

武当山区重楼属植物基于 ITS2 的种内鉴别研究

叶 方^{1,3}, 柳施一², 胡 培³, 杨光义^{1,3*}, 刘义梅², 李 丽³, 程 镇³

1. 湖北医药学院附属十堰市太和医院, 湖北 十堰 442000

2. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065

3. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000

摘要: **目的** 对武当山区重楼属植物进行种内分子鉴定研究, 以 DNA 条形码技术解决重楼因种内形态差异小而难以鉴别的问题, 规范重楼的正品来源, 确保本地药材的质量以及临床用药的有效性。 **方法** 对 ITS (internal transcribed spacers) 序列进行克隆测序, 以核基因 ITS2 片段作为 DNA 条形码, 对研究材料进行 PCR (polymerase chain reaction) 扩增并双向测序, 所得序列经 CodonCode Aligner 拼接后, 用软件 MEGA6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0) 进行相关数据分析, 并构建 NJ 邻接树 (neighbor-joining tree), 利用 Keller 等建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 的二级结构。 **结果** 经 BLAST 鉴定, 采集的武当山区重楼样本来源准确; 武当山区重楼属植物 ITS2 序列长度均为 232 bp, 与七叶一枝花的基因序列相比, 球药隔重楼有 16 个变异位点, 华重楼只有 1 个变异位点; 武当山区重楼的 ITS2 序列种内 K2P (Kimura-2-parameter) 距离为 0~0.073 6, 种内平均 K2P 距离为 0.027 2; 由所构建的系统聚类树可以看出, 本地区重楼主要分为七叶一枝花和球药隔重楼 2 大类, 华重楼为七叶一枝花的变种, 宽叶重楼、狭叶重楼与七叶一枝花为一支, 不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种; 比较 ITS2 二级结构发现, 武当山区重楼属植物螺旋区的茎环数目、大小、位置有明显差异。 **结论** DNA 条形码为重楼属药用植物鉴别开辟一条新途径, 不论是相似性搜索法、最近距离法还是 NJ 系统发育树等方法, 其分析结果均充分表明, ITS2 序列可将不同品种重楼药材很好地区分开; 七叶一枝花、狭叶重楼、宽叶重楼的 ITS2 基因 232 个碱基序列完全相同, MEGA 6.0 的分析结果也表明宽叶重楼、狭叶重楼与七叶一枝花属于一支, 不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种, 建议作为七叶一枝花的变型处理; ITS2 作为 DNA 条形码序列能够有效地区别重楼属植物, 在中药材的鉴定中具有重要的应用前景, 在实现规范化种植规程中可用于种质种源的正确鉴定。

关键词: 重楼属; DNA 条形码; ITS2; 宽叶重楼; 七叶一枝花; 狭叶重楼; 球药隔重楼

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)03-0550-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.021

Intraspecific discrimination of *Paris polyphylla* in Wudang Mountain area based on ITS2

YE Fang^{1,3}, LIU Shi-yi², HU Pei³, YANG Guang-yi^{1,3}, LIU Yi-mei², LI Li³, CHENG Zhen³

1. Department of Pharmacy, Taihe Hospital Affiliated with Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Abstract: Objective DNA barcoding technology, a molecular identification method, is applied to *Paris polyphylla* collected from Wudang Mountain area in order to solve the differential problem caused by small morphology difference, make authentic origins canonical, and guarantee the quality and clinical curative effect of this medical material in our area. **Methods** In this study, the second internal transcribed spacers (ITS2) of ribosomal DNA were amplified and sequenced. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed using the CodonCode Aligner. To perform a phylogenetic study, the genetic distances were computed using molecular evolutionary genetics analysis 6.0 (MEGA 6.0) in accordance with the Kimura-2-parameter (K2P) model. The phylogenetic

收稿日期: 2016-09-19

基金项目: 湖北省 2011 计划“武当山区重楼等特色中药资源调查及品质比较研究”; 2014 年湖北省中青年创新团队项目 (T201414, 武当山区道地中药材 GAP 关键技术研究); 湖北省药用植物综合利用工程技术研究中心项目 (GC2015204)

作者简介: 叶 方 (1971—), 男, 本科, 副教授。Tel: (0719)8801103 13986888020 E-mail: yxwen8801129@sina.com

***通信作者** 杨光义 (1975—), 男, 博士, 副教授, 副主任药师, 主要研究方向为中药资源开发和新药研究。

Tel: (0719)8801393 13971908298 E-mail: ygy996@163.com

tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) and Kimura-2-parameter methods. The ITS2 secondary structures were predicted using ITS2 database and website which was found by Keller. **Results** Identified by BLAST, *P. polyphylla* collected in Wudang mountain area was proved to be precise. The results showed that the ITS2 sequence length was 232 bp. It was indicated that their K2P distance were 0—0.073 6 and the average was 0.027 2. Compared with the gene sequence of *P. polyphylla*, there were 16 variation loci in *P. fargesii* and only one variation locus in *P. polyphylla* var. *chinensis*. As seen from the NJ tree, *P. polyphylla* in this area was mainly divided into two categories, *P. polyphylla* and *P. fargesii*. Obviously, *P. polyphylla* var. *chinensis* was a variation of *P. polyphylla*. Meanwhile, it was not tenable that *P. polyphylla* var. *stenophylla* and *P. polyphylla* var. *latifolia* were the variations of *P. polyphylla* because they belonged to a branch. To compare the ITS2 secondary structure of *P. polyphylla*, we noticed the differences in the amount, size, and position of loop of helix zone. **Conclusion** DNA barcoding technology opens up a new way for the identification of *P. polyphylla*. Regardless of what methods were used, such as similarity search, nearest distance, and NJ tree method, the analysis results have fully demonstrated that ITS2 sequences could be used to correctly identify the different varieties of *P. polyphylla*. It is identical in 232 base sequence of ITS2 to *P. polyphylla* var. *stenophylla*, *P. polyphylla* var. *latifolia*, and *P. polyphylla*. The results computed by Mega 6.0 also show that they belong to a branch. It is more appropriate to say *P. polyphylla* var. *stenophylla* and *P. polyphylla* var. *latifolia* are variants of *P. polyphylla*. Hence, as a DNA barcode sequence, ITS2 can be applied to intraspecific discrimination of *P. polyphylla*. Furthermore, the application of ITS2 in the identification of traditional Chinese medicine has an important prospect. And it can be used to correct identification of germplasm resources in GAP procedures.

Key words: *Paris* L.; DNA barcode; ITS2; *Paris polyphylla* Smith. var. *latifolia* Wang et Chang; *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara

重楼是百合科重楼属植物的统称，最早以蚤休之名始载于《神农本草经》，列为下品^[1]。重楼主要分布于欧洲和亚洲温带、亚热带地区，约有 10 个品种，我国分布有 7 种和 8 变种^[2]，《中国药典》2015 年版收载的正品重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[3]。重楼具有抗肿瘤、镇静镇痛、止咳平喘、免疫调节、止血等作用^[4-5]，是云南白药、季德胜蛇药的主要原料，需求量很大，除《中国药典》2015 年版收载的品种外，其余多数品种均在于市面上流通^[6-7]。为了更好地规范重楼的正品来源，确保本地药材的质量以及临床用药的有效性，有必要对重楼正品来源与本地混用品种进行种内鉴别研究。

几种分子方法已应用于识别药用植物^[8]。DNA 条形码技术通过比较 DNA 条形码，从已知物种的参考序列库中查询未知样本进行真核生物的识别和鉴定^[9-11]。该方法简便高效，不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制，适用于来源于生物体任何发育阶段部分组织或器官的中药材的真伪鉴别^[12]。最理想的 DNA 条形码区域是在一个小片段出现所有物种的一个主要分类，即相同物种的所有成员拥有不变的核苷酸序列，但有足够的变异物种之间的区别^[13]。朱英杰等^[14]对重楼属 11 个物种 17 份样品的 *psbA-trnH*、*rpoB*、*rpoC1*、*rbcL*、*matK* 和核 ITS2 序列进行 PCR 扩

增和测序，比较分析结果显示，ITS2 序列在所研究的重楼属药用植物中的扩增和测序效率均为 100%，对于 ITS2 序列扩大至 29 个物种 67 份样品依然具有 100% 的鉴定成功率，显示 ITS2 序列能够准确鉴定重楼属药用植物，可以作为潜在的重楼属药用植物通用条形码序列。本实验选择较易获得且方便处理的重楼属植物叶片作为实验对象，利用 ITS2 序列对采自武当山区重楼原植物进行 DNA 条形码鉴别研究，为该药材的准确鉴别提供分子证据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂

球磨仪（MM400，德国莱驰），冰箱（BCD-241WDBB，中国海尔），水浴锅（HHS-4S，上海虞龙），小型高速离心机（5424R，德国艾本德有限公司），PCR 仪（PTC-200，美国伯乐），电泳仪（JY1000C，北京君意）。无水乙醇、异丙醇、氯仿、 β -巯基乙醇等试剂均为分析纯。

1.2 药材

重楼样品采自武当山区和神农架林区，主要包括湖北省十堰市辖区内张湾区、茅箭区、郧阳区、竹山县、竹溪县、房县、郧西县、丹江口市、神农架林区，采集的植物叶片用吸水纸包好放入装有硅胶的自封袋中进行干燥保存，备用。材料均经湖北医药学院生药学教研室主任陈吉炎教授鉴定，鉴定结果见表 1。常见混伪品的信息均从 GenBank 中获得，见表 1。

表 1 重楼样品及常见混伪品信息

Table 1 Information of *P. polyphylla* and common adulterants

编号	采集号	缩写	采集地点	原植物鉴别结果	GenBank 号
1	20140826-02	BX2	鄱阳区鲍峡镇沧浪村	球药隔重楼 <i>P. fargesii</i>	KR152196
2	20140826-03	BX3	鄱阳区鲍峡镇沧浪村	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	KR152197
3	20140930-01	DJ	丹江口市官山镇杨叉村	七叶一枝花	KR152198
4	20140830-01	FX	房县野人谷镇东蒿坪村	球药隔重楼	KR152199
5	20140827-01	GC	茅箭区赛武当锅厂村	宽叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>latifolia</i>	KR152200
6	20140906-01	HS	鄱西县槐树林场仙姑洞村	宽叶重楼	KR152201
7	20141001-01	LW	茅箭区马家河龙王寨 (野生)	七叶一枝花	KR152202
8	20140921-01	MJ	茅箭区马家河龙王寨	宽叶重楼	KR152203
9	20140913-01	MT1	茅箭区茅塔乡坪子村	七叶一枝花	KR152204
10	20140913-02	MT2	茅箭区茅塔乡坪子村	七叶一枝花	KR152205
11	20140913-03	MT3	茅箭区茅塔乡坪子村	华重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	KR152206
12	20140828-01	TB	竹溪县天宝乡蒿坝村	华重楼	KR152207
13	20140829-01	TY	竹溪县桃源乡茂古坪村	球药隔重楼	KR152208
14	20140902-01	YX	鄱阳区叶家乡王良河村	狭叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	KR152209
15	混伪品	QS	安徽	拳参 <i>Polygonum bistorta officinalis</i>	EU591968
16	混伪品	YLC	四川	延龄草 <i>Trillium tschonoskii</i>	AY192541
17	混伪品	ZZBD	加拿大	蜘蛛抱蛋 <i>Aspidistra elatior</i>	AEU24023

2 方法

2.1 DNA 提取

取植物叶片约 30 mg, 置 2.0 mL 的 Ep 管中, 在球磨仪中充分研磨成粉末。加入 600 μ L 在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅里预热的 Buffer PCR 和 12 μ L 的 β -巯基乙醇, 于 65 $^{\circ}$ C 水浴 25 min, 间或混匀。水浴后加入 20 μ L 的 RNase A (10 mg/mL) 室温放置 2~5 min 后, 加入等体积的氯仿, 充分混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。吸取上层水相至 1.5 mL 离心管中, 加入等体积 Buffer BD, 颠倒混匀 3~5 次, 再加等体积的无水乙醇, 充分混匀后用移液器将其全部加入到吸附柱中, 室温静置 2 min, 10 000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中废液。将吸附柱放回收集管中, 依次加入 500 μ L PW Solution、500 μ L Wash Solution, 同法处理倒掉收集管中废液后, 再将吸附柱放回收集管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 打开吸附柱盖子于室温放置数分钟, 彻底晾干吸附材料中残留的 Wash Solution。将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 的离心管中, 在吸附膜中央加入 50 μ L TE Buffer, 静置 3 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 得到的 DNA 溶液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2.2 PCR 扩增及测序

采用核基因组的 rDNA-ITS 区的引物 2F 及 3R (引物序列为 2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3' 位于 5.8 S 上; 3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3' 位于 28 S 上) 进行序列扩增, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

扩增反应体系体积为 25 μ L, 包括 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 正反向引物各 1 μ L (2.5 μ mol/L), 模板 DNA 为 2 μ L, 加灭菌超纯水至 25 μ L。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取扩增产物 5 μ L 与 2 mL 稀释后的 SYBR Green I 染料混合后加入到 1.0% 琼脂糖凝胶的点样孔中, 电泳 1 h 后将凝胶置于紫外灯下观察, 将有明显条带的扩增产物置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中暂时保存, 送检。

PCR 产物送交上海生工生物工程股份有限公司测定, 分别以 2F、3R 引物为测序引物, 进行 DNA 序列的双向测定, 以保证测定序列的准确性。

2.3 数据处理

测序峰图利用 CodonCode Aligner 4.2.4 校对并

接, 去除引物区获得 ITS2 间隔区序列。将测定的基因序列提交到 GenBank 数据库, 在数据库中的登录号为 KR152196-KR152209。首先, 运用 NCBI Blast 工具完成物种鉴定。然后, 将所有序列用软件 MEGA6.0 进行多序列对比、变异位点分析并计算 K2P (Kimura-2-parameter) 遗传距离, 用邻接 (NJ) 法构建系统聚类树, 利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。最后, 在 ITS2 数据库中预测武当山区重楼 ITS2 的二级结构。

3 结果与分析

3.1 相似性搜索法鉴定结果

进入 DNA 条形码鉴定系统网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 对实验药材的 ITS2 序列使用 BLAST 方法进行鉴定和序列验证, 结果显示实验序列查询到所有序列均属于重楼属, 此鉴定

结果说明实验药材样本来源准确。

3.2 一级序列分析

采自武当山地区和神农架林区的重楼样本 ITS2 序列长度均为 232 bp, 14 个重楼属植物样品可以划分为 3 个组群: 样品 1、4、13 号碱基序列相同, 原植物鉴定为球药隔重楼; 2、3、5、6、7、8、9、10、14 号碱基序列相同, 其中 2、3、7、9、10 号鉴定为七叶一枝花, 5、6、8 号鉴定为宽叶重楼, 14 号鉴定为狭叶重楼; 11、12 号碱基序列相同, 相对于七叶一枝花的序列在 163 位点有 T-C 变异, 鉴别为七叶一枝花的变种华重楼。ITS2 基因序列的结果不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种, 建议作为七叶一枝花的变型处理。以药典正品重楼七叶一枝花的序列为标准, 各样品 ITS2 序列变异位点如表 2 所示。

表 2 各样品 ITS2 序列变异位点
Table 2 Variation locuses in ITS2 sequence of samples

[illegible]

位占

[illegible]

位占

[illegible]

续
位占

[illegible]

3.2.1 变异位点 以《中国药典》2015 年版正品重楼七叶一枝花的序列为标准,球药隔重楼有 16 个变异位点,显示球药隔重楼与七叶一枝花确为 2 个不同种;而华重楼只有在 163 位的 1 个变异位点,这一点与华重楼为七叶一枝花的变种相符。

3.2.2 遗传距离 对 ITS2 序列进行种内 K2P 距离分析可知,重楼的 ITS2 序列种内 K2P 距离为 0~0.073 6,种内平均 K2P 距离为 0.027 2。宽叶重楼、狭叶重楼与七叶一枝花的 K2P 为 0,又同为重楼属植物,确定为同一品种,印证了序列比较的结果。球药隔重楼与七叶一枝花的 K2P 为 0.073 6,遗传距离最远,与变异位点分析结果相符。球药隔重楼与华重楼的 K2P 为 0.068 7,遗传距离较七叶一枝花近。七叶一枝花与华重楼的 K2P 为 0.004 3,说明华重楼为七叶一枝花的变种这一结论成立。

3.2.3 聚类分析 对武当山区的 14 种重楼及其常见混伪品进行聚类分析,NJ 树见图 1。结果显示 14 种重楼聚为一支,拳参、延龄草和蜘蛛抱蛋单独聚为一支,说明采集样本来源准确,且本地区重楼主要分为七叶一枝花和球药隔重楼 2 大类,华重楼为

七叶一枝花的变种,宽叶重楼、狭叶重楼与七叶一枝花为一支,不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种,这与序列比较分析结果一致。

3.3 二级结构分析

在 ITS2 数据库 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>)^[15]输入测得序列预测武当山区重楼 ITS2 二级结构,见图 2。由图 2 可以看出,重楼属植物的二级结构均为一个中心环(主环)及 4 个螺旋区构成,每个螺旋上又有大大小小、或多或少

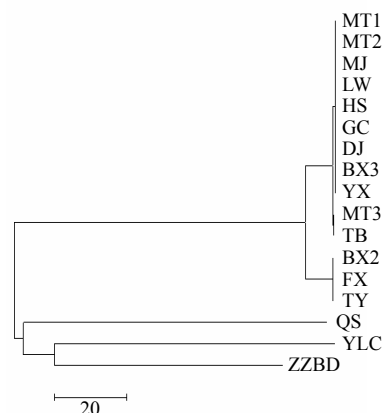


图 1 武当山区重楼属植物系统聚类树

Fig. 1 NJ tree of *P. polyphylla* in Wudang mountain area

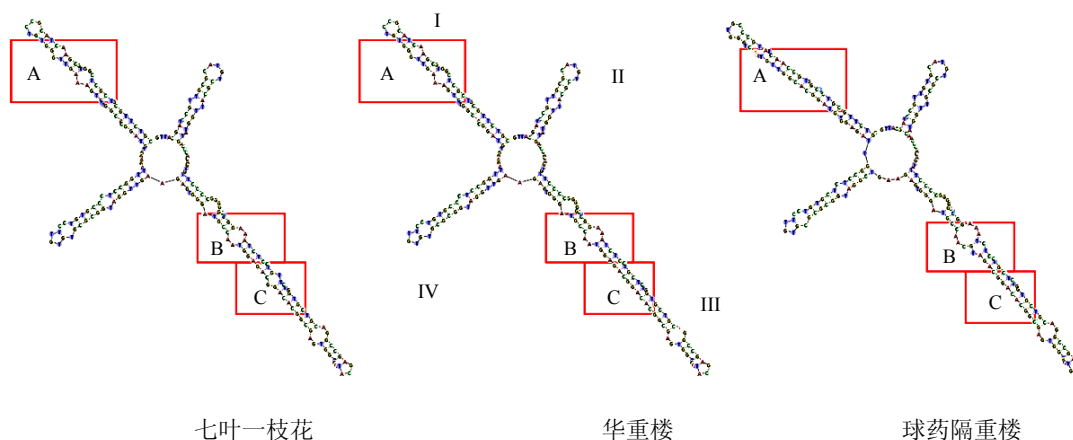


图 2 武当山区重楼 ITS2 二级结构预测

Fig. 2 Prognostic map of ITS2 secondary structure of *P. polyphylla* in Wudang Mountain area

的茎环结构。通过比较七叶一枝花与华重楼的 ITS2 二级结构发现,二者的差异较小,主要鉴别特征区为 III 的 C 区,七叶一枝花比华重楼多一个茎环;通过比较七叶一枝花与球药隔重楼的 ITS2 二级结构发现,二者的差异较大,I 的 A 区、II 的 B 区和 C 区均可有效鉴别这两种重楼,七叶一枝花的 A 区比球药隔重楼多 2 个茎环,C 区比球药隔重楼多 1 个茎环;B 区七叶一枝花为 1 个单独

的茎环,而球药隔重楼为一大一小相连的茎环。七叶一枝花与华重楼的二级结构只在 C 区有一个茎环的差别。因此,依据 ITS2 二级结构可以直观地将重楼属植物区分。

4 讨论

4.1 DNA 条形码为重楼属药用植物鉴别开辟一条新途径

传统重楼鉴别有原植物鉴别、显微鉴别和理化鉴

别。这些鉴别方法都依赖于鉴别人员的经验和操作技术,辨别药用植物的种属有很强的主观因素。然而,重楼属植物种内形态差异小,鉴别性状存在交叉或重叠^[16],难以准确鉴别。DNA 条形码这一新型的科学手段为重楼属药用植物鉴别开辟了一条新路径。不论是相似性搜索法、最近距离法还是 NJ 系统发育树等方法,其分析结果均充分表明,ITS2 序列可将不同品种重楼药材很好地区分开来。因此,基于 ITS2 序列建立的 DNA 条形码鉴定技术,可以为市场上重楼药材的混用现象提供有效的技术方法和解决途径,为保障中医临床用药安全以及用药准确性提供技术支持。

4.2 ITS2 作为 DNA 条形码序列能有效区别重楼属植物

重楼是经济价值较高、市场缺口较大的名贵中药^[17],由于重楼的生长环境要求严格,生长缓慢、自然生长周期长、繁殖系数低,长期大量采挖使野生资源日益减少^[18]。随着药材用量的不断增加,野生资源渐趋枯竭,重楼价格一路飙升至 2 000 元/kg。由于价格的刺激,难免有混伪品进入市场,为了更好地规范重楼的正品来源,确保本地药材的质量以及临床用药的有效性,本研究采集了武当山区各地的重楼,利用目前被广泛认可的 DNA 条形码 ITS2 序列片段,对重楼属植物进行种内鉴别,发现重楼的 ITS2 条形码序列长度均为 232 bp,重楼的 ITS2 序列种内 K2P 距离为 0~0.073 6,种内平均 K2P 距离为 0.027 2,在基于邻接法构建的系统聚类树中,重楼属植物能明显区分开,ITS2 二级结构又进一步显示了重楼属植物所具有的明显差异,因此,利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码,可以有效地鉴定重楼。

4.3 实验结果不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种

马剑等^[19]建议 matK 基因碱基差异为“0”的重楼作为变型处理较为恰当。从本研究结果看,七叶一枝花、狭叶重楼、宽叶重楼的 ITS2 基因 232 个碱基序列完全相同,MEGA 6.0 的分析结果也表明宽叶重楼、狭叶重楼与七叶一枝花属于一支,不支持宽叶重楼、狭叶重楼成为独立的变种,建议作为七叶一枝花的变型处理。对于这种基因型相同,表型却有差异的现象,可能是由于本地环境因素的影响造成营养器官的变异,这也恰恰说明了 DNA 条形码应用于药用植物鉴别的客观性和准确性,减少主观因素造成的影响,从而规范重楼的正品来源,确保本地重楼药材的质量以及临床用药的有效性。

参考文献

- [1] 清·黄奭辑. 神农本草经 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 15 卷) [M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 1978.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 陈吉炎, 涂汉军, 涂自良, 等. 中国武当中草药志 第一卷. [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2009.
- [5] 叶 方, 杨光义, 李志荣, 等. 重楼皂苷的提取工艺及质量控制研究概述 [J]. 中国药师, 2011, 14(8): 1207-1209.
- [6] 李 强, 丁春邦, 李 燕, 等. 四川重楼属药用植物种类及地理分布 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 629-631.
- [7] 李 青, 文飞燕, 尹鸿翔, 等. HPLC 测定黑籽重楼中的皂苷含量并评价其药材质量 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(4): 395-397.
- [8] Tehen N, Parveen I, Pan Z, et al. DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 103-110.
- [9] Shneer V S. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants [J]. *Genetika*, 2009, 45(11): 1436-1448.
- [10] 樊 杰, 白 妍, 束明月. 远志属 7 种药用植物 ITS1 和 ITS2 序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 562-565.
- [11] 刘义梅, 喻 珊, 罗 焜, 等. 旋覆花属 8 种药用植物 ITS2 序列分析 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 410-414.
- [12] Shneer V S. DNA barcoding of animal and plant species as an approach for their molecular identification and describing of diversity [J]. *Zh Obshch Biol*, 2009, 70(4): 296-315.
- [13] Shneer V S. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants [J]. *Genetika*, 2009, 45(11): 1436-1448.
- [14] 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(3): 376-382.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8 S-28 S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [16] 杨永红, 陆峻波, 王明辉, 等. 从文献分析看我国重楼研究进展 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 165-167.
- [17] 尹鸿翔, 张 浩. 濒危民族药重楼种植资源调查及质量评价研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2863-2865.
- [18] 施晓春, 李安华, 杨明维. 高黎贡山重楼属植物资源状况及保护利用初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2197-2199.
- [19] 马 剑, 李迪强, 张于光, 等. 基于 matK 基因的几种重要重楼属植物遗传关系分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 18-21.