

• 综 述 •

DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展

张彩云¹, 黄珊珊¹, 颜海飞^{2*}

1. 广东食品药品职业学院 广东省中药研究所, 广东 广州 510520

2. 中国科学院华南植物园 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室 广东省应用植物学重点实验室, 广东 广州 510650

摘 要: DNA 条形码 (DNA barcoding) 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。总结了植物 DNA 条形码研究的发展历程及最新进展, 重点讨论了超级条形码在近缘物种鉴别中的应用前景, 以及 DNA 条形码在中药材基原物种鉴定、道地药材鉴别以及中药材溯源系统研究中的应用, 并强调了植物 DNA 条形码在中药资源评价、保护和可持续利用中的重要地位和作用, 为药用植物 DNA 条形码研究提供新的思路。

关键词: DNA 条形码; 道地药材; 分子鉴定; 叶绿体基因组; 超级条形码

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)11-2306-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.026

Applications of DNA barcoding in Chinese materia medica identification

ZHANG Cai-yun¹, HUANG Shan-shan¹, YAN Hai-fei²

1. Guangdong Institute of Chinese Materia Medica, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstract: DNA barcoding involves the standardized use of one or a few DNA regions to tell species apart. It represents a hotspot of biological studies and one of the most rapid development directions of biology in recent years. Herein, we reviewed the development and current advances of plant DNA barcoding, focusing on the prospect of ultra-barcode in the identification of closely related species; The applications of DNA barcodes in the identification of traditional Chinese herbal medicine, the identification of genuine medicinal material and medicine traceability system. We also emphasized that the plant DNA barcoding will play an important role in the evaluation, protection and sustainable utilization of traditional Chinese medicine resources. This review may offer a new idea for the proceeding studies of medicinal plant DNA barcoding.

Key words: DNA barcoding; genuine medicinal material; molecular identification; chloroplast genome; ultra-barcode

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是国际上近年来快速发展的有关物种鉴定的新技术, 此概念最早由加拿大学者 Paul Hebert 等^[1]于 2003 年提出, 即用标准化的、较短的 DNA 序列作为条形码, 以实现快速、准确地鉴定。随后, 科学家们逐渐在不同生物类群的研究中确立了不同的标准 DNA 条形码, 例如线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome C oxidase subunit 1, COI) 用于动物, 特别适用于昆虫、鱼类和鸟类的鉴定^[1-6]; *matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、

ITS/ITS2 及其不同组合作为标准条形码用于植物鉴定^[7]; 核糖体 16 S RNA 用于细菌鉴定^[8-9]; *ITS* 用于真菌鉴定^[10-12]。利用 DNA 条形码进行物种鉴定有显著的优势: (1) 不受个体形态特征及发育阶段的影响, 从基因水平上提供一种可靠的分类依据; (2) 可提供信息明确的数字化数据库, 弥补形态描述的不足, 提高物种的鉴别速度, 同时便于发现新物种; (3) 可以在较短时间建立应用系统, 操作流程简单、规范, 可减少对经验的过度依赖。

收稿日期: 2017-01-20

基金项目: 广东食品药品职业学院自然科学基金项目 (2016YZ007)

作者简介: 张彩云 (1978—), 女, 山东青岛人, 博士, 研究方向为植物 DNA 条形码、药用植物资源评价与开发利用。

Tel: (020)28854995 E-mail: zhangcai@126.com

*通信作者 颜海飞 (1979—), 男, 硕士生导师, 副研究员, 研究方向为植物 DNA 条形码、植物系统发育和进化。

Tel: (020)37085659 E-mail: yanhaifei@scbg.ac.cn

经过 14 年的发展, DNA 条形码已成为生物学研究领域发展最迅速的方向之一, 极大地增强了人类探索、认识物种以及监测和利用生物多样性资源的能力, 推动了生物分类学的发展, 也为生态学和进化生物学的发展注入了新的活力。随着该技术及其标准数据库的发展和完善, DNA 条形码已成功应用于海关、法医、动植物检验检疫、食品、药品及化妆品检测等多个领域。本文将重点阐述植物 DNA 条形码的发展趋势, 超级条形码在近缘物种鉴定领域的应用前景, 以及 DNA 条形码技术在中药基原物种鉴定、地道药材鉴别以及中药溯源系统中的应用, 并强调植物 DNA 条形码技术在中药资源评价、保护和可持续利用中的重要地位和作用。

1 植物 DNA 条形码研究进展

1.1 标准植物 DNA 条形码的筛选

由于植物的核苷酸进化速率低于动物, 且植物存在更多的杂交和多倍化等复杂的进化事件, 因此, 植物中没有哪一个单独片段像动物 COI 一样, 能够成为高效和通用条形码。植物 DNA 条形码研究经历了大量叶绿体片段、核基因 ITS, 以及多种片段组合的筛选验证。常用植物 DNA 条形码单序列或组合序列的评价已有较全面的综述^[13-15]。

目前标准植物 DNA 条形码筛选工作已经告一段落, 其发展过程主要经历了以下几个大的事件:

(1) 2009 年 8 月, 生物条形码联盟 (Consortium for the Barcode of Life, CBOL) 植物工作组在国际权威杂志上发表文章, 对 7 个叶绿体片段 (*rbcL*、*matK*、*rpoC1*、*rpoB*、*trnH-psbA*、*atpF-atpH* 和 *psbK-psbI*) 进行了检验, 标准是 (a) 通用性, 包括扩增效率、测序成功率和序列质量; (b) 对物种的分辨率。最终推荐 *matK+rbcL* 作为陆生植物的核心 DNA 条形码^[16]。(2) 2009 年 11 月, 在墨西哥城举办的第 3 次国际条形码会议中提出: 作为对核心条形码 *matK+rbcL* 的补充, 应该继续对叶绿体基因组和核基因组中的候选序列 (如 *trnH-psbA* 和 ITS/ITS2) 进行评估。(3) 2011 年, 生物条形码中国植物工作组 (China Plant BOL Group) 评估了 *matK+rbcL*、*trnH-psbA* 和 ITS 在鉴定 6 286 个种子植物样本 (代表了 42 个目, 75 个科, 141 个属, 1 757 个物种) 时的通用性和有效性。根据其分析结果, ITS/ITS2 被建议纳入种子植物的核心条形码^[17], 并得到了国际同行的认可^[18]。近年来, 通过在大量群落或样地中筛选, *rbcL*+ITS2 也表现出了很好的使用效果^[19]。

总之, 目前标准植物 DNA 条形码确定为叶绿体片段 *matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*, 以及核糖体基因及其转录间隔区 ITS/ITS2^[7]。总体而言, 标准植物 DNA 条形码对于分属 (属以上水平的鉴定) 效果很好, 改进了现有植物分类的大框架, 但对于属内物种水平的鉴定, 尤其是大属内 (多经历了快速辐射演化) 近缘种间的分辨率依然有限^[7,13]。

1.2 植物 DNA 条形码标准数据库建设情况

DNA 条形码技术要实现大批量快速、准确地鉴定物种, 除了要确立标准通用的 DNA 条形码, 同时还要构建以此为基础的标准数据库。2010 年, 国际生命条形码计划 (International Barcode of Life, iBOL, <http://ibol.org/>) 启动, 这是世界上迄今最大的生物多样性研究计划。该计划的目标是建立全球共享的真核生物 (包括动物界、植物界、真菌界和原生生物) 生命条形码标准数据库系统 (The Barcode of Life Data Systems, BOLD Systems)。目前已经完成近 26 万个物种, 521 万份标本的 DNA 条形码测定 (www.barcodinglife.com)。BOLD 以鱼类、鸟类和昆虫类数据为主, 提供的技术规范也主要针对动物类群, 为此, 中国学者们也提出了适用于植物条形码研究的技术规范^[20]。在我国, 中国科学院昆明植物研究所于 2009 年主导启动了中国维管植物标准数据库的建设工作。2012 年, 进一步启动了新一代植物志 iFlora 研究计划, 拟完成中国 80% 维管植物属级水平的 DNA 条形码标准数据库构建和基于云服务的物种快速鉴定和信息共享平台^[21-22]。此外, 中国科学院植物研究所建立了“中国珍稀濒危植物 DNA 条形码鉴定平台”, 为保护我国珍稀濒危植物提供了有力支持^[23]。在中药方面, 也已建有 2 个 DNA 条形码数据库。这些数据库的建设极大地发挥了 DNA 条形码的应用功能。

1.3 植物 DNA 条形码发展趋势

随着标准植物 DNA 条形码的筛选告一段落, 植物 DNA 条形码研究向着纵、横 2 个方向发展。纵向上表现在 3 个方面: (1) 继续完善标准植物 DNA 条形码数据库建设; (2) 着力解决标准 DNA 条形码近缘物种分辨率有限的问题; (3) 针对样本碎片或植物制品 (如茶叶、中药饮片、木制家具、卷烟等), 以及混合植物材料或环境样品 (如植物根系、沉积物、动物消化道中的食物残渣等), 开展微条形码 (mini-barcode, 长度在 200 bp 左右) 等方面的研究^[22]。植物研究一般选用的微条形码为叶绿

体基因 *trnL* (UAA) 内含子序列中的 P6 环 (*trnL* P6 loop), 长度为 10~143 bp, 引物高度保守, 扩增体系稳定, 在高度降解的 DNA 样品的鉴定研究中优势明显^[24-25]。最近, 有研究利用 *trnL* P6 loop 对冻土沉积物进行研究, 重建了几千年前的历史植被类型^[26-27]。横向上, 植物 DNA 条形码与群落生态学和区系地理学交叉融合, 开拓了群落系统发育学 (community phylogenetics) 和系统发育区系学 (phylofloristics) 的崭新研究领域, 并成为近年来新的研究热点^[28-31]。

针对标准植物 DNA 条形码近缘物种分辨率有限的问题, 早在 2008 年加拿大植物无国界 (Botany without Borders) 会议上, 有学者就提出了超级条形码 (ultra-barcoding) 的概念。认为叶绿体全基因组序列包含的信息量与动物线粒体的 COI 相当, 应该可以将叶绿体基因组的整个序列作为条形码使用, 并认为随着第 2 代高通量测序技术的不断提高以及成本的降低和生物信息技术的发展, 超级条形码的应用是可行的^[32]。后续的很多研究也支持了这一观点, 用叶绿体全基因组序列可以提升对近缘类群的鉴别能力^[33-35], 甚至对种下类群可做出精确的鉴别。例如, Kane 等^[36]利用超级条形码对重要的经济作物可可 *Theobroma cacao* L. 的 9 个品系做出了有效鉴定。在未来几年叶绿体全基因组序列的应用领域将比标准植物 DNA 条形码更深入。

应用超级条形码的主要挑战在于非专业的实验室获取叶绿体全基因组序列及生物信息学处理上的困难, 并且费用相对较高。最近, 我国研究人员利用 GenBank 中被子植物叶绿体基因组数据自主设计了 2 套通用引物, 结合长片段 PCR 和二代测序技术, 可从少量总 DNA 中快速获取被子植物叶绿体全基因组。这一技术体系将叶绿体基因组测序通量提高了 5~10 倍, 极大地降低了测序成本^[37-38]。此外, 基于第 2 代测序技术的基因组浅层测序技术 (genome skimming) 或者 Shallow WGS (the whole genome sequencing) 已经成为获取叶绿体基因组的有效方法, 该方法利用相对低的测序深度, 覆盖到细胞内高比例的重复序列 (叶绿体 DNA、线粒体 DNA 和核 DNA 重复元件), 可以批量、高效、低成本地产生大量的目标读段 (reads), 这些数据通过生物信息学的分析可以产生可靠的组装结果。该技术不仅可以获得叶绿体的基因组, 同时还可获得大量核 DNA 的重复序列。从中开发合适的片段作

为 DNA 条形码, 以弥补叶绿体基因组的不足, 这也是下一步植物条形码工作的重要内容^[7]。

另外, 也有学者提出了一个折中的办法, 即“特定条形码 (specific barcodes)”的策略^[14], 通过对目标类群所在科或属内代表物种的叶绿体全基因组序列进行对比分析 (plastid-comparative analyses), 找出变异热点区域 (mutational hotspots and loci), 并针对这些区域设计引物, 筛选出通用的、特异性的片段, 作为目标类群的特定条形码。该方法可以针对某些疑难类群进行研究, 但是不利于构建标准统一的数据库。

2 植物 DNA 条形码在中药鉴定领域的应用

植物 DNA 条形码技术凭借其客观、准确的鉴定优势一经问世便引起中药研究领域的关注, 并得到快速发展^[39-40]。目前已经形成完善的中药 DNA 条形码鉴定体系, 成为传统中药鉴定方法 (性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定) 的重要补充, 加快了中药鉴定标准化的进程, 是现代中药鉴定学发展的必然趋势^[41-42]。本文将梳理 DNA 条形码在中药鉴定领域中的研究和应用进展。

2.1 药用植物标准 DNA 条形码数据库的建设

中国中医科学院中药研究所陈士林课题组利用大量药用植物样本 (992 个样品, 代表了被子植物、裸子植物、蕨类和真菌类) 对 7 个候选 DNA 条形码序列 (*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、*rpoC1*、*ycf5*、*ITS1*、*ITS2*) 进行筛选, 并将主要的 2 个候选条形码 (*ITS2* 和 *trnH-psbA*) 在另 2 套样本数据 (6 121 个样品具有 *ITS2* 序列, 1 443 个样品具有 *trnH-psbA* 序列) 中进行了深入分析, 最终确定 *ITS2* 作为鉴别药用植物及其近缘种的标准 DNA 条形码, 同时也推荐叶绿体基因间隔区片段 *psbA-trnH* 作为补充条形码^[43]。在此基础上, 他们构建了基于 *ITS2* 和 *trnH-psbA* 的大型中药 DNA 条形码鉴定数据库, 收集了 23 262 个物种, 78 847 条序列。该中药数据库涵盖《中国药典》及美、日、韩、印度和欧盟等国药典收载的 95% 的中药材^[39]。此外, 香港中文大学 2010 年构建了药材 DNA 条形码数据库 (Medicinal Materials DNA Barcode Database, MMDBD, <http://www.cuhk.edu.hk/icm/mmdbd.htm>)^[44], 包含《中国药典》和《美国药典》收录的 1 000 种中药材, 包括药材资源、掺假信息、药用部位、照片以及获取条形码的引物等信息。药材 DNA 条形码数据库的构建为中药快速、准确地鉴定打下了基础。

2.2 DNA 条形码应用于中药基原物种鉴定

DNA 条形码可以在中药鉴定领域发挥巨大的作用。目前,国内外应用 DNA 条形码鉴定中药材基原物种及其混伪品的研究已有广泛的报道^[40,45-48]。中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则已获准纳入《中国药典》2010 年版(第三增补本),辛天怡^[49]依照该指导原则,基于 ITS2 序列对《中国药典》收载中药材羌活、枸杞子和红景天及相应混伪品实现了有效鉴定。Xin 等^[50]用 DNA 条形码技术研究了市场上的红景天中药饮片,100 份样品中只有 36 份(40%)是《中国药典》收录的大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba, 其他皆为伪品。Han 等^[51]用 DNA 条形码研究了我国中药市场的掺假状况,结果表明,在 1 260 份样品中有 4.2% 存在掺假,存在掺假的中药主要集中在人参、茅莓根、降香、石菖蒲、旋覆花、金银花、五加皮和柴胡。Kumar 等^[52]调查了印度 10 个自然保健品原料市场,利用 DNA 条形码对心叶黄花稔 *Sida cordifolia* L. 保健品原材料进行分析,发现原料药掺假行为十分猖獗,所有的心叶黄花稔都用黄花稔 *Sida acuta* Burm. f. 代替。

中药材等植物制品的特点是 DNA 高度降解,致使利用传统方法获取 DNA 条形码非常困难。这也是 DNA 条形码实际应用中的瓶颈之一。针对这一问题,研究者通常从 2 个方面寻求解决途径:(1) 针对“植物碎片或植物制品”研究更有效的 DNA 提取技术。方涛等^[53]较为系统地研究了植物标本 DNA 的提取方法及核心条形码和微条形码的扩增与测序条件,总结了从标本获取微条形码的实验技术流程。这些方法在中药材及中药饮片的 DNA 条形码鉴定中可以借鉴。(2) 开发利用更短、更易获取且具有一定鉴定率的片段,即微条形码(mini-barcode)或微条形码组合开展物种的鉴定。例如, Little 等^[54]用微条形码对美国市场出售的 37 种锯棕榈 *Serenoa repens* (W. Bartram) Small 果实膳食补充剂(用于改善良性前列腺肥大症)进行分析,在 34 份能提取 DNA 的样品中,29 份含有锯棕榈成分,2 份含有非法销售的相关物种,3 份成分不能确定。2014 年, Little^[55]利用相同的方法又发现 6 份(共检测 37 份)市售银杏膳食补充剂(用银杏叶制备,可通过改善血流灌注和线粒体功能提高认知能力)中并不含有银杏的成分。目前,随着叶绿体基因组数据库和全基因组数据库的不断完善,通过基因

组浅层测序和大数据的分析,从降解样品中获得大量微条形码基因信息用于降解样品的物种鉴定已展现出广阔的前景^[56]。

对于经过高强度工业加工的中成药,尤其是口服液和注射剂,其 DNA 的量更是微乎其微。Chen 等^[57]首次报道了应用基于 PCR 的 DNA 分子鉴定方法鉴别中成药的有效成分。该方法首先从中成药中提取混合 DNA(中成药往往含多种有效成分),然后应用基于 ITS 的特定引物进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据琼脂糖凝胶上出现的不同亮带作为鉴别依据。他们用该方法成功鉴别了含人参成分的中成药(药片、药丸、口服液、注射剂)与其掺假制品(用党参代替人参),以及正品藿香正气水(含半夏)与其掺假制品(含掌叶半夏和水半夏)。最近,我国学者基于 ITS2 片段中目标类群特有的 SNP(single nucleotide polymorphism)位点,设计特异性的核苷酸标签(nucleotide signature),有效鉴别了含当归 *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels 以及西洋参 *Panax quinquefolius* L. 的中成药及其混伪品^[58-59]。

基原的准确鉴定是中药发挥药效和用药安全的基本保障。随着植物 DNA 条形码研究的不断深入以及该技术的通用性和可操作性不断提高,中药 DNA 条形码鉴定技术必将在中药鉴定等领域大放异彩。同时也必须承认,鉴于中药制备、储藏、炮制过程的复杂性,DNA 条形码在中药鉴定领域也并非万能的,尤其是对于经过了高强度工业加工的植物提取制品。Mishra 等^[45]肯定了 DNA 条形码在中药鉴定中的有效性的同时也指出,要完全解决中药鉴定中的难题,DNA 条形码必须与代谢组学以及基于需求的转录组和蛋白质组学相结合。

2.3 DNA 条形码应用于道地药材鉴别

道地药材是中医临床长期、反复实践中产生并公认的品质优、疗效佳的中药材,与产地密切相关。生物学上指的是某一药用生物物种的特定居群^[60]。道地药材的形成是一个与生态因子、遗传变异和人文特征密切相关的复杂过程。从生物学的角度分析,应该是遗传因子与生态因子(土壤、气候、温度、湿度、光照、其他生物等)长期相互作用的结果。理论上,若同一种药材不同产地之间在药材品质上的差异也反映在居群间的遗传特征上,则其道地性可以通过 DNA 条形码加以鉴别。这方面的研究也有报道,刘玉萍等^[61]对广藿香不同产地的 6 个样本

matK 基因和 18 S rRNA 基因序列的差异进行分析, 结果表明广藿香基因序列分化与其产地、所含挥发油化学变异类型(化学型)呈良好的相关性; 黄林芳等^[62]基于 *trnH-psbA* 序列对不同产地肉苁蓉进行分子鉴别及分析, 通过 *trnH-psbA* 序列构建 NJ 树, 分析结果显示, 2 个产地的肉苁蓉明显分为 2 支, 差异显著。

但是, 植物标准 DNA 条形码往往无法区分近缘物种, 这限制了其在道地药材鉴别中的应用(道地药材多为种下变异)。超级条形码技术, 即叶绿体全基因组的序列, 可以提供更多信息位点, 有望对药用植物道地品种做出精确鉴别。这项技术将有利于道地药材资源的保护、评价和可持续利用, 也可以为道地药材的产地溯源提供可靠的技术支持。目前这方面的研究还有待加强^[63]。NCBI 上发表的叶绿体基因组虽然呈爆发式增长的趋势, 但药用植物的叶绿体全基因组序列相对较少, 而且绝大部分都是一个物种只有单个体的数据。理论上, 作为标准条形码数据库, 一个物种应该包含能代表该物种所有种下变异的多个个体的数据。而作为道地药材鉴别的标准超级条形码数据库, 不同产地或不同品种都应该有能代表品种变异的多个个体的数据。相信, 随着第 2 代测序技术的发展, 甚至第 3 代测序技术的普及, 叶绿体基因组序列的获得会越来越容易, 药用植物超级条形码标准数据库将越来越完善。

2.4 DNA 条形码技术应用于中药材溯源系统研究

针对中药材市场流通环节存在诸多问题, 为保障中药材的用药安全, 建立中药材从种植、加工、收购、储存、运输、销售到使用的各环节可溯源的系统已成当务之急^[64]。DNA 条形码在中药材溯源系统中的应用主要体现在两方面: 一方面是针对中药材流通源头, 对种子/种苗进行 DNA 条形码鉴定, 从源头上确保药材种质资源的准确性。另一方面对中药材流通末端, 即市场销售的药材进行 DNA 条形码鉴定验证。顾选等^[65]利用 DNA 条形码技术, 结合产地信息和形态特征, 发现市售的黑果枸杞实为伪品喀什小檗 *Berberis kaschgarica* Rupr.。将 DNA 条形码技术与新兴信息技术[如二维码、LAMP(Linux+Apache+MySQL+PHP)系统等]、网络和数据库结合使用, 可构建方便、可靠的中药材信息溯源系统^[64,66-67], 实现对中药流通过程的监管。随着智能手机的普及和网络覆盖率的提升, 用

户使用手机扫描二维码, 轻松获取中药材对应的物种和产地等信息, 已经不存在技术上的障碍。

3 展望

据估计, 世界范围内传统的药用植物在 $1.0 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^4$ 种之多, 另据世界卫生组织统计, 约 25% 的药物为植物来源^[68]。我国是植物资源大国, 有高等植物约 3 万种, 其中药用植物约占 37% (1.1×10^4 多种), 资源非常丰富。另一方面, 在过度采挖、生存环境破坏等情况下, 越来越多的野生药材出现濒危和濒临灭绝的境况。在药材需求量不断增加的情况下, 出现野生变家种、道地药材异地无序种植等情况, 使药材质量不断下降。中药的质量和资源可持续问题关乎中医发展的命脉, 应该给予高度重视。对中药资源的挖掘、评估、保护和可持续利用, 中药材种植过程中种子和种苗的确定、中药材选购以及中药的监管、标准的制定都要以准确鉴定中药材基原物种为基础。因此, 植物 DNA 条形码技术在药用植物领域有着广阔的应用前景。随着该技术的不断完善和研究的不断深入, 植物 DNA 条形码技术在中药鉴定领域的研究和应用也会更加广泛和深入。总之, DNA 条形码技术必将助力中医药现代化的发展。

参考文献

- [1] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Royal Soc B*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [2] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 968-971.
- [3] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [4] Hebert P D N, Ratnasingham S, Zakharov E V, *et al.* Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects [J]. *Philos Trans Royal Soc B*, 2016, 371(1702): 20150333.
- [5] Yancy H F, Zemlak T S, Mason J A, *et al.* Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia [J]. *J Food Protect*, 2008, 71(1): 210-217.
- [6] Yoo H S, Eah J Y, Kim J S, *et al.* DNA barcoding Korean birds [J]. *Mol Cells*, 2006, 22(3): 323-327.
- [7] Hollingsworth P M, Li D Z, van der Bank M, *et al.* Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes [J]. *Philos Trans Royal Soc B*, 2016, 371(1702):

- 20150338.
- [8] Flanagan J L, Brodie E L, Weng L, *et al.* Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 1954-1962.
- [9] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere” [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [10] Nilsson R H, Kristiansson E, Ryberg M, *et al.* Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification [J]. *Evol Bioinform*, 2008, 4: 193-201.
- [11] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [12] Avin F A, Bhassu S, Shin T Y, *et al.* Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(7): 7355-7364.
- [13] Hollingsworth P M, Graham S W, Little D P. Choosing and Using a Plant DNA Barcode [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19254.
- [14] Li X W, Yang Y, Henry R J, *et al.* Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biol Rev*, 2015, 90(1): 157-166.
- [15] 宁淑萍, 颜海飞, 郝 刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417-425.
- [16] CBOL Plant Working Group. A DNA barcoding in land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [17] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [18] Hollingsworth P M. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451-19452.
- [19] Liu J, Yan H F, Newmaster S G, *et al.* The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China [J]. *Divers Distrib*, 2015, 21(2): 188-199.
- [20] 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): 592-606.
- [21] 李德铎, 王雨华, 伊廷双, 等. 新一代植物志: iFlora [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 525-531.
- [22] 李德铎, 曾春霞. 植物 DNA 条形码研究展望 [J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 297-298.
- [23] 李长昊, 程 涛, 董文攀, 等. “中国珍稀濒危植物 DNA 条形码鉴定平台” 简介 [J]. 生物多样性, 2014, 22(1): 110.
- [24] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, *et al.* Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(3): e14.
- [25] Valentini A, Miquel C, Nawaz M A, *et al.* New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9(1): 51-60.
- [26] Jørgensen T, Kjaer K H, Haile J, *et al.* Islands in the ice: detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA meta-barcoding [J]. *Mol Ecol*, 2012, 21(8): 1980-1988.
- [27] Willerslev E, Davison J, Moora M, *et al.* Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet [J]. *Nature*, 2014, 506(7486): 47-51.
- [28] Joly S, Davies T J, Archambault A, *et al.* Ecology in the age of DNA barcoding: The resource, the promise and the challenges ahead [J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(2): 221-232.
- [29] Kress W J, Garcia-Robiedo C, Uriarte M, *et al.* DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation [J]. *Trends Ecol Evol*, 2015, 30(1): 25-35.
- [30] 裴男才, 米湘成, 陈步峰. 植物 DNA 条形码技术应用于大样地群落学研究 [J]. 科学通报, 2014, 59(24): 2333-2341.
- [31] 裴男才, 张金龙, 米湘成, 等. 植物 DNA 条形码促进系统发育群落生态学发展 [J]. 生物多样性, 2011, 19(3): 284-294.
- [32] Kane N C, Cronk Q. Botany without borders: barcoding in focus [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(24): 5175-5176.
- [33] Nock C J, Waters D L E, Edwards M A, *et al.* Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification [J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(3): 328-333.
- [34] Parks M, Cronn R, Liston A. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes [J]. *BMC Biol*, 2009, 7(1): 84-90.
- [35] Ruhsam M, Rai H S, Mathews S, *et al.* Does complete plastid genome sequencing improve species discrimination and phylogenetic resolution in *Araucaria* [J]. *Mol Ecol Resour*, 2015, 15(5): 1067-1078.
- [36] Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, *et al.* Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA [J]. *Am J Bot*, 2012, 99(2): 320-329.
- [37] Yang J B, Li D Z, Li H T. Highly effective sequencing whole chloroplast genomes of angiosperms by nine novel universal primer pairs [J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14(5): 1024-1031.

- [38] Zhang T, Zeng C X, Yang J B, *et al.* Fifteen novel universal primer pairs for sequencing whole chloroplast genomes and a primer pair for nuclear ribosomal DNAs [J]. *J Syst Evol*, 2016, 54(3): 219-227.
- [39] Chen S L, Pang X H, Song J Y, *et al.* A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [40] Techen N, Parveen I, Pan Z Q, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opin Biotech*, 2014, 25: 103-110.
- [41] 陈士林, 庞晓慧, 罗 焜, 等. 生物资源的 DNA 条形码技术 [J]. 生命科学, 2013, 25(5): 451-459.
- [42] 陈士林, 庞晓慧, 姚 辉, 等. 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.
- [43] 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(1): e8613.
- [44] Lou S K, Wong K L, Li M, *et al.* An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database) [J]. *BMC Genomics*, 2010, 24(11): 402.
- [45] Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, *et al.* DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 8-21.
- [46] Cheng X W, Su X Q, Chen X H, *et al.* Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput sequencing: The story for Liuwei Dihuang Wan [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5147.
- [47] Newmaster S G, Grguric M, Shanmughanandhan D, *et al.* DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products [J]. *BMC Med*, 2013, 11(1): 222.
- [48] Coghlan M L, Haile J, Houston J, *et al.* Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(4): 436-446.
- [49] 辛天怡. 《中国药典》中药材 DNA 条形码分子鉴定研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [50] Xin T Y, Li X J, Yao H, *et al.* Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8337.
- [51] Han J P, Pang X H, Liao B S, *et al.* An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18723.
- [52] Kumar J U S, Krishna V, Seethapathy G S, *et al.* DNA barcoding to assess species adulteration in raw drug trade of “Bala” (genus: *Sida* L.) herbal products in South India [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2015, 61: 501-509.
- [53] 方 涛, 曾春霞, 杨俊波, 等. 馆藏植物标本与 iFlora [J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 687-692.
- [54] Little D P, Marc L J. DNA Barcode authentication of saw palmetto herbal dietary supplements [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 3518.
- [55] Little D P. Authentication of *Ginkgo biloba* herbal dietary supplements using DNA barcoding [J]. *Genome*, 2014, 57(9): 513-516.
- [56] Besnard G, Christin P A, Malé P J G, *et al.* From museums to genomics: Old herbarium specimens shed light on a C-3 to C-4 transition [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(22): 6711-6721.
- [57] Chen R, Dong J, Cui X, *et al.* DNA based identification of medicinal materials in Chinese patent medicines [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 958.
- [58] Liu Y, Wang X, Wang L, *et al.* A nucleotide signature for the identification of American ginseng and its products [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 319.
- [59] Wang X Y, Liu Y, Wang L L, *et al.* A nucleotide signature for the identification of *Angelicae sinensis* Radix (Danggui) and its products [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34940.
- [60] 黄璐琦, 陈美兰, 肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 494-496.
- [61] 刘玉萍, 罗集鹏, 冯毅凡, 等. 广藿香的基因序列与挥发油化学型的相关性分析 [J]. 药学报, 2002, 37(4): 304-308.
- [62] 黄林芳, 郑司浩, 武拉斌, 等. 基于化学成分及分子特征中药材肉苁蓉生态型研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(3): 318-328.
- [63] 杨慧洁, 杨世海, 张淑丽, 等. 药用植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2581-2587.
- [64] 辛天怡, 李西文, 姚 辉, 等. 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.
- [65] 顾 选, 张晓芹, 宋晓娜, 等. 基于 DNA 条形码-产地-形态联用的药材溯源新方法研究——以黑果枸杞 1 种伪品为例 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4759-4762.
- [66] Liu C, Shi L, Xu X, *et al.* DNA Barcode Goes Two-Dimensions: DNA QR Code Web Server [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35146.
- [67] 廖保生. 基于 DNA 条形码技术的中药材溯源系统研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [68] Saslis-Lagoudakis C H, Savolainen V, Williamson E M, *et al.* Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): 15835-15840.