

· 专题 ·

基于 DNA 条形码技术鉴别 5 种列当属药用植物[△]韩奇亨¹, 汤健¹, 王晓琴^{2*}, 李旻辉^{1,3,4,5*}

- (1. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060;
2. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110;
3. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010110;
4. 内蒙古自治区特色药用植物培育与保护工程技术研究中心, 内蒙古 包头 014060;
5. 内蒙古自治区特色道地药材资源保护与利用重点实验室, 内蒙古 包头 014060)

[摘要] 目的: 建立一种快速、准确、标准化的 5 种列当属药用植物的 DNA 条形码鉴别方法。方法: 采集 5 种列当属药用植物, 所有样品进行总 DNA 提取, PCR 扩增, 并对扩增产物进行测序得到相应的序列, 测序结果使用 CONTIG、BioEdit、MEGA6.0 软件进行分析, 构建系统发育树。结果: 测得 5 种列当属植物的 ITS、rbcL、trnL-F 和 matK 全长序列共 200 条, 4 种序列长度范围在 364 ~ 1240 bp, 其中 ITS、trnL-F 和 matK 可将其鉴别出来。结论: rbcL 序列无法有效鉴别 5 种列当属药用植物, trnL-F 与 ITS 序列能够成功鉴别, 可作为列当属植物的分子鉴别方法。

[关键词] 分子鉴别; DNA 条形码; 列当属;

Study on Identification of Five Species of Genus *Orobanche* with DNA Barcoding TechnologyHAN Qiheng¹, TANG Jian¹, WANG Xiaojin^{2*}, LI Minhui^{1,3,4,5*}

- (1. Baotou Medical College, Baotou 014060, China;
2. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;
3. Inner Mongolia Autonomous Region Academy of Chinese Medicine, Hohhot 010110, China;
4. Inner Mongolia Research Center of Characteristic Medicinal Plants Cultivation and Protection Engineering Technology, Baotou 014060, China;
5. Inner Mongolia Key Laboratory of Characteristic Traditional Chinese Medicinal Resources Protection and utilize, Baotou 014060, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid, accurate and standardized method for identifying five species from genus *Orobanche* with DNA barcoding technology. **Methods:** Total DNA of 5 kinds of medicinal plants from genus *Orobanche* were extracted. ITS, rbcL, trnL-F and matK gene sequence amplified by PCR. PCR product was directly sequenced, and the results were aligned and analyzed with different software (CONTIG、BioEdit、MEGA6.0) to construct the phylogeny trees. **Results:** The 200 complete ITS, rbcL, trnL-F and matK sequences of 5 species from genus *Orobanche* have been obtained, and the length of 4 sequences region varied from 364 to 1240 bp. They were distinguished by trnL-F, ITS or matK sequence. **Conclusion:** RbcL sequence was not suitable to identify 5 species from the genus *Orobanche*, but ITS and trnL-F region could be a pretty good marker to distinguish these species, and it will be a potential molecular identification method for identifying *Orobanche* plants.

[Keywords] Molecular identification; DNA barcoding; *Orobanche* L.

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.7.004

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(81260615)

* [通信作者] 王晓琴, 教授, 研究方向: 中药资源学及生药学; E-mail: nywangxiaojin@163.com;
李旻辉, 教授, 研究方向: 中蒙药资源保护与开发利用、分子生药学; Tel: (0471)6262232, E-mail: li_minhui@aliyun.com

分子标记方法起源于1987年^[1],具有灵敏度高、准确性好、客观性强等优势,但分子标记法在重复性和稳定性上并不尽如人意^[2]。此外,由于其操作的复杂程度,也限制了分子标记法的推广应用。DNA条形码概念于2003年被加拿大Guelph大学Herbert等人首次正式提出^[3],因其具有对物种进行快速、准确鉴别的特点而备受外界关注。使用核基因序列与叶绿体基因序列搭配对植物进行鉴别的方法因可靠性较高被国内外广泛采用。

列当属植物在我国共分布有25种,为多年生、二年生或一年生肉质寄生草本,其中16种列当属植物的寄主有明确记载,多为蒿属植物。列当属植物多生于沙丘、山坡及沟边草地上,生长环境分布在海拔850~4000 m。列当属主要活性成分为苯乙醇苷类和多糖,其具有抗疲劳,改善脑组织循环,增强免疫力的药理作用,在传统医学中主要被用作强筋壮骨,补肾助阳,常被作为肉苁蓉的代用品。25种列当属植物中有6种在蒙、藏、傈僳、彝的民族医药中作为民族药应用,占总数的24%^[4-6]。

列当(紫花列当)*Orobanchae coerulescens*、黄花列当*O. pycnostachya*、弯管列当*O. cernua*、毛药列当

*O. ombrochares*属于列当属列当组,常作为蒙药使用。列当(紫花列当)、黄花列当、弯管列当、毛药列当以全草入药,由于这几种列当经炮制切片后外形、颜色十分相近,且显微鉴别也较难区分,故本实验尝试采用DNA条形码技术进行鉴别^[6-8]。实验中选用4种常用DNA条形码引物序列对列当(紫花列当)、黄花列当、弯管列当、毛药列当和分枝列当*O. aegyptiaca*进行分子鉴别,用以比较不同候选片段对此5种植物的鉴别能力,其中分枝列当属于列当属小苞组本,用于考察这4种序列对列当属属内组间的鉴别能力,从而筛选可鉴别该属植物的优选DNA条形码序列,为该属植物的分子鉴别提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验选用的5种列当属植物采自内蒙古自治区阿拉善盟、巴彦淖尔市,其中列当(紫花列当)13株,黄花列当4株,弯管列当29株,分枝列当3株,毛药列当1株,具体样品信息见表1。样品由内蒙古医科大学王晓琴教授采集并鉴定,凭据标本保存于内蒙古医科大学生药教研室。

表1 材料信息表

植物	拉丁名	标本编号
列当(紫花列当)	<i>Orobanchae coerulescens</i> Steph	YPZ1-2, YPZ5-8, YPZ10-12, YPZ14, YPZ17-18, YPZ21, YPZ22
黄花列当	<i>Orobanchae pycnostachya</i> Hance	YPP2-3, YPP21, YPP22
弯管列当	<i>Orobanchae cernua</i> Loefling	YPC1-6, YPC8, YPC10-14, YPC16-21, YPC25-33
分枝列当	<i>Orobanchae aegyptiaca</i> Pers	YPA1-3
毛药列当	<i>Orobanchae ombrochares</i> Hance	YPO3

1.2 试剂

DP305-02植物基因组DNA提取试剂盒(天根公司),1×TAE缓冲液、琼脂糖(Promega公司),2×Taq DNA Master Mix(Takara公司),2000 bp DNA Markar(Takara公司),巯基乙醇(Amresco公司),核酸染料(赛百盛公司),三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇均为国产分析纯。

1.3 仪器

Arktik-5020型PCR仪(美国Thermo),LABO-FUGE 400R型低温冷冻干燥仪(美国Thermo),5000 plus型紫外凝胶成像分析仪(赛智ChampGel),掌上离心机(德国IKA miniG),手持移液器(德国Eppendorf),MM400型混合型球磨仪(德国Retsch)。

2 方法

2.1 总DNA的提取

取适量(约100 mg)的植物样品干燥的茎,液氮研磨成细粉后,使用试剂盒法提取,获得总DNA,于-20℃保存备用。

2.2 引物设计

选择目前中药鉴别中常用的通用引物^[9],详情见表2。

2.3 DNA扩增

4种引物片段PCR扩增体系为40.0 μL,包含:2×Taq DNA Master Mix(Takara公司)20.0 μL,正向、反向引物各1.0 μL,DNA模板1.0 μL,ddH₂O 17 μL。

表2 引物信息

候选片段	引物名称	引物序列(5'→3')
trnL-F	trnL-F c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	trnL-F f	ATTTGAACTGGTGACACGAG
matK	matK-AF	CTA TAT CCA CTT ATC TTT CAG GAG T
	matK-8R	AAA GTT CTA GCA CAA GAA AGT CGA
rbcL	rbcL 1F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC
	rbcL 724R	TCG CAT GTA CCY GCA GTT GC
ITS	ITS1 F	AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG
	ITS4 R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

反应条件:

①ITS (1F/4R)片段

预变性温度: 94 ℃, 5 min; 变性温度: 94 ℃, 1 min; 退火条件: 45 ℃, 45 s; 复性条件: 72 ℃, 1 min; 35 个循环; 延伸条件 72 ℃, 7 min, 最后 4 ℃ 保存。

②rbcL (1F/724R)片段:

预变性条件: 94 ℃, 4 min; 变性温度: 94 ℃, 30 s; 退火条件: 52 ℃, 45 s; 复性条件: 72 ℃, 1 min; 35 个循环; 延伸条件 72 ℃, 7 min; 最后 4 ℃ 保存。

③trnL-F(trnL-F c/trnL-F f)片段:

预变性条件: 94 ℃, 5 min; 变性温度: 94 ℃, 1 min; 退火条件: 50 ℃, 45 s; 复性条件: 72 ℃, 1 min; 35 个循环; 延伸条件 72 ℃, 7 min; 最后 4 ℃ 保存。

④matK (AF/8R)片段:

预变性条件: 94 ℃, 1 min; 变性温度: 94 ℃, 50 s; 退火条件: 50 ℃, 45 s; 复性条件: 72 ℃, 1 min; 35 个循环; 延伸条件 72 ℃, 7 min; 最后 4 ℃ 保存。

扩增结束后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并使用凝胶成像系统分析。

2.4 测序

经过 PCR 扩增后, PCR 原产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序部北京分部测序, 各样品均采用正向和反向测序, 以保证测序的准确性。

2.5 序列分析

将 5 种列当药材分别进行 rbcL, ITS, trnL-F, matK 4 个序列的比对分析。用 CONTIG 软件将 DNA 序列排序后, 应用 BioEdit 分析软件进行分析处理, 结合 Mega 5.0 分析软件中的 NJ(Neighbor-joining)工具构建系统进化树, 并以 Bootstrap 作 1000 次可信度分析。

3 结果

3.1 评价 4 种 DNA 条形码序列

从 5 个不同物种中获得 rbcL、ITS、trnL-F、matK 序列各 50 条, 共 200 条。引物通用性、PCR 扩增成功率以及序列扩增成功率, 皆 100% (表 3), 将获得的序列进行 CONTIG 软件和 BioEdit 分析软件对比分析, 发现 trnL-F 变异位点 228 个, 信息位点 118 个; rbcL 变异位点 47 个, 信息位点 30 个; matK 变异位点 279 个, 信息位点 159 个; ITS 变异位点 171 个, 信息位点 146 个。

3.2 5 种列当属植物经典分类学的探讨

通过利用 Mega 6.0 软件, 以 NJ(Neighbor-joining)法构建系统进化树, 从系统进化树(图 1、图 2、图 3、图 4)及序列分析可知, 4 种片段中所选择的 ITS、trnL-F 与 matK 片段效果较好, 能够鉴别出 5 种列当属植物。而 rbcL 的鉴别能力相对较差, 无法将 5 种列当属植物鉴别开来。

表3 评价 4 种 DNA 通用引物

评价指标	trnL-F	matK	rbcL	ITS
引物通用性	通用	通用	通用	通用
PCR 扩增率(%)	100%	100%	100%	100%
测序成功率(%)	100%	100%	100%	100%
对齐的序列长度/bp	1031	962	364	699
信息位点/变异位点	118/228	154/277	31/47	146/171

3.3 trnL-F 序列数据分析

通过对 trnL-F 序列进行分析对比之后, 本实验发现 248 个变异位点, 197 个信息位点, 通过这些信息位点的变化可以将这 5 种列当科植物很好的鉴别出来(表 4), 比如弯管列当与其他 4 种有两个独特的位点(17 bp: A 或 48 bp: A), 都分别可看作一个特征位点。其他种的特征位点有: 黄花列当(53 bp: T 或 556 bp: A), 分枝列当(203 bp: G 或 205 bp: T), 毛药列当(307 bp: T, 447 bp: G 或 504 bp: G), 列当(紫花列当)(447 bp: T)。

3.4 matK 序列数据分析

通过对 matK 序列进行分析对比以后, 本试验发现变异位点 236 个, 信息位点 147 个, 通过这些信息位点的变化可以将这 5 种列当科植物较好的鉴别出来(表 5), 比如毛药列当(19 bp: C 或 63 bp:

G), 分枝列当(20 bp: G, 32 bp: A, 88 bp: A, 350 bp: G 或 398 bp: T), 弯管列当(204 bp: A, 371 bp: T 或 689 bp: C), 列当(紫花列当)

(350 bp: C 或 398 bp: A), 黄花列当(914 bp: G)。此外在所获得序列的同一位点中, 不同种列当碱基变异可能在2种以上, 如350 bp, 389 bp, 914 bp等处。

表4 5种列当属植物 trnL-F 序列信息位点

Taxa(n)	17 bp	48 bp	53 bp	203 bp	205 bp	307 bp	447 bp	504 bp	556 bp
<i>O. coerulescens</i> 1	G	G	C	T	A	A	T	T	T
<i>O. coerulescens</i> 2	G	G	C	T	A	A	T	T	T
<i>O. pycnostachya</i> 2	G	G	T	T	A	A	—	T	A
<i>O. pycnostachya</i> 3	G	G	T	T	A	A	—	T	A
<i>O. cernua</i> 1	A	A	C	T	A	A	—	T	T
<i>O. cernua</i> 2	A	A	C	T	A	A	—	T	T
<i>O. aegyptiaca</i> 1	G	G	C	G	T	A	—	T	T
<i>O. aegyptiaca</i> 2	G	G	C	G	T	A	—	T	T
<i>O. ombrochares</i>	G	G	C	T	A	T	G	G	T

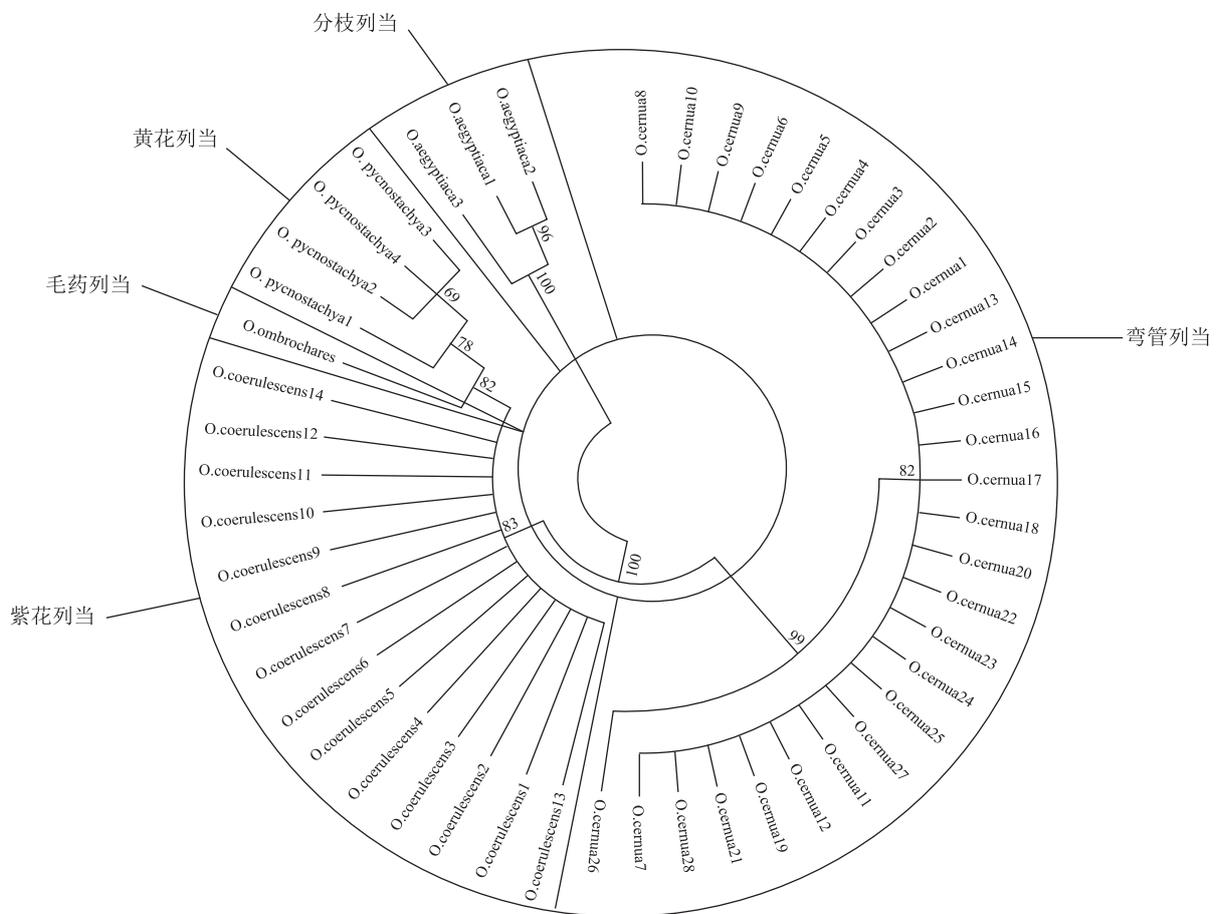


图1 基于 trnL-F 序列的5种列当属植物 NJ 系统进化树

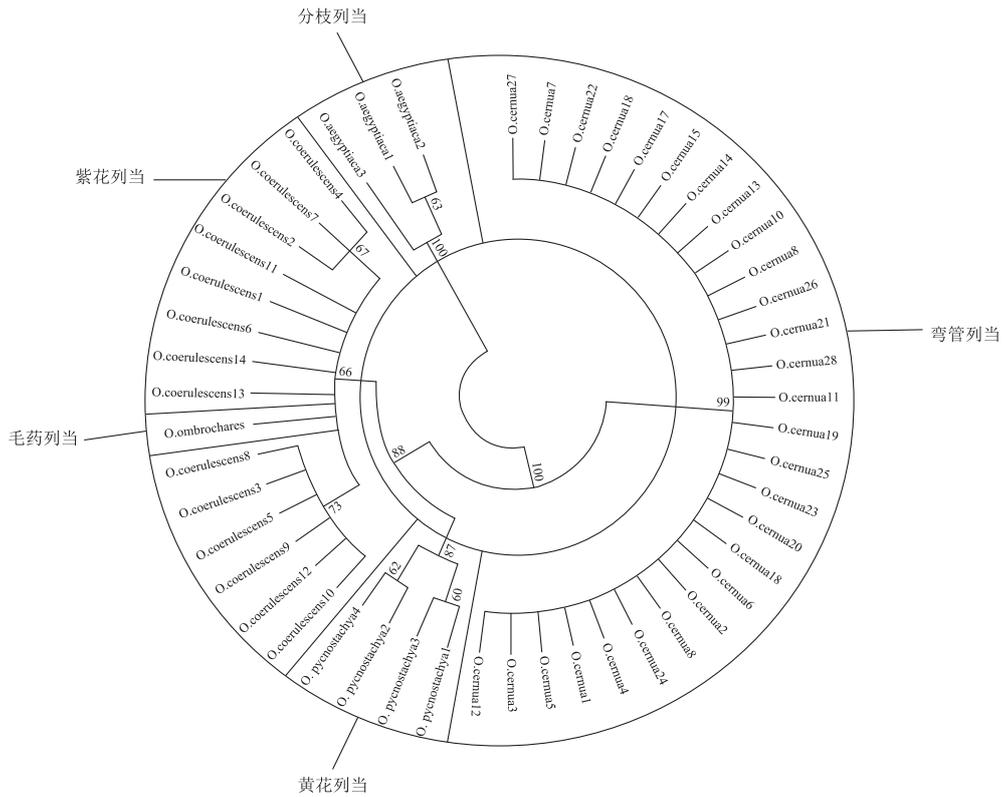


图2 基于 matK 序列的 5 种列当科植物 NJ 系统进化树

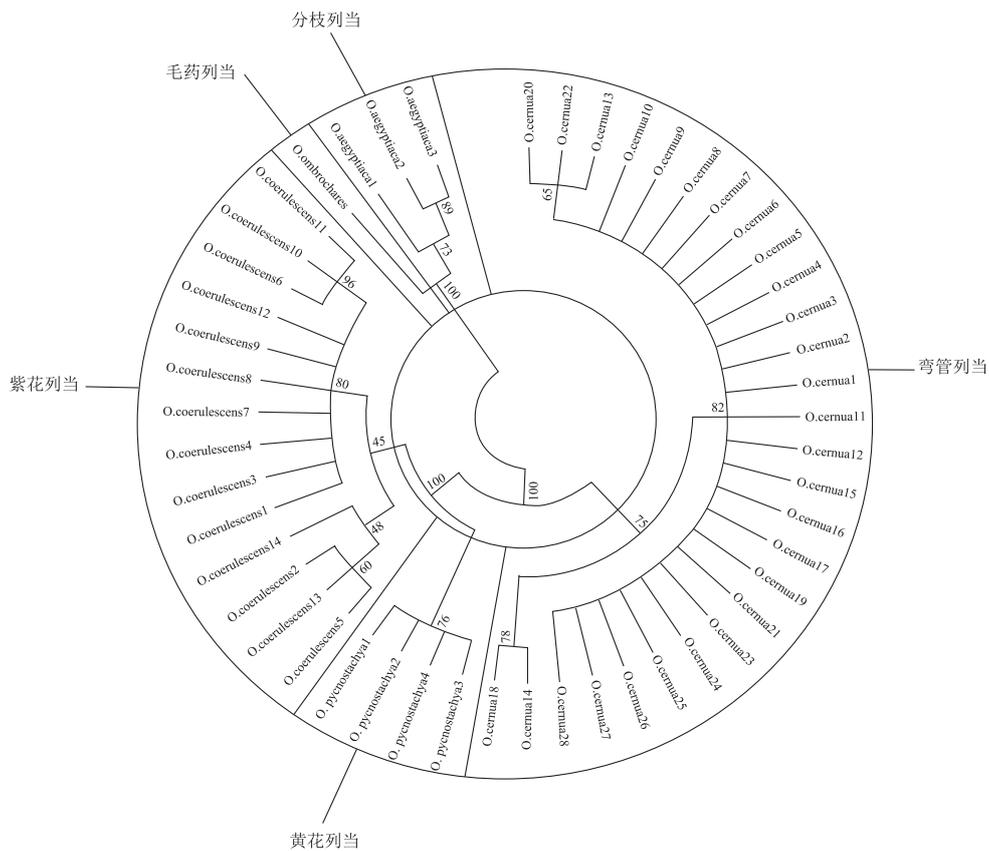


图3 基于 ITS 序列的 5 种列当科植物 NJ 系统进化树

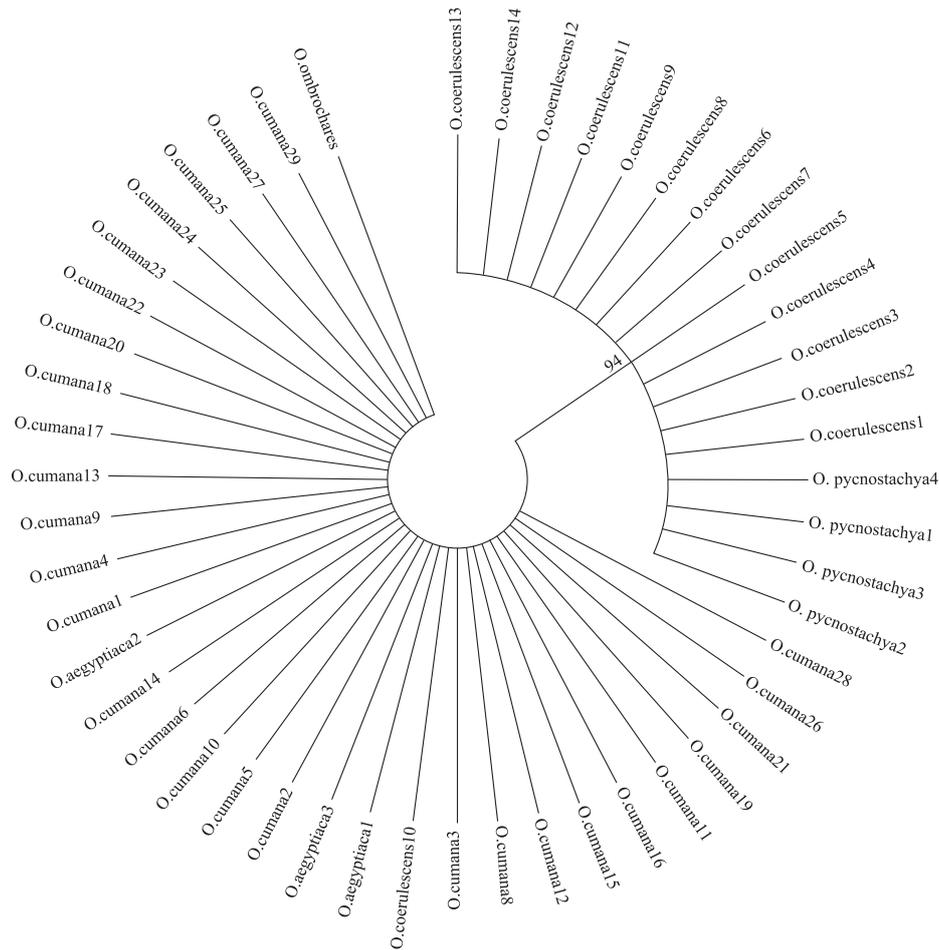


图4 基于 rbcL 序列的 5 种列当科植物 NJ 系统进化树

表5 5 种列当属植物 matK 序列信息位点

Taxa (n)	19 bp	20 bp	32 bp	63 bp	88 bp	204 bp	350 bp	371 bp	398 bp	689 bp	914 bp
<i>O. coeruleascens1</i>	T	C	G	A	G	G	C	C	A	T	A
<i>O. coeruleascens2</i>	T	C	G	A	G	G	C	C	A	T	A
<i>O. pycnostachya2</i>	T	C	G	A	G	G	A	C	C	T	G
<i>O. pycnostachya3</i>	T	C	G	A	G	G	A	C	C	T	G
<i>O. cernua1</i>	T	C	G	A	G	A	A	T	C	C	T
<i>O. cernua2</i>	T	C	G	A	G	A	A	T	C	C	T
<i>O. aegyptiaca1</i>	T	G	A	A	A	G	G	C	T	T	T
<i>O. aegyptiaca2</i>	T	G	A	A	A	G	G	C	T	T	T
<i>O. ombrochares</i>	C	C	G	G	G	G	A	C	C	T	A

3.5 ITS 序列数据分析

通过对 ITS 序列进行分析对比之后，共现 171 个变异位点，146 个信息位点，通过这些信息位点的变化可以将这 5 种列当科植物很好的鉴别出来

(表 6)，比如分枝列当(46 bp: T 或 311 bp: A)，黄花列当(184 bp: T 或 299 bp: T)，列当(紫花列当)(237 bp: G 或 451 bp: T)，毛药列当(390 bp: C 或 396 bp: A)，弯管列当(470 bp: G 或 595 bp: A)。

表6 5种列当属植物 ITS 序列信息位点

Taxa(n)	46 bp	184 bp	237 bp	299 bp	311 bp	390 bp	396 bp	451 bp	470 bp	595 bp
<i>O. coerulescens</i> 1	C	A	G	C	G	G	G	T	—	T
<i>O. coerulescens</i> 2	C	A	G	C	G	G	G	T	—	T
<i>O. pycnostachya</i> 2	C	T	A	T	G	G	G	G	—	T
<i>O. pycnostachya</i> 3	C	T	A	T	G	G	G	G	—	T
<i>O. cernua</i> 1	C	A	A	C	G	G	G	G	G	A
<i>O. cernua</i> 2	C	A	A	C	G	G	G	G	G	A
<i>O. aegyptiaca</i> 1	T	A	A	C	A	G	G	G	—	T
<i>O. aegyptiaca</i> 2	T	A	A	C	A	G	G	G	—	T
<i>O. ombrochares</i>	C	A	A	C	G	C	A	G	—	T

4 讨论

综合上述实验及数据处理结果可知, trnL-F、matK 序列和 ITS 序列都可将本实验的物种鉴别出来。rbcL 序列在实验的扩增、测序环节成功率高, 但通过 CONTIG 软件和 BioEdit 软件分析, 使用 Mega 6.0 软件建树后发现, 5 种列当属植物的 rbcL 序列变异位点少, 信息位点仅 31 个, 且缺乏区分 5 种植物的特征位点, 所构建的 NJ 树也显示, rbcL 序列无法将 5 种列当植物区分出来, 因此不适合此 5 种列当属药材鉴别。对于 ITS 序列和 trnL-F、matK 序列, trnL-F 序列特征位点最多, 其次为 ITS 序列, 这两种序列鉴别能力最强, 而 matK 序列区分毛药列当与列当(紫花列当)能力较 trnL-F 序列、ITS 序列差。从各类 DNA 条形码技术的报道和相关文献来看, rbcL 序列适合用于科级的鉴别, matK 序列则通常用于鉴别属级的植物, 而 ITS 序列和 trnL-F 序列更适合鉴别种级的不同个体^[10], 本实验的结果显然印证了此类观点。

对于 matK 序列, 一般认为其通用性相对较差, 就本实验结果, matK 序列可考虑与其他序列进行搭配, 如本实验中的 ITS 序列、trnL-F 序列, 从而增加对此 5 种列当属植物鉴别的准确性。对于 ITS 序列, 本实验虽然选择了 ITS1 和 ITS4 组合作为引物, 但在实验的初期, 选用的引物组合为常用的 ITS4 与 ITS5, 经过反复的实验, 发现 ITS4 与 ITS5 通用引物组合的 PCR 成功率较低, 故而改变 ITS 序列的组合, 选用了的 ITS1 与 ITS4 组合, PCR 效果较好。由于此组合多被用于真菌类生物的 PCR 实验^[11-12], 故实验易受真菌干扰, 对实验材料的选择及实验操作有一定要求。但 ITS 序列的鉴别能力突出, 可被用作

鉴别的特征位点丰富, 能很好鉴别目标植物, 且在不同生境中分布的种内植物间, 特征位点保守且稳定, 而在种间却变异较大^[13], 故可作为此 5 种植物最理想的鉴别片段之一。对于 trnL-F 序列, 本实验中选取的 5 种列当属植物之间差异大, 碱基缺失、变异和可用作于鉴别的特征信息位点丰富, 实验要求相对较低, 因此也可作为此 5 种植物的理想鉴别片段。

随着我国民族医药的发展以及保健品市场的快速壮大, 列当属药用植物的使用越来越多, 越来越广泛, 但市场上列当属植物的药材鱼龙混杂, 以次充好的情况时有发生。到目前为止, 对其鉴别一直沿用经典的性状鉴别、显微鉴别及理化鉴别方法。本次实验的结果表明: DNA 条形码技术这一高效、准确的分子鉴别方法可在分子水平上解决这些问题, 其实用性强、准确度高的特点可在中药以及民族药的鉴别和替代品的规范与发掘等方面发挥重要的作用, 在药材的正本清源工作中提供有力的技术保障, 并将药材的鉴别领入一个新的阶段。

参考文献

- [1] 黄映萍. DNA 分子标记研究进展[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学. 医学版), 2010, (2): 27-36.
- [2] 何希荣. 中药材的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 41.
- [3] 程希婷, 王爱民, 顾志峰. DNA 条形码研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 748-758.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 69 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999[5]. 许国青, 王晓琴, 文迪. 列当科药用植物研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 10(18): 35-38.

(下转第 959 页)

6 讨论

本论文报道了从潺槁树根皮中分离得到6个化合物,其中4个为首次从该属植物分离得到。另外,文献报道波尔定碱、新木姜子碱具有抗糖尿病作用,然而它们的作用靶点并不清楚。通过采用分子对接的方法,首次发现这两个化合物与PTP1B对接程度最高。波尔定碱、新木姜子碱的抗糖尿病作用极可能与调控PTP1B相关。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 张闯珍,王刃余,谢振家,等. 潺槁治疗糖尿病86例临床分析[J]. 福建中医药,1985,16(4):13-14.
- [3] Pan J Y,Zhang S,Wu J,et al. Litseaglutinan A and lignans from *Litsea glutinosa*[J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93: 951-957.
- [4] Wang Y S,Huang R,Lu H,et al. A new 2'-oxygenated flavone glycoside from *Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob. [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2010,74(3):652-654.
- [5] Chi T S, Lee S S, Su M J. Antihyperglycemic effect of aporphines and their derivatives in normal and diabetic rats [J]. *Planta Med*,2006,72:1175-1180.
- [6] Lin C J, Chen C H, Liu F W, et al. Inhibition of intestinal glucose uptake by aporphines and secoaporphines [J]. *Life Sci*,2006,79:144-153.
- [7] 陈湛娟,刘秀萍,毕和平. 山苍子枝的化学成分研究[J]. 林产化学与化工,2013,33(4):97-100.
- [8] 余文怡,邓亮,李兰,等. 云南地方晾晒烟化学成分研究[J]. 昆明学院学报,2015,37(6):25-27.
- [9] 李云志,宫铮,马超,等. 豆瓣绿的酰胺类化学成分[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):468-469.
- [10] 赵凯,姜勇,薛培凤,等. 国产肉桂的化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(17):2358-2363.
- [11] 张水英,郭强,曹愿,等. 豆豉姜的生物碱类成分研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(20):3964-3968.
- [12] 张君增,方起程. 山柃化学成分的研究[J]. 中草药,1994,25(11):565-568.

(收稿日期 2016-11-14)

(上接第923页)

- [6] 白贞芳,刘勇,王晓琴. 列当属、肉苁蓉属和草苁蓉属植物传统药物学调查[J]. 中国中药杂志,2014,39(23):4548-4552.
- [7] 周溢,张继. 黄花列当的生药学研究[J]. 药物分析杂志,2007,27(11):1719-1721.
- [8] 杨来秀,王素巍,王晓琴,等. 列当的生药鉴别[J]. 华西药理学杂志,2015,30(1):54-55.
- [9] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2007,9(3):7-12.
- [10] 闫化学,于杰. DNA条形码技术在植物中的研究现状[J]. 植物学报,2010,45(1):102-108.
- [11] 曹永军,程萍,喻国辉. 利用ITS1和ITS4通用引物扩增香蕉枯萎病菌核酸片段鉴定其生理小种[J]. 热带作物学报,2010,31(7):1098-1102.
- [12] 郭鹏豪,刘秀丽,崔颖鹏. 真菌通用引物Its1和Its4在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生物学杂志,2013,25(8):922-924.
- [13] 刘建全,陈之端,廖志新. “藏茵陈”原植物及其混淆种类的ITS序列比较[J]. 药学学报,2001,36(1):67-70.

(收稿日期 2016-10-08)