

基于 ITS 序列鉴别真菌类药材马勃及其混伪品

张嘉丽^{1,3} 黄宇航¹ 宋 明² 任阳阳¹ 张梦婷¹ 刘 霞¹ 孙 伟³ 陈士林^{1,3}

(1 武汉理工大学化学化工与生命科学学院,武汉,430070; 2 安利(中国)植物研发中心,无锡,214145;

3 中国中医科学院中药研究所,北京,100700)

摘要 目的:运用 ITS 序列鉴别真菌类药材马勃 *Lasiosphaera calvatia* 及其混伪品。方法:收集来自重庆、北京等 9 个地方的 21 份脱皮马勃、大马勃、紫色马勃样品,提取基因组 DNA,经 PCR 扩增后双向测序。同时从 GenBank 上下载常见马勃药材混伪品的序列。将所有序列进行剪切校准拼接后分析,基于 K2P(Kimura 2-Parameter)模型计算马勃及其混伪品的种内和种间遗传距离,并构建 Neighbor-Joining(NJ)系统聚类树。结果:大马勃的 ITS 序列种内最大 K2P 遗传距离为 0;脱皮马勃的 ITS 序列种内最大 K2P 遗传距离为 0.003;紫色马勃的 ITS 序列种内最大遗传距离为 0.003。大马勃与混伪品种间最小 K2P 遗传距离为 0.019,脱皮马勃与混伪品种间最小 K2P 遗传距离为 0.031,紫色马勃与混伪品种间最小 K2P 遗传距离为 0.634。大马勃、脱皮马勃、紫色马勃的种内最大遗传距离均小于它们与混伪品的种间最小遗传距离。NJ 树结果显示大马勃、紫色马勃、脱皮马勃各自聚为一支,表现出良好的单系性,能够与混伪品明显的区别开来。结论:基于 ITS 序列的条形码技术可以将马勃药材及其混伪品有效进行鉴别。

关键词 马勃;混伪品;ITS;条形码

Identification of *Lasiosphaera Calvatia* and Its Adulterants Using ITS Barcode

Zhang Jiali^{1,3}, Huang Yuhang¹, Song Ming², Ren Yangyang¹, Zhang Mengting¹, Liu Xia¹, Sun Wei³, Chen Shilin^{1,3}

(1 School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070,

China; 2 Amway(China) Botanical Research and Development Center, Wuxi 214145, China; 3 Institute of

Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract **Objective:** ITS sequence was used as a barcode to identify *Lasiosphaera Calvatia* and its adulterants. **Methods:** We collected 21 samples of *Lasiosphaera Calvatia* and extracted their DNA, then amplified their ITS sequences. We also downloaded sequences of *Lasiosphaera Calvatia*'s adulterants from GenBank. Sequences were assembled and analysis their variable sites. The Kimura 2-Paramter(K2P) genetic distances and compute the Neighbor-joining(NJ) phylogenetic tree were computed. **Results:** The maximum intraspecific K2P genetic distances of the ITS sequence of *Calvatia gigantea*(Batsch ex Pers.) Lloyd is 0. The maximum intraspecific K2P genetic distances of the ITS sequence of *Lasiosphaera fenzlii* Reich. is 0.003. The maximum intraspecific K2P genetic distances of the ITS sequence lengths of *Calvatia lilacina*(Mont. et Berk.) Lloyd is 0.003. The minimum interspecific K2P genetic distances of *Calvatia gigantea* and adulterants is 0.019, *Lasiosphaera fenzlii* and adulterants is 0.031, while *Calvatia lilacina* and adulterants is 0.634. The maximum intraspecific genetic distances of *Calvatia gigantea*, *Lasiosphaera fenzlii* and *Calvatia lilacina* were all less than the minimum interspecific genetic distances of themselves and their adulterants. the NJ tree based on ITS sequence showed that *Calvatia gigantea*, *Lasiosphaera fenzlii* and *Calvatia lilacina* can gather into a branch sperately. **Conclusion:** ITS sequence was able to identify *Lasiosphaera Calvatia* from their adulterants, which is suitable in the identification of *Lasiosphaera Calvatia* and its adulterants.

Key Words *Lasiosphaera Calvatia*, ITS, adulterants, Barcoding

中图分类号:R282 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.006

马勃 *Lasiosphaera calvatia* 为灰包科真菌脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzlii* Reich.、大马勃 *Calvatia gigantea*(Batsch ex Pers.) Lloyd、紫色马勃 *Calvatia lilacina*(Mont. et Berk.) Lloyd 的干燥子实体,能够清肺利咽、止血,用于治疗风热郁肺咽痛,音哑,咳嗽;外治

鼻衄,创伤出血^[1]。马勃中所含马勃多糖被证实在抗肿瘤方面有良好的效果^[2],大马勃中还含有丰富的蛋白质和多种人体必需氨基酸^[3],且大马勃的菌株在经过液体发酵培养后,其镇痛、抗炎的作用增强^[4]。由于菌类分布较广泛、形态简单难鉴别,故市

基金项目:国家重大科技专项子课题“中药新药安全性检测技术与标准研究”——中药原料药混伪品分子基因鉴定技术与标准(编号:2014ZX09304-307-001-020)

作者简介:张嘉丽(1993.3—),女,硕士研究生,研究方向:中药资源与分子鉴定

通信作者:陈士林,男,研究员,主要研究方向:中药资源与分子鉴定, Tel: (010)64058460, E-mail: slchen@icmm.ac.cn

售的马勃经常出现乱用、混用的现象。



图1 马勃药材照片

目前市面上常见的混伪品主要有小马勃 *Lycoperdon pusillum* Batsch ex Pers.^[5]、豆包菌 *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch.^[6]、头状秃马勃 *Calvatia craniiformis* (Schw.) Fries.、网纹马勃 *Lycoperdon perlatum* Pers.^[7]、白秃马勃 *Calvatia candida* (Rostk.) Hollos、梨形马勃 *Lycoperdon pyriforme* Schaeff es Pers.、铅色灰球菌 *Bovista plumbea* Pers.、树皮丝马勃 *Mycenastrum corium* (Guess. ex DC.) Desv.、长根静灰球菌 *Bovistella radicata* (Dur. et Mont.) Pat^[8]。

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是利用基因中一段特定的相对较短的, 并且拥有高稳定性和重复性的序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术^[9]。该技术作为传统鉴定技术的有效补充, 可为中药材的鉴定提供准确的结果^[10]。目前, 该技术在已经在植物分类、中药材鉴定等多个领域得到广泛的应用, 其准确性也已得到验证, 并已成功应用于蔓荆子、蟾皮、血竭、车前子、羌活等多种中药材的鉴别中^[11~15], 其对于控制药材市场药品的安全、准确具有很重要的作用^[16]。

由于不同种类的真菌在外表上相对于动植物来说难以区分, 且许多真菌分布广泛、来源复杂, 所以使得真菌的鉴别更加困难^[17]。目前真菌类中药材已经越来越多地应用于临床, 为了保证药材的真实有效以及用药安全, 目前常规的鉴别手段也存在一定的局限性, 故我们急需更为准确的鉴定手段。研究发现, ITS 序列在真菌鉴别中具有一定的优势, 而 COI 序列含有较多内含子, 不利于扩增, 并不适用于成为全部真菌鉴定的条形码^[18]。通过比较 ITS 序列与 COI 序列的应用, 发现 ITS 序列在真菌中的鉴别范围更加广泛^[19], 也表现出了更好的鉴别能力^[20]。

本研究以马勃药材及其常见混伪品作为研究对象, 获得其 ITS 序列, 以准确鉴别真菌类药材马勃及其混伪品。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验通过实地采集、药材市场购买等方式收集马勃共 3 个物种 21 份药材, 分别来自重

庆、北京、河北等地, 样品信息见表 1。另从 GenBank 数据库下载 35 条序列, 详细信息见表 2。

表1 样品信息表

药材名	基原物种名	拉丁名	凭证标本号	样品来源
马勃	脱皮马勃	<i>Lasiophaera fenzlii</i>	YC0777MT08	重庆
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT09	北京
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT10	河北安国
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT11	内蒙古
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT12	重庆
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT13	广西玉林
马勃	脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	YC0777MT14	浙江杭州
马勃	大马勃	<i>Calvatia gigantea</i>	YC0776MT08	北京
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT09	安徽亳州
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT10	河北安国
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT11	河北安国
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT12	河北安国
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT13	河北安国
马勃	大马勃	<i>C. gigantea</i>	YC0776MT14	河北安国
马勃	紫色马勃	<i>Calvatia lilacina</i>	YC0809MT01	安徽亳州
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT02	湖北武汉
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT03	安徽亳州
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT04	湖北十堰
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT05	安徽亳州
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT06	广西玉林
马勃	紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	YC0809MT07	新疆

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 取干燥马勃药材 20 mg, 用核分离液 (2% PVP, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L pH 8.0 Tris-Hcl 和 0.7 mmol/L NaCl) 800 μ L 抽提 2 次, 利用基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 采用 ITS 通用引物 ITS1-18S (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') 和 ITS4-28S (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增, PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 2 $\times$ Tag PCR Mix 12.5 μ L, 2.5 μ mol/L 引物各 1.0 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 85 s, (95 $^{\circ}$ C 35 s, 55 $^{\circ}$ C 55 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s) 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测并纯化后, 使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co, USA) 进行双向测序。

1.2.3 数据处理 测序峰图文件用 CodonCode Aligner V4.2 (CodonCode Co., USA) 进行序列拼接和剪切, 去除低质量序列, 获得 ITS 序列。将所得 ITS 序列使用 MEGA5.0 软件进行序列比对分析。基于 K2P (Kimura 2-Parameter) 模型计算种内种间遗传距离, 并对马勃药材及其混伪品进行遗传距离分析, 并构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统聚类树, 采用 boot-

strap 重复 1000 次进行检验。

表 2 GenBank 下载序列

样品名	拉丁名	GenBank 登录号
白秃马勃	<i>Calvatia candida</i>	KF668328
白秃马勃	<i>C. candida</i>	GU939632
头状秃马勃	<i>Calvatia craniiformis</i>	DQ112625
网纹马勃	<i>Lycoperdon perlatum</i>	KP340200
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KP340199
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KP340194
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KP340197
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KF668322
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KF668309
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	KF668306
小马勃	<i>Lycoperdon pusillum</i>	AB067724
梨形马勃	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	AF479762
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	KM609394
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	KJ713982
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	KP454030
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	KP454020
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	AY854075
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	AJ237620
铅色灰球菌	<i>Bovista plumbea</i>	JX183694
铅色灰球菌	<i>B. plumbea</i>	DQ112613
铅色灰球菌	<i>B. plumbea</i>	JX183695
铅色灰球菌	<i>B. plumbea</i>	FJ755226
铅色灰球菌	<i>B. plumbea</i>	AJ237629
树皮丝马勃	<i>Mycenastrum corium</i>	JX984568
树皮丝马勃	<i>M. corium</i>	EU833666
树皮丝马勃	<i>M. corium</i>	DQ112628
长根静灰球菌	<i>Bovistella radicata</i>	DQ112608
长根静灰球菌	<i>B. radicata</i>	AJ237624
长根静灰球菌	<i>B. radicata</i>	FJ441028
豆包菌	<i>Pisolithus tinctorius</i>	JX030193
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	KJ809561
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	KJ809560
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	KJ809558
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	KF881877
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	KF802173

2 结果

2.1 马勃及其混伪品的种内变异分析 脱皮马勃、大马勃、紫色马勃、白秃马勃、头状秃马勃、网纹马勃、小马勃、梨形马勃、铅色灰球菌、树皮丝马勃、长根静灰球菌、豆包菌的 ITS 序列长度、种内变异位点数、GC 含量等信息见表 3。大马勃共 7 条序列,长度为 609 bp,没有变异位点。脱皮马勃共 7 条序列,长度为 609 bp,以 YC0777MT14 为主导单倍型,在 22 bp 处存在 C-T 变异,在 494 bp 处存在 A-G 变异。紫色马勃共 7 条序列,长度为 607 bp,以 YC0809MT01 为主导单倍型,在 388 bp 处存在 A-G 变异;在 395 bp 处存在 G-A 变异。

2.2 马勃种内、种间及其与混伪品的种间遗传距离

分析 基于 K2P 模型计算遗传距离见表 4,大马勃、脱皮马勃和紫色马勃的种内最大遗传距离小于它们分别和混伪品的种间最小遗传距离,大马勃、脱皮马勃和紫色马勃的种间最小遗传距离大于大马勃、脱皮马勃和紫色马勃的种内最大遗传距离。

表 3 马勃及其混伪品 ITS 序列特征

物种名	拉丁名	ITS 序列长度	GC 平均含量/%	种内变异位点数
大马勃	<i>C. gigantea</i>	609 bp	46.9%	0
脱皮马勃	<i>L. fenzlii</i>	609 bp	45.2%	2
紫色马勃	<i>C. lilacina</i>	607 bp	45.4%	2
白秃马勃	<i>C. candida</i>	603 bp	44.3%	9
头状秃马勃	<i>C. craniiformis</i>	645 bp	44.1%	0
网纹马勃	<i>L. perlatum</i>	651 bp	44.0%	5
小马勃	<i>L. pusillum</i>	609 bp	45.0%	0
梨形马勃	<i>L. pyriforme</i>	536 bp	45.3%	1
铅色灰球菌	<i>B. plumbea</i>	575 bp	45.4%	2
树皮丝马勃	<i>M. corium</i>	658 bp	47.1%	3
长根静灰球菌	<i>B. radicata</i>	570 bp	44.3%	6
豆包菌	<i>P. tinctorius</i>	589 bp	51.7%	2

表 4 马勃药材种内、种间及其与混伪品的种间遗传距离分析

种内、种间 K2P 遗传距离	K2P 遗传距离	平均 K2P 遗传距离
大马勃种内	0	0
脱皮马勃种内	0 ~ 0.003	0.001
紫色马勃种内	0 ~ 0.003	0.001
大马勃、脱皮马勃及紫色马勃种间	0.039 ~ 0.645	0.438
大马勃与混伪品种间	0.019 ~ 0.214	0.074
脱皮马勃与混伪品种间	0.031 ~ 0.224	0.076
紫色马勃与混伪品种间	0.634 ~ 0.815	0.696

2.3 马勃与其混伪品的 NJ 树鉴定 基于 ITS 序列构建马勃药材与其混伪品 NJ 树(图 2),结果表明,ITS 序列能够很好的将马勃药材与其混伪品区分开来。

3 讨论

马勃药材为灰包科真菌脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzlii* Reich.、大马勃 *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd、紫色马勃 *Calvatia lilacina* (Mont. et Berk.) Lloyd 的干燥子实体,其形态与白秃马勃、头状秃马勃、网纹马勃、小马勃、梨形马勃、铅色灰球菌、树皮丝马勃、长根静灰球菌、豆包菌非常相近,容易发生混用的现象。其中豆包菌又叫彩色豆马勃,它是一种有益的外生菌根,能够增强树木的营养吸收能力及抵抗力^[21]。因此,马勃药材的准确鉴定对市场上马勃药材的使用和流通的安全性与规范性有着非常大的意义。目前,对于马勃类药材的鉴别多数为传统的形态鉴别、显微鉴别等手段^[22],但这些

技术手段存在一定局限性,而 DNA 条形码技术具有很强的适用性与通用性,利用该技术,可以更加稳定

和准确保证马勃药材的质量,也保证了临床用药安全。

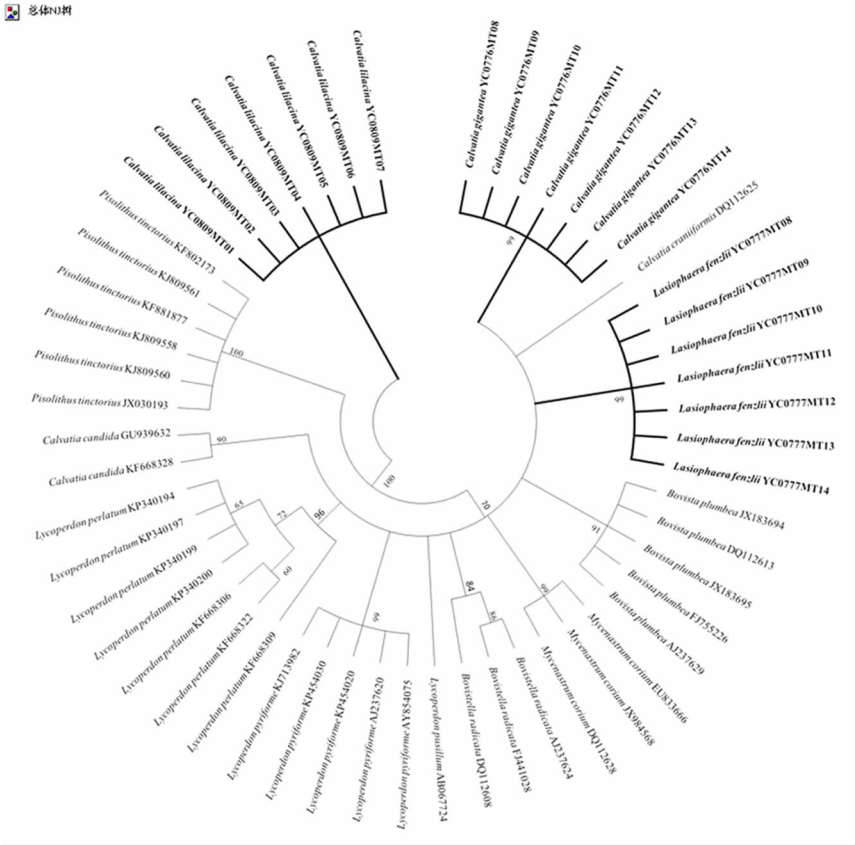


图2 基于 ITS 序列构建马勃药材及其混伪品的 NJ 树

注:Bootstrap 1 000 次重复,支上数值仅显示自展支持率≥50%。

本研究收集了来自重庆、北京、河北、内蒙、广西、浙江、安徽、湖北、新疆等地的马勃药材样品,选用 ITS 序列作为 DNA 条形码对马勃药材及其混伪品进行鉴定研究。应用基于 K2P 计算的遗传距离对马勃药材种内、种间及其混伪品的种间遗传距离进行比较、分析结果表明,马勃药材的种内最大 K2P 遗传距离小于马勃药材与其混伪品的种间最小 K2P 遗传距离,构建 NJ 树,马勃药材和其混伪品各自聚为一支,表现出良好的单系性,同时马勃药材与其混伪品可以区分开来。因此,应用 DNA 条形码技术能够准确的鉴别马勃药材与其混伪品。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:50.
[2] 姜明华,田易玲,徐凌川. 马勃多糖对荷瘤模型小鼠抑瘤作用及生命延长率的影响[J]. 山东中医药大学学报,2014,38(2):157-158.
[3] 张江萍,范晓龙,吴锐. 山西野生大马勃营养成分分析[J]. 山西农业科学,2013,41(5):456-457.
[4] 张帆,王大可,李爱欣,等. 大马勃抗炎镇痛及体外抑菌作用的研究[J]. 中国食用菌,2014,33(2):50-52.

[5] 游黔平,陈昆先. 马勃及其伪品小灰包的鉴别[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):349.
[6] 余听,张丹. 浅谈 4 种真菌类中药的真伪鉴别[J]. 山西中医,2009,12(25):48-50.
[7] 芮正祥. 安徽中药志第三卷[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2005:353.
[8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第一册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:609-612.
[9] 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.
[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):141-147.
[11] 张晓存,徐迪,孙伟,等. 蔓荆子药材及其混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(11):2366-2370.
[12] 樊佳佳,宋明,宋驰,等. 中药材蟾皮及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国药理学杂志,2015,50(15):1292-1296.
[13] 王俊,刘霞,孙伟,等. 名贵中药材血竭的 DNA 条形码研究[J]. 中国药理学杂志,2015,50(15):1261-1265.
[14] 宋明,张雅琴,林韵涵,等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对细小种子类药材车前子的鉴定比较[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2227-2232.

- 源,2008,27(1):11-15.
- [11]刘娟,刘程诚,关力.红蓼的开发利用及研究进展[J].黑龙江医药,2012,25(4):542-544.
- [12]李秀岚,李友莲.红蓼提取物对桃蚜拒食活性及触角电位的研究[J].山西农业大学学报,2005,25(3):228-230.
- [13]胡冠芳,刘敏艳,沈慧敏,等.红蓼提取物对 13 种农业害虫触杀活性的研究[J].草业学报,2011,20(4):229-235.
- [14]Wang L,Zhang J,Zhao R,et al. Adsorption of basic dyes on activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn;Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies[J]. Desalination,2010,254(1-3):68-74.
- [15]Wang L,Zhang J,Zhao R,et al. Adsorption of 2,4-dichlorophenol on Mn-modified activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn[J]. Desalination,2011,266(1-3):175-181.
- [16]Chen S L,Pang X H,Song J Y,et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv,2014,32:1237-1244.
- [17]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.
- [18]马晓冲,姚辉,邬兰,等.木香、川木香、土木香、青木香和红木香药材的 ITS2 条形码分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2169-2175.
- [19]赵莎,辛天怡,侯典云,等.党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2013,15(3):421-428.
- [20]于俊林,赵莎,任明波,等.基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2160-2163.
- [21]辛天怡,姚辉,罗焜,等.羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药理学学报,2012,47(8):1098-1105.
- [22]孙稚颖,庞晓慧.基于 DNA 条形码技术探讨板蓝根及大青叶基原物种问题[J]. 药理学学报,2013,48(12):1850-1855.
- [23]Chen X C,Liao B S,Song J Y,et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding[J]. Gene,2013,530:39-43.
- [24]赵莎,庞晓慧,宋经元,等.应用 ITS2 条形码鉴定中药材合欢皮、合欢花及其混伪品[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2164-2168.
- [25]Zhao S,Chen X C,Song J Y,et al. Internal transcribed spacer2 barcode;a good tool for identifying *Acanthopanax cortex* [J]. Front Plant Sci,2015,6:840.
- [26]Xin T Y,Li X J,Yao H,et al. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues [J]. Sci Rep,2015,5:8337.
- [27]Xin T Y,Yao H,Gao H H,et al. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode [J]. Food Res Int,2013,54:1699-1704.
- [28]罗焜,马培,姚辉,等.多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究[J]. 药理学学报,2012,47(12):1710-1717.
- [29]Xiang L,Song J Y,Xin T Y,et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. FEMS Microbiol Lett,2013,347:156-162.
- [30]Pang X H,Shi L C,Song J Y,et al. Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials[J]. J Nat Med,2013,67:571-575.
- [31]Hou D Y,Song J Y,Yao H,et al. Molecular identification of *Corni Fructus* and its adulterants by ITS/ITS2 sequences[J]. Chin J Nat Med,2013,11(2):121-127.
- [32]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.
- [33]Keller A,Schleicher T,Schultz J,et al. 5. 8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430:50-57.
- [34]Tamura K,Peterson D,Peterson N,et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol,2011,28(10):2731-2739.
- [35]陈士林,郭宝林,张贵君,等.中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1043-1055.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 780 页)

- [15]张改霞,金钱,贾静,等.药用植物羌活种子 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):390-395.
- [16]辛天怡,李西文,姚辉,等.中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究[J]. 中国科学:生命科学,2015,45(7):695-702.
- [17]张宇,郭良栋.真菌 DNA 条形码研究进展[J]. 菌物学报,2012,31(6):809-820.
- [18]周均亮,赵瑞琳.真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. 微生物学通报,2013,40(8):1468-1477.
- [19]KEITH A. SEIFERT. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Resources,2009,9(1):83-89.
- [20]Dentinger BT,Didukh MY,Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and Allies (Agaricomycotina) [J]. PLoS One,2011,6(9):e25081.
- [21]周爱东,吴小芹,王明生,等.彩色豆马勃硝酸还原酶基因克隆与序列分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2013,37(6):22-26.
- [22]刘信奎,孙伟,矫明昭.中药饮片马勃质量标准的改进[J]. 中国保健营养,2012(7):241.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)