

· 资源与鉴定 ·

五味子与南五味子药材的 DNA 条形码鉴定

陈靓¹, 吴亚男¹, 单会娇², 杨燕云¹, 许亮^{1*}, 王冰¹, 康廷国¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600;

2. 葫芦岛市食品药品检验检测中心, 辽宁 葫芦岛 125000)

[摘要] 目的:利用内转录间隔区 2(ITS2)序列对五味子及南五味子药材进行 DNA 条形码鉴定。方法:对五味子和南五味子样品的 ITS2 序列进行聚合酶链式反应(PCR)扩增和测序。从 GenBank 中下载了五味子属 10 个近缘种和 2 个外类群的 ITS2 序列。利用 CodonCode Aligner 软件拼接,采用 MEGA 5.10 计算相关数据,基于 K2P 模型构建聚类树(NJ 树),应用 Blast 法进行鉴定分析。获取所测样品序列的 ITS2 二级结构信息,分析各样品间 ITS2 序列二级结构的差异。结果:五味子、南五味子样品序列长度分别为 231,225~227 bp,Blast 鉴定五味子药材原植物为五味子 *Schisandra chinensis*,南五味子药材原植物为华中五味子 *S. sphenanthera*。五味子与南五味子药材的种间 K2P 遗传距离(0.010 4~0.015 7)远大于五味子种内 K2P 遗传距离(0~0.002 5)和南五味子种内 K2P 遗传距离(0~0.005 1)。在 NJ 树模型中,五味子样品被独聚为 1 支,南五味子样品被独聚为 1 支,皆表现出单系性,Bootstrap 支持率较高,可与五味子属近缘种区分开。结论:以 ITS2 序列为标准的 DNA 条形码能够有效地鉴定五味子和南五味子药材。

[关键词] 内转录间隔区 2; DNA 条形码; 五味子; 南五味子

[中图分类号] R282.5;R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0066-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151118.1149.010.html>

[网络出版时间] 2015-11-18 11:49

DNA Barcoding Identification of *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus* by ITS2 Sequences

CHEN Liang¹, WU Ya-nan¹, SHAN Hui-jiao², YANG Yan-yun¹,

XU Liang^{1*}, WANG Bing¹, KANG Ting-guo¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Huludao Institute for Drug and Food Control, Huludao 125000, China)

[Abstract] **Objective:** To identify *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus* by ITS2 sequences. **Method:** ITS2 sequences of *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and bidirectionally sequenced. ITS2 sequences of related 10 *Schisandra* species and 2 out-group specie samples were downloaded from GenBank. CodonCode Aligner was used for sequence splicing and MEGA 5.10 was utilized for related data calculating. Then neighbour-joining tree (NJ tree) was built based on K2P model, and Blast method was used to identify specie of samples in this study. Differences between ITS2 secondary structures which were predicted using ITS2 web server

[收稿日期] 20150616(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173499);辽宁中医药大学杰出青年基金项目(20121228);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2014101);“我国水生、耐盐中药资源的合理利用研究”项目(201407002)

[第一作者] 陈靓,在读硕士,从事中药分子鉴定研究,Tel:13942344164,E-mail:174015472@qq.com

[通讯作者] *许亮,博士,副教授,从事中药资源与质量研究,Tel:15998541918,E-mail:861364054@qq.com

were analysed. **Result:** Lengths of sequences of *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus* were 231, 225-227 bp. Blast identification of samples were *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus*. K2P genetic distance between two species (0.010 4-0.015 7) was greater than intraspecific genetic variation. In NJ tree, *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus* were clustered into a single branch respectively, which showed monophyletic, and could be distinguished between other species of *S.* with a high Bootstrap approval rate. **Conclusion:** DNA barcoding based on ITS2 sequence is a powerful and efficient tool for identification of *Schisandrae Chinensis Fructus* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus*.

[**Key words**] internal transcribed spacer 2; DNA barcoding; *Schisandrae Chinensis Fructus*; *Schisandrae Sphenantherae Fructus*

五味子习称“辽五味”、“北五味”，是东北著名的地道药材^[1]；南五味子为同科植物华中五味子的干燥成熟果实。二者均具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效，均已收录在 2010 年版《中国药典》^[1]，李时珍曾曰：“五味今有南北之分，南产者色红，北产者色黑，入滋补药必用北产者良……”，故对二者的准确鉴别具有重要意义^[2]。相对于传统的鉴定方法，DNA 条形码技术能够快速、准确地识别和鉴定种类，受到越来越多研究者的推崇^[3-5]。与中药原植(动)物相比，中药材的 DNA 降解较多，不易提取，但该技术具有较强的通用性，所需扩增片段较短，且不受样品发育阶段和器官组织的影响，随着 DNA 提取方法的提高和日趋成熟，从药材中也可以提取到满足要求的 DNA，成为鉴定中药材的有效方法^[6-9]。内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 序列在种或种下水平具有明显的变异性，其二级结构也为物种的鉴定提供了重要信息，并具有适合测序和扩增的长度、鉴定力佳、易操作等优点，具有极高的研究价值，逐渐成为 DNA 条形码研究的热点^[10]。

前期已完成了 ITS2 序列对五味子原植物及白果五味子原植物的分子鉴定^[11-13]，而直接使用五味子药材作为样品研究的报道几乎空缺。本实验直接从五味子、南五味子药材中提取出 DNA，并对其 ITS2 序列进行研究与分析，为五味子及南五味子药材的准确鉴定提供参考。

1 材料

MG96G 型聚合酶链式反应(PCR)仪(杭州朗基科学仪器有限公司)，H1650-W 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)，EPS-600 型电泳仪(上海天能科技有限公司)，Tanon-4100 型凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司)，ABI 3730XL 型测序仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)，*Taq* master mix(北京康为世纪生物科技有限公司)，引物(上海生物工程股份有限公司)，Trans5K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司)，西班牙琼脂糖(香港 Gene 公司)，溴化乙锭(上海生物工程股份有限公司)，其余试剂均为分析纯。

10 份五味子药材样品和 6 份南五味子药材样品的信息见表 1，经辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴定分别为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 和华中五味子 *S. sphenanthera* 的干燥成熟果实。从 GenBank 中下载五味子属 10 个物种 12 条 ITS2 序列用于比较分析，结果见表 2。

2 方法与结果

2.1 DNA 提取 选取各产地干燥的五味子、南五味子药材约 50 mg，用 75% 乙醇反复擦拭表面，-80 °C 超低温冷冻后研磨粉碎，使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取总 DNA，具体步骤按照试剂盒操作说明进行。

2.2 PCR 扩增及产物测序 扩增的 ITS2 序列的引物，正向引物 ITS2F 为 5'-ATGCGATACTTGGTG TGAAT-3'，反向引物 ITS3R 为 5'-GACGCTTCTCCA GACTACAAT-3'。PCR 反应体系 50 μL，含有正、反引物各 2.0 μL(2.5 μmol·L⁻¹)，*Taq* master mix 25 μL，总 DNA 4.0 μL(约 40 ng)，加水补足至 50 μL。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，56 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 45 s(40 个循环)；72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经纯化后，使用 ABI 3730XL 型测序仪测序。

2.3 数据处理 所得序列和从 GenBank 中获得的五味子属物种序列，去除两端 5.8S 和 28S 区段，获得 ITS2 序列，利用 CodonCode Aligner V3.0.1 软件进行校对拼接，使用隐马尔可夫模型的注释方法，去

表 1 五味子与南五味子药材样品信息

Table 1 Informations of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus samples

编号	基原物种中文名	基原物种拉丁名	采集地	GenBank 登录号	贮藏时间/月	备注
AS	五味子	<i>Schisandra chinensis</i>	辽宁省鞍山市	KP893158	7	野生
BD	五味子	<i>S. chinensis</i>	吉林省白山市	KP893159	5	栽培
CB	五味子	<i>S. chinensis</i>	吉林省长白山	KP893160	6	野生
DX	五味子	<i>S. chinensis</i>	黑龙江省大兴安岭	KP893161	5	野生
GZ	五味子	<i>S. chinensis</i>	辽宁省盖州市	KP893162	48	栽培
KD	五味子	<i>S. chinensis</i>	辽宁省丹东市	KP893163	60	栽培
NA	五味子	<i>S. chinensis</i>	黑龙江省宁安市	KP893164	48	栽培
QY	五味子	<i>S. chinensis</i>	辽宁省抚顺市	KP893165	60	野生
WS	五味子	<i>S. chinensis</i>	吉林省白山市	KP893166	48	野生
YC	五味子	<i>S. chinensis</i>	黑龙江省伊春市	KP893167	60	野生
N1	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	江西省	KP893168	36	野生
N2	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	江西省	KP893169	36	野生
N3	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	河南省灵宝市	KP893170	48	野生
N4	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	江苏省	KP893171	48	野生
N5	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	安徽省亳州市药材市场	KP893172	36	购买
N6	华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	山西省平陆市	KP893173	48	野生

注:除 N5 为购买的样品外,所有样品采集后皆经过自然晒干处理,干燥保存。

表 2 从 GenBank 数据库获得的 ITS2 序列信息

Table 2 ITS2 sequences informations of samples obtained from GenBank database

基原物种中文名	基原物种拉丁名	GenBank 登录号
五味子	<i>Schisandra chinensis</i>	AB558158.1
五味子	<i>S. chinensis</i>	AF263441.1
五味子	<i>S. chinensis</i>	JF970271.1
华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	AF263437.1
华中五味子	<i>S. sphenanthera</i>	AF163705.1
红花五味子	<i>S. rubriflora</i>	AF163706.1
毛叶五味子	<i>S. pubescens</i>	AF163709.1
翼梗五味子	<i>S. henryi</i>	AF163708.1
金山五味子	<i>S. glaucescens</i>	AF263439.1
重瓣五味子	<i>S. plena</i>	AF263443.1
铁箍散	<i>S. propinqua</i> var. <i>sinensis</i>	AF263444.1
合蕊五味子	<i>S. propinqua</i>	AF163717.1
冷饭团	<i>Kadsura coccinea</i>	AF163716.1
冷饭团	<i>K. coccinea</i>	AF263445.1

除质量较低的序列以及引物区^[14]。将所得的序列用软件 MEGA (molecular evolutionary genetics analysis)5.10 进行分析比对,计算遗传距离(K2P)并对各数据进行分析、处理^[15-17]。利用 neighbour-joining tree (NJ 树)法和 Blast 法进行序列的比对,构建系统聚类树,鉴定分析各物种^[18-19]。

2.4 五味子及南五味子药材的 DNA 提取,PCR 扩增和测序成功率 对五味子、南五味子药材进行 DNA 提取,对提取后的 DNA 进行电泳检测,结果显示所有样品电泳条带较亮、清晰。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果见图 1。结果显示五味子及南五味子供试品 ITS2 序列的 PCR 扩增效率 100%,测序成功率 100%。2 种药材样品采集后自然晒干,干燥贮藏 0.42 ~ 5 年,表明 ITS2 序列对五味子和南五味子药材有很高的 PCR 扩增效率和测序成功率,存放 5 年的五味子和 4 年的南五味子药材仍可提取到 DNA。测序所得序列经校对拼接和注释处理后,所有五味子样品序列长度 231 bp,GC 质量分数(鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比率)59.7% ~ 60.1%;南五味子样品序列长度 225 ~ 227 bp,GC 质量分数 59.0% ~ 59.1%。

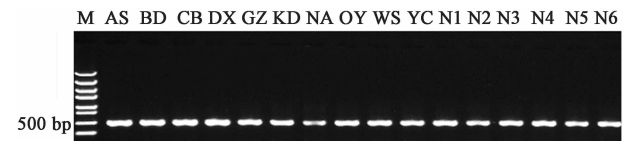


图 1 五味子与南五味子 ITS2 序列正、反引物的 PCR 扩增
Fig.1 PCR consequence of ITS2 bidirectional primers

2.5 种内和种间变异分析 五味子 10 个样品 ITS2 序列间的变异位点只有 YC 样品在 176 bp 处为 T,

其他样品均为 C; 南五味子样品在 52, 157 bp 位点处发生变异, N1 和 N2 样品在 52, 157 bp 位点分别为 C 和 A, N3, N4, N5 样品分别为 T 和 C, N6 样品为 C 和 C。五味子属不同种间在 7, 31, 36, 52, 157, 176, 223 bp 存在 7 处碱基变异位点, 五味子与南五味子药材的种间 K2P 遗传距离(0.010 4 ~ 0.015 7) 远大于五味子种内 K2P 遗传距离(0 ~ 0.002 5) 和

南五味子种内 K2P 遗传距离(0 ~ 0.005 1), 见表 3。对于这 2 个物种, 种内遗传分化明显低于种间遗传分化, 表明可使用 ITS2 片段作为基因标记来进行鉴定。五味子样品在位点 7, 31, 36, 223 bp 处和南五味子样品有差异, 故可根据这些信息进行有效鉴别, 见表 4。说明 ITS2 片段可用于区分五味子和南五味子药材。

表 3 五味子与南五味子药材样品 ITS2 序列的 K2P 遗传距离

Table 3 K2P genetic distance of ITS2 sequences of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus samples

	AS	BD	CB	DX	GZ	KD	NA	QY	WS	YC	N1	N2	N3	N4	N5
AS															
BD	0														
CB	0	0													
DX	0	0	0												
GZ	0	0	0	0											
KD	0	0	0	0	0										
NA	0	0	0	0	0	0									
QY	0	0	0	0	0	0	0								
WS	0	0	0	0	0	0	0	0							
YC	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5	0.002 5					
N1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.015 7				
N2	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.013 1	0.015 7	0			
N3	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.015 7	0.005 1	0.005 1		
N4	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.015 7	0.005 1	0.005 1	0	
N5	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.013 0	0.015 7	0.005 1	0.005 1	0	0
N6	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.010 4	0.013 0	0.002 6	0.002 6	0.002 5	0.002 5

表 4 五味子、南五味子样品与 GenBank 中五味子、华中五味子 ITS2 序列种间变异位点

Table 4 Interspecific variable sites in ITS2 sequence of medicinal material samples and ITS2 sequence of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus in GenBank

序列	位点/bp				
	7	31	36	223	
五味子	AS, BD, CB, DX, GZ, KD, NA, QY, WS, YC	A	T	G	T
	AB558158.1	*	*	*	*
	AF263441.1	*	*	*	*
	JF970271.1	*	*	*	*
南五味子	N1, N2, N3, N4, N5, N6	T	C	T	A
	AF163705.1	T	C	T	A
	AF263437.1	T	C	T	A

注: “*” 表示与第 1 列碱基相同。

2.6 NJ 树聚类分析 使用 10 份五味子样品, 6 份南五味子样品及外类群南五味子属冷饭团 *K. coccinea* 的 2 个 ITS2 序列构建 NJ 树, 见图 2。结果

3 个种群均被区分开来, 且 Bootstrap 支持率 > 91%。另将测得的 16 个 ITS2 序列及从 GenBank 中获取的五味子属 12 个 ITS2 序列与南五味子属冷饭团 2 个

ITS2 序列构建 NJ 树, 见图 3。结果显示所有序列被聚为三大支, 其中冷饭团被单聚为 1 支, 与五味子属能够明显地区分开; 重瓣五味子、铁箍散和合蕊五味子被聚到了一大支; 五味子、南五味子样品与 GenBank 中五味子、华中五味子、红花五味子、毛叶五味子、翼梗五味子和金山五味子聚为一大支, 关系较近。五味子药材及 GenBank 中五味子共 13 个序列、南五味子药材及 GenBank 中华中五味子共 8 个序列被各自聚到了一支, 表现出单系性, 且支持率较高, 说明使用 ITS2 序列片段也可将五味子与南五味子药材等近缘种区分开来。五味子药材及 GenBank 中华中五味子 ITS2 序列、南五味子药材及 GenBank 中华中五味子 ITS2 序列能够各自表现出单系性, 说明五味子和南五味子药材的 ITS2 信息与其基原植物中的 ITS2 信息相近, 可同时进行鉴定。

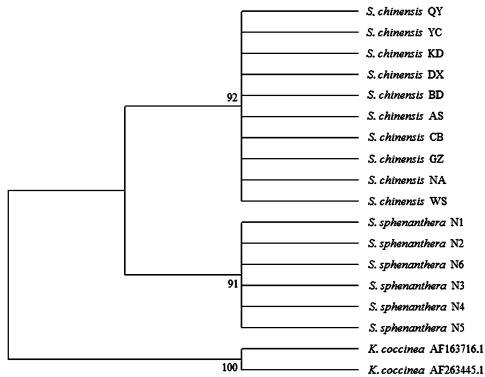


图 2 基于 NJ 树法(五味子与南五味子药材样品的 ITS2 数据)构建系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ tree method (ITS2 data of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus)

2.7 Blast 法鉴定 采用 Ross 等^[20]报道的 Blast 法对五味子及南五味子样品比对。结果表明 AS, BD, CB, DX, GZ, KD, NA, QY, WS, YC 等供试样品均为五味子, 对五味子药材样品的鉴定效率 100%, 参考序列 AB558158.1; 对比表明 N1, N2, N3, N4, N5, N6 等样品均为华中五味子, 对于南五味子药材样品也能 100% 鉴定到种, 参考序列 AF263437.1。

2.8 五味子、南五味子样品 ITS2 序列的二级结构分析 ITS2 序列二级结构的比较见图 4, 所有样品的二级结构均由一个中心环(主环)及 4 个螺旋区构成。五味子、南五味子药材的主要差异位于螺旋区(helix) I, III, IV 区, 表现在茎环(loop)的数目、大小、位置上, 主要差异在于南五味子 helix III 比五味子 helix III 多 1 个茎环、五味子 helix IV 比南五味子 helix IV 多 1 个茎环。

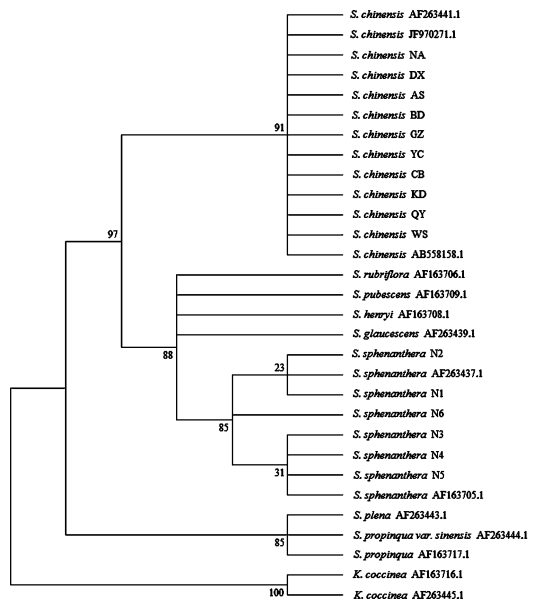
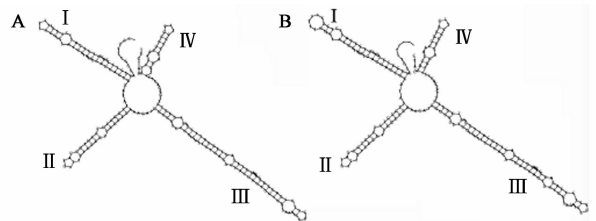


图 3 基于 NJ 树法(五味子与南五味子药材及 GenBank 中其他近缘种的 ITS2 数据)构建系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on NJ tree method (ITS2 data of Schisandrae Chinensis Fructus, Schisandrae Sphenantherae Fructus and other relative species sequences in GenBank)



A. 五味子 AS 样品; B. 南五味子 N1 样品

图 4 五味子、南五味子样品 ITS2 序列的二级结构比较

Fig. 4 ITS2 secondary structure of Schisandrae Chinensis Fructus and Schisandrae Sphenantherae Fructus

3 讨论

现已有许多中药 DNA 条形码研究的报道, 但大多数是从原植物叶片中提取 DNA。然而药材更多出现在市场流通及临床使用中, 所以直接从药材中提取到 DNA 进行分子鉴定研究更具有现实意义^[21]。本文采用来自全国 8 个省共 16 个市县地区的 16 份五味子及南五味子药材为实验材料, 有较高的 DNA 提取和测序成功率, 说明该方法适用于果实类药材五味子和南五味子, 且 DNA 条形码鉴定技术对于二者的稳定性良好, 不同产地和不同批次的样品均能稳定地获得 DNA 条形码序列。为尽可能降低真菌 ITS2 序列的影响, 实验样品用 75% 乙醇擦洗以避免污染, 16 个样品无一扩增出真菌序列。另外, 对五味子的果肉、种子、种皮及种仁分别进行了

DNA 提取,发现五味子种子和种仁中也能够较好地提取出 DNA,且 PCR 扩增和测序成功,所得序列与同产地药材 ITS2 序列相同,这可能与五味子种子中含有大量 DNA 有关。对于一些五味子原粉入药的中成药,由于五味子种皮质硬,粉碎后也保留于药物组成中,故可为含五味子中成药的 DNA 条形码鉴定研究提供参考。

五味子是辽宁省重要的道地药材,具有极高的药用和保健价值。南五味子也有广泛的应用,在 2010 年版《中国药典》一部中已将二者明确分为 2 种不同的药材,并制定了各自的检验标准。由于二者外观不易区分,成分指标单一,缺乏专属性,不易进行有效鉴别,需使用更加科学、有效、全面的方法进行鉴别。通过本文研究,五味子与南五味子药材的 ITS2 序列较短,有明显的变异性,便于扩增,结合二级结构信息能准确地鉴定其物种,说明使用 DNA 条形码技术能有效地鉴定五味子与南五味子药材,即使不具备分类学背景知识和经验的人员,仍可准确进行物种鉴定。ITS2 序列可作为鉴定五味子和南五味子药材的 DNA 条形码序列,对中药材的标准化及安全使用、分子鉴定等方面具有极其重要的意义。

[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,2010:61-62,227-228.
[2] 李时珍. 本草纲目. 校点本. 二册[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:1239.
[3] 向婷婷,周志勇,刘朝奇,等. DNA 条形码鉴定药用植物的研究进展[J]. 时珍国医国药,2015,26(1):181-183.
[4] 夏至,冯翠元,高致明,等. 黄芩及其同属近缘种的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中草药,2014,45(1):107-112.
[5] 张忠廉,宋美芳,李海涛,等. 千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中草药,2015,46(1):118-122.
[6] Hou D Y, Song J Y, Yao H, et al. Molecular identification of Corni Fructus and its adulterants by ITS/ITS2 sequences[J]. Chinese J Nat Med, 2013, 11(2):121-127.
[7] 王晓玥,陈晓辰,廖保生,等. 基于 DNA 条形码鉴定豆蔻类中药材[J]. 中国现代中药,2014,16(11):888-894.

[8] 杨桂玲,陈晓妮. 广陈皮 DNA 条形码的初步研究[J]. 广州化工,2015,43(2):72-73.
[9] 严华,董亚娟,程显隆,等. 南柴胡与常见混伪品的鉴别方法研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(2):109-114.
[10] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1):e8613.
[11] Li X K, Wang B, Han R C, et al. Identification of medicinal plant *Schisandra chinensis* using a potential DNA barcode ITS2[J]. Acta Soc Bot Pol, 2013, 82(4):283-288.
[12] 李先宽,王冰,郑艳超,等. 五味子特殊类型白果五味子的 ITS2 序列鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):2011-2015.
[13] 苑广信,孙绩岩,范新田. 南北五味子随机扩增 DNA 多态性(RAPD)指纹图谱研究[J]. 北华大学学报,2014,15(1):54-57.
[14] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5. 8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1/2):50-57.
[15] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biol, 2005, 3(12):e422.
[16] Moritz C, Cicero C. DNA barcoding: promise and pitfalls [J]. PLoS Biol, 2004, 2(10):e354.
[17] Lahaye R, Warner J, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(8):2923-2928.
[18] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(30):11030-11035.
[19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10):2731-2739.
[20] Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation [J]. Syst Biol, 2008, 57(2):216-230.
[21] Cheng X W, Chen X H, Su X Q, et al. DNA extraction protocol for biological ingredient analysis of Liuwei Dihuang Wan [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2014, 12(3):137-143.

[责任编辑 刘德文]