

# 忍冬属四种不同种质农艺学性状比较及 DNA 条形码鉴定研究

李绍吉, 蒋向辉

(凯里学院 化学与材料工程学院, 贵州 凯里 556011)

**摘要:**以忍冬属不同来源的 4 种种质为试材, 采用形态分类学的方法, 根据株高、叶长、叶宽、叶的形状、花开时间等农艺性状, 对不同种质进行了比较分析, 同时采用分子生物学的方法, 以 5 对引物对 4 份种质的 DNA 条形码序列进行 PCR 扩增和测序, 构建聚类图, 并分析物种的亲缘关系。结果表明:忍冬属 4 种种质在农艺学性状上差异不明显, 如采用形态学的方法进行鉴别容易导致误判, 然而这 4 种种质在 DNA 条形码序列上存在着丰富的遗传多样性, 研究认为在对金银花种质进行亲缘关系鉴定时, 借助 DNA 条形码序列特性与农艺学性状相结合能有效区分物种之间的差异, 鉴定结果相对可靠。

**关键词:**忍冬属; 金银花; 农艺学性状; DNA 条形码

**中图分类号:**S 567.7<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0137-04

金银花(*Lonicera japonica* Thunb.) 属忍冬科忍冬属多年生常绿藤本植物, 又名金花、银花和忍冬花, 是我国中医和民族民间医生常用的药材, 其药用价值较高, 具有广谱抗菌和散风消肿的功效, 常用于治疗清热解毒、痈肿疔疮、丹毒和血痢等病症<sup>[1]</sup>。国内外对金银花的研究主要集中在对其化学成分、药用价值等方面<sup>[2-4]</sup>, 然而药用金银花种质品种繁多, 药用成分各有差异, 2010 版药典规定金银花为忍冬(*L. japonica*) 干燥的花蕾或者是初开的花<sup>[1]</sup>, 在我国中医或民间医生都已习惯地把山银花也当作金银花使用, 并且近年来我国河北、河南、湖南等省份已连续培育出了金银花新品种, 准确鉴定不同的金银花种质, 对金银花的合理用药有十分重要的意义。

金银花的农艺学性状主要包括株形、株高、叶形、叶色、叶长、叶宽、花形、花色等指标, 而这些性状又难以用准确的文字将所有的金银花种质区分开来。随着 DNA 条形码技术的不断完善和发展, 其在药用植物物种鉴别和多样性分析中的应用越来越广泛, DNA 条形码技术的核心内容是从生物细胞细胞质或细胞核中选择相对保守的序列进行 PCR 扩增与测序, 通过序列特征分析进行物

种鉴别<sup>[5]</sup>, 当前已开发的主要有 ITS(internal transcribed spacer)、psbA-trnH、rbcL、matK 和 rbcL+matK 等序列或序列组合, 这些序列扩增条件不苛刻, 且物种特异性强, 在生物多样性分析中已经成为了常用的候选序列<sup>[6-8]</sup>。

该研究选取 ITS、psbA-trnH、rbcL、matK 和 rbcL+matK 等 5 个热点候选序列针对忍冬科忍冬属 4 份种质进行了比较研究, 并通过 DNA 条形码与农艺学性状相结合验证了各候选序列在忍冬属种质鉴定中的可靠性, 为 DNA 条形码技术应用于忍冬属种质的鉴定提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料来自贵州凯里、湖南怀化、山东平邑、浙江杭州, 于 2013 年种植于凯里学院试验基地, 试验地肥力中等。

PCR 相关试剂 dNTPs 和 DNA Polymerase 购自宝生物工程(大连)有限公司试剂; 植物基因组 DNA 提取用试剂为实验室自行配制: 2×CTAB 缓冲液(pH 8.0), Tris-biose 100 mmol/L, NaCl 1.4 mol/L, EDTA 20 mmol/L (2% 巯基乙醇用时加), TE buffer (pH 8.0), Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, 无 DNA 酶的 RNaseA 10 mg/mL。

### 1.2 试验方法

1.2.1 农艺学性状 对 4 种忍冬属种质的株型、叶长、叶宽、花形、开花时间及花色进行测量观察, 分析其外部形态的差异。

**第一作者简介:**李绍吉(1993-), 男, 贵州施秉人, 本科, 研究方向为药材成分。E-mail:jxfei789@163.com。

**责任作者:**蒋向辉(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事药材成分等研究工作。E-mail:jxfei789@163.com。

**基金项目:**贵州省科技计划厅联合基金资助项目(黔科合 LH 字[2014]7219); 贵州省教育厅重点资助项目(黔教合 KY 字[2014]281)。

**收稿日期:**2015-09-25

1.2.2 DNA提取与PCR扩增 4种忍冬属种质基因组DNA提取采用蒋向辉等<sup>[9]</sup>改良的CTAB法,用于进行PCR扩增的5对引物序列如表1所示,PCR反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性40 s,57℃退火40 s,72℃延伸40 s,35个循环;72℃后延伸5 min;最后16℃保温。

表1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequences			
引物代号 Primer code	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	碱基数 Number of base
A	trnL-cF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	20
	trnF-fR	ATTGAACTGGTGACACGAG	20
	PIpetBF	CTGCCGTATTATGTTAATG	20
B	PIpetDR	AATTTAGCTCTTAATACAGG	20
	S-trnK-F	TACTCTACCAATTGAGTTAGCAAC	23
C	S-rps16-R	AAAGGTGCTCAACCTACAAGAAC	23
	S-trnH-3-F	TGAACCGCGCATGGTGGATT	21
D	S-psbA-3-R	GTAATGCACGAACGTAATGCTCA	23
	ITS	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
E		GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG	21

### 1.3 数据分析

登入NCBI网站,将4种忍冬属种质相对应的DNA条形码序列在NCBI中进行BLAST搜索,进行物种鉴定,将结果和已经登录NCBI的序列进行相似性比对,检验序列的准确度;用MEGA 4.0软件对4个物种的序列进行比对,并根据每对引物做出一个聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 农艺学性状比较

由表2可知,黄褐毛忍冬与毛花柱忍冬叶长差异不明显,山银花叶片最长,忍冬叶片最短。山银花叶片最宽,忍冬叶片最窄,黄褐毛忍冬与毛花柱忍冬叶宽无明显差异。4种忍冬属种质叶型全为卵圆形。忍冬、毛花柱忍冬与山银花的花梗长没有明显差异,黄褐毛忍冬的花梗明显比其它3种要短。忍冬、山银花与毛花柱忍冬的集中开花期都在5—6月,山银花有一年开多次的现象,黄褐毛忍冬的集中开花期都在6—7月,比其它3种

种质要晚开花。4种忍冬属种质的花色主要有白色与黄色2种,且都是前期白色后期黄色。

表2 不同金银花种质的农艺学性状比较

Table 2 Comparison of agronomic characters of different germplasms

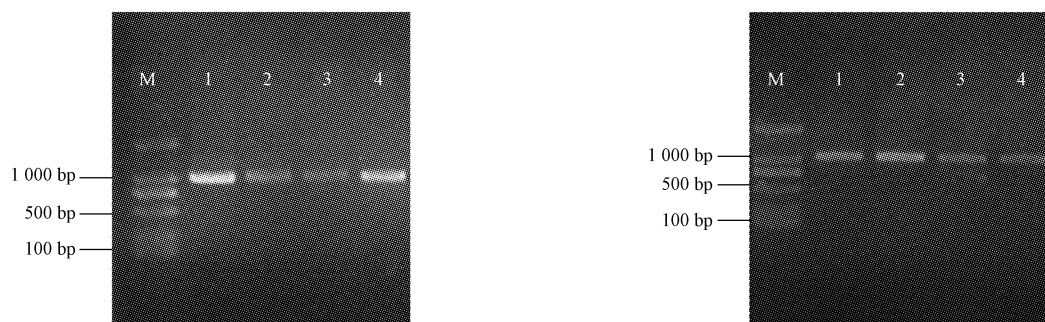
性状 Character	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>	山银花 <i>Flos lonicerae Confusae</i>	黄褐毛忍冬 <i>Lonicera fulvotomentosa</i>	毛花柱忍冬 <i>Lonicera dasystyla</i> Rehd.
叶长 Length of leaf/cm	4.2±2.5	6.5±1.5	5.5±2.0	5.8±1.5
叶宽 Leaf width/cm	3.5±2.0	4.7±1.5	4.0±1.5	4.3±1.5
叶形 Leaf shape/cm	卵圆形	卵圆形	卵圆形	卵圆形
花梗长 Length of pedicel/mm	2.0±0.5	2.0±0.5	1.5±0.5	2.0±0.5
开花期 Flowering period	5—6月	5—6月	6—7月	5—6月
花色 Flower color	白色、黄色	白色、黄色	白色、黄色	白色、黄色

### 2.2 PCR扩增及产物检测

由图1~3可知,5对引物在4种忍冬属种质中扩增条带在475~1 000 bp,带型清晰而且稳定。A引物(trnL-cF与trnF-fR)PCR扩增产物长度约1 000 bp左右,并且条带清晰,无杂带。B引物(PIpetBF与PIpetDR)PCR得到的扩增产物条带都在1 000 bp左右。C引物(S-trnK-F与S-rps16-R)的扩增产物在750~1 000 bp。D引物(S-trnH-3-F与S-psbA-3-R)扩增产物的条带在500 bp左右。E引物(ITS)扩增产物条带长度为500~800 bp。

### 2.3 物种鉴定

在对PCR产物进行回收纯化后,对产物直接进行测序,测得的序列在NCBI数据库中进行BLAST序列相似性比对,并将序列在NCBI数据库进行登录(其中ITS序列登录号JQ780991.1、JQ780990.1、JQ780986.1、JQ7317114.1)。已有大量的研究表明<sup>[10-11]</sup>,ITS在物种鉴定与多样性分析中可靠性相对较强,该研究将ITS扩增后得到的序列在NCBI中进行BLAST检索,结果显示序列相似度较高的物种分别是忍冬(*Lonicera japonica*)、山银花(*Flos lonicerae Confusae*)、黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa*)、毛花柱忍冬(*Lonicera dasystyla* Rehd.),表明试验中所用的4个物种分别为忍冬、山银花、黄褐毛忍冬、毛花柱忍冬。

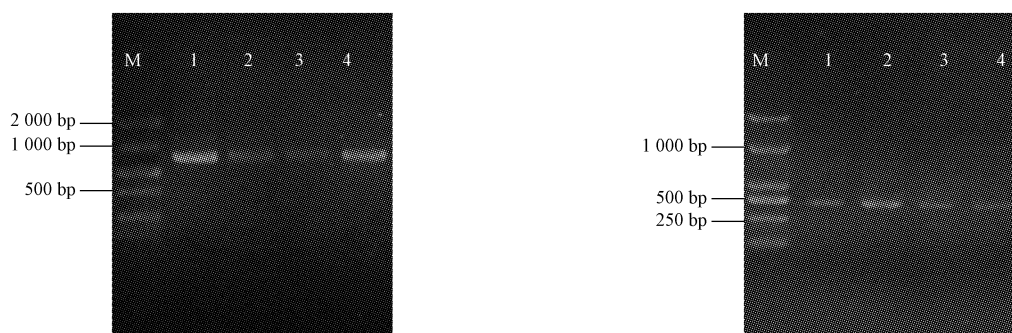


注:M为标准DNA;1、2、3、4号分别为忍冬、山银花、黄褐毛忍冬、毛花柱忍冬。

Note: M is the standard DNA; 1, 2, 3, 4 are *Lonicera japonica*, *Flos lonicerae Confusae*, *Lonicera fulvotomentosa*, *Lonicera dasystyla* Rehd., respectively.

图1 4种种质 trnL 引物(左)与 PIpetB-D 引物(右)PCR扩增图

Fig. 1 PCR amplification figure of four species by trnL primer (left) and PIpetB-D primer (right)

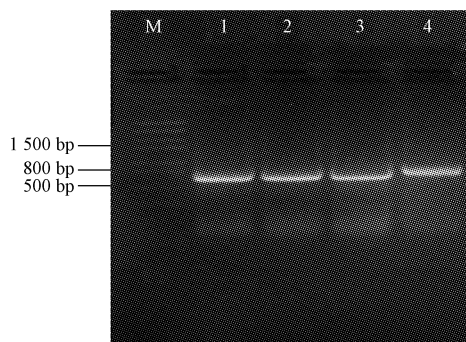


注:M为标准DNA;1、2、3、4号分别为忍冬、山银花、黄褐毛忍冬、毛花柱忍冬。

Note: M is the standard DNA; 1, 2, 3, 4 are *Lonicera japonica*, *Flos lonicerae* Confusae, *Lonicera fulvotomentosa*, *Lonicera dasystyla* Rehd., respectively.

图2 4种金银花 S-trnK-rps16 引物(左)与 S-trnHpsbA-3 引物(右)PCR 扩增图

Fig. 2 PCR amplification figure of four species by S-trnK-rps16 primer (left) and S-trnHpsbA-3



注:M为标准DNA;1、2、3、4号分别为忍冬、山银花、黄褐毛忍冬、毛花柱忍冬。

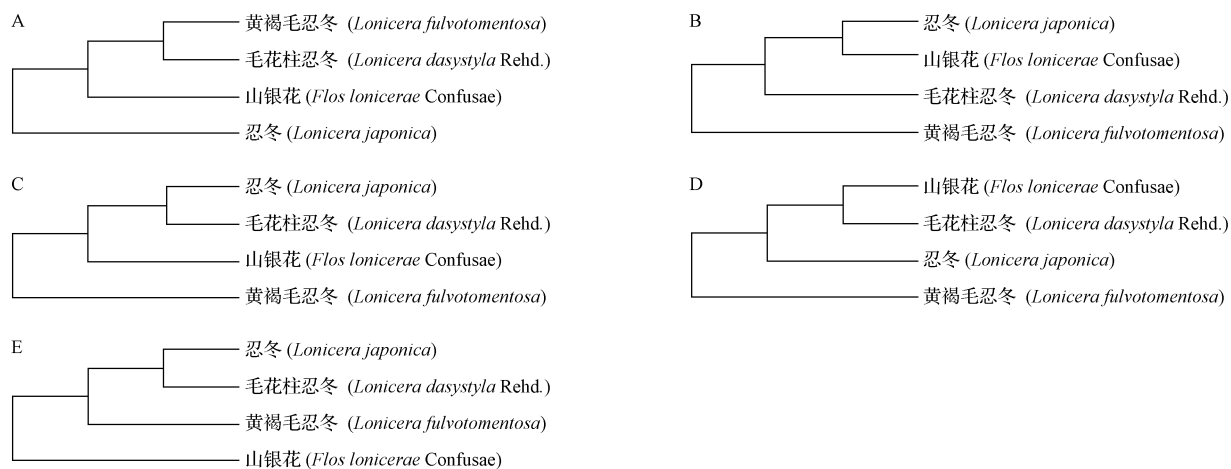
Note: M is the standard DNA; 1, 2, 3, 4 are *Lonicera japonica*, *Flos lonicerae* Confusae, *Lonicera fulvotomentosa*, *Lonicera dasystyla* Rehd., respectively.

图3 4种金银花 ITS 引物 PCR 扩增图

Fig. 3 PCR amplification figure of four species by ITS primer

## 2.4 基于DNA条形码序列的物种亲缘关系分析

由图4可以看出,利用DNA条形码在分子水平上对忍冬属4个种质进行鉴定结果显示,这4个种质亲缘关系比较接近,但由于所用引物不同,系统发育树上的聚类关系仍有一定的差异。在A引物中,忍冬单独为一枝,引物A可以很好的作为忍冬鉴别的DNA条形码引物。在引物B、C、D扩增后的物种,黄褐毛忍冬全部单独聚类为一枝,说明这3种引物对黄褐毛忍冬的鉴定特异性高,相对稳定。E引物中,山银花单独为一枝,则引物E可以很好的作为山银花鉴别的DNA条形码引物。A引物扩增的结果显示,黄褐毛忍冬和毛花柱忍冬有极高的相似性;B引物扩增的结果显示,忍冬和山银花的亲缘关系更接近;C引物扩增结果显示忍冬和毛花柱忍冬亲缘关系比较接近;基于D引物的亲缘关系分析显示山银花和毛花柱忍冬的亲缘关系最为接近;E引物扩增结果显示忍冬和毛花柱忍冬条形码序列更相似。



注:A. trnL-cF 与 trnF-fR, B. PlpetBF 与 PlpetDR, C. S-trnK-F 与 S-rps16-R, D. S-trnH-3-F 与 S-psbA-3-R, E. ITS。

Note: A. trnL-cF and trnF-fR primer, B. PlpetBF and PlpetDR primer, C. S-trnK-F and S-rps16-R primer, D. S-trnH-3-F and S-psbA-3-R primer, E. ITS primer.

图4 不同DNA条形码分别构建的4种种质亲缘关系树状图

Fig. 4 The phylogenetic relationships figure of four species which were constructed by different DNA bar code



### 3 讨论

该研究从植株叶长、叶宽、开花时间及花的颜色等方面对忍冬属 4 个种质的农艺学性状进行了比较分析,结果发现这 4 个种质在农艺学上有许多共同的特点,只存在部分细小的差异,仅根据农艺学性状很难将这些种质准确分开。采用基于 DNA 条形码序列的分析技术,借助聚类分析的方法,对忍冬属 4 个种质进行遗传多样性研究发现这忍冬属 4 个种质在 DNA 条形码序列上存在着丰富的遗传多样性,采用农艺学性状与 DNA 条形码相结合的方法在忍冬属种质鉴定中有很广泛的应用前景和实践意义。

该研究筛选出的 5 对引物有 4 对是叶绿体基因片段,ITS 引物为核基因组片段。序列 trnI-trnF 是叶绿体内含子片段,属非编码序列,具有引物保守,容易扩增等优点,但进化速度过慢,物种的识别率较低。大量的研究表明叶绿体基因序列 trnH-psb 在植物物种进化的历程中是一个进化速率比较快的基因间隔序列<sup>[12]</sup>,这个序列的两边部分有相对保守的 trnH 序列和 psbA 序列,而这 2 个保守序列之间又有多个缺失/插入的变异位点,遗传信息较为丰富,用于进行鉴定的前景较为广阔,鉴定效率相对较高。ITS 序列位于细胞核基因中,在已克隆了该序列的所有物种中都是相对保守的,而该序列是位于非编码区,相对其它基因序列而言其承受的自然选择的压力相对较小,因此,其变异位点也相应较多,在物种系统学分析中能提供较为详细的遗传信息,在分子水平上对该序列的分析结果往往与物种表观性状分析结果之间有明显的相关性,并且 ITS 序列长度也相对保守,在被子植物中长度一般小于 700 bp<sup>[13]</sup>。由于性状是受基因与环境共同决定的加性遗传特性,形状指标聚类

受环境影响较大,而分子水平分析是建立在物种遗传基础上的,聚类结果较形态学分析更可信。虽然 DNA 条形码技术不可能完全取代形态学分类法,但其在物种鉴别与分类中表现的准确性、丰富性和可重复性,导致其必将成为物种分类中的重要方法。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1 部. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 林凯. 福建金银花挥发油成分分析[J]. 江西农业学报,2009,21(5):35-37.
- [3] 焦守国. 金银花研究现状及综合应用[J]. 齐鲁药事,2009,28(8):487-489.
- [4] 姜南辉. 金银花化学成分研究[J]. 中药材,2015,38(2):315-316.
- [5] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Biol Sci Ser B, 2003, 270(40):96-99.
- [6] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31):12-14.
- [7] 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, 53(3):7-12.
- [8] YAO H, SONG JY, MA X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region[J]. Planta Med, 2009, 75(6):66-67.
- [9] 蒋向辉, 余朝文, 许栋, 等. 七叶一枝花基于 ITS 序列的 DNA 条形码构建研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12):3295-3296.
- [10] YUAN Y M, KUPFER P, DOYLE J J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA[J]. American Journal of Botany, 1996, 83:641-652.
- [11] 刘艳玲, 徐立铭, 倪学明, 等. 睡莲科的系统发育: 核糖体 DNA ITS 区序列证据[J]. 植物分类学报, 2005, 43(1):22-30.
- [12] 全妙华, 欧立军, 余朝文, 等. 中国石蒜属种间关系的 trnH-psbA 序列分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(8):1598-1594.
- [13] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4):407-416.

## Comparison of Agronomy Properties and DNA Barcoding Identification in Four Different Species of *Lonicera*

LI Shaoji, JIANG Xianghui

(College of Chemistry and Materials Engineering, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011)

**Abstract:** Taking four species of *Lonicera* as test materials, the agronomical characters of four species of *Lonicera*, such as the height of plant, leaf length, leaf width, leaf shape and flowering period were studied. The results showed that character difference of four species was not obvious, which easily caused misjudgment in species identification. At the same time, the genomic DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis and PCR amplification of DNA barcode was carried out for further comparison with five pairs of primers. The phylogenetic relationship of the four species by DNA barcoding sequencing was analyzed, and the phylogenetic dendrogram was built by MEGA. The results showed that there was no obvious difference between the agronomy traits of these four species, which easily caused misjudgment in species identification. On the basis of agronomical characters and DNA barcoding identification technology, the genetic diversity of the four species was analyzed, the result showed the identification of DNA barcoding and the comparison of agronomical characters should be considered together when identifying the genetic relationship of species.

**Keywords:** *Lonicera*; *Lonicera japonica*; agronomic traits; DNA barcoding