

基于DNA条形码技术的俄罗斯特色药用植物资源调查

罗凌龙¹, 张弛¹, 邓博¹, 赵保胜², 张耀圣³, 邵远洋¹, 晋小雁¹, 王学勇^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029;
3. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 调查俄罗斯高加索、阿尔泰野外地区药用植物的分布现状,明确该地区药用植物的种类、功效信息,深入挖掘一带一路沿线国家地区的药用植物新资源、新功效。**方法:** 在野外搜寻并采集药用植物制成蜡叶标本运回国,提取腊叶标本的植物总DNA,使用内转录间隔区(ITS)序列通用引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,PCR产物送双向测序,测序结果经软件进行拼接,根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库BLAST所获相似度最高物种的同属ITS序列,经DNAMAN软件对待鉴定物种的ITS序列和同属ITS序列进行相似度分析,利用MEGA 7软件作进化树,采用Kimura-2参数遗传距离,采用邻接法构建邻接法(NJ)系统树,发育树各分支的置信度用自举检验法检验,共进行2000次循环,根据聚类结果进行鉴定。在此基础上对俄罗斯高加索、阿勒泰野外地区的重点药用植物进行归纳与分析。**结果:** 经过NCBI数据库BLAST比对,各标本ITS序列与NCBI数据库上登录序列聚为一支,与外类群明显分开,结合植物标本性状特征,确定了待鉴定标本的种属分类。该次野外收集的标本中共鉴定出51种植物,覆盖17科44属,有明确功效记载的植物共有29种。查阅俄罗斯联邦国家药品目录和《中国药典》,分析国内常用药用植物,总结出20种中俄常见药材其在当地具有不同药用功效。该研究对扩大中药用药范围和临床经验具有重要的借鉴意义,也为当地加强物种保护和开发利用野生药用植物资源提供了依据。

[关键词] 药用植物; 内转录间隔区序列; DNA条形码; 美国国立生物技术信息中心数据库

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0175-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20200211

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191011.1730.007.html>

[网络出版时间] 2019-10-12 14:21

Russian Characteristic Medicinal Plant Resources Based on DNA Barcode Technology

LUO Ling-long¹, ZHANG Chi¹, DENG Bo¹, ZHAO Bao-sheng², ZHANG Yao-sheng³,
SHAO Yuan-yang¹, JIN Xiao-yan¹, WANG Xue-yong^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the distribution status of medicinal plants in the wild areas of Russian Caucasus and Altai, and clarify the types and efficacy information of medicinal plants in the area, so as to dig deep into new resources and new functions of medicinal plants in the countries along the Belt and Road. **Method:** Medicinal plants in the wild were searched and collected to make waxy specimens, and sent back to the country to extract the total DNA of the leaves of the leaves. Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence universal primers were used for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification. The PCR products were sent for the two-way sequencing, and the sequencing results are spliced by software according to National Center for Biotechnology Information (NCBI). The same ITS sequence of the highest similarity species obtained by database BLAST was

[收稿日期] 20190326(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773841);中央本级重大增减支项目(2060302-1610-04)

[第一作者] 罗凌龙,在读硕士,从事药用植物与分子生药学研究,E-mail:luolinglong1995@163.com

[通信作者] *王学勇,博士,教授,从事药用植物与分子生药学研究,E-mail:wxyph.d@163.com

analyzed by DNAMAN software to identify the ITS sequence of the species and the ITS sequence of the same species. The MEGA 7 software was used as the phylogenetic tree, and the Kimura-2 parameter genetic distance was used to construct the neighbor joining (NJ) phylogenetic tree by the neighbor-joining method. The confidence of each branch of the development tree was tested by the bootstrap test method. A total of 2 000 cycles were performed, and the results were identified based on the clustering results. On this basis, the key medicinal plants in the Russian Caucasus and Altay wild areas were summarized and analyzed. **Result:** After BLAST alignment in NCBI database, the ITS sequences of each specimen were clustered with the login sequences on the NCBI database, which were separated from the outer group. The species classification of the specimens to be identified was determined by combining the characteristics of the specimens. A total of 51 plants were identified from the specimens collected in the field, covering 44 genera of 17 families, and 29 plants had clear efficacy records. The National Drug List of the Russian Federation and the Chinese Pharmacopoeia were retrieved to summarize commonly used medicinal plants in China and conclude that 20 kinds of Chinese and Russian common medicinal materials have different medicinal effects in local areas. This study has a reference significance for expanding the scope and clinical experience of traditional Chinese medicines, and provides a basis for strengthened local species conservation, development and utilization of wild medicinal plant resources.

[**Key words**] medicinal plants; internal transcribed spacer sequence; DNA barcode; National Center for Biotechnology Information Database

俄罗斯地处“一带一路”沿线国家,国土广袤,土壤气候条件多样,赋予了俄罗斯丰富的草药资源,但其尚存草药资源开发和应用程度远远不够深入的局面,因此需要充分利用俄罗斯丰富的药用植物资源,开展俄罗斯草药资源调查工作,对于发掘中药新药源,丰富中医临床用药等具有重要意义。本研究利用 DNA 条形码技术,对俄罗斯阿尔泰及高加索地区野外药用植物进行基原鉴定工作,调查其分布状况,对于“一带一路”沿线国家药用植物资源开发具有重要借鉴意义。

真核生物的核糖体 DNA 存在串联结构与多拷贝数的基因家族,其结构可划分为编码 18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA 及分别位于三者中间的内转录间隔区(ITS1, ITS2), ITS 序列由于在进化过程中承受的选择压力小,因此发生突变的概率大大增加,其片段的插入、缺失和替换是较为常见的,能够提供详尽的系统学分析所需要的可遗传性状,因此可作为代表该物种的 DNA 条形码^[1-3]。利用 DNA 条形码在药用动植物种质资源研究中取得的成果已得到国内外学者的肯定^[4-5]。张蓉等^[6]通过遗传距离和分子系统进化树分析显示 DNA 条形码鉴别方法能够在种属水平上将鹿科 3 属 9 种鹿成功的鉴别,对 90% 的鹿茸样本可进行有效地鉴定。张改霞等^[7]基于 ITS2 条形码对药用植物羌活种子进行分子鉴定,研究证实 DNA 条形码技术可用于羌活种子基原鉴别,为中药材种质资源鉴定提供了新方法、新依

据。马晓冲等^[8]对土木香基于 DNA 条形码鉴定做了大量工作,对易混淆的木香、川木香、土木香、青木香、红木香等品种进行鉴别,结果表明利用 ITS2 序列能准确鉴定到物种,使木香类药材鉴别方法简便易行,为临床安全用药提供可靠依据。

1 俄罗斯地理概况

俄罗斯联邦是由 22 个自治共和国, 46 个州, 9 个边疆区, 4 个自治区, 1 个自治州, 3 个联邦直辖市组成的联邦共和立宪制国家。俄罗斯位于欧亚大陆北部,地跨欧亚两大洲,地跨欧亚两洲,面积 1 709.82 万平方公里。俄罗斯大部分地区处于北温带,气候多样,以温带大陆性气候为主,1 月平均温度为 -18 ~ -10 ℃, 7 月平均温度为 11 ~ 27 ℃, 年降水量平均为 150 ~ 1 000 mm。俄罗斯森林覆盖面积为了 7.06 亿公顷,占领土总面积的 40%。远东阿尔泰地区植物资源丰富,生长着 2 000 余种植物,其中 100 余种药用植物已开发生产诸多俄罗斯草药产品。该地区许多植物种群、植物多样性与中国东北及新疆地区药用植物类群类似,物种重叠明显。高加索地区气候处于温带和亚热带之间,高加索山脉生物群落的垂直变化十分明显,海拔 2 000 m 为农作物耕区系, 2 000 ~ 2 800 m 为针叶林和高山草甸区系, 2 800 ~ 3 500 m 为冰雪覆盖寒冷区系,不同海拔植物多样性变化也非常显著。高加索独特的气候变化带,在较小范围类孕育了丰富的植物物种。针对俄罗斯生物多样性明显的这 2 个区域的药用

植物资源进行调查,具有很强的代表性。

2 材料

2.1 样品 2017 年 8 月采摘于俄罗斯阿尔泰及高加索地区,样品凭证标本保存于北京中医药大学中药学院 C309 实验室。

2.2 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Biomiga, 批号 2611021802220001), Mix 酶等聚合酶链式反应 (PCR) 试剂 (北京博迈德生物有限公司, 批号 726381AC), 琼脂糖, 乙醇, ddH₂O 等。

2.3 仪器 1-14 型离心机 (Sigma), TC-5000 型 PCR 扩增仪 (Techne), DYY-6C 型电泳仪, 水平电泳槽, WD-9413B 型凝胶成像分析仪 (北京六一仪器厂), 820HTD 型超声波清洗机 (深圳市观益佳科技有限公司, 40 kHz, 480 W), -20 °C 超低温冰箱 (Haier); XMA-600 型电热恒温鼓风干燥箱, XMTD-600 型恒温水浴锅 (余姚市益成智控技术有限公司)。

3 调研方法

3.1 野外标本采集 本课题组与 2017 年 8 月在俄罗斯地区进行野外药用植物样本采集工作,首先抵达俄罗斯阿尔泰共和国地区,该区域位于俄罗斯、中国、蒙古、哈萨克斯坦交界处,北纬 52°20'18.83", 东经 87°6'12.08", 海拔 415 m。随后前往俄罗斯西部黑海之边克拉斯诺达尔市周边山区,调研俄罗斯西部高加索地区植被及草药生长分布情况,北纬 44°31'23.08", 东经 38°38'29.57", 海拔 412 ~ 789 m。

3.2 DNA 提取及 PCR 扩增 取样品,观察形态,形态结果一致。取标本叶片进行 DNA 提取。样本用

液氮冷冻后研磨成细粉,采用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

3.3 ITS 序列 PCR 扩增 采用 ITS 序列通用引物在热循环扩增仪上进行扩增。ITS 上游引物 P1: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; 下游引物 P4: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTC-3'。PCR 扩增条件: 20 μL 体系含 2 × Taq PCR MasterMix 10 μL, 引物 P1 和 P4 各加 1 μL (μmol · L⁻¹), DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检视,后送 PCR 原液至北京中林希科公司测序部测序。各样品均采用正向、反向测序,以保证测序的准确性。用 ContigExpress 软件对测序所获得的正向、反向序列进行拼接,根据 NCBI 数据库 BLAST (相似性搜索法) 所获相似度最高物种的同属 ITS 序列边界,截取待鉴定物种的 ITS 序列,用 DNAMAN 对待鉴定物种的 ITS 序列和参比 ITS 序列进行相似度分析,利用 MEGA 7 软件作进化树分析。

3.4 美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库分析

3.4.1 相似度对比 通过 NCBI 核酸数据库的 BLAST 对比功能,检索经截取后的待鉴定样品 ITS 序列,综合考虑各项指标后,下载 Ident 值在 99% 以上的物种 ITS 序列,其作为参比序列,然后用 DNAMAN 软件进行相似度分析,将结果中相似度最高的物种初步作为待鉴定样品的基源。见图 1。

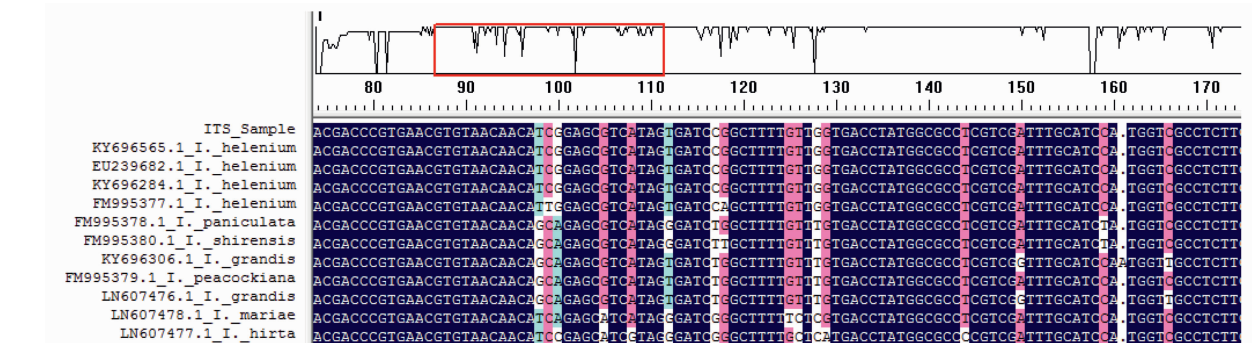


图 1 土木香 (*Inula helenium*) ITS 序列相似度分析
Fig.1 ITS sequence similarity analysis of *Inula helenium*

3.4.2 参比 ITS 序列筛选 由于 NCBI 的核酸数据库中注册序列的物种可能会出现错误鉴定,因此需要对相似度最高的参比序列进行筛选。既从 NCBI 网站上下载与待鉴定药材相似度最高物种的

ITS 序列,利用 Mega 7 软件构建这些序列和参比序列的系统发育树。

3.4.3 系统发育分析 选择一种近缘属植物为外类群,利用 Mega 7 软件构建待鉴定样品和参比 ITS

序列的系统发育树, Kimura-2 参数遗传距离, 采用邻接法构建邻接法 (NJ) 系统树, 发育树各分支的置信度用自举检验法检验, 共进行 2 000 次循环, 根据聚类结果进行鉴定。

4 结果

4.1 药用植物种类特点 此次所采集的样品标本, 通过形态学观察结合 DNA 条形码技术, 共鉴定出的药用植物覆盖 17 科 44 属 51 种。含 1 种药用植物的单种科为 10 科 10 种, 占本区药用植物总

科数 58.82% 的和总种数的 19.6%; 含 2~4 种的药用植物 5 科 15 种, 占本区药用植物总科数和总种数的 29.41%; 含 6~7 种的药用植物为 2 科 13 种, 占本区药用植物总科数 11.76% 的和总种数的 25.49%; 本区药用植物种类最多的是菊科, 共 12 种, 占总种数的 23.52%。查阅《俄罗斯药典》及《中国药典》, 发现鉴定的药材中有 29 种具有明确的药用价值, 其余 22 种的药用价值待挖掘。见表 1。

表 1 部分俄罗斯野外特色药用植物

Table 1 Medicinal plants with Russian characteristics in field

No.	中文名	拉丁名	NCBI 登录号	药用价值
1	高山蓍	<i>Achillea alpina</i>	KX670802.1	全草入药, 能清热解毒、祛风止痛。茎叶含芳香油, 可作调香原料
2	两色乌头	<i>Aconitum albobolaleaceum</i>	KF022316.1	根用于高血压, 关节疼痛
3	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	KR082763.1	炮制品治风湿性关节炎、神经痛、牙痛、中风等症。块根可作农药, 防治稻螟虫、棉蚜等虫害, 以及棉花立枯病、小麦秆锈病等病害, 也可消灭蝇蛆、孑孓等。叶用于热病发热, 泄泻腹痛, 头痛, 牙痛
4	龙蒿	<i>Artemisia dracunculul</i>	KX581805.1	用于治胸腹胀满、消化不良
5	大狼把草	<i>Bidens frondosa</i>	KY968965.1	全草用于呼吸道感染, 咽喉肿痛, 感冒, 急性阑尾炎, 黄疸性肝炎, 胃肠炎, 痢疾, 风湿关节炎, 疟疾; 外用于疔疮, 蛇伤, 跌打肿痛
6	狭叶柴胡	<i>Bupleurum scorzonrifolium</i>	KR902821.1	感冒发热, 寒热往来, 疟疾, 胸胁胀痛, 月经不调, 子宫脱垂, 脱肛
7	黑柴胡	<i>Bupleurum smithii</i>	KR902826.1	外感发热; 寒热往来; 疟疾; 肝郁胁痛乳胀; 头痛头眩; 月经不调; 气虚下陷之脱肛; 子宫脱垂; 胃下垂
8	匍匐风铃草	<i>Campanula rapunculoides</i>	HQ823434.1	治疗狂犬病
9	蔓蝉	<i>Cicerbita racemosa</i>	AJ633326.1	治疗癫痫, 闭经和便秘
10	野胡萝卜	<i>Daucus carota</i>	AY552527.1	防止血管硬化, 降低血压及减少心脏病, 增强免疫功能, 益肝明目, 通便, 抗过敏
11	东方山羊豆	<i>Galega orientalis</i>	DQ311966.1	发汗、利尿和驱虫药
12	黄海棠	<i>Hypericum ascyron</i>	JN984874.1	平肝, 止血, 败毒, 消肿。治头痛, 吐血, 跌打损伤, 疮疖
13	牛膝草	<i>Hyssopus officinalis</i>	JQ669106.1	化痰、止咳、祛风寒、杀菌, 用于咳嗽、头痛, 哮喘及寒性引起的感冒发烧, 气管炎引起的咳嗽气喘等
14	土木香	<i>Inula helenium</i>	FN870378.1	健脾和胃, 调气解郁, 止痛安胎之功效。用于胸胁、腕腹胀痛, 呕吐泻痢, 胸胁挫伤, 岔气作痛, 胎动不安
15	野芝麻	<i>Lamium barbatum</i>	KC350619.1	治肺热咳血, 血淋, 白带, 月经不调, 小儿虚热, 跌打损伤, 肿毒
16	牧地山黧豆	<i>Lathyrus pratensis</i>	AY839384.1	肺气壅实、咳嗽痰多、胸满喘急之证
17	无	<i>Lavatera thuringiaca</i>	EF419451.1	传染性疾病、癌症
18	突厥益母草	<i>Leonurus turkestanicus</i>	EF395809.1	月经不调, 痛经经闭, 恶露不尽, 水肿尿少, 疮疡肿毒
19	柳穿鱼	<i>Linaria vulgaris</i>	KJ747021.1	清热解毒、散瘀消肿, 利尿。黄疸, 头痛, 头晕, 痔疮便秘, 皮肤病, 烫伤
20	阔荚苜蓿	<i>Medicago platycarpus</i>	KX788055.1	清胃热, 利尿除湿
21	草木犀	<i>Melilotus officinalis</i>	DQ311985.1	治疗结喉, 狂犬病, 久热, 毒热
22	野薄荷	<i>Mentha arvensis</i>	DQ667325.1	传统上用叶子制成的茶叶用于治疗发烧, 头痛, 消化系统疾病和各种轻微疾病。叶子是治疗胃癌的经典药物。全草用于麻醉、消炎、解痉、防腐、芳香、驱风、发汗
23	宽叶石防风	<i>Peucedanum terebinthaceum</i>	AY548216.1	用于感冒、风湿痹痛

续表 1

No.	中文名	拉丁名	NCBI 登录号	药用价值
24	细距舌唇兰	<i>Platanthera bifolia</i>	MF944372.1	用于儿童和疗养者的功能食品,治疗胃肠道刺激
25	金露梅	<i>Potentilla fruticosa</i>	AF163478.1	根的汁液用于治疗消化不良
26	狗筋麦瓶草	<i>Silene vulgaris</i>	KJ918500.1	润肤作用,植物汁液用于治疗眼炎
27	乌苏里藜芦	<i>Veratrum nigrum</i> var. <i>ussuriense</i>	JF807683.1	动脉闭塞
28	马鞭草	<i>Verbena officinalis</i>	JN575351.1	外用治疗轻伤,湿疹,疮,神经痛和牙龈疾病。叶和开花茎具有止痛,抗菌,抗凝血,解痉,收敛,清理,发汗,温和利尿
29	欧洲荚蒾	<i>Viburnum opulus</i>	KY860934.1	强效抗痉挛药,主要用于治疗哮喘,痉挛和其他症状,如绞痛或月经痛

4.2 中俄部分草药习用功效差异分析 俄罗斯传统医药源于希腊,随后又整合了鞑靼人和蒙古族传统药物以及阿拉伯传统医药体系特点,形成了独特的俄罗斯医药体系。因此,俄罗斯药典记载的习用

传统草药有许多品种与我国中草药品种虽然相同,但在习用功效方面与我国中医药既有联系,又有区别。下表列举了 20 种部分《俄罗斯药典》记载品种中俄^[9]间功效及临床应用差异的比较。见表 2。

表 2 中俄部分草药功效对比

Table 2 Comparison of efficacy of some Chinese and Russian herbal medicines

No.	拉丁名	中文名	俄罗斯传统功效 ^[9]	功效 ^[10]
1	<i>Ledum palustre</i>	杜香	祛痰	化痰、止咳、平喘
2	<i>Calendula officinalis</i>	金盏花	抗感染性和抗炎	清热平喘、凉血止血
3	<i>Centaurea cyanus</i>	矢车菊	利尿	补心壮阳、燥湿固精
4	<i>Crataegus sanguinea</i>	辽宁山楂	心血管病	消食积、化滞痰
5	<i>Leonurus cardiaca</i>	益母草	镇静	活血调经、利尿消肿
6	<i>Origanum vulgare</i>	牛至	祛痰	清暑解表、利水消肿
7	<i>Polygonum aviculare</i>	扁蓄	利尿	功专利水清热、除湿杀虫
8	<i>Polygonum hydropiper</i>	水蓼	止血	清火解毒、消肿止痛
9	<i>Thymus serpyllum</i>	铺地百里香	祛痰	治白带、久不怀孕
10	<i>Taraxacum officinale</i>	蒲公英	刺激食欲和利胆	清热解毒、消肿散结、利尿通淋
11	<i>Bergenia crassifolia</i>	厚叶岩白菜	外用止血	滋补强壮、止咳止血
12	<i>Polygonum bistorta</i>	拳参	止血	清热利湿、凉血止血
13	<i>Acorus calamus</i>	水菖蒲	食欲兴奋剂,利胆	化痰开窍、除湿健胃、杀虫止痒
14	<i>Inula helenium</i>	土木香	祛痰	健脾和胃、行气止痛
15	<i>Valeriana officinalis</i>	缬草	镇静	清热、解毒、镇静
16	<i>Cucurbita moschata</i>	南瓜	驱虫	解毒消肿
17	<i>Schisandra chinensis</i>	五味子	滋补	收敛固涩、益气生津
18	<i>Laminaria saccharina</i>	海带	润肠通便	清热止痛、软坚散结、清胆止泻
19	<i>Tussilago farfara</i>	款冬花	化痰	润肺下气、化痰止咳
20	<i>Hyoscyamus niger</i>	天仙子	抗胆碱作用	解痉昌涌、安心定痛

5 讨论

俄罗斯作为世界上领土面积最为广阔的国家,拥有极为丰富的中草药资源,民族复杂多样,孕育了独特的传统医药体系和用药特色。我国中草药市场

需求巨大,再加上老龄化社会的来临,中药草药市场需求将进一步扩大。为此,俄罗斯草药资源开发前景十分广阔。俄罗斯草药资源与我国巨大的市场需求存在显著的优势互补性,为“一带一路”沿线国家

野外新药资源开发工作奠定重要基础。本研究开展了俄罗斯境内野外药材资源普查工作,通过 DNA 条形码技术结合性状鉴定结果,进一步确定了俄罗斯野外药用植物的分布现状,为俄罗斯药用植物资源普查提供重要的借鉴意义,为新药的开发提供了新的优质原料、扩大了中医临床用药的资源。

俄罗斯独特用药习惯和临床经验具有重要的借鉴意义。在俄罗斯传统用药习惯的影响下,许多俄罗斯习用药与我国中药在功效和临床应用方面存在较大差异。如表 2 所示,土木香俄罗斯民间用作祛痰药,而在我国土木香具有健脾和胃、行气止痛之功效,常用于脾胃运化失调等疾病的治疗。又比如益母草,在俄罗斯常用作镇静药使用;而中药益母草,具有活血调经、利尿消肿之功,是妇科之要药。可见,俄罗斯传统草药用药特点与我国中医药用药存在较大差异,这种“差异”可为我国中药功效“再评价”或进行新药开发提供重要的借鉴意义。本研究是在“一带一路”项目支持下,进行俄罗斯野外特色药用植物资源调查,为加强一带一路建设奠定了重要基础。

[参考文献]

[1] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA; a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. *Annal Missouri Bota Garden*, 1995, 82(2):247-277.

[2] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae[J]. *Mol Phylogenetics Evol*, 1992, 1(1):3-16.

[3] Eickbush T H, Eickbush D G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes[J]. *Genetics*, 2007, 175(2):477-485.

[4] YANG Z Y, CHAO Z, HUO K K, et al. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6):416-423.

[5] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(3):491-496.

[6] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(4):263-266.

[7] 张改霞, 金钺, 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.

[8] 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.

[9] The State Register of Medicinal Drugs. Official publication in 2 volumes [M]. Moscow: Medicine, 2004.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.

[责任编辑 顾雪竹]