

个产地冬虫夏草的遗传距离大于 0.1,即便是同样来自于青海或四川的样品。Chen 等<sup>[12]</sup>认为真菌的 ITS 序列遗传距离大于 0.05 则代表不同的种。Chen 等<sup>[12]</sup>基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列获得 17 个产地冬虫夏草的遗传距离为 0~0.031,这尚不包括变异较大的环青海湖地区的样品,但其变异程度远大于本研究的 21 个冬虫夏草居群(图 2,第支)。Stensrud 等<sup>[14]</sup>对 GenBank 中冬虫夏草 rDNA-ITS 序列的分析认为类似于图 2 的 3 个分支均为冬虫夏草的神秘(系统发育的)种,尽管它们在序列上的差异甚至超越物种科属间的变化。本研究所测定的冬虫夏草居群分布范围较广,但其 rDNA-ITS 序列的变化并不大。而以往研究获得的冬虫夏草该序列<sup>[12,13]</sup>及 GenBank 中相关序列所存在的巨大差异,可能并不是实验样品采集地不同所能解释的。这些有较大变异的 rDNA-ITS 序列大多是从天然冬虫夏草分离培养后测序获得的,与本研究直接选用冬虫夏草子座不同。冬虫夏草是青藏高原的特有种,在海拔缺氧低温等极端环境下生长的冬虫夏草与人工培养的冬虫夏草之间是否存在遗传差异,人工分离培养过程中冬虫夏草是否会产生变异等问题有待进一步研究。

致谢:重庆市中药研究院钟国跃研究员、西藏农牧学院卢杰老师、复旦大学生命科学学院钟扬教授、浙江农科院计东风研究员、青海省畜牧兽医科学院徐海峰先生、兰州大学生命科学学院金樑老师为本研究冬虫夏草样品的收集等提供帮助。

## 参考文献:

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [2] Shimitsu D. *Green Book 51, Cordyceps* [M]. Tokyo: New Science Company, 1978.
- [3] 董应才, 罗都强. 我国的冬虫夏草研究 [J]. 国土与自然资源研究, 1996, 3: 47-51.
- [4] 梁洪卉, 程舟, 杨晓伶, 等. 青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1859-1864.
- [5] 陈永久, 王文, 杨跃雄, 等. 冬虫夏草的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化 [J]. 遗传学报, 1997, 24(5): 410-416.
- [6] Chen YJ, Zhang YP, Yang YX, et al. Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers [J]. *Biochem Genet*, 1999, 37: 201-213.
- [7] Hibbett D S. Ribosomal RNA and fungal system [J]. *Trans Mycol Soc*, 1992, 33: 533-556.
- [8] Chen YQ, Wang N, Qu L H, et al. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 597-607.
- [9] 赵锦, 王宁, 陈月琴, 等. 冬虫夏草无性型的分子鉴别 [J]. 中山大学学报:自然科学版, 1999, 38(1): 121-123.
- [10] 魏鑫丽, 印象初, 郭英兰, 等. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析 [J]. 菌物系统, 2006, 25(2): 192-202.
- [11] 屈良鹤, 陈月琴, 章卫民, 等. 虫草属多元起源的分子生物学证据 [J]. 中山大学学报:自然科学版, 2000, 39(4): 70-73.
- [12] Chen YQ, Hu B, Xu F, et al. Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230: 153-158.
- [13] Kinjo N, Zang M. Morphological and phylogenetic studies on *Cordyceps sinensis* distributed in southwestern China [J]. *Mycoscience*, 2001, 42: 567-574.
- [14] Stensrud yvind, Schumacher T, Shalchian-Tabrizi K, et al. Accelerated nrDNA evolution and profound AT bias in the medicinal fungus *Cordyceps sinensis* [J]. *Mycol Res*, 2007, 111: 409-415.
- [15] Kuo H C, Su YL, Yang H L, et al. Identification of Chinese medicinal fungus *Cordyceps sinensis* by PCR-single-stranded conformation polymorphism and phylogenetic relationship [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 3963-3968.
- [16] 梁洪卉. 冬虫夏草遗传多样性及 DNA 鉴定技术研究 [D]. 上海: 同济大学, 2006.
- [17] Zetkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genome*, 1994, 20: 178-183.

## 栀子道地药材遗传关系的 ISSR 证据

雷 栗<sup>1,3</sup>, 王 益<sup>1</sup>, 赵阿曼<sup>1</sup>, 朱培林<sup>2\*</sup>, 周世良<sup>1</sup>

(1. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; 2. 江西省林业科学院, 江西 南昌 330032; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**目的 分析来自江西省樟树、丰城、新干等 3 个栀子 GAP 基地的样品在 DNA 水平上的差异, 了解栀子的遗传变异及其相互关系, 为栀子育种提供参考。方法 采用 ISSR 分子标记技术结合实地考察。结果 10 个 ISSR 引物共扩增出 58 个位点, 其中 32 个位点为多态位点, 多态位点百分率 (PPB) 值为 55.17%。Nei's 遗传多样性指数变化范围在 0.005~0.167, Shannon 信息指数 (I) 变化范围在 0.008~0.254。居群内变异占总变异的 75.12%, 居群间变异占总变异的 24.88%。用 NJ 法建立聚类图大体上可以将栀子样品分为两组: 第一组由樟树的样品组成, 而第二组主要由新干和丰城的样品组成, 内含樟树的个别样品。结论 来自同一个地方的样品, 遗传距离比较近, 遗传上比较相似, 说明栀子种源基本上来自当地。ISSR 分子标记大体上可以将不同地方的栀子分开。产于樟树的栀子遗传多样性最高, 可能种源相对比较广。丰城和新干的样品地理距离比较远, 但是遗传距离却比较近, 可

收稿日期: 2008-06-16

基金项目: 江西省财政林业重大专项 (2006510105): “森林中药 GAP 种植技术研究”

作者简介: 雷 栗 (1983—), 女, 云南昭通人, 中国科学院植物研究所在读硕士研究生, 主要从事植物系统学及居群生物学研究。

\*通讯作者 朱培林 Tel: (0791) 3833803 E-mail: yczpl@126.com

能是各地之间存在相互引种现象。有少数樟树的样品在遗传上更接近丰城或新干的样品,除了种源交流外,在种下水平平行遗传突变也可能导致这种结果。

关键词: 栀子; ISSR; 药材道地性; 遗传多样性

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0116-05

## Genetic relationship of *Gardenia jasminoides* among plantations revealed by ISSR

LEI Li<sup>1,3</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, ZHAO A-man<sup>1</sup>, ZHU Pei-lin<sup>2</sup>, ZHOU Shi-liang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 2. Jiangxi Academy of Forestry Sciences, Nanchang 330032, China;

3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract : Objective** To evaluate the genetic differences and mutual relationship of *Gardenia jasminoides* at DNA level among Zhangshu, Fengcheng, and Xingan GAP plantations in Jiangxi Province, so as to provide reference for *G. jasminoides* breeding. **Methods** Genetic variations were revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **Results** Ten ISSR primers generated 58 loci of which 32 loci were polymorphic. The average percentage of polymorphic bands (PPB) is 55.17%. The range of Nei's genetic diversity is 0.005—0.167, and the range of Shannon information index ( ) is 0.008—0.254. The variations within populations account for 75.12% and among them for 24.88% of the total. The NJ dendrogram showed two basic clusters. One consists of the samples from Zhangshu, and the other mainly consists of the samples from Xingan and Fengcheng with very few samples from Zhangshu. **Conclusion** Zhangshu population has the highest genetic diversity, while Fengcheng has the lowest genetic diversity, possibly because of very few samples assayed. The samples from the same population are more similar than those from different populations, indicating that ISSR makers have the power to trace the origin of samples. The geographical distance between Fengcheng and Xingan is farther but the genetic distance between them is shorter. This is quite possibly because of inter-introduction between them, and some exceptions of a few samples from Zhangshu clustered with samples from Fengcheng might be because of parallel mutations which are common below specific level.

**Key words:** *Gardenia jasminoides* Eills; inter-simple sequence repeats (ISSR); geoherbalsim genetic diversity

栀子 *Gardenia jasminoides* Eills 是茜草科 (Rubiaceae) 栀子属常绿灌木, 又名山栀子、黄栀子、黄枝子等<sup>[1]</sup>, 是《中国药典》2005 年版一部中规定的栀子药材原植物<sup>[2]</sup>。栀子以干燥成熟果实入药, 其有效成分有去羟栀子苷、栀子苷、黄酮类栀子素、山栀子苷等<sup>[1]</sup>。栀子的商品药材约有 10 个品种, 在我国广泛种植, 以江西、湖南两省种植面积最大, 质量最好<sup>[1]</sup>。江西省是道地栀子的主产区, 生产历史悠久。江西省樟树市、丰城市、新干县等出产的栀子因皮薄、色红、饱满、品质优良而被称为“小红栀”, 畅销全国各地, 出口东南亚等地<sup>[3]</sup>。不同产地的同种药材由于多种因素的影响, 药用成分的种类、质量分数存在差别<sup>[4]</sup>, 从而导致药效的差异。因此, 道地药材的使用就显得十分必要。

道地药材与非道地药材药性的差异, 归根结底是药材遗传组成的不同, 生长地点的气候、土壤、地形、生物等环境因素能加大遗传因素与环境因素的相互

作用。因此, 鉴别不同药材的遗传差异能更好地理解药性的差别。传统上, 药材的质量和道地性常通过形态特征加以鉴别。随着分子生物技术在药材鉴别方面的应用, DNA 分析在药材道地性鉴别方面就显现出稳定可靠的突出优势<sup>[5]</sup>。基于 PCR 技术的简单序列重复区间 (Inter-simple sequence repeats, ISSR) 在众多的分子标记中具有重复性高、多态性丰富、操作简单、成本低等优点<sup>[6,7]</sup>, 其在正品龙胆、怀地黄、石斛、江枳壳和人参等的亲缘关系、品种鉴定、品种内的遗传变异等方面的研究中得到成功运用<sup>[6-12]</sup>。

目前对栀子的化学成分、药理作用等方面有较多的研究<sup>[3,13-15]</sup>, 而栀子药材遗传差异的研究显得相当薄弱, 从而影响了栀子新品种的选育。本研究采用 ISSR 技术分析来自江西省樟树、丰城、新干等 3 个栀子 GAP 种植示范基地的样品在 DNA 水平上的差异, 旨在初步了解栀子的遗传变异以及这些材料之间相互关系, 为栀子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料:样品来自江西省樟树市吴城乡、丰城市隍城镇、新干县金川镇(表 1)的栀子 GAP 研究与示范基地,由朱培林研究员鉴定共 50 个样品。样品来源:樟树市吴城乡 27 个,样品编号 Z01 ~ Z27;丰城市隍城镇 3 个,样品编号 F01 ~ F03;新干县金川镇 20 个,样品编号 X01 ~ X20。新鲜叶片硅胶干燥后备提取 DNA。

表 1 3 个产地的地理及气候因子

Table 1 Factors about geography and climate in three habitats

产地	北 纬	东 经	年均温 /	降水量 /mm	年日照 时数/h	无霜期 /d
丰城	27°42' ~ 28°25'	115°25' ~ 116°27'	17.3	1 550	1 935.7	274
樟树	115°06' ~ 115°4'	27°49' ~ 28°09'	17.6	1 545	1 898.7	275
新干	27°30' ~ 27°58'	115°14' ~ 115°44'	17.7	1 594.8	1 625.4	275

1.2 基因组 DNA 的提取与 ISSR-PCR 反应:基因组 DNA 的提取参考 Doyle 等<sup>[16]</sup>的 CTAB 法做适当改良,增加去除多糖和多酚的步骤,并添加抗氧化剂巯基乙醇。提取的 DNA 用 Promega 基因组 DNA 纯化试剂盒纯化,然后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,将 DNA 质量浓度调整为 5 ng/μL。

ISSR 引物是根据哥伦比亚大学提供的序列,在上海生工有限公司随即合成了 45 个引物,随机选取 3 个产地各一个样品进行预实验,从 45 个 ISSR 引物序列中筛选出能够扩增出清晰条带、反应稳定的 10 个引物(表 2),对所有的材料进行 ISSR-PCR 反应扩增。PCR 反应总体积 25 μL,其混合物成分为 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 8% DMSO, 0.4 μmol/L 引物, 10 × PCR Buffer, 1 单位 rTaq DNA 聚合酶, 25 ng 模板 DNA。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 2 min,接着 35 个循环的 94 °C 45 s, 46 °C 40 s, 72 °C 2 min,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的含 0.5% EB 的进口 (Promega) 琼脂糖胶, 0.5 × TBE 缓冲液, 120 V 恒压电泳 3 h。用 100 bp 的 DNA ladder (MD109-01, 北京天为时代科技有限公司) 为相对分子质量标记。Gel-document 2000 凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司) 成像记录。

1.3 数据统计与分析:ISSR 通常为显性标记,电泳迁移率相同的条带被认为是同源条带,属于同一位点。按电泳条带有 (1)、无 (0) 记录,构成数据矩阵。用 Popgene1.3.1 软件计算遗传多样性参数和相似性参数<sup>[15]</sup>。用 Winamova 软件<sup>[17]</sup> 计算出居群间的方差组分 V (A) 和居群内的方差组分 V (B); 用 PAUP4.0<sup>[18]</sup> 计算出 Nei-Li<sup>[19]</sup> 距离,然后再用

表 2 ISSR 引物序列及其位点数与多态性

Table 2 Sequences of ISSR primers used and their loci and polymorphism

序号	引物名称	序列	位点数目	多态位点	多态位点百分率/ %
1	ISSR-15	GGA-(GTG) <sub>4</sub>	5	1	20
2	ISSR-18	(AC) <sub>7</sub> -T	6	4	66.67
3	ISSR-19	GC-(AC) <sub>7</sub>	9	3	33.33
4	ISSR-24	(GT) <sub>7</sub> -CC	10	8	80
5	ISSR-41	(CA) <sub>7</sub> -AG	5	2	40
6	ISSR-43	(CA) <sub>7</sub> 7-GT	5	5	100
7	ISSR-44	(CT) <sub>8</sub> -AC	2	2	100
8	ISSR-45	(CT) <sub>8</sub> -GC	5	3	60
9	ISSR-S	(GAG) <sub>4</sub> -R* C	5	1	20
10	ISSR-T	(GTG) <sub>4</sub> -R* C	6	3	50
	平均		5.8	3.2	57

R\* 为 A 或 G

R\* is A or G

MEGA3.0<sup>[20]</sup>进行 Neighbour-Joining (NJ) 的聚类分析。

2 结果

2.1 栀子的遗传多样性:10 个 ISSR 引物对所有的样品均扩增出清晰的条带(图 1),共扩增出 58 个位点,平均每个引物扩增出 5.8 个位点,DNA 片段的大小在 300 ~ 1 800 bp。其中,32 个位点为多态位点,多态位点百分率 (PPB) 值为 55.17%,每个引物平均获得 3.2 个多态条带(表 2)。其中樟树市吴城乡的样品共有 58 个位点,多态性位点有 31 个,多态位点百分率为 53.45%;丰城的样品共有 58 个位点,只有 1 个多态性位点,多态位点百分率为 1.72%;新干的样品总位点数 58 个,其中 8 个多态性位点,多态位点百分率为 13.79%。Nei s 多样性指数 (Nei s genetic diversity) 变化范围在 0.005 ~ 0.167,平均值为 0.068;shannon 信息指数 (Shannon s Information index) 变化范围在 0.008 ~ 0.254,平均值为 0.105(表 3)。



图 1 部分来自樟树 (Z01 ~ Z21)、丰城样品 (F01、F02) 的 ISSR-18 电泳图

Fig. 1 ISSR-18 Electrophoregram among samples from Zhangshu (Z01—Z21) and Fengcheng (F01—F02)

表 3 3 个道地产区的栀子遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity of *G. jasminoides* from three habitats

产地	位点总数	多态性位点数	多态位点比率/ %	Nei s 多样性指数	Shannon s 信息指数
樟树	58	31	53.45	0.167	0.254
丰城	58	1	1.72	0.005	0.009
新干	58	8	13.79	0.032	0.053
总体	58	32	55.17	0.147	0.233

合计的各项指标是把樟树、丰城、新干 3 地的样本合在一起当作一个居群来计算的

Each index is calculated by putting samples from Zhangshu, Fengcheng, and Xingan together as one population

2.2 不同产地栀子材料的相互关系:从 50 个样品的 NJ 聚类图(图 2)中可以看出,来自樟树、丰城和新干的栀子样品大体上可以分为两组。第一组由樟树的样品组成,而第二组主要由新干的样品和丰城的样品组成,内含樟树的个别样品。

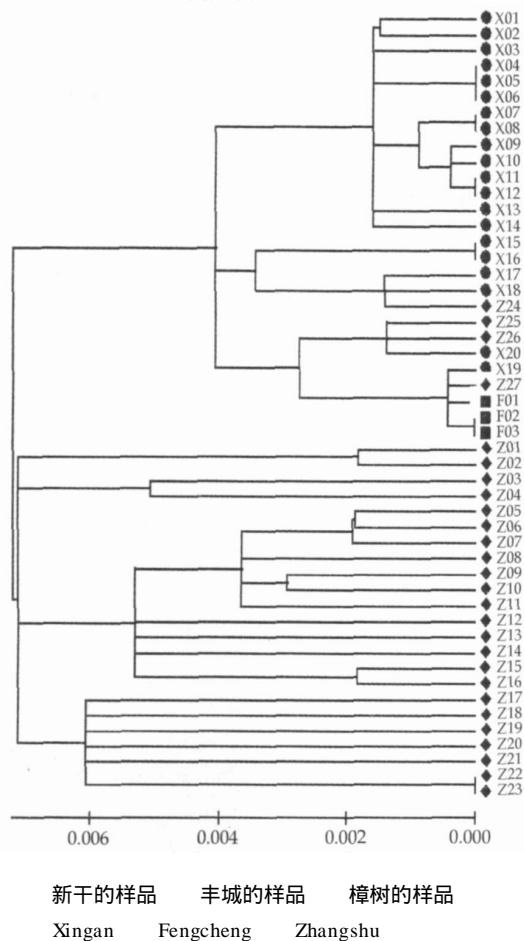


图 2 栀子样品之间相互关系的 NJ 聚类图

Fig. 2 NJ Dendrogram among samples of *G. jasminoides*

3 讨论

3.1 栀子的遗传多样性:从多态性位点百分率、Nei s 多样性指数、Shannon 信息指数可以看出,大于总体水平的只有樟树的样品,说明该地的栀子遗

传多样性最高,遗传变异比其他两地更为丰富。樟树的样品,在 58 个位点中,多态性位点有 31 个,多态位点百分率为 53.45%,Nei s 多样性指数为 0.167,Shannon 信息指数为 0.254,在 3 个产地中均居于最高水平。这可能与种植的栀子种源丰富有关。相对而言,3 个栀子 GAP 种植点,以樟树种植面积最大,一方面取样范围因此也大;另一方面,据了解其种植苗木来源系从永丰县专业育苗户调入,种源可能更复杂,因而多样性较大;丰城与新干种植点面积均较小,取样范围比樟树更窄,同时此两地种植用苗均源于当地育苗,由于所育苗数量较少,种源范围也可能更小,故多样性较小。来自丰城的样品遗传多样性最低,在 58 个位点中,多态性位点只有 1 个,多态位点百分率为 1.72%,Nei s 多样性指数为 0.005,Shannon 信息指数为 0.009,一方面可能是因为取样地丰城县隍城镇位于湖区,地势平坦,小气候单一;另一方面可能是由于取样不够,所以来自丰城的样品的遗传多样性还有待进一步的研究。

3.2 用 ISSR 分子标记鉴定栀子的道地性:不同产地的栀子质量差别较大。赵祥军等<sup>[21]</sup>研究了湖南长沙、广西南充等 9 个不同产地的栀子,其栀子苷质量分数不同,也即栀子的质量不同。所以,鉴别栀子的道地性很有必要。要鉴定药材的道地性可凭形态学性状或经验,辅之以分子生物学手段。这样能更准确鉴定其道地性,消除品种混杂等问题。

目前,已经有人对中草药的道地性作了 ISSR 鉴定。罗群等<sup>[22]</sup>用 8 条 ISSR 引物建立了 10 个川乌居群的 DNA 指纹图谱,准确、高效地鉴别了 10 个川乌居群;周延清等<sup>[23]</sup>用一个 ISSR 引物建立了 10 个怀地黄样品的 DNA 指纹图谱并且能将其彼此区分出来。但用分子标记的手段来鉴定栀子道地性的研究目前尚未见有报道。本研究对来自不同产地的栀子进行了 ISSR 分析,揭示了不同产地栀子的遗传关系。从聚类图可以看出,来自樟树、丰城和新干的栀子样品聚为两组。大体上,樟树的样品聚为一支,而新干和丰城的样品又聚为另一支,来自丰城的所有样品再聚在一个小支上,表明了来自同一个地方的样品,遗传距离也比较近,遗传上比较相似。因此,ISSR 分子标记可以将不同地方的栀子大致分开。然而,聚类结果也有一些例外的地方。丰城的样品虽然聚为一个小支,但是却在新干样品的大支内,表明虽然丰城和新干地理距离比较远,但是样品之间的遗传距离却非常近。这有两种可能,一种是两地通过引种等交流种源,因此种源一样;另一种可

能是两地的生境相似,均为平原湖区,气候单一,自然选择导致适应相同自然环境的基因型保存下来,从而使两地样品具有很高的遗传相似性。另外有少数樟树的样品(Z24~Z27)和丰城的样品聚在一个大支上,说明物种内部不同居群的遗传分化并不很大,不可能像具有很长生殖隔离历史的物种之间那样毫不含糊地区分每一个个体,这也是分子标记分析常用居群的基因频率而非个体作为分析单元的原因。这类问题可通过增加位点数目得到解决。

可见,基于栀子的 ISSR 遗传多态性的聚类分析结果与栀子产区的地理分布比较吻合,这为从分子生物学角度研究栀子的道地性提供了新的启示。可以说药材的道地性不仅仅是一个地理上的概念,同时也具有丰富的遗传特质。而作为现代分子生物学的重要手段,ISSR 分子标记技术对揭示道地药材与非道地药材之间的地理-生态-遗传的差异是一种有效的手段。

#### 参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 中国药典 [S]. 2005.
- [3] 付小梅, 赖学文, 葛菲, 等. 中药栀子类药材资源调查和商品药材鉴定 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 23-25.
- [4] 高增平, 江佩芬, 邬国庆, 等. 栽培栀子与野生栀子化学成分对比研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 654-656.
- [5] Shaw P C, Wang J, But P P H. *Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology* [M]. Singapore: World Scientific Publishing, 2002.
- [6] Ash G J, Raman R, Crump N S. An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using intersimple sequence repeats (ISSR) analysis [J].

- Weed Res*, 2003, 43: 208-213.
- [7] Pradeep R M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [8] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 100-103.
- [9] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [10] 沈颖, 徐程, 万小凤, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 423-427.
- [11] 左云娟, 朱培林, 刘强, 等. 道地药材江枳壳品种遗传学关系的 ISSR 证据 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1416-1419.
- [12] 李靖, 程舟, 杨晓伶, 等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [13] 曹进, 徐燕, 张永知, 等. 栀子药材的指纹图谱整体性分析 [J]. 分析化学, 2004, 32(7): 875-879.
- [14] 田智勇, 于培明, 许启泰. 中药栀子的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(11): 782-784.
- [15] Yeh F C, Yang R, Boyle T, et al. *POPGENE, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis: Release 1.31* [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11.
- [17] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479-491.
- [18] Swofford D L. *PAUP 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony* [M]. Washington: Smithsonian Institution, 2001.
- [19] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5629-5273.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [21] 赵祥军, 曹琳, 韩玉梅, 等. 不同产地栀子的质量研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 508.
- [22] 罗群, 马丹炜, 王跃华. 川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1554-1557.
- [23] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.

## 粗茎秦艽药材 HPLC 指纹图谱研究

王妍妍<sup>1</sup>, 赵志礼<sup>1\*</sup>, 吴新荣<sup>1</sup>, 王峥涛<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学 生药学教研室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立粗茎秦艽药材的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法 以龙胆苦苷为内参照物, 分析 13 批粗茎秦艽药材的 HPLC 色谱行为, 并进行相似度计算, 色谱条件: Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 240 nm。结果 标定了 10 个共有峰, 建立了 HPLC 指纹图谱, 该图谱相关系数均在 0.98~1.0。结论 该方法准确可靠, 重现性好, 可为控制粗茎秦艽药材内在质量提供科学依据。

**关键词:**粗茎秦艽; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0120-04

收稿日期: 2008-06-29

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目 (2006A-14)

作者简介: 王妍妍 (1983—), 女, 硕士, 研究方向为中药质量评价。E-mail: wuyan830406@126.com

\*通讯作者 赵志礼 Tel: (021) 51322202 E-mail: zhilzhao@sohu.com