

• 药材与资源 •

基于多基因组片段构建枸杞属药用植物 DNA 条形码

倪梁红, 赵志礼*, 陆佳妮

上海中医药大学中药学院 生药学教研室, 上海 201203

摘要: 目的 采用核基因组核糖体 DNA ITS 区、叶绿体基因组 9 个 DNA 片段和线粒体基因组 2 个 DNA 片段构建国产枸杞属药用植物 DNA 条形码。方法 采集枸杞属黑果枸杞 *Lycium ruthenicum*、黄果枸杞 *L. barbarum* var. *auranticarpum*、宁夏枸杞 *L. barbarum*、枸杞 *L. chinense* 和新疆枸杞 *L. dasystemum* 5 个分类群标本及实验样品, 测定各样品的核糖体 ITS 区, 叶绿体 *matK*、*rbcL*、*rpoC1*、*trnL*(UAA)intron、*psbA-trnH*、*atpB-rbcL*、*trnS*(GCU)-*trnG*(UCC)、*rpl20-rps12*、*trnL*(UAA)-*trnF*(GAA)和线粒体 *nad1* 第 2 内含子、*nad5* 第 4 内含子序列; 以全萼秦艽 *Gentiana lhasica* 为外类群, 进行系统学分析。结果 共获得 108 条序列, ITS 区变异位点最为丰富; 筛选出 6 个叶绿体 DNA 片段; 2 个线粒体 DNA 片段可作为该属 3 个物种的条形码推荐序列; 构建各物种多基因组多片段组合 DNA 条形码。结论 ITS 区及筛选的 6 个叶绿体 DNA 片段均具有物种鉴别意义; 2 个线粒体 DNA 片段具有一定鉴别意义; 为枸杞类物种鉴定及遗传背景分析提供基础资料。

关键词: 枸杞属; ITS; 叶绿体 DNA; 线粒体 DNA; DNA 条形码

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2328-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.021

DNA barcoding construction of medicinal plants in genus *Lycium* L. based on multiple genomic segments

NI Liang-hong, ZHAO Zhi-li, LU Jia-ni

Department of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To construct the DNA barcoding of medicinal plants in genus *Lycium* L. from China based on sequences of ITS, nine chloroplast DNA segments, and two mitochondrial DNA segments. **Methods** Specimens and samples of *Lycium ruthenicum*, *L. barbarum* var. *auranticarpum*, *L. barbarum*, *L. chinense*, and *L. dasystemum* were collected and nuclear DNA ITS, chloroplast DNA *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *trnL* (UAA) intron, *psbA-trnH*, *atpB-rbcL*, *trnS* (GCU)-*trnG* (UCC), *rpl20-rps12*, *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA), and mitochondrial DNA *nad1*/b-c and *nad5*/d-e were sequenced from these samples. *Gentiana lhasica* was used as the external group to make statistical analysis. **Results** One hundred and eight sequences were obtained. The mutation site of ITS region was the most abundant; The six chloroplast DNA fragments were selected; Two mitochondrial DNA fragments could be used as the bar code recommendation sequences of the three species from the genus, and the multiple genomic and multi fragment combination DNA bar code of each species was constructed. **Conclusion** ITS region and the screening of six chloroplast DNA fragments have the significance of species identification; The two mitochondrial DNA fragments have a certain significance. The study may provide the reference for the species identification and genetic background of the plants in *Lycium* L. from China.

Key words: *Lycium* L.; ITS; chloroplast DNA; mitochondrial DNA; DNA barcoding

茄科 (Solanaceae) 枸杞属 *Lycium* L. 植物国产 7 种 3 变种; 其果实、根或叶在各地多药用或作为保健品食用, 具有很高的药用及经济价值^[1]。《中国药典》2015 年版^[2]规定中药枸杞子的基原植物为该属宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L., 但实际应用情况

较为复杂, 该属一些近缘植物的红色果实亦作为混淆品使用^[3]。同时, 宁夏枸杞及枸杞 *Lycium chinense* Mill. 的干燥根皮作为中药地骨皮入药。

因枸杞属植物近缘物种形态相近, 营养器官变异幅度较大, 加上产地、环境等因素的影响, 应用

收稿日期: 2015-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173654)

作者简介: 倪梁红 (1980—), 男, 讲师, 研究方向为民族药资源与品种鉴定。

*通信作者 赵志礼, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与品种鉴定研究。Tel: (021)51322202 E-mail: zhilzhao@sohu.com

传统鉴定方法存在一定局限性。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,植物 DNA 序列被大量应用于药用植物的分子鉴定,显示出极大的优势^[4-6]。然而,对于亲缘关系相近的物种,仅凭单一 DNA 序列片段常无法提供很好的物种分辨率;往往通过筛选大量多基因组序列,寻找多片段组合有效物种鉴定信息,以提升鉴别效率。

目前,已有学者^[3]进行枸杞类核基因组 ITS2 条形码鉴定等工作,取得一定进展。在参考国内外相关研究工作的基础上,本课题组扩大国产枸杞属近缘物种采集数量,并进一步开展了核基因组 ITS 区、叶绿体基因组 *matK*、*rbcL*、*rpoC1*、*trnL*(UAA)intron、

psbA-trnH、*atpB-rbcL*、*trnS*(GCU)-*trnG*(UCC)、*rpl20-rps12*、*trnL*(UAA)-*trnF*(GAA)及线粒体基因组 *nad1* 第 2 内含子(*nad1/b-c*)和 *nad5* 第 4 内含子(*nad5/d-e*)序列(共 12 个片段)的筛选,评价各片段的物种鉴定意义,寻找稳定、高效的片段组合,构建各物种的 DNA 条形码,以期为国产枸杞属药用植物物种鉴定及遗传背景分析提供基础资料。

1 材料

标本均为自采,同时取新鲜叶片,经硅胶快速干燥,备用。凭证标本经赵志礼教授鉴定,存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室,样品信息及鉴定结果见表 1。

表 1 样品与凭证标本
Table 1 Samples and voucher specimens

植物名称	凭证标本	采集地
黑果枸杞 <i>Lycium ruthenicum</i>	NX2015001	宁夏同心县河西镇
黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>auranticarpum</i>	NX2015002	宁夏同心县河西镇
宁夏枸杞-1 <i>L. barbarum</i>	NX2015003-1	宁夏同心县河西镇
宁夏枸杞-2 <i>L. barbarum</i>	NX2015003-2	宁夏同心县河西镇
枸杞-1 <i>L. chinense</i>	SH2015001	上海中医药大学百草园
枸杞-2 <i>L. chinense</i>	SH2015002	上海中医药大学百草园
新疆枸杞-1 <i>L. dasystemum</i>	2015LZ001-1	甘肃兰州白塔山
新疆枸杞-2 <i>L. dasystemum</i>	2015LZ001-2	甘肃兰州白塔山
全萼秦艽 <i>Gentiana lhasica</i> (外类群)	XZ201303-1	西藏米拉山口山坡草地

2 方法

2.1 总 DNA 提取

取上述干燥植物叶片,液氮中研磨成粉末,采用改良 CTAB 法^[7]进行总 DNA 提取。

2.2 PCR 扩增和测序

对核糖体 ITS 区、叶绿体 *matK*、*rbcL*、*rpoC1*、*trnL*(UAA)intron、*psbA-trnH*、*atpB-rbcL*、*trnS*(GCU)-*trnG*(UCC)、*rpl20-rps12*、*trnL*(UAA)-*trnF*(GAA)及线粒体 *nad1/b-c* 和 *nad5/d-e* 共 12 个片段进行扩增,引物及 PCR 反应条件参考相关文献方法^[8-9]。扩增产物经电泳确认有清晰目的条带后送上海生工生物有限公司纯化并测序(ABI 3730xl 型测序仪)。

2.3 序列数据分析

各片段的起止范围参考 GenBank 中相关序列。应用 MEGA 5.03 软件计算 ITS 区各段的碱基量,并计算成对比较时的位点变异值及 K2P 遗传距离。各物种的 ITS 区、叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 序列分别应用 ClustalW 对齐,分析变异位点。

3 结果与分析

3.1 序列的获得

直接测序法获得 108 条序列,全部上传至 GenBank,共获得 108 个登录号(表 2)。物种内各样品间序列均分别一致。

3.2 序列分析

3.2.1 ITS 区序列分析 ITS 区序列分析显示,枸杞属 5 种样品的 ITS 区长度范围在 611~630 bp,其中 ITS1 长度为 222~241 bp,5.8 S 区均为 164 bp,ITS2 长度为 220~225 bp。任意两组序列比较,均有位点变异情况,变异位点数为 14~56;同时,每个物种均有可与其他 4 个物种区分的鉴别位点,其中新疆枸杞鉴别位点最为丰富,共有 22 个。K2P 遗传距离变异幅度为 0.025~0.107,新疆枸杞与其他物种的遗传距离相对较远(表 3 和表 4)。

3.2.2 叶绿体 DNA 序列分析 基于叶绿体 DNA 序列比对,各物种的 *atpB-rbcL*、*rpoC1* 和 *rbcL* 序列分别完全一致,无变异位点;而其他 6 个片段均具有变异位点,且每个物种均具有鉴别位点(表 5)。基于 *trnL*

表 2 序列 GenBank 登录号

Table 2 GenBank accession numbers

物种	ITS	<i>matK</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnL</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>atpB-rbcL</i>	<i>rpl20-rps12</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>nad1/b-c</i>	<i>nad5/d-e</i>
黑果枸杞	KT906358	KT906308	KT906328	KT906333	KT906318	KT906343	KT906313	KT906303	KT906323	KT906338	KT906348	KT906353
黄果枸杞	KT906359	KT906309	KT906329	KT906334	KT906319	KT906344	KT906314	KT906304	KT906324	KT906339	KT906349	KT906354
宁夏枸杞-1	KT906360	KT906310	KT906330	KT906335	KT906320	KT906345	KT906315	KT906305	KT906325	KT906340	KT906350	KT906355
宁夏枸杞-2	KU314470	KU314446	KU314458	KU314461	KU314452	KU314467	KU314449	KU314443	KU314455	KU314464	KU314473	KU314476
枸杞-1	KT906361	KT906311	KT906331	KT906336	KT906321	KT906346	KT906316	KT906306	KT906326	KT906341	KT906351	KT906356
枸杞-2	KU314471	KU314447	KU314459	KU314462	KU314453	KU314468	KU314450	KU314444	KU314456	KU314465	KU314474	KU314477
新疆枸杞-1	KT906362	KT906312	KT906332	KT906337	KT906322	KT906347	KT906317	KT906307	KT906327	KT906342	KT906352	KT906357
新疆枸杞-2	KU314472	KU314448	KU314460	KU314463	KU314454	KU314469	KU314451	KU314445	KU314457	KU314466	KU314475	KU314478
全萼秦艽	KJ947801	KJ947441	KJ947631	KJ947676	KJ947541	KJ947766	KJ947491	KJ947394	KJ947586	KJ947721	KP718881	KR184744

表 3 ITS 区序列信息

Table 3 Basic information of ITS sequences

物种	占比/%				长度/bp				鉴别位点数
	T	C	A	G	ITS1	5.8 S	ITS2	总长	
黑果枸杞	19.31	32.57	18.49	29.62	222	164	225	611	7
黄果枸杞	19.42	32.04	18.93	29.61	229	164	225	618	5
宁夏枸杞	20.32	31.04	19.04	29.60	241	164	220	625	18
枸杞	18.25	33.81	17.14	30.79	241	164	225	630	7
新疆枸杞	20.00	32.06	19.68	28.25	241	164	225	630	22

表 4 ITS 序列成对比较时的位点变异值 (上三角: 变异位点; 下三角: K2P 遗传距离)

Table 4 Pairwise comparison on ITS sequences of point mutations (above diagonal) and K2P genetic distance (below diagonal)

物种	黑果枸杞	黄果枸杞	宁夏枸杞	枸杞	新疆枸杞
黑果枸杞	—	14	53	33	56
黄果枸杞	0.025	—	48	34	55
宁夏枸杞	0.098	0.088	—	38	54
枸杞	0.059	0.061	0.069	—	41
新疆枸杞	0.107	0.102	0.100	0.075	—

表 5 叶绿体 DNA 片段变异位点信息

Table 5 Variable sites of chloroplast DNA segments

物种	<i>matK</i> /bp		<i>rpl20-rps12</i> /bp			<i>trnL</i> /bp		<i>trnL-trnF</i> /bp		<i>trnS-trnG</i> /bp			<i>psbA-trnH</i> /bp		
	206	508	61 ^c	208 ^d	681	159 ^a	381	31	306 ^b	311	377	429 ^e	10 个位点 ^b	220	313
黑果枸杞	C	G	C	C	T	A	C	C	A	A	A	C	—	G	G
黄果枸杞	C	G	C	C	T	G	C	C	G	A	A	C	*	G	G
宁夏枸杞	A	A	A	C	C	G	T	A	A	T	T	C	—	T	T
枸杞	A	A	C	A	C	G	T	A	A	T	A	C	—	G	T
新疆枸杞	A	A	C	C	C	G	T	A	A	T	T	A	—	T	T

a-黑果枸杞鉴别位点 b-黄果枸杞鉴别位点 c-宁夏枸杞鉴别位点 d-枸杞鉴别位点 e-新疆枸杞鉴别位点 *黄果枸杞的 10 个鉴别位点

a-black fruit wolfberry loci identified b-cambogia wolfberry differential sites c-means Ningxia wolfberry differential sites d-lysergic wolfberry differential sites EU1 of *L.barbarum* differential sites **psbA-trnH* sequence cambogia medlar ten loci identified

(UAA)intron 片段可鉴别黑果枸杞; *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) 和 *psbA-trnH* 片段均可鉴别黄果枸杞; *rpl20-rps12* 片段可鉴别宁夏枸杞和枸杞;

trnS(GCU)-*trnG*(UCC)片段可鉴别新疆枸杞。黄果枸杞的鉴别位点最为丰富, 其中 *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) 片段中有 1 个, *psbA-trnH* 片段中有 10 个。

3.2.3 线粒体 DNA 序列分析 基于线粒体 DNA 序列比对, *nad1/b-c* 片段具有 1 个变异位点; *nad5/d-e* 片段具有 3 个变异位点, 基于此 2 个片段可鉴别枸杞和黄果枸杞 (表 6)。

3.2.4 各物种多片段组合 DNA 条形码序列 综合以上分析, ITS 区及筛选出的 6 个叶绿体 DNA 片段均具有物种鉴别意义; 线粒体 DNA 2 个片段可鉴别枸杞、黑果枸杞和黄果枸杞, 但不能区别宁夏枸杞及新疆枸杞 2 个物种。为提高 DNA 条形码的实用性及可操作性, 分别选取各基因组鉴别位点最为丰富的片段, 进一步优化组合, 提出该物种的 DNA 条形码鉴定序列 (表 7)。

表 6 线粒体 DNA 片段变异位点信息
Table 6 Variable sites of mitochondrial DNA segments

物种	<i>nad5/d-e</i> 变异位点/bp			<i>nad1/b-c</i> 变异位点
	597 ^a	704	880 ^b	902
黑果枸杞	T	A	A	T
黄果枸杞	T	A	C	T
宁夏枸杞	T	C	A	G
枸杞	G	C	A	G
新疆枸杞	T	C	A	G

a-枸杞鉴别位点 b-黄果枸杞鉴别位点

a-lysergic wolfberry differential sites EU1 of *L.barbarum*
differential sites b-cambogia wolfberry differential sites

表 7 枸杞属 5 种植物物种鉴定 DNA 条形码推荐序列组合
Table 7 Proposed DNA barcoding markers for five taxa of *Lycium* L.

物种	序列组合
黑果枸杞	ITS、 <i>trnL</i> (UAA)intron、 <i>nad5/d-e</i> 、 <i>nad1/b-c</i>
黄果枸杞	ITS、 <i>psbA-trnH</i> 、 <i>nad5/d-e</i> 、 <i>nad1/b-c</i>
宁夏枸杞	ITS、 <i>rpl20-rps12</i>
枸杞	ITS、 <i>rpl20-rps12</i> 、 <i>nad5/d-e</i> 、 <i>nad1/b-c</i>
新疆枸杞	ITS、 <i>trnS</i> (GCU)- <i>trnG</i> (UCC)

3.3 NJ 系统树

分别将各样品的 ITS 区、9 个叶绿体片段和 2 个线粒体片段组合, 以全萼秦艽为外类群, 基于所有序列构建 NJ 系统树 (Kimura 2-parameter 模型, bootstrap 1 000 次重复)。结果显示, 外类群首先单独区分开; 宁夏枸杞和新疆枸杞聚为一小支, 再与枸杞聚为一支; 黑果枸杞和黄果枸杞聚为一支 (图 1)。

4 讨论

鉴于植物物种进化程度、物种数量的多样性及各自遗传背景的复杂性等, 构建相应的 DNA 条

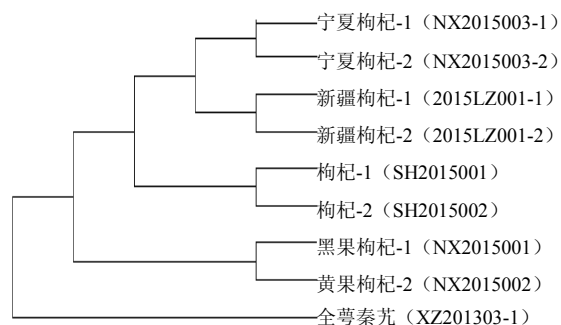


图 1 基于所有 DNA 序列构建的 NJ 系统树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree based on all DNA sequences

形码是一项长期艰巨的系统工作。核基因组核糖体 DNA ITS 区因其具多拷贝^[10], 易扩增、进化速率快及变异位点丰富等特点, 常被用作构建条形码的候选序列。但双亲遗传, 存在杂合现象, 较易受环境等因素影响而发生变异。而被子植物叶绿体和线粒体 DNA 均为单亲遗传, 不存在序列杂合的影响^[11], 且序列较为保守。同时, 对来源于植物地下部分的药材 (如根、根茎类等) 而言, 获取线粒体 DNA 鉴定信息更为可行^[12]。

本实验分别评价了 3 个基因组 12 个片段的枸杞属物种鉴别意义, 即具物种分辨率的 ITS 区序列及筛选出的 6 个叶绿体 DNA 片段; 线粒体 DNA 2 个片段可鉴别枸杞、黑果枸杞和黄果枸杞, 但不能区别宁夏枸杞及新疆枸杞 2 个物种。为提高 DNA 条形码的实用性及可操作性, 分别选取各基因组鉴别位点最为丰富的片段, 进一步优化组合, 提出了该物种的 DNA 条形码鉴定序列, 以提升这些条形码的实际应用价值。同时, 本实验可为枸杞类遗传背景分析提供基础资料。

据《中国植物志》记载, 黄果枸杞为宁夏枸杞一变种, 与原种的主要区别在于叶形狭窄, 果实橙黄色, 种子较少^[1]。而在上述 NJ 系统树中, 黄果枸杞和黑果枸杞聚为一支, 与宁夏枸杞相对较远, 在基因水平上显示了显著的物种间断特性, 提示该分类群可能为一与黑果枸杞近缘的独立物种。陈天云等^[13]发表一新种小叶黄果枸杞, 据原始文献描述, 该新种与宁夏枸杞相接近, 且模式标本采自中宁县; 然而令人遗憾的是并未指出其与黄果枸杞的系统关系。本实验 DNA 数据似支持黄果枸杞独立为一个物种。当务之急是开展该分类群系统位置及合法名称的进一步确定; 黄色果实品质的深入评价、栽培学研究及市场开发可行性的分析等。

枸杞属植物栽培历史悠久,同一物种具有不同的品种(系),品种(系)间遗传背景复杂多样,给应用分子手段进行种间区分带来一定难度,特别是变种与原变种的区分^[14-15]。下一步需加大样本量,广泛筛选更多 DNA 片段,为解决复杂的品种鉴定问题提供坚实的基础资料。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 67 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 辛天怡, 姚 辉, 马晓冲, 等. 宁夏枸杞及其同属近缘物种 ITS 2 条形码鉴定 [A] // 中药与天然药高峰论坛暨第十二届全国中药和天然药物学术研讨会论文集 [C]. 海口: 中国药学会中药和天然药委员会, 2012.
- [4] 陈士林, 姚 辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [5] Kres 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: 8369-8347.
- [6] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. ITS 和 *psbA-trnH* 序列鉴别绿绒蒿属藏药植物 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 541-545.
- [7] Stewart C N J, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. *Biol Technol*, 1993, 14(5): 748-750.
- [8] 倪梁红, 赵志礼, 吴新荣, 等. 3 种藏药基原植物遗传多样性研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3883-3888.
- [9] Duminil J, Pemonge M H, Petit R J. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA [J]. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2(4): 428-430.
- [10] 李春香, 杨 群. PCR 产物直接测序还是克隆测序——密叶杉属 rDNAITS 序列的测定方法 [J]. 植物学通报, 2002, 19(6): 698-704.
- [11] Birky C W J. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25): 11331-11338.
- [12] 陆佳妮, 赵志礼, 倪梁红, 等. 线粒体基因在药用植物 DNA 分子鉴定中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1791-1796.
- [13] 陈天云, 蒋旭亮, 李清善, 等. 宁夏枸杞属 (茄科) 一新种和一新变种 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 5-8.
- [14] 尹 跃. 枸杞品种 (系) 分子鉴定及亲缘关系分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [15] 张 波, 李 敦, 戴国礼, 等. 22 份枸杞属种质的 RAPD 分析 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(5): 112-113.