

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.004

黄琼林, 梁凌玲, 何瑞, 等. 应用 *matK* 基因鉴别青天葵及其常见混伪品[J]. 广西植物, 2014, 34(3): 299-303Huang QL, Liang LL, He R, et al. Apply *matK* gene to identify *Nervilia fordii* and its common adulterants[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3): 299-303

应用 *matK* 基因鉴别青天葵及其常见混伪品

黄琼林, 梁凌玲, 何 瑞, 詹若挺, 陈蔚文*

(广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心 岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006)

摘 要: 分析了青天葵及其混伪品 *matK* 序列, 以期在分子水平建立青天葵及其常见混伪品的鉴别方法。采用一对通用引物对 *matK* 基因进行 PCR 扩增并测序, 所得序列用 DNAMAN、MEGA 等软件进行分析。获得青天葵及其混伪品的 *matK* 基因序列长度为 587 bp, 平均 GC 含量为 32.8%。青天葵的种内遗传距离为 0, 与混伪品种间遗传距离范围为 0.016~0.375。基于 *matK* 基因序列构建的 NJ 聚类树能明显地区别青天葵及其混伪品。因此, 应用 *matK* 基因序列可以有效鉴别青天葵及其混伪品。

关键词: 青天葵; *matK* 基因; 混伪品

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)03-0299-05

Apply *matK* gene to identify *Nervilia fordii* and its common adulterants

HUANG Qiong-Lin, LIANG Ling-Ling, HE Rui,
ZHAN Ruo-Ting, CHEN Wei-Wen*

(Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to establish the novel method on distinguishing *Nervilia fordii* and its common adulterants, *matK* genes from *N. fordii* and its adulterants were amplified and sequenced using a pair of universal primers. The results revealed that *matK* genes acquired from *N. fordii* and its adulterants contained 587 base pairs, and average GC content was 32.8%. The intraspecific distances among *N. fordii* were 0, whereas the interspecific distance between *N. fordii* and its adulterants ranged from 0.016 to 0.375. The clustering tree according to Neighbor Joining method and Kimura 2-Parameter model discriminated *N. fordii* and its adulterants obviously. *matK* gene is suggested to be an effective biomarker to identify *N. fordii* and its common adulterants.

Key words: *Nervilia fordii*; *matK* gene; adulterant

青天葵为岭南地区地道药材, 主产地为广西、广东, 来源于兰科植物毛唇芋兰 (*Nervilia fordii*) 的全草或叶片, 具有镇咳平喘、抗肿瘤、增强免疫、抗菌等作用。临床上主要用于治疗肺部疾病, 尤其是在治疗百日咳等小儿呼吸道疾病等方面具有良好效

果。青天葵野生资源由于过度开采, 加上其自身繁殖条件苛刻, 现已面临枯竭(陈蔚文, 2010)。由于资源短缺, 市场上屡见青天葵的伪品或掺假品, 常见的有同属植物毛叶芋兰 (*N. plicata*)、车前科车前草 (*Plantago asiatica*)、伞形科积雪草 (*Centella asia-*

收稿日期: 2013-08-28 修回日期: 2013-11-08

基金项目: 教育部博士点基金(200805720004); 教育部留学回国人员科研项目(教外司留[2009]1001)。

作者简介: 黄琼林(1986-), 男, 广东湛江人, 博士, 主要从事创新中药研究与开发工作, (E-mail)perfecthql@163.com。

*通讯作者: 陈蔚文, 博士, 教授, 主要从事创新中药研究与开发工作, (E-mail)chenww@gzucm.edu.cn。

tiaca)、旋花科红薯叶 (*Ipomoea batatas*) 等(梅全喜,2008)。青天葵也因叶片大小被分为三个类型,即大叶型、中叶型和小叶型(杜勤等,2009)。混伪品的化学成分和功效多与青天葵存在差异,它们的存在严重影响了青天葵的临床安全和用药质量。因此,青天葵的真伪鉴别是其合理用药和资源保护的首要前提。

传统青天葵及其混伪品鉴别方法,如性状鉴别、显微鉴别等(广东省药材公司,1998;乐凡,2006),容易受到植物生长发育阶段、生长环境及加工条件等诸因素影响,主观性强,重复性和稳定性差,而且需要具有专业知识的人员进行。杜勤等(2009)利用 RAPD 分子标记揭示了青天葵及其常见混伪品在 DNA 基因组上的差异,然而 RAPD 是基于 PCR 和随机引物扩增的方法,虽然避免了传统鉴定方法的主观误差,但其操作复杂,重复性和稳定性也较差。

近年来,DNA 条形码在中药品种鉴别方面应用广泛,*matK* 基因已被认为是植物 DNA 条形码有效的候选片段之一,广泛应用于中药的真伪鉴别、系统发育探讨和亲缘关系分析(滕艳芬等,2002;王亚玲等,2006;马剑等,2010)。目前,应用 *matK* 基因快速鉴别青天葵及其混伪品未见有报道。为此,本文针对 3 种不同叶型青天葵以及 4 种常见混伪品 *matK* 基因序列进行分析和鉴定,为青天葵的真伪鉴别和临床用药提供分子依据。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

实验材料及 Genbank 下载序列见表 1。采集供试植物的叶片,置硅胶中保存,经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定。

1.2 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技公司;PCR 试剂、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Markers 购自大连宝生物工程公司;引物合成和测序由北京六合华大基因科技股份有限公司广州分公司完成。

1.3 DNA 提取

取硅胶保存的干燥叶片约 0.05 g,用蒸馏水清洗表面并擦拭干净,采用植物基因组总 DNA 提取试剂盒提取供试植物 DNA。将 DNA 溶液稀释至浓度为 25 ng/ μ L,分装并置-20 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 样品信息及 Genbank 登记号

Table 1 The collected information and Genbank accession numbers of the samples

| 物种 | 类型 | 来源 | Genbank 登记号 |
|--------------------------|-------------|--|-------------|
| 青天葵 | 大叶 | 本实验室培育 | JX629275- |
| <i>Nervilia fordii</i> | Big-leaf | Cultivated in our lab | JX629277 |
| 青天葵 | 中叶 | 本实验室培育 | JX629278- |
| <i>N. fordii</i> | Middle-leaf | Cultivated in our lab | JX629279 |
| 青天葵 | 小叶 | 本实验室培育 | JX629280- |
| <i>N. fordii</i> | Small-leaf | Cultivated in our lab | JX629281 |
| 毛叶芋兰 | | Genbank | JN004511- |
| <i>N. plicata</i> | | | JN004512 |
| 车前草 | | 广州中医药大学药王山 | JX629282 |
| <i>Plantago asiatica</i> | | Medicinal mountain, Guangzhou University of Chinese Medicine | |
| 车前草 | | 广东省平远县 | JX629283 |
| <i>P. asiatica</i> | | Pingyuan, Guangdong | |
| 积雪草 | | 广州中医药大学药王山 | JX629284 |
| <i>Centella asiatica</i> | | Medicinal mountain, Guangzhou University of Chinese Medicine | |
| 积雪草 | | 广东省平远县 | JX629285 |
| <i>C. asiatica</i> | | Pingyuan, Guangdong | |
| 红薯叶 | | 广州中医药大学药王山 | JX629286 |
| <i>Ipomoea batatas</i> | | Medicinal mountain, Guangzhou University of Chinese Medicine | |
| 红薯叶 | | 广州大学城 | JX629287 |
| <i>I. batatas</i> | | Higher Education Mega Center, Guangzhou | |

1.4 PCR 扩增和测序

PCR 扩增的正向引物为 M3F (5'-CGTACAG-TACTTTTGTGTTTACGAG-3'),反向引物为 M1R (5'-ACCCATGCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3')(Hollingsworth *et al.*,2009)。

PCR 反应体系:总体积为 100 μ L,其中 10 \times *Ex Taq* buffer 10 μ L、dNTP(10 mmol/L)6.0 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L、模板 DNA 3.0 μ L、*Ex Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)1.0 μ L,用灭菌蒸馏水补足体积。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 0.5 min,52 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 1.0 min,33 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送样纯化及双向测序。

1.5 序列分析

采用 DNAMAN 和 Omega 2.0 进行序列拼接校对,去除序列两端的低质量区,并利用 CLUSTALX 1.83 进行多重比对。将获得的条形码片段序列进行 Blastn(Nucleotide Blast)比对确认后,采用 Bankit 软件提交至 Genbank。采用 CLUSTALX 软件比对序列,基于 Kimura 2-Parameter 双参数模型和 Neighbor-Joining 邻接法,运用 MEGA4.0 分析遗传距离并构建系统发育树(1 000 次重复 bootstrap 检验各分支的支持率)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

青天葵及其混伪品 *matK* 基因的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,得到的条带约 800 bp (图 1)。13 个供试样品的 PCR 产物纯化后,均获得质量可靠的序列。采用 Bankit 向 Gnebank 提交序列,获得的序列登记号见表 1。

2.2 序列分析

获得青天葵及其混伪品 *matK* 序列的长度为 587 bp,平均 GC 含量为 32.8%。不同叶型青天葵样品 *matK* 基因序列完全一致。青天葵与同属的毛叶芋兰有 9 处差异位点,与其他混伪品之间的变异较大,序列比对结果如图 2 所示。

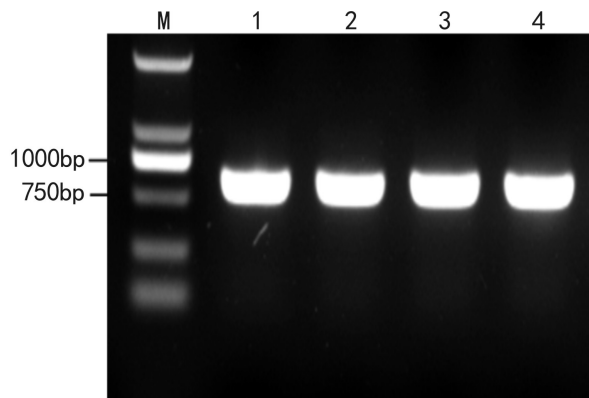


图 1 青天葵及其常见混伪品 *matK* 基因电泳图
M. DL 2 000 标记; 1. 青天葵; 2. 车前草; 3. 积雪草; 4. 番薯叶。

Fig. 1 Electrophoretogram of *matK* gene from *Nervilia fordii* and its common adulterants M. DL 2 000 markers; 1. *Nervilia fordii*; 2. *Plantago asiatica*; 3. *Centella asiatica*; 4. *Ipomoea batatas*.

表 2 青天葵及其混伪品的 K2P 遗传距离

Table 2 The K2P genetic distances of *Nervilia fordii* and its common adulterants

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 <i>Nervilia fordii</i> JX629275 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 <i>N. fordii</i> JX629276 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 <i>N. fordii</i> JX629277 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 <i>N. fordii</i> JX629278 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | | |
| 5 <i>N. fordii</i> JX629279 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | | |
| 6 <i>N. fordii</i> JX629280 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | | |
| 7 <i>N. fordii</i> JX135581 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | | | | | | | | |
| 8 <i>N. plicata</i> JN004511 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | | | | | | | | |
| 9 <i>N. plicata</i> JN004512 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | | | | | | | |
| 10 <i>Plantago asiatica</i> JX135582 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.369 | 0.369 | | | | | | |
| 11 <i>P. asiatica</i> JX135583 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.375 | 0.369 | 0.369 | 0.000 | | | | | |
| 12 <i>Centella asiatica</i> JX135584 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.304 | 0.304 | 0.243 | 0.243 | | | | |
| 13 <i>C. asiatica</i> JX135585 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.309 | 0.304 | 0.304 | 0.243 | 0.243 | 0.000 | | | |
| 14 <i>Ipomoea batatas</i> JX135586 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.327 | 0.327 | 0.283 | 0.283 | 0.249 | 0.249 | | |
| 15 <i>I. batatas</i> JX135587 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.333 | 0.327 | 0.327 | 0.283 | 0.283 | 0.249 | 0.249 | 0.000 | |

2.3 遗传距离计算

根据 Kimura-2 Parameter 遗传距离模型计算得到的序列间的遗传距离见表 2。青天葵的种内遗传距离为 0;在种间,与毛叶芋兰的遗传距离最小(0.016),与车前草的遗传距离最大(0.375)。

2.4 聚类分析

从 NJ 树上可以看出,所有样品聚成两大支,青天葵的 7 个样品先单独聚成一支,再与同属的毛叶芋兰形成一大支,其它混伪品聚成另外一支。聚类树直观地将青天葵及其常见混伪品鉴别开来,而且展开支持率在 98% 以上,结果可靠。

3 讨论与结论

DNA 条形码是指利用一段短的 DNA 标准序列实现快速、准确的物种鉴别 (Hebert *et al.*, 2005),其常用片段主要位于叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA) 和核糖体 DNA 转录间隔区 (nuclear ribosomal DNA internal transcribed space, nrITS)。*matK* 是叶绿体基因蛋白编码区中进化最快的基因之一,编码成熟酶(maturase)K,其进化速率为 *rbcL* 的 2~3 倍,具有丰富的碱基替换、非同义

```

[ 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1222222222 ]
[ 1112222 3333344444 4556666688 8899999999 0000011222 2222333344 4455666777 7888889999 9001111122 ]
[ 4692590289 0567813678 9271234556 7801234569 0348909134 5689258912 4758289246 9017893567 8170124934 ]
Nervilia_fordii_JX629275 CTTAGTCTAG ATATCCGGTC TCGACACATA TCTATAGTAG TTGTTCTCGA GGTCAGCCCA ATCTATGCAT AAGGCATGGT TAGTCTAGAA
Nervilia_fordii_JX629276 .....
Nervilia_fordii_JX629281 .....
Nervilia_fordii_JX629277 .....
Nervilia_fordii_JX629278 .....
Nervilia_fordii_JX629279 .....
Nervilia_fordii_JX629280 .....
Nervilia_plicata_JN004511 ..... A ..... A .....
Nervilia_plicata_JN004512 ..... A ..... A .....
Plantago_asiatica_JX629282 TA. CA. . CCA . C. . T. . T C. A. TCT. . G . . GGGGAGCC CCTGGTG. . G T. A. T. GG. C . A. GG. . A. A . . ATGCC. . C . . GTCCT. .
Plantago_asiatica_JX629283 TA. CA. . CCA . C. . T. . T C. A. TCT. . G . . GGGGAGCC CCTGGTG. . G T. A. T. GG. C . A. GG. . A. A . . ATGCC. . C . . GTCCT. .
Centella_asiatica_JX629284 TCCCA. . CC. CC. . . AAC. C. AGT. T. C. . . GG. . A. C . GCGG. . AG TCAT. . ATG. G. . . GC. AGA . . . T. . CCAC A. . G. CC. .
Centella_asiatica_JX629285 TCCCA. . CC. CC. . . AAC. C. AGT. T. C. . . GG. . A. C . GCGG. . AG TCAT. . ATG. G. . . GC. AGA . . . T. . CCAC A. . G. CC. .
Ipomoea_batatas_JX629286 . C. CACTCC. . CCAGT. . C. CTA. ACAT. G CT. G. . AA. C . GCGGA. A. G CAA. . TG. . . G. TCG. TAGA GG. T. . C. C . TAG. . C. TC
Ipomoea_batatas_JX629287 . C. CACTCC. . CCAGT. . C. CTA. ACAT. G CT. G. . AA. C . GCGGA. A. G CAA. . TG. . . G. TCG. TAGA GG. T. . C. C . TAG. . C. TC
[ 2222222222 2222222222 2222222222 2233333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3344444444 ]
[ 2333334444 5666666777 7788888899 9900001111 1112222222 3333444455 5555555666 6666677778 9900011111 ]
[ 5234680168 2012389013 8923567814 5623570124 5690124567 1269028901 2345679023 4568935674 0605602346 ]
Nervilia_fordii_JX629275 GAAACCTCGA TTTACACTT CTACTTATGC CAAGATCCCA CTTCTTCTCT TTGTTTGTG ATA AAAAATAT TTGTA AAAAG GAAAACCTGC
Nervilia_fordii_JX629276 .....
Nervilia_fordii_JX629281 .....
Nervilia_fordii_JX629277 .....
Nervilia_fordii_JX629278 .....
Nervilia_fordii_JX629279 .....
Nervilia_fordii_JX629280 .....
Nervilia_plicata_JN004511 . . C. . . . . T. . . . . C. . . . . A C. . . . .
Nervilia_plicata_JN004512 . . C. . . . . T. . . . . C. . . . . A C. . . . .
Plantago_asiatica_JX629282 T. . . GT. . CC . GGC. TC. CC T. T. ACGA. T TC. TC. TA. . . CCTCCTGAA GCCCC. C. CC CG. . TG. . C. GCA. GCG. GT A. CC. AGCTT
Plantago_asiatica_JX629283 T. . . GT. . CC . GGC. TC. CC T. T. ACGA. T TC. TC. TA. . . CCTCCTGAA GCCCC. C. CC CG. . TG. . C. GCA. GCG. GT A. CC. AGCTT
Centella_asiatica_JX629284 AGT. ATCTT. AG. C. T. . CG . . . . GAGA. . TG. C. . T. T. . . GC. GAC C. C. CA. . CA CGGCT. . CC. . CA. GCCGG. A. CTGAACCT
Centella_asiatica_JX629285 AGT. ATCTT. AG. C. T. . CG . . . . GAGA. . TG. C. . T. T. . . GC. GAC C. C. CA. . CA CGGCT. . CC. . CA. GCCGG. A. CTGAACCT
Ipomoea_batatas_JX629286 T. . CAT. TC. . G. . CTGT. G TCTA. G. AA. T. GT. CT. . G . C. . CCTGAC A. C. C. A. T CC. CT. CCCC . CACGGC. G. . TT. . AGCTT
Ipomoea_batatas_JX629287 T. . CAT. TC. . G. . CTGT. G TCTA. G. AA. T. GT. CT. . G . C. . CCTGAC A. C. C. A. T CC. CT. CCCC . CACGGC. G. . TT. . AGCTT
[ 4444444444 4444444444 4444444444 4445555555 5555555555 5555555555 55 ]
[ 2222333333 4444555555 6667788889 9990001111 1223334444 4555666677 88 ]
[ 0346235678 1278134789 5684556790 2561340124 6021784567 9268016748 16 ]
Nervilia_fordii_JX629275 TATACAAGCC AGTTCTAGGA GTATCCTGAT GTCCTTACCA CACGTGCTTG TATTGGGTCG GC
Nervilia_fordii_JX629276 .....
Nervilia_fordii_JX629281 .....
Nervilia_fordii_JX629277 .....
Nervilia_fordii_JX629278 .....
Nervilia_fordii_JX629279 .....
Nervilia_fordii_JX629280 .....
Nervilia_plicata_JN004511 . . . . . G. . . A. . . . .
Nervilia_plicata_JN004512 . . . . . G. . . A. . . . .
Plantago_asiatica_JX629282 GGGT. CTATT TAGC. GGAAG . GTG. ACC. . AG. CCGG. . G TGTA AAAGAA C. GGAT. CAC AT
Plantago_asiatica_JX629283 GGGT. CTATT TAGC. GGAAG . GTG. ACC. . AG. CCGG. . G TGTA AAAGAA C. GGAT. CAC AT
Centella_asiatica_JX629284 . G. CTCTATT . A. C. G. . C . GTGAACAG. . G. . . GGTG TG. A. . A. . C. GG. T. C. C A.
Centella_asiatica_JX629285 . G. CTCTATT . A. C. G. . C . GTGAACAG. . G. . . GGTG TG. A. . A. . C. GG. T. C. C A.
Ipomoea_batatas_JX629286 G. . CT. T. TT . A. CAC. . . . AGT. AA. . . C AGAC. . . . G TG. A. . A. . AGGG. TACTT AT
Ipomoea_batatas_JX629287 G. . CT. T. TT . A. CAC. . . . AGT. AA. . . C AGAC. . . . G TG. A. . A. . AGGG. TACTT AT

```

图 2 青天葵及其常见混伪品 *matK* 基因序列比对Fig. 2 Comparison of *matK* gene sequence between *Nervilia fordii* and its common adulterants

突变和插删,可用于科内、属内物种鉴别(Gadek *et al.*, 2000; Hilu *et al.*, 2003; 徐凤霞等, 2003)。在本研究中,以青天葵及其混伪品的不同个体或不同居

群植株为样品,用一对通用引物扩增 *matK* 基因并双向测序,确保序列的可靠性和代表性。通用引物的扩增效率和测序成功率高,序列易于比对,获得的

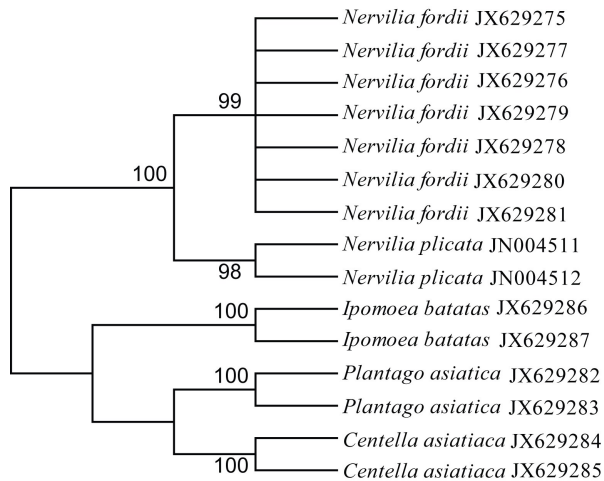


图3 基于 *matK* 基因的青天葵及其常见混伪品 NJ 聚类树
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on *matK* gene from *Nervilia fordii* and its common adulterants

序列聚类效果良好。本研究表明,青天葵与同属毛叶芋兰亲缘关系最近,红薯叶次之,积雪草和车前草则最远,与杜勤等(2009)的研究结论一致。*matK* 在青天葵及其混伪品间遗传距离远远大于青天葵的种内遗传距离,提示 *matK* 基因具有足够的变异来区别青天葵及其混伪品。

青天葵在民间用药时,根据叶片大小被分为3种类型。3种叶型的产区也有所不同,广东北部和东部以及广西桂林地区产者多为小叶或中叶,广西南宁、百色及海南产者多为大叶(王振华等,2007)。杜勤等(2005)认为大叶青天葵是高产品种,而小叶青天葵是繁殖新块茎能力最强的品种。在本研究中,没有在 *matK* 基因序列找到3种叶型青天葵的鉴别依据,说明它们的 *matK* 基因依然保持高度的同源性,可能是叶片形态差异仅是因生长环境因素的影响,并非基因组DNA变异而造成的;此外也可能在于3个叶型分化时间并不长久。作者的研究也未能能在叶绿体 *rbcl* 基因序列找到区别3种叶型青天葵的碱基差异位点(黄琼林等,2012)。青天葵的分型问题仍需进一步探讨。

本研究建立起青天葵及其混伪品基于 *matK* 基因序列的鉴别体系,为青天葵的真伪鉴别和用药安全提供了科学依据。

参考文献:

Chen WW(陈蔚文). 2010. Medicinal plant in Lingnan (岭南本草(二))[M]. Guangzhou(广州):Guangzhou Technology Press(广东科技出版社),2:318-334

- Du Q(杜勤),Xu HH(徐鸿华),Wang ZH(王振华). 2005. Preliminary investigation for growth condition of *Nervilia fordii* by artificial cultivation (人工种植青天葵生长情况的初步调查)[J]. *J Trad Chin Med*(中药材),28(10): 869-870
- Du Q(杜勤),Wei ZQ(魏智强),Tian J(田军). 2009. Genetic diversity identification of *Nervilia fordii* by RAPD(基于 RAPD 的青天葵遗传多样性及鉴别研究)[J]. *Trad Chin Drug Res & Clinic Pharm*(中药新药与临床药理),26(6):554-557
- Gadek PA,Alpers DL,Heslewood MM,*et al.* 2000. Relationships within Cupressacea sensu lato: a combined morphological and molecular approach[J]. *Amer J Bot*,87:1 044-1 057
- Guangdong Medicinal Corporation(广东省药材公司). 1998. Identification of common traditional Chinese medicine(常用中药材真伪鉴别)[M]. Guangzhou(广州):Guangzhou Technology Press(广东科技出版社):128-129
- Hebert PDN,Gregory TR. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. *Syst Biol*,54:852-859
- Hilu KW,Borsch T,Müller K,*et al.* 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information[J]. *Amer J Bot*,90:1 758-1 776
- Hollingsworth PM, Foresst LL, Spouge JL, *et al.* 2009. A DNA barcode for land plants[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 106:12 794-12 797
- Huang QL(黄琼林),Liang LL(梁凌玲),He R(何瑞),*et al.* 2012. Molecular identification of *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. and its adulterants by *rbcl* gene(青天葵及其混伪品的 *rbcl* 基因序列鉴定研究)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报),33(9):1 630-1 634
- Le F(乐凡). 2006. Identification of *Nervilia fordii* (青天葵的真伪鉴别)[J]. *J Tradit Chin Med Heilongjiang* (黑龙江中医药), (6): 46-47
- Ma J(马剑),Li DQ(李迪强),Zhang YG(张于光),*et al.* 2010. Analysis the genetic relationship of several important *Polyphylla* genus based on *matK* gene sequence (基于 *matK* 序列的几种重要重楼属植物遗传关系分析)[J]. *Chin Pharm J* (中国中药杂志),35(1):18-21
- Mei QX(梅全喜). 2008. Research progress on resource, cultivation and identification of *Nervilia fordii* (青天葵的资源、栽培与鉴别研究进展)[J]. *Chin Pharm* (中国药房), 19(18):1 426-1 428
- Teng YF(滕艳芬),Wu XJ(吴晓俊),Xu J(徐江),*et al.* 2002. Apply *matK* gene sequence to compare *Herba dendrobii* and its common adulterants(石斛及其常见混伪品的 *matK* 基因序列比较)[J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 33(4):280-283
- Wang YL(王亚玲),Li Y(李勇),Zhang SZ(张寿洲),*et al.* 2006. Apply *matK* gene sequence to analyze and discuss the phylogeny of *Magnolia* (用 *matK* 序列分析探讨木兰属植物的系统发育关系)[J]. *Acta Phytot Sin* (植物分类学报), 44(2):135-147
- Wang ZH(王振华),Du Q(杜勤),Xu HH(徐鸿华). 2007. Comparative study on quality standard of *Nervilia fordii* (Hance)Schltr. of different species(不同品种青天葵药材质量标准的比较研究)[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med* (广州中医药大学学报),24(1):59-61
- Xu FX(徐凤霞). 2003. Analysis the relationship between systematics and *Magnolieae* DC and *Micheliaceae* based on the chloroplast *matK* gene sequence(木兰族和含笑族和系统学关系-基于叶绿体 *matK* 基因序列分析)[J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin* (西北植物学报),23(7):1 169-1 173