

基于高通量测序技术对五种白头翁药材混合样品的 DNA 分子鉴定研究

张婷婷¹, 梁勇满^{1,3,4}, 许亮^{1*}, 杨燕云¹, 邢艳萍¹, 刘涛², 康廷国^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116000; 2. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110122; 3. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 成都 611900; 4. 国家中医药管理局“中药配方颗粒质量与疗效评价”重点实验室, 四川 成都 611900)

摘要: 中药白头翁应用历史悠久, 药典收载为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根。市场流通中易混淆种有朝鲜白头翁、兴安白头翁、细叶白头翁、金县白头翁等, 伪品众多, 准确鉴定十分迫切。本研究采用宏基因组学的方法, 基于高通量测序技术对 5 种白头翁药材混合样品的 ITS2 序列进行测序。首先对药材混合粉末中的总 DNA 进行提取, 并对总 DNA 中 ITS2 片段进行 PCR 扩增, 再利用 Illumina MiSeq 平台对 DNA 片段进行双端测序, 最后采用 FLASH、QIIME 以及 GraPhlAn 等软件对序列进行整理分析与本课题组前期上传至 GenBank 中的序列进行聚类分析。结果显示, 混合样品中共得到 53 024 条 ITS2 序列, 有效序列 52 295 条, 白头翁属 5 种药材总计 49 079 条, 其代表序列与本课题组前期上传至 GenBank 中的序列进行聚类分析后, 5 种白头翁分别聚为一支, 呈单系性。结果表明, 利用高通量测序技术, 以 ITS2 序列作为 DNA 条形码, 可以对 5 种白头翁药材的混合粉末进行有效鉴定, 为混合中药材的基原鉴定提供新的方法和思路。

关键词: 高通量测序技术; 白头翁; 混合粉末; ITS2

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1918-06

Study on DNA molecular identification of mix samples of five species of Baitouweng medicinal materials based on high-throughput sequencing technology

ZHANG Ting-ting¹, LIANG Yong-man^{1,3,4}, XU Liang^{1*}, YANG Yan-yun¹, XING Yan-ping¹, LIU Tao², KANG Ting-guo^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116000, China; 2. China Medical University, Shenyang 110122, China; 3. Neo-Green Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611900, China; 4. Key Laboratory of Chinese Medicine Formulations Particle Mass and Clinical Evaluation, Chengdu 611900, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine Baitouweng have a long history of application. The pharmacopoeia included dry roots of *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel of Ranunculaceae. There are easily confused species in the market circulation, such as *P. cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz., *P. dahurica* (Fisch.) Spreng., *P. turczaninowii* Kryl. et Serg., and *P. chinensis* (Bge.) Regel var. *kissii* (Mandl) S. H. Li et Y. H. Huang, etc. In this study, using the method of metagenomics, based on high-throughput sequencing technology, the ITS2 sequence of mixed samples of five species of Baitouweng medicinal materials was sequenced. First, the total DNA extraction of medicinal materials mixing powder, and the ITS2 fragment of total DNA was amplified by PCR. Second, the Illumina MiSeq platform was used to carry out Paired-end sequencing for DNA fragments. Last, using FLASH,

收稿日期: 2018-08-02; 修回日期: 2018-09-10.

基金项目: 辽宁中医药大学杰出青年基金 (20121228); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划 (LJQ2014101); “我国水生、耐盐中药资源的合理利用研究”项目 (201407002); 中央本级重大增减支项目——名贵中药资源可持续利用能力建设 (2060302).

*通讯作者 Tel: 15998541918, E-mail: 861364054@qq.com;

Tel: 13386858833, E-mail: kangtingguo@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0696

QIIME and GraPhlAn software to arrange and analyze, and clustering analysis with the sequences of uploaded to GenBank by our group in the early stage. The results showed that a total of 53 024 sequences of ITS2 were obtained from the mixed samples, there are 52 295 effective sequences, there are a total of 49 079 of five species of medicinal materials of *P. Miller*. After the representative sequences and the sequence of uploaded to GenBank by our group in the early stage were clustering analysis, 5 species of Baitouweng medicinal materials were clustered into one branch separately, presenting monophyletic. The results showed that using the high-throughput sequencing technology, using ITS2 sequence as DNA barcode, the mix powder of 5 species of Baitouweng medicinal materials could be effectively identified. It provides a new method and thought for the origin identification of mixed Chinese medicinal materials.

Key words: Illumina MiSeq; *Pulsatilla chinensis*; mix power; ITS2

白头翁为我国传统中药, 2015 版《中国药典》收载其为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根, 具有清热解毒、凉血止痢的功效, 用于热毒血痢、阴痒带下^[1]。白头翁始载于《神农本草经》^[2]; 梁代医家陶弘景有“近根处有白茸, 状似人白头, 故以为名”的描述^[3]。明代李时珍《本草纲目》^[4]以丈人、胡使、奈何为别名, 皆状老翁之意。为了研究白头翁药材市场应用品种混乱的问题^[5], 本课题组实地调查了安徽亳州、河北安国、广西玉林、四川荷花池等 7 家中药材市场, 利用性状鉴定及基于 ITS2 序列的 DNA 条形码鉴定技术对其中的 38 份药材进行了鉴定, 发现了朝鲜白头翁 *P. cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz.、兴安白头翁 *P. dahurica* (Fisch.) Spreng.、细叶白头翁 *P. turczaninowii* Kryl. et Serg.、金县白头翁 *P. chinensis* (Bge.) Regel var. *kissii* (Mandl) S. H. Li et Y. H. Huang 及翻白草 *Potentilla discolor* Bge.、火绒草 *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv. Bull. Soc. Bot. Genève.、大火草 *Anemone tomentosa* (Maxim.) C. P'ei 等冒充白头翁药材。Chen 等^[6]利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码和特定的 PCR-RFLP 分析方法对 30 种商品白头翁药材进行鉴定, 结果显示只有 2 种是正品白头翁, 正品率仅为 6.7%, 白头翁的基原鉴定显得十分迫切。本课题组前期研究也表明利用 ITS2 序列能准确鉴别白头翁药材及伪品^[7]。Xing 等^[8]利用高通量测序技术可成功对牛蒡子药材及伪品药材的混合粉末进行鉴定, 但尚未见多种白头翁药材混合样品 DNA 分子鉴定的研究报道。

第二代测序技术, 又称新一代测序技术 (next-generation sequencing), 已广泛应用于动植物全基因组测序、基因组重测序、转录组测序、小 RNAs 测序和表观基因组测序等方面^[9]。随着测序技术的提高和基因组学的发展, 对单一物种 DNA 序列的测定已经不能满足学科的发展, 人们提出了一种新的研究思

路, 即宏基因组学 (metagenomics) 研究策略^[10, 11]。宏基因组学是研究生态群体基因功能和其相互作用的新科学领域, 以特定生态环境中微小生物遗传物质的总和作为研究对象, 基本研究策略是通过克隆、异源表达, 筛选出有用的新基因及其产物^[12]。Handelsma 等^[13]在研究土壤微生物的文章中定义宏基因组为“微生物群落中的所有基因组的集合”。高通量测序技术通量高、速度快, 适合宏基因组的深度测序研究^[14], 使宏基因组的测序分析得以进一步发展。本文对五种白头翁药材的混合粉末进行高通量测序, 采用宏基因组学物种多样性的方法进行分析, 对混合样品进行物种鉴定, 为混合中药材的基原鉴定提供新的方法和思路。

材料与方法

试材 白头翁干燥根于 2016 年采集于辽宁省鞍山市千山、朝鲜白头翁干燥根于 2016 年采集于辽宁省凤城市、兴安白头翁干燥根于 2016 年采集于黑龙江省伊春市、细叶白头翁干燥根于 2016 年采集于内蒙古自治区通辽市、金县白头翁干燥根于 2016 年采集于辽宁省大连市大黑山, 均由辽宁中医药大学康廷国教授鉴定。

试剂 天根植物提取试剂盒, 1×TAE 缓冲液 (Solarbio 公司), 琼脂糖 (Promega 公司), 溴化乙锭 (Fluka 公司), DNA Taq 聚合酶 (TaKaRa 公司), 2000 bp DNA Marker (TaKaRa 公司)。

仪器 PCR 仪 (ABI 公司, 型号 9700), 电泳系统 (北京市六一仪器厂, 型号 DYY-12), 低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf, 型号 5810R), 紫外凝胶成像分析仪 (英国 Syngene, 型号 GBOXHR), 微量移液器 (德国 Eppendorf)。

混合粉末样品总 DNA 提取 取 5 种白头翁药材各 5 g, 等比混合, 用研钵研碎, 取混合粉末 100 mg

作为样品。使用天根植物总 DNA 提取试剂盒提取样品的总 DNA, 操作方法按试剂盒使用说明进行。获取混合样品总 DNA, 并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, 同时采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。

PCR 扩增 混合样品宏基因组物种多样性分析, 目标为核糖体 RNA 中 ITS2 片段, 根据序列中的保守区域设计相应引物, 引物序列为 ITS3: 5'-GCATCGA TGAAGAACGCAGC-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3'。扩增体系 (25 μL): 5 \times 反应 buffer 5 μL , 5 \times GC buffer 5 μL , dNTP (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL , DNA 模板 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , ddH₂O 8.75 μL , Q5 DNA 聚合酶 0.25 μL 。扩增参数: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 25~30 循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 伸长 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并对目标片段进行切胶回收, 回收采用 AXYGEM 公司的凝胶回收试剂盒。

测序文库制备 使用 Illumina MiSeq 平台对药材 DNA 片段进行双端 (paired-end) 测序。采用滑动窗口法对 FASTQ 格式的双端序列逐一进行质量筛查: 窗口大小为 10 bp, 步长为 1 bp, 从 5' 端第一个碱基位置开始移动, 要求窗口中碱基平均质量 $\geq Q20$ (即碱基平均测序准确率 $\geq 99\%$), 从第一个平均质量值低于 Q20 的窗口处截断序列, 并要求截断后的序列长度 ≥ 150 bp, 且不允许存在模糊碱基 (ambiguous base) N。利用 FLASH 软件^[15], 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接: 要求 Read 1 和 Read 2 两条序列的重叠碱基长度 ≥ 10 bp, 且不允许碱基错配。最后, 根据每个样本所对应的 Index 信息 (即 Barcode 序列, 为序列起始处用于识别样本的一小段碱基序列), 将连接后的序列识别分配入对应样本 (要求 Index 序列完全匹配), 从而获得每个样本的有效序列。

使用 QIIME 软件默认参数, 调用 UCLUST 这一序列比对工具^[16], 对前述获得的序列按 95% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。将丰度值低于全体样本测序总量 0.001% (十万分之一) 的 OTU 去除^[17], 并将去除了稀有 OTU 的此丰度矩阵用于后续的一系列分析。利用 ITS 序列的数据库: UNITE 数据库^[18] (Release 5.0, <https://unite.ut.ee/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 将 OTU 代表序列与

对应数据库的模板序列相比对, 获取每个 OTU 所对应的分类学信息。

分类等级与进化分析 使用 GraPhlAn 可视化工具^[19], 对样本总体在各分类水平的组成构建等级树, 发现优势类群。并使用 QIIME 软件将所有 OTU 代表序列与白头翁、朝鲜白头翁、兴安白头翁、细叶白头翁、金县白头翁的 ITS2 参考序列比对, 进一步进行筛选, 使用 MEGA 6.0 对筛选所得序列进行种水平上的进一步分析。

结果

1 测序结果

对 5 种白头翁药材混合粉末进行宏基因组物种多样性分析, 共得到 53024 条序列, 序列长度集中在 147~417 bp, 如图 1。其中长度为 384 bp 的序列最多为 29443 条, 其次是长度为 383 bp 和 322 bp 的序列分别为 18804 和 1430 条。

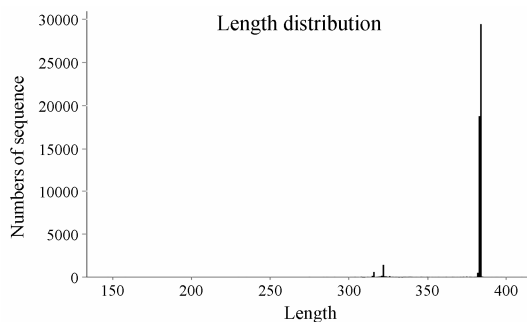


Figure 1 Sequence length distribution diagram. The horizontal coordinate is the length distribution of the sequence in all samples, and the vertical coordinate is the total number of sequences corresponding to each length value

2 分类学组成分析

将混合粉末样品中的 52295 条 ITS2 有效序列划分为 384 个 OTU, 根据 OTU 划分和分类地位鉴定结果, 可以获得样本在各分类水平的具体组成, 分类结果见表 1、表 2。使用 NCBI 选取的白头翁属植物的 ITS2 序列与样本中所有 OTU 进行聚类分析, 有 222 个 OTU 与白头翁属植物的 ITS2 序列聚为一支, 将 222 个 OTU 与 NCBI 中选取的白头翁、朝鲜白头翁、兴安白头翁、细叶白头翁、金县白头翁序列进行聚类分析, 其中有 179 个 OTU 与白头翁属 5 种植物分别聚为一支。

3 基于 GraPhlAn 的分类学组成信息可视化分析

利用 GraPhlAn 可视化工具^[19], 对样本 384 个 OTU 在各分类水平的组成构建等级树如图 2。其中 I

节点表示白头翁属植物, 白头翁属序列占有有效序列总量的 93.8%, 微生物序列占比小于 7%, 可以看出白头翁属植物平均丰度最大, 属于优势类群。

Table 1 Statistical table of species number of different classification levels

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
4	15	40	59	92	177

Table 2 Statistical table of sequences and classification of species

Species	Number of OTU	Number of sequences	Number of sequences ratio/%
<i>P. chinensis</i>	51	2 606	5.0
<i>P. cernua</i>	224	45 651	87.3
<i>P. dahurica</i>	25	173	0.3
<i>P. turczaninovii</i>	19	504	1.0
<i>P. chinensis</i> var. <i>kissii</i>	37	145	0.3
Other	28	3 216	6.1

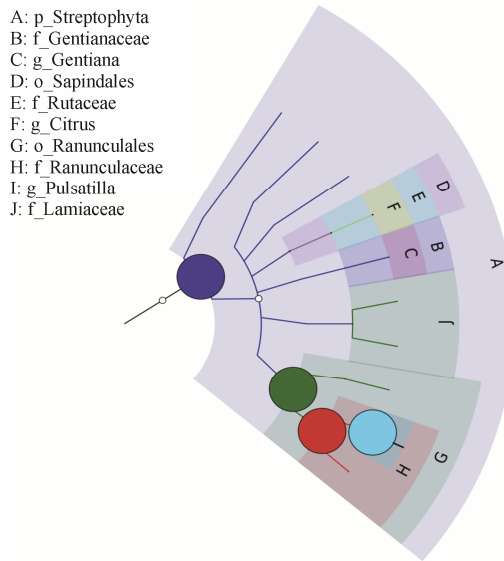


Figure 2 The classification level tree map of all sample based on GraphAn. The classification tree shows the hierarchical relationships of all the taxa (represented by nodes) from phylum to genus (from inner ring to outer ring) in the sample. The size of the node corresponds to the average relative abundance of the taxa. The top 10 taxonomic units also be marked with letters in the figure (arranged in order from the outer layer to the inner layer from phylum to genus). The color of the shadow on the letter was the same as that of the corresponding node

4 系统发育树的构建

使用 MEGA 6.0 对 NCBI 选取本课题组前期上传的五种白头翁药材的已知 ITS2 序列与样品中 OTU 代表序列进行 NJ 系统分类法分析, 筛选出与混合样品中物种进化关系匹配度高的 26 个 OTU, 其相似度达

99% 以上, 进一步 NJ 聚类分析, 结果如图 3。

编号 denovo157、denovo51、denovo259、denovo69、denovo303、denovo145、denovo295 的 OTU 总计有 37974 条序列, 约占序列总数的 71.6%, 与朝鲜白头翁的 ITS2 参考序列相似度最高, 在邻接法分类系统树里与本课题组前期成功上传至 GenBank 中的 3 条朝鲜白头翁序列聚为一支。编号 denovo70、denovo112、denovo8、denovo50、denovo379、denovo356 的 OTU 总计有 1068 条序列, 与白头翁的 ITS2 参考序列相似度最高, 在邻接法分类系统树里与本课题组前期成功上传至 GenBank 中的 3 条白头翁序列聚为一支。编号 denovo383、denovo139 的 OTU 总计有 59 条序列, 与金县白头翁的 ITS2 参考序列相似度最高, 在邻接法分类系统树里与本课题组前期成功上传至 GenBank 中的 3 条金县白头翁序列聚为一支。编号 denovo342、denovo48、denovo154、denovo2、denovo13、denovo337 的 OTU 总计有 61 条序列, 与兴安白头翁的 ITS2 参考序列相似度最高, 在邻接法分类系统树里与本课题组前期成功上传至 GenBank 中的 3 条兴安白头翁序列聚为一支。编号 denovo153、denovo260、denovo121、denovo152、denovo380 的 OTU 总计有 398 条序列, 与细叶白头翁的 ITS2 参考序列相似度最高, 在邻接法分类系统树里与本课题组前期成功上传至 GenBank 中的 3 条细叶白头翁序列聚为一支。混合样品中 5 种白头翁都被鉴定出, 鉴定出的序列数量占白头翁属 5 种药材序列总量的 80% 以上。综上, 此混合样品含有白头翁、朝鲜白头翁、兴安白头翁、细叶白头翁、金县白头翁, 结果表明此方法可以对 5 种白头翁药材混合样品进行准确鉴定。

讨论

中药分子鉴定是分子生药学的研究任务之一, 近些年来, 中药分子鉴定快速发展^[20]。分子鉴定技术是指通过直接分析遗传物质 DNA 的多态性来推断物种内在的遗传变异而实现药材鉴定的方法^[21]。这种方法已广泛应用于中成药原料药的鉴定, 如 Song 等^[22]运用 shotgun metagenomic sequencing 方法对龙胆泻肝丸中成药的鉴定, 可以检测到所有的混合物种基原信息, 为商品中成药的物种鉴定提供新思路。Cui 等^[23]运用荧光测序分型技术对六味地黄丸原料药进行分子鉴定, 可成功鉴别出 3 种原料药; 成药连翘败毒丸中的 19 种原料药材可以通过 *psbA-trnH* 和 *rbcL* 序列鉴定出 10 种^[24]。Gou 等^[25]采用叶绿体基因 *trnL-F* 序列和当归特异鉴别标记, 成功对 10 份中成

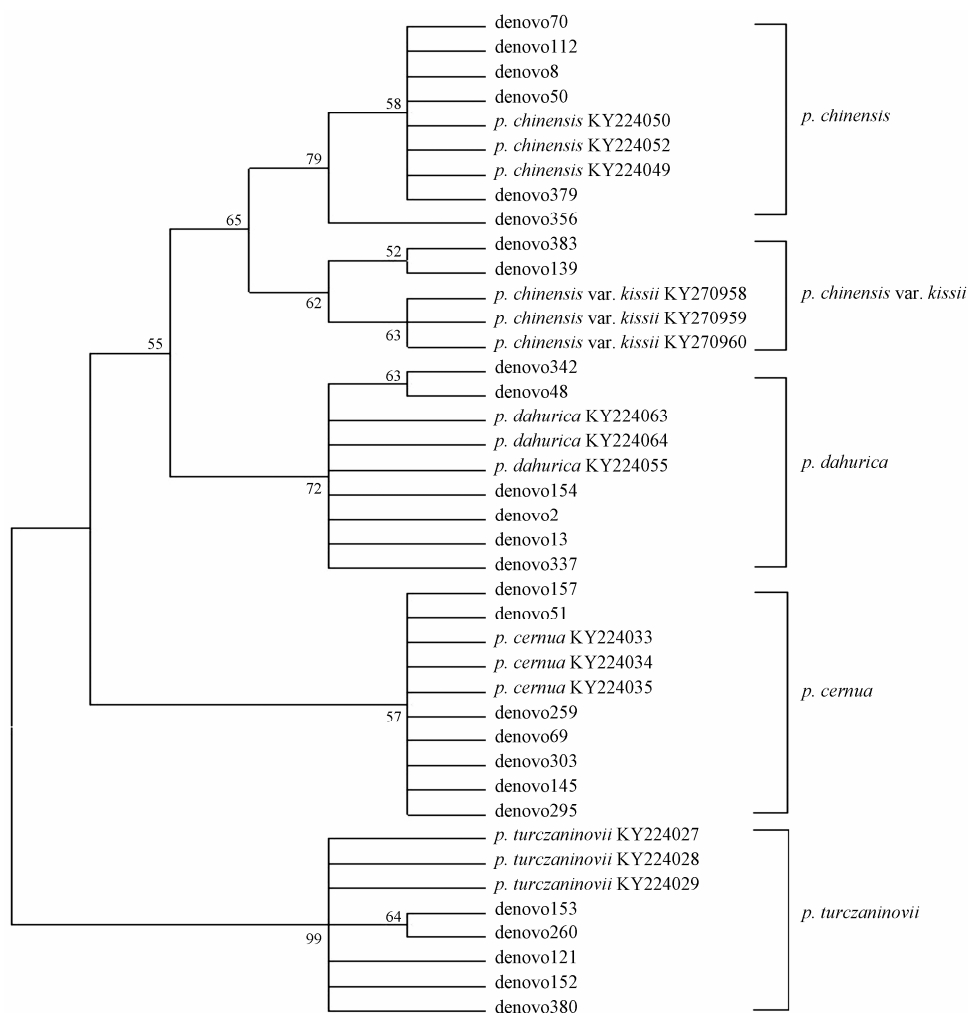


Figure 3 Molecular phylogenetic tree of screening sequence constructed by Neighbour-Joining clustering analysis. The bootstrap scores (1 000 replicates) are shown

药中当归原料药材进行了鉴别。

中药材 DNA 条形码分子鉴定是以 ITS2 为主体条形码序列鉴定中药材的方法体系，其中植物类中药材选用 ITS2 为主体序列^[26]。如 Chen 等^[27]利用 ITS2 序列对棘豆属药材的鉴定，Luo 等^[28]利用 ITS2 序列对秦艽正伪品的鉴定，Xin 等^[29]利用 ITS2 序列对羌活药材的鉴定等。本研究采用高通量测序技术对样品中的 ITS2 序列进行测序，进而对混合粉末中的物种进行鉴定。利用此方法可鉴定出混合粉末中的 5 种白头翁药材。

通过高通量测序技术还有一部分 OTU 被鉴定为各个不同科属的微生物，但是丰度较低。这些物种类群的来源可能为白头翁药材本身带有的微生物，但不是白头翁药材中的主要成分。

通过 NJ 聚类分析，可以看出白头翁、金县白头翁、兴安白头翁聚为一大支，可推测三者有较近的亲缘关系。并且，白头翁与金县白头翁进一步聚成一支，

两者亲缘关系更近。

尽管高通量测序技术有诸多的优势，但其局限性也不容忽视^[30]。与朝鲜白头翁聚为一支的 denovo259 含有 37 653 条序列，与细叶白头翁聚为一支的 denovo260 仅有 2 条序列，可能是由于高通量测序技术自身存在一些不足之处，如测序过程中碱基偏好性、组装偏差等都会导致与细叶白头翁相似度较高的 OTU 未被分析。同时，也可能是由于 PCR 技术本身的局限性导致对不同物种的 DNA 模板扩增效率不同，使该物种的 DNA 扩增产物浓度过低，出现该结果。

本实验主要对测序后的结果进行比对，实现中药混合粉末的鉴定。因此，用于比对的数据库的大小和数据的准确性对药材的鉴定结果具有十分重要的影响。随着分子标记技术的不断发展，可以筛选出更合适的 DNA 进行标记，为药材的成功鉴定提供基础，使本方法能更广泛、更深入的运用到中药混合粉末的

DNA 分子鉴定中。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1 (中华人民共和国药典一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 104.
- [2] Gu GG, Yang PJ. Shennong's Herbal (神农本草经) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 2007: 262–263.
- [3] Tao HJ. Bencao Jing Jizhu (本草经集注) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 370–371.
- [4] Li SZ. Bencao Gangmu (本草纲目) [M]. Beijing: Huaxia Press, 2013: 1116.
- [5] Liang YM, Zhao R, Xu L, et al. Herbal textual analysis of Pulsatillae Radix and taxonomy of *Pulsatilla* sect in China [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 203–209.
- [6] Shi YH, Zhao MM, Yao H, et al. Rapidly discriminate commercial medicinal *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel from its adulterants using ITS2 barcoding and specific PCR-RFLP assay [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40000.
- [7] Liang YM, Chen SY, Xu L, et al. Identification of plants and herbs of *Pulsatilla* genus based on ITS2 barcode [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2017, 40: 1547–1551.
- [8] Xing YP, Chen SY, Xu L, et al. Study on high throughput sequencing identification of Fructus Arctii and five spurious species mix power [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 303–308.
- [9] Yue GD, Gao Q, Luo LH, et al. The application of high-throughput sequencing technology in plant and animal research [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2012, 42: 107–124.
- [10] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68: 669–685.
- [11] Hugenholtz P, Tyson GW. Microbiology: metagenomics [J]. Nature, 2008, 455: 481–483.
- [12] Chu YL, Yang E. Research progress of metagenomics and its technology [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (西安交通大学学报), 2008, 29: 601–608.
- [13] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5: R245–R249.
- [14] Liu LY, Cui HF, Tian G. Application of high-throughput sequencing technology in metagenomics [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2013, 8: 196–200.
- [15] Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27: 2957–2963.
- [16] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26: 2460–2461.
- [17] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nat Methods, 2013, 10: 57–59.
- [18] Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. Mol Ecol, 2013, 22: 5271–5277.
- [19] Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, et al. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn [J]. PeerJ, 2015, 1029: 1–17.
- [20] Huang LQ, Liu CX. Molecular Pharmacognosy (分子生药学) [M]. Beijing: Science Press, 2015: 20.
- [21] Shi SM, Pan MJ, Wang J, et al. Application of molecular identification techniques in Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 3121–3126.
- [22] Xin TY, Su C, Lin YL, et al. Precise species detection of traditional Chinese patent medicine by shotgun metagenomic sequencing [J]. Phytomedicine, 2018, 47: 40–47.
- [23] Cui ZH, Huang LQ, Yuan Y, et al. Study on fluorescence sequencing typing technology identification of raw materials in Liuwei Dihuang Pill [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 3695–3700.
- [24] Cui ZH, Jiang C, Li MH, et al. Molecular identification of raw materials from Lian Qiao Bai Du Wan [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 590–596.
- [25] Gou H, Wang YW, Zheng Q, et al. DNA extraction and molecular identification in Angelicae Sinensis Radix preparations [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 44–50.
- [26] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 141–148.
- [27] Chen SY, Wu YN, Xu L, et al. DNA barcoding of Mongolian *Oxytropis* medicinal materials [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2016, 39: 284–288.
- [28] Luo K, Ma P, Yao H, et al. Identification of Gentianae Macrophyllae Radix using the ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1710–1717.
- [29] Xin TY, Yao H, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of Notopterygii Rhizoma et Radix using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1098–1105.
- [30] Wang XC, Yang ZR, Wang M, et al. High-throughput sequencing technology and its application [J]. China Biotechnol (中国生物工程杂志), 2012, 32: 109–114.