

细辛属 8 种药用植物 rDNA ITS 的克隆与序列分析

蒋明^{1,4}, 吴丹², 李嵘嵘³, 张慧娟⁴, 贺蔡明⁴

1. 台州学院 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室, 浙江 椒江 318000

2. 杭州市中医院 骨科, 浙江 杭州 310007

3. 台州学院医药化工学院, 浙江 椒江 318000

4. 台州学院生命科学学院, 浙江 椒江 318000

摘要: 目的 克隆和分析 8 种细辛属药用植物的 ITS 序列, 为开展该属植物分子鉴定和遗传多样性研究奠定基础。方法 以基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 法克隆 ITS 全长序列, 借助生物信息学软件对序列进行比对分析, 并构建系统发育树。结果 测序结果表明, 8 种细辛属植物的 ITS 全长为 637~646 bp, 其中的 5.8 S 序列最为保守, 长度和碱基组成完全一致; ITS1 与 ITS2 均存在一定的变异, 它们的长度分别为 255~257 bp 和 226~232 bp, 序列中出现大量插入/缺失和转换/颠换现象, ITS1、ITS2 的可变位点和简约信息位点数分别为 46/30 和 14/9。系统发育分析结果表明, 8 种细辛属植物在进化树上可分为 4 组, 与传统分类结果完全一致, I~IV 分别对应细辛组、华细辛组、长花组和杜衡组。结论 8 种细辛属植物 ITS 序列具有丰富的信息位点, 可用于这些植物的分子鉴定。

关键词: 细辛属; rDNA; ITS 序列; 克隆; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2937-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.022

Cloning and sequence analysis of rDNA ITS from plants in genus *Asarum* L.

JIANG Ming^{1,4}, WU Dan², LI Rong-rong³, ZHANG Hui-juan⁴, HE Cai-ming⁴

1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation in Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

2. Department of Orthopedics, Hangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China

3. College of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

4. College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

Abstract: Objective To clone and analyze ITS sequences of eight *Asarum* L. medical plants, and to provide evidence for both molecular identification and genetic diversity studies. **Methods** PCR amplifications were performed with genomic DNA as templates to isolate ITS sequences, and sequence comparisons as well as phylogenetic tree construction were conducted by bioinformatics software. **Results** Sequencing results indicated that the full ITS sequences of eight *Asarum* plants ranged from 637 to 646 bp in length, and 5.8 S sequence was highly conserved with identical sequence length and nucleotide composition. However, sequence variations were observed in ITS1 and ITS2, their sequences were 255—257 bp and 226—232 bp in length, respectively. Insertion/deletion and conversion/transition events were occurred frequently in ITS1 and ITS2 sequences, with variable sites of 46 and 30 and parsimony informative sites of 14 and 9, respectively. Results of the phylogenetic analysis indicated that the eight plants grouped to four different clades, which were completely coincide with traditional plant taxonomy. Groups of I—IV corresponded to section *Asarum* L., *Asiasarum* L., *Longiflora* L., and *Heterotropa* (Nakai) Hara, respectively. **Conclusion** ITS sequences of eight *Asarum* plants were rich in informative sites, which could be applied as molecular marker to identify these species.

Key words: *Asarum* L.; rDNA; ITS sequence; cloning; molecular identification

细辛属 *Asarum* L. 植物隶属马兜铃科 有 90 个种, 主要分布于亚洲东部和南部, 我国有 (Aristolochiaceae), 为多年生草本植物, 全世界约 30 种、4 变种和 1 变型^[1]。细辛属植物常具肉质须

收稿日期: 2016-09-28

基金项目: 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室植物进化生态学人才培养项目 (2014)

作者简介: 蒋明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学及其分子调控。E-mail: jiangming1973@139.com

根, 有芳香和辛辣味, 该属植物含甲基丁香酚 (methyl Eugenol)、黄樟醚 (safrole)、沉香醇 (linalool)、呋喃双叶细辛酮 (furano-caulesone)、马兜铃酸 (aristolochic acid)、细辛脂素 (asarinin)、芝麻脂素 (sesamin) 和卡枯醇 (safrol) 等成分, 大部分种类具有一定的药用价值^[1-4]。细辛属植物具有祛寒止咳、祛风止痛和温肺化饮等功效, 用于治疗风寒感冒、关节疼痛、跌打损伤和毒蛇咬伤等^[2]。近年来, 科研人员在细辛属植物药理作用^[5-6]、成分分析^[4,7]、形态发生^[8]、种子生理^[9]和组培快繁^[10]等方面进行了一系列的研究。

药用植物品质的形成与遗传因素及环境因子相关, 来自同属的不同种药用植物其成分不尽相同, 甚至不同产地的同一种植物, 其化学成分及功效也存在差异^[11-12]。市场上细辛属药用植物经常混用, 如杜衡 *A. forbesii* Maxim.、大花细辛 *A. macranthum* Hook. f.、单叶细辛 *A. himalaicum* Hook. f. et Thomson ex Klotzsch.、双叶细辛 *A. caulescens* Maxim.、长花细辛 *A. longiflorum* C. Y. Cheng et C. S. Yang 均作细辛使用; 另外, 市场上存在大量的混淆品, 常见的有徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa、白薇 *Cynanchum atratum* Bunge、娃儿藤 *Tylophora ovata* (Lindl.) Hook. ex Steud. 和獐耳细辛 *Hepatica nobilis* var. *asiatica* (Nakai) Hara 等^[13-14]。与传统的药材鉴定方法相比, 分子标记因具有操作简便、稳定性好和重复性高等优点, 现已广泛应用于中药材的鉴定^[15]。本研究以 8 种细辛属药用植物为材料, 在克隆核糖体 DNA 内转录间隔区 (ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA ITS) 的基础上, 对它们进行序列分析和比对, 为该属植物的分子鉴定和遗传多样性研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

细辛 *A. sieboldii* Miq.、长毛细辛 *A. pulchellum* Hemsl.、杜衡 *A. forbesii* Maxim.、祁阳细辛 *A. magnificum* Tsiang ex C. Y. Cheng et C. S. Yang、五岭细辛 *A. wulingense* C. F. Liang、马蹄细辛 *A. ichangense* Hemsl. 和尾花细辛 *A. caudigerum* Hance 采自浙江, 双叶细辛 *A. caulescens* Maxim. 采自贵州, 均由台州学院陈彤高级实验师鉴定 (表 1)。每种植物选 5 个单株, 分别采集健康、完整的叶片, 置于装有干燥硅胶的取样袋, 带回实验室后用于基因组 DNA 的提取。

表 1 细辛属植物来源

Table 1 Sources of *Asarum* L. plants

| 植物名称 | 采集地 | 海拔/m | 组别 |
|------|-----|-------|------|
| 细辛 | 临安 | 1 281 | 华细辛组 |
| 长毛细辛 | 江山 | 813 | 细辛组 |
| 杜衡 | 嵊州 | 649 | 杜衡组 |
| 双叶细辛 | 桐梓 | 1 386 | 细辛组 |
| 祁阳细辛 | 江山 | 437 | 长花组 |
| 五岭细辛 | 开化 | 1 189 | 杜衡组 |
| 马蹄细辛 | 临海 | 365 | 杜衡组 |
| 尾花细辛 | 仙居 | 643 | 细辛组 |

1.2 仪器

伯乐 C1000 型 PCR 仪; 伯乐 Gel Doc XR⁺凝胶成像系统; 六一 DYY-12 型电泳仪和电泳槽; SANYO MDF-382E 型超低温冰箱; 艾本德 Eppendorf 移液枪; BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机; 恒温培养箱; 恒温摇床。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

40 份细辛属植物样品的基因组 DNA 采用试剂盒法提取, 基因组 DNA 小量抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司 (碧云天), 实验操作根据其提供的说明书进行。基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 ITS 序列的克隆

细辛属植物 ITS 序列的克隆采用 PCR 法, 所用上下游引物分别为 ITSUP: 5'-AGAAGTCGTAACA-AGGTTTCCGTAGG-3' 和 ITSDN: 5'-GGAAGTAA-AAGTCGTAACAAGG-3', 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 配成 20 μmol/L 备用。反应体系为 25 μL, 分别加入 2.5 μL 10×PCR 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺)、0.4 μL 2 U/μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、50 ng 各植物的基因组 DNA 和 0.45 μL dNTPs (GenView), 最后加入无菌 ddH₂O 至终体积。PCR 扩增程序为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 56.5 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 75 s, 32 次循环后于 72 °C 最后延伸 10 min。

2.3 PCR 产物的回收和测序

取 20 μL PCR 产物用于琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下用刀片割取目的胶块。DNA 片段的回收和纯化采用 DNA 凝胶回收试剂盒 (碧云天), 操作根据其提供的说明书进行。分别取 2 μL 纯化 DNA, 与 p-GEM T-easy 载体连接, 置于 4 °C 冰箱中放置

10 h 以完成反应；连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞（北京全式金生物技术有限公司），经菌液 PCR 验证后，各取 3 份阳性菌液测序。菌液 PCR 体系与 ITS 序列的克隆相同，模板改成等量的菌液。

2.4 序列分析

去除 ITS1-ITS2 两侧的无关序列后，用 ClustalX 1.81 软件进行多重比对，参数设置为默认；系统发育树的构建用 MEGA 7.0 软件，建树方法为邻接法（neighbor joining, NJ），自举检测次数为 1 000。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列的克隆

以 8 种细辛属植物的 40 份基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，经电泳、割胶、回收、转化和测序，得到各自的 ITS 序列。结果表明，同一物

种 5 株植株的 ITS 序列完全一致，而不同种细辛属植物间存在一定的差异（表 2）。从表 2 可知，8 种细辛属植物的 ITS 全长（ITS1+5.8 S+ITS2）范围为 637~646 bp，其中，五岭细辛和马蹄细辛的 ITS 最短，细辛次之，为 638 bp，而尾花细辛的 ITS 序列最长。

3.2 ITS1 序列的比较分析

与 ITS1 和 ITS2 相比，5.8 S 的序列长度最为保守，均为 157 bp，序列组成也完全一致，8 条序列的 GC 值均为 52.2%。ITS1 的长度变化较小，其中，尾花细辛的序列最长，为 257 bp，杜衡次之，为 256 bp，其余物种的 ITS1 长度均为 255 bp。ITS1 的 GC 值变异范围分别为 45.9%~52.5%，其中，祁阳细辛的 GC 值最大，杜衡和细辛次之，分别为 52.3%和 52.2%（表 2）。

表 2 细辛属植物 ITS 序列的长度及 GC 量

Table 2 Sequence length and GC contents of ITS from *Asarum L.* plants

| 植物名称 | ITS 长度/bp | 5.8 S | | ITS1 | | ITS2 | |
|------|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | | 长度/bp | GC/% | 长度/bp | GC/% | 长度/bp | GC/% |
| 细辛 | 638 | 157 | 52.2 | 255 | 52.2 | 226 | 52.2 |
| 长毛细辛 | 644 | 157 | 52.2 | 255 | 47.5 | 232 | 49.6 |
| 杜衡 | 639 | 157 | 52.2 | 256 | 52.3 | 226 | 55.3 |
| 双叶细辛 | 644 | 157 | 52.2 | 255 | 48.2 | 232 | 49.6 |
| 祁阳细辛 | 640 | 157 | 52.2 | 255 | 52.5 | 228 | 52.2 |
| 五岭细辛 | 637 | 157 | 52.2 | 255 | 50.2 | 225 | 52.4 |
| 马蹄细辛 | 637 | 157 | 52.2 | 255 | 50.6 | 225 | 53.3 |
| 尾花细辛 | 646 | 157 | 52.2 | 257 | 45.9 | 232 | 49.6 |

序列比对结果发现，ITS1 中存在大量插入/缺失和转换/颠换现象，可变位点和简约信息位点数分别为 46 和 14。+1~+46 位十分保守，8 种植物的序列完全一致；+47、+51、+60、+81、+87、+96、+100、+112、+149、+150、+155、+185、+202、+204、+219、+222、+226、+237 和+240 等位点发生 T \leftrightarrow C 转换；+66、+69、+75、+85、+90、+107、+123、+138、+140、+144、+156、+158、+201、+209、+213、+228、+239、+242 和+247 位发生 A \leftrightarrow G 转换；与转换相比，颠换现象相对较少，+64 和+176 位发生 A \leftrightarrow C 颠换，+145 和+205 发生 G \leftrightarrow T 颠换，+254 位发生 1 次 A \leftrightarrow T 颠换。另有少量插入/缺失现象，+113~+114 处发生 1 次 TT 插入/缺失现象，+206 位发生 T 碱基插入/缺失现象（图 1）。

3.3 ITS2 序列的比较分析

ITS2 的可变位点数为 30，简约信息位点数 9，均少于 ITS1 序列。与 ITS1 相对，ITS2 序列长度变

异相对较大，范围为 225~232 bp，其中，长毛细辛、双叶细辛和尾花细辛的 ITS2 最长，祁阳细辛次之，为 228 bp，而五岭细辛和马蹄细辛的最短。ITS2 的 GC 值变异范围为 49.6%~55.3%，杜衡的 GC 值最大，其次为马蹄细辛和五岭细辛，GC 值分别为 53.3%和 52.4%，而长毛细辛、双叶细辛和尾花细辛的 GC 值最小，均为 49.6%（表 2）。

与 ITS1 相似，ITS2 中的转换现象也十分常见，如+45、+83、+101、+109、+112、+119、+112、+128、+146、+149、+155、+162、+175、+181、+191、+203、+228 和+232 位发生 T \leftrightarrow C 转换；+9、+20、+26、+115、+120、+150、+179 发生 A \leftrightarrow G 转换。与 ITS1 相比，ITS2 序列中的颠换相对较多，如+78、+93 和+212 发生 A \leftrightarrow C 颠换，+108、+180 和+193 位有 3 次 A \leftrightarrow T 颠换，另有 1 次 G \leftrightarrow T 颠换，位于+57 处。与 ITS1 相比，8 种细辛属植物 ITS2 的插入/缺失事件相对频繁，在+31~+39

有 1 次 AATAGAAGT 插入/缺失现象; +50、+153 和+194 位各有 1 次 A 碱基插入/缺失; 在+79 位与+151~+152 位各发生 1 次 C 碱基与 TT 插入/缺失 (图 2)。

3.4 系统发育分析

将 8 种细辛属植物的 ITS 序列用 Clustal X 程序对齐后, 利用 MEGA 7.0 构建系统发育树 (图 3)。结果表明, 8 种细辛属植物可分为 4 组, 细辛组的

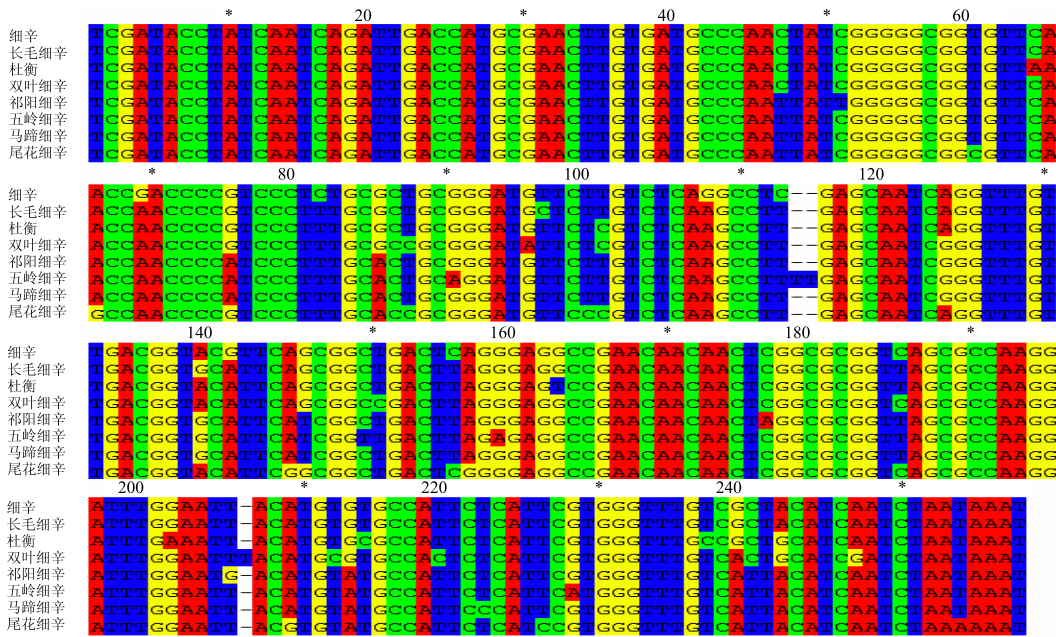


图 1 细辛属 8 种药用植物的 ITS1 序列

Fig. 1 ITS1 sequences of eight medical plants in *Asarum* L.

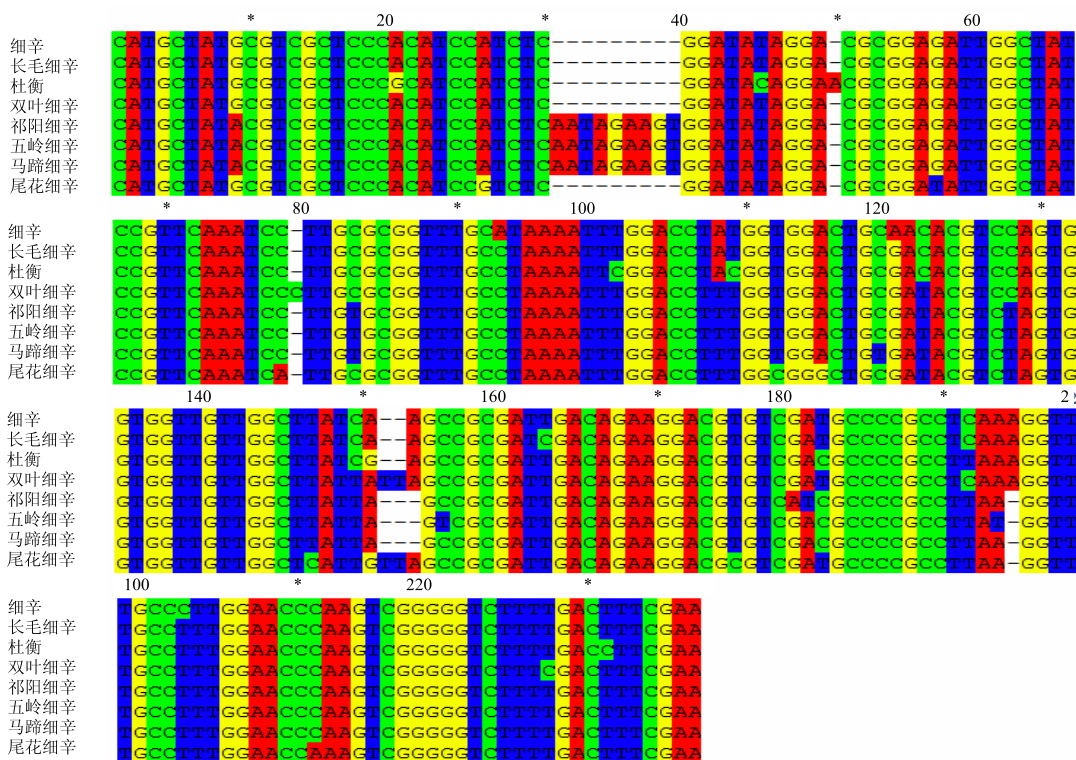


图 2 细辛属 8 种药用植物的 ITS2 序列

Fig. 2 ITS2 sequences of eight medical plants in *Asarum* L.

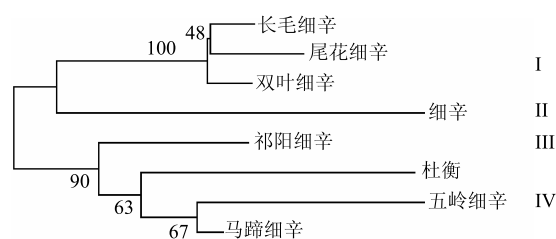


图 3 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on ITS sequences

长毛细辛、双叶细辛和尾花细辛聚于组 I，杜衡组的杜衡、五岭细辛和马蹄细辛聚为组 IV，而华细辛组细辛与长花组的祁阳细辛各自单独成组，分别归属于组 II 和组 III。

4 讨论

性状鉴别、显微鉴定、红外指纹图谱和薄层色谱等是中药材鉴定的常用方法。曹建华^[13]利用性状鉴别法对正品细辛和混淆品进行鉴定，根据根部特征、根皮分离难易和特殊气味等，将细辛与伪品徐长卿及金粟兰科药材区分开。林君清^[14]利用性状鉴别和显微鉴定将北细辛、华细辛、杜衡、汉城细辛、西南细辛及徐长卿等加以区别。但对于多来源药材、粉末药材和中成药的鉴定有一定的困难^[16]。但采用分子标记技术，可实现对原植物、细胞、组织、饮片或粉末药材的准确、快速鉴定^[17]。ITS 是位于 18 S、5.8 S 和 26 S 之间的序列，它们在进化过程中所受的选择压力较小，因此进化速度快、变异丰富，另外，ITS 序列长度适中，易于 PCR 扩增，近年来在植物分子鉴定中得到了广泛应用^[18]。彭禄等^[19]对独活属 *Heracleum* L. 17 个种进行分子鉴定，发现除牛尾独活类 3 个样本外，其他均可利用 ITS 序列鉴定到种。阎梦颖等^[20]利用 rDNA ITS 对当归属 *Angelica* L. 32 个物种进行鉴别，结果表明 ITS 可用作该属药用植物的分子条码。本研究以细辛属药用植物为材料，在克隆全长 ITS 的基础上，对序列进行了比对和分析，结果表明，ITS 具有丰富的信息位点，可用于该属植物的分子鉴定。

5.8 S 序列的长度和组成通常十分保守，如李喜凤等^[21]克隆了蒲公英属 *Taraxacum* F. H. Wigg. 药用植物的 ITS 序列，发现这些植物的 5.8 S 长度完全相同，均为 162 bp，序列比对未见变异位点；赵国平等^[22]对当归属 *Angelica* L. 药用植物的 ITS 进行研究，发现 5.8 S 的序列长度均为 165 bp，而且

碱基组成完全一致。蒋继宏等^[23]发现苏皖产大戟属 *Euphorbia* Linn. 6 种植物的 5.8 S 序列长度存在 1 个碱基的差别，除斑地锦 *E. maculata* L. 为 163 bp 外，其余植物的 5.8 S 长度均为 164 bp。本研究 8 种细辛属植物的 5.8 S 序列十分保守，长度均为 157 bp，较前述的蒲公英属、当归属和地锦属短。ITS2 通常被认为是物种鉴定的标准分子条形码，因长度短、变异快，并能提供丰富的信息位点，已广泛用于药用植物的鉴定、系统发育和分类研究。高婷等^[24]以辽藁本 *Ligusticum jeholense* Nakai et Kitagawa 和细叶藁本 *L. tenuissimum* (Nakai) Kitagawa 等为材料，证实 ITS2 是藁本药材鉴定的有效分子标记。李栎等^[25]以 25 种海南产大戟科 (*Euphorbiaceae*) 药用植物为材料，用 PCR 克隆到各自的 ITS2 序列，结果表明，ITS2 的信息位点丰富，可用于这些植物的分子鉴定。本研究中，8 种细辛属药用植物的 ITS2 存在大量的插入/缺失和转换/颠换现象，其中的插入/缺失与颠换的发生较为频繁，但信息位点数少于 ITS1。

本研究在克隆 8 种细辛属药用植物 ITS 序列的基础上，利用生物信息学方法对序列进行了分析，结果表明，ITS1 和 ITS2 序列中存在大量插入/缺失和转换/颠换现象，信息位点丰富，可将 8 种植物完全区分开，实验结果为细辛属植物的分子鉴定及遗传多样性研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 24 卷) [M]. 北京: 科学技术出版社, 1988.
- [2] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志 (第 2 卷) [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992.
- [3] 宋双红, 色林格, 陈 蓓, 等. HPLC 法测定 4 种细辛中马兜铃酸 I 和细辛脂素 [J]. 中成药, 2014, 36(8): 1711-1715.
- [4] 张 磊, 陈晓辉, 刘玉磊, 等. RP-HPLC 法同时测定辽细辛中 L-细辛脂素、L-芝麻脂素和卡枯醇 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1098-1100.
- [5] Park H J, Lim E J, Zhao R J, et al. Effect of the fragrance inhalation of essential oil from *Asarum heterotropoides* on depression-like behaviors in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 43.
- [6] 明海霞, 陈彦文, 王 强, 等. 单叶细辛对家兔心肌的急性毒性作用 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1337-1339.
- [7] 李 伟, 韩建平, 高 钧, 等. 液相色谱-电喷雾质谱联用测定细辛及养血清脑颗粒中马兜铃酸 A [J]. 分析化

- 学, 2007, 35(12): 1798-1800.
- [8] 史全芬, 孟爱平, 楚海家, 等. 青城细辛的花器官发生 [J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(4): 345-350.
- [9] 马琳, 王志清, 张秀莲, 等. 北细辛种子储藏过程中储藏物质变化的研究 [J]. 种子, 2015, 34(12): 1-8.
- [10] 成智博, 钱昱臻, 曲艺姣, 等. 汉城细辛试管苗繁殖的研究 [J]. 河南科学, 2013, 31(9): 1369-1371.
- [11] 曹海禄, 曹国番, 魏建和, 等. 遗传和环境因子对药用植物品质的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 785-788.
- [12] 郭巧生, 汪涛, 程俐陶, 等. 不同栽培类型药用菊花黄酮类成分比较分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 37(7): 756-759.
- [13] 曹建华. 细辛及其混淆品种的鉴别 [J]. 医药前沿, 2013, 3(16): 302-303.
- [14] 林君清. 细辛药材与易混品的鉴别 [J]. 海峡药学, 2006, 18(6): 69-70.
- [15] 罗洪斌, 商楠. 道地药材分子标记的研究进展 [J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2014, 31(3): 73-76.
- [16] 黄璐琦, 唐仕欢, 李军德, 等. 动物药材分子鉴定研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 234-236.
- [17] 孙稚颖, 张永清. 基于 DNA 条形码的藤类药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(5): 2005-2009.
- [18] Alvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 417-434.
- [19] 彭禄, 余岩, 王志新, 等. 基于 ITS 序列对独活 17 个种的分子鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1648-1653.
- [20] 阎梦颖, 房敏峰, 祝娟, 等. 基于 ITS 条形码标记对当归属药用植物的鉴别 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 974-981.
- [21] 李喜凤, 杜云锋, 张红梅, 等. 蒲公英属植物 rDNA ITS 序列测定及分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 714-715.
- [22] 赵国平, 新关稔, 石川隆二, 等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076.
- [23] 蒋继宏, 孟娜, 曹小迎, 等. 苏皖产大戟属药用植物 rDNA 的 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 900-902.
- [24] 高婷, 姚辉, 陈士林. 基于 ITS2 序列的藁本与常见混伪品的分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 418-423.
- [25] 李栎, 徐腊红, 唐历波. ITS2 条形码序列对海南大戟科植物的鉴定 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1572-1577.