

• 药材与资源 •

基于 DNA 条形码技术对喉红石斛的植物学分类研究

刘红梅^{1,2}, 张存艳¹, 叶 强¹, 张廷模¹, 郭 力^{1*}

1. 成都中医药大学 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 电子科技大学, 四川省人民医院 药学部 (个体化药物治疗四川省重点实验室), 四川 成都 611731

摘要:目的 利用 DNA 条形码技术探索喉红石斛 *Dendrobium christyanum* 的分类归属问题, 并建立一种新的 ITS2 二级结构的信息挖掘方法。方法 提取分属 5 个组 14 种石斛的 DNA, 对 ITS 序列 (ITS1-5.8 S-ITS2) 进行 PCR 扩增, 测序, 获得 ITS 序列; 基于序列信息, 计算遗传距离、构建系统发育树, 对 ITS2 的二级结构进行预测, 并对其量化、聚类分析。结果 喉红石斛与黑毛组的矮石斛 *D. bellatulum*、长距石斛 *D. longicornu* 的遗传距离最小, NJ 系统发育树与 ITS2 二级结构的系统聚类图均显示喉红石斛与黑毛组石斛聚为一支, 且喉红石斛与黑毛组石斛的二级结构图基本一致。结论 喉红石斛与黑毛组石斛的亲缘关系最近, 应归属于黑毛组; 新建立的 ITS2 二级结构量化分析方法可提供更多的分类信息, 具有更高水平的分类潜能。这是首次运用 DNA 条形码进行石斛组间的分类研究, 为石斛属植物系统提供了重要依据。

关键词: 喉红石斛; DNA 条形码; ITS; 二级结构; 分类鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6656-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.023

Botanical Classification of *Dendrobium christyanum* based on DNA barcode technologyLIU Hong-mei^{1,2}, ZHANG Cun-yan¹, YE Qiang¹, ZHANG Ting-mo¹, GUO Li¹

1. State Key of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Pharmacy, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China.

Abstract: Objective To explore the classification of *Dendrobium christyanum* by using DNA barcode technology, and establish a new information mining method for ITS2 secondary structure. **Methods** Extraction of DNA from 14 *Dendrobium* species belonging to 5 groups. The ITS sequence (ITS1-5.8 S-ITS2) was amplified by PCR and sequenced to obtain ITS sequence. Based on the sequence information, the genetic distance was calculated and the phylogenetic tree was constructed. The secondary structure is predicted, quantified and clustered. **Results** The genetic distance of *D. christyanum* are closest to *Dendrobium longicornu* and *D. bellatulum* belong to Section Formosae. NJ phylogenetic tree and ITS2 secondary structure cluster diagram also showed that *D. christyanum* and *Dendrobium* species which belong to Section Formosae were divided into one branch. The secondary structure of *D. christyanum* is consistent with that of Section Formosae. **Conclusion** The relationship among the *D. christyanum* and *Dendrobium* species of Section Formosae are the closest, and *D. christyanum* should be categorized as the Section Formosae. The newly established quantitative analysis method of ITS2 secondary structure can provide more classification information and have higher classification potential. This is the first time that DNA barcode has been used to classify and identify among *Dendrobium* groups, which provides an important basis for the identification and classification of *Dendrobium* resources.

Key words: *Dendrobium christyanum* Rchb. f.; DNA barcode; ITS; secondary structure; taxonomy and identification

收稿日期: 2021-03-06

基金项目: 国家自然科学基金国家基础人才培养项目 (J1310034-18); 国家重点研发项目 (2017YFC1701804); 成都中医药大学科技发展基金 (CXTD2018012)

作者简介: 刘红梅 (1992—), 女, 博士, 从事中药化学成分与质量标准化研究。Tel: 18215529213 E-mail: liuhongmei@stu.cdutcm.edu.cn

*通信作者: 郭 力, 男, 博士, 博士生导师, 从事中药化学成分与质量标准化研究。E-mail: guoli@cdutcm.edu.cn

石斛属 *Dendrobium* Sw. 是兰科 (Orchidaceae) 植物中最大的属之一^[1], 大约有 1200~1500 种, 主要分布于亚洲与澳洲^[2], 具有良好的药用与观赏价值。自 1995 年以来,《中国植物志》收录了 76 种石斛属植物, 包括 74 种石斛和线叶石斛的 2 个变种, 依据形态学分类法被分为 12 个组^[3]; 自 2016 年起《中国植物志》网络版新收录了喉红石斛^[4], 为单列品种, 尚未归类。有研究指出喉红石斛与矮石斛 (黑毛组) 形态相似^[5], 认为其隶属于黑毛组; 然而石斛种类繁多, 外观形态均相似, 石斛属内的分类鉴别历来是兰科植物分类中最复杂的难题^[6-7], 仅依据与矮石斛的外观形态进行归属, 略显证据不足。

DNA 条形码鉴定是近年来生物分类与鉴定的研究热点, 是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段进行物种鉴定和分类的技术^[8]。该技术不受物种形态学特征与发育阶段的限制, 且不受药材状态的限制, 新鲜材料、干燥后材料、加工炮制后的材料都可以运用该技术, 弥补了经典分类学性状相似且不稳定、易受外界因素影响等缺点^[9-10]。目前 DNA 条形码技术被广泛应用于石斛的鉴定^[11-13],《中国植

物志》中仅喉红石斛尚未进行归属, 而将 DNA 条形码技术应用于石斛组间的分类鲜有报道。

目前石斛的分子鉴定主要基于核基因 (ITS、IGS) 与质基因 (*matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*、*trnL intron*)^[14-17], 其中核 DNA (rDNA) ITS 序列表现出较高的突变率与进化率, 是鉴别石斛种属水平最常用的条形码。此外, ITS2 序列在物种水平或种下水平具有明显的序列变异性, 其二级结构可提高系统发育树重建的稳定性, 为物种在分类水平上提供更多信息。然而, 目前对石斛 ITS2 二级结构的信息挖掘较少且大部分停留在“分子形态”层面^[18], 即分析 ITS2 二级结构的四个螺旋臂形态差异, 未见“数据化”分析。本研究建立了一种新的 ITS2 二级结构信息挖掘方法, 结合 rDNA ITS 条形码的序列分析、遗传距离、系统发育关系探究喉红石斛的分类归属, 丰富 DNA 条形码技术在植物系统进化与分类的应用。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究所用 14 种石斛采自四川、云南, 由成都中医药大学张廷模教授鉴定, 样品信息见表 1。

表 1 石斛样品信息

Table 1 Sample information of *Dendrobium*

编号	名称	拉丁名	GeneBank 号	分组	产地
1	梳唇石斛	<i>D. strongylanthum</i> Rchb. f.	MK522252	草叶组	云南
2	单茎草石斛	<i>D. porphyrochilum</i> Rchb. f.	MK522255		云南
3	聚石斛	<i>D. lindleyi</i> Rchb. f.	MK522261	顶叶组	云南
4	具槽石斛	<i>D. sulcatum</i> Rchb. f.	MK522262		云南
5	长距石斛	<i>D. longicornu</i> Rchb. f.	MK522197	黑毛组	云南
6	矮石斛	<i>D. bellatulum</i> Rchb. f.	MK522222		云南
7	刀叶石斛	<i>D. terminale</i> Rchb. f.	MK522256	剑叶组	云南
8	细叶石斛	<i>D. hancockii</i> Rchb. f.	MK522189	石斛组	四川
9	苏瓣石斛	<i>D. harveyanum</i> Rchb. f.	MK522195		云南
10	美花石斛	<i>D. loddigesii</i> Rchb. f.	MK522196		云南
11	曲轴石斛	<i>D. gibsonii</i> Rchb. f.	MK522204		云南
12	罗河石斛	<i>D. lohohense</i> Rchb. f.	MK522254		云南
13	线叶石斛	<i>D. aurantiacum</i> Rchb. f.	MK522265		四川
14	喉红石斛	<i>D. christyanum</i> Rchb. f.	MK522207	未定	云南

1.2 仪器与试剂

全自动冷冻球磨仪 (上海净信实业发展有限公司), Sartorius BP121s 电子分析天平 (Sartorius 公司, 德国), UPT-II-107 优普系列超纯水器 (成都超纯水科技有限公司), T100 PCR 仪、自动凝胶成像系统、核酸蛋白检测仪, 电泳仪、电泳槽 (Bio-Rad 公司, 美国); MK200-2 型干式恒温箱 (杭州奥盛

仪器有限公司)、Allegra X-30R Centrifuge 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter 公司, 美国)、HVE-50 型高压蒸汽灭菌器 (Hirayama 公司, 日本)、VOREX-5 型涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 植物 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司); 引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序

取各石斛样品约 100 mg, 加入液氮后, 用快速球磨仪研磨 3 min (30 次/s), 用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。以样品 DNA 作为模板, 对 ITS 进行 PCR 扩增, 正向引物 P1: 5'-CGTAACAAGGTT-TCCGTAGGTGAAC-3', 反向引物 P2: 5'-TTATTGATATGCTTAACTCAGCGGG-3'。反应体系为: 25 μ L 2 $\times$ Easy Taq PCR Super Mix, 正反引物各 2.0 μ L, 1.0 μ L 模板 DNA 和 20 μ L 蒸馏水。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s; 56.4 $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 循环 35 次。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度后, 送至成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

2.2 数据处理

将所得的测序峰图利用 Codon Code Aligner V 6.0.2 (Codon Code Co., 美国) 进行校对拼接, 除去引物区和低质量的序列, 将获得的序列提交到美国国立生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 进行 Blast 比对, 获得标准的 ITS1-5.8 S-ITS2 与 ITS2 间隔区序列。采用 MEGA 5.0 计算 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离, 同时截取云南石仙桃此区域序列作为系统发育树的外族群, 构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树, 并根据 Bootstrap (1000 次重复) 检验各分支的支持率, 对 ITS2 的二级结构进行预测 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>)。测量二级结构

四个螺旋的长度、角度以及每个螺旋环的个数, 采用 SPSS 18.0 统计分析软件对数据进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 石斛 ITS 序列分析

由表 2 可知, 14 种石斛的 ITS 序列有 327 个变异位点, 变异率为 50.9%; 5.8 S 序列有 20 个变异位点, 变异率为 12.3%; ITS1 序列有 157 个变异位点, 变异率为 65.6%; ITS2 有 150 个变异位点, 变异率为 60.5%, 变异率大小顺序: ITS1>ITS2>ITS>5.8 S。由此可见, 5.8 S 基因序列趋于保守, 在物种间变化小, 而内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 作为非编码区, 变异率在 60% 以上, 这也是选择 ITS 序列作为石斛分类的基础。此外, 鸟嘌呤和胞嘧啶所占的比率称为 GC 含量, GC 含量越高, DNA 的密度也越高, 且热及碱稳定性也越高, ITS 区域的 GC 含量在 47.2%~54.5% (平均含量为 52.0%), 5.8 S 的 GC 含量在 56.4%~59.6% (平均含量为 58.3%), ITS1 的 GC 含量在 43.2%~53.3% (平均含量为 48.9%), ITS2 的 GC 含量在 44.7%~54.7% (平均含量为 50.6%), GC 含量由小到大顺序为 ITS1<ITS2<ITS<5.8 S。结果发现 GC 含量的大小顺序与变异率的顺序恰好相反, 由此可以得出结论: GC 含量越低, DNA 序列的稳定性相对较低, 则变异率越高。

3.2 遗传距离分析

兰科石仙桃属植物与石斛属植物非常相似, 以截取的云南石仙桃 (AF362911) ITS 序列为外族群, 与 14 种石斛的 ITS 序列建立遗传距离矩阵 (表 3)。

表 2 14 种石斛的 ITS 序列信息

Table 2 Information of ITS sequences in 14 *Dendrobium* species

品种	长度/bp				GC/%			
	ITS	5.8 S	ITS1	ITS2	ITS	5.8 S	ITS1	ITS2
梳唇石斛	642	163	229	246	47.2	56.4	43.2	44.7
单萼草石斛	638	163	228	227	47.7	56.4	43.4	45.8
聚石斛	618	163	229	248	50.5	58.9	48.0	47.2
具槽石斛	640	156	239	247	53.7	59.6	51.0	52.6
长距石斛	642	163	228	247	53.9	58.3	52.6	52.2
矮石斛	638	163	229	247	54.5	58.9	53.3	52.6
刀叶石斛	639	162	232	248	51.6	57.4	46.1	52.8
细叶石斛	642	163	229	245	53.7	59.5	48.5	54.7
苏瓣石斛	637	163	230	243	52.8	58.3	52.6	49.4
美花石斛	636	158	236	244	50.6	58.9	43.6	52.0
曲轴石斛	638	163	228	243	52.5	57.7	50.0	51.4
罗河石斛	634	163	232	243	52.2	58.9	50.0	49.8
线叶石斛	638	163	229	244	54.4	58.3	49.8	50.8
喉红石斛	640	163	230	247	52.4	58.9	53.0	52.6
变异位点	327	20	157	150	—	—	—	—

表 3 石斛种间遗传距离分析

Table 3 Interspecific genetic distance analysis of Dendrobium

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.056													
3	0.252	0.256												
4	0.233	0.238	0.148											
5	0.241	0.254	0.138	0.111										
6	0.224	0.235	0.130	0.099	0.026									
7	0.277	0.277	0.211	0.185	0.198	0.180								
8	0.261	0.275	0.135	0.143	0.136	0.126	0.204							
9	0.257	0.274	0.152	0.151	0.139	0.127	0.195	0.119						
10	0.293	0.299	0.191	0.179	0.156	0.148	0.242	0.155	0.165					
11	0.230	0.239	0.161	0.139	0.127	0.113	0.206	0.121	0.133	0.163				
12	0.273	0.284	0.171	0.166	0.158	0.142	0.218	0.132	0.125	0.159	0.154			
13	0.275	0.279	0.184	0.175	0.152	0.142	0.225	0.127	0.133	0.157	0.150	0.122		
14	0.224	0.235	0.130	0.099	0.026	0.000	0.180	0.126	0.127	0.148	0.113	0.142	0.142	

由表 3 可知, 14 种石斛的种间遗传距离在 0~0.293, 其中草叶组间的遗传距离为 0.056, 顶叶组间的遗传距离为 0.148, 黑毛组间的遗传距离为 0.026, 石斛组间的遗传距离为 0.119~0.155, 不同组间的遗传距离具有差异性。草叶组与黑毛组的组间遗传相似度高, 与其他组的遗传距离均在 0.224 以上, 黑毛组与其他组的距离均在 0.113 以上, 表明草叶组和黑毛组的组内接受率高, 且组间拒绝率高, 更宜用于组间的鉴别与分类研究。而喉红石斛与黑毛组中矮石斛与长距石斛的遗传距离最低, 分别为 0、0.026。因此, 从遗传距离的角度分析, 喉红石斛更支持归属于黑毛组。此外, 14 种石斛与外族种云南石仙桃的遗传距离范围为 0.239~0.360, 总体上高于石斛属内遗传距离, 表明石斛属内的遗传分化程度低于外族群。

3.3 系统发育树分析

根据 ITS1-5.8 S-ITS2 序列对所有石斛样品与云南石仙桃构建 NJ 系统发育树, 利用 Bootstrap 1000 次检验各分支的支持率 (图 1)。

由 NJ 系统发育树可知, 草叶组石斛的亲缘关系很近, 梳唇石斛和单茎草石斛以 100% 的支持率聚为一支, 且与剑叶组的刀叶石斛比较近, 但支持率仅 44%; 石斛组的曲轴石斛、细叶石斛、苏瓣石斛、美花石斛、罗河石斛与线叶石斛这 6 种石斛以 53% 的支持率聚为一支; 顶叶组的具槽石斛与聚石斛的亲缘关系较远, 未被聚为一支; 喉红石斛与黑毛组的矮石斛、长距石斛以 100% 的支持率聚为一支。由此可以看出, 系统发育树的聚类结果同样支

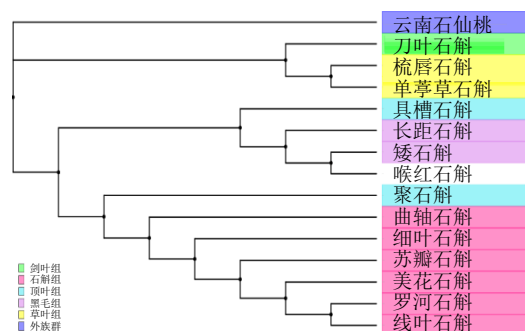


图 1 14 种石斛的系统发育树 (NJ 法)

Fig. 1 Phylogenetic tree of 14 Dendrobium species based on NJ method

持喉红石斛归属于黑毛组, 与 K2P 遗传距离的分析结果一致。

3.4 ITS2 二级结构分析

基于 14 种石斛的 ITS2 序列, 预测其二级结构 (图 2), 可以看出二级结构由 4 个螺旋区组成 (Helix I、II、III、IV), 通过统计 14 种石斛二级结构的螺旋夹角、长度以及茎环数目 (表 4), 采用“组间连接”方法, 并以平方欧氏距离为度量标准进行系统聚类分析 (图 3)。

从二级结构的“分子形态” (图 2) 可以看出, 矮石斛、长距石斛与喉红石斛的二级结构完全一致, 该结果与遗传距离、系统发育树一致, 同样支持将喉红石斛归属于黑毛组。其余大部分石斛的二级结构具有独特性, 螺旋环的长度、茎环数目以及螺旋之间的角度都存在差异。将二级结构“量化”后 (图 3), 可以明显看出, 除矮石斛、长距石斛、喉红石

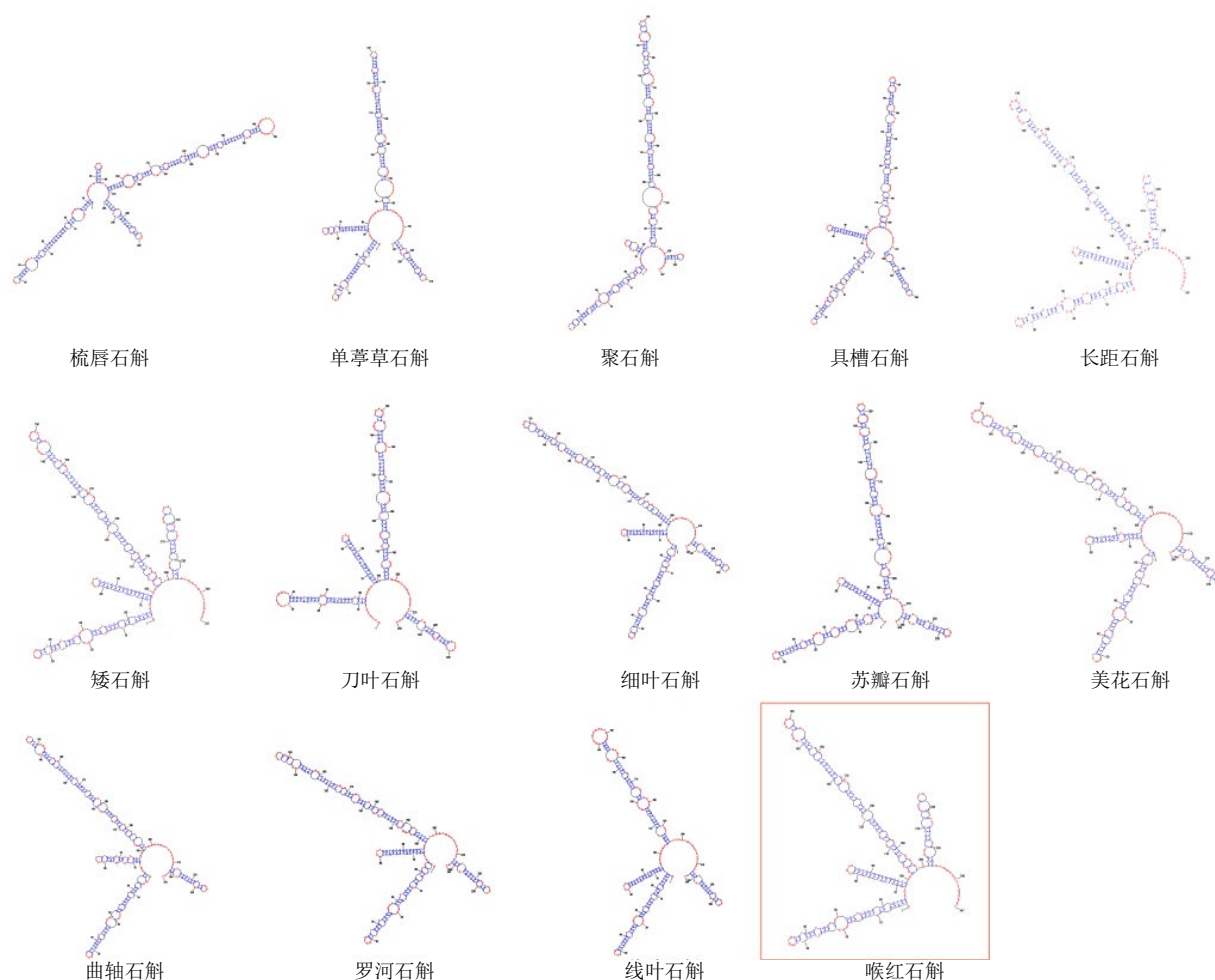


图 2 14 种石斛的 ITS2 序列二级结构

Fig. 2 Secondary structure of ITS2 sequence of 14 Dendrobium

表 4 ITS2 二级结构的量化信息

Table 4 Quantitative information of ITS2 Secondary structure

品种	长度/cm				角度/°			环数/个			
	螺旋I	螺旋II	螺旋III	螺旋IV	角度 1	角度 2	角度 3	螺旋I	螺旋II	螺旋III	螺旋IV
梳唇石斛	14.71	2.46	23.55	6.74	135.7	69.6	68.6	5	1	8	3
单葶草石斛	9.52	6.09	21.12	6.38	50.3	89.8	149.3	9	3	13	3
聚石斛	13.06	2.74	30.60	2.45	70.2	57.2	89.8	9	2	17	1
具槽石斛	13.42	5.96	21.53	7.04	62.7	80.4	148.1	11	1	15	4
长距石斛	12.65	6.35	20.68	7.48	35.7	33.6	34.5	9	1	13	6
矮石斛	12.89	6.25	20.61	7.42	34.7	34.7	33.6	8	1	13	6
刀叶石斛	10.68	6.85	20.24	7.04	54.2	31.1	127.8	3	1	9	3
细叶石斛	13.41	5.87	23.01	5.99	66.5	34.0	179.4	8	1	17	3
苏瓣石斛	12.92	5.45	22.78	5.96	52.1	51.1	120.2	6	2	12	3
美花石斛	12.66	5.74	21.09	5.87	55.8	39.1	186.8	8	2	15	3
曲轴石斛	13.49	5.88	21.70	5.43	56.3	41.9	165.5	8	5	13	3
罗河石斛	12.85	5.88	21.78	5.94	47.5	32.7	190.8	9	1	14	3
线叶石斛	13.01	5.89	18.23	5.95	28.9	85.5	169.8	6	1	6	3
喉红石斛	12.91	6.33	20.63	7.52	34.5	34.1	33.9	8	1	13	6

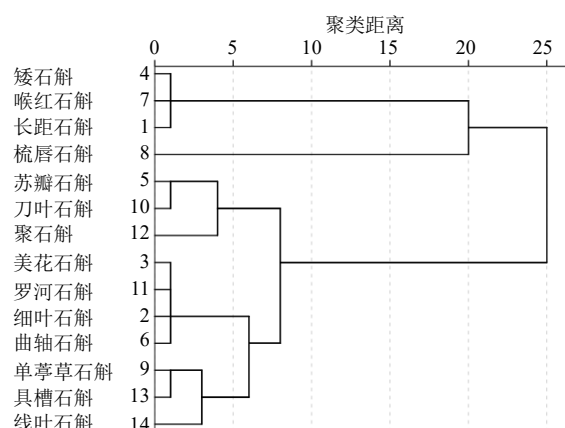


图 3 ITS2 二级结构聚类图

Fig. 3 Clustering Graph of ITS2 Secondary Structure

斛被聚为一类外，石斛组的美花石斛、罗河石斛、细叶石斛与曲轴石斛也被聚为一类，表明“量化”的二级结构能避免肉眼观察的局限性，提供更多客观的石斛组间分类信息。此外，石斛组的苏瓣石斛与线叶石斛未与其他 4 种石斛组石斛聚为一类，草叶组与顶叶组的 2 种石斛也未被聚为一类，表明同组石斛的种间差异或可通过 ITS2 二级结构进行区分与鉴别。

4 讨论

基于 DNA 条形码的分子技术是分类鉴定的最新进展，近年来，DNA 条形码在物种鉴定与分类方面得到了快速发展，并迅速成为了研究热点。与传统的形态鉴定及其他分子标记技术相比，DNA 条形码技术具有操作简单、快速、重复性和稳定性高、结果可靠^[8]的优势。目前，DNA 条形码在石斛中的应用非常广泛，包括物种鉴定、系统分类、物种进化、植物育种、资源保护等领域^[7]。

喉红石斛作为《中国植物志》石斛属下唯一未被分类的品种，其分类归属问题亟待解决。前人^[5]根据外观形态指出喉红石斛与矮石斛相似，应归属于黑毛组。本文从石斛的 rDNA ITS 序列信息、遗传距离、NJ 系统发育树以及 ITS2 二级结构多方面对喉红石斛的分类进行研究，均发现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，本研究结果更加可靠，且为 DNA 条形码作为石斛分类以及系统发育的研究提供了有力证据。

陈士林等^[8]指出二级结构的差异主要体现在以下 3 点：①Helix I、II、III、IV 之间的夹角；②Helix I、II、III、IV 的长度；③Helix I、II、III、IV 上面茎、

环的数目与形状。基于此，本研究在以往根据遗传距离与系统发育树进行分类鉴定研究的基础上，建立了一种新的利用 ITS2 二级结构进行数据分析的方法，该方法打破了以往“看图说话”的主观分析模式，首次将二级结构图的差异性“量化”，为物种鉴定与分类提供更多、更准确的信息。如草叶组的梳唇石斛与单茎草石斛，其遗传距离（0.056）与系统发育树（100%支持率）结果都显示它们亲缘关系非常近，笔者通过 ITS2 序列建立系统发育树同样显示两者的支持率为 100%，这也导致二者种间鉴别比较困难，而通过 ITS2 二级结构图以及二级结构数据聚类分析可以明显将两者区分开，该结果表明 ITS2 二级结构的信息具有用于植物更高水平的分类与鉴别研究的潜能，与遗传距离和系统发育树分析可以进行相互验证与补充，整套方法体系更加科学完整，为石斛属植物的不同水平上分类研究提供了可靠的方法。同时也为其他植物的 DNA 条形码的进一步研究提供借鉴与参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feng S, Jiang Y, Wang S, *et al.* Molecular identification of *Dendrobium* species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21975-21988.
- [2] World Checklist of Selected Plant Families [DB/OL], 2015. <http://apps.keew.org/wcsp/home>.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第十九卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 126.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第二十卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 106.
- [5] 蒋宏, 杨硕. 中国石斛属 (兰科) 一未详知种: 喉红石斛 [J]. *云南植物研究*, 2005, 27(2): 134-136.
- [6] 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): 3928-3935.
- [7] 钟志敏, 张桂芳, 黄松, 等. 石斛属叶绿体 DNA 序列的系统发育及变异位点分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3605-3611.
- [8] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 236.
- [9] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [10] 时圣明, 潘明佳, 王洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [11] Zhang Y J, Song J, Cheng X. The complete chloroplast

- genome sequence of an endangered traditional Chinese medicine plant *Dendrobium candidum* (Orchidaceae) [J]. *Conserv Genet Resour*, 2018, 10(1): 9-11.
- [12] Liu H M, Fang C X, Zhang T M, *et al.* Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rDNA ITS region sequence analysis [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 53.
- [13] Gao Y X, Zhou Y Y, Xie Y, *et al.* The complete chloroplast genome sequence of an endangered Orchidaceae species *Dendrobium moniliforme* and its phylogenetic implications [J]. *Conserv Genet Resour*, 2018, 10(3): 397-399.
- [14] Wu C T, Gupta S K, Wang A Z M, *et al.* Internal transcribed spacer sequence based identification and phylogenetic relationship of *Herba Dendrobii* [J]. *J Food Drug Anal*, 2020, 20(1): doi:10.38212/2224-6614.2051.
- [15] Chattopadhyay P, Banerjee G, Banerjee N. Distinguishing orchid species by DNA barcoding: Increasing the resolution of population studies in plant biology [J]. *Omics*, 2017, 21(12): 711-720.
- [16] Burke J M, Ladiges P Y, Batty E L, *et al.* Divergent lineages in two species of *Dendrobium* orchids (*D. speciosum* and *D. tetragonum*) correspond to major geographical breaks in eastern Australia [J]. *J Biogeogr*, 2013, 40(11): 2071-2081.
- [17] Xu Q, Zhang G Q, Liu Z J, *et al.* Two new species of *Dendrobium* (Orchidaceae: Epidendroideae) from China: Evidence from morphology and DNA [J]. *Phytotaxa*, 2014, 174(3): 129.
- [18] 刘依丽, 冯尚国, 何仁锋, 等. 基于 ITS2 条形码对铁皮石斛及其混伪品分子鉴定的初步研究 [J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2014, 13(1): 35-41.

[责任编辑 时圣明]