

基于 ITS2 序列对藏药材植物的分子鉴定

郝豆豆¹, 张勇群^{1*}, 付苏宏¹, 施 静¹, 张鹏飞¹, 拉 多²

1. 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院, 四川 成都 610000

2. 西藏大学, 西藏 拉萨 850000

摘 要: 目的 选用 ITS2 序列作为条形码来鉴定 44 种藏药材植物。方法 用高盐低 pH 法提取藏药材植物的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增藏药材植物的 ITS2 序列, 共得到 ITS2 序列 145 条, 分属于 24 科, 39 属, 44 种。在 GenBank 数据库中通过序列比对选取了部分藏药材的同源序列。将 ITS2 序列在 Bioedit 软件中进行序列比对, 在 MEGA 软件中计算双参数 (K2P) 种内和种间遗传距离, 并基于邻接法构建系统进化树来分析物种的系统发育关系。结果 ITS2 区域有显著的种内、种间差异, 基于 ITS2 区域的系统进化分析与形态学结果一致, 并可以反映物种之间的亲缘关系。此外, 藏药材的 ITS2 序列二级结构各有不同, 为物种鉴定提供了另一种方法。结论 ITS2 序列是藏药材植物鉴定和系统发育研究的非常有效的单条形码, 为藏药材植物资源的利用和保护提供了科学依据。

关键词: 藏药材植物; ITS2; 分子鉴定; 系统发生关系; PCR

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12-2967-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.033

Molecular identification of Tibetan medicinal plants based on ITS2 sequence

HAO Dou-dou¹, ZHANG Yong-qun¹, FU Su-hong¹, SHI Jing¹, ZHANG Peng-fei¹, LHA Duo²

1. Hospital of Chengdu Office of People's Government of Tibetan Autonomous Region, Chengdu 610000, China

2. Tibet University, Lhasa 850000, China

Abstract: Objective The barcoded ITS2 DNA sequence was used to identify 44 Tibetan medicinal plants. **Methods** Genomic DNA of Tibetan medicinal plants were extracted with high salt and low pH method. The PCR technique was performed to obtain the ITS2. A total of 145 ITS2 sequences was obtained belonging to 24 families, 39 genera, and 44 species. Some homologous sequences were also selected according to sequence alignment from Genbank database. The ITS2 sequences were aligned using Bioedit and the intraspecific and interspecific Kimura 2-parameter genetic distance was calculated using MEGA, and the neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees were constructed to analyze phylogenetic relationship. **Results** ITS2 regions have significant intra- and inter-specific difference, phylogenetic analysis based on ITS2 regions concurred with the result of morphological classification, and it could also determine the phylogenetic relationship between species. In addition, the secondary structure of the ITS2 sequence of Tibetan medicinal plants is different, providing another method for species identification. **Conclusion** ITS2 can be used as a very effective single-locus barcode in the identification and phylogenetic study of Tibetan medicinal plants. The barcoding technique provides a scientific baseline for the utilization of resources and conservation of Tibetan medicinal plants.

Key words: Tibetan medicinal plant; ITS2; molecular identification; phylogenetic relationship; PCR

青藏高原总面积 220 万 km², 平均海拔 4 500 m, 空气稀薄, 紫外辐射强, 昼夜温差大, 有的区域终年积雪, 被称为世界第 3 级^[1]。独特的地理环境孕育了很多青藏高原特有种, 含有特殊的活性成分 (如抗氧化剂, 具有清除羟基自由基、抑制脂质

氧化等能力^[2]), 在种质资源中占有重要地位, 使得藏医药独具特色^[3]; 藏医药用植物中毛茛科 (Ranunculaceae)^[4]、龙胆科 (Gentianaceae)^[5]、菊科 (Compositae)^[6]、豆科 (Leguminosae)、报春花科 (Primulaceae) 等占很大比例, 这几大科植物药

收稿日期: 2019-01-13

基金项目: 西藏自治区科技厅自然科学基金项目 (2015ZR-13-5); 湖南师范大学蛋白质与发育生物学教育部重点实验室 (2014 年) 开放课题 (2015DF03)

作者简介: 郝豆豆 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为藏药材的分子鉴定。E-mail: 31724478@qq.com

*通信作者 张勇群 (1976—), 女, 博士, 从事藏药材基因与功能研究。E-mail: yongqunzhang@yahoo.com

用种类较多、药材使用历史悠久、药用价值高。藏医药多采用大复方而很少使用单方，许多药方配药都在 25 种以上，有的甚至多达七八十、一百多种。大复方配药所带来的问题就是很难保证每一批次的药材质量，藏药的疗效就会大打折扣，所以对藏药材的质量监控就成为一项重要的环节。但是由于目前缺乏科学有效的质量控制标准，藏药的开发推广受到了阻碍。藏药材识别新技术研究对保护我国藏药材资源、保护消费者的合法权益、打击违法犯罪等至关重要。应用 DNA 条形码技术区分和鉴定物种的关键在于获得被鉴定物种的条形码序列信息，然后与数据库中已保存的 DNA 序列进行同源性比对。随着 DNA 分子标记鉴定研究的深入，通过不断探索，各类研究人员建立了本领域的标准化 DNA^[7-8]，

建立快速、有效、标准化的鉴定藏药材的方法，对促进藏药材种质资源研究开发及遗传资源的保护有重要意义。近期的研究表明，ITS2 序列是药用植物种的一个有用的条形码^[9-10]，被作为鉴定植物的通用 DNA 条形码，也作为动物鉴定中 CO1 的补充。ITS2 序列的另外一个优点是其保守的二级结构与相对较低的中间变化相关联，ITS2 序列和二级结构相结合可以提供更准确的鉴定结果，体现出 ITS2 序列在物种鉴定中的优势^[11]。

1 材料

于西藏自治区拉萨市夺底沟、林周县白朗村、达孜、墨竹工卡、林芝地区采集了 44 种藏药材，分属于 16 目 24 科 39 属，共 145 个样本（表 1），样本于装有硅胶的自封袋中保存。

表 1 44 种藏药材植物的物种信息及 GenBank 登录号

Table 1 Species information of 44 Tibetan medicinal plants and GenBank accession number

编号	中文名	拉丁名	GenBank 序列号
1	藏橐吾	<i>Ligularia rumicifolia</i>	KY624379、MH258111、MH258112、MH258113、MH258114、MH258115、MH258116、MH258117、MH258118
2	苞叶雪莲	<i>Saussurea obvallata</i>	MH258146、KY624377
3	川西合耳菊	<i>Synotis solidaginea</i>	MH258149、KY624382
4	拉萨蒲公英	<i>Taraxacum sherriffii</i>	MH258193、MH258194
5	笔直黄耆	<i>Astragalus ladakensis</i>	MH258119、MH258120、MH258121、MH258122
6	鬼箭锦鸡儿	<i>Caragana jubata</i>	MH258168、MH258169、MH258170、MH258171
7	镰荚棘豆	<i>Oxytropis falcata</i>	MH258176、MH258177、MH258178、MH258179
8	藏豆	<i>Stracheya tibetica</i>	MH258147、KY624378
9	砂生槐	<i>Sophora moorcroftiana</i>	MH258154、KY624396
10	瑞香狼毒	<i>Stellera chamaejasme</i>	MH258103、MH258104、MH258105、MH258106、MH258107、MH258108、MH258109、MH258110、KY624394
11	黄苞南星	<i>Arisaema flavum</i>	MH258125、MH258126、MH258127、MH258128、MH258129、MH258130
12	拉萨小檗	<i>Berberis hemsleyana</i>	MH258097、MH258098、MH258099、MH258100、MH258101、MH258102、KY624390
13	桃儿七	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	MH258155、KY624399
14	海乳草	<i>Glaux maritima</i>	MH258150、KY624386
15	锡金报春	<i>Primula sikkimensis</i>	MH258158、KY624405
16	垫状卷柏	<i>Selaginella pulvinata</i>	MH258140、MH258141
17	匙叶翼首花	<i>Pterocephalus hookeri</i>	MH258142、MH258143、MH258144、MH258145、KY624397
18	独一味	<i>Lamiophlomis rotata</i>	MH258148、KY624383
19	叉枝蓼	<i>Polygonum tortuosum</i>	MH258135、KY624381
20	圆穗蓼	<i>Polygonum macrophyllum</i>	MH258131、MH258132、MH258133、MH258134
21	蓝玉簪龙胆	<i>Gentiana veitchiorum</i>	MH258085、MH258086、MH258087、MH258088、MH258089、MH258090、MH258091

续表 1

编号	中文名	拉丁名	GenBank 序列号
22	长梗秦艽	<i>Gentiana waltonii</i>	MH258082、MH258083、MH258084
23	线叶龙胆	<i>Gentiana farreri</i>	MH258074、MH258075、MH258076、MH258077
24	麻花苳	<i>Gentiana straminea</i>	MH258078、MH258079、MH258080、MH258081
25	喉毛花	<i>Comastoma pulmonarium</i>	MH258092、MH258093、MH258094、MH258095、MH258096
26	绢毛蔷薇	<i>Rosa sericea</i>	MH258151、KY624388
27	珍珠梅	<i>Sorbaria sorbifolia</i>	MH258164、KY624412
28	西藏中麻黄	<i>Ephedra intermedia</i>	MH258138、MH258180、MH258181、MH258182、MH258183
29	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnantrum</i>	MH258165、MH258166、MH258167、KY624392
30	条叶银莲花	<i>Anemone trullifolia</i>	MH258123、MH258124
31	三裂碱毛茛	<i>Halerpestes tricuspis</i>	MH258153、KY624395
32	云生毛茛	<i>Ranunculus longicaulis</i>	MH258163、KY624411
33	铁线莲	<i>Clematis florida</i>	MH258191、MH258192
34	樱草杜鹃	<i>Rhododendron primuliflorum</i>	MH258162、KY624410
35	雪层杜鹃	<i>Rhododendron nivale</i>	MH258157
36	圆齿红景天	<i>Rhodiola crenulata</i>	MH258172、MH258173、MH258174、MH258175
37	岩白菜	<i>Bergenia purpurascens</i>	MH258161、KY624408
38	商陆	<i>Phytolacca acinosa</i>	MH258189、MH258190
39	大花黄牡丹	<i>Paeonia ludlowii</i>	MH258184、MH258185、MH258186、MH258187、MH258188、KY624387
40	老鹳草	<i>Geranium wilfordii</i>	MH258152、KY624391
41	菟丝子	<i>Cuscuta chinensis</i>	MH258156、KY624400
42	西藏大戟	<i>Euphorbia tibetica</i>	MH258157、KY624403
43	血满草	<i>Sambucus ebullus</i>	MH258160、KY624407
44	藏波罗花	<i>Incarvillea younghusbandii</i>	MH258136、MH258137

2 方法

对采集的硅胶干燥后的叶片进行 DNA 提取，对于无法采集到叶片的物种，用其种子、花、茎秆等部位来提取。用高盐低 pH 法^[12]提取藏药材 DNA，部分 DNA 用于 PCR 扩增，剩余的 DNA 保存在 -80℃ 冰箱。对提取的 DNA 进行凝胶电泳检测、浓度及纯度检测，然后进行 PCR 扩增，引物^[13]为 ITS2F：5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'，ITS2R：5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'，扩增产物送到擎科测序公司测序。

3 数据分析

3.1 测序结果分析

在 CodonCode Aligner 软件中将测序得到的序列峰图打开，分析每个样品的测序结果，将序列两端信号差的部分去掉。为了保证测序所得序列结果不会因为人为因素导致的样品混淆或者测序污染而得到错误的序列，在 GenBank 数据库中进行 BLAST 搜索比对，核对每条序列的科、属、种的匹配率，

如果属于同科或是同属，即符合形态学鉴定的预期植物 DNA 序列，说明扩增序列无误，可进行后续的分析；如果比对出的同源序列所属的种类与提交的序列相差很大（如不属于同一科，甚至同一目），则说明植物提取过程中出现错误，需重新核对采集的样品，并重新提取 DNA 和进行 PCR 扩增。

3.2 获取 ITS2 序列并预测二级结构

ITS 序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 28 S 区段即可获得 ITS2 间隔区序列^[14]，根据 Koetschan 等^[15]建立的 ITS2 Database 数据库（<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>）预测 ITS2 序列的二级结构。

3.3 序列比对

将藏药材的 ITS2 序列与近缘物种序列在 MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) 软件中进行序列比对，比较序列之间的差异（如插入、缺失、替换等），计算序列之间的 K2P (K: kimura, 多变异位点的校正; P: 不同核苷酸变异位点比例)

遗传距离, 基于邻接 (neighbor joining, NJ) 法构建系统进化树, 同时用 Bootstrap 法 1 000 次重复检验各分支的支持率。将所有藏药材 145 个样本的 ITS2 序列提交到 GenBank 数据库中, 可获得每条序列对应的唯一登录号 (表 1), 为藏药材的条形码数据库提供更多参考信息。

4 结果与分析

4.1 基于 ITS2 序列的 44 种藏药材的 145 个样本的系统进化分析

将 44 种藏药材的 145 个样本的 ITS2 序列进行序列比对后, 基于 NJ 法构建系统进化树 (图 1), 分支的不同颜色代表物种属于不同的科, 可以看到属于同一科的物种聚于同一大支, 每个科中同一属的物种聚于同一分支; 在进化树中可以明显区分不同的科, 以及每一个科中不同属的物种聚于不同分

支; 系统进化树中可以体现不同科、属的进化关系, 即亲缘关系的远近, 同时也可以说明基于 ITS2 序列对物种进行分类鉴定的合理性与准确性。

4.2 基于 ITS2 序列的 4 个科的 19 种藏药材与其近缘物种的分子鉴定

4.2.1 19 种藏药材与其近缘物种遗传距离比较从 NCBI 数据库中通过序列比对筛选了豆科植物镰夹棘豆、笔直黄耆、鬼箭锦鸡儿、砂生槐的同属近缘物种 ITS2 序列 27 条, 菊科植物藏橐吾、川西合耳菊、苞叶雪莲、拉萨蒲公英的同属近缘物种 ITS2 序列 28 条, 龙胆科植物长梗秦艽、麻花艽、线叶龙胆、蓝玉簪龙胆、喉毛花同属近缘物种 ITS2 序列 16 条, 毛茛科植物云生毛茛、三裂碱毛茛、露蕊乌头、条叶银莲花、铁线莲同属近缘种 ITS2 序列 21 条, 将所有物种的序列在 MEGA 软件中进行

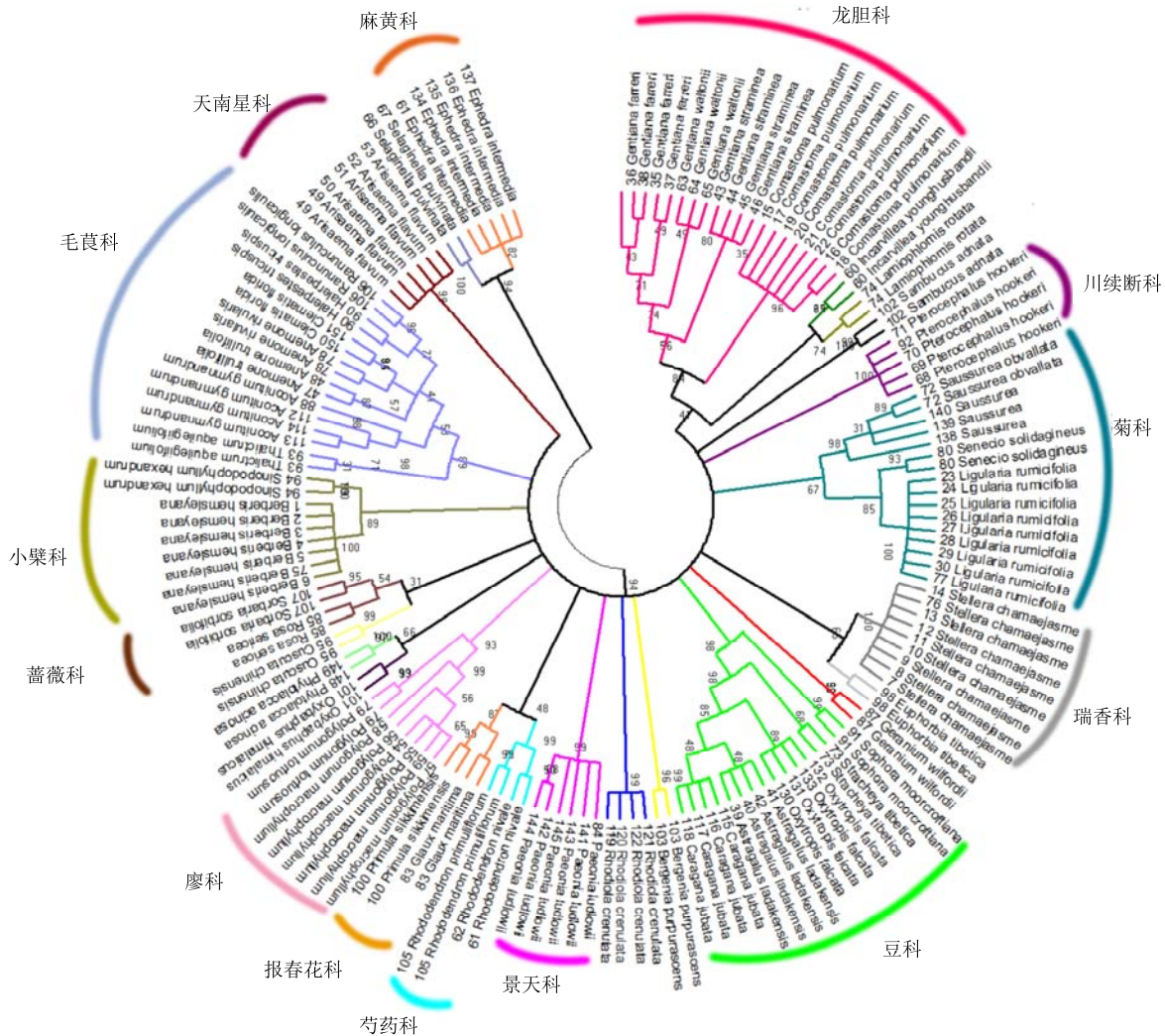


图 1 基于 ITS2 序列对 44 种藏药材的 145 个样本系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 145 samples of 44 Tibetan medicinal plants based on ITS2 sequence

序列比对分析, 计算同属物种的种内、种间遗传距离以及同科不同属物种的种间距离 (图 2、3)。同一属的种间遗传距离大于种内遗传距离, 体现了同属内不同物种间的差异; 同科不同属的种间遗传距离显著大于同属物种间遗传距离, 说明了不同属物种间区分度很高, 进而可以对不同的物种进行鉴定。

4.2.2 19 种藏药材与其近缘物种系统进化分析基于 ITS2 序列分别构建 4 个科的 19 种藏药材与其

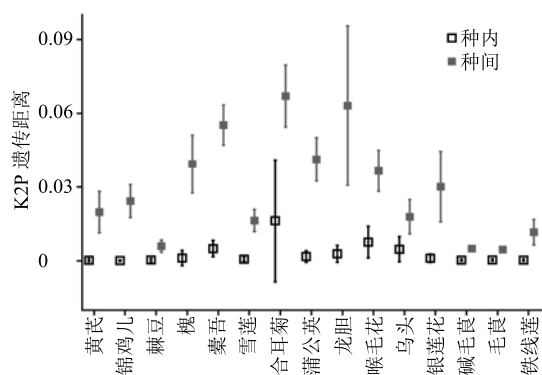
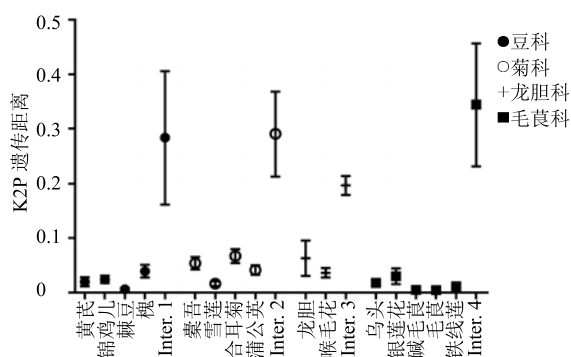


图 2 同属物种种内与种间遗传距离比较

Fig. 2 Comparison of genetic distances between species belonging to same genus



Inter. 1-豆科中不同属的物种种间遗传距离 Inter. 2-菊科中不同属的物种种间遗传距离 Inter. 3-龙胆科中不同属物种的种间遗传距离 Inter. 4-毛茛科中不同属物种种间遗传距离
Inter. 1-genetic distance between species belonging to different genera in Leguminosae Inter. 2-genetic distance between species belonging to different genera in Compositae Inter. 3-genetic distance between species belonging to different genera in Gentianaceae Inter. 4-genetic distance between species belonging to different genera in Ranunculaceae

图 3 同属物种种间遗传距离与同科不同属物种种间遗传距离比较

Fig. 3 Comparison of genetic distance between species of same genus and species of different genus in same family

近缘种的系统进化树 (图 4~7)。在系统进化树上, 聚在同一分支上的物种之间亲缘关系最近, 物种所在的分支之间距离越远, 说明物种之间的亲缘关系越远。

每个科的系统进化树中同一属的物种聚为一个分支, 与其他的属分开于不同的分支, 在同一分支上的同属物种根据物种类别又分开称为不同的分支, 同一物种的不同样本共聚为一支, 进而与其他物种进行区分。如龙胆科进化树 (图 4) 中龙胆属和喉毛花属分别聚为两大支, 龙胆属中长梗秦艽与麻花艽聚为一支, 说明两者之间的亲缘关系较近, 同时 2 个物种各自的样本又分别聚为不同的小分支, 并且与其他近缘物种也能显著区分; 线叶龙胆和蓝玉簪龙胆同聚为一支, 各自的样本又分别单独聚为一个分支, 说明两者亲缘关系最近, 同时又可以进行明确的区分, 两者在形态学特征上也有很高的相似度, 聚类结果与之吻合, 体现了用 ITS2 序列鉴定 2 物种的合理性; 本课题中获得的喉毛花 ITS2 序列聚为一支, 同时与 GenBank 数据库中得到的喉毛花序列共同聚为一个分支, 验证了所得序列的准确性, 同时也能与喉毛花属中的其他近缘物种进行区分。

4.3 藏药材二级结构预测

ITS2 序列二级结构由 1 个中心圆环和向外辐射形成的 4 个分支 (旋臂) 组成, 不同的物种, 其 ITS2 序列二级结构不同, 具体表现为中心圆环的大小不同、4 个分支之间的夹角不同, 每个分支上的茎环数量、茎的长度、环的大小也有所不同。属于同科同属的物种 ITS2 序列二级结构相似度很高 (图 8-A), 中心环大小相似, 4 个旋臂之间的夹角相似, 每个分支上的茎环数量、茎的长度和大小略有不同, 从而将这物种进行区分; 属于同科不同属的物种 ITS2 二级结构的差异变大 (图 8-B), 各分支的夹角发生改变, 分支上的茎环数量及大小变化也较大; 属于不同科或不同属的物种, ITS2 序列二级结构差异出现更大的变化 (图 8-C), 其中心圆环大小不同, 4 个旋臂之间的夹角差异很大, 旋臂上的茎环数量, 茎的长度和环的大小差异很大, 如瑞香狼毒 ITS2 序列二级结构的第 1 条旋臂非常短, 其上面只有 1 条短臂和 1 个小环, 大花黄牡丹第一条旋臂很长, 有 7 个大小不同的环。所以可通过 ITS2 序列的二级结构来区分不同的物种。

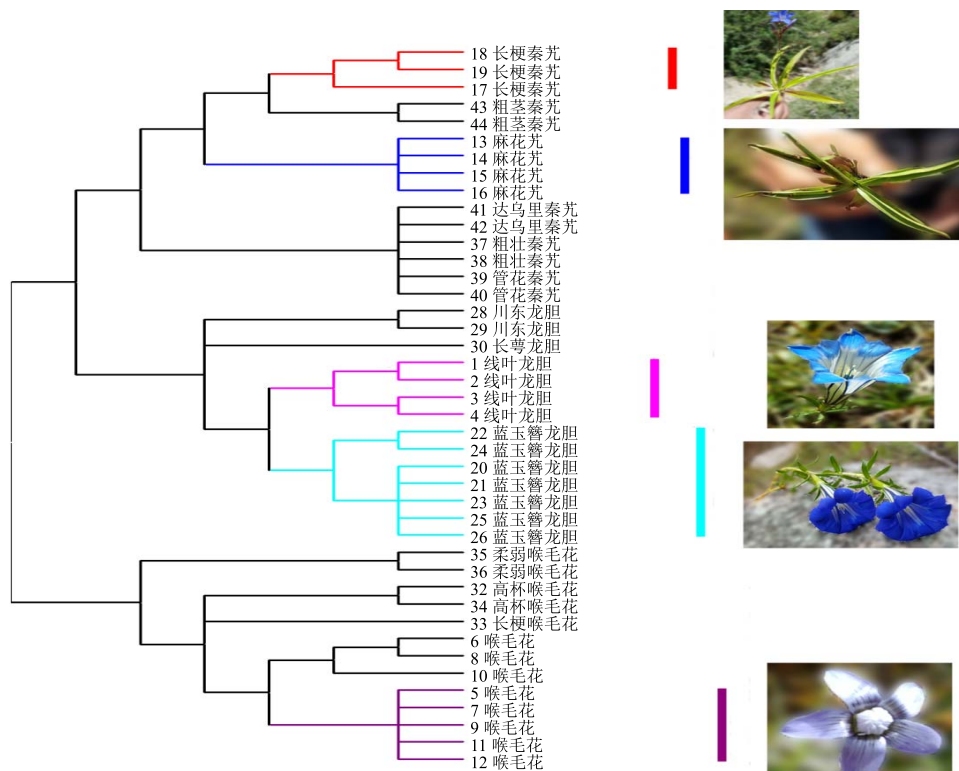


图 4 龙胆科 5 种藏药材与近缘物种的系统进化分析

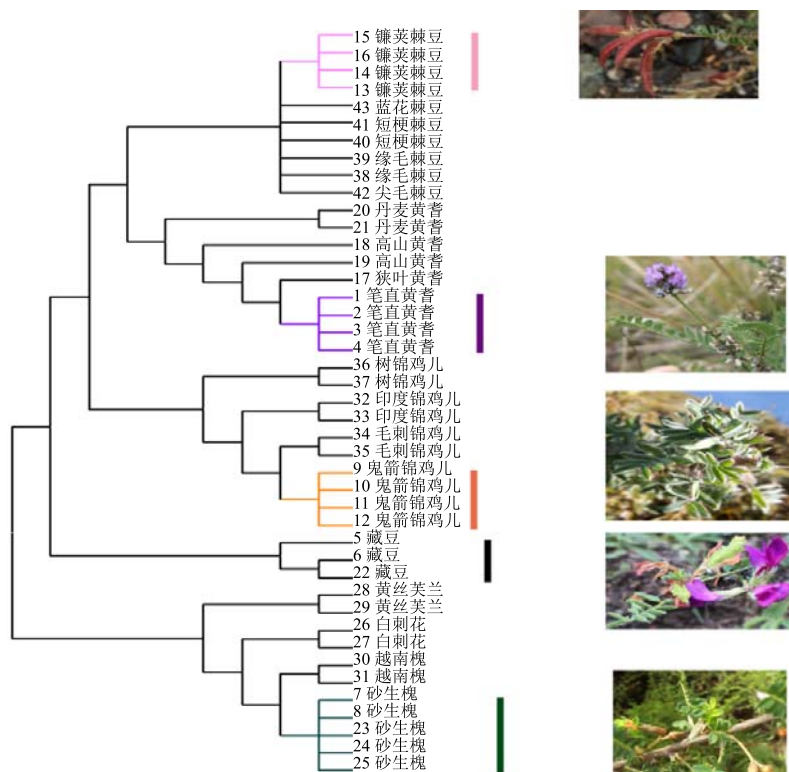
Fig. 4 Phylogenetic analysis of five Tibetan medicinal materials and related species in *Gentianaceae*

图 5 豆科 5 种藏药材与近缘物种系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of five Tibetan medicinal materials and related species in *Leguminosae*

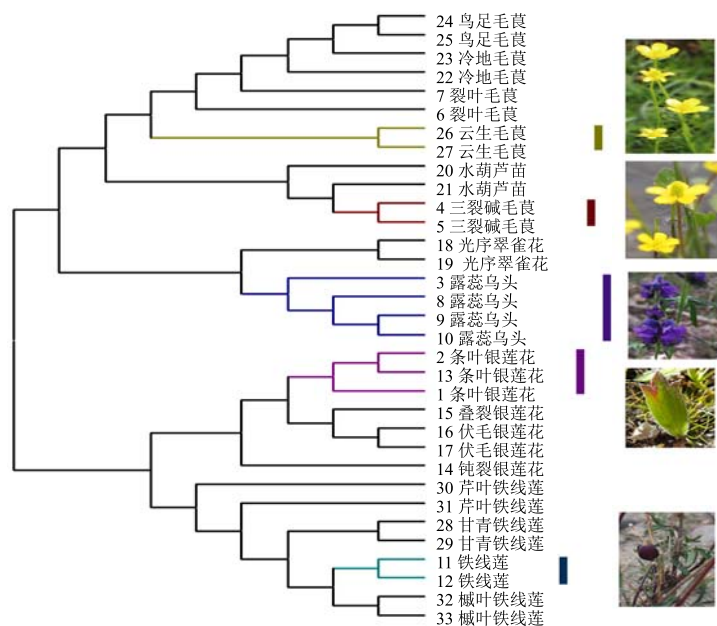


图 6 毛茛科 5 种藏药材与近缘物种系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of five Tibetan medicinal materials and related species in *Ranunculaceae*

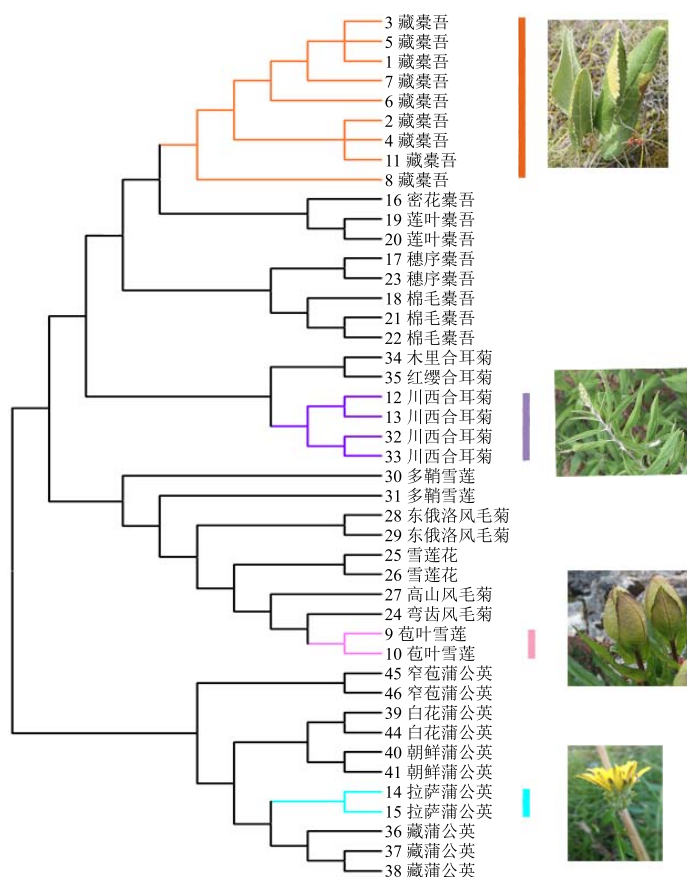


图 7 菊科 4 种藏药材与近缘物种系统进化分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of four Tibetan medicinal materials and related species in *Compositae*

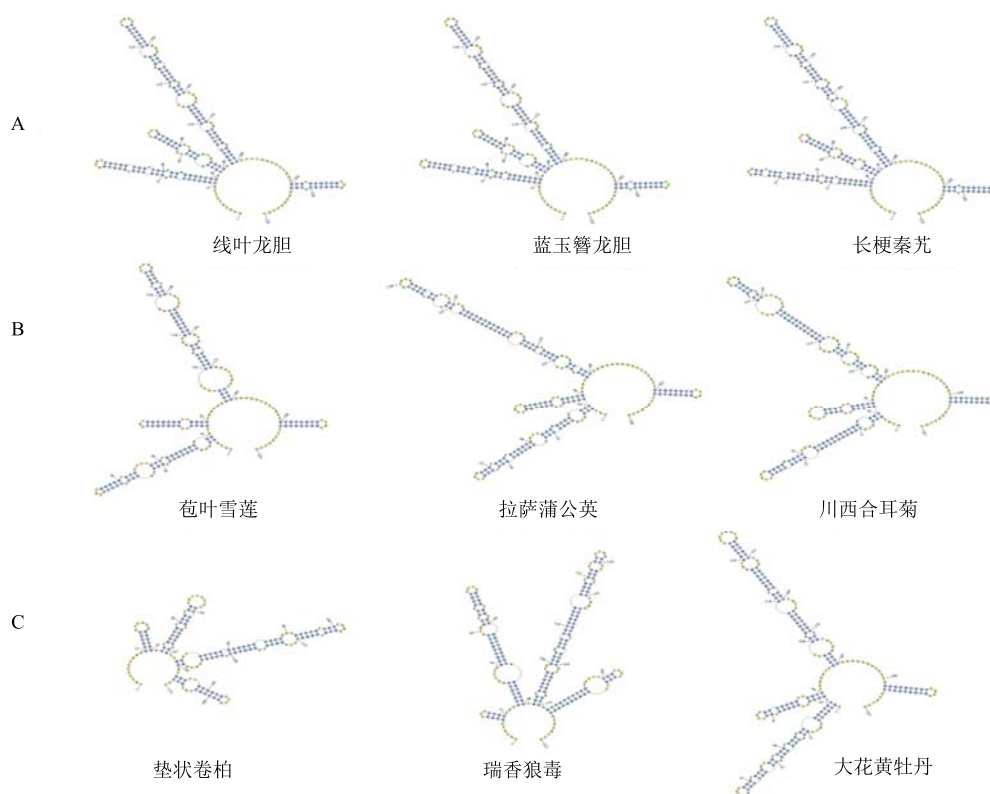


图 8 藏药材 ITS2 序列二级结构预测

Fig. 8 Prediction of secondary structure of ITS2 sequence of Tibetan medicinal materials

5 讨论

ITS2 是 ITS 序列中的一个片段, 位于 5.8 S 和 26 S rRNA 之间, 长度较短, 易于设计通用引物进行扩增和测序。在 DNA 部分降解的药材中也容易扩增, 在物种的分子鉴定中更具有优势。

本研究提取了 44 种藏药材的 145 个样本的基因组 DNA, PCR 扩增得到所有样本的 ITS2 序列, 在 GenBank 数据库中选取了部分藏药材的近缘物种 ITS2 序列, 并进行序列比对, 计算种内、种间遗传距离, 结果表明种间距离明显大于种内距离, 且同属种间距离显著小于不同属种间距离, 所以 ITS2 序列种内变异小, 种间变异大; 在 MEGA 中构建的 NJ 系统进化树结果显示同一物种的不同个体聚于同一支, 同一属的不同物种聚为一大支, 同一科的不同属进而又聚为一支, 物种之间能明显区分, 同时也展示出物种之间的亲缘关系的远近; 预测每条 ITS2 序列的二级结构, 可以通过二级结构中心圆环的大小、4 个旋臂的夹角、每条旋臂上的茎环数量、茎的长度、环的大小来判断 ITS2 序列二级结构的不同, 从而反映出不同物种的 ITS2 序列的差异。所以可以利用 ITS2 序列来区分不同的物种, 对植物系统分类、藏药材混伪品的鉴定工作

起辅助作用。

实现 DNA 条形码物种鉴定, 就必须构建完善的 DNA 条形码数据库。目前 DNA 条形码数据库正在建立和完善中^[16-19], 植物 DNA 条形码工作的开展需要依赖传统的植物正确分类, 所以植物 DNA 条形码研究要与传统的分类学鉴别相结合, 要保证采集的样本分类的准确性。藏药材种类多, 很多物种在外观上很难区分, 尤其经过加工之后更难从形态上进行区分, 市场上有很多混伪品, 因此从分子水平对物种进行区分是一种较为准确和便捷的方法。通过建立藏药材 DNA 条形码分子鉴定数据库, 对监测藏药材市场药材流通具有重要意义。

参考文献

- [1] 樊海岩. 试论现代医药产业发展趋势之藏医药产业发展的思路和路径 [J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(7): 71-78.
- [2] 杨丽花, 兰小中, 罗由萍, 等. 22 种藏药材抗氧化活性研究 [J]. 中药材, 2012, 35(12): 2007-2009.
- [3] 周华蓉, 幕泽迺, 杜小浪, 等. 藏医学药用植物中我国种子植物特有种整理 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3463-3469.
- [4] 李 敏, 雷志强, 钟国跃. 藏医学药用毛茛科植物药材品种与标准的现状分析 [J]. 中药新药与临床药理,

- 2015, 26(1): 133-137.
- [5] 成磊, 张亚梅, 杜小浪, 等. 藏医学药用龙胆科植物药材品种与标准的现状分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 647-650.
- [6] 周华蓉, 王昌华, 刘翔, 等. 藏医学药用菊科植物药材的品种与标准整理 [J]. 中国民族民间医药, 2010(17): 5-6.
- [7] Jiao L, Yu M, Wiedenhoef A C, *et al.* DNA barcode authentication and library development for the wood of six commercial pterocarpus species: the critical role of xylarium specimens [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1945-1952.
- [8] Chattopadhyay P, Banerjee G, Banerjee N. Distinguishing orchid species by DNA barcoding: increasing the resolution of population studies in plant biology [J]. *OMICS*, 2017, 21(12): 711-720.
- [9] Techen N. DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opinion Biot*, 2014, 25:103-110.
- [10] Lo Y T, Shaw P C. DNA barcoding in concentrated Chinese medicine granules using adaptor ligation-mediated polymerase chain reaction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 149: 512-516.
- [11] Coleman A W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(10): 3322-3329.
- [12] 郝豆豆, 雷鸣, 武俊喜, 等. 拉萨蒲公英基因组DNA不同提取方法的比较及PCR检测 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 2034-2037.
- [13] Chen S, Yao H, Han J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [14] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [15] Koetschan C, Forster F, Keller A, *et al.* The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: D275-D279.
- [16] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [17] Ratnasingham S, Hebert P D. bold: The barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(3): 355-364.
- [18] 鹿江南, 成航, 樊佳佳, 等. 基于ITS2序列的5种鬼臼类中药材DNA条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3907-3911.
- [19] 陈炼, 吴琳, 王启菲, 等. DNA条形码及其在生物多样性研究中的应用 [J]. 四川动物, 2016(6): 942-949.