

实验技术与方法

食品中植物源性成分非定向筛查技术的应用

郭颖慧^{1,2}, 胡梅^{1,2}, 霍胜楠^{1,2}, 郑世超^{1,2}, 陈怡文³, 王骏^{1,2}, 任易婕^{1,2}, 孟静^{1,2}, 程祥龙^{1,2}, 崔生辉³
(1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101; 2. 山东省特殊医学用途配方食品质量工程技术研究中心, 山东 济南 250101; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 实现食品中植物源性成分非定向筛查技术在实际样品中的检测应用, 为打击植物源性成分的掺假提供技术支持。方法 采用改良 CTAB 法、SDS 法和试剂盒法对多种植物源性食品基因组 DNA 进行提取, 对获得的脱氧核糖核酸(DNA)质量、浓度和纯度进行比较。以植物中叶绿体基因组中的 *RbcL* 基因为条形码, 选用 30 种常见植物物种对该引物进行通用性、特异性验证。将二代高通量测序与 DNA 条形码技术相结合, 对山东省市售的 4 个混合植物样本进行种属鉴别。结果 改良 CTAB 法和试剂盒法可有效去除植物中多糖类和多酚类物质的干扰, DNA 提取效果较理想, SDS 法较差; CTAB 法获得的 DNA 浓度高于试剂盒法。该方法对选用的 30 种植物物种通用性、特异性良好。在属和种水平下, 混合样本中植物物种的同步检出率较高, 种水平的物种检出率达到 98%, 出现非目标匹配。结论 *RbcL* 基因片段可以作为植物种属鉴别的条形码, 在属水平下的鉴别率较高, 在种水平下存在高检出、低分辨率的问题, 后期可以通过增加条形码长度等方法进行进一步改善, 以期推进 DNA 宏条形码方法在植物鉴定领域的常规化应用奠定基础。

关键词:植物源性成分; 基因组 DNA; 提取方法; *RbcL* 基因; 高通量测序; 非定向筛查

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)07-1006-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.07.006

Application of non-directional screening technology for plant-derived components in food

GUO Yinghui^{1,2}, HU Mei^{1,2}, HUO Shengnan^{1,2}, ZHENG Shichao^{1,2}, CHEN Yiwen³, WANG Jun^{1,2},
REN Yijie^{1,2}, MENG Jing^{1,2}, CHENG Xianglong^{1,2}, CUI Shenghui³

(1. Institute for Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250101, China; 2. Shandong Quality Control Engineering Technology Research Center of Foods for Special Medical Purpose, Shandong Ji'nan 250101, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To provide technical support for combating adulteration of plant-derived ingredients, the detection application of non-directional screening of plant-derived ingredients in food was realized. **Methods** Modified CTAB, SDS, and kit methods were used to extract genomic DNA from various plant-derived foods. Quality, concentration, and purity of the obtained DNA were compared. Using the *RbcL* gene in the chloroplast genome of plants as a barcode, 30 plant species were selected to verify the universality and specificity of this primer. Combining the second-generation high-throughput sequencing with DNA barcode technology, species identification of four mixed plant samples sold in Shandong Province was performed. **Results** DNA extraction using the improved CTAB and kit methods removed the interference of polysaccharides and polyphenols, which was an ideal effect, whereas that of the SDS method was poor. The DNA concentration obtained by CTAB method was higher than that obtained using the kit method. This method had a good performance in universality and specificity of 30 selected plant species. At the genus and species level, the identification rate of plant species in mixed samples was high. The detection rate at the species level was 98%, and resulted in non-target matching. **Conclusion** The *RbcL* gene can be used as a barcode for plant species identification. The discrimination rate is high at the genus level. At the species level, detection rate was high and discrimination rate was low. To provide a foundation for the advancement of DNA metabarcoding method in the field of identification for plant-derived components in food, the method can be further improved by increasing the barcode length.

收稿日期: 2021-12-30

作者简介: 郭颖慧 女 工程师 研究方向为食品生物安全检测技术研究 E-mail: 273108580@qq.com

通信作者: 霍胜楠 女 研究员 研究方向为食品生物安全质量管理与检测技术开发 E-mail: huosn@163.com

Key words: Plant-derived components; genome DNA; extraction method; *RbcL* gene; high-throughput sequencing; non-directional screening

基于植物源性食品掺假情况的多样性和复杂性,依据现行标准对植物源性食品进行一对一定性检测,导致现有检测方法成本较高且效率较低,无法得到广泛应用。DNA 条形码是来自生物核基因组或细胞器基因组序列的特异核苷酸片段^[1],在物种鉴定、系统分类、植物育种、资源保护等领域发挥着重要作用^[2-5]。利用 DNA 条形码可实现食品中植物源性成分的非定向筛查。*RbcL* 位于叶绿体 DNA 上,属于核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的大亚基基因,在进化上较为保守^[6],具有通用性好、易扩增和易序列比对等优点^[7],广泛应用于植物物种鉴定的研究。例如,利用 *RbcL* 基因进行种属分析从而揭示苔藓植物真藓目的物种多样性^[8],通过 *RbcL* DNA 条形码对越南珍珠兰种质的遗传分类^[9],利用 *RbcL* 基因对濒危植物进行分子表征^[10]等。本文利用通用引物 *RbcL*,开展了食品中植物源性成分非定向筛查技术的应用研究。

1 材料与方法

1.1 实验样本

1.1.1 单一植物源性样本

供试材料来自山东省食品药品检验研究院食品中心,所有样本材料均经物种鉴定,包括:红小豆、草莓、大豆、绿豆、红薯、马铃薯、木薯、薏米、小麦、玉米、椰子、枣、小米、水稻、杏、腰果、榛子、芝麻、巴旦木、核桃、桃、香蕉、梨、小番茄、南瓜、胡萝卜、苹果、花生、开心果、豌豆 30 种植物物种。

1.1.2 混合植物源性样本

对山东省市售半固体复合调味料、淀粉及方便食品共计 4 份样品进行本技术的应用验证,配料表所标识的具体物种成分见表 1。

表 1 植物源性样本成分

Table 1 Plant-derived sample components

样本编号	样本名称	配料标识(物种成分)
B1	芝麻酱	芝麻
B2	芝麻花生酱	芝麻、花生
B3	豌豆淀粉	豌豆、玉米
B4	黑豆核桃粉	黑豆、黑米、燕麦、核桃仁

1.2 溶液配制

裂解缓冲液 I : 117.0 g/L NaCl, 20 g/L CTAB, 200 mL/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液, 100 mL/L 乙二胺四乙酸二钠溶液, pH 8.0。

裂解缓冲液 II : 50 g/L 十二烷基肌氨酸钠。

提取/裂解缓冲液 I : 30.0 g/L SDS, 50 mL/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液, 100 mL/L 乙二胺四乙酸二钾溶液, pH 8.0。

TE 缓冲液 (pH 8.0) : 10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA · 2Na。

10×电泳缓冲液 : 108 g/L Tris, 55 g/L 硼酸, 20 mmol/L EDTA · 2Na; 使用时 10 倍稀释。

乙酸钾溶液 : 3 mol/L, pH 5.2。

1.3 主要仪器

梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司), NanoDrop 2000c 生物紫外可见分光光度计(美国 ThermoFisher 公司), 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), 凝胶成像系统(美国 Spring Scientific 公司), 生物安全柜(美国 Nuair 公司)等。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 提取

利用改良 CTAB 法、SDS 法、试剂盒法分别对 30 种单一植物源性样本进行基因组 DNA 提取。

1.4.1.1 改良 CTAB 法

准确称取 0.5 g 待测样品,充分研磨后转移至离心管中。加入 1.0 mL 裂解缓冲液 I 和 0.4 mL 裂解缓冲液 II,充分混匀,65 °C 温浴 40 min, 20 °C 12 000×g 离心 15 min, 吸取上清到另一新的离心管中。加入等体积平衡酚-氯仿溶液,轻轻混匀,20 °C 12 000×g 离心 10 min, 吸取上清到另一新的离心管中。加入等体积氯仿,轻缓混匀,20 °C 12 000×g 离心 10 min, 吸取上清到另一新的离心管中。加入 0.6 倍体积异丙醇、0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钾溶液,轻轻颠倒混匀,-20 °C 静置 2 h 以上,12 000×g 离心 10 min, 弃上清。加入 0.5 mL 70% 乙醇溶液,颠倒混合。12 000×g 离心 10 min, 弃上清。干燥 DNA 沉淀。加 100 μL 水或 TE 缓冲液溶解 DNA。

1.4.1.2 SDS 法

准确称取 0.5 g 待测样品,充分研磨后转移至离心管中。加入 1.0 mL 提取/裂解缓冲液 I, 70 °C 温浴 2 h。12 000×g 离心 15 min, 吸取上清到另一新的离心管中。加入 1 倍体积平衡酚,轻缓颠倒混匀,12 000×g 离心 10 min, 转移上层水相至一新离心管。加入 1 倍体积平衡酚—氯仿—异戊醇溶液,轻缓颠倒混匀,12 000×g 离心 10 min, 转移上层水相至一新离心管。加入 1 倍体积氯仿—异戊醇溶液,轻缓颠倒混匀,12 000×g 离心 10 min, 转移上层水相至一新离心管。加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 乙酸钾溶液和

2 倍体积 95% 乙醇,充分混匀,-20 °C 静置 1 h, 20 000×g 离心 10 min,弃上清。加入 0.5 mL 70% 乙醇溶液洗涤 DNA 沉淀。12 000×g 离心 10 min,弃上清。干燥 DNA 沉淀。加 100 μL 水或 TE 缓冲液溶解 DNA。

1.4.1.3 试剂盒法

使用 QIAGEN 植物基因组提取试剂盒,按照试剂盒操作说明书提取 DNA。

1.4.2 DNA 浓度与纯度检测

DNA 的浓度和质量采用紫外分光光度法测定。使用 Thermo NanoDrop ONE 核酸分析仪测定 3 种方法提取的 DNA 样品的光吸收值,根据 A_{260}/A_{280} 的比值确定 DNA 纯度。

1.4.3 PCR 扩增与电泳

1.4.3.1 植物通用引物序列

本研究采用植物通用引物 *RbcL*^[11],扩增后得到 430 bp 左右条带,正向引物为 5'-AATCTTCTACTGG TACATGGAC-3',逆向引物为 5'-TCATCATCTTTGG TAAAATCAAG-3'。

1.4.3.2 PCR 反应体系与反应参数

反应体系总体积 25 μL,其中含:样品 DNA (10~100 μg/mL) 2 μL,植物通用引物 (10 μmol/L) 各 1 μL,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.2 μL,dNTP (10 μmol/L) 2 μL,10×PCR 缓冲液 5 μL,去离子水补足至总体积 25 μL。可使用相同效果的商品化 DNA 聚合酶预混液进行 PCR 扩增。

反应参数:95 °C (5 min)→95 °C (30 s)→56 °C (30 s)→72 °C (30 s),35 个循环;72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。

1.4.3.3 电泳检测

制备 2% 的琼脂糖凝胶,加入溴化乙锭(或等效染色剂)至终浓度为 0.5 μg/mL。将 8 μL PCR 扩增产物分别和 2 μL 上样缓冲液混合,点样,同时上样 5 μL 的 DNA Marker,9 V/cm 恒压,电泳至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶 2/3 处。凝胶成像仪下观察电泳结果并记录。

1.4.4 测序及分析

1.4.4.1 单一植物源性样本测序及分析

PCR 扩增获得的产物进行 Sanger 法 DNA 测序。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司测序平台完成。测序结果利用 DNAMAN 软件进行比对分析。

1.4.4.2 混合植物源性样本测序及分析

RbcL 引物扩增后构建文库进行测序分析,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司测序平台完成。将样本扩增后 DNA 随机打断,构建 430 bp 小

片段文库,分别进行平行测序,Illumina Miseq™/HiSeq™得到的原始图像数据文件经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列(Sequenced Reads)。采用 Cutadapt(v1.18)等软件对测序原始数据进行优化处理,采用 gplots 3.0.1.1、RDPclassifier 2.12 等软件对所有序列进行 OTUs 划分并进行生物信息统计分析。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取方法比对结果

对改良 CTAB 法、SDS 法以及试剂盒法 3 种方法提取的基因组进行 DNA 浓度与纯度检测,其结果见表 2。由表 2 可看出,改良 CTAB 法提取 DNA 质量较好,DNA 浓度较高, A_{260}/A_{280} 介于 1.7~1.9。SDS 法提取的 DNA 浓度较高,但 DNA 质量较差, A_{260}/A_{280} 均低于 1.7,可能存在蛋白质、RNA、有机溶

表 2 3 种方法提取基因组 DNA 质量及浓度检测

Table 2 The quality and concentration of DNA extracted by 3 methods

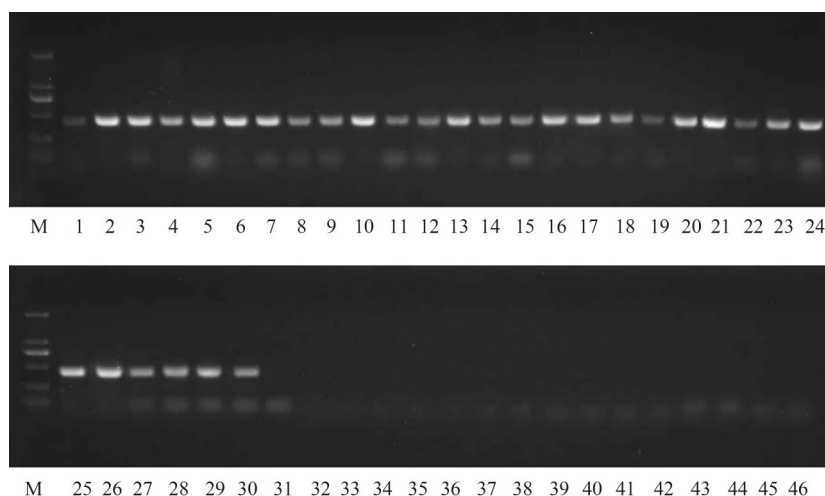
物种名称	A_{260}/A_{280}			DNA/(mg/L)		
	改良 CTAB 法	SDS 法	试剂盒法	改良 CTAB 法	SDS 法	试剂盒法
红小豆	1.78	1.69	1.87	633.7	520.6	103.7
大豆	1.88	1.70	1.87	596.1	643.5	127.2
绿豆	1.80	1.68	1.86	395.5	456.2	100.8
红薯	1.75	1.64	1.82	89.4	182.3	55.1
马铃薯	1.81	1.55	1.83	248.2	207.7	97.5
木薯	1.82	1.61	1.85	73.6	56.7	26.8
薏米	1.76	1.69	1.86	375.8	382.1	118.2
小麦	1.87	1.68	1.85	683.7	762.8	156.9
玉米	1.87	1.70	1.88	732.5	676.7	176.8
小米	1.88	1.68	1.87	332.8	367.0	124.4
水稻	1.87	1.60	1.86	724.6	684.9	166.2
杏	1.82	1.59	1.82	116.4	135.8	53.4
核桃	1.81	1.53	1.90	59.5	67.4	22.5
腰果	1.82	1.52	1.87	543.8	476.9	81.1
榛子	1.82	1.61	1.88	88.6	79.8	16.7
芝麻	1.86	1.67	1.81	197.4	170.2	105.3
巴旦木	1.83	1.69	1.81	264.7	371.5	70.8
桃	1.72	1.55	1.87	94.5	78.8	13.9
香蕉	1.75	1.65	1.88	142.8	135.7	24.5
梨	1.70	1.67	1.83	76.8	82.9	15.0
小番茄	1.73	1.54	1.89	114.5	95.7	23.8
南瓜	1.85	1.67	1.90	254.2	300.9	104.7
胡萝卜	1.86	1.69	1.89	156.9	145.2	29.7
苹果	1.79	1.53	1.80	87.7	98.5	18.2
花生	1.88	1.68	1.85	353.7	476.8	57.9
豌豆	1.86	1.67	1.82	589.5	498.1	169.0
开心果	1.82	1.63	1.86	859.7	564.2	132.4
草莓	1.73	1.59	1.80	109.7	102.5	25.7
椰子	1.80	1.76	1.86	880.4	765.7	135.4
枣	1.85	1.65	1.82	327.2	309.0	85.7

剂等杂质污染导致 DNA 纯度较低。试剂盒法提取 DNA 质量最好, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~1.9, DNA 纯度较高, 但浓度低于其他 2 种方法。

2.2 方法通用性结果

大豆、枣、小麦、开心果等 30 种果蔬粮食作物的基因组 DNA 和 15 种动物基因组 DNA 为模板,

利用 *RbcL* 引物进行 PCR 扩增后电泳检测, 验证该方法的通用适用性, 结果见图 1。研究表明, 30 种植物基因组通过 *RbcL* 引物 PCR 扩增后, 均可获得 430 bp 左右大小的条带, 而实验中的动物基因组经扩增后均未得到目标片段。因此, 该方法对研究中涉及的 30 种植物成分通用性良好。



注: M: Marker (DL2000); 1~30: 红小豆、草莓、大豆、绿豆、红薯、马铃薯、木薯、薏米、小麦、玉米、椰子、枣、小米、水稻、杏、腰果、榛子、芝麻、巴旦木、核桃、桃、香蕉、梨、小番茄、南瓜、胡萝卜、苹果、花生、开心果、豌豆基因组为模板进行电泳结果; 31~45: 猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅、马、驴、猫、狗、貂、狐狸、貉、鹌鹑、鸽子基因组为模板进行电泳结果; 46: 阴性对照

图 1 PCR 扩增结果电泳图

Figure 1 Electrophoresis of PCR amplification results

2.3 方法特异性结果

对 30 种植物的 PCR 产物序列通过 DNAMAN 软件两两比对分析其一致性, 结果可见, 30 种不同物种的测序序列两两一致性未达到 100%, 介于 35.24%~99.77% 之间(表 3), 因此, 该方法可以有效区分研究中涉及的 30 种植物物种。

2.4 混合植物源性样本测序分析

2.4.1 测序数据统计分析

对 4 个样本测序原始数据进行数据量和测序质量的统计, B1、B2、B3、B4 样本的数据产出的有效序列条数分别为 51 773、50 274、42 675、45 527(表 4)。

2.4.2 OTU 聚类分析及物种注释

OTU (operational taxonomic units) 是在系统发生学或群体遗传学研究中, 为了便于进行分析, 人为给某一个分类单元设置的统一标志。4 个样本聚类分析共产生 24 个 OTU, 见表 5(表中仅展示了丰度前 5 的 OTU)。

利用 ete3 package 绘制每个样本分类系统组成树状图。四个样本在不同分类水平下: domain(域)、phylum(门)、class(纲)、order(目)、family(科)、genus(属)、species(种)的物种种类统计见图 2。在种水平下, 四个样本的物种鉴别率与属水平下相同, B1、

B2、B3、B4 分别鉴别出 1、2、3、5 个物种, 但是 B3、B4 样本在种水平也产生了非目标物种匹配, 例如, B4 鉴别出枫杨、枸杞。

3 讨论

本文研究了食品中植物源性成分非定向筛查技术, 对改良 CTAB 法、SDS 法以及试剂盒法 3 种 DNA 提取方法进行了比较。植物样本复杂多样, 含有多糖多酚, 多糖的理化性质与 DNA 相似以致难以分离, 改良 CTAB 法可有效去除多糖多酚^[12], 从而提高 DNA 的质量和浓度。选择 30 种植物物种对该技术进行通用性、特异性验证, 通过一致性分析, *RbcL* 条形码可有效鉴别本研究所涉及的 30 种植物物种。文献报道的植物通用引物包括 *matK*、*RbcL*、ITS2、*trnH-psbA* 等, 聂传朋等^[13] 研究结果表明适合茶树 DNA 条形码的引物为 *matK*、*RbcL*, 潘韵佳等^[14] 研究结果表明五倍子的 *matK*、*RbcL*、ITS2、*trnH-psbA* 序列扩增成功率为 75.0%、100%、100%、91.7%。因此, 利用本研究建立的方法技术对其他植物通用引物进行验证并进行通用性、特异性比对将是进一步研究的方向。

此外, 对山东省市售的 4 份食品样本进行技术

表 4 测序数据信息

Table 4 Sequencing data information

样本名称	有效序列条数	碱基数	平均长度/bp	最短序列长度/bp	最长序列长度/bp
B1	51 773	20 109 249	388.41	210	462
B2	50 274	19 525 458	388.38	238	440
B3	42 675	16 556 106	387.96	215	432
B4	45 527	17 682 100	388.39	244	439

表 5 样本 OTU 中序列数统计及物种注释

Table 5 Sequence number statistics and species annotation of samples OTU

OTU 编号	B1	B2	B3	B4	物种注释信息
OTU3	48 576	2 058	1	282	d__Viridiplantae; p__Streptophyta; c__norank_Streptophyta; o__Lamiales; f__Pedaliaceae; g__Sesamum; s__Sesamum_indicum;
OTU1	226	44 346	93	0	d__Viridiplantae; p__Streptophyta; c__norank_Streptophyta; o__Fabales; f__Fabaceae; g__Arachis; s__Arachis_ipaensis;
OTU19	3	0	0	0	d__unclassified; p__unclassified; c__unclassified; o__unclassified; f__unclassified; g__unclassified; s__unclassified;
OTU5	8	3	208	6 781	d__Viridiplantae; p__Streptophyta; c__Liliopsida; o__Poales; f__Poaceae; g__Avena; s__Avena_occidentalis;
OTU4	2	29	1 924	28 681	d__Viridiplantae; p__Streptophyta; c__norank_Streptophyta; o__Fabales; f__Fabaceae; g__Glycine; s__Glycine_max;

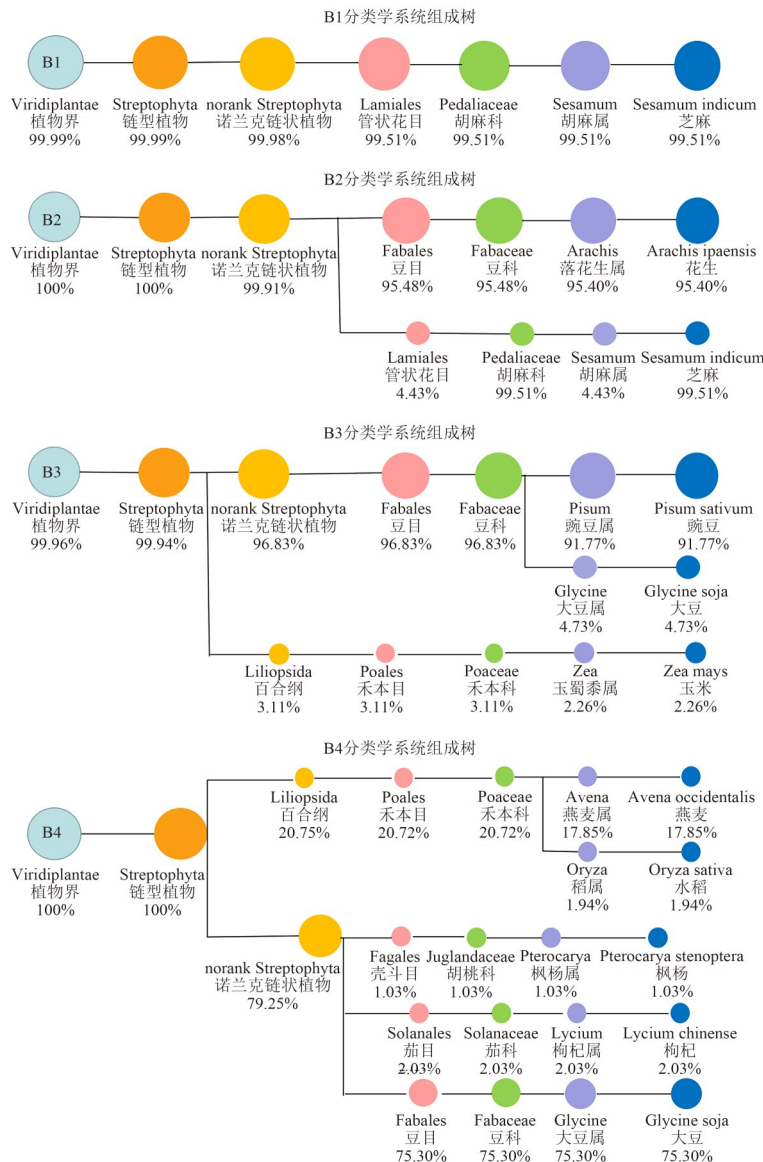


图 2 分类学系统组成树状

Figure 2 Taxonomic system composition tree

的应用验证,在种水平下,实际样本中物种的检出率高达98%,但在种水平也产生了非目标物种匹配,这可能是由于本研究采用的是430 bp的*RbcL*基因条形码,其碱基序列较短,分辨率不高,同时测序过程中引入的碱基误读也会产生非目标物种的匹配^[15]。随着DNA提取方法的改善、二代测序技术的发展以及数据库质量的提升,此类状况将逐步得到改善。本研究以期为食品中植物物种鉴定提供重要的分子学依据,并为植物源性食品的产业升级、监管执法提供良好的技术支持。

参考文献

- [1] 曾军,黄圣卓,蔡彩虹,等.白木香良种“热科2号”的DNA条形码分子鉴定[J].分子植物育种,2021,19(4):1237-1242.
ZENG J, HUANG S Z, CAI C H, et al. Molecular identification of *Aquilaria sinensis* 'reke 2' based on DNA barcoding [J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(4): 1237-1242.
- [2] CONSUEGRA S, O'RORKE R, RODRIGUEZ-BARRETO D, et al. Impacts of large and small barriers on fish assemblage composition assessed using environmental DNA metabarcoding [J]. Science of the Total Environment, 2021, 790: 148054.
- [3] LI M, HONG X, QIU X C, et al. Ultrasensitive monitoring strategy of PCR-like levels for Zearalenone contamination based DNA barcode [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(11): 4490-4497.
- [4] DE JESUS INACIO L, MERLANTI R, LUCATELLO L, et al. Natural contaminants in bee pollen: DNA metabarcoding as a tool to identify floral sources of pyrrolizidine alkaloids and fungal diversity[J]. Food Research International, 2021, 146: 110438.
- [5] MECHAI S, BILODEAU G, LUNG O, et al. Mosquito identification from bulk samples using DNA metabarcoding: A protocol to support mosquito-borne disease surveillance in Canada [J]. Journal of Medical Entomology, 2021, 58(4): 1686-1700.
- [6] 董斌,田夏红,谢月亮,等.剑麻种质资源DNA条形码遗传多样性分析[J].分子植物育种,2021,19(16):5546-5554.
DONG B, TIAN X H, XIE Y L, et al. Genetic diversity analysis of sisal germplasm resources base on DNA barcoding [J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(16): 5546-5554.
- [7] 代培红,邱东,姚正培,等.基于ITS和*rbcL*基因序列探讨广义棒果芥属植物的系统发育关系[J].分子植物育种,2020,18(22):7506-7511.
DAI P H, QIU D, YAO Z P, et al. Phylogenetic relationships of generalized *Sterigmostemum* based on evidences from ITS and *rbcL* gene sequences [J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(22): 7506-7511.
- [8] FAWLEY M W, FAWLEY K P, CAHOON A B. Finding needles in a haystack—Extensive diversity in the eustigmatophyceae revealed by community metabarcode analysis targeting the *rbcL* gene using lineage-directed primers [J]. Journal of Phycology, 2021, 57(5): 1636-1647.
- [9] HO V T, TRAN T K P, VU T T T, et al. Comparison of *matK* and *rbcL* DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam [J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2021, 19(1): 93.
- [10] ALAKLABI A, AHAMED A, AL QTHANIN R N, et al. Molecular characterization of endangered endemic plant *Aloe pseudorubroviolacea* using chloroplast *matK* and plastid *rbcL* gene [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(1): 1123-1127.
- [11] 赵琳娜,胡凤月,吴孝槐,等.用于转基因检测的番木瓜基因组DNA提取方法的比较[J].现代食品科技,2010,26(2):188-191.
ZHAO L N, HU F Y, WU X H, et al. Study on DNA extraction from papaya for detection of genetically modified organism [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(2): 188-191.
- [12] 潘英文,张凌,王安石,等.濒危兰科植物DNA的提取方法[J].热带生物学报,2019,10(1):94-98.
PAN Y W, ZHANG L, WANG A S, et al. Extraction of genome DNA from endangered orchid plants [J]. Journal of Tropical Biology, 2019, 10(1): 94-98.
- [13] 聂传朋,陈欣,马欣耀,等.茶树DNA条形码引物的筛选[J/OL].分子植物育种:1-11[2021-12-24].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210916.1316.026.html>.
- [14] 潘韵佳.五倍子基原物种DNA条形码鉴定及叶绿体基因组解析[D].北京:北京协和医学院,2021.
PAN Y J. DNA barcoding identification and chloroplast genome analysis of original plants of *Galla chinensis* [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2021.
- [15] 陈云霞,薛晓明,周用武,等.基于线粒体Cyt b的多物种混合生物样本中濒危动物的快速鉴别研究[J/OL].基因组学与应用生物学:1-9[2021-11-23].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20201016.0953.004.html>.
- CHEN Y X, XUE X M, ZHOU Y W, et al. Identification of endangered wildlife in complex biological samples based on mitochondrial Cyt b [J/OL]. Genomics and Applied Biology: 1-9 [2021-11-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20201016.0953.004.html>.