

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.30452

蔡金龙, 谢世清, 张广辉, 刘涛, 杨生超, 陈军文. 药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 452-464

Cai JL, Xie SQ, Zhang GH, Liu T, Yang SC, Chen JW. Current advances in DNA barcoding of medicinal plants[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(3): 452-464

药用植物 DNA 条形码鉴定研究进展

蔡金龙^{1,2}, 谢世清², 张广辉², 刘涛², 杨生超², 陈军文^{1,2*}

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学云南省优势中药材规范化种植工程研究中心, 昆明 650201)

摘要: DNA 条形码是利用相对较短的标准 DNA 片段对物种进行快速准确鉴定的一门技术。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, 已经广泛应用于动物物种的鉴定研究中。近年来, 随着药用植物 DNA 条形码鉴定研究的快速发展, 逐渐形成了药用植物和植物源中药材鉴定的完善体系。本文综述了 DNA 条形码技术鉴定药用植物的原理, 介绍了中草药传统鉴定方法及其缺陷、使用 DNA 条形码技术鉴定植物源药材的意义以及 DNA 条形码在药用植物鉴定中的应用, 对其应用前景进行了展望。

关键词: DNA 条形码; 药用植物; 物种鉴定

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)03-0452-13

Current advances in DNA barcoding of medicinal plants

Cai Jin-Long^{1,2}, Xie Shi-Qing², Zhang Guang-Hui², Liu Tao²,
Yang Sheng-Chao², Chen Jun-Wen^{1,2*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Provincial Research Center on Good Agricultural Practice for Dominant Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: DNA barcoding is a taxonomic method that uses a short genetic marker in an organism's DNA to identify it as belonging to a certain species. DNA barcoding can be used to overcome the shortcomings of traditional species identification methods; in particular, it has the advantage of versatility, making the process of species identification more efficient. DNA barcoding has been well applied in the identification of animal species, and in recent years it has been rapidly developed and promoted in the identification of medicinal plants. This paper reviews the principles of DNA barcoding, and introduces and discusses the limitations of traditional identification methods for Chinese medicinal herbs. The significance, application, and prospects of DNA barcoding in the identification of Chinese medicinal herbs are also examined.

Key words: DNA barcoding; Medicinal plants; Species identification

植物界种类繁多、物种丰富, 人类要开发利用丰富的植物资源, 物种鉴定是基础。作为生物学家和生物专业学生, 必须学会鉴别用不同语言(汉

语、英语等)记录的、具有不同名称的植物物种, 这是个艰巨的任务。此外, 在不同分类群体之间, 特征差异很大, 难以鉴别。对于复杂多样的植物,

收稿日期: 2016-08-28, 退修日期: 2016-10-28。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360609); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2014HB011)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (81360609) and the Project of Young and Middle-Aged Talent of Yunnan Province (2014HB011)。

作者简介: 蔡金龙(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价与种质创新(E-mail: 1289585377@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: cjw31412@163.com)。

即使经验丰富的分类学家, 在没有相关文献资料帮助的情况下, 也很难鉴别特定植物类群的所有物种, 例如, 兰科植物或禾本科植物。培养一位植物分类学家需要经过长期的学习及实践积累, 对这门枯燥冷门却又十分重要的学科如今很少学生对其感兴趣。在中国或世界其它地区, 植物分类学家的人数或将越来越少^[1]。因此, 植物分类界急需发展一种新的分类鉴定技术以克服当前的困境。

近年来, 随着分子生物技术的不断发展, 常用于物种鉴别的植物 DNA 分子标记技术有: 限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)、简单重复序列间区 (inter-simple sequence repeats, ISSR)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 等。虽然 DNA 分子标记技术可以从分子水平弥补传统物种鉴定方法的一些不足, 但是每一种分子标记技术都有其自身的特点和应用范围, 存在通用性差、没有相应的国际应用平台、不适于推广等缺点^[2]。直至 2003 年, 加拿大圭尔夫大学的 Paul Hebert 教授将条形码技术引入生物界并提出“DNA 条形码”概念, 才解决了上述的部分问题。

生物条形码联盟 (Consortium for the barcode of life, CBOL) 阐述了 DNA 条形码的优点, 概括起来有以下几点: (1) 不受生物个体形态特征上的限制, 只需采用一小部分材料来准确鉴别大多数物种, 鉴别结果不受样本部分受损的影响, 扩大了物种识别样本的范围; (2) 个体生长发育阶段不影响鉴定结果, 可加快鉴定进程。有些物种在不同生长发育时期, 形态特征有明显的差异, 给形态学鉴定带来了不便, 但其不同生长时期的遗传信息不会随形态变化而改变; (3) 准确性高, 对于分类学中难以区分的类群, 采用 DNA 条形码技术可以避免以形态学鉴定造成的误差, 从分子水平上提供了一种稳定可靠的分类依据; (4) 数据库的建立, 快速有效地鉴定, 在分子层面上构建的核苷酸序列数据库, 可以从数字上提供永久性的确切信息, 从而弥补了形态学鉴定上的缺陷, 进而实现在短时间内识别已知物种, 同时有利于发现新物种, 这将促进分类学科更加深入、快速的研究; (5) 非专家鉴定

化, 如果条形码相关科技设备的实现, 将会解决分类学鉴定人才短缺的问题, 促进物种分类学的发展, 加快全世界物种鉴定分类与保护的进程。

理想的 DNA 条形码应该符合以下几个标准: (1) 在种内种间需要有明显的遗传变异和分化, 同时种内变异足够小; (2) 片段足够短, 便于一个反应完成测序工作, 而且便于 DNA 提取, 满足 PCR 扩增, 尤其是对存在 DNA 降解的材料; (3) 存在保守区域, 便于设计通用引物。DNA 条形码技术具有良好的通用性, 只需选用一个或少数几个基因片段就可快速有效地鉴别物种, 使得物种鉴定过程更加快速, 大大缩短了鉴定样本的时间。并且该技术操作简便, 具有良好的重复性和稳定性, 目前已得到广泛的应用。

Hebert 等^[3]选取线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*COI*) 的一个片段在动物界不同分类水平上进行研究, 最终发现各个分类水平上该序列都具有良好的识别能力, 从而提出建立以一段 650 bp 长的 *COI* 基因序列为基础的条形码识别方法。2008 年 3 月, 在 DNA 条形码数据库中已有来自 13 761 种生物的 136 338 条序列符合 DNA 条形码标准, 截至 2015 年 12 月, 序列数则达到 2 869 168 条。在 2014 年, 基于 ITS2 + *psbA-trnH* 片段组合的中药材 DNA 条形码鉴定系统已初步建成, 它系统收录了中国药典以及日本药局方、韩国药典、美国药典、欧洲药典和印度药典所记载的 23 262 个物种 (包含了 95% 以上的草药药材), 共计 78 847 条 DNA 条形码序列^[4]。DNA 条形码技术的发展缓解了植物分类学面临的困境, 至少能解决部分问题^[1]。

本文综述了中草药传统鉴定方法及其缺陷、DNA 条形码技术在植物源药材鉴定中的意义、DNA 条形码在药用植物鉴定中的应用等, 并对其未来应用前景进行了展望。

1 当前中草药鉴定的方法及其缺陷

药用植物无论是在人们的日常生活中还是在临床应用中都具有重要的作用。药用植物覆盖了广泛的植物类群, 其中包含形态学上难以鉴别的物种。调查显示, 中国药用植物覆盖了 383 科、2309 属、11 146 种, 具有丰富的生物多样性^[5]。由于有些植物在形态上极其相似, 加之长期以来对中草药的

品种来源、定名、谱系、品种特性等缺乏科学管理,致使中药材名称混乱,出现一名多物、一物多名等现象,给用药安全带来了隐患。因此,寻找一种快速有效的对药用植物进行分类鉴定的方法,以区别中草药及其易混品、伪品,确保品种来源的准确性,已成为当前亟需解决的问题^[5,6]。

陈科力等^[7]指出传统中药材普遍采用基源鉴定、形态鉴定、显微鉴定、理化鉴定等方法及传统的通过眼观、手摸、口尝等方法来鉴定。虽然这些方法中有的简便、直捷,但是人为干扰因素较多,主观性较强,如手摸、口尝,基源鉴定却要求鉴定者具备系统的分类学知识、较强的植物分类能力及一定的鉴定经验,这对中药材的分类鉴定及其相关知识的整理和交流都带来了许多困难,并且在植物的生长发育过程中,其性状和成分容易受到环境、生长期等诸多因素的影响。因此仅凭借这些传统的鉴定方法是不可能将中药材及其混伪品、伪品很好地鉴别开来的^[1,8,9]。

2 DNA 条形码技术在植物源药材鉴定中的意义

随着分子生物学技术的发展以及多学科知识的渗透,为了达到准确区分物种的目的,科研人员针对药用植物的遗传多样性,使用分子生物学技术从 DNA 分子层面进行研究已变得越来越普遍,基于基因层面的 DNA 条形码技术也应运而生,从分子遗传学的角度对物种身份以及相关制品纯度进行鉴定,并且将二维 DNA 条形码技术应用于中药材流通体系中,从而自源头上对药材进行质量监控,确保临床用药安全^[10-12]。目前, DNA 条形码技术已成功应用于多个科属药用植物及药材的鉴定中^[13-15],如在形态学上难以辨别的五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill)、金钱草 (*Lysimachia christinae* Hance) (珍珠菜属)等药用植物鉴定中也得到了较好的应用^[16,17]。

DNA 分子标记技术可以弥补和克服传统鉴定方法上的一些缺陷和难题。但是,每一种分子标记技术都有其自身的特点和适用范围,普遍存在通用性差的问题。目前, DNA 条形码技术得到了大多数专家学者的认可,在物种鉴定中得到了广泛而有效的应用,可快速、准确地鉴别植物种类^[11,18];该技术在中药材鉴定中得到了广泛的应用和快速发

展,在药用植物及植物源药材鉴定等方面均取得了突出成绩^[19],加快了中药鉴定标准化的进程。

在药用植物及植物源药材鉴定研究领域中,自从 DNA 条形码概念提出后,我国 DNA 条形码植物工作组对该技术在药用物种尤其是药用植物鉴定中的应用展开了深入和广泛的研究,并筛选得到了若干条可供实际鉴定使用的 DNA 条形码引物序列,例如彭梓等^[20]利用 ITS2 序列成功鉴别了杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver) 及其混伪品,余亚东等^[21]使用 ITS2 序列有效地区分了白术 (*Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma) 与苍术 (*Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma) 及其混伪品,为确保其种质资源的正确性及保障临床用药的安全提供了重要的分子依据,这无疑为我国药用植物 DNA 条形码鉴定平台的建立奠定了坚实的基础。Han 等^[22]利用 DNA 条形码对大量的草药及其混伪品进行试验后,建议将 DNA 条形码技术作为监管传统中药市场的方法。

综上, DNA 条形码技术在植物源药材鉴定中的意义可概括为以下几方面: (1) DNA 条形码技术从分子遗传学的角度对物种进行分类鉴定,避免了主观因素的干扰; (2) 能够弥补和克服传统鉴定方法的部分缺陷和难题,快速有效地鉴别物种,加快中药鉴定标准化的进行; (3) 从分子层面确保中草药种质资源的正确性,保障临床用药安全; (4) 可为传统中药材市场的监督管理提供快速有效的鉴别方法。

3 DNA 条形码在药用植物鉴定中的应用

自从 DNA 条形码概念首次由加拿大 University of Guelph 的 Hebert 等 (2003)^[3]提出并将其引入生物界以来,相关研究者对植物的通用条形码进行了大量研究, Kress 等^[23]建议将 ITS 和 *trnH-psbA* 这两个片段作为植物的通用条形码,而 Newmaster 等^[24]却建议以 *rbcL* 作为条形码。国际生命条形码联盟于 2009 年对来自 550 个物种 907 个样品的 7 个序列 (*rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*) 分析比较后,提议将 *rbcL* + *matK* 组合作为植物界的通用条形码^[25]。Pennisi^[26]认为植物 DNA 条形码技术能否得到成功应用,关键在于合适片段的选择及其相关质量评价。Chen 等^[5]进行了相关研究并建议将

ITS2 作为药用植物的通用条形码序列。中国 DNA 条形码植物工作组通过对大量样本的 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*、ITS 以及 ITS2 序列进行研究, 分析比较后建议将 ITS/ITS2 作为种子植物的核心条形码^[27]。

ITS 具有较好的稳定性与准确性, 但是在对一些物种的鉴定中, ITS 并不能获得有效的鉴定结果。ITS2 序列的变异位点能够确保其鉴定能力, 维持物种鉴定的成功率, 从而能够鉴定种类繁多、数量庞大的中药基原植物。*matK* 难以进行扩增和测序, 引物通用性差, 不同植物类群通常需要使用不同的引物。*rbcL* 序列虽然具有通用、易扩增、易比对的优点, 但是在物种水平上的变异性不显著。*psbA-trnH* 比较容易设计通用引物, 并且具有高通用性、扩增成功率高的特点, 但是该片段在不同物种间间隔区的长度或拷贝的变异性较大, 存在过多的插入/缺失现象, 较难在大规模的样本间进行序列比对, 导致鉴别同属的植物物种较困难。

3.1 ITS

ITS (internal transcribed spacer) 为内转录间隔区, 是核糖体 RNA (rRNA) 基因非转录区的一部分。ITS 位于 18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因之间, 中部被 5.8S rRNA 基因一分为二, 即 ITS1 (the first internal transcribed spacer) 区和 ITS2 (the second internal transcribed spacer) 区。间隔区 ITS (ITS1 和 ITS2) 进化速率较快, 一般用于研究属间、种间甚至居群间等较低分类等级的系统关系。

在植物类药材的鉴定中, ITS 也体现了较好的稳定性与准确性。夏至等^[28] 针对菊属 (*Dendranthema*) 8 个物种 20 个样本的 ITS 序列进行 PCR 扩增和测序, 为了检验 ITS 的鉴别能力, 样品中除药用菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 和野菊 (*Dendranthema indicum* L.) 外, 还包含同属 6 种密切相关物种, 其研究结果表明, 药用菊花与其近缘种之间的遗传距离大于药用菊花种内的遗传距离; 野菊与其近缘种之间的遗传距离大于野菊种内的遗传距离; 在邻接 (NJ) 分子系统树上对药用菊花栽培类型的 7 个个体的鉴别率为 82%; 对野菊的 4 个个体的识别率为 78%。为了检验 ITS 鉴定的稳定性与准确性, 辛天怡等^[29] 以羌活 (*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang) 药材为

对象, 对 31 份样本的 ITS 序列进行 PCR 扩增和双向测序结果显示, ITS 序列种内平均 K2P 遗传距离小于其与混伪品的种间平均 K2P 遗传距离; NJ 系统树分析结果显示利用 ITS 可明显区分羌活、宽叶羌活 (*Notopterygium franchetii* H. de Boiss.) 及其混伪品。张乐等^[30] 对 ITS 序列的验证结果表明其可以用于沙苑子 (*Astragalus complanatus* R. Br.) 及其混伪品的鉴别。

尽管 ITS 对大多数物种能够提供准确的鉴别, 但是在某些物种的鉴定中, ITS 也未能获得有效的鉴定结果。Xiang 等^[31] 使用 131 个冬虫夏草 (*Ophiocordyceps sinensis*) 样本, 以及 12 个常见伪品和近缘物种分析和评估 ITS 是否能提供精确、快速的鉴定, 结果显示 ITS 具有充足的序列差异, 可以鉴定冬虫夏草及其伪品。Selvaraj 等^[32] 研究发现, ITS 可作为草药黄细心 (*Boerhavia diffusa* L.) 的条形码, 对黄细心及其密切相关的物种进行鉴别, 同时也可以验证其草药制品, 从而为黄细心的安全使用提供了保障。对于市场上售卖的芸香 (*Ruta graveolens* L.) 及其形态上极其相似的混伪品, ITS 也能够提供准确的鉴别^[33]。ITS 还能快速有效地区分黄芪 (*Radix Astragali*) 及其混伪品^[34]。Muellner 等^[35] 对楝科 DNA 条形码进行了筛选, 发现 ITS 具有较好的种间遗传距离, 在种内和种间的变异性上具有显著性差异, 适合作为楝科的 DNA 条形码。Roy 等^[36] 使用 ITS 对榕属 (*Ficus*) 和棉属 (*Gossypium*) 进行研究, 获得了 100% 的扩增率, 并能成功地鉴别这 2 个属中用于实验的所有物种, 然而, ITS 并非适用于所有种属, 对小檗属 (*Berberis*) 的鉴别就较困难。Gu 等^[37] 对药用植物女贞子 (*Fructus Ligustri Lucidi*) 的鉴定研究中, 利用女贞属 (*Ligustrum* L.) 的 20 个物种 92 个样品来分析比较 4 个区域片段 (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, ITS) 对女贞属的鉴别能力, 结果显示, 可以使用 ITS 作为条形码并结合 NJ 树和 MP 树方法来区分所有物种, 并且建议将 ITS 作为鉴定植物物种的 DNA 条形码。然而, 也有研究表明, 利用 ITS 可以准确鉴别崖爬藤属 (*Tetrastigma*) 中的 5 种药用植物, 尤其是三叶崖爬藤 (台湾崖爬藤 *Tetrastigma formosanum* (Hemsl.) Gagnep.), 但并不能鉴别出所有物种, 特别是喜马拉雅崖爬藤 (*Tetrastigma runcispersum* (Laws.) Planch.)^[38]; 还有人对 98

个科 326 个物种 400 个样品进行了分析研究, 仅获得 42.3% 的扩增成功率^[5]; 罗焜等^[39]对芸香科 72 属 192 种 300 个样本进行了研究, 发现 ITS 序列扩增效率很低, 难以对物种进行鉴定。

3.2 ITS2

ITS2 基因序列是去除 5.8S rRNA 序列和 28S rRNA 序列的核糖体 DNA 序列间隔区, 具有良好的通用性, 片段足够短并且易扩增、测序。

ITS2 序列在多个科属基原植物及植物类药材中的鉴定能力已得到大量的验证^[5,40], 能够鉴定种类繁多、数量庞大的药用植物及其密切相关的物种^[41]。并且 ITS2 的变异位点也足够确保其鉴定能力, 维持其鉴定物种的成功率^[42]。

研究者利用大量的植物材料对热点候选条形码序列进行了分析研究, 并提出 ITS2 最适合作为 DNA 条形码。罗焜等^[39]将目前热点候选序列 (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *rpoC1*, *ycf5*) 及 nrDNA ITS 序列与芸香科 72 属 192 种 300 个样本进行比较, 试图在同一科属具有较多近缘种的条件下, 真实判定各序列的鉴定能力, 结果表明, ITS2 的 PCR 扩增和测序成功率较高, 具有最大的种间变异和较小的种内变异, 且种内种间变异存在极显著差异, 各评价指标均优于其他候选序列, 并且物种鉴定成功率最高。Chen 等^[5]对 7 个候选 DNA 条形码 (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS2, ITS) 的 PCR 扩增效率、种内/种间遗传变异以及 barcoding gap 进行了分析比较, 并针对 ITS2 序列, 对 753 个属 4800 个物种 6600 多个样品进行研究, 评价其鉴定能力, 所鉴定的样品涉及范围广泛, 包括 7 个门 (被子植物门、裸子植物门、蕨类植物门、苔藓植物门、地衣、藻类和真菌), 结果显示 ITS2 在物种水平的鉴定效率高达 92.7%, 此研究结果表明 ITS2 是最适合的 DNA 条形码。在所研究的五加科 23 属 276 个物种中, ITS2 能成功鉴定 85% 的物种, 在属级水平上成功率达 97%, 因此研究者建议将 ITS2 作为五加科的条形码^[43]。条形码 ITS2 在果实类药材枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 的鉴定中, 能够成功的区分出枸杞物种^[44]。对于中国药典中记载的皮类药材, 该序列也能得到良好的鉴定效果^[45]。ITS2 可以有效地识别具有一定年限的、物种繁多的药用材料标本^[46]。DNA 条形码研究者建议将 ITS/ITS2

作为种子植物的通用条形码, 两者可以相互弥补^[5,27]。

在实际应用中, ITS2 能够成功鉴别植物类药材。王晓玥等^[47]针对豆蔻类 (*Amomi Fructus Rotundus*) 中药材利用 ITS2 序列进行扩增, 并对 PCR 产物进行双向测序, 所得序列经拼接后进行序列分析比对, 计算种内和种间距离, 构建邻接树, 结果表明 ITS2 序列作为 DNA 条形码可准确稳定地鉴别不同种豆蔻类药材。刘震等^[48]对忍冬科 13 属 33 个物种的 58 个样本进行分析, ITS2 序列在属级水平上的鉴定成功率为 100%, 在物种水平上的鉴定成功率为 96.6%。利用 ITS2 序列对海南茜草科黎药植物进行分子鉴定, 通过分析 ITS2 二级结构发现, 各 ITS2 的二级结构在种内无明显差异, 在种间存在明显差异; 种内变异和种间变异存在明显的 barcoding gap, 表明 ITS2 序列可以作为 DNA 条形码对海南茜草科黎药植物进行快速准确的分子鉴定^[49]。庞晓慧等^[50]利用 ITS2 对灯心草 (*Junci Medulla*) 药材及其密切相关物种进行 PCR 扩增和测序, 分析比较灯心草药材种内遗传距离, 结果表明 ITS2 序列可以有效区分灯心草及其密切相关物种。俞超等^[51]提取了 8 个贝母属 (*Fritillaria*) 21 个样品基因组 DNA 并进行 ITS2 序列的 PCR 扩增和测序, 结果显示 ITS2 序列的种内及种间遗传距离差异显著, 并且种内变异高度保守; ITS2 序列长度为 236 ~ 244 bp, 有信息位点 20 个 (占 8.2%), ITS2 序列所构建的 NJ 树准确度高, 鉴定成功率为 100%。对于中药蒲黄 (*Cattail Pollen*)、松花粉 (*Pine Pollen*) 及其混伪品, 中药材锁阳 (*Cynomorii Herba*) 及其混伪品, 用 ITS2 序列也能成功鉴别且具有较好的稳定性和准确性^[52,53]。庞晓慧等^[54]研究发现, ITS2 序列也能将中药麻黄 (*Ephedrae Herba*) 及其密切相关种成功鉴别; 而且 ITS2 序列对红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 和合欢 (*Albizia julibrissin* Durazz) 物种鉴定及其混伪品鉴别、中药制品的市场监管方面提供了准确、便利的方法^[55,56]。

3.3 *matK*

matK 基因是位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因 (*trnK*) 高度保守的 2 个外显子之间的内含子中, 序列长度约 1500 bp, 为单拷贝编码基因, 编码参与 RNA 转录本中 II 型内含子剪切的成熟酶 (matu-

rase)。matK 基因是叶绿体基因组中进化较快的基因之一, 进化速率介于 ITS 与 *rbcL* 之间。

matK 的通用性差的问题可以通过开发合适的引物来解决。matK 位于叶绿体 *trnK* 中, 其进化速率较快, 但难以进行扩增和测序, 引物通用性差, 不同植物类群通常需要使用不同的引物, 将 matK 作为条形码出现了争议。为了解决这些问题, Yu 等^[57] 分析比较了整个 matK 区域, 结果发现了一对命名为 matK472F 和 matK1248R 的引物适用于 matK 的扩增和测序, 而且具有足够的变异位点、极高的扩增率和测序成功率; 在对来自 47 科 58 种被子植物的测试实验中, 获得了 93.1% 的扩增率和 92.6% 的测序成功率, 指出这对引物将能解决使用 matK 时遇到通用性差的问题, 因此建议将 matK 作为被子植物的 DNA 条形码。Li 等^[58] 对来自 11 科 44 属的 57 个具代表性的裸子植物物种 (覆盖裸子植物 92% 的科, 大约占据 47% 的属) 进行研究, 使用 9 个 matK 候选引物对样品进行 PCR 扩增和测序, 结果发现 matK 具有较高的扩增率和测序成功率, 经过比较分析, 建议将 matK (Gym_F1A/Gym_R1A) 作为裸子植物的 DNA 条形码。

有些研究表明, matK 序列并不适合作为药用植物的 DNA 条形码。Newmaster 等^[59] 对肉豆蔻科毛楠属 (*Compsonera*) 的 8 个物种进行扩增, 测序结果表明, matK 不能作为它们的条形码。Fazekas 等^[60] 使用 matK 片段的 10 对不同引物, 对 32 属 92 种 251 个个体进行扩增, 结果仅获得 87.6% 的成功率。然而, Lahaye 等^[61] 使用 matK 的 390F/1326R 引物对所研究的 1667 个植物样本进行扩增, 结果获得了 100% 的扩增率, 并且可以正确鉴别 90% 以上的物种, 但是 Fazekas 等^[60] 采用 Lahaye 等介绍的方法进行研究, 却只获得了不到 50% 的扩增率。黄海等^[62] 对石斛属 (*Dendrobium*) 植物 DNA 条形码 (ITS、*rbcL*、matK、*trnH-psbA*) 进行筛选, 结果表明 matK 序列在种内和种间的变异没有显著性差异, 因此 matK 不适合作为石斛属的 DNA 条形码。Pang 等^[63] 对蔷薇科植物 DNA 条形码 (*rbcL*、matK、*rpoC1* 和 ITS) 进行了筛选, 结果表明 matK 的成功扩增率在 90% 以上, 但是难以进行测序。石春林等^[64] 对豆蔻属 (*Amomum*) 植物 36 个物种 46 个样本的 matK 进行扩增、测序以及序列分析, 成功鉴定了 82.1%

的物种, 表明 matK 不适合作为 DNA 条形码来鉴定豆蔻属药用植物。王娟等^[65] 使用 ITS、ITS2、matK、*rpoB*、*rpoC1* 和 *trnH-psbA* 序列对广西莪术 (*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang) 进行扩增和测序, 通过比较发现 matK 的测序和鉴定成功率虽然在 90% 以上, 但其种内和种间的变异性没有显著性差异, 因此不建议将 matK 作为广西莪术药用植物的候选 DNA 条形码序列。杨培等^[66] 对黄精属 (*Polygonatum* Mill.) 8 个物种 44 份样本进行了分析, 结果 matK 的成功扩增率仅为 64%, 种内与种间变异较小, 无明显的 bar-coding gap。罗焜等^[39] 对芸香科 72 属 192 种 300 个样本进行了研究, 发现 matK 序列扩增成功率过低以致无法进行后续的数据分析。Gao 等^[67] 在菊科植物中获得了 91% 的扩增和测序成功率, 但不能成功鉴定物种。matK 序列是植物叶绿体 DNA 中进化较快的一条编码区序列, 虽然是多位研究者推荐的条形码序列之一, 但是 matK 序列在忍冬科植物中几乎无法扩增成功, 而采用 Lahaye 等^[61] 介绍的 390/1326R 引物仅成功扩增到 2 个物种。90% 的被子植物样本和 83% 的裸子植物样本能被成功扩增和测序^[25]; Sun 等^[68] 发现 matK 在薯蓣属 (*Dioscorea*) 植物中也具有较好的鉴定效果。朱英杰等^[69] 对重楼属 (*Paris*) 植物的研究表明, matK 序列的扩增效率为 82.4%, 但需要进行 2 次 PCR, 最终只能鉴定出重楼属 52.9% 的物种。

3.4 *rbcL*

rbcL 位于植物叶绿体基因组的大单拷贝区, 序列长度约 1400 bp, 编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶大亚基, 在不同植物类群中的进化速率有着较大的差异。

虽然 *rbcL* 片段对有些物种难以进行有效的鉴别, 但是研究者可以充分探索 *rbcL* 序列的变异性 and 它的鉴定能力, 通过对引物设计的改进, 使 *rbcL* 更适合作为 DNA 条形码。*rbcL* 序列虽然具有通用、易扩增、易比对的优点, 但是自从其被提出作为候选 DNA 条形码以来, 因其在物种水平上的变异性不显著, 而遭到广泛的质疑, 事实上人们还从未在所有植物类群中 (从藻类到有花植物) 充分探索 *rbcL* 序列的变异性 and 它作为条形码的鉴定能力。Dong 等^[70] 通过对绿藻门、轮藻门、苔藓植物、蕨类植物和被子植物等 6 门中被提

议作为 DNA 条形码的 *rbcL* 序列的比较分析, 结果表明 *rbcL* b 序列具有良好的通用性、较好的序列质量以及较好的物种鉴别能力, 可作为通用的植物条形码。Li 等^[58] 利用 *rbcL* 对来自 11 科 44 属的 57 个具代表性的裸子植物物种进行扩增, 获得了 100% 的扩增率, 表明 *rbcL* 普遍存在于裸子植物中。Gao 等^[67] 对菊科植物开展了主要 DNA 条形码鉴定研究, 结果显示 *rbcL* 的扩增和测序成功率为 85%, 但是种间变异不显著。在对忍冬科 5 属 15 个物种 26 个样本的研究中, 选取了 4 个序列进行比较研究, 虽然 PCR 扩增效率为 88.5%, 测序成功率达到 100%, 但在种内种间变异分析中发现其种内变异小, 甚至种间变异也很小, 难以对物种进行区分鉴定^[48], 但在棕榈科的鉴定中却获得了 90% 的鉴定成功率^[71]。变异位点及信息位点数可反映所分析材料的碱基变异程度, 而碱基变异程度是衡量鉴别物种的依据之一, 若序列较保守, 缺乏足够的信息位点, 则无法准确鉴定物种。在石斛属药用植物相关研究中, 黄海等^[62] 研究发现, *rbcL* 序列没有明显的 barcoding gap, 序列种内和种间变异重复较多, 而且序列的种间变异偏小。在千斤拔属 (*Flemingia*) 4 个物种 14 份样本中, *rbcL* 序列在所分析的样品中获得了 100% 的扩增成功率; 在测序成功率方面, 该序列的测序成功率也为 100%。对序列的变异位点及信息位点进行统计可知, *rbcL* 的变异位点相对较多 (385 个), 但其中信息位点仅为 5 个, 所提供的物种鉴别信息极为有限^[72]。朱英杰等^[69] 对重楼属 (*Paris*) 药用植物的研究中, *rbcL* 序列种内和种间遗传变异重叠比例大, 不利于区分物种。陈一龙等^[73] 对茜草 (*Rubia cordifolia* L.) 及其混伪品的鉴别实验中, *rbcL* 并不能将茜草及其同属其他物种成功鉴别。虽然 *rbcL* 片段对有些物种难以进行有效的鉴别, 但是研究者仍然可以通过对引物设计的改进, 使 *rbcL* 容易获取, 非常适合用于获得高质量的双向测序, 适合用于与其它序列片段组合^[25]。

3.5 *psbA-trnH*

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, 该区间进化速率较快, 常用于植物属间、种间的系统发育研究。

尽管 *psbA-trnH* 序列具有良好的通用性, 然而该片段在不同物种间的长度或变异性变化较大,

导致较难鉴别植物物种。*psbA-trnH* 是叶绿体间隔区 (非编码区) 中的一个片段, 在植物中进化速率较快。其平均长度多数在 400 ~ 700 bp, 长度适宜, 两端存在保守序列, 较容易设计通用引物, 并且该片段的引物具有高通用性、扩增成功率高的特点^[74]。但是该片段不同物种间间隔区的长度或拷贝的变异性较大, 序列长度变化区间为 296 ~ 1120 bp, 另外该序列存在过多的插入/缺失现象, 较难在大规模的样本间进行序列比对^[61], 导致鉴别植物物种较困难。刘震等^[48] 研究发现, *psbA-trnH* 序列在忍冬属 (*Lonicera*) 中具有很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%, 在属级和种级水平上该序列鉴定成功率分别为 100% 和 75.0%。并且该序列能鉴别 70% 的毛楠属 (*Compsonura*) 植物^[59], 也能实现对中药材八角茴香 (*Illicium verum* Hook. f.) 及其混伪品的成功鉴别^[75], 冯杉杉等^[76] 建议使用 *psbA-trnH* 序列来鉴别威灵仙 (*Radix et Rhizoma Clematidis*) 药材及其伪品。DNA 条形码都面临着难以鉴别近源物种的问题, 一个理想的 DNA 条形码序列需要有足够的变异, 其种间变异应明显大于种内变异^[77]。张忠廉等^[72] 在对千斤拔属 (*Flemingia*) 药用植物进行 DNA 条形码筛选中发现 *psbA-trnH* 序列, 其变异位点及信息位点数均较多 (148/270), 根据序列的变异位点数及信息位点数, 他们认为 *psbA-trnH* 序列对千斤拔属的物种鉴定能力有限。黄海等^[62] 在石斛属 (*Dendrobium*) 物种的鉴定实验中, 所使用的序列没有明显的 barcoding gap, 序列种内和种间变异重复较多, 也不能有效鉴别不同种类的石斛。

部分物种的 *psbA-trnH* 序列具有 polyA/T 结构, 使得该片段不能得到广泛的应用。该序列难以进行双向测序, 主要原因是单核苷酸高频率的重复, 干扰了测序的进行^[25]。Wu 等^[78] 在主要针对马兜铃科的 13 个科 24 属 79 个种 289 个样本的研究中, 发现 *psbA-trnH* 虽然可以成功鉴定物种, 但是由于存在大量的 poly (A) 结构域尾巴, 导致序列测序难以进行。虽然能完全扩增成功, 但是测序成功率较低, 并且 *psbA-trnH* 的种内最大变异超过了种间最小变异^[69]。Gao 等^[79] 在对豆科常用药用植物鉴别研究中, 利用 *psbA-trnH* 序列对 152 个样品进行扩增测序, 这些样品包含豆科 60 属

104 种药用植物，包括 25 个中国药典上记载的易于混淆的豆科物种，研究表明，*psbA-trnH* 具有良好的普遍性和变异性，PCR 扩增的效率和测序成功率分别为 98.9%和 77.4%，分析 *psbA-trnH* 序列显示可鉴定 91.3%的物种，在 *psbA-trnH* 序列比对实验中没有遇到相应的困难。然而，有大约 11.4%的测序质量差，主要是因为 polyA/T 结构的存在。因此，使用 *psbA-trnH* 作为标准条形码需要改进测序技术，以获得更高质量的序列。*psbA-trnH* 序列在豆科物种鉴定研究中，其长度为 249 ~ 515 bp，并且种间和种内变异差异显著，因此是一种理想的 DNA 条形码^[79]。Ma 等^[80]选取 5 个候选 DNA 条形码序列（*rbcL*，*matK*，*rpoB*，*rpoC1*，*psbA-trnH* 基因间隔区）对来自 24 个科 51 种的 79 个蕨类药用植物样品进行鉴定，结果表明 *psbA-*

trnH 序列具有最大的种间差异，鉴定成功率为 90.2%。Jiang 等^[81]建议将 *psbA-trnH* 序列作为淫羊藿属 (*Epimedium*) 的 DNA 条形码。

在此，笔者对以上各序列研究各药用植物或草药成功案例进行了归纳总结并列于表 1。

4 药用植物 DNA 条形码鉴定的展望

DNA 条形码技术在动物物种鉴定中得到了广泛应用，在植物物种鉴定研究中快速发展，其技术日益成熟，能够更加客观、精确、简便地对物种进行鉴定。大量研究表明，并不能找到对所有物种进行鉴定的植物 DNA 条形码。依据形态分类学对类群进行鉴定是开展植物 DNA 条形码研究的基础，而植物 DNA 条形码也可以检验传统分类鉴定，但目前二者还未能有机结合使用。并且目前针对植物

表 1 近年来主要研究的药用植物科、属、种或草药及其对应的 DNA 条形码
Table 1 Recent research on herbs and medicinal plant species, genera, and families, and the corresponding DNA barcodes

片段 Sequence	科 Family	属 Genus	种/草药 Specie/Herbs
ITS2	姜科 Zingiberaceae ^[13]	贝母属 <i>Fritillaria</i> ^[40]	贝母 <i>Fritillariae</i> Bulbus ^[85]
	菊科 Asteraceae ^[67]	重楼属 <i>Paris</i> ^[69]	白术 <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz.、 苍术 <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. ^[21]
	茜草科 Rubiaceae ^[38]	灯心草属 <i>Juncus</i> ^[39]	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver ^[20]
	忍冬科 Caprifoliaceae ^[37]	豆蔻属 <i>Amomum</i> 、山姜属 <i>Alpinia</i> ^[36]	莪术 <i>Curcuma zedoaria</i> (Christm.) Rosc ^[65]
	五加科 Araliaceae ^[32]	豆蔻属 <i>Amomum</i> ^[64]	枸杞 <i>Lycium barbarum</i> L. ^[33]
	芸香科 Rutaceae ^[31]	麻黄属 <i>Ephedra</i> ^[43]	红景天 <i>Rhodiola rosea</i> L. ^[45]
		曼陀罗属 <i>Datura</i> ^[82]	合欢皮 <i>Albiziae</i> Cortex、合欢花 <i>Albiziae</i> Flos ^[44]
		千斤拔属 <i>Flemingia</i> ^[72]	鸡骨草 <i>Abri</i> Herba、独活 <i>Angelicae pubescentis</i> Radix、降香 <i>Dalbergiae odoriferae</i> Lignum、合欢皮 <i>Albiziae</i> Cortex ^[22]
			秦艽 <i>Gentianae macrophyllae</i> Radix ^[86]
			蒲黄 <i>Cattail</i> Pollen、松花粉 <i>Pine</i> Pollen ^[41]
ITS	楝科 Meliaceae ^[53]	菊属 <i>Dendranthema</i> ^[46]	锁阳 <i>Cynomorii</i> Herba ^[42]
		女贞属 <i>Ligustrum</i> ^[55]	冬虫夏草 <i>Ophiocordyceps sinensis</i> ^[49]
		羌活属 <i>Notopterygium</i> ^[47]	黄细心 <i>Boerhavia diffusa</i> L. ^[50]
		沙芥属 <i>Pugionium</i> ^[83]	黄芪 <i>Radix astragali</i> ^[52]
		崖爬藤属 <i>Tetrastigma</i> ^[56]	芸香 <i>Ruta graveolens</i> L. ^[51]
ITS + <i>trnH-psbA</i>		榕属 <i>Ficus</i> 、棉属 <i>Gossypium</i> ^[54]	沙苑子 <i>Astragalus complanatus</i> R. Br. ^[48]
<i>matK</i> + ITS		梅花草属 <i>Parnassia</i> ^[19]	
<i>matK</i>		龙胆属 <i>Gentiana</i> ^[84]	
<i>rbcL</i>	棕榈科 Palmae ^[71]	薯蓣属 <i>Dioscorea</i> ^[68]	
<i>psbA-trnH</i>	豆科 Leguminosae ^[79]	淫羊藿属 <i>Epimedium</i> ^[81]	八角茴香 <i>Illicium verum</i> Hook. f. ^[75] 威灵仙 <i>Radix et Rhizoma Clematidis</i> ^[76]

注：表中的“科”、“属”、“种”并无从属性，也没有相关性，只是为了反映近年来主要研究的药用植物各科、不同属和各物种所适用的 DNA 条形码。
Note: There were no correlations and subordinates in the families, genera, and species. They were used to reflect the applicable DNA barcodes of main medicinal plants in families, genera and species in recent research.

具体类群的研究较少, 仅以有限的物种种类作为相应科或属的代表, 使得许多 DNA 片段尽管在某些特定科属中的鉴别效率较高, 但在鉴别更多物种时, 成功率就会显著下降。目前 ITS2 序列是发现的较适合的条形码, ITS2 序列能够鉴定种类繁多、数量庞大的药用植物。这一发现将为非分类专业的植物研究者提供快速准确的鉴定方法, 从而对药用植物进行正确的鉴定分类, 有望在不久的将来建立药用植物条形码数据库, 这将有助于弥补传统方法鉴定药用植物和植物类药材的缺陷, 实现中药材的快速检索和鉴定。

尽管目前的研究表明 ITS2 最适合作为药用植物 DNA 条形码, 但还需要针对具体类群进行更深入地研究, 注重亲缘关系较近的亚种或近缘种的比较, 还需要选择和评价可能的 DNA 条形码 (如 *rbcL*、*matK*), 并且进行大规模的分析和整体评价。另外, 也需要加强研究力度, 进一步开发出针对某些特殊序列的研究分析方法 (如: *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*), 以期找到更适合的药用植物 DNA 条形码, 从而构建更完整的公共序列数据库, 最终使快速有效的 DNA 条形码技术越来越实用。

通过 DNA 条形码技术对药用植物的鉴定, 丰富了人们对中药材鉴定的认识, 提高了对药材品质、来源等的评价水平, 促进了我国中药鉴定的进一步发展, 但是在发展 DNA 条形码技术的同时, 还要对传统鉴定方法进行研究和完善, 促进二者的结合和协同发展。这样, 才能使 DNA 条形码技术能够完善药用植物的标准化鉴定体系, 提高中药鉴定的科学性, 逐步引导中药鉴定走向高标准、高效率、信息化的新时代。

参考文献:

- [1] Li DZ, Liu JQ, Chen ZD, Wang H, Ge XJ, Zhou SL, Gao LM, Fu CX, Chen SL. Plant DNA barcoding in China[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 165–168.
- [2] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 韩建萍, 罗焜. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13(5): 747–754.
Chen SL, Pang XH, Yao H, Han JP, Luo K. Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia medica[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica—World Science and Technology*, 2011, 13(5): 747–754.
- [3] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313–321.
- [4] Chen SL, Pang XH, Song JY, Shi LC, Yao H, Han JP, Leon C. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237–1244.
- [5] Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, Shi LC, Zhu YJ, Ma XY, Gao T, Pang XH, Luo K, Li Y, Li XW, Jia XC, Lin YL, Leon C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e8613.
- [6] Wang LL, Kong WJ, Yang MH, Han JP, Chen SL. Safety issues and new rapid detection methods in traditional Chinese medicinal materials[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 38–46.
- [7] 陈科力, 黄林芳, 刘义梅. 中药鉴定方法学发展历程[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1203–1208.
Chen KL, Huang LF, Liu YM. Development history of methodology of Chinese medicines' authentication[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(7): 1203–1208.
- [8] 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 严铸云, 罗光明, 孙素琴, 吴和珍, 黄林芳, 庞晓慧, 陈建波. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1043–1055.
Chen SL, Guo BL, Zhang GJ, Yan ZY, Luo GM, Sun SQ, Wu HZ, Huang LF, Pang XH, Chen JB. Advances of studies on new technology and method for identifying traditional Chinese medicinal materials[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(8): 1043–1055.
- [9] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 原超, 李雪童, 刘占林. 地黄属植物的 DNA 条形码研究[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 25–32.
Chen FT, Li ZH, Liu CY, Yuan C, Li XT, Liu ZL. DNA barcoding of the genus *Rehmannia* (Scrophulariaceae)[J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(1): 25–32.
- [10] Galimberti A, Mattia FD, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M. DNA barcoding as a new tool for food traceability[J]. *Food Res Int*, 2013, 50: 55–63.
- [11] Li XW, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang YT, Chen SL. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. *Biol Rev*, 2015, 90: 157–166.
- [12] 辛天怡, 李西文, 姚辉, 韩建萍, 宋经文, 陈士林. 中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(7): 695–702.
Xin TY, Li XW, Yao H, Han JP, Song JY, Chen SL. A two-dimensional DNA barcode system for circulation regulation of traditional Chinese medicine[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2015, 45(7): 695–702.
- [13] Shi LC, Zhang J, Han JP, Song HY, Yao H, Zhu YJ, Li

- JC, Wang ZZ, Xiao W, Lin YL, Xie CX, Qian ZZ, Chen SL. Testing the potential of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae [J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 261–266.
- [14] Liu J, Moller M, Gao LM, Zhang DQ, Li DZ. A test of seven candidate barcode regions from the plastome in *Picea* (Pinaceae) [J]. *Mol Ecol Res*, 2011, 11: 89–100.
- [15] Ran JH, Wang PP, Zhao HJ, Wang XQ. A test of seven candidate barcode regions from the plastome in *Picea* (Pinaceae) [J]. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(12): 1109–1126.
- [16] Zhang J, Chen M, Dong XY, Lin LZ, Fan JH, Chen ZD. Evaluation of four commonly used DNA barcoding loci for Chinese medicinal plants of the family Schisandraceae [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e125574.
- [17] Zhang CY, Wang FY, Yan HF, Hao G, Hu CM, Ge XJ. Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (Myrsinaceae) [J]. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12: 98–108.
- [18] Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(4): 594–605.
- [19] Yang JB, Wang YP, Moller M, Gao LM, Wu D. Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae) [J]. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12: 267–275.
- [20] 彭梓, 朱金国, 谭建锡, 王利兵. 基于 ITS2 序列的杜仲及其主要混伪品的鉴定 [J]. *中草药*, 2013, 44(21): 3042–3047.
- Peng Z, Zhu JG, Tan JX, Wang LB. Identification of *Eucommia ulmoides* and its adulterants based on ITS2 sequences [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(21): 3042–3047.
- [21] 余亚东, 石林春, 马晓冲, 孙伟, 叶萌, 向丽. 白术与苍术及其混伪品 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(12): 2194–2198.
- Xu YD, Shi LC, Ma XC, Xun W, Ye M, Xiang L. Identification of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma and *Atractylodis* Rhizoma from their adulterants using DNA barcoding [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(12): 2194–2198.
- [22] Han JP, Pang XH, Liao BS, Yao H, Song JY, Chen SL. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18723.
- [23] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *PNAS*, 2005, 102(23): 8369.
- [24] Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, 84(3): 335–341.
- [25] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *PNAS*, 2009, 106: 12794–12797.
- [26] Pennisi E. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, 2007, 318: 190–191.
- [27] Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chenn SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *PNAS*, 2011, 108(49): 19641–19646.
- [28] 夏至, 李家美, 张红瑞, 李贺敏, 高致明. 中药材菊花和野菊花的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(8): 1902–1905.
- Xia Z, Li JM, Zhang HR, Li HM, Gao ZM. Applying DNA barcoding technique to identify *Chrysanthemi Flos* and *Chrysanthemi Indici Flos* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(8): 1902–1905.
- [29] 辛天怡, 姚辉, 罗焜, 向丽, 马晓冲, 韩建萍, 林余霖, 宋经元, 陈士林. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究 [J]. *药学报*, 2012, 47(8): 1098–1105.
- Xin TY, Yao H, Luo K, Xiang L, Ma L, Ma XC, Han JP, Lin YL, Song JY, Chen SL. Stability and accuracy of the identification of *Notopterygii Rhizoma et Radix* using the ITS/ITS2 barcodes [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(8): 1098–1105.
- [30] 张乐, 朱虹, 韦坤华, 张春红, 李旻辉. 沙苑子与其混伪品的 ITS 序列分子鉴别研究 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(7): 668–682.
- Zhang L, Zhu H, Wei KH, Zhang CH, Li MH. Molecular identification of *Astragalus complanatus* and its adulterants by ITS sequences [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2015, 17(7): 668–682.
- [31] Xiang L, Song JY, Xin TY, Zhu YJ, Shi LC, Xu XL, Pang XH, Yao H, Li WJ, Chen SL. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 347: 156–162.
- [32] Selvaraj D, Shanmuganandhan D, Sarma RK, Joseph JC, Srinivasan RV, Ramalingam S. DNA barcode ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Boerhavia diffusa* from its adulterants [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2012, 10: 364–367.
- [33] Al-Qurainy F, Khan S, Tarroum M, Al-Hemaid FM, Ali MA. Molecular authentication of the medicinal herb *Ruta graveolens* (Rutaceae) and an adulterant using nuclear and chloroplast DNA markers [J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(4): 2806–2816.
- [34] Zheng SH, Liu DW, Ren WG, Fu J, Huang LF, Chen SL. Integrated analysis for identifying *Radix Astragali* and its adulterants based on DNA barcoding [J]. *Evid-Based*

- Compl Alt*, 2014, 2014: 843923.
- [35] Muellner AN, Schaefer H, Lahaye R. Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae) [J]. *Mol Ecol Res*, 2011, 11: 450–460.
- [36] Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM, Chaudhary LB, Datt B, Bag SK, Singh PK, Nair NK, Husain T, Tuli R. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study with Indian *Berberis* species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13674.
- [37] Gu J, Su JX, Lin RZ, Li RQ, Xiao PG. Testing four proposed barcoding markers for the identification of species within *Ligustrum* L. (Oleaceae) [J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 213–224.
- [38] Fu YM, Jiang WM, Fu CX. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques [J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 237–245.
- [39] 罗焜, 陈士林, 陈科力, 宋经元, 姚辉, 马新业, 朱英杰, 庞晓慧, 余华, 李西文, 刘震. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 342–358.
- Luo K, Chen SL, Chen KL, Song JY, Yao H, Ma XY, Zhu YJ, Pang XH, Yu H, Li XW, Liu Z. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, 40(4): 342–358.
- [40] Yao H, Song JY, Liu C, Luo K, Han JP, Li Y, Pang XH, Xu HX, Zhu YJ, Xiao PG, Chen SL. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13102.
- [41] Pang XH, Shi LC, Song JY, Chen XC, Chen SL. Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3): 571–575.
- [42] Song JY, Shi LC, Li DZ, Sun YZ, Niu YY, Chen ZD, Luo HM, Pang XH, Sun ZY, Liu C, Lv AP, Deng YP, Larson-Rabin Z, Wilkinson M, Chen SL. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43971.
- [43] Liu ZH, Zeng X, Yang D, Chu GY, Yuan ZR, Chen SL. Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae [J]. *Gene*, 2012, 499(1): 76–80.
- [44] Xin TY, Yao H, Gao HH, Zhou XZ, Ma XC, Xu CQ, Chen J, Han JP, Pang XH, Xu R, Song JY, Shi LC. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode [J]. *Food Res Int*, 2013, 54(2): 1699–1704.
- [45] Sun ZY, Chen SL. Identification of cortex herbs using the DNA barcode nrITS2 [J]. *J Nat Med*, 2013, 67: 296–302.
- [46] Han JP, Zhu YJ, Chen XC, Liao CS, Yao H, Song JY, Chen SL, Meng FY. The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS [J]. *BioMed Res Int*, 2013, 2013: 741476.
- [47] 王晓明, 陈晓辰, 廖保生, 王丽丽, 韩建萍. 基于 DNA 条形码鉴定豆蔻类中药材 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(11): 888–894.
- Wang XY, Chen XC, Liao BS, Wang LL, Han JP. Identification of *Amomi Fructus Rotundus* based on DNA barcoding [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2014, 16(11): 888–894.
- [48] 刘震, 陈科力, 罗焜, 潘宏林, 陈士林. 忍冬科药用植物 DNA 条形码通用序列的筛选 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2527–2532.
- Liu Z, Chen KL, Luo K, Pan HL, Chen SL. DNA barcoding in medicinal plants Caprifoliaceae [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(19): 2527–2532.
- [49] 李栎, 肖憬, 苏振宇, 黄瑶, 唐历波. ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 43(13): 1814–1818.
- Li L, Xiao J, Su ZY, Huang Y, Tang LB. Identification of Li Medicine plants in Rubiaceae using ITS2 barcode sequence [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 43(13): 1814–1818.
- [50] 庞晓慧, 宋经元, 陈士林. 应用 DNA 条形码技术鉴定中药材灯心草 [J]. 中国中药杂志, 2012a, 37(8): 1097–1099.
- Pang XH, Song JY, Chen SL. Identification of *Junci Medulla* using DNA barcoding technique [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012a, 37(8): 1097–1099.
- [51] 俞超, 梁孝祺, 陈金金, 盛梦俊, 冯亚斌, 王忠华. DNA 条形码技术鉴定贝母属植物 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1613–1619.
- Yu C, Liang XQ, Chen JJ, Sheng MJ, Feng YB, Wang ZH. Identification of plants in *Fritillariae* L. by DNA barcoding technology [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(11): 1613–1619.
- [52] 马孝熙, 孙伟, 任伟超, 向丽, 赵博, 张雅琴, 宋明, 慕泽涇, 陈士林. 蒲黄、松花粉等花粉类药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2189–2193.
- Ma XX, Sun W, Ren WC, Xiang L, Zhao B, Zhang YQ, Song M, Mu ZJ, Chen SL. Identification of cattail pollen (Puhuang), pine pollen (Songhuafen) and its adulterants by ITS2 sequence [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(12): 2189–2193.
- [53] 侯典云, 宋经元, 石林春, 杨培, 陈士林, 姚辉. 中药材锁阳的 ITS2 条形码分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4028–4032.
- Hou DY, Song JY, Shi LC, Yang P, Chen SL, Yao H. Molecular identification of *Cynomorii* Herba using ITS2 DNA

- barcoding[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(23): 4028–4032.
- [54] 庞晓慧, 宋经元, 徐海滨, 姚辉. 应用 ITS2 条形码鉴定中药材麻黄[J]. *中国中药杂志*, 2012b, 37(8): 1118–1121.
Pang XH, Song JY, Xu HB, Yao H. Using ITS2 barcode to identify *Ephedrae Herba*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012b, 37(8): 1118–1121.
- [55] 赵莎, 庞晓慧, 宋经元, 陈士林. 应用 ITS2 条形码鉴定中药材合欢皮、合欢花及其混伪品[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(12): 2164–2168.
Zhao S, Pang XH, Song JL, Chen SL. Identification of *Albiziae Cortex*, *Albiziae Flos* and their adulterants using ITS2 barcoding [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(12): 2164–2168.
- [56] Xin TY, Li XJ, Yao H, Lin YL, Ma XC, Cheng RY, Song JY, Ni LH, Chen SL, Fan CZ. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8337.
- [57] Yu J, Xue JH, Zhou SL. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 176–181.
- [58] Li Y, Gao LM, Poudel RC, Li DZ, Forrest A. High universality of matK primers for barcoding gymnosperms[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 169–175.
- [59] Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae[J]. *Mol Ecol Resour*, 2008, 8: 480–490.
- [60] Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH. Multiple multilocus DNA Barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well[J]. *PloS One*, 2008, 3: e2802.
- [61] Lahaye R, Bank MVD, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. *PNAS*, 2008, 105: 2923–2928.
- [62] 黄海, 李劲松, 符岸军, 严海. 石斛属植物 DNA 条形码序列的筛选[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(10): 1769–1777.
Huang H, Li JS, Fu AJ, Yan H. Screening of potential DNA barcoding markers in *Dendrobium*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(10): 1769–1777.
- [63] Pang XH, Song JY, Zhu YJ, Xu HX, Huang LF, Chen SL. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification[J]. *Cladistics*, 2011, 27: 165–170.
- [64] 石林春, 宋经元, 陈士林, 姚辉, 韩建平. 豆蔻属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. *世界科学技术——中医药现代化*, 2010, 12(3): 473–479.
Shi LC, Song JY, Chen SL, Yao H, Han JP. Identification of *Amomum* (Zingiberaceae) through DNA barcodes[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica—World Science and Technology*, 2010, 12(3): 473–479.
- [65] 王娟, 侯艳芳, 白准, 付明磊, 曾建红, 黄凤香, 刁珂, 陈旭. 广西莪术 DNA 条形码通用序列的筛选[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1): 100–103.
Wang J, Hou YF, Bai Z, Fu ML, Zeng JH, Huang FX, Diao K, Chen X. Screening the universal sequence of DNA barcodes in *Curcuma kwangsiensis*[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2015, 30(1): 100–103.
- [66] 杨培, 周红, 辛天怡, 马双姣, 段宝忠, 姚辉. 黄精属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. *世界中医药*, 2015, 10(8): 1173–1176.
Yang P, Zhou H, Xin TY, Ma SJ, Duan BZ, Yao H. Identification study of DNA barcode sequences in the medicinal plants of *Polygonatum*[J]. *World Chinese Medicine*, 2015, 10(8): 1173–1176.
- [67] Gao T, Yao H, Song JY, Zhu YJ, Liu C, Chen SL. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family[J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324.
- [68] Sun XQ, Zhu YJ, Guo JL, Peng B, Bai MM, Hang YY. DNA Barcoding the *Dioscorea* in China, a vital group in the evolution of monocotyledon: use of matK gene for species discrimination[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32057.
- [69] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 谭睿, 宋经元, 罗焜, 鲁静. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. *药学报*, 2010, 45(3): 376–382.
Zhu YJ, Chen SL, Yao H, Tan R, Song JY, Luo K, Lu J. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(3): 376–382.
- [70] Dong WP, Cheng T, Li CH, Xu C, Long P, Chen CM, Zhou SL. Discriminating plants using the DNA barcode rbcL b: an appraisal based on a large data set[J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(2): 336–343.
- [71] Naeem A, Khan AA, Cheema HMN, Khan LA, Buerkert A. DNA barcoding for species identification in the Palmae family[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 10341–1034.
- [72] 张忠廉, 宋美芳, 李海涛, 管燕红, 牛迎凤, 马小军, 张丽霞. 千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. *中草药*, 2015, 46(1): 118–122.
Zhang ZL, Song MF, Li HT, Guan YH, Niu YF, Ma XJ, Zhang LX. Identification of DNA barcoding on medicinal plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(1): 118–122.
- [73] 陈一龙, 范刚, 刘悦, 宋驰, 张艺, 向丽, 赖先荣. 茜草及其混伪品 DNA 条形码鉴定[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(15): 1266–1272.
Chen YL, Fan G, Liu Y, Song C, Zhang Y, Xiang L, Lai XR. Identification of traditional Chinese medicine *Rubiae*

- Radix et and its adulterants using DNA barcodes[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50(15): 1266–1272.
- [74] Pang XH, Liu C, Shi LC, Liu R, Liang D, Li H, Cherny SS, Chen SL. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48833.
- [75] Liu MZ, Yao H, Luo K, Ma P, Zhou WB, Liu P. Authentication of *Illicium verum* using a DNA barcode *psbA-trnH* [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(16): 3156–3161.
- [76] 冯杉杉, 郑司浩, 李亚康, 黄林芳. 中药材威灵仙及其伪品 DNA 条形码鉴别研究[J]. *药学报*, 2014, 49(2): 260–266.
- Feng SS, Zheng SH, Li YK, Huang LF. Identification of Radix et Rhizoma *Clematidis* and its adulterants using DNA barcoding[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(2): 260–266.
- [77] Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *tpsba-trnH* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 6: e508.
- [78] Wu L, Sun W, Wang B, Zhao HY, Li YL, Cai SQ, Xiang L, Zhu YJ, Yao H, Song JY, Cheng YC, Chen SL. An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11318.
- [79] Gao T, Ma XY, Zhu XZ. Use of the *psbA-trnH* region to authenticate medicinal species of Fabaceae [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(12): 1975–1979.
- [80] Ma XY, Xie CX, Liu C, Song JY, Yao H, Luo K, Zhu YJ, Gao T, Pang XH, Qian J, Chen SL. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11): 1919–1924.
- [81] Jiang Y, Ding CB, Zhang L, Yang RW, Zhou YH, Tang L. Identification of the genus *Epimedium* with DNA barcodes[J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(28): 6413–6417.
- [82] 吴亚男, 许亮, 陈靓, 王冰, 赵容. 基于 ITS2 条形码的曼陀罗属药用植物 DNA 分子鉴定[J]. *中草药*, 2015, 38(9): 1852–1857.
- Wu YN, Xu L, Chen L, Wang B, Zhao R. DNA molecular identification of *Datura* medicinal plants using ITS2 barcode sequence [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 38(9): 1852–1857.
- [83] Wang Q, Yu QS, Liu JQ. Are nuclear loci ideal for barcoding plants? A case study of genetic delimitation of two sister species using multiple loci and multiple intraspecific individuals[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 182–188.
- [84] Liu J, Yan HF, Ge XJ. The use of DNA barcoding on recently diverged species in the genus *Gentiana* (Gentianaceae) in China [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153008.
- [85] Xiang L, Su YY, Li XW, Xue G, Wang Q, Shi JL, Wang LZ, Chen SL. Identification of *Fritillariae bulbus* from adulterants using ITS2 regions[J]. *Plant Gene*, 2016, 7: 42–49.
- [86] 罗焜, 马培, 姚辉, 辛天怡, 胡燕, 郑司浩, 黄林芳, 刘军, 宋经元. 多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究[J]. *药学报*, 2012, 47(12): 1710–1717.
- Luo K, Ma P, Yao H, Xin TY, Hu Y, Zheng SH, Huang LF, Liu J, Song JY. Identification of *Gentianae Macrophyllae* Radix using the ITS2 barcodes[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(12): 1710–1717.

(责任编辑: 张 平)