

# 通用中药 DNA 条形码鉴定系统的研究及应用\*

□陈 念\*\* 赖小平\*\*

(广州中医药大学中药学院 广州 510006)

**摘要:**为了对特殊身份的物种或品种进行保护、检测转基因生物,以及追踪生物的扩散,对所采集生物样本的来源物种进行准确地识别是非常必要的。简而言之,条形码物种鉴定技术即通过大范围地对一个或多个参考基因进行筛选,从而达到将未知个体归属于某个分类单元的目的,其使用通用的 PCR 引物对物种特异性的 DNA 条形码识别区进行扩增,将扩增产物的测序结果与数据库进行比较即可确定物种的身份。此项技术的推广尚面临 2 个关键问题:①如何进一步使用和分析 DNA 条形码数据;②如何建立起 DNA 条形码与经典分类方法之间的关联。本文结合上述问题对 DNA 条形码技术的原理和应用进行了综述。

**关键词:** DNA 条形码 分类 分子鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.003

## 一、研究意义及现状

在对生物体及其组织样本进行商品交易或研究等很多情况下,均要求对其来源物种进行准确地鉴定。物种鉴定技术的主要应用领域有:①商标管理部门及部分消费者要求对商品(如中药材)进行标记,除了外在的商品条形码外,商品本身内在的 DNA 标记可跟随其整个流通过程;②许多生物媒介均与已知的病原或害虫具有密切的关系,因此,在利用转基因生物作为生物防治的工具时,人工转入的高毒力基因可能具有潜在的危害<sup>[1]</sup>。尤其是在使用生物防治工具来控制杂草、细菌、真菌或有害昆虫,以及使

用其它活的生物作为接种体时,无论这些释放到环境中的生物是野生型还是转基因型,均需要对其进行追踪,以便了解它们在生物及环境中的扩散情况<sup>[2]</sup>;③对引起某种流行病的野生型菌株进行鉴定;④对于受知识产权保护的物种或品种,需证明其是否未经许可进行非法种植。

对具有重要经济价值的转基因生物进行鉴定是一笔很大的开销。在过去,种子用户使用 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)等分子标记技术来确认其它竞争者是否使用了其专利的遗传信息;确认农民是否保存和反复使用了未经认证的转基因种子。以消费者权益保护组织为代表的管理部门也使用类似的技术来确认转基因产品是否混合了非转基因的生物<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2009-12-02

修回日期: 2009-12-23

\* 国家自然科学基金面上项目(30672624):电泳和 mtDNA 技术在燕窝鉴别中的应用,负责人:赖小平。

\*\* 联系人:陈念,博士后,主要研究方向:线粒体基因组学,E-mail:mitogenome@126.com;赖小平,本刊编委,教授,博导,广州中医药大学中药学院院长,主要研究方向:中药学,E-mail:lxpq@gzhtcm.edu.cn。

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术的敏感性使得对作物和商品中痕量的转基因进行检测成为可能, 但考虑到作物的混合及其它可能混入多种不同来源转基因等因素, 此类问题有可能会变得更加复杂。以含油菜的转基因商品为例, 由于油菜普遍受到花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的感染, 因此, 几乎所有的非转基因商品中也可发现常见的 35S 启动子, 从而造成假阳性的鉴定结果。为此, 必须进一步使用限制性内切酶法、Southern 杂交或直接测序的方法进行验证。对于经较剧烈条件加工后的产品, 由于 DNA 片段长度较小 (平均约 <400bp), 以及参考 DNA 序列的缺乏, 造成鉴定可能会比较困难<sup>[4-5]</sup>。此外, 免疫学方法也被广泛用于许多转基因产品的检测, 如利用夹心法对编码抗除草剂草甘膦 (Glyphosate) 抗性的细菌 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSP) 进行检测等。此类方法的缺点在于: 当存在多个不同的转基因产品时, 每个样品均需和多个抗体进行反应, 且可能受基因突变的影响使得鉴定结果并不可靠。

## 二、DNA 条形码鉴定

### 1. 基本原理及应注意的问题

设计商品条形码系统的目的是为了对各种商品进行快速识别, 条形码阅读器 (即读码器, Barcode Reader 或 Barcoder) 可以一种方向依赖性的方式对不同样式顺序间隔的条形标记进行扫描和识别<sup>[6-7]</sup>。如图 1 左所示, 在商品条形码两端的通用识别区域之间, 是一系列指定的具不同宽度和间距的条形标记, 将该指定区域的特征在数据库中进行检索, 即可对商品的来源进行识别。

DNA 条形码系统的原理与商品条形码类似, 该系统采用单一参考数据库对代码进行设计和分配, 并结合通用 PCR 引物扩增和测序技术对材料进行分

析。如图 1 右所示, DNA 条形码两端为通用引物的识别位点, 额外区是根据某些特殊要求针对特定生物类群所指定的识别区域, 将中间的特异识别区序列在数据库中进行检索, 即可实现对未知物种的鉴定。对于转基因生物而言, 人工设计的物种特异性识别序列与转化的基因同时插入靶生物中作为转基因体的一部分, 而对于非转基因生物, 该区域则是根据物种自身的基因组序列特点人为指定的一段特异性 DNA 序列<sup>[8]</sup>。值得一提的是, 从“商品条形码”这一原义来理解, “DNA 条形码”本身似乎暗示了每个物种都具有一个固定不变的特征, 但从生物进化的角度来看这种类推是值得怀疑的。

DNA 条形码的设计和使用需注意以下问题: ①通用引物识别序列应足够长, 使得少量的突变不会对识别造成影响; ②识别区序列也应足够长, 以保证有上百万种不同的组合, 并允许一定程度的突变, 且为了避免 Taq 酶扩增受阻, 应尽量排除自身退火的可能性; ③条形码序列的所有阅读框中应插入终止密码, 以阻止由于移码突变而产生可编码的序列; ④对于单个产品包含多个条形码的情况 (如由不同转基因作物组成的混合物), 则需对多个 PCR 产物进行测序和序列分析。

### 2. 读码方式的选择

鉴定和发现新的物种是 DNA 条形码研究的 2 个主要目的, 两者对所使用的 DNA 数据的类型和数量各有不同的要求。条形码阅读方式的选择是使用 DNA 序列信息进行生物分类研究所面临的首要问题。

#### (1) 距离和特征。

对应于所利用的 DNA 数据类型——是“相似性和距离数据 (Similarity and Distance Data)”还是“离散特征数据 (Discrete Character Data)”, DNA 条形码可采用以距离或特征为基础的两阅读方法。

基于距离的阅读方法具体可分为 BLAST 法 - 利用原始相似性分值 (Raw Similarity Score) 确定与查询序列最近的邻居和基于距离法构建系统树 2 种, 后者利用的是所有种或运筹分类单位间的进化距离来建树, 采用的算法如邻接法 (NJ)、非加权组平均法 (UPGMA)、“Fitch-Margoliash”法等<sup>[9]</sup>。虽然基于距离的方法一直以来被作为物种定界的参考, 但却存

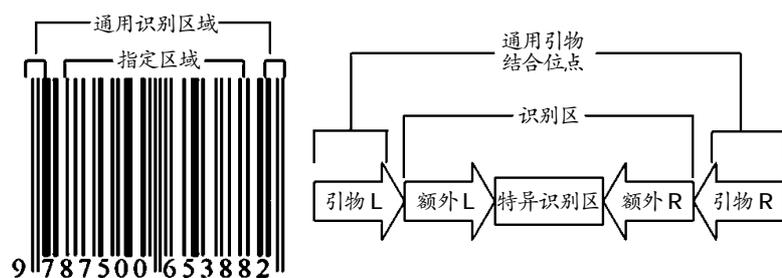


图 1 商品条形码 (左) 和 DNA 生物条形码 (右) 示意图

在以下不足<sup>[10]</sup>:①经典的分类方法大多以特征(Characteristic)为基础,特征性性状对于物种身份的确定非常关键,而距离法则难以与之形成统一;②按原始相似性分值排序确定的最近邻居并不一定具有最近的亲缘关系,当缺乏特征性性状时,以特征为基础的方法虽然无法进行鉴定,但却允许一定程度的假设检验,这对距离法来说则是无法实现的;③种内和种间距离存在广泛的重叠,这使得确定一个通用的可决定物种地位的相似性阈值变得十分困难,研究者不得不针对不同的生物群体对该数值进行修正。另外,在以距离为基础对属内不同的群体进行研究时,所使用的参数往往存在差异,这使得用距离法来描述物种将难以建立起一套客观的标准。

基于特征阅读方法是利用包括 DNA 碱基排序在内的具有离散特征状态的数据,该方法可分为建树和无需建树两大类。其中前者是通过将离散特征数据转换为距离数据后再利用最大简约法(MP)、最大似然法(ML)、进化简约法(EP)等算法来构建系统树<sup>[9,11]</sup>,建树时考虑到了所有特征或核苷酸位点在运筹分类单位或 DNA 序列间的进化关系等多方面的因素。

由于与经典的形态学、行为学方法相互兼容,并且可将上述信息组合在一起进行分析,因此,基于特征的 DNA 条形码阅读方法显得优势更为明显。

### (2)构建进化树。

以树为基础的物种鉴定方法除了应避免使用距离法所带来的问题之外,还需注意以下问题<sup>[12]</sup>:①利用包括多个不同来源分组数据的组合分析法建树比单基因树可更好地呈现出进化历史,并且还可针对各分组数据对组合树的性状贡献或支持程度进行评价,这在对多个基因单独进行分析时则往往难以实现。利用查询序列构建总的证据树可作为引导树对某未知个体的系统发育关系进行初步地识别,以节点处的特征性共享性状为基础,利用生物信息学工具可对查询序列进行进一步准确地定位;②根据建树时所采用的等级分层法(Hierarchical Methods)和以单系为基础的物种定界标准,当个体和种群无法形成具明确祖先-后代关系的等级分层系统时,仍可将单系重新定义为互为单系(Reciprocal Monophyly)或排外(Exclusivity);③根据性状分布或树的拓扑学特点将终端处的物种进行集合,这相对距离法建树来说是一种改进,但对于那些包括多个个体在内的

同一类型的物种来说,使用任何以树为基础的方法对其进行阅读看来都是不合适的。

由此看来,与建树法相比,仅对序列自身的特征性性状进行分析似乎更符合实际的需要,这类似于经典分类研究中所采用的两步法分析步骤,即先通过特征性性状对处于终端的物种进行鉴定,随后再对种间亲缘关系进行评价。只有在不同生物类群间存在固定差异的鉴定方法才能被研究者所接受,Sarkar 称之为“完美的(pure)”鉴定方法,关于此类方法在物种分类及鉴定研究中的应用价值,前人已进行了详细地讨论<sup>[13]</sup>。

## 三、样本数目和读码区域的选择

### 1. 样本数目

一个或少数个体并不能代表该物种的全体,尤其对于那些分布广泛的物种来说更是如此。采集足够数目的样本对于以距离或性状为基础的分析方法来说都是必要的。和基因区域的选择一样,适合所有物种的标准样本数目看来并不存在,不断尝试以及对物种生活史、扩散能力和交配方式等相关背景信息的了解是决定采样策略的重要因素。传统的分类实践均针对某特定物种从覆盖其分布范围的不同地理位置对其进行大规模采样和筛选,这将不仅有助于获得代表性的种内和种间变异,同时还有助于对某物种所有成员间的独有性状进行辨认。

### 2. 读码区域

为实现鉴定大量物种的目标,前人已针对各种单分子标记所能提供的信息含量和分辨率进行了详细地研究。作为动物 DNA 条形码研究首选的对象,目前已有许多关于成功使用线粒体编码基因的报道,除此以外,以核糖体为代表的其它一些核基因标记也被认可作为动物 DNA 条形码使用。考虑到植物线粒体基因组变异程度较小的特点,虽然 *cox 1* 基因也适用于对某些藻类进行研究,但与 *trn H-psb A* 基因间隔区、*rbc L* 和 *trn L-F* 等为代表的一些经典的质体系统发育标记相比,其作为植物 DNA 条形码使用仍存在很多不足之处<sup>[14-15]</sup>。

以当前在动物系统学研究中使用的最多的线粒体细胞色素氧化酶亚基 1 (Cytochrome C Oxidase Subunit 1, COX 1) 的编码基因为例,Hebert 等<sup>[16]</sup>指出,在 *cox 1* 基因中仅需 15 个变异位点即可提供 10 亿种不同的碱基组合,从而产生足够的条形码式样,其以

10 倍的种内遗传距离作为通用的距离阈值用来对鸟类进行种间水平的鉴定,并进一步肯定了 *cox 1* 在动物领域的应用价值。当然,种内遗传分化程度大于预期的情况也时有发生,如对桡脚亚纲 (Copepods) 进行研究发现,其种内 *cox 1* 序列差异百分数可高达 20%<sup>[17]</sup>。以上分类单元中遗传距离存在显著分化的事实暗示可能有尚未认识的遗传多样性存在。

仅利用 *cox 1* 进行系统发育关系的研究显然是不够的,但目前还无法确定其是否足以作为 DNA 条形码使用,不过至少对于一部分生物类群来说,*cox 1* 已显示出足够的对物种进行鉴定的能力。

#### 四、DNA 条形码复合鉴定法及其应用

以性状为基础的复合鉴定法 (Compound Diagnostics Method) 原理如图 2 所示,横线代表种群间的地理屏障,序列 1~6 和 7~12 分别来自 2 个不同的种群集合体 (Aggregates),其中 a、s 列的碱基均为“pure”鉴定性状;c 列虽不为“pure”鉴定性状,但 3 个 G 对于其所在的种群来说是“独有的”鉴定性状;e、g 列组合在一起 (AA、AG、GA) 构成了一个“pure”鉴定组合,j~m 列碱基既非特征性也非独有,而将其中的 4 个多态性位点组合在一起 (GA 或 AG + GA 或 AG) 即可用来对横线上方的种群进行“pure”鉴定。

##### 1. 鲟 鱼

鲟科有 3 个物种被 CITES 列为濒危行列,分别为欧洲鳇 (*Husu huso*)、俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*) 和闪光鲟 (*Acipenser stellatus*),在利用 DNA 序列对与之有关的鱼子酱贸易进行监控的过程中,有报道俄罗斯鲟鱼子酱可能来自于西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)。Birstein 等<sup>[18]</sup>将俄罗斯鲟和西伯利亚鲟与其它近 150 种鲟科 (*Acipenseridae*) 鱼类的约 700 bp 的线粒体细胞色素 b (cyt b) 基因片段进行比

No.	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s
1	A	A	A	G	A	A	A	A	A	C	A	G	A	G	G	A	A	A	A
2	A	A	G	G	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	G	A	A	A	G
3	A	G	A	G	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	A	A	A	G
4	A	A	G	G	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	A	A	A	G
5	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	A	A	A	A	G
6	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	A	A	G
-----																			
7	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	C
8	G	G	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	C
9	G	A	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T
10	G	A	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T
11	G	G	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	T
12	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	T

图 2 复合鉴定法实例

较发现,俄罗斯鲟和西伯利亚鲟间存在 36 个可变位点,其中有 3 个位点可同时对这 2 个物种实现“pure”鉴定,有 15 个单位点或超过 1000 种不同的双位点组合分别对以上 2 个物种具有特异性。另外,研究还发现了一个在形态上与俄罗斯鲟相同,同时又与西伯利亚鲟相似的隐种,DNA 鉴定说明该隐种与俄罗斯鲟并非同种实体。该实例不仅说明了 DNA 序列信息可用于揭示隐藏的多态性,同时值得一提的是,还有与之有关的 2 个技术方面的问题:①当样本量较小时,俄罗斯鲟鱼的隐种被错误鉴定为西伯利亚鲟,这说明样本数量是影响鉴定准确性的重要因素;②为了推进 DNA 条形码在物种定界实践中的广泛应用,综合性 DNA 序列数据库的建立是非常重要的。

##### 2. 毛冠鹿

毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 在我国属于二级保护动物,由于其肉味鲜嫩、毛皮质量好而受到人类的大肆捕捉,并濒于灭绝。经验表明,当样本数目较少时,若所选基因区域的变异程度较高,则容易造成种内和种间水平变异的混淆,反之则无法覆盖足够的变异,从而无法识别出真实的物种差异—出于平衡以上 2 种误差的考虑,Amato 等选择线粒体 16S rRNA 基因建立了一个包括毛冠鹿属 (*Elaphodus*) 所有物种和外群在内的含 114 个个体的 DNA 序列矩阵,所有物种均来自于已经形态学描述并命名的馆藏样品。研究发现,于 1932 年在老挝采集的罗氏鹿标准品 (*Muntiacus rooseveltorum*) 的 DNA 与所有新采集的样品享有共同的鉴定位点,这意味着所有随后发现的罗氏鹿均并非新的物种。此时若仅使用 DNA 数据而不将组群中包括标准品在内的所有物种包括在一起进行分析,则很有可能得到相反的结论。

##### 3. 药用水蛭

欧洲药用水蛭 (*Hirudo medicinalis*) 曾在肥胖和中风的治疗中风靡一时,作为一种极具价值的生物医药研究工具,美国 FDA 已于 2004 年正式通过将其作为药用“装置”使用,Leeches USA、BioPharm 和 Ricarimpex 等国际知名公司早已涉足于“水蛭微创”治疗技术的研究。对于这样一个如此广泛地在医学、神经生物学和基因组学研究中使用的药用物种,Black 等首次用 *cox 1* 序列对其进行了系统发育研究,随后,Trontelj 等<sup>[19]</sup>以 *cox 1* 为基础将欧洲药用水蛭明确划分为 4 个不同的家系,同时发现该位点具较高的碱基组成偏爱,其中约 24% 的可变位点表现为二元

性,高达 72%的核苷酸由 A 和 T 组成,且第 3 密码子位置的 AT 含量高达 96%<sup>[20]</sup>。

### 五、注意的问题

DNA 分类学是当前分类学(包括物种鉴定)研究中很活跃的一个研究领域,而条形码技术的出现再一次引发了分子生态学和形态分类学研究者之间的争论,具体表现在<sup>[21-24]</sup>:①大型数据库的建立,必将有助于辅助解决分类学上的争议和加快新物种发现的速度;②在建立统一的物种定界标准、提高鉴定的可靠性和准确性,以及多位点鉴定技术的开发等方面,依然存在很多尚未解决的难题;③尤其对于那些亲缘关系密切且依然保留有祖先 DNA 多态性的物种,以及当研究对象内部存在杂交时,利用线粒体 DNA 进行物种鉴定将存在很多局限<sup>[25]</sup>。

影响条形码鉴定准确性的因素主要集中在凭证标本、样本数目和读码区域 3 个方面:①凭证标本不仅可提供 DNA,还可为形态学等其它方面的研究提供材料,来自馆藏样本的 DNA 序列数据已证明对物种状态的精确评价是非常关键的;②相对种间变异而言较低的种内变异是影响鉴定准确性的重要因素。Ebach 等<sup>[26]</sup>提出:“在一般情况下,每个分类群(Taxonomic Group)均存在一个特征性的变异阈值,该数值在一般情况下约为 2%~12%,高于此阈值的个体组合将不再属于同一物种而形成一个种上等级的分类单元”。因此,样本数目必须足够大才得以容纳某特定基因区域内尽可能多的变异,将种群内部、种群之间或不同的物种组群中尽可能多的物种包括在内一起进行分析对于新物种的发现是非常必要的;③读码区域必须具备足够的可反映种间真实差异的变异。

另外,采用建树为基础的条形码阅读方式目前还存在很多不足。单分子标记所构建的系统进化树虽然在通常情况下都是有意义的,但其对应的支持值却不高,组合数据矩阵的利用可解决该难题。与此同时,由于缺少地理和形态学信息的配合,条形码在对环境微生物样本进行鉴定时可能会存在很多困难。

### 六、总结与展望

综上,无论是对于物种定界还是对物种进行描述,线粒体 DNA 均非必须也非主要的标准,在分类

鉴定研究中忽略形态学、生态学和行为学等方面特征的做法是不可取的,DNA 不应被作为物种分类或鉴定的唯一的信息来源,以 DNA 为基础的分类并不能取代传统的系统学和分类学研究方法,如以多个性状为基础的对物种进行详细地描述和对假说进行严格地测试等。综合 DNA 分子系统学和传统分类方法为一体的“整合分类学(Integrated Taxonomy)”的出现,已成为促进 DNA 条形码不断发展的一个关键要素。

对各种 DNA 条形码所适用的对象及其范围进行深入地研究是很有必要的,通过大规模采样,从而包含足够的种内变异,可保证即使潜在的姐妹种也能得到评估并被正确地地区分。在对数据进行分析时,还需注意将前人已描述过的与研究对象同属的物种包括在内,并附带一个关于置信程度(如系统发育支持值)及由于采样频率过小所引起的不确定因素的说明。另外,那些频繁杂交的生物类群、最近刚扩展形成的组织群落,以及线粒体和细胞核之间的高速基因传递,也值得进一步地研究。无论如何,条形码方法与过去常规的物种鉴定技术相比,具有明显的优势,条形码序列数据库的建立可节省大量的资源,并为所有者提供必要的保护。

目前,DNA 条形码研究在国内尚处于起步阶段<sup>[27-31]</sup>,本实验室当前正尝试以鉴定国内药用动物为突破口<sup>[32-33]</sup>,希望由此引起国内研究者的关注。其它有关该领域的最新进展可参见 <http://www.barcodinglife.org> 和 <http://barcoding.si.edu> 等网站的介绍。

### 参考文献

- Gressel J. Potential failsafe mechanisms against the spread and introgression of transgenic hypervirulent biocontrol fungi. *Trends Biotechnol*, 2001,19:149-154.
- William E. Hintz, Elisa M. Becker, Simon F. Shamoun. Development of genetic markers for risk assessment of biological control agents. *Can J Plant Pathol*, 2001,23:13-18.
- Meyer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 1999,10:391-399.
- LIPP Markus, BLUTH Anke, EYQUEM Fabrice, et al. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur Food Res Technol*, 2001,212:497-504.
- Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant derived food products. *Eur Food Res Technol*,

- 2002,214:3-26.
- 6 转基因食品拥有 DNA“条形码”.食品与发酵工业,2003,29(8):79.
  - 7 王默存.给生物贴上标签——DNA 条形码.大科技,2005,1:36-37.
  - 8 Wheeler QD, Raven PH, Wilson EO. Taxonomy: impediment or expedient? Science, 2004, 303:285.
  - 9 常青,周开亚.分子进化研究中系统发生树的重建生物多样性.1998,6(1):55-62.
  - 10 Hebert PD, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Aspitrupes fulgurator*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:14812-14817.
  - 11 Jack W, Sites J, Jonathon CM. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. Trends in Ecology and Evolution, 2003,18 (9): 462-470.
  - 12 Gatesy J, Baker RH, Hayashi C. Inconsistencies in arguments for the supertree approach: supermatrices versus supertrees of Crocodylia. Syst Biol, 2004, 53:342-355.
  - 13 Prendini L. Comment on: Identifying spiders through DNA barcoding. Can J Zool, 2005, 83:498-504.
  - 14 Saunders GW. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Phil Trans R Soc B, 2005, 360:1879-1888.
  - 15 Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:8369-8374.
  - 16 Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol, 2004, 2:1657-1663.
  - 17 Goetze E. Cryptic speciation on the high seas, global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. Proc R Soc B, 2003, 270:2321-2331.
  - 18 Birstein VJ, Ruban G, Ludwig A, et al. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: How many cryptic forms does it contain? Systematics and Biodiversity, 2005, 3:203-218.
  - 19 Trontelj P, Utevsy SY. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech(genus *Hirudo*). Mol Phylogenet Evol, 2005, 34:616-624.
  - 20 Siddall ME, Budinoff RB. DNA-barcoding evidence for widespread introductions of a leech from the South American *Helobdella triserialis* complex. Conservation Genet, 2005, 6:467-472.
  - 21 Dunn CP. Keeping taxonomy based in morphology. TREE, 2003, 18: 270-271.
  - 22 Seberg O, Humphries CJ, Knapp S, et al. Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. TREE, 2003, 18:63-65.
  - 23 肖金花,肖晖,黄大卫.生物分类学的新动向——DNA 条形码.动物学报,2004,50(5):852-855.
  - 24 王鑫,黄兵.DNA 条形码技术在动物分类中的研究进展.生物技术通报,2006,4:67-72.
  - 25 Mallet J, Willmott K. Taxonomy:renaissance or Tower of Babel? TREE, 2003, 18:57-59.
  - 26 Ebach MC, Holdrege C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. Nature, 2005, 434:697.
  - 27 潘程莹,胡婧,张霞,等.斑腿蝗科 Catantopidae 七种蝗虫线粒体 COI 基因的 DNA 条形码研究.昆虫分类学报,2006,28(2):103-110.
  - 28 陈士林,姚辉,宋经元,等.基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定.世界科学技术—中药现代化,2007,9(3):7-12.
  - 29 陈士林,宋经元,姚辉,等.药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析.中国天然药物,2009,7(5):322-327.
  - 30 Song Jingyuan, Yao Hui, Li Ying, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(3):434-439.
  - 31 Yao Hui, Song Jingyuan, Ma Xinye, et al. Identification of *Dendrobium* Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: the Chloroplast psbA-trnH Intergenic Region. Planta Medica, 2009, 75(6):667-669.
  - 32 Chen Nian, Zhao Shujin. Forensic identification of snake crude venom by mtDNA analysis. LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(8):2001-2003.
  - 33 Chen Nian, Zhao Shujin. New Progress in Snake Mitochondrial Gene Rearrangement. Mitochondrial DNA, 2009, 20(4):69-71.

## "Global System" for Species Identification: DNA Barcode

Chen Nian, Lai Xiaoping

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The identification of biological samples is a contributing factor in the recognition and protection of identity preserved species, detection of transgenic species and tracing of biological dispersal. The "barcode" identification technique, which uses the universal PCR primers to recognize the target sequences in unknown samples, recognizes a species identity by comparing its barcode DNA sequences to databases. Two major issues ought to be clarified before its extensive use in taxonomy and species delimitation: ① How to analyze and use DNA data? Currently, the tree building methods are commonly used to place certain DNA sequences into a taxonomic context; ② How to find the relevance between barcode and traditional taxonomic methods in order to make the barcode technique accepted by the taxonomic community? The principles and applications of DNA barcode are reviewed in this paper.

**Keywords:** DNA barcode, Taxonomy, Molecular identification

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)