

峨嵋山区姜科药用植物 ITS2 序列分析

任瑶瑶, 江南屏, 张良, 宋良科, 刘睿颖, 谭睿*
(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] **目的:**评价以 ITS2 序列作为 DNA 条形码对峨眉山地区姜科药用植物的鉴定。**方法:**于四川省峨眉山地区采集姜科药用植物样本 43 个,提取其基因组 DNA,进行转录间隔区(ITS)2 序列 PCR 扩增、测序,从 GenBank 上下载 40 条姜科植物 ITS2 序列;运用 MEGA6.0 软件对所有样本序列种间和种内遗传距离进行计算分析,构建 neighbor joining(NJ)系统进化树;利用 TAXON DNA 软件分析序列种内、种间变异并作 barcoding gap 分析;从 ITS2 数据库中预测并比较样本 ITS2 序列的二级结构差异。**结果:**姜科样本种间最小距离大于种内最大距离,有较为明显的 barcoding gap;NJ 进化树中各属样本分别聚山姜属(*Alpinia*),姜黄属(*Curcuma*),舞花姜属(*Globba*),姜花属(*Hedychium*),姜属(*Zingiber*)五大支,种内之间于各属分支中各聚为小支;各属及各种样本 ITS2 二级结构存在差异明显。**结论:**以 ITS2 序列作为 DNA 条形码,能够对姜科药用植物进行准确、快速的识别和鉴定,准确地弄清物种之间的系统进化关系,为该属药用植物的分布、种群及种群量研究提供指导,对其质量控制、安全用药及资源保护及合理开发利用提供理论依据。

[关键词] 姜科; DNA 条形码; 转录间隔区(ITS)2 序列; 二级结构; 鉴定; 资源调查

[中图分类号] R284.1;R282.5;R289;R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0217-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182209

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180831.1248.002.html>

[网络出版时间] 2018-08-31 16:45

Analysis of Zingiberaceae in E'mei Area Using ITS2 Sequences

REN Yao-yao, JIANG Nan-ping, ZHANG Liang, SONG Liang-ke, LIU Rui-ying, TAN Rui*
(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the use of ITS2 sequences as DNA barcode to identify the Zingiberaceae medicinal plants from E'mei area. **Method:** The genomic DNAs were extracted from 43 Zingiberaceae medicinal plant samples from Sichuan E'mei area. The ITS2 sequences of these samples were amplified and bidirectionally sequenced by PCR. 40 ITS2 sequences were downloaded from the GenBank, and then the interspecific and intraspecific genetic distances were calculated and analyzed by using MEGA 6.0 to construct Neighbor-joining (NJ) tree; TAXON DNA software was also used to analyze intraspecific and interspecific variations and barcoding gaps. The differences in secondary structure of the ITS2 sequences were predicted and compared. **Result:** The minimum interspecific distance in Zingiberaceae samples was greater than the maximum intra specific distance, with obvious barcoding gap. The NJ tree showed that the samples were clustered into five different branches, *Alpinia*, *Curcuma*, *Globba*, *Hedychium*, and *Zingiber* respectively, and further cluster into sub-branches. Significant differences were also present in the secondary structures of ITS2 between different samples. **Conclusion:** ITS2 sequences as DNA barcode can be used to conduct accurate and rapid identification of the Zingiberaceae plants and clearly figure out the phylogenetic relationship among them, providing guidance for

[收稿日期] 20180520(011)

[基金项目] 四川省重点研发项目(2018SZ0061);国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304-307-001-019);四川省中医药管理局项目(2016Z013)

[第一作者] 任瑶瑶, 硕士, 工程师, 从事中药学研究, E-mail: yyren82@163.com

[通信作者] * 谭睿, 教授, 博士生导师, 从事民族药的资源保护及有效利用, E-mail: tanrui@swjtu.edu.cn

the study of the distribution of medicinal plants of this genus, as well as theoretical basis for the quality control, medication safety and rational development of Zingiberaceae medicinal plants in E'mei area.

[**Key words**] Zingiberaceae; DNA bar code; ITS2; secondary structure; identification; resource utilization

峨眉山位于中国四川峨眉山市境内,以山峰相对如峨眉而名,最高峰万佛顶海拔 3 099 m。由于岩层和土质复杂,气候垂直差异很大,为植物生长创造了各种小环境,从山脚到山顶分布着不同的药用植物^[1]。药用植物就有 1 655 种,分属 212 科,868 属。《孔子图记》记载“峨眉有仙药,汉武帝遣使者祭之。”^[2]峨眉山有丰富的姜科药用资源,姜科植物中有较多种是传统的药食两用植物,主要活性成分有多糖、黄酮和精油等^[3]。中国约有 21 属近 200 种,分布于东南部至西南部各省区^[4],其中具有药用价值的植物有 15 属,1 655 余种^[5]。峨眉山地区更是广泛分布有峨眉姜花。

传统的形态鉴定法依赖鉴定者的专业知识和经验积累,对近源物种的识别存在困难^[6]。DNA 条形码是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术^[7],是现在的中药鉴定的研究热点。陈士林等^[8]首次提出将转录间隔区(ITS)2 序列作为药用植物鉴定的通用条形码序列。本实验采集峨眉山不同地区姜科植物,并从 GenBank 下载序列,以 ITS2 序列作为 DNA 条形码,分析遗传距离,Neighbor Joining(NJ)系统进化树和 ITS2 序列二级结构,对姜科植物进行鉴定。通过 DNA 条形码技术对姜科植物的分类研究,避免姜科植物的混淆,也对具有药用价值的姜科植物提供了研究基础。

1 材料

1.1 样品采集 从四川省峨眉山黄湾乡、张坝村、龙池镇、高桥镇、雷坪洞不同区域采集了 43 份姜科植物样本,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,分别为囊荷(*Zingiber mioga*),盘珠姜花(*Hedychium flavescens*),峨眉姜花(*H. emeiense*),峨眉舞花姜(*Globba emeiensis*),四川山姜(*Alpinia sichuanensis*),艳山姜(*A. zerumbet*),莪术(*Curcuma zedoaria*)。其中囊荷样品 5 份、盘珠姜花样品 6 份、峨眉姜花样品 5 份、峨眉舞花姜样品 8 份、四川山姜样品 8 份、艳山姜样品 3 份、莪术样品 2 份,样品信息详见表 1,标本保存于西南交通大学标本室。同时在 GenBank 数据库中下载姜科植物 ITS2 序列 40 条,信息见表 2。

1.2 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP305-02],引物(TSINGKE,批号 P1701005962,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,正向 ITS2F,反向 ITS2R)。

2 方法

2.1 样品 DNA 提取,PCR 扩增及测序 取干燥、干净的样品 20~30 mg,加入液氮充分碾磨,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。以样品 DNA 作为模板,使用如下所述的引物扩增 ITS2 条码,正向引物 ITS2F:5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3';反向引物 ITS2R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'^[9]。PCR 反应以样品基因组 DNA 为模板的 50 μL 中进行,参照 PCR 反应试剂盒的说明。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min^[10]。将 PCR 产物送至北京梓熙生物科技有限公司进行测序。

2.2 数据处理 引物区,使用 CondonCode Aligner 6.0.2 进行编辑和组装。隐马尔可夫模型(HMMer)软件用于注释 ITS2 区域。使用 MEGA 6.0.31 计算遗传距离。使用 Kimura 2-paramete 参数(K2P)模型分析每个基因座的成对种间和种内距离,验证“条码间隙”明显大于种内变异的种间分歧的存在。

采用 CodonCode Aligner 6.0.2(CodonCode Co., U.S.A)对所得序列峰图进行编辑拼接,由基于 HMMer 的注释 ITS2 区域,获得标准的 ITS2 间隔区序列^[11]。所有 ITS2 序列用 MEGA7.0 比对计算遗传距离^[12],使用 K2P 模型分析每个基因座的成对种间和种内距离,验证种间变异明显大于种内变异的分歧,相邻结合法(neighbor joining,NJ)构建系统进化树^[10],利用 MEGA7.0 进行靴带检验法(Bootstrap,1000 重复)检验各分支的支持率。利用 TAXON DNA 1.8 和 DNAMAN 8.0 软件对所有样本种内、种间遗传距离进行分布频度及样本序列的变异程度进行分析,评价 Barcoding gap。根据 Koetschan 等^[13]建立的 ITS2 数据库网站预测 ITS2 序列的二级结构。

3 结果

3.1 K2P 遗传距离分析 物种间种内遗传距离、种

表 1 姜科植物样本信息

Table 1 Information of *Zingiberaceae* plant samples

植物名称	拉丁名	序列长度/bp	GC 比例/%	来源	GenBank 登录号
襄荷	<i>Zingiber mioga</i>	260.0	62	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992328
襄荷	<i>Z. mioga</i>	260.0	62	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992329
襄荷	<i>Z. mioga</i>	259.0	61	四川省峨眉山市张坝村	KY992330
襄荷	<i>Z. mioga</i>	260.0	62	四川省峨眉山市龙池镇	KY992331
襄荷	<i>Z. mioga</i>	260.0	62	四川省峨眉山市雷洞坪	KY992332
盘珠姜花	<i>Hedychium flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992333
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992334
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市张坝村	KY992335
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市龙池镇	KY992336
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市雷洞坪	KY992337
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市高桥镇	KY992338
盘珠姜花	<i>H. flavescens</i>	227.0	63	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769566
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769568
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769569
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769570
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市高桥镇	MF769571
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市高桥镇	MF769572
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769573
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市高桥镇	MF769574
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市高桥镇	MF769575
峨眉姜花	<i>H. emeiense</i>	227.0	64	四川省峨眉山市高桥镇	MF769576
姜花	<i>H. coronarium</i>	227.0	64	广州中山	KF304520
姜花	<i>H. coronarium</i>	227.0	64	广州中山	KF304521
姜花	<i>H. coronarium</i>	227.0	64	广州中山	KF304522
峨眉舞花姜	<i>Globba emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市张坝村	KY992341
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市张坝村	KY992342
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市龙池镇	KY992343
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市龙池镇	KY992344
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市雷洞坪	KY992345
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市高桥镇	KY992346
峨眉舞花姜	<i>G. emeiensisiniana</i>	230.0	58	四川省峨眉山市黄湾乡	MF769573
四川山姜	<i>Alpinia sichuanensis</i>	229.0	60	四川省峨眉山市高桥镇	KY992347
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	60	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992348
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	60	四川省峨眉山市张坝村	KY992349
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	60	四川省峨眉山市张坝村	KY992350
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	59	四川省峨眉山市龙池镇	KY992351
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	59	四川省峨眉山市雷洞坪	KY992352
四川山姜	<i>A. sichuanensis</i>	229.0	59	四川省峨眉山市高桥镇	KY992353
艳山姜	<i>Alpinia zerumbet</i>	229.0	59	四川省峨眉山市黄湾乡	KY992354
艳山姜	<i>A. zerumbet</i>	229.0	59	四川省峨眉山市张坝村	KY992355
艳山姜	<i>A. zerumbet</i>	229.0	59	四川省峨眉山市龙池镇	KY992356
莪术	<i>Curcuma zedoaria</i>	237.0	60	四川省峨眉山市雷洞坪	KY992357
莪术	<i>C. zedoaria</i>	237.0	60	四川省峨眉山市高桥镇	KY992358

表 2 GenBank 下载姜科植物样本 ITS2 序列

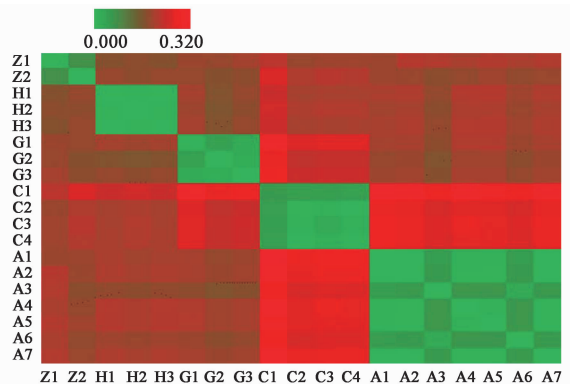
Table 2 ITS2 sequences of species in family Zingiberaceae downloaded from GenBank

名称	拉丁名	属	GenBank 登录号
海南山姜	<i>Alpinia hainanensis</i>	山姜属	AY742355, GQ434438, JF421464
光叶山姜	<i>A. intermedia</i>	山姜属	FJ496803, FJ496802, FJ496810, FJ496811
菱唇山姜	<i>A. kusshakuensis</i>	山姜属	FJ496850, FJ496851
毛瓣山姜	<i>A. malaccensis</i>	山姜属	KF304427, KF304433, KF359971
箭杆风	<i>A. jianganfeng</i>	山姜属	AY188289
大花山姜	<i>A. uraiensis</i>	山姜属	FJ496838, FJ496840, FJ496841, FJ496843
朥果姜	<i>Curcuma amada</i>	姜黄属	KF304462, KF304468
郁金	<i>C. aromatica</i>	姜黄属	GQ434451, JQ409958
川黄姜	<i>C. chuanhuangjiang</i>	姜黄属	KF694821, KF694814
-	<i>Globba ophioglossa</i>	舞花姜属	KF304507, KF304508, KF304509
舞花姜	<i>G. racemosa</i>	舞花姜属	AY339694, AY339698, AY339699, AY339703
盘珠姜花	<i>Hedychium flavescens</i>	姜花属	KF304523, KF304527
姜花	<i>H. coronarium</i>	姜花属	GQ434447, KF304520, KF304521, KF304522
毛姜	<i>Zingiber kawagooi</i>	姜属	HM116878, HM116882, HM116884, HM116885

间遗传距离的大小是判断其是否适合条形码鉴定的标准。种间遗传距离越大、种内遗传距离越小的样本则越适合于条形码鉴定。应用 MEGA 7.0 软件基于 K2P 距离模型计算样本种内、种间变异距离值, 结果见图 1。由热图可见, 姜科样品种内、属内遗传距离较小, 为图中颜色最浅的区域; 盘珠姜花、姜花、峨眉姜花种间 ITS2 序列遗传变异较小; 各属之间遗传距离较大, 为图中颜色较深区域; 黄姜属与山姜属样本种间变异值较大, 在热图中所最硬的区域颜色最深。分析统计样本种内和种间遗传距离分布发现, 样本间存在较为明显的 Barcoding gap, 说明 ITS2 序列对姜科样本在种水平上鉴定能力较强; 种间变异距离值主要集中在 0.080 ~ 0.300。见图 2。

3.2 种内种间的变异分析 对样本测序结果进行拼接并 HMMer 的注释方法切除 ITS2 两端的 5.8S 和 28S 区域, 得到的 50 条 ITS2 序列, 其中盘珠姜花、峨眉姜花、姜花的 ITS2 序列长度均为 227 bp, 囊荷序列长 259 ~ 260 bp, 峨眉舞花姜、四川山姜、艳山姜、莪术序列长分别为 230, 229, 229, 237 bp。所有序列 GC 含量 58.0% ~ 61.0%, 见表 1。应用 MEGA6.0 软件进行多序列比对, 种内变异位点少, 仅有 0 ~ 2 个变异位点, 种间变异位点 128 个, 简约信息位点 93 个, 分别占总序列长度的 47.57%, 34.83%, 见表 3。

3.3 NJ 树分析 根据 ITS2 序列对所有样本构建 NJ 系统聚类树, 利用 Bootstrap 1 000 次检验各分支的支持率。从 NJ 进化树图可以看出, 所有样本属



Z1, Z2, H1, H2, H3, G1, G2, G3, C1, C2, C3, C4, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 分别代表 *Zingiber mioga*, *Z. kawagooi*, *Hedychium omeiense*, *H. flavescens*, *H. coronarium*, *Globba racemosa*, *G. ophioglossa*, *G. emeiensis*, *Curcuma zedoaria*, *C. chuanhuangjiang*; *C. aromatica*, *C. amada*; *Alpinia zerumbet*; *A. uraiensis*; *A. sichuanensis*; *A. malaccensis*; *A. kusshakuensis*; *A. intermedia*; *A. hainanensis* (表 3 同)

图 1 姜科植物样本种间和种内距离分析

Fig. 1 Analysis of intra and inter distances of Zingiberaceae plant samples

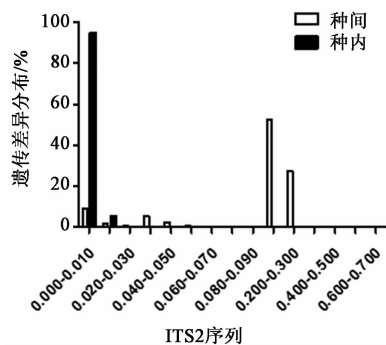


图 2 姜科植物样本 ITS2 序列种内和种间变异分布

Fig. 2 Distribution of genetic divergence

分别聚为山姜属 (*Alpinia*), 姜黄属 (*Curcuma*), 舞花姜属 (*Globba*), 姜花属 (*Hedychium*), 姜属 (*Zingiber*), 各属内各种样本聚为小枝, 分支之间靴带检验法 (Bootstrap) 支持率在 50% 以上, 物种之间可明显区分开。见图 3。

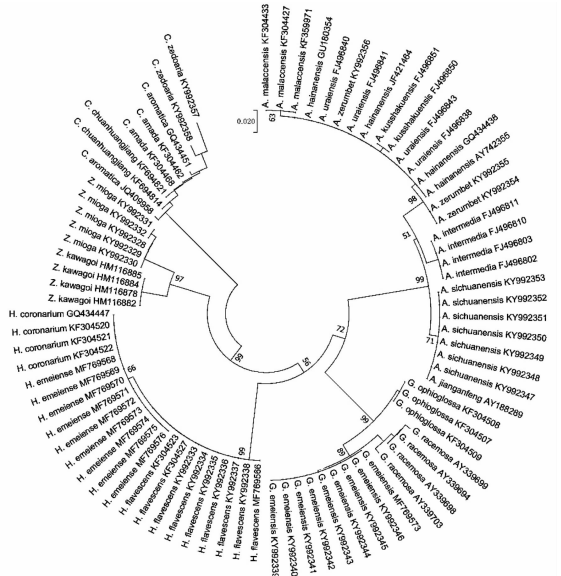


图 3 基于 ITS 序列构建的姜科植物样本的 NJ 树
Fig. 3 NJ tree of *Zingiberaceae* plant samples according to ITS2 sequences

3.4 ITS2 二级结构的分析 姜科植物样本 ITS2 序列的二级结构见图 4, 从样本的二级结构中可以看出, 各属样本的 ITS2 的二级结构较为相似, 只是在各个螺旋区 (Helix) 上的茎环 (Loop) 数量或大小存在差异。姜花属的姜花、峨眉姜花 ITS2 序列二级结构极为相似, 中心环和螺旋 I, II, III 区均一致, 但 IV 区上有两个茎环存在差异, 能够将二者区分开。其他姜科各种样本 ITS2 序列之间均存在较大差异, 运动 ITS2 序列作为 DNA 条形码, 能够将姜科样本鉴别区分开来。

4 结论

DNA 条形码技术建立了一种对形态学分类技术要求不高且准确、方便、快捷的生物分类鉴定方法^[14-16]。ITS2 是核糖体 DNA 上的内转录间隔区, 在植物类药材的 DNA 条形码鉴定中广泛应用^[17], ITS2 序列对植物具有良好的扩增成功率和物种水平的鉴定成功率, 以 ITS2 序列作为 DNA 条形码对植物的鉴定进行研究可以达到即快速又准确^[18]。本研究将 43 份姜科植物样本进行 PCR 扩增、测序, 成功获得双向序列, 用 CodonCode Aligner 软件拼接序列, HMMer 的注释方法得到 ITS2 间隔区序列; 并从 GenBank 上下载同科序列 40 条。以 MEGA 7.0

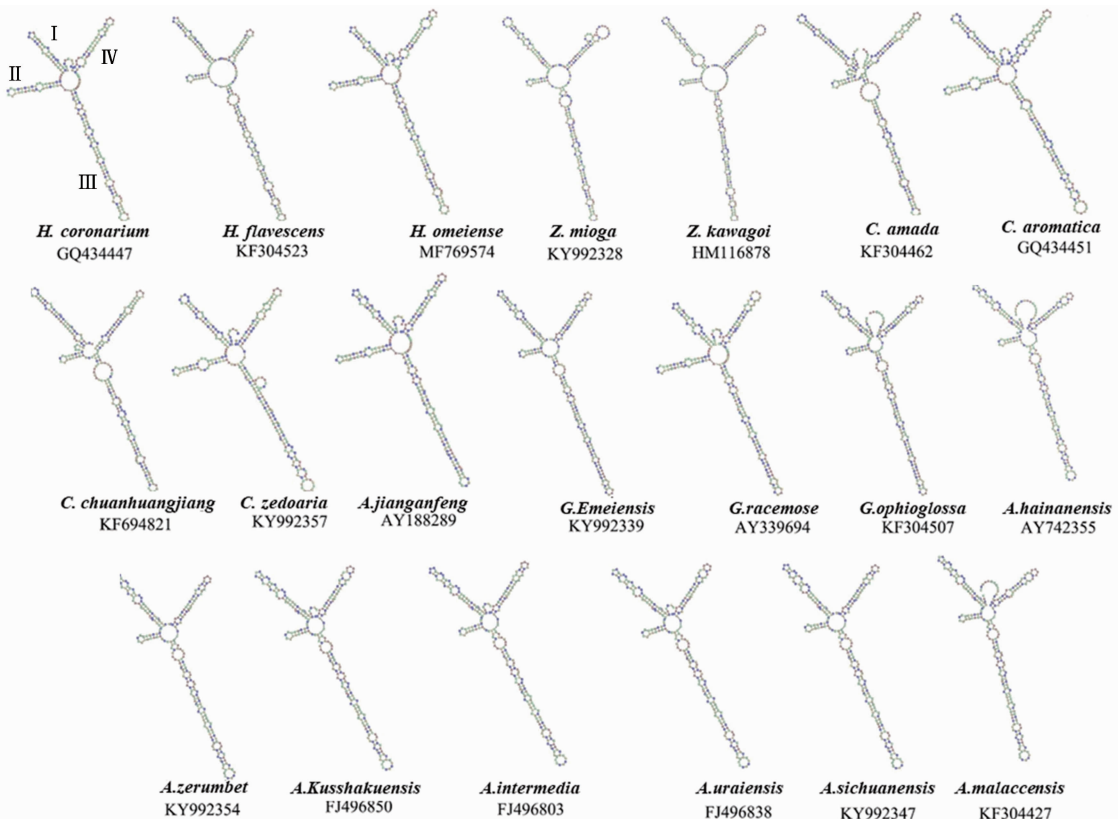


图 4 姜科 ITS2 序列的二级结构
Fig. 4 Secondary structures of ITS2 sequences of *Zingiberaceae* plant samples

等软件分析样本间变异位点、种内种间的遗传距离和构建的 NJ 进化树,并对其样本间的序列相似度和 Barcoding gap 进行考察。结果发现以 ITS2 序列作为 DNA 条形码对姜科药用植物样本具有很好的鉴定作用。

峨眉姜花作为峨眉山地区的特有植物,外形上与盘珠姜花和姜花极其相似,通过形态学的鉴定方法较难准确地对三者进行鉴定^[19]。以 ITS2 序列作为 DNA 条形码,通过 NJ 树聚类和 ITS2 二级结构均能够更加准确和快速的对三者进行区分鉴定。外形亦十分相近四川山姜与箭杆风,虽在 NJ 树聚类时区分较不明显,但其 ITS2 序列二级结构存在明显差异^[20]。

峨眉山物种繁多,具有得天独厚的生物多样性,因此药用资源丰富,有“仙山药园”之称,品类齐全,潜力巨大,峨眉山资源植物品类齐全,尤其是在药用、观赏、食用等方面的资源植物最为丰富多样^[21]。峨眉山温暖潮湿的环境,有利于姜科植物的生长,有些峨眉山特有的姜科植物如峨眉舞花姜、四川山姜等具有很好的药用价值。但是峨眉山的药用植物种类多,产量少,部分药材尚未见规范化栽培,人们对种质资源破坏的日益严重,通过对峨眉山姜科植物的分析研究,在不影响植物种类发展的基础上,进行合理的开发利用,更好的保护姜科植物资源^[22]。

[参考文献]

[1] 周翔. 峨眉山名山风景区景观序列研究[D]. 重庆:重庆大学,2008:3.
[2] 蒋虎臣. 峨眉山志. 卷 2 [M]. 壁经堂,1672.
[3] 李萍,何丽华,魏华,等. 姜科植物精油抑菌作用的进展研究[J]. 食品工业科技,2014,35(6):377-382.
[4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 16(2)卷[M]. 北京:科学出版社,1981.
[5] 鲁松,谢孔平,李策宏. 峨眉山野生濒危药用植物资源评价体系的初步研究[J]. 广西植物 2013,33(2):229-235.
[6] 石林春,金钺,赵春颖,等. 基于 DNA 条形码技术的知母种子基原鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):21-27.
[7] 王孟虎,许亮,康廷国,等. 动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):227-234.

[8] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 regions a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5(1):e8613.
[9] 任瑶瑶,江南屏,刘睿颖,等. 藏药臭蒿及其近缘种药材的 ITS2 DNA 条形码鉴别[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1395-1400.
[10] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
[11] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430(1):50-57.
[12] 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.
[13] Koetschan C, Förster F, Keller A, et al. The ITS2 database III-sequences and structures for phylogeny[J]. Nucleic Acids Res,2010,38(suppl 1):D275-D279.
[14] 任瑶瑶,张良,谢博文,等. 峨眉山桑科药用植物 ITS2 条形码序列鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2018,20(1):140-145.
[15] 王孟虎,康廷国,许亮,等. 基于 COI 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(8):1572-1577.
[16] 樊丛照,徐建国,李亚伟,等. 基于 DNA 条形码技术的维吾尔药材桑葚基原鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(16):3219-3224.
[17] 许亮,刘春生,杨燕云,等. DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):127-129.
[18] 朱英杰,陈士林,姚辉. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报,2010,45(3):376-382.
[19] 祝正银. 峨眉山姜花属二新种[J]. 云南植物研究,1984,6(1):63-66.
[20] 祝正银. 四川山姜属一新种[J]. 广西植物,1987,7(4):295-296.
[21] 吴荭,庄平,张超,等. 峨眉山资源植物研究[J]. 资源开发与市场,2011,27(4):347-351.
[22] 秦运潭,王书林,王金鹏. 峨眉山珍稀濒危药用植物保护研究[J]. 中国医药指南,2011,9(32):279-280.

[责任编辑 顾雪竹]