

## 22种樟科植物DNA条形码分子鉴定

许丹芸, 张辉菊, 李可心, 杨全\*, 高弘扬\*  
(广东药科大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:筛选适合樟科植物的DNA条形码,对采集的22种樟科植物进行鉴定分类。方法:以22种樟科植物为实验材料,提取其DNA,使用不同的DNA条形码引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,电泳检测后进行双向测序。采用Codon Code Aligner软件对测序峰图和序列进行校对、拼接并去除正反向引物序列。将序列导入DNAMAN,进行多序列对比,查看并分析碱基变异位点。用MEGA计算不同种植物的遗传距离(K2P),根据遗传距离分析变异程度,基于邻接法构建系统进化树。结果:采用3对DNA条形码通用引物对22种樟科植物的DNA进行扩增测序后通过比较基因序列的特异碱基位点成功鉴别出其中20种植物。结论:matK序列能鉴定4个木姜子属植物;rbcL除粗脉桂外,对实验材料中楠属的3个物种都能进行区分;matK+rbcL+rpoB序列结合可鉴别20种樟科植物。其中matK序列对樟科植物鉴定效果最好,结果也表明将DNA条形码对植物进行组合鉴定,效果更佳。从分子角度研究樟科植物之间的亲缘关系,同时也为药用植物资源调查、栽培种植、开发保护利用提供依据。

**[关键词]** 樟科; DNA条形码; 鉴别; matK; rbcL; rpoB

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0159-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211019

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210616.1653.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-06-17 10:38

### Molecular Identification of 22 Species of Lauraceae by DNA Barcoding

XU Dan-yun, ZHANG Hui-ju, LI Ke-xin, YANG Quan\*, GAO Hong-yang\*  
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** DNA barcodes suitable for Lauraceae plants were screened, and 22 Lauraceae plants were identified and classified. **Method:** The DNA of 22 species of Lauraceae was extracted and amplified by polymerase chain reaction (PCR) with different DNA barcoding primers, followed by electrophoresis and sequencing. Codon Code Aligner was used to proofread, splice, and remove the forward and reverse primer sequences. The sequence was imported into DNAMAN for multiple sequence alignment, and the base mutation sites were analyzed. The Kimura 2-Parameter (K2P) distance of different plants was calculated by MEGA, and the variation degree was analyzed according to the genetic distance. The phylogenetic tree was constructed based on the adjacency method. **Result:** Three pairs of DNA barcoding primers were used to amplify and sequence the DNA of 22 species of Lauraceae, and 20 species were identified by comparing the specific base sites of gene sequences. **Conclusion:** Four *Litsea* plants could be identified by *matK*, three *Phoebe* plants except for *Cinnamomum validinerve* by *rbcL*, and 20 Lauraceae plants by the combination of *matK*, *rbcL*, and *rpoB*, which

**[收稿日期]** 20210413(011)

**[基金项目]** 广东省中医药局中医药科研项目(20201231);广东省普通高校青年创新人才类项目(2019KQNCX057);广东省基础和应用基础研究基金联合基金项目(2019A1515111043);罗定肉桂产业发展基础研究项目(2018-082);第四次全国中药资源普查项目(2017-152-006)

**[第一作者]** 许丹芸,在读硕士,从事中药资源与分子生物学研究,Tel:020-39252353,E-mail:xudanyun01@qq.com

**[通信作者]** \*杨全,博士,教授,从事中药资源开发与品质评价研究,Tel:020-39252353,E-mail:yangquan7208@vip.163.com;

\*高弘扬,博士,讲师,从事植物逆境生理与分子生物学研究,Tel:020-39252353,E-mail:240521141@qq.com

provided a theoretical basis for the identification and development of Lauraceae plants. Among them, *matK* was predominant in the identification of Lauraceae plants, and the results also showed that the combination of sequences for plant identification could achieve a better result in DNA barcoding. This study investigated the genetic relationship between Lauraceae plants at the molecular level, aiming at providing a basis for the investigation, cultivation, development, protection, and utilization of medicinal plant resources.

[**Keywords**] Lauraceae; DNA barcoding; identification; *matK*; *rbcL*; *rpoB*

樟科植物素以树形优美、气味芳香、材质优闻名,广泛应用于生产生活中<sup>[1]</sup>。樟科植物在香精制作、医药行业、建筑行业等均具有重要地位<sup>[2-3]</sup>。樟属植物中的香樟树材质坚硬、具有香气,常应用于建筑行业,也是南方常见的行道树种;月桂叶常作为调味香料或罐头矫味剂;樟属、木姜子属和山胡椒属等种类的果实含有丰富的油脂和芳香油,在工业上用途很大;鳄梨是营养价值很高的水果。但樟科植物种类繁多,其中许多同属植物极为相似,且目前鉴定主要以花、果为鉴定依据,在非花期、果期难以直接鉴定,缺乏分子方面的分类研究。

DNA条形码是利用生物体DNA中一段保守片段对物种进行快速准确鉴定的新兴技术。DNA条形码技术在植物分类中得到广泛应用,高效精确,在药品基源鉴定、保证药物安全等方面起到作用。从2003年DNA条形码技术问世以来,已被广泛地运用于物种的分类、鉴定和系统发育分析<sup>[4-5]</sup>。DNA条形码的理想标准是种间变异足够大,种内变异足够小;引物具有保守性,且可通用;条形码较短,聚合酶链式反应(PCR)扩增结果稳定。但遗憾的是,理想的DNA条形码还没有出现。分子生物学的发展,运用DNA条形码对植物进行鉴定,并将数据上传至互联网的DNA信息数据平台,是全球研究人员都能共享资源,已经成为趋势<sup>[6]</sup>。DNA条形码作为分子技术的一种,为物种鉴定、系统发育树构建及生物信息学等带来新的探索方向<sup>[7]</sup>。植物DNA条形码研究主要集中在核糖体间隔区和叶绿体基因组的编码和非编码区。其中常见的叶绿体基因组DNA条形码有*matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rpoC*等。

DNA条形码技术为药材鉴定提供了新的思路,且已成功应用于姜科等多个科属植物及药材鉴定<sup>[8-10]</sup>。樟科植物数量庞大,然而樟科植物的条形码数据库在物种丰富度和数量上都相对不完整,需要大量研究。实验操作简单快速,相比于依赖于经验的传统鉴定及耗资较大的全基因组测序,有极大的优势。植物分类的高效精确,是准确鉴定药材原植物种类,保证药材生产、研究的科学性的基础。

本文采用DNA条形码技术对22种樟科植物进行物种鉴定,鉴定出20种樟科植物。实验发现结合多种DNA条形码对植物进行鉴定,效果更好。本文研究樟科植物之间的亲缘关系,以期从分子水平了解这22种樟科植物的序列特征及其进化位置同时也为药用植物资源调查、栽培种植、开发保护利用提供依据。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 材料与试剂** 样品采集均采集于广东省广州市华南植物园,每种选取3株植株,每株采集2份无虫害的健康叶片。样品经广东药科大学杨全教授鉴定,硅胶干燥, -20 °C保存,存放于国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室。见表1。

植物DNA提取试剂盒 Takara MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit, PCR试剂 Premix Taq™ (Takara公司,批号分别为AHE4572A, AJG1551A)。

Nano-100型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司);C1000Touch™ Thermal Cycler型PCR仪, PowerPac™Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Tocan240型凝胶成像仪(上海领成生物科技有限公司);5401型低温离心机(德国Eppendorf AG公司);Biosafte-20TB型实验室级超纯水器[赛飞(中国)有限公司];TIM-20型制冰机(上海领成生物科技有限公司)。

**1.2 DNA提取** 使用植物DNA提取试剂盒提取样品的DNA,然后通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量, Nano-100型微量分光光度计检测DNA的浓度和纯度,合格的DNA样品于-20 °C保存备用。通过文献查阅及实验室前期工作初步筛选了引物,在DNA条形码通用引物中筛选15对引物,引物序列见表2,引物由擎科生物科技有限公司合成。

**1.3 PCR扩增及产物检测** 采用Bio-rad C1000型仪器进行反应,使用Premix Taq™试剂盒,该反应需在冰上配置反应液。反应总体积25 μL, 10 mol·L<sup>-1</sup> Premix Taq 12.5 μL; 10 mol·L<sup>-1</sup>引物 2.0 μL;

表1 22个樟科植物样品名称

Table 1 Statistics table of 22 Lauraceae samples

No.	中文名	拉丁学名	属
1	黄樟	<i>Cinnamomum parthenoxylon</i>	樟属
2	细毛樟	<i>C. tenuipile</i>	樟属
3	粗脉桂	<i>C. validinerve</i>	樟属
4	钝叶桂	<i>C. bejolghota</i>	樟属
5	肉桂	<i>C. cassia Presl</i>	樟属
6	大叶清化桂	<i>C. cassia var. macrophyllum</i>	樟属
7	樟	<i>C. camphora</i>	樟属
8	闽楠	<i>Phoebe bournei</i>	楠属
9	大果楠	<i>P. macrocarpa</i>	楠属
10	普文楠	<i>P. puwenensis</i>	楠属
11	假柿木姜子	<i>Litsea monopetala</i>	木姜子属
12	豺皮樟	<i>L. rotundifolia var. oblongifolia</i>	木姜子属
13	黄椿木姜子	<i>L. variabilis</i>	木姜子属
14	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	木姜子属
15	梨润楠	<i>Machilus pomifera</i>	润楠属
16	扁果润楠	<i>M. platycarpa</i>	润楠属
17	红楠	<i>M. thunbergii</i>	润楠属
18	柳叶润楠	<i>M. salicina</i>	润楠属
19	绒毛润楠	<i>M. velutina</i>	润楠属
20	舟山新木姜子	<i>Neolitsea sericea</i>	新木姜子属
21	琼楠	<i>Beilschmiedia intermedia</i>	琼楠属
22	乌药	<i>Lindera aggregata</i>	山胡椒属

10 mol·L<sup>-1</sup> DNA模板 3.0 μL; 灭菌水 3.5 μL。PCR反应条件见表2。1.5%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,送擎科生物科技有限公司进行双向测序。

**1.4 数据处理** 采用Codon Code Aligner软件对测序峰图和序列进行校对、拼接并去除正反向引物序列。将序列导入 <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, 加载到不同的通道,进行多序列对比,查看并分析碱基变异位点。用MEGA计算不同种植物的遗传距离(K2P),根据遗传距离分析变异程度,基于邻接法(NJ)构建系统进化树。

## 2 结果分析

**2.1 DNA提取质量及PCR产物检测分析** 提取总DNA进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,条带清晰完整明亮, A<sub>260/280</sub>均在1.6~1.8,表明提取DNA纯度较高,无蛋白质污染,可以满足后续试验要求。使用不同引物对样品进行PCR扩增,对扩增样品进行测序。测序结果表明 *rbcL*, *matK*, *rpoB* 的产物长度分别为 705,

827, 480 bp, 这3个引物对22种植物的6个重复样本测序结果是一致且稳定。其他引物包括 *rp132-trnI*, *trnI*, *psbA-trnH*, ITS2/3, *rpoC*, *ycf1b*, AT103, ITS1/ITS4, ITS/ITS2 和 ITS3/ITS4 序列扩增结果较差,不予使用。

**2.2 差异位点分析** 将3个DNA条形码的差异位点进行汇总,见表3~5。

表3中 *matK* 序列的PCR扩增效率为100%。通过分析差异位点, *matK* 可以区分钝叶桂、假柿木姜子、豺皮樟、黄椿木姜子、毛叶木姜子、舟山新木姜子、琼楠和乌药8个樟科植物。在3个DNA条形码的扩增结果中,琼楠特异位点最多,特别是 *matK* 序列。可能是由于琼楠与其他21种植物亲缘关系较远,差异较大。*rbcL* 序列的PCR扩增效率为100%。*rbcL* 序列可以区分粗脉桂、闽楠、大果楠、肉桂、大叶清化桂和红楠等6个植物。*rpoB* 序列的PCR扩增效率为100%。*rpoB* 可以区分普文楠。普文楠280 bp的碱基为“A”。

对3种DNA条形码单独分析差异基因后,仅黄樟、细毛樟、香樟、梨润楠、柳叶润楠、绒毛润楠和扁果润楠7种植物未被区分。对3种DNA条形码进行联合分析,可区分黄樟、细毛樟、香樟、绒毛润楠和扁果润楠5种植物。在 *rbcL* 的305 bp可以将乌药与柳叶润楠与其他20种植物区分,而 *matK* 在14 bp可以区分出乌药,因此可区分柳叶润楠。对于绒毛润楠, *rbcL* 在708 bp可将绒毛润楠、大果楠、红楠和乌药与其他18种植物区分, *rbcL* 可区分出大果楠和红楠, *matK* 可区分出乌药,故绒毛润楠可以区分。*rpoB* 在304 bp可将梨润楠、扁果润楠和柳叶润楠与其他19种植物区分,而柳叶润楠已被单独区分,故梨润楠和扁果润楠可被区分为一组。对于黄樟, 综上所述已经区分出的梨润楠、扁果润楠、柳叶润楠和绒毛润楠,结合 *rbcL* 的557 bp可成功区分出来。

**2.3 系统发育分析** 采用自举法对 *matK*, *rbcL*, *rpoB* 和 *matK*+*rbcL*+*rpoB* 组合序列进行了1 000次测试, NJ法构建系统发育树。*matK* 基因序列建立了NJ系统发育树,琼楠属的琼楠单独分为一支;楠属、木姜子属、润楠属分别聚在一个分支;樟属除黄樟外均聚于同一分支,新木姜子属的舟山新木姜子和山胡椒属的乌药与樟属聚于同一分支,见图1A。*rbcL* 基因序列建立NJ系统发育树,楠属单独聚为一支,樟属除黄樟外均聚于同一分支;润楠属的绒毛润楠、梨润楠和扁果润楠与黄樟聚为一支;润楠属其他的植物与木姜子属和新木姜子属的聚为一支,

表2 DNA条形码的引物序列

Table 2 Primer sequence of DNA barcoding

引物	序列(5'-3')	长度/bp	扩增条件
<i>rbcL</i>	上游 ATGTCACCACAAACAGA	17	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 TCGCATGTACCTGCAGTA	18	
<i>matK</i>	上游 CGTACAGTACTTTTGTGTTTAC	22	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 55 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 ACCCAGTCCATCTGGAAATC	20	
<i>rpoB</i>	上游 AAGTGCATTGTTGGAAGCTGG	20	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 35 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 CCCAGCATCACAATTCC	17	
<i>rpl32-trnL</i>	CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC	22	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57.8 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	20	
<i>trnL</i>	上游 CGAAATCGGTAGACGCTACG	20	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 CCATTGAGTCTCTGCACCTATC	22	
<i>psbA-trnH</i>	上游 GTTATGCATGAACGTAATGCTC	22	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 CGCGCATGGTGGATTCAATCC	23	
ITS2/3	上游 ATGCGATACTTGGTGTGAAT	20	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min
	下游 GACGCTTCTCCAGACTACAAT	21	
<i>rpoC</i>	上游 CAAAGAGGGAAGAT	14	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 TAAGCATATCTTGAGT	16	
<i>yef1b</i>	上游 TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT	28	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 ATACATGTCAAAGTGATGAAAA	23	
AT103	上游 CTTCAAGCCMAAGTTCATCTTCTA	24	94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	下游 ATCATTGAGGTACATNGTMACATA	24	
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 4 °C 保存 10 min
	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	
ITS/ITS2	GCTACGTTCTTCATCGATGC	20	94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 39 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	GCTACGTTCTTCATCGATGC	20	
ITS3/ITS4	GCATCGATGAAGAACGTAGC	20	94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 39 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存 10 min
	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	

见图 1B。樟属除黄樟外均聚于一支,黄樟与润楠属的植物聚于同一分支;木姜子属和楠属均分别聚于同一分支;琼楠单独一支,见图 1C。*matK+rbcL+rpoB* 组合序列中可以看到除樟属的黄樟外,同一种属植物大部分聚在同一分支,见图 1D。

### 3 讨论与结论

樟科植物分类是当前樟科植物资源利用的问题之一<sup>[11]</sup>。仅仅通过形态来鉴别樟科植物比较困难,因为樟科同属植物形态十分接近,需要一定的专业门槛才能准确鉴别樟科植物<sup>[12]</sup>。如果能筛选出适合樟科植物的 DNA 条形码,对樟科植物的分类鉴别、资源保护、品种选择和市场调控具有重要意

义。亲缘关系较近的植物通常含有相似的 DNA 分子标记,且含有同类或者同种化学元素。当前植物 DNA 条形码研究工作主要是筛选合适的 DNA 片段进行评价,没有一种完美 DNA 条形码完全适配所有植物鉴定,需要针对不同科属种植物特点选择最优 DNA 条形码<sup>[13]</sup>。在动物研究中,线粒体细胞色素氧化酶 I (CO I) 基因是比较常见的 DNA 条形码片段<sup>[14]</sup>。*matK* 是植物叶绿体基因中进化速率较快的一条编码基因<sup>[15]</sup>。马丽等<sup>[16]</sup>使用 *matK* 基因对 60 个石榴品种进行扩增,将其分为 6 大类。孟啸龙等<sup>[17]</sup>使用 *matK* 基因成功鉴定 7 个薯蓣属中的 5 个。*matK* 基因主要用于属内和种内的分类。*rbcL* 变异

表3 22种樟属植物中的 *matK* 的差异位点信息

Table 3 Information of different *matK* loci in 22 species of *Cinnamomum*

bp

种类	<i>matK</i> 差异位点																							
	20	40	63	156	183	234	335	392	400	419	448	478	602	629	651	653	677	696	724	733	734	735	743	785
黄樟	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	A	G
细毛樟	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	G	A
粗脉桂	*	*	*	*	*	*	*	C	C	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
钝叶桂	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
肉桂	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
大叶清化桂	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
香樟	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	A
闽楠	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	G
大果楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
普文楠	*	*	*	*	T	G	*	*	*	*	T	*	A	A	*	*	*	*	*	*	*	*	A	G
假柿木姜子	*	*	G	*	A	T	*	*	*	*	C	*	G	G	*	*	*	*	*	*	*	*	G	A
豺皮樟	*	*	A	*	T	*	*	*	*	*	*	*	A	A	G	A	*	G	G	*	*	*	*	*
黄椿木姜子	*	*	G	A	*	*	*	*	*	*	*	*	A	A	A	C	*	A	A	G	*	*	*	*
毛叶木姜子	*	*	*	G	*	T	*	*	*	*	C	*	G	G	G	A	*	G	*	C	*	A	G	A
梨润楠	*	*	*	A	*	G	*	*	*	*	T	*	A	A	*	*	*	*	*	G	*	T	A	G
扁果润楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
红楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
柳叶润楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
绒毛润楠	*	*	*	*	*	*	A	*	*	G	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	T	A	G
舟山新木姜子	*	C	*	*	*	*	G	*	*	A	C	*	*	*	*	*	*	G	A	*	C	A	G	A
琼楠	G	T	*	*	*	*	A	C	*	G	T	*	*	*	*	*	G	A	G	*	A	T	*	*
乌药	A	*	*	*	*	*	*	T	*	*	C	*	*	*	*	*	A	G	A	*	*	A	*	*

率较低,但在对陆地植物进行大规模调查后认为其通用性较好,虽然不能用于识别全部植物,但常应用于区分同属植物和作为组合DNA条形码<sup>[18]</sup>。*rpoB*序列变异程度虽然小于*matK*,但片段变异长度差异较大,含有多个插入缺失位点,利用好缺失位点对鉴定物种有一定的帮助。大量研究表明,单一DNA条形码对所有植物进行鉴定是不现实的,因此2005年DNA条形码多序列组合被提出,并应用至今。

本实验中,采样22种樟科植物,通过DNA条形码技术共鉴定20种。*matK*,*rbcL*,*rpoB*序列均属于叶绿体基因编码区片段。实验中*matK*序列可以区分钝叶桂、假柿木姜子、豺皮樟、黄椿木姜子、毛叶木姜子、舟山新木姜子、琼楠和乌药这8个樟科植

物,其中钝叶桂是樟属,假柿木姜子、豺皮樟、黄椿木姜子、毛叶木姜子是木姜子属,舟山新木姜子是新木姜子属,琼楠是琼楠属,乌药是山胡椒属。*matK*序列能鉴定4个木姜子属植物,推测该序列适合对木姜子属植物进行鉴定。*rbcL*序列可以区分粗脉桂、闽楠、大果楠和红楠,除粗脉桂外,楠属的3种植物均能被识别。*rpoB*序列可以区分普文楠和绒毛润楠。3个DNA条形码序列组合后交叉还可区分出大叶清化桂、肉桂、梨润楠、柳叶润楠、黄樟和扁果润楠6种植物。本研究表明,将DNA条形码中的*matK*,*rbcL*,*rpoB*序列进行组合,对樟科植物鉴定有较好的效果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

表 4 22 种樟属植物中的 *rbcL* 的差异位点信息

Table 4 Information of different *rbcL* loci in 22 species of *Cinnamomum*

bp

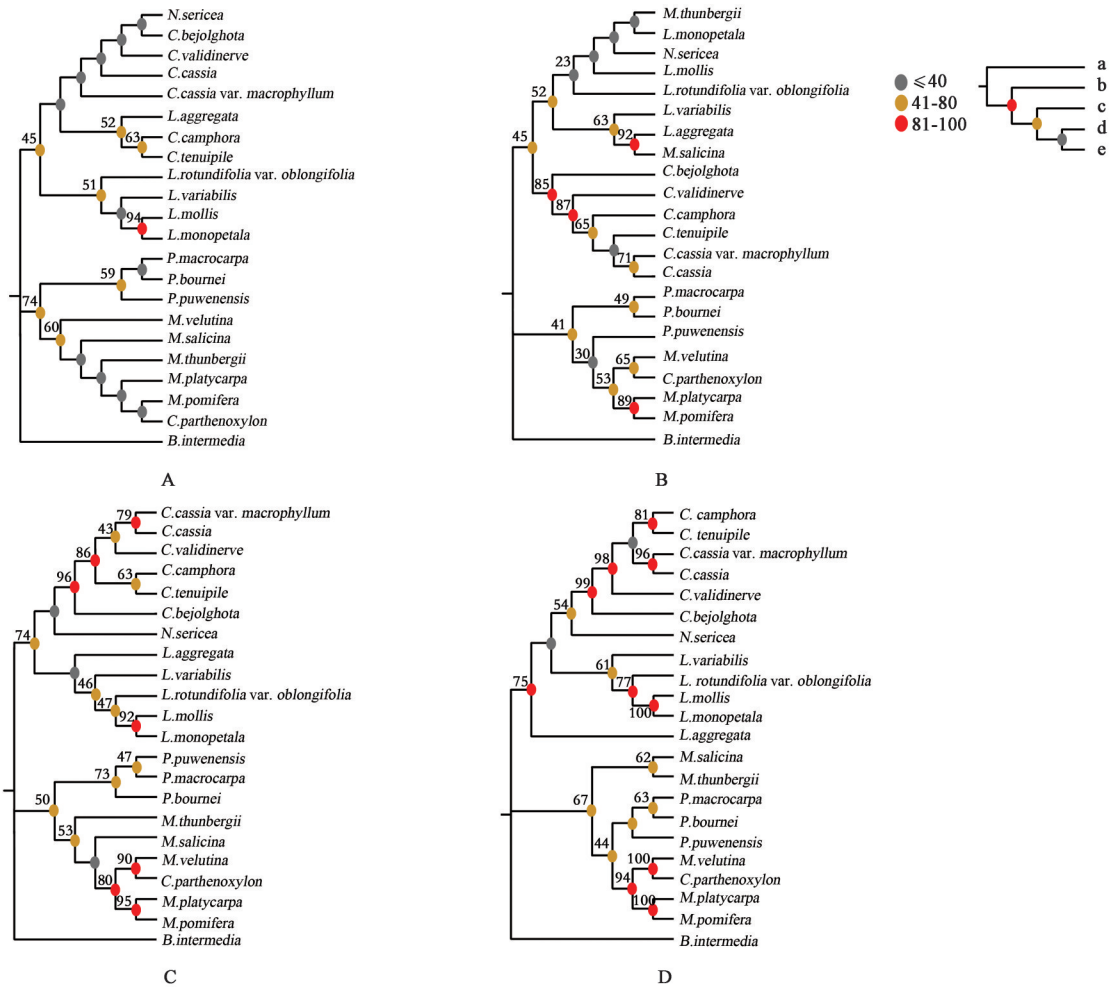
种类	<i>rbcL</i> 差异位点																					
	26	43	52	70	182	305	307	413	441	454	557	627	631	641	657	680	705	707	708	709	710	712
黄樟	*	A	*	A	*	*	*	*	C	C	G	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
细毛樟	*	C	*	C	*	*	*	*	G	G	C	T	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*
粗脉桂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*
钝叶桂	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	C	*	G	*	*	*	*	C	G	*	*
肉桂	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	T	*	*	*	*	*	T	C	T	*	*
大叶清化桂	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	T	*	*	*
香樟	*	*	*	C	*	*	T	A	G	G	*	T	*	G	*	*	*	*	*	*	G	G
闽楠	*	C	*	A	*	*	C	*	C	C	*	C	*	C	*	*	*	C	*	T	T	T
大果楠	*	A	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	T	*	G	T	G
普文楠	*	A	*	A	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	G	*
假柿木姜子	*	C	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	T	*	*	*
豺皮樟	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	G	*	G	G	*	*
黄椿木姜子	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	T	T	*	*
毛叶木姜子	*	C	T	C	*	*	*	*	*	*	C	*	T	*	G	*	*	*	T	G	*	*
梨润楠	*	A	G	A	*	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*	*	*	T	C	T	G	*
扁果润楠	*	A	G	A	G	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*	*	G	C	T	C	T	*
红楠	*	C	T	C	A	A	*	*	*	*	C	*	T	*	G	A	T	*	*	*	G	*
柳叶润楠	*	C	*	C	G	G	*	*	*	*	C	*	*	*	T	G	G	*	*	*	*	*
绒毛润楠	A	A	*	A	*	A	*	*	*	*	G	*	*	*	G	A	*	*	*	*	*	*
舟山新木姜子	G	C	*	C	*	*	*	*	*	C	C	*	T	*	*	*	*	*	*	C	G	*
琼楠	A	*	*	A	*	A	*	*	*	G	*	*	G	*	G	A	*	C	*	T	T	*
乌药	*	*	*	C	*	G	*	*	*	C	*	*	T	*	T	G	*	T	*	G	G	*

表 5 22 种樟属植物中的 *rpoB* 的差异位点信息

Table 5 Information of different *rpoB* loci in 22 species of *Cinnamomum*

bp

种类	<i>rpoB</i> 差异位点																								
	8	19	51	67	121	141	154	211	226	235	241	280	299	302	303	304	352	358	369	397	407	439	454	457	468
黄樟	*	*	*	A	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	T	*	*	*
细毛樟	*	*	*	G	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	C	*	*	*
粗脉桂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
钝叶桂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
肉桂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
大叶清化桂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
香樟	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	C	*	*	*
闽楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	T	*	*	*
大果楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
普文楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	A	*
假柿木姜子	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	G	*
豺皮樟	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*
黄椿木姜子	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
毛叶木姜子	*	*	*	G	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	C	*	*	*
梨润楠	*	*	*	A	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	T	*	*	*
扁果润楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*
红楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*
柳叶润楠	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*
绒毛润楠	*	*	*	A	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	T	*	*	*
舟山新木姜子	T	G	T	G	C	C	A	A	A	*	*	*	T	G	G	*	*	G	C	C	T	C	T	*	A
琼楠	C	A	C	A	A	T	*	G	G	G	T	*	C	A	T	*	*	A	T	A	G	T	G	*	G
乌药	T	G	T	G	C	C	*	A	A	A	C	*	T	G	G	*	*	G	C	C	T	C	T	*	A



A. *matK* 序列片段分析; B. *rbcL* 序列片段分析; C. *rpoB* 序列片段分析; D. *matK+rbcL+rpoB* 序列片段分析

图1 22种樟科植物的系统发育分析

Fig. 1 Neighbor-joining trees of 22 species of Lauraceae

[参考文献]

[1] 陆云峰, 王豪, 徐沁怡, 等. 樟科楠属4种植物种实表型性状及其发芽特性研究[J]. 种子, 2020, 39(12): 107-112, 119.

[2] BARBOSA H, DA S R L C G, COSTASILVA T A, et al. Interaction of dicentrinone, an antitrypanosomal aporphine alkaloid isolated from *Ocotea puberula* (Lauraceae), in cell membrane models at the air-water interface[J]. Bioorg Chem, 2020, 101: 103978.

[3] 王静, 冯恩友, 谢嘉辉, 等. 樟科植物提取物驱虫杀虫作用研究进展[J]. 热带林业, 2020, 48(3): 17-21.

[4] MARI K, HEBERT D N. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows[J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(4): 706-715

[5] REN F M, WANG Y W, XU Z C, et al. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae[J]. Ecol Evol, 2019, 9(4): 1934-1945

[6] 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): 1-10

[7] TAHIR A, HUSSAIN F, AHMED N, et al. Assessing universality of DNA barcoding in geographically isolated selected desert medicinal species of Fabaceae and Poaceae[J]. Peer J, 2018, 6: 4499

[8] 郑辉, 李秋娥, 陈安琪, 等. 峨眉山区唇形科药用植物 ITS2 和 *matK* 条形码序列鉴定[J]. 中草药, 2019, 50(22): 5563-5570.

[9] 胡建霖, 刘志芳, 慈秀芹, 等. DNA 条形码在热带龙脑香科树种鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2019, 54(3): 350-359.

[10] 张桂芳, 钟志敏, 黄松, 等. 姜科植物 *matK* 条形码鉴定及聚类分析[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 99-102.

[11] 杨永, 刘冰. 中国樟科物种编目: 问题和展望[J]. 生物多样性, 2015, 23(2): 232-236.

- [12] 曾凤,唐小清,陈红锋,等. 广东省樟科植物资源调查与园林应用研究[J]. 广东林业科技,2015,31(2):96-103.
- [13] HUANG Q L, DUAN Z G, YANG J F, et al. SNP typing for germplasm identification of *Amomum villosum* Lour. based on DNA barcoding markers[J]. PLoS One,2017,9(12):508.
- [14] 张蒙,赵艳艳,鲁玉杰,等. 基于线粒体CO I 和CO II 基因的米象与玉米象的分子鉴定[J]. 中国粮油学报,2021,doi:11.2864.TS.20210316.1357.004.
- [15] 沈晓霞,孙健,王志安. 基于叶绿体 *matK* 和 *rps16* 基因序列的黄精属药用植物亲缘关系分析[J]. 中国现代中药,2021,23(2):275-279,325.
- [16] 马丽,周玉亮,郝兆祥,等. 石榴种质资源的 *matK* 基因序列分析[J]. 分子植物育种,2020,18(16):5274-5279.
- [17] 孟啸龙,孟乡,周国富,等. DNA条形码在山药及其混伪品鉴定中的应用[J]. 辽宁中医杂志,2020,47(4):163-166.
- [18] 张家榕,雷万钧. 18种苔藓植物 *rbcL* 基因的密码子偏性及聚类分析[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2020,40(6):1-12.

[责任编辑 顾雪竹]