

种子类药材补骨脂及其混伪品的 ITS2 条形码序列鉴定

周建国¹ 马双姣¹ 黄玉龙² 石林春¹ 金 钺¹ 姚 辉¹

(1 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京, 100193; 2 湖南中医药大学药学院, 长沙, 410208)

摘要 目的: 种子类药材补骨脂具有肝肾毒性, 其混伪品曼陀罗子、天仙子、洋金花的种子、猪屎豆也含有毒性成分, 且补骨脂与其混伪品外形相似, 易导致混用误用, 严重危害人体健康。本研究利用 DNA 条形码技术, 分析补骨脂及其混伪品的 ITS2 序列, 以期快速准确鉴定补骨脂及其混伪品, 保证其用药安全及临床疗效。方法: 对补骨脂及其混伪品样品进行 DNA 提取、PCR 扩增 ITS2 序列, 并进行双向测序, 所有序列用 MEGA6.0 软件进行种间、种内 Kimura2-parameter (K2P) 遗传距离计算, 并构建 NJ 系统聚类树。结果: 补骨脂 ITS2 序列长度为 233bp, G + C 含量为 69.5%, 种内无变异位点。补骨脂与其混伪品种间变异位点较多, 种间 K2P 最小距离为 0.5321, 远远大于其种内距离, NJ 树显示可以将补骨脂及其混伪品完全分开。结论: ITS2 条形码序列可准确鉴别种子类药材补骨脂及其混伪品, 为保证补骨脂的临床用药安全和种质资源鉴定提供了良好的技术手段。

关键词 补骨脂; ITS2 序列; 鉴定; DNA 条形码; 混伪品

Identification of *Psoraleae Fructus* and its adulterants using ITS2 sequence

Zhou Jianguo¹, Ma Shuangjiao¹, Huang Yulong², Shi Linchun¹, Jin Yue¹, Yao Hui¹

(1 The Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2 School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract Objective: *Psoraleae Fructus* has toxic effects on liver and kidney and its adulterants including *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *D. metel*, *Crotalaria pallid* are also tested to have toxic ingredients. *Psoralea corylifolia* shares similar morphological characters with its adulterants, which can easily lead to misuses and greatly threaten the human health. This study aimed to identify *P. corylifolia* and its adulterants rapidly and accurately using DNA barcoding method based on ITS2 sequence. **Methods:** Genomic DNA of *P. corylifolia* and its adulterants were extracted and then the ITS2 sequences were obtained by direct PCR amplification and sequenced bi-directionally. The intra- and inter-specific genetic distances were analyzed using software MEGA 6.0, and the phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) method. **Results:** The ITS2 sequence length of *P. corylifolia* was 233bp, and the G + C content was 69.5%. The intra-specific variations were highly conservative. There were many variation sites of ITS2 sequences between *P. corylifolia* and its adulterants. The results showed that the minimum inter-specific divergence was 0.5321, which was larger than the maximum intra-specific divergence. The NJ tree indicated that *P. corylifolia* could be distinguished from its adulterants obviously. **Conclusion:** The ITS2 region can be used as a barcode for identification of *P. corylifolia*, which provide a new technique for the authentication of germplasm resources and clinic safety of medicinal use.

Key Words *Psoralea corylifolia* L.; ITS2 sequence; Identification; DNA barcoding; Adulterants

中图分类号: R282.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.008

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2015 年版一部记载其性辛、苦、温, 归肾、脾经。内用温肾助阳, 纳气平喘, 温脾止泻; 外用消风祛斑。用于肾阳不足, 阳疾遗精, 五更泄泻等; 外用治白瘫风, 斑秃^[1]。由于补骨脂有较为悠久的用药历史, 疗效确切, 近年来需求量不断增

加, 但原有的道地药材供不应求, 致使各种混伪品乘虚而入, 而且补骨脂为细小种子类中药, 混伪品外形与其相似度较高, 靠传统方法很难有效鉴别, 导致误用现象时有发生, 严重影响临床用药安全, 甚至危及患者生命。据文献资料记载, 补骨脂的混伪品主要为: 苘麻子 *Abutilon theophrasti* Medic.、曼陀罗子 *Datura stramonium* L.、天仙子 *Hyoscyamus niger* L.、莱

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项 (编号: 2014ZX09304307001); 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAI07B08)

作者简介: 周建国 (1993—), 男, 2015 级在读硕士研究生, E-mail: 1312905813@qq.com

通信作者: 姚辉 (1976—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向: 中药资源学, 电话: (010) 57833194, E-mail: scauyaoh@sina.com

菹子 *Raphanus sativus* L.、洋金花 *D. metel* L. 的种子、沙苑子 *Astragalus complanatus* R. Br.、猪屎豆 *Crotalaria pallid* Ait. 和木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent.^[2-6]。其中,曼陀罗子、天仙子、洋金花的种子和猪屎豆都有一定的毒性,临床报道因误服伪品而使患者中毒的现象不胜枚举。曼陀罗子主要有毒成分为莨菪碱、东莨菪碱等,误食后可使人口干、神志模糊、瞳孔散大^[5];天仙子有大毒,特别是服用过量可产生剧毒,使人神智错乱,有昏昏欲仙之感^[7];洋金花的种子主要成分为东莨菪碱,少量可起到麻醉镇静作用,过量易导致急性中毒,甚至死亡^[8];猪屎豆主要有毒成分为吡咯里西啶生物碱(PAs),是目前已知的最重要的植物性肝毒成分,可诱发肝癌、肺癌等症^[9]。沙苑子虽然功效与补骨脂有部分相似,但是它们的归经不完全相同,以致它们的配伍会不同,而且他们的用法用量也有区别;苘麻子和莱菹子则功效与补骨脂相差甚远。由于补骨脂别名为破故脂、故纸,而木蝴蝶也有故纸、洋故纸的俗称,所以二者临床中混用误用的现象时有发生,常有医生和调配人员因名迷实,存在错误处方和调剂的现象^[10]。黄应安^[11]曾报道当地常把木蝴蝶误用为补肾壮阳药,民间自购滋补品炖食鸡鸭时,木蝴蝶是一味不可或缺的中药配方。但木蝴蝶与补骨脂的功效截然不同,误用不仅延误治疗,而且可能会加重病情,极大地影响了医师对治疗方案的疗效评价。另外,据报道,补骨脂本身也有一定的肝肾毒性,其主要成分补骨脂素,可使人恶心、胃痛、头痛^[12-13],Clark 等^[14]研究发现补骨脂素作为抗癌剂可以引发正常细胞发生突变,导致肿瘤的发生。所以如果补骨脂混用于其他药材中,长期服用会对患者的肝肾产生一定的损害。

综上所述,混伪品的使用不仅给人们的健康带来危害,甚至威胁人们的生命安全,也给中医药事业的发展带来了不利的影响。所以,准确有效的鉴别补骨脂及其混伪品,对于其临床安全用药、保证疗效具有重要作用。目前,已有学者对补骨脂及其混伪品从来源、性状、理化、显微等方面进行鉴定^[2-6,10-11,15]。作为传统形态鉴别方法有效补充的 DNA 条形码(DNA barcoding)分子鉴定法,是利用基因组中一段相对较短的、公认标准的 DNA 序列来进行物种鉴定,此技术简便高效,有法定的鉴定指导原则和明确的鉴定标准,鉴定结果有良好的可重复性,方法稳定性高,通用性强,不受样品性状以及研究者的专业水平限制,避免了主观人为的判断和客观条件的影响,有助于实现物种鉴定规范化和标准化,非

常适用于中药材的真伪鉴定^[16-18],已被《中国药典》收录^[19-20]。目前,对植物类药材来说,ITS2 片段是最具优势的 DNA 条形码序列之一^[21-22]。本研究运用 ITS2 序列对补骨脂及其混伪品进行鉴定研究,旨在为该药材的用药安全、质量控制、种质资源保护与开发利用等方面提供分子依据。

1 材料

研究材料包括 9 个物种共 118 份样品,包括基原植物样本、药材样本、对照药材样本、复核样本和从 GenBank 上下载的序列。其中样品 BUGZ0001-09 来自国家药用植物种质资源库,所有样品均经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定。复核样本由中国中医科学院中药研究所(样本号 RC-YC0158MT01、06,RC-YC0649MT01)、北京市药品检验所(样本号 BJ-YC0612MT0405)、湖南省食品药品检验研究院(样本号 HN-YC0612MT04)进行复核验证,对照药材样本(样本号 FDC039、FDC153、FDC148、FDC238)来自中国食品药品检定研究院,样品具体信息详见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取 将实验样品用 75% 乙醇棉擦拭干净,种子样品称取约 50 mg,叶片样品取变色硅胶干燥叶片约 20 mg(注意:木蝴蝶的取样要尽量取到其种子的胚乳部分,其翅为细胞产物或死细胞,DNA 含量低)。向装有样品的 EP 管中分别加入约 3% 的 PVP-40(聚乙烯吡咯烷酮),经球磨仪(Retsch MM400,Germany)研磨 2 min(30 次/min),研磨后用核分离液[100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),20 mmol/L EDTA(pH 8.0),0.7 mmol/L NaCl,2% PVP-40,0.4% β -巯基乙醇]洗涤 1~3 遍,用植物 DNA 提取试剂盒(Bioteke Co.,China)提取总 DNA,其余步骤按试剂盒操作说明进行。叶片样品 65℃ 水浴 30 min,种子类 65℃ 水浴 1 h。

2.2 PCR 扩增及测序 参照 Chen 等^[20]的研究方法,ITS2 序列的 PCR 反应体系为 25 μ L,包括 2 $\times$ Taq PCR Master Mix(北京艾德莱生物科技有限公司,北京)12.5 μ L(2.5 μ mol/L),正、反向引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L(约 40 ng/ μ L),灭菌双蒸水 8.5 μ L。通用引物为 S2F:5'-ATGCGATACTTGTTGTAAT-3'和 S3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。扩增程序为 94℃,5 min;94℃,30 s,56℃,30 s,72℃ 45 s,40 个循环;72℃,10 min。电泳查看 PCR 扩增情况,PCR 扩增产物由中国农业科学院开放实验室进行双向测序。

表 1 样品来源

样品	拉丁学名	样本分类	样本编号/GenBank 登录号	样品来源
补骨脂	<i>Psoralea corylifolia</i>	基原植物	PS0221 MT01-04	广西南宁、北京药用植物园
		对照药材	FDC039	中国食品药品检定研究院
		复核样本	RC-YC0158MT01_06	四川荷花池市场、广西玉林药市
		药材样本	YC0158MT01-10、BUGZ0001-09 *	四川荷花池市场、安徽亳州药市、河北安国药市、广西玉林药市、北京某药店、浙江杭州某药店、北京药用植物园、河南开封、重庆市、山西万荣
苘麻子	<i>Abutilon theophrasti</i>	GenBank	FJ606754、GU217600、JN115046、KF921458、KF921457、JQ230975	
		基原植物	YC0488MT20-23、PS0569MT04	北京药用植物园
		对照药材	FDC153	中国食品药品检定研究院
		药材样本	YC0488MT01-20	安徽亳州药市、北京药用植物园、中科院北京植物园、河北石家庄、河北保定、福建莆田、湖北神农架、北京市
莱菔子	<i>Raphanus sativus</i>	GenBank	DQ006017、DQ287984、KF454276、GQ434460	
		基原植物	PS1289MT01-02	福建莆田、广西南宁
		对照药材	FDC148	中国食品药品检定研究院
		药材样本	YC0115MT01-03	河北安国药市、河北某中药公司、北京某药店
洋金花	<i>Datura metel</i>	GenBank	AY722480、DQ249819、GQ268079、GQ436655、AF128105、LC090017、AY746462-63	
		基原植物	YC0649MT01、PS1152MT01-05	华南植物园、北京药用植物园、福建莆田、广西南宁
		药材样本	YC0649MT02	北京药用植物园
		复核样本	RC-YC0649MT01	华南植物园
沙苑子	<i>Astragalus complanatus</i>	GenBank	JX467604、LC076492、HQ658595	
		基原植物	YC0612MT11-12	北京某医院、广东广州药市
		对照药材	FDC238	中国食品药品检定研究院
		药材样本	YC0612MT01_04-05	北京某药店、河北安国药市
木蝴蝶	<i>Oroxylum indicum</i>	GenBank	KM588073、GU217602	
		基原植物	PS1669MT01-02	贵州贞丰、广西南宁
		药材样本	YC0247MT01-04	河北安国药市、安徽亳州药市
		GenBank	KC441043、FJ606747、JN407437	
天仙子	<i>Hyoscyamus niger</i>	药材样本	YC0256MT01	河北安国药市
		复核样本	RC-YC0256MT01	河北安国药市
		GenBank	JF421505	
		GenBank	KF454041、KP894043、JX467611、JN244323、HQ658603、KP894026、KP894017、KP322646、HQ658585	
曼陀罗	<i>Datura stramonium</i>	GenBank		
猪屎豆	<i>Crotalaria pallida</i>	GenBank	JQ067305、JN990136-37、KP698653-55	

注：* 样品来源于国家药用植物种质资源库

2.3 数据处理 利用 CodonCode Aligner V 5.1.5 对测序得到的峰图进行校对和拼接,去除低质量端和引物区,获得严格一致性序列,将实验数据和从 GenBank 上下载的序列使用基于隐马尔科夫模型 HMMer^[23] 注释方法去除 5.8S 和 28S 片段,以获得 ITS2 间隔区序列,然后将所有序列用软件 Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0 进行序列比对和变异位点分析,并基于 Kimura-2-parameter(K2P) 双参数模型计算遗传距离,用邻接(NJ) 法构建系统分类树。

3 结果与分析

3.1 补骨脂及其混伪品 ITS2 序列种内种间变异分析 本研究涉及补骨脂不同来源序列共计 30 条,包括基原植物样本 4 条、药材样本 19 条、对照药材样本 1 条、复核样本和从 GenBank 上下载的序列 6 条。序列长度均为 233bp, G + C 含量为 69.5%, 种内 K2P 遗传距离为 0。补骨脂与其混伪品种间序列进行比对后,序列长度为 287bp。见表 2, ITS2 序列间变异位点较多,达到 197 个,补骨脂与其混伪品的 K2P 遗传距离范围为:0.5321 ~ 0.7976。见表 3,种

间最小遗传距离远远大于种内遗传距离。

表 2 补骨脂及其混伪品的 ITS2 序列长度
及 G + C 含量

样品	序列长度 (bp)	平均 G + C 含量 (%)
补骨脂	233	69.5
苘麻子	231	54.1
天仙子	211	57
曼陀罗子	230	64.8
莱菔子	193	55.5
洋金花	230	65.6
沙苑子	218	52.8
猪屎豆	231	60
木蝴蝶	236	69.5

表 3 补骨脂及其混伪品 ITS2 序列种内种间 K2P
距离计算结果与变异位点数目

样品	K2P 距离范围	K2P 平均距离	变异位点数目
补骨脂种内	0	0	0
补骨脂与洋金花种间	0.5569	0.5569	82
补骨脂与天仙子种间	0.6293 ~ 0.6434	0.6387	84
补骨脂与莱菔子种间	0.7525	0.7525	84
补骨脂与曼陀罗种间	0.5685 ~ 0.5914	0.5800	85
补骨脂与沙苑子种间	0.6014 ~ 0.6222	0.6056	89
补骨脂与木蝴蝶种间	0.6801 ~ 0.6940	0.6847	92
补骨脂与猪屎豆种间	0.5321 ~ 0.5452	0.5387	93
补骨脂与苘麻子种间	0.7933 ~ 0.7976	0.7965	102

3.2 补骨脂及其混伪品的 ITS2 序列聚类分析 因为补骨脂种内无变异位点,所以选取其基原植物样本、药材样本、对照药材样本、复核样本和从 Gen-Bank 上下载的序列各一条,用 MEGA6.0 构建补骨脂及其混伪品的 NJ 系统分类树(图 1),从 NJ 树中可以看出,补骨脂的 ITS2 序列聚为一支,其混伪品各自聚为一支。因此,ITS2 条形码序列可将补骨脂及其混伪品很好地区分开来。

4 讨论

4.1 补骨脂及其混伪品的 DNA 提取及 PCR 扩增 获取高质量的 DNA 是进行 DNA 条形码研究的关键环节和必要前提^[24],但中药材中含有大量的次生代谢产物,DNA 提取较为困难^[25-26],尤其种子类药材内含丰富油脂及酚类和多糖类物质,研磨时极易被氧化,损失较大。本研究适当加大样品量,加大 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)使用量,用核分离液洗涤至上清液无黏稠,并延长水浴时间,补骨脂及混伪品均可成功提取 DNA,其 PCR 产物电泳后均可显示出单一目的条带。多位学者在提取种子类样品 DNA 时采取类似处理。马双姣等^[27]在提取王不留行 DNA 时,在样品粉碎前加入相当于药材量 5% 的 PVP,粉碎后用核分离液漂洗 2 ~ 3 次,并 65 ℃ 水浴 3 h,可

提高 DNA 提取效率。宋明等^[28]研究发现,在提取车前子 DNA 时,用核分离液洗涤 3 次,以 56 ℃ 水浴 8 ~ 9 h,可以成功提取其所有样品 DNA。

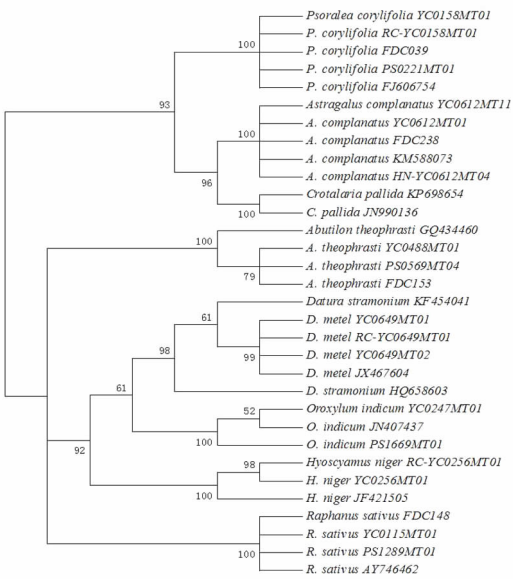


图 1 基于 ITS2 序列构建的补骨脂及其混伪品的 NJ 树

4.2 为中药材从种质资源上鉴定及临床应用提供保障,对中药材种子质量标准建立提供依据 种子是中药材产业链的起点,是中药材生产、加工、运输、储存最基本、最重要的资料,对中药质量和临床疗效具有至关重要的影响。然而,据报道,目前国内中药材种子质检主要参考农作物种子质量标准,中药材种子市场缺少全面系统的质检标准及可操作性强的技术^[29-30]。本研究结果表明 ITS2 条形码对可明显区分种子类药材补骨脂及其混伪品沙苑子、天仙子、苘麻子、莱菔子、木蝴蝶、曼陀罗子、洋金花的种子、猪屎豆,从种源上保证了药材的品质,该技术可推广应用到种子生产、销售、临床应用等各环节。这一技术的推广运用,一是促进种质资源保护,有助于中药材规范化安全化种植,有利于中药材种植基地的 GAP 达标。二是有助于规范药材市场秩序,加强对中药材的市场监管,有助于药企 GMP 和 GLP 达标。三是有利于临床用药质量和安全,保证临床疗效,维护患者切身利益,也有助于临床 SOP 和 GCP 达标。

4.3 DNA 条形码分子鉴定在实际工作中的意义 作为传统中药鉴定方法的补充,中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则中明确指出,DNA 条形码技术通过精密度考察和方法适用性考察,确保鉴定结果稳定、可靠^[16]。近年来,DNA 条形码技术已在中药鉴定学、系统分类学、发育进化、生态学、生物多样性保护等各个领域得到广泛运用^[32-33]。本研究中选择 ITS2 条形码序列对补骨脂及其混伪品进行鉴定,

其基原植物样本、药材样本、和复核样本来自不同产地、不同批次,对照药材样本为中国食品药品检定研究院认定,但其 ITS2 序列均可稳定获得,说明采用 ITS2 条形码鉴定补骨脂及混伪品具有很好的稳定性。补骨脂 ITS2 序列经比对后,种内未发现变异位点,K2P 遗传距离为 0。补骨脂与其混伪品经比对后,变异位点较多,种间 K2P 遗传距离远远大于补骨脂种内距离。另外,从基于 ITS2 序列构建的 NJ 树也可以明显区分补骨脂及其混伪品。说明应用 ITS2 条形码鉴定补骨脂及其混伪品具有很高的准确性。本研究突破了传统鉴定方法主要依靠主观经验的限制,直接从基因水平提供客观鉴定依据,具有鉴定结果稳定性高、准确可靠、非专业人员也可以操作的优势,适用于补骨脂及其混伪品的鉴定。运用 DNA 条形码对补骨脂及其混伪品进行有效鉴别,可以防止补骨脂混入无毒中药材特别是需要长期服用的中药材中,为保证中药材的质量和临床疗效,促进中医药的健康发展提供技术支撑。

致谢:感谢中国中医科学院中药研究所、北京市药品检验所、湖南省食品药品检验研究院对部分样品进行复核!

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:187-188.
- [2] 刘蔚,宋卫中,杨磊. 补骨脂与混淆品的鉴别[J]. 中国实用医药, 2011,6(33):238-239.
- [3] 苏园. 补骨脂及其染色掺伪品的鉴别[J]. 中国药业,2012,21(22):94.
- [4] 张百峰,艾相平. 补骨脂混伪品天仙子的鉴别[J]. 时珍国医国药,1998,9(5):67.
- [5] 王先教. 补骨脂伪品曼陀罗子的鉴别[J]. 中南药学,2004,2(4):239-240.
- [6] 胡浩彬,刘舞霞. 补骨脂及其伪品南洋金花种子的鉴别[J]. 江苏药学与临床研究,1998,6(4):48-49.
- [7] 宋勇君,李军,赵月然,等. 天仙子化学成分初步研究[J]. 中华中医药学刊,2014,32(7):1720-1723.
- [8] 付晖,单伟光,栗晓黎,等. 有毒中药洋金花研究近况及检测方法补充报道[J]. 药物分析杂志,2013,33(10):1822-1834.
- [9] 李林珍,朱海燕,石京山,等. 猪屎豆属植物化学成分及药理活性研究概况[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(4):724-730,670.
- [10] 白宇明,郝近大. 补骨脂与木蝴蝶的本草考证及性状鉴别[J]. 中国中药杂志,2014,39(5):946-948.
- [11] 黄应安. 木蝴蝶与补骨脂的鉴别[J]. 海峡药学,1995,7(3):57-58.
- [12] 周昆,代志,柳占彪,等. 补骨脂水提物引起的大鼠肝损害[J]. 天津中医药大学学报,2013,32(4):221-224.

- [13] 张红莲,王雅楠,王建华. 补骨脂的化学成分及药理活性研究概况[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(5):909-913,918.
- [14] Clark SM, Wilkinson SM. Phototoxic contact dermatitis from 5-methoxypsoralen in aromatherapy oil[J]. Contact Dermatitis,1998,38(5):289-290.
- [15] 李庚喜,朱琪,曾立,等. 补骨脂及其混伪品蛋白质电泳鉴别[J]. 广东微量元素科学,2011,18(7):50-53.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 陈士林,庞晓慧,罗焜,等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. 生命科学,2013,25(5):451-459.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版第三增补本)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2014:92-94.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版四部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:383-385.
- [21] 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.
- [22] Yao H, Song J Y, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. PLoS ONE,2010,5(10):e13102.
- [23] 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.
- [24] 罗焜,马培,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定中的 DNA 提取方法研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2012,14(2):1433.
- [25] Bi I V, Harvengt L, Chandelier A, et al. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction[J]. Plant Breeding,1996,115:205.
- [26] Zeng J, Zou Y P, Bai J Y, et al. Preparation of total DNA from "recalcitrant plant taxa"[J]. Acta Bot Sin,2002,44(6):694.
- [27] 马双蛟,周建国,金铨,等. 王不留行种子的 ITS2 序列分子鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2016,18(1):29-34.
- [28] 宋明,张雅琴,林韵涵,等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对细小子种类药材车前子的鉴定比较[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2227-2232.
- [29] 宁书菊,魏道智. 关于我国中药材种子产业的思考[J]. 中国种业,2013(3):3-4.
- [30] 邵长勇,尤泳,王光辉,等. 安国中药材种子种苗产业发展中的现代物理技术应用[J]. 种子,2013,32(12):70-72,75.
- [31] 陈士林,苏钢强,邹健强,等. 中国中药资源可持续发展体系构建[J]. 中国中药杂志,2005,30(15):1141-1146.
- [32] 裴男才,陈步峰. 生物 DNA 条形码:十年发展历程,研究尺度和功能[J]. 生物多样性,2013,21(5):616-627.
- [33] 辛天怡,雷美艳,宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国现代中药,2015,17(2):170-176,184.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)