

丁 鸽, 张代臻, 丁小余, 等. 基于线粒体 *nadl intron 2* 序列的金钗石斛和混淆品亲缘关系及 DNA 条形码研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 38–41.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.008

基于线粒体 *nadl intron 2* 序列的金钗石斛和混淆品亲缘关系及 DNA 条形码研究

丁 鸽¹, 张代臻³, 丁小余², 蔡照胜¹, 商士斌⁴

(1. 盐城工学院化学化工学院, 江苏盐城 224003; 2. 南京师范大学生命科学院, 江苏南京 210046;

3. 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点实验室, 江苏盐城 224002; 4. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 江苏南京 210042)

摘要: 为了建立简便、重复性高的金钗石斛的分子鉴别方法, 对金钗石斛及其混淆品的亲缘关系进行分析并构建稳定的序列条形码分析, 根据金钗石斛及其混淆品的 *nadl intron 2* 序列, 寻找其中存在的特异性位点并设计特异性鉴别引物, 运用 Mega 5.0 等软件进行遗传关系分析并构建系统进化树。根据序列中存在的单核苷酸多态性(SNP)位点及特异性鉴别引物, 可在 53 ℃ 的复性条件下扩增得到约 400 bp 的条带, 将金钗石斛与其混淆品成功分开; 构建的 UPGMA 树可以将金钗石斛及其混淆品鉴别开。SNP 位点及位点特异性 PCR 具有高效、准确、省时的特点, 有广泛的应用前景。同时, 通过 *nadl* 基因第 2 内含子可以分析正品与混淆品之间的亲缘关系并成功构建物种分析的条形码序列, 为石斛药材的鉴别提供了可靠的科学依据, 也为构建更完整的 DNA barcoding(DNA 条形码)数据库奠定基础。

关键词: 金钗石斛; *nadl* 基因第 2 内含子; 单核苷酸多态性; 亲缘关系; DNA 条形码

中图分类号: S567.23⁺9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0038-04

石斛是我国兰科石斛属(*Dendrobium*)的珍稀濒危物种, 主要分布于我国植物区系学上的热点地区“岭南地区”和“华中地区”^[1], 长于海拔 800~1 600 m 的悬崖岩石或树干上。石斛属为兰科第 2 大属, 在我国共有 74 种和 2 个变种^[2]。独特的生境造就了石斛药材的非凡品质, 早在《神农本草经》中石斛药材就被列为上品, 应用历史悠久, 具有养阴生津、润肺明目、抗癌防老等功效^[3]。金钗石斛是《中华人民共和国药典》(2005 版)^[4]收录的适合加工成药材的 5 种石斛之一, 由于相似的外形及组织结构, 其他许多同属植物及金石斛属、石仙桃属的植物在加工后被用于冒充石斛正品在市场出售^[5-6]。准确鉴定石斛种类是保证药材质量和药理活性研究的重要前提, 对于濒危物种的资源保护也具有重要意义。

nadl 基因编码线粒体呼吸传递链的复合体 I-泛醌氧化还原酶(也可称 NADH 脱氢酶)的 *nadl* 亚基, 是 1 个结构较为稳定的线粒体基因, 由 5 个外显子构成^[7], 依次是 *nadl/a*~*nadl/e*。*nadl* 基因的内含子 2 序列位于 *nadl/b* 和 *nadl/c* 之间, 可能与 mRNA 成熟的反式剪接机制有关。植物线粒体中许多基因存在进化较快的内含子, 加上被子植物线粒体是母系遗传, 因此线粒体 DNA 片段信息同样提供了重要的进化信息, 在植物系统发育重建、居群生物学和生物地理学研究中许多成功的报道^[2,8-9]。SNP(single nucleotide polymorphism)称为单核苷酸多态性, 是指在染色体基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列多态性, 包括单碱

基的转换、颠换、插入及缺失等形式^[10]。SNP 具有位点丰富、更高的遗传稳定性、易实现分析的自动化等特点^[11-12], 广泛地应用于疾病检测、分子育种及中药材鉴别等领域^[13-15]。

AS-PCR, 即位点特异性 PCR, 首次利用是 DeSalle 等在 Nature 上发表的对鱼子酱中鱼卵所属鲟鱼的种类进行鉴别^[16]。在中药材鉴定领域, 有姜黄、大黄、齿瓣石斛、铁皮石斛等的位点特异性鉴别研究^[17-20]。DNA 序列分析是常用于植物分子系统学研究的一类重要的分子标记, 它是通过比较 DNA 序列的差异来反映生物体在遗传上的差异, 在此基础上发展起来 DNA barcoding(DNA 条形码)技术, 被越来越多地应用于中药材鉴定的研究中。DNA 条形码是基于 DNA 片段来表征生物物种身份并且有足够变异位点同时容易扩增的技术^[2,21], 已经在人参、金银花、石斛等中药材原植物的鉴定中得到广泛应用^[22-25]。本研究拟对金钗石斛及其近缘物种的 *nadl* 基因内含子 2 序列进行研究, 确定该序列作为 DNA 条形码的可行性并寻找 SNP 分子标记, 研究基因片段在植物鉴定方面的应用并探讨金钗石斛的进化地位, 为濒危物种的保护生物学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用材料主要采自云南、广西、广东等地, 各种植物的种类、来源及 GenBank 登录号详见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取

取硅胶干燥的材料叶片 0.1 g, 用无菌水冲洗干净, 采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[26]提取叶片总 DNA。利用紫外分光光度计测定所提取的 DNA 模板质量, 评价其 DNA 浓度及纯度, 于 -20 ℃ 保存。

收稿日期: 2017-07-22

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21606192); 江苏省自然科学基金(编号: BK20171276); 国家重点研发计划(编号: 2016YFD0600800)。
作者简介: 丁 鸽(1982—), 女, 山东烟台人, 博士, 副教授, 从事药用植物资源多样性及成分研究。E-mail: dingzye@163.com。

表 1 供试材料来源及登录号

编号	物种	来源	GenBank 登录号
1	粉花石斛(<i>D. loddigesii</i>)	云南文山	JQ864218
2	铁皮石斛(<i>D. officinale</i>)	广西乐业	JQ864219
3	齿瓣石斛(<i>D. devonianum</i>)	广西桂林	JQ864220
4	黄花石斛(<i>D. dioxanthum</i>)	云南思茅	JQ864221
5	球花石斛(<i>D. thyrsiflorum</i>)	云南西双版纳	JQ864222
6	束花石斛(<i>D. chrysanthum</i>)	广西乐业	JQ864223
7	兜唇石斛(<i>D. aphyllum</i>)	广西乐业	JQ864224
8	金钗石斛(<i>D. nobile</i>)	云南西双版纳	JQ864225
9	流苏石斛(<i>D. fimbriatum</i>)	广西天峨	JQ864226
10	黑毛石斛(<i>D. williamsonii</i>)	广西天峨	JQ864227
11	玫瑰石斛(<i>D. crepidatum</i>)	云南勐腊	JQ864228
12	晶帽石斛(<i>D. crystallinum</i>)	云南西双版纳	JQ864229
13	报春石斛(<i>D. primulinum</i>)	云南西双版纳	JQ864230
14	细叶石斛(<i>D. hancockii</i>)	云南西双版纳	JQ864231
15	矮石斛(<i>D. bellatulum</i>)	云南思茅	JQ864232
16	牛齿兰(<i>Appendicula cornuta</i>)	广东	AF314849

1.3 引物设计及 PCR 扩增

引物根据 Zhang 等对石斛属植物的研究^[27]设计,序列如下:*nadI* F, 5' - GCATTACGATCTGCAGCTCA - 3'; *nadI* R, 5' - GGAGCTCGATTAGTTTCTGC - 3'。PCR 扩增反应在 30 μ L 的反应体系中进行,包括 10 mmol/L Tris - HCl (pH 值为 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 U *Taq* 酶, 200 mmol/L dNTPs, 各 10 pmol/L 引物, DNA 模板约 80 ng。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μ L PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.4 PCR 产物纯化与测序

PCR 产物用美国 Axygen 试剂盒纯化, 纯化产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 DNA 序列分析

所得石斛属植物的序列用 Clustal X 1.8 软件完成比对, 用 Mega 5.0 软件分析碱基组成、变异位点数、简约信息位点数、转换和颠换数。以 Kimura - 2 参数计算遗传距离, 以牛齿兰(*Appendicula cornuta*)为外类群, 分析植物的种间变异, 构建 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean, 非加权组平均法)系统发生树, 分析石斛属各物种的亲缘关系。

1.6 位点特异性引物设计及扩增

运用 Clustal X 1.8, Mega 5.0 软件对所得序列进行排列, 根据碱基位点的变异设计特异性引物, 对金钗石斛及其混淆品进行鉴别。扩增反应的引物序列如下: JCF, 5' - CTAACGA-CGAGCAAACACT - 3'; JCR, 5' - AATTTCG-CGCCCTAAGAAGC - 3'。30 μ L 的反应体系包括 3 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 2 μ L 2 mmol/L dNTPs, 1 U *Taq* 酶, 1 μ L 10 pmol/L 引物, 100 ng DNA 模板。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 *nadI* intron 2 序列的长度和变异

金钗石斛及其近缘物种(不含外类群)的 *nadI* intron 2 序

列长度为 774 ~ 852 bp, 长度变异较大, 其中金钗石斛的 *nadI* 内含子 2 序列长度为 843 bp。经 Clustal X 1.8 和 MEGA 5.0 软件排序, 简并序列长度为 871 bp。其中碱基组成平均含量 T 为 18.2%、C 为 25.6%、A 为 25.8%、G 为 30.4%, GC 含量为 56%, GC 含量明显高于 AT 含量, 其中金钗石斛 GC 含量为 55.8%, 各样本的序列长度及碱基含量见表 2。

表 2 金钗石斛及混淆品 *nadI* intron 2 序列长度及碱基组成

物种	含量(%)						序列长度 (bp)
	T	C	A	G	T + A	C + G	
<i>D. loddigesii</i>	18.4	25.5	25.7	30.4	44.1	55.9	838
<i>D. officinale</i>	18.2	25.5	25.9	30.3	44.1	55.8	844
<i>D. devonianum</i>	18.2	25.6	25.7	30.6	43.9	56.2	837
<i>D. dioxanthum</i>	18.5	25.5	26.1	30.0	44.6	55.5	844
<i>D. thyrsiflorum</i>	18.3	25.7	25.8	30.2	44.1	55.9	834
<i>D. chrysanthum</i>	18.3	25.9	25.2	30.6	43.5	56.5	834
<i>D. aphyllum</i>	18.4	25.5	25.7	30.4	44.1	55.9	838
<i>D. nobile</i>	18.5	25.4	25.7	30.4	44.2	55.8	843
<i>D. fimbriatum</i>	17.9	26.1	25.6	30.4	43.5	56.5	851
<i>D. williamsonii</i>	18.1	25.6	26.1	30.1	44.2	55.7	843
<i>D. crepidatum</i>	18.3	25.9	25.6	30.2	43.9	56.1	808
<i>D. crystallinum</i>	18.5	25.4	25.7	30.5	44.2	55.9	844
<i>D. primulinum</i>	18.3	25.8	25.7	30.3	44.0	56.1	838
<i>D. hancockii</i>	17.4	25.5	26.1	31.0	43.5	56.5	774
<i>D. bellatulum</i>	17.9	25.4	26.2	30.5	44.1	55.9	847

15 种石斛有保守位点 817 个, 变异位点 27 个, 简约信息位点 5 个, 单变异位点 22 个。共有 6 处 indels(碱基缺失), 其中较长的 indels 位于 349 ~ 417、579 ~ 596 bp, 不同的物种表现出缺失碱基的长度和位置的差异; 较短的 indels 位于 140 ~ 146、445 ~ 451、522 ~ 528、610 ~ 613 bp, 最大的长 6 bp, 最小的长 4 bp。

2.2 基于 SNP 的金钗石斛的鉴别

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, 简称 SNP), 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。金钗石斛与其混淆品之间存在 22 个 SNP 位点, 可以用于物种之间的鉴别。在获得的 15 种石斛的 *nadI* intron 2 序列中, 金钗石斛在第 603 位上的碱基为 T, 其他种类均为 C, 该位点可以作为金钗石斛与其混淆品的种间鉴别的有效位点。根据特异性位点设计的引物用于石斛植物的扩增, 结果显示, 只有在金钗石斛中产生了大约 400 bp 长度的单一条带, 说明该变异性引物用于物种鉴定的可行性。

2.3 遗传距离的计算及基于 DNA barcoding 的石斛属亲缘关系分析

应用 MEGA 5.0 进行序列分析, 以 Kimura - 2 参数计算各物种之间的遗传距离, 结果见表 3。从遗传距离来看, 铁皮石斛与黄花石斛遗传距离差异最小, 为 0, 而兜唇石斛与齿瓣石斛的差异最大, 为 0.010, 平均遗传距离为 0.004。外类群牛齿兰与 15 种石斛的遗传距离为 0.147 ~ 0.156。利用 MEGA 5.0 软件对获得的序列片段进行分析, 构建序列进化 UPGMA 树(图 1)。UPGMA 树分析发现, 矮石斛、报春石斛、黄花石斛、铁皮石斛首先聚为 1 支, 然后与玫瑰石斛、粉花石斛、细叶石斛、流苏石斛、束花石斛形成的分支聚为 1 支, 最后与晶帽石斛、球花石斛、金钗石斛、兜唇石斛、齿瓣石斛依次聚

表 3 基于 *nadl intron 2* 序列的石斛属及牛齿兰遗传距离分析

物种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	0.003														
3	0.007	0.007													
4	0.003	0.000	0.007												
5	0.004	0.004	0.008	0.004											
6	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005										
7	0.005	0.005	0.010	0.005	0.007	0.007									
8	0.005	0.005	0.007	0.005	0.007	0.004	0.008								
9	0.003	0.003	0.004	0.003	0.004	0.001	0.005	0.003							
10	0.003	0.003	0.007	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.003						
11	0.001	0.004	0.005	0.004	0.005	0.003	0.007	0.004	0.001	0.004					
12	0.004	0.004	0.008	0.004	0.005	0.005	0.007	0.007	0.004	0.004	0.005				
13	0.003	0.003	0.007	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.003	0.003	0.004	0.004			
14	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005	0.003	0.007	0.004	0.001	0.004	0.003	0.005	0.004		
15	0.001	0.001	0.005	0.001	0.003	0.003	0.004	0.004	0.001	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	
16	0.147	0.151	0.156	0.151	0.152	0.151	0.151	0.149	0.151	0.151	0.149	0.152	0.151	0.151	0.149

注:物种编号同表 1。

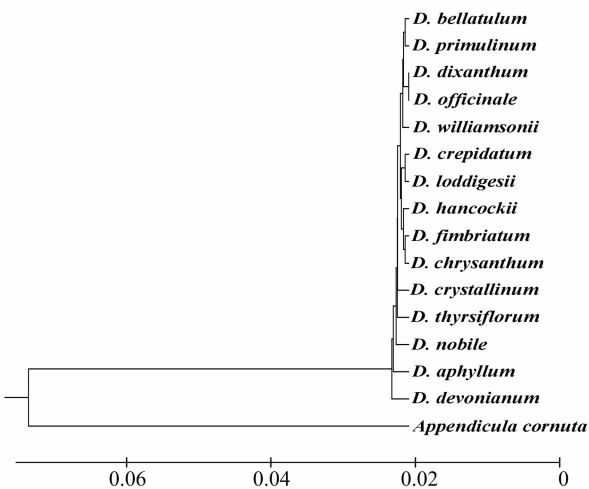


图1 金钗石斛及其近缘物种的系统进化树

类,形成与牛齿兰并列的 2 个大支。可以看出,*nadl intron 2* 序列可以对石斛种类进行有效的鉴别,适宜作为分子条形码用于金钗石斛及其近缘物种的亲缘关系分析。

3 讨论与结论

DNA 是植物细胞的遗传物质,具有稳定、可靠、不受外界影响和可遗传性等优点,可以作为药用植物鉴别、植物分类及进化关系分析的依据^[28-32]。线粒体基因含有较好的位点多样性水平,基因重排对于近缘物种的鉴定具有较大的意义,在动物中广泛应用于谱系地理、系统发育、DNA 条形码鉴定等研究^[33-34]。而植物线粒体基因组远大于动物线粒体基因组,变异幅度可能高达 10 倍以上,在同一科中也可能存在较大差异^[35-36]。*nadl intron 2* 序列用于药用植物的鉴别并有效地追溯其原产地^[2,27]、稻族的系统发育及分析鉴定^[37]、挪威云杉不同居群的遗传关系分析^[38]等研究,均取得了较好的效果。本试验通过对 15 种石斛的研究发现,线粒体基因 *nadl intron 2* 变异位点数量为 27 个,可用于金钗石斛及其混淆品的鉴别。

与其他分子标记相比,SNP 具有位点丰富、检验成本低、

更高的稳定性及检出率高等优点,被广泛应用于植物遗传育种、物种鉴别及中药材的鉴定研究中^[15,39]。位点特异性鉴别 PCR (allele-specific diagnostic polymerase chain reaction, 简称 AS-PCR) 具有操作简单、高效等特点,亦被广泛应用于药材及其混淆品、伪品的鉴别^[6,15]。而线粒体基因序列中含有的 SNP 位点,方便结合 AS-PCR 等技术,更利于物种的鉴定。本研究中,存在于 603 位的 SNP 位点,可以成功地鉴别金钗石斛与其混淆品,为石斛属植物的鉴别及其他中药材的物种鉴定及规范中药材市场提供理论依据。

DNA barcoding 是 2003 年由加拿大圭尔夫大学的 Paul Hebert 正式提出的,是利用 1 段短的、标准的 DNA 片段,从基因组标准化区间对物种进行快速、准确的鉴定^[40]。DNA 条形码的优点包括不受样品形态和发育阶段限制、准确性高等,可以从分子层面构建物种的序列库并快速有效地进行鉴别,可以促进物种的鉴定分类及保护生物学的发展,对新物种的发现和珍稀濒危物种的保护具有重要的意义。本研究利用的基于线粒体 *nadl intron 2* 序列的 DNA 条形码技术,排除了植物形态等条件的限制,可以直接从分子水平对金钗石斛及其近缘物种进行鉴别,效果较好。研究过程中涉及的物种序列的 GC 含量、遗传距离、UPGMA 进化树等结果,可为石斛的市场应用提供有效的鉴别方法,为石斛类药材的鉴定提供了一种新的思路,也为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奠定基础。

参考文献:

[1] 应俊生. 中国种子植物物种多样性及其分布格局[J]. 生物多样性, 2001, 9(4): 393-398.

[2] 耿丽霞, 郑瑞, 任洁, 等. 新型联合片段: nrDNA ITS + *nadl intron 2* 在枫斗类石斛鉴定中的意义[J]. 药学学报, 2015, 50(8): 1060-1067.

[3] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, et al. Authentication of stems of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences[J]. Planta Medica, 2002, 68(2): 191-192.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

- [5] Ding X Y, Wang Z T, Zhou K Y, et al. Allele – specific primers for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale* [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(6): 587 – 588.
- [6] Qian L, Ding G, Zhou Q, et al. Molecular authentication of *Dendrobium loddigesii* Rolfe by amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. *Planta Medica*, 2008, 74(4): 470 – 473.
- [7] Gutierrez S, Combettes B, De Paepe R, et al. In the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant, a recombination – mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated with lack of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 261(2): 361 – 370.
- [8] Gugerli F, Senn J, Anzidei M, et al. Chloroplast microsatellites and mitochondrial nad1 intron2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*) [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(6): 1489 – 1497.
- [9] Sanjur O I, Piperno D R, Andres T C, et al. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: implications for crop plant evolution and areas of origin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(1): 535 – 540.
- [10] 杨昭庆, 洪坤学. 单核苷酸多态性的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2000(1): 4 – 8
- [11] Yoon M S, Song Q J, Choi I Y, et al. BARCSoySNP23: a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(5): 885 – 899.
- [12] Schwarz G, Baumler S, Block A, et al. Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(3): e24.
- [13] Nasu S, Suzuki J, Ohta R, et al. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers [J]. *DNA Research*, 2002, 9(5): 163 – 171.
- [14] Gabrielle S S, Christine G, Richard S H. A novel gene for neonatal diabetes maps to chromosome 10p12.1 – p13 [J]. *Diabetes*, 2003, 52(10): 2636 – 2638.
- [15] Ding G, Xu G H, Zhang W C, et al. Preliminary geoherbalism study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(4): 1283 – 1286.
- [16] DeSalle R, Birstein V J. PCR identification of black caviar [J]. *Nature*, 1996, 381(6579): 197 – 198.
- [17] Sasaki Y, Fushimi H, Cao H, et al. Sequence analysis of Chinese and Japanese *Curcuma* drugs on the 18S rRNA gene and *trnK* gene and the application of amplification – refractory mutation system analysis for their authentication [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(12): 1593 – 1599.
- [18] Yang D Y, Fushimi H, Cai S Q, et al. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR – RELP) and amplification refractory mutation system (ARMS) analyses of medicinally used *Rheum* species and their application for identification of *Rhei rhizoma* [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(5): 661 – 669.
- [19] 丁小余, 王峥涛, 徐红, 等. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别 [J]. *药学学报*, 2002, 37(7): 567 – 573.
- [20] 丁 鸽, 张代臻, 张伟超, 等. 保健食品铁皮石斛及其混淆品的分子鉴别及亲缘关系分析 [J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 141 – 145.
- [21] Li X W, Yang Y, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biological Reviews*, 2015, 90(1): 157 – 166.
- [22] Zuo Y J, Chen Z J, Kondo K, et al. DNA barcoding of *Panax* species [J]. *Planta Medica*, 2011, 77(2): 182 – 187.
- [23] Sun Z Y, Gao T, Yao H, et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method [J]. *Planta Medica*, 2011, 77(3): 301 – 306.
- [24] 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.
- [25] 汤 欢, 向 丽, 李西文, 等. 濒危兰科药用植物 DNA 条形码鉴定 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(6): 2058 – 2067.
- [26] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phyto Chemistry Bulletin*, 1987, 19(1): 11 – 15.
- [27] 张 婷, 王峥涛, 徐璐珊, 等. 线粒体 nad1 内含子 2 序列在石斛属植物分子鉴定中的应用 [J]. *中草药*, 2005, 36(7): 1059 – 1062.
- [28] 田旭飞, 曲 波. DNA 条形码技术在入侵植物刺萼龙葵检验检疫中的应用 [J]. *杂草学报*, 2017, 35(1): 30 – 35.
- [29] 李国良, 张建霞, 曾宋君, 等. 基于 ITS, *Nad intron2* 和 *psbA* – *trnH* 序列探讨霍山石斛的分类位置 [J]. *广东农业科学*, 2013, 40(13): 145 – 147.
- [30] 袁俊杰, 马新华, 龙 阳, 等. 利用 DNA 条形码对 10 种苍耳属杂草的鉴定 [J]. *杂草学报*, 2016, 34(3): 11 – 16.
- [31] 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.
- [32] 袁俊杰, 魏 霜, 马新华, 等. *trnH* – *psbA* 序列作为 DNA 条形码在苍耳属杂草鉴定中的应用 [J]. *杂草学报*, 2016, 34(2): 1 – 6.
- [33] 胡 佳, 汪登强, 危起伟, 等. 施氏鲟、达氏鲟及其杂交子代的分子鉴定 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 21 – 29.
- [34] 高玉时, 唐修君, 屠云洁, 等. 基于线粒体 *CO I* 基因 15 个鸡种的 DNA 编码研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(3): 587 – 594.
- [35] Levings C S, Brown G G. Molecular biology of plant mitochondria [J]. *Cell*, 1989, 56(2): 171 – 179.
- [36] 陆佳妮, 赵志礼, 倪梁红, 等. 线粒体基因在药用植物 DNA 分子鉴定中的应用 [J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1791 – 1796.
- [37] 郭亚龙, 葛 颂. 线粒体 *nad1* 基因内含子在稻族系统学研究中的价值——兼论 *Porteresia* 的系统位置 [J]. *植物分类学报*, 2004, 42(2): 333 – 344.
- [38] Sperisen C, Buchler U, Gugerli F, et al. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(1): 257 – 263.
- [39] Li J M, Jin Z X. Genetic variation and differentiation in *Torreya jackii* Chun, an endangered plant endemic to China [J]. *Plant Science*, 2007, 172(5): 1048 – 1053.
- [40] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings. Biological Sciences/the Royal Society*, 2003, 270(1512): 313 – 321.