

• 药材与资源 •

虾脊兰属 11 种药用植物 rDNA ITS 的克隆与序列分析

蒋 明¹, 吴棣飞², 鲍洪华³, 贺蔡明¹, 朱 欣¹, 吕 奕¹, 蒋晓颖¹

1. 台州学院生命科学院, 浙江 椒江 318000

2. 温州市公园管理处, 浙江 温州 325000

3. 台州市路桥区环境监测站, 浙江 路桥 318050

摘 要: 目的 通过比对 11 种虾脊兰属药用植物的 rDNA ITS 序列, 为该属植物的分子鉴定奠定基础。方法 以叶片基因组 DNA 为材料, 利用 PCR 法克隆虾脊兰属植物的 ITS 序列, 利用 Clustal、GenDoc 和 Mega 等软件进行生物信息学分析。结果 11 种虾脊兰属植物的 ITS 全长为 652~661 bp, 其中 ITS1 为 228~230 bp, ITS2 为 256~264 bp, 5.8 S 的长度则完全一致, 均为 167 bp; ITS1 和 ITS2 分别有 44 与 46 个变异位点, 其中信息位点数为 22 和 24 个, 而 5.8 S 中没有检测到变异位点和信息位点; 系统发育分析结果表明, 11 种虾脊兰属植物之间的遗传距离为 0.002~0.081, 在发育树上可分为 3 组, I~III 组的物种数量分别为 5、4 和 2。结论 11 种虾脊兰属植物的 ITS 序列具有丰富的信息位点, 可用于这些药用植物的分子鉴定。

关键词: 虾脊兰属; rDNA; ITS; 克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)14-3369-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.024

Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from 11 medical plants in *Calanthe*JIANG Ming¹, WU Di-fei², BAO Hong-hua³, HE Cai-ming¹, ZHU Xin¹, LV Yi¹, JIANG Xiao-ying¹

1. College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

2. Department of Park Management of Wenzhou, Wenzhou 325000, China

3. Luqiao Environmental Monitoring Station of Taizhou, Luqiao 318050, China

Abstract: **Objective** To provide evidences for molecular identification, sequence comparisons of 11 rDNA ITS in *Calanthe* plants were performed. **Methods** ITS sequences of *Calanthe* plants were isolated by using Polymerase Chain Reaction (PCR) method, and then analyzed by software namely Clustal, GenDoc, and Mega. **Results** The full ITS sequences of 11 *Calanthe* plants ranged from 652 to 661 bp; ITS1 and ITS2 sequences were 228—230 bp and 256—264 bp in length, respectively, while their 5.8 S sequences were identical with a length of 167 bp. The variable sites in both ITS1 and ITS2 were 44 and 46, respectively. Parsimony information sites of ITS1 and ITS2 were 22 and 24, however, there was no variable and information sites indentified in 5.8 S sequences. Genetic distance among 11 *Calanthe* species varied from 0.002 to 0.081, and they were divided into three groups in a phylogenetic tree with species numbers of 5, 4, and 2 in I—III groups, respectively. **Conclusion** The ITS sequences of 11 *Calanthe* plants were rich in information sites, which could be applied for molecular identification.

Key words: *Calanthe* R. Br.; rDNA; ITS; cloning; sequence analysis

虾脊兰属 *Calanthe* R. Br. 植物隶属兰科 (Orchidaceae), 为多年生地生草本, 全球约 150 种, 我国有 49 种和 5 变种, 主产于长江流域及以南地区^[1]。虾脊兰属植物形态多样、花色丰富、花型奇特, 具有很好的观赏价值, 有“兰中西施”的美誉^[2-3]。虾脊兰属植物具有较好的药用价值, 含麦角甙-7,22-

二烯-3-醇、 α -香树酯醇、 β -香树酯醇、豆甾-5,22(E)-二烯-3 β -醇、琉球虾脊兰苷和虾脊兰菲醇等成分^[4-5]。虾脊兰属植物以全草、根、假鳞茎或根茎入药, 具有清热解毒、润肺止咳、活血散结和止痛消肿等功效, 可用于瘰癧、淋巴结核、跌打损伤、腰肋疼痛、扁桃体炎、肌腱拉伤、脱肛和痔疮等的治疗^[6-7]。近

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 台州市 211 人才工程经费 (2012 年度)

作者简介: 蒋 明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为植物逆境生物学及其分子调控。

E-mail: jiangming1973@139.com

年来,有关虾脊兰属植物鉴定的研究较少,利用传统的形态、显微和理化等方法进行药用植物鉴定具有一定的局限性,对于干品、粉末或破碎药材则更难鉴别,而分子方法具有操作简便、稳定性佳和重复性好等优点,在中草药鉴别上有着广泛的应用前景^[8-9]。

目前常用的分子标记技术有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA(random amplification polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单重复序列区间(inter simple sequence repeat, ISSR)、相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)和核糖体 DNA 内转录间隔区(ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS)等,它们在药用植物鉴定中均有应用^[10-14]。rDNA-ITS 由于能提供丰富的变异位点和信息位点,在植物系统发育、分类和鉴定方面得到了广泛的应用^[15-16]。rDNA-ITS 在药用植物鉴定中的报道很多,如重楼属 *Paris* L.、堇菜属 *Viola* L.、远志属 *Polygala* L.、鼠尾草属 *Salvia* L. 和大戟属 *Euphorbia* L. 等^[17-21]。本研究以 11 种虾脊兰属植物为材料,在测定各自 rDNA-ITS 序列的基础上,利用分子生物学软件进行比对和系统发育树构建,为该属植物的分子鉴定奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自浙江、广东、四川和云南等省,均由笔者鉴定,分别为泽泻虾脊兰 *Calanthe alismaefolia* Lindl.、弧距虾脊兰 *C. caudatilabella* Rolfe、三棱虾脊兰 *C. tricarinata* Lindl.、虾脊兰 *C. discolor* Lindl.、三褶虾脊兰 *C. triplicata* (Willem.) Ames、反瓣虾脊兰 *C. reflexa* (Kuntze) Maxim.、钩距虾脊兰 *C. graciliflora* Hayata、长距虾脊兰 *C. sylvatica* (Thou.) Lindl.、银带虾脊兰 *C. argenteo-striata* C. Z. Tang et S. J. Cheng、镰萼虾脊兰 *C. puberula* Lindl. 和剑叶虾脊兰 *C. davidii* Franch. 植物的叶片(表 1),每种采集 5 个单株的叶片用于 DNA 提取,除虾脊兰、反瓣虾脊兰和钩距虾脊兰为新鲜叶片外,其余材料均为硅胶干燥叶片。

1.2 仪器

伯乐 C1000 型 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国);北京六一 DYY-12 型电泳仪和电泳槽(北京市六一仪器厂);伯乐 Gel Doc XR⁺凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国);生化培养箱(上海森信实验仪器有

表 1 虾脊兰属植物的来源

Table 1 Sources of *Calanthe* plants

编号	植物名称	采集地	海拔/m
1	泽泻虾脊兰	四川峨眉山	1 211
2	弧距虾脊兰	四川峨眉山	1 680
3	三棱虾脊兰	重庆金佛山	1 765
4	虾脊兰	浙江天目山	912
5	三褶虾脊兰	广东南岭	1 008
6	反瓣虾脊兰	浙江天目山	933
7	钩距虾脊兰	浙江九龙山	891
8	长距虾脊兰	广东南岭	1 264
9	银带虾脊兰	云南麻栗坡	823
10	镰萼虾脊兰	云南道人山	1 457
11	剑叶虾脊兰	重庆金佛山	776

限公司);恒温摇床(江苏盛蓝仪器制造有限公司);艾本德移液枪(Eppendorf 公司,德国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);贝克曼 Allegra 64R 高速冷冻离心机(Beckman Coulter, 美国)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

虾脊兰属植物 DNA 的提取采用试剂盒法,“新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒”购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(北京鼎国),操作根据说明书提供的实验步骤进行, DNA 按单株提取。DNA 经电泳检测,用无菌水稀释成 50 ng/μL 的浓度,置于-20 ℃冰箱中保存备用。

2.2 rDNA ITS 序列的克隆

以虾脊兰属植物叶片 DNA 为模板,采用通用引物进行 PCR 扩增,其中的上、下游引物分别为 5'-TATGCTTAAAYTCAGCGGGT-3'和 5'-AACAAG-GTTTCCGTAGGTGA-3',委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。在薄壁 PCR 管中分别加入 2 μL 10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L Mg²⁺)、0.50 μL 10 mmol/L dNTPs (Genview)、各 0.3 μL 20 μmol/L 的上、下游引物,30 ng DNA 和 0.35 μL 2 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶(北京鼎国),最后加无菌 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增在伯乐 C1000 型 PCR 仪上进行,扩增程序为 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 55.2 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 60 s, 循环次数设为 32。

2.3 PCR 产物的回收和连接

PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下割取含目的条带的胶块。采用 PCR/DNA 纯化

试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)回收 DNA 片段,操作根据其提供的说明书进行。用 pGEMX-T Easy 试剂盒(Promega)连接回收片段,4 ℃冰箱放置过夜后将产物转入 Trans5α 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司),经蓝白斑筛选和菌液 PCR 验证后,各取 3 份阳性菌液测序。

2.4 序列分析

序列比对采用 ClustalX 1.81 软件;系统发育树的构建用 MEGA 3.1 软件,建树方法为邻接法(neighbor joining, NJ),经 1 000 次自举检测;GC 值计算采用 Microsoft Excel 2007 完成。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列的克隆

利用通用引物,用 PCR 法克隆到了 11 种虾脊兰属药用植物的 ITS 序列。测序结果表明,每种植物 5 个单株的 ITS 长度和序列完全一致。11 种植物的 ITS 全长为 652~661 bp,剑叶虾脊兰的 ITS 最

长,长距虾脊兰次之,为 656 bp,三棱虾脊兰、虾脊兰和钩距虾脊兰的 ITS 最短(表 2)。11 种植物的 5.8 S 序列长度完全一致,均为 167 bp。泽泻虾脊兰、反瓣虾脊兰、镰萼虾脊兰和剑叶虾脊兰的 ITS1 最长,为 230 bp,弧距虾脊兰、三褶虾脊兰、长距虾脊兰和银带虾脊兰次之,均为 229 bp,其他 3 种植物的 ITS1 长度都为 228 bp。11 种虾脊兰属植物的 ITS2 长度范围为 256~264 bp,剑叶虾脊兰的 ITS2 最长,长距虾脊兰次之,为 260 bp,反瓣虾脊兰和镰萼虾脊兰的 ITS2 最短,均为 256 bp。

3.2 5.8 S、ITS1 和 ITS2 序列的比较分析

序列比对结果表明,11 种虾脊兰属植物的 5.8 S 序列完全一致,没有发现变异位点和信息位点;11 种植物 5.8 S 的 GC 值均为 55.7%,序列如图 1 所示。与 5.8 S 序列相比,ITS1 的变异十分丰富,存在较多的转换/颠换和插入/缺失现象,共有变异位点 44 个,其中信息位点 22 个。

表 2 虾脊兰属植物 ITS 序列的长度及 GC 含量

Table 2 Sequence length and GC contents of ITS from *Calanthe* plants

编号	植物名称	ITS 名称	ITS 全长/bp	5.8 S		ITS1		ITS2	
				长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%	长度/bp	GC/%
1	泽泻虾脊兰	CalITS	654	167	55.7	230	43.9	257	49.0
2	弧距虾脊兰	CcaITS	654	167	55.7	229	45.4	258	46.5
3	三棱虾脊兰	CtrlITS	652	167	55.7	228	45.6	257	49.0
4	虾脊兰	CdiITS	652	167	55.7	228	46.1	257	49.0
5	三褶虾脊兰	CtiITS	653	167	55.7	229	43.2	257	48.2
6	反瓣虾脊兰	CreITS	653	167	55.7	230	43.9	256	44.9
7	钩距虾脊兰	CgrITS	652	167	55.7	228	45.6	257	49.0
8	长距虾脊兰	CsyITS	656	167	55.7	229	44.5	260	48.8
9	银带虾脊兰	CarlITS	653	167	55.7	229	44.1	257	48.6
10	镰萼虾脊兰	CpuITS	653	167	55.7	230	47.4	256	44.9
11	剑叶虾脊兰	CdaITS	661	167	55.7	230	44.8	264	46.2

TAGATTAACATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGC
AGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTG
AACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA

图 1 虾脊兰属植物的 5.8 S 序列

Fig. 1 5.8 S sequence of *Calanthe* plants

三棱虾脊兰、虾脊兰和钩距虾脊兰的+9 与+175 存在 A↔C 转换现象,在+21 位存在 C↔T 转换现象,+18 和+19 位则出现 TA 缺失。泽泻虾脊兰的+55 位、反瓣虾脊兰、镰萼虾脊兰和剑叶虾脊兰的+140 位存在 A 碱基插入现象,另一个插入事件发生在+177 位,三棱虾脊兰、虾脊兰和钩距虾脊兰在该位点有 C 碱基

的插入。镰萼虾脊兰在+49 位存在颠换现象,其在该位点的碱基为 T,其他 10 种植物为 A。三棱虾脊兰、虾脊兰和钩距虾脊兰的+116 位存在颠换现象,它们在该位点的碱基为 A,而其他植物为 C。有 2 个位点的变异较为复杂,既有转换也有颠换现象,它们分别位于+157 和+186 处(图 2)。

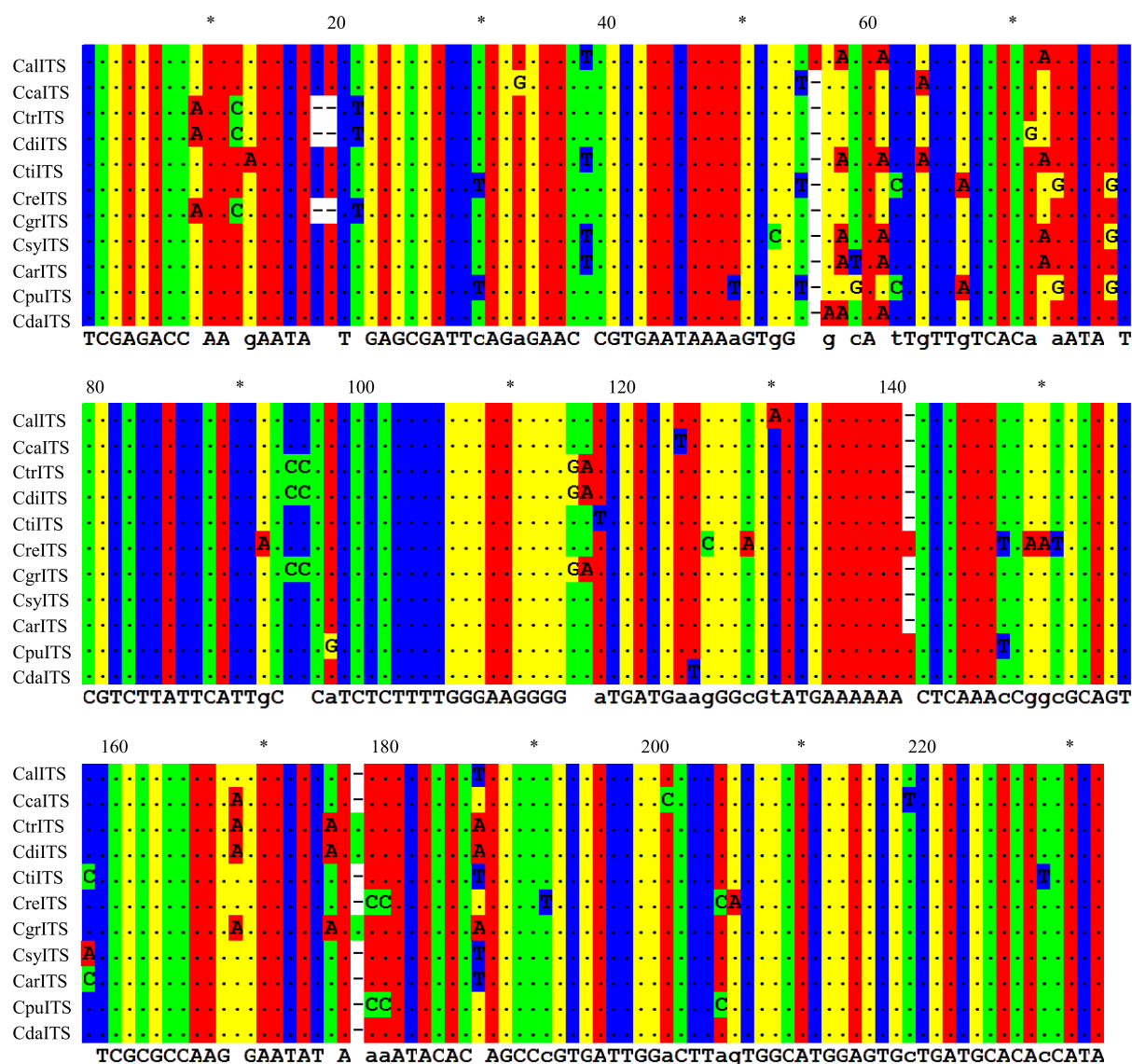


图 2 虾脊兰属 11 种药用植物的 ITS1 序列

Fig. 2 ITS1 sequences of 11 *Calanthe* plants

与 ITS1 类似, 11 种虾脊兰属植物的 ITS2 序列也存在丰富的变异, 涉及转换/颠换和插入/缺失现象。比对结果表明, 这些植物的 ITS2 上共有 46 个变异位点, 其中信息位点 24 个, 变异率较 ITS1 低。11 种植物的 ITS2 序列在+85、+127、+165、+166、+202~+205 和+234 位存在插入/缺失现象。C↔T 转换现象发生在+21、+75、+116、+128 和+131 位, 而 A↔G 转换发生在+4、+59、+146、+89、+110 和+160 等位点。颠换现象发生在+25、+68、+81、+82、+86、+95 和+107 等位点, 而+34 和+210 位的变异方式较为复杂, 既有转换又有颠换现象(图 3)。

3.3 系统发育分析

利用 Mega 软件计算遗传距离和构建系统发育

树, 结果表明, 11 种虾脊兰属植物的遗传距离为 0.002~0.081, 平均为 0.044。反瓣虾脊兰与弧距虾脊兰和三棱虾脊兰的遗传距离最小, 均为 0.002, 亲缘关系最近; 其次为三棱虾脊兰和弧距虾脊兰, 它们的遗传距离为 0.003; 三褶虾脊兰与三棱虾脊兰和弧距虾脊兰之间的遗传距离最大, 均为 0.081, 亲缘关系最远(表 3)。系统发育分析的结果表明, 11 种虾脊兰属植物在发育树上可分为 3 组, 三褶虾脊兰、银带虾脊兰、长距虾脊兰、泽泻虾脊兰和剑叶虾脊兰聚为一组(I), 反瓣虾脊兰和镰萼虾脊兰聚为一组(III), 其余 4 种聚于组 II(图 4)。

4 讨论

编码核糖体小亚基 rDNA 的 18S、5.8S、26S 将

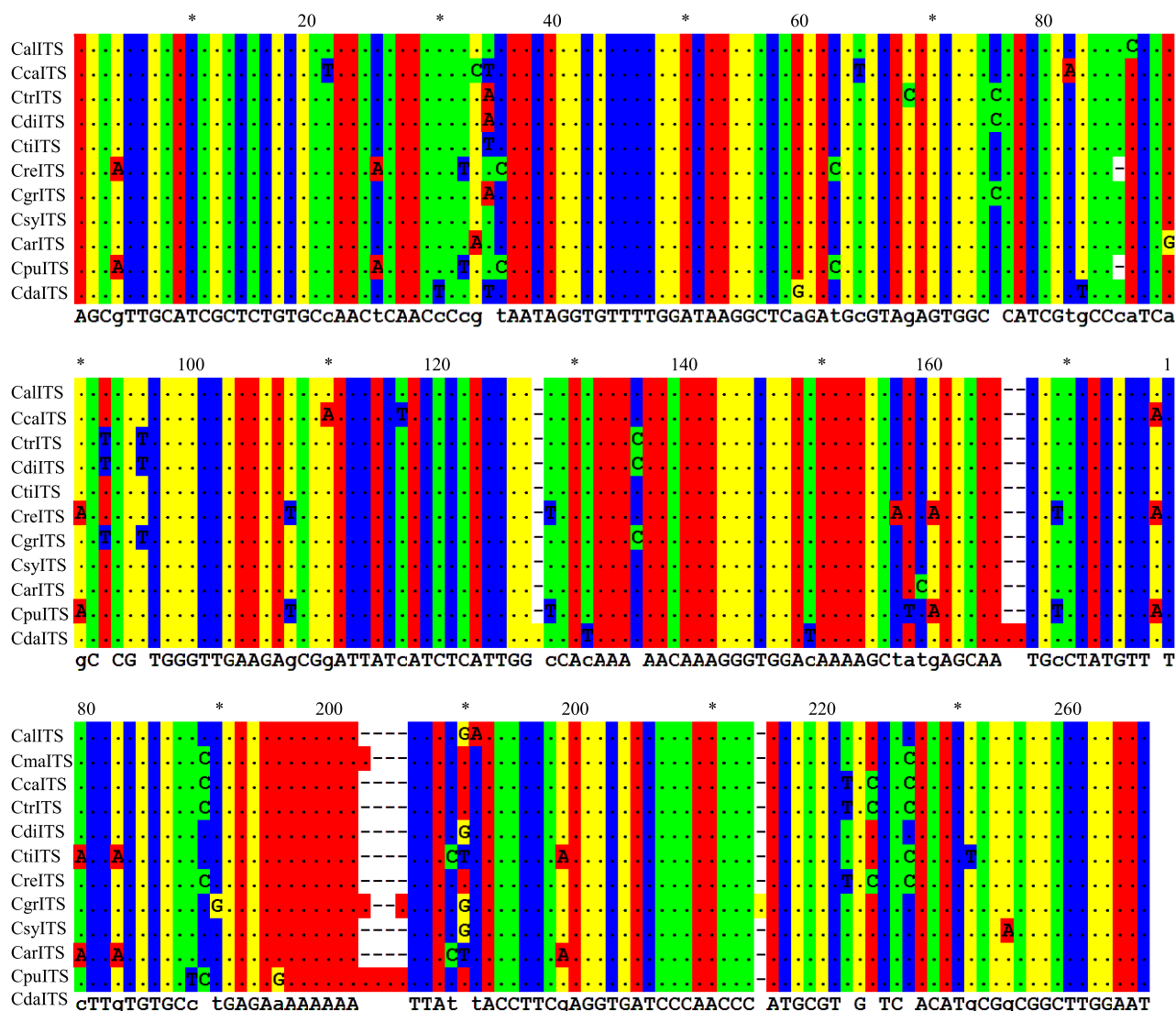


图 3 虾脊兰属 11 种药用植物的 ITS2 序列

Fig. 3 ITS2 sequences of 11 *Calanthe* plants

表 3 虾脊兰属 11 种药用植物的遗传距离

Table 3 Genetic distances of 11 *Calanthe* plants

ITS 名称	CalITS	CdaITS	CcaITS	CtrlITS	CdiITS	CtiITS	CreITS	CgrITS	CsyITS	CarITS	CpuITS
CalITS	—										
CdaITS	0.040	—									
CcaITS	0.040	0.045	—								
CtrlITS	0.040	0.045	0.003	—							
CdiITS	0.014	0.038	0.043	0.043	—						
CtiITS	0.067	0.072	0.081	0.081	0.072	—					
CreITS	0.038	0.043	0.002	0.002	0.042	0.079	—				
CgrITS	0.011	0.042	0.041	0.041	0.014	0.065	0.040	—			
CsyITS	0.014	0.043	0.045	0.045	0.016	0.072	0.043	0.014	—		
CarITS	0.057	0.065	0.074	0.074	0.062	0.022	0.072	0.055	0.060	—	
CpuITS	0.027	0.042	0.045	0.045	0.029	0.076	0.043	0.028	0.032	0.065	—

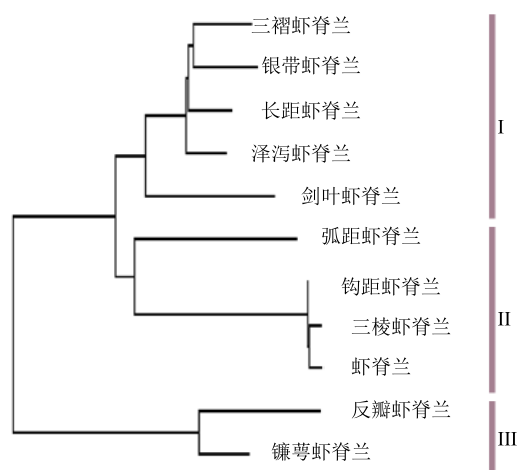


图 4 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on ITS sequences

ITS 序列分隔成 ITS1 与 ITS2, 18 S、5.8 S、26 S 的序列十分保守, 目前应用较少; 而间隔区 ITS1 和 ITS2 在进化过程中所受的压力较小, 变异位点和信息位点十分丰富, 可用于物种的分子鉴定、药材道地性鉴别和较低分类阶元的系统发育研究^[16]。叶方等^[17]以 ITS2 为 DNA 条形码, 对不同重楼属药材进行鉴别研究, 结果表明 ITS2 可将这些材料完全区分开。蒋明等^[18]通过克隆和分析 11 种堇菜属植物的 ITS 序列, 发现它们的信息位点十分丰富, 可用于分子鉴定。樊杰等^[19]利用 ITS 鉴定远志属植物, 共得到变异位点 232 个和信息位点 53 个, 可用于 7 种植物的鉴定。蒋继宏等^[21]对苏皖产大戟属药用植物的 ITS 序列进行了分析, 发现该分子标记可区分 6 种供试材料。谢晖等^[22]对 9 种柴胡属 *Bupleurum* L. 进行了鉴定, 认为 ITS 可应用于该属植物的分子鉴别。本研究中, 11 种虾脊兰属植物的 ITS 序列中共有变异位点 90 个, 其中信息位点 46 个, 这些位点可将它们完全区分开。

ITS1 和 ITS2 之间的 5.8 S 序列通常十分保守, 5.8 S 在进化中所受的压力较大, 因此序列长度和碱基组成的变化相对较小。李喜凤等^[23]克隆了蒲公英属 *Taraxacum* F. H. Wigg. 4 种植物 ITS 序列, 发现它们的 5.8 S 长度均为 162 bp, 没有变异位点。李艳萍等^[24]对分布于东北地区的 11 种丁香属 *Syringa* L. 植物进行系统发育分析, 发现 5.8 S 的长度完全一致, 序列上发生两次转换, 但无颠换现象。向红等^[25]对贵州境内蓼属 *Polygonum* L. 头状蓼组 6 种植物进行 rDNA-ITS 扩增, 结果表明, 它们的 5.8 S

序列长度均为 165 bp, 仅有 2 个变异位点。桑属 *Morus* L. 植物的 5.8 S 也存在一定的变异, 除蒙桑 *M. mongolica* 的 5.8 S 序列长度为 154 bp 外, 其余 12 种 (变种) 的长度均为 152 bp, 此外, 5.8 S 的碱基组成也存在一定差异, GC 值 42.1%~55.3% 不等^[26]。三白草科 (Saururaceae) 植物的 5.8 S 长度为 163~164 bp, 有变异位点 20 个, 其中 3 个为信息位点, 科内序列的变异度为 0~9.877%, 说明 5.8 S 对重构古老、孑遗类群的系统发育有一定意义^[27]。本研究中, 11 种虾脊兰属植物 5.8 S 序列的长度均为 167 bp, 未见变异位点和信息位点, 说明这些植物的 5.8 S 的十分保守。

与 5.8 S 相比, ITS1 和 ITS2 的长度和碱基组成变异较为丰富。据统计, 被子植物 ITS1 的长度为 187~298 bp, ITS2 的长度为 187~252 bp^[28]。大部分 ITS1 和 ITS2 的长度符合这一统计规律, 如药用野生稻复合体 5 个稻种的 ITS1 长度为 194~206 bp, ITS2 的长度为 214~231 bp^[29]; 蒲公英属植物 ITS1 的长度为 255~256 bp, ITS2 均为 224 bp^[23]; 丁香属植物的 ITS1 为 239~241 bp, 而 ITS2 为 222~223 bp^[24]; 石斛属 *Dendrobium* Sw. 植物的 226~235 bp 和 241~247 bp^[30]。但也有例外, 如桑属植物的 ITS1 长度为 181~197 bp, 其中的牛耳桑 ITS1 长度仅 181 bp^[26]; 虎耳草属 *Saxifraga* Tourn. ex L. 山羊臭组植物的 ITS1 序列长度为 247~316 bp, 而 ITS2 序列为 66~238 bp, 变异幅度较大^[31]。本研究中, 11 种虾脊兰属植物的 ITS1 序列长度为 228~230 bp, ITS2 为 256~264 bp, ITS2 的长度均大于 Baldwin 等^[28]的统计范围。

本研究以 11 种虾脊兰属植物为材料, 在克隆 ITS 全长序列的基础上, 对它们进行了比对分析, 结果表明 ITS1 和 ITS2 中的变异位点和信息位点丰富, 可用于这些植物的分子鉴定。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 18 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] 侯 鸣. 虾脊兰的观赏与栽培 [J]. 中国花卉园艺, 2008(10): 28-29.
- [3] 苏文君, 龙 波, 刘飞虎. 虾脊兰属植物研究现状 [J]. 北方园艺, 2012, 36(16): 190-193.
- [4] 苑鹏飞, 许启泰, 康文艺. 九子连环草的化学成分研究 [J]. 中成药, 2010, 32(11): 2017-2019.
- [5] Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, et al. Novel indole

- S,O*-bidesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(5): 886-888.
- [6] 李丹平, 陈雨洁, 万定荣, 等. 鄂西土家族常用兰科植物药 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2009, 28(1): 48-50.
- [7] 关 祿, 王春兰, 肖培根, 等. 地生型兰科药用植物化学成分及其药理作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(14): 1053-1061.
- [8] Moon B C, Kim W J, Ji Y, *et al.* Molecular identification of the traditional herbal medicines, *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae* Tuber, and common adulterants via universal DNA barcode sequences [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): 1-14.
- [9] Gutteridge A, Burns M. The application of DNA molecular approaches for the identification of herbal medicinal products [J]. *J Assoc Public Anal*, 2013, 41: 53-66.
- [10] Chen S, Pang X, Song J, *et al.* A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [11] Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, *et al.* DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 8-21.
- [12] Kool A, de Boer H J, Krüger A, *et al.* Molecular identification of commercialized medicinal plants in southern Morocco [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39459.
- [13] Tehen N, Parveen I, Pan Z, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25(2): 103-110.
- [14] Ismail N A, Rafii M Y, Mahmud T M, *et al.* Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies [J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(12): 1347-1358.
- [15] 牛宪立, 姬可平, 吴 群, 等. rDNA ITS 区序列分子标记技术在植物学研究中的应用 [J]. 生物信息学, 2009, 7(4): 268-271.
- [16] Patwardhan A, Ray S, Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2014, 2(2): 1-9.
- [17] 叶 方, 柳施一, 胡 培, 等. 武当山区重楼属植物基于 ITS2 的种内鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 550-558.
- [18] 蒋 明, 吴 丹, 李嵘嵘, 等. 堇菜属 11 种药用植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2454-2459.
- [19] 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.
- [20] 王 迎, 李大辉, 张英涛. 鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析 [J]. 药学学报, 2007, 42(12): 1309-1313.
- [21] 蒋继宏, 孟 娜, 曹小迎, 等. 苏皖产大戟属药用植物 rDNA 的 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 900-902.
- [22] 谢 晖, 晁 志, 霍克克, 等. 9 种柴胡属植物的核糖体 ITS 序列及其在药材鉴定中的应用 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1460-1463.
- [23] 李喜凤, 杜云锋, 张红梅, 等. 蒲公英属植物 rDNA ITS 序列测定及分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 714-715.
- [24] 李艳萍, 魏继承, 何 淼, 等. 基于 nrDNA ITS 序列东北地区丁香属植物的系统发育关系 [J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(8): 45-47.
- [25] 向 红, 孙爱群, 翁贵英, 等. 蓼属头状蓼组 rDNA-ITS 的序列扩增及分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 918-924.
- [26] 赵卫国, 潘一乐, 张志芳. 桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析 [J]. 蚕业科学, 2004, 30(1): 11-14.
- [27] 孟少武, 李德铎, 梁汉兴. 基于 5.8 S rDNA 序列论三白草科的系统发育 [J]. 云南植物研究, 2001, 23(3): 309-312.
- [28] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, *et al.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995, 82(2): 247-277.
- [29] 龚汉雨, 刘如亮, 董正伟, 等. 药用野生稻复合体 ITS1 和 ITS2 序列变异及其系统进化分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 442-447.
- [30] 金建峰, 朱思眉, 蒋 明, 等. 石斛属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析 [J]. 浙江农业学报, 2014, 26(3): 685-692.
- [31] 张得钧, 陈生云, 高庆波, 等. 虎耳草属山羊臭组的界定和系统发育: 核糖体 DNAITS 序列证据 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(5): 667-675.