

• 药材与资源 •

鬼针草及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究

夏 至, 高致明*, 李贺敏, 张红瑞

河南农业大学农学院 中药材工程技术研究中心, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 构建鬼针草 *Bidens pilosa* 及其与近缘种之间系统发育关系, 准确鉴别鬼针草及其近缘种。方法 提取鬼针草及其近缘种 DNA, 对核基因 ITS 片段和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列扩增和测序, 计算物种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。采用最近距离、相似性搜索、构建 Neighbor-joining (NJ) 系统聚类树 3 种方法进行鉴定分析。结果 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树支持鬼针草不同居群样本聚为一单系分支, 支持率为 79% 和 87%; 其中, 鬼针草与白花鬼针草构成一单系分支, 金盏银盘与婆婆针构成姐妹群分支, 上述两分支 ITS 和联合数据支持率均为 100%; 狼把草与柳叶鬼针草、大狼把草构成一单系分支 (ITS 和联合数据支持率为 100%, *psbA-trnH* 数据支持率为 96%)。鬼针草及其近缘种种间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的遗传距离为 0.007 94~0.128 80 和 0.005 18~0.074 52, 均远大于鬼针草种内遗传距离 0~0.001 59 和 0~0.002 52。结论 鬼针草与白花鬼针草亲缘关系最近, 金盏银盘与婆婆针构成姐妹群关系, 狼把草与柳叶鬼针草、大狼把草亲缘关系较近。ITS 和 *psbA-trnH* 序列可以准确鉴别鬼针草及其近缘种。

关键词: ITS; *psbA-trnH*; 鬼针草; 分子鉴定; 亲缘关系

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)06-0828-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.017

Molecular authentication and phylogenetic relationship of *Bidens pilosa* and its relative species

XIA Zhi, GAO Zhi-ming, LI He-min, ZHANG Hong-rui

Research Center of Engineering Technology for Traditional Chinese Medicine Materials, College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Objective To construct the phylogenetic relationship of *Bidens pilosa* and its relative species, and to accurately identify *B. pilosa* and its relative species. **Methods** Total genomic DNA was isolated from *B. pilosa* and its relative species. Nuclear DNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast gene *psbA-trnH* sequences were amplified and sequenced. The Kimura 2-parameter (K2P) distances were calculated. Authentication analyses were performed using Nearest Distance, BLAST1, and Neighbor-joining (NJ) methods. **Results** The NJ trees (ITS and *psbA-trnH* data) indicated that the different populations of *B. pilosa* form a monophyletic clade [Bootstrap (BS) = 79% and 87%]. *B. pilosa* and *B. pilosa* var. *radiata* formed one monophyletic clade, and *B. biternata* was sister to *B. bipinnata* (ITS and combined data: BS = 100%). *B. tripartita*, *B. cernua*, and *B. frondosa* formed one monophyletic clade (ITS and combined data: BS = 100%; *psbA-trnH* data: BS = 99%). The inter-specific genetic distances (ITS and *psbA-trnH* data) between *B. pilosa* and its relative species were (0.007 94—0.128 80) and (0.005 18—0.074 52) which were far higher than intra-specific genetic distances of *B. pilosa* (0—0.001 59) and (0—0.002 52). **Conclusion** The closest relative of *B. pilosa* is *B. pilosa* var. *radiata*. *B. tripartita* is closely relative to *B. cernua* and *B. frondosa*. The sister relationship between *B. biternata* and *B. bipinnata* is corroborated. ITS and *psbA-trnH* are two efficient barcodes for the authentication of *B. pilosa* and its relative species.

Key words: internal transcribed spacer; *psbA-trnH*; *Bidens pilosa* L.; molecular authentication; phylogenetic relationship

菊科 (Asteraceae) 鬼针草属 *Bidens* Linnaeus 有 9 种和 2 个变种, 隶属于 2 个组, 其中, 鬼针草植物药用历史悠久, 始载于《本草拾遗》, 在我国 *Bidens pilosa* Linn. 与其变种白花鬼针草 *B. pilosa*

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 科技部国家星火计划项目 (2012GA750004); 国家自然科学基金面上项目 (31070171, 31270236)

作者简介: 夏至 (1974—), 男, 河南固始人, 副教授, 博士, 研究方向为中药资源的分子鉴定。

Tel/Fax: (0371)63554995 E-mail: xiazhiE-mail@126.com

*通信作者 高致明, 教授, 主要从事中药资源的规范化种植研究。E-mail: gaozhiming672@shou.com

var. *radiata* Sch.、小花鬼针草 *B. parviflora* Willd.、婆婆针 *B. bipinnata* Linn.、金盏银盘 *B. pilosa* var. *radiata* Sch. 亲缘关系较近, 隶属于裸果组, 全国各地均有分布^[1]。河南分布有 6 种 1 个变种, 野生资源极为丰富^[2]。鬼针草 *Bidens pilosa* Linn. 以全草入药, 具有清利湿热之功, 多用于治疗咽喉疼痛、肠炎痢疾、尿路感染、小儿腹泻、慢性支气管炎和神经衰弱等疾病^[3]。植物化学和药理学的研究表明鬼针草属植物(如小花鬼针草、婆婆针、金盏银盘等)大多可药用^[4], 活性成分主要是黄酮类、烯炔类化合物等^[3-4], 具有抑菌、抗炎、抗上呼吸道感染、抗疟、降血压等多种药理作用^[5], 临床应用十分广泛。由于, 鬼针草属植物在我国南北均有分布, 生态适应幅度大, 形态上产生很多变异, 导致鬼针草与同属的一些近缘种很难区分。且有关鬼针草基源植物的中文名称常有混淆, 如鬼针草又叫三叶鬼针草, 其下变种白花鬼针草又叫金盏银盘, 婆婆针又叫鬼针草。因此, 鬼针草属的药用物种之间容易混淆^[5-10], 直接影响临床用药的安全。目前, 有关鬼针草及其同属的一些种类的鉴定主要集中在果实微形态性状^[6]、叶形态脉序图谱^[11]、显微和薄层性状的分析等^[7], 鬼针草与其近缘种的 DNA 条形码分子鉴定研究未见报道。为确保鬼针草的正确和安全用药, 对鬼针草及其近缘种进行 DNA 条形码分子鉴定研究, 找到快速准确鉴定鬼针草的方法是非常必要的。

近年来, 随着分子生物学的快速发展, DNA 条形码(DNA barcoding)技术为中药材物种鉴定研究提供了方便快捷的方法。DNA 条形码技术是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段对物种进行快速、准确的自动鉴定^[12]。目前, 药用植物的 DNA 条形码鉴定研究得到快速发展, 广泛应用于多个科属的药用植物及中药材鉴定^[13-15]。植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段作为国际通用条形码序列, 在种间及种下居群间具有进化速率快、变异程度高、区分物种能力强的特点适用于药用植物与其近缘种类等较低分类阶元的分子鉴定^[16-18]。本研究选用核基因 ITS 片段和叶绿体基因 *psbA-trnH* 片段, 通过对鬼针草属 7 个种和 1 个变种, 取样分类标准依据《中国植物志》和 *Flora of China*^[19]共 22 个样本进行 DNA 条形码分子鉴定研究, 探讨鬼针草及其与近缘种的亲缘关系, 为鬼针草的准确鉴定提供科学依据。

1 材料

收集鬼针草属 7 个种和 1 个变种共 22 个样本, 实验材料由河南农业大学农学院中药材系高致明教授和朱长山教授鉴定, 凭证标本保存于河南农业大学。实验材料来源于植物新鲜叶片, 经硅胶快速干燥后保存于 -80 °C 冰箱, 实验材料详细信息、GenBank 登录号见表 1。

2 方法

2.1 样品 DNA 的提取、扩增和测序

采用北京天根生化植物 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., 中国)提取样品 DNA, ITS 序列扩增使用 Wendel 等^[20]设计的引物 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); *psbA-trnH* 序列扩增使用 DNA 条形码通用引物^[15], 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应条件及扩增程序参考 Chen 等^[15]和 Xia 等^[21]的研究。PCR 产物纯化后, 送到北京三博远志有限公司, 用 ABI 3730X 测序仪(Applied Biosystems Co., 美国)进行双向测序, 测序结果在 GenBank 注册新序列号为 KF731835~KF731864, 见表 1。

2.2 数据处理

测序所得的峰图采用 CodonCode Aligner V3.0 (CodonCode Co., 美国)对序列峰图进行校对拼接, 去除引物区和低质量的序列, 利用软件 PAUP* version 4.0b10 计算物种种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。构建邻接(Neighbor-joining, NJ)系统发育树, 利用 Bootstrap (BS, 1 000 次重复)检验各分支的支持率。利用相似性搜索法(BLAST1)、最近距离法(nearest distance)、NJ 系统发育树等方法对鬼针草及其近缘种进行鉴定分析。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列信息、序列种内及种间变异分析

鬼针草及其同属的 7 个种和 1 个变种的 ITS 序列长度变异范围为 630~633 bp, 鬼针草、白花鬼针草、金盏银盘、婆婆针的 ITS 序列均为 633 bp, 大狼把草的 ITS 序列最短为 630 bp。其中 ITS1 序列长度变异范围为 252~255 bp。5.8 S 区域长度均为 164 bp, ITS2 序列长度变异范围为 213~216 bp。在 ITS 序列的矩阵中, 鬼针草 5 个居群的 ITS 序列长度一致, 本课题组取样的河南栾川、洛阳、禹州 3 个居群(A1、A2 和 A3)与 A5 (GenBank 序列号为 GU736433)

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

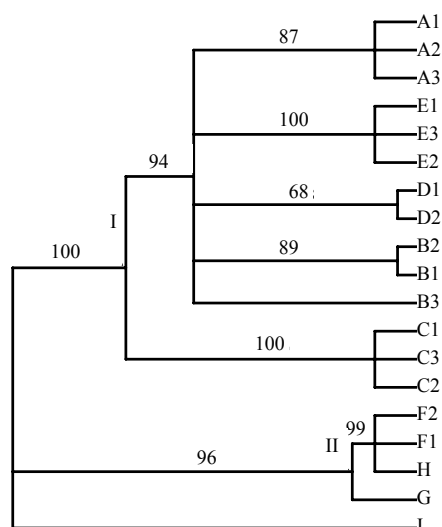
编号	样品	采集地	GenBank 登录号	
			ITS	<i>psbA-trnH</i>
A1	鬼针草 <i>B. pilosa</i>	河南栾川	KF731835	KF731850
A2	鬼针草	河南洛阳	KF731836	KF731851
A3	鬼针草	河南禹州	KF731837	KF731852
A4	鬼针草	GenBank	U67106	
A5	鬼针草	GenBank	GU736433	
B1	白花鬼针草 <i>B. pilosa</i> var. <i>radiata</i>	河南栾川	KF731838	KF731853
B2	白花鬼针草	河南栾川	KF731839	KF731854
B3	白花鬼针草	GenBank	AY623061	GQ435609
C1	小花鬼针草 <i>B. parviflora</i>	河南栾川	KF731840	KF731855
C2	小花鬼针草	河南洛阳	KF731841	KF731856
C3	小花鬼针草	河南洛宁	KF731842	KF731857
D1	金盏银盘 <i>B. biternata</i>	河南栾川	KF731843	KF731858
D2	金盏银盘	河南禹州	KF731844	KF731859
D3	金盏银盘	GenBank	EU117247 EU117245 EU117273	
E1	婆婆针 <i>B. bipinnata</i>	河南洛阳	KF731845	KF731860
E2	婆婆针	河南洛阳	KF731846	KF731861
E3	婆婆针	河南栾川	KF731847	KF731862
F1	狼把草 <i>B. tripartita</i>	河南洛阳	KF731848	KF731863
F2	狼把草	河南洛宁	KF731849	KF731864
F3	狼把草	GenBank	U67097	
G	大狼把草 <i>B. frondosa</i>	GenBank	U67094	HQ596614
H	柳叶鬼针草 <i>B. cernua</i>	GenBank	U67098	HQ596612
I	秋英 <i>Cosmos bipinnatus</i>	GenBank	FJ980345	GQ435119

ITS 序列的同源性高达 100%。居群 A4 (GenBank 序列号为 U67106) 对比其他 4 个居群有 3 个碱基位点的变异, 分别在居群 A4 的第 131 个位点, 第 158 个位点, 第 389 个位点。其中第 131、158 个位点分别出现兼并碱基 Y 和 M, 而第 389 个位点出现在 5.8 S 区域, 由 T→C 的变异。ITS 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示, 鬼针草与其同属其他 6 个种的种间遗传距离为 0.007 94~0.128 80, 明显大于鬼针草种内的遗传距离 (0~0.001 59) (表 2)。

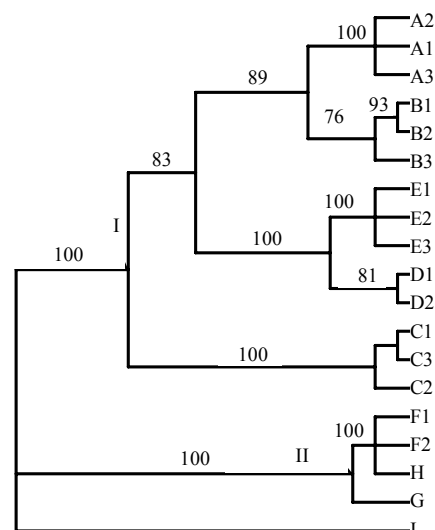
3.2 *psbA-trnH* 序列信息、序列种内及种间变异分析

鬼针草及其同属的 7 个种和 1 个变种的 *psbA-trnH* 序列长度变异范围为 376~407 bp, 其中白花鬼针草的 *psbA-trnH* 序列最长为 407 bp, 大狼把草 *psbA-trnH* 序列最短均为 376 bp。在 *psbA-trnH*

序列的矩阵中, 鬼针草的 3 个居群样本中, 河南栾川 (A1) 和禹州 (A3) 居群的 *psbA-trnH* 序列完全一致, 其中居群河南洛阳 (A2) 对比 A1 和 A3, 在 43 个位点出现 1 个碱基位点由 T→A 的变异。对比鬼针草的 *psbA-trnH* 序列, 白花鬼针草的 *psbA-trnH* 序列在第 203 和 358 位点有 6 个碱基和 3 个碱基的插入, 金盏银盘和婆婆针在第 201 和 358 位点有 4 个碱基的缺失和 2 个碱基的插入, 小花鬼针草在 392 位点有 7 个碱基的缺失, 狼把草、柳叶鬼针草和大狼把草分别第 182 和 226 位点有 9 个碱基和 6 个碱基的插入。*psbA-trnH* 序列种内、种间 K2P 遗传距离结果显示, 鬼针草与其同属 6 个种的种间遗传距离为 0.005 18~0.074 52, 明显大于鬼针草种内的遗传距离 (0~0.002 52), 见表 2。

图2 基于 NJ 法构建系统发育树 (*psbA-trnH* 数据)Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ method (*psbA-trnH* data)

可以联合进行分析。核基因 ITS 序列矩阵总长度为 640 bp, 信息位点 (informative sites) 为 125 个, 叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列矩阵总长度为 409 bp, 信息位点为 51 个, ITS 和 *psbA-trnH* 序列联合矩阵总长度为 1 049 bp, 信息位点为 176 个。在 ITS 分子系统树上 (图 1), 鬼针草属内形成 2 大分支 (分支 I 和分支 II), 在分支 I 内, 鬼针草的 5 个居群样本与白花鬼针草 3 个居群样本聚为一单系分支, 支持率为 100%, 金盏银盘与婆婆针构成姐妹群的单系分支, 支持率为 100%, 这 4 个种又与小花鬼针草一起, 构成分支 I, 支持率为 97%。在分支 II 内, 狼把草的 3 个居群样本并没有构成一单系分支, 而是和柳叶鬼针草一起形成一单系分支, 支持率为 100%, 这 2 个种又与大狼把草一起构成分支 II, 支持率为 100%。在 *psbA-trnH* 分子系统树上 (图 2), 各分支的拓扑结构与 ITS 分子系统树差别不大, 同样, 鬼针草属内形成两大分支 (分支 I 和分支 II), 分支 I 包括鬼针草、白花鬼针草、金盏银盘、婆婆针和小花鬼针草, 支持率为 100%。分支 II 包括狼把草、柳叶鬼针草和大狼把草, 支持率为 96%。在 ITS 和 *psbA-trnH* 序列联合分子系统树上 (图 3), 各分支的拓扑结构与 ITS 分子系统树的拓扑结构基本一致, 惟一不同的是白花鬼针草的 3 个居群在 ITS 和 *psbA-trnH* 各自的分子系统树上均未构成单系分支, 但在联合分子系统树上, 却构成一单系分支, 支持率为 76%。

图3 基于 NJ 法构建系统发育树 (ITS 和 *psbA-trnH* 数据联合)Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on NJ method (ITS and *psbA-trnH* combined data)

4 讨论

4.1 基于 ITS 和 *psbA-trnH* 序列对鬼针草与其近缘种的分子鉴定

近年来, 随着鬼针草在临床方面的应用不断扩大, 其市场需求量也越来越大。然而, 由于鬼针草属药用植物种类众多, 多个地区出现鬼针草的近缘种替代用药, 导致中药材鬼针草临床用药存在不安全因素。本研究应用国际通用的 DNA 条形码序列核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列对中药材鬼针草及其同属的 7 个种和 1 个变种 (共 22 个样本) 进行鉴定研究, 结果表明 ITS 和 *psbA-trnH* 序列在鬼针草不同居群个体间均存在少量变异, 在鬼针草与其同属其他种类之间, 存在丰富的变异。鬼针草与其近缘种之间 ITS 和 *psbA-trnH* 序列的种间 K2P 遗传距离均远大于鬼针草种内居群间 K2P 遗传距离。NJ 树聚类分析结果显示, 在 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树上, 鬼针草不同居群均聚为一单系分支, 支持率分别为 79% 和 87%, 与其近缘种很好地区分开。这表明, 核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列可以作为鬼针草及其与近缘种类进行鉴定的条形码序列。

但对于鬼针草属的其他种类白花鬼针草和狼把草, 本研究结果表明, 白花鬼针草与其近缘种的 ITS 序列的种间 K2P 遗传距离 (0.007 94~0.130 63) 与白花鬼针草种内居群间 K2P 遗传距离 (0.001 58~

0.012 76) 存在重叠。NJ 树聚类分析结果显示, 在 ITS 和 *psbA-trnH* 分子系统树上, 来源于 GenBank 的白花鬼针草 B3 这一居群, 与 B1 和 B2 的 2 个居群均没有聚为一单系分支。狼把草的不同居群也没有聚为一单系分支, 而是和柳叶鬼针草聚在一起。这表明, 针对亲缘关系较近的物种, 核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列在物种间和居群内提供的变异信息位点也存在差异, 并不能将这 2 个种与其近缘种区分开。

4.2 鬼针草属下种间系统发育关系

鬼针草属植物在全世界分布有 230 余种, 以美洲分布的种类最为丰富, 在我国仅有 9 个种, 2 个变种。《中国植物志》^[1]、*Flora of China*^[19]和夏晓飞等^[7]基于果实形状的特征, 将鬼针草属属下划分为 2 个组, 即宽果组和裸果组。本研究的分子系统学结果进一步支持上述关于鬼针草属下组的划分, 在 ITS、*psbA-trnH* 和联合基因的分子系统树上, 本研究取样的 7 个种和 1 个变种被划分到 2 个独立的单系分支内, 分别为分支 I (对应裸果组) 和分支 II (对应宽果组), 均具有较高的支持率, 这表明基于分子和形态特征对鬼针草属下组的划分是一致的。属下种间系统发育关系上, 在裸果组内 (分支 I), 鬼针草、白花鬼针草、小花鬼针草、金盏银盘与婆婆针这 5 个种亲缘关系较近。其中, 鬼针草与其变种白花鬼针草聚成一单系分支, 支持率均为 100% (图 1、3), 这 2 个种对比其他种类, 分布区重叠, 具有三出复叶, 叶边缘无毛或具极少柔毛的近裔共性 (synapomorphy), 也支持二者亲缘关系最近。区别二者的主要形态特征, 表现在白花鬼针草对比鬼针草在头状花序边缘具有 5~7 枚白色的舌状花, 在果期, 白花鬼针草与鬼针草很难区分, 极易混淆。金盏银盘与婆婆针聚成一单系分支, 支持率均为 100%, 二者亲缘关系最近, 形态特征的差异主要体现在羽状复叶的顶生小叶上, 金盏银盘的顶生小叶先端短尖, 边缘具密齿, 而婆婆针顶生小叶先端渐尖, 边缘具不规则粗齿^[20]。在宽果组内 (分支 II), 狼把草与柳叶鬼针草构成一单系分支, 具有较高的支持率, 二者亲缘关系最近。这 2 个种构成的单系分支与大狼把草一起, 组成姐妹群分支。这 3 个种对比宽果组 (分支 I) 的种类, 具有瘦果较宽, 楔形或到卵状楔形, 顶端截形的近裔共性, 支持他们的亲缘关系较近。

由于鬼针草属植物的瘦果顶端具倒刺的芒状冠

毛, 果实易于附着在动物的皮毛、人类的衣服上等, 宜于传播^[22], 因此, 该属一些物种在我国大部分地区均有分布, 如鬼针草、狼把草被视为是广布种。Ganders 等^[23]认为该属植物的形态特征和地理上分布, 呈现典型的适应性辐射 (adaptive radiation) 进化模式, 物种的快速形成, 并形成大量的适应性形态特征, 造成传统的鉴定困难^[24]。本研究基于 DNA 条形码技术的分子鉴定不仅准确鉴定中药材鬼针草及其近缘种 (易混品), 并初步构建鬼针草及其同属种类的系统发育关系, 为开展鬼针草属药用植物亲缘学研究打下基础。此外, 在构建鬼针草及其同属种类的分子系统发育关系时, 核基因 ITS 和叶绿体基因 *psbA-trnH* 的联合矩阵提供的变异位点 (信息位点) 多于单个基因, 因此, 联合 NJ 分子系统树的各节点的支持率稍高于单基因片段 NJ 分子系统树的各节点支持率。本研究对鬼针草及其近缘种的系统发育关系进行初步探讨, 但鉴于鬼针草属植物种类较多, 进一步在该属扩大取样范围, 选取 ITS 和 *psbA-trnH* 序列及其他基因片段开展分子系统学研究, 方能全面构建鬼针草属属下系统发育框架, 从分子水平揭示该属的起源, 演化及属下各种间的亲缘关系, 为鬼针草属的药用植物的资源开发与利用提供可靠的理论依据。

志谢: 中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室植物系统发生与进化发育创新研究课题组提供本研究分子实验平台, 中国科学院植物研究所标本馆协助查阅标本。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 75 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 丁宝章, 王遂义. 河南植物志 (第 3 册) [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1997.
- [3] 李 帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等. 鬼针草化学成分的研究 (I) [J]. 中草药, 2003, 34(9): 782-785.
- [4] 王建云, 何广新, 苏 豹. 民族药鬼针草及其同属植物的研究概况及开发前景 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1998, 30: 24-27.
- [5] 李 帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等. 鬼针草化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2004, 35(9): 972-975.
- [6] 王 玲, 崔冬安, 周绪正, 等. 鬼针草的化学成分与药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 147-150.
- [7] 夏晓飞, 胡丹丹, 赵良成, 等. 北京 7 种鬼针草属植物果实微形态特征及其系统学意义 [J]. 西北植物学报,

- 2011, 31(10): 2001-2007.
- [8] 胡伟, 陈飞虎, 吴繁荣, 等. 鬼针草药材的生药学鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 329-330.
- [9] 杨小唯, 黄敏珠, 赵卫权, 等. 中药鬼针草化学成分的研究 [J]. 解放军药学学报, 2009, 25(4): 283-286.
- [10] 黎平, 王业玲, 唐丽, 等. 三叶鬼针草的黄酮苷类成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(18): 2498-2501.
- [11] 何报作, 曾静, 韦邵, 等. 鬼针草与易淆品白花鬼针草的叶形态——脉序图谱鉴别特征 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2559-2563.
- [12] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [13] 刘美子, 宋经元, 罗焜, 等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [14] 夏至, 张红瑞, 李贺敏, 等. 碎米槎及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2904-2909.
- [15] 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: e8613.
- [16] 李妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [17] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [18] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [19] Shi Z, Chen Y L, Chen Y S. *Flora of China* Vol. 20-21 [M]. Beijing: Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 2011.
- [20] Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional inter locus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280-284.
- [21] Xia Z, Wang Y Z, Smith J F. Familial placement and relationships of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae sensu lato) inferred from five different gene regions [J]. *Am J Bot*, 2009, 96(2): 519-530.
- [22] 郝建华, 刘倩倩, 强胜. 菊科入侵植物三叶鬼针草的繁殖特征及其与入侵性的关系 [J]. 植物学报, 2009, 44(6): 656-665.
- [23] Ganders F R, Berbee M, Pirseyedi M. ITS Base sequence phylogeny in *Bidens* (Asteraceae): Evidence for the continental relatives of hawaiian and marquesan [J]. *Bidens Syst Bot*, 2000, 25(1): 122-133.
- [24] Tsai L C, Wang J C, Hsieh H M. *Bidens* identification using the noncoding regions of chloroplast genome and nuclear ribosomal DNA [J]. *Forensic Sci Int: Genet*, 2008(2): 35-40.