



# 基于SRAP分子标记的贵州5种忍冬属 药用植物遗传多样性分析

潘绿昌<sup>1</sup>, 赵致<sup>1\*</sup>, 何云<sup>2</sup>, 李园园<sup>1</sup>, 刘红昌<sup>1</sup>, 俸婷婷<sup>2</sup>, 周英<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>贵州大学农学院/贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵阳 550025; <sup>2</sup>贵州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心, 贵阳 550025)

**摘要:**【目的】分析贵州5种忍冬属药用植物的遗传多样性,为忍冬属药用植物鉴定、良种筛选及开发利用提供理论依据。【方法】采集贵州6份忍冬属药用植物材料的嫩芽为试验材料,采用SRAP分子标记研究其遗传多样性,并利用NTSYS-pc2.1计算各材料间的遗传相似系数,利用UPGMA进行聚类分析。【结果】从154对SRAP引物组合中筛选出15对重复性好、条带清晰、多态性丰富,且扩增条带(100~1000 bp)数目≥5的引物组合。15对SRAP引物共扩增出197条条带,其中178条为多态性条带,多态性条带比率为90.36%,平均每对引物扩增11.87条多态性条带。引物组合Me8-Em10扩增的多态性条带数最多(16条);引物组合Me2-Em2扩增的多态性条带最少(8条);引物组合Me4-Em2扩增条带数为15条,均为多态性条带,但从5种忍冬属药用植物的扩增条带数不同。聚类分析结果显示,6份忍冬属药用植物材料间遗传相似系数为0.4213~0.8477,平均0.5672;其中,野生忍冬与栽培忍冬间遗传相似系数最大(0.8477),二者亲缘关系最近,灰毡毛忍冬与野生忍冬遗传相似系数最小(0.4213),二者亲缘关系最远。在遗传相似系数0.4873处,6份忍冬属药用植物分为两大类,第I类包括灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬,均为山银花的基源植物;第II类包括野生忍冬、栽培忍冬和红白忍冬,均为金银花的基源植物。【结论】贵州5种忍冬属药用植物具有丰富的遗传多样性,SRAP分子标记能有效分析其遗传多样性及亲缘关系,其引物组合Me4-Em2可用于鉴别5种忍冬属药用植物。

**关键词:** 忍冬属药用植物; SRAP分子标记; 遗传多样性; 遗传相似系数; 聚类分析

中图分类号: S567.790.24

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2018)12-2349-07

## Genetic diversity among five species medicinal plants of *Lonicera* L. in Guizhou Province by SRAP molecular markers analysis

PAN Lü-chang<sup>1</sup>, ZHAO Zhi<sup>1\*</sup>, HE Yun<sup>2</sup>, LI Yuan-yuan<sup>1</sup>, LIU Hong-chang<sup>1</sup>, FENG Ting-ting<sup>2</sup>, ZHOU Ying<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agriculture, Guizhou University/Guizhou Key Laboratory for Propagation and Cultivation of Medicinal Plants, Guiyang 550025, China; <sup>2</sup>Guizhou Traditional Chinese Medicine and Ethnic Drug Engineering Center, Guiyang 550025, China)

**Abstract:**【Objective】Analysis of genetic diversity of five species medicinal plants of *Lonicera* L. in Guizhou Province was conducted. It provided reference for the identification, fine breed selection and utilization of medicinal plants of *Lonicera* L. 【Method】Collecting the tender shoots of six medicinal plants samples of *Lonicera* L. as test materials in Guizhou Province, their genetic diversity was studied by SRAP marker, and the genetic similarity coefficient among the materials was calculated by NTSYS-pc2.1. The UPGMA method was used for cluster analysis. 【Result】From the 154 pairs of SRAP primer combinations, 15 pairs of primer combinations with good reproducibility, clear bands and rich polymorphism, and amplified bands(100-1000 bp)≥5 were screened. A total of 197 bands were amplified by 15 pairs of SRAP primers, among them there were 178 polymorphic bands. The percentage of polymorphic bands was 90.36%. On average, each pair of primers amplified 11.87 polymorphic bands. Among them, the primer combination of Me8-Em10 amplified the most polymorphic bands(16), but the primer combination of Me2-Em2 amplified the least polymorphic bands(8). The number of amplified bands of primer-combined Me4-Em2 was 15 and all were polymorphic bands, the number of amplified bands of five medicinal plants samples of *Lonicera* L. was different. Cluster analysis results displayed, the similarity coefficient between the six medicinal plants samples of *Lonicera* L. was 0.4213-0.8477, and the average similarity coefficient was 0.5672. Among them, the genetic similarity coefficient between wild *L. japonica* Thunb. and cultivated *L. japonica*

收稿日期: 2018-10-14

基金项目: 贵州省社会攻关计划项目(黔科合[2016]支撑2909); 贵州省药用植物繁育与种植人才基地项目(黔人领发[2013]15); 贵州省生物学一流学科建设项目(GNYL[2017]009)

作者简介: \*为通讯作者, 赵致(1959-), 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物生产理论与实践研究工作, E-mail: zzhao@gzu.edu.cn. 潘绿昌(1993-), 研究方向为作物栽培学与耕作学, E-mail: 1085656396@qq.com

Thunb. was the highest(0.8477), indicating that the genetic relationship was the closest, and the genetic similarity coefficient of *L. macranthoides* Hand.-Mazz. and wild *L. japonica* Thunb. was the smallest(0.4213), indicating that the genetic relationship was the farthest. At the genetic similarity coefficient of 0.4873, six medicinal plants samples of *Lonicera* L. were divided into two categories. The first category included *L. macranthoides* Hand.-Mazz., *L. hypoglauca* Miq. and *L. fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng, all of which were the base plants of the *Flos Lonicerae*. The second category included wild *L. japonica* Thunb. cultivated *L. japonica* Thunb. and *L. japonica* var. *chinensis* (Wats.) Bak., which were the base plants of *Lonicerae japonica*. 【Conclusion】The five species medicinal plants of *Lonicera* L. have rich genetic diversity in Guizhou Province. SRAP molecular markers can effectively analyze their genetic diversity and genetic relationship. The SRAP primer combination of Me4-Em2 can be used to identify five species medicinal plants of *Lonicera* L.

**Key words:** medicinal plants of *Lonicera* L.; SRAP molecular marker; genetic diversity; genetic similarity coefficient; cluster analysis

## 0 引言

【研究意义】忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)、灰毡毛忍冬(*L. macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬(*L. hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*L. confusa* DC.)和黄褐毛忍冬(*L. fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng)均被作为大宗药材金银花广泛使用。2005版《中华人民共和国药典》首次将传统金银花分为金银花和山银花两类,并规定金银花的来源是忍冬,山银花的来源是灰毡毛忍冬、红腺忍冬和华南忍冬;2010版《中华人民共和国药典》又将黄褐毛忍冬纳入山银花类别。忍冬属(*Lonicera* L.)药用植物品种多样,金银花和山银花药材鱼龙混杂,难辨真假,导致其临床用药存在风险。因此,为了确保金银花和山银花临床用药安全有效,研究这两类药材来源的遗传多样性,并从分子水平对二者进行区分具有重要意义。【前人研究进展】SRAP分子标记具有简单、高效、重复性好、无需预知物种的序列信息等优点,已被广泛应用于药用植物遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传连锁图谱构建、基因连锁标记及基因定位等领域研究(Li and Quiros, 2001; 曹亮等, 2010; 王维婷等, 2010; 柴琨等, 2014; 潘玉玲, 2016)。近年来,为了探索金银花和山银花两类药材的遗传信息差异,较多学者针对二者的遗传多样性进行了研究。杨飞等(2007)运用RAPD分子标记对5个金银花品系进行遗传多样性研究,结果发现其多态性条带比例较高,遗传多样性较丰富。王晓明等(2008)利用ISSR分子标记对湖南、山东和河南的22个金银花主栽品种进行遗传多样性分析,结果表明这些品种具有丰富的遗传多样性。陈大霞等(2011)利用SRAP分子标记分析15个不同来源地的野生灰毡毛忍冬及2个花蕾型栽培品种的遗传多样性,结果发现野生灰毡毛忍冬具有丰富的遗传多样性,表明SRAP分子标记可有效分析灰毡毛忍冬的遗传差异。王珊等(2011)采用ISSR和RAPD分子标记对17份灰毡毛忍冬样品进行遗传多样性分析,结果发现两种分子标记均显示其具有较高的遗传多样性,但ISSR分子标记多态性高于RAPD分子标记。李小侠等(2012)采用ISSR和

SRAP分子标记对浙南忍冬属忍冬、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬及黄褐毛忍冬药用植物遗传多样性进行分析,结果表明利用ISSR和SRAP分子标记均可有效分析忍冬属药用植物的遗传多样性。【本研究切入点】贵州忍冬属药用植物栽培历史悠久,黔北的灰毡毛忍冬和黔西南的黄褐毛忍冬栽培历史均达40年(潘绿昌等, 2018),但对其遗传多样性研究报道较少,仅赵丹等(2014)采用ISSR和SCoT分子标记对贵州栽培的灰毡毛忍冬遗传多样性进行分析。至今,鲜见有关利用SPAP分子标记分析贵州忍冬属药用植物遗传多样性的文献报道。【拟解决的关键问题】采用SRAP分子标记对贵州5种忍冬属药用植物遗传多样性进行分析评价,为忍冬属药用植物的物种鉴定、良种筛选及开发利用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

供试的5种忍冬属药用植物分别为灰毡毛忍冬(*L. macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬(*L. hypoglauca* Miq.)、黄褐毛忍冬(*L. fulvotomentosa* Hsu et S.C.Cheng)、忍冬(*L. japonica* Thunb.)和红白忍冬[*L. japonica* var. *chinensi* (Wats.) Bak.],其中忍冬又分为野生忍冬和栽培忍冬,材料编号及来源地见表1。以上供试材料均由贵州省药用植物繁育与种植重点实验室提供,并经贵州大学生命科学学院赵财副教授鉴定。主要试剂:琼脂糖购自上海复申生物科技有限公司;金牌Mix(Green)PCR反应试剂购自北京擎科新业生物技术有限公司;DL2000 DNA Marker购自贵州弥勒天根生物科技有限公司;40%丙烯酰胺溶液购自生工生物工程(上海)股份有限公司;植物基因组DNA提取试剂盒(E.Z.N.A™ Plant DNA Mini Kit)购自美国OMEGA BIO-TEK公司。主要设备仪器:垂直电泳槽(DYCZ-24A,北京六一有限公司)、移液器(Eppendorf,德国)、C1000™ PCR仪(BIO-RAD,美国)、离心机(Thermo,美国)、-80℃超低温冰箱(Thermo,美国)、水平电泳槽(DYCZ-22A,北京六一有限公司)、酶标仪(Thermo,美国)、

制冰机(SANYO,日本)、凝胶成像系统(BIO-RAD,美国)。

表 1 供试材料编号及来源地

Table 1 Sample numbers and sources

| 序号<br>No. | 材料编号<br>Sample No. | 材料名称<br>Sample name | 来源地<br>Sample source |
|-----------|--------------------|---------------------|----------------------|
| 1         | HZMRD              | 灰毡毛忍冬               | 贵州省思南县杨家坳乡青年台村       |
| 2         | HXRD               | 红腺忍冬                | 贵州省务川县石朝乡乱水村         |
| 3         | HHMRD              | 黄褐毛忍冬               | 贵州省安龙县德卧镇大水井村        |
| 4         | YSRD               | 忍冬(野生)              | 贵州省安顺市西秀区七眼桥镇兴隆村     |
| 5         | ZPRD               | 忍冬(栽培)              | 贵州省赤水市天台镇金坪山村        |
| 6         | HBRD               | 红白忍冬                | 贵州省石阡县花桥镇北坪村         |

## 1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取及纯度检测 分别采集6份忍冬属药用植物的嫩芽,于研钵中加入液氮充分研磨至粉状,根据植物基因组DNA提取试剂盒说明

表 2 SRAP引物序列

Table 2 SRAP primers sequence

| 上游引物 Forward primer | 序列 Sequence              | 下游引物 Reverse primer | 序列 Sequence               |
|---------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|
| Me1                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG ATA-3' | Em1                 | 5'-GACTGCGTACGAATT AAT-3' |
| Me2                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG AGC-3' | Em2                 | 5'-GACTGCGTACGAATT TGC-3' |
| Me3                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG AAT-3' | Em3                 | 5'-GACTGCGTACGAATT GAC-3' |
| Me4                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG ACC-3' | Em4                 | 5'-GACTGCGTACGAATT TGA-3' |
| Me5                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG AAG-3' | Em5                 | 5'-GACTGCGTACGAATT AAC-3' |
| Me6                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG TAA-3' | Em6                 | 5'-GACTGCGTACGAATT GCA-3' |
| Me7                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG TCC-3' | Em7                 | 5'-GACTGCGTACGAATT CAA-3' |
| Me8                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG TGC-3' | Em8                 | 5'-GACTGCGTACGAATT CTG-3' |
| Me9                 | 5'-TGAGTCCAAACCGG TAG-3' | Em9                 | 5'-GACTGCGTACGAATT CGA-3' |
| Me10                | 5'-TGAGTCCAAACCGG CAT-3' | Em10                | 5'-GACTGCGTACGAATT CAG-3' |
| Me11                | 5'-TGAGTCCAAACCGG TCT-3' | Em11                | 5'-GACTGCGTACGAATT CCT-3' |
| Me21                | 5'-TGAGTCCAAACCGG GTA-3' |                     |                           |
| Me22                | 5'-TGAGTCCAAACCGG CCC-3' |                     |                           |
| Me23                | 5'-TGAGTCCAAACCGG AAA-3' |                     |                           |

1.2.4 扩增产物检测 取3.0 μL PCR产物进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压150 V,功率4 W,时间2.3 h。电泳结束后,采用银染法(固定→银染→显色)进行染色,最后用凝胶成像系统观察并拍照。

## 1.3 统计分析

根据电泳图谱,从中选取清晰的电泳条带,以“1”或“0”记录相同位置上电泳条带的有或无,转换成0/1矩阵。利用NTSYS-pc2.1计算6份忍冬属药用植物材料间的遗传相似系数(陈大霞等,2011),遗传相似系数(GS)= $2N_{ij}/(N_i + N_j)$ ,式中 $N_{ij}$ 表示在*i*和*j*材料

提取其DNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。利用全波长酶标仪检测DNA浓度及纯度( $OD_{260}/OD_{280}$ )。最后将DNA稀释为20 ng/L,用于后续的PCR扩增。

1.2.2 引物筛选 将14条上游引物和11条下游引物进行组合(表2),共得到154对引物组合。从中筛选出重复性好、条带清晰、多态性丰富,且扩增条带(100~1000 bp)数目≥5的引物组合。

1.2.3 PCR扩增 PCR反应体系25.0 μL: PCR Master Mix 22.0 μL,上、下游引物各1.0 μL,20 ng/L DNA模板1.0 μL。扩增程序参照Li和Quiros(2001)的复性变温法:94 °C预变性5 min;94 °C 1 min,45 °C 1 min,72 °C 1 min,进行5个循环;94 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 1 min,进行35循环;72 °C延伸10 min,4 °C保存。

中共有的条带数量, $N_i$ 和 $N_j$ 分别是*i*和*j*材料的条带数量,并按照UPGMA进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA提取结果

6份忍冬属药用植物材料各提取2次DNA并进行凝胶电泳检测,结果如图1所示。条带清晰,无明显杂带,表明提取的DNA质量较好。用全波长酶标仪检测DNA浓度及纯度( $OD_{260}/OD_{280}$ ),结果如表3所示。选取各材料DNA浓度最高的溶液用于后续试验。

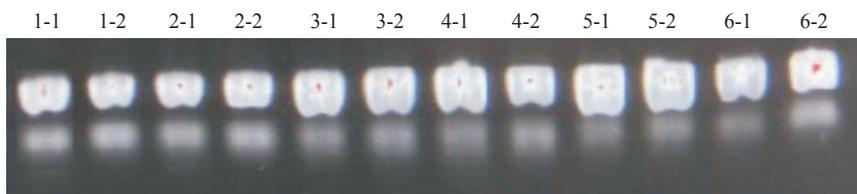


图 1 6份忍冬属药用植物材料的DNA扩增电泳结果

Fig.1 DNA amplification electrophoresis results of six *Lonicera* L. medicinal plant samples

1~6: 材料编号(与表1对应);-1和-2分别表示各材料的2个重复

1-6: Sample number (corresponding to Table 1); -1 and -2 indicated two repetitions of one sample

表 3 DNA纯度及浓度

Table 3 DNA purity and concentration of sample

| 材料名称 Sample name  | 纯度(OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub> ) Purity | 浓度(μg/mL) Concentration |
|---|--|-------------------------|
| 灰毡毛忍冬 <i>L. macranthoides</i> Hand.-Mazz.                 | 1.102  | 41.4                    |
| 红腺忍冬 <i>L. hypoglauca</i> Miq.                            | 0.753  | 39.5                    |
| 黄褐毛忍冬 <i>L. fulvotomentosa</i> Hsu et S.C.Cheng           | 1.092  | 65.5                    |
| 忍冬(野生) <i>L. japonica</i> Thunb. (wild)                   | 1.055  | 156                     |
| 忍冬(栽培) <i>L. japonica</i> Thunb. (planted)                | 0.961  | 98.5                    |
| 红白忍冬 <i>L. japonica</i> var. <i>chinensi</i> (Wats.) Bak. | 1.087  | 42.7                    |

表 4 筛选获得的SRAP引物组合

Table 4 Selected SRAP primer combination

| 序号 No. | 引物组合 Primer combination | 序号 No. | 引物组合 Primer combination |
|--------|-------------------------|--------|-------------------------|
| 1      | Me2-Em2                 | 9      | Me8-Em5                 |
| 2      | Me2-Em8                 | 10     | Me8-Em9                 |
| 3      | Me3-Em2                 | 11     | Me8-Em10                |
| 4      | Me4-Em2                 | 12     | Me10-Em8                |
| 5      | Me5-Em2                 | 13     | Me11-Em8                |
| 6      | Me5-Em9                 | 14     | Me23-Em2                |
| 7      | Me7-Em8                 | 15     | Me23-Em4                |
| 8      | Me7-Em9                 |        |                         |

2.2 引物筛选结果

从154对SRAP引物组合中筛选出15对引物组合(表4),用于后续的遗传多样性分析。

2.3 PCR扩增结果

利用筛选获得的15对SRAP引物分别对6份忍冬属药用植物材料的DNA进行PCR扩增,结果显示,每对SRAP引物对样品均能扩增出清晰且多态性丰富的条带。图2中显示部分引物(Me3-Em2和Me4-Em2)的电泳检测结果。

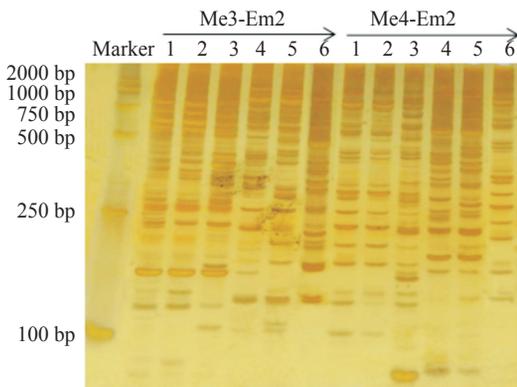


图 2 引物组合Me3-Em2和Me4-Em2扩增产物的电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of amplification products for primers combination of Me3-Em2 and Me4-Em2

1-6:材料编号(与表1对应)

1-6:Sample number(corresponding to Table 1)

2.4 SRAP多态性分析结果

由表5可知,筛选出的15对SRAP引物组合从6份忍冬属药用植物材料中共扩增出197条条带,其中多态性条带178条,不同引物组合扩增的条带数为9~17条,平均13.13条,其中引物组合Me8-Em10、Me11-Em8和Me23-Em4扩增条带数均达17条;不同引物组

合扩增的多态性条带数为8~16条,平均11.87条,其中,引物组合Me8-Em10扩增的多态性条带数最多,为16条,引物组合Me2-Em2扩增的多态性条带数最少,为8条;不同引物组合扩增的多态性条带比率为78.57%~100.00%,平均90.36%,其中以引物组合Me4-Em2、Me10-Em8和Me23-Em2扩增的多态性条带比率较高。上述结果表明,SRAP分子标记在5种忍冬属药用植物中具有丰富的多态性,变异较大,适用于分析忍冬属药用植物遗传多样性,也可较好地揭示其亲缘关系。

2.5 SRAP引物物种鉴定的有效性分析结果

利用筛选出的15对SRAP引物组合对6份忍冬属药用植物材料进行PCR扩增,结果显示15对引物均能扩增出多态性条带,其中引物组合Me4-Em2扩增条带(100~1000 bp)数为15条,且均为多态性条带,分别从野生忍冬、栽培忍冬、红白忍冬、灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬扩增出11、11、10、9、8和6条条带。引物组合Me4-Em2从5种忍冬属药用植物的扩增条带数不同,表明其可用于鉴别忍冬属药用植物。

2.6 遗传多样性分析结果

基于15对SRAP引物组合的扩增图谱,利用NT-SYS-pc2.1计算6份忍冬属药用植物材料间的遗传相似系数,并建立遗传相似系数矩阵,结果如表6所示。6份忍冬属药用植物材料间的相似系数为0.4213~0.8477,平均0.5672,表明5种忍冬属药用植物间具有丰富的遗传多样性。野生忍冬与栽培忍冬间的遗传相似系数最大,为0.8477,表明其亲缘关系最近。灰毡毛忍冬与野生忍冬间的遗传相似系数最小,为0.4213,表明其亲缘关系最远。灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬间的平均相似系数为0.6514,高于6份忍冬属药用植物材料的平均相似系数(0.5672),表明同为山银花基源植物的灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬的亲缘关系较近,遗传差异较小。红白忍冬与同为金银花基源植物的野生忍冬和栽培忍冬的遗传相似系数分别为0.6548和0.6650,均高于红白忍冬与灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬的遗传相似系数(0.4416、0.4467和0.4822),表明红白忍

表 5 SRAP引物扩增结果

Table 5 Amplification results of SRAP primers

| 引物组合<br>Primer combination | 总扩增带数(条)<br>Total number of amplification bands (band) | 多态性带数(条)<br>Number of polymorphic bands (band) | 多态性条带比率(%)<br>Ratio of polymorphic bands |
|----------------------------|--|--|--|
| Me2-Em2                    | 9  | 8  | 88.89                                    |
| Me2-Em8                    | 15   | 14   | 93.33                                    |
| Me3-Em2                    | 14   | 11   | 78.57                                    |
| Me4-Em2                    | 15   | 15   | 100.00                                   |
| Me5-Em2                    | 11   | 9  | 81.82                                    |
| Me5-Em9                    | 14   | 13   | 92.86                                    |
| Me7-Em8                    | 11   | 9  | 81.82                                    |
| Me7-Em9                    | 15   | 14   | 93.33                                    |
| Me8-Em5                    | 10   | 9  | 90.00                                    |
| Me8-Em9                    | 11   | 10   | 90.91                                    |
| Me8-Em10                   | 17   | 16   | 94.12                                    |
| Me10-Em8                   | 10   | 10   | 100.00                                   |
| Me11-Em8                   | 17   | 15   | 88.24                                    |
| Me23-Em2                   | 11   | 11   | 100.00                                   |
| Me23-Em4                   | 17   | 14   | 82.35                                    |
| 平均 Mean                    | 13.13  | 11.87  | 90.36                                    |
| 总计 Total                   | 197  | 178  | -  |

表 6 各样品间的遗传相似系数

Table 6 Genetic similarity coefficients among different samples

| 材料<br>Sample  | 灰毡毛忍冬<br><i>L. macranthoides</i><br>Hand.-Mazz. | 红腺忍冬<br><i>L. hypoglauca</i><br>Miq. | 黄褐毛忍冬<br><i>L. fulvotomentosa</i><br>Hsu et S.C.Cheng | 忍冬(野生)<br><i>L. japonica</i><br>Thunb. (wild) | 忍冬(栽培)<br><i>L. japonica</i><br>Thunb. (planted) | 红白忍冬<br><i>L. japonica</i> var.<br><i>chinensi</i> (Wats.)<br>Bak. |
|---|---|--------------------------------------|---|---|--|--|
| 灰毡毛忍冬 <i>L. macranthoides</i> Hand.-Mazz.                 | 1.0000  |                                      |   |   |  |  |
| 红腺忍冬 <i>L. hypoglauca</i> Miq.                            | 0.7614  | 1.0000                               |   |   |  |  |
| 黄褐毛忍冬 <i>L. fulvotomentosa</i> Hsu et S.C.Cheng           | 0.6142  | 0.5787                               | 1.0000  |   |  |  |
| 忍冬(野生) <i>L. japonica</i> Thunb. (wild)                   | 0.4213  | 0.4873                               | 0.5635  | 1.0000  |  |  |
| 忍冬(栽培) <i>L. japonica</i> Thunb. (planted)                | 0.4721  | 0.4975                               | 0.5736  | 0.8477  | 1.0000   |  |
| 红白忍冬 <i>L. japonica</i> var. <i>chinensi</i> (Wats.) Bak. | 0.4416  | 0.4467                               | 0.4822  | 0.6548  | 0.6650   | 1.0000   |

冬与金银花基源植物的亲缘关系较近,与山银花基源植物的亲缘关系较远。

## 2.7 UPGMA聚类分析结果

根据6份忍冬属药用植物材料间的遗传相似系数,利用UPGMA进行聚类分析,结果如图3所示。在遗传相似系数为0.4873处,6份忍冬属药用植物分为两大类,第I类包括灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬,均为山银花的基源植物,三者亲缘关系较近;第II类包括野生忍冬、栽培忍冬和红白忍冬,均为金银花的基源植物。第I类又可划分为3个亚类,在遗

传相似系数为0.5965处,黄褐毛忍冬单独聚为一类;在遗传相似系数为0.7614处,灰毡毛忍冬和红腺忍冬分别单独聚为一类,表明二者亲缘关系较近,黄褐毛忍冬与灰毡毛忍冬和红腺忍冬的亲缘关系较远,其原因可能是材料来源地的地理环境存在差异。第II类可分为两个亚类,在遗传相似系数为0.6599处,红白忍冬单独聚为一类,在遗传相似系数为0.8477处,野生忍冬和栽培忍冬聚为一类,表明野生忍冬和栽培忍冬遗传差异较小,引起遗传差异的原因可能是地理环境和多年人工栽培所致。

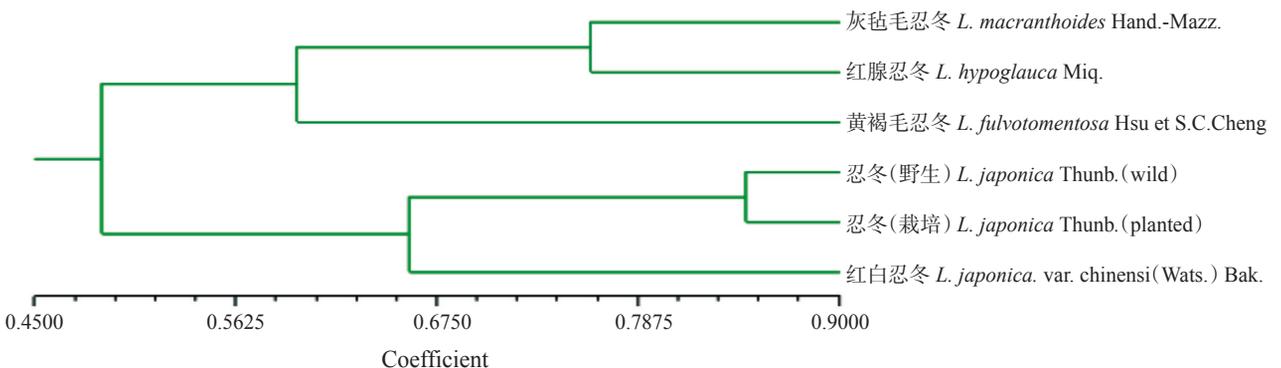


图 3 6份忍冬属药用植物材料的UPGMA聚类分析结果

Fig.3 UPGMA cluster among six *Lonicera* L. medicinal plant samples

### 3 讨论

SRAP标记分子以简便、稳定、中等产量、高共显性、重复性好、易分离等优点而广泛应用于基因定位、基因克隆、遗传图谱构建、遗传多样性等生物学研究(徐操和赵宝华,2009)。已有研究表明,SRAP分子标记可有效运用于忍冬属药用植物的遗传差异分析(陈大霞等,2011)及物种鉴别(李小侠等,2012),如李小侠等(2012)利用ISSR和SRAP分子标记分析浙南忍冬属药材遗传多样性,结果表明ISSR和SRAP分子标记均能有效分析忍冬属药材资源的遗传多样性,并将忍冬、红腺忍冬、灰毡毛忍冬、黄褐毛忍冬和华南忍冬药材划分为金银花和山银花基源植物两大类,与本研究结果基本一致。本研究利用SRAP分子标记对6份忍冬属药用植物材料进行遗传多样性分析,结果显示,15对引物共扩增出197条带,多态性条带178条,多态性条带比率90.36%,表明SRAP分子标记在6份忍冬属药用植物材料中表现出丰富的多态性和稳定性。本研究的聚类分析结果显示,在遗传相似系数为0.4873处,可将6份忍冬属药用植物材料分为两大类,一类为山银花的基源植物即灰毡毛忍冬、红腺忍冬和黄褐毛忍冬,另一类为金银花的基源植物即忍冬和红白忍冬(金银花自然变种)。在外观形态上,金银花和山银花存在明显差异,如金银花花色为鹅黄或浅绿色,山银花为黄白色或棕绿色,金银花花蕾直径大于山银花(成差群等,2017);在化学成分上,金银花的绿原酸含量明显低于山银花,金银花的芦丁、木犀草苷、木犀草素-7-O- $\beta$ -D-半乳糖苷和忍冬苷含量远高于山银花(杨倩茹等,2016),说明金银花和山银花在药用价值上存在差异。这也是《中华人民共和国药典》将金银花和山银花进行区分的原因之一。

本研究的聚类分析结果还显示,第I类可划分为三个亚类,在遗传相似系数为0.5965处,黄褐毛忍冬单独聚为一类;在遗传相似系数为0.7614处,灰毡毛忍冬和红腺忍冬分别单独聚为一类,表明灰毡毛忍冬和红腺忍冬亲缘关系较近,黄褐毛忍冬与灰毡毛忍冬和红腺忍冬的亲缘关系较远,其原因可能是材料来源地的地理环境不同,从而导致遗传信息存在差异。据前人报道,黄褐毛忍冬、灰毡毛忍冬和红腺忍冬的形态特征存在明显差异(成差群等,2017);第II类可分为两个亚类,在遗传相似系数为0.6599处,红白忍冬单独聚为一类,在遗传相似系数为0.8477处,野生忍冬和栽培忍冬聚为一类,表明野生忍冬和栽培忍冬遗传差异较小,二者与红白忍冬存

在较大遗传差异。红白忍冬是金银花自然突变产生的变种,其幼枝呈紫黑色,幼叶和花冠表面均为紫红色,内面呈白色,花蕾香味比忍冬浓郁,其抗逆性更强(余晓丹,2013)。目前,针对红白忍冬的研究主要集中在花青素形成机制、生理特性和成分含量等方面(李建军等,2013;田亦平,2014;Yuan et al.,2014)。蒋超等(2012)通过EST-SSR序列分析对忍冬和红白忍冬进行鉴定,结果表明EST-SSR引物jp.ssr4、jp.ssr64和jp.ssr65可准确鉴别金银花基源植物忍冬,且有效区分忍冬和红白忍冬及山银花基源植物。本研究利用SRAP分子标记对5种忍冬属药用植物进行遗传多样性分析,不仅为忍冬属药材资源的开发利用打下基础,还为忍冬属药材的物种鉴定、良种筛选提供理论依据。

### 4 结论

贵州5种忍冬属药用植物具有丰富的遗传多样性,SRAP分子标记能有效分析其遗传多样性及亲缘关系,其中SRAP引物组合Me4-Em2可用于鉴别5种忍冬属药用植物。

#### 参考文献:

- 曹亮,魏宝阳,李顺祥. 2010. SRAP和SCAR分子标记应用于中药材研究进展[J]. 科技导报,28(12):104-109. [Cao L, Wei B Y, Li S X. 2010. Molecular markers technologies SRAP and SCAR used in research of Chinese herbal medicines[J]. Science & Technology Review, 28(12): 104-109.]
- 柴锐,刘红昌,李金玲,罗夫来,王华磊,黄明进,罗春丽,赵致. 2014. 基于SRAP分子标记的天麻遗传多样性研究[J]. 中草药,45(20):2974-2981. [Chai K, Liu H C, Li J L, Luo F L, Wang H L, Huang M J, Luo C L, Zhao Z. 2014. Genetic diversity of *Gastrodia elata* based on SRAP analysis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,45(20): 2974-2981.]
- 陈大霞,李隆云,吴叶宽,张雪,蔡应繁. 2011. 灰毡毛忍冬自然群体遗传多样性的SRAP研究[J]. 中草药,42(1):143-147. [Chen D X, Li L Y, Wu Y K, Zhang X, Cai Y F. 2011. Genetic diversity of *Lonicera macranthoides* geographical populations revealed by SRAP markers[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,42(1):143-147.]
- 成差群,谭秀芬,钟碧莲. 2017. 金银花和山银花的鉴别与归属[J]. 中国地方病防治杂志,32(6):686-687. [Cheng C Q, Tan X F, Zhong B L. 2017. Identification and attribution of *Lonicerae japonicae* and *Lonicerae flos*[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases,32(6):686-687.]
- 蒋超,袁媛,刘贵明,黄璐琦,王绪敏,于军,陈敏. 2012. 基于EST-SSR的金银花分子鉴别方法研究[J]. 药学学报,47(6):803-810. [Jiang C, Yuan Y, Liu G M, Huang L Q, Wang X M, Yu J, Chen M. 2012. EST-SSR identification

- of *Lonicera japonica* Thunb.[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 47(6):803-810.]
- 李建军, 贾国伦, 王君, 李静云, 杨丽. 2013. 红白忍冬不同花期花蕾千蕾质量及指标成分含量比较[J]. 河南农业大学学报, 47(5):534-537. [Li J J, Jia G L, Wang J, Li J Y, Yang L. 2013. Weight and index ingredients components content comparison of different flowering phase in *Lonicera japonica* var. *chinensis*(Wats.) Bak[J]. Journal of Henan Agricultural University, 47(5):534-537.]
- 李小侠, 陶正明, 吴志刚, 潘晓军, 林新春, 范传颖, 包晓青. 2012. 采用ISSR和SRAP技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性[J]. 中草药, 43(10):2030-2035. [Li X X, Tao Z M, Wu Z G, Pan X J, Lin X C, Fan C Y, Bao X Q. 2012. Evaluation on genetic diversity among species of *Lonicera* L. in southern Zhejiang Province by ISSR and SRAP[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 43(10):2030-2035.]
- 潘绿昌, 李园园, 何云, 刘红昌, 周英, 赵致. 2018. 贵州金银花和山银花产业现状与发展对策[J]. 贵州农业科学, 46(7):117-120. [Pan L C, Li Y Y, He Y, Liu H C, Zhou Y, Zhao Z. 2018. Current situation and development countermeasures of *Lonicerae japonicae* and *Lonicerae flos* industry in Guizhou[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 46(7):117-120.]
- 潘玉玲. 2016. 基于SSR、SRAP和ISSR丹参遗传连锁图谱构建及其农艺性状的QTL定位[D]. 泰安: 山东农业大学. [Pan Y L. 2016. Genetic linkage map construction based on SSR, SRAP, ISSR and QTL mapping of agronomic traits in *Salvia miltiorrhiza* Bge[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University.]
- 田亦平. 2014. 北京地区春季不同水分条件下红白忍冬的生长与光合特性研究[J]. 北京农业职业学院学报, 28(1):24-28. [Tian Y P. 2014. Study on growth and photosynthetic characteristics of *Lonicera japonica* var. *chinensis* (Wats.) Bak. under different water conditions in spring in Beijing[J]. Journal of Beijing Vocational College of Agriculture, 28(1):24-28.]
- 王珊, 周日宝, 潘清平, 鲁耀邦, 童巧珍, 刘湘丹, 吴佳. 2011. 利用ISSR和RAPD标记技术分析灰毡毛忍冬种质资源的遗传多样性[J]. 中医药导报, 17(11):65-67. [Wang S, Zhou R B, Pan Q P, Lu Y B, Tong Q Z, Liu X D, Wu J. 2011. Use ISSR and technical analysis of grey felt RAPD marker hair honeysuckle germplasm resources of genetic diversity[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 17(11):65-67.]
- 王维婷, 单成钢, 倪大鹏, 王志芬. 2010. 不同来源丹参种质遗传多样性的SRAP标记分析[J]. 中草药, 41(4):632-635. [Wang W T, Shan C G, Ni D P, Wang Z F. 2010. SRAP analysis of genetic diversity about germplasm in *Salvia miltiorrhiza* from different sources[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 41(4):632-635.]
- 王晓明, 谢碧霞, 李俊彬, 曾慧杰, 李永欣. 2008. 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, 28(6):14-18. [Wang X M, Xie B X, Li J B, Zeng H J, Li Y X. 2008. Analysis of honeysuckles genetic diversity by ISSR molecular markers[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 28(6):14-18.]
- 徐操, 赵宝华. 2009. SRAP分子标记的研究进展及其应用[J]. 生命科学仪器, 7(4):24-27. [Xu C, Zhao B H. 2009. The development and application of SRAP molecular markers[J]. Life Science Instruments, 7(4):24-27.]
- 杨飞, 张敏, 彭兴扬, 魏建军, 李立家. 2007. 金银花五个品系的RAPD分析及DNA指纹图谱的建立[J]. 武汉植物学研究, 25(3):235-238. [Yang F, Zhang M, Peng X Y, Wei J J, Li L J. 2007. RAPD analysis and construction of DNA fingerprints in five *Flos loniceræ* lines[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 25(3):235-238.]
- 杨倩茹, 赵媛媛, 郝江波, 李卫东. 2016. 金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J]. 中国中药杂志, 41(7):1204-1211. [Yang Q R, Zhao Y Y, Hao J B, Li W D. 2016. Research progress on chemical constituents and their differences between *Lonicerae japonicae* *Flos* and *Lonicerae flos*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 41(7):1204-1211.]
- 余晓丹. 2013. 红白忍冬花色色素及其形成机制的初步研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学. [Yu X D. 2013. Preliminary research of anthocyanidins in *Lonicera japonica* var. *chihensis* and its formation mechanism[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University.]
- 赵丹, 丁铃, 周涛, 魏升华, 熊厚溪, 肖承鸿, 艾强. 2014. 贵州栽培灰毡毛忍冬的遗传多样性ISSR与SCoT标记[J]. 贵州农业科学, 42(1):21-25. [Zhao D, Ding L, Zhou T, Wei S H, Xiong H X, Xiao C H, Ai Q. 2014. Genetic diversity analysis of *Lonicera macranthoides* cultivars in Guizhou by ISSR and SCoT markers[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 42(1):21-25.]
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 103(2-3):455-461.
- Yuan Y, Yang J, Yu X D, Huang L Q, Lin S F. 2014. Anthocyanins from buds of *Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak.[J]. Food Research International, 62:812-818.

(责任编辑 陈燕)