

• 药材与资源 •

葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选

李 妮¹, 陈士林², 刘义梅¹, 陈科力^{1*}

1. 湖北中医药大学 中药资源和中药复方省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘 要: **目的** 评价几个热点 DNA 条形码候选序列对葫芦科植物的鉴别能力。**方法** 使用 ITS2、*rbcL*、*matK* 和 *psbA-trnH* 序列的通用引物对葫芦科植物进行 PCR 扩增和测序, 通过比较各序列的扩增和测序成功率、种内和种间的变异、barcoding gap, 并采取相似性探索 BLAST 1 和最近距离 Nearest Distance 方法评价不同序列的鉴别能力。**结果** ITS2 序列对葫芦科 33 个属、90 个物种、182 个样本进行分析, 其鉴定成功率较高, 在属水平为 100.0%, 在物种水平为 88.5%; *psbA-trnH* 序列对 201 个样本进行分析, 其鉴定成功率在属水平为 93.0%, 在物种水平为 73.1%, 但其可以补充部分 ITS2 不能分析的物种区域。**结论** ITS2 和 *psbA-trnH* 是适合葫芦科植物鉴别的一个较好的 DNA 条形码序列组合。

关键词: DNA 条形码; 葫芦科; *psbA-trnH*; *matK*; *rbcL*; ITS2

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)07-1396-06

Screening of universal DNA barcodes for plants in Cucurbitaceae

LI Ni¹, CHEN Shi-lin², LIU Yi-mei¹, CHEN Ke-li¹

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To evaluate the candidate sequence of several hotspot DNA barcodes for identification ability on the species in Cucurbitaceae family. **Methods** Using universal primers, three chloroplast sequences, *psbA-trnH*, *rbcL*, *matK*, and a nuclear ribosomal DNA ITS2 were amplified and sequenced. PCR amplification and sequencing efficiency, intra- and inter-specific variation, barcoding gap, and identification efficiency (with BLAST 1 and Nearest Distance methods) were used to evaluate these loci. **Results** The rate of successful identification using ITS2 sequence was 88.5% at the species level and 100% at the genera level for 182 plant samples belonging to 90 species from 33 distinct genera in Cucurbitaceae. The rate of successful identification using *psbA-trnH* sequence was 73.1 % at the species level and 93.0% at the genera level, but it could complement some species region which could not be successfully discriminated by ITS2 sequence. **Conclusion** It proposes that the combination of ITS2 and *psbA-trnH* sequence is promising for the identification of the species in Cucurbitaceae.

Key words: DNA barcodes; Cucurbitaceae; *psbA-trnH*; *matK*; *rbcL*; ITS2

葫芦科 Cucurbitaceae 植物在全球约有 113 个属 800 个种, 在中国有 32 个属 154 个种 35 个变种, 主要分布于西南部和南部, 少数散布到北部^[1]。葫芦科中瓜类作物在水果蔬菜生产中占重要地位, 南瓜、西瓜、苦瓜、冬瓜等都是中国重要的药食两用

植物^[2]。葫芦科还有许多重要的药用植物, 如栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的果实就是常用中药瓜蒌, 具有润肺止咳、清热化痰之功效, 其根则为常用中药天花粉, 从中提取出的天花粉蛋白 (trichosanthin) 具有引产、抗肿瘤和抗 HIV 等多种

收稿日期: 2011-01-08

基金项目: 国际科技合作项目 (2007DFA30990); 卫生行业科研专项资助项目 (200802043)

作者简介: 李 妮, 湖北中医药大学中药学 2008 级硕士研究生。E-mail: lily-child-98@163.com

*通讯作者 陈科力 Tel: (027)68890106 E-mail: kelichen@126.com

活性^[3-4]。从绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 中分离出 82 种与人参皂苷有类似骨架的绞股蓝皂苷, 以及多种黄酮、维生素、氨基酸类成分, 具有抑制肿瘤、防止衰老、调节血脂、增强免疫力等功效^[5-7]。此外, 葫芦科植物雪胆 *Hemsleya chinensis* Cogn. ex Forbes et Hemsl.、木鳖子 *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. 等都是常用中草药。目前, 在传统分类基础上, 采用 RAPD 分子标记法^[8-9], ISSR 分析法^[10-11]等分子标记方法对葫芦科植物进行了分类鉴定和系统学研究, DNA 条形码技术的出现, 为葫芦科植物的分子鉴定研究提供了新的视野。

DNA 条形码是由加拿大动物学家 Paul Hebert 首次提出的利用一段标准 DNA 片段对物种进行快速、准确鉴定的技术^[2], 筛选出通用的条形码序列是其关键步骤。近年来植物条形码研究者已经提出了许多候选条形码序列及其组合^[12], 但尚未达成一致。2009 年国际生命条形码联盟 (Consortium for the Barcode of Life) 提议将 *rbcL*+*matK* 的复合序列作为整个植物界的通用条形码序列^[13]。2010 年 Chen 等^[14]针对广泛药用植物类群的 4 800 个物种 6 600 个样本进行研究, 发现 ITS2 序列在物种水平的鉴定成功率超过 90%, 表明 ITS2 序列也能够较好地用于植物物种的鉴定研究。*psbA-trnH* 片段是进化速率最快的叶绿体间隔区之一, 而且其两端存在约 75 bp 的保守序列, 可用于设计通用引物, 后经 Kress 等^[15]和 Yao 等^[16]的验证发现其通用性较好, 扩增成功率较高, 因而在条形码研究中被广泛应用。但是以上这些序列是否适合每一个具体的科或属植物, 还需要进行针对性的研究。目前, 针对一些具体科、属通用条形码的选择, 已有学者进行了深入研究^[16-20]。在此背景下, 本实验选取近年来几个热点推荐的植物 DNA 条形码候选序列 ITS2、*rbcL*、*matK*、以及 *psbA-trnH* 等对葫芦科物种的鉴别进行比较研究, 考察各候选序列对该科植物的适用性。

1 材料与方法

1.1 材料

葫芦科 20 个物种 43 份样品采自江西、湖北、云南等地, 由湖北中医药大学药教研室潘宏林教授和中国科学院西双版纳热带植物园肖春芳鉴定, 数字影像信息及凭证标本保存于湖北中医药大学。实验材料 (均采自植物的新鲜嫩叶) 详见表 1, GenBank 数据库 (数据下载日期为 2010 年 6 月 10

日) 下载数据。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取、PCR 扩增和测序 取干燥的植物叶片 10 mg, 经液氮研磨后, 使用植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取总 DNA。候选序列 ITS2、*rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 的 PCR 反应条件、通用引物及扩增程序参考 Chen 等^[14]的研究。PCR 扩增产物经纯化后, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., 美国) 进行双向测序。

1.2.2 数据的处理方法 测序所得的峰图采用 Codon Code Aligner V 3.71 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 利用 Clustal X V2.0 (Higgins D.G.) 进行多序列比对并查错, 可用数据纳入后续分析。ITS2 序列依照 Keller 等^[21]的方法处理, 其他序列采用 Codon Code Aligner 处理。利用实验材料考察各候选序列的 PCR 扩增效率, 采用罗焜等^[18]方法, 对不同序列种间、种内变异进行比较, 并采取 Wilcoxon Signed Rank Tests 对结果进行检验, 通过 Taxon DNA 软件做出各候选序列的 barcoding gap 图。最后纳入 GenBank 数据库可用数据, 采用相似性搜索法 (BLAST 1) 和最近距离 (Nearest Distance) 法考察序列的鉴定成功率^[22]。

2 结果

2.1 候选序列 PCR 扩增成功率、测序成功率、有效序列获得率

对实验样本的 PCR 扩增成功率 (出现明显 PCR 条带即判定为成功)、测序成功率 (测序后获得高质量的序列即判定为成功) 以及有效序列的获得率 (有效序列比例=PCR 扩增效率×测序成功率) 进行统计, 见表 2, 发现 43 个样本的 ITS2、*rbcL*、*psbA-trnH* 序列使用率都超过了 90%。

2.2 不同 DNA 条形码候选序列种内和种间差异分析

理想的 DNA 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。参照 Chen 等^[14]的方法计算各候选序列的 6 个“阈值”, 以便更直观判断其种间、种内的变异。通过对葫芦科各条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异分析, ITS2 序列具有最大的种间变异和种内变异; *psbA-trnH* 序列具有较大的种间变异, 但种内变异都很小; *rbcL* 序列虽然种内变异最小, 但种间变异也是最小的, 不容易区分物种, 见表 3。利用 Wilcoxon 检验分析两两序列种间、种内变异的

表 1 材料来源
Table 1 Source of materials

中文名	拉丁名	采集地	登录号	中文名	拉丁名	采集地	登录号
木鳖子	<i>Momordica cochinchinensis</i>	江西庐山	LS0813MT01	冬瓜	<i>Benincasa hispida</i>	武汉植物园	LS0801MT03
木鳖子		西双版纳热带植物园	LS0813MT02	冬瓜		武汉植物园	LS0801MT02
绞股蓝	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	江西庐山	LS0809MT01	冬瓜		湖北罗田	LS0801MT01
绞股蓝		江西庐山	LS0809MT02	钮子瓜	<i>Zehneria maysorensis</i>	昆明植物园	LS0823MT01
绞股蓝		昆明植物园	LS0809MT03	钮子瓜		昆明植物园	LS0823MT02
绞股蓝		昆明植物园	LS0809MT04	油瓜	<i>Hodgsonia heteroclite</i>	西双版纳热带植物园	LS0802MT01
绞股蓝		景洪药园	LS0809MT05	金瓜	<i>Gymnopetalum chinensis</i>	西双版纳热带植物园	LS0808MT01
绞股蓝		景洪药园	LS0809MT06	金瓜		西双版纳热带植物园	LS0808MT02
瓜叶栝楼	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	江西庐山	LS0820MT01	红瓜	<i>Coccinia grandis</i>	西双版纳热带植物园	LS0804MT01
瓜叶栝楼		江西庐山	LS0820MT02	红瓜		景洪药园	LS0804MT02
栝楼	<i>T. kirilowii</i>	武汉植物园	LS0821MT01	棒锤瓜	<i>Neoalsomitra integrifoliola</i>	西双版纳热带植物园	LS0814MT01
栝楼		湖北罗田	LS0821MT02	苦瓜	<i>Momordica charantia</i>	西双版纳热带植物园	LS0812MT01
栝楼		湖北罗田	LS0821MT03	苦瓜		湖北京山	LS0812MT02
栝楼		昆明植物园	LS0821MT04	苦瓜		湖北应城	LS0812MT03
栝楼		西双版纳热带植物园	LS0821MT05	黄瓜	<i>Cucumis sativus</i>	湖北京山	LS0806MT01
密毛栝楼	<i>T. villosa</i>	西双版纳热带植物园	LS0822MT01	黄瓜		湖北应城	LS0806MT02
密毛栝楼		西双版纳热带植物园	LS0822MT02	丝瓜	<i>Luffa cylindrica</i>	湖北京山	LS0811MT01
南赤瓟	<i>Thladiantha nudiflora</i>	江西庐山	LS0819MT01	丝瓜		湖北应城	LS0811MT02
南赤瓟		江西庐山	LS0819MT02	西瓜	<i>Citrullus lanatus</i>	湖北应城	LS0803MT01
异叶赤瓟	<i>T. hooker</i>	昆明植物园	LS0818MT01	瓠子	<i>Lagenaria siceraria</i> var. <i>hispida</i>	湖北京山	LS0810MT01
佛手瓜	<i>Sechium edule</i>	武汉植物园	LS0815MT01	瓠子		湖北应城	LS0810MT02
罗汉果	<i>Siraitia grosvenorii</i>	武汉植物园	LS0816MT01				

表 2 不同 DNA 序列扩增获得的有效序列的比例
Table 2 Effective sequence ratio obtained by different DNA sequence amplification

序列名	扩增成功率/%	测序成功率/%	序列有效使用率/%
ITS2	95.3	95.1	90.6
<i>psbA-trnH</i>	97.7	97.6	95.4
<i>matK</i>	4.7	0.0	0.0
<i>rbcL</i>	95.3	100.0	95.3

差异情况,结果表明,不论种间还是种内变异,ITS2 与 *psbA-trnH* 序列之间都无显著差异,但两者都要大于 *rbcL* 序列,见表 4、5。

2.3 葫芦科不同 DNA 条形码候选序列 barcoding gap 检验

Meyer 等^[23]和 Lahaye 等^[24]提出,理想的条形码检测到的种间遗传变异应明显大于种内遗传变异,并在两者之间存在显著差异,形成一个明显的间隔区,即 barcoding gap。利用 Taxon DNA 对所选序列进行分析,并计算 barcoding gap,见图 1。从不同序列种间和种内变异的分布图(图中横坐标表示种间与种内变异程度,纵坐标表示在不同变异值时物种的分布情况)分析,3 种 DNA 片段的 barcoding gap 都不明显,但可以看出 ITS2 序列的

表 3 葫芦科 3 个候选序列的种间和种内差异 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Variation between inter-specific and intra-specific of three candidate sequences in Cucurbitaceae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

候选序列	种间变异	种间平均变异	种间最小变异	种内变异	种内平均变异	种内最大变异
ITS2	0.068 2±0.060 8	0.100 9±0.071 4	0.091 9±0.080 5	0.015 4±0.015 6	0.015 9±0.019 0	0.019 2±0.021 8
<i>psbA-trnH</i>	0.047 5±0.048 8	0.076 5±0.067 3	0.060 5±0.066 7	0.014 1±0.025 5	0.010 9±0.021 4	0.015 2±0.030 4
<i>rbcL</i>	0.012 0±0.006 7	0.011 4±0.005 5	0.009 7±0.006 1	0.002 9±0.003 0	0.001 7±0.001 9	0.002 4±0.003 1

表 4 两两序列种内差异的 Wilcoxon 检验
Table 4 Wilcoxon signed rank test for intra-specific variation

W+	W-	物种种内相关性检验	结果
ITS2	<i>psbA-trnH</i>	W+=16.0, W-=5.0, n=6, P>0.05	ITS2= <i>psbA-trnH</i>
ITS2	<i>rbcL</i>	W+=125.0, W-=11.0, n=16, P<0.05	ITS2> <i>rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	W+=6.0, W-=21.0, n=0, P<0.05	<i>psbA-trnH</i> > <i>rbcL</i>

表 5 两两序列种间差异的 Wilcoxon 检验
Table 5 Wilcoxon signed rank test for inter-specific variation

W+	W-	物种种间相关性检验	结果
ITS2	<i>psbA-trnH</i>	W+=10.0, W-=0.0, n=4, P>0.05	ITS2= <i>psbA-trnH</i>
ITS2	<i>rbcL</i>	W+=227.0, W-=28.0, n=24, P<0.05	ITS2> <i>rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	W+=21.0, W-=0.0, n=6, P<0.05	<i>psbA-trnH</i> > <i>rbcL</i>

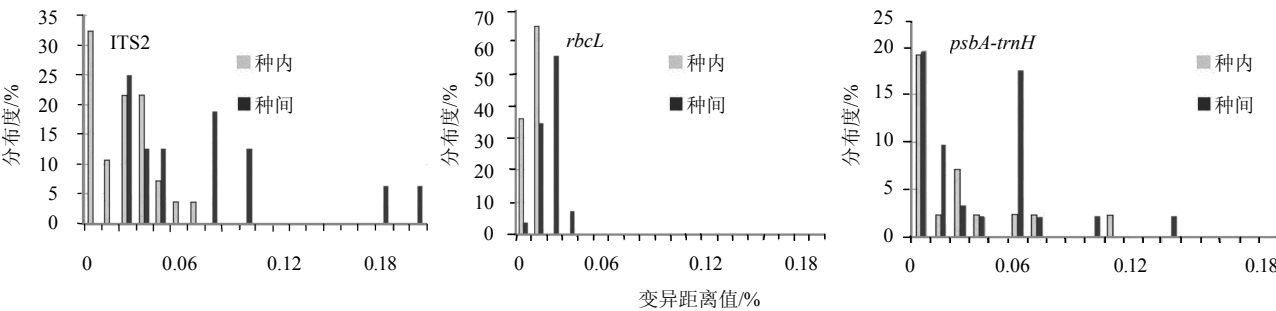


图 1 3 个候选序列的 barcoding gap
Fig. 1 Barcoding gap of three candidates sequences

种间变异幅度较大，种内与种间变异有往两边分开的趋势，更有利于区分物种。

2.4 葫芦科 DNA 条形码候选序列的鉴定效率评价
本实验使用 BLAST 1 法和 Nearest Distance 法来评估 3 种 DNA 序列对样品的鉴定效率，发现两种方法得到结果趋于一致，见表 6。ITS2、*rbcL* 序列在属水平上的鉴定成功率均为 100%，在种水平上 ITS2、*rbcL* 和 *psbA-trnH* 的鉴定成功率分别为 100%、100%和 88.4%。由于实验采集样本数有限，

故纳入 GenBank 网上葫芦科的数据进行分析，发现 ITS2 可用数据 182 个样本 90 个种，用 BLAST 1 和 Nearest Distance 两种方法评价，其在属水平上的鉴定成功率仍为 100%，物种水平的鉴定成功率为 88.5%。*psbA-trnH* 纳入 GenBank 数据共 201 个样本后，属水平鉴定成功率为 93.0%，种水平为 73.1%。*rbcL* 纳入 GenBank 中数据共 259 个样本后，其在属水平鉴定成功率为 93.1%，种水平鉴定成功率是 67.6%。

表 6 BLAST 1 和 Nearest Distance 法考察 3 种 DNA 片段的鉴定效率
Table 6 Identification efficiency for three kinds of DNA fragments observed by BLAST1 and Nearest Distance methods

序列	鉴定方法	鉴定成功率/%		鉴定错误率/%		模糊鉴定率/%	
		种水平	属水平	种水平	属水平	种水平	属水平
ITS2	BLAST 1 法	100.0	100.0	0	0	0	0
	Nearest Distance 法	100.0	100.0	0	0	0	0
<i>psbA-trnH</i>	BLAST 1 法	88.4	100.0	0	0	11.6	0
	Nearest Distance 法	83.7	95.3	0	0	16.3	4.7
<i>rbcL</i>	BLAST 1 法	100.0	100.0	0	0	0	0
	Nearest Distance 法	95.1	100.0	0	0	4.9	0

3 讨论

3.1 DNA 条形码片段在葫芦科的应用

DNA 条形码使用短的标准 DNA 片段,对物种进行快速、准确地识别和鉴定。该项技术在动物学研究中采用线粒体 COI 基因中的一段作为标准片段,已得到了广泛的应用,但在植物学研究中的进展要相对缓慢。植物中线粒体基因组进化速率较慢,因此植物 DNA 条形码序列主要在叶绿体和核基因上进行选择。

ITS2 是真核生物 rDNA 上的一段顺反子,位于 5.8~26 S rRNA,它在种间具有显著的差异,因此,被广泛用于物种分类、系统进化和植物条形码研究^[15]。本实验在针对葫芦科植物考察时,发现 ITS2 序列较短,约 220 bp,利于 DNA 的提取、扩增和测序,Kress 等^[15]认为短序列更有利于获取发生降解的样本序列,这对于 DNA 条形码在实际中的应用具有重要的意义。而且 ITS2 序列可基于隐马尔可夫模型去除两端 5.8 S 和 26 S 区段,获得完整 ITS2 间隔区序列,使后续数据处理更准确可靠,这也是目前其他候选条形码序列不具备的优势。Müller 等^[25]专门对 ITS2 的鉴定能力做出评估,得出 ITS2 序列具有足够的能力区分物种,Moniz 等^[26]成功鉴定了硅藻属 99.5% 的物种。本实验发现 ITS2 序列对葫芦科的实验样本在属和物种水平上的鉴定成功率均为 100%,且在纳入 GenBank 中葫芦科的 ITS2 数据后,涉及 33 个属 182 个样本,在属水平上的鉴定成功率依然是 100%,种水平的鉴定成功率有 88.5%。

matK 序列是植物叶绿体 DNA 中进化较快的一条编码区序列,也是多位研究者推荐的条形码序列之一。但是 *matK* 序列在葫芦科植物中扩增成功率极低,所以后期就没有再考察此序列。

psbA-trnH 片段是进化速率最快的叶绿体间隔区之一,而且其两端存在约 75 bp 的保守序列,可用于设计通用引物,也是 Kress 等^[15]重点推荐的序列。其在本实验中取得了较高的扩增成功率,在纳入 GenBank 数据共 201 个样本后,在属水平的鉴定成功率为 93.0%,在物种水平的鉴定成功率为 73.1%。

rbcL 序列具有通用、易扩增、易比对的优点,虽在本实验中对采集的实验样本也取得了较高的鉴定成功率,但是当纳入 GenBank 中数据共 259 个样本后,在种水平的鉴定成功率仅为 67.6%,属水

平上的鉴定成功率是 93.1%,鉴定效果不及 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列。而且 *rbcL* 序列的种间变异较小,较为保守,适于种以上水平的鉴别,不适于单独作为葫芦科植物种水平上的鉴别。

3.2 DNA 条形码技术在葫芦科的应用展望

葫芦科植物多为一年生或多年生藤本植物,花果期较短,藤和叶是常见到的部位。而葫芦科植物的叶子由于地域分布、光照等外界环境的刺激,不论是叶形还是叶的质地等都会发生一些改变,这时单纯依靠传统的分类学方法来区分物种难度就增大了。利用植物的一段短的基因片段从遗传学角度对物种实施鉴定,就能充分利用现有植物材料,克服花果不全在物种鉴定中的局限性。Steele 等^[27]对葫芦科的 *Psiguria* 属,用 8 个叶绿体基因、ITS 和核基因丝氨酸苏氨酸磷酸酶的内含子 DNA 序列对 *Psiguria* 属的物种进行了成功的鉴别。本实验对 DNA 条形码技术在葫芦科植物中的应用进行了初步探索,在纳入 GenBank 中数据分析后,发现 ITS2 序列共 185 个样本,其鉴定成功率在属水平上为 100%,种水平为 88.5%; *psbA-trnH* 共 201 个样本后,鉴定成功率在属水平上为 93.0%,种水平上为 73.1%; *rbcL* 共 259 个样本,在属水平上鉴定成功率为 93.1%,种水平上鉴定成功率是 67.6%。其中,ITS2 序列的鉴定成功率最高,其分析数据涵盖我国葫芦科近 70% 属,超过 50% 物种,因此建议 ITS2 序列作为 4 个序列中首推的葫芦科条形码候选序列。由于葫芦科的 ITS2 序列的种内和种间差异没有形成明显的 barcoding gap,会出现一些无法鉴别的种群,虽然 *psbA-trnH* 序列的物种鉴定成功率略低于 ITS2,但其扩增和测序成功率较高,且可以覆盖和补充部分 ITS2 不能分析和成功鉴定的物种区域(大约 14.3%),作为补充,建议把 *psbA-trnH* 和 ITS2 作为葫芦科的条形码序列组合。

由于不同分类学家对种的概念、大小和界限有着不同的理解,以及同一分子标记片段在不同分类群中进化速率存在差异,因此利用一段短的基因片段难以对所有物种进行鉴定^[28]。本研究发现 ITS2 在葫芦科中具有较高的鉴定成功率,同时 *psbA-trnH* 序列可对其进行一定补充,而该 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的组合在对葫芦科所有物种的准确鉴定上还有一定距离。但该方法可为葫芦科植物的分子分类和亲缘关系研究提供新的选择。ITS2 和 *psbA-trnH* 是容易扩增和测序的较短片段,单纯依靠 ITS2 就

可以确定葫芦科植物样品属的划分,对于 ITS2 无法扩增成功的样品可以考虑用 *psbA-trnH* 序列处理,这可以将无法确认的葫芦科植物样品缩小到一个确定的物种区域甚至某一物种,对于样品不完整的植物的鉴定具有重要意义,对于分类学中有争议的分组也有一定价值。本实验中由于采样条件的限制,有些物种缺乏重复个体,一些属内关系密切的种较少,存在一定缺陷。ITS (含 ITS2) 和 *psbA-trnH* 是普遍较关注的核基因和叶绿体基因序列,相信随着 GenBank 中可信赖的数据和进行实验研究的材料数增加以及研究的进一步深入,能够为葫芦科物种的鉴别提供更多有效的信息和可靠的方法。

致谢:中国科学院西双版纳热带植物园肖春芳和潘宏林教授协助采集样品并指导鉴定植物标本。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [2] 邹明学, 许勇, 张海英, 等. 葫芦科瓜类作物分子标记辅助育种研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007, 4: 72-76.
- [3] Han J P, Liu C, Li M H, *et al.* Relationship between DNA barcoding and chemical classification of salvia medicinal herbs [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 16-29.
- [4] Shawa P C, Lee K M, Wonga K B. Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties [J]. *Toxicon*, 2005, 45(6): 683-689.
- [5] 刘锦业, 殷铭, 刘远军, 等. 复方绞股蓝口服液的研制 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 124-125.
- [6] 刘振洋, 刘延泽, 刘改岚, 等. 绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1071-1073.
- [7] 刘世彪, 胡正海. 绞股蓝生物学的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 144-146.
- [8] 庞敏, 邹芳平, 肖娅萍, 等. 应用 RAPD 技术构建绞股蓝 DNA 指纹图谱 [J]. 陕西师范大学学报, 2006, 34(3): 87-91.
- [9] 孙稚颖, 周凤琴. 山东产瓜蒌不同农家品种的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 426-429.
- [10] 王翀, 郭志刚, 赵桂仿, 等. 利用 ISSR 分析 6 种绞股蓝属植物的遗传多样性与亲缘关系 [J]. 西北大学学报, 2008, 38(5): 767-770.
- [11] 王翀, 周天华, 杨雪, 等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 588-591.
- [12] Ning S P, Yan H F, Hao G. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiv Sci*, 2008, 16(5): 417-425.
- [13] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [14] 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.
- [15] 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: 8369-8374.
- [16] 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: 667-669.
- [17] 刘震, 陈科力, 罗焜, 等. 忍冬科药用植物 DNA 条形码通用序列的筛选 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2527-2531.
- [18] 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: 生命科学, 2010, 40: 342-351.
- [19] 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]. 药学报, 2010, 45: 376-385.
- [20] Ren B Q, Xiang X G, Chen Z D. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Mol Ecol Res*, 2010(4): 594-605.
- [21] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [22] Thomas C. Plant bar code soon to become reality [J]. *Science*, 2009, 325(5940): 526.
- [23] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3: 2229-2238.
- [24] Lahaye R, Bank M, Bogarin D, *et al.* DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105(8): 2923.
- [25] Müller T, Philippi N, Dandekar T, *et al.* Distinguishing species [J]. *RNA*, 2007, 13(9): 1469.
- [26] Moniz M B J, Kaczmarek I. barcoding of Diatoms: nuclear encoded ITS revisited [J]. *Protist*, 2009, 161(1): 7-34.
- [27] Steele P R. Molecular systematics of the neotropical genus *Psiguria* (Cucurbitaceae): Implications for phylogeny and species identification [J]. *Am J Bot*, 2010, 97(1): 156-173.
- [28] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45: 1-12.