

基于 ITS 和 *trnL*-F 序列碱基差异的繁缕 及其近缘种的亲缘关系分析

赵海光¹, 周建建¹, 曹珊珊², 郑玉红¹, 单宇¹, 夏冰^{1,①}

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014; 2. 南京林业大学, 江苏南京 210037]

摘要: 应用 PCR 产物直接测序法分析了繁缕 [*Stellaria media* (L.) Villars] 及其近缘种和鹅肠菜 [*Myosoton aquaticum* (L.) Moench] 的 ITS 和 *trnL*-F 序列的碱基差异, 并以孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 为外类群构建 N-J 系统树, 分析了这些种类的种间亲缘关系。结果表明, 供试的繁缕属 (*Stellaria* L.) 种类及鹅肠菜的 ITS 和 *trnL*-F 序列长度分别为 521~784 和 788~951 bp, 各有变异位点 77 和 59 个, 其中信息位点分别为 18 和 11 个, 种间碱基差异百分率分别为 6.5% 和 3.1%。ITS 的碱基组成为 A 22.1%、T 20.9%、G 28.5% 和 C 28.5%, G+C 含量 57.0%; *trnL*-F 的碱基组成为 A 35.9%、T 33.7%、G 15.7% 和 C 14.8%, G+C 含量 30.5%。繁缕、雀舌草 (*S. alsine* Grimm) 和 管 姑 草 (*S. vestita* Kurz) 的 ITS 和 *trnL*-F 序列一致; 鹅肠菜的 ITS 序列中有 4 个位点与前述种类不同, 但 *trnL*-F 序列则相同; 中国繁缕 (*S. chinensis* Regel) 的 ITS 和 *trnL*-F 序列与孩儿参较相似。在 N-J 系统树中, 鹅肠菜与繁缕、雀舌草和管姑草聚为一支, 表明它们的亲缘关系相对较近, 支持将鹅肠菜重新归入繁缕属的分类处理。研究结果显示, ITS 和 *trnL*-F 序列分析均可用于繁缕及其近缘种的鉴别, 且 ITS 是更为适宜的分子标记。

关键词: 繁缕; 近缘种; ITS; *trnL*-F; 种间关系

中图分类号: Q523+.8; Q949.745.8; Q949 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)01-0001-05

Analysis of interspecific relationship among *Stellaria media* and its related species based on ITS and *trnL*-F sequence differences ZHAO Hai-guang¹, ZHOU Jian-jian¹, CAO Shan-shan², ZHENG Yu-hong¹, SHAN Yu¹, XIA Bing^{1,①} (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(1): 1-5

Abstract: The *trnL*-F and ITS sequence differences of *Stellaria media* (L.) Villars and its related species as well as *Myosoton aquaticum* (L.) Moench were determined by PCR direct sequencing, and N-J tree was constructed using *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax as an outgroup to analyze the interspecific relationship. The results show that the length of ITS and *trnL*-F is 521-784 and 788-951 bp, with 77 and 59 variable sites, 18 and 11 information sites, respectively. And the percentage of base differences of ITS and *trnL*-F sequences among different species is 6.5% and 3.1%, respectively. The nucleotide composition of ITS is 22.1% A, 20.9% T, 28.5% G and 28.5% C, with the G+C content of 57.0%. The nucleotide composition of *trnL*-F is 35.9% A, 33.7% T, 15.7% G and 14.8% C, with the G+C content of 30.5%. *S. media*, *S. alsine* Grimm and *S. vestita* Kurz have the same ITS and *trnL*-F sequences. The ITS sequence of *M. aquaticum* is different in 4 sites with the above three species, while its *trnL*-F sequence is the same. The ITS and *trnL*-F sequences of *S. chinensis* Regel are similar to those of *P. heterophylla*. *M. aquaticum*, *S. media*, *S. alsine* and *S. vestita* cluster together in N-J phylogenetic tree, indicating a relatively close relationship, which supports the suggestion of putting *M. aquaticum* back into *Stellaria* L. It is concluded that ITS and *trnL*-F markers can be used in identification of *S. media* and its related species, and ITS is a better molecular marker.

收稿日期: 2008-07-25

项目资助: 江苏省药用植物开发研究中心开放基金资助项目(200802)

作者简介: 赵海光(1981—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。

①通讯作者 E-mail: xiabingbg@sina.com

Key words: *Stellaria media* (L.) Villars; related species; ITS; *trnL-F*; interspecific relationship

近些年来,随着分子生物学技术的迅速发展,RFLP、RAPD、SSR、ISSR及SNPs等技术为分子系统学研究提供了可靠的分子标记,并被广泛应用于植物种质遗传多样性研究。目前用于分子标记的主要为核DNA(rDNA)的18S基因及ITS等非编码区、叶绿体DNA(cpDNA)的编码基因及非编码区序列和部分线粒体DNA(mtDNA)的基因片段。ITS是位于18S和26S rDNA之间的非编码转录间隔区,被子植物的ITS序列长度比较稳定,总长度(包括5.8S rDNA)一般为600~700 bp,ITS序列的PCR扩增及测序简单易行,并可以提供丰富的信息位点,近年来PCR产物直接测序法的诞生,极大地推动了ITS序列在被子植物一些科内,尤其是属内及种间关系研究中的应用^[1-6],是被子植物系统发育研究中的重要分子标记。*trnL-F*序列位于叶绿体基因组中,由于该片段不受功能的限制,受外界环境选择压力小,进化速率大于其他编码序列,片段大小适中,目前已广泛用于植物系统学的研究^[7-11]。

繁缕 [*Stellaria media* (L.) Villars] 是石竹科 (Caryophyllaceae) 繁缕属 (*Stellaria* L.) 一年生草本植物,分布广泛,农业上常视为田间杂草,其茎、叶及种子可入药,具有抗菌和消炎等作用^[12-13],目前有关其化学成分的研究较多^[14-19];鹅肠菜 [*Myosoton aquaticum* (L.) Moench] 早期曾被归入繁缕属,但由于其形态与繁缕属植物明显不同,后来将其从繁缕属中分离出来,独立成鹅肠菜属 (*Myosoton* Moench),但对于鹅肠菜的分类地位存在着一定的争议^[12,20-21]。

作者以繁缕及其近缘种以及鹅肠菜为研究对象,并以同科植物孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 为外类群,测定了它们的ITS和*trnL-F*序列,并根据序列的碱基差异探讨了它们之间的亲缘关系,特别是鹅肠菜与繁缕属植物的亲缘关系,以期为繁缕及其近缘种的鉴定提供有效的分子标记。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的繁缕于2006年7月采自江西南昌;雀舌草 (*S. alsine* Grimm) 于2006年5月采自浙江清凉

峰;箬姑草 (*S. vestita* Kurz) 于2006年5月采自浙江西天目山;中国繁缕 (*S. chinensis* Regel) 于2007年7月采自江西庐山;鹅肠菜于2008年3月采自江苏南京;孩儿参于2008年3月采自江苏宝华山。采集供试植物的全株,放入变色硅胶中快速干燥,密封并保存于-70℃冰箱中待用。

1.2 方法

1.2.1 总DNA的提取及纯化 采用改良的CTAB法^[22]提取各种类的总DNA。取1~3g新鲜茎叶,加液氮磨成粉,转移至10mL离心管中并加入650μL预热至65℃的体积分数2%的CTAB提取缓冲液(含体积分数3%的β-巯基乙醇),65℃水浴保温30min(每隔10min轻轻摇动1次);加入等体积的V(氯仿):V(异戊醇)=24:1混合液抽提2次,轻轻颠倒摇动至提取液上层出现白色浊状物且下层呈深绿色时为止,12000r·min⁻¹离心30min;取上清液,加入2倍体积无水乙醇沉淀DNA,置于-20℃冰箱内2h;挑出DNA,用体积分数70%乙醇洗涤2次,风干后,将DNA溶解于灭菌双蒸水中。将提取的总DNA粗样用DNA纯化回收试剂盒(北京莱博生物实验材料研究所生产)进行纯化,然后溶解于TE缓冲液中,-20℃冰箱贮藏、备用。

1.2.2 ITS和*trnL-F*序列的扩增和测序 参照文献[23]合成ITS引物,引物序列为:5'-CGT AAC AAG GTT TCC GTA-3'和5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3';参照文献[11]合成*trnL-F*引物,引物序列为:5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3'和5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3'。

扩增反应在System 9700型PCR扩增仪上进行。反应体系包含约25ng模板DNA、2.5mmol·L⁻¹MgCl₂、20μmol·L⁻¹dNTP、引物各2pmol·L⁻¹、1.5U *Taq* DNA聚合酶和1×PCR buffer〔含100mmol·L⁻¹Tris-HCl(pH 8.3)、500mmol·L⁻¹KCl和质量分数0.01% gelatin〕,双蒸水补足至50μL。PCR扩增程序为:94℃预变性5min;94℃变性45s,58℃退火30s,72℃延伸1min,35个循环反应;最后于72℃保温5min。反应结束后,吸取3μL PCR产物用质量体积分数1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,并以100bp的DNA ladder作为分子

量标记, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭 (EB) 染色后, 用凝胶成像系统拍照。PCR 扩增产物的纯化和测序由上海英骏生物技术有限公司完成, 测序引物为 PCR 扩增引物。

1.3 数据处理

采用 CLUSTALX 1.83 软件对获得的 ITS 和 trnL-F 序列与从 GeneBank 上获得的序列进行对位排序, 并进行手工校正; 用 MEGA 3.1 分子进化遗传分析软件计算 Kimura-2 参数遗传距离, 采用邻接法进行系统发生分析; 系统树各分支的置信度采用自举检验法 (bootstrap test) 检验, 共进行 1 000 次循环, 以评价各分支的系统学意义与可靠性。建立系统树时, 以孩儿参为外类群, 空缺 (gap) 始终作缺失 (missing) 处理。

2 结果和分析

2.1 ITS 序列分析

雀舌草、箬姑草、繁缕、中国繁缕、鹅肠菜和孩儿

参的 ITS 序列登录号分别为 EU785983、EU785984、EU785985、EU785986、AY594303 和 EF121855, 其中鹅肠菜和孩儿参的 ITS 序列均来自 GeneBank。对上述种类的 ITS 序列进行序列分析和比较, 结果表明, 供试的 4 个繁缕属种类及鹅肠菜的 ITS 序列长度为 521 ~ 784 bp, 两端切平后长度为 521 bp, 加上外类群 (孩儿参) 的 ITS 序列后, 当空位始终做缺失处理时, 有变异位点 77 个, 其中信息位点 18 个 (见表 1), 占序列总长度的 3.5%; 种间的碱基差异百分率为 6.5%, 其中转换率为 3.8%, 颠换率为 2.7%; 碱基组成为 A 22.1%、T 20.9%、G 28.5%、C 28.5%, G+C 含量为 57.0%。

分析结果表明, 雀舌草、箬姑草和繁缕的 ITS 序列碱基排列完全一致, 无法区分; 鹅肠菜有 4 个位点与上述种类不同, 分别为第 201 位、第 202 位、第 204 位和第 455 位的碱基; 中国繁缕的 ITS 序列与上述 4 个种类差异较大, 但与孩儿参 (外类群) 较相似。可见, 用 ITS 序列作为分子标记可将鹅肠菜和中国繁缕与其他 3 种繁缕属植物区分开来。

表 1 繁缕及其近缘种和鹅肠菜的 ITS 序列不同位点的碱基差异

Table 1 Base difference in different sites of ITS sequence of *Stellaria media* (L.) Villars and its related species as well as *Myosoton aquaticum* (L.) Moench

种类 Species	不同位点的碱基 Base in different sites																	
	39	50	79	129	133	190	201	202	204	260	261	416	422	438	439	455	487	512
雀舌草 <i>Stellaria alsine</i>	A	T	G	G	G	C	A	T	G	G	A	G	A	A	T	A	T	A
箬姑草 <i>Stellaria vestita</i>	A	T	G	G	G	C	A	T	G	G	A	G	A	A	T	A	T	A
繁缕 <i>Stellaria media</i>	A	T	G	G	G	C	A	T	G	G	A	G	A	A	T	A	T	A
鹅肠菜 <i>Myosoton aquaticum</i>	A	T	G	G	G	C	C	C	T	G	A	G	A	A	T	T	T	A
中国繁缕 <i>Stellaria chinensis</i>	T	A	A	A	A	T	C	A	A	A	G	A	G	C	A	T	C	G
孩儿参 ¹⁾ <i>Pseudostellaria heterophylla</i> ¹⁾	T	A	A	A	A	T	C	C	A	A	G	A	G	C	A	T	C	G

¹⁾ 外类群 Outgroup.

2.2 trnL-F 序列分析

雀舌草、箬姑草、繁缕、中国繁缕、鹅肠菜和孩儿参的 trnL-F 登录号分别为 EU785987、EU785988、EU785989、EU785990、EU785991 和 EU785992。供试的繁缕属种类及鹅肠菜的 trnL-F 序列长度为 788 ~ 951 bp, 两端切平后长度为 797 bp, 加上外类群 (孩儿参) 的 trnL-F 序列后, 当空位始终作为缺失处理时, 有变异位点 59 个, 其中信息位点 11 个 (见表 2), 占序列总长度的 1.4%; 种间的碱基差异百分率为 3.1%, 其中转换率为 1.3%, 颠换率为 1.8%; 碱基组成为 A 35.9%、T 33.7%、G 15.7%、C

14.8%, G+C 含量为 30.5%, 远低于 A+T 含量。

分析结果表明, 雀舌草、箬姑草、繁缕和鹅肠菜的 trnL-F 序列碱基排列完全一致, 无法区分; 中国繁缕的 trnL-F 序列与上述 4 个种类的差异较大, 但却与孩儿参 (外类群) 较相似。可见, 采用 trnL-F 序列作为分子标记能够明显地将中国繁缕与鹅肠菜及其他 3 种繁缕属植物区分开。与 ITS 序列分析结果相比, trnL-F 序列的鉴别能力相对较弱。

2.3 基于 ITS 和 trnL-F 序列的繁缕及其近缘种和鹅肠菜的种间关系分析

采用邻接法, 以孩儿参为外类群, 获得了基于

ITS 序列和 *trnL*-F 序列构建的繁缕及其近缘种和鹅肠菜的 N-J 系统树(图 1)。其中, 笏姑草和雀舌草首先聚在一起, 表明二者的亲缘关系最近; 鹅肠菜与繁缕、雀舌草和笏姑草聚为一支, 且自展支持率达

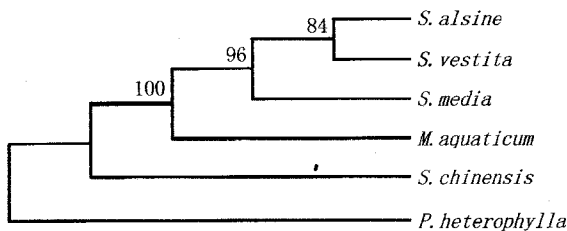
到 100%, 表明这 4 个种的亲缘关系非常近, 而中国繁缕与供试的其他 3 种繁缕属植物及鹅肠菜的亲缘关系稍远。

表 2 繁缕及其近缘种和鹅肠菜的 *trnL*-F 序列不同位点的碱基差异

Table 2 Base difference in different sites of *trnL*-F sequence of *Stellaria media* (L.) Villars and its related species as well as *Myosoton aquaticum* (L.) Moench

种类 Species	不同位点的碱基 Base in different sites										
	7	40	50	101	117	120	141	143	474	527	609
雀舌草 <i>Stellaria alsine</i>	A	G	T	G	T	A	A	A	G	T	A
笏姑草 <i>Stellaria vestita</i>	A	G	T	G	T	A	A	A	G	T	A
繁缕 <i>Stellaria media</i>	A	G	T	G	T	A	A	A	G	T	A
鹅肠菜 <i>Myosoton aquaticum</i>	A	G	T	G	T	A	A	A	G	T	A
中国繁缕 <i>Stellaria chinensis</i>	G	T	A	A	C	G	T	G	T	A	T
孩儿参 ¹⁾ <i>Pseudostellaria heterophylla</i> ¹⁾	G	T	A	A	C	G	T	G	T	A	T

¹⁾ 外类群 Outgroup.



分支上的数据为自展支持率 The datums on the branches indicate the bootstrap values; 孩儿参为外类群 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax is the outgroup.

图 1 基于 ITS 和 *trnL*-F 序列的繁缕及其近缘种和鹅肠菜的 N-J 系统树

Fig. 1 N-J phylogenetic tree of *Stellaria media* (L.) Villars and its related species as well as *Myosoton aquaticum* (L.) Moench based on ITS and *trnL*-F sequences

3 讨 论

3.1 关于鹅肠菜分类地位的探讨

根据基于 ITS 和 *trnL*-F 序列构建的 N-J 系统树可以看出, 鹅肠菜与繁缕、雀舌草和笏姑草聚为一支。繁缕属和鹅肠菜属植物的植株形态、叶着生状态和形态、花和果形态等大多数形态特征相似, 生境也基本相同。主要区别为: 繁缕属种类的茎侧有 1 列细毛, 花瓣比萼片短, 花柱数多为 3~4 枚; 鹅肠菜属种类的茎为紫色, 花瓣远长于萼片, 花柱数为 5 枚。鹅肠菜属早期被归入繁缕属, 但由于其花柱数为 5, 蒴果 5 瓣裂, 裂瓣顶端再二齿裂等特点与繁缕属种类不同, 后来将其从繁缕属中分离出来, 成立单种

属。但关于鹅肠菜的归属问题仍存在争议。黄文哲等^[20]以垂梗繁缕(*S. radians* L.)、笏姑草、繁缕、鹅肠菜及长叶繁缕(*S. longifolia* Muhl. ex Willd.)为实验材料, 利用 5S rRNA 间区基因构建了亲缘关系树, 发现鹅肠菜与供试的 4 种繁缕属植物之间具有很近的亲缘关系, 并提出“鹅肠菜应该重新归入繁缕属”的观点; 刘瑾等^[21]利用 ITS 序列对繁缕和鹅肠菜进行了分子鉴定, 并得出与前者类似的结论; 本研究结果也表明, 鹅肠菜与繁缕属一些种类的亲缘关系较近。可见, 分子生物学证据支持将鹅肠菜重新归入繁缕属中, 而不支持经典分类中将鹅肠菜独立成属的观点。

3.2 ITS 和 *trnL*-F 序列在繁缕属植物种间鉴别中的意义

雀舌草、笏姑草、繁缕和中国繁缕均具有以下共同特征: 叶扁平; 花小, 多数组成顶生聚伞花序; 萼片 5; 花瓣 5, 白色, 二深裂, 有时无花瓣; 雄蕊 10; 子房 1 室, 胚珠多数, 花柱 3; 蒴果圆球形或卵形, 裂齿数为花柱数的 2 倍; 种子多数, 近肾形, 微扁, 具瘤或平滑; 胚环形。这 4 种植物的形态差别较小, 从形态上区分这几种植物比较困难。

繁缕、雀舌草和笏姑草的 ITS 序列有信息位点 18 个, 碱基差异率为 2.0%~2.2%, 而中国繁缕与上述 3 个种的碱基差异较大, 碱基差异率为 8.0%~8.2%, 从 ITS 序列的信息位点可以看出: 基于 ITS 序列可以将这 4 种植物加以区分。繁缕、雀舌草和笏

姑草的 *trnL*-F 序列完全一致, 碱基差异率为 0%, 说明这 3 种植物的亲缘关系非常近; 中国繁缕与繁缕、雀舌草和箬姑草间 *trnL*-F 序列的碱基差异率都为 2.7%, 亲缘关系有一定的距离。在构建的 N-J 系统树中, 繁缕、雀舌草和箬姑草聚在一起, 自展支持率高达 96%, 也说明这 3 种植物的亲缘关系较近。

综上所述, 以 ITS 序列作为分子标记可以很清楚地将繁缕、雀舌草和箬姑草与中国繁缕和鹅肠菜区分开; 而以 *trnL*-F 序列作为分子标记只能将中国繁缕与鹅肠菜和其他 3 种繁缕属植物区分开; 用这 2 种序列均无法将繁缕、雀舌草和箬姑草区分开。对于中国繁缕而言, 不论是从 ITS 和 *trnL*-F 序列的碱基差异, 还是从基于这 2 个序列所构建的 N-J 系统树来看, 它与繁缕、雀舌草、箬姑草和鹅肠菜的亲缘关系都稍远一些, 说明中国繁缕有可能位于系统进化树的另一个小分支上。总体看来, 用 ITS 序列作为分子标记更适于繁缕及其近缘种的种间鉴别。

参考文献:

- [1] 汪小全, 洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展概况 [J]. 植物分类学报, 1997, 35(5): 465-480.
- [2] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- [3] 赵志礼, 徐培珊, 董辉, 等. 核糖体 DNA ITS 区序列在植物分子系统学研究中的价值 [J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 50-54.
- [4] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 1-5.
- [5] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995, 82: 247-277.
- [6] Campbell C S, Donoghue M J, Baldwin B G, et al. Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology [J]. American Journal of Botany, 1995, 82(7): 903-918.
- [7] Olmstead R G, Palmer J D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis [J]. American Journal of Botany, 1994, 81(9): 1205-1224.
- [8] Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, et al. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10(2): 202-209.
- [9] Bakker F T, Gulham A, Daugherty L C, et al. A *trnL*-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes [J]. Plant Systematics and Evolution, 1999, 216: 309-324.
- [10] 葛燕芬, 杭悦宇, 夏冰, 等. 5 种苍术属药用植物的 *trnL*-F 序列测定及种间遗传关系分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 12-16.
- [11] Taberlet P T, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17: 1105-1109.
- [12] Lu D Q, Wu Z Y, Zhou L H, et al. Caryophyllaceae [M] // Wu Z Y, Raven P H. Flora of China (Vol. 6). Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2001: 1-113.
- [13] 国家中医药管理局, 中华本草编委会. 中华本草 (第二册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1443.
- [14] 陈兴荣, 胡永美, 汪豪, 等. 繁缕的黄酮类化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(4): 41-43.
- [15] 宋京都, 王竹红, 马骥, 等. 垂梗繁缕挥发性化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1783-1784.
- [16] 刘明生, 陈英杰, 王英华, 等. 野生银柴胡甾醇类成分研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(2): 134-135.
- [17] 赵玉瑞, 周俊, 王宪楷, 等. 千针万线草环肽 H 的结构 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(4): 463-467.
- [18] Hu Y M, Ye W C, Li Q, et al. C-glycosylflavones from *Stellaria media* [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2006, 4(6): 420-424.
- [19] Morita H, Kayashita T, Shishido A, et al. Dichotomins A-E, new cyclic peptides from *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge. [J]. Tetrahedron, 1996, 52(4): 1165-1176.
- [20] Huang W Z, Dong T X, Qi H Y, et al. Identification of *Stellaria media* by PCR [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2005, 14(3): 144-148.
- [21] 刘瑾, 吴耘珂, 马子馥, 等. 基于核 rDNA ITS 序列的繁缕族疑似种分子鉴定 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2007, 44(5): 1101-1110.
- [22] Permingeat H R, Romagnoli M V, Vallejos R H. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16: 1-6.
- [23] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M] // Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.