

• 药材与资源 •

半夏及近缘种叶绿体非编码区序列分析

郑丹书¹, 张君毅^{1*}, 郭巧生²

1. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021

2. 南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 通过测定半夏及近缘种的 DNA 叶绿体的非编码区序列, 为半夏的分子鉴别和遗传多样性研究提供依据。方法 在我国半夏主要分布区收集到 43 份半夏及滴水珠和虎掌半夏 2 个近缘种, 采用 PCR 法克隆叶片基因组 DNA 中 *psbK-psbI* 和 *atpF-atpH* 两段序列, 借助生物信息学软件进行比对分析。结果 半夏 *atpF-atpH* 序列长为 337~342 bp, 较为保守, 仅含变异位点 7 个, 其中信息位点 1 个, 遗传距离为 0~0.024。半夏 *psbK-psbI* 序列长为 432~435 bp, 变异位点 37 个, 其中信息位点 17 个, 遗传距离为 0~0.069。聚类分析结果均显示出与表型以及地理居群的不一致。结论 *psbK-psbI* 序列较 *atpF-atpH* 有更好的鉴别能力, 在半夏种内具有较丰富的变异位点。

关键词: 半夏; *psbK-psbI*; *atpF-atpH*; 分子鉴定; 非编码区序列; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)07-0881-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.020

cpDNA non-coding sequence analysis of *Pinellia ternata* and its related speciesZHENG Dan-shu¹, ZHANG Jun-yi¹, GUO Qiao-sheng²

1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

2. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: **Objective** To provide the evidence for the identification and genetic diversity of *Pinellia ternata* by studying cpDNA non-coding sequences of *P. ternata* and its related species. **Methods** Besides *P. cordate* and *P. pedatisecta*, 43 *P. ternata* samples were collected from the main habitats in China. *psbK-psbI* and *atpF-atpH* sequences in leaf genome DNA were cloned by PCR. Comparative analysis was carried out by bioinformatics software. **Results** The sequence length of *atpF-atpH* in *P. ternata* was 337—342 bp and conservative. The numbers of variable sites and parsimony information sites were only 7 and 1, respectively. The genetic distance was 0—0.024. The length of *psbK-psbI* was 432—435 bp, with 37 variable sites, including 17 information sites, and the genetic distance was 0—0.069. Cluster analysis was not consistent with the phenotype or the geographical distributions. **Conclusion** The discrimination of *psbK-psbI* is better than that of *atpF-atpH*, and there are more mutation sites in *psbK-psbI* sequence among species in *P. ternata*.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; *psbK-psbI*; *atpF-atpH*; molecular identification; cpDNA non-coding sequence; genetic diversity

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 是我国传统中药, 具有燥湿化痰、降逆止呕之功效, 药理研究表明其具有抗肿瘤、抗早孕等疗效^[1]。半夏在我国分布广泛、种质多样、资源丰富, 但由于自然环境的破坏、大量农药的使用和过度的采挖, 导致半夏野生资源急剧减少, 而人工栽培发展相对缓慢, 造成市场上半夏质量参差不齐、真假难辨。此外, 经过长期演化、地理隔离和栽培种植等因素导致半夏各居群表型出现严重的分化^[2], 表现出丰富的遗传

多样性^[3-4]。因此, 亟需对现存遗传资源进行有效地鉴别和评价, 以保障用药安全和资源的可持续利用。

目前半夏遗传多样性研究已在诸多方面展开。植物形态学方面研究半夏叶形变化和珠芽数量的表形性状^[5], 孢粉学方面研究花粉形态、大小及表面纹饰等^[6], 细胞学方面研究染色体的倍性和数目等^[7], 微观结构方面研究叶片叶绿体、基粒、淀粉粒等^[8], 化学成分方面有生物碱^[9]、鸟苷^[10]等, 分子标记方面研究包括利用 ISSR 技术^[11]、SRAP 技

收稿日期: 2013-01-24

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2009BAI74B01-01-04); 华侨大学基本科研业务费专项基金资助项目 (JB-ZR1115)

作者简介: 郑丹书 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物的开发与利用。

*通信作者 张君毅 E-mail: zjy0054@yhaoo.com.cn

术^[12]、AFLP 技术^[13]、MSAP 技术^[14]等。在半夏鉴别方面,核糖体 ITS 序列已被用于半夏真伪品的鉴定^[15],并发现此序列在半夏种内不同居群间存在相当的变异位点^[16]。

叶绿体 DNA (cpDNA) 在大部分被子植物中为母系遗传,但其编码区高度保守,仅适合科内、科间乃至整个被子植物的较高分类阶元的系统发育研究,而非编码区(基因间区和内含子)适用于种间及种以下水平的植物研究^[17]。常用的非编码区有 *trnL-trnF*、*trnH-psbA*、*psbK-psbI*、*atpF-atpH* 等序列,并在繁缕^[18]、石蒜^[19]、砂仁^[20]等药用植物中开

展应用,但在半夏中尚未见报道。本实验拟利用叶绿体的非编码区检测半夏种内的遗传变异性,同时在一定程度上提供种间分子鉴定依据。

1 材料

在我国半夏主要分布区共收集了 16 个地区 43 份半夏资源。贵州是半夏野生资源分布集中地区之一,所以重点收集贵州省 20 份。同时收集到同属近缘种福建泰宁的滴水珠 (*Pinellia cordata* N. E. Brown, 编号 D50) 和江苏南京的虎掌半夏 (*Pinellia pedatisecta* Schott, 编号 H53)。供试材料经南京农业大学郭巧生教授鉴定,见表 1。

表 1 样品采集信息
Table 1 Information of samples

编号	来源	纬度	经度	编号	来源	纬度	经度	编号	来源	纬度	经度
B1	贵州兴义	25.09	104.90	B19	贵州大方	27.15	105.60	B37	甘肃西和	34.01	105.30
B2	贵州兴仁	25.44	105.18	B20	贵州大方	27.15	105.60	B38	广西贵港	23.11	109.60
B3	贵州盘县	25.71	104.47	B21	湖北京山	31.02	113.11	B39	江苏邳州	34.34	118.01
B4	贵州安顺	26.25	105.94	B22	湖北荆州	30.33	112.23	B40	云南昭通	27.34	103.71
B5	贵州赫章	27.12	104.72	B23	湖北荆州	30.33	112.23	B41	湖北潜江	30.40	112.90
B6	贵州关岭	25.87	105.62	B24	湖北来凤	29.49	109.40	B42	河南唐河	32.70	112.84
B7	贵州关岭	25.87	105.62	B25	湖北来凤	29.49	109.40	B43	河南唐河	32.70	112.84
B8	贵州普安	25.78	104.94	B26	湖南怀化	27.57	110.02	B44	安徽芜湖	30.89	118.36
B9	贵州册亨	24.98	105.81	B27	山东临沂	35.07	118.36	B45	安徽芜湖	30.89	118.36
B10	贵州湄潭	27.75	107.47	B28	陕西商洛	33.88	109.95	B46	江苏连云港	34.74	119.44
B11	贵州安龙	25.09	105.44	B29	山东菏泽	35.25	115.47	B47	安徽金寨	31.67	115.88
B12	贵州安龙	25.09	105.44	B30	重庆涪陵	29.70	107.38	B48	辽宁大连	38.92	121.59
B13	贵州遵义	27.72	106.92	B31	湖北恩施	30.29	109.48	B49	天津蓟县	40.04	117.41
B14	贵州遵义	27.72	106.92	B32	湖北恩施	30.29	109.48	D50	福建泰宁	26.90	117.08
B15	贵州凤冈	27.96	107.71	B33	浙江杭州	30.27	120.15	B51	江苏邳州	34.34	118.01
B16	贵州贵阳	26.65	106.67	B34	四川南充	30.83	106.12	B52	江苏泰州	32.45	119.91
B17	贵州德江	28.26	108.11	B35	重庆三岔	29.57	106.57	H53	江苏南京	31.95	118.84
B18	贵州毕节	27.30	105.30	B36	广西西林	24.48	105.09				

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

每份半夏材料取 1~2 个样品(共 51 个),采用改良 CTAB 法从新鲜叶片中提取基因组 DNA, DNA 的质量及浓度分别通过琼脂糖凝胶电泳及超微量紫外分光光度计检测,并稀释至 20 mg/L,置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

2.2 PCR 扩增和测序

选用 *psbK-psbI* 区和 *atpF-atpH* 区 2 段 cpDNA 基因间隔区序列,PCR 扩增均使用通用引物。

psbK-psbI 引物序列为 *psbKF*: 5'-TTAGCCTTTGTT-TGGCAAG-3'; *psbIR*: 5'-AGAGTTTGAGAGTAA-GCAT-3'; *atpF-atpH* 的引物序列为 *atpFF*: 5'-ACTCGCACACACTCCCTTTCC-3'; *atpHR*: 5'-GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3'。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。利用 EDC-810 型基因扩增仪(东胜创新生物科技有限公司)进行 PCR 扩增。

PCR 扩增反应总体积为 50 μL,终浓度为 30 ng 模板 DNA, 25 μL 1×PCR Reaction Mix, 2.5 μL

10 μmol/L 引物, 0.25 μL 5 U/μL Taq DNA 聚合酶, 18.25 μL 超纯水。两段序列均采用上述体系进行 PCR 扩增。

atpF-atpH 区扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 40 个循环; 72 °C 总延伸 5 min。*psbK-psbI* 区扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 °C 总延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶在 DYY—8C 型电泳仪 (北京六一仪器厂) 上检测, 利用凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司) 拍照记录。PCR 产物的纯化及序列双向测定均由上海英潍捷基生物技术完成。

2.3 数据处理

atpF-atpH 序列起止范围参照 Genebank 中天南星科巨魔芋 *Amorphophallus titanum* Becc. ex Arcang. (FJ455768) 和欧海芋属 *Arum maculatum* L. (J395275) 确定边界。*psbK-psbI* 序列起止范围参照浮萍属浮萍 *Lemna minor* L. 和紫萍属紫萍 *Landoltia punctata* (G. Mey.) C. H. Thomps., 登录号分别为 GU454328 和 GU454310。所得 DNA 序列用 BioEdit 软件进行编辑校准, 然后用 CLUSTAL X 2.0 进行多序列比对。利用 MEGA 4.0 进行序列差异分析, 并统计序列间的碱基突变位点、信息位点, 计算 GC

量等, 基于 UPGMA 法构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 序列扩增测定分析

从 *trnH-psbA*、*trnL-trnF*、*atpF-atpH* 和 *psbK-psbI* 4 段叶绿体非编码序列着手进行预扩增, 通过扩增效率和测序成功率的比较, 优先选择扩增效果较好的 *atpF-atpH* 和 *psbK-psbI* 两段序列对半夏及其近缘种进行分析, 见表 2。

3.2 *atpF-atpH* 序列长度及变异

供试的 43 份半夏和 2 份近缘种 *atpF-atpH* 序列均得到扩增并测序。将半夏所得 *atpF-atpH* 序列中的相同序列合并, 最终得到 4 个单倍型, 见表 3, 即 H1、H2、H3、H4, 长度为 337~342 bp, A 占碱基总数的 30.0%, T 占 38.7%, G 占 16.6%, C 占 14.7%, GC 量为 31.2%~31.3%。单倍型之间进行比对后可发现 6 处变异位点, 包含了 5 处插入/缺失和 1 处碱基置换。其中 5 处插入/缺失分别为 161、162、163、186、187 bp 处的单碱基插入/缺失; 1 处置换是位于 263 bp (C→G)。滴水珠和半夏的长度分别为 336 bp 和 337 bp。GC 量分别为 31.2% 和 31.3%。与半夏相比滴水珠差异位点有 11 个, 包括 4 个单碱基插入/缺失, 即 140、141、142、143; 7 处碱基置换, 即 2 处 162 bp (G→A)、170 bp (G→A) 的置换和 5 处 117 bp (T→A)、136 bp (T→A)、

表 2 半夏 4 段叶绿体非编码区基本信息

Table 2 Information of four cpDNA non-coding sequences from *P. ternata*

序列	扩增效率 / %	测序效率 / %	长度 / bp	GC 量 / %
<i>trnL-trnF</i>	80	60	748	32.5~33.4
<i>atpF-atpH</i>	80	80	343	31.2~31.3
<i>psbK-psbI</i>	100	80	448	23.6~27.6
<i>trnH-psbA</i>	0	0	—	—

表 3 半夏及 2 个近缘种 *atpF-atpH* 变异位点分析

Table 3 Variation sites in *atpF-atpH* of *P. ternata* and its two related species

类型	长度 /bp	GC 量 / %	变异位点 / bp																				总数
			117	136	140	141	142	143	145	156	157	161	162	163	164	166	167	170	171	186	187	263	
H1	341	31.2	T	T	T	T	T	G	T	A	T	T	G	A	A	T	T	G	A	T	—	C	48
H2	341	31.3	T	T	T	T	T	G	T	A	T	T	G	A	A	T	T	G	A	T	—	G	1
H3	337	31.3	T	T	T	T	T	G	T	A	T	—	—	—	A	A	T	G	A	—	—	C	1
H4	342	31.2	T	T	T	T	T	G	T	A	T	T	G	A	A	T	T	G	A	T	T	C	1
D50	336	31.2	A	A	—	—	—	—	T	A	T	T	A	A	T	T	A	A	T	—	—	C	1
H53	337	31.3	T	T	T	T	T	G	A	T	G	—	—	—	A	T	T	G	A	—	—	C	1

164 bp (A→T)、167 bp (T→A)、和 171 bp (A→T) 的颠换。虎掌半夏的差异位点有 3 处, 即 145 bp (T→A)、156 bp (A→T) 和 157 bp (T→G) 的颠换。

3.3 *psbK-psbI* 序列长度及变异

43 份半夏居群 *psbK-psbI* 区的序列长度 432~435 bp, A 占碱基总数的 39.0%, T 占 36.4%, G 占 13.0%, C 占 11.6%, 平均 GC 量为 24.6%。变异位点 37 个, 其中信息位点 17 个, 转换为 8, 颠换为 9。合并相同序列, 得到 46 条不同的序列, 即 46 个单倍型。滴水珠和虎掌半夏的长度分别为 429 bp 和 430 bp, GC 量分别为 24.2% 和 25.8%。相较于半夏, 二者各具有 17 个变异位点, 单倍型数目为 1。结果见表 4。

表 4 半夏及近缘种 *psbK-psbI* 序列分析

Table 4 Sequence analysis on *psbK-psbI* of *P. ternata* and its two related species

类型	长度 / bp	GC / %	变异位点数	信息位点数	单倍型
半夏	432~435	23.6~27.6	37	17	46
滴水珠	429	24.2	17	—	1
虎掌半夏	430	25.8	17	—	1

3.4 遗传相似性分析

应用 MEGA 4.0 计算出半夏居群间的遗传距离为 0.003~0.061, 半夏属 3 个种间的遗传距离分别为 0.035 (半夏/滴水珠)、0.038 (半夏/虎掌半夏) 和 0.045 (滴水珠/虎掌半夏)。半夏种内出现个别居群间的遗传距离大于种间的情况, 如 B39 和 B51 来自江苏邳州的材料, 其中 39 号同半夏中半数以上居群之间的距离均大于 0.035, 显示出了较大的差异性。这可能是由于半夏长期处于不同生态条件及遗传性状方面出现变化已形成了一定的生态型所致^[21]。基于遗传距离构建聚类图, 见图 1。从聚类结果中可以看出 D50 和 H53 两个近缘种明显地同半夏种内绝大部分居群区分开来, 同时, 半夏种内个别居群显示出了较大的差异性, 即 B8、B43、B42、B45、B48 号材料。其余的半夏材料分为 3 组, 具体为 B10、B24、B29、B30、B44、B32、B35、B31、B50、B22、B25、B21、B49、B40、B11、B27、B3、B5、B14、B23、B20、B38、B28、B6、B19、B51、B17、B4、B47、B34、B33、B15 和 B39 为一组; 第 2 组包含了 B16、B37、B18、B26、B12、B7、B9、B46、B2、B1、B36 和 B13; B41 自成一组。聚类结果均未显示出与表型及地理信息相一致。

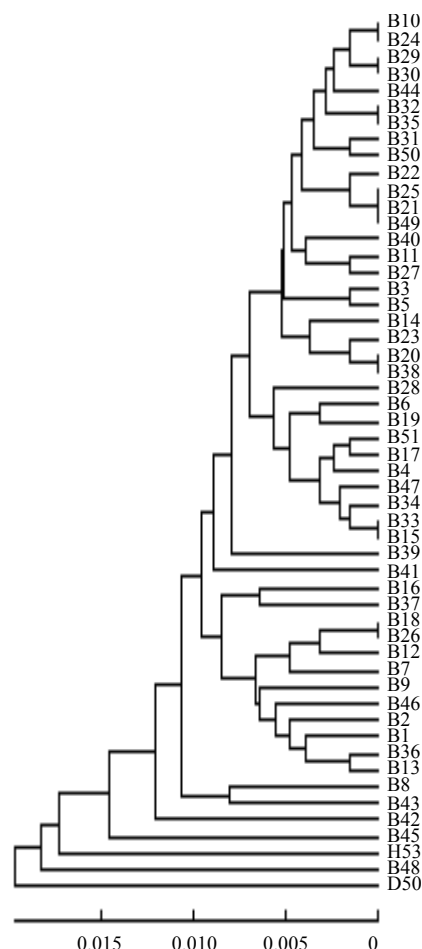


图 1 43 份半夏以及 2 个近缘种基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of Nei's genetic distance among 43 *P. ternata* samples and its two related species

4 讨论

4.1 序列选择

叶绿体非编码区序列受外界选择压力小, 进化速率较快, 因此常作为植物 DNA 条形码的候选序列, 已被广泛应用于药用植物种间鉴别及亲缘关系的研究。当前属下以至种内的鉴别是条形码鉴别工作的瓶颈^[22], 这可能要求针对某一物种以下水平的鉴别要有特定的序列, 能够对种内不同的居群或不同的亚种进行鉴定^[23]。本研究选择了 4 段序列进行半夏种内不同类群间分析。

trnH-psbA 序列是叶绿体非编码序列中进化速度较快且被认为适用于植物属间及种间的系统发育研究^[24], 但在本研究中, 该序列在半夏及其近缘种中全部扩增失败。对于 *trnL-trnF* 序列, 张乐容等^[25]

就用其对半夏属药用植物进行过种间关系的遗传分析,而本研究 *trnL-trnF* 序列的测序成功率较低。

atpF-atpH 和 *psbK-psbI* 均为叶绿体非编码区序列,二者和编码区 *matK* 基因的组合于第二届国际生物条形码大会上提出,即 *matK+atpF-atpH+psbK-psbI* 组合,同时提出的还有 *matK+atpF-atpH+trnH-psbA* 组合。2008 年 Fazekas 等^[26]对上述组合在 32 属 92 种共 251 个植物个体中进行了验证,结果得出 *matK+atpF-atpH+psbK-psbI* 的正确识别率最高,可达 69%,而单片段进行检测时 *atpF-atpH* 和 *trnH-psbA* 的成功率仅有 44%和 45%,然而鉴别能力较优的单一片段在片段组合中却不一定能够显示出相似的结果,反之亦然。目前还未有报道对半夏 *atpF-atpH* 和 *psbK-psbI* 这两段区域进行过系统发育的相关研究,而在此次预实验中,二者均显示出了较好的扩增效果,故本实验采用这两段序列进行半夏及其近缘种的克隆分析。

4.2 遗传变异

本研究中半夏 43 个居群 51 个样本的 *atpF-atpH* 存在 7 个变异位点,信息位点 1 个, *psbK-psbI* 存在 37 个变异位点,信息位点 17 个,半夏种内遗传距离为 0.003~0.061,可以看出半夏种内具有较高水平的遗传多样性。张乐容等^[25]对半夏属 5 个种 9 个类群的 *trnL-trnF* 序列进行统计分析,半夏种内遗传距离为 0.001~0.005,这与本研究结果基本一致。张君毅等^[16]测定了半夏主要的 16 个居群 18 个样本 rDNA 中的 ITS 和 5.8 S rDNA 完全序列。ITS1 遗传距离为 0~0.36%, ITS2 为 0~2.06%,这与本实验结果差异较大,可能所选序列的进化速率有关。

从半夏表型变异的连续性以及半夏染色体的变异情况来看,半夏种内很可能经历了形态学种-半隐性种-隐性种这样的一个演化过程^[27],毫无疑问地给形态学及分子分类学在鉴定工作制造了较大的困难,这也可能是半夏以及其他复合体内鉴定问题至今仍未得到解答的根源,在一定程度上可以为传统形态学同现代分子分类学还未达到有机结合做出解释。从本实验的聚类结果中可以看出,半夏各居群的聚集显示出较杂乱的情况,与表型及地理分布明显不相一致。半夏居群内个别样品显示出了较大的差异性,如 B8、B42、B43、B45 和 B48 号材料,其中 B42 和 B43 来自河南唐河的二叶半夏材料表现出较少的双珠芽特点。此外,个别样品间的遗传距离甚至超出了半夏种间的距离,如 B39 与 B51 来自江

苏邳州的材料,其中 B39 同半夏种内半数以上的居群之间的遗传距离均大于 0.035。

在细胞学半夏属各自然居群染色体存在严重的复合多倍体现象,甚至还存在非整倍体数目的变异^[28],半夏由此成为至今发现的染色体倍性最多的多倍体种群之一。在本实验测序结果中,核酸变异位点中亦存在杂合子现象,这与前述半夏染色体的多倍性特点是一致的。序列分析后的聚类结果显示与表型及产地分布均不相关,这可能由半夏染色体倍性变化复杂,以至于可能出现不同居群染色体数目相同而同一居群半夏染色体数目各异的特点导致。

参考文献

- [1] 李玉先,刘晓东,朱照静.半夏药理作用的研究述要[J].辽宁中医学院学报,2004,6(6):459-460.
- [2] 高凯,李名旺,顾德兴.华东地区半夏属群体营养器官的比较解剖及其演化[J].南京农业大学学报,1998,21(2):11-17.
- [3] 魏淑红,彭正松.半夏群体性状变异类型研究[J].江苏农业科学,2004,4:37-39.
- [4] 宋金斌,张国泰,郭巧生,等.不同半夏种质田间比较试验[J].中草药,1997,28(3):175-177.
- [5] 姚绳林,曹庆生.半夏的野生类型及其增值率研究[J].基层中药杂志,1998,12(1):46-47.
- [6] 李名旺,於丙军,顾德兴,等.半夏属(*Pinellia*)的花粉粒和醇溶蛋白比较[J].武汉植物学研究,2000,18(3):250-252.
- [7] 欧巧明,厚毅清,包梅年,等.中药半夏单细胞悬浮培养、胚胎发生及植株再生[J].中国生物工程杂志,2012,32(10):39-49.
- [8] 白权,赵淑芝,孙琪华,等.南充半夏的质量研究[J].药学实践杂志,2000,18(5):297-298.
- [9] 张鲁,李遇伯,李利新,等.半夏种内各变异类型总生物碱含量的变异规律[J].中草药,2013,44(6):681-685.
- [10] 陈钢,崔小兵,谈献和,等.半夏药材中鸟苷和尿苷的含量测定及半夏指纹图谱研究[J].西北药物杂志,2011,26(5):313-316.
- [11] 熊忠臣,史艳财,漆小雪,等.壮药战骨种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J].中草药,2012,43(10):2040-2044.
- [12] 欧阳钟鸣,赵静,彭正松,等.中国半夏属植物亲缘关系的 SRAP 分析[J].植物科学学报,2012,30(2):116-121.
- [13] 张杰,徐涛,张建光,等.半夏栽培种遗传差异的 AFLP 分析[J].中草药,2007,38(12):1884-1889.
- [14] 薛梅,陈成彬,陈力,等.半夏多倍体复合体基因组 DNA 甲基化状态的 MSAP 分析[J].中草药,2008,

- 39(11): 1713-1716.
- [15] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦, 等. 应用等位基因特异聚合酶链式反应鉴别半夏类药材 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(1): 17-20.
- [16] 张君毅, 郭巧生, 吴丽伟, 等. 我国不同地区半夏 rDNA 序列分析 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1768-1772.
- [17] Small R L, Ryburn J A, Cronn R C, *et al.* The tortoise and the hare: Choosing between noncoding plastome and nuclear ADH sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group [J]. *Am J Bot*, 1998, 85: 1301-1315.
- [18] 赵海光, 周建建, 曹珊珊, 等. 基于 ITS 和 trnL-F 序列碱基差异的繁缕及其近缘种的亲缘关系分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(1): 1-5.
- [19] 全妙华, 欧立军, 余朝文, 等. 中国石蒜属种间关系的 trnH-psbA 序列分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1589-1594.
- [20] 杨振艳, 张玲. 姜科砂仁属植物 DNA 条形码序列的筛选 [J]. 云南植物研究, 2010, 32(5): 393-400.
- [21] 王祖秀, 彭正松, 何奕昆. 三叶半夏 (*Pinellia ternata*) 雄配子败育的遗传分析 [J]. 作物学报, 2000, 26(1): 83-86.
- [22] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.
- [23] Blaxter M. Molecular systematics-counting angels with DNA [J]. *Nature*, 2003, 421: 122-124.
- [24] Naciri Y, Cavat F, Jeanmonod D. *Silene patula* (Siphonomorpha, Caryophyllaceae) in North Africa: A test of colonisation routes using chloroplast markers [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 54(3): 922-932.
- [25] 张乐荣, 杨在君, 欧阳钟鸣, 等. 半夏属药用植物 trnL-F 序列与中间遗传关系分析 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(21): 81-85.
- [26] 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.
- [27] 敖成齐. 种、隐种和半隐种 [J]. 生物学教学, 2010, 35(2): 78.
- [28] 候典云, 王荔, 杨艳琼, 等. 半夏不同居群的细胞学研究 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(2): 159-162.