

分子标记技术在大黄属植物种质资源研究中的应用

胡延萍 王莉 李毅

(中国科学院西北高原生物研究所 高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001)

摘要: 介绍了几种常用分子标记 RAPD、AFLP、SSR、ISSR 和 SRAP 的原理和特点, 着重论述了分子标记在大黄属植物遗传多样性、亲缘关系和种质鉴定等方面的应用, 分析了大黄种质资源研究中存在的问题和提出了今后研究工作的重点。

关键词: 分子标记 大黄 种质资源

Application of Molecular Techniques in the Research of Germplasm Resources of *Rheum*

Hu Yanping Wang Li Li Yi

(Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810001)

Abstract The principle and characteristic of molecular markers including RAPD, AFLP, SSR, ISSR and SRAP, were introduced in this paper. Applications of molecular markers were reviewed in the field of genetic diversity, relationship and identification of rhubarb germplasm resources. The current problems and prospects of the application in *Rheum* were also discussed.

Key words Molecular marker Rhubarb Germplasm resources

随着分子生物学的快速发展、分子克隆及 DNA 重组技术的不断完善, 分子标记技术已成为现代植物学研究的一项新的技术手段。它反映的是生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段, 能够直接反映基因组 DNA 间的差异。与传统的形态标记、细胞学标记和生化标记相比, 分子标记有许多明显的优越性, 具体表现在以下方面: 直接以 DNA 的形式表现, 在生物体各个发育时期的个体、组织、器官和细胞中均可检测到, 不受季节、环境限制, 不存在表达与否等问题; 数量丰富, 遍布整个基因组; 遗传稳定, 多态性高; 表现为中性, 不影响目标性状的表达; 许多标记表现为共显性, 能区别纯合体和杂合体。分子标记已被广泛应用于植物分类、进化和遗传多样性分析、种质鉴定、遗传图谱的构建及基因定位等领域的研究^[1-4]。

大黄属 (*Rheum*) 隶属于蓼科 (Polygonaceae), 其植物为多年生高大草本。全世界约 60 种, 分布在亚

洲温带及亚热带的高寒地区。以我国为分布中心, 有 39 种 2 变种, 约占全部种数的 2/3, 主要分布于西北、西南及华北地区, 东北较少。该属植物具有重要的经济价值, 中药大黄是我国特产的重要药材之一, 早在 2 000 多年前就有记载^[5]。大黄具有泄热通肠、凉血解毒、逐瘀通经之功效; 其正品来源于掌叶大黄、鸡爪大黄及药用大黄, 药用部位为根及根状茎^[6]。此外, 还有一些用作食用的大黄属品种, 以叶柄为食用器官, 营养价值高, 是理想的芳香保健蔬菜^[7]。由于大黄属植物的重要经济价值, 国内外市场对其需求的与日俱增, 过度开采和生境的破坏已导致野生大黄资源的锐减^[8]。种质资源研究是资源保护和开发利用的基础。目前, 多种分子标记技术如 RAPD、AFLP、SSR 和 ISSR 等已在大黄属植物的种质资源研究中得到应用。关于大黄的综述多集中于化学成分、药理作用、临床应用及资源的开发利用等^[9-13], 而其分子生物学方面的综述未见报道。

收稿日期: 2010-06-17

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD64B04), 2009 年中国科学院“西部之光”人才培养计划项目

作者简介: 胡延萍, 女, 博士, 研究方向: 植物生物技术; E-mail huyanpingqfmu@163.com

通讯作者: 李毅, 研究员, E-mail liy@nwipb.ac.cn

本文就分子标记在大黄属植物中的研究进展进行综述,以便于今后的研究工作。

1 分子标记在大黄属植物种质资源研究中的应用

1.1 大黄属 RAPD 标记的应用

RAPD 即随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA), 是 1990 年由美国杜邦公司的科学家 Williams^[14] 和加利福尼亚生物研究所 Welsh^[15] 两个小组几乎同时发展起来的建立在 PCR 基础上的一种 DNA 分子标记技术。它采用一个 10 碱基任意序列的寡核苷酸片段为引物, 以生物的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 当模板上有引物的结合位点, 并且一定范围内有与引物互补的反向重复序列时, 此范围内的 DNA 片段就可以被扩增出来。RAPD 标记具有快速、简便, 无需预知受试基因组 DNA 序列等优点, 可用于不同基因组的分析^[16, 17]。

RAPD 标记已广泛应用于大黄属植物的鉴定研究中。最早, 裴德清^[18] 对掌叶大黄和阿尔泰大黄进行 RAPD 扩增, 扩增结果显示二者差异明显。因此, 这一研究结果为大黄属生药鉴定提供了一种可行而崭新的 DNA 指纹鉴定方法, 弥补了传统鉴别方法的不足, 促进生药鉴定技术的发展。随后, 刘叔倩^[19] 用 RAPD 分子标记对大黄属 5 种植物的鉴定进行了初步研究。杨美华^[20] 用 RAPD 方法对正品和伪品大黄进行指纹图谱研究, 得到了两个具有正品大黄特征性条带的引物, 为正品和伪品大黄的鉴定提供分子生物学证据。基于形态学和 RAPD 标记的 12 种食用大黄栽培品种的亲缘关系研究结果表明, 不同品种间存在一定程度的遗传变异, 形态学标记和分子标记的聚类结果具有较强的相关性^[21]。

1.2 大黄属 AFLP 标记的应用

扩增片段长度多态性 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 是 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发展起来的一种检测 DNA 多态性的方法^[22, 23]。其基本原理是对基因组 DNA 进行双酶切, 使用特定的双链接头与酶切 DNA 片段连接作为扩增反应的模板, 用含有选择性碱基的引物对模板 DNA 进行特异性扩增。它结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 具有多态性丰富、DNA 用量少、引物通用性

强、稳定性好等优点, 但其试验过程复杂, 流程长, 成本高^[24]。Kuhl 等^[25] 首次用 AFLP 标记对 37 个食用栽培大黄品种和 4 个大黄属其它物种的遗传多样性进行研究, AFLP 标记可以用来区分所有栽培品种以及大黄属其它物种, 推测食用大黄可能起源于当初由我国引入欧洲种植的药用大黄物种的杂交后代。

索风梅等^[26] 应用 AFLP 方法分析了药典中记载的 3 种正品大黄 44 份样品的亲缘关系, 8 对选择性扩增引物中, 共扩增得到 1 255 条稳定清晰的条带, 其中 1 209 条多态性条带, 多态性带占总带数的 96.2%。《中国药典》规定的 3 种正品大黄中, 药用大黄和掌叶大黄的亲缘关系较唐古特大黄近, 表明 AFLP 技术可用于分析 3 种正品大黄的亲缘关系。

1.3 大黄属 SSR 标记的应用

简单重复序列 SSR (simple sequence repeat), 是指由 1-6 个碱基组成的基本序列串联重复的短片段, 这些片段广泛存在于真核细胞的基因组, 由于串联重复的数目是可变的而表现出高度多态性。SSR 位点两翼的 DNA 序列多是相对保守的单拷贝序列, 因而可根据其两翼区域的序列设计位点专一的引物, 通过扩增、电泳来构建 DNA 指纹。SSR 标记具有共显性、高度重复性和丰富的多态性等优点^[27]。Zhang 等^[28] 筛选了 10 对 SSR 引物用于唐古特大黄不同个体的 SSR 分析, 同时, 也可用于另外两种正品大黄 (掌叶大黄和药用大黄) 的研究, 表明 SSR 分子标记是大黄属植物遗传学研究的有效工具。Chen^[29] 进一步用 SSR 分子标记研究了唐古特大黄 10 个居群共 114 个个体的遗传多样性, 居群多态位点百分率为 78.81%, 期望杂合度为 0.423-0.591 (平均值 0.515), Shannon 多样性指数为 0.251-0.447 (平均值 0.323), 表明野生唐古特大黄居群具有较高的遗传多样性。探讨了导致唐古特大黄濒危的原因可能是野生居群的过度采挖和人类活动的干扰, 而不是遗传多样性的降低。

1.4 大黄属 ISSR 标记的应用

ISSR (inter-simple sequence repeats) 标记是由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等^[30] 于 1994 年发展起来的一种基于微卫星序列的分子标记技术, 这

一技术是依据真核生物基因组具有丰富的高度串联重复序列而提出的。其基本原理是利用基因组中存在的简单重复序列 (simple sequence repeats SSR) 本身设计引物, 在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1-4 个随机碱基, 然后以此为 3' 或 5' 引物, 对两侧具有反向排列的 SSR 之间的基因组片段进行扩增。ISSR 结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 具有较好的稳定性和多态性, 但 ISSR 标记产物多态性远比 RFLP、SSR、RAPD 更加丰富, 可以提供更多关于基因组的信息^[31-35]。因此, ISSR 标记被认为是居群遗传多样性研究的一种有效的分子标记手段^[36-37]。Hu 等^[38] 利用 ISSR 分子标记方法研究了唐古特大黄野生居群的遗传结构和遗传变异, 结果显示, 在物种水平上, 唐古特大黄多态位点百分率为 92.94%, Nei 基因多样性指数为 0.2689, 居群水平上多态位点百分率为 46.51%, Nei 基因多样性指数为 0.1724, 无论是居群水平还是物种水平, 唐古特大黄均具有较高的遗传多样性。遗传距离与地理距离的 Mantel 检验表明, 二者呈显著的正相关。同时, 还探讨了唐古特大黄的遗传多样性与生态因子的关系, 其遗传多样性与海拔呈显著的正相关, 与纬度和年平均气温呈显著的负相关, 因此, 海拔和温度可能是影响唐古特大黄遗传多样性的重要外部因子。

1.5 大黄属 SRAP 标记的应用

相关序列扩增多态性 SRAP (sequence related amplified polymorphism) 是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros^[39] 博士于 2001 年提出的一种新的 DNA 分子标记, 它利用独特的引物设计对开放阅读框 (ORFs) 进行扩增, 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性。SRAP 标记具有多态性高、产率中等、操作简单、重复性好和选择条带序列容易获得等优点, 近年来在植物遗传多样性分析^[40-42]、基因定位^[43-44]、遗传图谱的构建^[45] 以及种质资源鉴定^[46] 等方面得到广泛应用。在大黄属植物的研究中, 仅见陈大霞^[47] 用 SRAP 标记分析了正品大黄的遗传关系, 通过对 12 个不同来源大黄材料的研究表明, 24 对引物组合共得到 272 条扩增条带, 其中 199 条呈现多态性, 占 73.2%, 从 DNA 分子水平显示不同材料间存在着丰富的遗传多样性, SRAP 标记能有效分辨 3 种正品大黄, 聚类

分析结果表明正品大黄的分类结果与传统形态分类结果相同。总之, SRAP 标记为正品大黄鉴定和亲缘关系研究提供了新的 DNA 分子标记技术手段。

1.6 DNA 序列分析在大黄属中的应用

DNA 序列分析是在 DNA 一级结构水平上检测遗传多样性的分子标记技术, 即采用某种策略通过测定核苷酸在基因组 DNA 特定区域的排列顺序来研究 DNA 多样性, 它是最能充分揭示多样性的方法。序列分析是区分个体间遗传差异最彻底准确的方法, 可提供高度重复的、信息丰富的数据, 适合于中等和高等层次分类群的系统学研究^[1]。目前应用最多的是利用“通用”引物扩增 mtDNA、cpDNA 或核 DNA 某些基因、DNA 片段, 然后用这些通用引物直接测序, 最后通过相关的软件进行序列比对和分析, 构建系统进化树^[48-49]。

杨美华等^[50] 利用叶绿体 *tmL/tmF* 基因序列测定进行正品和伪品大黄的鉴定。姬可平和张西玲^[51, 52] 对甘肃省掌叶大黄种子 rRNA 基因内转录间隔区进行序列测定, 并建立了大黄种子 rRNA 基因图谱。王爱兰等^[53] 用叶绿体 DNA *tmL-tmF* 基因序列对大黄属植物的系统进化与适应辐射进行研究, 尽管其形态上的分化较大, 但分子水平的遗传变异相对较低, 这表明青藏高原的隆升所形成的地理和生态多样性以及第四纪的震荡气候可能促使物种在小的隔离居群中形成和大黄属一些特殊形态特征的固定。Yang^[54] 用叶绿体 *matK* 基因和核糖体 18S rRNA 基因对大黄属 9 种植物进行鉴定。Kamat su^[55] 结合叶绿体 *matK* 基因序列和反相 HPLC 法研究不同来源大黄药材的化学成分和遗传变异的关系, 得出以下结论: 基因型相同、采集地不同的大黄药材, 化学成分组成相同; 而基因型不同、采集地相同的大黄药材, 其化学成分组成不同。表明遗传因素是决定大黄化学成分组成的关键因子。

2 问题与展望

国内外市场对大黄需求量的不断增加和掠夺式的滥采滥挖, 已导致大黄野生资源锐减, 如驰名中外的唐古特大黄和掌叶大黄等名贵药材, 已被列入青海省重点保护野生植物名录 (第一批)^[56]。因此, 保护大黄野生资源、实行大黄规范化种植和选育优良品种已是当务之急。

针对大黄资源研究中存在的问题,今后工作的重点主要有以下几点。首先,制定合理的野生大黄资源保护策略和措施。综合运用多种分子标记技术对大黄属植物的遗传多样性和遗传背景进行研究,探讨其遗传结构和基因交流,为野生大黄资源保护策略的制定提供科学的理论依据。

其次,实现大黄规范化种植。通过人工栽培满足市场对大黄用药的需求,从根本上缓解野生大黄资源的压力。由于栽培大黄种质来源混乱、良莠不齐,给临床应用带来极大不便,尤其是青海省道地药材唐古特大黄与掌叶大黄在形态上极为相似,仅叶片深裂程度不同,难以辨别。对大黄药材进行分子鉴定,来弥补形态学上的不足,解决大黄规范化种植的种源问题。在种源明确的情况下,于大黄适应生长的高海拔山区和生境破碎化地区建立种植基地,增加基因交流,减少遗传多样性的降低,实现大黄 GAP 药材规范化生产。

最后,培育大黄优良新品种。在传统育种的基础上,结合 RAPD、AFLP、ISSR、SSR 等分子标记在大黄属植物遗传多样性研究中的应用,加强遗传图谱构建和基因定位研究,从野生类群中筛选优良目的基因,并对其改良,缩短新品种培育的时间。

总之,加强交流合作,开展多种分子标记研究,筛选多态性高的引物和探针,加快大黄属植物种质资源研究进程,为更好地开发、利用和保护大黄资源奠定生物学基础。

参考文献

- [1] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001.
- [2] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [3] 黄海,李劲松,曹兵.分子标记技术在石斛属植物种质资源研究中的应用.生物技术通报,2010(4): 75-80, 87.
- [4] Semagn K, Björnsdóttir A, Ndjondjop MN. An overview of molecular marker methods for plants African Journal of Biotechnology, 2006, 5(25): 2540-2568.
- [5] 李安仁.中国植物志(第25卷,第1分册)[M].北京:科学出版社,1998: 166-171.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005: 17-18.
- [7] 卢莉,赵一鹏.菜用大黄的研究进展.广东农业科学,2008(2): 19-21.
- [8] 李锦萍,陈桂琛,卢学峰.青海唐古特大黄种质资源现状与保护对策.青海草业,2007,16(2): 38-42.
- [9] 李敏,李丽霞,刘渝,刘勇.大黄研究进展.世界科学技术-中医药现代化,2006,8(4): 34-39.
- [10] 丁玉玲.大黄蒽醌类的研究概况.时珍国医国药,2005,16(11): 1160-1162.
- [11] 邹英杰.大黄的现代药理研究.中国医药卫生,2007,8(5): 81-81.
- [12] 叶彩云.大黄炮制品及其临床应用.基层医学论坛,2006,10(1): 58-58.
- [13] 李福安,李建民.青藏高原大黄资源应用与开发研究进展.青海医学院学报,2001,22(3): 39-41.
- [14] Williams J, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [16] 莫可元. RAPD 技术在中药鉴定及相关领域应用的研究进展.中国药师,2007,10(9): 908-910.
- [17] 邹锋,谭晓风,袁德义,袁军. RAPD 分子标记及其在油茶遗传育种研究中的应用(综述).亚热带植物科学,2009,38(1): 70-73.
- [18] 裴德清,果德安,郑俊华,等.大黄属植物 DNA 的提取及 RAPD 扩增.北京医科大学学报,1996,28(5): 330.
- [19] 刘叔倩,卢萍,郑谦,郑俊华.用 RAPD 鉴定大黄属 5 种植物间的差异.北京医科大学学报(大黄专辑,增刊),1998,30(6): 60-63.
- [20] 杨美华,张大明,刘健全,等.正品和伪品大黄的 RAPD 指纹图谱鉴定研究.中草药,2003,34(6): 557-560.
- [21] Persson HA, Rumpunen K, Mollerstedt LK. Identification of culinary rhubarb (*Rheum* spp.) cultivars using morphological characterization and RAPD markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2000, 75(6): 684-689.
- [22] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent application, 92402629[P]. 1993.
- [23] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [24] Nybo K. DNA and general PCR methods amplified fragment length polymorphism (AFLP). Biotechniques, 2010, 48(5): 367-369.
- [25] Kuhl JC, DeBoer VL. Genetic diversity of rhubarb cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133(4): 587-592.
- [26] 索风梅,宋经元,陈士林,等. AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究.中草药,2010,41(2): 292-296.
- [27] 李明芳,郑学勤.开发 SSR 引物方法之研究动态.遗传,2004,26

- (5): 769-776
- [28] Zhang DY, Chen N, Yang YZ, et al Development of 10 microsatellite loci for *Rheum tanguticum* (Polygonaceae). *Conservation Genetics* 2008, 9(2): 475-477.
- [29] Chen F, Wang A, Chen K, et al Genetic diversity and population structure of the endangered and medically important *Rheum tanguticum* (Polygonaceae) revealed by SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 2009, 37(5): 613-621.
- [30] Ziekiwicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics* 1994, 20(2): 176-183
- [31] 王建波. SSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. *遗传*, 2002, 24(5): 613-616
- [32] 张玉星, 马艳芝, 赵国芳. 简单重复序列间扩增分子标记技术及其应用. *生物技术通报*, 2009(9): 54-56
- [33] 王康, 董宽虎, 杨青川, 等. SSR 分子标记在牧草研究中的应用. *生物技术通报*, 2008(6): 65-68, 77
- [34] Ye YM, Zhang JW, Ning GG, Bao MZ. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 2008, 118(1): 1-7
- [35] Jhang T, Kaur M, Kalia P, Sham a TR. Efficiency of different marker systems for molecular characterization of subtropical carrot germplasm. *Journal of Agricultural Science*, 2010, 148: 171-181
- [36] Cao PJ, Yao QF, Ding BY, et al Genetic diversity of *Sinojackia dolichoapa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biochemical Systematics and Ecology* 2006, 34(3): 231-239.
- [37] Ma X, Zhang XQ, Zhou YH, Bai SQ, Liu W. Assessing genetic diversity of *Elymus sibiricus* (Poaceae: Triticeae) populations from Qinghai Tibet Plateau by SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 2008, 36(7): 514-522
- [38] Hu Y, Wang L, Xie X, et al Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(3): 264-274.
- [39] Li G, Quiros CF. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 2001, 103(2-3): 455-461
- [40] 程远辉, 周昌华, 马爱芬, 石小刚, 张兴翠. 重庆何首乌遗传多样性的 SRAP 研究. *中国中药杂志*, 2007, 32(8): 661-663
- [41] Song Z, Li X, Wang H, Wang J. Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by SSR and SRAP. *Genetica* 2010, 138: 241-249
- [42] Ding G, Zhang DZ, Ding XY, et al Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis. *Plant Systematics and Evolution* 2008, 276(3-4): 149-156
- [43] 姜树坤, 张喜娟, 张丽. 水稻品种‘沈农 606’抗稻瘟病基因定位和连锁的 SRAP 片段分析. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5): 852-856
- [44] 张慧, 张淑江, 武剑, 等. 大白菜细胞核隐性雄性不育系恢复基因 BM 2 的标记及定位. *中国农业科学*, 2010, 43(5): 993-999
- [45] Sun Z, Wang Z, Tu J, Zhang J, Yu F, McVety P, Li G. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 2007, 114(8): 1305-1317
- [46] Feng N, Xue Q, Guo Q, Zhao R, Guo M. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP. *Biochemical Genetics* 2009, 47(7): 521-532
- [47] 陈大霞, 李隆云, 钟国跃, 等. 用 SRAP 标记分析正品大黄的遗传关系. *中国中药杂志*, 2008, 33(20): 2309-2312
- [48] 曹晖, 邵鹏柱. DNA 分子指纹图谱与测序技术在中药品质研究中的现状及展望. *中国中药杂志*, 1998, 23(11): 643-645.
- [49] 季力, 徐永莉, 张月云, 赵成坚. DNA 分子标记在中药鉴定中的应用及发展趋势分析. *时珍国医国药*, 2009, 20(11): 2845-2847.
- [50] Yang MH, Zhang DM, Liu JQ, Zheng JH. A molecular marker that is specific to medicinal rhubarb based on chloroplast *trnL/trnF* sequences. *Planta Medica* 2001, 67(8): 784-786
- [51] 张西玲, 姬可平, 李应东, 等. DNA 测序建立甘肃当归、大黄种子 rRNA 基因图谱的研究. *中药材*, 2003, 26(7): 481-484
- [52] 姬可平, 李啸红, 李应东, 张西玲. 应用 rRNA 基因间隔区碱基测序对中药(大黄)进行鉴定. *世界科学技术-中药现代化*, 2002, 4(4): 44-47
- [53] Wang AL, Yang MH, Liu JQ. Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA *trnL-F* sequences. *Annals of Botany*, 2005, 96(3): 489-498
- [54] Yang DY, Fushin H, Cai SQ, Komatsu K. Molecular analysis of *Rheum* species used as Rheirrhizma based on the chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004, 27(3): 375-383
- [55] Komatsu K, Nagayan A, Tanaka K, et al Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006, 54(11): 1491-1499.
- [56] 青海省人民政府. 青海省人民政府关于公布青海省重点保护野生植物名录(第一批)的通告. *青海草业*, 2009, 18(1): 50-51.