

## • 药材与资源 •

## 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列鉴别金线兰及其近缘种

吴岩斌<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 吴建国<sup>1</sup>, 吴锦忠<sup>1\*</sup>, 郑承剑<sup>2\*</sup>

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 海军军医大学药理学系中药鉴定学教研室, 上海 200433

**摘要:** 目的 应用 ITS2 和 psbA-trnH 条形码鉴定金线兰 *Anoectochilus roxburghii* 及其近缘种。方法 提取金线兰及其近缘种的 DNA, 对 ITS2 和 psbA-trnH 序列进行扩增和测序, 计算物种种内、种间遗传距离, 构建邻接法 (neighbor-joining, NJ) 系统聚类树直观反映鉴定结果。结果 经 PCR 扩增后测序, 金线兰及其近缘种 ITS2 序列长度为 250~254 bp, GC 含量为 48.2%~51.6%; psbA-trnH 序列长度为 636~704 bp, GC 含量为 31.8%~32.0%。根据 K2P 遗传距离计算, 金线兰的种内遗传距离明显小于种间遗传距离。基于 ITS2 序列构建的 NJ 树结果显示, 除长片金线兰 *A. longilobus* 外, 金线兰与其余混伪品可以明显区分。基于 psbA-trnH 序列构建的 NJ 树结果显示, 除长片金线兰和丽蕾金线兰 *A. lylei* 外, 金线兰与其余金线兰属近缘种可以明显区分。结论 ITS2 和 psbA-trnH 序列可以鉴别金线兰与其遗传距离较远的近缘种。

**关键词:** 金线兰属; 金线兰; DNA 条形码; ITS2 序列; psbA-trnH 序列

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5807-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.023

Identification of *Anoectochilus roxburghii* and its closely related species based on ITS2 and psbA-trnH sequencesWU Yan-bin<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, WU Jian-guo<sup>1</sup>, WU Jin-zhong<sup>1</sup>, ZHENG Cheng-jian<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Department of Chinese Medicine Authentication, Faculty of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

**Abstract: Objective** To identify *Anoectochilus roxburghii* and its closely related species using ITS2 and psbA-trnH barcode. **Methods** Total genomic DNA was isolated from *A. roxburghii* and its related species. Nuclear DNA ITS2 and chloroplast gene psbA-trnH sequences were amplified and sequenced. The Kimura 2-parameter (K2P) distances were calculated. Identification analyses was performed using Neighbor-joining (NJ) methods. **Results** After PCR amplification, the ITS2 regions of tested samples were sequenced and their lengths were from 250—254 bp, and the GC content was 48.2%—51.6%. The lengths of psbA-trnH regions ranged in size from 636 to 704 bp, with GC content ranging from 31.8%—32.0%. Based on K2P model, the intra-specific genetic distances of *A. roxburghii* in ITS2 and psbA-trnH regions were smaller than the inter-specific ones of *A. roxburghii* with its closely related species. The NJ tree based on ITS2 sequence showed that *A. roxburghii* can be distinguished clearly from its adulterants except for *A. longilobus*, while the NJ tree based on psbA-trnH sequence showed that *A. roxburghii* can be distinguished clearly from other *Anoectochilus* species except for *A. longilobus* and *A. lylei*. **Conclusion** ITS2 and psbA-trnH sequences can be used as potential DNA barcode to distinguish *A. roxburghii* from its related species with genetic distances.

**Key words:** *Anoectochilus* Blume; *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; DNA barcoding; ITS2 sequences; psbA-trnH sequences

目前, 全世界有金线兰属 *Anoectochilus* Blume 植物 40 余种, 中国有 20 种 (10 个特有种), 其中金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl 分布最

广, 储量相对较多, 分布于福建、浙江、江西、云南、广西、湖南等地区, 是福建特色中草药金线莲的基原植物<sup>[1-4]</sup>。金线莲具有清热凉血、祛风利湿、

收稿日期: 2022-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174081, 81773846); 福建省科技厅高校产学研合作项目 (2020Y4015); 上海市浦江人才计划 (21PJD082)

作者简介: 吴岩斌 (1982—), 男, 副研究员, 研究方向为中药药效物质及品质评价。E-mail: wxsq1@163.com

\*通信作者: 吴锦忠, 教授, 研究方向为中药药效物质及品质评价。E-mail: jinzhongfj@126.com

郑承剑, 教授, 研究方向为中药药效物质及品质评价。E-mail: cjzheng1984@126.com

解毒的功效<sup>[4]</sup>, 具有保肝、降血糖、抗类风湿性关节炎、抗骨质疏松、减肥等生物活性<sup>[5-9]</sup>, 临床上主要用于治疗肝炎、手足口病、糖尿病等疾病, 显示出良好的应用前景<sup>[10-14]</sup>。课题组在前期金线莲资源调查过程中发现, 除金线兰外, 台湾银线兰、丽蕾金线兰、兴仁金线兰、长片金线兰、高金线兰和滇南金线兰等金线兰属植物在民间均被当作金线莲使用。此外, 一些斑叶兰属、血叶兰属和齿唇兰属植物也常混作金线莲使用。金线兰及其近缘种形态特征相似, 从外观上难以进行快速准确地鉴定, 容易造成混用, 影响金线莲临床疗效的稳定。因此准确鉴别金线兰, 对保障金线莲药材质量具有重要的意义。本研究选用 ITS2 和 psbA-trnH 2 条序列对金线兰及其近缘种进行分子鉴定, 以期为金线兰的快速鉴定及其开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 材料

金线兰及其近缘种样品采自福建、江西、广东、广西、云南等地(采样时间 2016 年 3~8 月), 由福建中医药大学药学院黄泽豪教授和吴锦忠教授鉴定为金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.、台湾银线兰 *A. formosanus* Hayata、兴仁金线兰 *A. xingrenensis* Z. H. Tsi & X. H. Jin、丽蕾金线兰 *A. lylei* Rolfe ex Downie、长片金线兰 *A. longilobus* H. Jiang & H. Z. Tian、滇南金线兰 *A. burmannicus* Rolfe、高金线兰 *A. elatus* Lindl.、血叶兰 *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich.、大花斑叶兰 *Goodyera biflora* (Lindl.) Hook. f.、斑叶兰 *G. schlechtendaliana* Rchb. f.、小小斑叶兰 *G. yangmeishanensi* (L.) R. Br.、小斑叶兰 *G. repens* (L.) R. Br.、西南齿唇兰 *Odontochilus elwesii* C. B. Clarke ex Hook. f.、艳丽齿唇兰 *O. moulmeinensis* (Parish et Rchb. f.) T. Tang et F. T. Wang, 凭证标本保存于福建中医药大学药学院。样品信息见表 1。

### 1.2 仪器及试剂

S1000 Thermal Cycler PCR 扩增仪(美国 BIO-Rad 公司); 凝胶成像系统(美国 BIO-Rad 公司); DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); Tris 碱(合肥 biosharp 生物科技有限公司);  $\beta$ -巯基乙醇(Genview 公司); Tris 饱和酚(美国 Solarbio 公司); DL2000 DNA marker (TaKaRa 公司); PrimeSTAR Max dna Polymerase (TaKaRa 公司); GoldView (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 6 $\times$ DNA

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	拉丁名	中文名	代码	采集地
1	<i>A. roxburghii</i>	金线兰	AR1	福建漳州
2			AR2	福建漳州
3			AR3	福建漳州
4			AR4	福建漳州
5			AR5	福建龙岩
6			AR6	江西赣州
7			AR7	广东清远
8			AR8	广东清远
9			AR9	广西南宁
10			AR10	福建漳州
11			AR11	福建龙岩
12			AR12	福建漳州
13			AR13	福建漳州
14			AR14	福建漳州
15			AR15	福建三明
16			AR16	福建漳州
17			AR17	福建漳州
18			AR18	福建龙岩
19	<i>A. formosanus</i>	台湾银线兰	AF1	福建漳州
20			AF2	福建漳州
21			AF3	福建漳州
22			AF4	福建漳州
23			AF5	福建漳州
24	<i>A. xingrenensis</i>	兴仁金线兰	AX1	广西南宁
25			AX2	广西河池
26			AX3	广西南宁
27	<i>A. lylei</i>	丽蕾金线兰	LY1	广西南宁
28			LY2	广西南宁
29	<i>A. longilobus</i>	长片金线兰	AL	云南文山
30	<i>A. burmannicus</i>	滇南金线兰	AB	云南德宏
31	<i>A. elatus</i>	高金线兰	AE	云南西双版纳
32	<i>Ludisia discolor</i>	血叶兰	LD1	广西南宁
33	<i>L. discolor</i>	血叶兰	LD2	广西南宁
34	<i>Goodyera biflora</i>	大花斑叶兰	GB	贵州兴义
35	<i>G. schlechtendaliana</i>	斑叶兰	GS	浙江丽水
36	<i>G. yangmeishanensi</i>	小小斑叶兰	GY	广西河池
37	<i>G. repens</i>	小斑叶兰	GW	云南怒江
38	<i>Odontochilus elwesii</i>	西南齿唇兰	OE	云南麻栗坡
39	<i>O. moulmeinensis</i>	艳丽齿唇兰	OM	云南麻栗坡

Loading Buffer (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 琼脂糖 (Genview 公司)。

## 2 方法

### 2.1 样品 DNA 的提取、PCR 扩增和测序

取经过硅胶干燥的植物叶片约 0.5 g, 经液氮研磨后, 用改良的 CTAB 法提取总 DNA<sup>[15]</sup>。各候选序列的 PCR 反应条件, 通用引物及扩增程序参考陈士林等的研究<sup>[16]</sup>。PCR 扩增产物经纯化后, 使用 ABI3730 型基因分析仪进行双向测序。

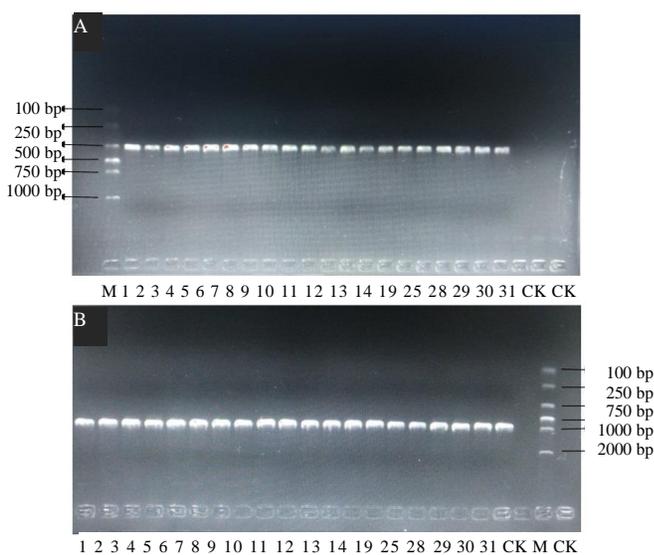
## 2.2 数据处理

测序所得到的峰图采用 Contig Express v 3.0 (Codon Code Co., 美国) 校对拼接, 去除引物区及低质量区。使用隐马尔可夫模型 HM-Mer 序列注释方法去除两端 5.8S 和 28S 区段, 获得 ITS2 序列<sup>[17]</sup>。通过与 GenBank 序列进行 Blastn 比对, 并通过参考序列进行注释, 获得 psbA-trnH 序列<sup>[18]</sup>。利用 MEGA 5.05 对序列进行比对分析, 比对后的序列统计 GC 含量, 同时采用 Kimura-2-Parameter (K2P) 模型计算遗传距离, 并基于邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 利用 bootstrap (1000 次重复) 检验各分支的支持率。

## 3 结果与分析

### 3.1 PCR 扩增产物检测

金线兰及其部分近缘种样品的 PCR 扩增成功率均为 100%, 经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, ITS2 序列在 500 bp 左右, psbA-trnH 序列在 750~1000 bp。



M-Marker CK-空白对照, 1~31 为表 1 中样品  
M-Marker CK-blank control 1—31 represent for the samples in Table 1

图 1 样本的 ITS2 (A) 和 psbA-trnH (B) 序列凝胶电泳图  
Fig. 1 Electrophoretogram of ITS2 (A) and psbA-trnH (B) sequences of samples

### 3.2 ITS2 和 psbA-trnH 序列的 GC 含量分析

通过 MEGA5.05 软件对金线兰及其近缘种 ITS2 和 psbA-trnH 序列的 GC 含量进行分析, 结果显示 (表 2), 样品 1~39 的 ITS2 序列长度为 250~254 bp, 其中金线兰与长片金线兰、滇南金线兰的 GC 含量均为 48.2%, 金线兰与台湾银线兰、兴仁金

表 2 ITS2 和 psbA-trnH 序列长度及其 GC 含量

Table 2 Length and GC content of ITS2 and psbA-trnH sequences

编号	代码	序列长度/bp		GC 含量/%	
		ITS2	psbA-trnH	ITS2	psbA-trnH
1	AR 1	253	695	48.2	31.8
2	AR 2	253	695	48.2	31.8
3	AR 3	253	695	48.2	31.8
4	AR4	253	694	48.2	31.8
5	AR5	253	695	48.2	31.8
6	AR6	253	694	48.2	31.8
7	AR7	253	695	48.2	31.8
8	AR8	253	695	48.2	31.8
9	AR9	253	695	48.2	31.8
10	AR10	253	694	48.2	31.8
11	AR11	253	695	48.2	31.8
12	AR12	253	694	48.2	31.8
13	AR13	253	695	48.2	31.8
14	AR14	253	695	48.2	31.8
15	AR15	253	694	48.2	31.8
16	AR16	253	695	48.2	31.8
17	AR17	253	695	48.2	31.8
18	AR18	253	694	48.2	31.8
19	AF1	253	701	48.6	31.8
20	AF2	253	701	48.6	31.8
21	AF3	253	701	48.6	31.8
22	AF4	253	701	48.6	31.8
23	AF5	253	702	48.6	31.8
24	AX1	253	693	48.6	32.0
25	AX2	253	693	48.6	32.0
26	AX3	253	693	48.6	32.0
27	LY1	253	636	48.6	31.9
28	LY2	253	636	48.6	31.9
29	AL	253	695	48.2	31.9
30	AB	253	704	48.2	32.0
31	AE	253	704	49.0	32.0
32	LD1	250		50.0	
33	LD2	250		50.0	
34	GB	252		50.4	
35	GS	252		49.6	
36	GY	254		49.2	
37	GR	252		51.6	
38	OE	250		50.8	
39	OM	251		49.0	

线兰、丽蕾金线兰、高金线兰、斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰、小斑叶兰、血叶兰、西南齿唇兰和艳丽齿唇兰的 GC 含量差异分别为 0.4%、0.4%、0.4%、0.8%、1.4%、2.2%、1.0%、3.4%、1.8%、2.6% 和 0.8%。样品 1~31 的 psbA-trnH 序列长度为 693~704 bp，其中金线兰与台湾银线兰的 GC 含量均为 31.8%，金线兰与兴仁金线兰、丽蕾金线兰、长片金线兰、滇南金线兰、高金线兰的 GC 含量差异分别为 0.2%、0.1%、0.1%、0.2% 和 0.2%。

### 3.3 遗传距离分析

ITS2 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示(表 3)，金线兰种内遗传距离为 0，金线兰与长片金线兰的种间遗传距离为 0，金线兰与兴仁金线兰、丽蕾金线兰、长片金线兰、滇南金线兰、高金线兰的种间遗传距离分别为 0.004 0、0.004 0、0.004 0、0.012 0、0.008 0。金线兰与斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰、小斑叶兰、血叶兰、西南齿唇兰和艳丽齿唇兰的种间遗传距离分别为 0.104 1、0.113 5、0.108 3、0.108 6、0.099 2、0.080 8、0.063 0。结果说明，基于 ITS2 序列的遗传距离，可以鉴别金线兰与兴仁金线兰、丽蕾金线兰、长片金线兰、滇南金线兰、高金线兰、斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰、小斑叶兰、血叶兰、西南齿唇兰和艳丽齿唇兰等近缘种混伪品，但是不能鉴别金线兰与长片金线兰。

psbA-trnH 序列种内种间 K2P 遗传距离结果显示(表 3)，金线兰种内遗传距离为 0，金线兰与台湾银线兰、兴仁金线兰、丽蕾金线兰、长片金线兰、滇南金线兰、高金线兰的种间遗传距离分别为 0.001 6~0.007 3，明显大于金线兰种内遗传距离。结果表明，基于 psbA-trnH 序列的遗传距离可作为鉴别金线兰与其他近缘种混伪品的重要依据。

### 3.4 金线兰及其同属近缘种 NJ 树的鉴定

利用邻接法(NJ)构建金线兰与其近缘种的 ITS2、psbA-trnH 序列的 NJ 系统发育树。ITS2 序列构建的 NJ 树结果显示(图 2)，金线兰与长片金线兰聚为一支，兴仁金线兰、丽蕾金线兰、台湾银线兰、和滇南金线兰聚为一支、高线兰单独聚为一支，西南齿唇兰、艳丽齿唇兰和血叶兰聚为一支，斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰和小斑叶兰聚为一支。基于 ITS2 序列构建的 NJ 树结果显示，除长片金线兰外，金线兰与其余近缘种混伪品可以明显区分。psbA-trnH 序列构建的 NJ 树结果显示(图 3)，18 批金线兰单独聚为一支，台湾银线兰、丽蕾金线兰、

表 3 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列的金线兰及其近缘种的 K2P 遗传距离

Table 3 K2P genetic distances of *A. roxburghii* and its closely related species based on ITS and psbA-trnH sequences

类别	ITS2 遗传距离	psbA-trnH 遗传距离
金线兰种内	0	0
金线兰与台湾银线兰种间	0.004 0	0.002 9
金线兰与兴仁金线兰种间	0.004 0	0.004 3
金线兰与丽蕾金线兰种间	0.004 0	0.001 6
金线兰与长片金线兰种间	0	0.001 4
金线兰与滇南金线兰种间	0.012 0	0.007 3
金线兰与高金线兰种间	0.008 0	0.007 3
金线兰与斑叶兰	0.104 1	
金线兰与大花斑叶兰	0.113 5	
金线兰与小小斑叶兰	0.108 3	
金线兰与小斑叶兰	0.108 6	
金线兰与血叶兰	0.099 2	
金线兰与西南齿唇兰	0.080 8	
金线兰与艳丽齿唇兰	0.063 0	

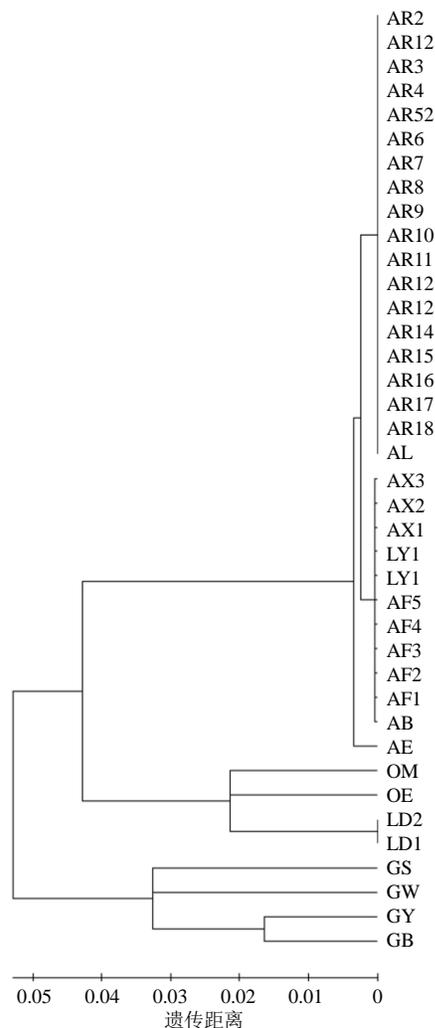


图 2 基于 NJ 法(ITS2 数据)构建系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (ITS2 data)

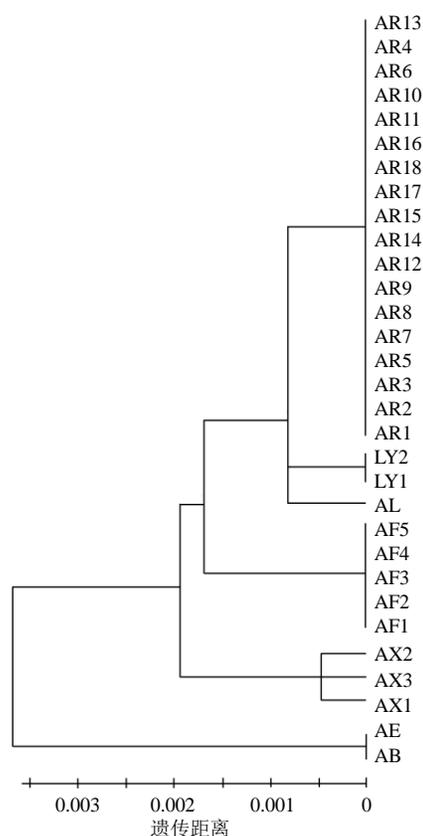


图3 基于NJ法(psbA-trnH数据)构建系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on NJ methods (psbA-trnH data)

兴仁金线兰、长片金线兰也各自聚为一支，高金线兰和滇南金线兰聚为一支，基于 psbA-trnH 序列构建的 NJ 树结果显示，金线兰与台湾银线兰、兴仁金线兰、高金线兰和滇南金线兰可以区分开；但是金线兰与丽蕾金线兰、长片金线兰较难区分，其支持率只有 39%，并未达到物种鉴定的标准。

#### 4 讨论

核基因 ITS2 片段和叶绿体基因 psbA-trnH 片段作为国际通用条形码序列，被广泛应用于药用植物的分子鉴定<sup>[19]</sup>。目前，鲜有文献对多种金线兰属植物的 DNA 条形码进行研究。Lv 等<sup>[20]</sup>在对金线兰、台湾银线兰、血叶兰、斑叶兰等 4 个物种 DNA 条形码研究中发现，ITS2 可以将金线兰与同属植物台湾银线兰、血叶兰属植物血叶兰、斑叶兰属植物斑叶兰区分开，其研究结果与本试验的 ITS2 结果一致，但应用核糖体 ITS2 序列却无法鉴别金线兰与长片金线兰。同时，本研究单独应用叶绿体 psbA-trnH 序列可较好的鉴别金线兰与台湾银线兰、兴仁金线兰、高金线兰和滇南金线兰，但不能用于

鉴别金线兰与丽蕾金线兰、长片金线兰。研究表明，物种间的 GC 含量差异可反映其亲缘关系的远近<sup>[21]</sup>。本研究通过对金线兰及其近缘种 ITS2 序列的 GC 含量差异分析可知，长片金线兰与金线兰的 GC 含量没有差异，系统发育树中可见长片金线兰与金线兰聚为一支；而在 ITS2 序列中，滇南金线兰与金线兰的 GC 含量也没有差异，但在系统发育树中滇南金线兰与金线兰却没有聚为一支。psbA-trnH 序列的 GC 含量差异分析显示，丽蕾金线兰和长片金线兰二者与金线兰 GC 含量差异均为 0.1%，说明二者与金线兰亲缘关系较近，在系统发育树中可见金线兰、丽蕾金线兰和长片金线兰聚为一大支。因此，序列的 GC 含量与金线兰属植物的亲缘关系是否存在必然联系还有待进一步研究。综上所述，ITS2 和 psbA-trnH 序列可以鉴别金线兰与其遗传距离较远的近缘种，而金线兰与长片金线兰的鉴别还需进一步研究。此外，金线兰属植物种类较多，后续研究有必要进一步扩大取样范围。本研究工作可为金线莲基原植物的鉴定及金线兰属植物的亲缘关系与分类提供有益借鉴。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志: (第二十七卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 23.
- [2] Jin Y, Sun M, Jiang H, et al. *Anoectochilus medogensis* (Goodyerinae, Cranichideae, Orchidaceae), a new species from Tibet, China [J]. *Phytotaxa*, 2021, 510(3): 213-227.
- [3] Wu Y B, Peng M C, Zhang C, et al. Quantitative determination of multi-class bioactive constituents for quality assessment of ten *Anoectochilus*, four *Goodyera* and one *Ludisia* species in China [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(4): 430-439.
- [4] 福建省食品药品监督管理局. 福建省中药饮片炮制规范 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2012: 144.
- [5] Zeng B Y, Su M H, Chen Q X, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 153: 391-398.
- [6] Zhang J G, Liu Q, Liu Z L, et al. Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 180-185.
- [7] Guo Y L, Ye Q, Yang S L, et al. Therapeutic effects of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* on type II collagen-induced arthritis in rats [J]. *Int J Biol Macromol*,

- 2019, 122: 882-892.
- [8] Hsiao H B, Lin H, Wu J B, *et al.* Ginsenoside prevents ovariectomy-induced bone loss and suppresses osteoclastogenesis by regulating classical NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(5): 1663-1676.
- [9] Tian D M, Zhong X Y, Fu L Y, *et al.* Therapeutic effect and mechanism of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. in diet-induced obesity [J]. *Phytomedicine*, 2022, 99: 154031.
- [10] 刘政芳, 李芹. 复方金线莲口服液联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎 30 例临床观察 [J]. 福建中医药, 2008, 39(5): 3-4.
- [11] 李芹, 周文, 刘路, 等. 金线莲喷雾剂治疗手足口病口腔疱疹临床观察 [J]. 福建中医药, 2012, 43(3): 9-10.
- [12] 许文江, 陈裕, 黄自强, 等. 复方金线莲胶囊治疗 II 型糖尿病初步研究 [J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(3): 47-49.
- [13] 朱细华. 金线兰治疗 II 型糖尿病 90 例 [J]. 中国民间疗法, 1999, 7(11): 34.
- [14] 江颖倩, 彭梦超, 吴建国, 等. 长片金线兰多糖对四氯化碳诱导急性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5932-5938.
- [15] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [16] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [17] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [18] Ma X Y, Xie C X, Liu C, *et al.* Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1919-1924.
- [19] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [20] Lv T W, Teng R D, Shao Q S, *et al.* DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants [J]. *Planta*, 2015, 242(5): 1167-1174.
- [21] 崔秀婷, 刘俊, 耿雅萍, 等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列的药用甘草分子鉴定 [J]. 山西农业科学, 2021, 49(2): 115-120, 203.

[责任编辑 时圣明]