

• 药材与资源 •

基于 ITS 和 ITS2 序列的药用石斛 DNA 条形码鉴定研究

张高曼, 赵立佳, 刘光富*, 王正亮*

中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 浙江 杭州 310018

摘要: 目的 探讨内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 和内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 片段作为 DNA 条形码鉴别我国 41 种药用石斛种类的可行性。方法 通过 PCR 扩增测序结合 GenBank 公共序列筛选分别获得我国 41 种药用石斛的核基因 ITS 和 ITS2 序列 433 条和 410 条, 以 Kimura-2-parameter (K2P) 模型计算种间和种内遗传距离, 以邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 并对 ITS2 二级结构进行预测分析。结果 基于遗传距离和 NJ 树分析结果均显示, ITS 和 ITS2 作为 DNA 条形码可分别有效区分待测的 30 和 31 种药用石斛, 物种鉴定效率分别为 73.2% 和 75.6%。联合系统发育树和 ITS2 序列二级结构分析, 药用石斛种类的鉴定效率可提升至 87.8%。结论 ITS2 作为 DNA 条形码对药用石斛的物种分辨率优于 ITS, 物种取样数量可显著影响 DNA 条形码对药用石斛的物种鉴定效率。结果丰富了我国石斛属植物的 DNA 条形码数据库, 为保障药用石斛种质资源和药用安全提供了科学基础和技术支撑。

关键词: 石斛药材; 石斛属; DNA 条形码; ITS; ITS2; 物种鉴定

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0575-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.023

DNA barcoding identification of medicinal *Dendrobium* based on ITS and ITS2 sequences

ZHANG Gaoman, ZHAO Lijia, LIU Guangfu, WANG Zhengliang

Zhejiang Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Objective To explore the feasibility of using internal transcribed spacer (ITS) and internal transcribed spacer 2 (ITS2) fragments as DNA barcodes to identify 41 species of medicinal *Dendrobium* in China. **Methods** By PCR amplification sequencing combined with GenBank public sequence screening, 433 ITS and 410 ITS2 sequences from 41 medicinal *Dendrobium* species nuclear genes were obtained. The intra- and inter-species genetic distances were estimated based on Kimura-2-parameter (K2P) model. The phylogenetic trees were constructed by neighbor joining (NJ) method. The secondary structures of ITS2 were also predicted and analyzed. **Results** The results of genetic distances calculation and NJ tree analysis revealed that ITS and ITS2 as DNA barcodes could effectively distinguish 30 and 31 tested medicinal *Dendrobium* species, with the species identification rates of 73.2% and 75.6%, respectively. The combination of phylogenetic tree construction and ITS2 sequence secondary structure analysis could increase the species identification rate of medicinal *Dendrobium* to 87.8%. **Conclusion** The identification rate of ITS2 as a DNA barcode for medicinal *Dendrobium* species tested in this study is better than that of ITS. Moreover, the success rate of species identification was found to be significantly affected by the number of species sampled. Our results not only enriched the DNA barcode database of *Dendrobium* plants in China, but also provided scientific basis and technical support for ensuring the germplasm resources and medicinal safety of medical *Dendrobium*.

Key words: *Dendrobium Caulis*; *Dendrobium* L.; DNA barcode; ITS; ITS2; species identification

收稿日期: 2023-08-02

基金项目: 浙江省重点研发项目 (2018C02041); 浙江省属高校基本科研业务费项目 (2022YW82, 2020YW27)

作者简介: 张高曼 (1999—), 女, 硕士, 研究方向为药食同源植物资源与鉴定。E-mail: 1005089942@qq.com

*通信作者: 刘光富, 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为食用农产品质量控制。E-mail: lgf@cjlu.edu.cn

王正亮, 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为药食同源功能食品质量安全检测。E-mail: zhengliang.w0234@163.com

石斛是兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* L. 多年生草本植物, 我国有近 80 种, 其中一半以上种类具有药用价值, 是中国传统的名贵中药材, 素有“人间仙草”之称^[1]。现代药理学研究表明, 药用石斛富含多糖、黄酮、生物碱和香豆素等化学成分, 在抗衰老、抗肿瘤、降血糖和调节机体免疫等方面功效显著^[2]。随着居民生活水平的提高和对健康饮食的追求, 近年来我国药用石斛市场需求量逐年增加。然而, 石斛对生长条件要求苛刻、生长周期长、繁殖率低, 无法满足日益增长的消费需求。在高额利益的驱动下, 一些不法商家在药用石斛生产和销售过程中掺伪造假、以次充好, 如以相对廉价的紫皮石斛、棒节石斛、铜皮石斛冒充高价的铁皮石斛和霍山石斛出售, 严重影响了石斛产业的可持续发展^[3-4]。因此, 为有效保障消费者权益和稳定市场秩序, 迫切需要建立快速准确的药用石斛种类鉴定技术体系。

目前, 石斛种类鉴定技术主要包括传统鉴定技术、光谱和色谱鉴定技术以及分子鉴定技术。传统鉴定方法主要基于形态特征, 而石斛在非花期及近缘种间外观极其相似, 精深加工后更加难以准确区分^[5]; 光谱和色谱鉴定技术依据不同石斛理化特征差异进行鉴别, 但该方法依赖昂贵仪器, 且存在样品前处理过程复杂繁琐、操作耗时、成本较高等缺点, 无法满足快速和低成本的需求^[6-7]。基于核酸检测的分子鉴定技术不受植物生长环境、发育阶段、样品形态和组织部位的限制, 是目前石斛种类鉴别过程中比较主流和权威的方法, 具有操作简单快速、结果准确可靠的优点^[8-10]。其中 DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是利用生物体 DNA 中一段标准化的短基因片段对物种进行快速鉴定的新兴分子鉴定技术, 近年来已被广泛应用于包括石斛在内的诸多药用植物的种类快速鉴别^[11-13]。如基于叶绿体 *trnH-psbA* 片段, 邵世光等^[14]和 Yao 等^[15]分别对我国 15 种和 17 种药用石斛进行了准确的鉴定; 陈文强等^[16]通过比较分析 9 条候选 DNA 片段 (*ITS2*、*nad1*、*matK*、*ycbL*、*psbK-psbI*、*trnL-trnF*、*trnG-trnS*、*rbcL* 和 *trnH-psbA*) 对 11 种药用石斛的分辨率, 最终推荐 *ITS2*+*trnL-trnF* 组合片段作为铁皮石斛及其近缘种鉴别的 DNA 条形码。

研究表明, DNA 条形码的物种鉴定效率与待测物种集的物种数量密切相关^[17]。Asahina 等^[12]和 Liu

静等^[18]分别证明叶绿体序列 *matK* 可对常见的 5 种和 12 种药用石斛进行区分, 而 Singh 等^[17]在评估常用植物 DNA 条形码 (*matK*、*rbcL*、*rpoB*、*rpoCl*、*trnH-psbA* 和 *ITS*) 对 36 种石斛属植物的种类鉴别效率时, 发现 *matK* 仅能有效鉴别约 80% 的待测种类。徐素素等^[19]对 12 种药用石斛及其 3 种常见混伪品的 4 种 DNA 条形码 (*ITS*、*ITS2*、*matK* 和 *trnH-psbA*) 进行了序列分析, 结果显示 *ITS2* 能够成功区分 12 种药用石斛及其混伪品。然而, 当 Nguyen 等^[20]将石斛物种取样数量扩大到 24 种时, 发现 *ITS2* 对石斛物种鉴别效率仅为 79%。目前, 针对我国药用石斛 DNA 条形码的研究中物种取样数量总体偏低, 关于药用石斛 DNA 条形码适用性相关研究有待进一步深入。为此, 本研究收集了铁皮石斛、金钗石斛、细茎石斛和密花石斛等 27 种药用石斛样本, 以通用引物扩增其 *ITS* 和 *ITS2* 序列, 并结合公共数据库中其他 14 种药用石斛对应序列, 验证 DNA 条形码技术对我国 41 种药用石斛的鉴定能力, 旨在进一步充实我国药用石斛的 DNA 条形码数据库, 为药用石斛的质量控制和市场监管奠定技术基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究涉及药用石斛共 41 种, 其中 27 种药用石斛样本采自浙江、四川、云南、安徽和广西等地区, 经中国计量大学生命科学学院刘光富高级实验师鉴定, 分别为鼓槌石斛 *D. chrysotoxum* Lindl.、流苏石斛 *D. fimbriatum* Hook.、金钗石斛 *D. nobile* Lindl.、铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo、霍山石斛 *D. huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng、细茎石斛 *D. moniliforme* (L.) Sw.、束花石斛 *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl.、兜唇石斛 *D. aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch.、密花石斛 *D. densiflorum* Lindl. ex Wall.、球花石斛 *D. thyrsoiflorum* Rchb. f.、玫瑰石斛 *D. crepidatum* Lindl. ex Paxt.、喇叭唇石斛 *D. lituiflorum* Lindl.、美花石斛 *D. loddigesii* Rolfe、晶帽石斛 *D. crystallinum* Rchb. f.、叠鞘石斛 *D. aurantiacum* Kerr.、尖刀唇石斛 *D. heterocarpum* Lindl.、长苏石斛 *D. brymerianum* Rchb. f.、紫瓣石斛 *D. parishii* Rchb. f.、短棒石斛 *D. capillipes* Rchb. f.、报春石斛 *D. primulinum* Wall. ex Lindl.、肿节石斛 *D. pendulum* Roxb.、细叶石斛 *D. hancockii* Rolfe、重唇石斛 *D. hercoglossum* Rchb.

f.、广东石斛 *D. wilsonii* Rolfe、小黄花石斛 *D. jenkinsii* Wall. ex Lindl.、杯鞘石斛 *D. Gratiolosissimum* Rchb. f.、大苞鞘石斛 *D. wardianum* Warner、齿瓣石斛 *D. devonianum* Paxt.、曲茎石斛 *D. flexicaule* Z. H. Tsi, S. C. Sun et L. G. Xu、钩状石斛 *D. aduncum* Wall. ex Lindl.、苏瓣石斛 *D. Harveyanum* Rchb. f.、滇桂石斛 *D. Scoriarum* W. M. Sw.、少花石斛 *D. parciflorum* Rchb. f.、杓唇石斛 *D. Moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.、曲轴石斛 *D. gibsonii* Lindl.、梳唇石斛 *D. Strongylanthum* Rchb. f.、勐海石斛 *D. Minutiflorum* S. C. Chen et Z. H. Tsi、聚石斛 *D. lindleyi* Stendel、黄石斛 *D. Tosaense* Lindl.、藏南石斛 *D. monticola* P. F. Hunt et Summerh.和串珠石斛 *D. falconeri* Hook.。取各样本鲜茎或鲜叶，保存于-20℃冰箱，其余14种药用石斛和1种石仙桃(用

于系统发育树构建的外群)序列信息来自 GenBank 公共数据库，具体信息见表1。

1.2 仪器与试剂

电子分析天平(Sartorius 公司, 美国); T100 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国); 涡旋混合器(IKA 公司, 德国); 核酸电泳仪(Bio-Rad 公司, 美国); 自动凝胶成像仪(Bio-Rad 公司, 美国); 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); 高速离心机(Thermo 公司, 美国); Nanodrop2000 微量核酸蛋白分析仪(Thermo 公司, 美国); 高压蒸汽灭菌锅 MLS-3780 (Sanyo 公司, 日本); DNA Maker (Takara 公司, 日本); 植物 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 中国); PrimeSTAR® HS (Premix)(Takara 公司, 日本); DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司, 美国); 引物由杭州有康生物科技有限公司合成。

表 1 药用石斛样本信息

Table 1 Sample information of medicinal *Dendrobium* species

编号	物种名称	产地	GenBank 登录号	
			ITS	ITS2
1	鼓槌石斛	浙江	OP430734、OP430735、OP430736、AB593533、 AB873185、MK483266、KF143444、 HM590383、KT778756、KY966526、 HQ114221、AF362023、MK483272、 MK483283、MK483291、MK522232、JN388585	OP738542、OP738543、OP738544、OP738545、 AF362023、JN388585、KY745805、AF314127、 MK522232、AB593533、HQ114221、KY508514、 AB873185、KY745804
2	流苏石斛	广西	OP430747、OP430748、OP430749、AF362023、 MK483271、MK483290、MN263239	OP738552、OP738553、OP738554、OP738555、 OP738556、OP738557、MK522230
3	金钗石斛	贵州	OP430765、OP430766、OP430767、AB593619、 MT940440、HQ114217、HQ114218、 MH120176、MH120171、MH120172、 MH120173、MH120174、MH120175	KJ658298、KY508532、MH120171、MH120175、 MH120173、MH120174、MH120176、MH120172
4	铁皮石斛	浙江、云南	OP430771、OP430772、OP430773、OP430774、 MG779625、MG779626、HQ114245、 MG779623、KT779752、MG779624、 KC205183、JF803237、MH198102	OP738593、OP738594、OP738595、OP738596、 OP738597、OP738598、OP738599、OP738600、 OP738601、KY745799、KY745798、KY745797、 KY745796
5	霍山石斛	安徽	OP735529、OP735530、OP735531、KC331009、 KC331010、KC331011、KC331006、 KC205197、MK522199、KC331005、 KC331008、KF143476、KC331003	OP738570、OP738574、OP738575、OP738576、 KF143476、KP264994、MK522199、MT295875、 MT295869、MT295866、MT295867、MT295868、 MT295870、MT295872、MT295873、MT295874、 MT295871
6	细茎石斛	四川	OP430768、OP430769、OP430770、KJ210478、 MH808039、KJ210474、MH808040、 AB593488、KF143491、KJ210477、KJ210479	OP738586、OP738587、OP738588、OP738589、 KJ210478、KY508531、MH808039、KJ210477、 KF143491、AB593488
7	束花石斛	云南	OP430730、OP430731、OP430732、KY928056、 AF362047、MK522208、JN388584、AB873182、 MK483289	OP738539、OP738540、OP738541、KY745808、 KY508513、KY508512、KY745855、KY745809、 JN388584、MK522208、AB873182、KF263964、 KY928056
8	兜唇石斛	广西	OP430720、OP753646、OP753647、KJ944622、 KJ210413、KJ210414、HQ114247、MK169307、 AB593539、JN388571、HM590384、MK522217	OP738521、OP738522、OP738523、MK169307、 MK522217、MK483267、AB593539、JN388571、 HM054556、HQ114247、KF143430、KY508510、 KJ944622、KJ658303、KJ210414、KJ210413
9	密花石斛	广东	OP430740、OP430741、OP735532、AB593546、 AB593485、MN213668、KT778759、 KF143451、KX522633、HM054626、JF713097	OP738549、OP738549、OP738551、KT778759、 AB593485、KJ658325、HM054626、MN213669、 MN213668、MN213670、AF314129、JF713097
10	球花石斛	浙江	OP430786、OP430787、OP430788、KF143519、 HQ114227、HM054760、KJ210503、 KX600503、KY499228、AY240001、KJ210504、 HM054758、KT778758、FJ384733、AB593674	OP738611、OP738612、OP738613、HQ114227、 KF143519、KJ210503、AY240001、HM054758、 HM054760、MK522235、KY745810

表 1 (续)

编号	物种名称	产地	GenBank 登录号	
			ITS	ITS2
11	玫瑰石斛	云南	<u>OP430737</u> 、 <u>OP430738</u> 、 <u>OP430739</u> 、HQ114240、 <u>OP738536</u> 、 <u>OP738537</u> 、 <u>OP738538</u> 、MK522212、KF143446、KY440169、KJ210430、KJ944628、KY440169、HQ114240、KJ210433、KJ210432、KJ210433、AY842035、JN388586、MK522212、KJ658319、AF314128、AY842035、KF143446、KX522644	KX522644、JN388586
12	喇叭唇石斛	广西	<u>OP753643</u> 、 <u>OP753644</u> 、 <u>OP753645</u> 、MK522183、 <u>OP738580</u> 、 <u>OP738581</u> 、 <u>OP738582</u> 、AB972334、AB972334	MK522183、AB593602、AF355571
13	美花石斛	云南	<u>OP430762</u> 、 <u>OP430763</u> 、 <u>OP430764</u> 、HQ114220、 <u>OP738583</u> 、 <u>OP738584</u> 、 <u>OP738585</u> 、MK522196、KF143481、KC205187、AB873183、KT778746、KY508527、KY745819、HM590374、KF143481、HM590374、AF311778、EU121418、KT778746、KJ658320、KY508528、JN388569、MK522196、KY966562、KP159301、JN388569	AF314134、AB593604
14	晶帽石斛	浙江	<u>OP430742</u> 、 <u>OP430743</u> 、 <u>OP430744</u> 、AB593538、 <u>OP738546</u> 、 <u>OP738547</u> 、 <u>OP738548</u> 、KY745832、HQ114243、KF143447、KC205205、KY499225、KJ658321、HQ114243、MT004868、KY966529、KT778764、KJ944633、MT004867、GU339116、KT778764、KF143447	GU339116、MT004868
15	叠鞘石斛	福建	<u>OP430727</u> 、 <u>OP430728</u> 、 <u>OP430729</u> 、KJ210418、 <u>OP738524</u> 、 <u>OP738525</u> 、 <u>OP738526</u> 、 <u>OP738527</u> 、AF362040、FJ384731、MK522265、KJ210417、 <u>OP738528</u> 、 <u>OP738529</u>	KJ210416、AF521606、AF362043、JN388572、GU339113、FJ384732、FJ384730、FJ530949
16	尖刀唇石斛	云南	<u>OP430756</u> 、 <u>OP430757</u> 、 <u>OP430758</u> 、AB593582、 <u>OP738571</u> 、 <u>OP738572</u> 、 <u>OP738573</u> 、KJ658307、KF143473、GU339101、MW032194、KF143473、JN388593、JN388592、AB593582、JN388593、JN388592、KJ672627、KX600513、HM054667、JF713105、JF713106、MN213673、HM054667、JF713106、JF713105、KY966550	
17	长苏石斛	浙江	<u>OP430721</u> 、 <u>OP430724</u> 、 <u>OP430725</u> 、AB593511、 <u>OP738533</u> 、 <u>OP738534</u> 、 <u>OP738535</u> 、MK522231、KJ210422、KJ210423、MK522231、AF362036、KJ210423、KJ210422、KY745833、EU477500、KF143432、EU477500、KY499215、HQ114233、HQ114233、AB593511、JN388581、KF143432	KY966518、JN388581
18	紫瓣石斛	贵州	<u>OP430783</u> 、 <u>OP430784</u> 、 <u>OP430785</u> 、AB593630、 <u>OP738602</u> 、 <u>OP738603</u> 、 <u>OP738604</u> 、HM054735、KJ944629、HM054736、MK522227、HM054736、HM590378、MK522227、HM590378、MK483284、KX522639、MK483284、KY062487、KJ944629、AB972344、EU121417、KC568303、KC205202、KC205202	KY966570、HM054735
19	短棒石斛	云南	<u>OP430722</u> 、 <u>OP430723</u> 、 <u>OP430726</u> 、KF143433、 <u>OP738530</u> 、 <u>OP738531</u> 、 <u>OP738532</u> 、KY745840、HQ114224、MK522242、MT004850、KY745842、KJ658306、JN388582、MT004850、JN388582、AF362035、KJ672653	MK522242、HQ114224、KF143433
20	报春石斛	四川	<u>OP430789</u> 、 <u>OP430790</u> 、 <u>OP430791</u> 、MN213683、 <u>OP738608</u> 、 <u>OP738609</u> 、 <u>OP738610</u> 、KJ658309、KT778755、KJ944625、AB593641、HQ114242、KY745848、KY745849、KT778755、MK522184、KF143499、MK522184、HM054752、MK483269、HM054753、HM054754、HM054748、HM054756、JN388598、HM054750、HM054756、HM054757、JN388598、MK483269、JN388597、HM054747、JN388597、MN213683	HM054754、HM054751
21	肿节石斛	云南	<u>OP430780</u> 、 <u>OP430781</u> 、 <u>OP430782</u> 、AB593633、 <u>OP738605</u> 、 <u>OP738606</u> 、 <u>OP738607</u> 、KJ944632、KJ944632、GU339115、JN388596、KF143498、KJ658314、KY508533、KY745821、JN388596、KT778754、HQ114234、KF143496、AF362912、KF143498、KF143496、AB593633、HQ114234、EU477508、KX600502、KY966572、KY499235	GU339115
22	细叶石斛	河南	<u>OP430753</u> 、 <u>OP430754</u> 、 <u>OP430755</u> 、AB593524、 <u>OP738561</u> 、 <u>OP738562</u> 、 <u>OP738563</u> 、 <u>OP738564</u> 、AF362038、MK522189、FJ384725	<u>OP738565</u> 、 <u>OP738566</u> 、KY745829、KY508523、FJ384725、MK522189、AF362038、AB593524
23	重唇石斛	安徽	<u>OP430750</u> 、 <u>OP430751</u> 、 <u>OP430752</u> 、AB593581、 <u>OP738567</u> 、 <u>OP738568</u> 、 <u>OP738569</u> 、MK522187、KJ210457、KF143471、AB593580、HM590381、AB593580、AB593581、AB972333、KY508524、KF143472	KJ210457、KJ658329、KF143472
24	广东石斛	广东	<u>OP430795</u> 、 <u>OP430796</u> 、 <u>OP430797</u> 、KF143526	<u>OP738617</u> 、 <u>OP738618</u> 、 <u>OP738619</u> 、 <u>OP738620</u> 、 <u>OP738621</u> 、 <u>OP738622</u> 、KF143526

表 1 (续)

编号	物种名称	产地	GenBank 登录号	
			ITS	ITS2
25	小黄花石斛	福建	<u>OP430759</u> , <u>OP430760</u> , <u>OP430761</u> , KF143479, <u>OP738577</u> , <u>OP738578</u> , <u>OP738579</u> , KJ210460, KJ210460, KY440170, AB593525, KF143478, KY745837, KY499233, KX600506, JN388595, HQ114251, AB593589	KF143479, DQ058785
26	杯鞘石斛	浙江	<u>OP430745</u> , <u>OP430746</u> , <u>OP753648</u> , KF143464, <u>OP738558</u> , <u>OP738559</u> , <u>OP738560</u> , KF143464, AB593571, FJ384737, KJ672675, MK522190, KY508522, KF143465, MK522190, JN388590, DQ0587901	FJ384737, DQ058790, AB593571
27	大苞鞘石斛	云南	<u>OP430792</u> , <u>OP430793</u> , <u>OP430794</u> , HQ114231, <u>OP738614</u> , <u>OP738615</u> , <u>OP738616</u> , HQ114231, AF420245, KY499218, JN388600, KJ672699, AB593686, JN388600, KJ658300, KY745862, DQ058789	KY508540, KY499218, DQ058789
28	齿瓣石斛	未知	FJ384735, KJ210443, KJ210442, EU477502, KY745839, KY745836, KY508519, HQ114244, KY499236, KJ672665, KP743545, KC205194, KJ658311, KJ210443, KJ210442, KJ210441, HQ114244, AF311779	KP743545, AB593548, KC205194
29	曲茎石斛	未知	FJ384743, MG779630, MG779629, KT779770, MG779630, FJ384743, MG779629, MK522268, KT779769, KJ672623, KJ672622, KJ672621, AF355570	
30	钩状石斛	未知	KJ672619, GU339110, KC346887, KC568295, KJ210409, KJ210410, KJ658328, KF143428, MG779634, KJ210411, KJ210410, KF143428, JN388580, KJ210412, KJ210409	
31	苏瓣石斛	未知	JN388594, MK522195, KY966549, KJ210452, KJ658297, KJ210452, KC568299, MK522195, KF143468, KJ672677, KC568299, HQ114226, EU477506, KY966549, KF143468, JN388594, EU477506	HQ114226
32	滇桂石斛	未知	MG779632, MG779631, KF143508, KT779774, KY508534, AB593659, MG779633, MG779632, KT779773, KT779772, KT779771, KJ672644, MG779631, KF143508, KJ672643	
33	少花石斛	未知	KJ672688, AB593628	AB593628
34	杓唇石斛	未知	MN213679, MN213677, MN213676, AB593616, KX440954, KT778750, HM054716, HM054715, KY966563, KX522635, KT778757, HM054714, HM054712, HM054711, KT778750, JF713111, KY499229	
35	曲轴石斛	未知	GU339105, MK522204, KX522636, KJ672673, KJ658305, KJ658304, KX522636, AB593568, AB593568	GU339105, MK522204
36	梳唇石斛	未知	KF143515, KJ210499, KJ210500, DQ058797, MK522252, KJ658335, KJ210500, KF143515, MK522252, KJ672694, KF143514, KJ210501, KJ210499, KY499230, KJ210502	
37	勐海石斛	未知	MK522186, KF143488, KF143487, KJ672686, MK522186, KF143488, KF143487, KJ672686	
38	聚石斛	未知	JN388568, GU339114, MK522261, KC568301, KY508526, KY745831, KY966558, KY966559, KY966559, KY966558, KJ672682, DQ058784, KJ210461, KJ658322, AF314133, DQ058784, KJ210461	MK522261, GU339114, KC568301, JN388568
39	黄石斛	未知	EU003113, AF401488, KJ672645, KC331002, HM590367, MG779621, MK522245, KC330993, KC331000, KC330999, KC330998, KC330998, KC330997, KC330996, KC330995, KC330997, KC330996, MG779621, KC331001, KC331002, KC331000, KC330995, MK522245	
40	藏南石斛	未知	DQ058799, DQ058798	DQ058799, DQ058798
41	串珠石斛	未知	FJ384734, MN213671, KY966539, KY499217, KJ658310, KJ210447, FJ384734, AB593560, KJ210447, KF143458, KX600498, JF713102, KX600498, JF713102, MN213671, KY499217, HQ114239	KY966539, KF143458, HQ114239

本研究获序列的 GenBank 登录号以下划线表示。

The GenBank accession numbers of sequences obtained in the present study are underlined.

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

选取药用石斛新鲜组织(鲜茎或鲜叶),用 75% 乙醇溶液擦拭,待其表面干燥后称取 0.1 g 组织样

本,用液氮研磨至粉末。按植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行基因组总 DNA 提取。利用 Nanodrop 超微量分光光度计测定基因组总 DNA 浓度和纯度测定,并通过 1%的凝胶电泳检测

DNA 的完整性,合格 DNA 样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 PCR 扩增及测序

采用通用引物 ITS-5F/ITS-4R (5'-GGA-AGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'/5'-TCCTCC-GCTTATTGATATG-3')和 ITS2F/ITS2R(5'-CGTAA-CAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3'/5'-TTATTGAT-ATGCTTAACTCAGCGGG-3')分别扩增 ITS 和 ITS2 序列。PCR 扩增体系为 50 μL : 2 \times Premix PrimeSTAR HS 25 μL , DNA 模板 2 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,送北京擎科生物科技有限公司进行双向测序。

2.3 数据处理与分析

测序结果经 Chromas 软件评估序列峰图质量,除去低质量的序列;利用 Bioedit 7.0 软件进行正向序列拼接^[21],将所测序列在 NCBI 中进行 Blast 相似性比对,验证所获序列的准确性。从 GenBank 数据库中下

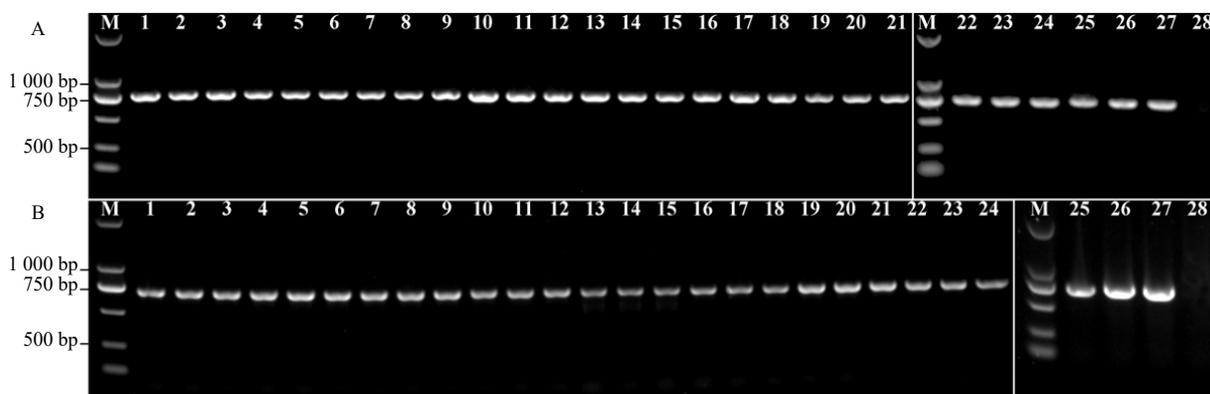
载与本研究扩增区段一致的药用石斛 ITS 和 ITS2 序列,通过比对 BOLD 数据库对序列准确性进行进一步验证。综合本研究所得和公共下载序列数据,使用 MEGA X 软件进行多序列比对,去除两端冗余序列^[22]。分析处理后序列的核苷酸组成、变异位点等,基于 Kimura-2-parameter (K2P) 模型计算种间和种内遗传距离。以石仙桃为外群,使用 1 000 次重复的置信度以邻接法 (neighbor joining tree, NJ) 构建系统发育树。通过在线网站 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 预测 ITS2 的二级结构。

物种鉴别效率 = 可鉴别的物种数 / 研究物种的总数

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增、测序及序列分析

以各样本的基因组总 DNA 为模板,利用 ITS 和 ITS2 通用引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测结果显示,序列扩增效率达 100% (图 1)。PCR 扩增产物经纯化和测序后,共获得 82 条 ITS 序列和 102 条 ITS2 序列。NCBI 在线 Blast 比对结果表明所获序列均准确可靠。从 GenBank 上获得 41 种药用石斛 (包括本研究采集种类) ITS 和 ITS2 序列分别为 351 和 308 条。



M-Marker, 1~27 依次为表 1 中编号为 1~27 的药用石斛; 28-阴性对照。

M-Marker, 1—27-medicinal *Dendrobium* species with No.1—27 listed in table 1; 28-negative control.

图 1 药用石斛 ITS (A) 和 ITS2 (B) 序列扩增产物琼脂糖凝胶电泳示意图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of ITS (A) and ITS2 (B) sequence amplification products from medicinal *Dendrobium* species

本研究 PCR 所获 ITS 序列及 GenBank 下载序列共 433 条,经 MEGA X 软件比对后,修剪成长度为 612 bp 的共有片段进行后续分析。结果显示所有位点中保守位点 189 个、可变位点 407 个、简约信息位点 374 个、单一多态位点共有 33 个。在碱基组成上, A、T、G、C 的平均含量分别为 23.2%、23.7%、28.9%、24.2%。A+T 总含量 46.9%, C+G 总含量为 53.1%。ITS2 序列共 410 条,经序列对比并去除

两端冗余序列后长度为 256 bp,其中保守位点 59 个、可变位点 194 个、简约信息位点 190 个、单一多态位点共有 4 个,分别占序列长度的 23.0%、75.8%、74.2%和 1.60%。在碱基组成上, A 占 20.4%, T 占 27.7%、G 占 29.9%、C 占 22.0%。A+T 总含量 48.1%, C+G 总含量为 51.9%。

3.2 遗传距离分析

基于 ITS 序列的药用石斛遗传距离分析结果

表明,少花石斛的种内遗传距离最大(0.019 5),鼓槌石斛、霍山石斛、玫瑰石斛等9种药用石斛的种内遗传距离均为0,种内平均遗传距离为0.001 7。种间遗传距离在0~0.140 7,种间平均遗传距离为0.072 6,其中最小种间遗传距离存在于广东石斛和霍山石斛之间,而勐海石斛和肿节石斛之间的遗传距离最大。基于ITS2序列的药用石斛种内遗传距离在0~0.012 4,种内平均遗传

距离为0.001 0。鼓槌石斛、流苏石斛、金钗石斛等26种药用石斛种内遗传距离均为0,最大种内遗传距离处于滇桂石斛种内。种间遗传距离大小范围为0~0.199 7,种间平均遗传距离为0.097 0,其中最小种间遗传距离存在于黄石斛铁皮石斛之间、广东石斛和霍山石斛之间、勐海石斛和藏南石斛之间,而藏南石斛和玫瑰石斛之间的遗传距离最大(表2)。

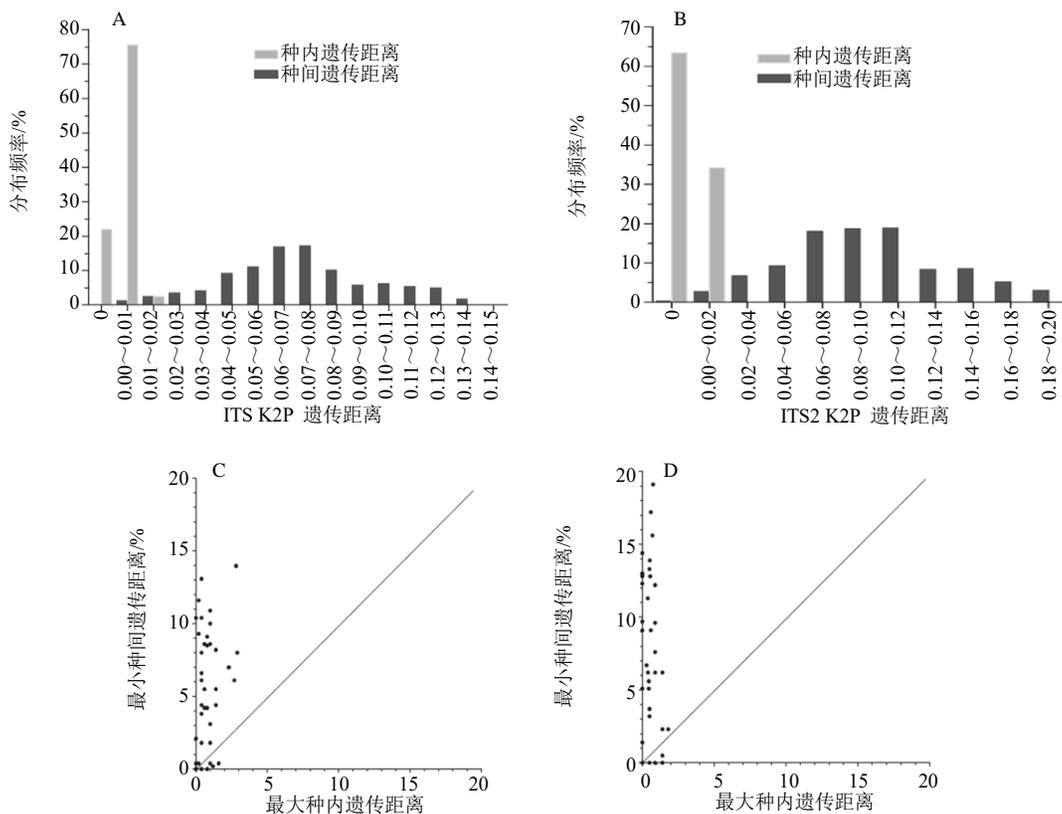
表2 基于ITS和ITS2序列的药用石斛种内和种间K2P遗传距离分析

Table 2 Intra- and inter-specific K2P genetic distances of medicinal *Dendrobium* based on ITS and ITS2

DNA 条形码	种内遗传距离			种间遗传距离		
	最小	最大	平均	最小	最大	平均
ITS	0	0.019 5	0.002 4	0	0.140 7	0.072 6
ITS2	0	0.012 4	0.001 0	0	0.199 7	0.097 0

尽管基于ITS和ITS2序列的药用石斛种间平均遗传距离均远远大于种内平均遗传距离(分别为30.3和97.0倍),但种内遗传距离和种间遗传距离在分布上未出现条形码间隙(barcoding gap)。基于ITS序列的种内遗传距离集中于0~0.01区域,种间

遗传距离集中分布于0.04~0.09,两者在0~0.02区域存在少许重叠(图2-A)。基于ITS2序列的种内遗传距离和种间遗传距离之间分别集中0~0.02和0.06~0.12区域,但在0~0.02区域存在部分重叠(图2-B)。以某一物种最小种间遗传距离超过最



A、B为ITS和ITS2序列K2P遗传距离频率分布示意图;C、D为基于ITS和ITS2序列分析的最小种间遗传距离和最大种内遗传距离比较示意图;对角线上方的点表示具有条形码间隙的物种。

A, B-frequency distribution of K2P distances of ITS and ITS2; C, D-plot depicts minimum inter-specific distances and maximum intra-specific divergences of each species for the barcode gap analysis based on ITS and ITS2 sequences, points above the diagonal line indicate species with a barcoding gap.

图2 药用石斛ITS和ITS2序列的种内和种间K2P遗传距离分析

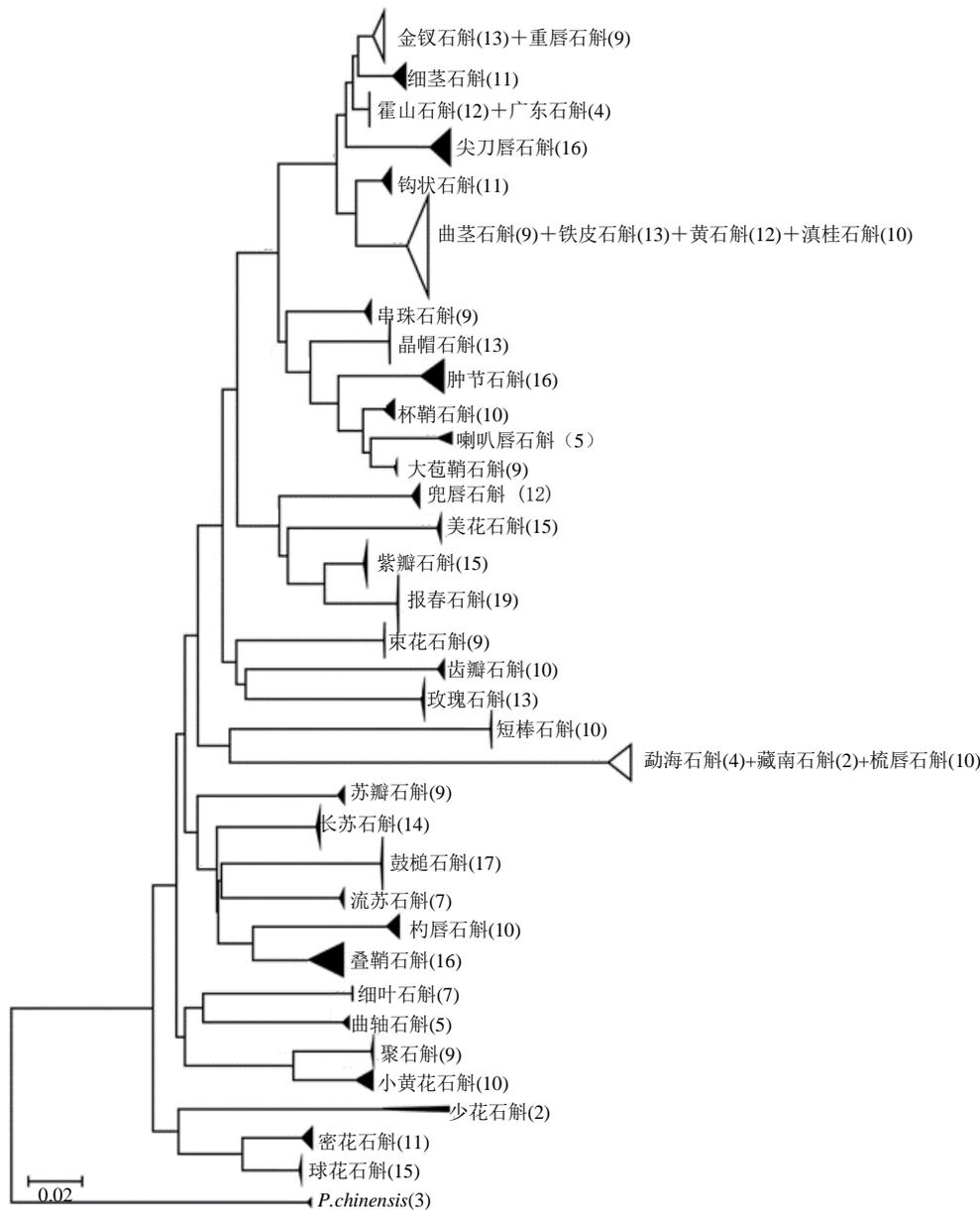
Fig. 2 Intra- and inter-specific K2P genetic distances analysis of medicinal *Dendrobium* based on ITS and ITS2 sequences

大种内遗传距离为标准评估条形码间隙时，ITS 序列分析显示可在 30 种药用石斛种类中鉴定到条形码间隙，但金钗石斛、铁皮石斛、滇桂石斛、黄石斛、勐海石斛、霍山石斛、广东石斛、重唇石斛、曲茎石斛、细茎石和梳唇石斛 11 种药用石斛的最大种内遗传距离超过最小种间遗传距离 (图 2-C)；基于 ITS2 序列的遗传距离比较分析结果类似，除 ITS 序列分析中的 30 种药用石斛外，

勐海石斛 ITS2 的种内和种间遗传距离之间亦存在条形码间隙 (图 2-D)。上述结果表明，ITS 和 ITS2 作为 DNA 条形码可分别有效区分待测的 30 和 31 种药用石斛。

3.3 聚类分析

以石仙桃为外群，分别基于 41 种药用石斛植物的 ITS 和 ITS2 序列，利用邻接法构建 NJ 系统发育树 (图 3、4)。结果显示，基于 ITS 序列的 NJ 树中，

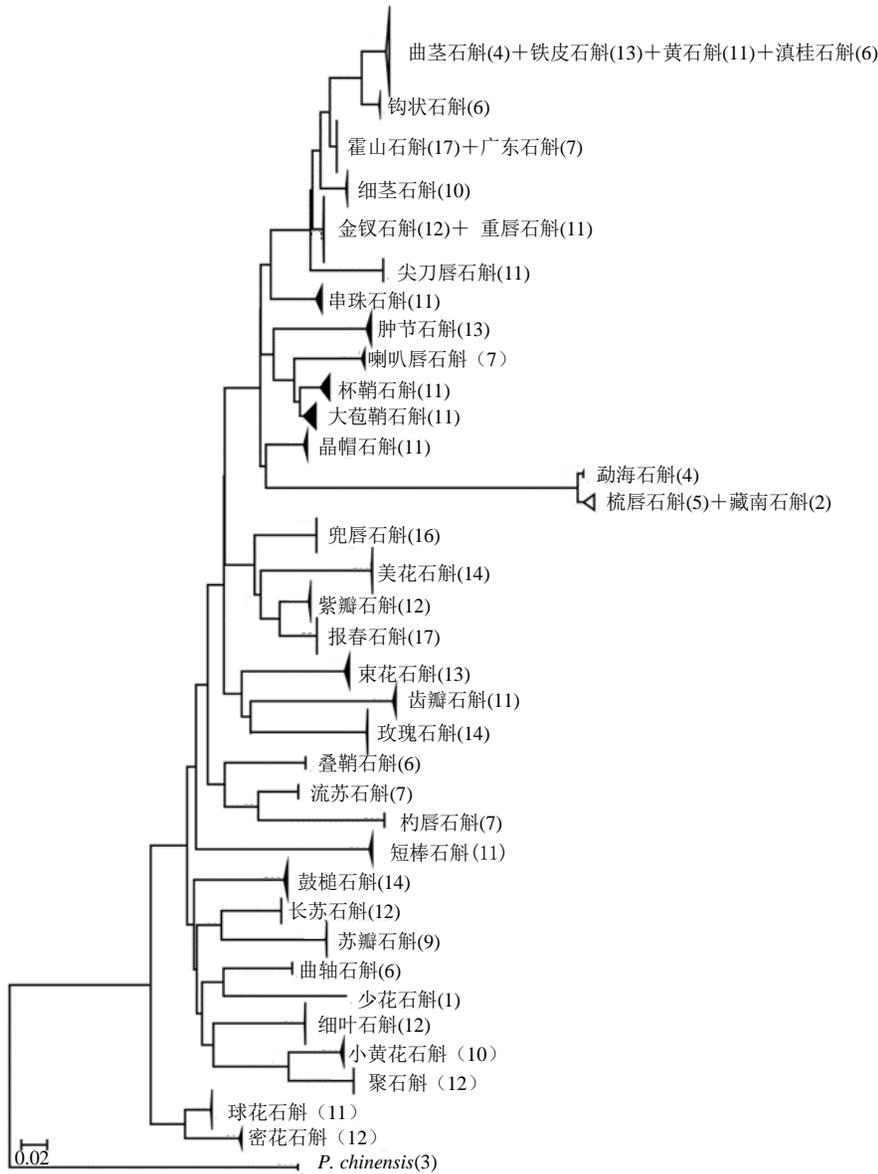


进化树终端节点被折叠，节点的高度和深度分别与序列数量及序列差异程度成正比；黑色和白色三角形分别表示折叠节点中包含单一石斛物种和多个石斛物种的序列；括号中数值表示序列数量。

The terminal node was collapsed, with the height of the terminal node proportional to the number of sequences and depth proportional to sequence divergence, black-filled and white-filled triangles indicate that the collapsed node contain sequences derived from the same and different *Dendrobium* species, respectively; The number of identical samples is given in brackets.

图 3 基于 41 种药用石斛 ITS 序列构建的邻接树

Fig. 3 Neighbor-joining (NJ) tree of 41 medicinal *Dendrobium* species based on ITS sequences



进化树终端节点被折叠，节点的高度和深度分别与序列数量及序列差异程度成正比；黑色和白色三角形分别表示折叠节点中包含单一石斛物种和多个石斛物种的序列；括号中数值表示序列数量。

The terminal node was collapsed, with the height of the terminal node proportional to the number of sequences and depth proportional to sequence divergence; black-filled and white-filled triangles indicate that the collapsed node contain sequences derived from the same and different *Dendrobium* species, respectively; The number of identical samples is given in brackets.

图 4 基于 41 种药用石斛 ITS2 序列构建的邻接树

Fig. 4 Neighbor-joining (NJ) tree of 41 medicinal *Dendrobium* species based on ITS2 sequences

除金钗石斛和重唇石斛，霍山石斛和广东石斛，曲茎石斛、铁皮石斛、滇桂石斛和黄石斛，勐海石斛、细茎石斛和梳唇石斛 4 组 11 种药用石斛外，其余 30 种不同药用石斛可各自单独聚集于同一单系分支内，表明以 ITS 序列作为 DNA 条形码可有效区分本研究中 73.2% 的药用石斛种类。由图 4 可知，ITS2 序列鉴定效率为 75.6%，除与 ITS 序列可有效鉴定的 30 种药用石斛外，还可将勐海石斛有效区

分。可见，基于遗传距离和聚类分析的物种鉴定效率一致。

3.4 ITS2 二级结构分析

针对 ITS2 序列聚类分析中未能有效区分的 10 种药用石斛，预测其 ITS2 序列的二级结构。由图 5 可知，10 种药用石斛 ITS2 序列均具有“一环四臂”的典型二级结构，但螺旋臂的结构、长短和复杂程度在部分石斛间存在明显不同。如金

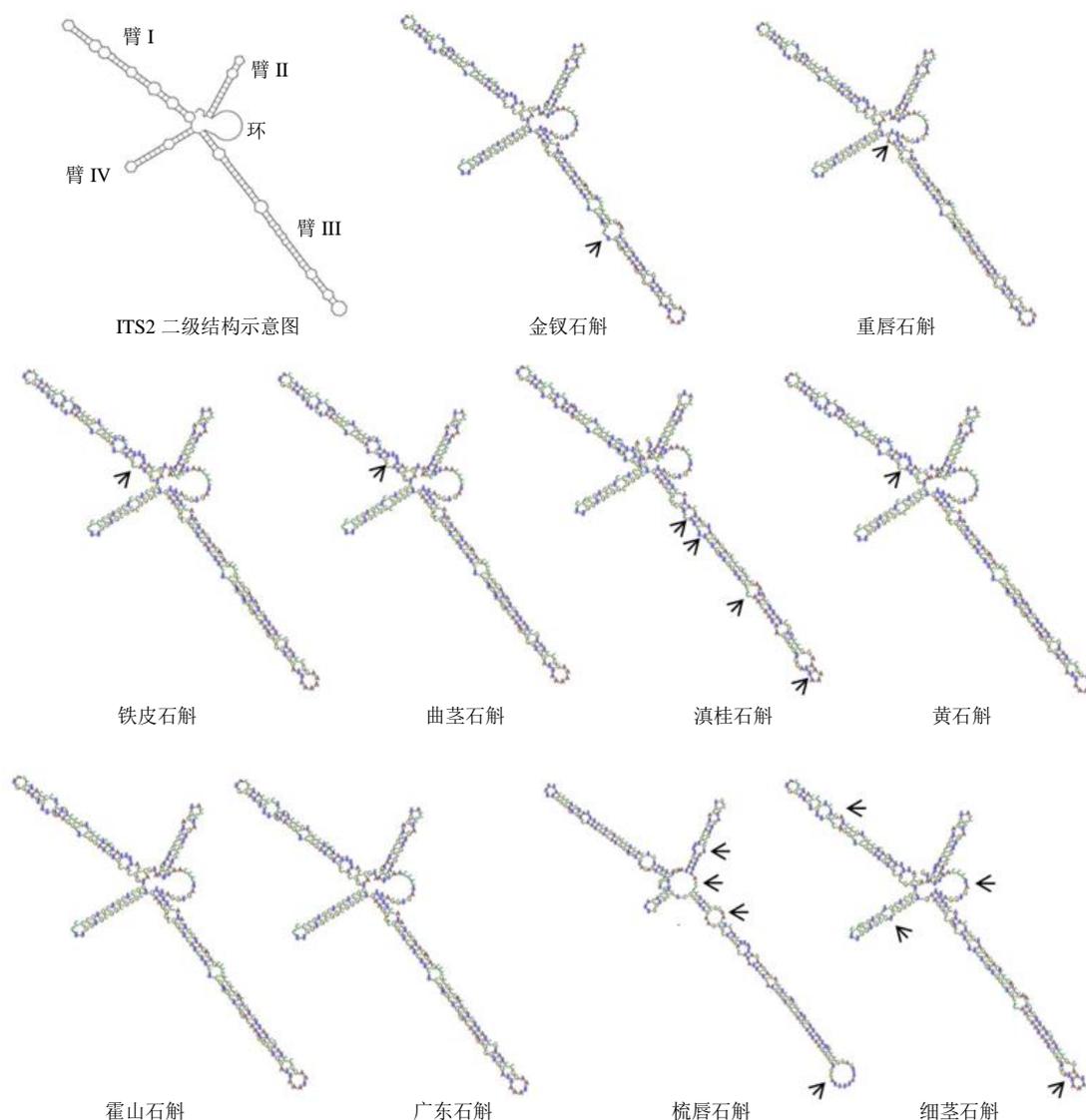


图 5 10 种药用石斛的 ITS2 序列二级结构

Fig. 5 Secondary structures of ITS2 sequences of 10 medicinal *Dendrobium* species

钗石斛和重唇石斛在 NJ 树中聚为一支,但两者在 ITS2 二级结构上具有明显差异,金钗石斛 ITS2 二级结构的 III 臂上的茎环数目显著多于重唇石斛,而重唇石斛近环端处具有颈环;在 NJ 树中聚为一支的细茎石斛和梳唇石斛在 ITS2 二级结构的“分子形态”上同样存在明显差异;滇桂石斛与曲茎石斛、铁皮石斛和黄石斛相比,其 I 臂 III 臂上茎环数目明显不同。可见,通过 ITS2 序列的二级结构比较分析,可进一步将金钗石斛、重唇石斛、滇桂石斛、细茎石斛和梳唇石斛 5 种药用石斛区分开来。因此,联合系统发育树与 ITS2 序列二级结构分析,ITS2 可有效鉴别 36 种药用石斛种类 (NJ 树分析 31 种;二级结构分析 5 种),

物种鉴别效率达到 87.8%。

4 讨论

快速准确的种类鉴别对于保障药用石斛种质资源和药用安全至关重要。然而,药用石斛种类众多,许多种类形态特征相似,尤其是一些种类仅在花型结构上存在细微区别,即使是专业的分类学家也很难在较短时间内对其进行准确的鉴别。运用分子生物学技术可以在保证鉴别结果准确性的基础上显著提高鉴定工作效率,其中 DNA 条形码技术具有简单、快速、通用性广和稳定性高等优点,已广泛应用于药用植物的基原鉴别过程中^[23-25]。

本研究评估了核基因 ITS 和 ITS2 作为 DNA 条形码在我国 41 种药用石斛种类鉴别中的适用性。基

于 K2P 遗传距离分析显示, 基于 ITS 和 ITS2 序列分析的药用石斛平均种间遗传距离分别为 0.072 6 和 0.097 0, 平均种内遗传距离分别为 0.002 4 和 0.001 0。能否作为物种鉴别的有效 DNA 条形码, 取决于物种种间遗传距离和种内遗传距离之间的差异, 但其差异程度还有待商榷^[26]。Herbert 等^[27]认为物种的种间平均遗传距离大于种内平均遗传距离 10 倍以上, 且遗传距离分布上存在“barcode gap”时, 候选基因片段可以作为该研究类群的 DNA 条形码, 而 Meier 等^[28]则建议物种最小种间遗传距离大于最大种内遗传距离时即可有效区分物种。本研究中, 基于 ITS 和 ITS2 序列分析的 41 种药用石斛的平均种间遗传距离分别是平均种内遗传距离的 30.3 和 97.0 倍。然而, ITS 和 ITS2 序列种内最大遗传距离与种间遗传最小距离均存在少许重叠, 不存在显著的“barcode gap”。上述结果说明单一的 ITS 和 ITS2 序列不能完全有效区分本研究待测的所有药用石斛物种, 该结果亦与目前诸多石斛属植物 DNA 条形码研究结论一致^[19-20, 29]。

构建系统发育树是评估 DNA 条形码物种鉴别效率的一种直观的方法, 同一物种聚类于同一分支表明该物种可被有效区分。以石仙桃为外群, 基于本研究 41 种药用石斛 ITS 和 ITS2 序列构建 NJ 树。结果表明, 基于遗传距离和聚类分析的物种鉴别效率完全一致, ITS 和 ITS2 可分别有效区分待测的 30 和 31 种药用石斛, 鉴别效率分别为 73.2% 和 75.6%。中国植物 DNA 条形码研究组研究提出将 ITS/ITS2 序列作为种子植物的核心 DNA 条形码^[30], Chen 等^[31]则建议将 ITS2 序列作为药用植物鉴定的通用 DNA 条形码。本研究中, ITS2 序列的物种鉴别效率稍优于 ITS 序列的物种分辨能力, 该结果进一步证实了 ITS2 作为药用植物 DNA 条形码的优先性。此外, 有研究表明, ITS2 序列二级结构在药用植物鉴定中具有着重要辅助作用, 可提供物种分类水平上更多的信息, 从而提高系统发育树重建的稳定性^[32]。刘红梅等^[34]通过对 14 种石斛属植物的 ITS2 二级结构的比较分析, 发现喉红石斛与黑毛组石斛亲缘关系最近, 认为其应归属于黑毛组石斛^[33]。ITS2 二级结构通常具有“一环四臂”的保守结构, 但其中心环大小以及四臂的长度、角度和茎环数目在不同物种间存在一定差异。本研究结果表明, NJ 树分析法无法区分的金钗石斛、重唇石斛、滇桂石斛、细茎石斛和梳唇石斛可通过 ITS2 序列二级结构差异进行

有效鉴别。因此, 系统发育树结合 ITS2 序列二级结构分析, 可有效提升药用石斛种类的鉴定效率。

研究表明, 物种取样数量可显著影响 DNA 条形码的物种鉴定效率^[17]。Nguyen 等^[20]研究显示 ITS 和 ITS2 作为 DNA 条形码在 24 种石斛属植物种类鉴定中成功率接近 80%, 但在 Xu 等^[35]的研究中, 随着石斛种类取样数量的扩大, 发现 ITS 和 ITS2 的鉴定效率均低于 35%。Singh 等^[17]研究发现当石斛属植物物种数量为 36 种时, DNA 条形码 matK 可有效区分 80.56% 的待测种类, 但当取样物种数量扩大到 52 种时, 其物种鉴别效率下降到 76.92%。最近, 徐素素等^[19]研究表明 ITS2 对我国 12 种药用石斛的鉴别效率可达 100%, 而基于相同分析方法, 在本研究 41 种药用石斛中 ITS2 的物种鉴定效率仅为 75.6%。可见, 本研究结果与上述研究结论相符, 即随着物种取样数量的增加, DNA 条形码的物种鉴别效率呈现下降趋势。

目前, 关于 DNA 条形码研究中待测物种集的物种数量要求还没有相关标准。除物种取样数量外, 样本取样范围, 取样个体数、候选条形码在待研究类群中的进化速度、干扰基因(假基因和内生菌)等也是 DNA 条形码物种鉴别效率的重要影响因素^[36-38]。鉴于不同候选条形码在待研究类群中的进化速度不同, 诸多研究者提出使用不同 DNA 条形码片段的组合方案, 如生命条形码联盟植物工作组^[39]推荐使用 rbcL+matK 组合作为陆生植物种类鉴定的 DNA 条形码。Xu 等^[35]通过比较不同组合片段对亚洲大陆石斛属植物的鉴定效率, 提出 ITS+matK 为最优 DNA 条形码组合。近年来, 叶绿体全基因组因含有更丰富的变异位点和遗传信息, 已被证实比单个和组合 DNA 条形码片段具有更高的物种分辨率, 可作为植物种类鉴定的超级条形码^[40]。我国石斛种类繁多, 除药用石斛外, 还有诸多观赏性石斛种类, 后续研究有必要进一步扩大取样数量、取样范围和取样个体数, 并评估组合条形码和超级条形码的物种鉴定能力, 以期获得可有效区分我国所有石斛属植物的理想 DNA 条形码。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. (第 19 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 126.
- [2] Yue H, Zeng H, Ding K. A review of isolation methods, structure features and bioactivities of polysaccharides

- from *Dendrobium* species [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(1): 1-27.
- [3] 刘朝波, 闻伟铿, 李肇高, 等. 不同产地铁皮石斛茎中内生真菌群落结构与农艺性状差异相关性分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1236-1242.
- [4] 樊丽彤, 杨洁, 周倩, 等. 紫皮石斛与铁皮石斛的鉴别研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(3): 843-845.
- [5] 侯晓强, 郭顺星. 20 种石斛属植物根解剖结构特征与种间分类研究 [J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(21): 1885-1888.
- [6] Hao J W, Chen Y, Chen N D, *et al.* Rapid detection of adulteration in *Dendrobium huoshanense* using NIR spectroscopy coupled with chemometric methods [J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(3): 854-859.
- [7] Ye Z, Dai J R, Zhang C G, *et al.* Chemical differentiation of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by using HPLC fingerprints, HPLC-ESI-MS, and HPTLC analyses [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 8647212.
- [8] 陈文强, 汪小福, 陈笑芸, 等. 铁皮石斛鉴定方法与技术的研究进展 [J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(2): 299-304.
- [9] Yang L, Wu W R, Zhou H, *et al.* Rapid identification of *Dendrobium officinale* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 337-345.
- [10] Dong X M, Jiang C, Yuan Y, *et al.* Application of high-resolution melting analysis for authenticity testing of valuable *Dendrobium* commercial products [J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(2): 549-558.
- [11] Wu H Y, Chan K T, But G W, *et al.* Assessing the reliability of medicinal *Dendrobium* sequences in GenBank for botanical species identification [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3439.
- [12] Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, *et al.* Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences [J]. *J Nat Med*, 2010, 64(2): 133-138.
- [13] Liu M, Li X W, Liao B S, *et al.* Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(8): 585-590.
- [14] 邵世光, 韩丽, 马艳红, 等. 枫斗类石斛 cpDNA psbA-trnH 的序列分析与鉴别 [J]. *药学学报*, 2009, 44(10): 1173-1178.
- [15] 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 Med*, 2009, 75(6): 667-669.
- [16] 陈文强, 汪小福, 陈笑芸, 等. 不同植物 DNA 条形码对铁皮石斛鉴定能力的评价 [J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 131-139.
- [17] 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 Res Notes*, 2012, 5: 42.
- [18] 刘静, 何涛, 淳泽. 基于 ITS 序列的中国药用石斛及其混伪品的分子鉴定 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2853-2856.
- [19] 徐素素, 高静, 陈军文, 等. 药用石斛及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定 [J]. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2021, 36(5): 862-871.
- [20] 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): 76.
- [21] Alzohairy A. BioEdit: An important software for molecular biology [J]. *GERF Bullet Biosci*, 2011, 2(1): 60-61.
- [22] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [23] 张国林, 邢以文, 薛满. DNA 条形码等分子鉴定技术与动植物类中药材的鉴定 [J]. *中国现代中药*, 2021, 23(2): 381-388.
- [24] Raskoti B B, Ale. DNA barcoding of medicinal orchids in Asia [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23651.
- [25] 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 Med*, 2001, 67(5): 456-460.
- [26] Hebert P D N, Ratnasingham S, DeWaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [27] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312.
- [28] Meier R, Zhang G Y, Ali F. The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the barcoding gap and leads to misidentification [J]. *Syst Biol*, 2008, 57(5): 809-813.
- [29] Feng S G, 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.

- [30] China Plant BOL Group, Li D Z, Gao L M, *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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 刘红梅, 张存艳, 叶强, 等. 基于 DNA 条形码技术对喉红石斛的植物学分类研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6656-6662.
- [34] Coleman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons [J]. *Trends Genet*, 2003, 19(7): 370-375.
- [35] Xu S Z, Li D Z, Li J W, *et al.* Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0115168.
- [36] Luo A R, Lan H Q, Ling C, *et al.* A simulation study of sample size for DNA barcoding [J]. *Ecol Evol*, 2015, 5(24): 5869-5879.
- [37] Bergsten J, Bilton D T, Fujisawa T, *et al.* The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding [J]. *Syst Biol*, 2012, 61(5): 851-869.
- [38] Smith M A, Bertrand C, Crosby K, *et al.* Wolbachia and DNA barcoding insects: Patterns, potential, and problems [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36514.
- [39] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [40] Li X, Yang Y, Henry R J, *et al.* Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2015, 90(1):157-160.

[责任编辑 时圣明]