文章编号：1000-1190(2013)04-0551-07

獐牙菜亚族植物 DNA 条形码研究

孙　瑶[1,2]，郗厚诚[1,2]，薛春迎[2*]

(1. 中国科学院大学，北京 100049；2. 中国科学院 昆明植物研究所 生物多样性与生物地理重点实验室，昆明 650201)

摘　要：为准确鉴定獐牙菜亚族植物(包含常用藏药“蒂达”(藏茵陈))的基原植物，实现对贮藏药材的标准化鉴别. 本研究利用核基因 ITS 片段和叶绿体 *rbc*L、*mat*K 和 *trn*H-*psb*A 片段对獐牙菜亚族 25 种 50 个个体进行 DNA 条形码研究，结合 4 个候选条形码及其组合的种内、种间距离分布及物种鉴别率评价其在獐牙菜亚族植物中的应用效果. 结果表明：核基因 ITS 片段不仅在单片段中鉴别率最高(80%)，包含 ITS 片段的候选条形码组合的物种鉴别率均为 100%，考虑 *mat*K+ITS 组合对种子植物的物种鉴别效果更好，推荐双条形码组合 *mat*K+ITS 为獐牙菜亚族植物的标准条形码.

关键词：DNA 条形码；獐牙菜亚族；*trn*H-*psb*A；ITS；*mat*K；*rbc*L

中图分类号：Q949　　**文献标识码**：A

DNA 条形码技术是运用一段或少数几段短的核苷酸片段对物种进行鉴别的技术. 动物分子条形码技术基于编码细胞色素氧化酶亚基 1 的线粒体 COX1 基因[1]，但该基因在植物中高度保守，并不适合作为植物的 DNA 条形码[2]. 植物 DNA 条形码研究的开端是片段的筛选[3]：CBOL 植物工作组推荐 *rbc*L + *mat*K 叶绿体片段的组合作为陆地植物的核心条形码[4]；Kress 等[5] 提出用叶绿体非编码片段 *trn*H-*psb*A 和核基因 ITS 片段作为被子植物的潜在条形码；中国植物条形码工作组的研究结果认为种子植物的核心条形码应包括核基因 ITS 片段[6].

獐牙菜亚族(Swertiinae)属于龙胆科龙胆族(Gentianaceae-Gentianea)，包括 14 个属，大多数种类为北温带分布，东亚和北美是本亚族的多样化中心[7]，我国有 11 属 137 种[8]. 该亚族植物包含常用藏药“蒂达”(音译)的基原植物[9]. “蒂达”类藏药来源复杂，主要包括龙胆科獐牙菜亚族的种类，如椭圆叶花锚(*Halenia elliptica*)、长梗喉毛花(*Comastoma pedunculatum*)、湿生扁蕾(*Gentianopsis paludosa*)、肋柱花(*Lomatogonium carinthiacum*)和抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana*)等均为“蒂达”类药材的植物来源[10]. 目前利用药材标本进行 DNA 提取、扩增和测序所得结果可靠，DNA 条形码技术在獐牙菜亚族植物中的应用可以实现对贮藏药材的鉴别，有利于“蒂达”类药材质量标准的制定和市场监管.

本研究选择生物条形码协会(CBOL)推荐的核心条形码片段 *rbc*L、*mat*K 和 2 个补充条形码 ITS、*trn*H-*psb*A 探讨 DNA 条形码技术在獐牙菜亚族植物中的应用，目的在于：(1) 研究四个候选条形码及其组合对獐牙菜亚族植物的鉴别；(2) 计算 4 个候选条形码及其组合的种内、种间遗传距离，进行“条形码间隙”(barcoding gap)[11] 检验，了解其与物种鉴别率之间的关系；(3) 结合物种鉴别率与条形码间隙检验的结果，评价 2 个候选条形码及其组合在獐牙菜亚族中的适用性，推荐獐牙菜亚族植物的标准条形码(组合).

1　材料与方法

1.1　研究材料

研究材料为主要分布于我国西南地区的獐牙菜亚族植物 6 属 25 种，基本涵盖了獐牙菜亚族植物的主要形态类型[8]. 除狭域分布的弥勒獐牙菜(*Swertia mileensis*)外，每种均包括来自不同的居群的 2 个个体. 实验材料为经硅胶快速干燥的叶片. 凭证标本保存于中国科学院昆明植物研究所标本馆.

1.2　实验方法

总 DNA 提取采用改良的 CTAB 法[12]. 4 个候

收稿日期：2013-04-10.
基金项目：国家自然科学基金项目(31170194)；中华人民共和国科学技术基础性工作专项(2011FY120200).
* 通讯联系人. E-mail：chyxue@mail.kib.ac.cn.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

选条形码片段 *rbc*L、*mat*K、*trn*H-*psb*A 和 ITS 的 PCR 扩增反应所使用的引物和反应程序见表1. 扩增反应体系为 16.5 μL:2×mix(天根生化科技有限公司,北京)7 μL,正向引物 0.5 μL,反向引物 0.5 μL,DNA 模板 1 μL,ddH_2O 7.5 μL.

表1 PCR 反应中使用的引物和反应程序

Tab.1 Primer and thermo-cycling conditions used in PCR reaction

DNA 片段	引物(5'-3')	反应条件
*rbc*L	1F:ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC[13] 724R:TCGCATGTACCTGCAGTAGC[13]	95 °C,4 min; 35 ×(95 °C,40 s;52 °C,40 s; 72°C,1 min); 72 °C, 10 min
*mat*K	390F:CGATCTATTCATTCAATATTTC[14] 1326R:TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT[14]	95 °C,4 min;35 ×(94 °C,50 s;52 °C,1 min;72 °C,80 s); 72 °C, 10 min
*trn*H-*psb*A	*trn*H:CGCGCATGGTGGATTCACAATCC[15] *psb*A:GTTATGCATGAACGTAATGCTC[16]	95 °C,2 min;33 ×(95°C,1 min;50 °C,10 s;65 °C,1 min);65 °C, 10 min
ITS	18S:AGGAGAAGTCGTAACAAG[17] 26A:GTTTCTTTTCCTCCGCT[17]	95 °C,4 min;35 ×(94 °C,50 s;55 °C,1 min,72 °C,80 s); 72 °C, 10 min

PCR 扩增产物经过 0.8%琼脂糖凝胶电泳检验,成功扩增的产物使用 ExoSAP-IT(USB,Cleveland,Ohio,USA)纯化酶纯化,纯化产物作为测序反应的模板. 利用单向引物分别进行测序反应,反应体系(6 μL)为:测序 mix:0.15 μL(Applied Biosystems,Wamington,UK),引物:0.8 μL,测序缓冲剂:1.2 μL(Applied Biosystems,Wamington,UK),DNA 模板:0.18 μL,ddH_2O:3.65 μL. 反应程序:32 ×(96 °C,10 s;50 °C,5 s;60 °C,4 min). 测序反应产物加沉降液后于 4 °C 沉降 30 min,然后加入 70%乙醇清洗后干燥;测序前加入变性剂充分溶解,经 95 °C 变性 4 min 后迅速埋在冰水中冷却,测序在 ABI3730xl 自动测序仪上完成.

1.3 数据分析

50 个样品 4 个候选条形码片段的 PCR 扩增成功率及测序成功率均为 100%,各片段均成功测序得到双向的测序峰图. DNA 序列的拼接使用 SeqMan(DNASTAR Inc.,Madison,Wisconsin,USA)软件;拼接好的序列在 Clustal X2.0[18] 中比对并做必要的人工调整. 使用 MEGA5[19] 为单片段和片段组合的 DNA 序列矩阵基于 Kimura-2-parameter(K2P)距离使用邻接(neighbor-joining,NJ)法构树. 鉴别的标准参考 Hollingsworth 等[3]:当 1 个物种的全部个体在 NJ 树中聚为 1 个单系分支时,认为该物种被成功鉴别.

条形码间隙是检验条形码的一项指标. 由于分子系统学的研究表明獐牙菜亚族内的系统关系十分混乱,属的划分仍有争议[11],将其作为一个整体计算种间距离. 使用 MEGA5 分别计算 4 个候选条形码及其组合的种内、种间 K2P 距离,然后计算种内距离 X 与种间距离 Y 的分布频率与重合概率 $P(X,Y)$,作为对条形码间隙的定量描述. 使用 R 软件[20] 对 $P(X,Y)$ 与物种鉴别率进行回归分析.

2 实验结果

2.1 4 个候选条形码的基本信息

序列的长度、变异位点数及遗传距离等信息统计见表2. *rbc*L 片段的矩阵长度包括 604 个位点、ITS 包括 634 个位点、*trn*H-*psb*A 包括 692 个位点,*mat*K 包括 789 个位点. 4 个片段的变异位点数的比例差异较大,其中变异位点最多的是 *trn*H-*psb*A(37.4%),最少的是 *rbc*L(6.0%),介于中间的是 ITS(35.5%)和 *mat*K(20.2%). 种间距离和种内距离最大的是 ITS 片段,分别是 0.078 5 和 0.001 9;*trn*H-*psb*A 次之,分别是 0.072 5 和 0.000 7;*mat*K 第 3,分别为 0.037 9 和 0.000 1;*rbc*L 片段最为保守,种间距离为 0.010 3,在 4 个候选条形码中最低,没有观察到种内变异. 4 个候选条形码的种间距离在靠近零的区域均与种内距离的分布出现重合(图1).

表2 4 个候选条形码的基本信息

Tab.2 Basic statistics of the 4 candidate barcodes used in this study

DAN 片段	矩阵长度	变异位总数/%	种内 K2P 距离	种间 K2P 距离	样本数/物种数
*rbc*L	604	36/6.0	0.0000±0.0000	0.0103±0.0040	50/25
*mat*K	789	159/20.2	0.0001±0.0003	0.0379±0.0150	50/25
*trn*H-*psb*A	692	259/37.4	0.0007±0.0025	0.0725±0.0318	50/25
ITS	634	225/35.5	0.0019±0.0026	0.0785±0.0260	50/25

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

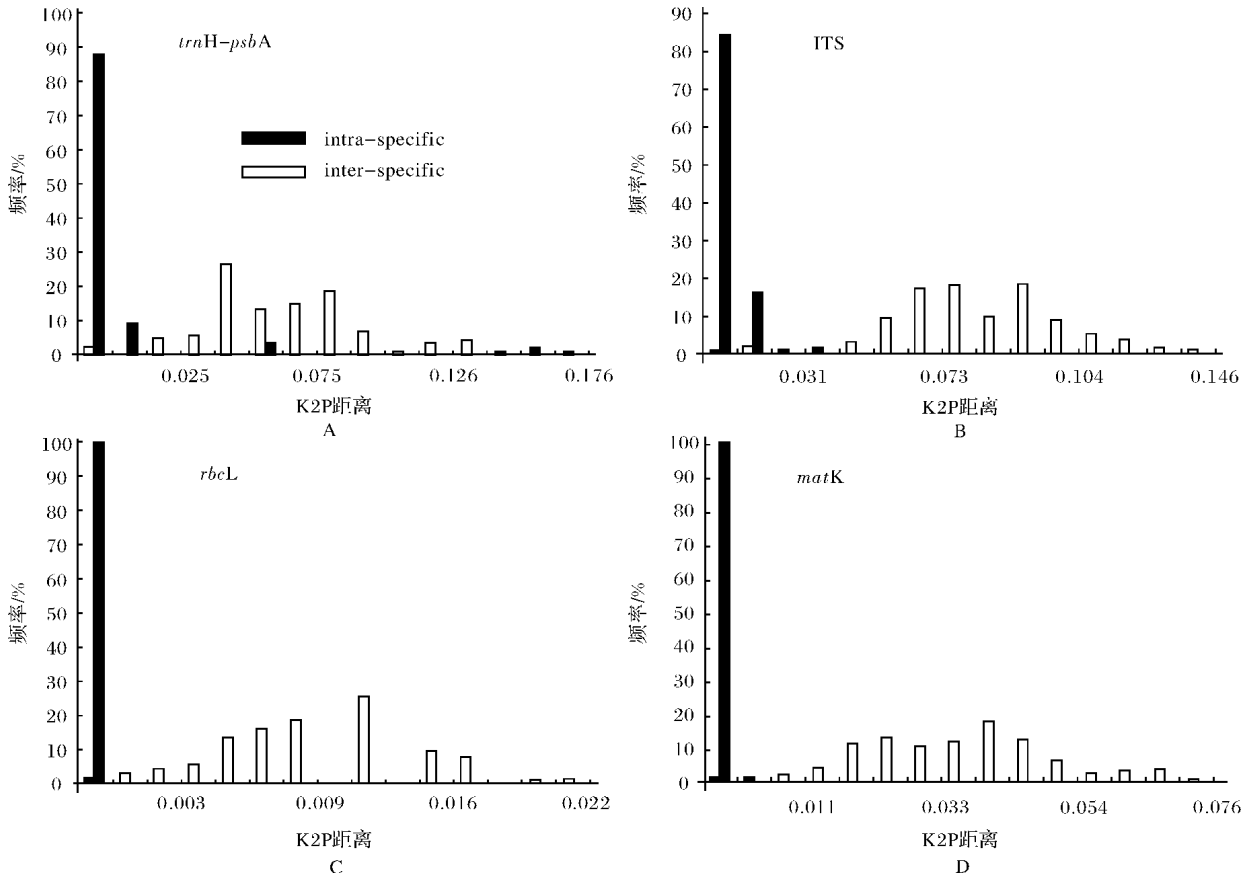

图 1　4 个候选条形码的种内、种间 K2P 距离频率分布直方图

Fig. 1　Frequency distribution of inter-specific and intra-specific K2P distances for 4 candidate barcodes

2.2　候选条形码及其组合的物种鉴别

4 个候选的条形码片段单独鉴别獐牙菜亚族的植物时，ITS 鉴别力最好，可以鉴别 25 种中的 20 种（80%）；其次是 *mat*K，能鉴别 18 个种（72%）；*rbc*L 和 *trn*H-*psb*A 的鉴别力最差，只能鉴别 16 个种（64%）. 双片段组合的鉴别率和单片段相比大幅提高，其中 *rbc*L＋ITS、*mat*K＋ITS、*trn*H-*psb*A＋ITS 组合的鉴别率均为 100%；其他双片段组合的鉴别率依次为 80%（*mat*K＋*trn*H-*psb*A）、84%（*rbc*L＋*mat*K）和 88%（*rbc*L＋*trn*H-*psb*A）. 多片段组合中除 *rbc*L＋*mat*K＋*trn*H-*psb*A 的物种鉴别率为 88% 外，其他组合的鉴别率均为 100%（图 2，表 3）.

25 种獐牙菜亚族植物类群被 4 个候选条形码及其组合的鉴别结果可概括为 3 种类型：(1) 能够被所有单片段及片段组合正确鉴别，包括镰萼喉毛花、高杯喉毛花、密花假龙胆、辐状肋柱花、红直獐牙菜、大籽獐牙菜、弥勒獐牙菜和四数獐牙菜共 8 种；(2) 能被所有片段组合正确鉴别，但不能被所有单片段正确鉴别，包括椭圆叶花锚、肋柱花、扁蕾、迴旋扁蕾、白花獐牙菜、观赏獐牙菜、云南獐牙菜、紫红獐牙菜、獐牙菜和显脉獐牙菜共 10 种；(3) 在单片段和片段组合中均存在鉴别失误，包括湿生扁蕾、细瘦獐牙菜、长梗喉毛花、黑边假龙胆、抱茎獐牙菜、毛獐牙菜和西南獐牙菜共 7 种（表 3）.

2.3　候选条形码的种内距离与种间距离的分布与物种鉴别率

4 个候选条形码片段的种内距离与种间距离均有重合，没有出现理想的条形码间隙（图 1，图 2）. 重合的概率最大的是 *trn*H-*psb*A（0.018 4）；其次是 *rbc*L（0.006 7）、ITS（0.003 7）；*mat*K 的重合概率最小（0.003 2）. 增加片段可以减小种内距离与种间距离重合的概率，如双片段组合中 *rbc*L＋ITS、*mat*K＋ITS 的重合概率为零，表现出理想的条形码间隙，其他 4 个双片段组合的重合概率依次为 0.001 7（*trn*H-*psb*A＋ITS）、0.002 9（*mat*K＋*trn*H-*psb*A）、0.003 1（*rbc*L＋*trn*H-*psb*A）0.003 2（*rbc*L＋*mat*K）. 多片段组合中除 3 个叶绿体片段的组合 *rbc*L＋*mat*K＋*trn*H-*psb*A 重合率为 0.002 9 外，其它组合的重合概率均为零，呈现理想的条形码间隙.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 4 个候选条形码及其组合的物种鉴别结果

Tab. 3 Results of species identification for four candidate barcodes and its combinations

植物名称	L	K	H	I	KI	KH	LH	HI	LK	LI	LHI	KHI	LKI	LKH	LKHI
镰萼喉毛花 (*Comastoma falcatum*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
高杯喉毛花 (*C. traillianum*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
密花假龙胆 (*GentiaWnella gentianoides*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
辐状肋柱花 (*Lomatogonium rotatum*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
红直獐牙菜 (*Swertia erythrosticta*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
大籽獐牙菜 (*S. macrosperma*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
弥勒獐牙菜 (*S. mileensis*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
四数獐牙菜 (*S. tetraptera*)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
椭圆叶花锚 (*Halenia elliptica*)	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
肋柱花 (*L. carinthiacum*)	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
扁蕾 (*Gentianopsis barbata*)	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
迴旋扁蕾 (*Gentianopsis contorta*)	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
白花獐牙菜 (*S. alba*)	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
观赏獐牙菜 (*S. decora*)	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
云南獐牙菜 (*S. yunnanensis*)	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
紫红獐牙菜 (*S. punicea*)	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
獐牙菜 (*S. bimaculata*)	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
显脉獐牙菜 (*S. nervosa*)	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
湿生扁蕾 (*Gentianopsis paludosa*)	—	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓
细瘦獐牙菜 (*S. tenuis*)	—	✓	—	✓	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
长梗喉毛花 (*C. pedunculatum*)	—	—	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
黑边假龙胆 (*Gentianella azurea*)	✓	—	—	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
抱茎獐牙菜 (*S. franchetiana*)	✓	—	—	✓	✓	—	✓	✓	—	✓	✓	✓	✓	—	✓
毛獐牙菜 (*S. pubescens*)	—	—	—	✓	✓	—	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	—	✓
西南獐牙菜 (*S. cincta*)	—	—	—	—	✓	—	—	✓	—	✓	✓	✓	✓	—	✓
正确鉴别的物种数 (*No. of species identified*)	16	18	16	20	25	20	22	25	21	25	25	25	25	22	25

注:✓(正确鉴别);—(未成功鉴别);L(*rbc*L);K(*mat*K);*trn*H-*psb*A(H);ITS(I)

根据片段种内、种间距离分布的重合概率 $P(X,Y)$ 与物种鉴别率 S 的分布特点确定回归模型为对数形式:$\begin{cases} S = a + b\ln Q, \\ Q = 0, S = 1, \end{cases}$ 其中 $Q = P(X,$

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Y)；使用最小二乘法求得 $a=-0.026$，$b=-0.1447$(图 3)．回归模型的平方误差 $SE\hat{S}$ (Squared Error of $\hat{S}$)是总变异 $SE\bar{S}$ (Squared Error of $\bar{S}$)中不能被回归模型描述的变异．相关系数 $R=\sqrt{1-\frac{SE\hat{S}}{SE\bar{S}}}$，表示总变异 $SE\bar{S}$ 中能够被回归模型描述的波动．根据表 4 求得 $R=0.930$，接近于 1，说明仅有很少的波动不能被回归模型描述，回归模型的拟合优度较好，片段(组合)的物种鉴别率随重合概率的降低呈对数增长．

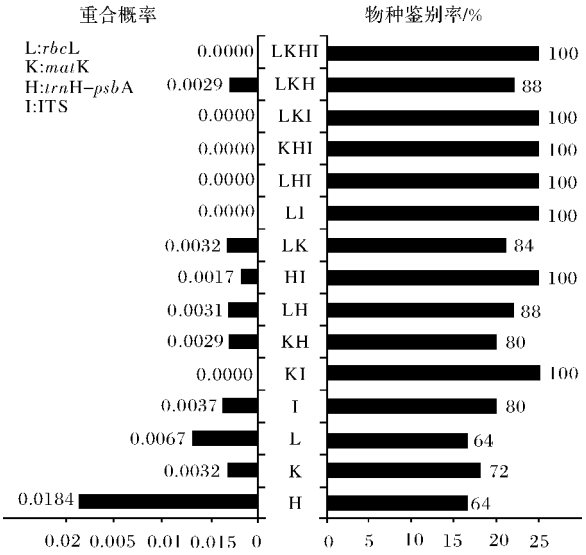

图 2　4 个候选条形码及其组合的种内距离与种间距离重合的频率与物种鉴别力

Fig. 2　Frequency of overlap and species identification rate for four candidate barcodes and its combinations

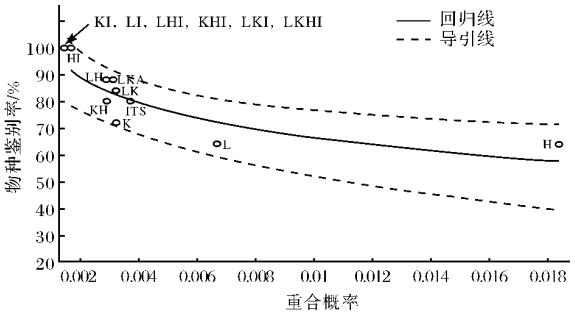

图 3　种内遗传距离与种间遗传距离重合的概率(Q)与物种鉴别效果(S)的回归分析

Fig. 3　Regression analysis of frequency of overlap (Q) and species identification rate (S)

3　讨论

3.1　候选条形码的物种鉴别

在 25 个类群中除镰萼喉毛花等 7 个类群能够被 4 个片段及其组合鉴别外，剩下的类群有些只能够被核基因 ITS 片段鉴别(如椭圆叶花锚等 12 种)，有些只能够被叶绿体片段鉴别(如肋柱花等 2 种)；另有些种核基因 ITS 片段和叶绿体片段都不能正确鉴别(如西南獐牙菜等 3 种)．在前两种情况中，核基因和叶绿体基因存在不一致性，可能的原因是杂交，基因渗入或不完整的种系排列(incomplete lineage sorting)，所有这些现象在植物中频繁发生．在后一种情况中，如西南獐牙菜来自不同居群的个体不能被核基因 ITS 片段和叶绿体片段鉴别，可能是远距离的居群间仅有有限的基因流或异域居群间中断了基因流，种内不同居群间存在明显的基因差异．

表 4　回归模型计算表

Tab. 4　The calculation table for the regression model

DNA 片段	$P(X,Y)$	S	$\hat{S}$	$(S-\hat{S})^2$	$(S-\bar{S})^2$
*rbc*L	0.006 7	0.6400	0.7217	0.0067	0.0576
*mat*K	0.003 2	0.7200	0.8286	0.0118	0.0256
*trn*H-*psb*A	0.018 4	0.6400	0.5755	0.0042	0.0576
ITS	0.003 7	0.8000	0.8076	0.0001	0.0064
*rbc*L+*mat*K	0.003 2	0.8400	0.8286	0.0001	0.0016
*rbc*L+ITS	0.000 0	1.0000	1.0000	0.0000	0.0144
*mat*K+*trn*H-*psb*A	0.002 9	0.8000	0.8429	0.0018	0.0064
*rbc*L+*trn*H-*psb*A	0.003 1	0.8800	0.8332	0.0022	0.0000
*mat*K+ITS	0.000 0	1.0000	1.0000	0.0000	0.0144
*trn*H-*psb*A+ITS	0.001 7	1.0000	0.9202	0.0064	0.0144
*rbc*L+*mat*K+*trn*H-*psb*A	0.002 9	0.8800	0.8429	0.0014	0.0000
*rbc*L+*trn*H-*psb*A+ITS	0.000 0	1.0000	1.0000	0.0000	0.0144
*rbc*L+*mat*K+ITS	0.0000	1.000 0	1.0000	0.0000	0.0144
*mat*K+*trn*H-*psb*A+ITS	0.000 0	1.0000	1.0000	0.0000	0.0144
*rbc*L+*mat*K+*trn*H-*psb*A+ITS	0.000 0	1.0000	1.0000	0.0000	0.0144
合　计				$SE\hat{S}=0.0346$	$SE\bar{S}=0.2560$

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

獐牙菜亚族植物的一些类群在表型上已有明显的自衍征,但分子数据还不能鉴别,可能的原因是物种的快速辐射演化.横断山区是龙胆科植物的多样化中心之一,这片区域经历了青藏高原的几次抬升、横断山脉快速形成以及第四纪冰川的进退等重大的历史事件[21].这些重大历史事件引起的地质和生态上的变化加速了在该地区生长的龙胆科植物的适应性演化[22],物种形成还处于"萌芽期",物种形成的时间还不足以使等位基因排序完全,新物种的形成使之父母种成为并系,表现为形态性状已存在明显区别的物种,分子数据仍不能区分.

3.2 候选条形码的条形码间隙与物种鉴别率

理想的条形码片段存在条形码间隙[11],因而能够准确地识别物种,此时种内距离与种间距离重合的概率等于零;当条形码的最大种内距离大于最小种间距离时,种内距离与种间距离的分布重合,阻碍条形码准确地鉴别物种.因此条形码间隙可以用重合概率来衡量,重合概率小的条形码比重合概率大的条形码物种鉴别效果好,重合概率为零的条形码鉴别物种的效果最好.回归分析的结果支持上述趋势,根据回归模型计算的条形码间隙与物种鉴别率之间的相关系数 R 为0.930,表明大部分物种鉴别率的波动都可以被回归模型解释,片段(组合)的物种鉴别率随重合概率的减小呈对数增长.

3.3 候选条形码片段及其组合的适用性评价

4个候选的条形码片段都没有达到理想的物种鉴别率,其中鉴别率最高的是核基因ITS片段(80%).增加片段可以提高鉴别率,如双片段组合中 *rbc*L+ITS、*mat*K+ITS 和 *trn*H-*psb*A+ITS 的鉴别率均为100%,*mat*K+*trn*H-*psb*A 为80%,*rbc*L+*mat*K 为84%和 *rbc*L+*trn*H-*psb*A 为88%.多片段组合中除 *rbc*L+*mat*K+*trn*H-*psb*A 的物种鉴别率为88%外,其他组合的鉴别率均为100%.值得注意的是,任何一个或多个片段与核基因ITS片段组合,鉴别率均提高至100%.以上结果表明核基因ITS片段不仅在单片段的物种鉴别中表现最好,任何包含核基因ITS片段的片段组合均达到了理想的物种鉴别率.这一结论支持China Plant BOL Group[6]将ITS作为陆地植物的核心条形码的建议.

核基因ITS序列对獐牙菜亚族植物的物种鉴别率为80%,加入3个叶绿体候选片段中的任一个都可以提高鉴别率至100%.因此只要在3个叶绿体片段中选择一个性能最好的片段与核基因ITS片段组合即可实现对獐牙菜亚族植物的准确鉴别.在3个叶绿体候选条形码中,*mat*K+ITS与 *rbc*L+ITS 组合的种内距离与种间距离重合的概率为零,存在理想的条形码间隙,因此与核基因ITS片段组合的标准条形码片段应从 *mat*K 和 *rbc*L 中选取.考虑到 *mat*K+ITS 组合在种子植物中具有75.3%的物种鉴别力,鉴别物种的性能高于 *rbc*L+ITS 组合(69.9%)[6],我们建议以 *mat*K+ITS 组合作为獐牙菜亚族植物的标准条形码.

致谢 感谢中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的杨俊波、李洪涛等各位老师以及DNA条形码小组的同学们在实验和数据处理过程中给予的帮助!

参考文献:

[1] Hebert P D N, Ratnasingham S, De W J. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, **270** (Suppl 1): S96-S99.

[2] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, **360**(1462): 1889-1895.

[3] 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, 2009, **9** (2): 439-457.

[4] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, **106**(31): 12794-12797.

[5] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, **102**(23): 8369-8374.

[6] China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, **108** (49): 19641-19646.

[7] Struwe L, Kadereit J W, Klackenberg J, et al. Gentianaceae, Systematics and Natural History [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 21-309.

[8] 何廷农,刘尚武,吴庆如.中国植物志(第62卷)[M].北京:科学出版社,1988.

[9] 钟国跃,古 锐,周华蓉,等.藏药"蒂达"的名称与品种考证[J].中国中药杂志,2009, **34**(23): 3139-3144.

[10] 杨永昌,何廷农,卢生莲,等.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[11] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. Plos Biology, 2005, **3** (12): 2229-2238.

[12] Doyle J J, Doyle J L. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue: the CTAB method [J]. Phytochemical Bulletin, 1987(19): 11-15.

[13] Fay M F, Swensen S M, Chase M W. Taxonomic affinities of Medusagyne oppositifolia (Medusagynaceae) [J]. Kew Bulletin, 1997, **52**(1): 111-120.

[14] Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou L W, et al. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbc*L, atpB, and *mat*K DNA sequences [J]. American Journal of Botany, 2002, **89**(1): 132-144.

[15] Tate J A, Simpson B B. Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. Systematic Botany, 2003, **28**(4): 723-737.

[16] Sang T, Crawford D, Stuessy T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae) [J]. American Journal of Botany, 1997, **84** (8): 1120-1136.

[17] Wen J, Zimmer E A. Phylogeny and Biogeography of Panax L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, **6**(2): 167-177.

[18] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, **23**(21): 2947-2948.

[19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, **28** (10): 2731-2739.

[20] R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [EB/OL]. http://www.R-project.org/. 2013.

[21] Yang F S, Wang X Q, Hong D Y. Unexpected high divergence in nrDNA ITS and extensive parallelism in floral morphology of Pedicularis (Orobanchaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2003(240): 91-105.

[22] Zhang X L, Wang Y J, Ge X J, et al. Molecular phylogeny and biogeography of Gentiana sect. Cruciata (Gentianaceae) based on four chloroplast DNA datasets [J]. Taxon, 2009, **58**(3): 862-870.

DNA barcoding of plants of Swertiinae

SUN Yao[1,2], XI Houcheng[1,2], XUE Chunying[2]

(1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;
2. Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201)

Abstract: The identification of plants of subtribe Swertiinae (Gentianaceae) holds importance in that many plants of Swertiinae are used as material for Tibetan medicine "Dida" (Zangyinchen). In order to provide accurate identification of these plants, we evaluate the performance of 4 candidate barcodes (nuclear ITS, chloroplast *rbc*L、*mat*K and *trn*H-*psb*A) in 50 individuals of 25 species of Swertiinae. The result shows that ITS not only perform best (80%) among 4 individual barcode; any barcode used in combination with ITS receive 100% species identification rate. Take the high discrimination power of *mat*K+ITS in seed plants into consideration, we recommend *mat*K+ITS combination as the standard barcode combination for plants of Swertiinae.

Key words: DNA barcoing; Swertiinae; *trn*H-*psb*A; ITS; *mat*K; *rbc*L

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net