

· 专题 ·

市售白花蛇舌草药材的 DNA 条形码鉴定研究[△]闫嵩^{1,2}, 任伟超¹, 郑希龙³, 杨毅⁴, 潘勃⁵, 师玉华², 孙伟^{2*}, 马伟^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 中国医学科学院 药用植物研究所海南分所, 海南 万宁 571533;

4. 中国医学科学院 药用植物研究所重庆分所, 重庆 南川 408435;

5. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223)

[摘要] 目的: 基于 ITS2 序列检测市场药材白花蛇舌草, 为白花蛇舌草药材鉴定提供一种新的分子手段。方法: 实验获取白花蛇舌草及其常见混伪品基原植物 ITS2 序列, 结合 GenBank 下载序列共 7 个物种 53 条序列。经 CodonCode Aligner V3.7.1 拼接, 利用 MEGA 6.0 软件进行变异位点分析, 遗传距离计算和构建邻接(NJ)系统发育聚类树。同时随机检测 37 份市场药材白花蛇舌草, 经中药材 DNA 条形码鉴定系统进行序列比对并构建邻接(NJ)系统聚类树确定物种, 鉴别真伪。结果: 白花蛇舌草基原植物 ITS2 序列种内 K2P 平均遗传距离远小于其与混伪品种间 K2P 平均遗传距离, NJ 树结果表明白花蛇舌草基原植物可与其混伪品明显区分; 市场药材中正品 29 份, 伪品 8 份, 其中半枝莲和远志为新发现的伪品。结论: 基于 ITS2 序列 DNA 条形码技术可有效准确鉴定白花蛇舌草及其混伪品, 为其用药安全提供了有力保障。

[关键词] 白花蛇舌草; ITS2; DNA 条形码; 鉴定

Survey of Commercially Available *Oldenlandia diffusa* Products Using DNA BarcodingYAN Song^{1,2}, REN Weichao¹, ZHENG Xilong³, YANG Yi⁴, PAN Bo⁵, SHI Yuhua², SUN Wei^{2*}, MA Wei^{1*}

(1. Pharmacy College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Hainan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Wanning 571533, China;

4. Chongqing Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanchuan 408435, China;

5. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a new molecular method for the identification of *Oldenlandia diffusa*, based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence. **Methods:** Combined with the sequences downloaded from GenBank, total 53 sequences of *O. diffusa* and its adulterants were obtained representing total 7 species. After sequences were assembled by Codoncode Aligner V3.7.1, MEGA 6.0 software was used for analyzing mutation loci, computing the genetic distances and building neighbor-joining(NJ) phylogenetic tree. Simultaneously, 37 random *O. diffusa* from markets were detected by Chinese herbal medicine DNA barcode identification system. The species were determined by NJ tree and Blast1 methods. **Results:** The results revealed that the intraspecific genetic distances of *O. diffusa* were lower than the interspecific genetic distances between *O. diffusa* and its adulterants. The NJ tree strongly supported that *O. diffusa* and its adulterants can be differentiated. 29 samples of *O. diffusa* collected from markets are genuine, 8 samples are counterfeit. *Scutellaria barbata* and *Polygala tenuifolia* were reported as new adulterants. **Conclusion:** The ITS2 sequences of DNA barcoding can identify *O. diffusa* from its adulterants accurately and effectively, which provide a strong guarantee for the safety of the drug.

[Keywords] *Oldenlandia diffusa*; ITS2; DNA barcoding; identification

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.10.005

[△] [基金项目] 林业公益性行业科研专项(201004079, 201404718); 重大新药创制国家科技重大专项(2014ZX09304307001)

* [通信作者] 马伟, 研究员, 研究方向: 药用植物生物工程; E-mail: mawei@hljucm.net;

孙伟, 助理研究员, 研究方向: 中药资源与分子鉴定; E-mail: wsun@icmm.ac.cn

白花蛇舌草又名蛇舌草、矮脚白花蛇利草、蛇舌癭等，生于潮湿的田边、沟边、路旁和草地，分布于我国东南至西南部各地，其味苦、甘，性寒；归心、肝、脾、大肠经^[1]。《中华人民共和国药典》2010 版一部附录拟定其来源为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Willd.) Roxb. (中国植物志为茜草科耳草属 *Hedyotis diffusa* Willd.) 的干燥全草。白花蛇舌草具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛、抗菌消炎和抗肿瘤等功效^[2]，其中成药白花蛇舌草注射液已被国内多个厂家生产，用于湿热蕴毒所致的呼吸道感染，扁桃体炎，肺炎，胆囊炎，阑尾炎，痈疖脓肿及手术后感染，亦可用于癌症辅助治疗。

调查发现市场上白花蛇舌草常见的混伪品主要有伞房花耳草、鹅不食草、漆姑草、雀舌草、地锦草、仙桃草等，药材形态特征有限，难以从外观上准确快速鉴定，因此白花蛇舌草伪品混用误用现象比较明显^[3-5]，使得药材质量以及用药安全得不到保证，因此急需一种准确快速鉴定白花蛇舌草的新方法。

DNA 条形码是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的一种分子诊断新技术，是近年来生物分类和鉴定的研究热点^[6-9]。在植物鉴定方面，Chen 等^[10]以药用植物及其密切相关物种为研究对象，分析比较筛选大量样本基因序列，结果表明 ITS2 表现突出，在物种水平的鉴定效率高达 92.7%，适合于中药材等存在 DNA 降解的材料，明显优于国际生命条形码联盟推荐的 400-800 bp 叶绿体序列 *rbcL* 和 *matK* 联合条形码，故将 ITS2 序列作为药用植物鉴定的通用条形码序

列^[11-15]。目前，该方法在羌活、赤芍、麻黄、党参、红景天、马兜铃等药材鉴定上得到了很好的验证^[16-21]。同时，陈士林团队建立了中药材 DNA 条形码数据库 (<http://www.tembarcode.cn>)，其鉴定核心数据库共包含数万物种，超过十万条序列，涵盖《中华人民共和国药典》2010 版收录的几乎所有动植物药材及其常见混伪品，同时包含日本、韩国、印度、美国和欧洲药典 95% 以上的药材。为确保样品的准确性和代表性，样品采集尽量覆盖药材原产地、主产地及其主要分布区，并由国内外权威专家采用经典分类方法确定其基原^[11]。本实验基于 ITS2 序列建立白花蛇舌草 DNA 条形码鉴定方法，同时检测全国市场药材，验证该方法的稳定性和准确性，确保白花蛇舌草的用药安全。

1 材料

本实验选用白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa*、伞房花耳草 *Oldenlandia corymbosa*、鹅不食草 *Centipeda minima*、漆姑草 *Sagina japonica*、雀舌草 *Stellaria alsine*、地锦草 *Euphorbia humifusa*、仙桃草 *Veronica anagallis-aquatica* 共 7 个物种 45 份基原植物，采集于中国医学科学院药用植物研究所海南分所、重庆分所、广西分所，中国科学院西双版纳植物园、华南植物园。凭证标本保存于中国中医研究院中药研究所，并从 GenBank 上下载 8 条 ITS2 序列(登录号为 HQ148830, HQ148798, HQ148799, HQ148800, HQ148801, HQ148802, KJ630576, KJ630577)。详细信息见表 1，表 2。

表 1 基原物种信息

基原物种	拉丁名	样本数	采集地	样品编号	GenBank 登录号
白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i>	7	广东、广西	YC0151MT04 ~ YC0151MT10	KT284787 ~ KT284793
伞房花耳草	<i>Oldenlandia corymbosa</i>	5	广东、西双版纳、海南	YC0848MT01 ~ YC0848MT05	KT284794 ~ KT284798
鹅不食草	<i>Centipeda minima</i>	12	广东、广西、重庆	YC0569MT08 ~ YC0569MT19	KT284799 ~ KT284810
漆姑草	<i>Sagina japonica</i>	5	重庆	YC0849MT01 ~ YC0849MT05	KT284811 ~ KT284815
雀舌草	<i>Stellaria alsine</i>	8	广东、重庆	YC0850MT01 ~ YC0850MT08	KT284816 ~ KT284823
地锦草	<i>Euphorbia humifusa</i>	5	广东、广西	YC0497MT12 ~ YC0497MT16	KT284824 ~ KT284828
仙桃草	<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	3	广东	YC0851MT01 ~ YC0851MT03	KT284829 ~ KT284830

表 2 GenBank 下载序列

物种	序列条数	GenBank 登录号
白花蛇舌草	3	HQ148830; HQ148798 ~ 99
伞房花耳草	3	HQ148800 ~ 02
仙桃草	2	KJ630576 ~ 77

2 方法

2.1 DNA 的提取

取白花蛇舌草及混伪品植物样本 40 mg，用高通量组织球磨仪 50 Hz 研磨 120 s 后，用植物组织 DNA

提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取总 DNA。期间加入 700 μL DNA 裂解液, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜。

2.2 PCR 扩增及测序

植物类中药材及其基原物种 ITS2 序列通用引物: 正向引物: ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向引物 ITS3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5 μL , 正反向引物 (2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , DNA 2 μL , 加 ddH₂O 至 25 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s (经过 40 个循环); 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min^[22]。PCR 产物取 3 μL , 以 0.5 $\times$ TAE 电泳缓冲液进行凝胶电泳, 扩增成功的产物送北京美吉生物医药科技有限公司双向测序。

2.3 数据分析

测序结果运用 Codoncode Aligner V3.7.1 进行校对拼接, 去除引物区。基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除 5.8S 和 28S^[23], 得到 ITS2 序列。用软件 MEGA 6.0 把所得序列进行分析比对^[24], 基于 K2P 模型计算遗传距离, 邻接 (NJ) 法构建系统发育聚类树, 采用自举检验法 bootstrap 重复 1000 次检验各个分支的支持率。

3 基原物种鉴定结果分析

3.1 白花蛇舌草的种内变异分析

白花蛇舌草 ITS2 序列比对后长度为 214 bp, 种内存在两条变异位点, 位置分别为 94 bp, 173 bp 处, 分为三种单倍型, 平均 GC 含量为 66.4%, A1 单倍型 4 条, 同 GenBank KT284787; A2 单倍型 3 条, 同 GenBank KT284788; A3 单倍型 3 条, 同 GenBank KT284791 (表 3)。

表 3 白花蛇舌草种内变异

GenBank 号	单倍型	变异位点/bp	
		94	173
KT284787	A1 (4 条)	C	T
KT284788	A2 (3 条)	T	G
KT284791	A3 (3 条)	T	T

3.2 白花蛇舌草及其混伪品的种内种间遗传距离分析

基于 K2P 模型计算白花蛇舌草与其混伪品 K2P

距离, 白花蛇舌草的种内 K2P 平均距离为 0.0044, 种内最大 K2P 遗传距离为 0.0094。白花蛇舌草与其伪品伞房花耳草、鹅不食草、漆姑草、雀舌草、地锦草、仙桃草的种间最小遗传距离分别为 0.2895, 0.5767, 0.7429, 0.6639, 0.7093, 0.4573, 均远大于白花蛇舌草种内最大遗传距离, 表明 ITS2 序列能准确区分白花蛇舌草及其混伪品 (表 4)。

表 4 白花蛇舌草种内遗传距离及其与混伪品的种间遗传距离

样品	K2P 遗传距离 (平均值)
白花蛇舌草种内	0 ~ 0.0094 (0.0044)
白花蛇舌草与伞房花耳草种间	0.2150 ~ 0.2289 (0.2240)
白花蛇舌草与鹅不食草种间	0.5560 ~ 0.5661 (0.5631)
白花蛇舌草与漆姑草种间	0.6921 ~ 0.7088 (0.7030)
白花蛇舌草与雀舌草种间	0.6060 ~ 0.6311 (0.6163)
白花蛇舌草与地锦草种间	0.6836 ~ 0.6963 (0.6925)
白花蛇舌草与水苦蕒种间	0.4412 ~ 0.4695 (0.4551)
白花蛇舌草与混伪品种间	0.2150 ~ 0.7088 (0.5287)

3.3 白花蛇舌草及其混伪品的 NJ 树鉴定

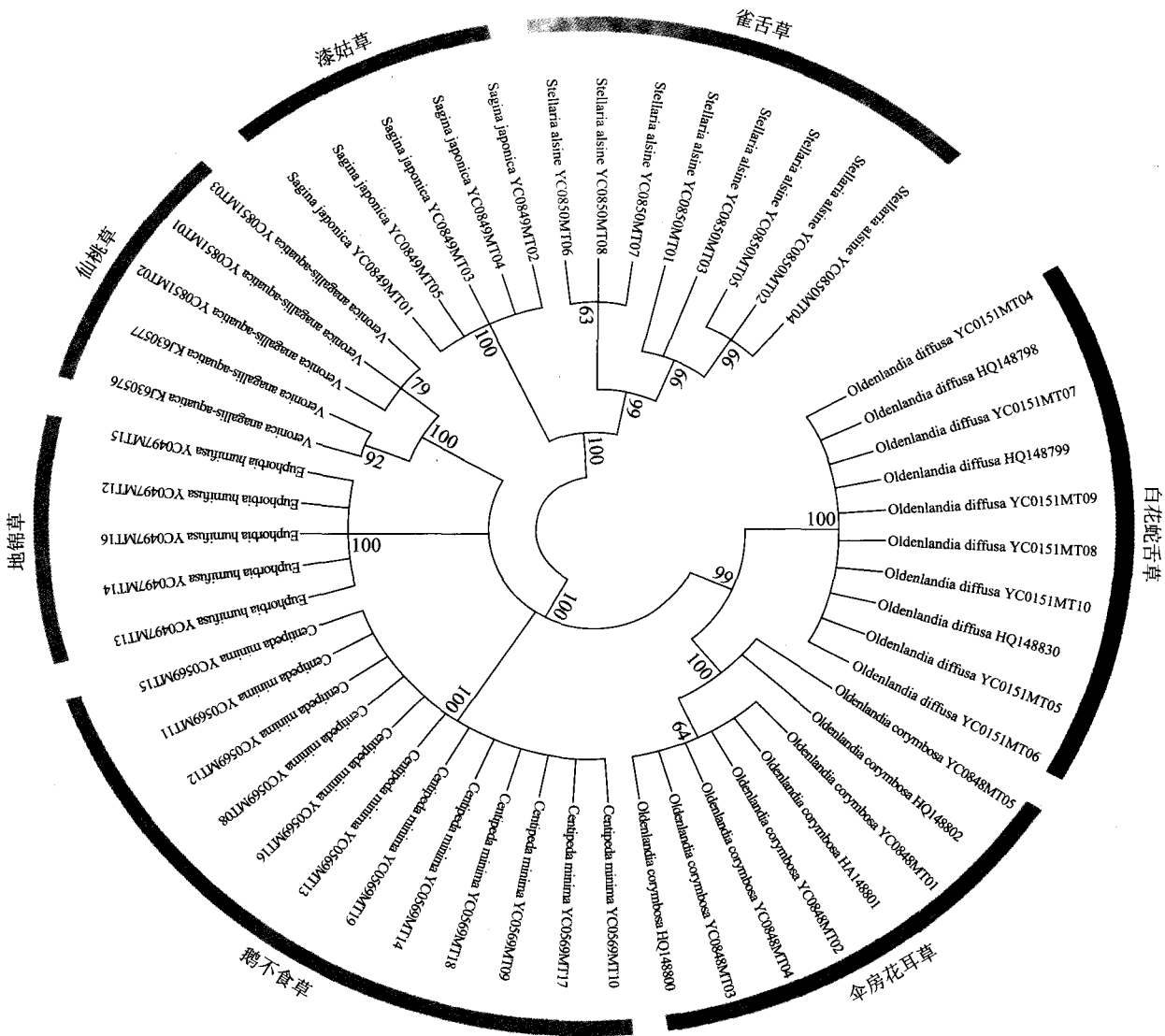
基于得到的 53 条 ITS2 序列, 用邻接 (NJ) 法构建白花蛇舌草和其混伪品的系统聚类树。从所构建的 NJ 树中可以看出, 白花蛇舌草序列单独聚为一支, 混伪品物种也能单独聚为一支, 呈现良好的单系性且自展支持率都大于 95% (图 1)。

4 市场药材白花蛇舌草鉴定结果分析

从安徽亳州药市, 河北安国药市, 成都莲花池药市, 哈尔滨, 湖北, 河南, 北京, 辽宁, 江西药店共收集药材白花蛇舌草 37 份 (编号 SCBH01-SCBH37), 用上文同样方法得到 ITS2 序列, 并到中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcode.cn/china/>) 比对, 鉴定结果见表 5。

对 37 份市场药材序列比对发现共有白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* 29 份, 伞房花耳草 *Oldenlandia corymbosa* 4 份, 鹅不食草 *Centipeda minima* 1 份, 发现新伪品 2 种, 半枝莲 *Scutellaria barbata* 2 份, 远志 *Polygala tenuifolia* 1 份。伪品占抽样调查的 21.6%。

根据以上序列的比对结果, 将 37 份市场药材 (包括新伪品) 和前文白花蛇舌草及其混伪品基原物种的 ITS2 序列一起构建 NJ 树 (图 2)。结果可以看出, 29 份药材与白花蛇舌草基原聚成一枝, 4 份与伞房花耳草聚成 1 枝, 1 份与鹅不食草构成一枝, 2 种新伪品也能单独的聚成一枝, 物种鉴定结果与中药



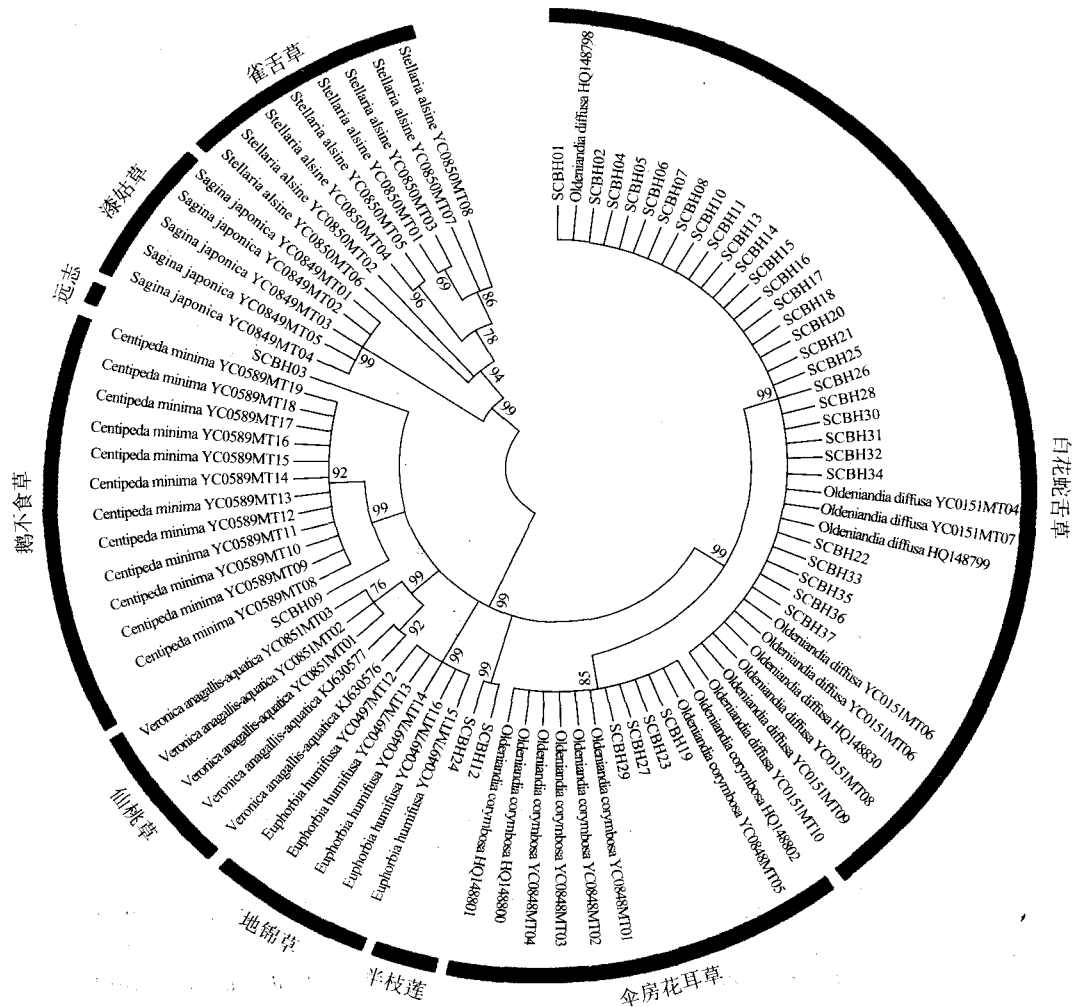
注：Bootstra P1000 次重复，枝上数值仅显示自展支持率≥50%
图 1 基于 ITS2 序列构建白花蛇舌草及其混伪品邻接 (NJ) 树

表 5 市场药材白花蛇舌草鉴定结果

编号	来源	比对结果	序列相似性
SCBH01	安徽亳州药市	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 99.5%
SCBH02 SCBH04-06	安徽亳州药市	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH03	安徽亳州药市	远志	<i>Polygala tenuifolia</i> MYS05 100%
SCBH07-08 SCBH10-11	河北安国药市	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH09	河北安国药市	鹅不食草	<i>Centipeda minima</i> RC-EB03 100%
SCBH12	河北安国药市	半枝莲	<i>Scutellaria barbata</i> YC0064MT04-X10 100%
SCBH13-15	成都莲花池药市	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH16-18	哈尔滨某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH19	哈尔滨某药店	伞房花耳草	<i>Oldenlandia corymbosa</i> JQ730816 100%
SCBH20-21	湖北某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH22	湖北某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JQ730817 100%
SCBH23	湖北某药店	伞房花耳草	<i>Oldenlandia corymbosa</i> JQ730816 100%

表 5(续)

编号	来源	比对结果	序列相似性
SCBH24	河南某药店	半枝莲	<i>Scutellaria barbata</i> YC0064MT04-X10 100%
SCBH25-26	河南某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH27	河南某药店	伞房花耳草	<i>Oldenlandia corymbosa</i> JQ730816 100%
SCBH28 SCBH30-32	北京某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH29	北京某药店	伞房花耳草	<i>Oldenlandia corymbosa</i> JQ730816 100%
SCBH33 SCBH35	辽宁某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JQ730817 100%
SCBH34	辽宁某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JN012482 100%
SCBH36-37	江西某药店	白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> JQ730817 100%



注: Bootstra P1000 次重复, 枝上数值仅显示自展支持率≥50%

图 2 基于 ITS2 序列构建的市场药材白花蛇舌草和已知基原物种的邻接 (NJ) 树

材 DNA 条形码鉴定系统鉴定结果相同, 表明基于 ITS2 DNA 条形码技术能很好的鉴定药材白花蛇舌草。

5 讨论

DNA 条形码技术的兴起及成熟, 解决了传统中药鉴定方法主观性强、重复性和稳定性差的缺

点^[25], 一个准确全面的中药 DNA 条形码数据库建立显得尤其重要, 应可方便快捷对中药资源信息检索、查询以及物种比对鉴定, 目前, 陈士林团队已建立了全世界最大的中草药 DNA 条形码鉴定数据库和中药材 DNA 条形码鉴定系统网站 <http://www.tcmbarcode.cn>, 为广大科研工作者直接应用

DNA 条形码技术鉴定中药材搭建了一个平台。

白花蛇舌草作为传统中药材, 拥有良好的药用价值, 市场及临床需求量大, 但其野生药材资源不断减少, 家种商品不多, 与其外观形态相似的伪品又多, 使得混用误用现象不断增加, 严重影响用药疗效与安全, 有关部门应提高白花蛇舌草药材监管力度, 确保药材的质量与规范化使用。虽然传统方法如从植物形态、性状、显微方面能够辨别真伪^[3-5], 但对操作者的专业知识要求较高, 且伴有较强的主观性, 本研究证实了运用 DNA 条形码技术鉴定市场药材白花蛇舌草的可行性。实验过程中应避免污染, 并要保证提取 DNA 的浓度, 本实验涉及的 7 种原植物和药材用通用引物 ITS2F/3R 有很好的扩增效率, PCR 电泳后均呈现清晰条带。白花蛇舌草及其混伪品基原物种最近距离法和 NJ 树鉴定均表明 ITS2 序列在物种间的鉴定能力, 能将白花蛇舌草及其混伪品很好鉴定开, 于此基础上再对市场药材白花蛇舌草进行比对鉴定和结合已知基原物种序列建立 NJ 树确定物种基原。37 份市场药材中正品 29 份, 伪品 8 份, 正品率为 78.4%, 需要提及的是, 伪品中还检测出两种新伪品半枝莲和远志, NJ 树上也能独自聚为一枝, 表现良好的单系性。综上, 应用 ITS2 序列可以准确鉴定白花蛇舌草药材及其混伪品, 且建立的白花蛇舌草 DNA 条形码鉴定方法可对市售白花蛇舌草进行鉴定。

参考文献

- [1] 中华本草编委会. 中华本草: 第 6 册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 433-436.
- [2] 纪宝玉, 范崇庆, 裴莉昕, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 235-240.
- [3] 李志俊, 王金梅, 刘宇琴. 白花蛇舌草与常见伪品的鉴别[J]. 甘肃医药, 2012, 31(6): 463-465.
- [4] 姚建兵. 白花蛇舌草及其混淆品的比较鉴别[J]. 海峡药学, 2010, 22(10): 34-35.
- [5] 苏筱娟. 白花蛇舌草及其混伪品的性状鉴别[J]. 中国现代中药, 1999, (9): 44-44.
- [6] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 中国医药卫生出版社, 2012: 4-4.
- [7] 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.
- [8] Chen S, Pang X, Song J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [9] Li X, Yang Y, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. Biol Rev, 2015, 90(1): 157-166.
- [10] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8613.
- [11] 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: 6-14.
- [12] Song J, Shi L, Li D, et al. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43971.
- [13] Pang X, Song J, Zhu Y, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. Cladistics, 2011, 27(2): 165-170.
- [14] Yao H, Song J, Liu C, et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals[J]. PLoS ONE, 2010, 5(10): e13102.
- [15] Gao T, Yao H, Song J, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(1): 116-121.
- [16] 辛天怡, 姚辉, 罗焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药学报, 2012, 47(8): 1098-1105.
- [17] 孙稚颖, 宋经元, 姚辉, 等. 基于 ITS2 条形码的中药材赤芍及其易混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(2): 407-411.
- [18] 庞晓慧, 宋经元, 徐海滨, 等. 应用 ITS2 条形码鉴定中药材麻黄[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1118-1121.
- [19] 刘美子, 刘萍, 李美妮, 等. 党参及其易混伪品的 ITS2 分子鉴定[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(2): 412-417.
- [20] Xin T, Li X, Yao H, et al. Survey of commercial Rhodiola products revealed species diversity and potential safety issues[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8337.
- [21] Wu L, Sun W, Wang B, et al. An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11318.
- [22] 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.
- [23] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene, 2009, 430(1-2): 50-57.
- [24] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [25] 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): 458-466.

(收稿日期 2015-08-06)