

基于 DNA 条形码的芦荟属 6 种植物的分子鉴定

韩洁¹, 黄琼林², 吴文如^{3*}, 马新业¹, 杨锦芬¹, 詹若挺^{1*}

1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006
2. 广东医学院, 广东 湛江 524023
3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 筛选出适合芦荟属 6 种植物的 DNA 条形码序列。方法 采用试剂盒法提取芦荟属 6 个品种基原植物的 18 份样本基因组 DNA, 应用通用引物扩增其核基因 ITS2 序列和叶绿体 psbA-trnH、rbcL、matK 基因序列并进行双向测序, 采用 Sequencher 4.1.4 软件对测序峰图进行校对拼接, 应用 MEGA 5.0 软件分析不同候选序列的特征, 计算物种的种内、种间 Kimura 2-Parameter (K2P) 遗传距离, 比较其种内、种间变异的大小, 评估序列的条形码间距 (barcoding gap), 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统聚类树。结果 共获得 72 条序列, ITS2、psbA-trnH、rbcL、matK 基因序列各 18 条, 测序成功率均为 100%。比对后序列长度为 255~723 bp, GC 量范围为 30.6%~68.2%。psbA-trnH 基因序列的最大种内遗传距离均小于最小种间遗传距离, 有明显的 barcoding gap, ITS2、rbcL、matK 序列的种内变异和种间变异有一些重叠, 没有明显的 barcoding gap。基于 psbA-trnH 序列的发育树能将芦荟属 6 个品种完全区分, 而其他 3 个序列在区分这些芦荟属品种时存在模糊鉴定。结论 DNA 条形码技术可以准确鉴别芦荟属植物, psbA-trnH 序列可以作为鉴别芦荟属植物的优选序列。

关键词: 芦荟属; DNA 条形码; 分子鉴别; ITS2; psbA-trnH; rbcL; matK

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)11-1950-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.023

Molecular identification of six species in *Aloe* L. based on DNA barcoding

HAN Jie¹, HUANG Qiong-lin², WU Wen-ru³, MA Xin-ye¹, YANG Jin-fen¹, ZHAN Ruo-ting¹

1. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources from Lingnan of Ministry of Education, Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China
3. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To screen out a proper DNA barcode for suitable of six species in *Aloe* L. **Methods** The genomic DNA from 18 samples of six species in *Aloe* L. was extracted by Plant Genomic DNA Kit, then nuclear ITS2 and the chloroplast psbA-trnH, rbcL, and matK of the samples were amplified using the universal primers and sequenced bidirectionally. The obtained sequences were assembled using Sequencher 4.1.4. The characteristics of four candidate DNA barcodes were analyzed and the Kimura 2-Parameter (K2P) distances were calculated based on the sequences using MEGA 5.0. DNA barcoding gaps were evaluated by the analysis of the intra- and inter-specific divergences. The phylogenetic trees were constructed on the basis of Neighbor-Joining method. **Results** Totally 72 sequences of species in *Aloe* L. were acquired altogether, with each of ITS2, psbA-trnH, rbcL, and matK regions having 18 sequences respectively. The successful sequencing rate was 100% of all the four candidate barcodes. The alignment length and GC contents ranged from 255 to 723 bp and 30.6% to 68.2%. The maximum K2P intra-specific genetic distances were much smaller than the minimum inter-specific genetic distance of all samples in terms of psbA-trnH sequence and thus forming into a prominent barcoding gap. Due to some overlaps of intra- and inter-specific variation, there was no obvious barcoding gap in the aspect of ITS2,

收稿日期: 2016-01-31

基金项目: 广东省教育厅高等院校学科与专业建设专项资金项目(粤财教[2013]412号); 广州中医药大学2014年度“薪火计划”资助项目(XH20140109)

作者简介: 韩洁(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。E-mail: 1171730864@qq.com

*通信作者 吴文如(1976—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药品种鉴定及植物DNA条形码研究。

Tel: (020)39358296 E-mail: wuwenru@gzucm.edu.cn

詹若挺(1970—), 男, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为中药资源可持续利用研究与开发。E-mail: ruotingzhan@vip.163.com

rbcL, and matK sequences. The phylogenetic tree constructed by psbA-trnH sequence was capable to identify the six species of *Aloe* L. while there existed fuzzy identification as to the other three candidate barcodes. **Conclusion** DNA barcoding technology can identify species in *Aloe* L. accurately and psbA-trnH sequence can be the optimal barcode to identify the species of *Aloe* L.

Key words: *Aloe* L.; DNA barcoding; molecular identification; ITS2; psbA-trnH; rbcL; matK

芦荟是芦荟属 *Aloe* L. 植物的通称, 来源于单子叶植物纲百合目百合科多年生肉质草本植物。芦荟性苦、味寒, 归肝、胃、大肠经, 具有泻下通便、清肝泻火、杀虫疗疳的功能^[1], 临床上主要用于治疗热结便秘、惊痫抽搐、小儿疳积等。除此之外, 芦荟还是许多美容化妆品、保健食品和药品等的重要原料。

芦荟原产于地中海、非洲, 我国南方各地均有栽培, 广泛用于观赏或药用。芦荟属种类繁多, 各物种形态特征相近, 其茎、叶形态受遗传控制和环境影响且存在动态变化^[2], 同时存在很多变种。利用传统的基原鉴定和性状鉴定难以准确快速地进行鉴别, 因此, 有必要建立一种快速、准确鉴别芦荟属物种的新方法。

DNA 条形码是当前生物分类学的热门技术, 是利用一段有足够变异的、易扩增且相对较短的标准 DNA 片段 (500~1 000 bp) 对物种进行快速、准确的自动鉴定^[3]。2009 年, 生命条形码联盟植物工作组建议将 rbcL 和 matK 基因片段作为植物的核心条形码, 叶绿体 psbA-trnH 片段和核基因 ITS 片段为补充条形码^[4]。Chen 等^[5]通过分析 6 600 多种植物, 发现 ITS2 序列具有较高的扩增效率, 且在物种水平的鉴定成功率高于 90%, 提议将 ITS2 序列作为药用植物的通用条形码。目前, DNA 条形码技术已经广泛应用于药用植物的鉴别研究^[6-7]。而对芦荟的研究主要集中在芦荟的化学成分^[8-9]、临床药理^[10-11]、开发利用^[12-13]等方面, 尚未见有芦荟属植物 DNA 条形码研究的相关报道。

本研究选用 4 条热门 DNA 条形码序列对芦荟属 6 种植物进行鉴别, 比较不同候选片段对该属物种的适用性和鉴别能力, 以筛选能鉴别该属植物的优选 DNA 条形码序列, 为该属植物的分子鉴定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所选用的芦荟属 6 个品种均采自广州中医药大学药王山, 每个品种取 3 株不同植株的样本, 具体样品信息见表 1。样品由广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员和广东中医

表 1 材料信息表

Table 1 Information of experimental materials

植物	拉丁名	标本编号
中华芦荟	<i>Aloe vera</i> L. var. <i>chinensis</i> Haw	79-1、79-2、79-3
皂质芦荟	<i>Aloe saponaria</i> Haw	80-1、80-2、80-3
海岸芦荟	<i>Aloe littoralis</i>	81-1、81-2、81-3
日本芦荟	<i>Aloe arborescens</i> Miller	82-1、82-2、82-3
库拉索芦荟	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	83-1、83-2、83-3
好望角芦荟	<i>Aloe ferox</i> Miller	84-1、84-2、84-3

药博物馆张秋镇助理研究员协助采集并鉴定, 凭证标本保存于广州中医药大学岭南中药资源教育部重点实验室。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 电泳仪 (DYY-8C 型), 北京市六一仪器厂; 电子天平 (METTLER TOLEDO ME204), 梅特勒托利多仪器 (上海) 有限公司; 微量分光光度计 (TGem Spectrophotometer OSE-260), 天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 仪 (Bio-Rad PTC-200), 美国; 凝胶成像系统 (Vilber Lourmat, INFINITY-1000), 法国; 掌上离心机 (Eppendorf Minispin), 德国; 漩涡混匀器 (Labnet, Vortex Mixer), 美国。

1.2.2 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国)、Premix TaqTM (Ex TaqTM Version 2.0, Takara Co., 中国)、琼脂糖 (Biowest, 西班牙)、灭菌水、液氮、氯仿、无水乙醇、Goldview 核酸染料。

1.3 方法

1.3.1 样品 DNA 的提取 取硅胶干燥过的植物叶片约 10 mg, 经液氮研磨后, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取样品 DNA, 使用 TGem Spectrophotometer 微量分光光度计 (Tiangen Biotech Co., 中国) 对提取的 DNA 进行纯度和浓度测定。

1.3.2 序列扩增 不同 DNA 条形码序列的通用引物、PCR 反应体系及扩增程序均参考文献方法^[14], 实际操作时扩增条件略有调整, 具体引物序列及反

应条件见表 2。25 μL PCR 反应体系包括: Premix Taq 酶 (Takara Co., 中国) 12.5 μL , 上游和下游引物各 0.5 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 补齐至 25 μL 。

扩增结束后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并使用凝胶成像系统分析。

1.3.3 PCR 产物测序及序列数据处理

PCR 扩增成

表 2 实验用引物及反应条件

Table 2 Universal primer sequences and PCR reaction conditions

候选片段	引物名称	引物序列 (5'→3')	反应程序
ITS2	ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 40 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min
	ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
psbA-trnH	fwd PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	95 $^{\circ}\text{C}$ 、4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55.4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min
	rev TH	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	
rbcL	rbcLa_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	95 $^{\circ}\text{C}$ 、4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55.4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min
	rbcLa_R	GTAAAATCAAGTCCACCRG	
matK	390F	CGATCTATTCAATCAATATTTTC	94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 40 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min
	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	

功后, 各样品交由华大基因科技 (广州) 有限公司纯化, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA) 进行双向测序。测序所得的峰图采用序列拼接软件 Sequencher 4.1.4 进行校对拼接, 去除引物区和低质量的序列。根据 Genbank 上序列注释, 其中 psbA-trnH 去除 psbA 和 trnH 基因区段获得 psbA-trnH 间隔区^[15], ITS2 基于隐马尔可夫模型 (Hidden Markov model, HMM) 去除 5.8 S 和 28 S 基因区段获得 ITS2 间隔区^[16-17]。运用 MEGA 5.0 软件对拼接后序列进行比对分析, 基于 Kimura 2-Parameter (K2P) 双参数模型和邻位连接法 (neighbor-joining, NJ), 计算遗传距离, 构建条形码距离 (barcoding gap) 图和系统发育树, 系统树各分支的相对支持率采用 Bootstrap 法 (BS) 检测, 自展系数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取、PCR 扩增及序列拼接

按照试剂盒操作步骤, 分别提取 18 个样品的基因组 DNA, 经微量分光光度计测定, A_{260}/A_{280} 的值在 1.62~2.03, 表明 DNA 纯度较好, 各样品 DNA 的浓度在 25.28~453.76 ng/ μL , 表明 DNA 质量浓度较高, 符合后续实验要求。对提取的 DNA 进行电泳检测, 结果见图 1, 条带较完整清晰。以通用引物对 ITS2、psbA-trnH、rbcL、matK 4 条序列进行 PCR 扩增, 电泳结果见图 2, 18 个样品条带明亮单一, 扩增成功率均为 100%, 可用于后续的测序分析。以碱基质量 Q 值 (quality value) 大于 20 (碱基读取错误的概率 $\leq 1\%$) 为标准, 对符合标准的测

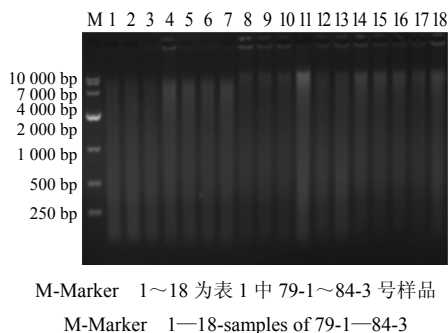


图 1 样品 DNA 提取产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of genomic DNA extracted from all samples

序序列进行拼接和校对。

2.2 候选序列的特征

如表 3 所示, 本研究共获得 ITS2、psbA-trnH、rbcL 和 matK 序列各 18 条, 序列的测序成功率均为 100%。不同候选序列在序列长度、GC 量上有较明显的差异。比对长度均符合理想条形码序列需尽可能短 (500~1 000 bp) 的选择标准, 比对序列长度由高到低依次为 matK、psbA-trnH、rbcL、ITS2, GC 量则排序相反。候选序列中 ITS2 序列变异最大, 占总位点的 4.3%, rbcL 序列变异位点数最少, 占总位点的 1.7%, psbA-trnH 序列和 matK 序列变异位点数相近, 分别占总位点的 2.8% 和 2.5%。

2.3 候选序列的种内、种间变异分析

本研究采用 MEGA 5.0 软件对芦荟属不同物种进行样品间的遗传距离分析, K2P 遗传距离结果

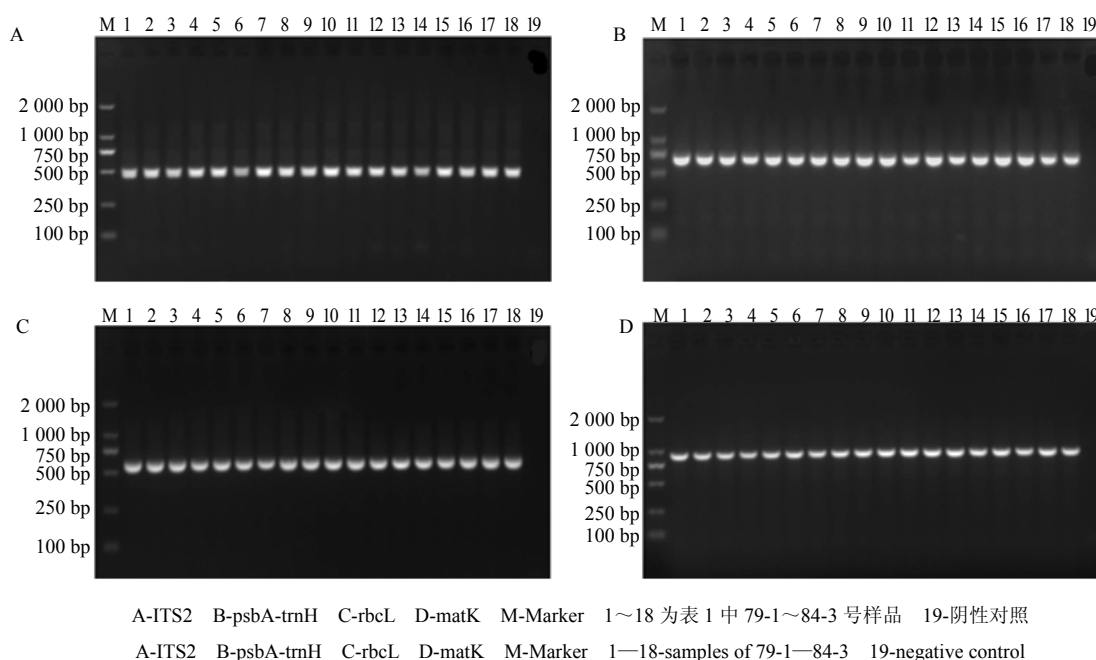


图 2 样品 4 条序列的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of PCR products of four barcode sequences

表 3 不同候选序列在芦荟属植物中的特点

Table 3 Sequence characteristics of different candidate sequences in species of *Aloe* L.

序列	序列总数/条	原序列长度/bp	比对后序列长度/bp	保守位点数 (百分率/%)	变异位点数 (百分率/%)	简约信息位点数 (百分率/%)	GC 平均量/%
ITS2	18	255	255	244 (95.7)	11 (4.3)	11 (4.3)	68.2
psbA-trnH	18	575~606	579	563 (97.2)	16 (2.8)	16 (2.8)	32.1
rbcL	18	573~595	573	563 (98.3)	10 (1.7)	10 (1.7)	42.9
matK	18	744~844	723	705 (97.5)	18 (2.5)	18 (2.5)	30.6

表明, 在 ITS2、psbA-trnH、rbcL 和 matK 序列中, 所有样品的平均遗传距离分别为 0.020、0.011、0.006、0.009, 种间 K2P 遗传距离分布于 0~0.040 (ITS2)、0.002~0.020 (psbA-trnH)、0~0.011 (rbcL)、0~0.018 (matK), ITS2 序列的种间差异最大, psbA-trnH 和 matK 序列次之, rbcL 序列最小。ITS2 序列最大种间遗传距离是 0.040, 分别位于皂质芦荟 (80) 和库拉索芦荟 (83)、海岸芦荟 (81) 和库拉索芦荟 (83) 之间, psbA-trnH 序列的种内最大变异小于种间最小变异, 较为理想。

2.4 不同序列变异性的 barcoding gap 评估

不同候选序列的 barcoding gap 见图 3, ITS2 序列种间变异最大, rbcL 和 matK 序列种间变异水平相对较低, ITS2、rbcL 和 matK 序列的种内和种间变异均有重叠, 没有明显的 barcoding gap,

psbA-trnH 序列变异程度不是很高, 但是序列种间和种内变异没有重叠, 明显分为两大部分, 有显著的 barcoding gap。

2.5 候选序列的物种鉴定有效性评价

使用 MEGA 5.0 软件对测序结果进行分析并建立 DNA 条形码的系统发育树。在采用 NJ 法构建系统发育树时, 各个序列的建树效果都较好, 基本上能将不同物种分开, 结果见图 4。psbA-trnH 序列能将芦荟属的 6 个品种准确区分, 其所构建的系统树各个品种不同的样本均分别聚在一起, 表现出单系性。ITS2、rbcL 和 matK 序列对其中 4 个品种鉴定效果良好, ITS2 序列不能区分皂质芦荟 (80) 和海岸芦荟 (81), 而 rbcL 和 matK 序列不能区分中华芦荟 (79) 和库拉索芦荟 (83)。因此, psbA-trnH 序列在芦荟属 6 个品种的鉴定有效性方面聚类效果最好。

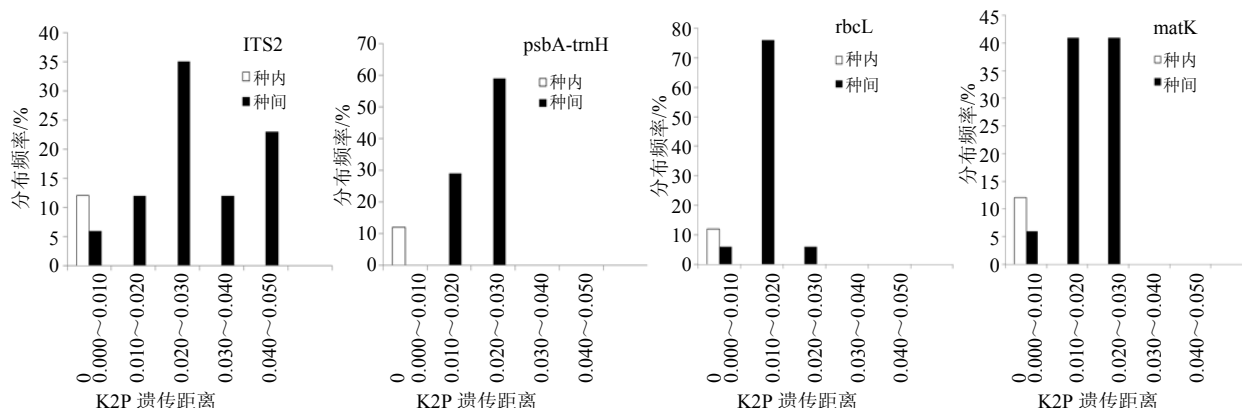


图 3 不同候选序列的 barcoding gap 图

Fig. 3 Distribution for intra- and inter-specific genetic variation of different candidate sequences

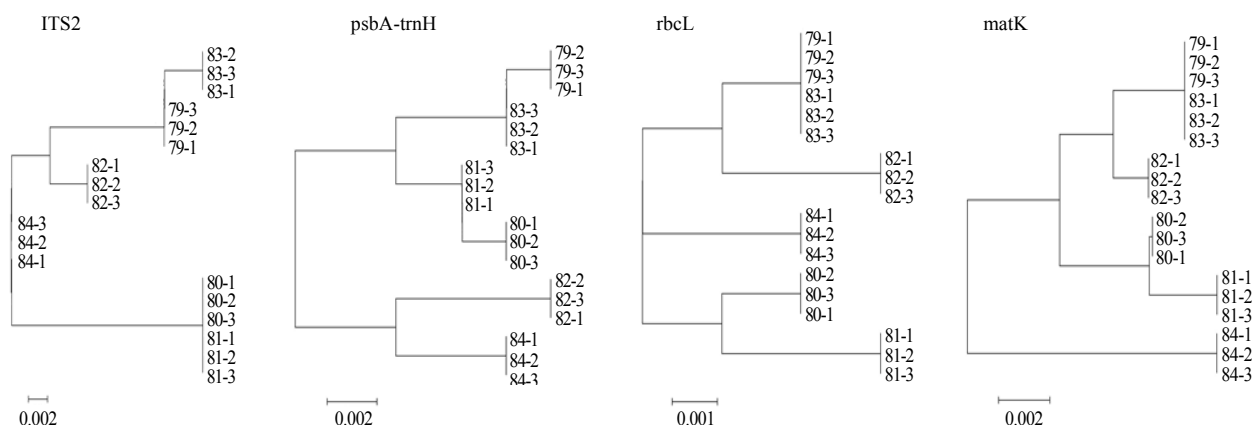


图 4 不同序列基于 NJ 法构建的系统发育树图

Fig. 4 Phylogenetic trees of different candidate sequences constructed using NJ method

3 讨论

迄今国内外对芦荟属植物鉴别的报道较少, 仅见少数利用 RAPD 技术进行芦荟遗传稳定性的研究^[18-20]。RAPD 分子标记实验可重复性较差不利于实际操作, 而 DNA 条形码技术可重复性高、操作简单、易于标准化, 无疑是对传统形态鉴定学的有力补充, 得到了许多专家学者的肯定^[21]。

DNA 条形码技术是基于分子生物学进行中药鉴定的重要工具, 具有足够的稳定性和准确度, 能构建丰富的 DNA 条形码分子鉴定数据库。理想的条形码序列应当具有明显的种间变异, 同时种内变异足够小, 引物通用性好且易于扩增, 能够通过测序得到高质量的序列^[22-23], 从而准确鉴别同属不同种的物种。随着十几年的发展, DNA 条形码技术日趋成熟, 已成功应用于药用植物栽培品种、中成药、保健食品、食用菌等领域的鉴定^[24]。

本研究采用当前植物学界推荐的 4 个热点 DNA 条形码候选序列, 从种内种间变异、barcoding

gap、系统发育树 3 个方面分析不同 DNA 条形码对于芦荟属 6 种物种的鉴别能力, 目的在于找到能快速、通用地鉴别芦荟属的 DNA 条形码序列。研究结果表明 psbA-trnH 序列能准确鉴别芦荟属的 6 个品种, 可以作为鉴别芦荟属的优选 DNA 条形码序列。本研究选用的 rbcL 和 matK 序列采用 barcoding gap 法和构建系统发育树法均不能成功鉴定中华芦荟 (79) 和库拉索芦荟 (83) 这两个物种, 原因是二者的亲缘关系较近, 刘思言^[25]提及中华芦荟 *Aloe vera* L. var. *chinensis* Haw 是库拉索芦荟 *Aloe barbadensis* Miller 的变种, 这也就从分子水平上验证了中华芦荟和库拉索芦荟的近缘关系。ITS2 序列不能将皂质芦荟 (80) 和海岸芦荟 (81) 区分开, 同时 ITS2 序列未成功鉴别的样本没有与 rbcL 或者 matK 未鉴别出的样本重合, 推测将 ITS2 序列与 rbcL 或者与 matK 序列组合也可以成功将芦荟属的这些物种完全区分开, 但是由于 psbA-trnH 序列这一单序列就可以达到鉴别的目的, 本研究没有进一

步考察组合片段的鉴定效果。就 ITS2 序列和 rbcL 序列而言, 每一个品种的 3 个不同植株的样品没有碱基差异; 就 psbA-trnH 序列而言, 皂质芦荟 (80) 的 3 个不同植株的样品在第 559 位有一个碱基差异, 分别是 T (80-1)、T (80-2) 和碱基缺失 (80-3); 就 matK 序列而言, 中华芦荟 (79) 的 3 个不同植株的样品在第 739 位有 1 个碱基差异, 分别是 G (79-1)、C (79-2)、C (79-3)。

由于采样条件的限制, 本研究只对同一个产地的样品进行分析, 并且 GenBank 中可用的芦荟属相关数据非常少, 故没有纳入网上的数据做扩大样本量的分析。在后期的研究当中, 需要适当扩大样品采集的范围, 增加样品的数量。本研究虽然有一定的局限性, 但仍具有鉴定意义, 为芦荟属物种的准确鉴定提供科学依据, 同时为其他药用植物的鉴定提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 马艳萍, 徐呈祥, 刘友良. 芦荟叶的特异结构、叶内生物活性成分及其与逆境适应的关系 [J]. 热带作物学报, 2010, 31(4): 676.
- [3] Hebert P D, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. *Syst Biol*, 2005, 54(5): 852-859.
- [4] Hollingsworth P M, Forrest L L, Spouge J L, et al. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [5] 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.
- [6] 杨培, 周红, 辛天怡, 等. 黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1173-1176.
- [7] 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.
- [8] 李亚辉, 马艳弘, 黄开红, 等. 芦荟多糖的超声波辅助纤维素酶提取及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(11): 91-97.
- [9] 何思微, 何凤林, 赵立超, 等. 库拉索芦荟中芦荟多糖提取方法的比较 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(2): 32-35.
- [10] 朱蓉. 芦荟联合多种维生素治疗复发性口腔溃疡的短期疗效观察 [J]. 医学理论与实践, 2015, 28(4): 488-489.
- [11] 崔燕. 芦荟对黄曲霉毒素 B₁ 致大鼠肝损伤的干预及其作用机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [12] 杜国丰, 朱宝伟, 吴美毅, 等. 芦荟苹果保健醋饮料的研制 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(31): 196-199.
- [13] 万金志, 徐新军, 钟佳胜, 等. 国外芦荟药品研究开发现状与趋势 [J]. 今日药学, 2013, 23(1): 59-62.
- [14] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [15] Ma X Y, Xie C X, Liu C, et al. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1919-1924.
- [16] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [17] Koetschan C, Hackl T, Muller T, et al. ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63(3): 585-588.
- [18] 李妮亚, 高培元, 周鹏, 等. RAPD 技术在芦荟属植物分类研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1432-1437.
- [19] Shioda H, Satoh K, Nagai F, et al. Identification of *Aloe* species by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis [J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2003, 44(4): 203-207.
- [20] Sahoo S, Rout G R. Plant regeneration from leaf explants of *Aloe barbadensis* Mill. and genetic fidelity assessment through DNA markers [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2014, 20(2): 235-240.
- [21] 杨慧洁, 杨世海, 张淑丽, 等. 药用植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2581-2582.
- [22] 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(3): 434-439.
- [23] 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): 667-669.
- [24] 辛天怡, 雷美艳, 宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 170-174.
- [25] 刘思言. 芦荟遗传转化受体体系的建立及转基因研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.