

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2018.60784

吕定豪, 刘安莉, 徐文芬, 何顺志. 中国蜘蛛抱蛋属植物 DNA 条形码研究 [J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 784~789

Lü DH, Liu AL, Xu WF, He SZ. Study on the genus *Aspidistra* based on DNA barcoding [J]. Plant Science Journal, 2018, 36(6): 784~789

中国蜘蛛抱蛋属植物 DNA 条形码研究

吕定豪¹, 刘安莉^{2,3}, 徐文芬³, 何顺志^{3*}

(1. 遵义市第四人民医院, 贵州遵义 563004; 2. 贵阳医学院第二附属医院, 贵阳 550002; 3. 贵阳医学院, 贵阳 550001)

摘要: 利用植物 DNA 条形码候选序列 *matK*、*psbA-trnH*、*psbK-psbI* 和 *rbcL* 对蜘蛛抱蛋属 (*Aspidistra*) 植物的 19 种 104 批样品进行扩增和测序, 并采用相似性搜索算法 (BLAST) 对各序列的鉴定效率进行评价, 得出蜘蛛抱蛋属物种鉴定的最佳序列。结果显示, *psbK-psbI* 的物种鉴定成功率为 88.7%, 在单一序列中成功率最高。通过多序列组合鉴定效率的比较, 发现组合序列的鉴定成功率明显高于单一序列, 其中 *matK+(psbK-psbI)* 组合的鉴定成功率高达 100%, 基于该序列组合构建蜘蛛抱蛋属植物的系统发育树, 结果显示同一物种的样品聚集度较好, 多表现为单系。研究结果表明 *matK+(psbK-psbI)* 序列组合可作为蜘蛛抱蛋植物种鉴定的最佳条形码序列。

关键词: 蜘蛛抱蛋属; DNA 条形码; 相似性搜索算法; 鉴定

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)06-0784-06

Study on the genus *Aspidistra* based on DNA barcoding

Lü Ding-Hao¹, Liu An-Li^{2,3}, Xu Wen-Fen³, He Shun-Zhi^{3*}

(1. The Fourth People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563004, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 3. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

Abstract: In this study, plant DNA barcode (*matK*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, and *rbcL*) candidate sequences were used for the PCR amplification and sequencing of 104 samples from 19 *Aspidistra* species. The amplification success rate, sequencing success rate, and intra- and inter-species genetic variation of each barcode sequence were investigated, with BLAST searching adopted to evaluate the identification efficiency of each sequence. Results showed that the identification success rate of *psbK-psbI* was 88.7%, which was the highest for a single sequence. The identification efficiency of multiple combinational sequences was also compared and found to be significantly higher than that of the single sequences, with the success rate of *matK+(psbK-psbI)* reaching 100%. In addition, the neighbor-joining tree constructed based on the *matK+(psbK-psbI)* combinational sequence showed that samples of the same species had better aggregation and were mostly monophyletic. Therefore, *matK+(psbK-psbI)* appears to be the best barcode sequence for interspecific identification of *Aspidistra*.

收稿日期: 2018-06-08, 退修日期: 2018-08-07。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660640); 贵州省科技计划项目(黔科合 LH[2016]7132 号); 贵州省教育厅国内一流学科建设项目(GNYL[2017]008)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (81660640), Science and Technology Planning Project of Guizhou Province of China (LH[2016]7132), and First-class Discipline Construction Project of Guizhou Provincial Education Department (GNYL[2017]008).

作者简介: 吕定豪(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药质量与鉴定(E-mail: 365173732@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: hesz8899@126.com)。

Key words: *Aspidistra*; DNA barcoding; BLAST; Identification

蜘蛛抱蛋属(*Aspidistra*)隶属于广义百合科, 目前全世界已知该属植物有150余种, 我国约97种, 主要分布于长江以南的广西、贵州、云南、四川、重庆、湖南等地。该属植物具有较高的园林观赏价值, 在我国民间还有着广泛的药用价值, 具有活血止痛、清肺止咳、利尿通淋等功效^[1]。该属植物的物种鉴定主要采用经典形态分类, 普遍辅以花部的形态结构为分类依据, 由于其种间花期不尽相同, 且花部变异较大, 相同居群中开花植株较少, 导致种间鉴别难度增大。此外, 针对该属还开展了细胞分类学、微形态和孢粉学等相关研究^[2-8], 但尚未获得该属植物理想的分类方法。

DNA条形码技术是通过比较物种中一条或几条通用的DNA片段, 对物种进行快速、准确鉴定的技术。它能够为植物提供简便、快速、可信的分类学依据。DNA条形码技术与传统分类学方法相比, 具诸多优点, 如: 样品用量较小, 鉴定物种不受个体形态特征、发育阶段以及完整性的影响, 操作简便、鉴定过程无限制、有利于发现新种和隐存种等特点。自Hebert等^[9]于2003年首次提出DNA条形码概念以来, 该项研究迅速成为植物分类学研究的热点。如何找到通用性好、测序质量高、物种分辨率高的DNA条形码片段是这项技术的关键。刘安莉等^[10]采用6个分子标记(*matK*、*psbA-trnH*、*rbcl*、*psbK-psbI*、*ITS2*、*ITS*)及组合, 对贵州蜘蛛抱蛋属植物11种20个样品进行了研究, 通过综合分析, 发现*matK*在单一序列中鉴定成功率最高, 但*matK*+(*psbK-psbI*)序列组合的鉴定成功率高达100%, 提出该序列组合可作为蜘蛛抱蛋属植物鉴定的分子标记。

本研究采用*matK*、*psbA-trnH*、*psbK-psbI*和*rbcl*4个DNA候选条形码序列, 对蜘蛛抱蛋属19种104批样品进行PCR扩增, 并对扩增成功率、测序效率、种内与种间变异水平和鉴定成功率等指标进行综合评价, 拟获得该属植物物种鉴定的最佳DNA条形码序列, 以期为该属物种的分子分类学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究共收集到不同产地的蜘蛛抱蛋属植物

19种104个样品(表1), 植物新鲜叶片经变色硅胶迅速干燥后常温密封保存。样品由贵阳中医学院何顺志教授鉴定。其中17种引种栽培于贵阳中医学院, 凭证标本存放于贵阳中医学院标本室。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取、PCR扩增和测序

取干燥的植物材料约20 mg, 提取总DNA。*psbA-trnH*、*matK*^[10]、*psbK-psbI*^[11]和*rbcl*^[12]序列扩增所用引物及PCR反应条件见表2。50 μL反应体系包括: 24 μL *Taq* PCR Master mix, 20 μL ddH₂O, 上、下游引物各2 μL, 2 μL模板DNA(20~50 ng/μL)。扩增后, 取PCR产物5 μL于1.2%~1.5%的琼脂糖凝胶中电泳检测, 筛选出具有单独和清晰条带的样品送测序。

1.2.2 数据处理

采用CodonCode Aligner 5.1.2软件对测序后得到的峰图进行校对拼接, 去除引物区及低质量序列, 对所得序列采用MEGA 5.05软件进行多序列比对; 对条形码候选序列的扩增成功率和测序效率进行评价; 利用Taxon DNA软件对4个条形码选序列进行种内、种间的变异分析^[13], 评价条形码序列在种间和种内的变异情况; 采用BLAST工具分析各条形码序列的鉴定成功率^[14]; 考察多序列组合的鉴定效率, 采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 进行遗传聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA条形码扩增和测序成功率, 序列长度和GC含量

研究发现, PCR扩增和测序成功率是评判DNA条形码序列优劣的标准之一。本研究对4条候选条形码序列的PCR扩增和测序结果进行了统计(表3), 结果显示, *psbA-trnH*和*psbK-psbI*的扩增成功率为100%, *matK*和*rbcl*的扩增成功率为97.3%; *matK*和*psbA-trnH*的测序成功率为100%, *psbK-psbI*和*rbcl*测序成功率为97.3%和96.4%。各条形码中, *matK*扩增的序列最长, *psbK-psbI*最短; *rbcl*序列的GC含量最高。

2.2 DNA条形码扩增序列的种内、种间变异

研究表明, 理想的DNA条形码序列应具有明

表 1 样品信息
Table 1 Sample information

名称 Species name	拉丁名 Latin name	采集地 Locality	样品编号 No.	数量 Amount	凭证标本 Voucher specimen
线叶蜘蛛抱蛋	<i>Aspidistra linearifolia</i> Y. Wan & C. C. Huang	云南马关县	01~05	5	ZYYJS14102102
线叶蜘蛛抱蛋	<i>A. linearifolia</i> Y. Wan & C. C. Huang	广西宁明县	06~10	5	ZYYJS14112001
盈江蜘蛛抱蛋	<i>A. yingjiangensis</i> L. J. Peng	云南盈江县	01~05	5	ZYYJS14102701
洞生蜘蛛抱蛋	<i>A. cavicola</i> D. Fang & K. C. Yen	广西凤山县	01~05	5	ZYYJS14051701
长药蜘蛛抱蛋	<i>A. dolichanthera</i> X. X. Chen	广西龙州县	01~05	5	ZYYJS14051401
啮边蜘蛛抱蛋	<i>A. marginella</i> D. Fang & L. Zeng	广西龙州县	01~05	5	ZYYJS14051403
柳江蜘蛛抱蛋	<i>A. patentiloba</i> Y. Wan & X. H. Lu	广西柳江县	01~05	5	ZYYJS14051003
凤凰蜘蛛抱蛋	<i>A. fenghuangensis</i> K. Y. Lang	湖南凤凰县	01~05	5	活体材料
辐花蜘蛛抱蛋	<i>A. subrotata</i> Y. Wan & C. C. Huang	广西南宁市	01~05	5	活体材料
石山蜘蛛抱蛋	<i>A. saxicola</i> Y. Wan	广西南宁市	01~04	4	活体材料
带叶蜘蛛抱蛋	<i>A. fasciaria</i> G. Z. Li	广西金秀县	01~05	5	ZYYJS14050901
乐山蜘蛛抱蛋	<i>A. leshanensis</i> K. Y. Lang & Z. Y. Zhu	四川乐山市	01~05	5	ZYYJS14061201
峨眉蜘蛛抱蛋	<i>A. omeiensis</i> Z. Y. Zhu & J. L. Zhang	四川眉山市	01~05	5	ZYYJS14061001
四川蜘蛛抱蛋	<i>A. sichuanensis</i> K. Y. Lang & Z. Y. Zhu	四川眉山市	01~05	5	ZYYJS14061101
四川蜘蛛抱蛋	<i>A. sichuanensis</i> K. Y. Lang & Z. Y. Zhu	贵州赤水市	06~10	5	ZYYJS15040201
粽叶草	<i>A. ob lanceifolia</i> F. T. Wang	重庆雁山区	01~05	5	活体材料
粽叶草	<i>A. ob lanceifolia</i> F. T. Wang	重庆雁山区	06~07	2	活体材料
十字蜘蛛抱蛋	<i>A. cruciformis</i> Y. Wan & X. H. Lu	贵州荔波县	01~05	5	ZYYJS15040401
环江蜘蛛抱蛋	<i>Aspidistra huanjiangensis</i> G. Z. Li & Y. G. Wei	贵州荔波县	01~05	5	ZYYJS15040301
云雾蜘蛛抱蛋	<i>A. yunwuensis</i> S. Z. He & W. F. Xu	广西融水县	01~05	5	活体材料
马关蜘蛛抱蛋	<i>A. maguanensis</i> S. Z. He & D. H. Lv	云南马关县	01~03	3	ZYYJS14102101
小花蜘蛛抱蛋	<i>A. minutiflora</i> Stapf	广西武鸣县	01~05	5	活体材料

表 2 PCR 扩增引物与扩增程序
Table 2 PCR amplification primers and amplification program

条形码 Barcoding	引物 Primer name	碱基序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增程序 Amplification program
psbA- trnH	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min; 55℃退火 1 min;
	trnH	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	72℃延伸 1.5 min; 共 30 个循环; 72℃延伸 7 min
matK	KIM_3F	CGTACAGTACTTTGTGTTACGAG	94℃预变性 1 min; 94℃变性 30 s; 52℃退火 1 min; 72℃
	KIM_1R	ACCCAGTCATCTGAAATCTTGGTTC	延伸 50 s; 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min
psbK- psbI	psbK	TTAGCCTTGTGGCAAG	94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s; 51℃退火 40 s; 72℃
	psbI	AGAGTTGAGAGTAAGCAT	延伸 1 min; 共 35 个循环; 72℃延伸 7 min
rbcL	1F	ACGTAGCTTATCCTTAGACC	95℃预变性 3 min; 94℃变性 20 s; 52℃退火 30 s; 72℃
	724R	TGGCATAGAGACCCAATCTT	延伸 1 min; 共 35 个循环; 72℃延伸 7 min

表 3 4 个条形码序列扩增和测序成功率, 序列长度和 GC 含量
Table 3 Sequence characteristics of four barcodes

条形码 Barcoding	扩增成功率(%) Success rate of amplification	测序成功率(%) Success rate of sequencing	序列长度(bp) Length	GC 含量(%) GC content
matK	97.3	100	896	31.0
psbA-trnH	100	100	673	36.1
psbK-psbI	100	97.3	514	28.6
rbcL	97.3	96.4	702	42.3

显的种间变异和足够小的种内变异。对各条形码的扩增序列在植物种内和种间变异数据进行分析(表 4), 发现 DNA 条形码在种内变异的大

小依次排序为: *psbA-trnH* > *rbcL* > *psbK-psbI* > *matK*; 种间变异大小依次排序为: *rbcL* > *psbA-trnH* > *psbK-psbI* > *matK*。

表 4 4 个条形码序列种内、种间遗传差异分析
Table 4 Analysis of intraspecific and interspecific divergences of four barcodes

遗传差异 Variation	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>
种内变异 Intraspecific variation	0.0004 ± 0.0007	0.0694 ± 0.2494
种间变异 Interspecific variation	0.0031 ± 0.0017	0.0626 ± 0.2353
遗传差异 Variation	<i>psbK-psbl</i>	<i>rbcL</i>
种内变异 Intraspecific variation	0.0153 ± 0.0984	0.0649 ± 0.2486
种间变异 Interspecific variation	0.0208 ± 0.1100	0.1601 ± 0.3693

2.3 DNA 条形码序列鉴定效率评价

研究表明, DNA 条形码的鉴定效率是判断条形码序列优劣的标准之一。本研究采用 BLAST 分析 4 个条形码序列的鉴定效率, 结果显示(表 5), 单一序列的鉴定成功率均未达到 100%, 其中 *psbK-psbl* 鉴定效率最高, 其次是 *matK*、*rbcL* 和 *psbA-trnH*。而组合条形码的鉴定效率明显优于单一序列, 其中 *matK* + (*psbK-psbl*) 达 100%, *matK* + *rbcL*、*rbcL* + (*psbK-psbl*) 和 (*psbK-psbl*) + (*psbA-trnH*) 组合分别为 91.2%、94.6% 和 97.9%。

表 5 4 个条形码序列的鉴定成功率
Table 5 Success rate of four barcode sequences

条形码 Barcode	鉴定成功率 (%) Success rate
<i>matK</i>	78.0
<i>psbA-trnH</i>	43.6
<i>psbK-psbl</i>	88.7
<i>rbcL</i>	50.5
<i>matK</i> + (<i>psbA-trnH</i>)	80.2
<i>matK</i> + (<i>psbK-psbl</i>)	100
<i>matK</i> + <i>rbcL</i>	91.2
<i>rbcL</i> + (<i>psbK-psbl</i>)	94.6
(<i>psbK-psbl</i>) + (<i>psbA-trnH</i>)	97.9

2.4 遗传聚类分析

本研究基于 *matK* + (*psbK-psbl*) 序列构建了蜘蛛抱蛋属 19 种 92 个样品的系统发育树(图 1), 结果显示该属植物聚集度较好, 多数表现为单系, 可对物种进行区分, 只有环江蜘蛛抱蛋的 5 个样品相对分散。线叶蜘蛛抱蛋的 01~04 号样品采于云南, 06~10 号采于广西, 2 个地区的样品聚为一支; 采于四川和贵州的四川蜘蛛抱蛋遗传距离较

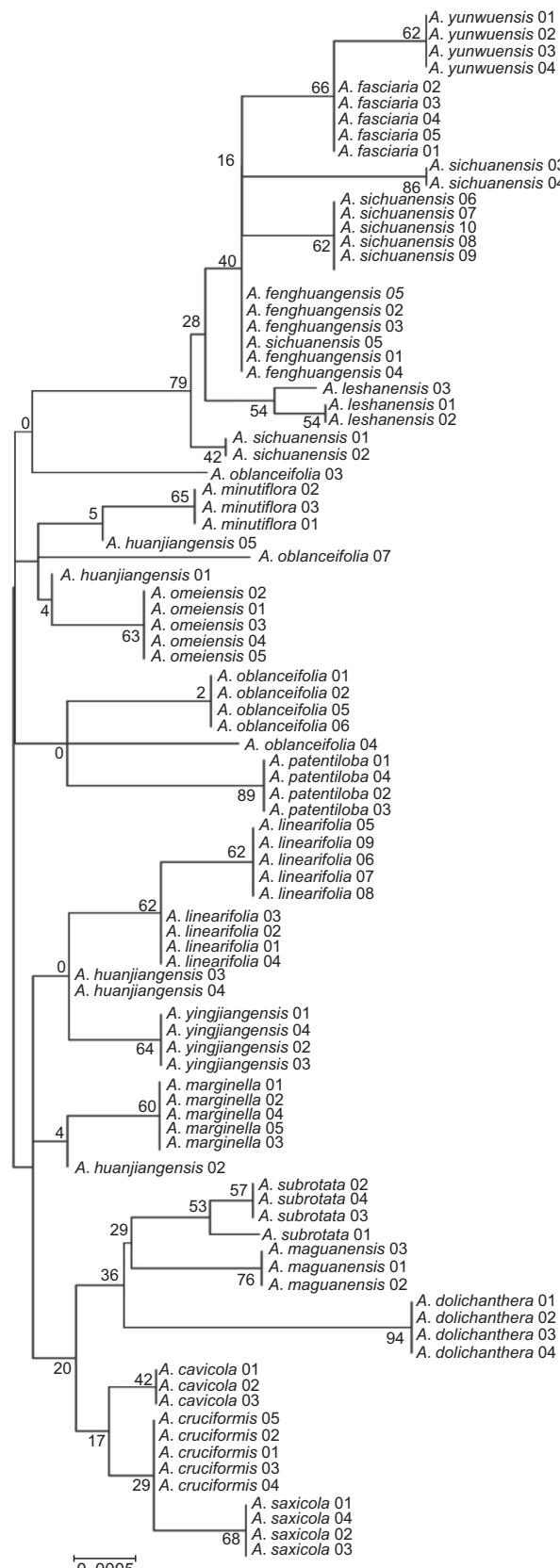


图 1 基于 *matK* + (*psbK-psbl*) 序列构建的 NJ 树
Fig. 1 Neighbor-joining tree based on *matK* + (*psbK-psbl*) sequences

近。研究结果表明生态地理环境对该属种内遗传变异的影响较小。

3 讨论

自DNA条形码技术提出以来,一直是分子分类学研究的热点^[15]。研究表明,一段相对较短、标准且具有足够变异、易扩增的DNA片段,能够对植物进行快速、准确地鉴定。目前植物中还没有一条被广泛认可的DNA条形码。陈士林等^[16]提出以ITS2序列作为鉴定药用植物标准的DNA条形码。刘安莉等^[10]对贵州蜘蛛抱蛋属植物进行核基因序列ITS和ITS2的研究,发现样品序列扩增效果不理想,本研究也尝试采用该序列对蜘蛛抱蛋属植物进行分析,但只有少量样品扩增成功,物种无法进行有效的区分。因此,有关核基因序列ITS和ITS2是否适用于蜘蛛抱蛋属植物的分类还有待进一步探讨。

matK序列是一条进化速率较快的基因编码区片段,在不同植物的分类群间很难进行扩增,因此该条形码最主要的缺点是引物的通用性较差^[17]。本研究中matK的扩增成功率为97.3%,测序成功率为100%。虽然种间变异水平明显大于种内,但该条形码的鉴定效率仅为80.2%。psbA-trnH是进化速率最快的植物叶绿体间隔区片段,该片段两端均存在较长的保守序列,便于设计通用引物^[18]。刘安莉等^[10]对贵州蜘蛛抱蛋属植物的psbA-trnH片段进行了扩增和测序,成功率达到100%,但其鉴定成功率为45%。rbcl序列具通用性好、易扩增特点,但其变异主要存在于种以上水平,种内鉴定效果不显著^[19],适用于物种属间的鉴定。本研究采用该序列进行扩增和测序,成功率分别为97.3%和96.4%,由于植物种内与种间遗传变异差异不显著,鉴定成功率仅为50.5%。psbK-psbI序列在植物叶绿体基因中相对保守,研究表明该序列具有较高的物种鉴别能力^[15]。采用该序列的扩增和测序成功率分别为100%和97.3%,在单一序列中鉴定成功率最高(88.7%),与刘安莉等^[10]的研究相比成功率提高了23%,原因可能是扩增该片段时采用的引物不同,且本实验扩增的基因片段长度为514 bp,相比前人的研究具有更多变异位点。

本研究发现,采用单一序列的鉴定结果均不理

想,因此进一步采用4个条形码组合对蜘蛛抱蛋属植物进行了鉴定。由于不同条形码组合能够降低植物种内的变异,因此可以减少种内和种间变异的重叠^[20]。多片段组合需选取进化速率快慢不同的片段,且包含基因编码区和非编码区的组合较好^[21]。研究已经证实,rbcl+matK组合可以作为整个植物界通用的条形码序列^[22]。本研究结果表明,多序列组合的鉴定效率均比单一序列高,其中rbcl+matK的鉴定效率达到91.2%,rbcl+(psbK-psbI)和(psbK-psbI)+(psbA-trnH)分别为94.6%和97.9%,而matK+(psbK-psbI)的鉴定成功率高达100%,本研究结果与前人^[10]对贵州产蜘蛛抱蛋属植物DNA条形码的研究结果一致。且基于matK+(psbK-psbI)序列所构建的系统发育树,样品聚集度较好,基本上能对不同物种进行区分。因此,我们认为matK+(psbK-psbI)序列组合适合用于蜘蛛抱蛋属植物的DNA条形码研究。

近年来,报道了许多蜘蛛抱蛋属植物新种,物种数量不断增加,因此尚需开发适用于该属物种鉴定的DNA条形码,构建该属的二维DNA条形码鉴定体系^[23],以解决存疑种的鉴定并为濒危种的保护提供理论依据。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [2] 乔琴, 张长芹, 马永鹏, 田伟. 蜘蛛抱蛋属植物的核型不对称性分析 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(5): 565-569. Qiao Q, Zhang CQ, Ma YP, Tian W. Karyotype asymmetry of *Aspidistra* (Convallarieae, Ruscaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2008, 30(5): 565-569.
- [3] 刘安莉, 何顺志, 徐文芬, 陈士林. 贵州产蜘蛛抱蛋属植物的细胞分类学研究 [J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 1-7. Liu AL, He SZ, Xu WF, Chen SL. Cytotaxonomy of the genus *Aspidistra* from Guizhou [J]. *Plant Science Journal*, 2012, 30(1): 1-7.
- [4] Gao Q, Lin Y. Karyomorphology of *Aspidistra grandiflora* H. J. Tillich from Indonesia [J]. *Nucleus*, 2012, 55(3): 139-141.
- [5] Meng T, Gao Q. Karyomorphology of six species of the genus *Aspidistra* Ker-Gawl. (Fam. Asparagaceae s. l.) from China [J]. *Nucleus*, 2014, 57(2): 143-147.
- [6] 高永跃. 贵州蜘蛛抱蛋属植物孢粉学与近红外光谱研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2014.
- [7] Gao Q, Huang J, Wei T. Karyotype analysis of the hexaploid *Aspidistra sutepensis* K. Larsen [J]. *Caryologia*,

- 2015, 68(1): 61–62.
- [8] Gao YY, He SZ, Xu WF. Classification of Guizhou *Aspidistra* plants by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2017, 18(4): 575–578, 590.
- [9] Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: S96–S99.
- [10] 刘安莉, 何顺志, 姚辉, 陈士林, 宋经元. 蜘蛛抱蛋属药用植物分子鉴定研究 [J]. 世界科学技术, 2012, 14(1): 1166–1171.
- Liu AL, He SZ, Yao H, Chen SL, Song JY. Molecular identification of the medicinal plant of the *Aspidistra* [J]. *World Science and Technology*, 2012, 14(1): 1166–1171.
- [11] 姚辉, 杨培, 周红, 马双姣, 宋经元, 陈士林. 基于叶绿体 *psbK-psbI* 序列的石斛属药用植物鉴定 [J]. 药学学报, 2015, 50(6): 783–787.
- Yao H, Yang P, Zhou H, Ma SJ, Song JY, Chen SL. Identification of medicinal plant *Dendrobium* based on the chloroplast *psbK-psbI* intergenic spacer [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2015, 50(6): 783–787.
- [12] 秦民坚, 黄芸, 杨光, 徐珞珊, 周开亚. 射干及类似药用植物叶绿体 *rbcL* 基因序列分析 [J]. 药学学报, 2003, 38(2): 147–152.
- Qin MJ, Huang Y, Yang G, Xu LS, Zhou KY. *RbcL* sequence analysis of *Belamcanda chinensis* and related medicinal plants of *Iris* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2003, 38(2): 147–152.
- [13] Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biol*, 2006, 3(12): e422.
- [14] Ross HA, Murugan S, Li WLS. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation [J]. *Syst Biol*, 2008, 57(2): 216–230.
- [15] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794–12797.
- [16] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 韩建萍. 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(6): 747–754.
- Chen SL, Pang XH, Yao H, Han JP. Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia medica [J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2011, 13(6): 747–754.
- [17] Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Berg CVD. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 295–299.
- [18] Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, et al. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. *Am J Bot*, 2005, 92(1): 142–166.
- [19] Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [20] Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigenetiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, 84(3): 335–341.
- [21] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 葛学军. 植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417–425.
- Ning SP, Yan HF, Hao G, Ge XJ. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiversity Science*, 2008, 16(5): 417–425.
- [22] Thomas C. Plant barcode soon to become reality [J]. *Science*, 2009, 325(5940): 526.
- [23] 雷美艳, 张娜娜, 张军, 辛天怡, 易思荣, 宋经元. 基于 DNA 条形码鉴定植物药常山及其混伪品 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 379–386.
- Lei MY, Zhang NN, Zhang J, Xin TY, Yi SR, Song JY. Identification of *Dichroa febrifuga* and its adulterants based on DNA barcoding technology [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(3): 379–386.

(责任编辑: 周媛)