

降香黄檀的 DNA 条形码鉴定研究

唐历波¹, 李 栎¹, 林维键¹, 黄 瑶², 秦明艳³, 冯 敏⁴, 蓝翠珍⁴

(¹海南医学院理学院, 海口 570204; ²海南惠普森医药生物技术有限公司, 海口 570102;

³海南省药品检验所, 海口 571109; ⁴海南省农垦医院, 海口 570203)

摘要: DNA 条形码技术是利用基因组中一段短的标准序列进行物种鉴定及探索其亲缘进化关系的方法。本研究对采自海南不同地区降香黄檀 5 个居群 24 份样品的 psbA-trnH、rbcL、核 ITS 及 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序, 比较各序列扩增和测序效率。采用 BLAST1 和邻接 (NJ) 法构建系统聚类树方法评价不同序列的鉴定能力。结果表明 ITS2 在所研究的材料中具有最高的扩增和测序效率, 而 ITS 扩增效率较低。ITS2 完整序列在区分黄檀属不同种间差异具有较大优势。因此可利用 ITS2 从分子水平区分降香黄檀与其他混伪种。

关键词: 降香黄檀; DNA 条形码; ITS2; 种源鉴定

DNA Barcoding the Plants of *Dalbergia odorifera*

TANG Li-bo¹, LI Li¹, LIN Wei-jian¹, HUANG Yao², QIN Ming-yan³, FENG Min⁴, LAN Cui-zhen⁴

(¹Science Department of Hainan Medical College, Haikou 570204;

²Hainan Helpson Medicine & Biotechnology Co. LTD., Haikou 570102; ³Hainan Drug Inspective Institute, Haikou 571109;

⁴Hainan Nongken Hospital, Haikou 570203)

Abstract: DNA barcoding is a technique of species identification and phylogenetic analysis by using DNA sequences from a small fragment of the genome. In the study, we used this technique to identify 24 *Dalbergia odorifera* samples of five populations from different regions of Hainan province and selected psbA-trnH, rbcL, nuclear ITS, and ITS2 sequences to compare the amplification and sequencing efficiency. We constructed phylogenetic tree by BLAST1 and NJ methods to evaluate the identification ability of different sequences. Our results showed that ITS2 had the highest amplification and sequencing efficiency among all the studied materials, while ITS had lower amplification efficiency. The complete sequence of ITS2 demonstrated greater advantages in distinguishing different strains of *Dalbergia odorifera*. Our study also demonstrated the efficacy of ITS2 to distinguish between *Dalbergia odorifera* and other adulterants species at the molecular level.

Key words: *Dalbergia odorifera*; DNA barcoding; ITS2; species identification

降香黄檀 (*Dalbergia odorifera* T. Chen.) 是我国海南岛特有的乔木乡土树种, 属于蝶形花科黄檀属植物, 为重要的黎药植物, 树干和根部心材入药, 名为降香, 具有活血散瘀、止血定痛功效。现代研究发现降香黄檀具有抗氧化^[1]、抑制中枢^[2]等作用。同时其心材也是重要红木家具原料, 具有很高的收藏价值, 俗称花梨木。由于市场价值高, 各种混伪品参

杂其间, 如来自越南的香枝木。李桂兰等^[3]从植株外部形态、心材横截面特征对海南降香黄檀与越南香枝木做了详细比较, 发现外部形态区别较大, 但药材特性差异较小。高兆蔚^[4]对海南黄檀和降香黄檀的外部形态及内部材质结构进行了比较, 发现两者植株的外部形态无差异, 海南黄檀心边材材色无区别, 木材无香气, 其材质和利用价值与降香黄檀相

差甚远。更为严重的是在引种降香黄檀过程中,由于海南黄檀与降香黄檀在形态特征上的相似性,引种栽培时易造成种源混淆。如福建省引种海南降香黄檀,全省降香黄檀的真实率仅为30%~40%。而海南黄檀的混淆率高达60%~70%。陈敏等^[5]对降香黄檀和海南黄檀的95%乙醇、正丁醇提取物,采用UV-160紫外分光光度扫描仪测定,可以区分这两个种,但鉴定成本较高和鉴定程序复杂。

DNA条形码技术是加拿大动物学家P. D. N. Hebert等^[6]于2003年首次提出利用基因组中的一段通用的标准序列来进行物种鉴定的分子生物学诊断技术。自提出DNA条形码的概念以来,这种新兴分类学技术引起了越来越多的生物学家们的关注。DNA条形码弥补了传统分类学方法的不足,有望实现对物种的快速自动鉴定。降香黄檀是海南的特有树种,经济价值高,然而其分类混乱,近缘种类及混伪品复杂,严重地限制了种植业的发展。目前,国内从分子水平研究植物物种鉴定及系统演化关系主要是基于SSR、SNP和RAPD等方法进行研究,虽然国

表1 降香黄檀样本采集地及序列

Table 1 The collection sites and its sequences of *Dalbergia* samples

种质名称 Species name	采集地 Collection site	ITS2	psbA-trnH	rbcL	ITS
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南万宁	WN005601-04	wn005601-03	wn005601-03	wn005603
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南通什	TZ005605-08	TZ005608	TZ005608	tz005608
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南乐东	LD005609-12		ld005609-10	ld005609-10
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南屯昌	TC005613-17	TC005613,16	TC005613-16	tc005614,16
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南琼山	QS005618-21	QS005621	QS005621	QS005621
海南黄檀 <i>D. hainanensis</i>	海南乐东	LD005701,02	LD005701	LD005701	
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南乐东	LD005801,02	LD005801	LD005801	
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	海南乐东	LD005901,02	LD005901	LD005901	

1.2 方法

1.2.1 样品DNA的提取 叶片样品为硅胶干燥后称取10~15 mg,采用DNA球磨仪(Retsch MM300, Genman)研磨30 s(2000 r/min),茎枝样品剪碎用液氮研磨后,使用DNA提取试剂盒(Tiangen biotech Co., China)提取总DNA。

1.2.2 PCR扩增和测序 PCR扩增引物参考文献[16]、[17]、[18],PCR反应体系为25 μL,体系包括MgCl₂ 2 μL(25 mmol/L),dNTP 2 μL(2.5 mmol),PCR缓冲液 2.5 μL(10×),引物各1.0 μL(2.5 μmol)(Sangon Co., China),聚合酶 1.0 U (Biocolor BioScience&Technology Co., China),总DNA 1 μL(约30 ng)。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸45 s,40个循环;72℃延伸

10 min。PCR扩增产物经纯化后,送样至上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

1 材料与方法

1.1 植物材料

降香黄檀供试材料于2012年10月采集自海南5个地区的5个居群,分别代表海南的北部、东部、中部、西部和南部5个生态区,每个居群随机抽取4~5株,每株采集健康无病斑叶片2片,硅胶干燥后带回实验室进一步分析。各类群及标本编号见表1。海南黄檀心材来自于海南乐东尖峰镇花梨木加工厂,标本编号为LD005701-02。

以上样本经中国热带作物研究院品质资源研究所王祝年研究员鉴定,凭证标本和数字影像信息保存于海南医学院理学院药用植物标本室。从GenBank数据库获得降香黄檀及其同属其他种或近缘属4种DNA条形码序列共计41条(表2)。

10 min。PCR扩增产物经纯化后,送样至上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

1.2.3 数据处理方法 测序返回的峰图文件采用CodonCode Aligner V3.7.1 (CodonCode Co., USA)进行正反向校对拼接,去除低质量序列及引物区。将拼接后的序列用软件MEGA 5.0 (molecular evolutionary genetics analysis)分析比对^[19],并基于K2P模型进行遗传距离等分析,用邻接(NJ)法构建系统聚类树,利用bootstrap(1000次重复)检验各分支的支持率。ITS序列采用基于隐马尔可夫模型的HMMER注释方法去除两端5.8S和28S区段即可获得ITS2间隔区序列^[20]。采用PCR扩增效率和测序成功率来评价4对候选引物的扩增情况,使用TAXON DNA软件^[21]分析序列种内、种间变异。

表 2 黄檀属序列的 GenBank 登录号

Table 2 Genbank accession number of *Dalbergia* species

种质名称 Species name	ITS2	psbA-trnH	rbcL	ITS
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>	GQ434362 ^[11]	GU396739 ^[11]		
降香黄檀 <i>D. odorifera</i>		GQ434964 ^[11]		
印度檀 <i>D. sissoo</i>		GU396738 ^[12]		AF189023 ^[12]
印度檀 <i>D. sissoo</i>	EF451079 ^[12]	GU135327 ^[12]	GU135159 ^[12]	
巴西黄檀 <i>D. brasiliensis</i>				EF451076 ^[13]
巴西黄檀 <i>D. miscolobium</i>	EF451069 ^[13]			DQ787405 ^[13]
密花黄檀 <i>D. congestiflora</i>				AF068140 ^[14]
南美黄檀 <i>D. foliolosa</i>	AF189022 ^[13]			EF451067 ^[13]
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>	FR854140 ^[14]	FR854167		FR854142
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>	FR854139 ^[14]	FR854166		FR854141
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>		FR854165		
越南黄檀 <i>D. tonkinensis</i>		FR854164		
酸枝木 <i>D. cochinchinensis</i>		FR854152		
酸枝木 <i>D. cochinchinensis</i>		FR854151		
酸枝木 <i>D. cochinchinensis</i>		FR854150		
酸枝木 <i>D. cochinchinensis</i>		FR854149		
缅甸黄檀 <i>D. elegans</i>	EF451066 ^[13]			
版纳黑檀 <i>Dalbergia foliolosa</i>	AF189022 ^[15]			
秧青 <i>Dalbergia assamica</i>	FR854122 ^[15]	FR854147		
秧青 <i>Dalbergia assamica</i>	FR854119 ^[15]	FR854146		
秧青 <i>Dalbergia assamica</i>		FR854145		
多裂黄檀 <i>Dalbergia rimosa</i>	GU217632 ^[14]			
黄檀 <i>Dalbergia hupeana</i>		HQ426987 ^[14]	U74236 ^[13]	
黄檀 <i>Dalbergia hupeana</i>		GU396817		
斜叶黄檀 <i>Dalbergia pinnata</i>		GU396737		
奥氏黄檀 <i>Dalbergia oliveri</i>		FR854157		
奥氏黄檀 <i>Dalbergia oliveri</i>		FR854155		
奥氏黄檀 <i>Dalbergia oliveri</i>		FR854153		

无参考文献标注的为没有在刊物上公开发表的序列

The sequences not annotated by references are unpublished in the magazine

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增效率和测序成功率

采用 4 对引物扩增后,分析其效率,从图 1 可知 ITS2 的 PCR 扩增效率和测序成功率最高,分别达到 96.3% 和 96.8%,这一结果与 J. Y. Song 等^[22-25] 研究结果类似。

采用 ITS2 进行 PCR 扩增,可见在 400 ~ 600 bp 之间有一条明显的条带,如图 2 所示。

2.2 降香黄檀种内及种间变异分析

在 C. P. Meyer 等^[26] 对 DNA 条形码序列变异分

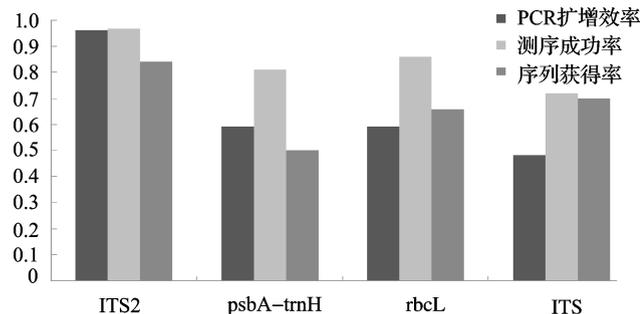
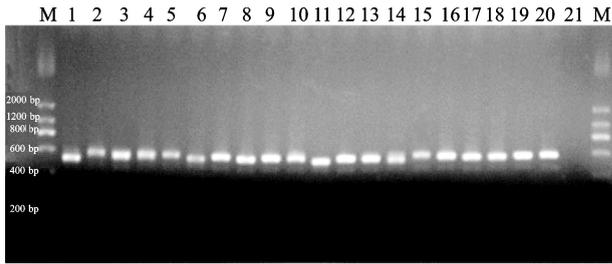


图 1 4 种 DNA 条形码扩增效率、测序成功率及序列获得率比较

Fig. 1 Identification efficiency of four loci using different methods for species identification



M: Marker; 1~20: 海南5个地区采集的样本; 21: 空白对照
M: Marker, 1-20: The samples collected in the 5 regions, 21: The black control

图2 利用ITS2引物的扩增结果

Fig. 2 The result of primer ITS2 PCR production

析方法的基础上,分析比较种间最小变异(minimum interspecific distance)以及对应种内最大变异-平均溯祖度(coalescent depth)。对试验获得的降香黄檀及GenBank下载的黄檀属中其他种不同DNA条形码候选序列的种内变异、种间变异、种间最小变异和种内最大变异进行分析(表3)。结果表明,ITS2序列的平均种间遗传距离(average inter-specific distance)最大,其次是psbA-trnH序列,rbcL序列最小。平均种间最小距离(average minimum interspecific distance)是psbA-trnH序列最小,ITS2最大。而各序列的种内

表3 4种DNA条形码序列变异分析

Table 3 The variation analysis of four DNA barcoding sequences

参数 Parameter	ITS	ITS2	rbcL	psbA-trnH
序列长度(bp) Length range	569~755	216~237	567~1407	220~355
GC含量(%) GC content	63.3	68.3	42.9	31.5
平均种间遗传距离 Average inter-specific distance	0.0327 ± 0.0053	0.0777 ± 0.0187	0.0113 ± 0.0043	0.0612 ± 0.0136
种间平均θ值 Average inter-specific θ value	0.0744 ± 0.0102	0.0702 ± 0.0177	0.0762 ± 0.0155	0.0107 ± 0.0041
平均种间最小距离 Average minimum interspecific distance	0.0488 ± 0.0077	0.0700 ± 0.0178	0.0110 ± 0.0052	0.0017 ± 0.0013
平均种内遗传距离 Average intra-specific distance	0.0005 ± 0.0004	0.0007 ± 0.0005	0.0088 ± 0.0023	0.0029 ± 0.0020
平均溯祖度 Coalescent depth	0.0007 ± 0.0007	0.0016 ± 0.0016	0.0487 ± 0.0103	0.0010 ± 0.0007
平均种内最大距离 Average maximum intra-specific distance	0.0015 ± 0.0014	0.0028 ± 0.0019	0.0509 ± 0.0112	0.0029 ± 0.0013

2.3.1 种内变异位点分析 来源于海南5个地区的降香黄檀样品27条ITS2序列长度均为216 bp,其中除了来源于乐东尖峰(LD005701)存在2个位点变异以外,其余序列全部与种源*Dalbergia odorifera*(GenBank登录号:GQ434362)相同(表4)。ITS序列由于扩增效率较低,最后测序成功仅占21.4%,5个居群中,仅来源于海南通什的降香黄檀在157 bp处有一个转换。而*Dalbergia tonkinensis*(GenBank登录号:FR854167)与海南5个地区的降香黄檀品种仅594 bp处有1个位点的差异。通过种内变异分析可知,来源于海南5个地区的不同居群,其ITS2扩增序列完全一致,同时,也与降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)(GenBank登录

变异-平均溯祖度(coalescent depth)是rbcL最大,ITS与ITS2序列较小,分别为0.0007和0.0016。平均种内最大距离(average maximum intra-specific distance)中,rbcL序列最大,为0.0509 ± 0.0112,大于其平均种间最小距离(0.0110 ± 0.0052),说明其种内种间距离有重叠,而psbA-trnH序列的平均种内最大距离也超过了平均种间最小距离。因此rbcL和psbA-trnH作为条形码难以区分降香黄檀不同的种。相反,ITS和ITS2平均种内最大距离远小于平均种间最小距离,具有明显的DNA gap,从实际鉴定结果来看,利用ITS序列在GenBank搜索比对后,与越南黄檀(*Dalbergia tonkinensis* Prain)相近,利用ITS2序列比对,在(<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>)网站进行序列的注释,去除5.8S和28S两端序列,获得ITS2序列,比对后与降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)序列完全吻合,与形态学指标鉴定相符。因此,可利用ITS2序列进行降香黄檀种源的鉴定。

2.3 降香黄檀及其近缘种变异位点分析

由表3可知,ITS及ITS2具有明显的DNA gap,因此采用这2对引物扩增序列进行种内变异位点分析,并进行初步鉴定。

号:GQ434362)完全一致。ITS2序列鉴定结果表明海南野生的黄花梨主要为降香黄檀(*Dalbergia odorifera*)。

利用ITS2扩增序列比对结果表明,来源于乐东尖峰海南花梨(标本号:LD005701)与降香黄檀仅有2个变异位点的差异,可利用分子生物学手段区分这两个不同的种,同时,5个居群分析结果表明,海南的降香黄檀的种源清晰,为降香黄檀,而海南黄檀数量较少。从形态特征方面考虑,两者的差异仅仅是心材的含油量及颜色上差异,即使最有经验的分类学家也难以从形态学方面加以区分,而只能通过钻孔取样或砍伐后剥去表皮后区分。本研究结果表明,降香黄檀与海南黄檀的亲缘关系很近,变异位点

可以区分降香黄檀和海南黄檀。故利用 DNA 条形码技术可以从苗期加以区分。同时,也可利用心材提取 DNA 进行木材鉴定。

表 4 降香黄檀种内 ITS/ITS2 序列种内变异位点分析

Table 4 The intraspecific variable sites in the ITS and ITS2 sequence of *Dalbergia odorifera*

位点 Locus	ITS		ITS2	
	157 bp	594 bp	203 bp	211 bp
WN005601-04	G	C	G	A
TZ005605-08	A	C	G	A
LD005609-12	G	C	G	A
TC005613-17	G	C	G	A
QS005618-21	G	C	G	A
LD005901,02	G	C	G	A
LD005802	G	C	G	A
LD005701	G	C	C	T
GQ434362	G	C	G	A
FR854142	G	A	G	A

2.4 降香黄檀及其同属近缘种 NJ 树鉴别

基于 ITS 和 ITS2 序列分别构建降香黄檀及其同属近缘种 NJ 树(图 3、图 4),结果表明在 ITS 构建的种内 NJ 树中(图 3),5 个居群的降香黄檀聚为一支,呈现明显的单系性。海南黄檀能够与降香黄檀区分开。基于 ITS2 的种间序列构建的 NJ 树,从图 4 可知降香黄檀与东京黄檀(*Dalbergia tonkinensis*)聚合成一支,变异位点在 594 bp 处有一个碱基转换。其次来源于海南 5 个地区的居群明显成为单系,并且与 *Dalbergia odorifera* (GenBank 登录号:GQ434362)完全相同。因此,ITS 及 ITS2 序列作为条形码均可准确鉴别海南地区的降香黄檀,并与黄檀属的其他种区别开。

3 讨论

降香黄檀是海南特有的珍贵红木树种,在国内具有较高知名度,同时,在收藏品市场需求量较大,经济价值高。近些年来降香黄檀野生资源减少,同时,诸如越南香枝木等假货混杂在市场中,种苗来源不清,限制了降香种植产业的发展,市场供求矛盾日益尖锐。目前,包括福建、广东都从海南引进种苗发展花梨木的种植业,但种苗的纯度、种源的鉴定都是困扰该产业发展的问题。本研究结果表明,利用 DNA 条形码鉴定技术,采用 ITS/ITS2 序列可准确鉴定降香黄檀的基源植物,为采用分子生物学手段进行早期种源鉴定,促进降香黄檀种植业的发展提供了理论基础。

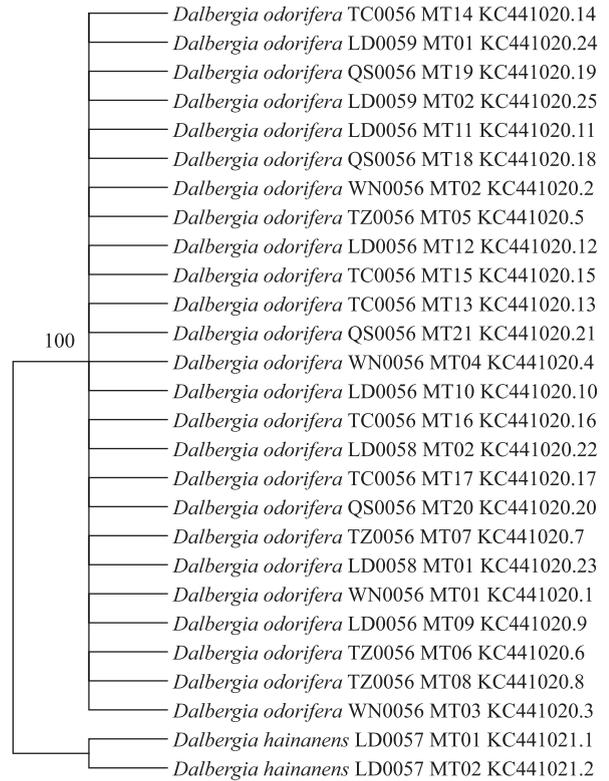


图 3 基于 ITS 序列构建降香黄檀与海南黄檀的 NJ 树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Dalbergia odorifera* and *Dalbergia hainanensis* constructed with the ITS sequences using NJ method

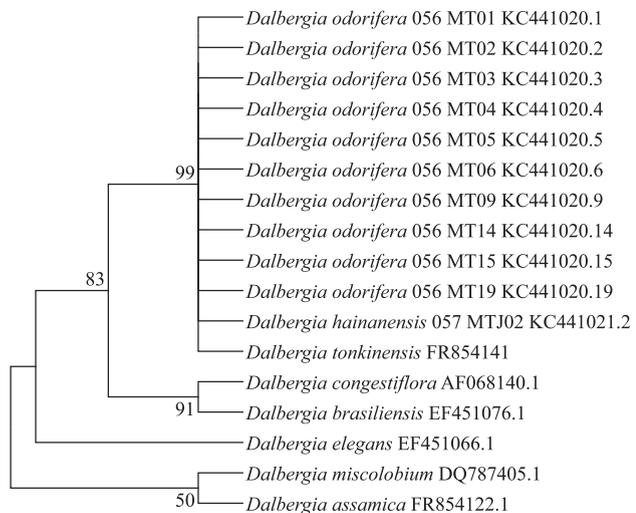


图 4 基于 ITS2 序列构建降香黄檀种间的 NJ 树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Dalbergia odorifera* constructed with the ITS2 sequences using NJ method

海南黄花梨是一类黄檀属植物的统称,其经济价值主要用于高档红木家具及艺术收藏品,本研究以干燥的心材作为样本,尽管在提取 DNA 时出现降解特征,但仍然能够成功地扩增出 ITS2 条形码序列

进行分析,原因可能是 ITS2 序列较短,且在核基因组中以重复序列的形式存在。本研究结果表明,ITS2 序列在区分种一级分类水平上具有良好的可操作性和重复性,因此,可以通过建立标准化的技术流程,对市场上流通的以花梨为材质的家具或收藏品进行准确的鉴定。

本研究采用 4 对候选序列针对特定的采集标本进行研究,从理论上证实了利用 DNA 条形码技术进行植物物种鉴定的可行性,无论从降香黄檀种内、种间及其与近缘种间遗传距离,还是基于 ITS2 条形码序列构建的 NJ 树,均证实 ITS2 条形码序列能够准确鉴别降香黄檀的两个基源植物,同时也能准确鉴定降香黄檀与其近缘种。考察不同地区的 5 个居群 ITS2 序列中,203 bp 位点处(ITS2 区)发生 G-C 颠换及 211 bp (ITS2 区)处发生 T-A 颠换,本研究表明,海南地区的降香黄檀根据 ITS2 序列差异可区分为 2 个单倍型。可从分子水平上对降香黄檀与海南黄檀加以区分。另一方面,本研究仅从乐东尖峰镇一家花梨木加工厂采集到 2 份海南黄檀心材样本,降香黄檀与海南黄檀在 ITS2 序列差异是否是稳定的差异,有待于进一步收集海南黄檀样本加以证实。总之,ITS2 作为 DNA 条形码具有扩增序列短,PCR 扩增效率高,种间种内的 DNA gap 显著的特征,从这个意义上来说 ITS2 是一个理想的 DNA 条形码。

参考文献

- [1] 姜爱莉,孙利芹. 降香抗氧化成分的提取及活性研究[J]. 精细化工,2004,21(7):525-528
- [2] 张磊,刘干中. 降香的中枢抑制作用[J]. 上海中医药杂志,1987(12):39-40
- [3] 李桂兰,徐蜂,罗建举,等. 海南香枝木与越南香枝木木材构造特征比较解剖研究[J]. 广西农业生物科学,2008,27(2):154-157
- [4] 高兆蔚. 两种黄檀的形态特征差异及甄别方法的探讨[J]. 林业勘察设计,2009(1):58-61
- [5] 陈敏,覃仁安,严航. 降香及伪品海南黄檀的鉴定[J]. 中医中药,2001,25(7):662
- [6] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Ward J R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: 96-99
- [7] 高山,林碧英,许端祥. 苦瓜种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(1):78-83
- [8] 黄晨旻,李翠斯,张金霞. 基于 DNA 拓扑异构酶 II 基因部分序列的侧耳属系统发育分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,

- 10(4):529-534
- [9] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等. 无锡水蜜桃品种群遗传多样性及与其他群体亲缘关系的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(3):367-372
- [10] 高连明,刘杰,蔡杰,等. 关于植物 DNA 条形码研究技术规范[J]. 植物分类与资源学报,2012,34(6):592-606
- [11] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8613
- [12] Tripathi A M, Tyagi A, Kumar A, et al. The internal transcribed spacer (ITS) region and *trnH-psbA* are suitable candidate loci for DNA barcoding of tropical tree species of India[J]. PLoS ONE, 2013, 8(2): e57934
- [13] Ribeiro R A, Lavin M, Lemos-Filho J P, et al. The genus *machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*; inferences from combined sequence data[J]. Syst Bot, 2007, 32(4): 762-771
- [14] Berya M A, Lavin M. A monograph of *Pictetia* (Leguminosae-Papilionoideae) and review of the tribe *Aeschynomeneae*[J]. Syst Bot Monogr, 1999, 56(1): 1-93
- [15] Lavin M, Thulin M, Labat J N, et al. Africa, the odd man out: molecular biogeography of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise[J]. Syst Bot, 2000, 25(3): 449-467
- [16] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 14-15
- [17] Song J Y, Yao H, Li Y, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124: 434-439
- [18] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hot spots [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 2923-2928
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731-2739
- [20] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5. 8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene, 2009, 430: 50-57
- [21] Slabbinck B, Dawyndt P, Martens M, et al. Taxon gap: a visualization tool for intra- and inter-species variation among individual biomarkers [J]. Bioinformatics, 2008, 24: 866-867
- [22] Song J Y, Shi L C, Li D Z, 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
- [23] 罗焜. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 342-351
- [24] Xin T Y, Yao H, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of *Notopterygii* Rhizoma et Radix using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharma Sin, 2012, 47(8): 1098-1105
- [25] Sun Z Y, Chen S L, Yao H, et al. Identification of *Notopterygii* Rhizoma et Radix and its adulterants using DNA barcoding method based on ITS2 sequence [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43: 568-571
- [26] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biol, 2005, 3: e422