·专 论·

宏基因组学与道地药材研究

陈晓辰，宋经元，董林林，姚 辉，陈士林，韩建萍*
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：宏基因组学是将分子生物学技术应用于微生物基因总和研究的一门新兴学科，现已广泛应用于医药、农业、海洋生态环境、土壤生态环境等领域。道地药材凭借其质优、疗效好的优势自古以来被各医家所青睐，其形成与诸多因素有关，其中根际微环境在药用植物次生代谢产物形成中起着重要作用。着重介绍宏基因组学的概念、技术策略以及其在道地药材研究中的应用现状，进一步阐明土壤微生物对道地药材形成机制的影响，并为解决药用植物连作障碍提出新的研究思路。

关键词：宏基因组学；根际土壤；道地药材；微环境；连作障碍
中图分类号：R282.1 **文献标志码**：A **文章编号**：0253 - 2670(2012)12 - 2315 - 06

Study on metagenomics and genuine traditional Chinese medicinal materials

CHEN Xiao-chen, SONG Jing-yuan, DONG Lin-lin, YAO Hui, CHEN Shi-lin, HAN Jian-ping
Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Metagenomics is a newly developing discipline which applies molecular biological techniques to analyze genomes of the total microbiota. Metagenomics is widely used in various fields, such as medicine, agriculture, marine ecological environment, soil ecological environment. Resorting to its excellent quality and good efficacy, genuine traditional Chinese medicinal materials (TCMM) have been in good graces of many physicians. The geoherbalism formation of TCMM is based on many factors among which the microenvironment of rhizosphere soil plays a important role in formation of secondary metabolism in medicinal plants. This article emphasizes on illustrating the conception, technique, and strategy of metagenomics and its potential application in genuine TCMM and provides new insights in removing the continuous cropping obstacles in medicinal plants.

Key words: metagenomics; rhizosphere soil; genuine traditional Chinese medicinal materials; microenvironment; continuous cropping obstacles

道地药材就是指在特定自然条件、生态环境的地域内所产的药材，且生产较为集中，栽培技术、采收加工也都有一定的要求，以致较同种药材在其他地区所产者品质佳、疗效好、为世所公认而久负盛名者称之[1]。道地药材历来为各医家青睐，其形成与多种因素相关，其中根际微生物起重要作用。根际微生物影响道地药材形成主要表现在促进土壤养分的活化、调节植物生长发育以及控制植物病虫害 3 个方面[2]。目前，道地药材的种植过程面临一个非常严峻的问题——连作障碍。如人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、西洋参 *P. quinquefolium* L.、三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 等名贵药材的连作障碍现象都较为突出。根际微环境的改变是导致药材连作障碍的重要因素之一。长期以来人们只能利用实验室培养的方法获得种类极少的微生物，而接近 99.8%的微生物是不能通过常规方法培养出来的[3]。对于大多数无法培养出的微生物群体始终一无所知，因此无法从整体上分析药材连作障碍的原因。随着分子生物学及微生物学的迅猛发展，一门新兴学科——宏基因组学受到越来越广泛的关注。宏基因组学突破了微生物研究的瓶颈，实现了跨越预先培养环节

收稿日期：2012-09-04
作者简介：陈晓辰，女，硕士在读，研究方向为药用植物DNA条形码及叶绿体基因组学研究。Tel: (010)57833051 E-mail: xcchen2011@126.com
*通讯作者 韩建萍 Tel: (010)57833198 E-mail: jphan@implad.ac.cn

来研究整体微生物，为药用植物连作障碍进一步探索架起桥梁。本文将宏基因组学理论与传统道地药材研究有机地结合起来，进一步阐明土壤微生物对道地药材形成机制的影响，并为解决药用植物连作障碍提出新的研究思路。

1 宏基因及宏基因组学

1.1 宏基因组（学）概念

早在 1991 年 Pace 等[4]在研究海洋微小浮游生物时，采用直接提取群体微生物基因总和的方法筛选到了 rDNA，首次证明了从群体 DNA 中克隆微生物基因的可行性。Handelsman 等[5]在 1998 年正式提出宏基因组（the genomes of total microbiota found in nature）的概念，即环境中全部微小生物 DNA 的总和，并建立了基因组学即宏基因组学（metagenomics）。宏基因组学通过直接从环境样品中提取全部微生物的 DNA，构建宏基因组文库，利用基因组学的研究策略研究环境样品所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。宏基因组学是在微生物基因组学的基础上发展起来的一种研究微生物多样性，发现新生理活性物质（或获得新基因）的新理念和新方法。其主要含义是对特定环境中全部微生物的总 DNA 进行克隆，并通过构建宏基因组文库和筛选等手段获得新的生理活性物质；或根据 rDNA 数据库设计引物，通过系统学分析获得该环境中微生物的遗传多样性和分子生态学信息。宏基因组学研究对象包含了特定环境中的总 DNA，不是某个特定的微生物或其细胞中的总 DNA，不需要对微生物进行分离培养和纯化，这对于认识和利用 95%以上的未培养微生物提供了一条新的途径。概念中“环境”已从最初的土壤发展到现今的海洋、空气、动植物及人体内生菌等领域。宏基因组学以分子生物学及真核基因组技术为基础，通过直接提取生态环境中微生物群体 DNA 的方法，从整体上对遗传序列进行拼接、分析，从而筛选出功能基因，成为挖掘未知基因、合成新化合物、研究微生物多样性的新途径[6]。

1.2 宏基因组技术

宏基因组技术流程见图 1。

1.2.1 环境样品 DNA 的提取　环境样品中总 DNA 的提取是整个宏基因组研究的第 1 步，所得到 DNA 的质量直接影响序列拼接以及构建文库的质量。微生物群体总 DNA 的提取方法在不同环境有所不同，本文现主要针对土壤环境中总 DNA 提取方法进行概述。

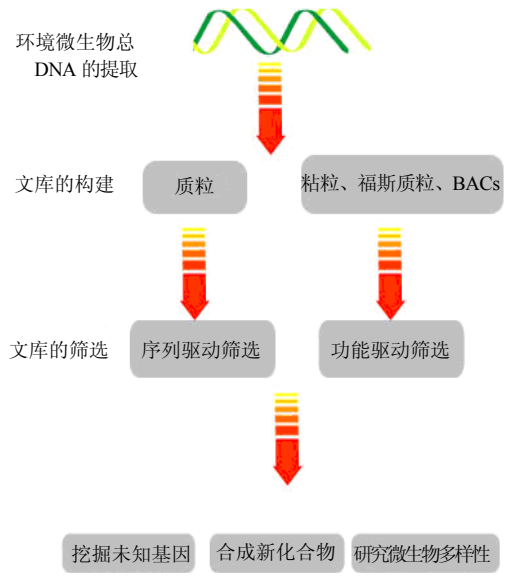

图 1　宏基因组技术流程

Fig. 1　Technological process of metagenomics

土壤总 DNA 的提取主要分为两大类：直接提取法和间接提取法[7]。二者主要区别在于是否先分离土壤中的微生物。直接提取法在所采集的环境样品中加入适当的裂解液让细胞充分裂解，使 DNA 游离出来，再进一步分离纯化，从而得到符合实验要求的 DNA 样本。而间接提取法则是先将土壤中的微生物用适当的方法分离出来，在一个相对纯净的环境中裂解细胞，释放 DNA。二者的比较见表 1。二者各有优缺点，应在实际操作中根据实验的要求和目的选择合适的方法。

1.2.2 宏基因组文库的构建　宏基因组文库的构建需要选择合适的载体和宿主。载体选择主要依据有利于目的基因扩增和表达的原则。目前构建宏基因组文库所用的载体主要包括质粒载体（plasmid）、粘粒载体（cosmid）和细菌人工染色体（bacterial artificial chromosome，BAC）。质粒载体一般用于克隆 7～10 kb 的片段，粘粒载体用于克隆 40 kb 左右的片段，而用 BAC 克隆的片段可达 350 kb。前者用于单基因片段的克隆与表达，后两者用于大片段插入文库的构建[10]。同时也有采用福斯质粒作为载体构建稻田土壤、海绵等宏基因组的文献报道[11-12]。宿主的选择要考虑转化效率、重组载体在宿主细胞中的稳定性、宏基因的表达等因素。构建宏基因组文库最常用的宿主是大肠杆菌 *Escherichia coli*[13]，其次变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans*、恶臭假单

表 1 两种土壤总 DNA 提取方法的比较

Table 1 Comparison on two methods for extracting total DNA from soil

方 法	步 骤	特 点
直接提取法	1）细胞裂解：物理法、化学法和酶解法 2）核酸分离与纯化	DNA 产量高，纯度低，片段较短，可得到 60%以上的微生物总 DNA[8]，更好地体现微生物的多样性
间接提取法	1）微生物的分离 2）细胞裂解 3）核酸分离与纯化	DNA 产量低，纯度高，片段较长，只能回收 25%～50%的内源性细菌群落[9]

胞杆菌 *Pseudomonas putida* 也可以作为宿主[14-15]。

1.2.3 宏基因组文库的筛选 宏基因组文库的筛选分为功能驱动筛选（function-driven screening）和序列驱动筛选（sequence-driven screening）[16]。功能驱动筛选基于重组基因克隆产生新活性来筛选，该法需要目的基因在宿主细胞中有很好的表达。功能驱动筛选可以迅速地找到酶和抗生素等天然产物，但筛选工作量大、效率较低。序列驱动筛选是根据已知基因序列来设计探针或者 PCR 引物来筛选宏基因组文库，从而得到目的序列。通过此方法在克隆出的一些随机序列中往往会有重要发现。但是采用序列驱动筛选的方法需要对目的基因序列有一定掌握，因此对于那些完全未知的基因是无法通过这种手段获取的。

1.3 宏基因组在生物领域的应用

随着分子生物学技术的发展，宏基因组学已广泛应用到医药、生态、农业等研究领域。马世宏等[17]利用宏基因组学技术研究转基因植物土壤环境微生物多态性，从而确保大面积种植转基因作物对生态环境的安全性。路杨[18]通过构建氯酚污染土壤微生物宏基因组文库首次获得除草剂 2, 4-二氯苯氧乙酸降解相关基因，为除草剂抗性机制的研究提供理论基础。赵晶等[19]构建了南极土壤微生物宏基因组文库，运用差异性 DNA 修复试验（DDRT）筛选文库，采用 MTT 法对其中活性较高的克隆子进行细胞毒活性测定，找到了对卵巢癌细胞生长具有抑制作用的克隆子 AE-3。Gillespie 等[20]从土壤宏基因组文库中筛选并命名了具有广谱抗菌活性的抗生素 turbomycin A、B。

2 宏基因组学在道地药材研究中的应用

道地药材通常指来自特定产区、生产历史悠久、栽培加工技术精细、质地优良、疗效显著的药材，是某些调节植物代谢产物合成的关键酶基因时空差异表达形成的[21-22]。根际微生物对药用植物次生代谢合成起关键作用。生态型（ecotype）是指一个种对某一特定生境发生基因型反应的产物。中药品质优劣和疗效差异在于其所含化学成分的不同，而实质上这种差异是由于生态型不同，植物个体在形态、生理、生化上的变化所导致。影响道地药材生长的环境因素很多，其中根际微环境在药用植物次生代谢产物形成中起着重要作用[2,23]。

2.1 环境微生物对道地药材形成的影响

根际微生态系统由植物、土壤与微生物相互作用形成，其中根际微生物细菌数量可达到 $1\times10^9/cm^3$，影响着土壤的物质转化和能量传递，调节根际微生态系统的动态平衡和提高植物对环境的适应性[24-25]。根际微生物对道地药材的影响主要体现在 3 方面：1）活化根际土壤营养元素，调节根际微环境的物质循环。根际微生物可以将有机物分解为无机物，为根系提供生长所需养料。如微生物可以分泌磷酸酶和植酸酶，将土壤中的磷从有机态转化为无机态，进而被根系有效地吸收利用。微生物自身可以分泌生长刺激素、维生素等多种促根生长物质[26]。2）影响植物根分泌物。根的分泌物在土壤微环境中为微生物提供重要的能量和营养物质，从而影响微生物的种类和数量。反之，根际微生物的种类数量及代谢情况又直接决定是促进还是抑制根的生长发育。微生物对根分泌物的作用体现在影响根细胞的通透性、影响根代谢、修饰根分泌物和改变根际营养成分 4 个方面[27]。通过这几种途径改变植物体内的生理生化过程，最终导致同种植物不同生境下的质量上的较大差别。3）增强植物对病虫害的抵抗作用。某些根际微生物分泌抗生素来抑制植物病原微生物的繁殖。目前市场上已有多种微生物病虫害防治剂，如苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、厚孢轮枝菌 *Verticillium chlamydosporium*、木霉菌 *Trichoderma* spp.、绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 等[27]。

2.2 利用宏基因组研究道地药材形成机制

道地药材不同生态型根际微生物种群结构存在差异，而不同微生物类群的生物学功能不同，从而

影响药用植物次生代谢。目前虽无直接应用宏基因组学研究道地药材的报道，但土壤微生态环境已成为药材道地性的一个研究热点。朱毓霞[28]采用稀释平板法对汶川地震前后土壤真菌、放线菌、细菌进行计数，采用最大或然数法测定土壤功能菌群落多样性、均匀性，认为灾区土壤震后两年可恢复震前水平。吴小丽等[29]研究在整个生育期内道地药材怀牛膝的土壤微生物和酶活性，认为怀牛膝在增重期土壤微生物数量和酶活性均最大。宏基因组学是一种整体性的研究策略[30]，可研究不同生态型土壤微环境对道地药材形成的影响。从环境样本中直接提取微生物 DNA，将 DNA 片段克隆到载体上，转化宿主菌，构建宏基因组文库。然后对文库进行随机序列测定以研究微生物群落的组成或筛选文库以发现特异的基因。具体流程见图 2。基于高通量测序技术，运用宏基因组的研究手段对道地药材生长的土壤微生物群落和结构进行研究，比较不同生态型道地药材根际土壤的微生物基因组，分析基因组结构，寻找编码分泌蛋白、与道地药材次生代谢产物合成相关的基因。探索微生物对于道地药材的生长、次生代谢产物的合成等方面的影响，为道地药材形成的土壤微环境的研究开辟了新道路。

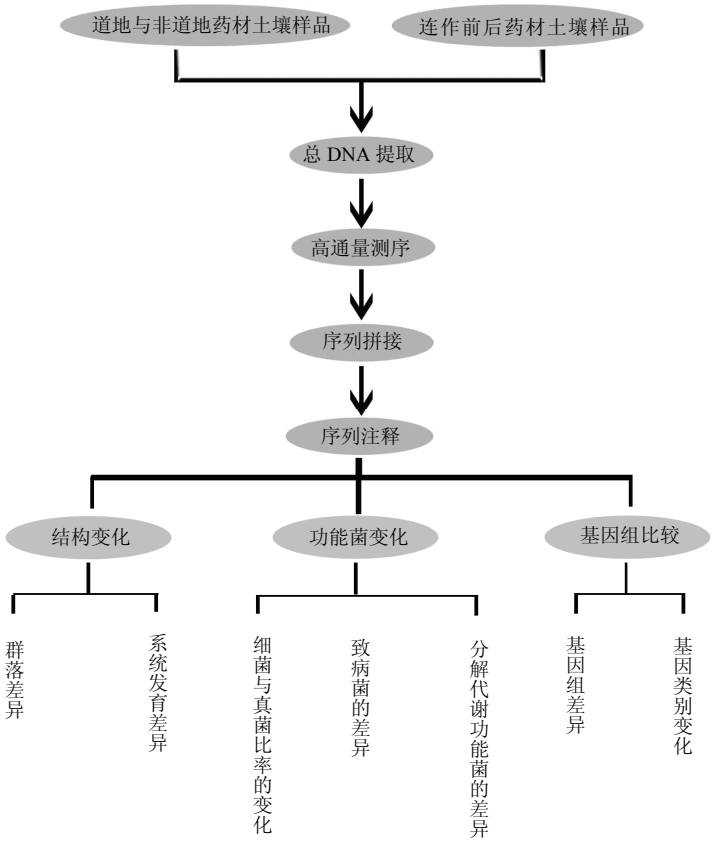

图 2　宏基因组在道地药材形成机制及药用植物连作障碍研究应用中的技术路线图

Fig. 2　Technological pathway of metagenomics in application of forming mechanism of genuine TCMM and study on continuous cropping obstacle in medicinal plants

2.3　利用宏基因组学解决药用植物连作障碍

同一作物或近缘作物连作以后，即使在正常管理的情况下，也会产生产量降低、品质变劣、生育状况变差的现象，称作连作障碍[31]。导致连作障碍的因素主要有：土壤理化性状改变、土壤生物学环境变化、药用植物自毒作用[32]。连作障碍加剧了药用植物-土壤之间的矛盾。同一种药用植物对土壤中的营养元素具有单一消耗的作用，从而引起土壤物理、化学、生物活性等方面的改变。连作障碍一直以来都是药用植物种植面临的困境之一，是一项迫切需要解决的棘手问题。目前已报道存在连作障碍的药用植物有人参、三七、太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.、地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et

Mey.、薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb.、当归、牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 等[33-40]。栽种过人参的土壤俗称“老参地”，这类土壤栽种人参会出现烧须、病害加剧、产量降低等严重后果。而目前仍缺乏有效的措施解决连作障碍的问题，使得人参产业的发展严重受阻[41]。杨利民等[42]从土壤微生物引起病害、根际化感作用和土壤营养不足 3 方面总结了人参、西洋参连作障碍的可能因素。乔卿梅等[43]分析了根际微生物在克服药用植物连作障碍中的潜力，从根际真菌、促生菌以及其他微生物菌剂几个方面进行了探讨。根际微生物是导致药用植物连作障碍的重要因素之一。随着种植年限的延长，导致栽培土壤障碍因素日益突出，病害在连作障碍中占 85% 左右，尤其是土传细菌及真菌病害[41]。利用宏基因组学技术对连作土壤中根际微生物样本进行基因组学分析，采集连作前后土壤样品，提取总 DNA，应用高通量测序技术，将得到的数据进行序列拼接、注释，利用与数据库中已提交的已知微生物种类进行对比，分析连作前后土壤微生物种类、数目的变化（图 2），为解决药用植物连作障碍提供新的研究思路。

3 展望

宏基因组学作为研究微生物种群分布、遗传特征以及基因相互作用的一门新兴学科在未来会遇到更多、更大的机遇和挑战。随着大规模测序技术的迅猛发展，基于高通量测序的宏基因组学将会在微生态学的研究中发挥越来越重要的作用。宏基因组学将来与宏转录组学以及宏蛋白质组学的结合也是研究微生物学领域未来一项崭新的切入点。道地药材与根际微环境密切相关。利用宏基因组学研究道地药材形成机制是方法学的创新。宏基因组学与现代微生物学、分子生物学、土壤学、生态学以及生物化学结合揭示道地药材形成的生物学机制，与中药材产地适宜性分析地理信息系统（TCMGIS）[44-46]结合探索道地药材适宜的生长环境，为道地药材及连作障碍的研究提供崭新的思路。

参考文献

[1] 谢宗万. 论道地药材 [J]. 中医杂志, 1990, 40(10): 43.

[2] 段金廒, 江 曙, 钱大玮, 等. 根际微生物对药材道地性的影响 [J]. 土壤, 2009, 41(3): 344-349.

[3] Streit W R, Schmitz R A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(5): 492-498.

[4] Schmidt T, Delong E F, Pace N R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(14): 4371-4378.

[5] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, *et al*. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chem Biol*, 1998, 5(10): 245-249.

[6] 李 慧, 何晶晶, 张 颖, 等. 宏基因组技术在开发未培养环境微生物基因资源中的应用 [J]. 生态学报, 2008, 28(4): 1762-1773.

[7] Robe P, Nalin R, Capellano C, *et al*. Extraction of DNA from soil [J]. *Eur J Soil Biol*, 2003, 39: 183-190.

[8] More M I, Herrick J B, Silva M C, *et al*. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(5): 1572-1580.

[9] Bakken L R, Lindahl V. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16: 135-142.

[10] 冯美琴. 宏基因组学的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 415-416.

[11] 张建萍, 段桂芳, 周勇军, 等. 稻田土壤细菌宏基因组文库构建 [J]. 江苏农业科学, 2001, 39(2): 18-20.

[12] 吴 杰, 李志勇, 张戌升. 海绵宏基因组文库构建及抗菌肽功能基因的初步筛选 [J]. 生物技术通报, 2006(3): 95-98.

[13] Henne A, Daniel R, Schmitz R A, *et al*. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 3901-3907.

[14] Schloss P D, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 303-310.

[15] Courtois S, Cappellano C M, Ball M, *et al*. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 49-55.

[16] Handelsman J. Sorting out metagenomes [J]. *Nat Biotecnol*, 2005, 23(1): 38-39.

[17] 马世宏, 高国庆, 刘 标, 等. 基于宏基因组学的转基因棉田土壤微生物功能多样性分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20559-20561.

[18] 路 杨. 土壤宏基因组文库筛选除草剂降解基因 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.

[19] 赵 晶, 杨祥胜, 曾润颖. 南极土壤微生物宏基因组文库构建及其抗肿瘤活性初探 [J]. 自然科学进展, 2007, 17(2): 267-271.

[20] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D, *et al*. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4301-4306.

[21] 郭宝林. 道地药材的科学概念及评价方法探讨 [J]. 世界科学技术——中药现代化, 2005, 7(2): 57-62.

[22] 黄璐琦, 郭兰萍, 胡 娟, 等. 道地药材形成的分子机制及其遗传基础 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2303-2308.

[23] 杨俊东, 陈兴福, 杨文钰, 等. 川泽泻质量与其根际土壤理化性质的相关性分析 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 581-587.

[24] 林先贵. 土壤微生物分子生态学与经典生物学的和谐发展 [A]. 第七届海峡两岸土壤肥料学术交流研讨会论文集 [C]. 北京: 中国土壤学会, 2008.

[25] 曹 慧, 崔中利, 李顺鹏. 中国土壤生物学研究的回顾与展望 [J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 830-836.

[26] Rengel Z, Marschner P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic diferences [J]. *New Phytol*, 2005, 168: 305-312.

[27] 王茹华, 张启发, 周宝利, 等. 浅析植物根分泌物与根际微生物的相互作用关系 [J]. 土壤通报, 2007, 38(1): 167-172.

[28] 朱毓霞. 汶川地震灾区道地药材产地土壤微生态变化的初步研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.

[29] 吴小丽, 黄进勇, 岳彩鹏, 等. 道地药材怀牛膝生长期间土壤微生物与酶活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23): 11008-11009.

[30] 陈旭玉, 周亚奎, 郑服丛. 宏基因组技术构建土壤宏基因组文库研究进展 [J]. 广东农业科学, 2008, 1: 32-34.

[31] 高 群, 孟宪志, 于洪飞. 连作障碍原因分析及防治途径研究 [J]. 山东农业科学, 2006, 3: 60-63.

[32] 张子龙, 王文全. 药用植物连作障碍的形成机理及其防治 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6): 19-23.

[33] 张鸿雁, 薛泉宏. 人参连作障碍防治研究进展 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(6): 68-71.

[34] 刘 莉, 刘大会, 金 航, 等. 三七连作障碍的研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(1): 70-75.

[35] 夏品华, 刘 燕. 太子参连作障碍效应研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(11): 2240-2246.

[36] 牛苗苗, 李 娟, 杜家方, 等. 地黄源库关系的变化及其与连作障碍的关系 [J]. 生态学杂志, 2011, 30(2): 248-254.

[37] 李自刚, 王新民, 刘太宇, 等. 复合微生物菌肥对怀地黄连作障碍修复机制研究 [J]. 湖南农业科学, 2008(5): 62-65.

[38] 张新慧, 张恩和, 王惠珍. 连作对当归药材挥发油含量的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(2): 274-277.

[39] 张新慧, 张恩和, 郎多勇, 等. 不同茬口对当归根际土壤酶活性及其产量和品质的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2322-2325.

[40] 李 娟, 黄 剑, 李 萍. 连作对牛膝中甾酮及三萜类物质含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2433-2434.

[41] 吴连举, 赵亚会, 关一鸣, 等. 人参连作障碍原因及其防治途径研究进展 [J]. 特产研究, 2008(2): 69-72.

[42] 杨利民, 陈长宝, 王秀全, 等. 长白山区参后地生态恢复与再利用模式及其存在的问题 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(5): 546-549.

[43] 乔卿梅, 程茂高, 王新民. 根际微生物在克服药用植物连作障碍中的潜力 [J]. 土壤通报, 2009, 40(4): 957-961.

[44] 谢彩香, 索风梅, 陈士林, 等. 基于地理信息系统的中药材生态适宜性定量化研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 379-382.

[45] Huang L F, Xie C X, Chen S L, *et al*. Mapping the potential distribution of high artemisinin-yielding *Artemisia annua* L. (Qinghao) in China with a geographic information system [J]. *Chin Med*, 2010, 5(18): 1-8.

[46] Yu H, Xie C X, Chen S L, *et al*. TCMGIS-II based prediction of medicinal plant distribution for conservation planning: a case study of *Rheum tanguticum* [J]. *Chin Med*, 2010, 5(31): 1-9.