

DNA BARCODING: THEORY AND APPLICATION

A Global & Standard Species Identification Platform for
Medicinal Animals and Plants

DNA

条形码的原理和应用

全球统一的药用动植物物种鉴定平台

主编 赖小平 赵树进 陈念



全国百佳图书出版单位

中国中医药出版社

DNA BARCODING: THEORY AND APPLICATION

A Global & Standard Species Identification Platform for
Medicinal Animals and Plants

DNA 条形码的原理和应用

全球统一的药用动植物物种鉴定平台

ISBN 978-7-5132-0001-1



9 787513 200011 >



责任编辑 张钢钢
文字编辑 原素敏

定价：32.00元

DNA条形码的原理 和应用

——全球统一的药用动植物物种鉴定平台

主 编	赖小平	赵树进	陈 念
编 委	李 薇	黄 松	王 新
	徐 涛	付晓燕	黄海波
	高 洁	吴文如	

中国中医药出版社
· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

DNA 条形码的原理和应用: 全球统一的药用动植物物种鉴定平台/赖小平, 赵树进, 陈念主编. —北京: 中国中医药出版社, 2010. 7

ISBN 978 - 7 - 5132 - 0001 - 1

I. ①D… II. ①赖… ②赵… ③陈… III. ①脱氧核糖核酸 - 应用 - 药用动物 - 物种 - 生物鉴定 ②脱氧核糖核酸 - 应用 - 药用植物 - 物种 - 生物鉴定 IV. ①Q959.9 ②S567

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 095327 号

中国中医药出版社出版

北京市朝阳区北三环东路 28 号易亨大厦 16 层

邮政编码 100013

传真 010 64405750

北京天竺颖华印刷厂印刷

各地新华书店经销

开本 787 × 1092 1/16 印张 16.75 字数 288 千字

2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978 - 7 - 5132 - 0001 - 1

定价 32.00 元

网址 www.cptcm.com

如有印装质量问题请与本社出版部调换

版权专有 侵权必究

社长热线 010 64405720

读者服务部电话 010 64065415 010 84042153

书店网址 csln.net/qksd/

“至于汤药，一物有谬，便性命及之。千乘之君，
百金之长，何可不深思戒慎耶？”

——出自《本草经集注》，南朝著名医药学家陶弘景（公元452年—536年）编著，他对《神农本草经》所采用的“三品分类法”进行了改进，首次依据自然属性将药物分为玉石、草木、虫兽、果、菜、米食和有名未用七类，该分类方法随后发展成为我国古代药物分类的标准方法。

专家序

从1758年林奈创造出统一的生物命名系统以来,250年来人们共对1.6 M的物种进行了形态学的描述。随着新种的发现,物种数量的急剧增加,物种的识别工作变得越来越复杂,因而使物种的形态描述变得更加专业化,对于形态学家水平的要求也越来越高。但是目前面临的一个现状是,传统分类学家的队伍正逐渐缩小。形态学鉴定的局限性和不断缩减的分类学家队伍,使分类学的发展面临巨大的挑战,亟需一种快捷方便的物种鉴定方法产生。DNA条形码(DNA barcoding)是一种分类学方法,其利用生物基因组中的一段短的DNA序列来鉴定此生物是否属于某个特定的物种类群。2005年,Schindel DE等在《Nature》上发表了题为“DNA barcoding, a useful tool for taxonomists”的文章中指出:DNA条形码是国际上近年来发展起来的物种鉴定新技术。Miller在《PNAS》一文提出DNA条形码鉴定技术正在推动分类学的“文艺复兴”。DNA条形码技术摆脱了传统形态鉴定方法依赖长期经验的障碍,通过建立鉴定数据库,容易实现数字化,是中药分子鉴定方法学上的一个创新。关于DNA条形码的大量报道已见诸于相关学术刊物和其他媒体上,如Science、Nature、PNAS、National Geographic News等。由于传统分类学不能满足现代物种鉴定的需求,DNA条形码技术利用较短的基因保守序列进行种的鉴定,可以在更大范围应用于生态保护研究。

目前,利用分子标记(如rDNA ITS序列、*atpB*序列等)阐明植物的系统进化关系,结果会因不同的标记

产生不同的植物系统进化树。DNA 条形码技术应用多个分子标记同时进行分析,结果更符合已知的植物系统进化事实,可以完成物种的区别和鉴定,发现新种,重建物种和高级阶元的演化关系,还能快速鉴定新种,并有可能解决形态学手段难以攻克的隐存种问题。随着现代中药产业的发展,药用植物濒危物种逐年增加,市场供需矛盾日益加剧,亲缘学研究为开发新资源,寻找替代药材指明了新的道路,DNA 条形码为保护濒危药用植物及其生物多样性奠定了理论基础。

鉴于此,将与 DNA 条形码技术相关的背景知识、技术原理、操作步骤、应用领域和国内外最新进展及时地进行归纳和总结,并展现在国内读者面前,是一件非常有意义的事情。且据本人所知,目前国内尚无该研究领域的专著出版。

最后,希望《DNA 条形码的原理和应用》不仅作为一本研究参考书,同时还希望此书能够为广大青少年读者打开一扇通往生物多样性知识的窗户,希望更多的人能够珍惜 and 爱护野生生物——毕竟,它们是我们人类的朋友,正是它们才使得大自然生机勃勃!

中国医学科学院药用植物研究所所长

陈保

2010 年 3 月

自序

随着人类对于实现自身可持续发展和认识生物多样性的要求日益迫切，合理利用生物资源并实现全世界所有物种的快速分类和鉴定已成为世界性的重大需求之一。

在过去，生物样品物种身份的鉴定一般采用形态学的方法，许多经过训练的技术人员虽然可熟练操作该鉴定方法，但在多数情况下仍需要一位有经验的分类学专家的协助。而对于形态学特征不明显的物种（如“隐种”或微小生物）、被破坏的样品（糜肉制品），以及具有变态发育特征的卵或幼体来说，即使是分类学专家也可能无能为力——然而，“DNA 条形码技术”则可以解决此类难题。

例如，在丢失了花或果实的情况下鉴定植物的叶子，基于胃的内含物或粪便鉴定动物的日常饮食结构，以及对破碎或不完整的动、植物药材进行鉴定。以蛇为例，利用该技术即可实现快速鉴定其腐烂的组织、蛇蜕、鳞片，甚至粗毒冻干粉的来源。因此，林业公安可利用该项技术鉴定偷猎者所捕获的猎物，并基于法医部门出具的权威鉴定结果作为定罪的证据，要是鉴定报告表明所捕猎物属于国家明令禁止捕杀的珍稀野生动物，那么，狩猎者就将面临严重的惩罚。

2003 年，加拿大 Guelph 大学教授兼皇家学会会员——Paul Herbert，首次提出了“DNA 条形码”的概念，并倡导将该项技术应用到生物物种鉴定当中，因此他也被称为“DNA 条形码之父”。他声称：“利用该项技术，可通过对一小段 DNA 分子进行快速分析即鉴定出地

球上所有的动物和植物物种，而这整个过程的实现，只需将未知生物的一部分放进一种‘掌上 DNA 扫描仪’中即可。”如果该 DNA 扫描仪研制成功的话，它将会有很多用途，例如：航空公司可用其检测撞击飞行器的鸟类，生物学家可以了解青蛙胃内部的饮食结构，卫生检疫人员利用其检测食品中动植物原料的真实来源，生态学爱好者在野外能随时了解未知的动植物物种，医生利用其鉴定病原微生物类型，海关检疫人员可当场确定货物中夹藏的外来物种种类以判断其是否对国家生物安全造成威胁等等；当然，对于我国的消费者来说，该仪器还具有一项更重要的用途，就是患者在中药店买药时可用其来确定药材的真假。

对于大多数动物而言，细胞色素氧化酶亚基 1 (*cox1*) 基因序列已作为公认的标准条形码序列；而植物的条形码鉴定标准则尚在进一步摸索当中。尤其对于某些难以用 *cox1* 进行分辨的类群，可能要辅助使用其他类型的线粒体基因或核基因进行鉴定。当然，DNA 条形码技术需要完善的地方还有很多，但基于前期大量研究的证据表明，该项技术在鉴定效率、信息含量、重复性和可靠性方面所具有的优势，使其必将成为未来生物分类和鉴定技术发展的大势所趋。截至 2010 年 2 月最新公布的统计数据，全球目前正式利用条形码方法进行描述的物种已达 65 898 种，累计提交的条形码序列记录已达 771 391 条。

当然，值得强调的是，这并非意味着传统的基于形态特征所建立的分类体系已变得不再重要，而是说 DNA 条形码应被作为一种新的研究工具，不仅可辅助专业的分类学家用于鉴定和发现新的物种，同时还可被技术人员利用来解决日常生产和生活中遇到的实际问题。另外，还需要指明的是，DNA 条形码技术不同于分子系统发育分析技术，后者的主要目标是决定分类，而前者则是根据一个已知的分类来鉴定未知的样本。因此，作为一项发展中的技术，还有很多方面需要我们广大的科研人员对其进行不断完善。

毋庸置疑，DNA 条形码技术的出现将极大地增强人类监测、了解和利用生物多样性资源的能力，其在生命科学、法医学、流行病学，以及医药、食品质量控制等领域均具有广泛的应用前景。另外，由 Paul Herbert 所发起的“国际生物条形码 (International Barcode of Life, iBOL) 计划”作为一项新的、国际性的大科学计划，已于 2008 年“登陆”中国，这无疑将对我们的生活产生重大和深远的影响。

众所周知，中药作为我国民族文化的瑰宝用于疾病防治已有几千年的历史，但由于现代中药“品”（品种——物种鉴定）、“质”（质量——活

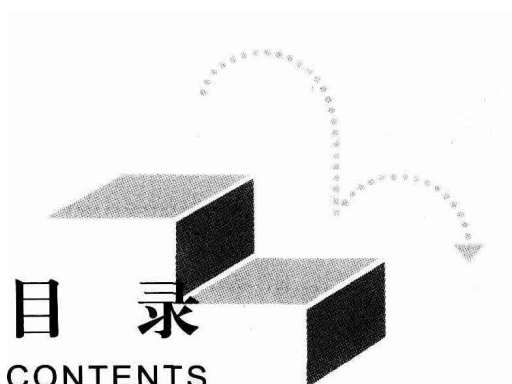
性成分鉴定) 监控技术不足, 以及由于特殊的社会背景而时常出现的药材混淆代用、故意伪制等现象, 严重影响了中药的声誉, 这使得在我国建立起健全、完善的中药品质检测技术体系迫在眉睫。

由于考虑到本书再版时内容扩充和国际化的需要, 特意选择了以“DNA 条形码的原理和应用”作为本书的书名, 并附以“全球统一的药用动植物物种鉴定平台”作为本书主要内容的辅助说明置于封面页, 但需要强调的是, 本书在内容上并不局限于药用动植物物种鉴定研究的需要。另外, 由于笔者一直以来均从事与蛇有关的 DNA 条形码技术研究工作, 故在封面下方放置了一张蛇的图片, 希望以此吸引众多青少年读者的关注, 激发他们保护自然环境的兴趣与愿望, 这同时也是笔者寄予该书的最终目标。

本书内容虽然已经过笔者和编辑的共同努力进行了反复多次核对和校稿, 但由于编者个人能力所限, 出现差错在所难免, 因此也希望国内相关领域的专家能够提出宝贵的意见和建议, 以便于笔者对该书在内容和形式上进行不断完善, 争取早日再版。

徐小平

2010 年 6 月



第一篇 物种鉴定

第一章 为什么要鉴定物种	3
第一节 生物分类学	3
第二节 “种”的概念和物种形成	9
第三节 中药品种鉴定	11
第二章 药用动植物物种鉴定理论	17
第一节 中药鉴定学和生药学	17
第二节 DNA 分类学	27
第三节 中药材品种鉴定与质量控制	30
第三章 药用动植物物种鉴定方法	35
第一节 传统鉴定方法	35
第二节 现代鉴定方法	38
第三节 中药鉴定技术发展趋势	41

第二篇 叶绿体和线粒体遗传学

第四章 叶绿体基因组学	47
第一节 叶绿体基因组结构特征	47
第二节 叶绿体基因组起源和进化	50
第三节 植物叶绿体 DNA 系统发育研究	52
第五章 线粒体基因组学	55
第一节 植物线粒体基因组	55

第二节 动物线粒体基因组	58
第三节 线粒体 DNA 系统发育分析	61

第三篇 DNA 条形码物种鉴定技术

第六章 DNA 条形码基础知识	69
第一节 发展 DNA 条形码技术的 10 个理由	70
第二节 概念和研究意义	73
第三节 技术原理、组成模块和操作步骤	75
第四节 生命 DNA 条形码计划	80
第五节 问题、争议和展望	84
第七章 DNA 条形码的应用领域	90
第一节 概述	90
第二节 植物 DNA 条形码	94
第三节 动物 DNA 条形码—— <i>cox1</i>	99
第四节 中药材 DNA 条形码	105
第五节 DNA 条形码在海关和司法部门的应用	112
第八章 DNA 条形码研究平台	114
第一节 生命条形码协会——CBOL	114
第二节 高通量 DNA 条形码分析协议	129
第三节 动物 <i>cox1</i> DNA 条形码分析协议	138
第四节 BOLD 使用说明	146
第五节 DNA 条形码网络资源	200
第九章 国内 DNA 条形码技术研究现状	203
第一节 研究现状	203
第二节 研究实例	211

第四篇 中药系统生物学

第十章 中药材质量综合鉴定与“组”学技术	233
第一节 中药系统生物学	233
第二节 中药基因组学	234
第三节 中药转录组学	237
第四节 中药蛋白质组学	238
第五节 中药代谢组学	239
参考文献	242
版权说明	254

物种鉴定

第一篇





第一章 为什么要鉴定物种

生物分类学 (Bio-taxonomy) 是一门研究生物类群间的异同及其异同程度, 阐明生物间的亲缘关系、进化过程和发展规律的科学。从理论上说, 生物分类学是有关生物进化历史的总结。生物分类学在过去曾被称为系统分类学, 其在概念上与分类系统学极易混淆, 后者则是研究生物的分化程度及各生物类群间相互关系的科学。

从古老的形态解剖学到现代生物化学和分子生物学技术, 均可为生物分类提供实验依据。作为一门综合性学科, 生物分类学亦有其自己的分支学科, 如细胞分类学 (也叫染色体分类学)、血清分类学、化学成分分类学和 DNA 分类学等。

第一章 为什么要鉴定物种

第一节 生物分类学

◎ 1. 生物分类的历史

生物分类的主要任务是对各种生物类群进行命名和划分等级。

人类在很早以前就能识别物种并给以名称, 如汉初的《尔雅》把动物分为虫、鱼、鸟、兽 4 类。虫, 包括大部分无脊椎动物; 鱼, 包括鱼类、两栖类、爬行类等低级脊椎动物及鲸、虾、蟹、贝类等; 鸟, 即鸟类; 兽, 则指哺乳动物。作为中国古代最早的动物分类系统, 其与林奈的六纲系统相比, 仅少了两栖纲和蠕虫纲。

古希腊的亚里士多德将生物分为能动的动物和不能动的植物两大界, 前者又按照性状差异分为热血动物和冷血动物。17 世纪末, 英国植物学家雷曾提出将“杂交不育”作为区分物种的标准, 其所著的《植物研究的新方法》一书是林奈以前有关植物分类学最全面的总结。

近代分类学诞生于18世纪，其标志性的经典著作是瑞典植物学者林奈在1753年出版的《植物种志》和1758年出版的《自然系统（第10版）》，在这两本书中，每一物种都隶属于一定的分类系统并占有一定的分类地位，可按阶元查对检索。

作为生物分类学的奠基人，林奈解决了分类学领域两个最基础的关键性问题：①建立了双名制，为每个物种分配一个由两个拉丁化名词所组成的学名，分别代表属名和种名；②确立了阶元系统，把自然界分为植物、动物和矿物三界，在动植物界下设纲、目、属、种四个级别。林奈的《自然系统》一书将哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类、昆虫和蠕虫六个动物纲按顺序依次排列，但并未提出涉及物种亲缘关系的概念。

一直到拉马克提出物种进化级别的观点，以及1859年达尔文《物种起源》的出版，才明确了物种亲缘关系研究和进化论在分类研究中的地位。至此，一门新的学科——系统分类学诞生了。

◎ 2. 生物分类的方法和学说

分类学可分为进化分类学、分支系统学和数值分类学三大流派，其在基本原理上有许多共通之处，仅表现在侧重点各不相同。

分类的基本方法是特征异同的对比，“异”即区分种类的根据，“同”即合并种类的根据。系统分类要求从历史的观点衡量特征的价值，重视这一或那一特征，均可能得出不一致的分类结论。在某些情况下，由于同源和非同源不易区分，使得特征价值的衡量又陷入循环论，如“共同的特征反映共同祖先，共同的祖先产生共同特征”。基于此，为了提升分类的稳定性和重复性，数量分类学提出了“总体相似性”的观点，即选择大量可以数值形式表示的特征，并编成符号，运用计算机分析求出相似性系数，从而得出结论。这种方法并不先考虑物种之间的亲缘，但得到的结果在很多情况下均能得到传统分类学的支持。

在以往，分类学特征的选择主要是来自物种的形态，尤其是外部形态。但随着各种分析手段的不断发展，来自物种生理、生化和遗传等方面的特征则不断受到重视，如DNA序列、蛋白质成分、染色体组型，以及植物化学成分、动物交配行为、鸟类的鸣叫声等等。

有关生物分类学说的演变参见表1-1。其中“五界系统”得到了现代分子生物学证据的有力支持，并广泛为研究者所接受，目前已成为物种分类的基础。



表 1-1

生物分类演变比较表

林奈 1735 二界	海克尔 1866 三界	柴顿 1937 二帝国	柯普兰 1956 四界	魏泰克 1969 五界	沃斯 1977 六界	沃斯 1990 三域
无分类	原生 生物界	原核生 物帝国	原核 生物界	原核 生物界	真核细菌界	细菌域
					古菌细菌界	古菌域
植物界	植物界	真核帝国	原生 生物界	原生生物界	原生生物界	真核域
			植物界	真菌界	真菌界	
动物界	动物界		植物界	植物界	植物界	
			动物界	动物界	动物界	

另外值得一提的是沃斯等人于1990年提出了“三域系统”，其将所有物种分为细菌域（Bacteria）、古菌域（Archaea）和真核域（Eukarya），其中前两者同归于原核生物界（Prokaryotae）。

① 细菌域包括蓝绿菌（原名蓝绿藻）、放线菌、衣原体、支原体和立克次体等；

② 古菌域的生物一般生存于深海、盐湖、火山口等极端环境，如某些嗜盐菌、嗜热菌和嗜酸菌等；

③ 真核域包括原生生物界（Protista）、真菌界（Fungi）、植物界（Plantae）和动物界（Animalia）。其中原生生物界介于单细胞和常见的多细胞生物之间，因此也是最受争议和最为复杂的生物类群；真菌界包括接合菌、子囊菌、担子菌、壶菌、聚合菌（又称为黏菌“slime”）和微孢子虫（注：在五界说中，壶菌和聚合菌被归于原生生物界，且彼此关系甚远）；植物界包含绿藻、轮藻、苔藓植物、蕨类植物和种子植物等（注：在五界说中，植物界一般为多细胞生物，仅极少数存在分类争议的绿藻为单细胞生物）；动物界即“后生动物”，均为多细胞生物。

◎ 3. 分类阶元、模本方法和物种命名

（1）阶元系统

当前的分类系统采用的是阶元系统，通常包括7个主要的级别：种、属、科、目、纲、门、界。

种（物种）是基本单元，近缘的种归合为属，近缘的属归合为科，科隶于目，目隶于纲，纲隶于门，门隶于界。随着研究的深入，分类层次不断增加，单元上下可附加次生单元，如总纲（超纲）、亚纲、次纲、总目