

浙江西南野生金银花种质资源的特性研究

蓝云龙¹, 王庆霞², 朱云国², 戴德雄³, 余 杨⁴, 程 舟^{2,4*}

1. 丽水市林业科学研究院, 浙江 丽水 323000

2. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

3. 浙江维康药业有限公司, 浙江 丽水 323000

4. 同济大学丽水中药研究院, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 研究浙江西南地区野生金银花种质资源的形态性状、有效成分及遗传特性, 为金银花种质资源的开发利用及遗传育种提供依据。方法 采用形态性状调查、HPLC 检测及 ITS 序列分析揭示野生金银花种质的特性。结果 浙江西南地区的 6 个野生金银花种质在形态性状上差异较小, 通过 ITS 序列分析表明它们之间亲缘关系非常相近, 能够与忍冬属其他植物明显区分。6 个野生种质与栽培品种之间形态差异和有效成分量差异较大, 其中有性状优良的野生种质, 如产自浙江省景宁县 (ZJN1) 与浙江省青田县 (ZJQT) 的样品, 其绿原酸量分别为 1.94% 和 2.42%, 达到《中国药典》2010 年版标准。结论 研究野生金银花种质的优良特性, 对浙江西南地区野生金银花资源的开发及优良栽培品种的选育具有重要的现实意义。

关键词: 金银花; 种质资源; 形态性状; ITS 序列; 忍冬属

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2490-04

Characteristics of wild *Lonicera Japonica Flos* germplasm resources in Southwest Zhejiang Province

LAN Yun-long¹, WANG Qing-xia², ZHU Yun-guo², DAI De-xiong³, YU Yang⁴, CHENG Zhou^{2,4}

1. Forestry Research Institute of Lishui, Lishui 323000, China

2. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

3. Wecome Medicine Industry, Lishui 323000, China

4. Lishui Institute of Traditional Chinese Medicine, Tongji University, Lishui 323000, China

Abstract: **Objective** Morphological, chemical, and genetic characteristics of wild *Lonicera Japonica Flos* (LJF) germplasm resources in Southwest Zhejiang Province were discussed for the utilization and breeding of LJF germplasm resources. **Methods** Morphological investigation, HPLC detection, and ITS analysis were combined to reveal the feature of wild LJF germplasm. **Results** Few differences in morphology were found among six wild LJF germplasm in Southwest Zhejiang Province and ITS analysis showed the similar result, indicating a closed relationship which was easy to distinguish from the other species in *Lonicera* Linn. Diversities in morphology and components were found between wild and cultivated LJF. Some wild germplasm, like ZJN1 and ZJQT, presented good properties, with the contents of chlorogenic acid reaching 1.94% and 2.42%, respectively, which met the requirements of *Chinese Pharmacopoeia 2010*. **Conclusion** The investigation on the good characteristics of wild LJF germplasm could provide the practical reference for the development of wild LJF in Southwest Zhejiang Province and breeding of superior cultivars.

Key words: *Lonicera Japonica Flos* (LJF); germplasm resources; morphological characteristics; ITS sequence; *Lonicera* Linn.

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF) 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花, 为常用大宗中药材, 具有清热解毒、凉散风热之功效, 其主要成分为绿原酸和木犀草苷^[1]。

其原植物忍冬为多年生半常绿缠绕木质藤本植物。现代药理实验研究表明, 金银花及其同属植物具有解热、抗炎、抑菌、抗病毒、利胆保肝、止血、抗氧化、免疫调节、抗生育等作用^[2-3]。近年来, 随

收稿日期: 2012-04-17

基金项目: 丽水市科技合作项目 (2011NZH0219); 丽水市重大专项 (20090310)

作者简介: 蓝云龙, 高级工程师, 从事药用植物研究。E-mail: 98lyl@163.com

*通讯作者 程 舟 Tel: (021)65985185 E-mail: chengzhou@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1752.004.html>

着金银花在中成药、中药配方以及保健品开发等应用的扩大,其需求量不断增加。目前金银花以人工栽培为主要来源,在山东^[4]、湖南^[5]及河南、河北等地均有较大规模种植。李林等^[6]对浙江乐清、永嘉以及文成的金银花进行调查发现,其原植物分别为红腺忍冬、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,但资源分散,未能形成商品。杨进等^[7]对野生和栽培金银花品种进行了核型分析,研究表明金银花在进化和驯化过程中并未丢失染色体或获得额外的染色体,两者亲缘关系较近。然而,随着环境问题的加剧,金银花野生资源逐渐减少,且未得到充足的开发利用。野生种质是抗病虫性、抗逆性、丰产性等优良品质的重要来源,是优良栽培品种选育的基础。浙江西南地区地处东经 118°41′~120°26′和北纬 27°25′~28°57′,以中山、丘陵地貌为主,生态环境优越,是优质金银花产地,其野生金银花资源十分丰富。为更好地开发利用金银花野生种质资源,本研究对浙江西南地区的 6 个野生金银花种质形态、有效成分、遗传等方面进行了调查探讨和评价,筛选优质野生金银花种质资源,为该地区金银花资源的开发利用及高产优质品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集到浙江西南地区庆元县、丽水市、景宁县、青田县及近邻福建寿宁县的 6 个金银花野生种质,分别编号为 ZJQY、ZJLS、ZJJN1、ZJJN2、ZJQT 和 FJSN,均由丽水市林业科学研究院王军峰工程师鉴定为忍冬属忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的花。以浙江景宁县栽培品种 ZJZP 作为对照(表 1)。所有金银花种质均保存在丽水市林业科学研究院中药

材种质资源圃中。

1.2 形态性状调查

根据《中国植物志》^[8]中忍冬的形态性状,主要调查植物形态、幼枝颜色、被毛情况、老枝颜色、叶片材质、叶下面被毛情况、叶片大小、花期、花色、苞片形状等性状。

1.3 有效成分的测定

根据《中国药典》2010 年版一部^[1]记载的金银花中绿原酸及木犀草苷的测定方法,采用 HPLC 法测定并对比分析 6 个野生种质和 1 个栽培品种的绿原酸及木犀草苷量。

1.4 ITS 序列扩增及分析

采集金银花植物叶片于自封袋中,硅胶干燥,用改良 CTAB 法提取总 DNA^[9]。用 1.0% 琼脂糖凝胶检测 DNA 质量。以引物 ITS-1“AGAAGTCGTAA-CAAGGTTTCCGTAGG”, ITS-4“TCCTCCGCTTATTGATATGC”扩增金银花 rDNA ITS 序列^[10]。反应体系 50 μL 含 1×Buffer、1 mol/L dNTP、0.2 mmol/L MgCl₂、1 μmol/L 各引物、Taq 聚合酶 0.03 U、10% 二甲基亚砷、总 DNA 约 25 ng。扩增程序:94 °C 预变性 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C、2 min, 72 °C、1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增得到的 PCR 产物进行电泳检测,可观察到约 700 bp 片段即为 ITS 片段。扩增产物在英潍捷基贸易有限公司进行测序,采用双向测序对 DNA 两条链都进行测序,序列上传 GeneBank 数据库,见表 1。运用 MEGA4 软件对 ITS 序列进行对齐,个别位点进行必要的人工校正。对各样本进行序列比对,统计变异位点数。运用 MEGA4 软件进行系统发育分析,结合 GenBank 中下载的部分忍冬属植物的 ITS 序列,用 UPGMA 法构建遗传关系树状图。

表 1 金银花野生种质及栽培品种的形态性状特征

Table 1 Morphological characteristics of wild and cultivated germplasm of LJF

编号	产地	枝条	叶片	苞片	花期	GenBank 号
ZJLS	浙江省丽水市	红褐色,细而软,匍匐状	3~6 cm,革质,光滑无被毛	小叶状,长<1 cm	3月~4月	JQ780986
ZJQT	浙江省青田县	红褐色,细而软,匍匐状	3~6 cm,革质,光滑无被毛	小叶状,长<1 cm	4月~6月	JQ780987
ZJQY	浙江省庆元县	红褐色,细而软,匍匐状	5~8 cm,革质,光滑无被毛	大叶状,长2~3 cm	4月~6月	JQ780991
ZJJN1	浙江省景宁县	红褐色,细而软,匍匐状	3~6 cm,革质,光滑无被毛	大叶状,长2~3 cm	4月~6月	JQ780990
ZJJN2	浙江省景宁县	红褐色,细而软,匍匐状	5~8 cm,革质,光滑无被毛	大叶状,长2~3 cm	4月~6月	JQ780988
FJSN	福建省寿宁县	红褐色,细而软,匍匐状	3~6 cm,革质,光滑无被毛	小叶状,长<1 cm	3月~4月	JQ780989
ZJZP	浙江省景宁县	黄色,粗壮,灌木状	4~6 cm,纸质,光滑无被毛	叶状,长2~3 cm	4月~6月	JQ780993

2 结果

2.1 野生金银花种质资源的形态特征

参照《中国植物志》^[9]中对忍冬的性状描述,调查了浙江西南6个金银花野生种质及1个栽培品种的主要形态性状。结果表明金银花野生种质与栽培品种的形态性状差别较大。栽培品种 ZJZP 枝条较粗壮,呈小灌木状;幼枝与老枝均为黄绿色,被毛;叶纸质,长度3~6 cm;叶下面疏生糙毛或无毛,叶脉与叶边缘被毛;花期4月~6月,双花生于叶腋处或者集生于枝顶,花色由白变黄,具大的叶状苞片。金银花野生种质一般枝条细小,柔软,匍匐于地面,常延伸至约1 m远处;幼枝、老枝均为红褐色,被毛;叶革质,长度一般小于10 cm,不同种质之间有差异;叶脉与叶边缘被毛;具叶状苞片。此外,各野生种质的花期也不尽相同,ZJLS、ZJQT、FJSN 花期为3月~4月,ZJJN1、ZJJN2、ZJQY 和的花期为4月~6月,花色均由白变黄。

2.2 金银花野生种质资源的有效成分分析

对浙江西南地区6个野生种质和1个栽培品种的绿原酸及木犀草苷定量测定^[1]表明,野生种质 ZJJN1、ZJJN2、ZJQT 的绿原酸及木犀草苷量均高于栽培品种 ZJZP,结果见表2。种质 ZJJN1 和 ZJQT 的绿原酸量分别为1.94%和2.42%,达到《中国药典》2010年版标准,而木犀草苷量分别为0.049%和0.046%;栽培品种 ZJZP 无论是绿原酸及木犀草苷量均未达标。

表2 金银花野生种质及栽培品种中绿原酸与木犀草苷量
Table 2 Determination of chlorogenic acid and luteoloside in wild and cultivated germplasm of LJJF

编号	产地	绿原酸 / %	木犀草苷 / %
ZJQY	浙江省庆元县	0.84	0.015
ZJLS	浙江省丽水市	0.57	0.013
ZJJN1	浙江省景宁县	1.98	0.049
ZJJN2	浙江省景宁县	1.04	0.032
ZJQT	浙江省青田县	2.42	0.046
FJSN	福建省寿宁县	0.40	0.022
ZJZP	浙江省景宁县	0.77	0.029

2.3 基于 ITS 序列的金银花野生种质资源遗传特征

对6个金银花野生种质及1个栽培品种的 ITS 序列分析表明 ITS 序列全长722 bp,保守位点719个,共3个变异位点,其中信息位点1个,自近裔位点2个,变异率极小,为0.4%。结合 GenBank

中忍冬属囊管组、空枝组及忍冬组植物的 ITS 序列进行综合分析,忍冬属植物 ITS 序列全长725 bp,共45个变异位点,其中信息位点35个,变异率增加为4.8%,序列间差异明显增大。

基于 ITS 序列差异构建了 GenBank 登录的忍冬属囊管组、空枝组、忍冬组植物及本研究测得的7个金银花种质的遗传关系树状图,见图1。从图中可以看出,在遗传距离为0.010处可聚为3大支,刚好将忍冬组、空枝组和囊管组分开。实验测得6个野生种质以及1个栽培品种均聚在忍冬组内,6个野生种质及栽培品种均与忍冬亲缘关系非常近,聚为一支。

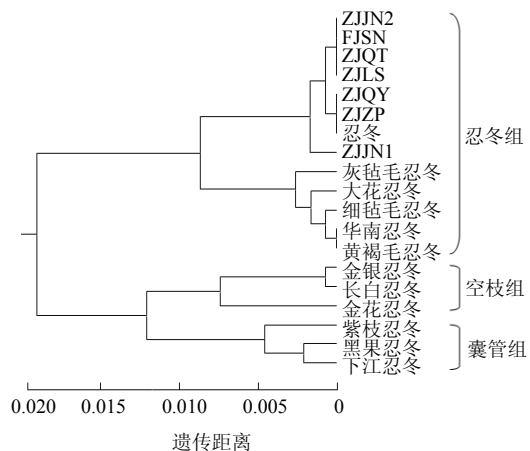


图1 基于 ITS 序列构建的浙江西南野生金银花种质及忍冬属植物的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree of wild germplasm of LJJF in Southwest Zhejiang Province and plants in *Lonicera* Linn. based on ITS sequences

3 讨论

浙江西南地区的6个金银花野生种质在植物形态上非常相近,与《中国植物志》^[10]中忍冬的性状描述较符合,为多年生藤本,枝条细小柔软,木质化程度低,与栽培品种在形态上有明显差别。栽培品种呈小灌木状,枝条粗壮繁密,木质化程度较野生种质高,叶面积、叶片密度以及开花期花蕾密度均较野生种质大。这可能与金银花栽培品种选育均注重选择灌木化、花密度高等性状有密切关系。因为在灌木形态下,通过修整株型、保证养分供应等方法可有效提高金银花的产量^[11]。

ITS 序列分析进一步验证了6个金银花野生种质在遗传上也与忍冬亲缘关系非常近,能够与山银花的植物来源灰毡毛忍冬、华南忍冬、黄褐毛忍冬

等明显区分。此外, 尽管野生金银花种质与栽培品种形态上存在较大变异, 但它们在 ITS 序列上的差异并不显著, 这说明栽培品种在形态特征上的变异可能主要来自于后天的人工选择。

本研究对浙江西南地区的 6 个金银花野生种质和 1 个栽培品种进行了有效成分定量调查。研究发现 6 个野生种质中绿原酸及木犀草苷量波动较大, 绿原酸量变化范围为 0.40%~2.42%, 木犀草苷量为 0.013~0.049%。栽培品种中绿原酸和木犀草苷量分别为 0.77%和 0.029%, 尚未达到《中国药典》2010 年版规定的要求 (绿原酸 $\geq$ 1.5%, 木犀草苷 $\geq$ 0.05%)。因此, 金银花在栽培生产中除了注重提升产量外, 更需要保证其品质的要求。以本研究所测的栽培品种 ZJZP 为例证, 其 2 个指标成分量均远低于一些野生种质, 如 ZJJN1 与 ZJQT。这两个野生种质与栽培品种相比, 在有效成分上更具优势, 其绿原酸量已达标, 木犀草苷量亦非常接近药典的要求, 是优秀的野生种质资源, 可以作为进一步开发利用的金银花材料。

综上所述, 浙江西南地区野生金银花种质资源在遗传关系上与栽培品种较近, 在形态性状、有效成分上与栽培品种有较大差异。其中不乏优良的野生种质如 ZJJN1 与 ZJQT, 因此, 加大对野生金银花种质的开发利用, 对选育浙江西南地区宜栽的优良金银花品种具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Oku H, Ogawa Y, Iwaoka E, *et al.* Allergy-preventive effects of chlorogenic acid and iridoid derivatives from flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(8): 1330-1333.
- [3] 盛卸晃, 刘文谦, 薛霞, 等. 绿原酸体外抗单纯疱疹病毒作用 [J]. *中国天然药物*, 2008, 3(6): 232-234.
- [4] 刘孝勇, 赵丽敏. 平邑县金银花产业发展现状及对策分析 [J]. *黑龙江农业科学*, 2011(7): 143-145.
- [5] 王昶, 王丁伟. 湖南省隆回县金银花产业现状及发展对策[J]. *湖南环境生物职业技术学院学报*, 2007, 13(4): 15-17.
- [6] 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.
- [7] 杨进, 李晓玲, 李宁, 等. 栽培种金银花和野生种金银花染色体核型的比较分析 [J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(2): 328-331.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 72 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [9] 王婷, 周凤琴, 李佳, 等. 忍冬干叶基因组 DNA 提取方法的研究 [J]. *中国中医药学刊*, 2008, 26(3): 496-498.
- [10] 朱颖, 董玉芝, 咎少平, 等. 基于 ITS 序列探讨忍冬属的系统发育关系 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(2), 250-254.
- [11] 王恒波, 袁月芳. 金银花繁育栽培技术 [J]. *河南林业科学*, 2003(3): 38-39.