

石斛属植物 DNA 条形码鉴定及铁皮石斛产地分析

鄢珊珊¹, 沈斌国², 赵海莹³, 丁艳菲^{1*}, 朱 诚¹

(¹ 中国计量大学生命科学学院 浙江省特色农产品品质及危害物控制技术重点实验室 杭州 310018

² 浙江凤凰源生物科技股份有限公司 浙江台州 318056

³ 中国计量大学材料与化学学院 杭州 310018)

摘要 为建立石斛属植物适合的 DNA 条形码以及利用条形码鉴定铁皮石斛产地,对鼓槌石斛、报春石斛、金钗石斛、铁皮石斛 4 种石斛以及杭州、霍山、云南和温州 4 个产地的铁皮石斛的 66 份样品的 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列进行扩增、测序及序列分析。比较石斛属植物种内、种间的变异,基于 K2P 距离分析 Barcoding Gap,构建 NJ 系统发育树。结果表明,*ITS2* 序列种内遗传变异(0~0.005)小于种间遗传变异(0.070~0.228),NJ 进化树也能准确区分 4 种石斛;而 *psbA-trnH* 序列未形成 Barcoding Gap,NJ 进化树未能区分报春石斛和金钗石斛,*psbA-trnH* 序列在鉴定石斛属植物时可作为补充序列。*ITS2* 序列和 *psbA-trnH* 序列在 4 种产地铁皮石斛中存在多个变异位点,可鉴别铁皮石斛产地。

关键词 石斛属; 铁皮石斛; DNA 条形码; 鉴定

文章编号 1009-7848(2023)12-0238-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.025

石斛属(*Dendrobium* Sw.)是微子目、兰科下的一个属,目前已确认的石斛属植物有 1 547 种,中国已报道的石斛属植物有 80 余种^[1]。铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)具有益胃生津、滋阴清热的功能,已与茯苓、人参等多种中药材共同开发成中成药^[2]。铁皮石斛野生资源匮乏,现以人工种植为主,因价格昂贵,故假冒伪劣和以次充好的情况常有发生。市售的中药材多经炮制,DNA 往往会发生严重降解,传统的形态学鉴定和分子鉴定方法难以奏效^[3],而利用 DNA 条形码技术对中药材鉴别,技术上还不成熟,适用性有限^[4-5],由此,对铁皮石斛流通源头——种子/鲜石斛进行品种鉴定,是确保种质资源正确的关键步骤。

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、相对较短的 DNA 片段进行物种鉴定和分类的技术。该技术不受物种形态学特征以及发育阶段的限制,

能够高效、准确鉴定其品种^[6]。*ITS*(internal transcribed spacer)是核糖体 RNA 基因的非转录区,该区域在物种种内差异不大,而在种间差异明显,因而非常适用于植物分类学研究及中药材物种鉴定^[7-8]。*ITS2* 序列是去除 5.8SrRNA 序列和 28SrRNA 序列的核糖体 DNA 序列间隔区,有良好的通用性,被广泛应用于系统发育标记,其变异位点能够保证其鉴定能力,维持物种鉴定的成功率^[9]。Chen 等^[10]使用 *ITS2* 序列鉴定 753 个属的 4 800 个种的 6 600 多个植物样品,其成功识别率高达 92.7%,首次在国际上提出把 *ITS2* 作为药用条形码的通用序列。2009 年,国际生命条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)推荐使用叶绿体基因片段 *rbcL+matK* 作为植物通用的 DNA 条形码^[11]。之后更多叶绿体基因片段被大量研究如 *psbA-trnH*。Yao 等^[12]的团队提出 *psbA-trnH* 是有效的条形码区域,试验选取的 17 种石斛属植物的 *psbA-trnH* 间隔区都是一个独特的序列,利用该序列可以鉴别不同种类的石斛。Xu 等^[13]通过分析 184 种石斛的 *psbA-trnH* 序列,发现 *psbA-trnH* 序列种内和种间距离有重叠,无条形码间隙。尽管做了许多努力,*psbA-trnH* 序列能否准确鉴定石斛种类,能否在石斛属植物中作为条形码使用,目前尚未达成共识^[14]。对于药用植物而言,产地和品种同样重要,每种药用植物都有固定的产地,不

收稿日期: 2022-12-11

基金项目: 台州市“500 精英计划”人才项目(B 类);浙江省自然科学基金项目(LZ22C130003);浙江省科技计划项目(2022C04002);浙江省高校基本科研业务费项目(2022YW79)

第一作者: 鄢珊珊,女,硕士生

通信作者: 丁艳菲 E-mail: dingyanfei@cjlu.edu.cn

同产地的同一药用植物所含有效成分不完全相同,功效有差异,导致制剂质量不稳定^[15-16]。利用 DNA 条形码技术对植物产地鉴别的研究目前较少。冯帅等^[17]使用 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列鉴定山东、河南、陕西、山西 4 省的连翘,发现 ITS2 序列不同产地间遗传距离为零,不同产地间变异不大;而 *psbA-trnH* 序列则把地理位置相距不远的样品聚类到一起,展示条形码技术不仅可以用于品种鉴别,更有潜力应用于产地鉴定。

本研究采用近几年较热门的 DNA 条形码候选序列 (ITS2 和 *psbA-trnH*),对铁皮石斛、鼓槌石斛、报春石斛及金钗石斛 4 种石斛属植物的相应片段进行分析,实现对石斛的品种鉴定。同时使用 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列分析云南、霍山、杭州及温州 4 个产地铁皮石斛在上述序列中的差异,实现铁皮石斛产地鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究采集到 4 种石斛:铁皮石斛 (*D. officinale*) ($n=41$)、鼓槌石斛 (*D. chrysotoxum*) ($n=8$)、报春石斛 (*D. primulinum*) ($n=9$)、金钗石斛 (*D. nobile*) ($n=8$)。铁皮石斛采集自杭州 (*D. officinale* HZ) ($n=11$)、霍山 (*D. officinale* HS) ($n=12$)、云南 (*D. officinale* YN) ($n=10$)、温州 (*D. officinale* WZ) ($n=8$)。总计 4 种石斛共 66 份样品。

1.2 试剂与设备

无水乙醇、75%乙醇、氯化钠、异丙醇,杭州高晶精细化工有限公司;十六烷基三甲基溴化铵、异戊醇,上海麦克林生化科技有限公司;Tris 饱和酚溶液、50×TAE Buffer,生工生物工程(上海)股份有限公司;Ex Taq PCR 酶、DNA Marker DL

2000,宝生物工程(大连)有限公司;乙二醇四乙酸二钠,无锡市展望化工试剂有限公司;三(羟甲基)氨基甲烷,天津市科密欧化学试剂有限公司; β -巯基乙醇,上海齐合生物技术有限公司;三氯甲烷,上海凌峰化学试剂有限公司;琼脂糖 (Agarose),西班牙;Goldview II 型核酸染色剂 5000×,北京索莱宝科技有限公司。

XFSTPRP-24 全自动样品高速研磨仪,上海净信实业发展有限公司;HHS 电热恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司;Beckman Allegra X-30R 冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 公司;Nano-100 微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;Long Gene A300 PCR 基因扩增仪,杭州朗基科学仪器有限公司;EPS300 电泳仪,上海天能科技有限公司;Tanon3500 凝胶成像仪,上海天能科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取、PCR 扩增和测序 所有石斛材料用乙醇擦净表面,称取石斛鲜茎约 0.1 g 于 2 mL 灭菌离心管,使用全自动高速研磨仪研磨,至样品被完全研碎,采用改良 CTAB 法^[18]提取石斛 DNA,于 -20 °C 保存。正向引物和反向引物见表 1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系均为:含模板 DNA 2 μ L、正反引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L、2×Taq master mix 12.5 μ L、ddH₂O 8.5 μ L。PCR 反应条件均为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,50~55 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 终延伸 10 min,于 4 °C 保存。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶成像仪观察后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

表 1 DNA 条形码引物及退火温度

Table 1 DNA barcode primer and annealing temperature

| 引物 | 序列 (5'-3') | 退火温度/°C | 参考文献 |
|---------------------|----------------------------|---------|------|
| ITS2-F | CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC | 52 | [19] |
| ITS2-R | TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG | | |
| <i>psbA-trnH</i> -F | GTTATGCATGAACGTAATGCTC | 55 | [20] |
| <i>psbA-trnH</i> -R | CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC | | |

1.3.2 序列分析 利用 Chromas 2 软件查看序列峰图,判断测序结果是否理想。使用 EditSep 编辑

测序成功的序列,删除两侧不确定区域,利用 NCBI (National Center for Biotechnology Informa-

tion) 平台的 BLAST 工具与数据库比对。利用 DNASTAR 软件计算所得序列 GC 含量, 并运用 MEGA 6 软件进行多序列比对, 以 K2P(Kimura 2-parameter) 为模型进行种内、种间遗传距离分析, 利用邻接法(neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树, 同时以 Bootstrap 自展支持率(1 000 次) 重复检验各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及测序结果分析

4 种石斛 ITS2 序列的扩增和测序成功率均为 100%; *psbA-trnH* 序列的扩增成功率和测序成功率分别为 100% 和 88%。66 份石斛样品的 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的序列长度、GC 含量统计结果见表 2。

表 2 4 种石斛序列分析结果

Table 2 The sequence analysis results of 4 species of *Dendrobium*

| 种类 | ITS2 | | <i>psbA-trnH</i> | |
|--------|--------------|---------|------------------|---------|
| | 序列长度/bp | GC 含量/% | 序列长度/bp | GC 含量/% |
| 杭州铁皮石斛 | 246(246~246) | 50.81 | 744(744~744) | 35.08 |
| 霍山铁皮石斛 | 246(246~246) | 50.81 | 746(744~750) | 35.08 |
| 云南铁皮石斛 | 246(246~246) | 50.73 | 744(744~744) | 35.08 |
| 温州铁皮石斛 | 246(246~246) | 50.81 | 748(744~750) | 35.07 |
| 鼓槌石斛 | 248(248~249) | 55.62 | 751(751~751) | 35.15 |
| 报春石斛 | 246(245~247) | 53.57 | 757(757~757) | 34.74 |
| 金钗石斛 | 246(246~246) | 53.66 | 757(757~757) | 34.74 |

2.2 BLAST 分析

对得到的 123 条序列在 GenBank 数据库中运用 BLAST 方法进行序列比对。获得的所有序列均在 GenBank 数据库中对比得到了相应物种的序列, 其中, 在 66 条 ITS2 序列中有 56 条的 BLAST 对比率为 100%; 9 条的 BLAST 对比率为 99%; 1 条的 BLAST 对比率为 98%。57 条 *psbA-trnH* 序列中有 43 条的 BLAST 对比率为 100%; 9 条的 BLAST 对比率为 99%; 5 条的 BLAST 对比率为 98%。

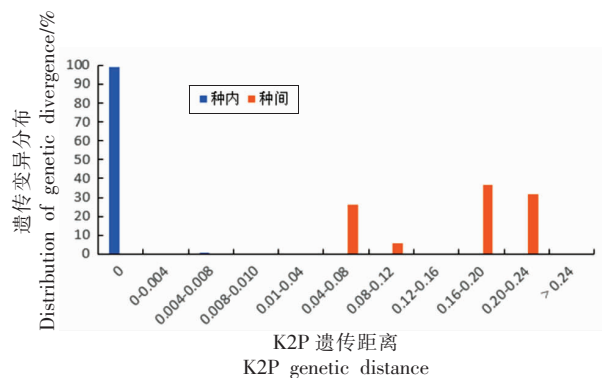


图 1 4 种石斛 ITS2 序列遗传变异分布图

Fig.1 The genetic divergence of ITS2 of 4 species of *Dendrobium*

2.3 种内、种间遗传距离分析

理想的条形码种间遗传变异应明显大于种内遗传变异, 并在两者之间形成明显的间隔区, 即 Barcoding Gap。根据 K2P 遗传距离, 2 条 DNA 条形码候选序列构建 Barcoding Gap 图 (图 1~图 2) 显示: ITS2 序列种内遗传变异和种间遗传变异能够很好的区分, 形成了明显的 Barcoding Gap 区。 *psbA-trnH* 序列虽然没有形成明显的 Barcoding Gap, 但种内遗传距离和种间遗传距离没有交叉。

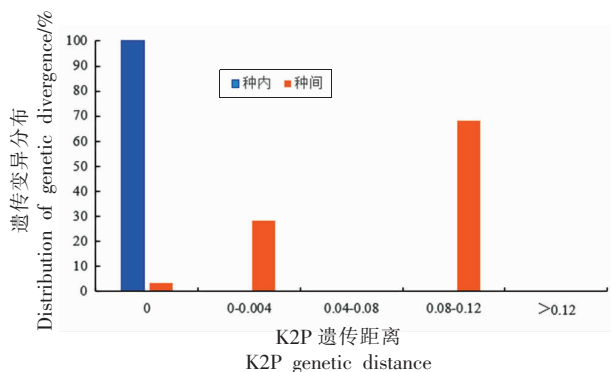


图 2 4 种石斛 *psbA-trnH* 序列遗传变异分布图

Fig.2 The genetic divergence of *psbA-trnH* of 4 species of *Dendrobium*

2.4 系统发育树的构建

将 4 种兰科石斛属植物的 66 条 *ITS2* 和 58 条 *psbA-trnH* 序列, 以兰科蝴蝶兰属的蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite* H. G. Reichenbach) 作为外群(黑色), 分别运用 NJ 法构建系统进化树(图 3~图 4), 红色为铁皮石斛、绿色为鼓槌石斛、黄色为报春石斛、蓝色为金钗石斛。*ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列都能做到将石斛属植物与蝴蝶兰分开。*ITS2*

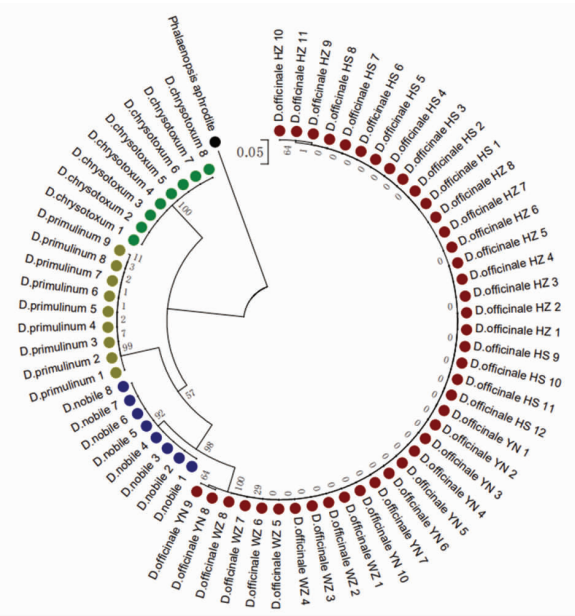


图 3 4 种石斛 *ITS2* 序列 NJ 系统发育树

Fig.3 NJ tree of *ITS2* of 4 species of *Dendrobium*

2.5 不同产地铁皮石斛 *ITS2* 及 *psbA-trnH* 序列变异位点分析

选取杭州、霍山、云南和温州 4 种产地铁皮石斛的 *ITS2* 序列和 *psbA-trnH* 序列, 利用 MEGA 软件进行 K2P 遗传距离分析发现, 4 种产地铁皮石斛的 *ITS2* 序列和 *psbA-trnH* 序列在不同产地间遗传距离均为 0。利用 *ITS2* 序列分析 4 种产地铁皮石斛亲缘关系(表 3), 可知: 1) 霍山产铁皮石斛和温州产铁皮石斛亲缘关系最近, 云南产铁皮石斛和杭州产铁皮石斛亲缘关系最远; 2) 温州产铁皮石斛和霍山产铁皮石斛 *ITS2* 序列变异位点数为 0; 3) 杭州产铁皮石斛该序列有 3 个变异位点, 均在 185 bp 处, 该处发生突变的样品占杭州产铁皮石斛样品的 27%; 4) 云南产铁皮石斛该序列有 2 个变异位点, 均在 93 bp 处, 该处发生突变的样

序列构建的 NJ 进化树如图 3 所示, 4 种石斛能被清晰分开, 所有样本聚为五大支。其中 4 种产地铁皮石斛聚为一大支, 其余 3 种石斛属植物各为一大支, 彼此间无交叉, 其中金钗石斛与铁皮石斛亲缘关系很近。*psbA-trnH* 序列构建的 NJ 进化树如图 4 所示, 4 种石斛未能被完全分开, 所有样品聚为四支, 鼓槌石斛和铁皮石斛单独聚为一支, 报春石斛和金钗石斛共聚为一支。

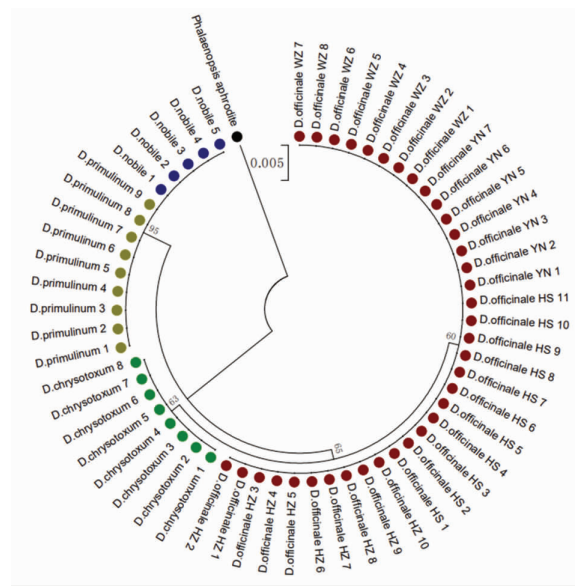


图 4 4 种石斛 *psbA-trnH* 序列 NJ 系统发育树

Fig.4 NJ tree of *psbA-trnH* of 4 species of *Dendrobium*

品占云南产铁皮石斛样品的 17%。利用 *psbA-trnH* 序列分析 4 种产地铁皮石斛亲缘关系(表 4), 可知: 1) 霍山产铁皮石斛和杭州产铁皮石斛亲缘关系最近; 2) 杭州产铁皮石斛和云南产铁皮石斛在该序列变异位点数为 0; 3) 霍山产铁皮石斛和温州产铁皮石斛在 89, 90, 91, 92, 93, 94 bp 处有变异, 且这两种产地铁皮石斛的变异规律一致, 均为增加一段 GTGATT 序列, 其中霍山产铁皮石斛样品中发生变异的比例为 36%, 而温州产铁皮石斛发生变异的比例为 63%。

3 讨论

3.1 DNA 条形码候选序列对石斛属植物鉴定准确性评价

利用条形码技术对植物进行物种鉴定具有高

表3 4种产地铁皮石斛 ITS2 序列变异位点信息比较分析

Table 3 Comparative analysis of ITS2 sequence variation site information of *Dendrobium officinale* from four habitats

| ITS2 突变位点 | 93 | 185 |
|-----------|----|-----|
| 共识 | C | A |
| 霍山铁皮石斛 1 | | |
| 霍山铁皮石斛 2 | | |
| 霍山铁皮石斛 3 | | |
| 霍山铁皮石斛 4 | | |
| 霍山铁皮石斛 5 | | |
| 霍山铁皮石斛 6 | | |
| 霍山铁皮石斛 7 | | |
| 霍山铁皮石斛 8 | | |
| 霍山铁皮石斛 9 | | |
| 霍山铁皮石斛 10 | | |
| 霍山铁皮石斛 11 | | |
| 霍山铁皮石斛 12 | | |
| 杭州铁皮石斛 1 | | |
| 杭州铁皮石斛 2 | | |
| 杭州铁皮石斛 3 | | |
| 杭州铁皮石斛 4 | | |
| 杭州铁皮石斛 5 | | |
| 杭州铁皮石斛 6 | | |
| 杭州铁皮石斛 7 | | |
| 杭州铁皮石斛 8 | | |
| 杭州铁皮石斛 9 | | T |
| 杭州铁皮石斛 10 | | T |
| 杭州铁皮石斛 11 | | T |
| 温州铁皮石斛 1 | | |
| 温州铁皮石斛 2 | | |
| 温州铁皮石斛 3 | | |
| 温州铁皮石斛 4 | | |
| 温州铁皮石斛 5 | | |
| 温州铁皮石斛 6 | | |
| 温州铁皮石斛 7 | | |
| 温州铁皮石斛 8 | | |
| 云南铁皮石斛 1 | | |
| 云南铁皮石斛 2 | | |
| 云南铁皮石斛 3 | | |
| 云南铁皮石斛 4 | | |
| 云南铁皮石斛 5 | | |
| 云南铁皮石斛 6 | | |
| 云南铁皮石斛 7 | | |
| 云南铁皮石斛 8 | T | |
| 云南铁皮石斛 9 | T | |
| 云南铁皮石斛 10 | | |

表4 4种产地铁皮石斛 psbA-trnH 序列变异位点信息比较分析

Table 4 Comparative analysis of psbA-trnH sequence variation site information of *Dendrobium officinale* from four habitats

| psbA-trnH 突变位点 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 |
|----------------|----|----|----|----|----|----|
| 共识 | . | . | . | . | . | . |
| 霍山铁皮石斛 1 | G | T | G | A | T | T |
| 霍山铁皮石斛 2 | G | T | G | A | T | T |
| 霍山铁皮石斛 3 | G | T | G | A | T | T |
| 霍山铁皮石斛 4 | G | T | G | A | T | T |
| 霍山铁皮石斛 5 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 6 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 7 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 8 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 9 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 10 | | | | | | |
| 霍山铁皮石斛 11 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 1 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 2 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 3 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 4 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 5 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 6 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 7 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 8 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 9 | | | | | | |
| 杭州铁皮石斛 10 | | | | | | |
| 温州铁皮石斛 1 | | | | | | |
| 温州铁皮石斛 2 | | | | | | |
| 温州铁皮石斛 3 | | | | | | |
| 温州铁皮石斛 4 | G | T | G | A | T | T |
| 温州铁皮石斛 5 | G | T | G | A | T | T |
| 温州铁皮石斛 6 | G | T | G | A | T | T |
| 温州铁皮石斛 7 | G | T | G | A | T | T |
| 温州铁皮石斛 8 | G | T | G | A | T | T |
| 云南铁皮石斛 1 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 2 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 3 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 4 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 5 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 6 | | | | | | |
| 云南铁皮石斛 7 | | | | | | |

效、准确等优势,2010年陈士林团队在国际上首次提出核基因 *ITS2* 可作为中草药通用 DNA 条形码^[10],近年来该团队致力于利用条形码技术实现中药的质量控制和安全性检测^[21]。Feng 等^[22]选取了 64 种石斛的 364 段 *ITS2* 片段,发现 *ITS2* 能鉴别绝大多数石斛属植物,成功鉴别了试验中 86% 的石斛属植物样品,但对亲缘关系比较近的石斛如铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 与黄石斛 (*Dendrobium tosaense*)、金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 与矩唇石斛 (*Dendrobium linavianum*) 等难以鉴别。而本试验中使用的所有材料均为鉴别率为 100% 的物种,66 个石斛属样品中,有 41 条铁皮石斛、7 条鼓槌石斛、8 条金钗石斛的 *ITS2* 序列 BLAST 的结果显示与相应物种的相似度为 100%,8 条报春石斛和 1 条鼓槌石斛的该序列 BLAST 的结果与相应物种的相似度为 99%,1 条报春石斛的该序列 BLAST 的结果显示与报春石斛相似度为 98%,试验结果显示:*ITS2* 序列的物种鉴定率为 84%。由此可知随着样本数的增加,序列内发生变异的位点增多,造成该序列品种鉴别率下降。*ITS2* 序列种内遗传距离小于种间遗传距离,能够准确识别铁皮石斛、鼓槌石斛、报春石斛和金钗石斛 4 种石斛属植物,并且能够在系统发育树中把上述 4 种石斛属植物单独聚为一支,*ITS2* 序列适合成为石斛属植物 DNA 条形码序列。叶绿体基因组包含丰富的遗传信息,被广泛用于物种鉴定及系统进化研究。李园园等^[23]研究 3 种金钗石斛的遗传变异类型(共 60 份样品),分别为鱼肚兰、圆茎兰和竹叶兰,发现 3 种金钗石斛的遗传变异类型的 *psbA-trnH* 序列的核苷酸排列有差异,相同遗传变异类型的不同样品间该序列核苷酸排列仍有差异;该序列仅能将不到 1/3 的样品鉴定为金钗石斛。分析试验获得的 58 份石斛属植物样品的 *psbA-trnH* 序列发现:有 27 条铁皮石斛、8 条鼓槌石斛、9 条报春石斛的该序列 BLAST 的结果显示与相应物种的相似度为 100%,9 条铁皮石斛的该序列 BLAST 的结果显示与铁皮石斛相似度为 99%,5 条金钗石斛的该序列 BLAST 的结果显示与金钗石斛相似度为 98%;该序列种内遗传距离为零的比例高达 100%,由于报春石斛和金钗石斛核苷酸组成高度相似,故该序列存在种

间遗传距离为零的情况,试验中占比为 4.74%,试验结果显示 *psbA-trnH* 序列的物种识别率为 76%。付涛等^[24]则发现 *psbA-trnH* 序列对试验中所使用的石斛材料的鉴别率为 50%。条形码序列对植物的鉴别率与试验中选取的石斛属植物的品种和数量有关,选取的植物间亲缘关系越远,同一种植物的样本量越少,常常显示出这段序列拥有良好的分类能力,但随着样本数的增加,植物种内变化的增大,该序列便不能很好区分植物种类,也就造成了同一段序列在石斛中的物种识别度有差异的现象。试验中构建系统发育树时金钗石斛和报春石斛被聚类到一起。综上 *psbA-trnH* 序列在石斛属中鉴定能力有限,无法完全鉴定石斛属植物的品种;*psbA-trnH* 序列具有一定分类能力,在进化树上能够把部分物种聚类到一起,但作为条形码,相对保守性与变异性仍不足,可以作为石斛鉴别的辅助性序列。

3.2 DNA 条形码序列分析铁皮石斛产地

利用 DNA 条形码技术对植物进行产地溯源鲜有报道。苏艳等^[25]研究新疆 18 个采集地的新塔花 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列核苷酸组成,发现地理条件相近或相似的样品遗传距离小、亲缘关系近。林爽等^[26]研究了 14 种不同地理居群的破布叶 *ITS2* 序列,发现不同居群的 *ITS2* 序列核苷酸排列有差异,可以利用该差异判断产地。彭小凤等^[27]研究了 6 个居群的铁皮石斛 *psbA-trnH* 序列,发现不同居群铁皮石斛间该序列的遗传距离均为 0,不同居群的铁皮石斛该序列中没有变异位点。前人的研究,选取同一产地的样品往往较少,结果不具有普遍性。本试验中,采集杭州产铁皮石斛 11 份,获得 *ITS2* 序列 11 条,*psbA-trnH* 序列 10 条、采集霍山产铁皮石斛样品 12 份,获得 *ITS2* 序列 12 条,*psbA-trnH* 序列 11 条、采集云南产铁皮石斛 10 份,获得 *ITS2* 序列 10 条,*psbA-trnH* 序列 7 条、采集温州产铁皮石斛 8 份,获得 *ITS2* 序列 8 条,*psbA-trnH* 序列 6 条。4 种产地铁皮石斛中 *ITS2* 序列变化不明显,结果显示云南产铁皮石斛更容易在 93 bp 处由 C 突变为 T;杭州产铁皮石斛更容易在 185 bp 处由 A 突变为 T。*psbA-trnH* 序列分析时发现,产地是霍山和温州的铁皮石斛更容易在 89 bp 处插入一段 GTGATT 序列,且发生

比例较高,这一发现对铁皮石斛产地溯源有一定参考意义。分析发现同一产地的铁皮石斛样品并未在相同变异位点全部发生变异,而是部分样品在该位点发生变异,其余则未发生变异,考虑是由于不同地域相互引种,造成的种质背景变模糊,或是在自然演化过程中由于该产地特殊的地理条件,该产地铁皮石斛或该产地所有物种的核酸序列更容易发生上述变化。这体现了地域性特点,可为DNA条形码技术研究药材产地提供一定参考价值。

4 结论

研究结果表明,ITS2序列对铁皮石斛、鼓槌石斛、报春石斛和金钗这4种石斛具有足够的鉴别能力;*psbA-trnH*序列相对保守性与变异性仍有不足,该序列能鉴别铁皮石斛和鼓槌石斛,该序列可以作为石斛鉴别的辅助性序列。ITS2和*psbA-trnH*序列在产地鉴别中均有潜力。

参 考 文 献

- [1] WANG Y H. Traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities, and toxicological effects of *Dendrobium* leaves: A review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 270: 113851.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 803.
Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 803.
- [3] 刘杨. 基于Mini-barcoding的中药材分子身份证研究——以西洋参、冬虫夏草、银杏叶为例[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
LIU Y. Study of TCM nucleotide signature based on Mini-barcoding—*Panax quinquefolius*, *Ophiocordyceps sinensis* and *Ginkgo biloba* for examples[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2018.
- [4] 马天宇, 张晓军, 魏继承, 等. 基于ITS2鉴定中药材天花粉中混伪成分的初步探究[J/OL]. *分子植物育种*, 1-9(2022-01-11)[2022-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220110.1902.018.html>.
MA T Y, ZHANG X J, WEI J C, et al. Preliminary Study on the identification of false components in Chinese herbal medicine trichinosis based on ITS2[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 1-9(2022-01-11)[2022-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220110.1902.018.html>.
- [5] 辛天怡, 闫海霞, 李冉郡, 等. DNA条形码技术在国家药品抽验中的应用研究[J]. *药学学报*, 2021, 56(5): 1497-1508.
XIN T Y, YAN H X, LI R J, et al. Application of DNA barcoding technology to national drug sampling inspection [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(5): 1497-1508.
- [6] HEBERT P, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [7] YAO H, SONG J Y, LIU C, et al. Use of ITS2 Region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13102-e13102.
- [8] LI D Z, GAO L M, LI H T, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [9] ZHANG W, TIAN W, GAO Z P, et al. Phylogenetic utility of rRNA ITS2 sequence-structure under functional constraint [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6395-6395.
- [10] 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-e8613.
- [11] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [12] YAO H, SONG J Y, MA X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode Sequence: The chloroplast *psbA-trnH* intergenic region[J]. *Planta Medica*, 2009, 75(6): 667-669.
- [13] 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-e011516

- [14] 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.
CHEN W Q, WANG X F, CHEN X Y, et al. Evaluation of the ability of different plant DNA barcodes to identify *Dendrobium officinale*[J]. Food Science, 2021, 42(22): 131-139.
- [15] 欧阳楠, 琚健. 从中药制剂生产用中药材及中药饮片质量问题谈监管模式[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(3): 239-244.
OUYANG N, JU J. Discussion of the supervision mode for the quality of traditional Chinese medicine and traditional Chinese medicine pieces in traditional Chinese medicine preparations[J]. China Pharm J, 2018, 53(3): 239-244.
- [16] PU Z J, YUE S J, ZHOU G S, et al. The Comprehensive evaluation of safflowers in different producing areas by combined analysis of color, chemical compounds, and biological activity[J]. Molecules, 2019, 24(18): 3381-3392.
- [17] 冯帅, 李峰, 刘杨, 等. 基于 *ITS2*、*trnH-psbA* 条形码的不同产地连翘及其伪品 DNA 分子鉴定[J]. 中药材, 2018, 41(3): 556-558.
FENG S, LI F, LIU Y, et al. DNA molecular identification of forsythia suspensa and its adulterants from different habitats based on *ITS2* and *trnH-psbA* barcode[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2018, 41(3): 556-558.
- [18] 郑云柯, 胡翔宇, 宋希强, 等. 石斛属植物基因组 DNA 提取方法的对比[J]. 热带生物学报, 2015, 6(2): 168-172.
ZHENG Y K, HU X Y, SONG X Q, et al. Optimized extraction method for genomic DNA from *Dendrobium* species (Orchidaceae) [J]. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(2): 168-172.
- [19] 张金家, 徐红, 赵淑娟. 应用直接 PCR 技术的药用植物批量样本快速处理及分子鉴定[J]. 药学学报, 2017, 52(11): 1763-1769.
ZHANG J J, XU H, ZHAO S J. Rapid identification of medicinal herbs through plant Direct-PCR[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52(11): 1763-1769.
- [20] WANG X L, XUE J Y, ZHANG Y Y, et al. DNA barcodes for the identification of *Stephania* (Menispermaceae) species [J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(3): 2197-2203.
- [21] 陈士林, 钱忠直. 中药安全性与检定研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1467-1468.
CHEN S L, QIAN Z Z. Study on safety and verification of traditional Chinese medicine[J]. Chin Pharm J, 2015, 50(17): 1467-1468.
- [22] 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]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 21975-21988.
- [23] 李园园, 蔡莉, 杨继勇, 等. 基于 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列的金钗石斛 DNA 条形码鉴定研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3516-3524.
LI Y Y, CAI L, YANG J Y, et al. Identification and research for DNA barcoding of *Dendrobium nobile* Lindl. based on *ITS2* and *psbA-trnH* gene sequence[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(8): 3516-3524.
- [24] 付涛, 胡仲义, 何月秋, 等. 基于 cpDNA 条形码鉴定铁皮石斛种质资源[J]. 核农学报, 2017, 31(2): 255-262.
FU T, HU Z Y, HE Y Q, et al. Identification of germplasm resources in *Dendrobium officinale* based on cpDNA barcoding[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(2): 225-262.
- [25] 苏艳, 程波, 何江, 等. 不同地理居群新塔花的 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 序列及聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 175-182.
SU Y, CHENG B, HE J, et al. Cluster analysis of *Ziziphora bungeana* from different geographical populations based on *ITS2* and *psbA-trnH* sequences[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(16): 175-182.
- [26] 林爽, 吴海燕, 张宏意, 等. 不同地理居群破布叶的 *psbA-trnH* 和 *ITS2* 序列及其聚类分析[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1403-1408.
LIN S, WU H Y, ZHANG H Y, et al. Cluster analysis on *psbA-trnH* and *ITS2* sequences of *Microcos paniculate* from different geographical populations[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(7): 1403-1408.
- [27] 彭小凤, 何涛, 淳泽, 等. 基于叶绿体 *psbA-trnH* 和核糖体 5S rRNA 基因间隔区序列的石斛种间和种内鉴别[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 887-896.
PENG X F, HE T, CHUN Z, et al. Interspecific

and intraspecific identification of *Dendrobium* based the *psbA-trnH* intergenic region sequences and the

5S rRNA gene spacer sequences[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2015, 21(5): 887-896.

DNA Barcoding Identification of *Dendrobium* and Analysis of *Dendrobium officinale* Habitats

Yan Shanshan¹, Shen Binguo², Zhao Haiying³, Ding Yanfei^{*}, Zhu Cheng¹

(¹Key Laboratory of Specialty Agri-Product Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, China Jiliang University, Hangzhou 310018

²Zhejiang Fenghuangyuan Biotechnology Co., Ltd., Taizhou 318056, Zhejiang

³College of Materials and Chemistry, China Jiliang University, Hangzhou 310018

Abstract To identify *Dendrobium* species and to analyze the habitats of *Dendrobium officinale*, the suitable candidate DNA barcoding genes of *Dendrobium* were evaluated. In this study, the internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) of nuclear ribosomal DNA and chloroplast *psbA-trnH* gene were amplified and sequenced from sixty-six samples of *D.chrysotoxum*, *D.nobile*, *D.primulinum* and *D.officinale*. The *D.officinale* samples were collected from Hangzhou, Huoshan, Yunnan and Wenzhou. The intra-specific and inter-specific divergence of *Dendrobium* was calculated, and the identification efficiency was assessed using Barcoding Gap, NJ tree by K2P distance. The results showed the intra-specific divergence of *ITS2* (0-0.005) were obviously lower than the inter-specific divergence (0.070-0.228), and four species of *Dendrobium* were also accurately distinguished in NJ tree. Whereas, there is no Barcoding Gap on *psbA-trnH*, and it cannot distinguish *D.nobile* and *D.primulinum* in the NJ tree, and it can be used as a supplementary sequence in the identification of *Dendrobium*. *ITS2* and *psbA-trnH* of *D.officinale* from four habitats have multiple mutation sites, which have the potential to identify the habitats of *D.officinale*.

Keywords *Dendrobium*; *Dendrobium officinale*; DNA barcoding; identification