

基于 ITS2 序列的东北透骨草及其混伪品 DNA 分子鉴定

马丽杰¹, 吴云², 谷巍^{1*}, 田荣¹, 周晨¹, 王帆¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 应用 ITS2 条形码鉴定东北透骨草及其混伪品, 为东北透骨草药材鉴定提供新方法。**方法** 提取 35 份东北透骨草及其混伪品的基因组 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 13 种东北透骨草及其混伪品 ITS2 序列 42 条; 对提交与下载的 77 条序列, 应用 MEGA 7.0 软件进行序列比对, 计算种内和种间遗传距离, 构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树, 并预测 ITS2 二级结构。**结果** 东北透骨草 3 种基原的种内最大 K2P 遗传距离均远远小于其与混伪品的种间最小 K2P 遗传距离; NJ 树结果显示东北透骨草及其混伪品药用植物均可明显区分, 表现出良好的单系性; 比较 ITS2 二级结构发现, 东北透骨草与其混伪品在 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。**结论** ITS2 序列作为 DNA 条形码能稳定、准确鉴别东北透骨草, 为保障安全用药提供了新的技术手段。

关键词: 透骨草; 混伪品; ITS2; 物种鉴定; DNA 条形码

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)23-5830-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.026

Molecular identification of *Tougucao* and its adulterants based on ITS2 sequence

MA Li-jie¹, WU Yun², GU Wei¹, TIAN Rong¹, ZHOU Chen¹, WANG Fan¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** ITS2 barcoding was used to discriminate *Tougucao* and its adulterants in order to provide a new method for the identification of *Tougucao*. **Methods** The total genomic DNAs were extracted from 35 samples of *Tougucao* and its adulterants. 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 42 samples belonging to 13 species were downloaded from the GenBank. Genetic distance, neighbor joining (NJ) phylogenetic tree and secondary structures of ITS2 sequences were analyzed by using MEGA 7.0. **Results** The maximum intraspecific genetic distance (K2P distance) was much smaller than the minimum interspecific genetic distance between *Tougucao* and its adulterants. The NJ tree showed that *Tougucao* and its adulterants could be distinguished obviously, which showed high monophyly. Comparing the secondary structure of ITS2 among *Tougucao* and its adulterants, it was found that there were significant differences in the number, size, position of loop, and the angle of helix exertion. **Conclusion** As a DNA barcode, ITS2 sequences can stably and accurately distinguish *Tougucao* from its adulterants and it can also provide a new technique to ensure the clinical safety in utilization of Chinese materia medica.

Key words: *Tougucao*; adulterants; ITS2; species identification; DNA barcode

透骨草为中医外科常用药, 具有祛风除湿、活血止痛之功, 可用于风湿疼痛、疮疡肿毒等^[1]。一直以来, 透骨草基原极为复杂, 品种混乱, 同名异物现象较严重, 据文献记载, 作为药材透骨草或称为透骨草且在不同地区使用的原植物共有 21 科 45 种 5

变种, 包括东北透骨草、珍珠透骨草、凤仙透骨草、铁线透骨草、羊角透骨草等^[2-3]。有报道表明, 这些来源于不同科属植物的透骨草在所含成分、药理作用、功效和毒性等方面存在较大的差异^[4-5]。东北透骨草为豆科野豌豆属植物山野豌豆 *V. amoena* Fisch.

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 2018 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2018]43 号); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目(ZDXM-3-24); 江苏省中药优势学科 II 期建设项目(yssk-2014)

作者简介: 马丽杰(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药检验与分析。Tel: 15951836592 E-mail: 2351588576@qq.com

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

ex DC.、广布野豌豆 *V. cracca* L.、大叶野豌豆 *V. pseudorobus* Fisch. et Mey. 的干燥地上部分,在辽宁、吉林、黑龙江 3 省广为使用。然而,凤仙花、地构叶、黄花铁线莲、角蒿等植物在许多地区也作透骨草使用,同名异物现象严重导致药材市场东北透骨草药材商品混乱;且野豌豆属种类繁多,各物种原植物形态、药材性状及显微特征方面极为相似,近缘种混伪品较多、真伪难辨,造成了药材质量不稳定,难以保证临床用药的安全、稳定和有效,故为了临床用药准确,对其从分子水平上进行鉴别尤为重要。

DNA 条形码是当前生物分类学的热门技术,是利用一段有足够变异的、易扩增且相对较短的标准 DNA 片段(500~1 000 bp)对物种进行快速、准确的自动鉴定^[6]。作为 DNA 候选序列的 ITS2 片段因其具有较强引物通用性、较高测序成功率以及足够

的序列变异性^[7],而被大家广泛关注,其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^[8-13],但将 ITS2 序列用于东北透骨草及其混伪品的鉴别,尚未见相关报道。因此,本研究利用 ITS2 序列对东北透骨草及其同科属近缘物种和同名异物混伪品进行 DNA 分子鉴定,为东北透骨草的快速、准确鉴定及用药安全提供科学依据。

1 材料

在东北透骨草主要分布地区吉林、辽宁、北京、江苏等地收集广布野豌豆、山野豌豆、大叶野豌豆及其混伪品药用植物样品 35 份,样品均经南京中医药大学谷巍教授鉴定,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,实验材料信息见表 1。从 GenBank 数据库中下载了东北透骨草及其混伪品药用植物 ITS2 序列共 42 条,样品信息见表 2。

表 1 实验材料产地及其 ITS2 序列信息

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

编号	植物名	单倍型	序列长度/bp	GC/%	GenBank 登录号	产地
1	广布野豌豆 <i>Vicia cracca</i> L.	A1	201	45.8	MN080834	辽宁丹东
2	广布野豌豆	A1	201	45.8	MN080835	贵州贵阳
3	广布野豌豆	A1	201	45.8	MN080836	辽宁大连
4	广布野豌豆	A2	201	45.8	MN080837	吉林长春
5	广布野豌豆	A2	201	45.8	MN080838	辽宁大连
6	山野豌豆 <i>V. amoena</i> Fisch. ex DC.	B1	214	47.7	MN080841	北京房山
7	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080842	北京房山
8	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080843	北京房山
9	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080844	北京房山
10	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080845	北京房山
11	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080846	辽宁丹东
12	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080847	吉林长春
13	山野豌豆	B1	214	47.7	MN080848	辽宁大连
14	大叶野豌豆 <i>V. pseudorobus</i> Fisch. et Mey.	C1	214	47.7	MN080827	辽宁丹东
15	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080828	辽宁丹东
16	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080829	辽宁丹东
17	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080830	辽宁丹东
18	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080831	北京房山
19	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080832	北京房山
20	大叶野豌豆	C1	214	47.7	MN080833	北京房山
21	救荒野豌豆 <i>V. sativa</i> L.	D1	214	46.3	MN080809	贵州贵阳
22	救荒野豌豆	D1	214	46.3	MN080810	山东蒙阴
23	救荒野豌豆	D2	214	46.3	MN080811	贵州贵阳
24	歪头菜 <i>V. unijuga</i> A.	E1	214	47.7	MN080805	辽宁大连
25	北野豌豆 <i>V. ramuliflora</i> (Maxim.) Ohwi	F1	214	47.2	MN080806	辽宁大连
26	鹿藿 <i>Rhynchosia volubilis</i> L.	G1	225	44.9	MN080807	江苏南京
27	鹿藿	G1	225	44.9	MN080808	江苏南京
28	地构叶 <i>Speranskia tuberculata</i> (Bunge.) Baill.	L1	227	58.6	MN080818	吉林长春
29	地构叶	L2	227	59.0	MN080819	山西万荣
30	凤仙花 <i>Impatiens balsamina</i> L.	M1	199	50.3	MN080820	江苏南京
31	凤仙花	M1	199	50.3	MN080821	贵州龙里
32	凤仙花	M1	199	50.3	MN080822	江苏南京
33	凤仙花	M1	199	50.3	MN080823	江苏南京
34	凤仙花	M1	199	50.3	MN080824	江苏南京
35	黄花铁线莲 <i>Clematis intricate</i> Bunge	N1	228	65.4	MN080825	河北赤城

表 2 GenBank 下载东北透骨草及其混伪品 ITS2 序列

Table 2 ITS2 sequences of Tougucao and its adulterants downloaded from GenBank

植物名	单倍型	GenBank 登录号	植物名	单倍型	GenBank 登录号
广布野豌豆	A1	KT270875.1	北野豌豆	F1	KJ417928.1
广布野豌豆	A1	KT270876.1	多茎野豌豆	H1	JQ309791.1
广布野豌豆	A1	KT270874.1	多茎野豌豆	H1	MH548028.1
山野豌豆	B1	KT270925.1	多茎野豌豆	H1	MH548027.1
山野豌豆	B1	KT270923.1	多茎野豌豆	H1	KR029993.1
山野豌豆	B1	KT270921.1	多茎野豌豆	H1	KR029992.1
山野豌豆	B1	KT270869.1	黑龙江野豌豆	I1	KJ417926.1
山野豌豆	B1	KT270866.1	黑龙江野豌豆	I1	JQ309789.1
大叶野豌豆	C1	KR029996.1	黑龙江野豌豆	I1	MH547995.1
大叶野豌豆	C1	KR029995.1	黑龙江野豌豆	I1	MH547994.1
大叶野豌豆	C1	KR029994.1	小巢菜 <i>Vicia hirsute</i> (L.) S. F. Gray.	J1	AB185890.1
大叶野豌豆	C1	KT270920.1	小巢菜	J1	MG235367.1
大叶野豌豆	C1	KT270889.1	长柔毛野豌豆 <i>Vicia villosa</i> Roth	K1	MG236957.1
大叶野豌豆	C1	KT270888.1	长柔毛野豌豆	K1	MG236900.1
救荒野豌豆	D1	DQ312198.1	长柔毛野豌豆	K1	MG236376.1
歪头菜	E1	JQ309790.1	凤仙花 <i>Impatiens balsamina</i> L.	M1	KY082768.1
北野豌豆	F1	JQ309793.1	凤仙花	M1	KT582062.1
北野豌豆	F1	KR029985.1	黄花铁线莲	N1	JN809683.1
北野豌豆	F1	KR029984.1	黄花铁线莲	N2	KT270926.1
北野豌豆	F1	KJ417930.1	黄花铁线莲	N3	KT270924.1
北野豌豆	F1	KJ417929.1	角蒿 <i>Incarvillea sinensis</i> Lam.	O1	KX181010.1

2 方法

2.1 仪器与试剂

Sigma 3-18K 高速冷冻离心机 (Sigma 公司, 德国); Compact 水平蛋白电泳仪 (Biometra 公司, 德国); Bio-Rad C1000PCR 扩增仪 (Bio-Rad 公司, 美国); Gel DocXR+凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 德国); 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生物有限公司); 引物由上海捷瑞有限公司合成。

2.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

将所收集的植物样品快速运输到实验室, 在实验室除去泥沙, 清洗干净, 采用硅胶对样品进行干燥。每份样品取约 30 mg, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech 有限公司, 中国) 提取总 DNA, PCR 扩增依照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则, 正向引物 ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; 反向引物 ITS2R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积 25.0 μ L, 体系包含 $MgCl_2$ 2.0 μ L (25 mmol/L), dNTP 2.0 μ L (2.5 mmol/L), PCR 缓冲液 2.5 μ L ($\times 10$), 引物各 1.0 μ L (2.5 μ mol/L)

(Generay 有限公司, 中国), rTaq 酶 0.25 μ L, 模板 DNA 2.0 μ L, 双蒸水 14.25 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 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。测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 每个样本重复 3 次测序。

2.3 数据处理

测序后所得峰图采用 Codon Code Aligner V5.1.3 (Codon Code 有限公司, 美国) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区^[14], 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^[15] (可将序列提交至 <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de> 进行注释), 获得标准 ITS2 间隔区序列。研究采用 MEGA 7.0^[16]软件比对所有序列, 计算种内序列变异和种间序列变异, 不同物种的单倍型为 A1、B1, 同一物种存在变异位点的单倍型为 A1、A2, 分析变异位点的信息确定不同的单倍型^[17], 构建 neighbor joining (NJ) 系统进化树^[18]评估各物种之间的亲缘性。根据 Koetschan 等^[19]建立的 ITS2 数据库及

其网站预测 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 东北透骨草及其混伪品 PCR 扩增效率及测序成功率

对东北透骨草及其混伪品药用植物的 35 个样

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%, 序列获得率亦为 100%, 经 1.0% 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, 序列长度均在 500 bp 左右。

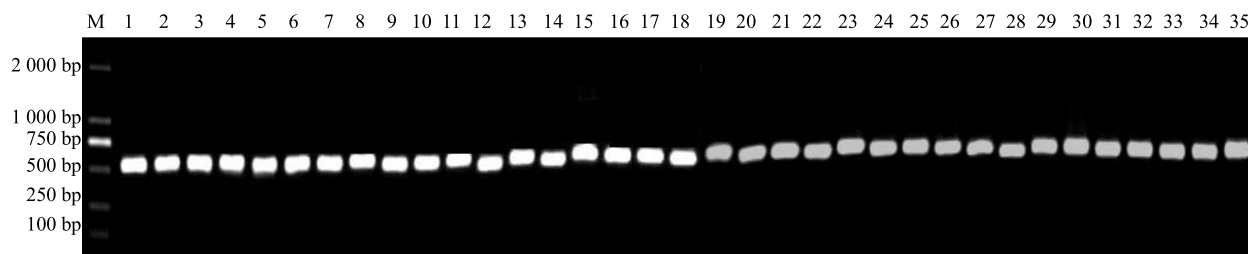


图 1 样本的 ITS2 序列凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ITS2 sequences of samples

3.2 ITS2 序列差异研究

广布野豌豆不同来源的 ITS2 序列共 8 条, 序列长度为 201 bp, ITS2 序列的 GC 含量为 45.8%, 种内 K2P 遗传距离为 0~0.005 0; 山野豌豆不同来源的 ITS2 序列共 13 条, 序列长度为 214 bp, ITS2 序列的 GC 含量为 47.7%, 种内 K2P 遗传距离为 0; 大叶野豌豆不同来源的 ITS2 序列共 13 条, 序列长度为 214 bp, ITS2 序列的 GC 含量为 47.7%, 种内 K2P 遗传距离为 0; 广布野豌豆与山野豌豆、假香野豌豆的种间 K2P 遗传距离为 0.009 4~0.030 5, 广布野豌豆、山野豌豆、大叶野豌豆与东北透骨草混伪品的种间 K2P 遗传距离分别为 0.020 2~1.018 8、0.004 7~1.030 3、0.004 7~1.015 1。东北透骨草 3 种基原种内最大遗传距离均小于其与混伪品的种间最小遗传距离, 亦均小于 3 种基原的种间最小遗传距离, 具有明显的条形码间距。

实验样品各物种 ITS2 序列, 长度、GC 含量见表 1。将实验数据和 GenBank 数据库下载的东北透骨草及其混伪品药用植物数据结合, 在更大样本量下考察东北透骨草及其混伪品的变异情况。结果表明, 东北透骨草及其混伪品的种间变异差异明显, ITS2 可以将其区分开, 东北透骨草 3 种基原之间变异差异也较为明显, 可以加以区分。

3.3 ITS2 序列变异位点分析

通过对不同来源的东北透骨草及其混伪品植物 ITS2 序列分析, 发现广布野豌豆种内存在 1 个变异位点, 有 2 个单倍型; 救荒野豌豆种内有 2 个单倍型, 6 个变异位点; 地构叶种内有 2 个单倍型,

1 个变异位点; 黄花铁线莲种内有 3 个单倍型, 1 个变异位点; 山野豌豆、大叶野豌豆、北野豌豆、歪头菜、鹿藿、多茎野豌豆、黑龙江野豌豆、小巢菜、长柔毛野豌豆、凤仙花、角蒿种内 ITS2 序列一致, 未发现变异位点, 均为一个单倍型。广布野豌豆与大叶野豌豆 ITS2 序列种间存在 6 个变异位点, 广布野豌豆与山野豌豆 ITS2 序列种间存在 5 个变异位点, 山野豌豆与大叶野豌豆 ITS2 序列种间存在 2 个变异位点, 3 种基原东北透骨草与其混伪品均存在多个变异位点, 各物种 ITS2 序列对比见图 2。

3.4 NJ 树分析

采用相似性搜索法 (BLAST1) 和最近距离法 (nearest distance) 对东北透骨草及其混伪品进行鉴定研究, 2 种方法分析结果均表明 ITS2 序列可以准确地将 3 种东北透骨草之间及与混伪品鉴别开。为了更直观地反映鉴定结果, 本研究基于相似性搜索法和最近距离法结果构建了 NJ 系统聚类树, bootstrap 1 000 次重复, 枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$, 见图 3。结果表明, 4 科 6 属 15 个物种的样本被聚为 3 大支, 野豌豆属植物聚为一大支, 鹿藿属植物鹿藿聚为一支, 凤仙花、地构叶、黄花铁线莲、角蒿与其他物种遗传距离较远, 单独聚为一大支。其中, 野豌豆属植物一大支中, 广布野豌豆、山野豌豆、大叶野豌豆、救荒野豌豆、歪头菜、北野豌豆、黑龙江野豌豆、长柔毛野豌豆、多茎野豌豆、小巢菜各自聚为一支, 物种之间可明显区分开。

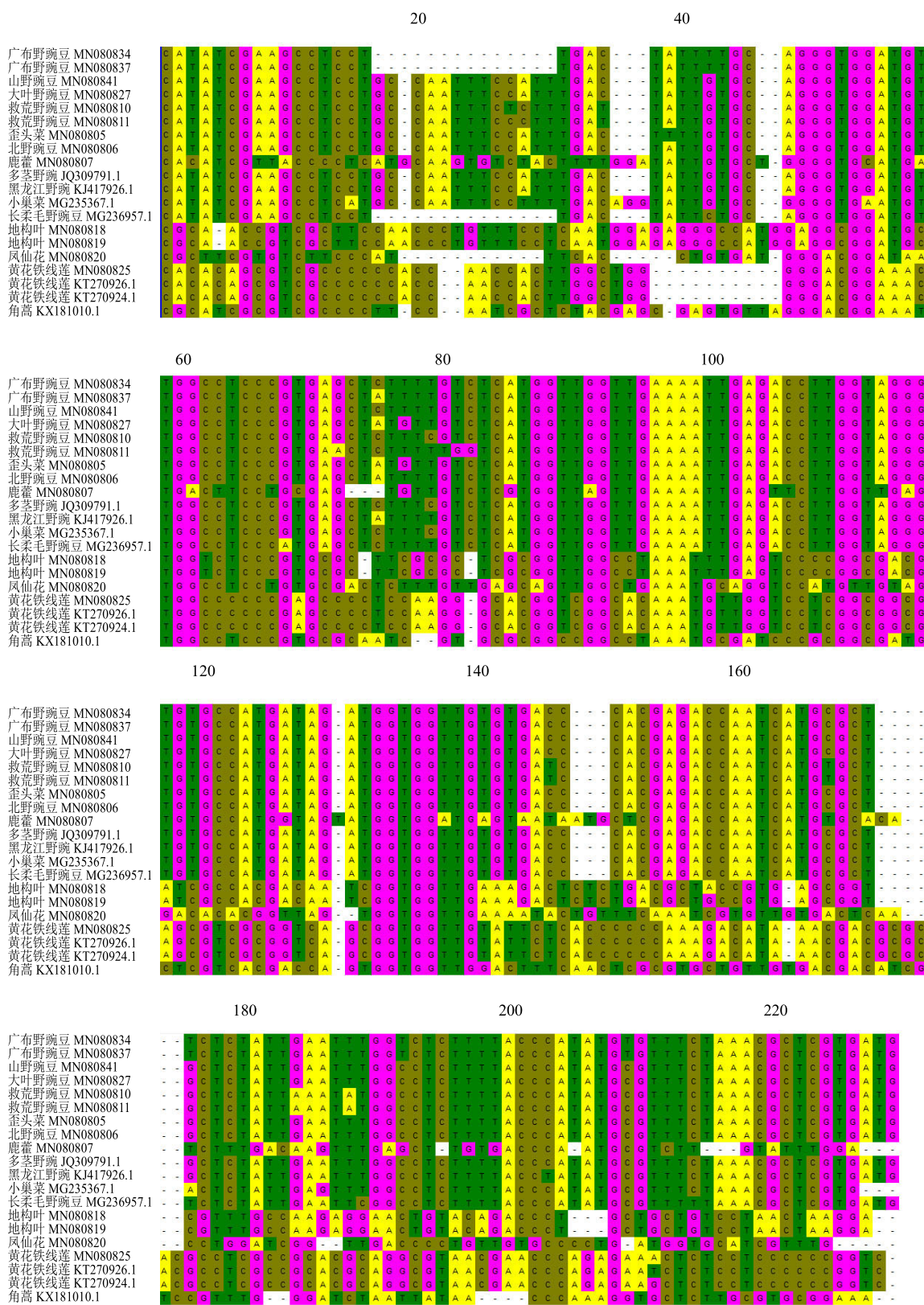
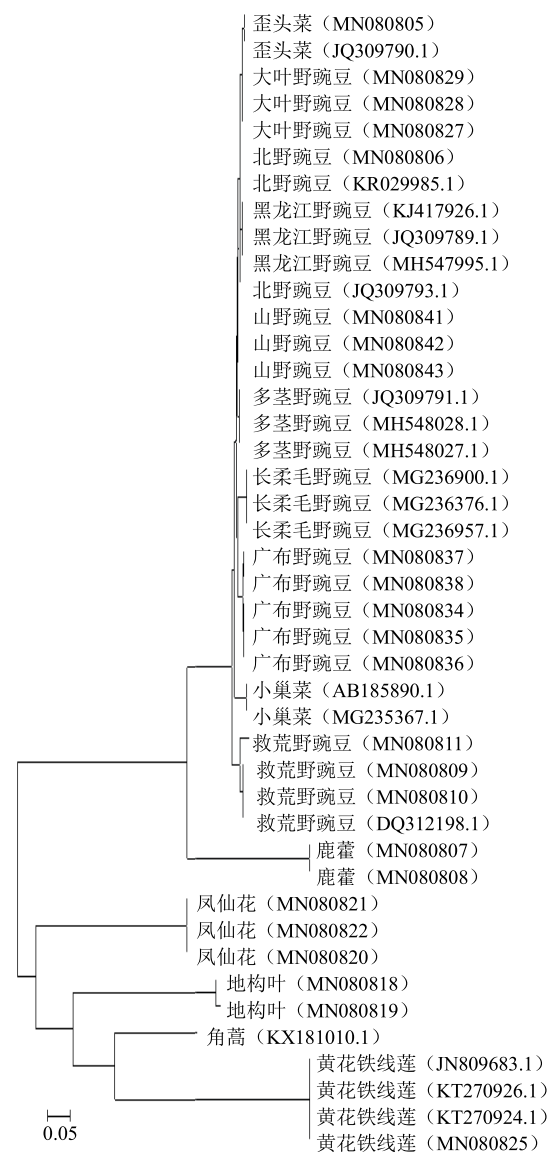


图 2 东北透骨草与其混伪品 ITS2 序列比对

Fig. 2 Interspecific alignment of ITS2 sequences in Tougucao and its adulterants



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 3 基于 ITS2 序列构建的东北透骨草及其混伪品 NJ 树
Fig. 3 NJ tree based on ITS2 sequences from Tougucao and its adulterants

3.5 ITS2 序列二级结构预测

根据 Koetschan 等^[19]建立的 ITS2 数据库及其网站预测东北透骨草及其混伪品的 ITS2 二级结构(图 4), 可以看出, 所有物种的二级结构均由一个中心环(主环)及 4 个螺旋区(helix)构成, 每个螺旋上又有大小、或多或少的茎环(loop)结构。通过比较东北透骨草及其混伪品的 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, 可以直观地将东北透骨草与其

混伪品区分。

4 讨论

市场上东北透骨草经常与其他中药材混用, 其混伪品主要是近缘的物种药材或具有相同名称的药材, 这些混伪品与东北透骨草在化学成分及功效上存在一定的差异, 增加了药物中毒的风险性。传统东北透骨草鉴别有性状鉴别、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^[20], 加上传统鉴定专业技术人员十分紧缺, 传统的鉴定方法难以满足市场的需求, 因此为确保东北透骨草临床用药安全有效, 提升东北透骨草的鉴定方法是十分必要的。

DNA 条形码是近年生物学分类和鉴定工作的研究热点, 其发展迅猛, 被国内外学者所公认和应用^[21]。DNA 条形码技术可以直接从基因水平提供鉴定依据, 具有快速、准确、微量、通用性强的特点, 不受发育阶段、供试部位、环境条件的限制^[22], 将有助于非分类学专业工作者对中药用植物进行快速、准确地鉴定, 是传统鉴定方法的补充和拓展, 在中药鉴定中展示了更加广阔的应用前景^[23]。

本研究分析了东北透骨草及其近缘种、同名异物混伪品样品的 ITS2 序列, 所有实验样本的 PCR 扩增效率为 100%、序列长度均在 500 bp 左右, 仅依靠凝胶电泳图无法将东北透骨草及其混伪品区分, 需结合进一步的测序结果进行分析; 所有试验样本测序成功率及序列获得率为 100%, 说明 ITS2 在东北透骨草的鉴定中是有效的 DNA 区段, ITS2 序列引物及其反应条件针对东北透骨草药用植物稳定性较好。东北透骨草 3 种基原的种内最大 K2P 距离均远远小于其与混伪品的种间最小 K2P 距离, 并且相对于同属物种而言, 东北透骨草与非同属物种的种间遗传距离相差较大, 这可能与物种亲缘性有关; 在基于 NJ 法构建的系统聚类树中, 不同物种单独聚为一小支, 呈现出良好的单系性, ITS2 二级结构所揭示的分子形态学特征也直观显示出东北透骨草与其混伪品的明显差异。因此, 基于 ITS2 条形码可准确、简便地鉴定东北透骨草及其混伪品。将东北透骨草 DNA 条形码研究与传统的分类学鉴别相结合, 保证采集的样品分类的准确性, 建立东北透骨草 DNA 分子鉴定数据库, 可以为市场上东北透骨草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

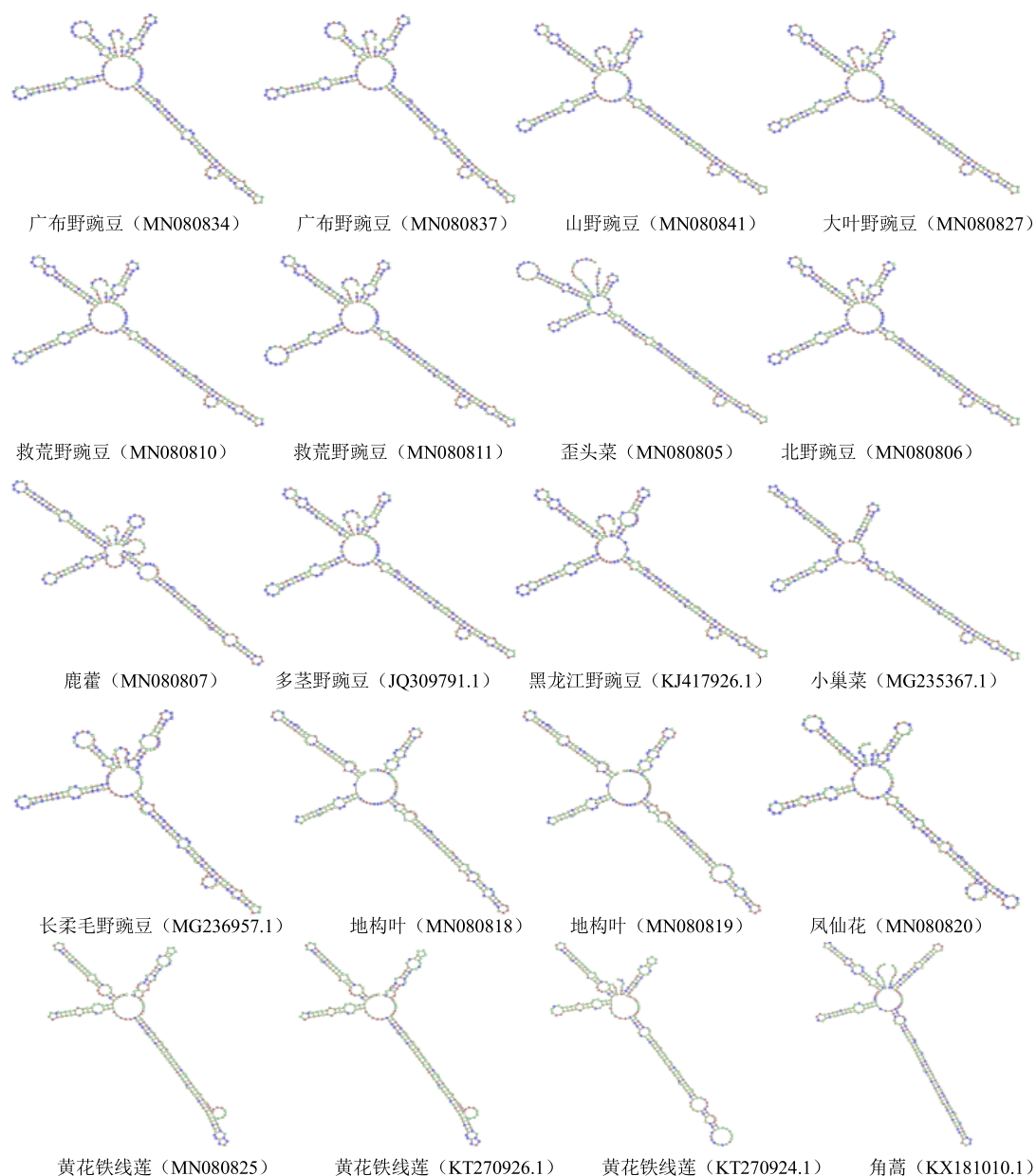


图 4 东北透骨草及其混伪品药用植物 ITS2 的二级结构

Fig. 4 Secondary structures of ITS2 sequences in Tougucao and its adulterants

准确性提供技术支持。

志谢：贵阳中医学院药学院孙庆文讲师、山东中医药大学药学院李佳讲师、辽宁中医药大学药学院许亮讲师、江苏省中医院药学部朱育凤、首都医科大学中医药学院刘长利、中国科学院植物研究所吴宝成、长春中医药大学药学院齐伟辰、南京中医药大学翰林学院李琳等在实验样品采集过程中提供帮助。

参考文献

[1] 常 安, 王维宁, 杨燕云, 等. HPLC 同时测定辽宁省

不同来源和产地透骨草中槲皮素和山柰酚的含量 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2053-2055.

[2] 桑育黎, 王 宇, 郭方岩, 等. 北方野豌豆属透骨草的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 371-375.

[3] 陈津慧. 中药透骨草的异物同名品种辨析 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(25): 50-51.

[4] 常 安, 王维宁, 杨燕云, 等. 透骨草药材 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 832-836.

[5] 夏成军. 中药透骨草的化学成分和药理活性分析 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(7): 158-159.

[6] 韩 洁, 黄琼林, 吴文如, 等. 基于 DNA 条形码的芦

- 苍属 6 种植物的分子鉴定 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1950-1955.
- [7] 彭 梓, 朱金国, 谭建锡, 等. 基于 ITS2 序列的杜仲及其主要混伪品的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 3042-3047.
- [8] Ren F M, Wang Y W, Xu Z C, *et al.* DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae [J]. *Ecol Evol*, 2019, 9(4):1934-1945.
- [9] Zhu S, Li Q W, Chen S C, *et al.* Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (ITS) region and ITS2 secondary structure [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 548-558.
- [10] Jing J Z, Xin H, Ping W, *et al.* Investigation on species authenticity for herbal products of *Celastrus orbiculatus* and *Tripterygium wilfordii* from markets using ITS2 barcoding [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 967-975.
- [11] Tahir A, Hussain F, Ahmed N. Assessing universality of DNA barcoding in geographically isolated selected desert medicinal species of Fabaceae and Poaceae [J]. *Peer J*, 2018, 6(3): e4499.
- [12] Wang X, Chen X, Yang P, *et al.* Barcoding the dendrobium (Orchidaceae) species and analysis of the intragenomic variation based on the internal transcribed spacer 2 [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017(1): 1-10.
- [13] 张婷婷, 梁勇满, 许 亮, 等. 基于高通量测序技术对五种白头翁药材混合样品的 DNA 分子鉴定研究 [J]. 药学报, 2018, 53(11): 1918-1923.
- [14] Mei Q, Chen X, Xiang L, *et al.* DNA barcode for identifying *Folium artemisiae argyi* from counterfeits [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(9): 1531-1537.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 1-57.
- [16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7):1870-1874.
- [17] 刘 琪, 谷 巍, 杨 兵, 等. 基于 ITS2 序列的滨海白首乌及其近缘种 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5901-5909.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 王广艳. 传统中药材麦冬的 DNA 条形码鉴定 [J]. 安徽农学通报, 2016, 22(24): 17-21.
- [23] Wei G, Jing Y S, Yuan C, *et al.* Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of Selaginellaceae in pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.