

娑罗子基原物种的 DNA 条形码鉴定研究

石召华^{1,2}, 陈士林³, 姚辉⁴, 叶利春², 宋经元⁴, 关小羽¹, 刘享平^{1*}

1. 武汉爱民制药有限公司, 湖北 鄂州 436070

2. 湖北省天然组合物工程技术研究中心, 湖北 鄂州 436070

3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

4. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193

摘要: 目的 筛选出适用于鉴定七叶树属药用植物的条形码序列。方法 考察了七叶树属 10 个物种 42 份样品的核 ITS、ITS2 与叶绿体 *psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 序列的 PCR 扩增和测序效率、种内及种间变异、鉴定效率, 对初筛后的序列进行 barcoding gap 检验及 NJ 树聚类分析。结果 *psbA-trnH* 序列的 PCR 扩增和测序效率均为 100%, 种间最小变异大于其种内最大变异, 且鉴定效率为候选序列中最高, barcoding gap 检验结果表明该序列在种间、种内变异重合比例较小, 且 NJ 树聚类分析结果也表明 *psbA-trnH* 序列能够提供充分的辨析效果。结论 *psbA-trnH* 序列能准确鉴定七叶树属药用植物, 可作为七叶树属药用植物条形码序列。

关键词: 七叶树属; DNA 条形码; 物种鉴定; *psbA-trnH*; *rbcL*; *matK*

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2593-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.021

DNA barcode identification of original species in *Aesculus* Linn.

SHI Zhao-hua^{1,2}, CHEN Shi-lin³, YAO Hui⁴, YE Li-chun², SONG Jing-yuan⁴, GUAN Xiao-yu¹, LIU Xiang-ping¹

1. Wuhan Aimin Pharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436070, China

2. Hubei Engineering Technology Centre of Natural Component Medicine, Ezhou 436070, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

4. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To screen the DNA barcodes for identifying the species in genus *Aesculus* Linn. **Methods** The PCR amplification and sequencing efficacy, intraspecific and interspecific variation, and identification efficiency of nuclear ITS, ITS2, chloroplast *psbA-trnH*, *rbcL*, and *matK* sequences from 42 samples of 10 species in genus *Aesculus* Linn. were investigated. The screened sequences were determined by barcoding gap and NJ tree clustering analysis. **Results** The PCR amplification and sequencing efficacy of *psbA-trnH* were 100%, the interspecific minimum variation was larger than the intraspecific maximum variation, and *psbA-trnH* had the highest identification efficacy. The *psbA-trnH* sequence had less polymerization of intraspecific and interspecific variation. By constructing the NJ tree, thorough verifying the three original plants could be used to separate with other related species. **Conclusion** The *psbA-trnH* sequence is a powerful, though not perfect, barcode for the identification of species in *Aesculus* Linn.

Key words: *Aesculus* Linn.; DNA barcode; species identification; *psbA-trnH*; *rbcL*; *matK*

七叶树属 *Aesculus* Linn. 为无患子目七叶树科 (Hippocastanaceae) 落叶乔木, 主要分布在亚洲、欧洲、美洲, 约有 30 余种^[1]。我国有 10 余种, 主要分布于湖北、云南、四川、陕西、浙江、广西、甘肃

等地, 大部分为野生, 有极少数地区形成产业化。该属植物在产地民间多作理气药使用, 其中中华七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge、浙江七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge var. *chekiangensis* (Hu et Fang) Fang

收稿日期: 2013-03-07

基金项目: 湖北省重大科技攻关项目 (2012BCA02)

作者简介: 石召华 (1978—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药资源和质量研究。Tel/Fax: (0711)3818216 E-mail: whimyf@163.com

*通信作者 刘享平 Tel/Fax: (0711)3818208 E-mail: lxp821@sina.com

和天师栗 *Aesculus wilsonii* Rehd 的干燥成熟种子是《中国药典》2010 年版收载的常用中药材娑罗子, 具有疏肝、理气、和胃、止痛、杀虫之功效^[2]。现代药理研究表明, 娑罗子在抗肿瘤、抗脑水肿、治疗高血压脑、出血、冠心病、美尼尔氏病、老年支气管哮喘、面神经炎等方面具有确切疗效^[3]。因市场需求量逐年提高, 医药公司的采购量也日益增大, 对娑罗子基原植物的野生资源破坏严重, 其产量呈下滑趋势, 且野生产量不稳定, 有大小年之分, 不能够满足市场需求, 娑罗子的采购价格一再攀升。为防止商品药材出现品种混杂、品质不一的问题, 寻找一种快速稳定的鉴别方法势在必行。现有的七叶树属植物鉴别方法主要有形态学及高效液相色谱法等, 为娑罗子的甄别筛选及药材品质控制提供了重要依据, 但其操作需要丰富的鉴定经验及复杂的实验条件。近年新兴的 DNA 条形码技术能够通过 DNA 序列对物种进行快速、准确的鉴别, 为中药材的鉴定提供了一种新的方法^[4]。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 由加拿大动物学家 Hebert 等^[5]首次提出, 即通过一段标准 DNA 片段, 对物种进行快速、准确地鉴定, 是近年来发展最迅速的学科之一。2009 年 8 月, CBOL (Consortium for the Barcode of Life) 植物工作组推荐 *rbcL*+*matK* 组合作为陆生植物的 DNA 通用条形码, 在同年 11 月被第三届国际生命条形码大会确定为核心条形码。由于该组合条形码还存在研究样本量偏小和物种分辨率低等问题, 大会建议 *psbA-trnH* 和 ITS 作为辅助条形码^[6]。陈士林等^[7]研究了 753 属 4 800 物种的 6 600 份植物样本, 检测了 *psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*、*rpoCl*、*ycf5*、ITS2 和 ITS 等植物候选条形码, 发现 ITS2 的鉴定成功率在物种水平达到 92.7%, 而众多学者推荐的 *psbA-trnH* 序列在扩增成功率和物种鉴定成功率方面也有着优良的表现^[8-9]。近年来, ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*、*matK*、*rbcL*+*matK* 这几个候选序列或序列组合由于通用性较好, 扩增成功率、有效序列获得率和物种鉴定成功率较高, 是植物条形码研究中重点推荐的候选序列^[10]。

本研究选取 ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 这 5 个热点候选序列针对七叶树科七叶树属 10 个物种 42 个样本进行比较研究, 验证各候选序列对该属植物的鉴定能力, 为 DNA 条形码技术应用于娑罗子药材基原物种的鉴定研究提供理论依据。

1 材料

10 个物种 42 份样本采自云南、四川、陕西、湖北、浙江和北京的各个分布区域, 采集新鲜嫩叶茎

胶快速干燥保存, 并对所选样品进行凭证标本、数字影像的采集, 经湖北中医药大学陈科力教授鉴定, 凭证标本和数字影像信息保存于武汉爱民制药有限公司研发中心药材 GAP 技术部, 样本信息见表 1。

2 方法

2.1 研究思路设计

分别选取七叶树属植物除大叶七叶树和欧洲七叶树外的 8 个不同物种的 16 份样品提取 DNA, 然后用表 2 中的 5 对引物进行 PCR 扩增、测序。针对测序结果分析, 筛选最佳条形码, 最后利用初步筛选出来的最佳条形码对全部样品进行鉴定分析。

2.2 DNA 的提取

材料均为硅胶干燥叶片, 取样约 40 mg, 用 DNA 提取研磨仪 (Retsch MM40, 德国) 研磨 2 min (30 次/s) 后, 利用植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取总 DNA。

2.3 PCR 扩增及测序

实验所需引物的序列、PCR 扩增反应程序参照文献方法^[7,11-12]设计, 见表 2。在 25 μ L 反应体系中包含有 2 μ L 模板 DNA (60 ng), 正反向引物 (2.5 μ mol/L) 各 1 μ L, 0.2 μ L *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μ L 10 \times 缓冲液, 2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L 染料 (Dye), 12.3 μ L ddH₂O。

PCR 反应在热循环仪 (Applied Biosystems Co., 美国) 上进行, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色后, 凝胶成像系统 (Bio-Rad) 紫外成像观察, 并记录结果。

PCR 扩增产物直接送测序, 测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., 美国) 进行双向测序。

2.4 数据处理方法

测序峰图利用 CodonCode Aligner V 3.0 (CodonCode Co., 美国) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 获得严格一致性 (consensus) 序列。对于从 GenBank 上获得的 ITS 序列, 使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 28S 区段, 获得 ITS2 间隔区序列全长^[11]。利用 Song 等^[12]方法, 将所有序列用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5.0 分析比对并基于 K-2-P 双参数模型进行遗传距离计算。最后采用 Ross 等^[13]报道的相似性搜索算法 (BLAST 1) 和最近距离法 (nearest distance) 计算各序列的鉴定成功率。

表 1 用于筛选候选条形码的样品

Table 1 Samples for screening potential barcodes

编号	基原植物	采集地	GenBank 号
1	天师栗 <i>A. wilsonii</i>	四川峨眉山	KC480179
2	天师栗	四川峨眉山	KC480180
3	天师栗	四川峨眉山	KC510147
4	天师栗	四川峨眉山	KC510148
5	天师栗	四川峨眉山	KC510149
6	天师栗	湖北鹤峰县	KC480181
7	天师栗	湖北宣恩县	KC510150
8	天师栗	湖北宣恩县	KC510151
9	天师栗	湖北宣恩县	KC510152
10	天师栗	湖北恩施市	KC510153
11	中华七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	陕西留坝县	KC480182
12	中华七叶树	陕西留坝县	KC510154
13	中华七叶树	陕西留坝县	KC510155
14	中华七叶树	陕西留坝县	KC510156
15	中华七叶树	陕西留坝县	KC510157
16	浙江七叶树 <i>A. chinensis</i> var. <i>chekiangensis</i>	浙江杭州市	KC480183
17	浙江七叶树	浙江杭州市	KC510158
18	浙江七叶树	浙江杭州市	KC510159
19	浙江七叶树	浙江杭州市	KC510160
20	浙江七叶树	浙江杭州市	KC510161
21	浙江七叶树	浙江杭州市	KC510162
22	云南七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>wangii</i>	云南马关县	KC480184
23	云南七叶树	云南马关县	KC510163
24	云南七叶树	云南马关县	KC510164
25	云南七叶树	云南马关县	KC510165
26	云南七叶树	云南马关县	KC510166
27	云南七叶树	云南马关县	KC510167
28	云南七叶树	云南马关县	KC510168
29	云南七叶树	云南马关县	KC480185
30	多脉七叶树 <i>A. polyneura</i>	云南马关县	KC510169
31	多脉七叶树	云南马关县	KC510170
32	多脉七叶树	云南马关县	KC510171
33	长柄七叶树 <i>A. assamica</i>	云南马关县	KC510172
34	长柄七叶树	云南马关县	KC510173
35	大果七叶树 <i>A. chuniana</i>	云南马关县	KC510174
36	大果七叶树	云南西畴县	KC510175
37	大果七叶树	云南马关县	KC510176
38	大叶七叶树 <i>A. megaphylla</i>	云南西畴县	KC510177
39	石生七叶树 <i>A. wangii</i> var. <i>rupicola</i>	云南西畴县	KC510178
40	石生七叶树	云南马关县	KC510179
41	石生七叶树	云南马关县	KC510180
42	欧洲七叶树 <i>A. hippocastanum</i>	北京潭柘寺	KC510181

表2 引物及其扩增程序

Table 2 Primers and amplification procedure

条形码	引物名称	引物序列 (5'-3')	PCR 反应程序	平均目的片段大小
ITS	5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min, 50 °C, 1 min, 72 °C, 1.5 min /循环, 30 个循环; 72 °C, 7 min	707 (571~1 153) bp
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 56 °C, 30 s, 72 °C, 45 s, 40 个循环; 72 °C, 10 min	226 (163~311) bp
	S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		
<i>rbcL</i>	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	95 °C, 2 min; 94 °C, 1 min, 55 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 35 个循环; 72 °C, 10 min	704 (702~883) bp
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC		
<i>psbA-trnH</i>	fwd PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1.5 min, 30 个循环; 72 °C, 7 min	401 (103~1 025) bp
	rev TH	CGCGCATGGTGGATTCCACAATCC		
<i>matK</i>	KIM 3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	94 °C, 1 min; 94 °C, 30 s, 52 °C, 20 s, 72 °C, 50 s, 35 个循环; 72 °C, 5 min	794 (656~861) bp
	KIM 1R	ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC		

3 结果与分析

3.1 序列信息、PCR 扩增效率和测序成功率

ITS 引物 PCR 扩增后电泳检测, 发现全部泳道都出现了大小极其接近的 2 条带, 测序时出现严重的套峰现象, 获得的序列无法完成拼接, 所以统计序列信息时未列入表中。

除 *matK* 的扩增效率为 81.25%, 测序成功率为 92.3% 外, 其余 3 条片段的 PCR 扩增效率和测序成功率均较高, 均为 100%。片段长度方面, ITS2

的长度最短, 均为 221 bp, 其次是 *psbA-trnH*, 为 430~492 bp, *rbcL* 和 *matK* 较长, 分别为 703 bp 和 790~837 bp。各片段的 GC 量以 *psbA-trnH* 最低, 为 27.8%, ITS2 最高, 为 72.3%。*psbA-trnH* 变异位点最多, 有 17 个, *matK* 和 ITS2 分别有 8 和 6 个, 而 *rbcL* 的变异位点最少, 只有 2 个。*psbA-trnH* 有 3 个插入/缺失, 片段大小分别为 2、11、7 bp, 其他条形码均无插入/缺失。各片段统计详见表 3。

表3 各候选条形码 PCR 扩增相关信息统计

Table 3 PCR amplification related information statistics of candidate codes

条形码	片段长度 / bp	GC 量 / %	PCR 扩增效率 / %	测序成功率 / %	变异位点数	插入/缺失 / bp
ITS2	221	72.3	100	100	6	0
<i>matK</i>	790~837	34.0	81.25	92.3	8	0
<i>rbcL</i>	703	43.0	100	100	2	0
<i>psbA-trnH</i>	430~492	27.8	100	100	17	2、11、7

3.2 不同 DNA 条形码候选序列种内种间差异分析

理想的条形码序列其种间差异与种内差异应存在显著区别, 且种间差异应明显大于种内差异。引入种间差异、种内差异等 6 个指标以量化分析各候选序列对实验样本的整体差异水平^[7], 通过对七叶树属各条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异分析, 结果表明 *psbA-trnH* 序列的种间差异最大, *rbcL* 序列最小,

种内差异的情况同样是 *psbA-trnH* 序列差异最大, *rbcL* 序列最小。*psbA-trnH* 序列的种间最小变异大于其种内最大变异。其余 3 条候选序列的种间最小变异与种内最大变异间差异不明显, 见表 4。

3.3 候选序列的鉴定效率评价

鉴定效率是评价不同条形码优劣的标准之一。采用 BLAST1 和最小距离法 2 种方法评估各候选序列的鉴定效率, 结果表明 (图 1), 在物

表4 4个条形码种间种内差异

Table 4 Intraspecific and interspecific differences of four barcodes

候选序列	种间变异	平均种间变异	最小种间变异	种内变异	平均种内变异	种内最大变异
ITS2	0.005 0±0.001 5	0.005 0±0.006 9	0.001 2±0.002 3	0.002 1±0.006 0	0.006 5±0.011 1	0.006 9±0.011 0
matK	0.003 5±0.002 3	0.003 5±0.006 2	0.000 8±0.001 3	0.002 5±0.002 3	0.002 2±0.001 3	0.002 9±0.002 0
rbcL	0.000 6±0.001 2	0.000 6±0.001 2	0.000 3±0.002 2	0.001 2±0.001 5	0.000 4±0.000 9	0.000 7±0.001 5
psbA-trnH	0.010 4±0.005 9	0.010 4±0.011 7	0.009 1±0.002 3	0.006 9±0.005 9	0.003 1±0.004 5	0.004 6±0.006 7

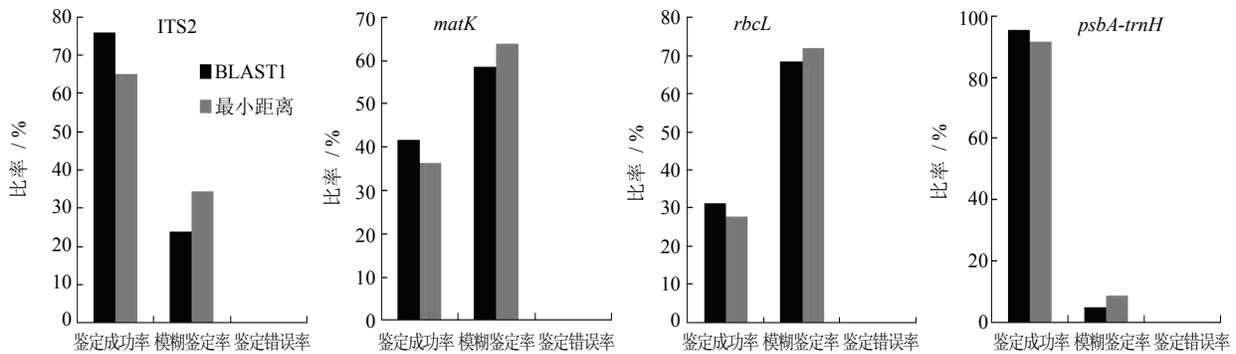


图1 BLAST1 和最小距离法分析各序列的鉴定效率

Fig. 1 Identification efficiency of each sequence by BLAST1 and nearest distance methods

种水平上通过 BLAST1 分析, *psbA-trnH* 的鉴定效率最高, 为 95.4%, 其次是 ITS2 序列, 为 76.1%。*matK* 和 *rbcL* 序列均不足 50%。通过最小距离法也得到同样的结论, 但各序列的鉴定成功率均较 BLAST1 低。各序列错误鉴定率均为 0。

3.4 七叶树属药用植物 *psbA-trnH* 序列分析检验及 NJ 树聚类分析

通过对候选序列 ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 进行 PCR 扩增效率、测序成功率、种内种间差异分析以及鉴定效率评价, 筛选出 *psbA-trnH* 序列为鉴定七叶树属药用植物的最佳条形码。

3.4.1 *psbA-trnH* 序列信息及变异分析 七叶树属植物 *psbA-trnH* 序列长度为 373~454 bp。经 MEGA 5.0 软件分析, 其中碱基组成平均量 T 为 43.9%, C 为 10.8%, A 为 32.4%, G 为 12.8%, GC 为 23.7%, AT 为 76.3%, GC 量明显低于 AT 量。变异位点 36 个, 简约信息位点 31 个, 分别占序列总长的 9.65% 和 8.31%。共有 6 处插入/缺失, 分别位于第 90~92、151~157、253~296、341~364、414~415 和 472~473 位, 最大长 44 bp, 最小长 2 bp。

3.4.2 七叶树属植物 *psbA-trnH* 序列 barcoding gap 检验 理想的条形码应具备种间遗传变异明显大于种内遗传变异的特点, 并且能够在两者间存在显著差异, 形成一个明显的间隔区, 即 barcoding gap^[14]。

七叶树属植物的 *psbA-trnH* 序列 barcoding gap (图 2) 显示, 该序列在种间、种内的变异重合比例较小, 且种间和种内变异的分布呈两边分开的趋势, 有利于区分物种, 可作为七叶树属植物的 DNA 条形码。

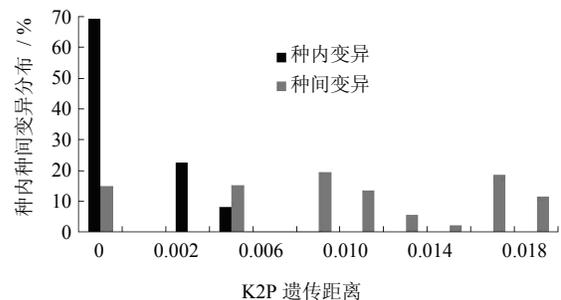


图2 *psbA-trnH* 序列 barcoding gap 检验图

Fig. 2 Barcoding gap test diagram of *psbA-trnH*

3.4.3 NJ 树聚类分析 通过构建 NJ 树对条形码候选序列 *psbA-trnH* 鉴定七叶树属植物的适用性进行了进一步的考察。从聚类分析结果 (图 3) 可知, *psbA-trnH* 序列具有鉴定七叶树属药用植物及其混伪品的作用, 并且也可用于鉴定七叶树属的不同品种。

4 讨论

4.1 七叶树属药用植物候选序列的筛选

DNA 条形码是通过合适的条形码获得高质量的序列, 使被鉴定样品具有较小的种内变异及显著

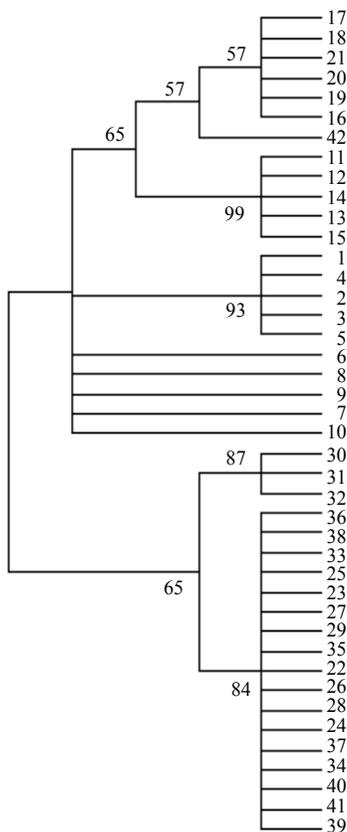


图 3 *psbA-trnH* 序列构建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed with *psbA-trnH* sequences

的种间变异^[6]。本研究选取 ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*、*matK* 序列进行七叶树属药用植物的条形码筛选，对各序列分析后发现，*psbA-trnH* 序列更适用于七叶树属的鉴定分析，其扩增效率与测序成功率均为 100%，并且物种鉴定效率最高，为 95.4%。ITS2、*rbcL* 序列的扩增效率及测序成功率虽然也为 100%，但物种鉴定效率分别为 76.1%和 31.4%，明显低于 *psbA-trnH* 序列。*matK* 序列的序列获得率及物种鉴定效率均较差，其中物种鉴定效率仅为 41.5%。ITS 则因扩增产物测序时出现严重套峰，无法获得序列信息。分析比较 *psbA-trnH*、ITS2、*rbcL* 和 *matK* 序列的种间、种内差异，结果表明 *psbA-trnH* 序列的种间差异最大，虽然其种内差异也是最大，但其种间最小变异大于种内最大变异，在区分物种上具有优势。ITS2、*rbcL* 和 *matK* 序列的种间最小变异与种内最大变异间差异并不明显，不利于物种的区分鉴定。

4.2 *psbA-trnH* 序列在七叶树属药用植物鉴定中的作用

psbA-trnH 序列是叶绿体间隔区进化速率最快

的片段之一，且其两端存在约 75 bp 的保守区域，可用于设计通用引物^[15]，由 Kress 等^[9]推荐作为条形码候选序列。本研究筛选得到的 *psbA-trnH* 序列能够成功鉴定包括天师栗、中华七叶树、浙江七叶树、欧洲七叶树、云南七叶树、大果七叶树、多脉七叶树、大叶七叶树、长柄七叶树、石生七叶树在内的七叶树属药用植物。利用 *psbA-trnH* 序列计算得到 K-2P 遗传距离，天师栗和混伪品多脉七叶树的种间 K-2P 距离最大，大果七叶树和大叶七叶树的种间 K-2P 距离最小；3 个基原物种天师栗、中华七叶树、浙江七叶树与混伪品的种间遗传距离均较大，这表明通过 *psbA-trnH* 序列能够将《中国药典》2010 年版中收录的天师栗、中华七叶树、浙江七叶树与混伪品区分开来。基于 *psbA-trnH* 序列构建的 NJ 树（图 3）表明娑罗子基原物种与混伪品聚在不同分支，可准确鉴别基原物种及其混伪品。3 种基原物种天师栗、中华七叶树、浙江七叶树也各自聚为一支，能够进行品种的区分。这些都表明 *psbA-trnH* 序列能够鉴定区分七叶树属药用植物。

4.3 DNA 条形码的应用对于控制娑罗子药材品质的意义

DNA 条形码技术从分子水平进行物种鉴定，可以避免形态学上的错误鉴别，准确性高、操作简便快捷，是生物分类学的发展趋势之一。因娑罗子商品药材性状十分相似，气味、质地等也不易区分，易出现商品药材品种混杂、品质不一的问题，利用传统的中药材鉴定方法进行形态鉴定费时费力、且对鉴定人的经验也有较高要求；显微结构、超显微结构、化学指纹图谱等鉴定方法也在中药材鉴定和质量评估中发挥了重要作用，但仍有其不便利的方面。DNA 条形码分子鉴定具有高通量、自动化、可靠性高的优点，其鉴定不受药材性状、鉴别经验的影响，可直接从基因水平提供鉴定依据，快速准确的区分药材及其混伪品。这种方法能够为药材市场的规范化管理以及药材的流通安全提供重要依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 46 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 李 珊, 马玲云, 李向日, 等. 中药娑罗子的现代化研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(8): 178-181.
- [4] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.

- [5] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [6] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [7] 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.
- [8] Yao H, Song J Y, Ma X Y, *et al.* Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: The chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Planta Med*, 2009, 75(6): 667.
- [9] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2: e508.
- [10] 李妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通过 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 7(42): 1396-1401.
- [11] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [12] Song J Y, Yao H, Li Y, *et al.* Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 434-439.
- [13] Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation [J]. *Syst Biol*, 2008, 57: 216-230.
- [14] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, *et al.* DNA barcoding the floras of biodiversity hot spots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2923-2928.
- [15] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, *et al.* The tortoise and the hare. II. Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. *Am J Bot*, 2005, 92: 142-166.