

· 资源与鉴定 ·

不同种源射干遗传多样性与质量分析

邸子真, 张颖, 姜鸿, 王光函, 李国信*

(辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034)

[摘要] 目的:对射干遗传多样性和药材质量进行综合评价,为射干种质资源的合理利用和药材优良品种的选育提供理论依据。方法:采用 ISSR 分子标记法分析射干 9 个种源的遗传多样性,并采用 HPLC 法测定各种源次野鸢尾黄素的含量。结果:9 个种源射干次野鸢尾黄素的质量分数为 0.12% ~ 0.36%;多态位点比率 PPB 为 55.42% ~ 90.36%;种源间遗传分化系数 G_{ST} 与基因流 Nm 分别为 0.204 1, 1.951 5。结论:射干次生代谢产物的含量与遗传多样性相关性不大,而是易受生长环境的影响,在品种选育过程中应对种质选取、栽培环境和栽培方法等进行综合考察。

[关键词] 射干;遗传多样性;ISSR 分子标记;次野鸢尾黄素

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0037-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1140.036.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:40

Genetic Diversity and Medicinal Quality of Belamcandae Rhizoma from Different Provenances

DI Zi-zhen, ZHANG Ying, JIANG Hong, WANG Guang-han, LI Guo-xin*

(Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To comprehensively evaluate the genetic diversity and medicinal quality of Belamcandae Rhizoma from different provenances and provide a theoretical basis for rational utilization of germplasm resources and fine variety breeding of Belamcandae Rhizoma. **Method:** The genetic diversity of 9 provenances of Belamcandae Rhizoma were analyzed by ISSR molecular markers, and the content of irisfloreantin in the rhizome was determined by HPLC. **Result:** The contents of irisfloreantin in 9 provenances of Belamcandae Rhizoma were among 0.12% - 0.36%; the percentage of polymorphic loci (PPB) were 55.42% - 90.36%; the coefficient of gene differentiation (G_{ST}) was 0.204 1 and the gene flow (Nm) was 1.951 5. **Conclusion:** The content of secondary metabolites of Belamcandae Rhizoma had little correlation to genetic diversity, but was more subjected to growing environments, so in the process of variety breeding for Belamcandae Rhizoma, more work shall be done to deal with germplasm selection, cultivation environment and cultivation methods synthetically.

[Key words] Belamcandae Rhizoma; genetic diversity; ISSR molecular maker; irisfloreantin

中药射干为鸢尾科植物,以干燥根茎入药,具有清热解毒、消痰、利咽的功效^[1],始载于《神农本草经》,是一味应用历史悠久的中药材。射干自然

资源分布广泛但零星,历史上主要靠采挖天然资源,随着野生资源的不断枯竭,1990 年代栽培品取代野生品成为射干药材的主要来源。

[收稿日期] 20160909(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273927);辽宁省科技厅项目(2015225015)

[第一作者] 邸子真,硕士,从事中药资源与品质评价的研究, Tel:15909880552, E-mail:dizizhen@aliyun.com

[通讯作者] *李国信,教授,从事中药临床药理学研究, Tel:024-86803005, E-mail:syyjldjlx024@126.com

长期以来,我国中药材的生产一直处于简单粗放的状态,野生资源日益枯竭,栽培品种质资源不明确、栽培方式不规范、没有系统选育品种的过程等一系列的问题限制了中药产业的现代化进程。在栽培的 200 多种中药材中,仅约 10% 经过了优良品种选育,绝大部分中药材缺乏各项遗传参数的研究资料,没有进行过系统的种质资源调查整理,缺乏优良品种选育的研究基础^[2]。射干药材的生产面临着同样的问题,各产区种质资源不明确、引种混乱、栽培方式不统一导致药材质量参差不齐,严重影响射干的临床应用。种质资源的遗传多样性是种质资源收集、保存、评价和利用的依据^[3]。

对射干研究采用的分子标记法有扩增片段长度多态性 DNA 分子标记 (amplified fragment length polymorphism DNA, AFLP), 随机扩增多态性 DNA 分子标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和简单重复序列间扩增 DNA 分子标记 (Inter-Simple

Sequence Repeat DNA, ISSR) 等,但多以鉴别、分类地位、近缘种间亲缘关系为研究目的^[4-8],而射干种内不同种质资源之间的比较^[9-10]多为化学成分差异性研究,其他方面鲜有报道。本研究对射干居群内、居群间 2 个水平的遗传多样性进行了深入分析,并综合评价了药材质量,为射干种质资源的合理筛选和综合利用奠定研究基础。

1 材料

2014 年春至 2015 年 7 月,共收集射干样品 162 份,来自 9 个种源,涉及 5 省份,6 县区。根据种源面积大小,选取间隔 5 ~ 10 m 不等的植株,采集植株上新鲜无病虫害的叶片,放入装有变色硅胶的小袋中,带回实验室,并经常更换变色硅胶保持样品干燥。同时切取根茎,洗净,晾干后封存,测定前粉碎至全部通过 60 目筛。样品经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为鸢尾科植物射干 *Belamcanda chinensis* 的干燥叶及根茎,见表 1。

表 1 射干样品采集信息与次野鸢尾黄素含量测定结果

Table 1 Sample collection information of *Belamcanda Rhizoma* and content determination results of irisyflorentin

No.	采集地	生长状况	经纬度	海拔/m	采集时间	取样数/株	次野鸢尾黄素质量分数/%
BY	辽宁省本溪市小市镇	野生	41°12'5"N 124°8'6"E	266	2014-08-01	10	0.19
BZ	辽宁省本溪市小市镇	栽培	41°12'14"N 124°9'33"E	312	2014-08-01	10	0.19
TZ	湖北省黄冈市但店镇	栽培	30°45'48"N 115°6'58"E	235	2014-11-13	17	0.31
TY	湖北省黄冈市但店镇	野生	30°46'27"N 115°5'47"E	233	2014-11-14	14	0.36
SH	陕西省汉中市胡家坝镇	野生	32°55'15"N 106°26'19"E	747	2014-11-20	29	0.30
HS	湖北省神农架林区松柏镇	野生	31°44'56"N 110°38'48"E	1018	2014-11-16	29	0.20
HL	湖北省神农架林区龙沟村	野生	31°44'19"N 110°41'36"E	931	2014-11-17	18	0.18
HA	河北省安国市伍仁桥镇	栽培	38°25'25"N 115°19'30"E	36	2014-11-24	18	0.26
LQ	湖南省邵阳市廉桥镇	栽培	27°19'20"N 111°50'31"E	269	2015-05-13	17	0.12

3-18K 型台式冷冻离心机 (美国 Sigma 公司), CK1000 型组织研磨机 (美国 Thmorgan 公司), HH-S 型恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司), Veriti9600 型梯度 PCR 仪 (ABI 公司), Powerpac universal 型电泳仪与水平电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司), SynGene G boxF3 型凝胶成像系统 (美国 Gene 公司), Nano DROP 2000 型 DNA 浓度测定仪 (美国

Thermo 公司), 1100 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司,包括四元泵、自动进样器及 DAD 检测器等模块), KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), FA1004 型 1/1 万电子天平 (上海上天精密仪器有限公司)。

离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司,批号 03211); 2 × Taq MasterMix (康

为世纪公司,批号 00161503);引物(Invitrogen 公司合成);GoldView II 型核酸染色剂,琼脂糖(Solarbio 公司,批号分别为 20151029, 326E0515);DNA Ladder 2000(近岸蛋白质科技有限公司,批号 NP1410);50 × TAE 缓冲液(上海 Sangon 公司,批号 B324KA5412);乙腈(Fisher 公司,批号 106062);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),次野鸢尾黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111557-200602),磷酸(Tedia 公司,批号 1204005),甲醇为分析纯。

2 方法

2.1 次野鸢尾黄素含量测定 参照《中国药典》2015 年版(一部)射干项下含量测定制备供试品溶液^[1],Phenomenex synergic 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 40:60,检测波长 265 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。以次野鸢尾黄素为对照品,采用外标法计算各样品质量分数。

2.2 DNA 提取 取干燥的植物叶片约 20 mg,于液氮中冷冻 30 min,迅速置组织研磨机中,以 1 100 r·min⁻¹ 研磨 1 min,得到植物叶片粉末,按试剂盒说明书提取总 DNA;测定 DNA 浓度,并稀释质量浓度至 10 μg·L⁻¹。

2.3 ISSR 引物筛选 本试验所用引物为哥伦比亚大学(UBC)公布的 100 条 ISSR 通用引物,和张敏^[4]设计的 9 条引物,共 109 条,以 TZ 样品筛选出 7 条多态性好、条带清晰的引物进行扩增,见表 2。

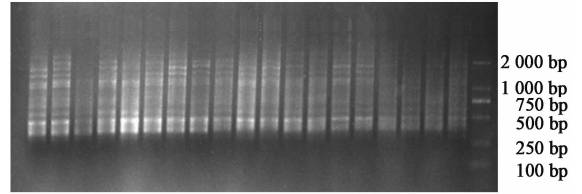
表 2 不同引物反应条件及扩增条带数

Table 2 Reaction conditions of different primers and number of amplified bands

引物	序列(5'-3')	退火温度/°C	PCR 反应循环数	扩增条带/条
ISSR6	AGAGAGAGAGAGAGGTT	53	35	12
ISSR7	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	53	35	12
ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	55	35	13
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	53	35	12
UBC867	GGCGCGCGCGCGCGCGGC	52	30	6
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	53	35	13
UBC891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	55	35	15

2.4 PCR 扩增与检测 本试验采用 25 μL 反应体系,包括 10 μmol·L⁻¹ 引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,2 × Taq MasterMix(含染料) 12.5 μL,用 RNase-Free Water 补足 25 μL。扩增程序:94 °C 预变性 5 min;

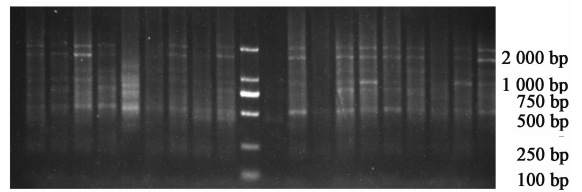
94 °C 变性 5 s,52 ~ 55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,30 ~ 35 个循环(各引物退火温度及循环数见表 2);72 °C 后延伸 7 min;4 °C 保存。电泳与成像:PCR 反应产物 5 μL 加入到 1.5% 琼脂糖凝胶中,1 × TAE 缓冲液,80 V 电压 10 min,150 V 电压 40 min;凝胶成像系统中观察 HS 居群 1 ~ 19 号样品,拍照,见图 1,2。



图中条带从左至右为 1 ~ 19, M 号样品

图 1 ISSR8 引物对 HS 种源 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of HS provenance by using ISSR8 primer



图中条带从左至右为 1 ~ 9, M, 10 ~ 19 号样品

图 2 UBC810 引物对 HS 居群 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of HS population by using UBC810 primer

2.5 数据统计与分析 将凝胶照片处理后导入 Quantity-one 软件,同一引物电泳迁移率一致的条带记为“1”,无条带记为“0”,形成 0/1 矩阵。用 POPGENE Version1.32 软件分别计算多态位点比率 PPB,观测等位基因数 N_a ,有效等位基因数 N_e ,总的基因多样性 H_T ,种源内基因多样性 H_S ,Shannon 多样性指数 H ,Nei's 基因多样性指数 h ,Nei's 遗传分化系数 G_{ST} 和基因流 Nm 。

3 结果与分析

3.1 不同种源射干次野鸢尾黄素含量测定结果 《中国药典》2015 年版规定射干中次野鸢尾黄素的质量分数不得低于 0.10%^[1],以上 9 个种源均符合《中国药典》规定。其中 TY 种源质量分数最高为 0.36%,LQ 种源含量最低为 0.12%。野生种源与栽培种源之间未见显著性差异。生长距离较近的种源之间含量差异较小,可见射干中次野鸢尾黄素的含量与生长环境之间具有一定的相关性。

3.2 不同种源射干的遗传多样性 ISSR 在 100 ~ 4 000 bp 共检测到 83 条谱带,各引物扩增的条带数见表 2,其中 83 个为多态性位点,居群内 PPB 的

平均值为 73.63%, H 为 0.344 1, h 为 0.223 9; 物种水平上 PPB 为 100.00%, H 为 0.438 8, h 为 0.281 7, 见表 3。

表 3 不同种源射干遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity analysis of *Belamcandae Rhizoma* from different provenances

种源	多态位点数	PPB/%	N_a	N_e	h	H
TY	60	72.29	1.722 2	1.376 0	0.230 1	0.352 3
HL	63	75.90	1.759 3	1.394 3	0.239 6	0.366 6
HS	71	85.54	1.851 9	1.408 9	0.248 1	0.381 9
TZ	65	78.31	1.787 0	1.369 6	0.229 4	0.356 4
BZ	61	73.49	1.731 5	1.355 1	0.217 9	0.337 2
HA	46	55.42	1.555 6	1.279 4	0.165 3	0.253 2
SH	75	90.36	1.907 4	1.448 8	0.273 2	0.420 3
LQ	49	59.04	1.592 6	1.270 5	0.168 2	0.261 3
BY	60	72.29	1.722 2	1.408 1	0.243 3	0.367 7
平均值	61	73.63	1.736 6	1.367 9	0.223 9	0.344 1
物种水平	83	100.00	2.000 0	1.450 8	0.281 7	0.438 8

表 4 不同种源射干的遗传相似度(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)

Table 4 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (under diagonal) of *Belamcandae Rhizoma* from different provenances

种源	TY	TZ	HS	HL	BY	LQ	SH	HA	BZ
TY	1	0.955 6	0.945 5	0.916 0	0.932 3	0.881 6	0.952 4	0.927 4	0.924 9
TZ	0.045 5	1	0.965 2	0.955 8	0.966 5	0.924 3	0.960 1	0.965 0	0.958 7
HS	0.056 1	0.035 5	1	0.951 2	0.949 4	0.922 7	0.969 8	0.963 0	0.958 5
HL	0.087 8	0.045 2	0.050 0	1	0.938 7	0.933 0	0.943 0	0.946 3	0.931 6
BY	0.070 1	0.034 1	0.051 9	0.063 3	1	0.898 2	0.944 9	0.954 8	0.946 3
LQ	0.126 0	0.078 7	0.080 4	0.069 3	0.107 4	1	0.904 2	0.921 7	0.939 9
SH	0.048 7	0.040 8	0.030 7	0.058 7	0.056 7	0.100 7	1	0.947 5	0.947 8
HA	0.075 3	0.035 6	0.037 7	0.055 2	0.046 3	0.081 5	0.053 9	1	0.974 0
BZ	0.078 0	0.042 2	0.042 3	0.070 8	0.055 2	0.061 9	0.053 6	0.026 4	1

4 讨论

4.1 射干遗传多样性 遗传多样性最直接的表达形式就是遗传变异的高低,同时还包括了遗传变异分布格局,即种源的遗传结构^[11]。基于条带表型频率的 Shannon 多样性指数和 Nei's 基因多样性指数可以较准确的衡量植物遗传多样性,采用上述 2 个指标对 9 个射干种源多样性研究结果基本一致。

张德全等^[12]统计了采用 ISSR 法标记的样本,计算出 H_{pop} 均值为 0.186。本研究的结果显示,射干 Shannon 多样性指数远高于统计平均值,说明射干种内具有较高的遗传多样性水平,这与射干本身的物种特性相一致,多年生草本,广布种,种子结实且量大。

种源 HA 多样性水平最低,PPB 为 55.42%, H 为 0.253 2,除 HA 与 LQ 之外,其他种源 PPB 水平均高于 72%;种源 SH 多态性水平最高,PPB 为 90.36%, H 为 0.420 3。

3.3 射干种源的遗传分化 9 个射干种源总基因多样性 H_T 与种群内基因多样性 H_S 分别为 0.281 3 和 0.223 9, H_S/H_T 为 0.795 9,种源间遗传分化系数 G_{ST} 为 0.204 1,说明 79.59% 的变异来自种群内,20.41% 的变异来自种源间;9 个种源基因流 N_m 为 1.951 5。以上结果表明射干种源内的遗传变异远大于种源间的遗传变异,各种源之间存在较大基因流。

3.4 射干种源的遗传距离和遗传相似度 射干 9 个种源间的遗传相似度范围在 0.881 6 ~ 0.974 0,其中 BZ 与 HA 遗传相似度最高,为 0.974 0,表明亲缘关系最近;遗传相似度最低的种源是 LQ 与 TY,为 0.881 6,见表 4。

植物繁育系统、分布范围、生活史、分类地位和种子散播机制均能影响物种的遗传变异水平。野生种源普遍具有较高的遗传多样性,说明药用植物栽培过程中人工干预程度的加深很可能导致基因多样性的逐步丧失,为保留更多的遗传基因资料,应率先保护野生遗传资源。同为栽培种源,BZ 和 TZ 的多样性水平高于 HA 和 LQ,可能与栽培的密度、人工对射干繁育的干预等因素有关。

4.2 射干种源遗传分化与遗传距离 Wright^[13]曾根据等位酶标记法提出遗传分化系数 (G_{ST}) 介于 0.15 ~ 0.25 时种源遗传分化较大, >0.25 表明种源遗传分化极大,但等位酶法测定的是部分功能基因的表达产物,对于另一部分功能基因和大量的

非功能基因无法检测,所检测的多样性水平远低于检测 DNA 基因组的分子标记法。用分子标记法检测数值与等位酶法直接比较显然不合理,但 ISSR 分子标记法运用时间较短,未能积累足够的资料用以统计,张德全等^[12]统计了 37 个采用 ISSR 分子标记法计算的样本, G_{ST} 均值为 0.408。本研究中不同引物计算出 G_{ST} 在 0.104 9 ~ 0.241 3,物种水平上 G_{ST} 为 0.204 0,远低于 0.408,本研究 9 个射干种源之间遗传分化可能处于较低的水平。

基因流 Nm 反应的是生物物种种内以及种间遗传物质的传递和交换。植物基因流的大小很大程度上取决于植物繁殖方式和繁殖体的移动方式。一般 Nm 的值远 < 1 时将导致较强的种群分化,而 Nm 值 > 4 的种群可以作为一个单一随机育种单位^[14]。本研究中物种水平 Nm 为 1.951 5,说明这 9 个射干种源之间存在广泛的基因交流。

基于 G_{ST} 和 Nm 的结果,分析原因可能为①射干栽培种源种质资源不明确;经过与栽培农户的交流发现,LQ 和 BZ 种源为当地野生射干直接驯化所得;而 HA 和 YZ 种源并没有明确的种质资源来源,团风种植基地虽为自己繁育种苗,但不清楚原始种质的来源,而河北安国是他地购买种苗进行栽培,从 HA 与 BZ 遗传相似度最高,推测可能两地栽培的是同一种质。②射干栽培历史短,栽培方式简单粗放,野生种源和栽培种源之间未能由于人工干预而积累出明显的遗传分化。

4.3 次野鸢尾黄素与遗传多样性 中草药的活性成分大多为植物的次生代谢产物,它们的合成与积累不仅与遗传特性有关,还受到生长环境、生长周期等多方面的影响。将本研究中各种源次野鸢尾黄素的含量与遗传多样性指数 H 做相关性分析,Pearson 相关系数为 0.323,说明 2 个指标之间相关性较小。计算来自同一地区的 2 个样本的相对标准偏差 (RSD),发现 BZ 与 BY,TZ 与 TY,HS 与 HL 之间的 RSD 分别为 0%,10.6%,7.4%,而 9 个种源间的 RSD 33%。可见植物的生长环境与采收时期对次生代谢产物含量的影响更大。

中药栽培者倾向于选择生长能力强、抗病性好、

质量良好而稳定的种质进行栽培。根据本研究的结果,笔者建议选取次野鸢尾黄素含量最高的 TY 与 TZ,遗传多样性水平最高的 HS 与 SH 4 个种质,同时进行栽培环境、栽培稳定性及药材质量的综合分析,为射干种源的保存和品种选育提供进一步的研究资料。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:285.
[2] 华国栋. 药用植物品种选育的特殊性及其对策措施[J]. 资源科学,2008,30(5):754-758.
[3] 董玉琛. 生物多样性及作物遗传多样性检测[J]. 作物品种资源,1995(3):1-5.
[4] 张敏,黄苏珍. 鸢尾属植物遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(2):6-11.
[5] 黄芸. 中国鸢尾属及其近缘植物的分子系统学研究[D]. 南京:中国药科大学,2002.
[6] 王玲,卓丽环. 基于 ITS 序列的鸢尾属植物部分种的系统分类[J]. 东北林业大学学报,2006,34(4):54-57.
[7] 卢海英. 中国北方 8 种鸢尾属植物 ITS 序列分析及其分子系统学意义的研究[D]. 长春:东北师范大学,2006.
[8] 黄芸,秦民坚. RAPD 法鉴定射干类中药[J]. 中草药,2002,9(15):789-791.
[9] 秦民坚,吉文亮,王峥涛. HPLC 测定射干中 6 种异黄酮含量的动态变化[J]. 中国中药杂志,2006,31(20):1681-1683.
[10] 从仁怀. 大别山道地药材射干指纹图谱研究及主要药用成分分析[D]. 武汉:华中科技大学,2007.
[11] 钱迎倩,马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994:3.
[12] 张德全,杨永平. 几种常用分子标记遗传多样性参数的统计分析[J]. 云南植物研究,2008,30(2):159-167.
[13] Wright S. Evolution and the genetics of populations-4: variability within and among natural populations[J]. J Hum Evol,1980,2(9):157-160.
[14] 阮成江. 植物分子生态学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:76-77.

[责任编辑 邹晓翠]