致; 头花杯苣 N7 与其他品系之间的遗传相似性最低, 它们之间的相似系数只有 0.51, 杂交牛膝 N2 与 N3、N4、N5、N6 之间的遗传相似系数为 0.62, 而 N1 与其他牛膝品系之间的相似系数却只有 0.52, 这与 RAPD 的聚类结果有较大的差异。从牛膝的 RAPD 和 AFLP 的聚类图上可以看出, 采自同一地方的 N5、N6 在聚类图上的位置较为一致, 其他栽培系和杂交种牛膝在 2 个聚类图上的位置则差异较大。比较 RAPD、AFLP 聚类图发现, RAPD 聚类结果更接近牛膝品系地理分布的实际情况,

P/E 组合。而目前文献报道的 AFLP 方法多用 E/M 引物组合<sup>[14-18]</sup>, 也有用 PstI (CTGCA/G) / Taq (T/CGA) 引物组合或 P/M 等引物组合的<sup>[19-20]</sup>, 但这些引物组合的使用有一个共同的特点, 即它们都是多切点酶 (4 碱基) (Frequent cutter) 和稀少切点酶 (6 碱基) (Rare cutter) 的组合。而该研究所筛选出的适合于牛膝扩增的 P/E 引物组合则是 Rare cutter 与 Rare cutter 的组合, 这种类型的引物组合未见成功使用的文献报道。双稀有酶切位点引物组合应用的成功, 为 AFLP 选用新的内切酶和进行引物设计提供了新的思路, 也为用常规引物组合难以进行有效的 AFLP 扩增的植物进行 AFLP 分析提供了有益的借鉴。

**3.2 川牛膝的遗传多样性和地道性** 用 RAPD 方法对川牛膝进行遗传多样性分析, 其多态性条带率为 79.2%; AFLP 的

多态性条带率为86.1%。可以看出,川牛膝各栽培系之间有较强的遗传变异。RAPD 聚类结果表明,川牛膝与头花杯苋的杂交种与其他栽培种的川牛膝之间具有最小的遗传相似系数,说明杂交牛膝与其他栽培品系的川牛膝之间存在较大的遗传差异。Nei 认为对于样品较少的群体,通过分析大量的基因位点可以抵消样品数较少引起的误差<sup>[21]</sup>。而增加引物的数目,是RAPD 获得大量基因位点的重要措施。该研究中所取的材料个体数较少,但是通过对140 条引物的筛选,得到30 条具特异性扩增且重复性好的引物,共产生231 条清晰可辨的条带。如此多的条带数目在一定程度上弥补了样品数目少的不足,使聚类结果的可靠性增加。

为了进一步研究杂交牛膝和川牛膝之间的遗传关系,在进行 AFLP 分析的时候增加了采自四川省攀枝花米易县的头花杯苋。聚类结果显示:头花杯苋 N7 与杂交牛膝和栽培牛膝的遗传相似性最低,杂交牛膝 N2 与 N3、N4、N5、N6 也具有较远的亲缘关系。而采自乐山金口河永胜乡的川牛膝 N1 与除 N7 以外的其他品系的牛膝有如此远的亲缘关系,一方面说明地域差异对川牛膝的遗传多样性有较大影响,另一方面说明乐山的川牛膝可能为伪品,需要进一步研究证实,同时也说明地域对药材道地性的重要。

川牛膝与杂交牛膝、头花杯苋较大的遗传差异表明,应用分子生物学方法可以很容易地将二者区分开来。从形态差异及 AFLP 和 RAPD 图谱的差异可以推断,川牛膝与杂交牛膝、头花杯苋在药理、药效方面也会有一定的差异。因此,进行川牛膝的去杂保纯将是栽培需要注意的主要问题。

牛膝是可以进行异花授粉的植物,大量的基因重组使牛膝种内形成较为丰富的遗传多样性。由于该研究的多数样品采自天全县境内,距离较近,无法判断地域因素对牛膝遗传多样性究竟有多大影响,但从 RAPD 和 AFLP 的聚类图上还是可以看出:采自同一地方的 N5、N6 具有最近的亲缘关系,从侧面说明地域因素可能对牛膝的遗传多样性有一定影响。

(上接第6681 页)

律,可通过杂交保留此突变,使杂交后代具有产多羔的性能。

研究表明,3 个绵羊群体间产羔数差异极显著,而且萨寒杂交羊的多羔率和平均产羔数均明显高于纯种萨福克羊,说明利用多胎品种小尾寒羊对萨福克羊的繁殖性能进行杂交改良是有效可行的。该研究方法和结果可应用于萨寒杂交羊选育过程,将该项技术与常规育种方法相结合,通过对杂交后代繁殖性能表型的鉴定与基因型对比,淘汰杂交后代中野生基因型个体,选择杂合突变基因型个体,可望获得高繁殖性能的肉用杂交绵羊新品种(系)<sup>[10]</sup>。

由于现场条件限制,研究的个别绵羊群体样本数量偏少,还需扩大样本数量,增加结果的可信度。

#### 参考文献

[1] MLSANT P, LECERF F, FABRES, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Borod a Mino ewes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9): 5104-5109.

#### 参考文献

- [1] 张敬杰, 芦卫红, 史旭霞, 等. 牛膝的草本学研究[J]. 现代中西医结合杂志, 1994, 7(11): 696-697.
- [2] 李宗错, 李电东. 牛膝多糖的免疫调节作用[J]. 药学学报, 1997, 32(12): 608-613.
- [3] 宋义平, 刘彩玉, 周副, 等. 牛膝多糖对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(3): 158-160.
- [4] 唐黎明, 吕志筠, 章小萍, 等. 牛膝多糖药效学研究[J]. 中成药, 1996, 18(5): 31-33.
- [5] 李祖伦, 石圣洪, 陈红, 等. 川牛膝多糖的免疫活性研究[J]. 中药材, 1998, 21(2): 90-92.
- [6] 胡世林. 中国道地药材论丛[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 63-65.
- [7] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, IIVAK J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [8] VIS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(2): 4407-4414.
- [9] 吴向莉. 川牛膝与麻牛膝的鉴别[J]. 贵阳中医学院院报, 2000, 22(2): 62-63.
- [10] SHARP P J, SHEVRY GALE MD. Location of  $\alpha$ -amylase sequence in wheat and its relatives[J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 289-290.
- [11] SHAW P C, BUT P P H. Authentication of panax species and their adulterants by random primed polymerase chain reaction[J]. J Nat Med, 1995, 61(5): 466-469.
- [12] MACKILL D J. Level polymorphism and Genetic mapping of AFLP markers in rice[J]. Genome, 1996, 39(5): 969-977.
- [13] DEGAN C, ROWLAND L J. DNA fingerprinting of strawberry (Fragaria xananassa) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers[J]. Euphytica, 1998, 102(2): 247-253.
- [14] 房经贵, 桥玉山, 张镇. AFLP 在芒果品种鉴定中的应用[J]. 广西植物, 2001, 21(3): 281-283.
- [15] 罗志勇, 周钢. AFLP 法构建人参、西洋参基因组 DNA 指纹图谱[J]. 药学学报, 2000, 35(8): 626-629.
- [16] DEGAN C, ROWLAND L J. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (Fragaria xananassa Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data[J]. Euphytica, 2001, 117(1): 1-12.
- [17] MARCHEL, VALETTE S. Intra species DNA polymorphism in the tobacco cyst nematode complex (Globodera tabacum) using AFLP[J]. Genome, 2001, 44(6): 941-946.
- [18] 翁跃进, SANTOSH G. 花生 AFLP 指纹图谱[J]. 中国油料植物学报, 1999, 21(1): 10-12.
- [19] 王涛, 朱军. 苹果砧木亲缘关系 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2001, 34(3): 256-259.
- [20] CHO Y G, BLAR M W, PANAUD O. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels[J]. Genome, 1996, 39: 373-387.
- [21] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 583.
- [2] WILSON T, WUXY, JUENGL J L, et al. Highly prolific Borod a sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein I receptor (ALK6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells[J]. Bd Reprod, 2001, 64(4): 1225-1235.
- [3] SOUZA C J, MACDOUGALL C, CAMPBELL B K, et al. The Borod a (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type IB (BMPRI B) gene[J]. J Endocrinol, 2001, 169(2): 1-6.
- [4] DAMS G H, GALLOWAY S M, ROSS I K, et al. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Borod a (FecB) mutation[J]. Bd Reprod, 2002, 66(6): 1869-1874.
- [5] 王根林, 毛鑫智, GEORGE H D, 等. DNA 分析发现我国湖羊和小尾寒羊存在 Borod a (FecB) 多胎基因[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 104-106.
- [6] 马月辉, 王端云. 推荐国外引进的优良肉用种绵羊[J]. 农村百事通, 1999(21): 21.
- [7] 王启贵, 钟发刚, 李辉, 等. 绵羊 BMPRI B 基因多态性与其产羔数的相关研究[J]. 草食家畜, 2003, 6(2): 20-23.
- [8] 王启贵, 钟发刚, 李辉, 等. 绵羊产羔性状主效基因检测研究[J]. 遗传, 2005, 27(1): 80-84.
- [9] 柳淑芳, 姜运良, 杜立新. BMPRI B 和 BMP15 基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 755-760.
- [10] 储明星. 利用分子育种技术选育肉用多胎绵羊新品种系[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(6): 15-19.