

唇形科常见药用植物 DNA 条形码的鉴定研究

杨 鹏¹, 沈文华², 石建明¹, 陈兴银¹, 张凯凯¹, 关 萍^{1*}

1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025

2. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

摘要: 目的 筛选出适合唇形科常见药用植物的 DNA 条形码序列。方法 通过对 33 种唇形科常见药用植物的核糖体 ITS 序列和 40 种唇形科常见药用植物的叶绿体 matK 基因进行 PCR 扩增和测序, 用 MEGA 6.0 软件计算其种间、种内的 Kimura 2-parameter (K2P) 距离及各序列变异位点, 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 ITS 序列长度为 620~698 bp, 平均 (G+C) 量为 62.8%, 叶绿体 matK 基因序列长度为 859~932 bp, 平均 (G+C) 量为 34%, ITS 序列与 matK 基因都有明显的 barcoding gap, 但 matK 基因的 barcoding gap 要小于 ITS 序列, 从聚类分析来看, matK 基因能更好地鉴定唇形科不同物种。结论 推荐 matK 基因序列作为唇形科植物鉴定的优选序列之一。

关键词: 唇形科; DNA 条形码; ITS; matK; 遗传距离

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1397-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.023

Identification of DNA barcoding of common medicinal plants in Lamiaceae

YANG Peng¹, SHEN Wen-hua², SHI Jian-ming¹, CHEN Xing-yin¹, ZHANG Kai-kai¹, GUAN Ping¹

1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To screen a proper DNA barcoding suitable for common medicinal plants in Lamiaceae. **Methods** The rDNA ITS sequence from 33 kinds of common medicinal plants in Lamiaceae and the chloroplast matK gene sequence from 40 kinds of common medicinal plants in Lamiaceae were amplified by PCR and sequenced. The interspecific and intraspecific Kimura 2-parameter distance (K2P) and the mutation sites in each sequence were calculated, and barcoding gap of sequence was evaluated by MEGA6.0. The phylogenetic trees were constructed on the basis of Neighbor-Joining method. **Results** The total length of ITS sequence was 620—698 bp, the average G + C content was 62.8%, the chloroplast matK gene sequence length was 859—932 bp, the average G + C content was 34%, and the ITS sequence and matK gene sequence have obvious DNA barcoding gap, but the matK DNA barcoding gap was less than that of ITS gene sequence. From clustering analysis, the matK gene can identify the different species in Lamiaceae better than ITS sequence. **Conclusion** matK sequence can be used as a preferred sequence to identify the species in Lamiaceae.

Key words: Lamiaceae; DNA barcoding; ITS; matK; Genetic distance

唇形科 (Lamiaceae) 植物为多年生或一年生草本、灌木或半灌木、藤本, 是双子叶植物纲中的一个大家族, 以地中海和小亚细亚等地区为中心呈世界性分布, 全球约 220 属, 3 500 余种^[1]。该科常见传统药用植物主要有藿香 *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) O. Ktze., 香薷 *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland., 益母草 *Leonurus japonicus* Houtt., 紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt., 夏枯草 *Prunella*

vulgaris L., 活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr., 荆芥 *Nepeta cataria* L., 草石蚕 *Stachys sieboldii* Miq. 等, 具有抗炎、抗过敏、抗氧化等药用价值^[2]。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术是利用基因组中一段通用 DNA 片段对物种进行鉴定的一种分子诊断技术, 具有快速、准确、高效、自动化等特点^[3]。该技术由加拿大圭尔夫大学 (University of

收稿日期: 2016-10-31

基金项目: 贵州省社会发展攻关课题 (201303137); 中央高校基本业务费一般项目 (XDJK2016C006)

作者简介: 杨 鹏 (1991—), 男, 土家族, 在读硕士, 研究方向为植物学。E-mail: 894734163@qq.com

*通信作者 关 萍, 女, 博士, 教授, 研究方向为植物学、分子生物学及植物生物技术。E-mail: guanp508@163.com

Guelph)教授 Hebert 等^[4]于 2003 年首次提出后并受到广泛的关注,现已成为生物分类和鉴定的研究热点,在物种鉴定方面显示了广阔的应用前景。线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码在动物中已得到广泛的应用,但由于 COI 基因的进化速率在动物中要远高于在植物中,因此迄今为止在陆生植物中还没有找到通用性 DNA 条形码^[5-8]。尽管如此,科学家们对植物 DNA 条形码的研究探索从未间断。Kress 等^[9]对陆生植物大范围的采样研究证明,结合 *rbcL* 片段和 *trnH-psbA* 片段可以作为多数植物 DNA 条形码的核心片段。但 Logacheva 等^[10]通过对伞形科 (Umbelliferae) 和禾本科 (Poaceae) 部分植物的 *trnH-psbA* 片段进行研究,表明 *trnH-psbA* 片段的变异率较低,不能完全作为植物的通用条形码片段。随后 Lahaye 等^[11]对兰科 (Orchidaceae) 植物的叶绿体 DNA 片段进行了对比研究,结果 *matK* 片段可以作为有花植物通用的 DNA 条形码。Newmaster 等^[12]在对合欢属 *Acacia* Mill. 植物的部分 DNA 片段进行对比分析,结果表明 *matK*、*trnH-psbA* 和 *rbcL* 片段都能很好地鉴定合欢属植物。Chen 等^[13]通过对部分药用植物 ITS 片段研究表明,ITS 可以作为药用植物的 DNA 通用条形码候选序列。Fazekas 等^[14]对 251 株植物的 *matK*、*trnH-psbA*、*rbcL*、ITS1、UPA、*rpoB*、*rpoC1*、*atpF-atpH* 和 *psbK-psbI* 等片段进行研究分析,指出 *trnH-psbA* 片段扩增成功率和物种识别率均最好。Song 等^[15]通过 8 个条形码候选区 (*rbcL*、*trnH-psbA*、*ndhJ*、*rpoB*、*rpoC1*、*accD*、*ycf5*、*nrITS*) 对蓼科 (Polygonaceae) 植物进行分析,结果表明 *trnH-psbA* 片段最适合作为蓼科植物鉴定的 DNA 条形码。当前根据现有的研究结果筛选出的片段并不能完全满足 DNA 条形码的标准,仍需要大量的实验去验证其物种识别及鉴定能力。

当前有关唇形科植物 DNA 条形码的研究报道还比较少,且唇形科植物 DNA 条形码的研究尚处于探索阶段。Mattia 等^[16]利用 4 个条形码候选区 (*matK*、*rbcL*、*rpoB*、*psbA-trnH*) 对唇形科 6 属 64 个物种进行研究,结果表明 *psbA-trnH* 最适合作为唇形科部分植物 DNA 条形码;Han 等^[17]对唇形科常见植物的 *matK*、*rbcL*、ITS2 和 *psbA-trnH* 4 个 DNA 条形码候选序列作对比分析后,认为 ITS2 序列能作为鉴定唇形科药用植物 DNA 条形码;Guo 等^[18]利用 DNA 条形码鉴定药用植物黄芩及其混伪品时,提出仅 *psbA-trnH* 可单独作为药用植物黄芩

及其混伪品的 DNA 条形码。本实验通过对唇形科部分药用植物的核糖体 ITS 序列和叶绿体 *matK* 基因序列进行对比分析,旨在选出鉴别唇形科植物的最适 DNA 条形码候选片段,为解决唇形科植物的分子鉴定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的唇形科常见药用植物共 23 属 40 种,其中包括 6 变种 (表 1)。所有标本均由贵州大学生命科学学院关萍教授鉴定,凭证标本保存于贵州大学生命科学学院植物组研究室标本收藏室。

1.2 DNA 提取、扩增及测序

植物总 DNA 提取参照陈业等^[19]采用改良的 CTAB 法。ITS 和 *matK* 序列扩增引物分别参照 White 等^[20]和 Cuénoud 等^[21]设计的引物,引物序列及 PCR 扩增程序见表 2,PCR 产物经检测之后直接送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序,测序采用双向测序。

1.3 数据处理及分析

用 DNASTar 软件对序列进行拼接、校对,采用 MEGA6.0 软件对序列进行多序列比对分析,比较不同序列的比对后长度 (Alignment Length)、保守位点 (conserved sites)、可变位点 (Variable sites) 和信息位点 (Pasim-informative sites),分析序列的碱基组成,采用 NJ 法建立系统发育树,设置置信度自举检测即 bootstrap 为 1 000 次,选择 K2P 模型计算遗传距离并结合 Microsoft Excel 构建条形码距离图,用 SPSS19.0 软件对物种 ITS 序列和 *matK* 基因的种间和种内遗传距离进行 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果与分析

2.1 候选序列特征

唇形科常见药用植物序列分析情况见表 3,核基因 ITS 序列长度为 620~698 bp,而叶绿体 *matK* 基因序列长度为 859~932 bp,ITS 序列中平均 (G+C) 量为 62.8%,*matK* 基因序列中平均 (G+C) 量为 34%,ITS 序列中 (G+C) 量几乎为 *matK* 基因 (G+C) 量的 2 倍。ITS 序列中变异位点占 51.34%,信息位点数占 42.06%;*matK* 基因中变异位点占 36.15%,而信息位点仅占 23.89%。

2.2 候选序列种间、种内遗传距离分析

K2P 遗传距离结果表明,33 种唇形科常见药用植物的 ITS 序列遗传距离最小为 0.000,最大为 0.190,

表 1 供试全材料

Table 1 Total materials for experiment

编号	物种	采集地	凭证标本
1	邻近风轮菜 <i>Clinopodium confine</i>	贵州省贵阳市	GY201211
2	五彩苏 <i>Coleus scutellarioides</i>	贵州省贵阳市	GY201210
3	金疮小草 <i>Ajuga decumbens</i>	贵州省贵阳市	GY201201
4	寸金草 <i>Clinopodium megalanthum</i>	贵州省贵阳市	GY201216
5	藿香 <i>Agastache rugosa</i>	贵州省贵阳市	GY201214
6	显脉香茶菜 <i>Isodon nervosus</i>	贵州省铜仁市	FJS201312
7	活血丹 <i>Glechoma longituba</i>	贵州省贵阳市	GY201301
8	龙头草 <i>Meehanian henryi</i>	贵州省铜仁市	FJS201309
9	野草香 <i>Elsholtzia cypriani</i>	贵州省贵阳市	GY201228
10	留兰香 <i>Mentha spicata</i>	贵州省贵阳市	GY201222
11	香薷 <i>Elsholtzia ciliata</i>	贵州省贵阳市	GY201223
12	荆芥 <i>Nepeta cataria</i>	贵州省贵阳市	GY201305
13	匍匐风轮菜 <i>Clinopodium repens</i>	贵州省贵阳市	GY201213
14	宝盖草 <i>Lamium amplexicaule</i>	贵州省贵阳市	GY201203
15	疏毛罗勒 <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>pilosum</i>	贵州省贵阳市	GY201327
16	灯笼草 <i>Clinopodium polycephalum</i>	贵州省贵阳市	GY201122
17	细锥香茶菜 <i>Isodon coetsa</i>	贵州省黔东南州	ZY201304
18	欧薄荷 <i>Mentha longifolia</i>	贵州省贵阳市	GY201218
19	美国薄荷 <i>Monarda didyma</i>	贵州省贵阳市	GY201217
20	小叶假糙苏 <i>Paraphlomis javanica</i> var. <i>coronata</i>	贵州省铜仁市	FJS201311
21	益母草 <i>Leonurus japonicus</i>	贵州省贵阳市	GY201237
22	夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i>	贵州省贵阳市	GY201203
23	纤细假糙苏 <i>Paraphlomis gracilis</i>	贵州省贵阳市	GY201210
24	紫苏 <i>Perilla frutescens</i>	贵州省贵阳市	GY201219
25	牛至 <i>Origanum vulgare</i>	贵州省贵阳市	GY201220
26	深蓝鼠尾草 <i>Salvia guaranitica</i>	贵州省贵阳市	GY201204
27	血盆草 <i>Salvia cavaleriei</i> var. <i>simplicifolia</i>	贵州省贵阳市	GY201225
28	韩信草 <i>Scutellaria indica</i>	贵州省贵阳市	GY201302
29	贵州鼠尾草 <i>Salvia cavaleriei</i>	贵州省贵阳市	GY201226
30	草石蚕 <i>Stachys sieboldii</i>	贵州省贵阳市	GY201221
31	天蓝鼠尾草 <i>Saivia officinalis</i>	贵州省贵阳市	GY201207
32	长毛香科科 <i>Teucrium pilosum</i>	贵州省贵阳市	GY201307
33	假龙头花 <i>Physostegia virginiana</i>	贵州省贵阳市	GY201207
34	荔枝草 <i>Salvia plbeia</i>	贵州省贵阳市	GY201224
35	微毛血见愁 <i>Teucrium viscidum</i> var. <i>nepetoides</i>	贵州省铜仁市	FJS201308
36	白苏 <i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>	贵州省贵阳市	GY201215
37	兰花鼠尾草 <i>Salvia farinacea</i>	贵州省贵阳市	GY201205
38	针筒菜 <i>Stachys oblongifolia</i>	贵州省贵阳市	GY201306
39	灌丛石蚕 <i>Teucrium fruticans</i>	贵州省贵阳市	GY201202
40	一串红 <i>Salvia splendens</i>	贵州省贵阳市	GY201208

表 2 所用引物序列及相应 PCR 反应条件

Table 2 Sequences of used primers and corresponding PCR reaction conditions

引物名称	引物序列 (5'-3')	PCR 反应条件
ITS	F: TCCTCCGCTTATTGATATGC	94 ℃、4 min; 94 ℃、1 min, 53.6 ℃、45 s, 72 ℃、1 min, 35
	R: GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	次循环; 72 ℃、7 min
matK	F: CGATCTATTCAATCAATATTTC	94 ℃、4 min; 94 ℃、1 min, 50.4 ℃、40 s, 72 ℃、1 min, 30
	R: TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	次循环; 72 ℃、7 min

表 3 唇形科常见药用植物序列特征

Table 3 Sequence analysis on single barcodes for common medicinal plants in Lamiaceae

序列	长度变化/bp	平均 (C+G) 量/%	保守位点数	变异位点数	信息位点数
ITS	620~698	62.8	345	382	313
matK	859~932	34.0	597	342	226

平均遗传距离为 0.095; 其中假龙头花与野草香的 ITS 遗传距离最大为 0.190。40 种唇形科常见药用植物的 matK 基因遗传距离最小为 0.000, 最大为 0.150, 荆芥与针筒菜、荆芥与草石蚕的 matK 遗传距离最大为 0.150, 平均遗传距离为 0.081。ITS 序列的种间遗传距离差异要大于 matK 序列种间遗传序列, matK 序列的种内最大变异小于种间最小变异, 较为理想。

2.3 候选序列 Wilcoxon 秩和检验

使用 SPSS 19.0 软件, 利用 Wilcoxon 秩和检验对不同片段之间的种间和种内变异进行统计学比较, 在用于 Wilcoxon 秩和检验的 33 个物种中, matK 基因与 ITS 序列的正秩为 164 524, 负秩为 1 702 754, 检验结果为 ITS 序列的种间变异性大于 matK 基因, 且差异极显著 ($P < 0.01$)。在用于 Wilcoxon 秩和检验的 11 个物种中, matK 基因与 ITS 序列的正秩为 178, 负秩为 1 253, 检验结果为 ITS 序列的种内变异性大于 matK 基因, 且差异极显著 ($P < 0.01$)。从种间及种内的 Wilcoxon 秩和检验结果可以看出, 无论是种间还是种内的变异性, ITS 序列的变异性都大于 matK 基因序列的变异性, 种间、种内遗传距离 Wilcoxon 秩和检验的 P 值都小于 0.01, 说明两者之间的差异都极显著。

2.4 候选序列变异性的 barcoding gap 评估

从不同候选序列种内与种间变异相对分布图 (图 1) 可以看出, ITS 序列与 matK 基因序列都有比较明显的 barcoding gap。ITS 序列的 barcoding gap 位置在 0.09~0.10, 种内遗传距离大部分集中在 0.03 以下区域, 而种间遗传距离多集中于 0.10 以上区域, 种内遗传距离与种间遗传距离存在部分的重叠现象。matK 基因的 barcoding gap 位置在 0.01~0.02,

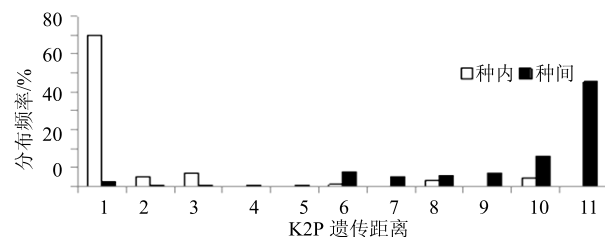


图 1 不同候选序列的 barcoding gap 图

Fig. 1 Barcoding gap plots of different candidate sequences

种内遗传距离大部分集中在 0~0.01 区域以内, 而种间遗传距离多集中于 0.04 以上区域, 虽然在 0.01~0.04 存在少量的重叠, 但是种内遗传距离在此区域内分布很少。仅从 barcoding gap 来讲, ITS 序列与 matK 基因都符合理想的 DNA 条形码要求, 可以作为唇形科常见药用植物的 DNA 条形码的理想候选序列。相比较而言, matK 基因具有更小的 barcoding gap, 种内遗传距离更加集中于小距离范围内, 因此, 作为唇形科常见药用植物的 DNA 条形码候选序列, matK 基因比 ITS 序列更加适合。

2.5 系统进化分析

利用 MEGA 6.0 软件的 NJ 法构建各序列的聚类树状图 (图 2), matK 基因序列构建的聚类图能很好地将所分析物种的同属样品聚在一起, 而不同种间的分支又能较好地分开 (除纤细假糙苏与小叶假糙

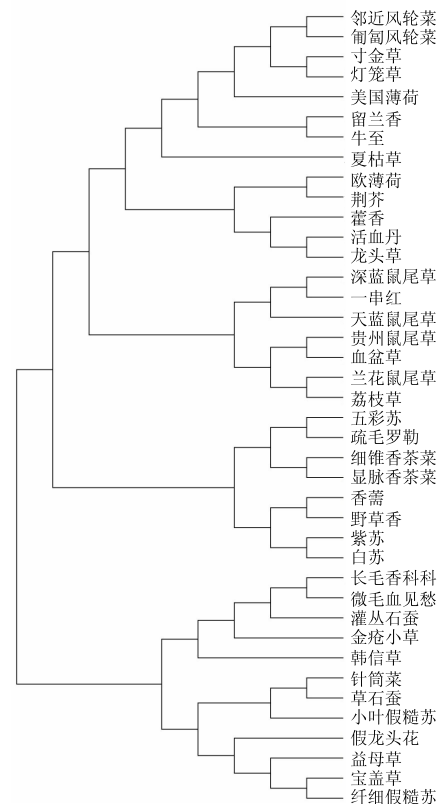


图 2 基于 matK 基因序列构建 NJ 系统进化树

Fig. 2 NJ tree based on matK sequences

苏,其聚类分支无法明显分开),充分说明 *matK* 基因序列对于唇形科植物具有很好地物种鉴别能力;而利用 ITS 序列构建的系统进化树无法很好地反映不同种间的遗传变异及同种样品间的同源性。由图 2 可知,假糙苏属的纤细假糙苏与小叶假糙苏 2 个种在 NJ 进化树中所处的位置较远,相比较而言,纤细假糙苏与益母草的亲缘关系较近,而小叶假糙苏则与水苏属的针筒菜、草石蚕的亲缘关系较近,也就是说,纤细假糙苏与小叶假糙苏之间的属内遗传距离大于其属间遗传距离。

3 讨论

DNA 条形码作为一种分子诊断技术现在已被普遍应用到物种鉴定中^[22]。理想的条形码基因片段应该满足以下几个特点:(1)种间变异明显大于种内变异;(2)一个或少数基因片段即可准确鉴定物种;(3)重复性和稳定性高;(4)操作简便,可实现自动化;(5)有统一的管理平台等^[23-24]。近年来,关于植物 DNA 条形码的候选片段研究还不成熟,已有研究表明,*matK* 基因序列更适合于不同科属之间的鉴定^[25]。*matK* 基因序列具有进化速度快,变异大等优点,作为一种候选的植物 DNA 条形码序列,已被众多学者关注^[26]。Gao 等^[27]利用 *matK* 基因对豆科植物进行研究表明,*matK* 基因可以作为豆科(*Leguminosae*)植物的鉴定候选条形码;胡伟毅等^[28]对 7 种苍耳属 *Xanthium* L. 植物的 *matK* 序列进行比对和分析,结果显示 *matK* 基因序列能对苍耳属植物进行有效的区分鉴定;焦婷等^[29]利用 *matK* 基因对 6 种常见牧草(聚合草 *Symphytum officinale* L., 紫花苜蓿 *Medicago sativa* L., 羊茅 *Festuca ovina* L., 箭筈豌豆 *Vicia sativa* L., 芨芨草 *Achnatherum splendens* N., 针茅 *Stipa capillata* L.) 进行研究结果表明,基于 *matK* 基因序列能实现 6 种牧草的鉴别。

本实验研究通过核糖体 ITS 序列和叶绿体 *matK* 基因序列对唇形科植物的 DNA 条形码的鉴定研究,结果表明 ITS 序列对收集到的唇形科常见药用植物的识别率为 70%,而 *matK* 基因序列的识别率为 95%。虽然核糖体 ITS 序列具有更高的变异性,但是其 PCR 扩增成功率较低,仅为 85%,且测序成功率也达不到 100%。综合考虑,认为叶绿体 *matK* 基因序列比核糖体 ITS 序列更适合作为唇形科常见药用植物 DNA 条形码,因此推荐 *matK* 基因序列作为唇形科植物鉴定的优选序列之一。

参考文献

- [1] 吴征镒. 中国植物志 (第 65 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 杨春澍. 《药用植物学》学习辅导 [J]. 中国药学杂志, 1990(12): 753-756.
- [3] Smith M A, Fisher B L, Hebert P D N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1825-1834.
- [4] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1): S96-S99.
- [5] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, et al. Plant DNA barcoding in China [J]. *J System Evol*, 2011, 49(3): 165-168.
- [6] Blaxter M, Mann J, Chapman T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philosoph Trans Royal Soci B Biol Sci*, 2005, 360(1462): 1935-1943.
- [7] Rach J, DeSalle R, Sarkar I N, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata [J]. *Proceed Royal Soci B Biol Sci*, 2008, 275(1632): 237-247.
- [8] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2802.
- [9] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [10] Logacheva M D, Valiejo-Roman C M, Pimenov M G. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae-Tordylieae W. D. J. Koch, with notes on evolution of their psbA-trnH sequences [J]. *Plant System Evol*, 2008, 270(3): 139-157.
- [11] Lahaye R, van d B M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [12] Newmaster S G, Ragupathy S, Janovec J. A botanical renaissance: state-of-the-art DNA barcoding facilitates an automated identification technology system for plants [J]. *Inter J Comput Appl Technol*, 2009, 35(1): 50-60.
- [13] 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.
- [14] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS*

- One*, 2008, 3(7): e2802.
- [15] 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.
- [16] Mattia F D, Bruni I, Galimberti A, *et al.* A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(3): 693-702.
- [17] Han J P, Shi L C, Chen X C, *et al.* Comparison of four DNA barcodes in identifying certain medicinal plants of Lamiaceae [J]. *J System Evol*, 2012, 50(3): 227-234.
- [18] Guo X, Wang X, Su W, *et al.* DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(8): 1198-1203.
- [19] 陈业, 张玉晶, 李娅迪, 等. 兜兰 ITS-PCR 反应体系的建立及优化 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40(7): 52-55.
- [20] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. *Genet Evol*, 1990, 38(3): 315-322.
- [21] Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, *et al.* Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences [J]. *Am J Bot*, 2002, 89(1): 132-144.
- [22] Cheung K S, Kwan H S, But P P H. Pharmacognostical identification of American and oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbit rarily primed polymerase chain reaction (AP2PCR) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1994, 42(1): 67.
- [23] Slabbinck B, Dawyndt P, Martens M, *et al.* TaxonGap: a visualization tool for intra-and inter-species variation among individual biomarkers [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(6): 1464-1475.
- [24] Chase M W, Nicolas S, Mike W, *et al.* Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philos Trans Ro Soci Lond*, 2005, 360(1462): 1889-1895.
- [25] Li X, Yang Y, Henry R J. Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2014, 90(1): 157-166.
- [26] 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.
- [27] Gao T, Sun Z Y, Yao H, *et al.* Identification of Fabaceae plants using the DNA barcode *matK* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(1): 92-94.
- [28] 胡伟毅, 邵套喜. *matK* 序列作为 DNA 条形码在苍耳属中的应用 [J]. 杂草科学, 2013, 31(4): 13-16.
- [29] 焦婷, 李永青, 姚喜喜, 等. 六种常见牧草 *Matk* 基因 DNA 条形码研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2016, 35(1): 5-8.