

中药金银花植物遗传多样性研究进展

许兰杰¹, 梁慧珍^{1*}, 余永亮¹, 谭政委¹, 杨红旗¹, 董薇¹, 王龙¹, 芦海灵¹, 雒峰²

(1. 河南省农业科学院芝麻研究中心, 河南郑州 450002; 2. 河南省种子管理站, 河南郑州 450046)

摘要 对金银花在我国分布及基因型分类进行分析, 利用形态学标记、生化标记和分子生物学技术对中药金银花植物的遗传多样性进行研究, 以期全面准确地了解金银花的遗传多样性并对其进行保护, 同时为开展金银花遗传改良提供理论依据。

关键词 金银花; 种质资源; 遗传多样性

中图分类号 S567.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)28-0022-03

Research Progress of Genetic Diversity of Germplasm Resources of *Lonicera japonica*

XU Lan-jie, LIANG Hui-zhen, YU Yong-liang et al (Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract Distribution and gene classification of *Lonicera japonica* were analyzed. Genetic diversity was studied by morphological marker, biochemical marker and molecular markers in *Lonicera japonica*. This research can provide theoretical basis for genetic improvement of *Lonicera japonica*.

Key words *Lonicera japonica*; Germplasm resources; Genetic diversity

金银花为忍冬科植物中中医的常用药物, 金银花富含芳樟醇和双花醇等挥发油, 以及绿原酸、异绿原酸、咖啡酸等有机酸, 黄酮类和皂苷类等化学成分, 具有清热解毒、凉散风热之功效^[1]。金银花的花、叶和茎均可入药。宋代以前只用茎和叶, 明代则茎、叶、花同等入药。但是不同部位其化学成分不同, 功效不同。我国主要金银花种质资源有忍冬属植物 98 种, 5 亚种, 18 变种, 在全国分布较广, 可供药用的达 49 种。我国是金银花的主产国, 2003 年, 全国金银花种植面积在 0.2 万 hm^2 以上, 年产量 8 000 t, 而当时国内外市场需求量为 20 000 t。2010 年种植面积超过 5.33 万 hm^2 。金银花寿命一般为 10~20 年, 栽种 3 年后就可以产生效益, 5 年达到盛产。该研究主要对我国金银花种质资源分类进行阐述, 并综述种质资源遗传多样性研究进展。

1 我国金银花种质资源研究

1.1 我国金银花主要产区分布 我国金银花分布甚广, 主产于河南、山东, 主要为栽培品种, 此外, 四川、广西、江西、江苏、陕西和甘肃等地均有野生^[2]。

山东金银花集中产于沂蒙山区, 包括平邑、费县、沂水、临沭、济南等地, 已有 300 余年的栽培历史, 全省各山地丘陵均有野生。主要有毛花系列, 包括小毛花、大毛花、九丰一号; 鸡爪花系列, 包括小鸡爪花、大鸡爪花、细毛针(线花)、红裤腿、麻针、大麻叶、中金一号等; 野生花系列, 包括野生忍冬、红梗子; 其他类, 包括灰毡毛忍冬、红金银花。推广种植

的有费县“中金一号”、平邑“九丰一号”。

河南是传统的金银花道地产地和栽培地, 产于河南的称为“南银花”或“密银花”。河南金银花主产区有郑州市所辖的新密、巩义、荥阳等县市, 新乡市所辖的封丘、原阳、辉县、濮阳、许昌所辖禹州等县, 洛阳所辖汝州、偃师等县, 以及焦作、信阳、南阳的部分山区。近些年, 在各地研究部门的培育下, 出现诸多优良品种, 基本上可以分为三大品系, 即毛花系、鸡爪花系和野生银花系, 共计十余个品种, 种植规模较大的品种有“原阳一号”“豫封”系列、“封丘大毛花”“鸡爪花”系列、“鑫蕾一号”、河南封丘“金丰一号”等。

其他产地如四川省可供药用的主流品种为灰毡毛忍冬、细毡毛忍冬和淡红忍冬; 浙江省的主流品种为忍冬、红腺忍冬、灰毡毛忍冬; 甘肃省主流品种为盘叶忍冬、细毡毛忍冬和淡红忍冬; 湖南省主流品种为灰毡毛忍冬, 此外, 各个地区还有分布广泛的野生忍冬植物。

1.2 我国金银花种质分类研究

1.2.1 形态学分类研究。植物形态学是最直观的分类方式, 目前已经应用于白芍、苍耳等中药植物的鉴别。张芳^[3]依据金银花植株形态特征差异证实了山东主产地的金银花植株确实存在不同的种质, 不同种质植株的形态特征与同工酶谱之间具有密切的关系, 同工酶谱一致的植株形态特征相近。周凤琴等^[4]采用盛花期与非花期结合的方法进行种质调查, 依据植物形态分类学知识进行品种的初步划分, 将主要金银花种质划分为 3 个系列 16 个品种。李林等^[5]对浙江乐清、永嘉以及文成的金银花进行调查, 依据植物形态分类学知识将其原植物分为红腺忍冬、灰毡毛忍冬以及引种河南的正品忍冬, 野生种质在浙江也有分布, 但是资源分散, 未能形成商品。周凤琴等^[6]依据盛花期和非盛花期的植株形态差异对我国金银花主产区的种质资源进行调查、收集与初步鉴定, 确定山东平邑、河南新密为金银花的道地产区, 河南封丘、河北巨鹿为金银花的新产区, 山东平邑是中国金银花种质资源分布中心。蓝云龙等^[7]采用形态性状调查发现浙

基金项目 国家中药材产业技术体系建设专项资金项目(CARS-21 花类岗位); 国家农业科研杰出人才及其创新团队“特种油料作物品质改良创新团队”(农财发[2016]45 号); 省科技攻关计划项目(172102110088); 河南省农业科学院自主创新基金项目(2017ZC69); 省超级产粮大省奖励资金扶持粮油良种培育等项目(YNK20177502); 河南省农业科学院科技发展专项资金项目(201513110)。

作者简介 许兰杰(1982—), 女, 河南漯河人, 助理研究员, 博士, 从事中药品质分析研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事中药材研究。

收稿日期 2018-05-04

江西南地区的 6 个野生金银花在形态性状上差异较小。

1.2.2 DNA 水平上分类研究。于燕莉等^[8]采用 RAPD 标记方法对金银花两品系的 DNA 指纹图谱进行分析,证明 RAPD 技术可以有效地用于金银花品种的分类与鉴别。蒋超等^[9]利用 15 对碱基数差异大于 6 的 EST-SSR 对 52 份金银花类药用植物进行分析,发现引物 jp.ssr4、jp.ssr64 及 jp.ssr65 可用于忍冬及其变种、山银花原植物的鉴别。牛伟涛等^[10]采用 10 个 RAPD 随机引物成功构建巨鹿金银花 DNA 指纹图谱,可快速准确地将巨鹿金银花与其他两产地金银花鉴别区分。徐石勇等^[11]基于 SNP 标记技术,结合高分辨率溶解曲线分析技术(high resolution melting, HRM)对金银花和山银花的标志性 SNP 位点进行分析,可以快速地鉴别金银花药材的真伪。

2 金银花种质资源遗传多样性研究

2.1 蛋白质水平 同工酶是基因编码的产物,其酶谱差异主要是由决定酶蛋白本身的等位基因或非等位基因的差异造成的,同工酶电泳图谱谱带发生多态性变化,反映了生物在蛋白质水平上的多型性,是生物发生遗传分化的证据^[12]。目前,同工酶标记已广泛应用于三七^[13]、枸杞等^[14]中药种质的遗传多样性研究。赵永亮等^[15]采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳技术,利用过氧化物同工酶和淀粉酶同工酶对 10 个地区 11 个金银花样品的遗传多样性进行分析,表明不同产区金银花的过氧化物酶和淀粉酶具有较丰富的多态性,说明金银花不同居群在遗传本质上是有所区别的;聚类分析表明 10 个产区的 11 个金银花样品可聚为 3 个类群;不同产区金银花的亲缘关系与其遗传本质和地理位置有关。

2.2 DNA 水平

2.2.1 SSR 标记。SSR(simple sequence repeats)标记是近年来发展起来的一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术,也称为微卫星 DNA(Microsatellite DNA),是一类由几个核苷酸(一般为 1~6 个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列。徐石勇等^[11]选择 25 个 SSR 位点用于 6 个金银花供试材料多态性分析,构建基于 Excel 格式的金银花 SSR 指纹图谱,可对金银花及其变种的遗传多样性进行分析,发现金银花与山银花之间遗传距离较远,仅 0.28;应用该指纹图谱对 87 个市售金银花进行分析,能够区分出河北、山东、河南等地的金银花品种。

2.2.2 RAPD 标记。向增旭等^[16]利用 RAPD 分析技术对金银花(*Lonicera aponica* Thunb.)6 个种源的遗传多样性及遗传关系进行研究,发现 23 个引物共扩增出多态性片段 83 条,金银花的 6 个种源可聚为两大类,产自山东平邑、湖南隆回和江苏南京的野生金银花种源遗传距离较近,聚为一类;来自河南封丘的 2 个野生种源和来自河南密县的 1 个栽培种源聚为一类。不同金银花种源间的遗传关系与地理分布有一定的相关性。蒋向辉等^[17]用 RAPD 分子标记技术对 7 个不同来源的金银花品种进行遗传多样性分析,发现以遗传距离 14.0 cM 为界,可将 7 个不同金银花种质分为三大类;第Ⅰ类为湘蕾金银花与华南忍冬,第Ⅱ类为巨花 1 号与金塔 1 号,

第Ⅲ类为九丰 1 号、鲁峰巨丰与金花 3 号。赵东岳等^[18]利用 RAPD 技术分析国内不同产区采集的 11 份栽培金银花和 1 份山银花样品,17 条 RAPD 引物共扩增出 150 条清晰可辨的 DNA 条带;表明河南封丘、河北巨鹿的金银花品种遗传差异较小,品种较为单一;山东平邑的金银花种质资源相对丰富;不同金银花种源间的遗传关系与地理分布存在相关性。Fu 等^[19]采用 18 对 RAPD 引物对 5 个金银花品种进行遗传多样性分析,共扩增出 147 条带,片段大小在 300~2 000 bp,每个引物 3~11 个扩增片段;发现 5 个金银花品种的相关性在 0.59~0.77。王一斐等^[20]利用 RAPD 分子标记技术对胶东地区 31 个金银花品种的遗传多样性进行研究,5 个引物共扩增出 650 条带;聚类分析结果表明,31 个金银花品种可以分为两大类,采自昆崙山太白顶的金银花品种为一类,其余 30 个金银花品种为一类。从遗传距离来看,采自昆崙山太白顶的品种与中医世家引进金银花品种大毛花遗传距离最远,为 2.507;采自龙口兰高镇马蔺塔(Ⅱ)与中医世家引进金银花品种四季丰遗传距离最近,为 0.020。可以看出不同金银花种源间具有较高的遗传多样性,不同金银花种源间的遗传关系与地理分布有一定的相关性。

2.2.3 ISSR。王晓明等^[21]利用 10 条 ISSR 引物对以湖南、山东、河南的 22 个金银花主要栽培品种进行遗传多样性分析,共扩增出多态性条带 96 条;22 个金银花品种间的遗传相似性系数为 0.41~1.00,平均遗传相似性系数为 0.68;利用 UPGMA 进行系统聚类分析,22 个供试金银花品种划分为两大类,第 1 类为忍冬种群,第 2 类为灰毡毛忍冬种群,每个大类又分为北方种群与南方种群。王珊^[22]采用 15 条具有多态性且重复性好的引物对湖南省不同产区的灰毡毛忍冬样品进行 ISSR 标记研究,共扩增出多态性条带 161 条,遗传相似性系数变化在 0.39~0.91。康玉秋^[23]采用 ISSR 分子标记对 12 个鸡爪花品系金银花进行分析,15 条引物共扩增出多态性条带 240 条,表明鸡爪花品系金银花的遗传多样性丰富,12 个鸡爪花品系金银花品种可按地域性分为山东与河南新密两大类,同一道地产区栽培品种的亲缘关系较近;各农家品种间遗传相似系数的变化在 0.640 8~0.873 8。王湘莹等^[24]采用 10 个重复性高、扩增效果好的 ISSR 引物对 23 个金银花品种的样本进行 PCR 扩增,共获得多态性条带 169 条,23 个金银花品种间的遗传相似系数在 0.471 3~0.100 0,表明品种间的遗传基础较宽及遗传多样性较高。聚类分析(UPGMA)表明:23 个供试金银花品种划分为忍冬、美国忍冬、灰毡毛忍冬三大类。韩琳娜等^[25]应用 16 个多态性 ISSR 引物对 27 个金银花原植物种质资源进行遗传多态性、相似性和聚类分析;遗传相似系数在 0.50~0.90;27 个品种可被聚为 2 个类群。孙稚颖等^[26]对采自金银花主产区的 18 个农家品种及野生忍冬和近缘种灰毡毛忍冬共计 36 个样品进行 ISSR-PCR 分析,12 条引物共扩增出多态性条带 114 条,表明金银花种质资源具有较丰富的遗传多样性。综上所述,利用 ISSR 标记可有效地分析金银花种质资源的遗传变异,为金银花品种鉴别、分类、种质资源的有效利用提供理论

依据。

2.2.4 AFLP. 扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择扩增而揭示其多态性, 具有灵敏、稳定、多态性丰富等优点。利用 AFLP 技术在丹参^[27]、黄蘗^[28] 等中药种质资源中开展了遗传多样性研究。郭庆梅等^[29] 采用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术对 13 个忍冬农家品种的遗传多样性进行初步分析, 共获得 191 条多态性条带, 表明同一道地产区的栽培品种亲缘关系较近, 山东种质基于 AFLP 标记的分类结果与形态特征基本一致。

3 存在的问题与展望

我国金银花育成品种栽培历史悠久, 种质资源丰富, 但是金银花相对遗传基础狭窄, 基础研究进展缓慢, 大大制约了金银花种质资源的开发利用和保存, 导致金银花品种退化、道地性差等问题。随着 DNA 分子标记技术的快速发展, 近年来, 国内外学者对金银花资源的收集、分类、种质评价及利用方面开展了很多研究, 并取得诸多成果, 使得金银花的用途更加广泛和明确。利用分子标记技术对金银花进行合理分类、发现、鉴定和利用, 将会有利于挖掘和利用我国的各种金银花种质资源, 提高育种效率, 解决由于长期不规范的选育, 金银花的种质严重退化、盲目引种等问题。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 177-178.
- [2] 吴德邻. 广东植物志: 第 4 卷[M]. 广州: 广东科技出版社, 2000: 291-310.
- [3] 张芳. 金银花种质资源初步研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [4] 周凤琴, 张永清, 张芳, 等. 山东金银花种质资源的调查研究[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(4): 268-271.
- [5] 李林, 陶正明, 雷海清, 等. 浙江产金银花的调查与评估[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(6): 431-434.
- [6] 周凤琴, 李佳, 冉蓉, 等. 我国金银花主产区种质资源调查[J]. 现代中药研究与实践, 2010(3): 21-25.
- [7] 蓝云龙, 王庆霞, 朱云国, 等. 浙江西南野生金银花种质资源的特性研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2490-2493.

- [8] 于燕莉, 石俊英. RAPD 技术在金银花品种鉴定中的应用[J]. 中药材, 2000, 23(11): 678-679.
- [9] 蒋超, 袁媛, 刘贵明, 等. 基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究[J]. 药学报, 2012(6): 803-810.
- [10] 牛伟涛, 曹萌. 巨鹿金银花 RAPD 分子鉴别技术的研究[J]. 邢台学院学报, 2013(2): 190-192.
- [11] 徐石勇, 李欧静, 张舒玮, 等. 金银花 SSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J]. 天津农业科学, 2015, 21(5): 11-14.
- [12] ROOSE M L. Catalytic properties of alcohol dehydrogenase isozymes specified by duplicate genes in the diploid plant *Stephanomeria exigua*[J]. Biochemical genetic, 1984, 22(7/8): 631-643.
- [13] 肖慧, 崔秀明. 三七种内同工酶遗传多样性分析[J]. 现代中药研究与实践, 2010(6): 16-18.
- [14] 马永平, 赵海燕, 杨少娟. 枸杞多种同工酶水平的遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 4042-4043.
- [15] 赵永亮, 张长付, 覃晓娟. 金银花的过氧化物酶和淀粉酶同工酶遗传多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6225-6227.
- [16] 向增旭, 郭巧生. 不同金银花种源间遗传关系的 RAPD 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 57-59.
- [17] 蒋向辉, 余朝文. 七个不同来源金银花品种遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2011, 42(8): 831-834.
- [18] 赵东岳, 李勇, 丁万隆. 我国金银花栽培品种的遗传多样性[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2011, 13(4): 650-653.
- [19] FU J J, YANG L Q, ASADUZZAMAN KHAN M, et al. Genetic characterization and authentication of *Lonicera japonica* Thunb. By using improved RAPD analysis[J]. Molecular biology reports, 2013, 40(10): 5993-5999.
- [20] 王一斐, 刘林德, 葛宜和, 等. 胶东地区金银花品种间遗传关系的 RAPD 分析[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(13): 145-146.
- [21] 王晓明, 谢碧霞, 李俊彬, 等. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(6): 14-18.
- [22] 王珊. 利用 ISSR 标记技术分析灰毡毛忍冬种质遗传多样性[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.
- [23] 康玉秋. 鸡爪花品系金银花的 ISSR 遗传多样性和 HPLC 指纹图谱的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.
- [24] 王湘莹, 何钢, 王晓明, 等. 金银花不同品种间遗传变异的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(11): 77-82.
- [25] 韩琳娜, 康玉秋, 郭庆梅, 等. 道地产区金银花的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 四川农业大学学报, 2013, 31(4): 414-418.
- [26] 孙雅颖, 姚辉, 王振中, 等. 金银花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013(9): 1890-1895.
- [27] 温春秀, 吴志明, 田伟, 等. 丹参种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(S2): 122-125.
- [28] 闫志峰, 张本刚, 张昭, 等. 珍稀濒危药用植物黄蘗野生种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(6): 488-497.
- [29] 郭庆梅, 王婷, 周凤琴, 等. 忍冬种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3024-3028.

(上接第 5 页)

综上所述, 大多数花药散粉时期是紫丹参授粉的最佳时期。这一时期, 不仅花粉活力高, 且柱头具有较强的可授性。

自然界中大多数植物的花粉活力和柱头可授性多保持在几天至十几天, 紫丹参与普通的植物相比, 其花粉活力和柱头可授性保持的时间相对较长, 可达几个月之久, 这是由于其生态环境所限制的。紫丹参生长的环境为高原草坡, 处在高山地区的植物为了适应严酷的环境条件必须采取一定的生殖策略来应对其严酷的生长季节^[9-10], 紫丹参在适生环境下, 盛花期正处于其生境地高温、少雨、干旱时期, 这一时期传粉昆虫因气候的原因也较少, 对于这样的情况紫丹参选择通过较长的花粉活力和柱头可授性的持续时间来完成传粉, 这对其有性生殖的顺利进行及种群的延续具有重要的意义。

参考文献

- [1] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准[M]. 昆明: 云南美术

- 出版社, 2005: 45.
- [2] 钱子刚, 梁晓原, 侯安国, 等. 滇丹参药用植物资源[J]. 中药材, 2002, 25(9): 628-629.
- [3] 张正付, 陈鸿珊, 李健蕊, 等. 滇丹参中酚酸类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1886-1890.
- [4] 闫彩珍, 李惠兰, 张荣平, 等. 滇丹参、甘西鼠尾、褐毛甘西鼠尾对离体豚鼠心脏的影响[J]. 昆明医学院学报, 2002, 23(1): 14-17.
- [5] 张荻. 长白鸢尾生殖生物学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007: 1-53.
- [6] ECOLOGY D A A practical approach[M]. Oxford: Oxford University Press, 1992: 1-57.
- [7] 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 302-321.
- [8] 赵金花, 李青丰, 那仁图雅, 等. 3 种野生忍属植物花粉活力和柱头可授性研究[J]. 草业科学, 2010, 27(4): 93-96.
- [9] HEDBERG O. Adaptive evolution in a tropical alpine environment[M]//HEYWOOD V H. Taxonomy and ecology. London: Academic Press, 1975: 71-93.
- [10] HÜLBER K, WINKLER M, GRABHER G. Intraseasonal climate and habitat-specific variability controls the flowering phenology of high alpine plant species[J]. Functional ecology, 2010, 24(2): 245-252.