

郭义红,孙威江,林伟东,等.植物DNA条形码鉴定研究进展[J].江苏农业科学,2016,44(7):19-21.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.005

植物DNA条形码鉴定研究进展

郭义红,孙威江,林伟东,陈志丹

(福建农林大学茶学系,福建福州 350002)

摘要: DNA条形码技术是近几年迅速发展的一种基于分子水平的物种鉴定技术,基本原理是根据不同物种间特定基因片段的序列差异,利用生物信息学技术对物种进行快速分类和鉴定,在植物的物种鉴定中已有较广泛的应用。本文从植物DNA条形码鉴定的步骤、DNA条形码在植物鉴定中的研究进展方面进行综述,并提出DNA条形码技术在植物中应用的一些展望。

关键词: DNA条形码;植物;品种鉴定

中图分类号: S571.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0019-03

常用的植物鉴定方法有表型鉴定和分子水平鉴定。由于生长环境、加工方式的差异,植物外观形态出现较大变化,因此在实际应用中很难通过表现型对其进行物种鉴定。DNA是一种稳定的生物大分子,利用DNA分子水平的鉴定方法能准确有效地对新鲜和加工过的植物样品进行鉴定,避免表型鉴定造成的误差和生化检测的繁杂操作。目前常用的DNA鉴定方法有DNA指纹图谱技术、DNA芯片技术和DNA条形码技术等。DNA条形码技术是利用一段短而标准的DNA序列作为标记来实现快速、准确和自动化物种鉴定的方法,是由加拿大的动物学家Herbert在2003年提出的^[1],经过多年的发展DNA条形码技术在分子系统发育、进化生态学^[2]等研究和动植物品种、食品组成^[3]、法医物证等鉴定中有广泛的应用。

1 植物DNA条形码鉴定的步骤

1.1 植物DNA提取

提取一定浓度和纯度的DNA是完成植物DNA条形码研究的前提。目前常用的植物DNA提取方法有CTAB法、SDS法、高盐低pH值法和试剂盒法等,在提取植物样品DNA前,应针对其特异性选择合适的DNA提取方法。对于新鲜的植物样品,一般采用传统的CTAB法或者常规的植物DNA提取试剂盒提取即可得到一定质量的植物样品DNA。对于干燥或者经特殊处理过的植物样品,则须根据样品的特性对传统的方法进行改良。刘少峰利用CTAB法、CTAB法联用试剂盒法和试剂盒法分别提取沉香的总DNA,结果表明CTAB法联合试剂盒法提取的DNA,经PCR扩增后目的片段的产率最高,且方法简单、快速^[4]。Costa等利用改良的试剂盒法提取植物性滋补品和茶叶的总DNA^[5-6],Arolla等对CTAB法进

行改良^[7-8],成功提取出穿心莲属和黏液质种子的总DNA,DNA浓度均较高且电泳条带清晰。

1.2 陆地植物通用的DNA条形码序列选择

生命条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)作为全球DNA条形码研究的权威机构,在综合以往研究和工作组所提供数据的分析结果,建议将叶绿体基因*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*和核基因*ITS*作为陆地植物通用的DNA条形码^[9-10]。

1.2.1 *rbcL*序列 *rbcL*片段在GenBank中有大量的序列数据,并且具有通用、易扩增、易比对的特点,因而被提议作为条形码片段,但是*rbcL*的变异主要存在于种以上水平,物种水平上通常变异不够大。此外,*rbcL*的整体长度较长(至少1300 bp),给整个基因的测序带来了困难。

1.2.2 *matK*序列 与其他编码区片段相比,*matK*片段的进化速率较快,但该片段的引物通用性较差,鉴定不同类群时往往需要设计不同的引物,其引物通用性和扩增成功率有待进一步检验,适用于种属水平的物种鉴别。

1.2.3 *trnH-psbA*序列 *trnH-psbA*片段作为植物DNA条形码最大的优势是进化速率快,但同时也由于插入/缺失过多引起了较高的突变率和简单的序列重复和重排,在进行序列分析时需要辅以人工校正,而给非同属物种间的比对带来了较大困难。不过,比对容易与否并不是条形码必需的条件,一旦建立恰当的条形码数据分析方法,插入/缺失还将会增加物种识别所需要的信息。

1.2.4 *ITS*序列 *ITS*片段在物种水平上变异较大,且已广泛应用于物种分类及系统进化研究,然而扩增成功率是*ITS*作为条形码应用的一个限制因素,主要表现为:其长度变异大,多数物种扩增片段长度超过1100 bp,需要使用中间引物才能扩增获得整个基因,且存在长的poly结构,导致测序和序列分析困难。另外,核基因本身存在多拷贝的特性,在种内序列变异较大,进一步降低了该片段作为条形码的应用性^[9,11-12]。

除了以上这4种DNA条形码序列,*trnL*、*rpoC1*、*rpoB*、*ndhJ*等DNA片段也常作为植物的DNA条形码序列^[13],另外,将不同的DNA片段进行组合可提高DNA条形码的鉴定

收稿日期:2016-01-08

基金项目:国家“863”计划(编号:2013AA10260605);福建茶产业农业科技推广服务试点建设(编号:KNJ-151000)。

作者简介:郭义红(1991—),女,福建莆田人,硕士研究生,主要研究方向为茶叶深加工与综合利用。E-mail:1492995046@qq.com。

通信作者:孙威江,博士,教授。E-mail:swj8103@126.com。

能力^[14-5]。

1.3 植物 DNA 条形码数据分析

将特定序列 PCR 扩增后的产物回收、纯化、测序,即得到植物样本的目的基因序列,此时须对其进行人工校正再使用序列处理软件进行拼接,去除低质量序列及引物区^[16]。常用序列拼接软件有 CodonCode Aligner V2.06 (CodonCode Co. USA) 和 DNAMAN 等。校正拼接后的序列即可进行 DNA 条形码的数据分析,常用的方法有 Blast 分析、遗传距离比较和系统进化关系的构建 3 种方式^[16]。Blast 即局部相似性基本查询工具,是由 NCBI 开发的基于序列相似性的数据库搜索程序,将待研究序列与 DNA 序列库进行比较,即可确定该序列的生物属性;遗传距离分析是运用 MEGA 等软件工具,采用 Kimura-2-Parameter distance (K2P) 或者 pairwise uncorrected p-distance 模型来计算种间距离,通过种内、种间的差异比较确定种内及种间变异的阈值,从而对未知植物样品进行检索与鉴定^[17-18];系统进化关系一般用进化树来描述,以确定同一谱系植物的进化关系。

3 DNA 条形码技术在植物鉴定中的应用现状

3.1 DNA 条形码在中药材鉴定中的研究

在日常生活和临床应用中,中药都起着重要的作用,传统的中药鉴定方法主要有基元鉴定、形态鉴定和理化鉴定,随着分子技术的发展,分子水平的鉴定技术已广泛应用,而 DNA 条形码鉴定的重复性高、方法通用性强,近年来得到了众多研究者的关注^[19]。

汤欢等将 *ITS2* 作为鉴定凉茶药材布渣叶及其混伪品的序列,对所取样品的 DNA 进行 PCR 扩增、测序,将测得序列拼接、计算布渣叶及其混伪品的遗传距离并构建系统 NJ 进化树,结果显示基于 *ITS2* 序列的 DNA 条形码序列可准确地鉴定布渣叶及其混伪品^[20];黄琼林等利用 *rbcL* 序列成功鉴定出青天葵及其混伪品^[21];王晓明等则利用 *matK* 序列有效鉴别出同为豆科的苜蓿、鸡骨草和毛鸡骨草^[22]。而由于中药材的多样性,在对中药进行 DNA 条形码鉴定前,通常需要先选择鉴定该药材的合适 DNA 条形码序列或序列组合。张忠廉等为了筛选一种能高效准确鉴别千斤拔属药用植物的 DNA 条形码序列,研究认为 *ITS* 可明显区分千斤拔属植物的不同物种,可作为千斤拔药材基原植物鉴定的条形码序列^[23]。Liu 等利用 *ITS2*、*psbA-trnH*、*ITS2* 与 *psbA-trnH* 的组合分别鉴定药用沙棘和非药用沙棘,结果表明 *ITS* 与 *psbA-trnH* 序列的组合鉴定效果最好^[24]。随着 DNA 条形码技术在中药领域的应用不断增多,研究者们也陆续寻找出鉴定血蝎^[25]、金钱莲^[26]、槟榔青属^[27]、北沙参^[28] 等种属最适的 DNA 条形码序列或序列组合。

目前,中药 DNA 条形码分子鉴定法指导原则已纳入 2010 版《中国药典》中。另外相关书籍如《中药 DNA 条形码分子鉴定》和《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》的出版也标志着我国常用中药材 DNA 条形码鉴定技术已趋于系统化和规范化^[29],为中药材的基元鉴定提供了一种科学规范的方法。

3.2 DNA 条形码在植物物证鉴定分析中的应用

将 DNA 条形码技术应用于植物物证的鉴定分析中,可避

免在案件现场发现的植物样本由于破碎、腐败等原因无法进行形态学的辨认,为案件的侦破提供科学性的证据^[30]。

杨雪莹等提取了 3 个可疑毒品样本的总 DNA,利用 *ITS2* 引物分别进行扩增,将扩增产物进行测序,对序列校对拼接,应用 Blast 方法在 NCBI 数据库中进行比对,成功分析了 3 种新型毒品的植物种属^[31]。宋炳轲等分别用通用引物 *ITS2* 和 *psbA-trnH* 对 5 个地区的 60 份大麻样品进行 PCR 扩增,发现所有大麻样本的 *ITS2* 扩增片段序列一致,没有变异; *psbA-trnH* 扩增片段变异较大,可以区分 5 个地区的大麻样本^[32]。宋炳轲等还利用 *psbA-trnH* 成功鉴别出毒品原植物大麻及其混伪品,提供了一种快速准确鉴定大麻种属的方法,能有效打击大麻毒品犯罪^[33]。

3.3 DNA 条形码技术在其他植物鉴定中的作用

由于部分植物种属内形态变异复杂,性状受环境影响大,往往呈现多样性,易对属、组和种类的划分造成影响, DNA 条形码技术可快速、准确鉴定出物种,逐渐在植物的分类鉴定中得到广泛应用。

焦丽娟等利用 4 个 DNA 条形码候选片段对秋海棠属 26 种 136 个个体进行分析,结果表明 *ITS/ITS2* 序列的种内和种间变异大,可作为鉴定秋海棠属的候选序列^[34]。张玉霄等运用 16 个叶绿体 DNA 片段,对青篱竹族和薊竹族的 10 个属 22 种 30 个个体进行扩增、测序及变异位点的分析,结果表明 *trnG-trnT(t)* 可作为竹内亚科鉴定的 DNA 条形码^[35]。董洋龙等对 11 个茶花品种基因组进行了 *ITS-PCR* 扩增、多重序列比对及种系发生等研究,结果表明 11 个样品基因组存在较高的一致性和位点的多态性, *ITS* 技术可用于分析茶花样品间的遗传关系^[36]。黄卫娟利用 *trnH-psbA*、*rbcL-a*、*trnL-F* 和 *ITS* 等 4 个 DNA 片段对 140 份荞麦及其野生近缘种进行了系统发育重建,将采集的荞麦样品进行了分类,将荞麦及其野生近缘种和野生型进行了初步区分,同时对野生种进行了鉴定^[37]。Stoeckle 等利用 *matK* 和 *rbcL* 序列对市售的 143 个茶叶样品进行了鉴定,结果表明 DNA 条形码技术也可应用于成品茶叶的分类和品种鉴定中^[6]。为了能有效地对相关产品的质量进行监管和生物多样性的研究,研究者陆续将 DNA 条形码技术应用于木材的种属鉴定中,对桦木属^[38]、杨树属^[39]、桤木属^[40] 等种属进行了鉴定,均取得了较好的鉴定效果。

4 研究展望

虽然 DNA 条形码技术在中药中的应用已经较系统和规范,在其他植物的鉴定中也有相关报道,但是研究都不够深入,相较于其他鉴定方法, DNA 条形码技术的认知度相对较低。因此,在今后的研究中,应扩大 DNA 条形码技术在其他植物中的应用范围,寻找出最适合各个植物物种的 DNA 条形码序列,为今后实现植物物种的快速鉴定奠定基础。

由于 DNA 条形码序列较短,遗传信息有限^[41-43],在鉴定近缘和近期分化的物种上还存在较大的争议^[17],与其他分子标记结合,提高 DNA 条形码技术鉴定的效率也是重要的研究方向之一。

参考文献:

[1] Hebert P N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications

- through DNA barcodes[J]. Proc R,2003,270(1512):313-321.
- [2] 裴英才. DNA条形码在进化生态学研究中的应用[J]. 生物多样性,2015,23(3):291-292.
- [3] 吕冬梅,黄原,文慧,等. DNA条形码技术在食品鉴定中的应用[J]. 食品科学,2015,36(9):248-253.
- [4] 刘少烽,陈晓东,朱爽,等. 沉香DNA的提取及其ITS2-PCR体系的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):7-11.
- [5] Costa J, Amaral J S, Fernandes T J, et al. DNA extraction from plant food supplements: Influence of different pharmaceutical excipients[J]. Molecular and Cellular Probes,2015,29(6):473-478.
- [6] Stoeckle M Y, Gamble C C, Kirpekar R, et al. Commercial teas high-light plant DNA barcode identification successes and obstacles[J]. Scientific Reports,2011,1:42.
- [7] Arolla R G, Cherukupalli N, Khareedu V R, et al. DNA barcoding and haplotyping in different species of *Andrographis*[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2015,62:91-97.
- [8] Simone N M R, Marcela M S, Goncalo A G P, et al. Plant and metagenomic DNA extraction of mucilaginous seeds[J]. MethodsX, 2014(1):225-228.
- [9] 宁淑萍,颜海飞,郝刚,等. 植物DNA条形码研究进展[J]. 生物多样性,2008,16(5):417-425.
- [10] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. PNAS,1994,106(31):51-52.
- [11] Kress W J, Erickson D L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,105(8):2761-2762.
- [12] 徐晗,孙旻旻,吴品珊,等. DNA条形码、形态学与地理分布相结合的植物果实(种子)鉴定方法——以口岸截获的外来入侵植物犬蔷薇(*Rosa canina* L.)为例[J]. 杂草科学,2015,33(2):26-31.
- [13] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon,2007,56(2):295-299.
- [14] 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.
- [15] 卢松茂,陈振东,林秀香,等. 基于rDNA-ITS序列的天门冬拟茎点霉与相似种的系统发育关系[J]. 江苏农业学报,2015,31(1):62-67.
- [16] 谭丽盈,郑婕. 基于*rbcl*序列鉴别十大功劳叶及其伪品[J]. 北方药学,2012,9(4):1-2.
- [17] 张驰,方昕,邱皓璞,等. 木材DNA条形码鉴定研究进展[J]. 世界林业研究,2015,28(1):50-55.
- [18] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae[J]. Molecular Ecology Resources,2008,8(3):480-490.
- [19] Schindel D E, Miller S E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy[J]. Proceedings of the National of Sciences,2007,104(12):4775-4776.
- [20] 汤欢,师玉华,屠鹏飞,等. 凉茶药材布渣叶及其混伪品的DNA条形码鉴定[J]. 中国药理学杂志,2015(17):1479-1484.
- [21] 黄琼林,梁凌玲,何瑞,等. 青天葵及其混伪品的*rbcl*基因序列鉴定研究[J]. 热带作物学报,2012,33(9):1630-1634.
- [22] 王晓明,姬可平,牛宪立,等. *matK*序列作为DNA条形码在中药鸡骨草中的作用[J]. 广东农业科学,2013(2):132-134.
- [23] 张忠廉,宋美芳,李海涛,等. 千斤拔属药用植物DNA条形码鉴定研究[J]. 中草药,2015(1):118-122.
- [24] Liu Y, Sun W, Liu C, et al. Identification of *Hippophae* species (Shaji) through DNA barcodes[J]. Chinese Medicine,2015,10(10):28.
- [25] 王俊,刘霞,孙伟,等. 名贵药材血竭的DNA条形码鉴定研究[J]. 中国药理学杂志,2015(15):1261-1265.
- [26] Lv T, Teng R, Shao Q, et al. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants[J]. Planta,2015,242(5):1167-1174.
- [27] Silva J N, Da Costa A B, Silva J V, et al. DNA barcoding and phylogeny in neotropical species of the genus *Spondias*[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2015,61:240-243.
- [28] Zhu X, Zhang Y, Liu X, et al. Authentication of commercial processed *Glehnia Radix* (Beishashen) by DNA barcodes[J]. Chinese Medicine,2015,10(9):35.
- [29] 杨培. 石斛、北豆根、肉桂的DNA条形码鉴定及石斛叶绿体基因组研究[D]. 北京:北京协和医学院,2015.
- [30] 杨雪莹,宋炳轲,裴黎,等. 植物物证的DNA条形码鉴定分析[J]. 中国法医学杂志,2015,30(2):189-190.
- [31] 杨雪莹,曹海丹,裴黎,等. 基于ITS2条形码序列对新型“香料”毒品植物成分的研究[J]. 刑事技术,2015,40(1):71-73.
- [32] 宋炳轲,杨雪莹,倪萍娅,等. DNA条形码技术在毒品原植物大麻鉴定中的作用[J]. 广西植物,2014,34(4):552-556.
- [33] 宋炳轲,冯涛,杨雪莹,等. 基于*psbA-trnH*条形码的毒品原植物大麻及其混伪品的鉴别[J]. 刑事技术,2014(6):39-41.
- [34] 焦丽娟,税玉民. 中国秋海棠属(秋海棠科)植物的DNA条形码评价[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(6):715-724.
- [35] 张玉霄,许宇星,马朋飞,等. 竹亚科叶绿体DNA条形码筛选[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(6):743-750.
- [36] 董洋龙,於林江,周拓,等. 基于ITS技术的11个茶花品种遗传多样性研究[J]. 中国农学通报,29(13):145-149.
- [37] 黄卫娟. 荞麦及其野生近缘种的DNA条形码鉴定[D]. 北京:中央民族大学,2014.
- [38] von Cräutlein M, Korpeläinen H, Pietiläinen M, et al. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity[J]. Biodiversity and Conservation,2011,20(2):373-389.
- [39] 杨雪莹,曹海丹,裴黎. 采用DNA条形码技术鉴定常见杨树树种属初探[J]. 中国法医学杂志,2015,30(1):9-11,15.
- [40] Ren B Q, Xiang X G, Chen Z D. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers[J]. Molecular Ecology Resources,2010,10(4):594-605.
- [41] 刘娜,李梦臻. DNA条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):10-12.
- [42] 丁摇滢,邢光东,胡肆农,等. 识别杜洛克猪个体身份的DNA条形码[J]. 江苏农业学报,2014,30(5):1058-1063.
- [43] 胡伟毅,汪连军,黎国勋,等. 5种DNA条形码在苍耳属中遗传距离比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):36-38.