

基于条形码 ITS2 序列的何首乌及其近缘种和混淆品的分子鉴别

黎洁文^{1,2}, 赵树进^{1,2*}

(1. 广州军区广州总医院, 广州 510010; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过内转录间隔区2(internal transcribed spacer 2,ITS2)序列分析,探究鉴别何首乌与其近缘种和混淆品的新方法。方法:何首乌与其近缘种和混淆品的ITS2序列进行扩增、纯化、测序,运用Seqman软件进行序列拼接,通过MEGA6.0软件进行序列的分析并构建kimura 2-parameter(K2P)模型的neighbor-joinin(NJ)系统聚类树。结果:何首乌与其近缘种和混淆品ITS2序列间存在明显差异,种内遗传距离小于种间遗传距离。齿叶蓼与何首乌种间遗传距离较大,却与翼蓼非常接近,二者的遗传距离仅0.029。NJ系统聚类树显示不同产地的何首乌聚为一支,与其近缘种和混淆品可很好地区分。结论:ITS2序列可有效地鉴别何首乌与其近缘种和混淆品,为何首乌的用药安全性提供技术保障。

[关键词] 何首乌; ITS2序列; 混淆品; 聚类分析

[中图分类号] R282.5; R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0080-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1105.019.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 11:05

Molecular Identification of *Fallopia multiflora* from Its Closely Related Species and Adulterants Based on Internal Transcribed Spacer 2 Barcode LI Jie-wen^{1,2}, ZHAO Shu-jin^{1,2*} (1. General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore a new method for identifying *Fallopia multiflorum* from its closely related species and adulterants by internal transcribed spacer 2 (ITS2) regions. **Method:** ITS2 regions of *F. multiflora* and its closely related species, adulterants were amplified, purified and sequenced. Sequences were assembled by Seqman and analysed by MEGA6.0, neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed based on Kimura 2-parameter (K2P) model. **Result:** ITS2 regions of *F. multiflorum* exhibited obvious differences with its closely related species and adulterants. Intraspecific variation was less than interspecific genetic distance. All samples of *F. multiflorum* showed monophyletic on NJ tree, they could be distinguished from its closely related species and adulterants. **Conclusion:** ITS2 can be used as a effective marker for identifying *F. multiflorum* from its closely related species and adulterants, it can provide technical support for drug safety of *F. multiflorum*.

[Key words] *Fallopia multiflorum*; internal transcribed spacer 2 sequences; adulterants; cluster analysis

何首乌临床应用可分为生何首乌和制何首乌,前者能解毒、消痈、润肠通便,后者能补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨^[1]。现在药理学研究发现何首乌在抗氧化、增强机体免疫功能、改善心血管功能、

增强记忆等^[2-4]方面能起到积极作用。但目前市场上出现了众多何首乌的混伪品,主要有何首乌变种毛脉蓼(*Fallopia multifloravar. ciliinerve*)、翼蓼(*Pteroxygonum giraldii*)、耳叶牛皮消(*Cynanchum*

[收稿日期] 20140813(008)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(10151001002000012);广东省科技计划项目(00697862100303016)

[第一作者] 黎洁文,在读硕士,从事中药分子鉴定研究,Tel:020-88654670,E-mail:lijiewen2013@126.com

[通讯作者] *赵树进,教授,博士生导师,从事中药分子鉴定和药理学研究,Tel:020-88654670,E-mail:gzzsjzhs@163.com

auriculatum)、头花千金藤 (*Stephania cepharantha*) 和芭蕉 (*Musa basjoo*)^[5]。

传统中药鉴定方法包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定,具有成本低、操作简单等特点,但存在主观性强、重复性差等缺点,而且鉴定标识都是物种的遗传表现型,容易受到各种因素的影响。性状鉴定还具有通量低、无法量化的缺点,难以用于破碎的中药鉴别。显微鉴别适用于区别外形相似但不同类型的药材,但对于近缘物种,由于其结构相似,只在分布和数量上有所差别,难以起到定性鉴别的目的。光谱鉴定提供的鉴别特征较少,指纹图谱鉴定存在重复性较差等缺点。断面皮部的云锦状花纹通常可作为何首乌鉴定的一个重要鉴定特征,但研究表明某些产地的何首乌并无这一特征;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷作为何首乌的标志性成分,但不同产地药材中该成分的含量差异较大。相对于传统鉴别方法,DNA 分子标记技术具有微量、特异性强的特点,并且不受环境和基因表达的限制,还可对破碎中药材进行鉴别^[6-7]。

DNA 条形码是利用一段较短的标准 DNA 片段快速准确地进行物种鉴别的方法^[8]。rDNA 的内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 序列长度较短,且其两端 5.8S 和 28S 区域保守,使得其具有易扩增、易测序的优点,常被选为药用植物的通用 DNA 条形码,并已用于黄芪、川贝母、女贞子等中药的真伪鉴别^[9]。本实验选择何首乌及其近缘种(卷茎蓼、木藤蓼、齿叶蓼、齿翅蓼)、混淆品(毛脉蓼、翼蓼、耳叶牛皮消和头花千金藤)为研究对象,对其 ITS2 序列进行测序分析,为何首乌的药材鉴定提供分子依据。

1 材料

PTC-1148 MJ Mini 型聚合酶链锁反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪, GelDoc XR 型凝胶成像系统和 Mini 型核酸电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); PICO 17 通风型微量离心机(美国 Thermo 公司); prime STAR HS DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司), 快捷型植物基因组 DNA 提取系统[非离心柱型, 天根生化科技(北京)有限公司]; 何首乌及其近缘种、混淆品样品主要采自广东、广西、福建、湖北、陕西、云南等地, 现凭证标本保存于广州军区广州总医院医学实验科, 24 份何首乌样品由华南植物园邢富武教授鉴定, 齿叶蓼样品由昆明医学院唐丽萍老师鉴定, 其他样品由西北农林科技大学植物研究员黎斌和西安植物园张莹协助采集并鉴定, 见表 1。

表 1 植物样品来源及 ITS2 序列的 GenBank 登录号

Table 1 Origin of plant materials and its GenBank accession number of ITS2 sequences

编号	药材	样品号	产地	GenBank 登录号
1	何首乌 <i>Fallopia multiflora</i>	DQ1	广东德庆	KM279320
2	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DQ2	广东德庆	KM279321
3	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DQ3	广东德庆	KM279322
4	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DQ4	广东德庆	KM279323
5	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DQ5	广东德庆	KM279324
6	何首乌 <i>F. multiflora</i>	GZ1	广东广州	KM279325
7	何首乌 <i>F. multiflora</i>	GZ2	广东广州	KM279326
8	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DG	广东东莞	KM279327
9	何首乌 <i>F. multiflora</i>	LZ	广东连州东坡	KM279328
10	何首乌 <i>F. multiflora</i>	GA	广东高州	KM279329
11	何首乌 <i>F. multiflora</i>	SZ	广东深圳	KM279330
12	何首乌 <i>F. multiflora</i>	ZQ	广东肇庆	KM279331
13	何首乌 <i>F. multiflora</i>	SX	广东遂溪	KM279332
14	何首乌 <i>F. multiflora</i>	HN	广东华南植物园	KM279333
15	何首乌 <i>F. multiflora</i>	JX1	广西靖西	KM279334
16	何首乌 <i>F. multiflora</i>	JX2	广西靖西	KM279335
17	何首乌 <i>F. multiflora</i>	DB	广西德保	KM279336
18	何首乌 <i>F. multiflora</i>	GX	广西药用植物园	KM279337
19	何首乌 <i>F. multiflora</i>	ES	湖北恩施	KM279338
20	何首乌 <i>F. multiflora</i>	WH	湖北武汉	KM279339
21	何首乌 <i>F. multiflora</i>	YC	湖北宜昌	KM279340
22	何首乌 <i>F. multiflora</i>	WY	福建武夷山	KM279341
23	何首乌 <i>F. multiflora</i>	YN	云南	KM279342
24	何首乌 <i>F. multiflora</i>	SC	四川	KM279343
25	毛脉蓼 <i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>	MA	陕西太白山自然保护区	KM279344
26	卷茎蓼 <i>F. convolulus</i>	JU	陕西眉县汤浴镇	KM279345
27	木藤蓼 <i>F. aubertii</i>	MT	西安新城广场	KM279346
28	齿叶蓼 <i>F. denticulata</i>	CY	云南昆明植物园	KM279347
29	齿翅蓼 <i>F. dentatoalata</i>	CC	陕西太白山自然保护区	KM279348
30	翼蓼 <i>Pteroxygonum giraldii</i>	YI	陕西太白山自然保护区	KM279349
31	耳叶牛皮消 <i>Cynanchum auriculatum</i>	BS	陕西太白山自然保护区	KM279350
32	头花千金藤 <i>Stephania cepharantha</i>	TH	云南昆明植物园	KM279351

2 方法

2.1 DNA 的提取 参照基因组 DNA 提取试剂盒

说明书提取总 DNA。将 DNA 溶液稀释至质量浓度约 100 mg·L⁻¹。

2.2 ITS2 序列的 PCR 扩增、纯化和测序 采用 ITS2 通用引物 5'-ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT-3'和 5'-GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT-3'对样品进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μL,含 DNA 模板 100 ng,引物(10 μmol·L⁻¹)各 1.5 μL,dNTP(2.5 mmol·L⁻¹)4 μL,DNA 聚合酶 1.25 U,5 × prime STAR 缓冲液(Mg²⁺)10 μL,加灭菌水补足至 50 μL。反应条件为 98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,59 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环;72 °C 延伸 8 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。根据 GenBank 发布的蓼科 ITS 序列,采用 Primer Premier 5.0 软件自行设计 ITS2 序列引物,分别为 5'-ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT-3'和 5'-GTT CGC TCG CCG TTA CTA G-3',扩增的片段包括完整的 ITS2 区及 5.8S 和 26S 的部分序列,反应体系和条件均同上。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯化和序列测定则由华大基因研究中心完成。

2.3 数据分析 测序获得的峰图利用 Seqman 软件进行校对拼接并辅以人工核查,使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端的 5.8S 和 28S 区段,获得 ITS2 间隔区序列。所有序列用 Clustal X 1.81 软件分析比对。MEGA6.0 软件计算序列的碱

基组成、变异位点及不同群体间的 Kimura 2-Parameter 遗传距离,利用邻接法构建系统树,系统树各节点的支持率以序列数据集 1 000 次重复抽查检验的自引导值表示。

3 结果

3.1 ITS2 序列的 PCR 扩增 采用 ITS2 通用引物和自行设计引物对 32 份样品进行扩增,电泳图谱见图 1。结果显示通用引物扩增不稳定,32 份样品中只有 19 份样品可扩增出明显条带;而采用设计引物扩增,有 30 份样品能扩增出亮带,只有 2 份样品需进行二次扩增。

3.2 何首乌种内序列分析 何首乌 24 条种内参考序列比对后长度均为 193 bp,4 种碱基 A,T,C,G 的平均质量分数分别为 11.8%,8.3%,45.4%,34.5%,其中 G+C 质量分数明显高于 A+T。何首乌 24 条参考序列共存在 11 个种内序列变异位点,分别为 18,88,101,104,185 位点的 A-T 变异,33,180 位点的 C-T 变异,116,152 位点的 A-T 变异和 149,188 位点的 A-C 变异,其中样品 YN 含变异位点最为丰富,存在 6 个变异位点。基于 K2P 模型的遗传距离结果见表 2。结果显示何首乌 ITS2 种内遗传距离具有一定差异性,其中云南野生种样品与其他群居多个样品种内距离较大,达 0.037,而其他来源的样品间遗传距离则相对较小或为零。

表 2 何首乌种内 K2P 遗传距离

Table 2 Intraspecific K2P distance of *Fallopia multiflorum*

居群	DQ1 ^a	DQ3 ^b	ES ^b	DB ^c	GZ2 ^c	JX2	LZ	GZ1 ^f	HN	DG ^g	YN
DQ1	0.000										
DQ3	0.005	0.000									
ES	0.010	0.005	0.000								
DB	0.016	0.010	0.016	0.000							
GZ2	0.010	0.016	0.021	0.005	0.000						
JX2	0.021	0.016	0.021	0.005	0.010	0.000					
LZ	0.026	0.021	0.026	0.010	0.016	0.005	0.000				
GZ1	0.026	0.021	0.016	0.010	0.016	0.005	0.010	0.000			
HN	0.026	0.021	0.016	0.010	0.016	0.016	0.021	0.010	0.000		
DG	0.010	0.005	0.010	0.005	0.010	0.010	0.016	0.016	0.016	0.000	
YN	0.032	0.026	0.032	0.026	0.032	0.032	0.037	0.037	0.037	0.021	0.000

注:a. DQ2 和 DQ1 序列完全一致;b. SZ,WY 和 DQ3 序列完全一致;c. WH 和 ES 序列完全一致;d. DQ4,DQ5,GX,GA,YC 和 DB 序列完全一致;e. JX1,ZQ 和 GZ2 序列完全一致;f. SX 和 GZ1 序列完全一致;g. SC 和 DG 序列完全一致。

3.3 何首乌与其近缘种和混淆品序列分析 何首乌与其混淆品(木藤蓼、齿翅蓼、卷茎蓼、齿叶蓼、毛脉蓼、翼蓼、头发千金藤、耳叶牛皮消)的 ITS2 序列长度分别为 193,190,194,195,206,193,206,193,

249 bp。图 1 显示何首乌与其混淆品的 ITS2 序列种间变异较大,存在多个变异位点。基于 K2P 模型的种间遗传距离结果见表 3,表明何首乌与木藤蓼 K2P 种间距离最小,与耳叶牛皮消 K2P 种间距离最

<i>F. multiflora</i>	CGCACCGCGT CGCCCC- C CCCCTC-----CGGGG A----- C	[60]
<i>F. aubertii</i>-G.....-T.....G-----C	[60]
<i>F. dentatoalata</i>-.....G-----C	[60]
<i>F. convolvulus</i>-.....GA-----	[60]
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>-G.....C.....C.....GG-----C	[60]
<i>F. denticulata</i>T.....C.....A.....GC-----G	[60]
<i>P. giraldii</i>T.....T.....GC-----	[60]
<i>S. cepharantha</i>	...GA...AC...A...A...C...TT...GC...G-----	[60]
<i>C. auriculatum</i>	...TT...T...CCA.....ACCC ATGTCCTGAA AGGG.C.C.C. GCCTTAGCG.	[60]
<i>F. multiflora</i>	CGGGCGGAG ACTGGCCCC CGTGCGCCCG CGCGCGCGG CGGCCTAAAC GCA C CCCCG	[120]
<i>F. aubertii</i>G.....	[120]
<i>F. dentatoalata</i>G.....	[120]
<i>F. convolvulus</i>	[120]
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>	.T.....C.....G...T.....	[120]
<i>F. denticulata</i>	A.....A.....T...A...T...G...T...A.....	[120]
<i>P. giraldii</i>	T.....A.....T...A...T...G...T...A.....	[120]
<i>S. cepharantha</i>	—A.T...T...T...C.A—G A.TT...T T...TG...T ATTAG....	[120]
<i>C. auriculatum</i>	G.....A GT...TT...A—G T.TT...TA...G.A CAG.GTT..C	[120]
<i>F. multiflora</i>	CGGCCG A AA A CGGCCGAC G A TTGGTGGT —GTG— ————G-CCCTGGG	[180]
<i>F. aubertii</i>G...G.....C.....A-----A-----A-----	[180]
<i>F. dentatoalata</i>G.....A-----A-----T...A...A...	[180]
<i>F. convolvulus</i>G.....A-----A-----T...A...A...	[180]
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>GG.G.....CC.....CA-----T...A...A...	[180]
<i>F. denticulata</i>	T.....G.G.T.C.....ACT CCTGGCCCTG T.C.T.GAA.	[180]
<i>P. giraldii</i>	T.....G.G.T.C.....ACC CCTGGCCCTG T.C.T.G.A.	[180]
<i>S. cepharantha</i>	AC...T—GG...A...T C.GC.....TGATG AGAAGC—CTTGTCAA.	[180]
<i>C. auriculatum</i>	TC.....GG...T...T A.G.....CGTCGAGATT TTACCGGAGT T.C.GGCAA.	[180]
<i>F. multiflora</i>	CATCGCGTGC CGC C C C GC GGGCCCCGGC GGCCACGGCC GACC C —CC A C A C CGTT	[240]
<i>F. aubertii</i>A...GA.....TT...GAA.....	[240]
<i>F. dentatoalata</i>T.....A...AA CGA...GAC.....	[240]
<i>F. convolvulus</i>T.....A...A...GA...GA...T...AC.....C	[240]
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>A.....CG.....	[240]
<i>F. denticulata</i>T.T...C.T...T...G A—TCAGA .GA...—T-A.....	[240]
<i>P. giraldii</i>T.T...C.T...T...G A—TCATA .GA...—TG TGA.....	[240]
<i>S. cepharantha</i>	..A.T.A...T.G...C...AA.GGAT...—GGC.GA .CA...CTT...GC.TA.C.	[240]
<i>C. auriculatum</i>	.TG...TCGA. GAGAG.ATTT...A...T.TG C.TGGGA.AT...GT...T.A C...GGG.CA	[240]
<i>F. multiflora</i>	G----- [253]	
<i>F. aubertii</i>	.----- [253]	
<i>F. dentatoalata</i>	.----- [253]	
<i>F. convolvulus</i>	.----- [253]	
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>	.----- [253]	
<i>F. denticulata</i>	.----- [253]	
<i>P. giraldii</i>	.----- [253]	
<i>S. cepharantha</i>	.----- [253]	
<i>C. auriculatum</i>	ATTCCAAACGA TTG [253]	

中框内碱基表示其有种内变异

图 1 何首乌及其近缘种和混淆品种间 ITS2 序列碱基差异

Fig. 1 Base differences in ITS2 sequences among *Fallopia multiflorum* and its closely related species, adulterants

表 3 何首乌及其近缘种、混淆品种间 K2P 遗传距离

Table 3 Interspecific K2P distance among *Fallopia multiflorum* and its closely related species, adulterants

物种	何首乌	木藤蓼	齿翅蓼	卷茎蓼	毛脉蓼	翼蓼	齿叶蓼	头花千金藤	耳叶牛皮消
<i>F. multiflora</i>	0.000								
<i>F. aubertii</i>	0.073	0.000							
<i>F. dentatoalata</i>	0.079	0.066	0.000						
<i>F. convolvulus</i>	0.085	0.079	0.035	0.000					
<i>F. multiflora</i> var. <i>ciliinervis</i>	0.106	0.092	0.132	0.154	0.000				
<i>P. giraldii</i>	0.221	0.228	0.211	0.212	0.290	0.000			
<i>F. denticulata</i>	0.230	0.214	0.205	0.206	0.285	0.029	0.000		
<i>S. cepharantha</i>	0.641	0.618	0.603	0.603	0.601	0.665	0.641	0.000	
<i>C. auriculatum</i>	0.693	0.696	0.689	0.696	0.618	0.646	0.649	0.746	0.000

大。何首乌近缘种齿叶蓼与何首乌种间遗传距离较大,却与翼蓼非常接近,二者的遗传距离仅 0.029,这与传统分类体系有较大分歧。

3.4 何首乌及其混淆品的聚类分析 为确定 ITS2

序列在何首乌及其近缘种和混淆品中的鉴定能力,构建了基于 K2P 模型的 NJ 系统聚类树,见图 2。结果显示整个树从根部分化为蓼科、防己科、萝藦科 3 个大分枝。蓼科植物中,何首乌属和翼蓼属分开成

2 个亚枝。何首乌属植物齿叶蓼未和何首乌属的其他种聚在同一个亚枝,而与翼蓼属植物翼蓼聚在一起,并获得 99% 的支持率,这与传统分类系统有很大的分歧。何首乌的不同居群的 24 个样品聚为一支,支持率达到 84%,可以与何首乌属其他种分开,因此用 NJ 构建的基于 ITS2 序列的系统发育树可用于区分何首乌及其近缘种和混淆品。

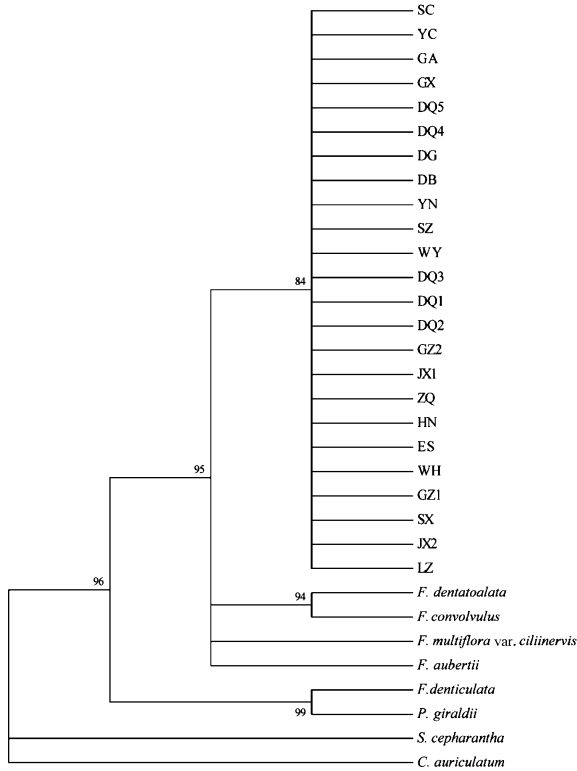


图 2 何首乌及其近缘种和混淆品基于 ITS2 序列构建的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree constructed on ITS2 sequences of *Fallopia multiflora* and its closely related species, adulterants

4 讨论

目前市场和临床应用中存在着何首乌各种混淆品,严重影响了该药材的用药安全性。本文利用 DNA 条形码技术对何首乌进行分子鉴定研究。采用设计的引物对何首乌及其近缘种、混淆品的 ITS2 区进行扩增,成功率明显高于通用引物。主要从 K2P 距离法和 NJ 树法两方面对何首乌及其混淆品和近缘种进行比较鉴定。在聚类分析中,何首乌与同属其他植物及其混淆品都归属于不同分枝。何首乌与其近缘种和混淆品在 ITS2 区变异位点达 140 个,且 ITS2 长度, G + C 含量及 K2P 遗传距离都存在差异,这些差异均可作为鉴定的依据。何首乌和毛脉蓼的分类处理上存在歧义,有主张将毛脉蓼作

为何首乌的变种处理^[5],亦有主张将其作为单独的种处理^[10-11]。通过对何首乌和毛脉蓼 ITS2 序列比对分析,包括 K2P 遗传距离和聚类分析等,结果更倾向于支持将毛脉蓼作为 1 个种处理。另从构建的系统发育树可知,何首乌属植物齿叶蓼没有和何首乌属的其他种聚在同一支,而是与翼蓼属植物翼蓼聚在一起,这与传统分类系统有较大的分歧,说明 ITS2 序列应用于中药真伪鉴别与分类有很大的潜力。

[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:中国医药科技出版社,2010:164-165.

[2] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39 (1):44-84.

[3] Zhang L, Yu S, Zhang R Y, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside antagonizes age-related alpha-synuclein overexpression in the hippocampus of APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Restor Neurol Neurosci, 2013, 31(1):41-52.

[4] Sun F L, Zhang L, Zhang R Y, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP + -induced cytotoxicity[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 660 (2/3): 283-290.

[5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 25 卷[M]. 北京:科学出版社,1998:102.

[6] 陈代贤,郭月秋. 商品何首乌、制何首乌的真伪质量鉴别考查[J]. 中药材,2008,31(6):836-839.

[7] 张勉,徐德然,张紫佳,等. 何首乌商品药材的鉴定与质量分析[J]. 中国药理学杂志,2005,40(11): 823-825.

[8] Hebert P D, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. Syst Biol, 2005, 54(5): 852-859.

[9] 毛帅,刘朝奇,向婷婷,等. 基于 DNA 水平的中国药用植物分子鉴定方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2014, 20(5):238-242.

[10] 湖北省植物研究所. 湖北植物志. 第一卷[M]. 湖北:湖北人民出版社,1976:246-247.

[11] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志. 第一卷[M]. 北京:科学出版社,1974:156-157.

[责任编辑 刘德文]