

DNA 条形码技术在石斛分类鉴定中的应用进展

涂国章*, 张显强

(贵州警察学院刑事技术系, 贵阳 550005)

摘要: 由于石斛属植物种间、种内形态相似, 地域分布范围广泛、杂交种众多, 市场上混乱, 亟需一种简单、高效的鉴定方法对其进行准确地鉴定。DNA 条形码技术利用标准的一个或多个 DNA 片段对物种进行鉴定, 是近年来生物学研究的热点领域, 也是生物学发展最迅速的方向之一。DNA 条形码技术可以从分子水平弥补传统鉴定方法的一些不足。该技术具有良好的通用性, 使得物种鉴定过程更加快速, 已经广泛应用于石斛的鉴定研究中。本文综述了 DNA 条形码技术及其原理, 同时讨论了基于核基因片段(*ITS*、*ITS2*)以及叶绿体基因片段(*matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*)在石斛分类鉴定中的应用, 以期为加大石斛分类鉴定的力度和精度, 以及为 DNA 条形码技术在石斛分类鉴定领域拓展和应用提供一定的理论指导依据。

关键词: DNA 条形码; 石斛; 分类鉴定

Application progress of DNA barcoding technology in *Dendrobium* classification and identification

TU Guo-Zhang*, ZHANG Xian-Qiang

(Department of Criminal Technology, Guizhou Police College, Guiyang 550005, China)

ABSTRACT: Due to the similar inter-species and intra-species morphology, wide geographical distribution and numerous hybrids of *Dendrobium*, the market is in chaos. Therefore, a simple and efficient identification method is urgently needed to accurately identify *Dendrobium*. DNA barcoding, which uses one or more standard DNA fragments to identify species, is one of the hot fields in biological research in recent years and one of the fastest developing directions of biology. DNA barcoding technology can make up for some shortcomings of traditional identification methods at the molecular level. This technology has good universality, which makes the process of species identification more rapid, and has been widely used in the identification of *Dendrobium*. This paper summarized the DNA barcoding technology and its principle, and discussed the application of nuclear gene fragments (*ITS*, *ITS2*) and chloroplast gene fragments (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*) in the classification and identification of *Dendrobium* based on the research of DNA barcoding technology in the classification and identification of *Dendrobium* in recent years at home and abroad, in order to increase the strength and accuracy of *Dendrobium* classification and identification, and provide a theoretical basis for the development and application of DNA barcoding technology in the field of *Dendrobium* classification and identification.

KEY WORDS: DNA barcoding; *Dendrobium*; classification and identification

基金项目: 贵州省教育厅特色领域项目(黔教合 KY 字[2021]076)

Fund: Supported by the Special Field Project of Guizhou Education Department (Qian Jiao He KY [2021]076)

*通信作者: 涂国章, 副教授, 主要研究方向为毒物分析。E-mail: gtd67892021@163.com

*Corresponding author: TU Guo-Zhang, Associate Professor, Department of Criminal Technology, Guizhou Police College, Guiyang 550005, China E-mail: gtd67892021@163.com

0 引言

石斛(*Dendrobium*)属植物为兰科附生草本, 全球约有 1200~1500 个物种, 中国约有 76 种, 常见为: 铁皮石斛、霍山石斛、金钗石斛、喉红石斛等, 主要分布在云南、贵州、四川以及华南等地区^[1]。石斛类产品含有多种生物碱、多糖、氨基酸和香豆素等成分, 具有抗氧化、抗衰老、抑制肿瘤和降血糖等药用价值, 同时石斛也被作为茶饮、凉拌菜、发酵食品等进行食用^[2]。由于石斛属植物种间、种内形态相似, 且地域分布范围广泛, 市场上出现的石斛类药材质量参差不齐, 而且劣质产品众多, 导致石斛类药用产品的安全和质量难以保证^[3]。因此为了保证药用石斛的临床疗效和使用安全, 迫切需要一种简单、高效、快捷的方法对其进行准确鉴定。传统的石斛鉴定多为形态学鉴定以及显微鉴定, 但是该方法带有一定的主观性, 同时又缺乏大量的、专业的分类学家, 导致传统的鉴定方法难以大规模推广^[4]; 除此外, 色谱法、光谱法、质谱法等理化方法虽然也被经常使用, 但是石斛中的化学成分及元素多样, 缺乏专属性和特异性, 因此无法对不同石斛进行精准的鉴别^[5]。而 DNA 分子生物学鉴定方法的出现, 尤其是 DNA 条形码技术的应用, 弥补了上述鉴定方法的不足, 由于 DNA 条形码技术具有高通量、高准确性等优点, 已成为目前物种鉴定的研究热点^[6]。本文综述了 DNA 条形码技术及其原理, 同时讨论了基于核基因片段(*ITS*、*ITS2*)以及叶绿体基因片段(*matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*)在石斛分类鉴定中的应用, 以期为加大石斛分类鉴定的力度和精度, 以及为 DNA 条形码技术在石斛分类鉴定领域拓展和应用提供一定的理论指导依据。

1 DNA 条形码技术及原理

长期以来, 生物分类学家一直在寻找能够迅速区分不用物种的方法。2003 年, 加拿大动物学家 HEBERTT 等^[7]首次提出了 DNA 条形码(也叫生物条形码)概念, 很快该技术广泛的在物种分子鉴别中得到应用, 成为生态学研究的重要工具, 在生物分类学领域发挥了极为重要的作

用。国际生命条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)对 DNA 条形码的定义是: DNA 条形码为一短段能够高效鉴定物种的 DNA 标准区域^[8]。DNA 条形码技术通过对样品提取理想的候选 DNA 片段, 利用引物聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增和纯化选取片段, 并进行测序分析序列, 从而寻找目标 DNA 条形码, 构建 DNA 条形码识别系统^[9]。DNA 条形码技术可准确地辨别形态相似性很高的物种, 该技术可以在生物任何生长发育时期的任何形态下使用, 相对于传统的形态学鉴定有着明显的优势, 而且该方法可以建立标准化的、统一的 DNA 条形码数据库, 可方便、快速的一次性鉴定大量的样本, 即使样本受损也不会影响识别结果, 这是传统分类鉴定方法所无法比拟的, 这为分类学研究提供了可信息化的分类学标准和有效的分类学手段, 使之快速的成为动、植物等分类学领域发展最快的前沿学科之一^[10]。

研究 DNA 条形码的难点是如何找到理想的 DNA 片段, 使所有的动、植物种群得到区分。在所有的基因序列中, 理论上不存在一种普遍适用于所有种群生物的 DNA 条形码序列。这是因为任何一个基因序列都不可能在各种生物中既表现出保守特征, 同时又包含足够的序列变异信息来满足物种的辨别需求, 因此在分辨不同的物种类群时需要选取不同的目标基因。理想的 DNA 条形码应当符合以下特征: (1)具有可以区分不同物种的足够的遗传变异性和一定的分化度, 同时种间变异大于种内变异, 具有保守性^[11]; (2)目标 DNA 区足够短, 便于 DNA 提取和 PCR 扩增^[12]; (3)具有相对保守的引物设计区, 便于设计通用引物^[13]; (4)应该包含足够多的系统进化信息, 便于确认物种的系统地位^[14]。常见 DNA 条形码在石斛分类中的应用见表 1。

国际上公认的植物 DNA 条形码候选序列主要有 *ITS*、*ITS2*、*psbA-trnH*、*matK* 和 *rbcL*^[23]。《中国药典》2015 年版收载 DNA 条形码技术指导原则建立了植物类采用 *ITS2/ITS* 为主、叶绿体 *psbA-trnH* 为辅的中药材鉴定体系。目前 DNA 条形码技术被广泛应用于石斛的鉴定中, 相关研究利用 DNA 技术已经成功区分多个石斛属物种^[24]。

表 1 常见 DNA 条形码在石斛分类中的应用

Table 1 Classification and application of common DNA barcoding

分类	基因片段	主要适用于对象	石斛分析对象	参考文献
核基因	<i>ITS</i>	动物、植物、真菌	秋石石斛、海南石斛	[15]
	<i>ITS1</i>		铁皮石斛	[16]
	<i>ITS2</i>		霍山石斛、喉红石斛	[17-18]
	<i>matK</i>		铁皮石斛、仙桃石斛	[19-20]
叶绿体基因	<i>rbcL</i>	植物	镰刀石斛	[21]
	<i>trnH-psbA</i>		金钗石斛、细叶石斛	[22]
	<i>rpoB</i> 、 <i>rpoC1</i> 、 <i>UPA</i> 、 <i>accD</i> 、 <i>ndhJ</i> 、 <i>YCF5</i> 、 <i>psbk-psbI</i>	植物	不单独作为核心条形码使用	[23]

2 基于核基因的 DNA 条形码技术在石斛分类鉴定中的应用

核基因组是串联重复排列的基因家族,其含有非常丰富的 DNA 序列,该序列常用于 rRNA 编码,但是大多数单拷贝基因和它们的内含子基因由于缺乏通用引物不利于 PCR 扩增从而不能作为 DNA 条形码候选序列^[25]。内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)(如图 1)基因位于 18S rRNA (ribosomal RNA)基因和 28S rRNA 基因之间,中部被 5.8S rRNA 基因分割为 *ITS1* 区与 *ITS2* 区^[27]。在前体 RNA 形成 rRNA 时,*ITS1* 和 *ITS2* 会被剪断,不参与核糖体的形成,因此该区域所受选择压力小,进化速度快,在大部分的真核生物中都表现出了较为广泛的序列多态性,现已被广泛应用于石斛近缘种间的系统发育关系研究,其序列常用来鉴定物种同源性^[28-29]。栗丹等^[15]对搜集的 35 个已知石斛样品以及 8 个未确定石斛样品进行研究,石斛的 *ITS* 序列大小通常比其他生物短,变幅在 187~298 bp 之间,通过分析 *ITS* 序列差异与形态特征的关系,结果表明, *ITS* 同源性的降低,与形态的相似性成正相关,即形态差异越小, *ITS* 序列同源性也就越高。*ITS* 序列分析不仅可以鉴定石斛种类,还可以为寻找新的石斛来源提供分子证据。DUONG 等^[30]构建了 32 种越南本土石斛的 *ITS1-5.8S-ITS2* 序列数据库,通过与世界石斛物种的序列进行对比,其中 23 种完全相同,在剩余的 9 个物种也重新进行拉丁名称编辑。由此可以看出, *ITS* 作为一个强大的系统进化编辑,在石斛鉴定中表现出较高水平的种间差异。然而,由于其完整的协同进化、扩增测序困难、真菌污染以及测序中扩增所包含真菌的序列进而导致与植物目的序列相混淆,在实际应用过程中影响鉴定结果,中国植物条形码研究团队认为其只是石斛鉴定中的一个补充点位,建议用 *ITS2* 作为候选序列^[31]。WANG 等^[17]筛选了霍山石斛鉴定的通用序列,发现 *ITS2* 为可以作为鉴定霍山石斛及其混淆品的 DNA 条形码序列。目前关于喉红石斛的分类在《中国植物志》中一直未被定义。刘红梅等^[18]建立了一种新的 *ITS2* 二级结构信息挖掘方法来探索喉红石斛的分类归属问题,该方法打破了以往“看图说话”的主观分析模式,通过在分析 *ITS2* 二级结构的 4 个螺旋臂形态差异的基础上,进行了“数据化”分析,同时对比了 *ITS2* 序列信息、遗传距

离、NJ 系统发育树,结果表明,喉红石斛与黑毛组石斛的亲缘关系非常接近,因此认为喉红石斛应该被归为黑毛组石斛。

ITS 基因在石斛分类鉴定中也存在一定的局限性^[32]。李园园等^[33]以贵州赤水产金钗石斛(包括鱼肚兰、竹叶兰和圆茎兰)为研究对象,结果显示,金钗石斛 3 种种质核糖体 *ITS2* 共有序列相似度达 96.69%, 两两比较,相似度均为 100.0%, 长度分别为:圆茎兰 491 bp、竹叶兰 492 bp、鱼肚兰 493 bp。由此可见, *ITS2* 在种内遗传变异较小,不能鉴定出金钗石斛种内变异。将 3 种种质的核糖体 *ITS2* 共有序列分别上传“中药材 DNA 条形码鉴定系统”(http://www.tcmbarcode.cn/china/index.php?optionid=174#this), 结果均显示最接近的物种为中药材金钗石斛,表明用核糖体 *ITS2* 序列可将金钗石斛与其他物种区分开。因此,不同物种在分类鉴定时,单纯的分子生物学鉴定也会有一定的局限性,需要传统鉴定方法加以辅助,才能达到对物种精确鉴定的目的。

3 基于叶绿体基因的 DNA 条形码技术在石斛分类鉴定中的应用

虽然核基因片段 *ITS/ITS2* 已经得到了广泛的应用,但是叶绿体基因在石斛分类鉴定中也发挥着至关重要的作用。叶绿体基因组是生物体内的第二大基因序列组,包含了丰富的遗传相关信息,主要可以分为 3 类:编码序列区(*matK*、*rbcL*)、非编码序列内含子区(*rpl16*、*trnI*)和非编码序列间隔区(*psbA-trnH*、*trnL-trnF*)等,其中,编码序列区基因具有高度的保守性,而内含子区则变异速率相对较快。叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA)条形码技术在种间系统发育关系、种间亲缘关系以及同源性的分辨上发挥着重要的作用,这主要是因为 cpDNA 分子量小、结构上相对简单,同时在发育过程中突变少、进化速率中,因此被广泛应用于物种鉴定、分子地理学和物种起源研究^[34-35]。目前叶绿体基因序列应用最多的为 *matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*, 其他叶绿体基因序列(如 *rpoB*、*rpoC1*、*UPA*、*accD*、*ndhJ* 和 *YCF5* 等)由于存在不同方面的缺点,在单独作为核心基因条形码进行物种分类鉴定时会出现相对较大的偏差,因此该基因只能作为备用或与其他核心基因进行联用进行物种鉴别^[36]。

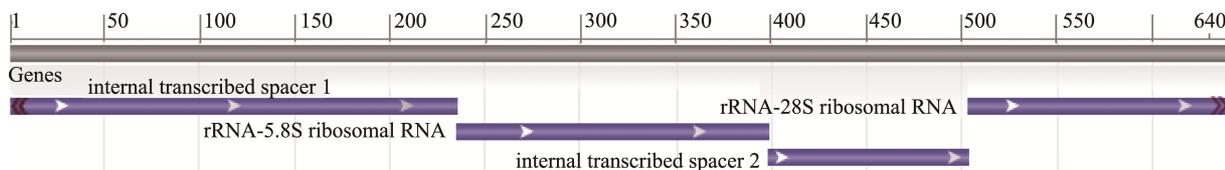


图 1 铁皮石斛 *ITS* 基因序列^[26]

Fig.1 *ITS* gene sequence of *Dendrobium candidum*^[26]

3.1 *matK* 基因在石斛分类鉴定中的应用

matK 基因, 即成熟酶 K 蛋白(maturase K protein)基因。该序列片段位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因内含子中, 在大部分的种子植物中都有存在, 属于单拷贝编码基因, 序列长度较长, 约为 1500 bp(如图 2)。*matK* 的进化速度在 cpDNA 中属于最快的, 并且其存在较大的遗传变异, 多适用于植物科、属水平下的分类鉴定工作^[19,38]。相关文献报道, 90%的兰科植物能够被 *matK* 基因分辨出^[39]。黄周英等^[20]以兰科的石斛属、石仙桃属、石豆兰属等 14 属 *matK* 全长的 CDS 为研究对象, 表明基于 *matK* 序列可将中药石斛鉴定到属。而 XU 等^[40]的研究则显示 *matK* 不适合单独的作为石斛属的 DNA 条形码鉴定。通常情况下, 会选择采用 *matK* 基因与其他基因片段联合的方式, 将其应用在植物物、种水平下的系统发育关系、亲缘关系等的研究中。LI 等^[41]采用 4 个叶绿体基因(*matK*、*rbcL*、*ndhF* 和 *ycf1*)对石斛进行研究, 通过比较 4 个基因间单序列或组合序列的核苷酸置换饱和度, 发现这些序列达到饱和状态, 适用于系统发育关系分析, 基于遗传距离的系统发育分析表明, *matK*+*ycf1* 可作为石斛鉴定的候选条形码。此外, *matK* 基因的引物存在一些问题, 在 PCR 扩增时, 往往需要针对不同的植物类群设计专门的引物^[42], 这对于 DNA 条形码的方便、快速性将大大受到影响, 虽然众多的研究学者在解决 *matK* 基因引物通用性差的问题上进行了大量的研究工作, 但是目前该问题仍未得到有效解决。因此, 未来关于 *matK* 通用引物的研究和验证工作仍然是重中之重。

3.2 *rbcL* 基因在石斛分类鉴定中的应用

rbcL 基因, 即核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) 基因^[43-44], 存在于 cpDNA 大单拷贝区。*rbcL* 基因在高等植物中以连续的方式存在, 序

列长度比 *matK* 基因较短, 约为 1300 bp(如图 3)^[45]。*rbcL* 基因的进化速度相对较慢, 通常为 *matK* 基因进化速度的 1/3 左右, 适合应用于高级分类种以上水平的遗传研究。另外, 由于该序列相对较长, 要得到完整的 *rbcL* 序列通常需要两对及以上的引物双向测序才能完成, 这违背了理想 DNA 条形码的特征, 因此研究者们常选择 *rbcL* 基因中的一段进行 PCR 扩增、测序分析^[46]。PHAM 等^[47]的研究中表明, *rbcL* 基因序列在石斛分类鉴定中具有一定的意义, 但鉴别效果并不理想, 在其所测的 12 种石斛中, 显示物种的遗传距离较低, 无明显的分支, 核苷酸序列几乎没有变化。而王晖等^[48]在对霍山石斛及常见混伪品的研究中发现, *rbcL* 序列扩增成功率低(88%)、NJ 系统树可靠性不高, 同时构建的系统树中形成单系的物种支持百分率比较低, 因此得出单独的 *rbcL* 序列不作为 DNA 条形码用来鉴别霍山石斛和铜皮石斛、铁皮石斛。这主要是因为 *rbcL* 序列在植物光合作用及光呼吸中有着及其重要的作用, 受其功能作用的影响, 导致 *rbcL* 进化速度相对较慢, 在物种水平遗传变异较小, 主要表现为种以上水平的遗传变异, 但 *rbcL* 具有引物通用性强、易扩增、易比对等特点, 可作为重要的候选片段与其他片段组合联合, 从而提高物种鉴定效率^[49]。FU 等^[21]采用 DNA 条形码技术对 15 株铁皮石斛和 1 株镰刀石斛进行分子鉴定, 结果表明, 5 种条形码序列(*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、*petA-psbJ* 和 *rpl32-trnL*)种间遗传距离显著高于种内遗传距离, 但是无论单个条形码还是 *matK*+*rbcL* 鉴定率均不高于 70%, 而在 *matK*+*rbcL* 基础上再结合其他序列(≥ 3)则可以将鉴定率提高至 81.25%, 尤其 *matK*+*rbcL*+*petA-psbJ* 是铁皮石斛分子鉴定的最佳条形码组合, 其鉴定率达到 100%。因此, 虽然单独使用该序列并不能达到人们的设计预期, 但是它与其他单一或多种序列相结合能够更准确鉴别石斛属植物也被研究者所证实的。

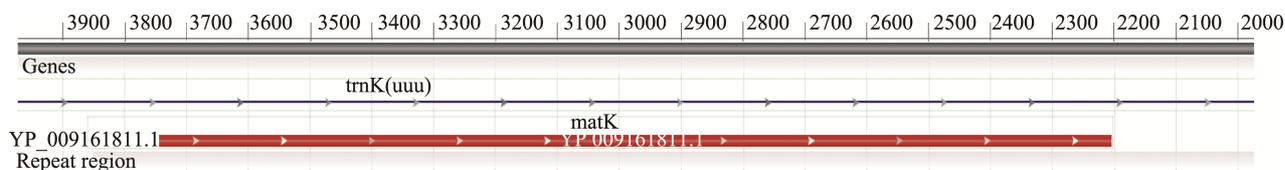


图 2 铁皮石斛 *matK* 基因序列^[37]

Fig.2 The *matK* gene sequence of *Dendrobium candidum*^[37]

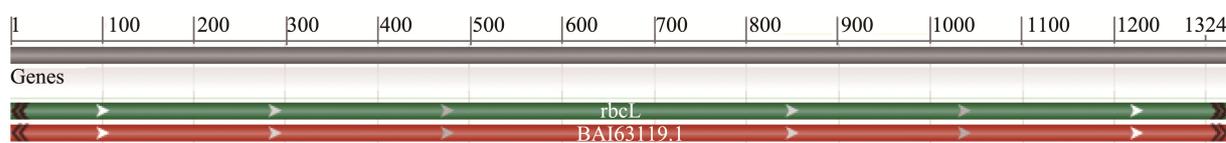


图 3 铁皮石斛 *rbcL* 基因序列^[45]

Fig.3 The *rbcL* gene sequence of *Dendrobium candidum*^[45]

3.3 *psbA-trnH* 基因在石斛分类鉴定中的应用

psbA-trnH 基因是位于叶绿体 *psbA* 基因和 *trnH* 基因之间的一段非编码区,长度一般是 350~750 bp 之间,该区间进化速率较快,适合种以及种以下水平的分析^[50](如图 4)。*psbA-trnH* 是最广泛使用的质体条形码,其两端高度保守的基因序列有利于设计通用引物,且只用一对引物就可以扩增几乎所有被子植物的该序列基因^[51]。大量的条形码研究表明 *psbA-trnH* 基因几乎可以鉴别石斛属所有的物种^[52]。彭小凤等^[22]通过叶绿体 *psbA-trnH* 基因对 12 种石斛进行研究,实验结果表明,该基因间隔区序列平均长度为 742.3 bp,其中变异位点约为 72 个左右,能有效的对金钗石斛、铁皮石斛、细叶石斛等 9 种石斛进行分类鉴定,同时显示出铁皮石斛具有不同居群间的显著差异。此外,由于 *psbA-trnH* 序列中存在众多基因片段的插入/缺失,这导致非同属物种间的比对难度系数大大增加,在实际分

析时需要通过人工比对进行分析鉴别;但正因如此,会使 *psbA-trnH* 序列的进化速率大大增加,适用于种间或种内亲缘关系的分类鉴别,尤其对于单倍型变异方面的检测有着巨大的优势^[53]。在 ZHU 等^[54]的研究中, *psbA-trnH* 基因在铁皮石斛的分类鉴定中具有非常高的扩增效率和鉴定成功率,且其种间变异扩增效率到达 96.2%,测序成功率达到 100%,在属、种级水平上该序列鉴定成功率分别为 100%和 75.0%。但是 WU 等^[55]在对石斛进行分类鉴定时候发现, *psbA-trnH* 虽然可以成功鉴定物种,但会出现测序失败的情况,这主要是因为 poly(A) 结构域尾巴的存在,从而导致测序难以进行。相关研究证明,约有 11.4%的测序问题是由于 poly(A)结构导致的^[56]。因此,使用 *psbA-trnH* 作为标准条形码进行石斛分类鉴定时,不仅需要考虑基因的选取,同时需要优化目前的测序技术,进而能够得到高质量、高标准的基因序列。

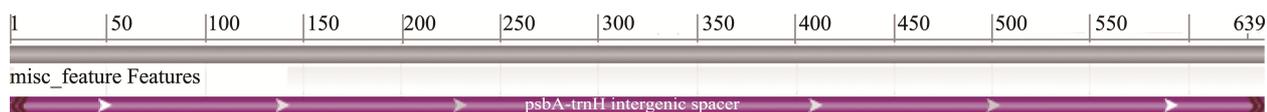


图 4 铁皮石斛 *psbA-trnH* 基因序列^[50]

Fig.4 The *psbA-trnH* gene sequence of *Dendrobium candidum*^[50]

4 结束语

石斛 DNA 条形码鉴别应根据具体情况采用核基因 (*ITS/ITS2*)或者叶绿体通用标记(如 *matK*、*rbcl* 和 *psbA-trnH* 等)与专一标记(如 *UPA*、*accD*、*ndhJ* 和 *YCF5* 等)共存的方法,分层次(如科、属、种以及种下等级)寻找最适合的条形码组合。DNA 条形码技术不仅仅是传统物种鉴定方法的有力补充,更由于其具有多元化、数字化、信息化的特点,使石斛分类鉴定过程能够实现自动化和标准化,打破了以往长期对经验过度依赖的方法。通过 DNA 条形码技术对石斛分类的鉴定,丰富了人们对石斛鉴定的认识,同时也提高了对药材质量、来源等的评价水平及标准。但是目前石斛的 DNA 条形码研究还不成熟,很多物种的序列并未及时上传到数据库,在数据库中已有的序列信息也可能存在序列错误、分类命名错误等问题。因此, DNA 条形码仍然需要众多学者进行更加深入的研究。每项技术本身都有各自的优缺点,并非所有的碱基变化都会形成新物种,所以 DNA 条形码技术也有其受限的因素,因此将 DNA 条形码技术与传统鉴定方法以及分类学、细胞学等相结合,才能更加精确的、快速的对石斛进行分类鉴定。

另外,随着 DNA 条形码鉴别技术在石斛分类鉴别中的不断深入,通过构建 DNA 条形码序列数据库,将 DNA 条形码与生物信息学技术相结合,形成属于石斛的“二维

码”,这样就可将石斛特征、特性、产地、生产时间等信息都整合在一起,应用到研究、采购、销售等普通的扫描终端,从而使石斛的市场更加标准化、规范化。

参考文献

- 王艳萍,李楚然,罗艳,等.中国9种石斛属植物的花药帽形态及其分类学意义初探[J].植物科学学报,2021,39(4):367-378.
WANG YP, LI CR, LUO Y, et al. Preliminary study on morphology and taxonomic significance of anther cap in nine *Dendrobium* species (*Orchidaceae*) from China [J]. J Plant Sci, 2021, 39(4): 367-378.
- 姚春,陈玉芹,李泽生,等.7种石斛(灯笼石斛组)中主要化学成分含量分析[J].中药材,2018,41(10):2302-2305.
YAO C, CHEN YQ, LI ZS, et al. Content analysis of main chemical compositions of seven species from *Gendrobium* genus (section callista) [J]. J Chin Med Mater, 2018, 41(10): 2302-2305.
- CHENG J, DANG PP, ZHAO Z, et al. An assessment of the Chinese medicinal *Dendrobium* industry: Supply, demand and sustainability [J]. J ethnopharmacol, 2019, 229: 81-88.
- ZHENG P, ZHENG S, WANG J, et al. Study on grade identification of *Dendrobium* by libs [J]. Spectrosc Spect Anal, 2020, 40(3): 941.
- 陈文强,汪小福,陈笑芸,等.铁皮石斛鉴定方法与技术的研究进展[J].浙江农业科学,2022,63(2):299-304.
CHEN WQ, WANG XF, CHEN XY, et al. Research progress in identification methods and techniques of *Dendrobium candidum* [J]. Zhejiang Agric Sci, 2022, 63(2): 299-304.
- 钟志敏.石斛 DNA 条形码鉴定及系统分类研究[D].广州:广州中医

- 药大学, 2018.
- ZHONG ZM. Study on DNA bar code identification and systematic classification of *Dendrobium* [D]. Guangdong: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018.
- [7] HEBERTT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270: 313–321.
- [8] 李磊, 蒋敬, 陈云霞. DNA 宏条形码技术在动植物法医鉴定中的应用进展[J]. *南京林业大学学报*, 2021, 45(1): 235–241.
- LI L, JIANG J, CHEN YX. Recent advances in the application of DNA metabarcoding technology in forensic identification of animals and plants [J]. *J Nanjing Forest Univ*, 2021, 45(1): 235–241.
- [9] SAHLIN K, LIM MCW, PAOST S. NGSspecies ID: DNA barcode and amplicon consensus generation from long-read sequencing data [J]. *Ecol Evol*, 2021, 11(3): 1392–1398.
- [10] 白文明, 邢冉冉, 陈丽萍, 等. 基于 DNA 条形码技术鉴别有毒鹅膏菌属物种 [J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 278–286.
- BAI WM, XIN RR, CHEN LP, *et al.* DNA barcoding for identification of toxic amanita species [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 278–286.
- [11] 黄蓬英, 廖富荣, 范群艳, 等. 燕窝显微特征及基于 DNA 条形码的基源鉴别 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(23): 9140–9148.
- HUANG PY, LIAO FR, FAN QY, *et al.* Microscopic characteristics of edible bird's nest and identification of its basic source based on DNA barcode [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(23): 9140–9148.
- [12] VU HT, LE L. Bioinformatics analysis on DNA barcode sequences for species identification: A review [Z]. 2019.
- [13] 王绍彬, 唐发辉, 赵元著. DNA 条形码在原生动物系统分类学中的应用[J]. *教育教学论坛*, 2019, (7): 158–159.
- WANG SB, TANG FH, ZHAO YJ. Application of DNA barcoding in protozoa phylogenetic taxonomy [J]. *Educ Forum*, 2019, (7): 158–159.
- [14] MIAO LIU, XI LI, BAO L, *et al.* Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(8): 585–590.
- [15] 栗丹, 李振坚, 毛萍, 等. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析[J]. *园艺学报*, 2012, 39(8): 1539–1550.
- LI D, LI ZJ, MAO P, *et al.* Phylogenetic analysis and identification of *Dendrobium* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence [J]. *Acta Hort*, 2012, 39(8): 1539–1550.
- [16] WU YH, CHEN DY, WANG XJ, *et al.* Using ex situ seedling baiting to capture seedling-associated mycorrhizal fungi in medicinal orchid *Dendrobium officinale* [J]. *J Fungi*, 2022, 8(10): 1036.
- [17] WANG H, SHI LL, ZHOU J, *et al.* DNA barcoding identification of *Dendrobium huo-shanense* and its adulterants [J]. *J Chin Med Mater*, 2018, 43(20): 4055–4061.
- [18] 刘红梅, 张存艳, 叶强, 等. 基于 DNA 条形码技术对喉红石斛的植物学分类研究[J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6656–6662.
- LIU HM, ZHANG CY, YE Q, *et al.* Botanical classification of *Dendrobium christyanum* based on DNA barcode technology [J]. *China Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(21): 6656–6662.
- [19] PHUEAKHLAI O, LUANGLUE S, SUNGKAEW S, *et al.* DNA barcoding of species in genus *dendrobium* section *Dendrobium* (Orchidaceae) using *matK* sequences [J]. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol*, 2021, 2021: 71–78.
- [20] 黄周英, 桑庆亮, 陈怀宇. 基于 *matK* 序列将中药石斛鉴定到属[J]. *赤峰学院学报*, 2020, 36(1): 52–55.
- HUANG ZY, SANG QL, CHEN HY. Identification of *Dendrobium officinale* to genus based on *matK* sequence [J]. *J Chifeng Univ*, 2020, 36(1): 52–55.
- [21] FU T, HU ZY, HE QY, *et al.* Identification of germplasm resources in *Dendrobium officinale* based on cpDNA barcoding [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2017, 31(2): 255.
- [22] 彭小凤, 何涛, 淳泽, 等. 基于叶绿体 *psbA-trnH* 和核糖体 5S rRNA 基因间隔区序列的石斛种间和种内鉴别 [J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(5): 887–896.
- PENG XF, HE T, CHUN Z, *et al.* Interspecific and intraspecific identification of *Dend-robium* based on the *psbA-trnH* intergenic region sequences and the 5S rRNA gene spacer sequences [J]. *Chin J Appl Envir Biol*, 2015, 21(5): 887–896.
- [23] GONG L, QIU XH, HUANG J, *et al.* Constructing a DNA barcode reference library for southern herbs in China: A resource for authentication of southern Chinese medicine [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201240.
- [24] LIU H, FANG C, ZHANG T, *et al.* Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rDNA ITS region sequence analysis [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 1–9.
- [25] 张玉秀, 刘杨, 刘培卫, 等. 莪术基原植物 DNA 条形码序列的筛选与鉴定[J]. *广西植物*, 2021, 41(8): 1263–1269.
- ZHANG YX, LIU Y, LIU PW, *et al.* Screening and identification on DNA barcoding sequences of original plants of *Curcuma rhizoma* [J]. *Guihaia*, 2021, 41(8): 1263–1269.
- [26] AN H, ZHU Q, PEI W, *et al.* Whole-transcriptome selection and evaluation of internal reference genes for expression analysis in protocorm development of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0163478.
- [27] MAHADANI P, CHAKRABARTI S, PAL R, *et al.* Application of DNA barcoding tool for authentication of traditionally important medicinal *Dendrobium* (Orchidaceae) species from Sikkim Himalaya [J]. *South Afr J Bot*, 2022, 146: 905–911.
- [28] XUE YC, YAN LIU, QING TAN, *et al.* Application of DNA barcoding and multiple real-time fluorescence quantitative PCR for authenticating *Dendrobium officinale* [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2020, 34(8): 1655.
- [29] RASKOTI BB, ALE R. DNA barcoding of medicinal orchids in Asia [J]. *Sci Rep-UK*, 2021, 11(1): 1–11.
- [30] DUONG TD, TRUNG KH, NGHIA TL, *et al.* Identification of Vietnamese native *Dendrobium* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence [J]. *Adv Stud Biol*, 2018. DOI: 10.12988/asb.2018.7823
- [31] 徐素素, 高静, 陈军文, 等. 药用石斛及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(5): 862–871.
- XU SS, GAO J, CHEN JW, *et al.* Molecular identification of medicinal *Dendrobium* and its adulterants based on DNA barcoding [J]. *J Yunnan Agricul Univ*, 2021, 36(5): 862–871.
- [32] CHEN W, CHEN X, XU J, *et al.* Identification of *Dendrobium officinale* using DNA barcoding method combined with HRM and qPCR technology [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15(5): 1310–1320.
- [33] 李园园, 蔡莉, 杨继勇, 等. 基于 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列的金钗石斛 DNA 条形码鉴定研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(8): 3516–3524.
- LI YY, CAI L, YANG JY, *et al.* Identification and research for DNA

- barcoding of *Dendrobium nobile* Lindl. based on *ITS2* and *psbA-trnH* gene sequence [J]. *Geno Appl Biol*, 2018, 37(8): 3516–3524.
- [34] WU L, CUI Y, NIE L, *et al.* The characteristics of complete chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of *Dendrobium moniliforme* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 55: 1056–1066.
- [35] 兰青阔, 陈锐, 赵新, 等. 贝母属药用植物叶绿体基因组单核苷酸多态性位点生物信息学分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(17): 4527–4533.
- LAN QK, CHEN R, ZHAO X, *et al.* Bioinformatics analysis for single nucleotide poly-morphism sites of chloroplast genome of *Fritillaria* [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(17): 4527–4533.
- [36] 沈晓霞, 孙健, 王志安. 基于叶绿体 *matK* 和 *rps16* 基因序列的黄精属药用植物亲缘关系分析[J]. *中国现代中药*, 2021, 23(2): 275–279, 325.
- SHEN XX, SUN J, WANG ZAN. Phylogenetic relationship of polygonatum medicinal plants based on cpDNA sequences analyses of *matK* gene and *rps16* gene [J]. *Mod Chin Med*, 2021, 23(2): 275–279, 325.
- [37] CHEN CY, TAN H, CHEN R, *et al.* Characterization of the complete chloroplast genome of *Dendrobium findlayanum* Par. et Rchb. f. 1874 (*Orchidaceae*) [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2022, 7(4): 644–645.
- [38] 陈文强, 汪小福, 陈笑芸, 等. 不同植物 DNA 条形码对铁皮石斛鉴定能力的评价 [J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 131–139.
- CHEN WQ, WANG XF, CHEN XY, *et al.* Evaluation of the ability of different plant DNA barcodes to identify *Dendrobium officinale* [J]. *J Food Sci*, 2021, 42(22): 131–139.
- [39] ZHENG S, HU Y, ZHAO R, *et al.* Genome-wide researches and applications on *Dendrobium* [J]. *Planta*, 2018, 248(4): 769–784.
- [40] XU S, LI D, XIANG X, *et al.* Evaluation of DNA barcodes in *Dendrobium* (*Orchidaceae*) from mainland asia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0115168.
- [41] LI H, XIAO W, TONG T, *et al.* The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of *Orchidaceae* plants [J]. *Sci Rep-Up*, 2021, 11(1): 1–15.
- [42] LI J, CHEN C, WANG ZZ. The complete chloroplast genome of the *Dendrobium strongylanthum* (*Orchidaceae: Epidendroideae*) [J]. *Mitochondrial DNA A*, 2016, 27(4): 3048–3049.
- [43] NEGI RK, NAUTIYALI P, BHATIA R, *et al.* *RbcL*, a potential candidate DNA barcode loci for aconites: Conservation of himalayan aconites [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(10): 6769–6777.
- [44] 林晓霞, 鹿炎, 李会丽, 等. 基于 *matK* 和 *rbcL* 序列的石斛属植物亲缘关系研究[J]. *生物学杂志*, 2021, 38(1): 46–50.
- LIN XX, LU Y, LI HL, *et al.* Genetic relationship analysis of *Dendrobium* plants based on chloroplast *matK* and *rbcL* gene [J]. *J Biol*, 2021, 38(1): 46–50.
- [45] NEHAL N, CHOUDHARY B, NAGPURE A, *et al.* DNA barcoding: A modern age tool for detection of adulteration in food [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(5): 767–791.
- [46] LI L, JIANG Y, LIU Y, *et al.* The large single-copy (LSC) region functions as a highly effective and efficient molecular marker for accurate authentication of medicinal *Dendrobium* species [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1989–2001.
- [47] PHAM TKD, MAI T. Genetic relationship analysis of *Dendrobium anosmum* Lindl var *semialba* based on the chloroplast *matK* and *rbcL* genes [J]. *J Agric Dev*, 2021, 20(3): 41–49.
- [48] 王晖, 时玲玲, 周珏, 等. 基于 DNA 条形码分析的霍山石斛及其常见混伪品的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(20): 4055–4061.
- WANG H, SHI LL, ZHOU Y, *et al.* DNA barcoding identification of *Dendrobium huoshanense* and its adulterants [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2018, 43(20): 4055–4061.
- [49] LUO J, HOU BW, NIU ZT, *et al.* Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: Insights into evolution of the *Orchidaceae* and development of molecular markers for phylogenetic applications [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99016.
- [50] ZHENG S, HU Y, ZHAO R, *et al.* Genome-wide researches and applications on *Dendrobium* [J]. *Planta*, 2018, 248(4): 769–784.
- [51] YU Z, ZHAO C, ZHANG G, *et al.* Genome-wide identification and expression profile of TPS gene family in *Dendrobium officinale* and the role of DoTPS10 in linalool biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5419.
- [52] GAO Y, ZHOU Y, XIE Y, *et al.* Chloroplast genome sequence of the endangered *Orchidaceae* species *Dendrobium hancockii* [J]. *Conserv Genet Res*, 2018, 10(2): 161–163.
- [53] 邵世光, 韩丽, 马艳红, 等. 枫斗类石斛 cpDNA *psbA-trnH* 的序列分析与鉴别 [J]. *药科学报*, 2009, 44(10): 1173–1178.
- SHAO SG, HAN L, MA YH, *et al.* Analysis and authentication of cpDNA *psbA-trnH* regions of *Dendrobium* species of Fengdous [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 44(10): 1173–1178.
- [54] ZHU S, NIU Z, XUE Q, *et al.* Accurate authentication of *Dendrobium officinale* and its closely related species by comparative analysis of complete plastomes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(6): 969–980.
- [55] WU HY, CHAN KT, BUT GWC, *et al.* Assessing the reliability of medicinal *Dendrobium* sequences in GenBank for botanical species identification [J]. *Sci Rep-UK*, 2021, 11(1): 1–9.
- [56] ZHANG GQ, LIU KW, LI Z, *et al.* The *Apostasia* genome and the evolution of orchids [J]. *Nature*, 2017, 549(7672): 379–383.

(责任编辑: 韩晓红 黄周梅)

作者简介

涂国章, 副教授, 主要研究方向为毒物分析。

E-mail: gtd67892021@163.com