

姜 钊,色里玛,李 捷,等. 基于 ITS2 序列的藏当归及易混植物 DNA 分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):58-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.008

基于 ITS2 序列的藏当归及易混植物 DNA 分子鉴定

姜 钊¹,色里玛²,李 捷¹,陈依春¹,郝婷婷¹,孙芳云¹

(1. 西藏民族大学藏药检测技术教育部工程研究中心,陕西咸阳 712082;

2. 西藏甘露藏药股份有限公司,西藏拉萨 851400)

摘要:笔者所在实验室长期从事藏药基源鉴定与药物开发,为了确保试验药材的质量及临床安全用药,运用 ITS2 条形码技术对采自西藏的藏当归及相似植物进行分子鉴定。首先,利用试剂盒提取植物叶片的 DNA,对 ITS2 序列进行 PCR 扩增,双向测序后运用 SeqMan 组装。而后,基于 ITS2 Database 中的 Annotate 注释方法去掉两端的 5.8S 区和 28S 区获得 ITS2 条形码并预测二级结构,用 MEGA 5.0 软件进行遗传距离计算并构建系统进化树(NJ)。分析发现,试验中的 4 种类似植物 ITS2 条形码间存在明显差异,结合二级结构、遗传距离、进化树位置及形态对比可知其分为 3 个物种并确定了其分类地位。试验证明,ITS2 条形码可有效快速地鉴别易混中药材的种类,为保证其临床用药安全提供了简单、高效、准确的技术手段。

关键词:ITS2 条形码;藏当归;系统发育分析;DNA 分子鉴定

中图分类号:R282.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)17-0058-05

藏当归,学名白亮独活(*Heracleum candicans* Wall. ex DC.),是伞形科独活属植物,多年生草本,花期 7—8 月,分布在尼泊尔、巴基斯坦以及我国的云南、西藏、四川等地。白亮独活植物形态与《晶珠本草》等书对珠嘎的叙述相符,具有杀虫、止血、愈疮痛、治麻风的功效,主治各种炎症、麻风、痈疽疔疮(中华本草),还用于治疗风寒感冒头痛、肢节风湿痛、白癜风及各种银屑病(《新华本草纲要》)。藏药发展至今共 1 300 多年历史,经典本草书总共 6 本:《度母本草》《医学四续》《蓝琉璃》《晶珠本草》《甘露本草》《晶镜本草》,而常用植物藏药材就有近 1 000 种^[1]。加之植物形态结构复杂,使得传统的藏药鉴定技术无法准确地进行具体藏药及其混伪品的区分,严重影响藏药的开发,也无法保证藏药的用药安全。笔者所在实验室前期对采自西藏林芝、那曲、日喀则、昌都等地的藏当归进行药效分析

试验时发现各地样本药效和外表型,尤其是根茎的形态都有差异,于是藏当归及混伪品分类地位的确定成为后期药效研究的先决条件,也是藏药开发和利用的重中之重。西藏地区藏当归分布普遍,常分布于海拔 2 000~4 000 m,而伞形科以下的分类等级常以果实的形态、有无,脊棱的形态、油管的数目等作为种属的分类依据^[2]。Widmer 等对独活属形态解剖研究表明,营养体的特征和果实的解剖特征为属以下分类的重要依据^[3]。加之有研究表明,独活属及芹亚科内的几个大属均不是单系群。因此,藏当归及相近植物鉴定困难,易混淆。

DNA 条形码技术是目前较为纯熟、快速、准确的分子鉴定方法,相较于传统的分类学研究方法更加快速、准确,在中药材的分类鉴定中有着广阔的前景。对于植物鉴定,DNA 条形码相对较多,其中有 ITS、*trnH-psbA*、*rbcL*、*matK* 等^[4-5],而核糖体 DNA 的第 2 内转录间隔区(ITS2)序列由于变异较快,能够较 ITS1 提供更多的变异位点信息,且其长度不到 300 bp,具有结构保守性高等特点,近年来已被提出作为药用植物鉴定的标准条形码序列^[6-9],并且植物 ITS2 序列在数据库中数据量较大,利于系统比较分析。本试验对采自西藏那曲、林芝、昌都、日喀则 4 个地区的 4 种相近外形和药效的植物样品基于 ITS2 基因进行分子验证,并结合形态结构,探究其分布和物种的多样性,旨在为后期实验室藏药

收稿日期:2020-12-20

基金项目:西藏民族大学青年学人培育计划(编号:19MDX01);藏药材基源研究及标准完善(编号:402040003);西藏自治区自然科学基金(编号:XZ2018 ZRG-86(Z));香莲祛痛霜的Ⅱ期临床实验(编号:2015XZOIG62)。

作者简介:姜 钊(1990—),男,陕西镇安人,博士,讲师,主要从事藏药材基源研究及分类工作。E-mail:zxmu_jiangz@163.com。

通信作者:孙芳云,教授,主要从事藏药材基源研究及药物开发工作。E-mail:zxmvfsy@163.com。

的筛选和研究奠定基础,也为藏药的应用和识别提供更多的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

药材由西藏甘露藏药股份有限公司提供,分别采自昌都卡若区城关镇(054)、日喀则康马县南尼乡(055)、林芝波密县扎木镇(056)、那曲申扎县申扎镇(057),样品采集后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存(表 1)。由笔者所在团队“藏药检测技术教育部工程研究中心”相关藏药鉴定专家进行实验室样本形态对比和鉴定,证实采集的 4 个样点部分植物表型差异明显,为不同种属植物。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 高速离心机(Eppendorf 5810R);PCR 扩增仪(Life);制冰机(IMS-50);电泳仪(JUNYI-300);凝胶成像仪(SAGECREATION);测序仪器 ABI 3730。DNA Marker[天根生化科技(北京)有限公司的 D2000,货号:MD114-01];Tris、乙二胺四乙酸(EDTA)、冰乙酸、无水乙醇(海默生物科技有限公司);植物基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司 DP305];DNA 凝胶回收试剂盒(北京擎科新业生物技术有限公司,货号:GE0101-50);PrimeSTAR HS DNA Polymerase(TaKaRa 公司)。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序 将收集的样品洗净并烘干,称取植物叶片干质量约 30~50 mg,加入液氮充分研磨成粉末状,采用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取植物基因组 DNA。PCR 扩增依照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则,采用内部转录间隔区 2(ITS2)序列^[10],扩增正向引物 5'-ATGCG ATACTTGGTGTGAAT-3',反向引物 5'-GACGCTT CTCCAGACTACAAT-3'。扩增体系(25 μL):5 \times Prime STAR Buffer 5 μL , dNTP Mixture 2 μL , PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.25 μL ,正、反向引物各 1 μL ,模板 1 μL ,双蒸水 14.75 μL 。ITS2 序列扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,33 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增后,凝胶电泳检测,之后使用 DNA 凝胶回收试剂盒(GE0101)进行 DNA 片段的纯化回收并送北京擎科新业生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据处理 测序公司返回数据利用 SeqMan 软件去除引物和低质量序列,并进行拼接。将所有个体的双向拼接序列结果利用 Keller 等的研究方法^[11](<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>)中的 Annotate 注释并去除两端的 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列,利用网站中的 Predict 预测其二级结构。结合二级结构预测结果从 NCBI 数据库下载相似性较高序列去除两端的 5.8S 和 28S 区。采用 Clustal X 软件^[12]进行多序列比对,比对结果通过 MEGA 5.0^[13]计算遗传距离(K2P)并利用邻近法(NJ)^[14]构建系统进化树,采用双参数模型(Two-parameter model),通过 Bootstrapping 进行系统发育树的评估,自展数据集为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 ITS2 条形码序列长度、GC 含量及序列差异

测序拼接后的序列经过数据库去除 5.8S 和 28S 区,4 个样品条形码序列的长度为 228~229 bp,GC 含量为 52.4%~57.5%(表 1),NCBI 下载高相似性序列数据信息见表 1。将 NCBI 收集到的高相似性序列与试验序列一起利用 MEGA 5.0 做序列间的 K2P 距离计算,结果见表 2。

从表 2 中可以看出,样品 054 与其他 3 个样品的遗传距离为 0.175,样品 055 与 056、057 的遗传距离为 0.216,056 与 057 的遗传距离为 0.000;054 与相似性最高序列的亮蛇床(*Selinum cryptotaenium*)的遗传距离为 0.009;055 与其相似性最高序列的白亮独活(*H. candicans*)的遗传距离为 0.000,同时 056 和 057 这 2 个样品与其相似性最高序列西藏凹乳芹(*Vicatia tibetica*)的遗传距离也为 0.000。说明 054、055、056 和 057 分别为 3 个不同物种,055 样品可能为藏当归(白亮独活),056 和 057 可能为同一物种(西藏凹乳芹)。

2.2 系统进化分析

将试验序列及 NCBI 得到的参考序列共 20 条序列经过统一去除 5.8S 和 28S 区,利用 Clustal X 进行多序列比对,结果通过 MEGA 5.0 构建系统进化树(NJ),见图 1-A。从进化树中可以看到,4 个样品主要集中在 3 枝,054 与伞形科亮蛇床(*S. cryptotaenium*)聚在一枝,序列相似性为 93.75%,可能为一个新种。055 与伞形科独活属的白亮独活(*H. candicans*)聚在一枝,序列相似性为 99.96%,该

表 1 材料来源及 ITS2 序列信息

编号/名称	样品/序列来源	序列长度 (bp)	GC 含量 (%)
054	西藏昌都市卡若区域关镇	228	57.5
055	西藏日喀则康马县南尼乡	228	57.4
056	西藏林芝波密县扎木镇	229	52.4
057	西藏那曲申扎县申扎镇	229	52.4
羽苞蘧本[<i>Ligusticum daucoides</i> (Franch.) Franch.]	GenBank (EU236173.1)	224	58.5
亮蛇床(<i>Selinum cryptotaenium</i> de Boiss.)	GenBank (EU236206.1)	224	58.0
滇藏细叶芹(<i>Chaerophyllopsis huai</i> de Boiss.)	GenBank (FJ385037.1)	224	57.6
红前胡(<i>Peucedanum rubricaula</i> Shan et Sheh.)	GenBank (KF806574.1)	224	58.5
地岩风(<i>Libanotis depressa</i> Shan et Sheh)	GenBank (AF164854.1)	222	57.7
白亮独活(<i>Heracleum candicans</i> Wall. ex DC.)	GenBank (GU967796.1)	225	57.3
钝叶独活(<i>Heracleum obtusifolium</i> Wall. ex DC.)	GenBank (EU185671.1)	225	58.2
西藏凹乳芹(<i>Vicatia thibetica</i> de Boiss.)	GenBank (GU395143.1)	226	52.7
西归芹(<i>Seselopsis tianschanica</i> Schischkin.)	GenBank (KJ999470.1)	228	51.3
尖叶蘧本(<i>Ligusticum acuminatum</i> Franch.)	GenBank (EU236172.1)	226	57.1
密瘤瘤果芹(<i>Trachydium subnudum</i> C. B. Clarke ex H. Wolff.)	GenBank (FJ483512.1)	222	53.6
鞘山芎[<i>Conioselinum vaginatum</i> (Spreng.) Thell.]	GenBank (FJ385041.1)	225	56.4
紫堇叶滇蘧本(<i>Hymenidium corydalifolium</i> Pimenov, Kljuykov & Tojibaev.)	GenBank (GU306178.1)	228	55.7
当归[<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels.]	GenBank (AF393784.1)	230	55.7
牡丹叶当归(<i>Angelica paeoniifolia</i> Shan et Yuan.)	GenBank (FJ237533.1)	224	52.7
裂叶独活(<i>Heracleum millefolium</i> Diels.)	GenBank (HQ686374.1)	227	56.8

样品可能为白亮独活。056、057 的 ITS2 序列一致，在进化树中与伞形科西藏凹乳芹(*V. thibetica*)聚在一枝,ITS2 序列相似性为 100% ,056 及 057 号样品应为西藏凹乳芹。

2.3 二级结构分析

将 4 个样品以及系统进化树中相似度较高且聚在一起物种的 ITS2 序列做二级结构比对,见图 1 – B,054 和 *S. cryptotaenium* 二级结构有差异,结合系统进化树的位置,054 样品可能为亮蛇床属中一个新种;055 和 *H. candicans* 的二级结构一致,根据其在进化树中的位置、遗传距离及 ITS2 序列相似性,055 样本可能为伞形科独活属的白亮独活(*H. candicans*),别称藏当归;056、057 这 2 个样本的二级结构与 *V. thibetica* 的二级结构基本一致,前期认为该样本可能为牡丹叶当归(*Angelica paeoniifolia*),但 056、057 这 2 个样本 ITS2 二级结构与牡丹叶当归的二级结构差异较大,并且进化树分布相差较远,因此 056、057 这 2 个样本为同一物种,但不是牡丹叶当归,056、057 这 2 个样本属于西藏凹乳芹(*V. thibetica*),别称野当归。

2.4 形态对比

对比《中国植物志》(FRPS)及《中国高等植物》(HPC)中的描述。亮蛇床(*S. cryptotaenium*):植株高达 80 cm。根粗壮,多枝根。叶宽三角状卵形,长 8 ~ 10 cm,宽约 8 cm,二至三回羽裂,小裂片长卵形或宽披针形,1 ~ 3 级深裂或浅裂,小裂片线形。花序径 8 ~ 10 cm,果序径达 20 cm;花序梗长 10 ~ 20 cm;总苞片 2 ~ 3 片,线形,长约 1 cm,密生糙毛,早落;伞辐 12 ~ 28 cm,长 5 ~ 7 cm,小总苞片 5 ~ 10 片,线形,长 5 ~ 8 mm,常向下反曲,密生糙毛。白亮独活(*H. candicans*):该植物全株被毛,根圆柱形,茎上部多分枝。基生叶和茎下部叶有长柄;叶宽卵形或长椭圆形,长 12 ~ 27 cm,一至二回羽裂,小裂片卵形或长卵形,长 4 ~ 7 cm,宽 2.0 ~ 4.5 cm,有不规则浅裂和锯齿,下面密生灰白色毛;茎上部叶有宽叶鞘。复伞形花序梗长 15 ~ 30 cm,总苞片 1 ~ 3 片,线形;伞辐长 3 ~ 7 cm,小总苞片少数,线形;伞形花序有花约 25 朵。西藏凹乳芹(*V. thibetica*):根圆锥形,长达 15 cm。除伞辐基部有糙毛外,全株无毛。基生叶近三角形,长 10 ~ 15 cm,三出二至三回

表 2 样品序列与参考序列的 K2P 距离

序号	编号/名称	K2P 距离																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	054																		
2	<i>Ligusticum daucooides</i> (EU236173.1)	0.018																	
3	<i>Selinum cryptotaenium</i> (EU236206.1)	0.009	0.009																
4	<i>Chaerophyllopsis huai</i> (FJ385037.1)	0.014	0.014	0.005															
5	<i>Peucedanum rubricaula</i> (KF806574.1)	0.018	0.000	0.009	0.014														
6	<i>Libanotis depressa</i> (AF164854.1)	0.014	0.005	0.005	0.009	0.005													
7	055	0.175	0.164	0.164	0.158	0.164	0.157												
8	<i>Heracleum candicans</i> (GU967796.1)	0.175	0.164	0.164	0.158	0.164	0.157	0.000											
9	<i>Heracleum obtusifolium</i> (EU185671.1)	0.169	0.158	0.158	0.152	0.158	0.152	0.009	0.009										
10	056	0.175	0.164	0.164	0.170	0.164	0.158	0.216	0.216	0.210									
11	057	0.175	0.164	0.164	0.170	0.164	0.158	0.216	0.216	0.210	0.000								
12	<i>Vicatia thibetica</i> (GU395143.1)	0.175	0.164	0.164	0.170	0.164	0.158	0.216	0.216	0.210	0.000	0.000							
13	<i>Seselopsis tianschanica</i> (KJ999470.1)	0.188	0.176	0.176	0.182	0.176	0.170	0.229	0.229	0.222	0.009	0.009	0.009						
14	<i>Ligusticum acuminatum</i> (EU236172.1)	0.114	0.103	0.103	0.109	0.103	0.098	0.140	0.140	0.134	0.091	0.091	0.091	0.102					
15	<i>Trachydium subnudum</i> (FJ483512.1)	0.147	0.136	0.136	0.141	0.136	0.130	0.192	0.192	0.186	0.082	0.082	0.082	0.092	0.071				
16	<i>Contioselinum vaginatum</i> (FJ385041.1)	0.109	0.098	0.098	0.104	0.098	0.093	0.152	0.152	0.146	0.082	0.082	0.082	0.092	0.023	0.072			
17	<i>Hymenidium corydaliifolium</i> (GU306178.1)	0.147	0.136	0.136	0.131	0.136	0.130	0.168	0.168	0.162	0.086	0.086	0.086	0.086	0.062	0.086	0.047		
18	<i>Angelica sinensis</i> (AF393784.1)	0.152	0.141	0.141	0.136	0.141	0.135	0.168	0.168	0.162	0.112	0.112	0.112	0.123	0.056	0.096	0.061	0.071	
19	<i>Angelica paeoniifolia</i> (FJ237533.1)	0.169	0.158	0.158	0.164	0.158	0.158	0.222	0.222	0.216	0.082	0.082	0.082	0.082	0.113	0.092	0.103	0.097	0.145
20	<i>Heracleum millefolium</i> (HQ686374.1)	0.175	0.164	0.164	0.158	0.164	0.158	0.062	0.062	0.052	0.191	0.191	0.191	0.204	0.134	0.186	0.135	0.157	0.151

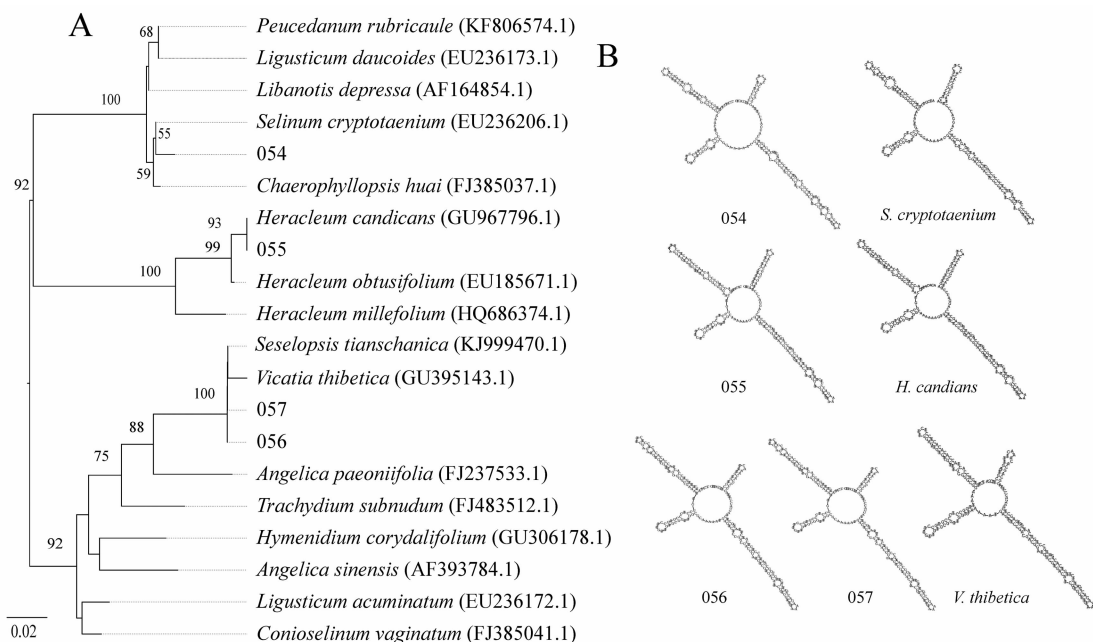


图1 基于 ITS2 序列构建试验样品及邻近物种进化树(NJ)(A); 试验样品及邻近物种 ITS2 序列二级结构(B)

羽裂;小裂片长圆形或宽卵形,长 1.0 ~ 2.5 cm,宽 0.5 ~ 1.5 cm,羽状深裂或缺刻状;顶部茎生叶细羽裂或 3 级裂。复伞形花序径 5 ~ 9 cm,总苞片 1 片或早落;伞辐 8 ~ 16 cm,长 2 ~ 5 cm;伞形花序有花 8 ~ 13 朵,小总苞片 4 ~ 7 片,钻形。

经笔者所在实验室“藏药检测技术教育部工程研究中心”相关藏药鉴定专家进行形态对比并结合 ITS2 序列的相似性、遗传距离、ITS2 二级结构的相似性、系统进化树位置最终确定 055 样品为白亮独活 (*H. candicans*),别称藏当归。056、057 这 2 个样本属于西藏凹乳芹 (*V. thibetica*),别称野当归。054 样品与亮蛇床形态略有差异,根单支,并且 054 样品 ITS2 序列相似性、遗传距离和 ITS2 二级结构都与亮蛇床有差异,因此确定 054 样品可能为亮蛇床属的一个潜在新种。

3 讨论与结论

藏当归是十大藏药之一,应用较为广泛,但形态相似植物较多,只能根据零散的传统形态进行区分,导致很多其他混伪品被错识而入药,因此在临床和用药过程中十分危险,比如,我国明确提出禁止以欧当归和东当归代替当归入药^[15],因此对入药植物的细分和仔细鉴定十分重要。传统的中药鉴定主要是依靠基原、性状鉴别,植物鉴别需要注重多样的性状,需要长期丰富的经验和理论基础,然而大多数药农和普通人不具备专业知识无法做到

精确判断。DNA 条形码技术操作简便、准确度高、不受性状限制,可以为药材的准确鉴定提供依据。

笔者所在实验室采集大量的西藏藏药植株样本进行药用成分分析,但部分植物由于表型接近无法仔细区分,在藏当归的药效研究中,对采自西藏 4 个地区具有丰富黄酮类化合物的植物样本进行分子分类鉴定并结合《中国植物志》和《中国高等植物》中相关植物的形态学对比,最后确定了 054 样品可能为亮蛇床属中潜在的一个新种,055 样品为白亮独活 (*H. candicans*),别称藏当归。056、057 这 2 个样本属于西藏凹乳芹 (*V. thibetica*),别称野当归。

西藏藏药植物资源较多,潜在植物多样性丰富,相似药效、相似表型植物容易混淆,这为精确的藏药研究和开发增加了难度,为保证试验研究和药物开发资源的准确性,DNA 条形码等分子手段随着相关数据库的完善操作简单、比对迅速,可为后期形态学的对比缩小范围,并提供更多的比较依据。后期可以广泛利用 DNA 条形码对区域内植物进行验证,结合形态学比较,为后期藏药的鉴定以及临床的安全应用提供快速、准确、多维的鉴定技术保障,也为其他植物的鉴定和研究提供参考。

参考文献:

- [1]多吉仁青,才让南加,却 样. 常用藏药材种类情况的调查分析[J]. 西藏科技,2016,275(2):28-30.
- [2]何兴金. 中国独活属果实的解剖学研究及独活属的修订[J]. 植物分类与资源学报,1998,20(3):295-302.

李井干,吴 晶,刘晓宇,等. 濒危龙树科植物 DNA 条形码鉴定方法[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):63-66.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.009

濒危龙树科植物 DNA 条形码鉴定方法

李井干,吴 晶,刘晓宇,许忠祥,李 洋,郭 静,伏建国,杨晓军

(南京海关动植物与食品检测中心,江苏南京 210019)

摘要:为了建立濒危龙树科植物 DNA 条形码鉴定方法,本研究选取 *rbcL*、*matK*、*ycf1b* 等 3 对引物对 9 种 21 份龙树科植物进行 DNA 提取、序列扩增及产物测序,比较序列扩增效率和测序成功率;应用 DNASTAR Lasergene 软件对测得的双向序列进行拼接;使用 MEGA-X 软件进行序列比对,分析种内和种间变异;使用邻接法构建系统聚类树。结果表明,*ycf1b* 序列可以区分龙树科 4 个属的植物,聚类效果好,种间存在可靠序列差异,可作为龙树科植物 DNA 条形码鉴定的有效序列片段。

关键词:龙树科;DNA 条形码;聚类分析;物种鉴定;基因片段

中图分类号:S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)17-0063-04

龙树科(Didiereaceae)别称刺戟木科,原产非洲马达加斯加岛的南部,当地特有种,是多肉植物中一个重要的科。按照恩格勒分类系统,龙树科被分为 4 属,分别是亚龙木属 [*Alluaudia* (Drake) Drake]、枝龙木属 (*Alluaudiopsis* Humbert & Choux)、曲龙木属 (*Decarya* Choux) 和刺戟木属 (*Didierea* Baill)^[1],全科 11 种均被列入《濒危野生动植物种

国际贸易公约》(CITES)附录 II。龙树科刺戟叶美,具有很高的观赏价值,世界多地有引种栽培。另外,龙树科还是一类重要的资源植物,刺戟木属 (*Didierea* Baill) 的阿修罗城 (*Didierea trollii*) 还是马达加斯加当地一种环尾狐猴的美味佳肴,对维护自然生态系统也起着重要作用^[2]。由于环境气候变化、过度采集利用等原因,导致龙树科植物沦为濒危植物,亟需准确快速的物种鉴定方法来加强龙树科植物的保护。虽然龙树科的分类鉴定研究较早,但也只是局限在形态特征和理化结构^[3],龙树科 DNA 条形码鉴定方法尚未有报道,且龙树科条形码数据库在物种丰富度及数量上都相对不完整,仍需

收稿日期:2021-01-28

基金项目:国家质量基础的共性技术研究与应用(编号:2017YFF0210300、2017YFF0210305)。

作者简介:李井干(1987—),男,山东滕州人,硕士,农艺师,主要从事濒危物种鉴定方面的研究。E-mail:570109771@qq.com。

[3] Widmer A, Baltisberger M. Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae) [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(9): 1282-1289.

[4] 熊 波,赵志礼,倪梁红,等. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用、局限性与展望[J]. 中药材,2015,38(10):2202-2206.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 孙稚颖,陈士林,姚 辉,等. 基于 ITS2 序列的羌活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定[J]. 中草药,2012,43(3):568-571.

[8] 林 好,陈镜安,李斯璐,等. 白前及其混伪品的 ITS2 分子鉴定[J]. 中药材,2017,40(11):2531-2536.

[9] 吴亚男,许 亮,陈 靓,等. 基于 ITS2 条形码的曼陀罗属药用植物 DNA 分子鉴定[J]. 中药材,2015,38(9):1852-1857.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.

[13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.

[14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4):406-425.

[15] 孙红梅,张本刚,齐耀东,等. 当归药材资源调查与分析[J]. 中国农学通报,2009,25(23):437-441.