

千斤拔属植物亲缘关系分析及其初步质量评价

张忠廉^{1*}, 张丽霞¹, 宋美芳¹, 李海涛¹, 高微微²

1. 中国医学科学院药用植物研究所云南分所, 云南 景洪 666100

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 分析千斤拔属植物种间亲缘关系, 并对其进行初步质量评价, 为筛选新药源提供理论依据。 **方法** 应用 ISSR 分子标记技术, 对 14 种千斤拔属植物进行亲缘关系分析; 同时, 采用紫外分光光度法测其总黄酮量。 **结果** 从 60 个 ISSR 引物中筛选出 30 个引物用于试验, 共扩增出 367 个条带, 其中多态性条带 363 条, 共有带 4 条, 多态性条带比例 (PPB) 为 98.91%, 遗传相似系数 (GS) 在 0.566 8~0.833 8, 表现出丰富的遗传多样性; 亲缘关系最近的为云南千斤拔和蔓性千斤拔, 遗传距离最远的为细叶千斤拔和墨江千斤拔; 总黄酮量最高的为勐捧千斤拔, 其次为蔓性千斤拔, 云南千斤拔总黄酮量也较高。 **结论** 千斤拔属植物具有丰富的遗传多样性, 云南千斤拔有成为药用植物蔓性千斤拔替代品的潜力。

关键词: 千斤拔属; ISSR; 遗传多样性; 云南千斤拔; 总黄酮

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1817-05

Analysis of genetic relationship and quality assessment on plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f.

ZHANG Zhong-lian¹, ZHANG Li-xia¹, SONG Mei-fang¹, LI Hai-tao¹, GAO Wei-wei²

1. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To analyze the genetic relationship of the plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. and make preliminary quality assessment, in order to provide the theoretical basis for screening the new medicinal resource. **Methods** Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers were used to analyze the genetic relationship of 14 species in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. Meanwhile, spectrophotometry was used to measure total flavones. **Results** Thirty primers were screened out of 60 ISSR random primers and produced 367 bands totally. Among them 363 bands (98.91%) were polymorphic, four bands were owned by all; The genetic similarity (GS) was 0.566 8 — 0.833 8, showing abundant genetic diversity; *F. wallichii* and *F. philippinensis* have the closest genetic relationship, *F. lineate* and *F. chaparr* have the largest genetic distance; The highest content of total flavones is in *F. mengpengensis* and secondary is in *F. philippinensis*, total content of flavones in *F. wallichii* is above average. **Conclusion** The plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. have the abundant genetic diversity. As medicinal plants, *F. wallichii* has the potential for replacing *F. philippinensis*.

Key words: *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f.; inter-simple sequence repeats (ISSR); genetic diversity; *Flemingiawallichii* Wight et Am.; total flavones

豆科 (Leguminosae) 千斤拔属 (*Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f.) 植物全世界约 40 种, 分布于亚洲、非洲热带和大洋洲的澳大利亚地区, 中国产 17 种及 1 变种, 主要分布于西南、中南和东南各省^[1-2]。该属植物在我国一直作为民族药及民间药被广泛使用, 其中有确切药用历史的就有 6 种^[3]。《中国药典》2010 年版^[4]规定千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔 *F. philippinensis* Merr. et

Rolfe、大叶千斤拔 *F. macrophylla* Willd. Prain 或锈毛千斤拔 *F. ferruginea* Wall. ex Benth. 的干燥根; 地方种还有球穗千斤拔 *F. strobilifera* (Linn.) Ait.、腺毛千斤拔 *F. glutiaosa* (Prain) Y. T. Wei 和宽叶千斤拔 *F. latifolia* Benth. 等。该属植物大都具有补肝肾、祛风湿、强腰膝的功效, 民间常用于治疗风湿性关节炎、腰腿痛、腰肌劳损、气虚脚肿、肺虚久咳、白带过多、月经不调、跌打损伤

收稿日期: 2011-04-02

基金项目: 中国医学科学院药用植物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项 (YZYN-09-04)

*通讯作者 张忠廉 (1982—), 男, 山西省阳泉市人, 助理研究员, 硕士研究生, 从事药用植物种质资源方面的研究, 主要研究方向为热带药用植物分子生物学。Tel: 15924692393 E-mail: zzl0605@163.com

等症^[3-4]。研究表明^[5], 千斤拔属植物及主要活性成分为黄酮类, 此外还含有香豆素类、萜类、挥发油类、脂肪酸类等, 具有抗炎镇痛、抗病原微生物、抗氧化、抗血栓、保护神经及脑组织等生物活性。近年来又发现因其富含植物雌激素而在治疗妇女更年期综合征方面有很好的疗效。目前, 对千斤拔药用资源的需求量日益增大, 《中国药典》2010 年版只规定 3 种千金拔属植物为千斤拔正品来源, 使得千斤拔药用资源供不应求。

本实验采用 ISSR-PCR 技术对千斤拔属 14 种植物进行遗传多样性分析, 同时采用紫外分光光度法测其总黄酮量, 旨在通过分析种间亲缘关系及初步

的质量评估, 扩大千斤拔药用资源, 为千斤拔的合理开发利用及新品种选育等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的 14 种植物材料均来自于中国医学科学院药用植物研究所云南分所栽培基地, 均经本所张丽霞副研究员鉴定, 收集当年生新鲜嫩叶, 经硅胶快速干燥后带回实验室内-20℃低温保存, 用于遗传多样性分析中的 DNA 提取; 收集原植物根部适量并保存于自封袋中, 以备下一步总黄酮的测定。材料编号、种名及其拉丁名见表 1。

表 1 14 份供试材料
Table 1 Fourteen materials used for test

编号	名称	拉丁名	编号	名称	拉丁名
HB	河边千斤拔	<i>F. fluminalis</i>	MP	勐捧千斤拔	<i>F. mengpengensis</i>
DY	大叶千斤拔	<i>F. macrophylla</i>	CY	长叶千斤拔	<i>F. stricta</i>
ZX	锥序千斤拔	<i>F. paniculata</i>	YN	云南千斤拔	<i>F. wallichii</i>
GZ	贵州千斤拔	<i>F. kweichowensis</i>	XY	细叶千斤拔	<i>F. lineate</i>
RM	绒毛千斤拔	<i>F. grahamiana</i>	MJ	墨江千斤拔	<i>F. chapparr</i>
XM	腺毛千斤拔	<i>F. glutinosia</i>	KY	宽叶千斤拔	<i>F. latifolia</i>
MX	蔓性千斤拔	<i>F. philippinensis</i>	AI	矮千斤拔	<i>F. procumbens</i>

1.2 仪器与试剂

扩增仪 (Biometra professional standard), 电泳仪 (Biometra 公司), 凝胶成像系统 (Uvitec 公司), TU—1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用), DP3111 型 DNA 提取试剂盒 (北京百泰生物技术有限公司), 引物 (上海生工), TaqDNA 聚合酶 (Takara 公司 DR001B), DNA Marker (Takara), 染料木黄酮对照品 (云南顺勃生物工程公司, 质量分数≥99.9%)。

1.3 ISSR-PCR 反应

1.3.1 基因组 DNA 的提取 材料经灭菌水清洗晒干后, 液氮充分研磨, 按照 DNA 快速提取试剂盒所提供方法提取基因组 DNA。DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 后经核酸蛋白分析仪测其原始质量浓度, 经适当稀释后-20℃保存备用。

1.3.2 PCR 反应 ISSR 反应体系: Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1.25 U、缓冲液 2 μ L 和模板 DNA 20~50 ng, 加 ddH₂O 至 20 μ L。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 30 个循环:

94℃变性 45 s, 50~55℃ (因引物序列不同退火温度不同) 退火 45 s, 72℃延伸 2 min; 循环结束后 72℃延伸 10 min。反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 V, 电泳 90 min, 经 EB 染色后在凝胶成像仪上观察并照相记录。

1.3.3 引物筛选 从 60 个 ISSR 随机引物中筛选出扩增条带清晰、多样性好、重复性高的 ISSR 引物用于样品的遗传多样性分析, 每个选定的引物至少重复扩增 2 次。每条引物退火温度进行单独摸索, 使之达到最好扩增效果。

1.3.4 统计分析与数据处理 ISSR 为显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 同一位点以带的有 (“1”) 和无 (“0”) 记录电泳条带, 得到 0、1 矩阵, 对于较弱条带, 如其在重复性试验中反复出现, 赋值 1。用 NTSYSpc 21-2 软件进行数据分析, 对原始矩阵用其中的 SimQual 程序求 DICE 相似系数矩阵, 用其中的 SHAN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析。

1.4 总黄酮的测定

1.4.1 对照品溶液的制备 精密称取充分干燥后的

染料木黄酮 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。

1.4.2 供试品溶液的制备 采用千斤拔总黄酮最佳提取工艺^[6], 各样品粉碎, 过 40 目筛, 于 60 ℃烘箱中干燥 6 h, 冷却后置于干燥器中备用。精密称取样品 1 g, 置于 150 mL 三角瓶中, 加 85% 甲醇 40 mL 超声提取 40 min 1 次, 滤过, 定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀。

1.4.3 线性关系考察 分别取对照品溶液 0.00、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 258 nm 处测其吸光度 (A)。以质量浓度 (X) 为横坐标, A 值 (Y) 为纵坐标, 标准曲线为 $Y=0.021\ 9X-0.014\ 1$, $r=0.999\ 1$, 在 0.5~4 μg/mL 内线性良好。

1.4.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 在波长 258 nm 处连续测定 5 次 A 值, 结果 A 值 RSD 为 0.32%, 说明仪器精密度良好。

1.4.5 重现性试验 精密称取 MP 样品 3 份, 制备供试品溶液, 测定总黄酮量, 结果质量分数为 3.683%、3.701%、3.659%, RSD 为 0.5%, 表明重现性良好。

1.4.6 稳定性试验 取 MP 样品供试液, 置室温条件下保存, 分别于 0、4、8、12、24、48 h 内测定 A 值。结果 A 值的 RSD 为 0.32%, 表明供试溶液在 48 h 内稳定性良好。

1.4.7 加样回收率试验 精密称取已知量的样品 5 份, 分别加入质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液 1 mL, 258 nm 处测定样品 A 值, 计算总黄酮量及样品回收率。结果 5 份样品的平均回收率为 99.64%,

RSD 为 1.12%。

1.4.8 总黄酮的测定 取供试品 1 mL, 置 10 mL 量瓶中稀释定容, 258 nm 处测其 A 值, 每个样品平行测定 3 次, 取其平均值, 计算总黄酮质量分数。

2 结果分析

2.1 引物筛选及扩增结果

对 60 个 ISSR 引物进行筛选, 共筛选出 30 个扩增条带较多、谱带清晰、多态性较好的引物用于 ISSR-PCR 分析, 具体引物名称、序列及其退火温度见表 2, 用筛选出的引物对 14 份材料进行 PCR 扩增, 并对扩增片段进行统计分析。结果显示, 扩增产物的碱基数在 100~2 000 bp。30 个引物共扩增出 367 个位点, 每个引物检测到的位点为 5~24, 平均每个引物可扩增出 12.2 条条带, 其中多态性条带 363 条, 共有条带 4 条, 多态性条带比例 (PPB) 为 98.91%。所筛选的 30 条引物全部是二核苷酸重复序列类型的引物, 其中 $(AG)_n$ 有 7 条, $(AC)_n$ 有 10 条, $(GT)_n$ 有 10 条, $(TC)_n$ 有 3 条, 说明千斤拔属植物基因组中存在大量的 AG、AC、GT 二核苷酸重复序列。图 1 为引物 UBC825 的扩增图谱。

2.2 遗传相似性分析

利用 NTSYS 软件计算出 14 份千斤拔属材料间遗传相似系数 (GS), 得到供试材料相似性矩阵 (表 3)。供试材料的 GS 值在 0.566 8~0.833 8, 表现出丰富的遗传多样性。由相似系数矩阵可以看出, 在所有供试材料间, XY 与 MJ 样品间遗传距离最远, 即遗传相似性最低; YN 与 MX 遗传距离最小, 即二者间亲缘关系最近。

2.3 聚类分析

利用 UPGMA 法对千斤拔属植物进行聚类分

表 2 筛选出的 30 个 ISSR 引物序列及其退火温度

Table 2 Thirty ISSR primer sequences and their annealing temperature

编号	引物序列	退火温度/℃	编号	引物序列	退火温度/℃	编号	引物序列	退火温度/℃
UBC808	$(AG)_8C$	54	UBC809	$(AG)_8G$	54	UBC810	$(GA)_8T$	52
UBC821	$(CA)_8T$	52	UBC823	$(TC)_8C$	54	UBC825	$(AC)_8T$	52
UBC829	$(TG)_8C$	54	UBC830	$(TG)_8G$	54	UBC831	$(AC)_8YA$	53
UBC834	$(AG)_8YT$	53	UBC841	$(AG)_8YC$	55	UBC843	$(CT)_8RA$	53
UBC844	$(CT)_8RC$	55	UBC846	$(CA)_8RT$	53	UBC847	$(CA)_8RC$	55
UBC848	$(CA)_8RG$	55	UBC849	$(GT)_8YA$	53	UBC850	$(GT)_8YC$	55
UBC851	$(GT)_8YG$	55	UBC855	$(AC)_8YT$	53	UBC856	$(AC)_8YA$	53
UBC858	$(TG)_8RG$	55	UBC859	$(TG)_8RC$	55	UBC860	$(TG)_8RA$	53
UBC807	$(AG)_8T$	52	UBC816	$(GA)_8G$	52	UBC817	$(CA)_8A$	52
UBC819	$(GT)_8A$	52	UBC826	$(GT)_8C$	54	UBC857	$(AC)_8YG$	55

R=G/A, Y=C/T

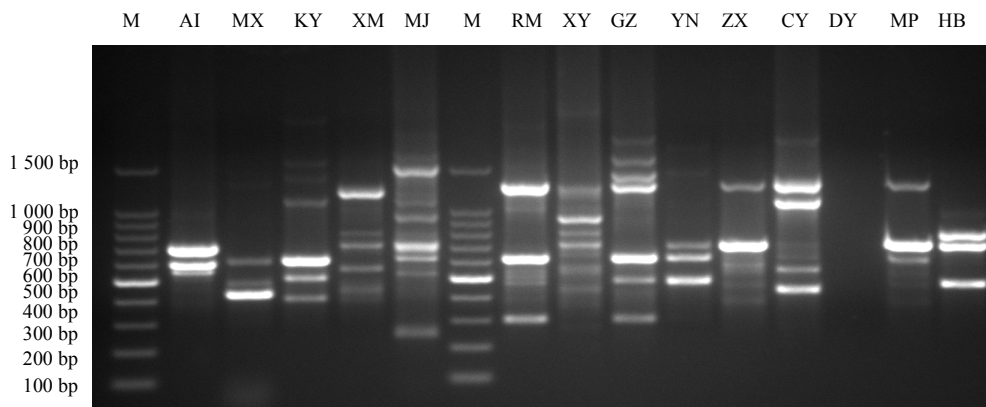


图 1 引物 UBC825 的 ISSR-PCR 扩增结果
Fig. 1 Amplification result of ISSR-PCR with Primer UBC825

表 3 ISSR-PCR 法建立的千斤拔属植物的遗传相似系数矩阵

Table 3 Genetic similarity matrix among plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. based on ISSR-PCR

材料	HB	MP	DY	CY	YN	GZ	XY	RM	MJ	XM	KY	MX	AI	ZY
HB	1.000 0													
MP	0.795 6	1.000 0												
DY	0.667 6	0.670 3	1.000 0											
CY	0.683 9	0.713 9	0.678 5	1.000 0										
YN	0.776 2	0.817 4	0.694 8	0.727 5	1.000 0									
GZ	0.700 3	0.724 8	0.673 0	0.689 4	0.760 2	1.000 0								
XY	0.705 7	0.686 6	0.613 1	0.580 3	0.667 6	0.574 9	1.000 0							
RM	0.637 6	0.673 0	0.648 5	0.632 2	0.741 1	0.735 7	0.588 6	1.000 0						
MJ	0.643 1	0.662 1	0.604 9	0.577 7	0.664 9	0.610 4	0.566 8	0.574 9	1.000 0					
XM	0.801 1	0.782 0	0.659 4	0.664 9	0.762 9	0.670 3	0.790 2	0.618 5	0.640 3	1.000 0				
KY	0.727 5	0.752 0	0.656 7	0.716 6	0.749 3	0.711 2	0.613 1	0.686 6	0.621 3	0.686 6	1.000 0			
MX	0.762 9	0.792 9	0.692 0	0.730 2	0.833 8	0.746 6	0.659 4	0.694 8	0.667 6	0.765 7	0.762 9	1.000 0		
AI	0.735 7	0.765 7	0.664 9	0.692 1	0.768 4	0.697 5	0.626 7	0.678 5	0.613 1	0.722 1	0.708 5	0.756 7	1.000 0	
ZY	0.730 2	0.722 1	0.599 5	0.637 6	0.681 2	0.648 5	0.632 2	0.591 3	0.629 4	0.711 2	0.632 2	0.662 1	0.651 2	1.000 0

析, 结果见图 2。由图可知, 亲缘关系最近的为 YN 与 MX 样品, GS 达 0.833 8; 次之为 HB 与 XM 样品, GS 为 0.801 1; 二分支与 MP 聚在一起成为较独立的一支, 然后与其他样品逐次聚在一起, 显示出逐步的递进演化过程; 其中, GZ 样品与 RM 样品较其他分支而言, 单独聚为一支, GS 为 0.735 7; 而遗传距离最远的 XY 与 MJ 样品, GS 仅为 0.566 8, 显示出千斤拔属植物间丰富的遗传多样性。

2.4 总黄酮测定结果

因样品资源有限, 本研究对 12 种千斤拔属植物进行总黄酮测定, 测定结果见表 4。其中, 量最高的为勐捧千斤拔 (3.685%), 其次为蔓性千斤拔 (3.136%), 最低的为腺毛千斤拔 (1.379%), 而与蔓性千斤拔亲缘关系最近的云南千斤拔总黄酮量较高 (2.148%)。

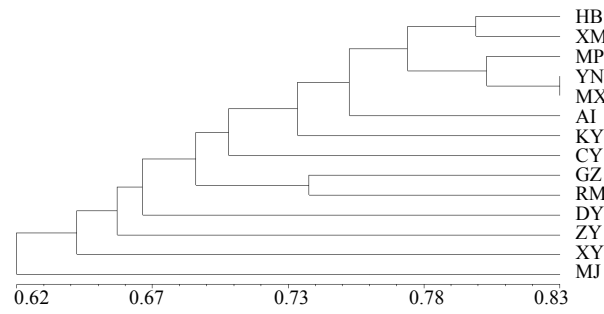


图 2 以 Nei's 遗传距离构建的千斤拔属植物 ISSR 聚类图
Fig. 2 ISSR dendrogram of plants in *Flemingia* Roxb. ex Ait. et Ait. f. based on Nei's genetic distance

3 讨论

遗传多样性体现着物种对环境变化的适应能力, 遗传多样性越丰富, 在环境发生变化时该物种生存下来的可能性越大, ISSR 分子标记技术因其

表4 总黄酮测定结果
Table 4 Determination of total flavonoids

样品	总黄酮/%	样品	总黄酮/%	样品	总黄酮/%
MP	3.685	MX	3.136	DY	2.880
KY	2.834	MJ	2.461	YN	2.148
CY	2.142	ZX	1.955	XY	1.939
HB	1.769	GZ	1.573	XM	1.379

稳定、方便、多态性丰富等优点,在药用植物遗传多样性及亲缘关系方面应用十分普遍^[7-9]。本研究结果表明,千斤拔属种间遗传距离水平差距很大,意味着该属植物对环境变化具有较强的适应能力。而 Hamrick 认为,物种的分布范围影响其遗传变异,遗传多样性水平与该物种分布区大小呈正比^[10]。依据韦裕宗等^[2]的研究结果,该属植物有 1/3 种,其分布的海拔高度变化幅度较大,适应生境较强、较广,此结论与本实验研究结果相一致。

千斤拔属植物虽在我国分布种类丰富,共有 17 种 1 变种,约占全属种类的 41%,尤其在我国云南西南部,被认为可能是该属植物的分布中心及起源中心,但大部分物种只在 1~3 个省区有分布,且种质资源十分匮乏,只有大叶千斤拔和蔓性千斤拔作为该属植物的广布种分布于我国 5 个省区以上^[2];外加千斤拔属植物大部分种类具有药用价值,如蔓性千斤拔、大叶千斤拔等作为妇科千金片、金鸡胶囊等中成药的主要原料,被广泛用于中成药的生产,从而造成千斤拔属植物野生资源锐减^[11]。本研究通过对千斤拔属植物亲缘关系进行分析,一方面对其野生资源保护策略提供了理论依据,另一方面为筛选新药源,使千斤拔属植物得到合理利用奠定基础。

从本研究结果可知,与千斤拔主流品种蔓性千斤拔亲缘关系最近的是分布较广、资源丰富^[9]且总黄酮量较高的云南千斤拔。依据以往科学研究结果,亲缘关系近的药用植物几乎具有相同或相似的功效、化学成分、药理作用^[12-13]。因此,云南千斤拔具有作为蔓性千斤拔替代品的开发潜力(总黄酮量最高的勐捧千斤拔虽与蔓性千斤拔的亲缘关系仅次于后者与云南千斤拔的亲缘关系,但其资源匮乏且分布范围很窄)。但仅以总黄酮量及亲缘关系判断其

是否能作为蔓性千斤拔替代品依据尚显不足,且关于云南千斤拔化学成分及药理作用的研究相对甚少,其是否能真正成为千斤拔替代品还需进一步科学研究。此外,总黄酮量最高的勐捧千斤拔,仅在我国云南省勐腊县(海拔 200~300 m)内分布,虽资源存储量少,但可作为以后千斤拔优良品种选育研究的候选种质资源以供选择,可对其进行深入的活性成分及药理作用研究,充分发挥其潜在的药用价值及商用价值。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志 [M]. 第 41 卷. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 韦裕宗. 中国千斤拔属植物的初步研究 [J]. 广西植物, 1991, 11(3): 198-204.
- [3] 吴征镒. 新华本草纲要 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [4] 中国药典 [S]. 2010.
- [5] 李 莉, 秦民坚, 张丽霞, 等. 千斤拔属植物的化学成分与生物活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 203-211.
- [6] 李 华, 马小军. 蔓性千斤拔总黄酮的提取与分析 [A]. 2008 年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集 [C]. 石家庄: 中国药学会, 2008.
- [7] Michael E, Soule L, Scott M. No need to isolate genetics [J]. *Science*, 1998, 282: 1658-1659.
- [8] 张春平, 何 平, 何俊星, 等. ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1519-1522.
- [9] 张忠廉, 李学兰, 杨春勇, 等. 砂仁遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 570-574.
- [10] Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. *Plant Population Genetic, Breeding and Genetic Resources* [M]. Massachusetts: Sinauer, 1989.
- [11] 管燕红, 马 洁, 张丽霞, 等. 西双版纳千斤拔属植物资源调查 [J]. 中药材, 2009, 32(10): 1514-1516.
- [12] 闫忠红, 李笑然. 当归属药用植物的本草学、亲缘关系、化学成分、及药理作用相关性研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2003.
- [13] 肖培根, 陈碧珠, 王力为, 等. 大黄属的植物亲缘关系、化学成分与疗效间联系性的初步研究 [J]. 药理学报, 1980, 15(1): 33-38.