

碎米桠及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究

夏至, 张红瑞, 李贺敏, 高致明*

河南农业大学农学院 中药材工程技术研究中心, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 构建碎米桠 *Isodon rubescens* 及其与近缘种之间系统发育关系, 准确鉴别碎米桠及其近缘种。方法 提取碎米桠及其近缘种 DNA, 对核基因 ITS 片段和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列扩增和测序, 计算物种内、种间 Kimura 2-parameter(K2P) 遗传距离。采用最近距离、相似性搜索、构建 Neighbor-joining (NJ) 系统聚类树 3 种方法进行鉴定分析。结果 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树支持碎米桠 5 个居群样本聚为一单系分支, 支持率为 94%和 68%; 其中, 碎米桠与毛叶香茶菜、香茶菜和内折香茶菜聚在一支, 支持率为 70%和 51%; 溪黄草和显脉香茶菜构成姐妹群分支, 支持率为 81%和 63%。碎米桠及其近缘种种间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的 K2P 遗传距离为 0.007 08~0.072 61 和 0.008 06~0.024 76, 均远大于碎米桠种内的遗传距离 0~0.001 76 和 0~0.002 68。结论 碎米桠与毛叶香茶菜、香茶菜和内折香茶菜亲缘关系较近, 溪黄草和显脉香茶菜亲缘关系最近。ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以准确鉴别碎米桠及其近缘种。

关键词: ITS; *psbA-trnH*; 碎米桠; 鉴定; 亲缘关系

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)20-2904-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.021

Molecular authentication and phylogenetic relationship of *Isodon rubescens* and its relatives

XIA Zhi, ZHANG Hong-rui, LI He-min, GAO Zhi-ming

Research Center of Engineering Technology for Traditional Chinese Medicinal Materials, College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Objective To construct the phylogenetic relationships of *Isodon rubescens* and its relative species, and accurately identify *I. rubescens* and its relative species. **Methods** Total genomic DNA was isolated from *I. rubescens* and its relative species. Nuclear DNA internally transcribed spacer (ITS) and chloroplast gene *psbA-trnH* sequences were amplified and sequenced. The Kimura 2-parameter (K2P) distances were calculated. Identification analyses were performed using Nearest Distance, BLAST1, and Neighbor-joining (NJ) methods. **Results** The NJ trees (ITS and *psbA-trnH* data) indicated that the five populations of *I. rubescens* formed a monophyletic clade [Bootstrap (BS) = 94% and 68%]. *I. rubescens* and *I. japonicus*, *I. amethystoides*, *I. inflexus* formed one monophyletic clade (BS = 70% and 51%), and *I. serra* was sister to *I. nervosus* (BS = 81% and 63%). The K2P genetic distances of ITS and *psbA-trnH* data between *I. rubescens* and its relative species were (0.007 08—0.072 61) and (0.008 06—0.024 76) which were far higher than intra-specific genetic distances of *I. rubescens* (0—0.001 76) and (0—0.002 68). **Conclusion** *I. rubescens* is closely relative to *I. japonicus*, *I. amethystoides*, and *I. inflexus*. The closest relative of *I. serra* is *I. nervosus*. ITS and *psbA-trnH* are two efficient barcodes for the identification of *I. rubescens* and its relative species.

Key words: internally transcribed spacer; *psbA-trnH*; *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara; authentication; phylogenetic relationship

唇形科 (Lamiaceae) 香茶菜属 *Isodon* (Schrader ex Benth) Spach 植物在我国有 90 种, 21 个变种, 全国各地均有分布^[1], 中药材冬凌草的来源为该属

植物碎米桠 *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara^[2], 主要分布于河南太行山区和伏牛山区, 广为栽培。该植物以全草入药, 具有清热解毒, 活血止痛等功效,

收稿日期: 2013-05-30

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

作者简介: 夏至 (1974—), 男, 河南固始人, 讲师, 博士, 研究方向为中药资源的分子鉴定。

Tel/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@shou.com

用于咽喉肿痛,蛇虫咬伤^[2]。植物化学和药理学研究表明香茶菜属植物活性成分主要是二萜类^[3],具有抗炎、抗癌、抗菌、降血压、保护缺血性心功能损伤等多种药理作用^[4],在临床上应用十分广泛。由于香茶菜属植物在我国南北均有分布,生态适应幅度大,形态上产生很多变异。作为河南分布的主要药材品种之一,野生和栽培的碎米桠种内的遗传变异十分显著,形态上有较大差异^[5],与同属近缘种类很难区分,且这些形态特征易受地理环境、生长发育时期的影响,从而影响鉴定结果的准确性,造成传统鉴定困难。此外,除碎米桠外,在河南地区,同属的一些植物(如毛叶香茶菜、香茶菜等)也作为冬凌草入药^[5-7],常有混淆现象发生,直接影响临床用药的安全。目前,有关碎米桠及其近缘种的鉴定和亲缘关系研究主要集中在形态性状和 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析等^[8],碎米桠与其近缘种类的 DNA 条形码分子鉴定研究未见报道。为确保碎米桠正确和安全用药,构建碎米桠及其与近缘种类的亲缘关系,对碎米桠及其近缘种类进行 DNA 条形码分子鉴定研究,找到快速准确鉴定碎米桠的方法是非常必要的。

近年来,随着分子生物学的快速发展, DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 为中药材物种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、准确的自动鉴定^[9]。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中药材鉴定^[10-11]。植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段作为国际通用条形码序列,在种间及种下居群间具有进化速率快、变异程度高、区分物种能力强的特点适用于药用植物与其近缘种类等较低分类阶元的分子鉴定^[12-15]。本研究选用核基因 ITS 片段和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段,通过对香茶菜属 7 种植物,包括碎米桠及其近缘种类(近缘种主要指这些种类形态特征相似和地理分布区域相近和重叠) 23 个样本进行基因片段扩增、测序、并应用 DNA 条形码技术进行分析,探讨碎米桠及其与近缘种的亲缘关系,为碎米桠的准确鉴定提供科学依据。

1 材料

收集香茶菜属 7 个种共 23 个样本,实验材料由

河南农业大学农学院中药材系高致明教授和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,经硅胶快速干燥后保存于-80℃冰箱中,实验材料详细信息、GenBank 登录号见表 1。

2 方法

2.1 样品 DNA 的提取、扩增和测序

采用北京天根生化植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取样品 DNA, ITS 序列扩增使用 Wendel 等^[16]设计的引物 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); *psbA-trnH* 序列扩增使用 DNA 条形码通用引物^[17], 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应条件及扩增程序参考 Chen 等^[17]和 Xia 等^[18]的研究结果。PCR 产物纯化后,用 ABI 3730X 测序仪 (Applied Biosystems Co., 美国) 进行双向测序,测序结果在 GenBank 注册新序列号为 KF032247~KF032292,见表 1。

2.2 数据处理

测序所得的峰图采用 CodonCode Aligner V3.0 (CodonCode Co., 美国) 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 计算物种种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。构建邻接 (Neighbor-joining, NJ) 系统发育树,利用 Bootstrap (BS) (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。利用相似性搜索法 (BLAST1)、最近距离法 (Nearest Distance)、构建 NJ 系统发育树等方法对碎米桠及其近缘种类进行鉴定分析。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列信息、序列种内及种间变异分析

碎米桠及其近缘种类的 7 个物种的 ITS 序列长度变异范围为 567~584 bp, 线纹香茶菜的 ITS 序列最长,为 584 bp, 香茶菜最短,为 567 bp。其中 ITS1 序列长度变异范围为 195~196 bp, 差异较小。5.8 S 区域长度为 164 bp, 7 个物种序列完全一致。ITS2 序列长度变异范围为 207~225 bp, 差异较大。在 ITS 序列的矩阵中,碎米桠的 5 个居群的 ITS 序列长度一致,居群间有 3 个碱基位点的变异,分别在居群 A3 的第 425 个位点,居群 A4 的 66 个位点,居群 A5 的 21 个位点,均发生由 C-T 的变异,这 3

表 1 样品来源
Table 1 Sources of samples

编号	样 品	采集地	GenBank 登录号	
			ITS	<i>psbA-trnH</i>
A1	碎米桠 <i>Isodon rubescens</i>	河南郑州	KF032 247	KF032 270
A2	碎米桠	河南栾川	KF032 248	KF032 271
A3	碎米桠	河南济源	KF032 249	KF032 272
A4	碎米桠	河南济源	KF032 250	KF032 273
A5	碎米桠	河南济源	KF032 251	KF032 274
B1	毛叶香茶菜 <i>I. japonicus</i>	河南商城	KF032 252	KF032 275
B2	毛叶香茶菜	河南新县	KF032 253	KF032 276
B3	毛叶香茶菜	河南新县	KF032 254	KF032 277
C1	显脉香茶菜 <i>I. nervosus</i>	广西南宁	KF032 255	KF032 278
C2	显脉香茶菜	河南栾川	KF032 256	KF032 279
C3	显脉香茶菜	河南栾川	KF032 257	KF032 280
D1	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	广西南宁	KF032 258	KF032 281
D2	香茶菜	河南禹州	KF032 259	KF032 282
D3	香茶菜	河南洛宁	KF032 260	KF032 283
E1	溪黄草 <i>I. serra</i>	河南郑州	KF032 261	KF032 284
E2	溪黄草	河南栾川	KF032 262	KF032 285
E3	溪黄草	河南洛宁	KF032 263	KF032 286
F1	内折香茶菜 <i>I. inflexus</i>	河南商城	KF032 264	KF032 287
F2	内折香茶菜	广西南宁	KF032 265	KF032 288
F3	内折香茶菜 <i>I. inflexus</i>	广西南宁	KF032 266	KF032 289
G1	线纹香茶菜 <i>I. lophanthoides</i>	河南商城	KF032 267	KF032 290
G2	线纹香茶菜	河南栾川	KF032 268	KF032 291
G3	线纹香茶菜	广西南宁	KF032 269	KF032 292
H	罗勒 <i>Ocimum basilicum</i>	GenBank	DQ667 240	DQ667 350

个居群地理分布均在河南济源这个区域。ITS 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示, 碎米桠与其同属近缘种类的种间遗传距离为 0.007 08~0.072 61, 明显大于碎米桠种内的遗传距离 (0~0.001 76) (表 2)。

3.2 *psbA-trnH* 序列信息、序列种内及种间变异分析

碎米桠及其近缘种类的 7 个物种的 *psbA-trnH* 序列长度变异范围为 288~364 bp, 碎米桠的 *psbA-trnH* 序列最长, 为 364 bp, 线纹香茶菜的 *psbA-trnH* 序列最短, 为 288 bp。在 *psbA-trnH* 序列的矩阵中, 对比碎米桠的 *psbA-trnH* 序列, 线纹香茶菜的 *psbA-trnH* 序列在第 130 bp 和 224 bp 处有 69 个碱基和 7 个碱基的缺失, 显脉香茶菜的 *psbA-trnH* 序列在第 271 bp 处有 6 个碱基的缺失,

香茶菜和毛叶香茶菜分别在第 295 bp 和 296 bp 处有 4 个碱基的缺失, 内折香茶菜在 355 bp 有 4 个碱基的缺失。碎米桠的 5 个居群样本中, 有 4 个 *psbA-trnH* 序列长度一致, 其中居群 A4 有 2 个碱基位点的缺失。*psbA-trnH* 序列种内、种间 K2P 遗传距离结果显示, 碎米桠与其同属近缘种类的种间遗传距离为 0.008 06~0.024 76, 明显大于碎米桠种内的遗传距离 (0~0.002 68) (表 2)。

3.3 碎米桠与其同属近缘种类的鉴定分析

应用相似性搜索法 (BLAST1) 对碎米桠与其同属近缘种类进行鉴定分析, 结果表明 ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以准确鉴别碎米桠与其同属近缘种类。应用 PAUP* version 4.0b10 构建碎米桠与其

表 2 基于 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的碎米桠与其近缘种的种间和种内 K2P 遗传距离Table 2 K2P genetic distance based on ITS and *psbA-trnH* from *I. rubescens* and its closely related species

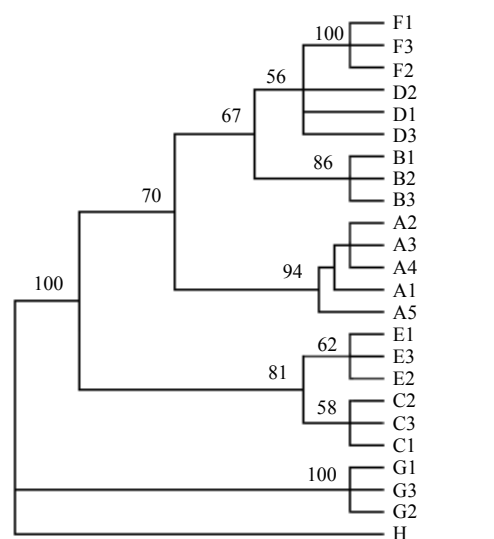
名 称	K2P 遗传距离	ITS	<i>psbA-trnH</i>
碎米桠	种间	0.007 08~0.072 61	0.008 06~0.024 76
	种内	0~0.001 76	0~0.002 68
香茶菜	种间	0.005 31~0.068 92	0.002 71~0.024 63
	种内	0	0
毛叶香茶菜	种间	0.007 06~0.072 66	0.002 71~0.027 99
	种内	0	0
显脉香茶菜	种间	0.008 83~0.070 50	0.005 47~0.022 66
	种内	0	0
溪黄草	种间	0.007 06~0.072 40	0.005 47~0.022 09
	种内	0~0.001 75	0
内折香茶菜	种间	0.015 93~0.083 86	0.022 04~0.031 02
	种内	0	0
线纹香茶菜	种间	0.068 62~0.083 86	0.017 71~0.031 02
	种内	0	0

同属近缘种类的 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的 NJ 系统发育树 (图 1、2), 外类群选择与香茶菜属近缘的罗勒属^[19]。从 NJ 树可以看出, ITS 序列构建的分子系统树上 (图 1), 碎米桠的 5 个居群样本聚为一单系分支, 支持率为 94%, 其中, 香茶菜的 3 个居群样本与内折香茶菜 3 个居群样本聚为一单系分支, 支持率 56%, 其余 4 个物种的各自 3 个居群样本都聚为一单系分支, 具有较高的支持率。依据 ITS 序列构建的分子系统树可将碎米桠与其同属近缘种类明显地区分开。系统发育关系图显示, 碎米桠与毛叶香茶菜、香茶菜、内折香茶菜聚为一单系分支, 具有 70% 的支持率, 溪黄草和显脉香茶聚为一单系分支, 具有 81% 的支持率, 线纹香茶菜处于系统树的基部位置。在 *psbA-trnH* 分子系统树上 (图 2), 碎米桠的 5 个居群样本聚为一单系分支, 具有 68% 的支持率, 其余 6 个物种的各自 3 个居群样本均聚为一单系分支, 具有较高支持率。依据 *psbA-trnH* 序列构建的分子系统树可将碎米桠与其同属近缘种类明显地区分开。系统发育关系图显示, 碎米桠与毛叶香茶菜、香茶菜、内折香茶菜聚为一单系分支, 支持率为 51%, 溪黄草和显脉香茶聚为一单系分支, 具有 63% 的支持率, 线纹香茶菜处于系统树的基部位置。

4 讨论

4.1 基于 ITS 和 *psbA-trnH* 序列对碎米桠与其近缘种的分子鉴定

近年来, 随着碎米桠功效在医学临床方面的不



分支上部数值表示 NJ 的 BS 分析对该分支的支持强度 (>50%), 下同

BS values of NJ (> 50%) are shown above and below branches, same as below

图 1 基于 NJ 法 (ITS 数据) 构建系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on NJ method (ITS data)

断发现, 碎米桠市场需求量也越来越大。然而, 由于香茶菜属药用植物种类众多, 多个地区出现碎米桠的近缘种类替代用药, 导致冬凌草临床用药存在不安全因素。本研究应用国际通用的 DNA 条形码序列核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列对碎米桠及其同属近缘种 7 个物种 (23 个样本) 进行鉴

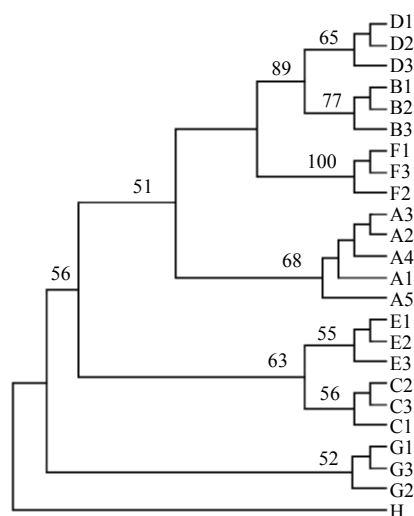


图2 基于NJ法(*psbA-trnH*数据)构建系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ method (*psbA-trnH* data)

定研究,结果表明 ITS 和 *psbA-trnH* 序列在碎米槎 5 个不同居群个体间均存在少量的变异,在碎米槎与其同属近缘种之间,存在丰富的变异。碎米槎与其同属近缘种之间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的种间 K2P 遗传距离均远大于碎米槎种内居群间 K2P 遗传距离(表 2)。NJ 树聚类分析结果显示,在 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树上,碎米槎 5 个居群均聚为一单系分支,支持率分别均为 94%和 68%,与其他 6 个近缘种很好地区分开(图 1、2)。此外,《中国药典》2010 年版附录中首次收载中药材溪黄草的来源为香茶菜属的植物溪黄草或线纹香茶菜[《中国药典》2010 年版中拉丁文名为 *Isodon striatus* (Benth.) Kudo, *Flora of China* 中的拉丁文名为 *Isodon lophanthoides* (Buchanan-Hamilton ex D. Don) H. Hara]的干燥地上部分。本研究的结果发现,溪黄草和线纹香茶菜与其同属 5 个近缘种之间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的种间 K2P 遗传距离均远大于溪黄草和线纹香茶菜的 3 个居群样本间的种内 K2P 遗传距离(表 2)。NJ 树聚类分析结果显示,在 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树上,溪黄草和线纹香茶菜各自的 3 个居群均聚为一单系分支,具有较高的支持率,与其他 5 个近缘种很好地区分开(图 1、2)。本课题组的研究支持卢小蕾等^[8]利用 RAPD 分子标记对碎米槎与其同属 5 个近缘种的研究结果,表明河南产香茶菜属植物不同种间存在明显的遗传分化,ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以作为碎米槎、溪黄草及其与同属近缘种进行鉴定的条形码序列。

4.2 碎米槎及其近缘种的系统发育关系

基于 DNA 条形码技术的分子鉴定不仅能准确鉴定中药材正品与伪品,还能准确构建药用植物与其近缘种类的系统发育关系,是开展药用植物亲缘学研究的基础和关键^[20]。本研究对碎米槎与其同属近缘种的系统发育关系研究中发现,基于核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列构建的分子系统树拓扑结构基本一致(图 1、2),但核基因 ITS 的 NJ 分子系统树中的各节点的支持率稍高于叶绿体基因 *psbA-trnH* 的 NJ 分子系统树各节点的支持率,这与核基因 ITS 序列对比叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列具有较多的变异位点(信息位点)相关^[21]。其中,碎米槎与毛叶香茶菜、香茶菜和内折香茶菜亲缘关系较近,溪黄草和显脉香茶菜亲缘关系最近。此外,《中国药典》2010 年版中,冬凌草的基源植物碎米槎的拉丁文名称仍为 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara,参照 *Flora of China* 中碎米槎的命名和植物命名法规, *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 被作为 *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara 的异名,应该废弃。《中国药典》中冬凌草的基源植物碎米槎的拉丁文名称应更改为 *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara。本课题组的研究对碎米槎及其近缘种的系统发育关系进行初步探讨,但鉴于香茶菜属植物种类较多,进一步在该属扩大取样范围,选取 ITS 和 *psbA-trnH* 序列及其他基因片段开展分子系统学研究,方能全面构建香茶菜属属下系统发育框架,从分子水平揭示该属各种间的亲缘关系,这将为香茶菜属的药用植物的资源开发与利用、品种选育、引种栽培提供可靠的理论依据。

志谢: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课题组提供本研究分子实验平台。中国科学院植物研究所标本馆协助查阅标本。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 魏志雄, 高幼衡, 卢海啸, 等. 显脉香茶菜中二萜类成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 247-250.
- [4] 孙骏, 郭莉, 庄炜, 等. 我国药用香茶菜属植物化学及药理学研究新进展 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 附 3-附 4.
- [5] 丁宝章, 王遂义. 河南植物志 (第三册) [M]. 郑州: 河

- 南科学技术出版社, 1997.
- [6] 苏秀红, 董诚明, 冯卫生, 等. 冬凌草叶片形态多样性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2351-2353.
- [7] 罗晓铮, 董诚明, 苏秀红, 等. 冬凌草的性状及显微鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 423-424.
- [8] 卢小蕾, 陈随清, 李雪菊, 等. 河南产香茶菜属 6 种植物的 RAPD 分析 [J]. 河南科学, 2006, 24(6): 841-843.
- [9] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Zhang J S, Li J, Li L, *et al.* Phylogeny of *Isodon* (Schrader ex Benth.) Spach (Lamiaceae) and related genera inferred from nuclear ribosomal ITS, *trnL-trnF* region, and *rps16* intron sequences and morphology [J]. *Syst Bot*, 2010, 35(1): 207-219.
- [20] 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—中药现代化, 2005, 7(6): 97-103.
- [21] 任宝青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.