

我国金银花分子生物学研究进展

董薇, 杨红旗, 余永亮, 许兰杰, 谭政委, 夏伟, 芦海灵, 梁慧珍* (河南省农业科学院芝麻研究中心, 河南郑州 450002)

摘要 综述了 DNA 条码、分子标记、液相色谱技术等分子生物学技术在金银花中的应用, 并简述了金银花组培快繁技术、金银花功能基因克隆情况, 为更深入地开展金银花研究奠定理论基础。

关键词 金银花; 组培快繁技术; 分子生物技术; 基因克隆

中图分类号 S567.7⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)02-0015-04

Research Advances in Molecular Biology of *Lonicera japonica* in China

DONG Wei, YANG Hong-qi, YU Yong-liang et al (Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract The application of molecular biology techniques such as DNA barcodes, molecular markers and liquid chromatography techniques in *Lonicera japonica* was reviewed. The rapid propagation of *Lonicera japonica* tissue culture and the cloning of functional genes of *Lonicera japonica* were briefly described, which lays a theoretical foundation for the further study of *Lonicera japonica*.

Key words *Lonicera japonica*; Rapid propagation technology of tissue culture; Molecular biology technology; Gene cloning

金银花(*Lonicera japonica*)为忍冬科忍冬属多年生半常绿藤本植物^[1]。金银花的干燥花蕾或初开的花,具有清热解毒、凉散风热的功效,为常用的大宗中药材。中国各省均有分布,种植区域主要集中在山东、陕西、河南、河北、湖北、江西、广东等地。分子生物手段在金银花中的应用虽然较晚,但已经在金银花快繁、金银花鉴定等方面取得了显著成果。为今后更深入地开展金银花研究,笔者对分子技术在金银花研究中取得的进展进行了综述。

1 金银花组培快繁技术

脱毒和离体快繁是植物组织培养应用最多、最广泛和最有效的一个方面。脱毒苗具有无杂菌、适应能力较强、繁育较快、质量优、抗性好等优点。近年来,金银花脱毒快繁、工厂化育苗有很大的发展。金银花不同部位的外植体在金银花组培快繁中均有应用,但诱导率不同,幼叶最易诱导愈伤组织^[2],易灭菌且萌发力强的当年嫩枝也可以成功诱导^[3-5],外植体木质化和半木质化茎段以4~6 mm为宜,未木质化和顶芽茎段的大小以操作方便为宜^[6],顶芽通过诱导生芽、增殖培养、诱导生根,也可以得到金银花幼苗^[7-8]。

诱导增殖培养基一般是以MS培养基为基础培养基,添加激素种类有6-BA、2,4-D、NAA、IBA、IAA、KT等,诱导幼叶愈伤使用MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L^[2],诱导顶芽外植体愈伤组织选择最优培养基配方为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA^[3]。杨冬业等^[5]使用MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.01~0.05 mg/L进行不定芽的诱导,诱导率为100%;MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.01~0.05 mg/L适合继代壮苗培养;1/2 MS+IBA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L适合金银花的生根诱导培养。王文静等^[7]研究发现,诱导红

金银花顶芽生芽培养基为MS+KT 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+ α -NAA 0.1 mg/L,增殖培养基为MS+KT 1.5 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+ α -NAA 0.3 mg/L,生根培养基为1/2 MS+ α -NAA 2.0 mg/L+IAA 0.15~0.20 mg/L。刘敏杰^[8]分析得出,以金银花的芽尖诱导丛生芽培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,增殖培养为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,生根培养基为1/2MS+IBA 3.0 mg/L+0.15%活性炭培养基。赵先海等^[4]研究表明,适合诱导的培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;较好的增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,芽健壮整齐,增殖系数可达4.5左右;较好的生根培养基为1/2MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.4 mg/L,生根率达90%以上。任斌^[9]以金银花试管苗带腋芽茎段为外植体,研究指出金银花经腋芽扩繁的最佳培养基为B5+NAA 0.05 mg/L+BA 2.0 mg/L+GA 31.0 mg/L,繁殖系数达4.1;另外研究萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)和多效唑(MET)对组培苗生根的影响,不同浓度的激素配比对组培苗根系指标影响不同,结果表明,生根率、主根数、须根数为统计指标最佳培养基配比中激素浓度差别很大^[10]。

金银花的组织培养中,防止组织褐变是培养成功的关键技术之一。王鹏等^[6]研究表明,0.1% Vc和0.3%活性炭在红金银花的组织培养中可有效地防止外植体组织褐化;2 mg/L 6-BA易引发褐变,2 mg/L KT和2 mg/L α -NAA对组织褐变影响与对照相比差异不大;采用仿自然气候(20℃-1 500 lx-4 h-85%→25℃-2 000 lx-8 h-85%→20℃-1 500 lx-4 h-85%→18℃-0 lx-8 h-85%)培养可有效抑制褐变的发生。

2 分子生物学技术在金银花鉴定中的应用

2.1 DNA条码在金银花鉴定中的应用 DNA分子鉴定技术用于物种鉴定具有准确可靠、重复性高等优点。以ITS2为主体的中药材DNA条形码鉴定新方法体系和数据库平台已获准纳入《中华人民共和国药典》。宋雯舒等^[11]提取金银花、山银花对照药材及河北和山东产地金银花样品DNA,检

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21);国家农业科研杰出人才及其创新团队(农财发[2016]45号);河南省科技攻关项目(172102110088)。

作者简介 董薇(1985-),女,河北邢台人,助理研究员,硕士,从事花类药材育种研究。*通讯作者,研究员,博士,从事花类药材育种研究。

收稿日期 2017-10-25

测 DNA 浓度和纯度,采用基于聚合酶链式反应(PCR)方法的 DNA 分子标记技术鉴别样品。崔志伟等^[12]研究 ITS2 和 psb A-trn H 作为鉴定金银花不同品种的优势条形码组合,不同品种金银花 ITS2 和 psb A-trn H 序列的扩增成功率为 100%,测序成功率分别为 72.7%、91.0%,且两者均存在较多的变异位点。胡凯等^[13]探讨 Bar-HRM 联用技术在金银花及山银花药材鉴别中的应用,发现利用 psb A-trn H 序列设计引物,HRM 曲线能够区分不同的金银花和山银花药材品种,Bar-HRM 能在金银花类药材混合物中检测出低至 5% 的山银花样品,说明 Bar-HRM 在金银花及山银花药材品种的分类、鉴别上具有可靠的分辨能力,适用于金银花及山银花药材掺混的快速鉴定,能够实现一管式闭合分析。

2.2 分子标记在金银花鉴定中的应用 利用简单有效的方法鉴定药用植物种及其变种一直是中药材鉴定首先要解决的问题。EST-SSR 多态位点多,信息量大,遗传变异信息丰富,并且检测快速、稳定,常用来鉴定药材品种。蒋超等^[14]通过生物信息学手段对实验室保存的忍冬及其变种红白忍冬(*L. japonica* var. *chinensis* Thunb.) EST 序列进行分析,共获得 3 705 条忍冬 EST-SSRs, 2 818 条红白忍冬 EST-SSRs; 分析结果表明,金银花及其变种红白忍冬主要 SSR 重复为二核苷酸,其次为三核苷酸,主要重复基序类型为 AG/TC 和 GAG/TCT; 通过同源比对,在忍冬及其变种中共筛选出 87 对重复次数具有差异的 EST-SSR; 选出 15 对碱基数差异大于 6 的 EST-SSR 进行验证,结果表明其中的 13 对引物在 52 份金银花类药用植物中具有有效扩增产物,且引物 Jp. ssr4、Jp. ssr64 及 Jp. ssr65 可用于忍冬及其变种、山银花原植物的鉴别。徐石勇等^[15]以金银花及其常见变种为材料,利用 SSR 标记技术构建分子指纹图谱,并用于遗传多样性分析; 选择 25 个 SSR 位点用于多态性分析,其中 3 个位点具有较强多态性,并构建基于 Excel 格式的金银花 SSR 指纹图谱,包括 3 对引物在 6 个供试材料中扩增到的 18 条多态性条带信息; 应用该指纹图谱对金银花及其变种的遗传多样性进行分析,结果表明,金银花与山银花之间遗传距离较远,仅 0.28; 应用该指纹图谱对 87 个市售金银花进行分析,能够区分出河北、山东、河南等地的金银花品种。

ISSR 分子标记能够灵敏地揭示 2 个亲缘关系十分相近个体之间的差异,可以应用于金银花样品间遗传多样性分析,分析金银花种内不同地域或不同植物来源的材料间存在的遗传差异,为金银花的种质资源鉴定、遗传关系分析及栽培育种提供分子生物学依据。王湘莹等^[16]采用 ISSR 标记技术从 100 个引物中筛选出 10 个重复性高、扩增效果好的引物,对 23 个金银花品种的样本进行 PCR 扩增,23 个金银花品种间的遗传相似系数为 0.471 3~0.100 0,平均遗传相似数为 0.629 9,平均基因多样性(He)和 Shannon 多样性指数分别是 0.379 3 和 0.556 3,表明品种间的遗传基础较宽及遗传多样性较高; 聚类分析(UPGMA)表明,23 个供试金银花品种划分为忍冬、美国忍冬、灰毡毛忍冬 3 大类。韩琳等^[17]应用 ISSR 分子标记技术对三大产地区的 27 个金银花原

植物种质资源进行遗传多态性、相似性和聚类分析,筛选出 16 个多态性引物,获得 344 条带,多态性比率为 88.4%; 遗传相似系数为 0.50~0.90; 聚类分析表明,27 个品种被分为 2 个类群。孙稚颖等^[18]对采自金银花主产区的 18 农家品种及野生忍冬和近缘种灰毡毛忍冬共计 36 个样品进行 ISSR-PCR 分析,采用 NTSYS-pc 软件计算金银花不同农家品种及近缘种间的 Jaccard 遗传相似系数,按非加权配对算术平均法(UPGMA)建立所研究类群的系统聚类图; 使用 12 条引物共扩增出 129 个条带,其中多态带为 114 条,占总扩增条带数的 88.37%; 从聚类分析图可以看出,金银花不同样本首先聚在一起,表明是一自然类群; 野生忍冬与栽培品种具有明显的遗传差异; 主产区传统品系毛花系列遗传相对较稳定,而鸡爪花系列品种繁杂,遗传变异大; 新品种九丰一号已独立成一稳定品种。

RAPD 分子标记已经在作物品种或种子纯度鉴定方面广泛应用,这种检测方法简便快速,但是存在条带稳定性差、饰演重复性低等问题^[19-22]。为了保证检验结果的准确性和可重复性,可以采取保证反应条件一致,多次重复每个引物,放弃重复性低的模糊条带,统计稳定出现、重复性高的条带并进行遗传分析。王一斐等^[19]利用 RAPD 分子标记技术对胶东地区 31 个金银花品种的遗传多样性及遗传关系进行研究,聚类分析结果表明,31 个金银花品种可以分为两大类: 采自昆崙山太白顶的金银花品种为一类,其余 30 个金银花品种为一类; 从遗传距离来看,采自昆崙山太白顶的品种与中医世家引进金银花品种大毛花遗传距离最远,为 2.507; 采自龙口兰高镇马蔺塘(II)与中医世家引进金银花品种四季丰遗传距离最近,为 0.020; 不同金银花种源间具有较高的遗传多样性,不同金银花种源间的遗传关系与地理分布有一定的相关性。

2.3 液相色谱技术在金银花鉴定中的应用 高效液相色谱(HPLC)法具有分离效率高、速度快、灵敏度高、稳定性和可重复性好、流动相选择性广、检测器种类多、色谱柱可反复使用等特点,现已成为研究中药指纹图谱的重要手段之一。赵君峰等^[23-24]采用 HPLC 法测定 10 个不同商品来源的金银花样品,建立川渝地区金银花药材甲醇溶解部分的 HPLC 指纹图谱; 色谱条件为 C_{18} 柱,甲醇-1% 磷酸为流动相进行梯度洗脱,检测波长 237 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 °C; 该方法能够很好地分离川渝地区金银花的主要成分; 不同产地金银花药材指纹图谱相似度较好,建立了含有 11 个特征指纹峰的川渝地区金银花标准指纹图谱。杨欣欣等^[25]采用指纹图谱技术对不同产地金银花药材进行分析比较,采用 Agilent TC- C_{18} 色谱柱,流动相为 0.5% 冰醋酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱,波长为 327 nm,对 14 种不同产地金银花药材进行测定,建立金银花药材指纹图谱,并确定 14 种不同产地金银花药材的 18 个共有峰,且 14 种金银花药材的指纹图谱相似度为 0.9 以上; 不同产地金银花药材的指纹图谱存在明显差异,又存在一定程度的相关性。何兵等^[26]以绿原酸为参照物建立金银花 HPLC 指纹图谱,同时以斜率校正法建立绿原酸与其余 8 个成分(新绿原酸、隐绿原酸、当药苷、芦

丁、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C) 的相对校正因子, 计算其含量, 实现一测多评; 同时采用外标法测定该 9 个成分的含量, 并比较二者的差异; 建立了金银花 HPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 21 个共有峰, 指认了其中 9 个共有峰, 20 批金银花的相似度为 0.959 ~ 0.997; 20 批金银花中 9 个成分的计算值与实测值间无显著差异; 验证了一测多评法的准确性和可行性。黄海燕等^[27] 通过指纹图谱比较金银花和山银花的质量, 对 50 批样品进行指纹图谱分析, 木犀草苷分析系统说明金银花与山银花有共同的有效成分物质基础, 该系统指纹图谱不能区别具体品种; 皂苷分析系统中不同品种的指纹图谱有较明显的区别, 可用于金银花与山银花具体品种的鉴别参考。宋雯舒等^[11] 以绿原酸、木犀草苷、灰毡毛忍冬皂苷乙为指标成分, 利用 HPLC 测定指标成分含量, 结果发现, 河北和山东产地金银花中绿原酸质量分数为 3.1% ~ 3.3%, 河北、山东产地金银花中木犀草苷质量分数分别为 0.049% ~ 0.050%、0.069% ~ 0.078%。韩永成等^[28] 采用 UPLC 指纹图谱方法, Agilent C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈 - 0.2% 磷酸水, 以 0.4 mL/min 的流速进行梯度洗脱, 检测波长 238 nm, 柱温 30 °C; 在 21 min 内得到金银花药材的指纹图谱, 对其中 5 个色谱峰进行了初步归属, 并对 14 批药材样品进行了分析, 其相似度为 0.915 ~ 0.987。UPLC 指纹图谱方法较 HPLC 大大缩短了分析时间。

3 金银花功能基因克隆情况

基因克隆是分子育种的基础。吴敏琳等^[29] 以不同产地及品种的金银花为材料, 通过 RT-PCR 法扩增其 HQT 基因编码区, 直接测序, 发现 HQT 基因编码区变异包括碱基置换突变、插入/缺失突变, 部分变异会引起 HQT 蛋白的改变, 并影响绿原酸的表达量。蒋向辉等^[30] 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 首次从金银花中克隆丙酮酸激酶基因全长 cDNA, 命名为 *LiPkc* (GenBank 登录号 JQ621946.1), *LiPkc* 基因编码区序列全长为 1 533 bp, 共编码 510 个氨基酸; 基于基因序列亲缘关系分析结果显示, *LiPkc* 基因与烟草 *Pkc* 基因亲缘关系最近, 属于双子叶植物 *Pkc* 基因家族; 蛋白质亚细胞定位分析认为 *LiPkc* 在线粒体或叶绿体中发挥作用; *LiPkc* 蛋白质的三维空间结构预测结果显示, *LiPkc* 蛋白主要由 α-螺旋、不规则盘绕组成; 定量 PCR 检测发现, *LiPkc* 基因在金银花不同组织中广泛表达, 但表达水平各有差异, 黄花中表达量最高。刘霞宇等^[31] 选取金银花的 9 个候选内参基因 *Lonja. ACT11*、*Lonja. ACT2/7*、*Lonja. G6PD*、*Lonja. GAPDH*、*Lonja. MTP*、*Lonja. TUA*、*Lonja. UBQ10*、*Lonja. EF1A*、*Lonja. UBC*, 利用 q RT-PCR 技术及 Ge Norm、Norm Finder 软件对它们的表达稳定性进行分析评价, 得出可选用 *Lonja. ACT2/7* 和 *Lonja. G6PD* 组合作为内参基因。乔中全等^[32] 根据已知的其他物种黄酮醇合成酶 cDNA 保守序列设计引物, 用 RT-PCR 技术从金银花叶片中扩增获得黄酮醇合成酶基因部分 cDNA 序列, 再用 RACE 技术获得其两端序列; 序列拼接得到完整的 1 248 bp 的黄酮醇合成酶基因, 根据获得的序列, 设计引物扩增获得

1 001 bp 的开放阅读框, 编码 333 个氨基酸; 序列分析显示, 金银花黄酮醇合成酶基因与烟草、马铃薯和桔梗的黄酮醇合成酶基因具有高度同源性。亓希武等^[33] 在药用植物金银花中克隆得到 1 条肌动蛋白 (*Actin*) 基因序列, 命名为 *Lj Actin* (Gen Bank 登录号: KY114518), 序列比对结果表明, 金银花的 *Actin* 和其他植物的 *Actin* 在序列上高度保守; 进化分析结果表明, 金银花的 *Actin* 与拟南芥的 *At ACT7* 和水稻的 *Os ACT2* 聚为一支; RT-PCR 结果显示, *Lj Actin* 在金银花 5 个不同发育时期的花中表达稳定。汪周勇等^[34] 从忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 转录组测序结果中分析获得 1 个 *Fat B* 基因, 分别以忍冬、红白忍冬 [*Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak.]、红腺忍冬 (*Lonicera hypoglauca* Miq.) 和水忍冬 (*Lonicera dasystyla* Rehd.) 新鲜花蕾为材料, 利用 RT-PCR 技术克隆获得了 *LJFat B*、*LHFat B*、*LJCFat B*、*LDFat B* 基因的全长 cDNA, 并进行生物信息学分析, 结果表明, *LJFat B*、*LJCFat B*、*LHFat B* 和 *LDFat B* 与拟南芥 *At Fat B* 具有较近的亲缘关系; *LJFat B*、*LJCFat B*、*LHFat B* 和 *LDFat B* 的核苷酸序列、蛋白特性及其二级结构有所差异, 但其蛋白均具有保守的 *Fat B* 底物结合位点和催化活性位点, 且在花蕾中的转录水平没有显著差异; 因此推测 *LJFat B*、*LJCFat B*、*LHFat B* 和 *LDFat B* 可能具有与 *At Fat B* 相同的生物学功能。莽草酸/奎宁酸香豆酰转移酶 (HCT) 是金银花中绿原酸合成途径的关键酶。何柳等^[35] 利用已经获得的金银花大量表达序列标签 (EST) 数据, 通过 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆金银花 HCT (*LiHCT*) 基因。蒋向辉等^[36] 采用设计简并性引物和 RACE 克隆相结合, 从金银花中克隆了捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长, 命名为 *LjCad* (Gen Bank 登录号: JQ621945.1); 基因全长为 960 bp, 开放阅读框为 798 bp, 其编码 265 个氨基酸, 基因不含内含子, 属于光系统 II 的 *Cab* 基因; *LjCad* 基因受光、6-BA、GA3 和 NAA 诱导表达, 但是黑暗和 ABA 激素处理对 *LjCad* 基因的表达没有明显的影响。齐琳洁等^[37] 通过生物信息学的方法从金银花转录组中获得 4 个 DNA 去甲基化酶基因, 分别为 *LJDME1*、*LJDME2*、*LJDME3* 和 *LJDME4*, 并预测其编码蛋白的理化性质和表达模式; 系统进化树结果表明, *LJDME1*、*LJDME2* 聚为一类, *LJDME3*、*LJDME4* 聚为一类, 与拟南芥中的 *DME* 关系更为密切; 基因表达分析表明, 4 个 DNA 去甲基化酶基因在变种间差异表达明显, *LJDME1*、*LJDME2* 基因表达水平在红金银花中高于金银花, 推测其可能参与调控金银花活性成分积累的过程, 并且 4 个 DNA 去甲基化酶基因具有组织表达特异性。

4 我国金银花研究中的问题和建议

金银花药用价值和保健用途广泛, 需求量不断增加, 种植面积不断扩大。分子生物技术在金银花繁殖、育种、分类、鉴定等方面的研究取得了一定进展, 尤其是鉴定方面, 现在已拥有 DNA 条码、HPLC 指纹图谱等快速、稳定、高效的金银花种间、种内鉴定技术。但与其他植物相比, 金银花的分子生物学研究仍处于起步阶段, 如金银花快繁研究没有一套成熟

的体系,关于金银花遗传图谱构建、功能基因研究较少。在今后的金银花研究中,一方面要在现有常规育种基础上解决金银花生产中的低产、染病等问题,同时分子生物辅助育种方面,如寻找绿原酸、木犀草苷紧密连锁的分子标记或生化标记,克隆关键基因同步开展,以期更快地促进我国金银花科学研究的发展。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2000:177.
- [2] 武丽娜. 金银花疏松愈伤组织诱导及细胞悬浮培养研究[J]. 北方园艺,2012(20):107-109.
- [3] 丁文静,张李娜,张谦,等. 金银花品种中花1号组培育苗技术研究[J]. 山东农业科学,2012,44(8):57-58.
- [4] 赵先海,张晓明,邓小梅,等. '金花3号'金银花组培快繁技术[J]. 林业科技开发,2014,28(3):105-107.
- [5] 杨冬业,张丽珍,李夏萍. 金银花高效再生体系的建立[J]. 分子植物育种,2017,15(4):1461-1465.
- [6] 王鹏,李艳,王文静. 金银花组织培养中防褐化技术实验[J]. 河南科学,2015,33(5):735-738.
- [7] 王文静,王鹏,李伟强. 金银花组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2013(18):100-102.
- [8] 刘敏杰. 金银花组织培养与快速繁殖研究[J]. 安徽农学通报,2014,20(21):21-22.
- [9] 任斌. 金银花腋芽快速繁殖体系探讨[J]. 浙江农业科学,2015,56(1):56-57.
- [10] 任斌. 金银花试管苗生根培养基的优选[J]. 安徽农业科学,2013,41(20):8515-8516.
- [11] 宋雯舒,张晨,甘亮,等. HPLC含量测定和DNA分子标记技术对不同产地金银花的鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):59-62.
- [12] 崔志伟,王康才,郑晖,等. DNA条形码序列对不同品种金银花的鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):43-45.
- [13] 胡凯,王微,游玉明. 基于DNA条形码和HRM技术对金银花及山银花药材的快速鉴别[J]. 时珍国医国药,2015,26(12):2923-2926.
- [14] 蒋超,袁媛,刘贵明,等. 基于EST-SSR的金银花分子鉴别方法研究[J]. 药学学报,2012,47(6):803-810.
- [15] 徐石勇,李欧静,张舒玮,等. 金银花SSR指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J]. 天津农业科学,2015,21(5):11-14,18.
- [16] 王湘莹,何钢,王晓明,等. 金银花不同品种间遗传变异的ISSR分析[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(11):77-82.
- [17] 韩琳娜,康玉秋,郭庆梅,等. 道地产区金银花的ISSR遗传多样性分析

- [J]. 四川农业大学学报,2013,31(4):414-418.
- [18] 孙稚颖,姚辉,王振中,等. 金银花种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2013,15(9):1890-1895.
- [19] 王一斐,刘林德,葛宜和,等. 胶东地区金银花品种间遗传关系的RAPD分析[J]. 安徽农业科学,2017,45(13):145-146,159.
- [20] 杨飞,张敏,彭兴扬,等. 金银花五个品系的RAPD分析及DNA指纹图谱的建立[J]. 武汉植物学研究,2007,25(3):235-238.
- [21] LI Y, DING W L. Genetic diversity assessment of *Trollius* accessions of Chinaby RAPD markers [J]. Biochemical genetics, 2010, 48:34-43.
- [22] SUN Z Y, GAO T, YAO H, et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method [J]. Planta medica, 2011, 77(3):301-306.
- [23] 赵君峰,马丽苹,白志川. 川渝地区金银花HPLC指纹图谱的研究[J]. 食品工业科技,2014,35(7):292-295,302.
- [24] 赵君峰,马丽苹,张彬,等. 金银花HPLC指纹图谱的建立[J]. 中国食品学报,2015,15(2):178-184.
- [25] 杨欣欣,王帅,包永睿,等. 不同产地金银花指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(5):17-20.
- [26] 何兵,刘艳,李春红,等. 多指标定量指纹图谱在中药金银花质量评价中的应用[J]. 中国药理学杂志,2015,50(14):1237-1242.
- [27] 黄海燕,饶伟文,钟建理. 金银花与山银花指纹图谱对比[J]. 中国现代药物应用,2016,10(16):288-289.
- [28] 韩永成,刘伟,陈宁,等. 不同产地金银花药材的UPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):67-69.
- [29] 吴敏琳,孙小琳,朱莎莎,等. 金银花HQT基因变异类型与其绿原酸含量相关性[J]. 吉林中医药,2014,34(7):728-731.
- [30] 蒋向辉,冯仕彪. 金银花丙酮酸激酶基因的克隆与表达特性分析[J]. 西北植物学报,2015,35(12):2372-2378.
- [31] 刘霞宇,陈亮,乔永刚,等. 金银花花器官实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. 山西农业科学,2017,45(4):514-517.
- [32] 乔中全,何钢,王晓明,等. 金银花黄酮醇合成酶基因全长克隆及其序列分析[J]. 生物技术通报,2012(4):64-68.
- [33] 元希武,徐道华,于盱,等. 金银花肌动蛋白基因LjActin的克隆及在花发育过程中的表达分析[J]. 江西农业学报,2017,29(3):90-94.
- [34] 汪周勇,蒋超,陈敏,等. 金银花类药用植物FatB基因克隆和生物信息学分析[J]. 药学学报,2012,47(10):1394-1398.
- [35] 何柳,徐晓兰,王振中,等. 金银花莽草酸/奎宁酸香豆酰转移酶(LjHCT)基因克隆与序列分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,26(2):263-268.
- [36] 蒋向辉,苑静. 金银花叶绿素a/b结合蛋白基因LjCab克隆与表达特性分析[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2016,50(3):409-414.
- [37] 齐琳洁,袁媛,伍翀,等. 金银花DNA去甲基化酶基因的生物信息学分析[J]. 药学学报,2015,50(3):367-371.

(上接第14页)

- [25] 李子双,廉晓娟,王薇,等. 我国绿肥的研究进展[J]. 草业科学,2013,30(7):1135-1140.
- [26] 黄锦福,吉家乐,黄忠兴,等. 绿豆、飞机草、牧草压青对芒果产量和质量的影响[J]. 广东农业科学,2011,38(7):88-89.
- [27] 何录秋,薛灿辉,张亚. 湖南主要经济绿肥的品种研究[J]. 湖南农业科学,2011(7):45-47.
- [28] 杜东英,王劲松,郭云周,等. 云南省主要秋播绿肥种植及还田技术[J]. 中国农技推广,2010,26(11):39-41.
- [29] 王丹英,彭建,徐春梅,等. 油菜作绿肥还田的培肥效应及对水稻生长的影响[J]. 中国水稻科学,2012,26(1):85-91.
- [30] 刘文平. 新垦幼龄茶园套种经济绿肥的生态效应研究与应用[J]. 江西农业学报,2011,23(8):17-18.
- [31] 何腾兵,毛国军,梅涛,等. 贵州喀斯特山区旱地绿肥聚拢秸秆还土的培肥增产效应研究[J]. 土壤通报,2001,32(2):62-65.
- [32] 黄平娜,秦道珠,龙怀玉,等. 绿肥-烟-稻轮作与烟叶产量品质及后茬晚稻产量效应[J]. 中国农学通报,2010,26(1):103-108.
- [33] 欧丽萍,徐建云,陈超君,等. 绿肥压青改土对秋植蔗高产群体产量和品质的效应初报[J]. 广西蔗糖,2006(1):19-23.
- [34] 宋湛谦. 构建秸秆高效利用体系 实现秸秆利用全产业链[J]. 科技导报,2015,33(4):1.
- [35] 杨丽娟. 农作物秸秆还田的方式及技术要求[J]. 现代农业,2011(5):165.
- [36] 李瑾,张晓伟,龚晓春,等. 免耕直播大麦的稻草覆盖量试验[J]. 浙江农业科学,2009,1(6):1135-1136.

- [37] 安丰华,王志春,杨帆,等. 秸秆还田研究进展[J]. 土壤与作物,2015,4(2):57-63.
- [38] 张晶. 秸秆还田土壤与纤维素降解相关的微生物的分子生态学研究[D]. 上海:上海交通大学,2007.
- [39] 李新举,张志国. 秸秆覆盖对土壤水分蒸发及土壤盐分的影响[J]. 土壤通报,1999(6):257-258.
- [40] 顾丽. 长期与短期秸秆还田后稻米品质的差异性变化研究[D]. 扬州:扬州大学,2008.
- [41] 徐国伟. 种植方式、秸秆还田与实地氮肥管理对水稻产量与品质的影响及其生理的研究[D]. 扬州:扬州大学,2007.
- [42] 刘阳. 不同生态条件下稻米品质对施氮反应的差异[D]. 扬州:扬州大学,2006.
- [43] 刘福英. 草木灰在农林上的应用[J]. 农技服务,2016,33(11):88.
- [44] 石峰,李楠,郭泽涵,等. 草木灰颗粒肥对土壤速效养分的影响[J]. 河南农业,2016(20):33-34.
- [45] 刘发林. 草木灰对四种松属种子发芽和幼苗生长的影响[J]. 生态学报,2017,37(17):5673-5680.
- [46] 朱雅兰,李明,黄巧云. 草木灰污泥联合施用对Cd污染土壤中Cd形态变化的影响[J]. 华中农业大学学报,2010,29(4):447-451.
- [47] 邵文奇,纪力,钟平,等. 水稻机插秧育苗草木灰基质的特性及应用效果[J]. 江西农业学报,2012,24(3):117-118.
- [48] 祝延立,郗登宝,潘晓峰,等. 草木灰与化肥配施对玉米农艺性状及产量的影响[J]. 安徽农业科学,2016,44(9):42-43,152.
- [49] 高焕勇,邱广伟,张鑫,等. 不同时期施用草木灰对网棚生产脱毒马铃薯原种产量的影响[J]. 农业科技通讯,2013(6):90-92.