

基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定

邵婧, 谷巍*, 巢建国, 耿超, 孙红梅, 李孟洋

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 应用 ITS2 条形码鉴定茅苍术 *Atractylodes lancea* 及其近缘种药材。方法 提取不同产地 29 份茅苍术、北苍术 *A. chinensis* 及白术 *A. macrocephala* 基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 ITS2 序列并进行双向测序, 测序结果提交至 GenBank; 从 GenBank 下载茅苍术及其近缘种 10 种 45 条 ITS2 序列; 对提交与下载的 73 条序列, 应用 MEGA 5.1 软件进行序列比对, 计算种内和种间距离, 采用相似性搜索法、最近距离法进行鉴定分析, 并构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树直观反映鉴定结果。结果 茅苍术药材 ITS2 序列长度均为 229 bp, 是 1 个单倍型; 与菊科近缘种苍术属药材距离较近, 与菊科其他属近缘种之间遗传距离较远, NJ 树结果显示茅苍术及其近缘种药材均可明显区分, 表现出良好的单系性, 依据 ITS2 二级结构, 也可以直观地将茅苍术与菊科近缘种药材区分。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别茅苍术药材, 为保障临床安全用药提供了新的技术手段。

关键词: 茅苍术; 北苍术; 白术; 近缘种; ITS2; 物种鉴定

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)08-1209-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.021

Molecular identification of *Atractylodes lancea* and its closely related species based on ITS2 sequence

SHAO Jing, GU Wei, CHAO Jian-guo, GENG Chao, SUN Hong-mei, LI Meng-yang

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective The aim of present study was to identify *Atractylodes lancea* and its closely related species (*Atractylodes chinensis* and *Atractylodes macrocephala*) using the ITS2 barcode. **Methods** The total genomic DNAs were extracted from twenty-nine samples of *A. lancea* and its closely related species from different habitats. The ITS2 sequences of these samples were amplified and bidirectional sequenced by PCR. The obtained sequences were submitted to the GenBank and the ITS2 sequences of 45 samples belonging to ten species were downloaded from the GenBank. Total 73 ITS2 sequences were aligned and the genetic distances were analyzed using the MEGA 5.1. Identification analyses were performed using the BLAST1 and the nearest distance methods, and were presented intuitively by constructing Neighbor-joining (NJ) tree. **Results** The lengths of all ITS2 sequences of *A. lancea* were 229 bp presented as one haplotype pattern. There was significant divergence between the interspecific and intraspecific genetic distances of the ITS2 sequences. The NJ tree showed that *A. lancea* could differed obviously from its closely related species, which showed high monophyly. The secondary structures of ITS2 in the helical regions displayed clear differences in stem loop number, size, position, and screw angle among the medicinal plants of Compositae. **Conclusion** As a DNA barcode, ITS2 sequences can stably and accurately distinguish *A. lancea* from its closely related species and also provide a new technique to ensure the clinical safety in utilization of Chinese materia medica.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.; *Atractylodes macrocephala* Koidz.; closely related species; ITS2; species identification

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本植物, 其根茎具有燥湿健脾、祛风明目等功效, 主要产于江苏、湖北、河南等地, 其中江苏句容是茅苍术的道地产区^[1]。研究表明, 茅苍

术中主要含挥发油, 挥发油中主要有效成分包括苍术酮、苍术素、茅术醇和 β -桉叶醇等^[2]。近年来, 由于过度采挖以及茅苍术本身野外繁殖能力低, 使得茅苍术资源日益稀缺, 甚至面临濒危。《中国药典》

收稿日期: 2014-10-09

基金项目: “六大人才高峰”高层次人才项目 (2012-YY-009); 江苏省中药优势学科 II 期建设 (ysxk-2014); 江苏省“青蓝工程”资助 (2012); 江苏省第四期“333 高层次人才培养工程”资助

作者简介: 邵婧 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为分子药理学、药用植物生理生态学。Tel: 18168037616 E-mail: sj198992@aliyun.com

*通信作者 谷巍, 女, 教授, 博士生导师。Tel: 13951879869 E-mail: guwei9926@126.com

2010 年版收载北苍术与茅苍术作为苍术药材来源, 而研究表明茅苍术与北苍术的药效成分挥发油量差异较大, 不同品种对苍术的内在质量及药效学有明显影响^[3]。白术药材与苍术药材形态特征相似, 难以从药材外观上进行快速准确地鉴定, 容易造成混用, 白术偏重于补气健脾, 宜于脾虚湿阻者; 苍术苦温燥湿力强, 宜于寒湿阻滞中焦而脾虚不明显者, 混用则影响疗效。因此正确鉴别茅苍术, 对保障茅苍术药材质量以及安全用药具有重要意义。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术是指用短的、标准的 DNA 片段作为物种标记而建立的一种新的生物鉴定方法。随着分子生物学以及生物信息学的快速发展, 应用 DNA 条形码技术对物种进行鉴定已逐渐成为中药分类学的研究热点^[4-5]。ITS2 的鉴定能力在药用植物多个科属基

原植物及药材的鉴定中得到了验证^[6-13]。然而 ITS2 对菊科药用植物的鉴定能力相关研究较少, 本实验采用 ITS2 序列对茅苍术及其近缘种进行分子鉴定, 为茅苍术的快速准确鉴定及其开发利用提供科学依据。

1 材料

从茅苍术主要分布区江苏、河南、湖北等地采集了茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 样品 18 份、北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 样品 5 份及白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 样品 6 份, 均经南京中医药大学药学院谷巍教授鉴定, 凭证样本和数字影像信息保存于南京中医药大学药学院标本馆, 实验材料信息及 GenBank 登录号见表 1。同时在 GenBank 数据库下载茅苍术及其菊科近缘种 10 种 45 条 ITS2 序列, 信息见表 2。

表 1 材料产地及其 ITS2 序列信息

Table 1 Habitats of samples used in present study and its ITS2 sequences

编号	植物学名	单倍型	序列长度/bp	GC/%	K2P 遗传距离	GenBank 登录号	产地
1	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222802	河南信阳
2	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222803	安徽大别山
3	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222804	河南信阳
4	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222805	河南信阳
5	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222806	江苏句容茅山
6	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222807	江苏句容茅山
7	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222808	安徽大别山
8	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KC573818	江苏句容茅山
9	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222809	湖北宜昌
10	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222810	湖北英山
11	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222811	河南信阳
12	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222812	南京仙林
13	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222813	河南信阳
14	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222814	江苏句容茅山
15	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222815	湖北宜昌
16	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222816	南京灵山
17	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222817	湖北英山
18	茅苍术	A1	229	69.0	0.000 0	KM222818	安徽大别山
19	北苍术	B1	229	67.7	0.031 3	KM222801	内蒙古赤峰
20	北苍术	B2	229	69.0	0.017 7	KM222797	内蒙古赤峰
21	北苍术	B2	229	69.0	0.017 7	KM222798	内蒙古赤峰
22	北苍术	B3	229	68.5	0.022 2	KM222799	内蒙古赤峰
23	北苍术	B3	229	68.5	0.022 2	KM222800	内蒙古赤峰
24	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222791	南京仙林
25	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222792	南京仙林
26	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222793	南京仙林
27	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222794	南京仙林
28	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222795	南京仙林
29	白术	C1	229	69.4	0.026 7	KM222796	南京仙林

表中所列 K2P 遗传距离是指每一个物种与茅苍术 *A. lancea* (KM222802) 之间的 K2P 遗传距离

The K2P genetic distance in the table refers to K2P genetic distance between each species and *A. lancea* (KM222802)

表 2 GenBank 下载菊科植物 ITS2 序列

Table 2 ITS2 sequences of species in family Compositae downloaded from GenBank

植物学名	GenBank 登录号	单倍型	植物学名	GenBank 登录号	单倍型
白术	AY925 164.1	C2	牛蒡	FJ440 321.1	D2
白术	AY548 206.1	C3	牛蒡	FJ440 324.1	D2
牛蒡 <i>Arctium lappa</i>	FJ440 325.1	D1	牛蒡	FJ440 301.1	D3
牛蒡	FJ440 323.1	D1	牛蒡	FJ440 309.1	D4
牛蒡	FJ440 303.1	D1	牛蒡	FJ440 311.1	D5
牛蒡	FJ440 302.1	D1	牛蒡	FJ440 320.1	D5
牛蒡	FJ440 319.1	D1	茵陈蒿 <i>Artemisia capillaris</i>	GQ434 538.1	E1
牛蒡	FJ440 318.1	D1	茵陈蒿	JQ173 381.1	E2
牛蒡	FJ440 317.1	D1	紫菀 <i>Aster tataricus</i>	FJ539 125.1	F1
牛蒡	FJ440 316.1	D1	紫菀	GQ434 543.1	F2
牛蒡	FJ440 315.1	D1	紫菀	GQ434 542.1	F3
牛蒡	FJ440 314.1	D1	紫菀	HQ154 045.1	F4
牛蒡	FJ440 313.1	D1	关苍术 <i>Atractylodes japonica</i>	AF319 107.1	G1
牛蒡	FJ440 312.1	D1	佩兰 <i>Eupatorium fortunei</i>	GQ434 513.1	H1
牛蒡	FJ440 310.1	D1	佩兰	KF112 834.1	H1
牛蒡	FJ440 308.1	D1	佩兰	KF112 833.1	H1
牛蒡	FJ440 307.1	D1	佩兰	KF112 832.1	H2
牛蒡	FJ440 306.1	D1	佩兰	KF112 831.1	H3
牛蒡	FJ440 305.1	D1	佩兰	KF112 830.1	H3
牛蒡	FJ440 304.1	D1	佩兰	KF112 829.1	H3
牛蒡	FJ440 300.1	D2	旋覆花 <i>Inula japonica</i>	JF421 506.1	I1
牛蒡	FJ440 322.1	D2	蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i>	AY548 210.1	J1

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序

使用 70%乙醇擦洗药材表面,取茅苍术及其近缘种药材约 0.01 g,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物有限公司)提取总 DNA。正向引物 ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3',反向引物 ITS3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积 50.0 μ L,体系包含 $MgCl_2$ 4.0 μ L (25 mmol/L),dNTP 4.0 μ L (2.5 mmol/L),PCR 缓冲液 5.0 μ L (10 $\times$),引物各 2.0 μ L (2.5 μ mol/L)(捷瑞有限公司),exTaq 酶 1.25 U,总 DNA 5.0 μ L (约 50 ng)。扩增程序:94 $^{\circ}C$ 变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,54 $^{\circ}C$ 退火 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 45 s(进行 40 个循环);72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

2.2 数据处理

测序后所得峰图采用 Codon Code Aligner V2.06(Codon Code Co., USA)校对拼接,去除低

质量序列及引物区;使用基于隐马尔可夫模型的 HMM 注释方法,去除拼接得到的一致序列的两端 5.8 S 和 28 S 区段^[14],获得标准 ITS2 间隔区序列。使用 MEGA 5.1 计算种内序列变异和种间序列变异,利用 Wilcoxon 双样本进行统计检验,采用相似性搜索法(BLAST1)和最小距离法(Nearest Distance)考察 ITS2 序列的鉴定成功率,构建 Neighbor-joining (NJ) 树评估各物种之间的亲缘性。根据 Koetschan 等^[14]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。

3 结果

3.1 茅苍术及其近缘种药材 PCR 扩增效率及测序成功率

对茅苍术及其近缘种药材样品的 ITS2 序列分析发现,所有实验样本的 PCR 扩增及测序成功率均为 100%,序列获得率(有效序列比例)亦为 100%,经琼脂糖凝胶电泳得到 PCR 扩增电泳图(图 1),扩增效果较好,条带较亮,没有拖尾现象,ITS2 序列在 500 bp 左右。

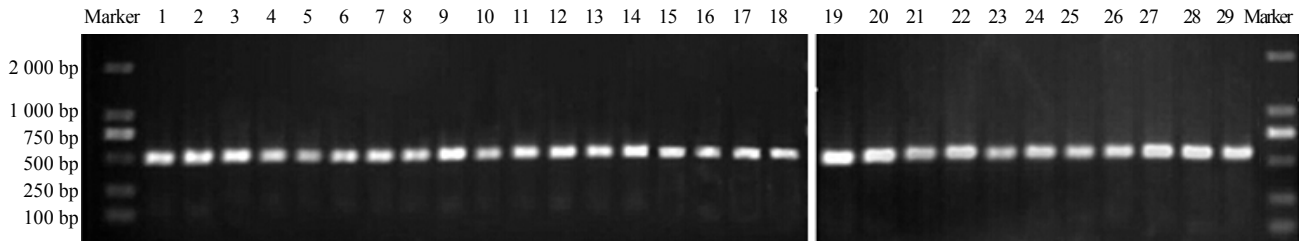


图 1 样本的 ITS2 序列凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ITS2 sequences of samples

3.2 茅苍术及其近缘种药材 ITS2 序列差异研究

实验样品 ITS2 序列长度为 229 bp, ITS2 序列 GC 量为 67.7%~69.4%, 平均 GC 量为 69.00%。本实验用茅苍术及其近缘种药材 ITS2 序列之间有 10 个变异位点, 茅苍术种内 K2P 距离为 0.000 0, 种间 K2P 距离为 0.017 7~0.031 3, 平均 K2P 距离为 0.024 7, 利用 Wilcoxon 2 个样本间的统计检验, 得到 $Z=-5.131$, $P<0.001$, 说明茅苍术种间 K2P 距离与种内 K2P 距离有显著差别。实验样品各物种 ITS2 序列长度、GC 量及物种 K2P 距离见表 1。

将实验数据和 GenBank 数据库内所有菊科药用植物数据结合, 在更大样本量下考察茅苍术及其

近缘种的变异情况, 结果表明, 茅苍术及其近缘种的种间变异与种内变异差异明显, ITS2 可以将其区分开。另外, 结合网上数据, 茅苍术种内 K2P 距离仍为 0, 为一个单倍型。

3.3 苍术药材及其菊科近缘种变异分析

3.3.1 苍术药材不同来源样品种间变异分析 苍术药材不同来源样品 23 个, 18 个样本序列与 KM222802 相同, 序列类型 A1; 2 个样本序列与 KM222797 相同, 序列类型 B2; 2 个样本序列与 KM222800 相同, 序列类型 B3; 1 个样本序列与 KM222801 相同序列类型 B1, 共 7 个位点存在变异, 见表 3。

表 3 苍术药材不同基源 ITS2 序列种间变异分析

Table 3 Interspecific variable sites in ITS2 sequences of *Atractylodis Rhizoma*

GenBank 登录号	单倍型	变异位置						
		18 bp	29 bp	48 bp	82 bp	125 bp	212 bp	219 bp
KM222802	A1	A	C	G	T	A	G	C
KM222801	B1	T	T	A	C	T	A	T
KM222797	B2	T	C	G	C	T	A	C
KM222800	B3	T	C	A	C	T	A	C

3.3.2 苍术菊科近缘种药用植物种内变异分析 对菊科药用植物种内不同居群之间进行种内变异统计分析, 变异位点及单倍型统计见表 4。北苍术种内有 3 个单倍型, 3 个变异位点; 牛蒡种内有 5 个单倍型, 5 个变异位点; 茵陈蒿种内有 2 个单倍型, 1 个变异位点; 紫菀种内有 4 个单倍型, 3 个变异位点; 佩兰种内有 3 个单倍型, 2 个变异位点。

3.4 茅苍术及其近缘种药材 ITS2 序列鉴定分析

采用相似性搜索法 (BLAST1) 和最近距离法 (nearest distance) 对茅苍术药材及其近缘种进行鉴定研究, 2 种方法分析结果均表明 ITS2 序列可以准确地将茅苍术药材与其他物种区分开。为了更直观地反映鉴定结果, 本研究基于

ITS2 序列构建了 NJ 系统聚类树, 见图 2。可以看出茅苍术药材表现出单系性, 单独一枝, 与菊科近缘种苍术属药材距离较近, 与菊科其他物种明显区分开。

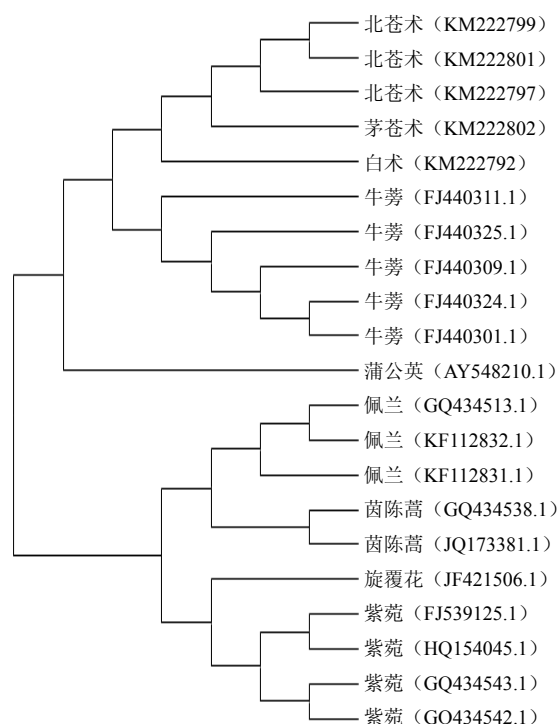
3.5 茅苍术及其主要易混品 ITS2 序列二级结构

根据 Koetschan 等^[14]建立的 ITS2 数据库及其网站预测茅苍术及其菊科近缘种的 ITS2 二级结构 (图 3), 可以看出, 所有物种的二级结构均为一个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区 (Helix) 构成, 每个螺旋上又有大大小小、或多或少的茎环 (Loop) 结构。通过比较茅苍术及其近缘种的 ITS2 二级结构发现, 各物种在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异, 因此, 依据 ITS2 二级结构, 可以直观地将茅苍术与菊科近缘种药用植物区分。

表 4 苍术药材菊科近缘种药用植物种内变异分析

Table 4 Intraspecific variable sites in ITS2 sequences of sibling species of medicinal plants in compositae

植物学名	GenBank 登录号	单倍型	位点/bp	碱基
北苍术	KM222801	B1	29, 48, 219	T, A, T
北苍术	KM222797	B2	29, 48, 219	C, G, C
北苍术	KM222800	B3	29, 48, 219	C, A, C
牛蒡	FJ440 325.1	D1	59, 152, 160, 195, 215	A, A, G, T, T
牛蒡	FJ440 322.1	D2	59, 152, 160, 195, 215	A, A, A, T, C
牛蒡	FJ440 301.1	D3	59, 152, 160, 195, 215	A, A, G, C, T
牛蒡	FJ440 309.1	D4	59, 152, 160, 195, 215	G, G, G, T, T
牛蒡	FJ440 311.1	D5	59, 152, 160, 195, 215	A, A, A, T, T
茵陈蒿	GQ434 538.1	E1	207	T
茵陈蒿	JQ173 381.1	E2	207	C
紫菀	FJ539 125.1	F1	86, 177, 200	G, C, A
紫菀	GQ434 543.1	F2	86, 177, 200	G, C, R
紫菀	GQ434 542.1	F3	86, 177, 200	G, C, G
紫菀	HQ154 045.1	F4	86, 177, 200	A, A, A
佩兰	KF112 833.1	H1	177, 187	T, T
佩兰	KF112 832.1	H2	177, 187	C, T
佩兰	KF112 829.1	H3	177, 187	T, A



bootstrap 1 000 次重复

Percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in 1 000 bootstraps are shown next to the branches

图 2 基于 ITS2 序列构建的茅苍术及其近缘种 NJ 树

Fig. 2 NJ tree based on ITS2 sequences from *A. lancea* and its closely related species

4 讨论

DNA 条形码鉴定技术的准确性和稳定性是研究者非常关注的问题。所谓稳定性是指不同产地、不同批次的样品均能够稳定获得 DNA 条形码序列^[15]。本实验分析茅苍术及其近缘种药材样品的 ITS2 序列, 结果显示所有实验样本的 PCR 扩增、测序成功率及序列获得率均为 100%, 说明 ITS2 在茅苍术的鉴定中是有效的 DNA 区段, ITS2 序列引物及其反应条件针对茅苍术药材稳定性较好。现有研究表明 ITS2 在物种水平的鉴定效率高达 92.7%, Chen 等^[6]建议将 ITS2 作为药用植物通用 DNA 条形码, ITS2 对菊科药用植物的鉴定能力在本研究中得到了进一步验证。本研究涵盖了江苏、湖北、河南等全国 4 个主要产区的茅苍术, 研究发现双亲遗传的核基因 ITS2 序列变异与植物的地理分布相关, 而不同产地的茅苍术并不表现出种内分化的地域性, 种内较稳定, 表明茅苍术具有较高的遗传稳定性。无论从茅苍术及其近缘种药材种内、种间遗传距离, 还是基于 ITS2 条形码序列构建的 NJ 树, 均证实 ITS2 条形码序列能够准确鉴别茅苍术及其菊科近缘种药材, 保证了苍术临床选择用药的准确安全。

DNA 条形码技术不受物种发育阶段(叶片、种子、花、果实等)和药材形态(原药材或粉末)的

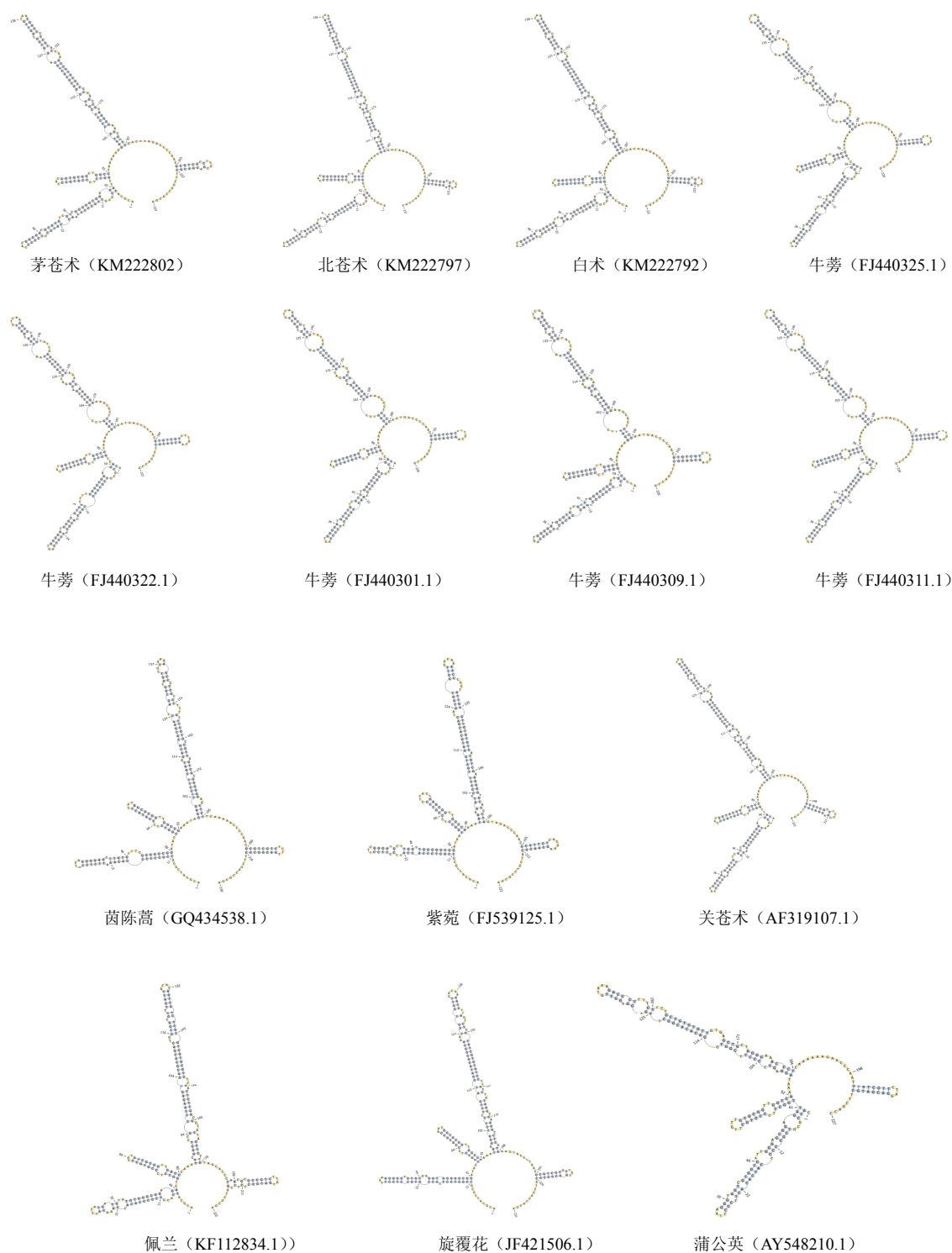


图 3 茅苍术及其近缘种药用植物 ITS2 序列的二级结构

Fig. 3 Secondary structures of ITS2 sequences in *A. lancea* and its closely related species

限制, 具有较强的通用性。这项技术可以直接从基因水平提供鉴定依据, 将有助于非分类学专业工作者对中药材进行快速、准确地鉴定, 是传统鉴定方

法的补充和拓展, 具较好的推广和应用价值。

参考文献

- [1] 李琳, 谷巍, 申修源, 等. 野生和栽培茅苍术

- RAPD 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(5): 468-469.
- [2] 张 霁, 刘大会, 郭兰萍, 等. 不同温度下丛枝菌根对苍术根茎生物量和挥发油的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 372-375.
- [3] 曾 志, 叶雪宁, 庞世敏, 等. 北苍术和茅苍术挥发油成分的比较 [J]. 应用化学, 2012, 29(4): 470-476.
- [4] Gu W, Song J, Cao Y, *et al.* Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.
- [5] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, *et al.* Plant DNA barcoding in China [J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 165-168.
- [6] 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.
- [7] 陈贝贝, 宋经元, 姚 辉, 等. 基于ITS2条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2150-2153.
- [8] Yao H, Song J Y, Liu C, *et al.* Use of ITS2 Region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13102.
- [9] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [10] 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(4): 3421-3426.
- [11] 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]. 药学学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [12] 李 栎, 肖 憬, 苏振宇, 等. ITS2条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1814-1818.
- [13] 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.
- [14] Koetschan C, Hackl T, Muller T, *et al.* ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63(3): 585-588.
- [15] 辛天怡, 姚 辉, 罗 焜, 等. 羌活药材ITS/ITS2条形码鉴定及其稳定性与准确性研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(8): 1098-1103.