

· 基础研究 ·

基于叶绿体DNA条形码的披麻草药材
及其混伪品的分子鉴定[△]时瑞梓¹, 田星², 赵禹¹, 李荣姣¹, 李国栋^{2*}

1. 云南医药健康职业学院, 云南 昆明 650500;

2. 云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500

[摘要] 目的: 分析 *trnV-atpE*、*psaC-ndhE* 序列变异特点, 并通过该序列鉴别披麻草不同基原植物与其混伪品。方法: 分别提取披麻草 3 种基原植物及其混伪品的总 DNA, 以 *trnV-atpE*、*psaC-ndhE* 为 DNA 条形码候选序列进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和测序。采用 DnaSP、MEGA 软件统计其片段长度、鸟嘌呤 (G) + 胞嘧啶 (C) 占比、变异位点个数、简约信息位点、插入或缺失位点, 并计算样品 K2-P (Kimura 2-parameter) 遗传距离和构建邻接法 (NJ) 系统发育树。结果: *trnV-atpE*、*psaC-ndhE* 序列长度分别为 373~381、491~534 bp, 简约信息位点分别为 18、15 个。*trnV-atpE* 和 *psaC-ndhE* 序列中披麻草 3 种基原植物最大遗传距离均小于与混伪品之间的最小遗传距离。基于 2 个序列构建的 NJ 系统发育树显示, 披麻草与其混伪品能明显区分。结论: 综合分析序列特点和种内、种间变异性, *trnV-atpE* 和 *psaC-ndhE* 序列均可将披麻草 3 种基原植物与其混伪品区分开。

[关键词] 披麻草; 叶绿体 DNA; *trnV-atpE* 序列; *psaC-ndhE* 序列; 遗传距离; 系统发育树; 分子鉴定

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0031-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220513005

**Molecular Distinguishment of Original Species of Pimacao from the Adulterants:
Based on Chloroplast DNA Barcoding**SHI Rui-zi¹, TIAN Xing², ZHAO Yu¹, LI Rong-jiao¹, LI Guo-dong^{2*}

1. Yunnan Medical Health College, Kunming 650500, China;

2. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the variation characteristics of *trnV-atpE* and *psaC-ndhE* sequence fragments and distinguish the original species (*Veratrum taliense*, *Veratrum stenophyllum*, *Veratrum mengtzeanum*) of Pimacao (a medicinal derived from the roots or rhizome/roots of the three species) from the adulterants with the sequences. **Methods:** The genomic DNA was extracted from the original species and the adulterants, respectively, and polymerase chain reaction amplification and sequencing were performed with *trnV-atpE* and *psaC-ndhE* as candidate sections for DNA barcoding. DnaSP and MEGA were used to measure the fragment length, guanine (G)+cytosine (C) content, number of variant sites, parsimony informative sites, and InDel sites. The K2-P (Kimura 2-parameter) genetic distance of the samples was calculated, and the phylogenetic tree was constructed with the Neighbor-Joining (NJ) method. **Results:** The *trnV-atpE* and *psaC-ndhE* were 373-381 bp and 491-534 bp, separately, with 18 and 15 parsimony informative sites, respectively. Based on *trnV-atpE* and *psaC-ndhE* sequences, the maximum genetic distance among original species was smaller than the minimum genetic distance between the original species and the adulterants. The phylogenetic tree clearly distinguished the original species from the adulterants. **Conclusion:** The original species of Pimacao and the adulterants can be clearly distinguished by *trnV-atpE* and *psaC-ndhE* DNA sequences based on comprehensive analysis of sequence characteristics and intraspecific and interspecific variation.

[Keywords] Pimacao; chloroplast genome; *trnV-atpE* sequence; *psaC-ndhE* sequence; genetic distance; phylogenetic tree; molecular identification

[△] [基金项目] 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021J1366)

* [通信作者] 李国栋, 副教授, 研究方向: 分子生药学; E-mail: gammar116@163.com

披麻草来源于百合科 (Liliaceae) 藜芦属 (*Veratrum* L.) 植物大理藜芦 *Veratrum taliense* Loes.、狭叶藜芦 *V. stenophyllum* Diels 和蒙自藜芦 *V. mengtzeanum* Loes. f. 的根或根茎及根, 主要分布于云南、贵州、四川等地^[1]。披麻草收载于《云南省药品标准》1996年版, 其味苦、辛, 性寒, 具有活血散瘀、消肿止痛、杀虫毒之功效, 用于中风痰壅、喉不通畅、跌打损伤、风湿疼痛、创伤止血、疥癣、恶疮等^[2], 是国家保密配方制剂云南白药和国家中药保护品种一粒止痛丸的主要组成药物之一^[3]。

近年来, 由于披麻草的规模化人工种植尚未开展, 完全依赖野生资源, 其售卖价格不断增高, 导致各地方对其进行大量收购和无计划采挖。披麻草野生资源呈零散分布, 生境片段化严重, 居群间的基因交流和遗传多样性降低, 野生资源量难以维持。并且有研究表明, 披麻草的花序结构特点不利于自然繁殖, 导致其繁殖率大大降低^[1]。基于上述原因, 目前披麻草野生资源量不断减少, 资源呈现渐危状态^[4]。由于价格的不断升高和资源量不断减少, 目前市场上的披麻草药材混伪品泛滥, 许多药材商将藜芦属其他植物当作披麻草药材售卖, 致使以披麻草入药的许多药物功效受到影响。

DNA条形码 (DNA barcoding) 技术是利用基因组中较短且含有大量变异、易扩增的DNA片段创建的一种新的物种鉴别系统^[5]。该技术最初由Hebert等^[6]提出, 并在物种的鉴定中大量应用, 近年来已广泛应用于多种中药材及其基原植物的鉴定^[7-10]。叶绿体基因组由于其序列相对保守、进化速率相对较低, 且为母系遗传, 无基因重组现象, 近年来被广泛作为DNA条形码用于物种鉴定, 如钩藤属^[11]、金槐^[12]、藏药党参^[13]等药用植物, 能高效地对这些药用植物进行快速鉴定。《中华人民共和国药典》2020年版已将中药材DNA条形码分子鉴定指导原则作为中药材质量控制的补充方法^[14], 建立了针对植物类的以内转录间隔区 (ITS) /ITS2为主、叶绿体 *psbA-trnH* 为辅的中药材鉴定体系。本研究前期通过预试验对ITS/ITS2、*psbA-trnH*、*matK* 等公认的DNA条形码进行鉴定效率比较, 发现这3种DNA条形码针对披麻草药材DNA进行扩增时效率普遍较低, 且难以测序; 基于已测序获得的序列构建系统发育树, 发现其分辨率较低, 不能将披麻草药材及其混伪品有效区分。因此, 本研究基于披麻草已发表的叶绿体基

因组序列筛选了适用于披麻草药材与其混伪品鉴定的特异性DNA条形码。

本研究以前期预试验筛选出的2对叶绿体DNA片段 (*trnV-atpE*、*psaC-ndhE*) 作为DNA条形码候选序列, 对披麻草3种基原植物共13个居群及9个藜芦属其他种植物进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增、测序, 并对其测序结果进行拼接、校对、分析等, 构建披麻草DNA条形码鉴别系统, 以期对披麻草及其混伪品鉴别和进一步开展披麻草群体遗传多样性、资源保护与开发利用等研究提供依据。

1 材料

1.1 样品

共收集了22份藜芦属样品, 包括披麻草3种基原植物13份 (蒙自藜芦 *Veratrum mengtzeanum* Loes. f. 3份、大理藜芦 *V. taliense* Loes. 6份、狭叶藜芦 *V. stenophyllum* Diels 4份)、混伪品9份 (兴安藜芦 *V. dahuricum* (Turcz.) Loes.、黑紫藜芦 *V. japonicum* (Baker) Loes. f.、毛穗藜芦 *V. maackii* Regel、藜芦 *V. nigrum* L.、尖被藜芦 *V. oxysepalum* Turcz.、牯岭藜芦 *V. schindleri* Loes.、毛叶藜芦 *V. grandiflorum* (Maxim. ex Baker) Loes.、南川藜芦 *V. nanchuanense* S. Z. Chen & G. J. Xu、长梗藜芦 *V. oblongum* Loes. 各1份)。样品由云南中医药大学李国栋副教授鉴定, 信息见表1。凭证标本保存于云南中医药大学标本馆。

1.2 仪器与试剂

EDC-810型PCR仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); Quantum-ST型凝胶成像系统 (郑州南北仪器设备有限公司); DYCP-32B型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Nanodrop One型微量分光光度计 (美国赛默飞世尔科技有限公司); Allegra 25R型台式高速冷冻离心机 (美国Beckman公司); DK-8B型电热恒温水槽 (上海精宏实验设备有限公司); YXQ-75S II型立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 微量可调移液器 (0.5~10.0、10~100、100~1000 μL , Eppendorf公司); Milli Q Biocel型纯水仪 (美国Millipore公司)。

新型快速植物基因组DNA提取试剂盒 (美国BioTeke公司); 2 \times EasyTaq PCR Mix酶 (北京全式金生物技术公司); *trnV-atpE*引物 (TA1F: 5'-TAA-CATATCTACAATTTCTGTGCAAG-3', TA1R: 5'-CA-

表1 藜芦属植物样品采集信息

物种	编号	采集地
蒙自藜芦	VmBC	云南省宾川县乌龙坝
	VmLJ	云南省丽江市高河坎
	VmMC	云南省鹤庆县马厂村
大理藜芦	VtYB	云南省漾濞县黑龙潭
	VtWY	云南省保山市瓦窑镇
	VtBC	云南省宾川县乌龙坝
	VtLWS	云南省澄江县梁王山
	VtXY	云南省保山市西邑乡
	VtDY	云南省大姚县百花岭
狭叶藜芦	VsMC	云南省鹤庆县马厂村
	VsDHS	云南省鹤庆县大黑山
	VsHDB	云南省大理市花甸坝
	VsDS	云南省鹤庆县东山坡
兴安藜芦	VdaJL	吉林省吉林市夹皮沟
黑紫藜芦	VjaWS	云南省文山市者底村
毛穗藜芦	VmaTBS	陕西省宝鸡市太白山
藜芦	VniQS	吉林省磐石市大荒山
尖被藜芦	VoxJL	吉林省吉林市南楼山
牯岭藜芦	VscSM	福建省三明市峨眉峰
毛叶藜芦	VgrZT	云南省昭通市巧家县
南川藜芦	VnaJFS	重庆市金佛山
长梗藜芦	VobJFS	重庆市金佛山

ATACATCAAATAACCAAAGAAG-3')、*psaC-ndhE* 引物 (PN1F: 5'-TGCTTAGCCTTACATCCGTCC-3', PN1R: 5'-GAGACATTTTCTCAATCTTTGTCAATAGC-3') 均由上海生工生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 基因组总DNA提取

披麻草及其混伪品基因组DNA采用新型快速植物基因组DNA提取试剂盒进行提取。使用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop One型微量分光光度计对所提取的DNA分别进行质量和浓度检测。

2.2 PCR扩增及测序

在预试验中,通过温度梯度确定了*trnV-atpE*、*psaC-ndhE*的最佳退火温度分别为51、56℃。本实验中,PCR扩增反应采用25 μL体系,体系组成为灭菌双蒸水(ddH₂O) 8.5 μL,2×EasyTaq PCR Mix酶12.5 μL,引物各1.5 μL(10 μmol·L⁻¹),模板DNA 1 μL(50~100 μg·μL⁻¹)。扩增程序:94℃预变性4 min;95℃变性40 s,退火40 s,72℃延伸50 s,共35个循环;循环完毕后72℃再延伸7 min,最终

4℃保存。PCR扩增产物使用1%琼脂糖凝胶电泳检测,将单一、明亮的扩增条带送至上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

2.3 序列分析及数据处理

测序结果用Sequencher v4.14软件^[15]连接和手动编辑。将编辑好的序列数据导入Clustal-X v1.83软件中进行序列比对^[16]。将比对好的序列文件导入Bioedit v7.0.9软件去除序列中不确定的碱基,手动校正测序错误碱基^[17]。使用MEGA v5.0软件,以K2-P(Kimura 2-parameter)模型计算不同种间和种内遗传距离,每个物种内所有样本的K2-P距离即为种内遗传距离^[18]。采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建基于K2-P距离的系统发育树(Bootstrap=1000)^[19]。

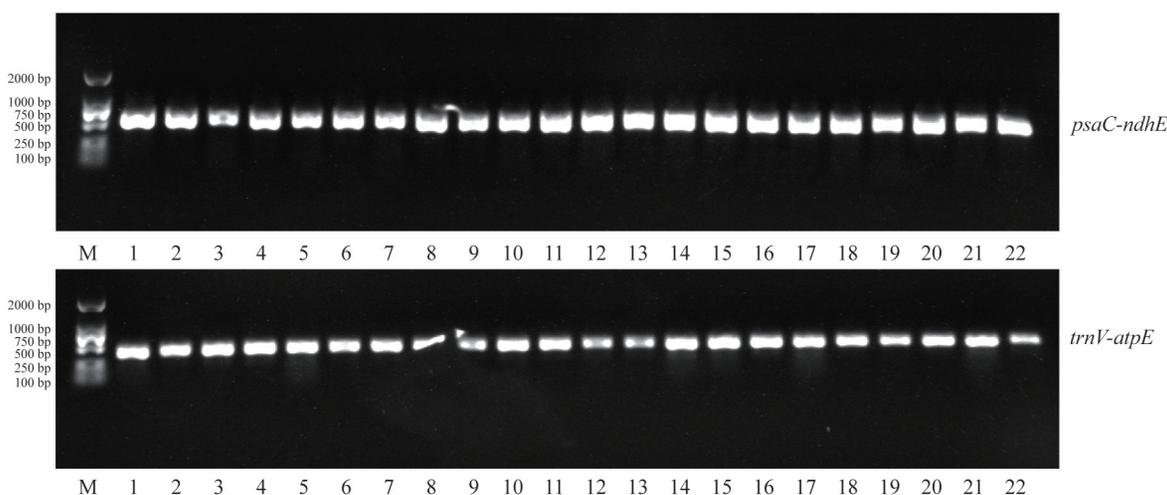
3 结果

3.1 叶绿体基因的序列特征

使用2对引物(*trnV-atpE*、*psaC-ndhE*)共扩增了22份材料的44条序列,均获得单一、清晰、明亮的特异性条带,PCR扩增率和测序成功率均为100%,凝胶电泳结果见图1。采用DNAsp6、MEGA v5.0软件分别统计了序列长度、鸟嘌呤(G)+胞嘧啶(C)占比、碱基变异数、简约信息位点个数和序列插入/缺失情况。所测样品的*trnV-atpE*序列长度为373~381 bp,有19个变异位点,平均G+C占比为32.2%,简约信息位点18个,5个插入/缺失位点。所测样品的*psaC-ndhE*序列长度为491~534 bp,共16个变异位点,平均G+C占比为30.1%,简约信息位点15个,8个插入或缺失位点。

3.2 种间和种内遗传距离分析

对22份藜芦属样品进行种间及种内遗传距离分析,结果见表2、表3。对*trnV-atpE*序列的分析结果显示,披麻草3种基原植物间最大种间遗传距离为0.0108,种内遗传距离、大理藜芦与狭叶藜芦间遗传距离均为0。对*psaC-ndhE*序列的分析结果显示,披麻草3种基原植物最大种间遗传距离为0.0115,种内遗传距离为0~0.0019,大理藜芦与狭叶藜芦的种间遗传距离为0。*trnV-atpE*和*psaC-ndhE*序列片段的披麻草3种基原植物与同属其他9种植物的种间最小遗传距离分别为0.0135、0.0116。从分析结果中可以看出披麻草基原植物与其混伪品间最小种间遗传距离均大于其基原植物之间最大遗传距离。



注: M. marker。

图1 藜芦属样品PCR扩增产物条带

表2 披麻草原植物与同属其他种的 *trnV-atpE* 序列 K2-P 遗传距离

物种	蒙自藜芦	大理藜芦	狭叶藜芦	兴安藜芦	黑紫藜芦	毛穗藜芦	藜芦	尖被藜芦	牯岭藜芦	毛叶藜芦	南川藜芦	长梗藜芦
蒙自藜芦	0	0.010 8	0.010 8	0.045 2	0.016 3	0.013 6	0.013 6	0.045 2	0.019 1	0.045 2	0.045 2	0.013 5
大理藜芦	0.010 8	0	0	0.033 4	0.027 5	0.024 8	0.024 8	0.033 4	0.030 4	0.033 4	0.033 4	0.024 7
狭叶藜芦	0.010 8	0	0	0.033 4	0.027 5	0.024 8	0.024 8	0.033 4	0.030 4	0.033 4	0.033 4	0.024 7

表3 披麻草原植物与同属其他种的 *psaC-ndhE* 序列 K2-P 遗传距离

物种	蒙自藜芦	大理藜芦	狭叶藜芦	兴安藜芦	黑紫藜芦	毛穗藜芦	藜芦	尖被藜芦	牯岭藜芦	毛叶藜芦	南川藜芦	长梗藜芦
蒙自藜芦	0~0.001 9	0.009 5~0.011 5	0.009 5~0.011 5	0.019 4	0.013 5	0.013 5	0.015 4	0.017 4	0.011 6	0.019 4	0.021 3	0.013 5
大理藜芦	0.009 5~0.011 5	0	0	0.023 4	0.015 5	0.017 4	0.017 4	0.021 4	0.013 5	0.021 4	0.023 4	0.015 4
狭叶藜芦	0.009 5~0.011 5	0	0~0.001 9	0.023 4	0.015 4	0.017 4	0.017 4	0.021 4	0.013 5	0.021 4	0.023 3	0.015 4

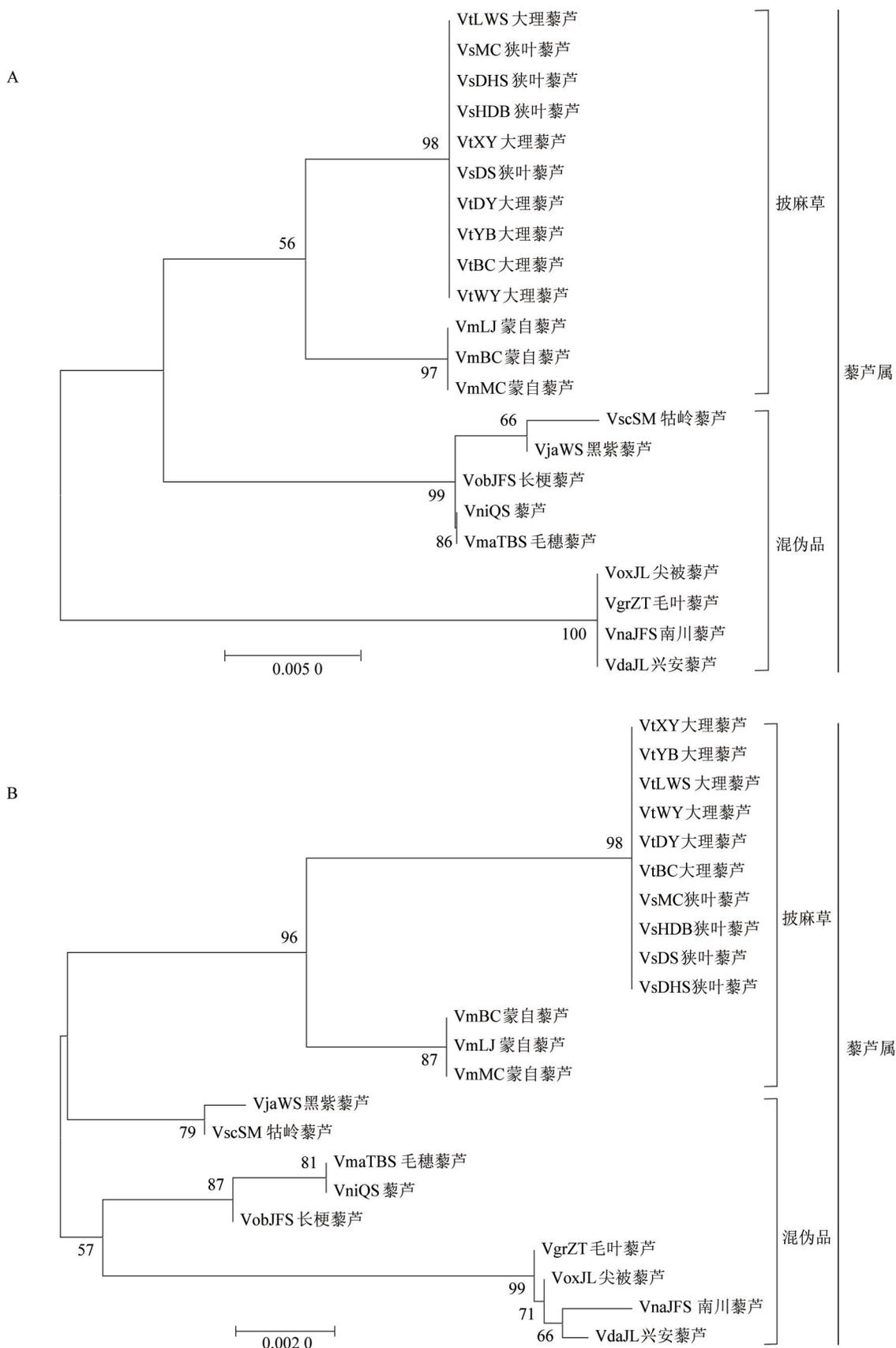
3.3 聚类分析

使用MEGA v5.0软件构建NJ系统发育树,结果见图2。*trnV-atpE*序列构建的系统发育树可以将披麻草3种基原植物与其混伪品分开,有56%的支持率将蒙自藜芦与大理藜芦、狭叶藜芦聚在不同分支,大理藜芦和狭叶藜芦聚在同一分支,其亲缘关系较近。*psaC-ndhE*序列也可将披麻草的3种基原植物与其混伪品分开,并且显示大理藜芦与狭叶藜芦亲缘关系较近,聚在同一分支;有96%支持率将蒙自藜芦与其他2个种聚在不同分支,这与*trnV-atpE*序列得出的结果一致。说明这2个叶绿体片段对披麻草原植物和其混伪品具有较好的鉴别能力。

4 讨论

披麻草主要有效成分为甾体类生物碱、萜类化合物、香豆素等。有研究表明,药材不同基原和产地的差异会导致其活性成分含量的差异,这些药效

物质基础的差异会对临床精准用药、中成药质量评价及功能性产品开发等造成影响,因此准确的基原鉴定是药材质量评价和合理应用的根本保证^[19]。随着基因组测序技术的不断发展及测序成本的不断降低,分子鉴定技术逐渐被应用于中药鉴定研究中。陈士林^[20]提议将DNA条形码应用于药用植物鉴定,该方法的应用显著提高了药用植物物种分类和鉴定的准确度。由于叶绿体基因组结构相对保守,进化速率适中,能反映更多的植物进化信息,且非编码区进化速率较编码区较快,被广泛应用于属及种间的物种鉴定^[21]。本研究采用了2个叶绿体非编码区片段对收集到的披麻草及其混伪品共22份样品进行分析,研究了披麻草及其混伪品分子鉴定的方法。2条序列的长度分别为373~381、491~534 bp,PCR扩增成功率及测序成功率均为100%,变异位点分别为19、16个,简约信息位点分别为18、15个,表明所选用的叶绿体DNA序列含有较多的变异信息。较短



注: A. *trnV-*atpE** 序列; B. *psuC-*ndhE** 序列。

图2 基于不同叶绿体 DNA 序列构建的藜芦属 NJ 系统发育树

的序列片段和较多的变异位点为构建披麻草分子鉴定系统的快速性和准确性提供了保障。相较于 *psaC-ndhE* 片段, *trnV-atpE* 片段长度更短, 且变异位点比 *psaC-ndhE* 片段多, 因此是披麻草分子鉴定的理想 DNA 条形码。

作为理想的 DNA 条形码需要具备以下几个条件^[22]: 1) 具有明显的种间变异; 2) 种内变异应足够小; 3) 种间最小变异要远大于种内最大变异。在本研究中, 披麻草 3 种基原植物 2 条 DNA 序列种间最大遗传距离分别为 0.010 8、0.011 5, 种内遗传距离为 0~0.001 9; 而与其同属其他 9 个种之间最小遗传距离分别为 0.013 5、0.011 6, 结果表明披麻草基原植物与其混伪品之间最小种间遗传距离均大于其基原植物之间最大遗传距离, 种内和种间遗传距离不存在重叠区。因此, 本研究采用的 2 个叶绿体 DNA 片段符合构建理想 DNA 条形码所需的条件。在分子系统发育学中, 构建系统发育树是对物种科、属及种间进行鉴定的常用并且有效的方法。方振名等^[23]对夹竹桃科多个属不同种进行 DNA 条形码研究, 提出将 *matK* 序列作为鉴定夹竹桃科的 DNA 条形码候选序列; 郭国业等^[24]使用 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列对野生筒蒿属植物进行了 DNA 分子鉴定研究, 结果表明, 所选的分子标记可以有效地对筒蒿属植物亲缘关系进行分析; 叶晓霞等^[25]为了建立快速准确的八角分子鉴定系统, 选用 3 个分子标记 (ITS、ITS2、*matK*) 进行了研究, 提出将 ITS2 序列作为八角最适合的 DNA 条形码, *matK* 序列作为八角辅助 DNA 条形码, 为八角快速高效的分子鉴定提供了参考。本研究使用 MEGA 软件对披麻草及其混伪品构建了邻接系统发育树, 结果表明, 2 条 DNA 序列均可将披麻草及其混伪品鉴定和区分开, 且拥有较高的支持率。

综上所述, 使用 *trnV-atpE* 序列和 *psaC-ndhE* 序列针对披麻草构建的 DNA 条形码鉴定系统可以快速且准确地鉴定披麻草及其混伪品, 且可以将蒙自藜芦与大理藜芦、狭叶藜芦较好地区分, 但是不能将大理藜芦和狭叶藜芦准确地区分开, 原因可能是单个叶绿体基因片段所拥有的变异位点不足以将这 2 种近缘基原植物鉴别区分。因此, 后续研究可以进一步将不同的叶绿体片段联合分析, 以增加更多的信息位点; 或者使用不同居群全叶绿体基因组作为超级条形码 (super-barcoding)^[26]进行系统发育分

析, 从而探讨披麻草 3 个基原植物之间更具体的系统发育关系。本研究为披麻草后续群体遗传学、谱系地理学及保护遗传学等研究提供了依据。

参考文献

- [1] 尹子丽, 谢晖, 张洁. 披麻草生物学特性初步研究[J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(4): 54-57.
- [2] 云南省卫生厅. 云南省药品标准: 1996 年版[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1998: 67-68.
- [3] 尹子丽, 谭文红, 杨仙雨, 等. 披麻草三种基原植物的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(3): 60-62.
- [4] 尹子丽, 冯泽辉, 陈静怡, 等. 披麻草野生居群表型多样性分析研究[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(7): 77-82.
- [5] SCHINDEL D E, MILLER S E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. Nature, 2005, 435(7038): 17.
- [6] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.
- [7] CHEN S L, PANG X H, YAO H, et al. Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia medica [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2011, 5(13): 747-754.
- [8] LV T W, TENG R D, SHAO Q S, et al. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants[J]. Planta, 2015, 242(5): 1167-1174.
- [9] ZHU X Z, ZHANG Y X, LIU X, et al. Authentication of commercial processed *Glehniae Radix* (Beishashen) by DNA barcodes[J]. Chin Med, 2015, 10: 35.
- [10] MA S J, LV Q D, ZHOU H, et al. Identification of traditional she medicine Shi-Liang tea species and closely related species using the ITS2 barcode[J]. Appl Sci, 2017, 7(3): 195.
- [11] 蔡一鸣, 代江鹏, 郑雨欣, 等. 钩藤属植物分子鉴定的 DNA 条形码筛选[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1828-1837.
- [12] 何爱芳, 傅鹏, 陈恒宇, 等. 基于 DNA 条形码的金槐系统发育和变异位点分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 183-191.
- [13] 李凤超, 李惠敏, 尹显梅, 等. 基于 ITS2 和 *psbA-trnH* 条形码的藏党参的分子鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 173-180.
- [14] 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, 2020: 294.
- [15] TIPPMANN H F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis [J]. Brief Bioinform, 2004, 5(1): 82-87.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al.

- The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (24) : 4876-4882.
- [17] HALL T. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symposium Series*, 1999, 41 (41):95-98.
- [18] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *J Mol Evol*, 1980, 16(2):111-120.
- [19] 丛悦,李莉,关佳莉,等. 基于叶绿体基因序列黄精和多花黄精遗传多样性分析[J]. *现代中药研究与实践*, 2021,35(3):12-15.
- [20] 陈士林. 中国药典中药材DNA条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015:1-10.
- [21] XUE S, SHI T, LUO W J, et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genome among *Prunus mume*, *P. armeniaca*, and *P. salicina*[J]. *Hortic Res*, 2019, 6:89.
- [22] CHASE M W, COWAN R S, HOLLINGSWORTH P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. *Taxon*, 2007, 56(2):295-299.
- [23] 方振名,赵仕花,卢海啸,等. 夹竹桃科DNA条形码的初步筛选[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1):93-96.
- [24] 郭国业,周悦. 野生葛属植物的DNA分子鉴定[J]. *南阳师范学院学报*, 2021, 20(6):40-44.
- [25] 叶晓霞,周兴文,赵仕花,等. 八角DNA条形码分子鉴定[J/OL]. *分子植物育种*, [2022-03-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220309.1046.002.html>.
- [26] KANE N C, CRONK Q. Botany without borders: Barcoding in focus [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(24):5175-5176.

(收稿日期: 2022-05-13 编辑: 田苗)