

植物DNA条形码研究展望

李德铎^{1,2*} 曾春霞¹

1 (中国科学院昆明植物研究所中国西南野生生物种质资源库, 昆明 650201)

2 (中国科学院昆明植物研究所东亚植物多样性和生物地理学重点实验室, 昆明 650201)

Prospects for plant DNA barcoding

Dezhu Li^{1,2*}, Chunxia Zeng¹

1 China Germplasm Bank of Wild Species, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

2 Key Laboratory for Plant Diversity and Biogeography of East Asia, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

物种的鉴定是生物多样性研究的基石之一。在DNA双螺旋结构发现50年之际, 加拿大学者提出了通过DNA条形码, 即标准化的、较短的DNA序列对物种进行快速、准确鉴定的动议(Hebert *et al.*, 2003)。经过12年的发展, DNA条形码已成为生物多样性研究领域发展最迅速的方向之一。一方面, DNA条形码和分子系统发育的研究使分类学、生态学、进化生物学等传统领域焕发出新的活力, 极大推动了生物分类学的发展; 另一方面, 由于该方法自诞生之日起就带有很强的实用价值, 在海关、动植物检验检疫、食品安全和法医等方面, 基于DNA条形码标准数据库对“非标准材料”的鉴定也展示出了广阔的应用前景。

由于植物线粒体基因的进化速率相对较慢, 如何从叶绿体基因组和核基因中寻找引物通用性高、测序质量好、物种分辨率高的DNA条形码候选片段一直是困扰植物学界的问题。通过协同努力, 国际生命条形码联盟植物工作组(CBOL Plant Working Group, 2009)建议将 $rbcL + matK$ 组合作为陆地植物的核心DNA条形码, 用于构建植物物种鉴定的统一框图。作为国际生命条形码计划(International Barcode of Life Project)的4个中心节点之一, 我国也积极参与了该计划的发展。植物核心条形码的确定是DNA条形码参考数据库建立的重要前提。我国植物

条形码研究团队基于更大规模取样的比较分析, 提出了将ITS或ITS2纳入种子植物核心条形码的建议(Yao *et al.*, 2010; China Plant BOL Group *et al.*, 2011)。2009年, 中国科学院昆明植物研究所联合全国相关科研院所和高校, 启动了“中国维管植物DNA条形码的获取和标准数据库的构建工作”。在此基础上, 2012年启动了新一代植物志iFlora研究计划(李德铎等, 2012), 该计划的目标是在5年内完成中国80%维管植物属级水平DNA条形码标准数据库的构建和基于云服务的物种快速鉴定和信息共享平台, 为专家和公众便捷、准确了解和获取植物多样性和遗传信息提供全新的认知手段和平台。

DNA条形码的应用解决了许多类群的物种鉴定问题(如Liu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013a), 但由于多倍化、杂交和辐射进化等因素, 在不少类群中利用现有的核心条形码对物种进行鉴定仍然存在局限性(Collins & Cruickshank, 2013; Percy *et al.*, 2014)。结合新一代测序技术和计算机技术的发展, 2013年在昆明召开的“第五届国际生命条形码大会”明确提出探讨植物DNA条形码2.0 (plant DNA barcode 2.0)的必要性, 即从单个或(和)少数DNA片段向利用大量DNA片段乃至细胞器基因组数据发展的趋势。植物DNA条形码2.0的主要趋势包括超级条形码(ultra-barcode)或细胞器条形码(organelle-bar-

收稿日期: 2015-05-17; 接受日期: 2015-05-19

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(2014CB954100)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: dzl@mail.kib.ac.cn

code)、微条形码(mini-barcode)以及通过新一代测序技术的基因组浅层测序(genome skimming)等方面。

超级条形码即通过新一代测序的办法获得全叶绿体基因组序列,用于近缘物种的鉴定(Kane *et al.*, 2012)。最近,我们利用GenBank现有被子植物叶绿体基因组数据自主设计了一套新颖的通用引物,结合长片段PCR和二代测序技术,可从少量总DNA中快速获取被子植物叶绿体全基因组。这一技术体系有效地解决了一些物种因个体微小而难于获得大量新鲜材料的难题,将叶绿体基因组测序通量提高了5–10倍,极大地降低了测序成本(Yang *et al.*, 2014)。通过长片段PCR扩增叶绿体片段(Yang *et al.*, 2014)、富集细胞器DNA (Yang *et al.*, 2013b; Ma *et al.*, 2014)或通过基因组浅层测序(Besnard *et al.*, 2014; Bock *et al.*, 2014)的方法,可获得全叶绿体基因组序列,并构建叶绿体基因组barcode 2.0数据库。基于细胞器条形码的超级条形码对于快速分化的近缘物种的鉴定具有重要作用,也是对核心条形码标准数据库的重要补充。

在DNA条形码技术的实际应用中还经常会遇到一些缺乏鉴别特征的“非标准材料”或样本碎片,如植物制品(中药材、木制家具、茶叶、卷烟等),以及植物根系、动物消化物等。此类样品的特点是或其DNA高度降解,或DNA提取浓度低,或受外源DNA污染(Rogers & Bendich, 1985; Staats *et al.*, 2011)。这些问题使得利用上述研究方法和技术获取DNA条形码非常困难,需要采用新的思路和手段,基于已有的DNA序列,利用片段更短、更易获得和具有一定物种鉴定率的微条形码或微条形码组合开展物种的鉴定。方涛等(2013)较为系统地研究了植物标本DNA的提取方法、核心条形码和微条形码的扩增与测序条件,总结了从标本获取微条形码的实验技术流程。最近,我们通过对6个微条形码(即ITS2、*psbI-psbK*、*trnH-psbA*、*trnL P6 loop*、TabE-

TabF、*trnE-trnY*)与核心条形码的通用性、PCR与测序成功率、物种鉴定率的比较研究,发现微条形码的通用性、PCR与测序成功率都高于核心条形码,微条形码组合在部分物种中的鉴定率与核心条形码相当(Zeng *et al.*, 待发表)。随着叶绿体基因组数据库和全基因组数据库的不断完善,通过基因组浅层测序和大数据的分析,从降解样品中获得大量微条形码基因信息,用于降解样品的物种鉴定已展现出广阔的前景(Besnard *et al.*, 2014)。

值得关注的是,将DNA条形码技术引入到群落生态学和区系地理学中,开展群落系统发育学(community phylogenetics)和系统发育区系学(phylofloristics)研究,是系统发育生物学与生态学的交叉融合,已成为近年来新的研究热点(Joly *et al.*, 2014; Kress *et al.*, 2015)。前者基于DNA条形码构建群落的系统发育树,研究群落物种组成和群落构建机制;或结合样地环境因子数据,研究在全球气候变化情景下群落物种组成的变化规律和维持机制等科学问题。后者利用DNA条形码序列重建特定区系中植物的高分辨率宏系统发育树,结合系统发育多样性指数、现代环境因子与地质历史事件,揭示该植物区系的形成原因和演化历史,有可能成为区系地理学发展的一个新方向。

总之,近十年来,植物DNA条形码研究取得了长足发展。植物DNA条形码标准数据库的建立和应用极大地促进了植物分类学、区系地理学、生物多样性调查与评估、生态学和保护生物学等相关学科的发展,在海关、检验检疫和食品安全等领域也具有广泛的应用前景。我们相信,DNA条形码的发展将进一步提升公众对生物多样性的认识,有效地服务于生物多样性保护和生物资源的合理利用。

文中引用的参考文献见附录1 (<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/w2015-135-1.pdf>)。

(责任编辑:黄祥忠)

附录1 参考文献

- Besnard G, Christin PA, Malé PJG, Lhuillier E, Lauzeral C, Coissac E, Vorontsova MS (2014) From museums to genomics: old herbarium specimens shed light on a C₃ to C₄ transition. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 6711-6721.
- Bock DG, Kane NC, Ebert DP, Rieseberg LH (2014) Genome skimming reveals the origin of the Jerusalem Artichoke tuber crop species: neither from Jerusalem nor an Artichoke. *New Phytologist*, **201**, 1021-1030.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**, 12794-12797.
- China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **108**, 19641-19646.
- Collins RA, Cruickshank RH (2013) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 969-975.
- Fang T (方涛), Zeng CX (曾春霞), Yang JB (杨俊波), Li DZ (李德铎) (2013) Herbarium collections and iFlora. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **35**, 687-692. (in Chinese with English abstract).
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**, 313-321.
- Joly S, Davies TJ, Archambault A, Bruneau A, Derry A, Kembel SW, Peres-Neto P, Vamosi J, Wheeler TA (2014) Ecology in the age of DNA barcoding: the resource, the promise and the challenges ahead. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 221-232.
- Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, Yang JY, Zhang D, Engels JM, Cronk Q (2012) Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, **99**, 320-329.
- Kress WJ, Garcia-Robiedo C, Uriarte M, Erickson DL (2015) DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **30**, 25-35.
- Li DZ (李德铎), Wang YH (王雨华), Yi TS (伊廷双), Wang H (王红), Gao LM (高连明), Yang JB (杨俊波) (2012) The next-generation Flora: iFlora. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34**, 525-531. (in Chinese with English abstract)
- Liu J, Michael M, Gao LM, Poudel RC, Li DZ, Forrest A (2011) DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae), and the discovery of cryptic species. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 89-100.
- Ma PF, Zhang YX, Zeng CX, Guo ZH, Li DZ (2014) Chloroplast phylogenomic analyses resolve deep-level relationships of an intractable bamboo tribe Arundinarieae (Poaceae). *Systematic Biology*, **63**, 933-950.
- Percy DM, Argus GW, Cronk QC, Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Husband BC, Newmaster SG, Barrett SCH, Graham SW (2014) Understanding the spectacular failure of DNA barcoding in willows (*Salix*): does this result from a trans-specific selective sweep? *Molecular Ecology*, **23**, 4737-4756.
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Molecular Biology*, **5**, 69-76.
- Staats M, Cuenca A, Richardson JE, Vrieland-van Ginkel R, Petersen G, Seberg O, Bakker FT (2011) DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS ONE*, **6**, e28448.
- Yao H, Song JY, Liu C, Luo K, Han JP, Li Y, Pang XH, Xu HX, Zhu YJ, Xiao PG, Chen SL (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, **5**, e13102.
- Yang JB, Li DZ, Li HT (2014) Highly effective sequencing whole chloroplast genomes of angiosperms by nine novel universal primer pairs. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 1024-1031.
- Yang JB, Tang M, Li HT, Zhang ZR, Li DZ (2013a) Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC Evolutionary Biology*, **13**, 84.
- Yang JB, Yang SX, Li HT, Yang J, Li DZ (2013b) Comparative chloroplast genomes of *Camellia* species. *PLoS ONE*, **8**, e73053.