

• 药材与资源 •

基于 DNA 条形码的玉叶金花属植物鉴定研究

龚 维¹, 陈 滢², 刘婉楨¹, 邓小芳³, 涂铁要^{4*}

1. 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642

2. 福建农林大学益虫研究所, 福建 福州 350002

3. 国家林业局管理干部学院, 北京 102600

4. 中国科学院华南植物园 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广东 广州 510650

摘要: 目的 利用 DNA 条形码进行玉叶金花属植物的分子鉴定。方法 对玉叶金花属 20 种、89 份个体进行叶绿体片段 *rbcL*、*matK* 和 *trnH-psbA* 以及核基因片段 ITS 的 PCR 扩增和测序, 计算种内和种间 Kimura 2-parameter (K2-P) 遗传距离, 利用序列相似性法和邻接法进行单一片段、核心片段、组合片段以及 ITS2 片段的分析。结果 单一片段分析结果表明玉叶金花属种间遗传距离 (0.002~0.012) 明显大于种内遗传距离 (0.000 3~0.000 7)。*trnH-psbA* 扩增率最低, ITS2 片段的分辨率最高, 其次是 *matK* 和 ITS 片段, *rbcL* 片段的分辨率最低。片段组合后的分辨率明显提高, 基于序列相似性法和邻接法, *matK+rbcL+ITS* 和 *matK+rbcL+trnH-psbA+ITS* 的分辨率相当, 且比其他片段组的分辨率更高, 分别为 77% 和 75%, 成功鉴定了 15 个近缘类群, 包括 2 个药用种类广西玉叶金花和藕花。结论 鉴于 *trnH-psbA* 扩增率较低, 建议 *matK+rbcL+ITS* 作为玉叶金花属物种鉴定的 DNA 条形码, 并作为其药用种类的分子鉴定工具。

关键词: 玉叶金花属; DNA 条形码; 物种鉴定; *matK*; *trnH-psbA*; *rbcL*; ITS; ITS2

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)05-0727-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.019

Identification of plants in *Mussaenda* L. based on DNA barcodingGONG-Wei¹, CHEN-Shi², LIU Wan-zhen¹, DENG Xiao-fang³, TU Tie-yao⁴

1. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2. Institute of Beneficial Insects, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. Institute of Cadre, State Academy of Forestry Administration, Beijing 102600, China

4. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Abstract: Objective This study aims at developing fast and accurate species identification methods for the plants of *Mussaenda* L.

Methods In the present study, DNA barcoding analysis was carried out on 89 individuals representing 20 species of *Mussaenda* in order to evaluate the performance of the four candidate barcoding loci (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, and ITS) and ITS2 region. Based on sequence similarity and Neighbor-joining (NJ) tree reconstruction, we detected inter- and intra-specific genetic distances using Kimura 2-parameter (K2P). **Results** Inter-specific genetic distance of species in *Mussaenda* was significantly higher than intra-specific genetic distance. The region of ITS2 showed the highest discrimination power among the independent sequences. Comparably high species discrimination power was also revealed by the *matK* and ITS data set. The candidate barcode of *rbcL* displayed the lowest identification rate among the others. However, each individual candidate barcode demonstrated significantly lower discrimination power than the barcode of combined data set. Comparable discrimination power was revealed between the two barcodes of combined sequences *matK+rbcL+ITS* and *matK+rbcL+trnH-psbA+ITS*, which showed the values around 77% and 75% based on sequence similarity and NJ tree method. Totally 15 species were identified based on NJ analysis of *matK+rbcL+ITS*.

Conclusion Consequently, the combined sequence of *matK+rbcL+ITS* provides an effective and fast tool for the identification and authentication of medicinal plant species in the genus *Mussaenda* L.

Key words: *Mussaenda* L.; DNA barcoding; species identification; *matK*; *trnH-psbA*; *rbcL*; ITS; ITS2

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31300174); 教育部博士点基金项目 (20124404120014)

作者简介: 龚 维 (1979—), 女, 副研究员, 研究方向为植物学。E-mail: wgong@scau.edu.cn

*通信作者 涂铁要 (1979—), 男, 副研究员, 研究方向为植物学。E-mail: tutieyao@scbg.ac.cn

玉叶金花属 *Mussaenda* L. 隶属于茜草科 (Rubiaceae), 本属植物为攀援灌木或藤本。玉叶金花属, 全世界约 120 种, 分布于热带亚洲、非洲及太平洋诸岛, 我国产 28 种, 1 变种^[1]。该属植物地理分布范围广, 形态变异大, 部分类群地理分布区重叠, 近缘类群难以区别。因此, 利用形态学的方法进行物种鉴别存在一定困难。该属植物具有较高的药用价值。据《中华本草》和《中药大辞典》记载以及相关研究报告, 玉叶金花 *Mussaenda pubescens* W. T. Aiton、广西玉叶金花 *M. kwangsiensis* H. L. Li 和 鸸花 *M. shikokiana* H. Lévl 等含有萜类、三萜皂苷类成分, 其干燥茎、根具有清热解暑、凉血、解毒的功效, 可用于治疗感冒、中暑和呼吸道疾病^[2-5]。然而, 由于该属形态鉴定困难, 野生资源受到威胁, 一些非药用种类常被作为替代品, 降低了其药用价值^[6]。前人已对该属植物进行了分类学研究, 但是关于该属植物的分子鉴定研究目前尚未见报道。

随着分子生物学技术的发展, DNA 条形码 (DNA barcoding) 为植物准确、有效地鉴定提供了更为方便快捷的方法。该技术运用一个或多个 DNA 片段进行物种鉴定^[7], 结果准确率高、重复率高, 不受环境、物种等因素限制, 方法通用性强。CBOL Plant Working Group^[8]建议叶绿体片段 *rbcL* 和 *matK* 组合作为陆生植物的核心 DNA 条形码, 并提出将 *trnH-psbA* 和核基因 ITS 作为 DNA 条形码候选片段^[9-10]。以上条形码片段在种间及种下具有较快进化速率, 变异程度较高, 适用于近缘种及种下物种鉴定^[11]。在药用植物条形码研究中, 大量研究表明 ITS2 片段在中药材鉴定中具有重要价值, 是药用植物鉴定的有效工具^[12-15]。同时, 以上各片段均已成功应用于茜草科植物的 DNA 条形码研究^[13,16-17]。基于此, 本研究将核心条形码片段 *rbcL* 和 *matK*、候选条形码片段 *trnH-psbA* 和 ITS 以及 ITS2 片段相结合, 对玉叶金花属植物进行 DNA 条形码物种鉴定研究, 并为该属药用植物种类的鉴定提供初步的分子证据和鉴定工具。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究一共包括玉叶金花属 20 个种、89 份个体, 每个种至少包括 2 个个体。由中国科学院华南植物园标本馆张奠湘研究员鉴定为贡山玉叶金花 *Mussaenda treutleri* Stapf、展枝玉叶金花 *Mussaenda divaricate* Hutchins.、疏花玉叶金花 *Mussaenda laxiflora* Hutchins.、短裂玉叶金花 *Mussaenda breviloba* S.

Moore、大叶玉叶金花 *Mussaenda macrophylla* Wall.、狭瓣玉叶金花 *Mussaenda lancipetala* X. F. Deng & D. X. Zhang、红毛玉叶金花 *Mussaenda hossei* Craib、多脉玉叶金花 *Mussaenda multinervis* C. Y. Wu ex Hsue et H. Wu、洋玉叶金花 *Mussaenda frondosa* Linn.、粗毛玉叶金花 *Mussaenda hirsutulata* Miq.、海南玉叶金花 *Mussaenda hainanensis* Merr.、广东玉叶金花 *Mussaenda kwangtungensis* Li、玉叶金花玉叶金花原变型 *Mussaenda pubescens* W. T. Ait. f. *pubescens*、白花玉叶金花 *Mussaenda pubescens* W. T. Ait. f. var. *alba* X. F. Deng et D. X. Zhang、仁昌玉叶金花 *Mussaenda chingii* Y. C. Wu ex Hsue et H. Wu、鸸花 *M. shikokiana* H. Lévl、壮丽玉叶金花 *Mussaenda antiloga* Chun et Ko、长瓣玉叶金花 *Mussaenda longipetala* H. L. Li、单裂玉叶金花 *Mussaenda simpliciloba* Hand. -Mazz.、广西玉叶金花 *Mussaenda kwangsiensis* Li、粉纸扇 *Mussaenda philippica* A. Rich. cv. Queen Sirikit、裂果金花 *Schizomussaenda henryi* (Hutch.) X. F. Deng & D. X. Zhang、假玉叶金花 *Pseudomussaenda flava* Verdc.。其中药用种类为玉叶金花、白花玉叶金花、广西玉叶金花和鸸花, 其他种类的药用价值目前尚不明确, 以假玉叶金花和裂果金花作为外类群。在有多个居群材料的情况下, 尽可能选取来自不同居群的样品, 以涵盖物种内部的遗传变异。居群样品采自广东、广西、云南、四川、海南等地, 全部凭证标本均保存在华南植物园标本馆 (IBSC)。采集植物新鲜叶片, 经硅胶快速干燥后保存。样品信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、片段扩增和测序 硅胶干燥叶片采用改良 CTAB 法提取总 DNA。选用 4 个片段 (*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 和 ITS) 的引物^[18-25]进行 PCR 扩增。各片段引物信息见表 2。PCR 反应用 50 μ L 体系, 其中基因组 DNA 50 ng, 10 \times PCR 缓冲液, 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 μ mol/L dNTPs, 引物各 0.2 μ mol/L, 以及 Takara (大连宝生物工程有限公司) 的 PrimeStar Taq 酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min, 接着是 30 个循环反应, 包括 94 $^{\circ}C$ 预变性 1 min, 54 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s, 循环反应完成后, 72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min, 最后 10 $^{\circ}C$ 保存。PCR 反应结束后, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离、检测, 同时电泳 3 μ L 的 Maker。条带清晰、单一的扩增产物直接送上海英潍捷基生物工程技术服务有限公司进行 PCR 产物直接测序。为保证序列的可靠性, 所有片段都进行双向测序。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	样本	标本号	采集地	编号	样本	标本号	采集地
1	贡山玉叶金花	Deng X.F.340	云南省福贡	47	玉叶金花原变型	Duan T.T.631	广东省茂名市电白县麻岗镇热水乡
2		Deng X.F.347	云南省福贡	48		Gong W.47	广东省象头山
3	展枝玉叶金花	Duan T.T.417	四川省宜宾	49		Gong W.76	广东省广州市龙洞宵窝
4		Duan T.T.418	四川省宜宾	50		Gong W.51	广东省东莞市观音山
5		Duan T.T.419	四川省宜宾	51		Gong W.77	江西省大余
6	疏花玉叶金花	Deng X.F.361	云南省金平	52		Gong W.78	江西省会昌
7		Duan T.T.436	云南省屏边	53		Gong W.83	香港大学
8		Duan T.T.432	云南省屏边	54	白花玉叶金花	Gong W.81	福建省上杭
9		Duan T.T.433	云南省屏边	55		Gong W.49	广东省东莞市观音山
10	短裂玉叶金花	Duan T.T.579	云南省勐海	56		Gong W.82	广东省深圳市梧桐山
11		Duan T.T.580	云南省勐海	57		Gong W.79	江西省大余
12		Duan T.T.581	云南省勐海	58		Gong W.80	江西省吉安
13		Duan T.T.582	云南省勐海	59		Deng X.F.184	广东省广州市
14		Deng X.F.423	云南省勐海	60	仁昌玉叶金花	Deng X.F.236	广西壮族自治区罗城
15		Deng X.F.387	云南省思茅	61		Duan T.T.673-1	广西壮族自治区罗城
16	大叶玉叶金花	Deng X.F.408	云南省勐仑	62		Duan T.T.673-2	广西壮族自治区罗城
17		Deng X.F.401	云南省版纳	63		Duan T.T.673-3	广西壮族自治区罗城
18		Duan T.T.471	云南省绿春	64		Duan T.T.673-5	广西壮族自治区罗城
19	狭瓣玉叶金花	Duan T.T.515	云南省绿春	65		Duan T.T.673-4	广西壮族自治区罗城
20		Duan T.T.516	云南省绿春	66	藕花	Deng X.F.215	广西壮族自治区金秀
21		Duan T.T.517	云南省绿春	67		Chen S.52	江西省井冈山
22		Duan T.T.518	云南省绿春	68		Chen S.78-1	广西壮族自治区七分山
23		Deng X.F.410	云南省勐腊	69		Chen S.78-2	广西壮族自治区七分山
24		Deng X.F.457	云南省勐腊	70		Chen S.78-3	广西壮族自治区七分山
25	红毛玉叶金花	Duan T.T.546	云南勐腊磨憨苗寨	71		Chen S.78-4	广西壮族自治区七分山
26		Deng X.F.416	云南省勐腊至勐仑途中	72		Chen S.78-5	广西壮族自治区七分山
27		Duan T.T.547	云南勐腊磨憨苗寨	73	壮丽玉叶金花	Duan T.T.75	海南省乐东县尖峰岭
28		Duan T.T.548	云南勐腊磨憨苗寨	74		Duan T.T.78	海南省乐东县尖峰岭
29	多脉玉叶金花	Duan T.T.464	云南省绿春	75	长瓣玉叶金花	Duan T.T.180	广西壮族自治区那坡县
30		Duan T.T.466	云南省绿春	76		Duan T.T.181	广西壮族自治区那坡县
31		Duan T.T.467	云南省绿春	77		Duan T.T.182	广西壮族自治区那坡县
32		Duan T.T.468	云南省绿春	78	单裂玉叶金花	Duan T.T.421	四川省凉山德昌县蒲坝
33		Deng X.F.418	云南省勐腊	79		Duan T.T.422	四川省凉山德昌县蒲坝
34		Deng X.F.444	云南省勐腊	80		Duan T.T.423	四川省凉山德昌县蒲坝
35	洋玉叶金花	Deng X.F.397	云南省勐腊	81		Duan T.T.424	四川省凉山德昌县蒲坝
36		Deng X.F.402	云南省版纳	82		Duan T.T.425	四川省凉山德昌县蒲坝
37	粗毛玉叶金花	Duan T.T.66	海南省乐东县尖峰岭	83	广西玉叶金花	Duan T.T.197	广西壮族自治区凌云县玉洪乡
38		Duan T.T.67	海南省乐东县尖峰岭	84		Duan T.T.198	广西壮族自治区凌云县玉洪乡
39		Duan T.T.68	海南省乐东县尖峰岭	85		Duan T.T.199	广西壮族自治区凌云县玉洪乡
40		Duan T.T.69	海南省乐东县尖峰岭	86		Duan T.T.200	广西壮族自治区凌云县玉洪乡
41	海南玉叶金花	Duan T.T.70	海南省霸王岭	87		Duan T.T.220	广西壮族自治区凌云县玉洪乡
42		Duan T.T.72	海南省霸王岭	88	粉纸扇	Deng X.F.463	云南省版纳植物园
43		Duan T.T.73	海南省霸王岭	89		Deng X.F.248	海南省万宁市兴隆热带花园
44	广东玉叶金花	Duan T.T.660	广东省台山市北峰山林场	90	裂果金花	Deng X.F.409	云南省勐腊
45		Gong W.50	广东省东莞市观音山	91	假玉叶金花	YS 438	广东省广州市华南植物园温室栽培
46		Zhang D.X.1053	广东省新会古兜山				

表 2 4 个条形码片段引物信息

Table 2 Primers information of four barcode fragment

条形码片段	引物名称	序列 (5'-3')
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa_f</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
	724R	TCGCATGTACTGCAGTAGC
<i>matK</i>	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC
	XF	TAATTTACGATCAATTCATTC
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA</i> 3	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	<i>trnH</i> -05	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC
ITS	ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS 5HP	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
	ITS-NNc18s10	AGGAGAAGTCGTAACAAG
	ITS-C26A	GTTTCTTTTCTCCGCT

1.2.2 数据处理和分析 利用 Sequencher 4.1.4 (Gene Code Cop.) 软件对原始序列数据进行检查和拼接, 并使用 Se-AL 软件^[26]进行人工校正。基于 4 个片段, 计算物种间和物种内的 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离。基于 K2P 模型, 对单一片段和片段组合条形码, 使用 MEGA 6.0 软件, 构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 树, 并通过 1 000 次重复的 bootstrap 值来确定每个分支的支持率。利用 TaxonDNA 软件, 确定遗传距离 95% 的阈值, 并将此阈值标定为种内变异的界限。通过 “best match” “best close match” “All species barcodes” 功能, 对

单一片段条形码和片段组合条形码进行序列相似性匹配分析, 将所有样品的序列均准确鉴定的物种计入严格匹配的序列中^[27]。

2 结果与分析

2.1 序列信息和种内/种间变异分析

玉叶金花属 4 个片段的扩增情况见表 3。除 *trnH-psbA* 的扩增成功率为 95.60% 外, 其他 3 个片段的 PCR 成功率均为 100%。在 *trnH-psbA* 片段扩增中, 红毛玉叶金花和多脉玉叶金花各有 2 份个体扩增失败。*rbcL* 和 *matK* 的测序结果较好, 序列不存在插入/缺失位点, 序列比对最容易。ITS 存在 14 个位点的插入/缺失, 序列长度为 750~755 bp, 分别为 ITS1、5.8 S rRNA 和 ITS2 区域。其中, ITS2 长度为 262~266 bp, 存在 6 个位点的插入/缺失。*trnH-psbA* 片段含有单拷贝碱基 A/T 重复, 在测序中表现为 poly 后双峰, 且包括 29 个插入/缺失位点, 片段长度为 241~285 bp。该片段序列比对具有一定困难, 结果需进一步进行手工校对。ITS 片段变异位点和信息位点数最多 (47 个和 31 个), 其中, ITS2 区域含有变异位点和信息位点数分别为 35 和 20 个。*rbcL* 的变异位点和信息位点均最少 (10 个和 5 个)。基于各单一片段的分析结果, 玉叶金花属 20 种植物的种内遗传距离为 0.000 3~0.000 7, 种间遗传距离 (0.002~0.012) 大于种内遗传距离。

表 3 各片段的 PCR 扩增和测序成功率及各自的序列信息

Table 3 PCR Amplification, sequencing successful rates, and sequence characteristics of each fragment

片段	候选条形码片段长度/bp	比对后长度/bp	获得的样品数	PCR 扩增及测序成功率/%	核苷酸变异数/信息位点数	种内遗传距离均值	种间遗传距离均值
<i>rbcL</i>	554	554	89	100.00	10/5	0.000 5	0.002
<i>matK</i>	794	794	89	100.00	23/21	0.000 6	0.004
<i>trnH-psbA</i>	241~285	325	85	95.51	12/12	0.000 3	0.012
ITS	750~755	765	89	100.00	47/31	0.000 7	0.007
ITS2	262~266	268	89	100.00	35/20	0.000 4	0.008

2.2 玉叶金花属近缘类群的鉴定

对单一片段和组合片段的条形码, 利用序列相似性法和 NJ 法对玉叶金花属植物进行物种鉴定。在单一片段中, ITS2 的分辨率最高, *matK* 和 ITS 片段的分辨率比 *rbcL* 和 *trnH-psbA* 高。在组合片段中, *matK+rbcL* 的分辨率比单一叶绿体片段高, *matK+rbcL+trnH-psbA* 的分辨率低于 *matK+rbcL+ITS*。*matK+rbcL+ITS* 与 *matK+rbcL+trnH-psbA+ITS* 的分辨率相当, 两者序列相似性法的分辨率为 77%,

NJ 树的分辨率均为 75%。ITS2 参与的组合片段中, 其分辨率均低于 ITS 参与的组合片段。此外, 基于 *rbcL*、ITS、*matK+rbcL*、*matK+rbcL+ITS* 和 *matK+rbcL+trnH-psbA+ITS* 的各条形码, 序列相似性法比 NJ 法具有更高的分辨率。

由于 *trnH-psbA* 有 2 份个体 PCR 扩增失败, 本研究进一步利用 *matK+rbcL+ITS* 进行玉叶金花属植物条形码分析。基于该组合片段的 NJ 树共成功鉴定了 15 个种, 分辨率为 75%, 其中包括 2 个药

用种类广西玉叶金花和繸花 (图 1)。未能成功鉴定的共 5 个种, 包括 2 个药用种类玉叶金花和白花玉叶金花以及 3 个非药用种类广东玉叶金花、海南玉叶金花和疏花玉叶金花。除广西玉叶金花的支持率

为 52%, 其他鉴定成功种类的支持率均在 60% 以上。此外, 狭域分布的种类大多被成功鉴定。例如, 5 个云南特有种贡山玉叶金花、狭瓣玉叶金花、红毛玉叶金花、多脉玉叶金花和壮丽玉叶金花, 1 个海南特有种洋玉叶金花, 以及 1 个广西特有种仁昌玉叶金花均被成功鉴定。从 NJ 树上来看, 广东玉叶金花、海南玉叶金花、玉叶金花和白花玉叶金花聚在一支, 与壮丽玉叶金花和广西玉叶金花遗传距离较近。

3 讨论

DNA 条形码是用于区分植物近缘类群、鉴定药用植物的有效手段。植物叶绿体量丰富, 即使从植物标本中提取 DNA 也能成功用于叶绿体片段扩增。叶绿体基因组单亲遗传, 避免了基因重组, 使其成为了植物 DNA 条形码的主要来源^[9,28]。然而, 仅仅依靠叶绿体基因组的信息尚不足以解决物种鉴定问题, 叶绿体基因组与核基因组片段相组合的条形码更具有物种鉴别能力^[18,29-30]。本研究中, 无论是利用序列相似性法还是 NJ 树法, 单一片段条形码的分辨率均 $\leq 50\%$, 而片段组合的条形码分辨率明显提高 (表 3)。基于本研究, 核心条形码 *matK+rbcL* 比单一叶绿体片段条形码具有更高的分辨率, 但仍不足以进行物种鉴定研究。在核心条形码基础上, 增加候选条形码 ITS 片段比 *trnH-psbA* 片段可获得更高的分辨率 (表 3)。ITS2 被证明为药用植物有效的 DNA 条形码, 本研究结果也表明 ITS2 比 ITS 具有更高的分辨率。但是, ITS2 单一片段条形码尚不足以解决玉叶金花属物种鉴定的问题 (表 3)。同时, 在组合片段中, ITS2 参与组合的条形码, 其分辨率低于 ITS 参与组合的条形码。因此, 建议仍利用 ITS 作为候选条形码。基于序列相似性法和 NJ 法, *matK+rbcL+ITS* 和 *matK+rbcL+trnH-psbA+ITS* 2 种组合的结果相当, 但是 *trnH-psbA* 的 PCR 扩增率较低。基于以上原因, 建议 PCR 扩增容易、成功率高、分辨率高的 *matK+rbcL+ITS* 片段组合作为玉叶金花属近缘类群物种鉴定的 DNA 条形码。

玉叶金花属植物具有较高的药用价值和经济价值^[4]。利用该属植物开发、生产的中药产品也已在民间流传, 如源吉林甘茶、玉叶清火片、玉叶解毒颗粒、玉叶解毒糖浆、三金感冒片和千金茶等^[6]。根据分类学和生药学研究报道, 该属植物长期以来存在形态鉴定困难、药用种类难以鉴定等问题, 对其药用植物的利用和开发造成影响。本研究成功鉴定了 2 个常见药用种类广西玉叶金花和繸花, 在 NJ 树上明显区别于其他近缘类群。然而, 2 个常见药用种类玉叶金

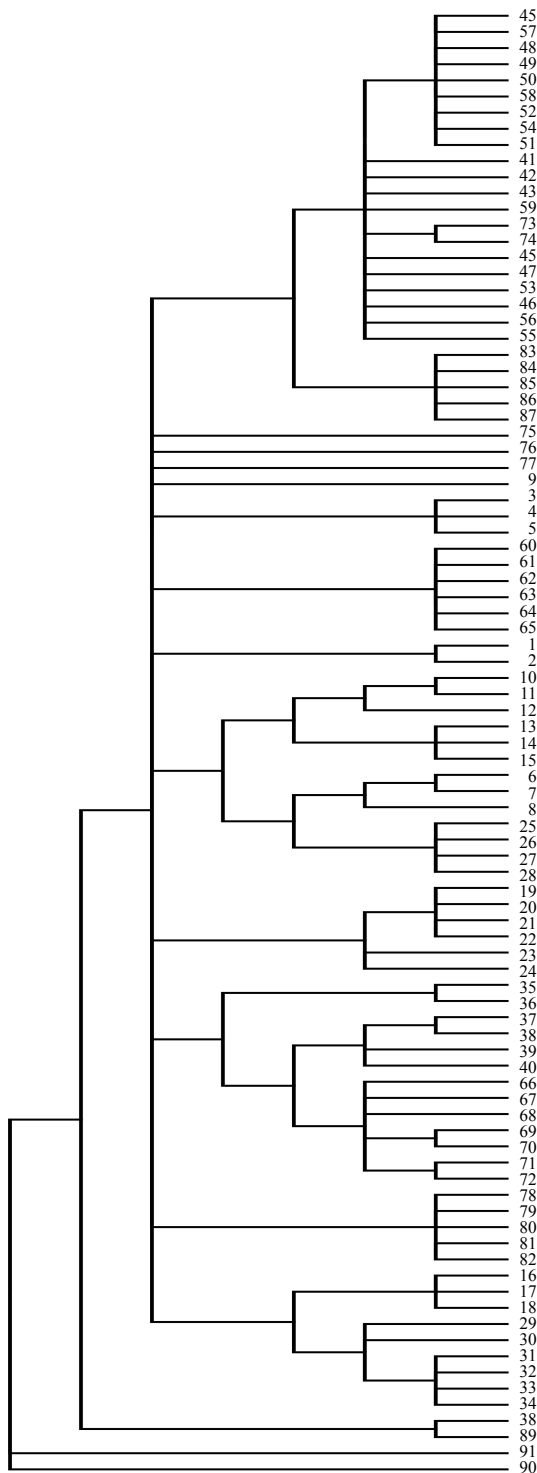


图 1 基于 *matK+rbcL+ITS* 条形码数据的玉叶金花属 NJ 树
Fig. 1 Neighbor-joining tree based on *matK+rbcL+ITS* combined for species of *Mussaenda L.*

花和白花玉叶金花的个体与广东玉叶金花和海南玉叶金花聚在一起,无法成功鉴定。这 4 个种地理分布区域广,分布区重叠,在形态学上难以区分,可能存在种间杂交或基因渐渗,建议利用更多片段组合的条形码对其进行更加深入的研究和分析。此外,DNA 条形码在鉴定云南、海南和广西的玉叶金花属植物中具有明显优势,共有 7 个地区性特有种被成功鉴定。这些地区是黎药和瑶药的重要产地,但这些地区的玉叶金花属植物药用价值尚不明确,本研究结果将在其药用植物的开发和利用中具备一定的应用价值。

参考文献

- [1] 邓小芳. 中国玉叶金花属(茜草科)分类修订及繁育系统进化的研究 [D]. 广州: 中国科学院华南植物园, 2007.
- [2] 张颖, 李嘉, 姜平川. 玉叶金花化学成分研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 278-281.
- [3] 廖月葵, 林安平, 辛宁, 等. 玉叶金花的生药鉴定 [J]. 中药材, 2000, 23(4): 195-197.
- [4] 林雀跃, 丘明明, 张荣林. 广西“玉叶金花属”植物八种玉叶金花的生药学研究 [J]. 中国药师, 2013(9): 1313-1316.
- [5] Jayasinghe U L B, Jayasooriya C P, Bandara B M R, et al. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73(5): 424-427.
- [6] 邱明明, 韦家福, 黄清泉, 等. 广西玉叶金花属植物资源调查研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 2(21): 75-77.
- [7] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 270(Spp1): S96-S99.
- [8] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [9] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philos T Roy Soc B*, 2005, 360(1462): 1889-1895.
- [10] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 8369-8374.
- [11] Han J P, Song J Y, Liu C, et al. Identification of *Cistanche* species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(1): 126-130.
- [12] 李妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [13] 李栎, 肖憬, 苏振宇, 等. ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 43(13): 1814-1818.
- [14] Che S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [15] Gao T, Yao H, Song J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *Ethnopharmacology*, 2010, 130(6): 116-121.
- [16] 陈倩. 马鞭草科和茜草科植物 DNA 条形码研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [17] 李栎, 肖憬, 苏振宇, 等. ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1814-1818.
- [18] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [19] Fay M F, Swensen S M, Chase M W. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae) [J]. *Kew Bull*, 1997, 52(1): 111-120.
- [20] Ford C S, Ayres K L, Toomey N, et al. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants [J]. *Bot J Linn Soc*, 2009, 159(1): 1-11.
- [21] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(8): 1120-1136.
- [22] Tate J A, Simpson B B. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. *Syst Bot*, 2003, 28(4): 723-737.
- [23] Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. *In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [24] Hershkovitz M A, Zimmer E A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences [J]. *Nucl Acids Res*, 1996, 24(15): 2857-2867.
- [25] Wen J, Zimmer E A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 6(2): 167-177.
- [26] Rambaut A. Se-Al [M]. Sequence alignment editor. Version 2.0a11. University of Oxford, UK, 2002.
- [27] Meier R, Shiyang K, Vaidya G, et al. DNA barcoding and taxonomy in *Diptera*: a tale of high intraspecific variability and low identification success [J]. *Syst Biol*, 2006, 55(5): 715-728.
- [28] Cowan R S, Chase M W, Kress W J, et al. 300, 000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants [J]. *Taxon*, 2006, 55(3): 611-616.
- [29] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 295-299.
- [30] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2802.