

豆蔻属药用植物 DNA 条形码鉴定研究*

□石林春** 宋经元 陈士林 姚 辉 韩建萍**

(中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院)

摘 要:目的:针对鉴定十分困难的豆蔻属药用植物筛选适合其鉴定的 DNA 条形码序列,探索豆蔻属药用植物鉴定新方法。方法:对该属植物 36 个物种,46 个样本的 8 个候选条形码序列 (psbA-trnH, matK, rbcL, psbK-psbI, rpoB, atpB-rbcL, ITS, ITS2)进行 PCR 扩增、测序和序列分析,我们采用了 4 种方法对于数据进行分析,应用 Mega4.1 计算不同序列的种间和种内遗传距离 (K-2P);用 Wilcoxon 秩和检验比较不同序列的变异性;用 Taxon DNA 软件评估“Barcoding Gap”;用 Blast、Distance 方法检验物种鉴定的可靠性。结果:ITS2 和 ITS 序列变异显著,物种水平鉴定成功率达 100%,其它 6 个候选序列 (psbA-trnH, matK, rbcL, psbK-psbI, rpoB, atpB-rbcL)不能有效鉴定豆蔻属物种。结论:本文推荐将 ITS2 和 ITS 作为豆蔻属药用植物潜在的 DNA 条形码序列,并依此建立该属药用植物的 DNA 条形码鉴定方法。

关键词:豆蔻属 DNA 条形码 鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.033

豆蔻属最早为瑞典植物学家林奈所确立 (1753),是姜科的第二大属,在全球约 150 余种,分布于亚洲、大洋洲的热带地区,我国有 24 种,2 变种,产于福建、广东、广西、贵州、云南、西藏等省区,以“花序生于地面上,头状或卵状,无总苞,小苞片通常管状;花冠管长度中等,顶端不呈直角弯曲”等特征与姜科其它属植物相区分(《中国植物志》)。本属植物大多可作香料或药用,能祛风止痛、健胃消食。其中被 2005 版《中国药典》收录的有 6 个种,分别是:爪哇白豆蔻 *A. compactum*、白豆蔻 *A. kravanh*、海南砂仁 *A. longiligulare*、草果 *A. tsao-ko*、阳春砂仁 *A.*

villosum、绿壳砂仁 *A. villosum* var. *xanthioides*,为药典收载物种较多的一个属。豆蔻属植物的形态鉴定比较困难^[1],属下等级的划分也一直存在争议,例如,《中国植物志》依据药隔附属体 2-3 裂或全缘分为草果亚属和豆蔻亚属,Xia 等^[2]用 ITS 及 matK 序列对该属植物的系统发育研究认为,豆蔻属可分为草果组、砂仁组及九刺豆蔻组 3 个组。

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是利用一段短的标准 DNA 序列对物种进行鉴定的新方法^[3-5],具有快速、准确、便捷等特点,在药用植物的鉴定和濒危物种的保护中具有广阔的应用前景^[6]。目前,基于线粒体细胞色素 C 氧化亚基 (Cytochrome C Oxidase CO I) 基因的动物条形码鉴定已经取得成功,但是在植物

收稿日期: 2010-06-04

修回日期: 2010-06-13

* 教育部博士点新教师基金 (200800231066): 姜科药用植物 DNA 序列数据库构建及鉴定研究,负责人:韩建萍。

** 联系人:石林春,博士研究生,主要研究方向:分子生物学,Tel: 010-62899925, E-mail: lcshi@implad.ac.cn; 韩建萍,副研究员,主要研究方向:中药资源学,Tel: 010-62899727, E-mail: jphan@implad.ac.cn。

的大多数类群中 CO I 基因进化缓慢、突变率低^[7],近年来,不同的学者提出了不同的序列或序列组合用于植物的 DNA 条形码鉴定研究^[8-12],psbA-trnH 基因间隔区虽然具有足够的种间变异,但在不同的植物类群中序列长度和种内变异较大^[8],给后期的数据分析造成困难^[12]。Renaud Lahaye^[12]推荐的 matK 序列尽管在兰科植物中有丰富的种间变异、合适的种内变异以及很高的扩增和物种鉴定成功率,但缺乏其它科属的实验支持。nr ITS 序列虽然具有足够的种间变异和适当的种内变异,但其应用受到扩增效率限制^[8],陈士林课题组在大样本量的研究基础上首次提出 ITS2 序列做为候选条形码鉴定药用植物及其近缘种^[27-32]。CBOL (植物条形码工作组)提出应用 matK+rbcL 作为通用的条形码,但这种组合并不能有效鉴定近缘种(约 70%的鉴定效率)^[33]。植物界始终没有找到通用的条形码序列,张金梅根据对芍药属的研究结果表明,针对一些属下物种的鉴定应分阶层寻找条形码序列^[34]。

本文通过对豆蔻属药用植物 36 个物种,46 个样本 8 个 (psbA-trnH, matK, rbcL, psbK-psbI, rpoB, atpB-rbcL, ITS, ITS2)候选条形码序列的分析比较,试图筛选适合于该属药用植物鉴定的潜在 DNA 条形码序列,为建立豆蔻属药用植物鉴定的新方法提供依据,同时为植物 DNA 条形码研究提供参考。

一、材料与方法

1. 材料

36 个物种,46 份豆蔻属样品分别采自广西植物园和华南植物园。新鲜叶片经硅胶干燥保存,原植物经中国医学科学院药用植物研究所林余霖老师鉴定。试验材料及登录号见表 1。

2. DNA 提取

取新鲜材料或硅胶干燥的叶子 0.03g,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., China)提取 DNA。

3. PCR 扩增

matK, psbK-psbI, atpB-rbcL 序列扩增所用引物及反应条件参考 Cuenoud^[14]、Lahaye^[12]和 Chiang^[15], ITS, rbcL, psbA-trnH 和 rpoB 序列扩增使用通用引物和反应条件, ITS2 引物及反应条件见^[27]。反应体系为:25μL 反应体积含 10×PCR buffer 2.5μL, 25mM MgCl₂ 2μL, 2.5mM dNTPs 2μL, Taq 酶 (SBS Genetech Co., China) 1.5U, 上游和下游引物 (2.5μM) 各 1.0μL

及模板 10~25ng, PCR 反应条件为:94℃ 5min, 94℃ 30sec, 56℃ 30sec, 72℃ 45sec, 40cycles; 72℃ 7min。

4. PCR 产物纯化及序列测定

从琼脂糖凝胶上切下扩增的目的 DNA 片段,用琼脂糖胶回收试剂盒 (AXYGEN)对目的片段进行回收,经纯化后作为测序反应的模板,PCR 反应的引物直接作为测序引物,用 ABI3730XL 进行测序。

5. DNA 序列数据分析

用 CodonCode Aligner 2.06 (CodonCode Co., Germany)进行序列校对拼接;用 CLUSTALX1.83 软件进行序列比对,用 Mega4.1 计算 K-2P 遗传距离,并采用 Meyer^[16]的方法计算种间和种内平均遗传距离,用 SPSS 16.0 进行 Wilcoxon 秩和检验,用 TaxonDNA^[25]软件评估“Barcoding Gap”,用 Blast 和 Distance 方法计算鉴定成功率^[17]。

二、结果

1. 序列分析

对所获得的 8 个序列进行序列分析,其中 matK、atpB-rbcL 序列较长,分别为 889bp 和 799bp,从目前的测序技术水平来看,PCR 产物直接测序存在一定的困难,新设计的 ITS2 引物所扩增得到的序列为 450bp 左右,ITS 为 600bp,序列长度比较理想。psbK-psbI 基因间隔区插入和缺失为 70bp,序列长度变异较大,不易于获得正确的序列比对,ITS2、ITS 序列的插入和缺失分别为 16bp 和 22bp,说明序列的变异大多来自点突变。序列的种间遗传距离(k-2P)比较和 Wilcoxon 秩和检验(见表 2)结果可以看出,序列变异大小依次是 ITS2(0.1369±0.0148)、ITS(0.1048±0.0078)、psbK-psbI (0.0339±0.0052)、atpB-rbcL (0.0146±0.0027)、matK (0.0130±0.0022)、psbA-trnH (0.0104±0.0035)、rpoB(0.0051±0.0021)、rbcL (0.0037±0.0015), ITS2、ITS 物种间序列差异显著。

从序列长度、序列插入和缺失、序列种间变异等因素综合考虑,ITS2、ITS 是比较理想的候选序列,序列长度合适,并且序列之间的变异大多数来自点突变,易于获得正确的序列比对和区分近缘物种。

2. “Barcoding Gap”和鉴定成功率评估

基于上文的分析,我们初步认为 ITS、ITS2 是比较理想的条形码序列,考虑到 Selvaraj^[18]曾推荐将 matK 作为整个姜科的条形码候选序列,另外, Renaud Lahaye^[11]曾用 matK 序列对兰科植物 1600 多个物种

表 1 样品采集表及 GenBank 登陆号

Species	ITS	ITS2	matK	atpB-rbcL	rbcL	psbK-psbI	rpoB	psbA-trnH
<i>A. angustipetalum</i>	AB097245.1	B097245.1						
<i>A. austrosinense</i>	AY351985.1	Y351985.1	Y352015.1					
<i>A. calyptratum</i>	AB097239.1	B097239.1						
<i>A. compactum</i>	AY351986.1 FJ972782	GQ118672 Y351986.1	Y352016.1	GQ118665	FJ972793	GQ118680	FJ972775	GQ118660
<i>A. coriaceum</i>	AB097240.1	B097240.1						
<i>A. coriandriodorum</i>	AY351987.1	Y351987.1	Y352017.1					
<i>A. dimorphum</i>	AB097244.1	B097244.1						
<i>A. durum</i>	AB097241.1	B097241.1						
<i>A. glabrum</i>	AF478721.1 AY351989.1	F478721.1 Y351989.1	F478821.1 Y352019.1					
<i>A. gyrolophos</i>	AB097242.1	B097242.1						
<i>A. kinabaluense</i>	AF414489.1	F414489.1						
<i>A. koenigii</i>	AY351991.1	Y351991.1	Y352021.1					
<i>A. kravanh</i>	FJ972779	GQ118669	FJ972783		FJ972790	GQ118677	FJ972772	GQ118657
<i>A. lappaceum</i>	AF414488.1	F414488.1						
<i>A. laxesquamosum</i>	AY351994.1	Y351994.1	Y352024.1					
<i>A. longiligulare</i>	FJ972780	GQ118670	FJ972784 GQ118673	GQ118663	FJ972791	GQ118678	FJ972773	GQ118658
<i>A. longiopetiolatum</i>	AF478722.1	F478722.1 Y769825.1	F478822.1					
<i>A. maximum</i>	AY351995.1	Y351995.1	Y352025.1					
<i>A. menglaense</i>	AY351996.1	Y351996.1	Y352026.1					
<i>A. oliganthum</i>	AB097243.1	B097243.1						
<i>A. paratsaoko</i>	AY351997.1	Y351997.1	Y352027.1					
<i>A. petaloideum</i>		Y769826.1						
<i>A. pierreanum</i>	AY769829.1	Y769829.1						
<i>A. propinquum</i>	AY351999.1	Y351999.1	Y352029.1					
<i>A. purpureorubrum</i>	AY352000.1	Y352000.1	Y352030.1					
<i>A. putrescens</i>	AY352002.1	Y352002.1	Y352032.1					
<i>A. quadratolaminare</i>	AY352003.1	Y352003.1	Y352033.1					
<i>A. queenslandicum</i>	AY352004.1	Y352004.1	Y352034.1					
<i>A. roseisquamosum</i>	AB097246.1	B097246.1						
<i>A. sericeum</i>	AY352005.1	Y352005.1	Y352035.1					
<i>A. somniculosum</i>	AB097247.1	B097247.1						
<i>A. subcapitatum</i>	AY352006.1	Y352006.1	Y352036.1					
<i>A. tsaoko</i>	AY352007.1 FJ972776	Y352007.1 GQ118666	FJ972785 Y352037.1	GQ118661	FJ972788	GQ118674	FJ972769	GQ118655
<i>A. uliginosum</i>	AY352008.1 AY769827.1	Y352008.1 Y769827.1	Y352038.1					
<i>A. villosum</i>	AF478724.1 AY352009.1 FJ972777 FJ972778	F478724.1 GQ118668 Y352009.1 Y769828.1	FJ972786 F478824.1 Y352039.1	GQ118662	FJ972789	GQ118675	FJ972770	GQ118656
<i>A. villosum</i> var. <i>xanthioides</i>	FJ972781	GQ118671	FJ972787	GQ118664	FJ972792	GQ118679	FJ972774	GQ118659

进行成功鉴定,而姜科和兰科都同属单子叶植物纲,因此下面我们对 *matK* 和 *ITS*、*ITS2* 一起进行“Bar-coding Gap”和鉴定成功率的评估比较。

(1)“Barcoding Gap”。

理想的 DNA 条形码序列其种间变异和种内变异应该有一个清晰的界限,即“Barcoding Gap”^[16]，“Bar-coding Gap”越大越有利于精确的区分和鉴定物种,尤其是对于未知样品物种的确认和未知物种分类位置的确定是必需的。根据 Taxon DNA 所做的种间与种内变异分布图可以看出(见图 1),*ITS2* 和 *ITS* 均有明显的“Barcoding Gap”,“Barcoding Gap”位置位于 2.5%~3.0%之间,*matK* 没有明显的“Barcoding Gap”,说明部分物种的种间变异和种内变异有重叠,这些发生重叠的物种无法用 *matK* 序列鉴定成功鉴定。

(2)鉴定成功率。

为了比较 *ITS*、*ITS2*、*matK* 在物种鉴定水平上的可靠性,我们采用 Howard^[17]所推荐的 Blast 和 Method 方法分别计算了这 3 个序列的鉴定成功率,结果表明,*ITS* 和 *ITS2* 均可以对豆蔻属 36 个物种所有样本进行准确的鉴定,鉴定

成功率为100%。而 *matK* 鉴定成功率 为 79% (Blast Method) 和 82.1% (Distance Method) 见表 3, 其中有 5 个样本无法准确鉴定,分别是:*A. maximum* (登录号: AY352025.1) 和 *A. purpureorubrum* (登录号:AY352030.1); *A. uliginosum* (登录号:AY352038.1) 和 *A. villosum* (登录号: AF478824.1)、*A. villosum* (登录号: AY352039.1)。

三、讨 论

豆蔻属是姜科比较重要的一

个属,该属的大多数植物都可作为药用,但其外部形态和内部结构存在高度的复杂性和多样性,依靠形态特征的传统鉴定和分类比较困难,依靠植物 DNA 序列信息的 DNA 条形码技术具有快速、精确和稳定性好等特点。本研究所筛选获得的 *ITS2*、*ITS* 序列均可以对该属植物的 36 个物种,46 个样本进行准确鉴定,对于建立该属药用植物鉴定新方法具有重要意义。

ITS 存在于大多数真核细胞中,由 *ITS1*、5.8S 和 *ITS2* rDNA 共 3 个部分组成,为 18S-26S 核糖体 DNA(nrDNA)的内转录间隔区。具有长度保守性和核苷酸高度变异性等特点,常用于不同分类阶元的系统进化研究,尤其是属水平或属以下水平的研究^[20],并被推荐为植物条形码研究的候选序列^[21],但其应用受到扩增效率低的限制^[8-9,11],至今没有找到适合于大多数类群的通用引物,Chase^[22]对 *ITS1*、*ITS2* 和 *ITS* 的比较研究表明:*ITS1*、*ITS2* 和 *ITS*,三者 在属和种水平均有较高的鉴定成功率,但 *ITS1*、*ITS2* 序列的序列长度只有 *ITS* 的 1/3,如果可以设计出适合的通用引物,

表 2 8 个候选条形码序列秩和检验

W+	W-	Inter Relative Ranks, n, P value	Result
<i>ITS2</i>	<i>ITS</i>	W+ = 176689.50, W- = 620.50, N = 595, p <= 9.666e-98	<i>ITS2</i> > <i>ITS</i>
<i>ITS2</i>	<i>matK</i>	W+ = 32131, W- = 0, N = 253, p <= 3.13e-43	<i>ITS2</i> > <i>matK</i>
<i>ITS2</i>	<i>psbA-trnH</i>	W+ = 120, W- = 0, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>ITS2</i> > <i>psbA-trnH</i>
<i>ITS2</i>	<i>rbcL</i>	W+ = 120, W- = 0, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>ITS2</i> > <i>rbcL</i>
<i>ITS2</i>	<i>psbK-psbI</i>	W+ = 114, W- = 6, N = 15, p <= 0.0008545	<i>ITS2</i> > <i>psbK-psbI</i>
<i>ITS2</i>	<i>rpoB</i>	W+ = 120, W- = 0, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>ITS2</i> > <i>rpoB</i>
<i>ITS2</i>	<i>atpB-rbcL</i>	W+ = 55, W- = 0, N = 10, p <= 0.001953	<i>ITS2</i> > <i>atpB-rbcL</i>
<i>ITS</i>	<i>matK</i>	W+ = 32131, W- = 0, N = 253, p <= 3.13e-43	<i>ITS</i> > <i>matK</i>
<i>ITS</i>	<i>psbA-trnH</i>	W+ = 120, W- = 0, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>ITS</i> > <i>psbA-trnH</i>
<i>ITS</i>	<i>psbK-psbI</i>	W+ = 113, W- = 7, N = 15, p <= 0.00116	<i>ITS</i> > <i>psbK-psbI</i>
<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	W+ = 95, W- = 25, N = 15, p <= 0.04791	<i>ITS</i> > <i>rbcL</i>
<i>ITS</i>	<i>rpoB</i>	W+ = 120, W- = 0, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>ITS</i> > <i>rpoB</i>
<i>ITS</i>	<i>atpB-rbcL</i>	W+ = 55, W- = 0, N = 10, p <= 0.001953	<i>ITS</i> > <i>atpB-rbcL</i>
<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	W+ = 26, W- = 79, N = 14, p <= 0.104	<i>matK</i> <= <i>psbA-trnH</i>
<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	W+ = 27, W- = 78, N = 14, p <= 0.1189	<i>matK</i> = <i>rbcL</i>
<i>matK</i>	<i>psbK-psbI</i>	W+ = 0, W- = 120, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>matK</i> < <i>psbK-psbI</i>
<i>matK</i>	<i>rpoB</i>	W+ = 93, W- = 12, N = 14, p <= 0.008545	<i>matK</i> > <i>rpoB</i>
<i>matK</i>	<i>atpB-rbcL</i>	W+ = 3, W- = 52, N = 10, p <= 0.009766	<i>matK</i> < <i>atpB-rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	W+ = 38, W- = 67, N = 14, p <= 0.391	<i>psbA-trnH</i> = <i>rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbK-psbI</i>	W+ = 0, W- = 120, N = 15, p <= 6.104e-05	<i>psbA-trnH</i> < <i>psbK-psbI</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rpoB</i>	W+ = 91, W- = 0, N = 13, p <= 0.0002441	<i>psbA-trnH</i> > <i>rpoB</i>

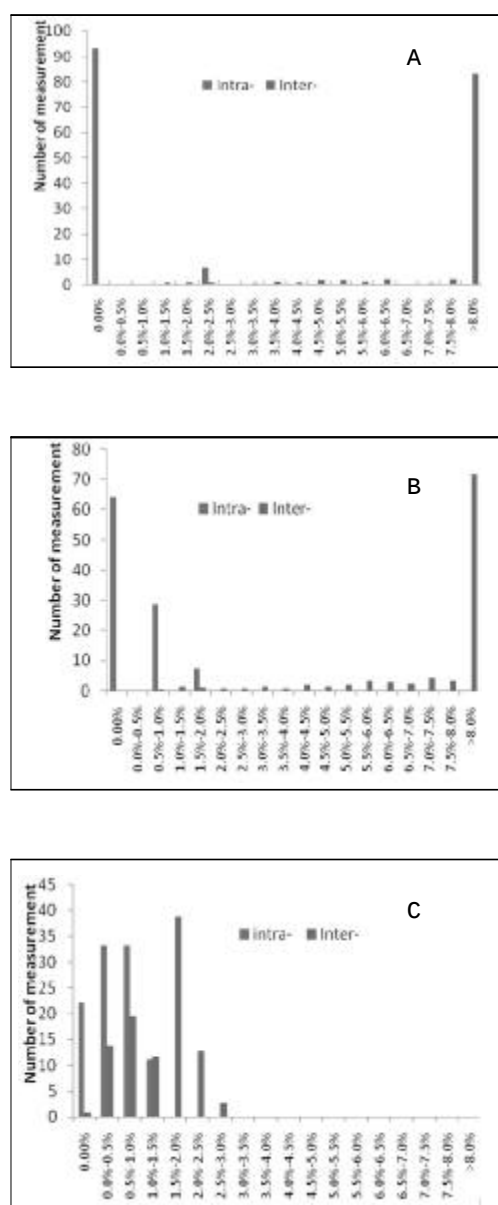


图1 种内种间变异分析
注:(A)ITS2;(B)ITS;(C)matK。

表3 应用 Blast 和 Distance 方法计算鉴定成功率

序列	鉴定方法	物种数	鉴定成功率	模糊鉴定率
			物种水平 (%)	物种水平 (%)
ITS	BLAST	43	100	100
	Distance	43	100	100
ITS2	BLAST	46	100	100
	Distance	46	100	100
matK	BLAST	28	75	25
	Distance	28	82.1	17.9

不但可以解决 ITS 的应用问题,降低试验的难度,而且对于鉴定标本、药材等 DNA 降解的材料是十分有利的。本文所采用的用于扩增 ITS2 序列的 S2F 引物位于 5.8S rDNA 的 54-73bp 处, S3R 引物位于 26S rDNA 的 141-161bp 处,所获得的序列长度为 450bp 左右,从试验的情况看在豆蔻属药用植物中具有高度的保守性和 100% 的扩增成功率, PCR 产物可以进行直接测序,具有良好的应用前景。

matK 序列为编码剪切 trnK 基因前体的成熟酶基因,全长约 1.5kb,包含在 trnK 基因一个长度约 2.6kb 的内含子中,广泛用于姜科豆蔻属及其他属的系统进化研究^[2-19],并且在陆生植物的 DNA 条形码研究中备受关注^[10-18]。本文使用了国际通用引物 390F-1326R^[11],扩增了 matK 基因 397-1329bp,长度为 889bp 的一段序列,包含了 matK 基因约 65% 的变异信息,但 24 个物种的平均种间变异仅 0.0130 ± 0.0022 ,物种鉴定成功率为 82.1% (Distance Method),不适合用于豆蔻属药用植物的 DNA 条形码鉴定研究。如果扩增 matK 基因的全序列,尽管可以包含更多的变异信息,但一般需要再合成 1~2 对特异的中间引物用于测序,不但增加了试验的复杂度和难度,降低其 PCR 和测序成功率,并且增加约 35% 变异信息的同时,相对的要增加约 40% 的序列长度,并不能增加序列的相对变异位点。因此,就本文的研究来看,不支持 Selvaraj^[18] 将 matK 作为姜科 DNA 条形码鉴定候选序列的观点, Selvaraj 是基于对 L. B. Pedersen^[26] 所提交序列的分析,共 8 个属,101 个物种,没有包含豆蔻属药用植物数据。姜科在全球有约 50 个属,1200 余种,豆蔻属为第二大属,本研究包含该属植物 36 个物种 46 个样本,包含较多的近缘物种。

所筛选的 8 个候选序列,其中 3 个(rpoB、matK、rbcL)为编码序列,5 个(ITS、ITS2、psbA-trnH、psbK-psbI、atpB-rbcL)为非编码序列。从本研究来看,虽然编码序列 PCR 扩增效率较高,插入和缺失位点较少,易于进行序列比对,但选择压力比较大,在进化上受到某些约束,所选的 3 个编码序列的序列变异均小于非编码序列,matK 虽然相较于其它编码序列进化速率最快,变异性最高,

但对该属植物在物种水平进行准确鉴定。非编码序列由于选择压力小,其变异性一般均高于编码序列,两侧编码序列又有利于设计通用引物,较适合属下水平的鉴定研究^[9],本文筛选得到的两个潜在序列(ITS2、ITS)也均为非编码序。因此对于属下级 DNA 条形码研究建议优先考虑对非编码序列的筛选。

参考文献

- Kress WJ, Prince LM, Williams KJ. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 2002,89(11):1680~1696.
- Xia YM, Kress WJ, Prince LM. Phylogenetic Analyses of A. (Alpinioideae:Zingib-eraceae) using ITS and matK DNA Sequence Data. *Systematic Botany*, 2004, 29(2):334~344.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2003,270:313~321.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Asatraptas fulgurator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004a, 101:14812~14817.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science, Biology*, 2004,101(41):14812~14817.
- 陈士林,谢彩香,姚辉,等. 中药资源创新方法研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 2008,10(5):1~9.
- Y Cho, JP Mower, YL Qiu, et al. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101:17741~17746.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102: 8369~8374.
- WJ Kress, DL Erickson. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding psbA-trnH Spacer Region. *PLoS ONE*, 2007, 2(6):e508.
- Newmaster SG, Fazekas, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Can J Bot*, 2006, 84: 335~441.
- Lahaye R, van der Bank M., Bogarin D., et al. DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008,105:2923~2928.
- Renaud Lahaye, Vincent Savolainen, Sylvie Duthoit, et al. A test of psbK-psbI and atpF-atpH as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa). *Nature Preceding*, 2008, 101:1~21.
- W. J. Kress, D. L. Erickson. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105:2761~2762.
- Cuenoud P, Savolainen V, Vhatrou LW, et al. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences. *American Journal of Botany*, 2002,89 (1): 132~144.
- Chiang T.Z., Schaal B.A., Peng C.I. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the atpB and rbcL genes of chloroplast DNA. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1998, 39:245~250.
- Christopher P. Meyer, Gustav Paulay. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Plos Biology*, 2005, 3(12):2229~2238.
- Howard A. Ross, Sumathi Murugan, Wai Lok Sibon Li, et al. Testing the Reliability of Genetic Methods of Species Identification via Simulation. *Systematic Biology*, 2008, 57:2, 216 ~230.
- Selvaraj D, Sarma RK, Sathishkumar R. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformatics*, 2008, 3(1):24~27.
- Kress WJ, Liu AZ, Newman M, et al. The molecular phylogeny of Alpinia (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of Gingers. *American Journal of Botany*, 2005, 92(1):167~178.
- Alvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3):417~314.
- Mark stoeckle. Taxonomy, DNA, and the Barcode of life. *Bioscience*, 2003, 53(9):2~3.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil. Trans. R. Soc.B*, 2005, 360:1889~1895.
- Cullings KW, Vogler DR. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Mol Ecol*, 1998, 7 (7): 919~23.
- A. Kovarik, J.C. Pires, A.R. Leitch, et al. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*, 2005, 169:931~944.
- Rudolf Meier, Kwong Shiyang, Gaurav Vaidya, et al. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Syst. Biol*, 2006, 55(5):715~728.
- L. B. Pedersen. Phylogenetic analysis of the subfamily Alpinioideae (Zingiberaceae), particularly Etlingera Giseke, based on nuclear and plastid DNA. *Plant Systematics and Evolution*, 2004, 245:239~258.
- Chen S., Yao H., Han J., et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 2010, 5(1):e8613.
- HAN Jian-ping, LIU Chang, LI Min-hui, et al. Relationship between DNA Barcoding and Chemical Classification of Salvia Medicinal Herbs. *Chinese Herbal Medicines*, 2010, 2(1): 16~29.
- 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. *中国科学*, 2010, 30 (4): 342~351.
- 朱英杰, 陈士林, 宋经元, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究. *药学报*, 2010, 45(3):376~382.
- Xiaohui Pang, Jingyuan Song, Shilin Chen, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*, 2010 10.1111/j. 1096-0031. 2010. 00328. x doi.
- 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):332~327.
- Cowan R.S., Erickson D.L., Fazekas A.J. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106: 12794.
- Zhang J.M., Wang J.X., Xia T, et al. DNA barcoding: species delimitation in tree peonies. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52:568~578.

Identification of *Amomum* (Zingiberaceae) through DNA Barcodes

Shi Linchun, Song Jingyuan, Chen Shilin, Yao Hui, Han Jianping

(Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: It is very difficult to identify *Amomum* medicinal plants. In this study, we tested 8 candidate DNA barcodes (psbA-trnH, matK, rbcL, psbK-psbI, rpoB, atpB-rbcL, ITS, ITS2) to choose suitable barcodes for *Amomum* medicinal plants. 46 specimens representing 36 species were amplified, sequenced and analyzed. Four methods were used to analyze the data. Mega4.1 software was used to calculate intraspecific variation and interspecific divergence. Wilcoxon signed rank test was used to compare divergence among different barcodes. Taxon DNA software was adopted to evaluate the "barcoding gap". The distance and blast method was employed to test the reliability of different barcodes at the species level. The results showed that 6 out of the 8 candidate barcodes (psbA-trnH, matK, rbcL, psbK-psbI, rpoB, atpB-rbcL) displayed no significant divergence at the species level, while the other 2 candidate barcodes had significant divergence and high species identification reliability (100%). ITS2 and ITS may be the potential DNA barcodes for the identification of *Amomum* medicinal plants, thus making the establishment of new identification methods for this genus possible.

Keywords: *Amomum*, DNA barcoding, Identification

(责任编辑:王 瑀,责任译审:张立崑)