

· 药材 ·

丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究

郭宝林^{1,2}, 林生², 冯毓秀¹, 赵杨景^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要:目的 研究丹参主要居群的遗传关系及药材的道地性问题。方法 选择丹参主要产地样本 44个(包括 9个居群样本), 进行 RAPD 分析, 得到的扩增条带用 NTSYS-_{pc} 和 AMOVA 软件进行数据处理。结果 (1)从 100 多个引物中选择出 11 个多态性强和重复性好的引物, 扩增得到 129 条带; (2)不同居群内多态位点比率为 20.9%~55.0%; (3)用 UPGMA 法得到所有样本的聚类图, 可分为 6 个主要分支组和 3 个组外个体, 其中四川中江居群的 5 个样本聚为一组, 并与其他样本遗传距离较大; (4)按产地分组, 遗传差异的 80.44% 存在于居群内, 8.29% 来自于组内居群间, 11.27% 的遗传差异来自于组间。结论 (1)丹参居群内遗传多样性十分丰富; (2)山东和河南的栽培居群栽培种来源于当地野生居群, 尚没有进行人工选择, 丹参酮 II_A 等成分的减少的原因主要是栽培条件不理想; (3)地区间居群的遗传分化不均衡, 四川中江和河北承德居群与其他居群距离较远; (4)丹参的道地性的确定应当依据现代的优质药材评价系统, 山东和河南产的丹参也可认为是丹参的道地药材。

关键词: 丹参; RAPD; 居群遗传关系; 丹参药材道地性

中图分类号: R282.21 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)12-1113-04

Primary research on genetic relationship among main populations of *Salvia miltiorrhiza* and genuineness of herb

GUO Bao-lin^{1,2}, LIN Sheng², FENG Yu-xiu¹, ZHAO Yang-jing¹

(1. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union of Medical College, Beijing 100094, China; 2. Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

Abstract Object To research on genetic relationship among the main populations of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and the genuineness of the herb. **Methods** From main distributed places, 44 samples (including nine populations) were analyzed by RAPD. The data of amplified bands were analyzed by the software NTSYS-_{pc} and AMOVA. **Results** (1) From more than 100 primers, 11 primers producing polymorphism and reproduceable bands were selected, 129 bands were amplified. (2) The percentage of polymorphic bands within different populations were 20.9%~55.0%. (3) The cluster map including all samples were obtained by UPGMA. In the map, there were six cluster groups and three individuals outside the groups. The branch with five samples of Zhongjiang Sichuan population were far from other samples in genetic distance. (4) According to the distribution provinces five groups were divided in genetic variance analysis. Genetic variance 80.44% existing within population, 8.29% among populations and 11.27% among groups. **Conclusion** (1) The genetic diversity within population of *S. miltiorrhiza* is plentiful. (2) The seeds of the cultivated population in Shandong and Henan Provinces come from the wild ones of same places. The cultivated plants lack artificial selection. The decrease of chemical compound is mainly due to the undesired condition of cultivating. (3) The genetic differentiation among the populations from different provinces is unbalance. Two population from Zhongjiang Sichuan and Chengde Hebei are far from the other population. (4) The genuineness of *Radix Salviae Miltiorrhizae* should be decided according to modern evaluation system. The herbs from some places of Shandong and Henan should be genuine ones.

Key words *Salvia miltiorrhiza* Bge.; RAPD; genetic relationship of population; genuineness of *Radix Salviae Miltiorrhizae*

丹参是著名活血化瘀药, 现代药理研究表明丹参对心血管系统作用十分显著, 已成为治疗冠心病

最常用的中药之一。《中华人民共和国药典》(2000年版)规定, 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltior-*

rhiza Bge.干燥根及根茎 丹参的生态适应强,在我国广泛分布于华北、华东、中南、西北、西南部分省区也有分布 随着野生资源的减少,20世纪 70年代中期丹参已经供不应求,在全国许多地区都开始栽培,目前栽培品已成为丹参主要来源,全国丹参产量大的有河南、山东、四川、山西、陕西、湖北、安徽等省

历代本草对丹参产地和道地产区叙述有所不同如《名医别录》(东汉)述:“生桐柏山谷及太山”(今河南和湖北交界及山东泰山一带);《图经本草》(宋朝):“今陕西河东州郡及随州皆有之”(今山西、湖北、河东州郡应归为山西而非陕西);《本草品汇精要》(明朝):“道地随州”(今湖北随州);《药物出产辨》(1930年):“产四川龙安府为佳”(今四川平武)。总结起来,在历史上湖北、河南、山东和山西等几个省曾是丹参的主要产地或道地产区。只是在近代才被认为川产丹参为佳品,但在《中国道地药材》中,丹参被列为川产道地

表 1 丹参材料来源和有效成分含量情况

序号	居群编号	种源	丹参酮II _A (%)	序号	居群编号	种源	丹参酮II _A (%)
1- 5	a	四川中江(栽)	0.4402	22- 25	d	山东沂南(栽)	0.7219
6- 10	b	河南卢氏(栽)	0.5797	26- 29	e	山东沂南(野)	0.6928
11- 15	c	河南卢氏(野)	0.9649	30- 32	f	山东沂水(栽)	0.3690
16		河南灵宝(栽)		33- 35	g	山东沂水(野)	0.8069
17		河南灵宝(野)		36		山东莱芜(栽)	
18		河南洛宁(栽)		37		山东莱芜(野)	
19		河南洛宁(野)		38- 40	h	河北承德(栽)	0.0585
20		河南嵩县(栽)		41- 43	i	山西垣曲(栽)	0.1495
21		河南嵩县(野)		44		湖北武当山(野)	0.1266

Biofuge Stratos, PCR仪为 PERKIN ELMER公司生产的 GeneAmp PCR System 9600,电泳仪为 BIO-RAD公司生产 POWER PAC 300 Taq酶、DNA ladder(华美公司),dNTP 随机引物(上海 Sangon),EB(SIGMA),β-巯基乙醇(MERCK),Tris碱(GIBCO),EDTA(AM RESCO),琼脂糖凝胶(Spanish),其他溶剂为分析纯

1.3 DNA提取方法:将丹参叶片约 0.4~ 0.5 g置于乳钵中,加入约 40 mg(重量约占叶片 10%)PV P-40T(聚乙烯吡咯烷酮),在液氮环境下研磨成细粉状,装入离心管,加入 4℃的提取液I(0.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, pH= 8.0),冰置 10 min 4℃, 7 000 r/min离心 10 min,弃去上清液,加入 65℃已预热的提取液II(即 2× CTAB) 3.5 mL(其中已加 Vc 0.4 g,并调 pH为 6.0~ 6.5),再加 2%的β-巯基乙醇约 70 μL,轻微振摇后放进水浴锅内 65℃恒温 1 h,期间不断振摇。取出离心管放至室温,用氯仿-异戊醇(24: 1)抽提至两界面间无沉淀,取上清液加 2/3体积的异丙醇,

药材^[1],科技部在四川省中江建立了丹参的 GAP种植基地,研究丹参的道地性,确立最佳生产地区对于优质药材的评价是十分有意义的 本文通过对四川、河南、山东、山西、河北等丹参主要居群(包括野生和栽培)材料 RAPD分析,研究类群间遗传关系,并就丹参的道地性问题进行一些探讨

1 材料和方法

1.1 材料:为 1999年至 2000年在丹参的主要产区采集的叶片,自然晒干或晾干,其中四川的样品为嫩叶经硅胶快速干燥 另测定同一样本的根中丹参酮II_A含量^[2](表 1)

每个居群取样 3~ 5个(居群 a~ i),并提供该居群样本的成分含量情况^[2],对丹参的主要分布区(河南和山东)的居群,补充了邻近居群的个体(16~ 21, 36, 37),湖北样本为单一个体(44)

1.2 仪器和试剂:离心机为 Heraeus公司生产的

- 20℃冷藏 1 h, 12 000 r/min离心 10 min,取沉淀,用 70%、95%乙醇离心各洗一次,晾干沉淀至无醇味,TE溶解

1.4 PCR扩增:25 μL反应体系 模板 DNA 5 μL(5~ 10 ng), 10× Reaction Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 25 nmol/L Mg²⁺ 2 μL, ddH₂O 12 μL, Taq酶 0.5 μL(1.5U),引物 1 μL(15 ng)

PCR扩增程序为:预变性:94℃, 10 min;扩增循环(45个):94℃, 1 min; 36℃, 1 min; 72℃, 2 min;延伸:72℃, 10 min

先进行引物筛选,再将筛选好的引物对所有的样本扩增,设不加模板的空白对照,每个引物重复 2~ 3次

1.5 数据处理:对扩增条带按有或无记录,每一位点有带记为“1”(强带和弱带同记),无带记为“0”,得到原始数据矩阵,计算多态性条带比率,推测遗传多样性 应用 NTSYS-PC软件,选择 DICE相似性系数、非加权算术平均数聚类方法(UPGMA)进行聚

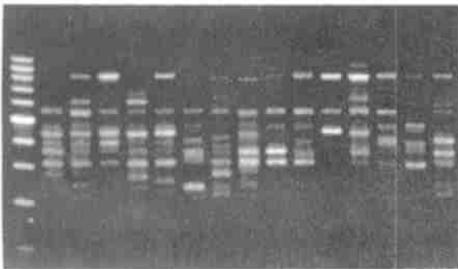
类分析,得聚类图。用 AMOVA 软件,利用欧氏距离系数进行距离计算,分析居群间遗传关系

2 结果

2.1 居群的多态性条带比率:从 S115~ S250号引物(上海生工生物工程技术有限公司)中筛选出 11个条带清晰,多态性强而且重现性好的引物,分别是 S193, S198, S201, S220, S227, S230, S232, S237, S246, S247, S250,引物 S250的部分样本扩增结果参见图 1,11个引物共得到 129条扩增带,全部为多态性带,即所有样本没有共有带,丹参种内多态率为 100%,表 2给出 9个居群内的多态性条带数量和多态位点比率,范围为 20.9%~ 55.0%。

表 2 9个丹参居群内多态位点的比较

居群	样本数	多态位点数	多态位点比率 (%)	居群	样本数	多态位点数	多态位点比率 (%)
a	5	42	32.6	f	3	44	34.1
b	5	65	50.3	g	3	34	26.4
c	5	71	55.0	h	3	27	20.9
d	4	59	45.7	i	3	42	32.6
e	4	41	31.6				



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
M-200bp ladder,最强带为 1 000 bp; 1-15丹参样本,序号同表 1

图 1 引物 S250部分样本的扩增图

2.2 全部样本的聚类结果:图 2为全部 44个样本的聚类图。依据聚类图,在相似性为 0.5处,有 6个分支组(I~VI)和 3个组外样本(44, 40和 11),分支组I包括四川居群样本(1~5)和河南灵宝和嵩县的两个野生个体(17, 21);分支组II包括河南野生或栽培的大部分样本(6, 9, 20, 7, 8, 19, 13, 16, 12)和 2个山东沂南栽培样本(24, 25);分支组III由河南卢氏居群的两个个体(14, 15)组成;分支组IV由河北承德和山西恒曲居群各两个样本(38, 39和 42, 43)组成;分支组V包括了山东野生或栽培的大部分居群样本(33, 37, 27, 28, 29, 31, 36, 32, 34, 35, 26, 30),仅有样本 18来自河南洛宁;分支VI来源较杂,有河南卢氏的样本 10,山东沂南样本 22和 23,山西垣曲样本 41。从整个聚类图可看出,6个分支组分化不十分显著。

四川居群内 5个样本聚为单独一个分支,表明

居群内遗传比较相似,而其他居群内个体间遗传多样性丰富,遗传特性不一致,但河南和山东的地区内样本间存在一定的遗传相似性。

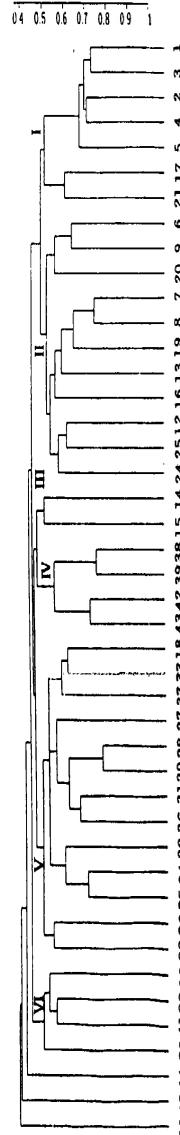


图 2 丹参 RAPD结果聚类图

2.3 居群遗传变异分析:按地理分布将丹参 9个居群分为 5个居群组,用 AMOVA 软件对居群的遗传变异进行分析,得出在研究群体内,有 80.44%的遗传差异来自于居群内,8.29%的遗传差异来自于组内居群间,11.27%的遗传差异存在于居群组间。不同居群间的遗传距离见表 3

3 讨论

3.1 丹参居群遗传结构:由于样本来源的限制,本研究涉及的居群个体较少,尚不能完全反映丹参居群关系,但本研究可得出一些初步结果。

3.1.1 丹参的居群内遗传多样性十分丰富,野生居

群内多态性条带百分率有随个体数增加而增加的趋势,如山东沂南居群为 26.4%,山东沂水居群 31.6%,河南卢氏居群 55.0%,因而丹参居群内的遗传多样性可能还大于本研究给出的实验值。从总体分析结果,有 80.44% 遗传差异来自于居群内,居群间变异仅占总变异的不足 20%,因而丹参应为典型的异花传粉植物。

表 3 丹参不同居群间的遗传距离值 ($a-i$ 为居群编号)

	a	b	c	d	e	f	g	h	i
a	0.000								
b	0.292	0.000							
c	0.230	0.074	0.000						
d	0.250	0.064	0.021	0.000					
e	0.395	0.231	0.150	0.209	0.000				
f	0.360	0.208	0.089	0.151	0.129	0.000			
g	0.377	0.159	0.047	0.130	0.157	0.048	0.000		
h	0.502	0.285	0.183	0.214	0.323	0.255	0.316	0.000	
i	0.357	0.160	0.079	0.120	0.209	0.063	0.162	0.213	0.000

山东和河南每一地区的栽培居群与相应的野生居群的遗传多样性基本一致,表明这些地区的栽培少有人工选择。目前存在的居群内丰富的遗传变异为良种选育提供了良好的基础。

3.1.2 丹参居群间遗传分化: 同一地区的栽培居群与野生居群的遗传距离很近,如河南卢氏两个居群遗传距离为 0.021,山东沂水两个居群间遗传距离为 0.048,均是本研究中遗传距离最近的关系居群,但两个地区的栽培类型丹参酮 II_A 的含量都明显低于野生类型,与前人研究一致^[3,4],说明这些地区现有栽培条件和栽培方法不利于丹参脂溶性成分的积累,需要寻找栽培方面的原因。山东沂南栽培和野生居群之间的遗传距离为 0.209(二居群的遗传多样性也相差很大),丹参酮 II_A 的含量却非常相近,这一特殊结果表明山东沂南地区的丹参值得进一步研究。

四川中江的居群与其他居群关系最远,与各居群的遗传距离分别为 0.230~0.502,该地区栽培历史较长,由于没有当地的野生样本,尚无法判定遗传差异是否来源于栽培选择,但长期栽培已使遗传多样性大大降低。

从表 3 给出的居群间距离值可看出,除四川中江外,河北承德居群 (h) 与其他居群距离较大,而其他不同地区间的距离存在较大的不均衡,表明地区间的遗传分化不十分显著,这与居群取样量较少有一定关系,有待进一步研究。

3.2 丹参的道地性问题: 在本草文献记述中,丹参主产区和道地产区出现较大变迁。在常用中药中,道地产区变迁十分普遍,产生变迁的原因除对优质药

材的进一步认识和有目的的选择外,还有政治文化等社会原因。药材市场占有率(如一些地区大量栽培、某一城镇药商集中等)等生产和市场的原因及本草著者掌握资料有限等主观原因等,因此一些产地比较广泛、道地记述有较大变迁的中药材,其道地药材的确定应当慎重,尤其在变迁的原因无法考证明确时,不能对本草中提及的地区进行简单取舍。丹参是使用历史最悠久的中药之一,道地四川在文献中提及不足百年,要确立川产丹参为佳品,需要充分的证据。

古人评价优质药材的标准是简单和直观的,没有系统的临床比较方案,也缺乏科学的评价标准,然而中国地域广阔,用产地来限定药材的质量是一种有效的权宜之计,因而传统的道地药材和真正的优质药材可能是很不一致的,简单地拘泥于古人的认识也是不可取的,而应当用已建立的现代质量标准体系阐明传统道地药材的科学内涵,并定向寻找、选择和培育新型的优质道地药材。对不同产地丹参的有效成分含量研究已有多篇报道^[3,5],结果表明山东和河南产丹参的脂溶性成分含量明显高于其他产地,而川产丹参含量不高,因而山东和河南的相应地区可以被确立为现代丹参的道地产区。但丹参的水溶性成分也已被证明是心血管活性的主要成分,因此,利用水溶性成分的含量评价优质道地丹参是目前迫切需要进行的工作。

四川中江栽培丹参历史较长,栽种方法比较规范,市场占有率大,质量比较稳定,近年随着培育方法的优化,质量在逐步提高^[6]。本研究表明中江丹参与其他地区丹参的遗传分化明显,因此通过杂交引进优良种质,选育新的优良品系是提高川产丹参质量的有效方法之一。

本研究的取样地区和采样量尚很不足,进一步的研究在进行中。

致谢: 本课题组高光跃、陈四保提供部分实验样品,林佳提供成分测定结果。

参考文献:

- [1] 胡世林. 中国道地药材 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [2] 林佳,徐丽珍,李琰,等. 不同产地丹参中丹参酮 II_A 的含量比较 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 153.
- [3] 黄秀兰,王长根,董月丽,等. 野生和栽培丹参的质量研究 [J]. 中药材, 1989, 12(6): 31.
- [4] 常效林,管玉民. 山东栽培丹参的质量考察 [J]. 中药通报, 1988, 13(12): 17.
- [5] 郭宝林,林生. 丹参干叶片 DN_A 提取 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 418-420.
- [6] 陈幸,黎万寿,夏文娟,等. 四川中江产丹参与其他产地丹参化学成分的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 522.