

# 基于 ITS2 条形码对龙虎山野生石斛资源的研究

宋剑波<sup>1</sup>, 周松松<sup>1</sup>, 杨坤<sup>1</sup>, 曾黎明<sup>1</sup>, 王胜难<sup>1</sup>, 王国鑫<sup>2</sup>, 何彬<sup>2</sup>, 王义华<sup>1</sup>, 黄长干<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学理学院, 江西南昌 330045; 2. 江西轩斛生物科技有限公司, 江西鹰潭 335005)

**摘要** 铁皮石斛是我国名贵中草药之一, 位列“中华九大仙草”之首。选取江西龙虎山铁皮石斛样品中的 31 株样本进行品种鉴定, 采用 DNA 条形码对 31 株样本进行 ITS2 序列分析, 利用软件 MEGA6.0 对筛选得到的 31 个 ITS2 序列进行遗传距离的测定和进化树的构建, 确定其之间的亲缘关系, 发现其中有 6 个品种为龙虎山特有品种, 就此建立起江西龙虎山铁皮石斛资源库, 为保护江西优质的石斛资源奠定理论基础。

**关键词** 铁皮石斛; DNA 条形码; 进化树; 分子鉴定

中图分类号 S567.23<sup>+</sup>9 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)06-0103-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.06.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Study on Wild *Dendrobium officinale* Resources in Longhu Mountain Based on ITS2 Bar Code

SONG Jian-bo, ZHOU Song-song, YANG Kun et al (College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

**Abstract** *Dendrobium officinale* is one of the most valuable Chinese herbal medicines in China, ranking first among the ‘Nine Chinese Herbs’. Thirty-one samples of *D. officinale* from Longhu Mountain, Jiangxi Province were selected for variety identification, ITS2 sequence of 31 samples were analyzed by DNA barcode. Using software MEGA6.0, the genetic distances of 31 ITS2 sequences were determined and the evolutionary tree was constructed to determine the relationship between them. Among them, 6 species are endemic species to Longhu Mountain, the resource pool of *D. officinale* in Longhu Mountain, Jiangxi Province was established to lay a theoretical foundation for the protection of high quality *D. officinale* resources in Jiangxi.

**Key words** *Dendrobium officinale*; DNA barcode; Phylogenetic tree; Molecular identification

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是兰科石斛属, 为多年生的草本植物, 是我国传统的名贵中药材之一, 在我国已经有两千多年的药用历史, 具有养阴生津、益胃、抗肿瘤、抗突变、降血糖的功效, 被誉为“中华九大仙草之首”<sup>[1-2]</sup>。野生铁皮石斛生长于海拔 100~3 000 m 的山地半阴湿岩石、树皮上, 喜温暖湿润气候和半阴湿的环境, 不耐寒。铁皮石斛种子细小, 其种子在自然条件下需与合适的真菌共生才能萌发, 因而自身繁殖能力极低。再加上人类对其生境的破坏和资源的过度利用, 使野生铁皮石斛资源濒临灭绝, 成为“濒危珍稀植物”, 被列到《中国植物红皮书》<sup>[3-5]</sup>。现有栽培铁皮石斛的地区也从传统的浙江、云南扩展到广西、广东、福建、安徽、贵州、江苏、北京、上海等 10 余个省市<sup>[6]</sup>。在江西, 石斛产业还处于起步阶段, 目前只在鹰潭、上饶、赣州、抚州等地有一定规模的种植。野生铁皮石斛资源丰富, 气候生态环境适合铁皮石斛规模化种植。

近年来, 在国际上发展起来一种新的生物鉴定技术——DNA 条形码技术, 此技术主要是利用一段有足够变异的、易扩增且相对较短的标准的 DNA 序列提供快速、准确的分子水平上的鉴定<sup>[7-8]</sup>。这项技术起源于“生命条形码计划”(barcode of life project), “生命条形码计划”于 2003 年由加拿大安大略省圭尔夫(<http://www.barcoding.si.edu>)的研究人员发起, 旨在建立一个基于标准分子方法的真核物种清单的通用系统, 并于 2004 年由国际生命条形码联盟(CBOL)发

起<sup>[9]</sup>。只要有准确的分类学鉴定, 就可以建立一个公共的分类群参考数据库, 以此来鉴定更广泛的物种。DNA 条形码可以为许多科学领域(如生态学、生物医学、流行病学、进化生物学、生物地理学和保护生物学)和生物工业提供有力的支持。DNA 条形码的成本和时间效益使其能够自动识别物种。这在大型取样活动中特别有用, 例如 Craig Venter 的全球海洋取样小组的大规模采样鉴定<sup>[10]</sup>。通过这种方式, DNA 条形码还可以改进针对具有医学、生态和农学意义的病原物种的未知物种检测和鉴定的大型调查<sup>[11]</sup>。此外, 重要的是能够识别、检测和追踪专利生物在农业生物技术中的扩散, 以证实来源生物或生物资源的安全知识产权<sup>[12-14]</sup>。

目前植物 DNA 条形码主要根据国际生命条形码联盟(CBOL)的建议, 在植物叶绿体中寻找植物 DNA 条形码<sup>[15]</sup>。ITS 序列可以作为种子植物的核心条形码, 用于植物的分类鉴定<sup>[16]</sup>。DNA 条形码将 DNA 的标准区域作为物种识别的工具进行测序, 截至目前, 在植物中还没有形成统一的 DNA 条形码通用序列, 其物种水平的鉴定效率达 92.7%。目前核基因 ITS2 片段是公认的具有相对优势的片段而被关注<sup>[17-23]</sup>。近几年国内中药 DNA 条形码分子鉴定得到快速发展, 加快了中药鉴定标准化的进程。通过中药 DNA 条形码鉴定研究, 我国首次提出将 ITS2 序列作为药用植物鉴定的通用条形码序列, 并建立以 ITS2 为核心、psb A-trn H 为补充序列的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系和以 COI 序列为核心、ITS2 为辅助序列的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系, 为中药 DNA 条形码鉴定的发展奠定了坚实基础<sup>[24]</sup>。ITS2 片段在植物物种水平上变化速度相对而言比较快, 有更多的突变位点来区别不同品种之间的微小差别, 因此在品种的鉴定上具有很大的潜在价值。笔者利用 ITS2 序列对龙虎山铁皮

**基金项目** 江西省教育厅科技计划项目(GJJ170276)。

**作者简介** 宋剑波(1983—), 男, 湖南株洲人, 教授, 博士, 从事植物学与分子生物学研究。\* 通信作者, 教授, 博士, 从事植物生物化学研究。

**收稿日期** 2018-11-16; **修回日期** 2018-12-07

石斛 31 个样品进行了分类和鉴定, 以期为保护江西优质的石斛资源奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 试验样本为江西省鹰潭市龙虎山石斛野生种质资源。根据外型不同采取野生石斛样品 31 个(表 1)。

表 1 石斛样品编号

Table 1 The number of dendrobe

编号 No.	采集地 Collection places	样品名 Sample name
DOKM-1	鹰潭龙虎山	矮红
DOKM-2	鹰潭龙虎山	米斛
DOKM-3	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-1
DOKM-4	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-2
DOKM-5	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-3
DOKM-6	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-4
DOKM-7	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-5
DOKM-8	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-6
DOKM-9	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-7
DOKM-10	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-8
DOKM-11	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-9
DOKM-12	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-10
DOKM-13	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-11
DOKM-14	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-12
DOKM-15	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-13
DOKM-16	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-14
DOKM-17	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-15
DOKM-18	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-16
DOKM-19	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-17
DOKM-20	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-18
DOKM-21	鹰潭龙虎山	龙虎山野生-19
DOKM-22	鹰潭龙虎山	红杆
DOKM-23	鹰潭龙虎山	浙江杆
DOKM-24	鹰潭龙虎山	青黑节-1
DOKM-25	鹰潭龙虎山	清黑节-2
DOKM-26	鹰潭龙虎山	龙虎 1 号
DOKM-27	鹰潭龙虎山	天目 1 号
DOKM-28	鹰潭龙虎山	天元 4 号
DOKM-29	鹰潭龙虎山	小苗 1 号
DOKM-30	鹰潭龙虎山	小苗 2 号
DOKM-31	鹰潭龙虎山	徐博大盘

**1.2 仪器与试剂** 仪器: DYY-5 电泳仪(北京六一仪器厂); HC-2518R 离心机(加拿大 BBI 公司); FR980 凝胶成像系统(上海复日科技仪器有限公司); S1000PCR 仪(美国伯乐 BIO-RAD); 旋涡混匀器(美国 LABNET); 测序仪(美国应用生物系统公司); 移液枪(北京 DRAGONMED)。

试剂: 植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司); Ex Taq 酶(TaKaRa 宝日医生物技术有限公司); 琼脂糖(BIOWEST, 西班牙); 引物交由上海生工生物公司合成, 75%乙醇, 液氮。

**1.3 方法** 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒对 31 个样品进行 DNA 提取, 所有基因组 DNA 样品采用 ITS2 通用引物进行 PCR 扩增, 并进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.1 总 DNA 的提取。**

(1) 取新鲜铁皮石斛样品的叶片 100 mg 左右放入研钵, 加入液氮, 快速充分碾磨成细粉, 之后利用植物基因组 DNA 提取试剂盒。

(2) 把细粉转移到 1.5 mL 离心管中, 加入 550  $\mu$ L 65  $^{\circ}$ C 预热的 Buffer P1 和 4  $\mu$ L RNase A, 剧烈涡旋 1 min, 静置 10 min。

(3) 加入 130  $\mu$ L Buffer P2 混匀, 1 200 r/min 离心 3 min, 吸取上清液于分离柱 A, 12 000 r/min 离心 3 min, 收集滤液加入 1.5 倍体积的 Buffer P3 轻轻涡旋。

(4) 将上述液体加入一个吸附柱 AC 中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液。

(5) 加入 700  $\mu$ L 漂洗液 WB, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃废液。

(6) 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12 000 r/min, 5 min, 尽量去除漂洗液。

(7) 将吸附柱 AC 放于干净的离心管中, 在吸附膜中间加入 25  $\mu$ L 洗脱缓冲液 EB(先放于 65  $^{\circ}$ C 水浴中预热使用); 室温放置 3~5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 再加入 25  $\mu$ L 洗脱缓冲液, 放置 3~5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集 DNA。

(8) 收集的 DNA 可存放于 2~8  $^{\circ}$ C, 长期保存则放于 -20  $^{\circ}$ C。用 0.8% 的琼脂糖进行电泳检测, 并经 UltraPowerDNA 染料染色后, 在凝胶成像系统上观测其纯度并判断 DNA 分子的大小及完整性, 选取条带单一、清晰明亮的基因组用于下一步试验。

**1.3.2 序列扩增与测定。** PCR 反应体系为模板 DNA 1  $\mu$ L、Ex Taq 酶 10  $\mu$ L、引物 A(P1) 1  $\mu$ L、引物 S(P2) 1  $\mu$ L、灭菌水 7  $\mu$ L。

正反序列引物分别为 P1: CGTAACAAGGTTTCCGTAG-GTGAAC; P2: TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG。

PCR 扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 高温预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 模板变性 30 s, 54  $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共计 35 个循环。直接测序 PCR 扩增纯化, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行 ITS2 序列的测序工作, 送到上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序。

**1.3.3 数据处理。** 通过 DNA 条形码技术对在龙虎山采取的 31 株野生石斛样品进行分子鉴定, 之后在 NCBI 上进行样品 BLAST 同源性比对分析。采用序列拼接软件 Codon Code Aligner V3.0 对测序峰图进行校正, 去除低质量序列及引物区, 进行多序列比对和人工校验。然后使用基于隐马尔可夫模型<sup>[25-28]</sup>(hidden Markov model, HMMer) 去除所有序列两端的 5.8S 和 26S 区段, 进而获得 ITS2 间隔序列。将所得 DOKM-1、DOKM-2、DOKM-4、DOKM-5、DOKM-12、DOKM-13、DOKM-19、DOKM-21、DOKM-24、DOKM-26 号的数据在 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) 网站上进行样品间的两两同源性比对。之后将这 10 个样品数据导入生物信息学软件 MEGA 7.0 进行多序列比对, 并使用同种软件计算 K2P 遗传距离, 测定样品之间亲缘关系, 用软件 MEGA 7.0 对所得序列构建 Neighbor-Joining 系统进化树。

## 2 结果与分析

**2.1 样品间的两两同源比对** 从 31 株样品中鉴定出 10 个品种,挑选 10 个品种的样品进行两两同源性比对,结果表

明,品种十与其他品种同源差异最大,其他品种间虽有差异,但变化极小(表 2)。

表 2 10 个品种之间的两两同源比对  
Table 2 Pairwise comparison between 10 dendrobe

品种 Variety	编号 No.	DOKM-2	DOKM-12	DOKM-4	DOKM-24	DOKM-26	DOKM-21	DOKM-19	DOKM-5	DOKM-1	DOKM-13	%
十	DOKM-2	100.00	93.30	92.95	93.12	93.29	93.29	93.29	93.46	93.46	93.62	
二	DOKM-12	93.30	100.00	99.33	99.50	99.66	99.66	99.66	99.83	99.50	99.66	
六	DOKM-4	92.95	99.33	100.00	99.33	99.33	99.33	99.33	99.50	99.50	99.33	
八	DOKM-24	93.12	99.50	99.33	100.00	99.50	99.50	99.50	99.66	99.33	99.50	
三	DOKM-26	93.29	99.66	99.33	99.50	100.00	99.66	99.66	99.83	99.50	99.66	
四	DOKM-21	93.29	99.66	99.33	99.50	99.66	100.00	99.66	99.83	99.50	99.66	
五	DOKM-19	93.29	99.66	99.33	99.50	99.66	99.66	100.00	99.83	99.50	99.66	
七	DOKM-5	93.46	99.83	99.50	99.66	99.83	99.83	99.83	100.00	99.66	99.83	
一	DOKM-1	93.46	99.50	99.50	99.33	99.50	99.50	99.50	99.66	100.00	99.83	
九	DOKM-13	93.62	99.66	99.33	99.50	99.66	99.66	99.66	99.83	99.83	100.00	

**2.2 野生石斛分子鉴定** 通过 DNA 条形码技术对在龙虎山采取的 31 株野生石斛样品进行分子鉴定,之后在 NCBI 上进行样品 BLAST 同源性比对分析,结果发现,这 31 株样本分别属于 10 个品种。其中,有 9 个品种为铁皮石斛,1 个品种为霍山石斛。在 9 个铁皮石斛品种中,有 6 个龙虎山特有的铁

皮石斛品种,其中 DOKM-1、DOKM-3、DOKM-12、DOKM-21、DOKM-19、DOKM-4 和 DOKM-26 为龙虎山特有种,其生长形态如图 1(选自江西龙虎山江西龙虎天元生物科技有限公司)所示。



注:A.DOKM-1;B.DOKM-3;C.DOKM-21;D.DOKM-19;E.DOKM-12;F.DOKM-26

图 1 龙虎山铁皮石斛特有种

Fig.1 Specific varieties in Longhu Mountain

其中,品种一、品种二、品种三、品种四、品种五和品种六都属于龙虎山特有的野生铁皮石斛品种(表 3)。将这 6 个品种在 NCBI 上进行登记认证,其 GenBank 序列号见表 4。

对其 ITS2 序列进行分析后,发现龙虎山特有的铁皮石斛品种的序列长度为 597 ~ 601 bp,ITS 序列的 GC 含量为 52.91% ~ 53.27%,平均 GC 含量约为 53.04%。

表3 龙虎山石斛种质鉴定

Table 3 Identification of dendrobium in Longhu Mountain

品种 Variety	石斛类型 Type of dendrobium	是否特有 Whether it is unique or not	编号 No.
一	铁皮石斛	是	DOKM-1、DOKM-3
二	铁皮石斛	是	DOKM-12
三	铁皮石斛	是	DOKM-26
四	铁皮石斛	是	DOKM-21
五	铁皮石斛	是	DOKM-19
六	铁皮石斛	是	DOKM-4
七	铁皮石斛	否	DOKM-5、DOKM-6、DOKM-7、DOKM-8、DOKM-9、DOKM-10、DOKM-11、DOKM-15、DOKM-16、DOKM-17、DOKM-18、DOKM-22、DOKM-23、DOKM-25、DOKM-27、DOKM-28、DOKM-29、DOKM-30
八	铁皮石斛	否	DOKM-24
九	铁皮石斛	否	DOKM-13、DOKM-14、DOKM-20、DOKM-31
十	霍山石斛	是	DOKM-2

将鉴定出 10 个品种的基因序列使用 MEGA6.0 计算 K2P 遗传距离,结果表明,其种内的遗传距离在 0~0.005(表 5)。由此可知,龙虎山特有品种的铁皮石斛之间序列进化变异

表5 10个品种之间的 K2P 遗传距离

Table 5 The Kimura-2-parameter of the ten species

品种 Variety	编号 No.	DOKM-1	DOKM-2	DOKM-4	DOKM-5	DOKM-12	DOKM-13	DOKM-19	DOKM-21	DOKM-24	DOKM-26
一	DOKM-1										
十	DOKM-2	0.058									
十六	DOKM-4	0.005	0.065								
六七	DOKM-5	0.003	0.058	0.005							
二	DOKM-12	0.005	0.060	0.007	0.002						
九	DOKM-13	0.002	0.056	0.007	0.002	0.003					
五	DOKM-19	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003				
四	DOKM-21	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003	0.003			
八	DOKM-24	0.007	0.062	0.007	0.003	0.005	0.005	0.005	0.005		
三	DOKM-26	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	

极小。

2.3 系统发育树分析 使用 MEGA 6.0 软件对 31 株样品的测序结果进行分析并建立 DNA 条形码的系统发育树(图 2),结果表明,31 株龙虎山野生石斛样品有 30 株为铁皮石斛,1 株为霍山石斛,分属于 10 个品种,其中 6 个是龙虎山特有品种。它们之间有差异,但变异程度极小,都是由同一分支进化而来。

表4 6种特有品种 ITS2 间隔区的基本信息

Table 4 The basic information of six endemic species

编号 No.	序列长度 Sequence length//bp	GC 含量 GC content %	GenBank 序列号 GenBank serial number
DOKM-26	597	53.09	KU556790.1
DOKM-1、DOKM-3	597	53.09	KU556791.1
DOKM-12	601	52.91	KU556792.1
DOKM-21	597	53.27	KU556793.1
DOKM-19	597	52.93	KU556794.1
DOKM-4	597	52.93	KU556795.1

表5 10个品种之间的 K2P 遗传距离

Table 5 The Kimura-2-parameter of the ten species

品种 Variety	编号 No.	DOKM-1	DOKM-2	DOKM-4	DOKM-5	DOKM-12	DOKM-13	DOKM-19	DOKM-21	DOKM-24	DOKM-26
一	DOKM-1										
十	DOKM-2	0.058									
十六	DOKM-4	0.005	0.065								
六七	DOKM-5	0.003	0.058	0.005							
二	DOKM-12	0.005	0.060	0.007	0.002						
九	DOKM-13	0.002	0.056	0.007	0.002	0.003					
五	DOKM-19	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003				
四	DOKM-21	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003	0.003			
八	DOKM-24	0.007	0.062	0.007	0.003	0.005	0.005	0.005	0.005		
三	DOKM-26	0.005	0.060	0.007	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	

### 3 讨论与展望

DNA 条形码技术是指使用通用 DNA 序列信息鉴定物种变异类型的一种分子生物学技术。在物种鉴别中,有很多可用的方法,可以从形态方面的鉴别,也可以是从分子水平上的检测。因从形态学上的方法区别近属物种难度比较大,所以一般选用从分子水平来进行检测。虽然 DNA 分子在进化了数亿年之后,种属之间差异很大,但对于同一物种而言,DNA 条形码技术在物种变异过程的鉴定中具有很大的作用。

该研究利用 DNA 条形码技术对龙虎山地区的野生石斛资源进行了分子遗传学鉴定,进行分门别类,并结合江西其他地区已知的野生石斛建立江西地区野生石斛种质资源库,以保护江西优质的石斛资源。鹰潭龙虎山是我国铁皮石斛资源主要分布区之一,野生铁皮石斛资源丰富,气候生态环境适合铁皮石斛规模化种植。目前,龙虎山铁皮石斛基地已经建立稳定有效的龙虎山石斛新品种的组培快繁体系和栽培技术体系,一方面可以保护龙虎山的野生种质资源,另一方面可以对新品种进行大规模的人工栽培与开发,还可以对比龙虎山石斛与其他地区石斛的营养成分差别,最终筛选出

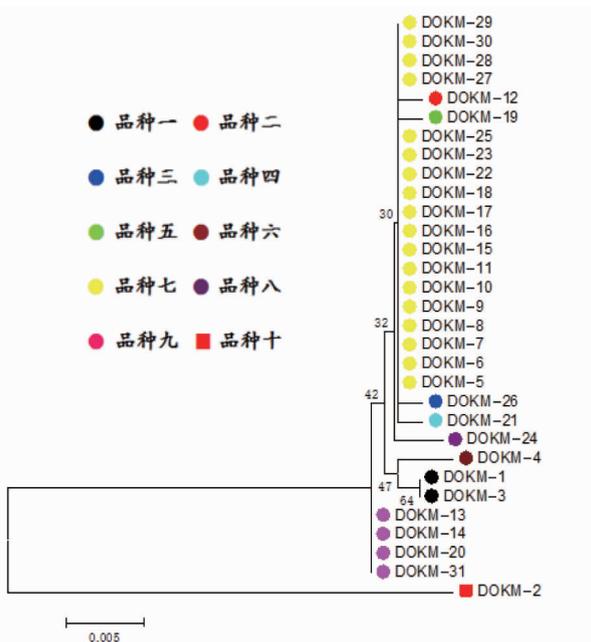


图2 31株样品之间的进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of the thirty-one sample

优质的石斛新品种并进行推广。

## 参考文献

- [1] 邵华,张玲琪,李俊梅,等.铁皮石斛研究进展[J].中草药,2004,35(1):109-112.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 杨虹,王顺春,王峰涛,等.铁皮石斛多糖的研究[J].中国药学杂志,2004,39(4):254-256.
- [4] 杨一令,来平凡,蒋士鹏.铁皮石斛的研究进展[J].山东中医药大学学报,2008,32(1):82-85.
- [5] 朱华,黄学萃,杨海广,等.石斛属多糖的研究进展[J].医药导报,2007,26(12):1476-1479.
- [6] 彭锐,范俊安,张艳.石斛属药用植物种质资源研究进展[J].时珍国医国药,2001,12(3):273-274.
- [7] FRÉZAL L, LEBLOIS R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects[J]. Infection, genetics and evolution, 2008, 8(5): 727-736.
- [8] HOGG I D, HEBERT P D N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes[J]. Canadian journal of zoology, 2004, 82: 749-754.
- [9] LAWSON D, ARENSBURGER P, ATKINSON P, et al. VectorBase: A home for invertebrate vectors of human pathogens[J]. Nucleic acids research, 2007, 35(S1): 503-505.
- [10] ARMSTRONG K F, BALL S L. DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification[J]. Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences, 2005, 360(1462): 1813-1823.
- [11] BALL S L, ARMSTRONG K F. DNA barcodes for insect pest identification: A test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae)[J]. Canadian journal of forest research, 2006, 36(2): 337-350.
- [12] RASTOGI G, DHARNE M, WALUJKAR S, et al. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers[J]. Meat science, 2007, 76(4): 666-674.
- [13] GRESSEL J, EHRlich G. Universal inheritable barcodes for identifying organisms[J]. Trends in plant science, 2002, 7(12): 542-544.
- [14] HAGHIGHI A R, BELDUZ A O, VAHED M M, et al. Phylogenetic relationships among *Artemisia* species based on nuclear ITS and chloroplast *psbA-trnH* DNA markers[J]. Biologia, 2014, 69(7): 834-839.

- [15] TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, et al. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding[J]. Nucleic acids research, 2007, 35(3): 1-8.
- [16] HOLLINGSWORTH M L, CLARK A A, FORREST L L, et al. Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants[J]. Molecular ecology resources, 2010, 9(2): 439-457.
- [17] 田晨曦,周巍,王爽,等.基于 DNA 条形码技术常见肉类掺假鉴别技术的研究[J].现代食品科技, 2016, 32(8): 295-301.
- [18] 罗焜,陈士林,陈科力,等.基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J].中国科学:生命科学, 2010, 40(4): 342-358.
- [19] 朱英杰,陈士林,姚辉,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J].药学学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [20] GAO T, YAO H, SONG J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. Journal of ethnopharmacology, 2010, 130(1): 116-121.
- [21] XU F, ZHANG L Q, GU W, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification[J]. Cladistics—the International journal of the Willi Hennig Society, 2011, 27(2): 165-170.
- [22] 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): 1-9.
- [23] GAO T, YAO H, SONG J Y, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family[J]. BMC evolutionary biology, 2010, 10(1): 1-7.
- [24] PANG X H, SONG J Y, ZHU Y J, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae[J]. Planta medica, 2010, 76(15): 1784-1786.
- [25] 刘依丽,冯尚国,何仁锋,等.基于 ITS2 条形码对铁皮石斛及其混伪品分子鉴定的初步研究[J].杭州师范大学学报(自然科学版), 2014, 13(1): 35-41.
- [26] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [27] KOETSCHAN C, HACKL T, MÜLLER T, et al. ITS2 Database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies[J]. Molecular phylogenetics & evolution, 2012, 63(3): 585-588.
- [28] EDDY S R. Profile hidden Markov models[J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 755-763.

(上接第 90 页)

高,受到短期经济利益的驱使,人们增加了对草原生态资源的利用强度,不顾草地的承载量,由此改变了害鼠及其生活环境的平衡,导致害鼠的大量繁殖扩张,草地质量下降,植被覆盖度降低,土壤沙化,向黑土滩型转变。而该过程又加重了鼠害,形成恶性循环<sup>[8]</sup>。研究表明,高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)对草地的频繁挖掘和对草原植物的啃食可能导致草原退化的发生。杨晓慧等<sup>[9-10]</sup>研究显示,高原鼠兔自然种群每只每日平均采食鲜草 66 g,全年损耗牧草 24.09 kg。该项研究得出类似的结果,对照区植被高度、盖度和产量都呈现逐年下降的趋势,且下降明显,差异显著( $P < 0.05$ );工程区的植被高度、盖度和产量都高于对照区,且差异显著,说明鼠害对草原退化影响较大,鼠害为害将加速草原的退化进程。雷岩等<sup>[11]</sup>的研究显示,在通过一系列措施治理后,根据每年牧草检测数据显示,草地植被盖度明显增加,产草量提高 400 kg/hm<sup>2</sup>左右,牧草高度提高了 3~6 cm,从而改善生态环境。而研究结果显示,植被高度、群落盖度、产草量总体趋势均为先减小后增加,说明鼠害防治后项目区植被恢复有缓冲适应期,植被高度、盖度及产草量是逐步开始恢复的,通过几年的修养才开始逐渐增加,同时,该研究表明草丛高度对地上生物量的贡献大于植被盖度

## 4 结论

(1)工程区的植被高度、盖度和产量呈先减小后增大的变化趋势,均高于对照区,且差异显著;植被高度、盖度从监测第 4 年开始逐年增加,产量从第 6 年开始增加。

(2)对照区植被高度、盖度和产量都呈现逐年下降的趋势,下降明显,差异显著。

(3)无论是工程区还是对照区,草丛高度对地上生物量的贡献大于植被盖度。

## 参考文献

- [1] 龙瑞军,董世魁,胡自治.西部草地退化的原因分析与生态恢复措施探讨[J].草原与草坪,2005(6):3-7.
- [2] 包文忠,山薇,杨晓东,等.我国北方草地资源面临的生态危机及对策[J].中国草地,1998(2):68-71.
- [3] 王宗礼.中国草原生态保护战略思考[J].中国草地,2005,27(4):1-9.
- [4] 张知彬.我国草原鼠害的严重性及防治对策[J].中国科学院院刊,2003,18(5):343-347.
- [5] 才旺.对达日县退牧还草中几个难点问题的分析[J].青海统计,2004(8):20-22.
- [6] 郭永旺,王登,施大钊.我国农业鼠害发生状况及防控技术进展[J].植物保护,2013,39(5):62-69.
- [7] 周立志,李迪强,王秀磊,等.三江源自然保护区鼠害类型、现状和防治策略[J].安徽大学学报(自然科学版),2002,26(2):87-96.
- [8] 施大钊,宛新荣,吴新平,等.毒鼠强整治后农业鼠害防治出现的問題及其对策[J].植物保护,2006,32(5):13-15.
- [9] 杨晓慧.青海省草地鼠害防治及高原鼠兔食性研究[D].兰州:兰州大学,2017.
- [10] 杨晓慧,唐俊伟,张明,等.果洛州草地鼠害危害及防治调查[J].青海草业,2015,24(4):28-32.
- [11] 雷岩.论玉树州草原鼠害防治建设与管理[J].农民致富之友,2016(14):227.