

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202010051

药用石斛及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定*

徐素素^{1,2,3}, 高 静^{1,2,3}, 陈军文^{2,3,4}, 赫京生^{1,2,3}, 刘祥宇^{1,2,3}, 张敬丽^{1,2,3}**

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201;

3. 云南农业大学 云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201;

4. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】筛选合适的 DNA 条形码序列并建立高效准确鉴定药用石斛 (*Dendrobium*) 的方法。【方法】以 12 种药用石斛的 82 个样品为材料, 提取样品总 DNA, 对核基因片段 ITS 和 ITS2、叶绿体基因片段 psbA-trnH 和 matK 序列进行扩增和测序; 利用生物信息学软件进行序列特征、DNA 条形码序列间隔 (barcoding gap) 和系统发育分析。【结果】4 条序列扩增成功率均为 100%, 其中 ITS 和 ITS2 测序成功率最高, 均为 97.6%, 其次是 matK 为 96.3%, psbA-trnH 为 95.1%; ITS 和 ITS2 序列与其他序列相比, 种内和种间存在重叠的部分较少, 具有条形码序列间隔。系统发育树表明: ITS 和 ITS2 序列能够成功区分 12 种药用石斛及混伪品, psbA-trnH 序列未能把叠鞘石斛 (*D. aurantiacum* Rchb. f. var. *denneanum*)、双斑叠鞘石斛 (*D. aurantiacum* Rchb. f. var. *zhaojuense*) 和流苏石斛 (*D. fimbriatum*) 以及混伪品全部区分开, matK 序列未能把叠鞘石斛和流苏石斛区分开; 4 条序列联合构建的系统发育树与 ITS 和 ITS2 单序列构建的系统发育树相似。【结论】以 ITS 和 ITS2 序列为主, psbA-trnH 和 matK 序列为辅的 DNA 条形码鉴定方法能够对药用石斛及其混伪品进行快速准确的鉴定。

关键词: 药用石斛; DNA 条形码; 系统发育分析; 分子鉴定

中图分类号: S 682.310.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 05-0862-10

Molecular Identification of Medicinal *Dendrobium* and Its Adulterants Based on DNA Barcoding

XU Susu^{1,2,3}, GAO Jing^{1,2,3}, CHEN Junwen^{2,3,4}, HE Jingsheng^{1,2,3},

LIU Xiangyu^{1,2,3}, ZHANG Jingli^{1,2,3}

(1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. National & Local Joint Engineering Research Center on Germplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwestern China, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. The Key Laboratory of Medicinal Plant Biology of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To screen the appropriate DNA barcoding and to establish a fast and accurate method for identifying medicinal *Dendrobium*. [Method] A total of 82 samples from 12 medicinal *Dendrobium* species were used as materials, after extracted the total DNA, ITS, ITS2, psbA-trnH

收稿日期: 2020-10-30

修回日期: 2021-04-16

网络首发时间: 2021-10-15 16:51:39

*基金项目: 云南省重大科技专项 (2017ZF003); 国家重点研发计划 (2017YFC1702205); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021Y184)。

作者简介: 徐素素 (1997—), 女, 云南曲靖人, 在读硕士研究生, 主要从事观赏植物资源利用与创新研究。E-mail: 1459781419@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 张敬丽 (1975—), 女, 河南开封人, 博士, 教授, 主要从事观赏植物资源利用与创新及育种研究。E-mail: jl200812@yeah.net

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211014.1431.011.html>



and matK sequences were sequenced. Sequence characteristics, DNA barcoding gap and phylogenetic analysis were used by bioinformatics software. [Results] The amplification success rates of the four sequences were 100%. Among them, ITS and ITS2 had the highest sequencing success rate at 97.6%, then matK at 96.3%, and psbA-trnH at 95.1%; compared with other sequences, ITS and ITS2 sequences had fewer overlaps within and between species and had barcoding gap. The phylogeny showed that ITS and ITS2 sequences could successfully distinguish the 12 medicinal *Dendrobium* and its adulterants. The sequence of psbA-trnH failed to distinguish the three species, *D. aurantiacum* Rchb. f. var. *denneanum*, *D. aurantiacum* Rchb. f. var. *zhaojuense* and *D. fimbriatum* and their adulterants. The matK sequence failed to distinguish *D. aurantiacum* Rchb. f. var. *denneanum* and *D. fimbriatum*; the phylogenetic tree constructed by combining four sequences was similar to the phylogenetic tree constructed by ITS and ITS2 single sequence. [Conclusion] The DNA barcoding identification method based on ITS and ITS2 sequences and supplemented by psbA-trnH and matK sequences can quickly and accurately identify the medicinal *Dendrobium* and its adulterants.

Keywords: medicinal *Dendrobium*; DNA barcoding; phylogenetic analysis; molecular identification

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 植物为兰科 (Orchidaceae) 附生草本, 中国有 76 种, 主要分布在华南及西南地区, 其中可作药用的有 40 余种^[1]。现代药理学研究表明: 石斛富含多糖、生物碱和香豆素等化学成分, 具有抗衰老、抑制肿瘤和降血糖等功效^[2-5]。由于石斛属植物集观赏和药用价值于一体, 市场需求量大, 无节制的采摘导致野生石斛资源匮乏甚至灭绝^[6-7]。此外, 石斛属植物近缘种间形态特征十分相似, 石斛药材中常混有金石斛属、石仙桃属和石豆兰属的某些物种^[8]。石斛具有益胃生津和滋阴清热等功效, 用于治疗热病津伤, 口干烦渴, 胃阴不足, 食少干呕, 病后虚热不退, 阴虚火旺, 骨蒸劳热, 目暗不明, 筋骨痿软^[9]; 而石仙桃具有养阴清肺和利湿消瘀等功效, 用于治疗眩晕, 头痛, 咳嗽, 吐血, 梦遗, 痢疾, 白带, 痞积^[10]。可见, 石斛与石仙桃的主治功能截然不同, 而且干燥后的石斛药材仅凭传统形态学鉴定更加困难。为了保证药用石斛的临床疗效和安全应用, 亟须一种简单、高效的鉴定方法对其进行准确的鉴定。

传统的鉴定方法难以完全实现对中药材的准确鉴定。DNA 条形码 (DNA barcoding) 是一种分子诊断技术, 于 2003 年由加拿大大学的 HEBERT 教授首次提出^[11], 主要利用基因组中 1 段公认标准的、相对较短的 DNA 片段, 对不同物种进行快速、准确地识别和鉴定。DNA 条形码技术简单、快速和高效, 避免了主观和客观等因素, 被认为是物种鉴定及系统进化分析的有效手段^[12-16]。目前, 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^[17]。《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。CHEN 等^[15, 18]首次建立了以 ITS2 为核心、psbA-trnH 为辅的植物类药材的 DNA 条形码鉴定体系, 并提出以 ITS2 序列作为植物通用 DNA 条形码, 极大提升了中药材鉴定能力。

DNA 条形码技术在石斛属中的应用越来越广泛^[19]。相关研究利用 DNA 条形码技术已成功区分多个石斛属物种^[20-22]。本研究以金钗石斛 (*D. nobile*)、流苏石斛 (*D. fimbriatum*) 和密花石斛 (*D. densiflorum*) 等 12 种药用石斛共 82 个样品为研究材料, 以核基因片段 ITS 和 ITS2 序列以及叶绿体基因片段 psbA-trnH 和 matK 序列为研究对象, 并从 GenBank 数据库中下载 44 条相关石斛及混伪品序列, 以期寻找最适于药用石斛及其混伪品高效准确的鉴定方法, 为药用石斛的临床疗效和安全应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究用于 DNA 条形码分析的 82 份药用石斛材料均来自云南野兰堂生物科技有限公司兰科植物种质资源圃, 样品主要采自云南、广西、海南和四川等省的野外并且来自多个居群, 所有样品均由云南农业大学中药材研究所和中国科学院昆明植物研究所相关专家进行鉴定 (表 1), 凭证标本保留在云南农业大学云南省药用植物生物学

重点实验室。所选 12 种石斛在分布范围上属于狭域分布，参考高连明等^[23]关于 DNA 条形码采集规范，建议狭域分布物种样本数量需采集 5 种以上，故本研究对每种植株随机采集 5~7 株植物个体的当年生新鲜叶片，能够代表所采物种整个分布区的不同居群的遗传多样性。用 75% 的乙醇清洗叶片表面，并正确标记采样名称及采样编号，然后用硅胶快速干燥放入-80 ℃ 冰箱低温保存。从 GenBank 数据库中下载相关石斛种及混伪

品的序列 44 条(表 2)用于后续分析。

1.2 植物基因组 DNA 的提取

在研钵中放入 0.2 g 石斛新鲜叶片，加入液氮冷冻，快速将叶片研磨成粉，参考李金璐等^[24]改良的 CTAB 法进行总 DNA 的提取，并长期保存在-20 ℃ 冰箱，防止 DNA 发生降解。

通用引物和 PCR 反应条件参考 CHEN 等^[15]的研究，通用引物在擎科生物科技有限公司昆明分部合成。ITS、ITS2、psbA-trnH 及 matK 扩增

表 1 石斛属植物样本采集信息
Tab. 1 Sample information of *Dendrobium* species

序号 serial number	组别 group	种名 species name	数量 quantity	标本号 specimen No.	采集地 collection place
1	石斛组 Sect. <i>Dendrobium</i>	叠鞘石斛 <i>D. aurantiacum</i> Rchb. f. var. <i>denneanum</i>	7	DQ 1-7	云南腾冲 Tengchong, Yunnan
2	石斛组 Sect. <i>Dendrobium</i>	双斑叠鞘石斛 <i>D. aurantiacum</i> Rchb. f. var. <i>zhaojuense</i>	5	SBDQ 1-5	云南文山 Wenshan, Yunnan
3	石斛组 Sect. <i>Dendrobium</i>	金钗石斛 <i>D. nobile</i>	7	JC 1-7	四川康定 Kangding, Sichuan
4	石斛组 Sect. <i>Dendrobium</i>	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	7	LS 1-7	广西百色 Baise, Guangxi
5	基肿组 Sect. <i>Crumenata</i>	景洪石斛 <i>D. exile</i>	7	JH 1-7	云南石屏 Shaping, Yunnan
6	草叶组 Sect. <i>Stachyobium</i>	梳唇石斛 <i>D. strongylanthum</i>	7	SHUC 1-7	云南普洱 Pu're, Yunnan
7	剑叶组 Sect. <i>Aporum</i>	剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	7	JY 1-7	云南勐腊 Mengla, Yunnan
8	圆柱叶组 Sect. <i>Strongyle</i>	海南石斛 <i>D. hainanense</i>	7	HN 1-7	云南景洪 Jinghong, Yunnan
9	黑毛组 Sect. <i>Formosae</i>	翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i>	7	CG 1-7	云南腾冲 Tengchong, Yunnan
10	顶叶组 Sect. <i>Chrysotoxae</i>	密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	7	MH 1-7	云南景洪 Jinghong, Yunnan
11	距囊组 Sect. <i>Pedilonum</i>	竹枝石斛 <i>D. salaccense</i>	7	ZZ 1-7	云南红河 Honghe, Yunnan
12	瘦轴组 Sect. <i>Breviflores</i>	钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	7	GZ 1-7	云南勐海 Menghai, Yunnan

表 2 从 GenBank 中下载序列信息
Tab. 2 The information of sequences downloaded from GenBank

种名 species name	登录号 GenBank accession No.			
	ITS	ITS2	psbA-trnH	matK
叠鞘石斛 <i>D. aurantiacum</i> Rchb. f. var. <i>denneanum</i>	KF143450.1	KJ658336.1	KF177489.1	—
金钗石斛 <i>D. nobile</i>	AB593619.1	MH120176.1	KP412226.1	—
流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	KF143461.1	KY508521.1	—	—
景洪石斛 <i>D. exile</i>	KF143457.1	KY508520.1	KF177496.1	—
梳唇石斛 <i>D. strongylanthum</i>	KJ210499.1	KJ658335.1	KF177553.1	—
剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	HQ114253.1	KY745818.1	EU887944.1	—
海南石斛 <i>D. hainanense</i>	KF143466.1	KJ210451.1	EU887943.1	—
翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i>	KF143522.1	KY508539.1	FJ216467.1	—
密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	KJ210438.1	KY966533.1	FJ216487.1	—
竹枝石斛 <i>D. salaccense</i>	MK522259.1	KJ210494.1	KF177545.1	—
钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	KJ210409.1	KY508509.1	—	—
金石斛 <i>Flickingeria comata</i>	AY240015.1	—	KC811575.1	KF361638.1
流苏金石斛 <i>Flickingeria fimbriata</i>	KY966573.1	—	—	KF361639.1
石仙桃 <i>Pholidota chinensis</i> .	KY966650.1	KY508583.1	—	MK607427.1
云南石仙桃 <i>Pholidota yunnanensis</i>	AF362911.1	KY508589.1	—	—
密花石豆兰 <i>Bulbophyllum odoratissimum</i>	FJ428222.1	—	MK177964.1	FJ216638.1

引物见表 3。PCR 扩增体系总体积为 25 μ L: 2 $\times$ Taq PCR Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 正、反向引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。扩增完成后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。将扩增成的 PCR 产物送至擎科生物科技有限公司, 进行双向测序。

表 3 序列引物

Tab. 3 The sequence primers		
片段 fragment	引物 primer	序列 (5'→3') sequence
ITS	5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS2	ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
	ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
psbA-trnH	PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	TH	CGCGCATGGTGGATTCAATCC
matK	3FMK	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	4RMK	ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC

1.3 数据处理

通过序列拼接软件 Seq Man 对试验获得的双向测序结果进行校对拼接, 去除低质量序列及引物区。基于隐马尔科夫模型 (HMMer) 的注释方法^[25], 去除 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列。使用 MEGA 7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) 软件进行序列特征、DNA 条形码序列间隔 (barcoding gap) 和系统发育分析; 利用 Edit seq 软件对 4 条序列进行组合, 基于 Kimura 2-parameter (K2P) 模型计算种内和种间遗传距离及构建 NJ 系统发育树, 用自举检验法 (bootstrap test) 检验系统各分支的置信度, 共循环 1000 次, 支持率仅展示 $\geq 60\%$ 的数值。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取、PCR 扩增及测序

对提取的 82 个样品的总 DNA 进行检测,

DNA 条带均明亮且清晰; 利用 4 对通用引物对总 DNA 片段进行 PCR 扩增, 扩增产物均呈现整齐、单一明亮的条带, 4 条序列的扩增成功率均为 100% (图 1)。测序结果表明: 大多数序列的检测结果较为理想, 峰图清晰、基线平整; ITS 与 ITS2 序列测序成功率最高为 97.6%, 其次是 matK 序列为 96.3%, psbA-trnH 序列最低为 95.1%; 4 条序列的测序成功率都高达 95% 以上, 均可用于后续试验数据分析。

2.2 序列特征分析

由表 4 可知: 用于分析的 ITS 序列有 93 条、ITS2 序列 91 条、psbA-trnH 序列 93 条和 matK 序列 82 条, 其中包括从 GenBank 数据库中下载的 11 条 ITS 序列、11 条 ITS2 序列和 9 条 psbA-trnH 序列。比对后的序列长度为 matK>psbA-trnH>ITS>ITS2, 均小于 1 000 bp, 满足理想的 DNA 条形码长度的要求。GC 平均含量为 ITS>ITS2>psbA-trnH>matK, 其中 ITS 和 ITS2 序列的 GC 含量与 psbA-trnH 和 matK 的 GC 含量差异较大。ITS2 序列的变异位点最多, 占总位点数的 65.6%; ITS 序列变异位点占总位点数的 58.9%; psbA-trnH 序列变异位点占总位点数的 14.9%; matK 序列的变异位点最少, 仅占总位点数的 11.5%。

2.3 DNA 条形码序列间隔分析

由图 2 可知: 4 条序列的平均遗传距离为 ITS2>ITS>psbA-trnH>matK, 数值分别为 0.238、0.180、0.031 和 0.019; 种内平均遗传距离 ITS2>ITS>psbA-trnH=matK, 数值分别为 0.009、0.007、0.001 和 0.001; 种间平均遗传距离为 ITS2>ITS>psbA-trnH>matK, 数值分别为 0.260、0.195、0.036 和 0.021。经过比对可知: ITS2 序列的变异性最大, matK 和 psbA-trnH 序列较保守, ITS 序列与

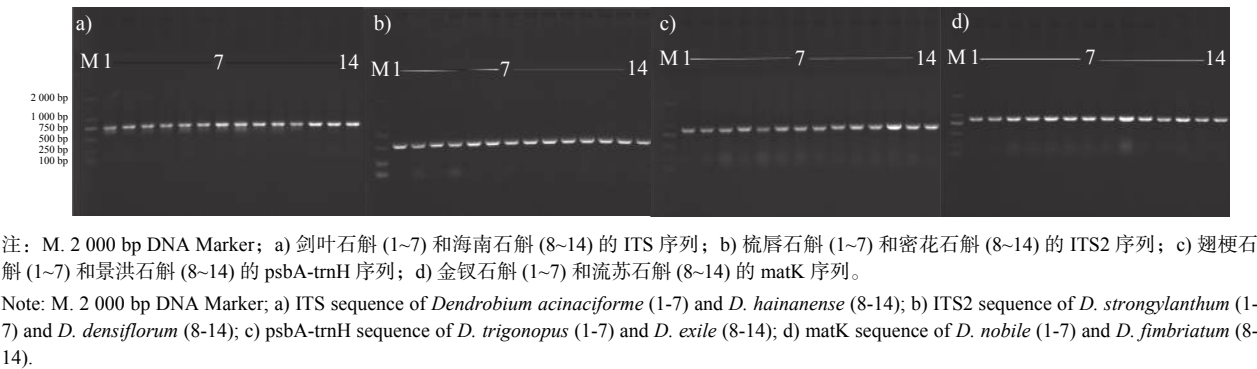


图 1 部分样品 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis with PCR amplification of some samples

ITS2 序列的平均种内种间遗传距离趋势大致相同并且重叠较少, 因此, ITS 和 ITS2 序列被认为具有理想 DNA 条形码的特征。

2.4 系统发育分析

由图 3 可知: ITS 和 ITS2 序列将系统发育树分为 13 支, 将 12 种药用石斛及混伪品区分开, 并且具有较高支持度, 可靠性高; psbA-trnH 序列将系统发育树分为 9 支, 只区分出 9 种石斛,

未能把石斛组的叠鞘石斛、双斑叠鞘石斛和流苏石斛及混伪品区分开; matK 序列将系统发育树分为 11 支, 将 10 种药用石斛及混伪品区分开, 未能把石斛组的叠鞘石斛和流苏石斛区分开。由图 4 可知: 4 条序列联合构建的系统发育树与 ITS 和 ITS2 单序列构建的系统发育树分支相似, 但是支持度较高。因此, ITS 和 ITS2 序列对药用石斛的鉴定效果优于 psbA-trnH 和 matK 序列。

表 4 4 条序列在 12 种药用石斛中的序列特征
Tab. 4 The sequence characteristics of four sequences in medicinal *Dendrobium* species

项目 item	ITS	ITS2	psbA-trnH	matK
序列总数/条 total number of sequences	93	91	93	82
比对后序列长度/bp sequence length after alignment	725	253	815	823
GC 平均含量/% GC average content	53.6	51.6	34.2	32.2
变异位点 variant sites	427 (58.9%)	166 (65.6%)	121 (14.9%)	95 (11.5%)
保守位点 conserved sites	291 (40.1%)	87 (34.4%)	694 (85.2%)	728 (88.5%)
简约信息位点 parsimonious information sites	360 (49.7%)	157 (62.1%)	113 (13.7%)	85 (10.3%)

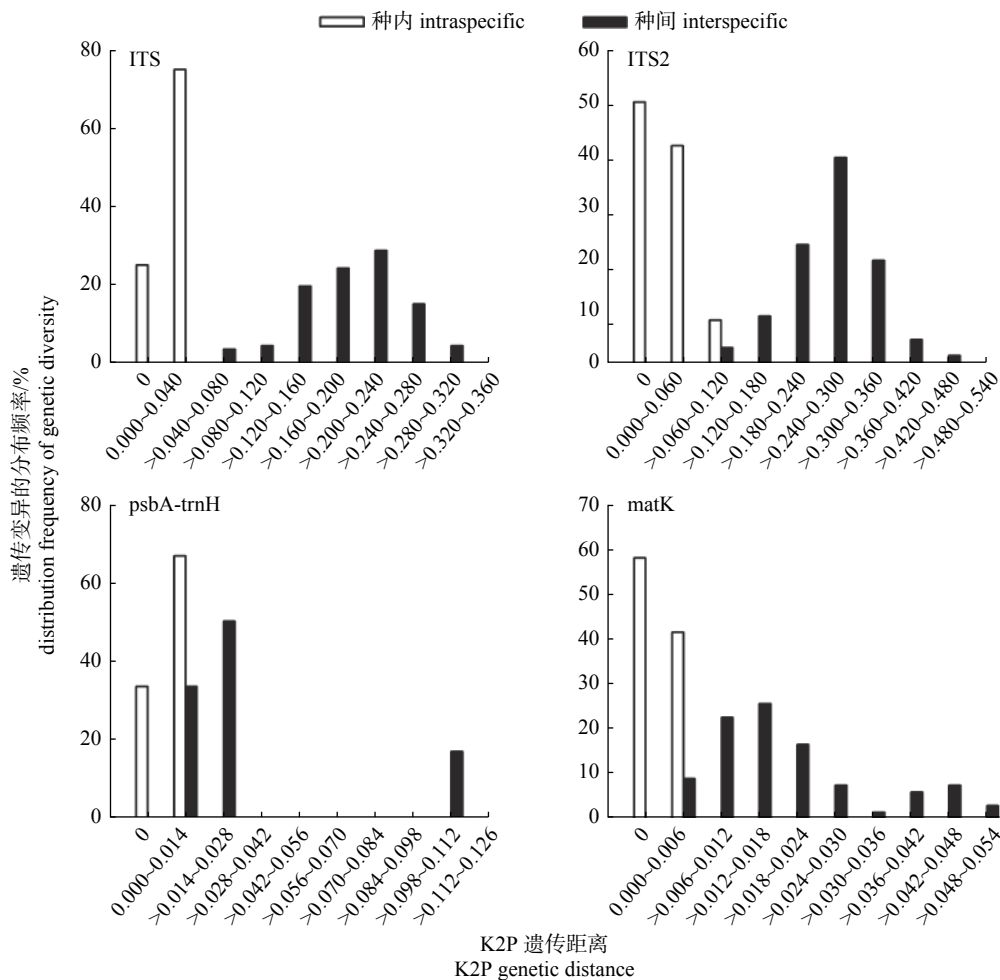
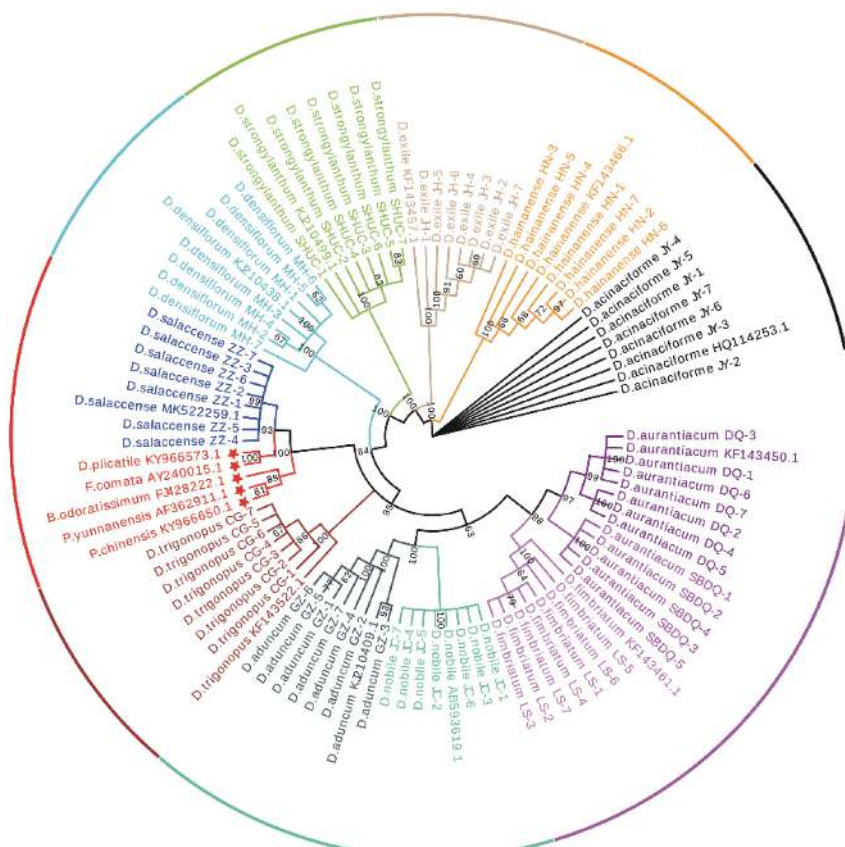
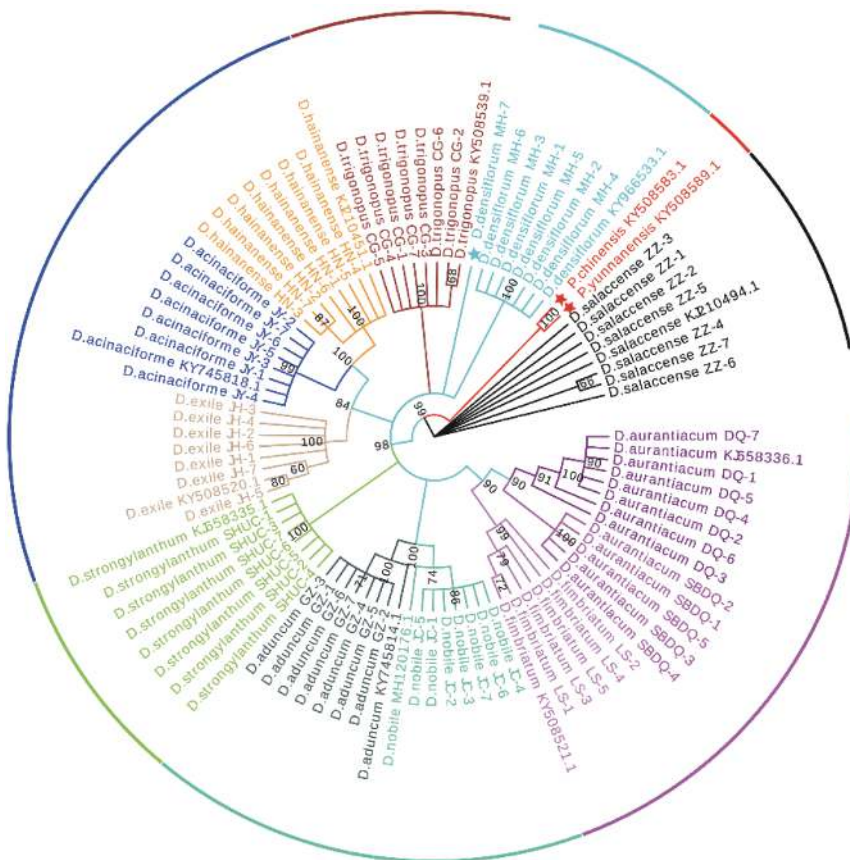


图 2 4 条序列的条形码序列间隔图
Fig. 2 The barcoding gap diagram of four sequences

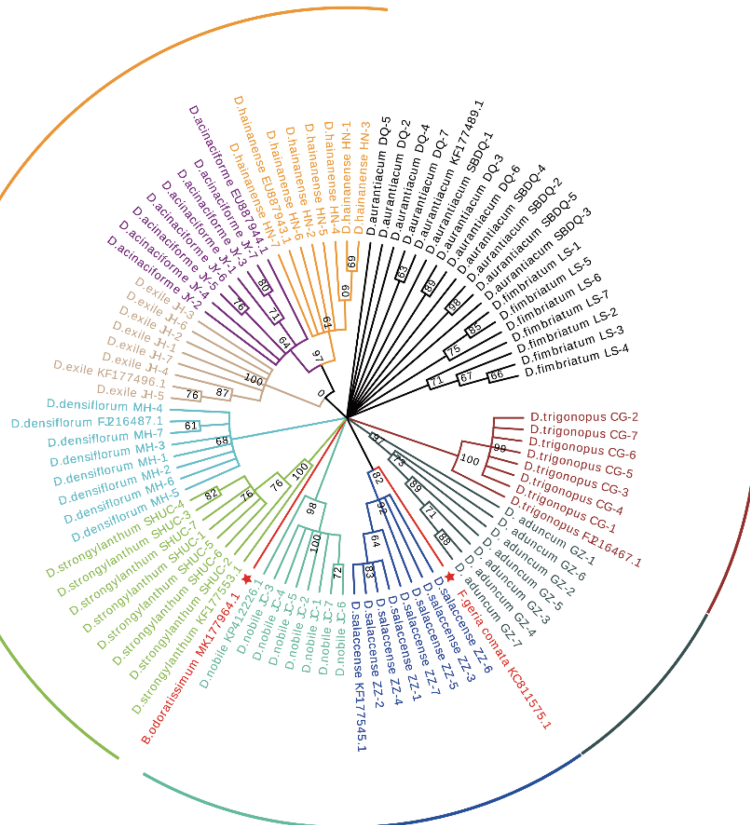
ITS



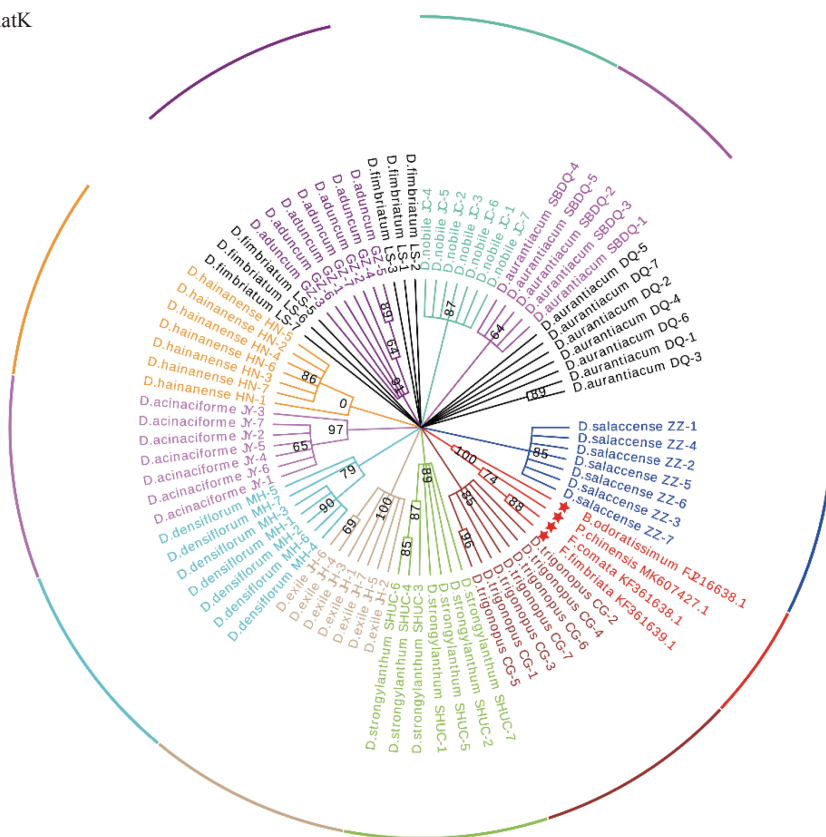
ITS2



psbA-trnH



matK



注：五角星标记代表在 NCBI 数据库下载的石斛混伪品。

Note: The five pointed star mark represents the *Dendrobium* adulterants downloaded from NCBI database.

图 3 基于 ITS、ITS2、psbA-trnH 和 matK 单序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on ITS, ITS2, psbA-trnH and matK sequences

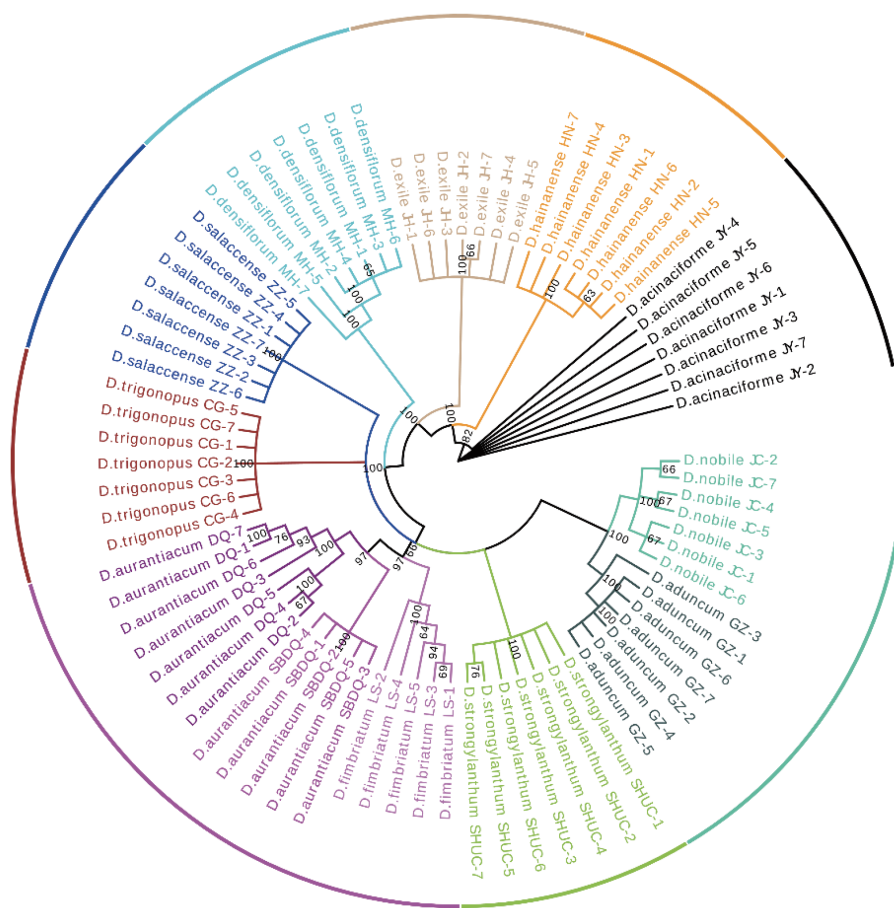


图 4 多序列联合构建 NJ 系统发育树

Fig. 4 Construction of NJ phylogenetic tree by multiple sequences.

3 讨论

3.1 石斛属植物 DNA 的提取、PCR 扩增及测序

PCR 扩增及测序成功率是评价 DNA 条形码技术实用性及通用性的指标。本研究中, 4 条候选序列 (ITS、ITS2、psbA-trnH 和 matK) 扩增成功率均为 100%, 其中 ITS 和 ITS2 测序成功率都为 97.6%, 其次是 matK 为 96.3%, psbA-trnH 相对较低, 为 95.1%; 但是 4 条序列的测序成功率都高达 95% 以上。前人研究显示: ITS 和 ITS2 序列在山茶属和委陵菜属植物中很难扩增或者测序成功^[26-27], ITS 序列在鸡血藤植物中测序成功率较低^[28], 本研究中 4 条序列利用通用引物进行扩增及测序成功率都很高, 说明 ITS、ITS2、psbA-trnH 和 matK 序列在石斛属中比较容易获得。

3.2 序列间隔评估

序列间隔是探究某一序列作为理想条形码的重要依据, 物种的种内与种间遗传距离应该有足够的间隔区。本研究基于 4 条序列构建的序列间

隔图中, ITS 序列与 ITS2 序列的种内种间遗传距离趋势大致相同, ITS 和 ITS2 序列在供试材料种内和种间比 psbA-trnH 和 matK 序列存在的重叠部分少, 具有序列间隔, 更倾向于理想的 DNA 条形码。黄海^[29]对石斛属植物 DNA 条形码序列的筛选发现 ITS 序列具有明显的序列间隔; 张忠廉等^[30]对千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究中发现 ITS2 序列在序列间隔检验中具有显著间隔, 与本研究结果一致。综上所述, ITS 和 ITS2 序列可以作为药用石斛鉴定的候选 DNA 条形码序列。

3.3 DNA 条形码的筛选及物种鉴定

DNA 条形码的关键作用是能够对不同物种进行快速准确的鉴定, 前人对石斛属植物条形码进行了大量研究工作。王晖等^[31]选择 rbcL、matK 及 ITS2 序列探讨石斛属植物发育关系发现: ITS2 序列不仅具有最大的种内和种间遗传变异, 而且有明显的序列间隔, 分支支持率也最高。王晖等^[31]和 NGUYEN 等^[32]研究表明: 在石

斛属植物中 ITS 和 ITS2 序列鉴定能力最强。在本研究中, ITS 和 ITS2 序列的变异度与种间和种内遗传距离范围均大于 psbA-trnH 和 matK 序列, 序列间隔重叠少, 并且能够成功区分来自 9 个组的 12 种药用石斛及其混伪品; 基于 psbA-trnH 和 matK 序列构建的系统发育树中, 除了石斛组的 4 种石斛分布较散乱, 没有聚在 1 个大支上, 其余均能区分开, 证明 psbA-trnH 和 matK 序列也具有一定的鉴别能力; 通过多序列联合构建的系统发育树除分支支持度较高外, 分类与 ITS 和 ITS2 单序列构建的系统发育树相似。

栗丹等^[33]利用 ITS 序列对石斛进行鉴定, 将传统分组中不在石斛组的重唇石斛、钩状石斛、鼓槌石斛和叉唇石斛分在了石斛组; 李海霞^[34]对石斛属 66 条 ITS 序列以及外群密花石豆兰和云南石仙桃构建 NJ 系统发育树发现有 6 个物种与传统分类方法不一致; 本研究中石斛组的金钗石斛和瘦轴组的钩状石斛始终聚为 1 个分支, 说明传统的形态学鉴定与分子生物学鉴定存在一定的差异。因此, 不同物种分类鉴定时, 分子生物学鉴定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。

CHEN 等^[15]通过大量的研究提出将 ITS2 作为药用植物鉴定的通用条形码序列, 中国植物 DNA 条形码研究组也建议将 ITS/ITS2 序列作为种子植物的核心条形码^[35], 后续也有较多相关研究表明 ITS 或 ITS2 序列有较强的鉴别能力^[36-40]。从本研究构建的系统发育树分析表明: ITS 和 ITS2 序列在 12 种药用石斛及混伪品中的物种鉴定效率高于 psbA-trnH 和 matK 序列; 通过多序列联合构建的系统发育树进一步验证了 ITS 和 ITS2 单序列建树的准确性, 也证明 matK 和 psbA-trnH 序列能够提高对石斛属植物的鉴别能力。但是, DNA 条形码技术也存在一定的局限性, 对于存储时间过长或加工过的药材鉴定困难, 也无法对天然矿物类的药材进行鉴定^[41-42]。另外, DNA 条形码技术只能鉴别药材真伪, 无法进行药材质量评价^[43]。至今未找到可以对所有生物进行鉴定的通用序列, 因此, DNA 条形码鉴定体系的完善需要多条序列联合应用。

4 结论

ITS 和 ITS2 测序成功率高于 matK 和 psbA-

trnH 序列, 且 ITS 和 ITS2 序列种内和种间存在重叠的部分较少, 具有序列间隔; ITS 和 ITS2 序列能够成功区分所研究的 12 种药用石斛及混伪品, psbA-trnH 和 matK 序列未能把全部石斛区分开; 4 条序列联合构建的系统发育树与 ITS 和 ITS2 单序列构建的系统发育树相似。因此, 以 ITS 和 ITS2 序列为主、psbA-trnH 和 matK 序列为辅的 DNA 条形码鉴定方法能够对药用石斛及其混伪品进行快速准确的鉴定。

[参考文献]

- [1] 吉占和. 中国植物志: 第19卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 宋广青, 刘新民, 王琼, 等. 石斛药理作用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2576. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.02.
- [3] HE L, SU Q, BAI L, et al. Recent research progress on natural small molecule bibenzyls and its derivatives in *Dendrobium* species[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 204: 112530. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112530.
- [4] NIE X Q, CHEN Y, LI W, et al. Anti-aging properties of *Dendrobium nobile* Lindl.: from molecular mechanisms to potential treatments[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112839. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112839.
- [5] YOO S R, JEONG S J, LEE N R, et al. Simultaneous determination and anti-inflammatory effects of four phenolic compounds in *Dendrobii herba*[J]. Natural Product Research, 2017, 31(24): 2923. DOI: 10.1080/14786419.2017.1300798.
- [6] 张昕, 魏江存, 庾延和, 等. 石斛研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(6): 77. DOI: 10.11954/ytctty.201706027.
- [7] 何涛, 淳泽, 罗傲雪, 等. 四川石斛野生资源及其保护研究[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(5): 710. DOI: 10.3321/j.issn: 1006-687X.2008.05.025.
- [8] 李满飞, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 商品石斛的调查及鉴定[J]. 中草药, 1986, 17(10): 33. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.1991.4.053.
- [9] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [10] 杨素雄, 姜家康, 迟文成, 等. 石仙桃的药理进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(69): 67. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2016.69.035.
- [11] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- [12] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物DNA条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322. DOI: 10.3724/SP.J.1009.2009.00322.
- [13] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于DNA barcoding (条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007(3): 7. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3849.2007.03.

- 002.
- [14] SHNEER V S. DNA barcoding of animal and plant species as an approach for their molecular identification and describing of diversity[J]. Zhurnal Obshchei Biologii, 2009, 70(4): 296.
- [15] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5: e8613. DOI: [10.1371/journal.pone.0008613](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613).
- [16] HOLLINGSWORTH P M. Refining the DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19451. DOI: [10.1073/pnas.1116812108](https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108).
- [17] HOLLINGSWORTH P M, LI D Z, BANK M V D, et al. Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, 371(1702): 20150338. DOI: [10.1098/rstb.2015.0338](https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0338).
- [18] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材DNA条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141. DOI: [10.4268/cjcmm20130201](https://doi.org/10.4268/cjcmm20130201).
- [19] 刘枫, 赵群, 戴军, 等. DNA分子标记技术在石斛属鉴别中的应用进展[J]. 皖西学院学报, 2017, 33(2): 9.
- [20] 叶子, 卢叶, 王峥涛, 等. 基于ITS序列鉴别石斛类药材[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3928. DOI: [10.4268/cjcmm20142008](https://doi.org/10.4268/cjcmm20142008).
- [21] LAU D T, SHAW P C, WANG J, et al. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA[J]. Planta Medica, 2001, 67(5): 456. DOI: [10.1055/s-2001-15818](https://doi.org/10.1055/s-2001-15818).
- [22] YAO H, SONG J Y, MA X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region[J]. Planta Medica, 2009, 75(6): 667. DOI: [10.1055/s-0029-1185385](https://doi.org/10.1055/s-0029-1185385).
- [23] 高连明, 刘杰, 蔡杰, 等. 关于植物DNA条形码研究技术规范[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 594. DOI: [10.3724/SP.J.1143.2012.12138](https://doi.org/10.3724/SP.J.1143.2012.12138).
- [24] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物DNA提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72. DOI: [10.3724/SP.J.1259.2013.00072](https://doi.org/10.3724/SP.J.1259.2013.00072).
- [25] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1/2): 50. DOI: [10.1016/j.gene.2008.10.012](https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.10.012).
- [26] 温贝贝. 基于DNA条形码技术对山茶属植物物种鉴别的探讨[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- [27] 乌吉斯古楞. DNA条形码候选序列在委陵菜属植物鉴定中的应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2018.
- [28] 熊瑶, 金晨, 王晓云, 等. 鸡血藤及其混伪品的DNA条形码分子鉴定研究[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3274. DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.020](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.020).
- [29] 黄海. 石斛属植物DNA条形码序列的筛选[J]. 热带作物学报, 2010, 31(10): 1775. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2010.10.022](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2010.10.022).
- [30] 张忠廉, 宋美芳, 李海涛, 等. 千斤拔属药用植物DNA条形码鉴定研究[J]. 中草药, 2015, 46(1): 121. DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.023](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.023).
- [31] 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(20): 4055. DOI: [10.19540/j.cnki.cjcmm.2018.0107](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.2018.0107).
- [32] NGUYEN N H, VU H T, LE N D, et al. Molecular identification and evaluation of the genetic diversity of *Dendrobium* species collected in Southern Vietnam[J]. Biology, 2020, 9(4). DOI: [10.3390/biology9040076](https://doi.org/10.3390/biology9040076).
- [33] 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): 1545. DOI: [10.16420/j.issn.0513-353x.2012.08.002](https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2012.08.002).
- [34] 李海霞. 基于rDNA ITS序列分析的石斛属种内及种间鉴别[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [35] LI D Z, GAO L M, LI H T, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19641. DOI: [10.1073/pnas.1104551108](https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108).
- [36] 杨美青, 杜燕. 基于ITS2序列及其二级结构对防己及其混伪品的鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018(10): 43. DOI: [10.13422/j.cnki.syfjx.20180947](https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20180947).
- [37] 叶方, 柳施一, 胡培, 等. 武当山区重楼属植物基于ITS2的种内鉴别研究[J]. 中草药, 2017, 48(3): 550. DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.021](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.021).
- [38] 过立农, 刘杰, 朱玲, 等. 基于DNA条形码技术的重楼栽培品基原鉴定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 857. DOI: [10.16155/j.0254-1793.2018.05.18](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2018.05.18).
- [39] CHATTOPADHYAY P, BANERJEE G, BANERJEE N. Distinguishing *Orchid* species by DNA barcoding: increasing the resolution of population studies in plant biology[J]. OMICS: a Journal of Integrative Biology, 2017, 21(12): 10.1089/omi.2017.0131.
- [40] SINGH H K, PARVEEN I, RAGHUVANSHI S, et al. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 42. DOI: [10.1186/1756-0500-5-42](https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-42).
- [41] 李笑, 谭朝阳, 徐德宏, 等. DNA条形码技术在中药材鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(2): 16. DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.005).
- [42] 王孟虎, 许亮, 康廷国, 等. 动物类中药DNA条形码鉴定研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 227. DOI: [10.13422/j.cnki.syfjx.2016150227](https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.2016150227).
- [43] KRAWCZYK K, NOBIS M, MYSZCZYŃSKI K, et al. Plastid super-barcodes as a tool for species discrimination in feather grasses (Poaceae: *Stipa*) [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1924. DOI: [10.1038/s41598-018-20399-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-20399-w).

责任编辑: 何馨成