

## 薄荷及其近缘物种叶的形态特征及 DNA 条形码鉴定研究

苏 畅<sup>1</sup>, 蔺应雪<sup>1</sup>, 王 乾<sup>1</sup>, 侯芳洁<sup>1</sup>, 张兰兰<sup>2</sup>, 马东来<sup>1</sup>, 郑玉光<sup>1\*</sup>, 郑开颜<sup>1\*</sup>

1. 河北中医学院药学院, 河北 石家庄 050200

2. 天津天士力集团股份有限公司, 天津 300410

**摘要:** 目的 探讨植物的形态特征及 ITS2、psbA-trnH 序列在薄荷及其近缘物种鉴定中的应用, 为薄荷及近缘物种的鉴定提供参考。方法 观察薄荷及其近缘物种叶片形状、叶缘形状、绒毛密度、腺鳞密度等形态特征并对供试材料 ITS2 序列、psbA-trnH 序列进行 PCR 并测序, 通过对比植物形态特征、分析 DNA 序列、计算遗传距离、构建邻接树等方法对数据进行整理分析, 并对植物进行鉴定。结果 植物的形态特征结合 ITS2 序列、psbA-trnH 序列构建的邻接树显示香水薄荷与夏香薄荷、丹参与紫苏、胡椒薄荷与美国薄荷、大叶薄荷与猫薄荷亲缘关系近, 该方法能将薄荷及其近缘物种区分。结论 ITS2 序列、psbA-trnH 序列可作为薄荷及其近缘物种的 DNA 条形码, 与叶的形态特征相结合鉴定效果更佳。

**关键词:** 薄荷; ITS2; psbA-trnH; 叶的形态特征; DNA 条形码

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)15-3667-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.023

## Morphological characteristics of leaves and DNA barcoding for identification of *Mentha haplocalyx* and its related species

SU Chang<sup>1</sup>, LIN Ying-xue<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, HOU Fang-jie<sup>1</sup>, ZHANG Lan-lan<sup>2</sup>, MA Dong-lai<sup>1</sup>, ZHENG Yu-guang<sup>1</sup>, ZHENG Kai-yan<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

2. Institute of Tasly Holding Group, Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** The morphological characteristics of plants and the application of ITS2 and psbA-trnH sequences in the identification of *Mentha haplocalyx* and its related species were discussed in order to provide references for the identification of *M. haplocalyx* and its related species. **Methods** The morphological characteristics such as the shape of leaf and leaf edge, villous density and glandular scale density of *M. haplocalyx* and its related species were observed. Alignment was performed to compare ITS2 and psbA-trnH sequences of the tested materials. The data were processed and analyzed by means of comparing the morphological characteristics of plants, analyzing the DNA barcode sequences, calculating the genetic distance, and constructing NJ trees. **Results** The NJ trees were constructed according to the morphological characteristics of plants combined with ITS2 and psbA-trnH sequences, which showed that *M. arvensis* was closely related to *Satureja Hortensis*, *Salvia miltiorrhiza* was closely related to *Perilla frutescens*, *Mentha piperita* was closely related to the *Monarda didyma* and *Agastache rugosa* was closely related to *Nepeta cataria*. This method could distinguish *M. haplocalyx* from its related species. **Conclusion** ITS2 and psbA-trnH sequences can be used as DNA barcode of *M. haplocalyx* and its related species, and the combination with morphological characters of leaves is better for the identification.

**Key words:** *Mentha haplocalyx* Briq.; ITS2; psbA-trnH; morphological characteristics of leaves; DNA barcoding

薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分, 始载于《新修本草》, 具有疏散风热、清利头目、利咽透疹、疏肝行气的功效, 是一味临床常用的辛凉解表药<sup>[1]</sup>。薄荷分布范围广、

种类多, 产于南北各地, 有性和无性繁殖并存, 且易与唇形科植物杂交, 由此造成薄荷品种混乱, 引起临床用药的困难。如何科学准确地鉴别薄荷及其近缘物种就变得十分重要。过去常用形态学分类或分子

收稿日期: 2019-02-09

基金项目: 河北中医药管理局科研计划项目 (2015003); 河北省高等学校科学技术研究项目 (BJ2016039); 河北中医学院博士科研基金资助项目 (BSZ2016002); 河北省二期现代农业产业技术体系创新团队项目 (HBCT2018060205)

作者简介: 苏 畅, 硕士研究生研究方向为中药质量评价与控制。E-mail: 18631135614@163.com

\*通信作者 郑玉光, 教授。Tel: (0311)89926316 E-mail: zyg314@163.com  
郑开颜, 讲师。E-mail: zhengkaiyan168@126.com

标记技术对薄荷的种质资源进行鉴定和评价。王少铭等<sup>[2]</sup>对贵州及周边省份的留兰香及野生薄荷资源的遗传多样性进行了研究,梁呈元等<sup>[3]</sup>采用 ISSR 标记技术证明了薄荷属种质资源存在丰富的遗传多样性,乐云辰等<sup>[4]</sup>从分子水平对上海地区的薄荷品种进行了种质资源的评价。目前,尚无薄荷及其近缘物种资源叶片的形态特征与分子研究相结合的报道,本实验在前人研究的基础上将叶的形态特征与分子技术相结合,以期薄荷及其近缘物种建立更为完善的区分机制,为薄荷及近缘物种的鉴定提供参考。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术是当前生物学研究热点之一<sup>[5]</sup>,国内外应用 DNA 条形码鉴定中药材基原物种及其混伪品的研究已有广泛的报道<sup>[6-10]</sup>,Techen 等对条形码、可用的数据库进行了综述,Cheng 等<sup>[8]</sup>通过测序对中药制剂的生物成分进行了分析。Chen 等<sup>[11]</sup>通过大量的分析,最终确定 ITS2 作为鉴别药用植物及其近缘种的标准 DNA 条形码,同时也推荐叶绿体基因间隔区片段 *psbA-trnH* 作为补充条形码。本研究以薄荷及其近缘物种为研究对象,扩增了其核糖体 DNA 的 ITS2

序列及叶绿体 DNA 的 *psbA-trnH* 序列,结合部分 GenBank 数据,采用邻接法 (NJ) 构建系统聚类树,并结合植物叶片的形态特征进行鉴别,以期薄荷的质量控制提供科学参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

基恩士数码成像系统 (VHX-6000); PCR 仪 (Veriti 96 Well Thermal Cycler); 凝胶成像系统 (OSTC106105); 高速离心机 (Eppendorf Centrifuge 5804 R); 各种量程的微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

### 1.2 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司,批号 DP305-02); 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; 所用试剂均为分析纯。

### 1.3 材料

植物样本 27 份,均来自河北中医学院中药材种植基地,经河北中医学院郑玉光教授鉴定为薄荷及其近缘物种,凭证标本保存于河北中医学院植物药材标本馆,其余各基原物种 DNA 序列均来自于 GenBank 数据库。材料来源及样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

中文名	拉丁名	编号	来源
柠檬薄荷	<i>Mentha citrata</i> Ehrh.	NM	河北中医学院种植基地
柠檬薄荷		G-NM	GenBank
猫薄荷	<i>Nepeta cataria</i> L.	M-1	河北中医学院种植基地
猫薄荷		M-2	河北中医学院种植基地
猫薄荷		G-M	GenBank
胡椒薄荷	<i>Mentha piperita</i> Linn.	HJ-1	河北中医学院种植基地
胡椒薄荷		HJ-2	河北中医学院种植基地
胡椒薄荷		G-HJ	GenBank
夏香薄荷	<i>Satureja hortensis</i> L.	XX-1	河北中医学院种植基地
夏香薄荷		XX-2	河北中医学院种植基地
夏香薄荷	<i>Peronospora saturejae-hortensis</i>	G-XX	GenBank
大叶薄荷	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. et Mey.) O. Ktze.	DY-1	河北中医学院种植基地
大叶薄荷		DY-2	河北中医学院种植基地
大叶薄荷		G-DY	GenBank
美国薄荷	<i>Monarda didyma</i> L.	MG	河北中医学院种植基地
美国薄荷		G-MG	GenBank
野薄荷	<i>Epimeredi indica</i> (L.) Rothm.	Y	河北中医学院种植基地
香水薄荷	<i>Mentha arvensis</i> L.	XS	河北中医学院种植基地
香水薄荷		G-XS	GenBank
留兰香	<i>Mentha spicata</i> Linn.	LLX-1	河北中医学院种植基地
柠檬留兰香	<i>Mentha citrata</i> Ehrh.	NMLLX	河北中医学院种植基地
薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.	BH	河北中医学院种植基地
薄荷		G-BH	GenBank
紫苏	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britt.	ZS	河北中医学院种植基地
紫苏		G-ZS	GenBank
丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	DS-1	河北中医学院种植基地
丹参		DS-2	河北中医学院种植基地

2 方法

2.1 样品的采集

取样本植物资源幼嫩的新鲜叶片液氮冷冻，用于 DNA 提取。另取植株中部健康叶片用于性状观测。凭证标本存放于河北中医学院标本馆。

2.2 性状观测

选取供试植株的同龄健壮叶片使用基恩士数码成像系统进行性状观测。

2.3 DNA 提取

取新鲜叶片进行洗净处理，液氮迅速磨成细粉。DNA 提取按试剂盒（北京天根生化科技有限公司，批号 DP305-02）说明步骤进行提取，部分操作

进行相应调整（温育时间延长至 40 min；第一步加入 GP1 时同时加入 CTAB）。

2.4 PCR 扩增及测序

引物由上海生工有限公司合成（表 2）。PCR 反应体系为 20 μL，包括 2×Tap PCR Mix 10 μL，正向引物 0.5 μL，反向引物 0.5 μL，ddH<sub>2</sub>O 7 μL，DNA 模板 2 μL。反应程序：94 °C（预变性 5 min），94 °C（变性 30 s），56 °C（退火 30 s），72 °C（延伸 45 s），40 个循环，72 °C（后延伸 10 min）<sup>[12]</sup>。PCR 产物用琼脂糖，1×TAE 缓冲液，凝胶成像系统成像记录，PCR 产物送上海生工有限公司进行双向测序，测序引物与 PCR 引物相同。

表 2 ITS2 和 psbA-trnH 引物

Table 2 Primers for ITS2 and psbA-trnH used in this study

DNA 片段	引物名称	引物序列 (5'→3')
ITS2	ITS2 F	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS2 R	TCCTCCGCTTATTGATAT
psbA-trnH	psbA-trnH F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	psbA-trnH R	CGCGCATGGTGGATTACATTCC

2.5 数据处理

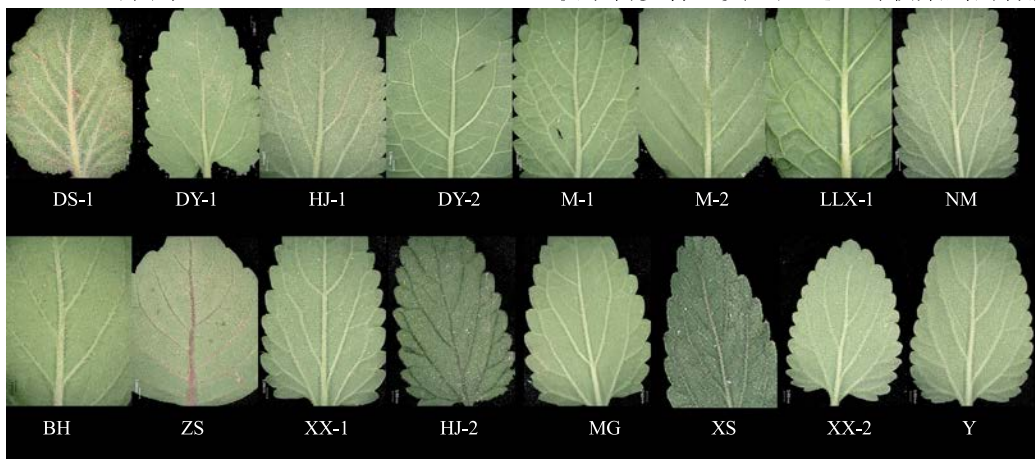
获得的 ITS2、psbA-trnH 测序峰图用 BioEdit 查看峰形质量，确保质量合格后将序列进行校对拼接，去除引物及低质量区，基于隐马尔科夫模型的 Hmmer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区段，获得 ITS2 间隔区序列及 psbA-trnH 序列，MEGA 5.0 (Molecular

evolutionary genetics analysis) 进行分析，利用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树。

3 结果与分析

3.1 薄荷及其近缘物种种质资源外部形态性状

由图 1 可以看出，收集到的种质资源的形态性状丰富多样、类型广泛。对收集到的种质资源的叶



DS-1-丹参 DY-1、DY-2-大叶薄荷 HJ-1、HJ-2-胡椒薄荷 M-1、M-2-猫薄荷 LLX-1-留兰香 NM-柠檬薄荷 BH-薄荷 ZS-紫苏 XX-1、XX-2-夏香薄荷 MG-美国薄荷 XS-香水薄荷 Y-野薄荷，下同

DS-1-*Salvia miltiorrhiza* Bge. DY-1, DY-2-*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) O. Ktze. HJ-1, HJ-2-*Mentha piperita* Linn. M-1, M-2-*Nepeta cataria* L. LLX-1-*Mentha spicata* Linn. NM-*Mentha citrata* Ehrh. BH-*Mentha haplocalyx* Briq. ZS-*Perilla frutescens* (L.) Britt. XX-1, XX-2-*Satureja hortensis* L. MG-*Monarda didyma* L. XS-*Mentha arvensis* L. Y-*Epimeredi indica* (L.) Rothm, same as below

图 1 供试部分种质资源的叶片形态

Fig. 1 Leaf morphology of some resources

片形状进行观察。其中，丹参、猫薄荷及紫苏叶片形状呈卵圆形，其余种质资源叶片均为不同程度的椭圆形状。猫薄荷、留兰香及胡椒薄荷叶片皱缩程度明显，薄荷及紫苏叶面平整，皱缩程度最小。除美国薄荷、胡椒薄荷及柠檬薄荷叶缘锯齿较尖锐外，其余品种叶缘锯齿均圆钝。胡椒薄荷叶片深绿色，其余品种颜色较浅。观察叶片表面叶绒毛的密度，按 1~5 分为 5 个等级，密度依次增大，丹参叶片绒毛密度为 5，胡椒薄荷、柠檬薄荷、夏香薄荷、野薄荷、美国薄荷为 4，猫薄荷、薄荷为 3，香水薄荷、大叶薄荷为 2，留兰香及紫苏为 1。与陈军<sup>[13]</sup>的研究结果一致。紫苏叶脉呈紫色，其余叶

脉均为淡绿色，有不同程度的绒毛包被。

观察可见叶片下表面有密度不等的凹点状腺鳞分布（图 2），按 1~5 分为 5 个等级，密度依次增大，其中，大叶薄荷、猫薄荷、紫苏、留兰香、薄荷、香水薄荷下表面腺鳞密度记为 5，柠檬薄荷、夏香薄荷记为 4，丹参、美国薄荷记为 3，野薄荷、美国薄荷及胡椒薄荷在相同视野下的腺鳞数量最少，记为 1。且大叶薄荷、猫薄荷及紫苏腺鳞沿叶脉分布，其余品种植物腺鳞在叶片各处散在分布。此外，丹参、胡椒薄荷、柠檬薄荷、夏香薄荷、香水薄荷叶片表面有浓密的绒毛包被，其余品种仅有少量绒毛或无绒毛包被（表 3）。

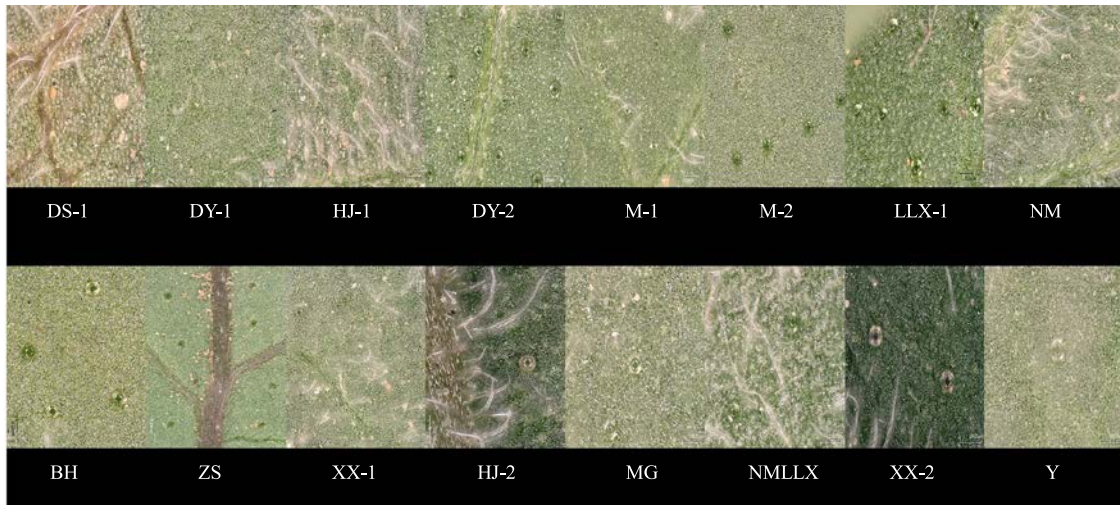


图 2 供试部分种质资源的叶片下表面腺鳞分布情况

Fig. 2 Distribution of leaf lower surface glandular scale of some resources

表 3 薄荷及其近缘物种叶的形态特征

Table 3 Morphological characteristics of leaves of *M. haplocalyx* and its related species

种	叶片	表面	
		绒毛	腺鳞
丹参	叶片卵圆形	5	3
大叶薄荷	叶片尖卵圆形	2	5
胡椒薄荷	叶片深绿色，边缘锯齿尖锐，表面皱缩	4	1
猫薄荷	叶片卵圆形，皱缩明显	3	5
留兰香	皱缩明显	1	5
柠檬薄荷	叶片边缘锯齿尖锐	4	4
薄荷	叶片皱缩不甚明显	3	5
紫苏	叶片卵圆形，皱缩不明显	1	5
夏香薄荷	叶脉明显	4	4
美国薄荷	叶片边缘锯齿尖锐	4	1
香水薄荷	叶片颜色深绿色	2	5
野薄荷	叶脉明显，分支清晰	4	1
柠檬留兰香	叶片椭圆形	4	3

1~5 表示密度依次增大

From 1 to 5 indicate an increase in density

### 3.2 薄荷及其近缘物种遗传距离

根据 K2P 遗传距离计算（表 4），薄荷及各近缘物种间的遗传距离为 0.076~0.497，采集样品中胡椒薄荷、柠檬留兰香、美国薄荷、野薄荷间遗传距离最小，为 0，其亲缘关系最近，有可能为一个种。胡椒薄荷、柠檬留兰香、美国薄荷、野薄荷与夏香薄荷的遗传距离最大，为 0.497，亲缘关系最远。其中留兰香与薄荷的遗传距离较近（0.076），大叶薄荷与薄荷的遗传距离较远（0.435），结果表明，留兰香的变异程度较小，与薄荷亲缘关系最近。

### 3.3 聚类分析

对测序成功的序列在 NCBI 网站进行 BLAST 相似性检索，均有较好的匹配度，确认为目标序列。为使实验结果更加清晰，加入 GenBank 下载的相关序列（G-BH、G-XS、G-XX、G-HJ、G-MG、G-NM、G-ZS、G-DY、G-M），构建 NJ 树。

表 4 薄荷与其近缘物种间的遗传距离

Table 4 Genetic distance in *M. haplocalyx* and its related species

物种	DS-2	HJ-2	NMLLX	MG	Y	XS	XX-2	BH
DS-2	1.000							
HJ-2	0.309	1.000						
NMLLX	0.309	0.000	1.000					
MG	0.309	0.000	0.000	1.000				
Y	0.309	0.000	0.000	0.000	1.000			
XS	0.129	0.319	0.319	0.319	0.319	1.000		
XX-2	0.291	0.497	0.497	0.497	0.497	0.191	1.000	
BH	0.108	0.337	0.337	0.337	0.337	0.091	0.256	1.000

物种	BH	DS-1	DY-1	DY-2	M-2	LLX-1	NM	ZS
BH	1.000							
DS-1	0.193	1.000						
DY-1	0.435	0.415	1.000					
DY-2	0.198	0.097	0.366	1.000				
M-2	0.235	0.176	0.434	0.155	1.000			
LLX-1	0.076	0.118	0.396	0.122	0.194	1.000		
NM	0.249	0.213	0.322	0.188	0.241	0.195	1.000	
ZS	0.198	0.106	0.399	0.085	0.195	0.129	0.206	1.000

基于 ITS2 序列构建薄荷及其近缘物种间的 NJ 系统聚类树 (图 3) 中发育树主要分为 4 支, 薄荷、香水薄荷各自单独聚为一支。大叶薄荷、柠檬薄荷、猫薄荷、丹参、紫苏、种植薄荷、留兰香聚为一支, 其中种植薄荷与留兰香亲缘关系较近, 聚为一支; 丹参与紫苏亲缘关系较近, 聚为一支。夏香薄荷、胡椒薄荷、美国薄荷聚为一支, 与上述物种亲缘关系较远。

基于 psbA-trnH 序列构建薄荷及其近缘物种间的 NJ 系统聚类树 (图 4)。从聚类树上可以看出, 薄荷及其近缘物种分为 3 支, 其中香水薄荷、夏香

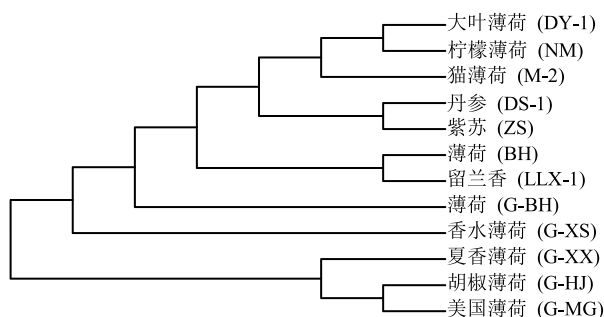


图 3 基于 ITS2 序列构建的薄荷及其近缘物种 NJ 树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of *M. haplocalyx* and its related species constructed with ITS2 sequences using NJ method

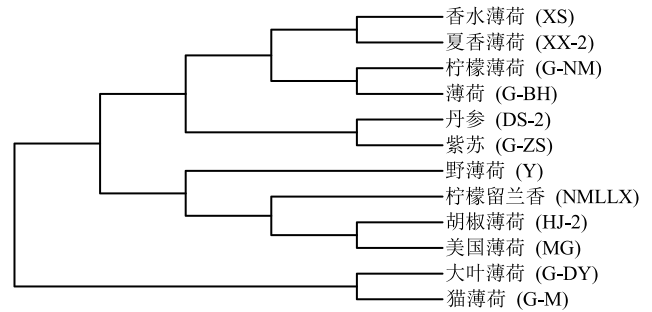


图 4 基于 psbA-trnH 序列构建的薄荷及其近缘物种 NJ 树  
Fig. 4 Phylogenetic tree of *M. haplocalyx* and its related species constructed with psbA-trnH sequences using NJ method

薄荷、柠檬薄荷、薄荷、丹参、紫苏聚为一类, 野薄荷、柠檬留兰香、胡椒薄荷、美国薄荷聚为一类, 大叶薄荷与猫薄荷聚为一类, 各支支持率较高, 表现出良好的单系性。结果表明, ITS2 和 psbA-trnH 均能作为薄荷及其近缘物种的 DNA 条形码, 其中 psbA-trnH 较 ITS2 更为保守。

#### 4 讨论

微性状鉴别是性状鉴定向微观领域的延伸, 通过观察、拍摄药材表面的细微特征信息达到鉴别的目的<sup>[14]</sup>。本研究通过对收集的薄荷及其近缘物种种质资源的微性状进行观察、统计发现薄荷属植物外部形态变异广泛, 遗传多样性十分丰富, 在叶片性状、皱缩程度、叶表面绒毛密度、叶的边缘形状、叶脉颜色等性状上表现出差异, 因此可通过微性状区分薄荷及其近缘物种。根据叶绒毛密度对薄荷及其近缘物种分类, 结果显示胡椒薄荷、柠檬薄荷、夏香薄荷、野薄荷、美国薄荷归为一类, 猫薄荷与薄荷归为一类, 香水薄荷与大叶薄荷归为一类, 留兰香与紫苏归为一类, 丹参自为一类。

腺鳞是特化的腺毛组织, 腺鳞的分泌细胞外存在致密的角质层, 角质层与分泌细胞所形成的空腔为腺毛的分泌物提供了储存场所<sup>[15]</sup>。薄荷腺鳞是一个完整的植物组织, 受到整体植株调控<sup>[16]</sup>, 因此腺鳞能够指示薄荷及近缘物种的性状差别, 能够作为薄荷及其近缘物种的鉴定依据。本研究对腺鳞进行观察统计, 结果显示大叶薄荷、猫薄荷、紫苏、留兰香、薄荷及香水薄荷聚为一类, 柠檬薄荷与夏香薄荷聚为一类, 野薄荷、胡椒薄荷与美国薄荷聚为一类, 丹参自为一类。与叶的绒毛密度为标准的分类结果相一致, 再次证明此分类方法能够作为薄



荷及其近缘物种的鉴定依据。

薄荷分布广泛、种类多、有性与无性繁殖并存，再加上生态环境的影响，造成薄荷的鉴别困难<sup>[17]</sup>，植物 DNA 序列现被大量应用于药材的分子鉴定，目前已成为植物分类和鉴定研究的热点<sup>[18]</sup>，对于亲缘很近的物种，单一片段的分析存在局限性，应用多个片段结合的方法可以获得更全面的信息<sup>[19]</sup>，为了更好地解决薄荷鉴定难的问题，本研究在微性状鉴别的基础上，应用 ITS2 条形码及 psbA-trnH 条形码对测序成功的薄荷及其近缘物种的序列进行分析对比研究，与庞晓慧等<sup>[17]</sup>研究结果不同，薄荷与胡椒薄荷亲缘关系较远，而与留兰香的亲缘关系较近。本研究结果表明薄荷与留兰香的亲缘关系近于薄荷与胡椒薄荷的亲缘关系。同时，结果显示香水薄荷与夏香薄荷亲缘关系近，丹参与紫苏亲缘关系近，胡椒薄荷与美国薄荷亲缘关系近，大叶薄荷与猫薄荷亲缘关系近。结果表明该条形码能够有效地将薄荷及其近缘物种区分开，进一步验证了 ITS2 结合 psbA-trnH 序列可以作为薄荷鉴定的 DNA 条形码。

#### 参考文献

- [1] 束雅春, 段煜, 陈亚军, 等. 薄荷-荆芥药对与单味药挥发性成分分析及体外抑菌作用比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 6-13.
- [2] 王少铭, 李德文, 罗莉斯, 等. 薄荷种质资源形态性状遗传多样性 [J]. 贵州农业科学, 2018, 46(8): 6-10.
- [3] 梁呈元, 刘艳, 李维林, 等. 薄荷属植物遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中药材, 2011, 34(8): 1190-1193.
- [4] 乐云辰, 吴亚妮, 张艳玲, 等. 不同薄荷品种遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2008(1): 29-32.
- [5] 段宝忠, 李巍, 邓海星, 等. 基于 DNA 条形码技术的民族药紫丹参及其近缘种鉴定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1204-1211.
- [6] Techen N, Parveen I, Pan Z Q, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opin Biotech*, 2014, 25(1): 103-110.
- [7] 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.
- [8] Cheng X W, Su X Q, Chen X H, *et al.* Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput sequencing: The story for Liuwei Dihuang Wan [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(1): 5147-5159.
- [9] Newmaster S G, Grguric M, Shanmughanandhan D, *et al.* DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products [J]. *BMC Med*, 2013, 11(1): 222-235.
- [10] Coghlan M L, Haile J, Houston J, *et al.* Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4): 436-446.
- [11] 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): 8613-8621.
- [12] 张彬. 当归属药用植物及药材的 DNA 条形码鉴别研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.
- [13] 陈军. 我国薄荷属植物特性及利用 (II) [J]. 林产工业, 2011, 38(4): 54-55.
- [14] 周建理, 杨青山. 中药微性状鉴定法 [J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(1): 66-68.
- [15] Gershenzon J, Mc Caskill D, Rajaonarivony J I, *et al.* Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products [J]. *Anal Biochem*, 1992, 200(1): 130-138.
- [16] 蒋征, 王红, 吴啟南, 等. 药用植物腺毛研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4118-4126.
- [17] 庞晓慧, 徐海滨, 韩建萍, 等. 中药材薄荷的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1114-1117.
- [18] 陈士林, 姚辉, 宋经元. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [19] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. ITS 和 psbA-trnH 序列鉴别绿绒蒿属藏药植物 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 541-545.