

## 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究

夏至<sup>1</sup>, 李贺敏<sup>1</sup>, 张红瑞<sup>1</sup>, 李家美<sup>2</sup>, 高致明<sup>1\*</sup>

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

2. 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002

**摘要:** 目的 构建紫苏属种、变种之间系统发育关系, 准确鉴别紫苏 *Perilla frutescens* var. *arguta*、白苏 *P. frutescens* 与其他变种。方法 提取紫苏、白苏及其他变种的 DNA, 对 ITS 和 *psbA-trnH* 序列扩增和测序, 计算物种种内(变种内)种间(变种间) Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。采用最简约法 (MP) 和邻接法 (NJ) 构建分子系统树, 进行系统发育和鉴定分析。结果 ITS 和 *psbA-trnH* MP 系统树显示白苏和紫苏的不同地域的样本聚为一单系分支 (支持率为 100%和 93%), 紫苏与回回苏构成姐妹群分支 (支持率为 95%和 90%), 野生紫苏和耳齿紫苏构成一单系分支 (支持率为 100%和 90%); 白苏、紫苏与其他变种间的 ITS 和 *psbA-trnH* 序列遗传距离 0.008 21~0.018 18 和 0.002 38~0.029 31, 明显大于白苏与紫苏间遗传距离 0~0.001 65 和 0, 大于各变种内遗传距离。结论 白苏和紫苏合并为一个种紫苏; 紫苏与回回苏亲缘关系最近, 野生紫苏与耳齿紫苏亲缘关系最近; ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以准确鉴别紫苏与其他变种。

**关键词:** 紫苏属; 紫苏; ITS; *psbA-trnH*; 鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-1027-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.021

## Molecular authentication and phylogenetic relationship of *Perilla frutescens* and its varieties

XIA Zhi<sup>1</sup>, LI He-min<sup>1</sup>, ZHANG Hong-rui<sup>1</sup>, LI Jia-mei<sup>2</sup>, GAO Zhi-ming<sup>1</sup>

1. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract: Objective** In order to investigate the phylogenetic relationship of *Perilla frutescens* and its varieties, and to identify *P. frutescens* and its varieties in *Perilla* L. **Methods** Total genomic DNA was isolated from *P. frutescens* and its varieties. Nuclear DNA ITS and chloroplast gene *psbA-trnH* sequence were amplified and sequenced. The inter- and intra-specific Kimura 2-Parameter (K2P) distances were calculated. Phylogenetic analyses including Maximum Parsimony (MP) and Neighbor-Joining (NJ) of nuclear DNA (ITS) and chloroplast gene *psbA-trnH* sequences were conducted individually. **Results** The MP tree (ITS and *psbA-trnH*) indicated that the different geographical population of *P. frutescens* and *P. frutescens* var. *arguta* formed a monophyletic clade [bootstrap (BS) = 100% and 93%], which was a sister branch to *P. frutescens* var. *crispa* (BS = 95% and 90%). Wild *P. frutescens* var. *purpurascens* and *P. frutescens* var. *auriculato-dentata* formed a monophyletic clade (BS = 100% and 90%). The inter-specific genetic distances (ITS and *psbA-trnH*) of *P. frutescens*, *P. frutescens* var. *arguta*, and other varieties were 0.008 21—0.018 18 and 0.002 38—0.029 31, which were obviously higher than those of *P. frutescens* and *P. frutescens* var. *arguta* at 0—0.001 65 and 0, and were higher than intra-specific genetic distances of each other variety. **Conclusion** *P. frutescens* and *P. frutescens* var. *arguta* should be classified into one species. *P. frutescens* is relatively closed to *P. frutescens* var. *crispa*. The closest relationship is found between wild *P. frutescens* var. *purpurascens* and *P. frutescens* var. *auriculato-dentata*. ITS and *psbA-trnH* are two efficient barcodes for the identification of *P. frutescens* and its varieties.

**Key words:** *Perilla* L.; *Perilla frutescens* (Linn.) Britt.; ITS; *psbA-trnH*; authentication

唇形科 (Labiatae) 紫苏属 *Perilla* L. 植物作为 具有多方面开发利用价值<sup>[1]</sup>。《中国药典》2010年版传统的药、油、菜、香料兼用作物在我国广泛栽培, 中紫苏 *Perilla frutescens* (Linn.) Britt. 入药部位以茎、

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 科技部国家星火计划项目 (2012GA750004); 国家自然科学基金面上项目 (31070171, 31270236)

作者简介: 夏至 (1974—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为中药资源及分子鉴定。

Tel: (0371)63554995 Fax: (0371)63554995 E-mail: xiazhiemail@126.com

\*通信作者 高致明, 教授, 主要从事中药资源的规范化种植研究。E-mail: gaozhiming672@sohu.com

叶及种子为主,具止痛、安胎、解表散寒、行气和胃、降气化痰、润肠通便的功效,主治胸膈痞闷、胎动不安、风寒感冒、妊娠呕吐、咳嗽气短和肠躁便秘<sup>[2]</sup>。紫苏属下变种等级划分和变种数目一直存在争议,《中国药用植物志》<sup>[3]</sup>记载紫苏属有1个种白苏 *P. frutescens* (L.) Britt. 和1个变种紫苏 *P. frutescens* var. *arguta* (Thunb.) Hand. -Mazz.。《中国植物志》<sup>[4]</sup>认为白苏和紫苏在形态上变异(如叶、花颜色的差异等)因栽培原因引起,将二者合并为1个种紫苏 *Perilla frutescens* (Linn.) Britt., 此外,紫苏属还包括3个变种,野生紫苏 *P. frutescens* var. *purpurascens* (Hayata) H. W. Li、回回苏 *P. frutescens* var. *crispa* (Thunb.) Hand. -Mazz.<sup>[5]</sup>和耳齿紫苏 *P. frutescens* var. *auriculato-dentata* C. Y. Wu. et Hsuan ex H. W. Li<sup>[6]</sup>。近年来,部分学者依据植物形态结构、种子显微特征、挥发油化学成分、花粉及同工酶分析等特征,支持白苏和紫苏独立分开,将紫苏作为白苏的1个变种<sup>[7-11]</sup>。至此,紫苏属有1个种4个变种,即白苏(包括原变种)、紫苏、野生紫苏、回回苏和耳齿紫苏。由于长期的引种栽培,紫苏属植物在我国生态适应幅度大,种下变种的形态特征极为相似<sup>[5]</sup>,且这些形态特征易受地理环境、生长发育时期的影响,从而影响鉴定的准确性,造成传统鉴定困难,常有混淆现象,直接影响到临床用药的安全。因此,对紫苏属植物开展分子鉴定研究,构建属下种、变种间系统发育关系,用分子数据验证白苏和紫苏的分类地位,找到快速准确鉴定药材紫苏与其变种的方法是非常必要的。

近年来,中药分子鉴定主要集中在核酸序列分析的DNA条形码鉴定技术<sup>[12]</sup>,DNA条形码技术(DNA barcoding)为中药材物种亲缘关系及鉴定研究提供了方便快捷的方法。DNA条形码技术是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段对物种进行快速的自动鉴定<sup>[13]</sup>,克服传统分类学鉴定方法的诸多缺陷。目前,药用植物的DNA条形码鉴定研究得到快速发展,广泛应用于多个科属的药用植物及药材鉴定<sup>[14-19]</sup>。刘美子等<sup>[20]</sup>认为中药材物种分子鉴定和亲缘关系研究应根据研究问题选择适当DNA条形码序列。本研究选用核基因ITS片段和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段被广泛应用于药用植物属下种间及种下较低分类阶元的分子鉴定和亲缘关系研究<sup>[21-23]</sup>。通过对上述基因片段扩增、测

序、并应用DNA条形码技术对紫苏属1种4变种进行分析,探讨紫苏属属下种、变种之间的亲缘关系,用分子数据验证白苏和紫苏的分类地位,旨在为紫苏属药用植物的快速鉴定找到可行的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料收集包括紫苏属1个种白苏,4个变种紫苏、野生紫苏、回回苏和耳齿紫苏。样品采自河南、河北、江苏、广西、湖北和安徽。实验材料由中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室王印政研究员鉴定,凭证标本保存于河南农业大学。实验材料来源于植物新鲜叶片,经变性硅胶快速干燥后保存于-80℃冰箱,详细信息、GenBank登录号及下载序列见表1。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品DNA的提取、扩增和测序** 采用改良后CTAB法<sup>[24]</sup>提取样品总DNA,ITS序列的扩增使用由Wendel等<sup>[25]</sup>设计的引物ITS1(5'-AGAAGT-CGTAACAAGGTTTCCGTA-3')和ITS4(5'-TCCT-CCGCTTATTGATATGC-3'); *psbA-trnH* 序列的扩增使用DNA条形码通用引物,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR反应条件及扩增程序参考Xia等<sup>[26]</sup>和Kress等<sup>[27]</sup>的研究。PCR产物用上海生工UNIQ-10 PCR产物纯化试剂盒纯化后直接用于测序,纯化产物送到北京六合华大基因科技股份有限公司,用ABI 3730X测序仪(Applied Biosystems Co., 美国)进行双向测序。

**1.2.2 数据处理** 测序所得的峰图采用CodonCode Aligner V3.0(CodonCode Co., USA)对序列峰图进行校对拼接,去除引物区和低质量的序列,利用软件PAUP\* version 4.0b10<sup>[28]</sup>构建简约(Maximum Parsimony, MP)和邻接(Neighbor-Joining, NJ)系统发育树,利用Bootstrap(BS)(1000次重复)检验各分支的支持率。对紫苏属种及其变种之间亲缘关系进行分析,并计算物种种内(变种内)、种间(变种间)Kimura 2-parameter(K2P)遗传距离,应用NJ树对紫苏属种及其变种进行鉴定分析。

## 2 结果

### 2.1 ITS序列信息、序列种内(变种内)和种间(变种间)变异分析

紫苏属1个种及其4个变种的PCR及测序成功率均为100%。5个物种的ITS序列长度为616~617 bp,其中ITS1序列长度为224 bp,5.8 S为158 bp,

表1 样品来源  
Table 1 Sources of samples

编号	样品	来源	GenBank 号	
			ITS	<i>psbA-trnH</i>
1	内类群 白苏 <i>Perilla frutescens</i>	河南郑州	KC011244	KC011255
2	白苏	河北巨鹿	KC011245	KC011256
3	白苏	GenBank	JF708208	FJ528996
4	白苏	GenBank	FJ606749	
5	白苏	GenBank	AF477785	
6	白苏	GenBank	DQ667246	
7	白苏	GenBank	DQ471339	
8	白苏	GenBank	DQ471340	
9	紫苏 <i>P. frutescens</i> var. <i>arguta</i>	河南郑州	KC011246	KC011257
10	紫苏	河北巨鹿	KC011247	KC011258
11	紫苏	江苏南京	KC011248	KC011259
12	回回苏 <i>P. frutescens</i> var. <i>crispa</i>	广西南宁	KC011249	KC011260
13	回回苏	广西南宁	KC011250	KC011261
14	回回苏	GenBank	DQ471342	
15	野生紫苏 <i>P. frutescens</i> var. <i>purpurascens</i>	广西金秀	KC011253	KC011264
16	野生紫苏	广西环江	KC011254	KC011265
17	耳齿紫苏 <i>P. frutescens</i> var. <i>auriculato-dentata</i>	湖北建始	KC011251	KC011262
18	耳齿紫苏	安徽巢湖	KC011252	KC011263
19	耳齿紫苏	GenBank	DQ471343	
20	外类群 二蕊紫苏 <i>Collinsonia canadensis</i>	GenBank	DQ667248	DQ667358
21	罗勒 <i>Ocimum basilicum</i>	GenBank	DQ667240	DQ667350

ITS2 序列长度为 234~235 bp。河南、河北和江苏取样的白苏 2 个样本和紫苏 3 个样本与 GenBank 下载的 4 个白苏的 ITS 序列同源性高达 100%。种内（变种内）种间（变种间）K2P 遗传距离结果显示，ITS 序列在各变种内不同样本间的遗传距离为 0，白苏种内不同样本间的遗传距离为（0~0.001 65），白苏和紫苏的不同样本间遗传距离也为（0~0.001 65），不能将种白苏和变种紫苏区分开。但白苏、紫苏与其他各变种间序列变异较大，白苏、紫苏与其他变种间的 ITS 序列遗传距离 0.008 21~0.018 18，明显大于白苏与紫苏间遗传距离 0~0.001 65，大于各变种内遗传距离 0，因此，核基因 ITS 序列片段可以用作紫苏、白苏与其他变种的分子鉴定。

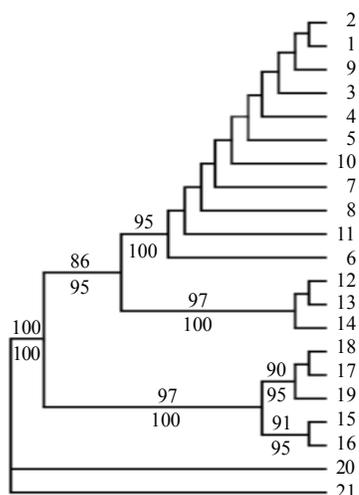
### 2.2 *psbA-trnH* 序列信息、序列种内及种间变异分析

紫苏属 1 个种及其 4 个变种的 PCR 及测序成功率均为 100%。5 个物种的 *psbA-trnH* 序列长度为 435~436 bp，在河南、河北和江苏取样的白苏 2 个样本和紫苏 3 个样本与 GenBank 下载的 1 个白苏的

*psbA-trnH* 序列同源性高达 100%。耳齿紫苏与其他变种在 116 bp 存在一个 T-A 的变异。耳齿紫苏、野生紫苏与紫苏、白苏和回回苏在 131~150 bp，共有 10 个碱基的变异。回回苏与其他变种在 295 bp 处有一个 G-A 的突变。种内（变种内）种间（变种间）K2P 遗传距离结果显示，*psbA-trnH* 序列在种内（变种内）不同样本间，及白苏和紫苏变种间的遗传距离均为 0，不能将种白苏和变种紫苏区分开。但白苏、紫苏与其他各变种间序列变异较大，白苏、紫苏与其他变种间的 *psbA-trnH* 序列遗传距离 0.002 38~0.029 31，明显大于白苏与紫苏间，各变种内遗传距离 0。因此，叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列片段可以用作紫苏、白苏与其他变种的分子鉴定。

### 2.3 紫苏属属下种、变种邻接系统发育树的鉴定

本实验应用 PAUP version 4.0b10 构建紫苏属的 ITS、*psbA-trnH* 序列的 NJ 系统发育树（图 1、2）。外类群选择与紫苏属近缘的二蕊紫苏属 *Collinsonia* L. 和罗勒属 *Ocimum* L.<sup>[29]</sup>。从 NJ 树可以看出，ITS



分支上部和下部数值表示 NJ 和 MP 分析 BS 分析对该分支的支持强度 (>50%)，下同  
BS values of NJ and MP (> 50%) are shown above and below branches, same as below

图 1 基于 NJ 和 MP 法 (ITS 数据) 构建系统发育树  
Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on NJ and MP methods (ITS data)

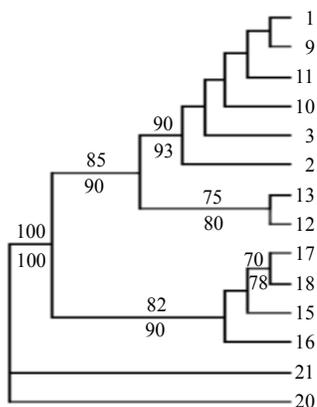


图 2 基于 NJ 和 MP 法 (psbA-trnH 数据) 构建系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ and MP method (psbA-trnH data)

序列构建的分子系统树并不能将变种紫苏和白苏区分开，紫苏和白苏来源于不同地域的样本，并没有各自独立聚为一个分支，二者来源于 9 个地域的 11 个居群样本聚为一个单系分支 (95%)。ITS 序列可将紫苏、白苏与其他 3 个变种很好的区分开，其中回回苏、野生紫苏、耳齿紫苏 3 个物种不同样本间形成 3 个独立分支，支持率均为 90% 以上。

*psbA-trnH* 序列构建的分子系统树并不能将紫苏和白苏区分开，紫苏和白苏来源于不同地域的样本并没有各自独立聚为一个分支，二者来源于 4 个

地域 6 个居群样本聚为一个单系分支 (90%)。*psbA-trnH* 序列可将紫苏、白苏与其他 3 个变种很好的区分开，回回苏、耳齿紫苏 2 个变种不同样本间形成 2 个独立分支，支持率分别为 75% 和 70%。

### 2.4 紫苏属属下种、变种简约系统发育树的分析

为探讨紫苏属各变种间的亲缘关系，本实验应用 PAUP\* version 4.0b10 构建紫苏属的 ITS、*psbA-trnH* 序列的 MP 系统发育树。外类群选择与紫苏属近缘的二蕊紫苏属和罗勒属<sup>[29]</sup>。最大 MP 树和 NJ 树的拓扑结构完全一致 (图 1、2)。ITS 矩阵的序列总长度为 625 bp，最大简约法分析得出 1 棵最简约树，树长为 129。在 ITS 最简约树上 (图 1)，紫苏属的单系得到 100% 支持，紫苏属内形成两大分支，紫苏、白苏先聚为一单系分支，与回回苏形成一姐妹群分支，野生紫苏与耳齿紫苏两变种形成另一单系分支，各分支间支持率均在 95% 以上。这表明紫苏、白苏与回回苏亲缘关系最近，野生紫苏与耳齿紫苏亲缘关系最近。*psbA-trnH* 序列矩阵的序列总长度为 436 bp，最大简约法分析得出 1 棵最简约树，树长为 276 bp。在 *psbA-trnH* 最简约树上 (图 2)，紫苏属的单系得到 100% 支持，同样，紫苏属内形成两大分支，紫苏、白苏与回回苏形成一单系分支，野生紫苏与耳齿紫苏两变种形成另一单系分支，各分支间支持率均在 90% 以上。这表明紫苏、白苏和回回苏亲缘关系最近，野生紫苏与耳齿紫苏亲缘关系最近。

## 3 讨论

### 3.1 紫苏属属下种、变种间系统发育关系

紫苏属属下系统分类争议主要体现在紫苏和白苏的划分。本研究通过对紫苏属属下 1 种 4 变种的 ITS 和 *psbA-trnH* 两个基因片段分析，构建紫苏属下的分子系统发育树，结果均支持将白苏与变种紫苏合并为一个种。染色体核型分析<sup>[30]</sup>结果表明紫苏与白苏的核不对称型均为 2A，与其他变种不同，也支持二者合并为 1 个种。参照《中国药典》2010 年版<sup>[2]</sup>、《中国植物志》<sup>[4]</sup>和 *Flora of China* 紫苏种的命名，本研究将白苏 *P. frutescens* 和变种紫苏 *P. frutescens* var. *arguta* 合并为一个种紫苏 *P. frutescens*。紫苏属内，ITS 和 *psbA-trnH* 系统树均支持野生紫苏和耳齿紫苏亲缘关系最近。《中国植物志》<sup>[4]</sup>曾记载耳齿紫苏与野生紫苏形态特征极相似，不同之处在于叶基圆形或心形，具耳状齿缺，雄蕊稍伸出花冠。刘月秀等<sup>[7]</sup>认为，耳齿叶这种变异现象有时会出现

苏和野生紫苏的主茎顶或侧枝顶。此外,本研究作者野外观察发现,雄蕊稍伸出花冠这一区别特征,在耳齿紫苏与野生紫苏之间差异并不显著,形态和分子证据支持二者的亲缘关系最近。回回苏被认为是紫苏在栽培过程中变异的类型,其叶形变异很大,是紫苏属较为进化的一个变种<sup>[7,31]</sup>,在全国各地栽培,与紫苏一样均可药用。《中国植物志》<sup>[4]</sup>记载回回苏的叶形,叶边缘锯齿变异范围介于紫苏的栽培和野生类型之间。本研究分子系统学结果支持紫苏与回回苏之间亲缘关系最近。ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树显示紫苏属被分为两独立分支,紫苏和回回苏构成一分支,野生紫苏和耳齿紫苏构成一分支,两独立分支内,紫苏相对于回回苏表现出较为原始的特性,如形态特征变异幅度大,分布区域广阔<sup>[4]</sup>;野生紫苏相对于耳齿紫苏表现出原始的形态性状,如植株矮小、叶小、果小<sup>[7]</sup>,这表明紫苏和变种野生紫苏可能代表紫苏属早期开始分化的2个物种。

### 3.2 ITS 和 *psbA-trnH* 序列对紫苏与其变种的鉴定

罗玉明等<sup>[32]</sup>对紫苏属的 ITS 序列分析结果表明,白苏和变种紫苏的鉴别位点仅在 ITS 序列上位于第430个位点,白苏为A,紫苏为G。可能由于取样的不同,该位点在本研究取样的白苏和紫苏的 ITS 序列均为G,不存在差异。对于紫苏属的回回苏和耳齿紫苏的 ITS 序列出现的鉴别位点<sup>[32]</sup>与本研究的结果完全一致。对紫苏属紫苏与其变种进行种内(变种内)和种间(变种间)遗传距离比较,及NJ树分析结果表明,ITS 和 *psbA-trnH* 序列种间(变种间)变异均大于种内(变种内)变异,NJ树聚类分析均能准确鉴别紫苏与其他变种,因此,ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以作为紫苏与其他变种进行鉴定的条形码序列。

### 3.3 ITS 和 *psbA-trnH* 在药用植物亲缘关系构建和鉴定中应用

ITS 和 *psbA-trnH* 序列作为国际通用条形码序列,在种间及种下分类等级具有进化速率快、变异程度高、区分物种能力强的特点<sup>[33]</sup>。在药用植物与其近缘种类等较低分类阶元的分子鉴定中,ITS 和 *psbA-trnH* 序列经常单独(如单个基因片段 ITS、*psbA-trnH* 和 ITS2),或联合作为 DNA 条形码序列使用,在药用植物鉴定中发挥关键作用。例如,Chen 等<sup>[16]</sup>和 Li 等<sup>[34]</sup>研究表明,ITS2 和 ITS 序列应纳入到国际条形码鉴定的核心序列,适用于种子植

物鉴定研究,*psbA-trnH* 序列适合作为 ITS2 和 ITS 互补序列<sup>[16]</sup>。但在构建药用植物与其近缘种类的亲缘关系时,单个基因片段可能会因为谱系分选、网状进化、杂交事件等<sup>[33,35]</sup>给药用植物与其近缘种类系统发育重建带来误差,并不能真实反映物种之间的亲缘关系,需要来自不同基因组的多基因联合分析验证<sup>[36]</sup>。在大多数被子植物中,核基因通常是双亲遗传,而叶绿体基因则是母系遗传<sup>[37]</sup>。因此,选用来自核基因组 ITS 和叶绿体基因组 *psbA-trnH* 等多个基因片段进行序列联合分析验证,构建分子系统树,可准确构建药用植物与其近缘种类的亲缘关系。药用植物的分子鉴定是药用植物种质鉴别的重要手段,确保中医临床用药的安全和疗效。药用植物亲缘关系的准确界定,是开展药用植物亲缘学研究的基础和关键<sup>[38]</sup>,对于扩大药用植物基源种类和药用植物栽培品种选育具有重要意义。通过对核基因 ITS 和叶绿体 *psbA-trnH* 序列等多基因联合使用,将为药用植物分子鉴定、亲缘关系构建、扩大新药源和选育新品种提供新的思路。

志谢:中国科学院植物研究所王印政研究员协助查阅标本并指导鉴定植物标本。

### 参考文献

- [1] 陈娟,郭凤根.紫苏研究的现状与展望[J].中国农学通报,2003,19(3):105-107.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] 裴鉴.中国药用植物志[M].北京:科学出版社,1956.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第66卷)[M].北京:科学出版社,1977.
- [5] 李锡文.我国一些唇形科植物学名更动[J].云南植物研究,1991,13(3):349-350.
- [6] 李锡文.我国一些唇形科植物学名更动[J].植物分类学报,1974,12(2):213-234.
- [7] 刘月秀,张卫明.紫苏属植物的分类及资源分布[J].中国野生植物资源,1998,17(3):1-4.
- [8] 陈永林,赵华英,许欣荣,等.苏子的显微鉴定研究[J].中草药,1998,29(5):338-339.
- [9] 赵淑平,朱兆仪,冯毓秀,等.紫苏与白苏不同化学型挥发油成分的研究[J].天然产物研究与开发,1993,3(5):8-20.
- [10] Yan H U, Sun L W, Mokgolodi N C, et al. Primary identifications and palynological observations of *Perilla* in China[J]. *J Systematics Evol*, 2010, 48(2): 133-145.
- [11] 郭凤根,陈娟,王仕玉.云南紫苏资源的酯酶同工酶

- 分析 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 101-103.
- [12] 王川易, 郭宝林, 肖培根. 中药分子鉴定方法评述 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 237-242.
- [13] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [14] 罗焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学 (C 辑): 生命科学, 2010, 40: 342-351.
- [15] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 116-121.
- [16] 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: e8613.
- [17] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2010, 45: 376-385.
- [18] Han J, Shi L C, Yao H, *et al.* Testing potential DNA barcoding regions in the Labiatae medicinal plants [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 407-407.
- [19] 李妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [20] 刘美子, 宋经元, 罗焜, 等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [21] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [22] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076.
- [23] Han J P, Song J Y, Liu C, *et al.* Identification of *Cistanche* species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45: 126-130.
- [24] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1988, A6: 1-10.
- [25] Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional inter locus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280-284.
- [26] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relationships of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae s. l.) inferred from five different gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.
- [27] 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.
- [28] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
- [29] Walker J B, Sytsma K J. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever [J]. *Ann Bot*, 2007, 100: 375-391.
- [30] 张旭, 吴卫, 郑有良, 等. 紫苏属植物染色体数目和核型分析 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(10): 1972-1973.
- [31] 郭凤根, 王仕玉. 云南境内紫苏种下变异的研究 [J]. 木本植物研究, 2007, 20(3): 270-274.
- [32] 罗玉明, 张卫明, 丁小余, 等. 紫苏属药用植物的 rDNA ITS 区 SNP 分子标记与位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 药学学报, 2006, 41(9): 840-845.
- [33] 任宝青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45: 1-12.
- [34] Li D Z, Gao L M, Li H T, *et al.* Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19641-19646.
- [35] 邹新慧, 葛颂. 基因树冲突与系统发育基因组学研究 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(6): 795-807.
- [36] Soltis P S, Soltis D E, Chase M W. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology [J]. *Nature*, 1999, 402: 402-404.
- [37] Soltis D E, Kuzof R K. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the Heuchera Group (Saxifragaceae) [J]. *Evolution*, 1995, 49: 727-742.
- [38] 陈四保, 彭勇, 陈士林, 等. 中药资源可持续利用—药用植物亲缘学 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(6): 97-103.