

• 药材与资源 •

基于 ITS2 条形码的乌头属藏药植物鉴别

任瑶瑶, 蔡子君, 赵梅宇, 宋良科, 江南屏, 谭睿*

西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

摘要:目的 乌头属藏药植物变异极为复杂, 品种繁多, 商品来源复杂, 极易造成药材混乱, 且大多乌头属藏药具有较大的毒性, 使安全用药面临巨大挑战。采用 ITS2 序列为 DNA 条形码, 建立一种快速、准确鉴定乌头属藏药药材的方法。方法 从青藏高原地区采集展花乌头、凉山乌头、工布乌头、露蕊乌头、铁棒锤、甘青乌头、木里乌头、弯喙乌头、多裂乌头、缩梗乌头等乌头属藏药样品 50 份, 分别提取样品 DNA, 对 ITS2 目标序列进行 PCR 扩增、测序, 获得 ITS2 序列信息; 运用 MEGA 6.0 对 50 条 ITS2 序列进行对比, 计算种间、种内遗传距离, 构建 neighbor joining (NJ) 系统进化树, 并比较样本 ITS2 序列间的二级结构差异。结果 乌头属藏药植物样本种间最小距离大于种内最大距离, NJ 树显示各种乌头属植物种内之间各单独形成一个分支, ITS2 序列二级结构也有明显差异, 能够将乌头属各种植物区分开。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码可以将乌头属藏药植物进行准确、快速的识别和鉴定, 为乌头属藏药的安全使用提供可靠的技术手段。

关键词: 藏药; DNA 条形码; ITS2 序列; 乌头属; 鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4614-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.023

Identification of Tibetan medicinal plants of *Aconitum* genus by ITS2 sequences

REN Yao-yao, CAI Zi-jun, ZHAO Mei-yu, SONG Liang-ke, JIANG Nan-ping, TAN Rui

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: Objective The complex morphological variation and sources of Tibetan medicinal plants from *Aconitum* genus make it difficult to identify the medicinal materials correctly. In addition, the toxicity of these materials could be a huge challenge for the safety of drug use. A rapid and accurate method for the identification and classification of Tibetan medicinal herbs of *Aconitum* genus was built by using ITS2 sequences as DNA barcodes. **Methods** A total of 50 samples of *Aconitum chasmanthum*, *A. liangshanicum*, *A. kongboense*, *A. gymnantrum*, *A. pendulum*, *A. tanguticum*, *A. phyllostegium*, *A. campylorrhynchum*, *A. Polyschistum*, and *A. sessiliflorum* were collected from the Qinghai-Tibet Plateau. PCR amplification and sequencing of ITS2 sequences were conducted after the extraction of DNA. Genetic distance, neighbor joining (NJ) phylogenetic tree and secondary structures of ITS2 sequences were analyzed using MEGA 6.0. **Results** The maximum distance between species was greater than the minimum distance within each species, NJ tree showed that the samples went to 12 separate branches, differences among the secondary structures of ITS2 sequences also made it clear to identify these species. **Conclusion** Using ITS2 sequence as DNA barcode can be an accurate and rapid method for identification and recognition for Tibetan medicinal plants of *Aconitum* genus, which provides a reliable technical means to ensure safety use of these Tibetan medicines.

Key words: Tibetan medicine; DNA barcode; ITS2 sequences; *Aconitum* L.; identification

藏药已有 2500 余年的发展历史, 并形成自己独特的理论体系——藏医药学。藏药学是我国传统药学中的一个重要的组成部分, 有着藏族人民与疾病斗争的宝贵经验, 具有独特的理论体系和民族特色^[1]。乌头属 *Aconitum* L. 植物在西藏地区

分布较为广泛, 有 44 个种和 5 个变种, 多生长于海拔 4 000~5 200 m 的高山灌丛或草地^[2]。乌头属藏药植物因具有很好药用价值的同时具有毒性^[3]而受到广泛关注。乌头属药材在藏医中应用广泛, 是很多藏成药的主要成分, 如收载在《中国药典》2015

收稿日期: 2018-05-06

基金项目: 国家科技重大专项 (2014ZX09304-307-001-019); 四川省重点研发项目 (2018SZ0061); 四川省中医药管理局项目 (2016Z013)

作者简介: 任瑶瑶 (1982—), 女, 硕士, 中药学专业。E-mail: yyren82@163.com

*通信作者 谭睿, 教授, 硕士生导师, 研究方向为民族药的资源保护及有效利用。Tel: (028)87634667 E-mail: tanrui@swjtu.edu.cn

年版^[4]中的“十二味翼首散”“二十五味珊瑚丸”“七十味珍珠丸”“十三味榜嘎散”等。乌头属藏药的商品来源较为复杂,并且缺乏统一完善的质量标准,很多乌头属藏药植物含有毒性很强的乌头碱类化合物,如果使用不当,可能导致中毒,严重者甚至死亡^[5]。目前国内外对乌头属藏药植物研究较少,其化学成分、药理作用、质量控制的研究还处于初步阶段^[6]。药用植物铁棒锤、多裂乌头、缩梗乌头等同物异名或同名异物现象十分严重,导致了药材市场乌头属药材商品交叉混淆的现象出现^[7]。

运用 DNA 条形码技术对药用植物进行鉴定是

目前中药鉴定的研究热点^[8-9],针对乌头属藏药的鉴定,目前生药学鉴定是主要的方法,由于乌头属藏药植物形态等特征极其相似,在用药时常常出现混淆。本研究运用基于 ITS2 序列为 DNA 条形码对几种常见乌头属藏药植物进行分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

从西藏、青海、甘肃、陕西及四川省的康定、木里、马尔康、若尔盖等地采集乌头属藏药植物样品 12 个种 49 份,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,保存于西南交通大学标本室,样本来源及其 ITS2 序列信息见表 1。

表 1 乌头属植物来源及其 ITS2 序列信息

Table 1 Samples of *Aconitum* genus used in present study and its ITS2 sequences

名称	拉丁名	来源	序列长度/bp	GC/%	GenBank 登录号	单倍型
展花乌头	<i>Aconitum chasmanthum</i>	西藏	218	67.9	MH193315	A1
展花乌头	<i>A. chasmanthum</i>	四川康定	218	67.4	MH193317	A1
展花乌头	<i>A. chasmanthum</i>	四川康定	218	67.9	MH193318	A2
凉山乌头	<i>A. liangshanicum</i>	四川康定	220	62.7	MH193319	B1
凉山乌头	<i>A. liangshanicum</i>	四川康定	220	62.7	MH193320	B1
工布乌头	<i>A. kongboense</i>	西藏	220	62.7	MH193321	C1
工布乌头	<i>A. kongboense</i>	西藏	220	62.7	MH193322	C2
工布乌头	<i>A. kongboense</i>	西藏	220	62.3	MH193323	C2
工布乌头	<i>A. kongboense</i>	西藏	220	63.2	MH193324	C3
工布乌头	<i>A. kongboense</i>	四川康定	220	63.2	MH193325	C4
露蕊乌头	<i>A. gymnantrum</i>	四川康定	218	67.0	KX180996	D1
露蕊乌头	<i>A. gymnantrum</i>	四川康定	218	67.4	KX180997	D2
露蕊乌头	<i>A. gymnantrum</i>	四川康定	218	67.4	KX180998	D2
铁棒锤	<i>A. pendulum</i>	西藏	220	63.2	MH193326	E1
铁棒锤	<i>A. pendulum</i>	西藏	220	63.6	MH193327	E2
铁棒锤	<i>A. pendulum</i>	西藏	220	63.6	MH193328	E2
铁棒锤	<i>A. pendulum</i>	西藏	220	62.7	MH193329	E3
铁棒锤	<i>A. pendulum</i>	西藏	220	62.7	MH193330	E3
甘青乌头	<i>A. tanguticum</i>	甘肃	220	64.1	MH193331	F1
甘青乌头	<i>A. tanguticum</i>	西藏	220	64.5	MH193332	F2
甘青乌头	<i>A. tanguticum</i>	青海	220	64.1	MH193333	F2
甘青乌头	<i>A. tanguticum</i>	四川康定	220	64.1	KX171668	F2
木里乌头	<i>A. phyllostegium</i>	四川木里	220	63.2	MH193334	G1
木里乌头	<i>A. phyllostegium</i>	四川木里	220	63.2	MH193335	G1
木里乌头	<i>A. phyllostegium</i>	四川木里	220	63.2	MH193336	G1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193337	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193338	H1

续表 1

名称	拉丁名	来源	序列长度/bp	GC/%	GenBank 登录号	单倍型
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193339	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193340	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193341	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193342	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193343	H1
弯喙乌头	<i>A. campylorrhynchum</i>	四川木里	220	63.6	MH193344	H1
高乌头	<i>A. sinomontanum</i>	陕西太白	221	59.7	MH193345	I1
高乌头	<i>A. sinomontanum</i>	陕西太白	221	59.7	MH193346	I1
高乌头	<i>A. sinomontanum</i>	陕西太白	221	59.7	MH193347	I1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	63.2	MH193348	J1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	63.2	MH193349	J1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	63.2	MH193350	J1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	63.2	MH193351	J1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	63.2	MH193352	J1
多裂乌头	<i>A. polyschistum</i>	四川马尔康	220	62.7	MH193353	J2
缩梗乌头	<i>A. sessiliflorum</i>	四川若尔盖	220	64.1	MH193354	K1
缩梗乌头	<i>A. sessiliflorum</i>	四川若尔盖	220	64.1	MH193355	K1
太白乌头	<i>A. taipeicum</i>	陕西太白山	220	64.5	MH193356	L1
太白乌头	<i>A. taipeicum</i>	陕西太白山	220	64.5	MH193357	L1
太白乌头	<i>A. taipeicum</i>	陕西太白山	220	64.5	MH193358	L1
太白乌头	<i>A. taipeicum</i>	陕西太白山	220	64.5	MH193359	L1
太白乌头	<i>A. taipeicum</i>	陕西太白山	220	64.5	MH193360	L1

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取、PCR 扩增及测序 取植物样本干质量约 20 mg, 加入液氮充分碾磨, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (擎科生物技术有限公司) 提取样本基因组 DNA。ITS2 扩增引物为 ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', ITS2R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'^[10], 引物由成都擎科生物技术有限公司合成, 以样品 DNA 作为模板, 对 ITS2 序列进行 PCR 扩增。PCR 反应参照 PCR 反应试剂盒 (擎科生物技术有限公司) 的说明进行。PCR 反应条件^[11]: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 7 min (40 个循环); 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由梓熙生物科技有限公司进行测序。

1.2.2 数据处理 使用 CondonCode Aligner V 5.1.3 (CondonCode Co., 美国) 对所有序列进行校对拼接, 去除引物区和低质量的序列^[12], 由基于隐马尔可夫模型 (HMMer) 的注释方法切除 ITS2 两端的 5.8 S 和 28 S 区域, 获得标准的 ITS2 间隔区序列^[13]。通过 MEGA 6.0 对得到的 50 条 ITS2 序列进行比对^[14],

分析种内、种间的遗传变异、计算 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离、构建 neighbor joining (NJ) 系统进化树, 建立的 ITS2 数据库网站预测 ITS2 序列的二级结构。

2 结果与分析

2.1 种内、种间的变异分析

工布乌头、铁棒锤、甘青乌头、木里乌头、弯喙乌头、多裂乌头、缩梗乌头、太白乌头的 ITS2 序列长度均为 220 bp, 展花乌头、露蕊乌头序列长 218 bp, 高乌头序列长 221 bp。GC 量 59.7%~69.9%, 平均 GC 量为 63.9% (表 1)。应用 MEGA 6.0 软件进行多序列比对, 种内变异位点少, 仅有 0~2 个变异位点, 种间变异位点最多为 61 个, 其中简约信息位点 45 个, 分别占总序列长度的 27.73% 和 20.45%, 见表 2。

2.2 K2P 遗传距离分析

利用 MEGA 6.0 软件计算所有样本种内和种间遗传距离, 结果如图 1 所示, 种内遗传距离为 0~0.009, 种间遗传距离为 0.009~0.221, 种间最小遗传距离远大于种内最大距离, 研究发现物种间、种内距离越小、种间距离越大越适合运用条形码鉴定。

表2 乌头属藏药植物种内变异分析
Table 2 Intraspecific variable sites in ITS2 sequences of sibling species from *Artemisia* genus

拉丁名	变异位点																	
	20	21	22	27	29	31	35	36	47	51	60	62	65	67	69	73	89	91
<i>A. chasmanthum</i> A1	C	G	C	C	C	—	T	C	G	G	A	C	A	T	G	A	A	G
<i>A. chasmanthum</i> A2	.	.	.	.	.	—	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. liangshanicum</i> B1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. kongboense</i> C1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. kongboense</i> C2	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. kongboense</i> C3	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. kongboense</i> C4	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. gymnandrum</i> D1	T	.	.	.	.	—	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. gymnandrum</i> D2	.	.	.	.	.	—	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. pendulum</i> E1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	T	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. pendulum</i> E2	.	.	T	.	.	—	.	.	.	T	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. pendulum</i> E3	.	.	T	.	.	—	.	.	.	T	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. tanguticum</i> F1	T	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. tanguticum</i> F2	T	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	G	T	T
<i>A. phyllostegium</i> G1	T	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. campylorrhynchum</i> H1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T
<i>A. sinomontanum</i> I1	.	T	.	A	G	T	.	T	T	.	G	.	T	G	A	.	T	.
<i>A. polyschistum</i> J1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. polyschistum</i> J2	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. sessiliflorum</i> K1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	T	C	G	.	.	T	T
<i>A. taipeicum</i> L1	.	.	T	.	.	—	.	.	.	.	G	.	C	G	.	.	T	T

拉丁名	变异位点																
	98	99	101	102	105	107	119	129	131	132	133	139	143	160	262	264	165
<i>A. chasmanthum</i> A1	T	G	G	G	A	C	C	G	—	—	—	C	A	A	A	C	T
<i>A. chasmanthum</i> A2	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	.	.	.	.	.	.
<i>A. liangshanicum</i> B1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. kongboense</i> C1	G	.	T	T	T	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. kongboense</i> C2	G	.	T	T	.	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. kongboense</i> C3	G	.	T	T	.	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. kongboense</i> C4	G	.	.	T	.	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. gymnandrum</i> D1	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	.	.	.	—	.	.
<i>A. gymnandrum</i> D2	.	.	.	.	.	.	.	.	—	—	—	.	.	.	—	.	.
<i>A. pendulum</i> E1	G	.	.	.	.	T	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. pendulum</i> E2	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. pendulum</i> E3	G	.	.	.	.	T	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. tanguticum</i> F1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. tanguticum</i> F2	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. phyllostegium</i> G1	G	.	.	.	.	.	T	A	C	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. campylorrhynchum</i> H1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	T	T	—	T	C
<i>A. sinomontanum</i> I1	G	A	A	A	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. polyschistum</i> J1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. polyschistum</i> J2	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	T	.	T	—	T	C
<i>A. sessiliflorum</i> K1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C
<i>A. taipeicum</i> L1	G	.	.	.	.	.	T	A	T	T	C	.	.	T	—	T	C

“.”-未变异位点 “—”-缺失变异位点

“.”-unmutated site “—”-missing variant site

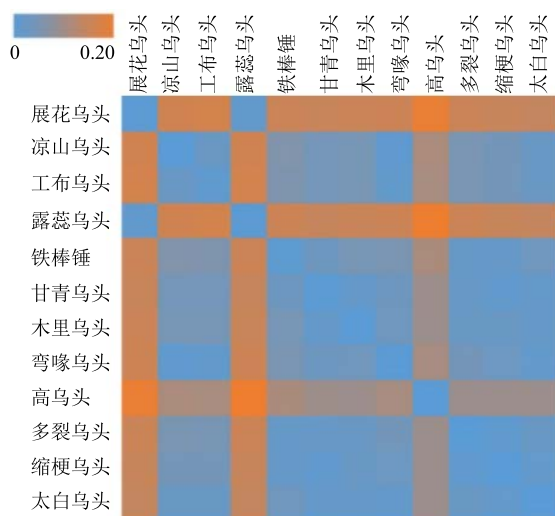


图 1 乌头属藏药植物样本种间和种内遗传距离分析
Fig. 1 Analysis of intra- and inter- distances of *Artemisia* genus samples

利用 ITS2 序列作为条形码可将每个物种区分开。

分析统计样本种内和种间遗传距离分布发现(图 2), 样本间存在较为明显的 barcoding gap, 说明 ITS2 序列对乌头属藏药样本在种水平上鉴定能力较强; 种间变异距离值主要集中在 0.01~0.05 和 0.10~0.20, 主要是展花乌头、露蕊乌头、高乌头

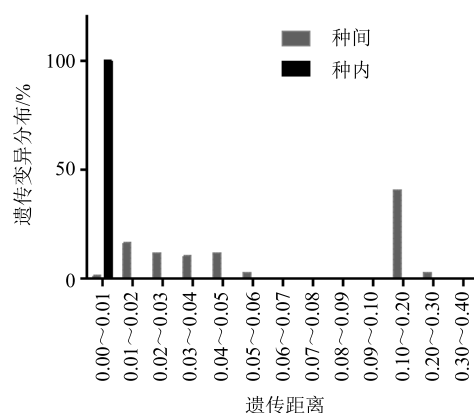


图 2 乌头属藏药植物样本 ITS2 序列种内和种间变异分布
Fig. 2 Intra- and inter-genetic divergence of ITS2 sequences from *Artemisia* genus

之间的遗传变异距离值组成。

2.3 NJ 树分析

对所有 ITS2 序列构建 NJ 系统聚类树, 利用靴带检验法 (bootstrap) 1 000 次检验各分支的支持率, 见图 3。从 NJ 进化树中可以看出, 各样本聚为 3 大支, 其中展花乌头、露蕊乌头为一支; 高乌头单独为一支, 与其他各种遗传距离较远; 凉山乌头、工布乌头、露蕊乌头、铁棒锤、甘青乌头、木里乌头、弯喙乌头、太白乌头、缩梗乌头聚为一个大分支。高乌头、露蕊

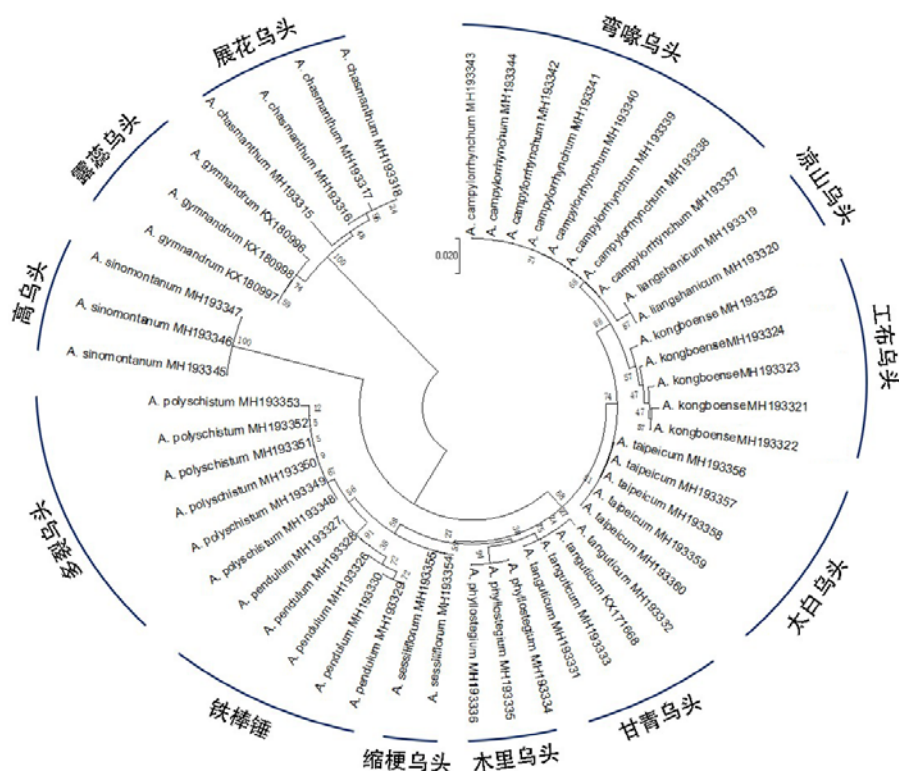


图 3 基于 ITS2 序列构建的乌头属药用植物样本的 NJ 树
Fig. 3 NJ tree of samples from *Artemisia* genus based on ITS2 sequences

乌头、展花乌头与其他物种亲缘关系较远，榜嘎榜那（甘青乌头、木里乌头、铁棒锤）的亲缘关系较近。凉山乌头、工布乌头、露蕊乌头、铁棒锤、甘青乌头、木里乌头、弯喙乌头、太白乌头、缩梗乌头种内分支之间 bootstrap 置信度在 50% 以上，物种之间可明显区分开。

2.4 二级结构

根据 ITS2 数据库及其网站预测的 12 种乌头属植物的 ITS2 二级结构如图 4 所示，从样本的二级结构

中可以看出 ITS2 二级结构较为相近，其均为 1 个中心环及 4 个螺旋区（helix）组成，各种样本二级结构主要构架极为相似，中心环大小、形状有一定差异，在螺旋区茎环（loop）数量、形状及大小也存在差异，能够将乌头属各种植物样本进行区分。甘青乌头和木里乌头的序列仅有 2 个碱基之差，但从二级结构上看，甘青乌头螺旋 IV 区的茎环有 3 个，木里乌头的茎环有 4 个。铁棒锤、多裂乌头、缩梗乌头序列最为相近，但二级结构上亦存在差异，能够将其区分开来。

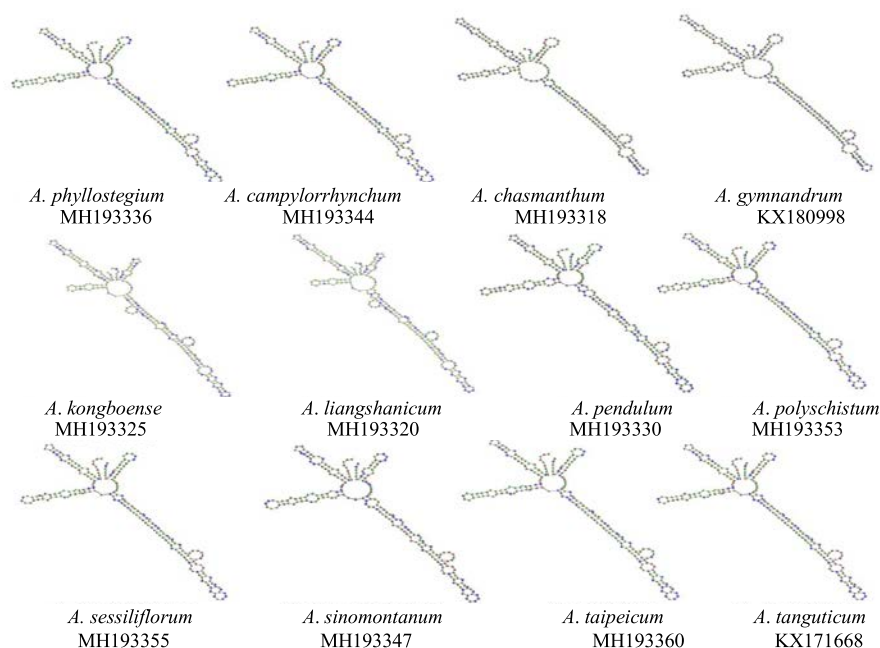


图 4 乌头属植物 ITS2 序列的二级结构

Fig. 4 Secondary structures of ITS2 sequences

3 讨论

藏医药是中国传统医药的重要组成部分，具有悠久的历史、独特的医疗和研究价值及市场开发潜力，藏药资源、品种混乱，质量标准及其控制技术不完善等已成为严重制约藏药新药研发、制药工艺技术进步等关键因素。乌头属植物在藏药中是重要的药用植物，同时也是著名的有毒植物，如榜嘎、榜那等，在藏医中应用广泛，是很多藏成药的主要成分，在藏医药中占有较为重要的地位。但由于乌头属药用植物品种繁多，形态极为复杂，易造成市场上药材品种混乱的现象；乌头属藏药的商品来源较为复杂，而且很多乌头属藏药植物生长在高海拔地区，产量少，不易采挖，更有些物种属于濒危物种，市场稀缺情况严重，市场上的混淆品非常多；乌头属植物含有毒

性很强的乌头碱类化合物，如果临床使用不当，可能导致中毒，严重者甚至死亡；准确地对乌头属药用植物进行识别和鉴定至关重要。

DNA 条形码是一种快速、准确的分类鉴定手段，使用一个或几个简短的标准化 DNA 区域^[15]。ITS2 序列是一条理想的条形码，因为其长度较短，易于用一对引物扩增，测序效率高，种间差异较大^[16]。许多研究表明，ITS2 具有很好的物种鉴定能力^[17]。Chen 等^[18]首次提出将 ITS2 序列作为药用植物鉴定的通用条形码序列。ITS2 序列可以很好地鉴别出药材的混伪品。本研究运用以 ITS2 序列为 DNA 条形码的分子鉴定技术，对几种常见的乌头属藏药植物进行鉴别，发现从 K2P 遗传距离、NJ 进化树、ITS2 序列二级结构等方面均可将各种乌头属藏药植物样本区分开，ITS2 序列对乌头属藏药植物

的鉴定能力强。

青藏高原有“世界屋脊”之称,平均海拔4 000~5 000 m,是世界上少有的无污染区之一,加之该地区地势复杂,气候变化异常,日照时间长,光合作用强,植物有效成分积累多,故生长在这里的药材具有独特的不可替代性和更高的药用价值和疗效。然而由于青藏高原高寒缺氧,气候干燥,植物生长缓慢,所以物种虽很丰富,但资源贮量有限,且资源更新速度慢,再生能力差,再加上生态系统极其脆弱,一旦遭到破坏,则很难恢复。在准确识别乌头属藏药植物的基础上,将药材的鉴定、安全性评价、资源统计与管理结合起来将有极大实际应用价值,为乌头属藏药植物的分布、种群及种群量研究提供指导,对其质量控制、安全用药、资源保护及合理开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 李隆云,次仁巴珠,占堆,等.藏药资源的开发与利用[J].中国中药杂志,2001,26(12):808.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第23卷第1分册)[M].北京:科学出版社,1998.
- [3] 赵翡翠,李杰.乌头属药用植物中生物碱的研究进展[J].中国现代应用药学,2010,27(13):1177-1182.
- [4] 中国药典[S].一部.2015.
- [5] 李志勇,李彦文,孙建宁,等.乌头类植物药三种双酯型生物碱研究进展[J].中央民族大学学报:自然科学版,2009,18(2):87-91.
- [6] 刘帅,李妍,李卫飞,等.乌头类中药毒性及现代毒理学研究进展[J].中草药,2016,47(22):4095-4102.
- [7] 杨世英,马伟林,董开忠.藏药铁棒锤的研究进展[J].西北民族大学学报:自然科学版,2014,35(3):46-50.
- [8] 陈士林.中药DNA条形码分子鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2012.
- [9] 张彩云,黄珊珊,颜海飞.DNA条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J].中草药,2017,48(11):2306-2312.
- [10] Chen S L. *Standard DNA Barcodes of Chinese Materia Medica in Chinese Pharmacopoeia* [M].北京:科学出版社,2015.
- [11] 任瑶瑶,江南屏,刘睿颖,等.藏药臭蒿及其近缘种药材的ITS2 DNA条形码鉴别[J].中国中药杂志,2017,42(7):1395-1400.
- [12] Mei Q X, Chen X L, Xiang L. DNA Barcode for identifying *Folium Artemisiae Argyi* from counterfeits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(9): 1531-1537.
- [13] Keller A, Schleicher T, Schultz *et al.* 5.8 S—28 S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [16] Li D Z, Gao L M. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceed Nat Acad Sci Unit Stat Amer*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [17] Pang X, Song J, Zhu Y, *et al.* Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [18] 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.