

我国柴胡的种质资源现状与育种研究展望

姚入宇¹, 陈兴福^{1*}, 张宝林², 李志飞¹, 杨兴旺³

1. 四川农业大学农学院 农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 四川 温江 611130

2. 四川省内江市食品药品检验所, 四川 内江 641000

3. 四川德培源中药科技开发有限公司, 四川 绵阳 621000

摘要: 柴胡为常用大宗药材之一, 为顺应中药材规范化生产的趋势, 家种柴胡已成为主要的药材供应源, 对良种的需求日益急切。总结了我国柴胡种质资源的形态多样性、细胞核型多样性和分子遗传多样性特征, 并对目前柴胡育种成果进行综述, 建议今后柴胡育种工作以优良种质资源为基础, 结合传统选种法和现代分子育种法选育良种。

关键词: 柴胡; 育种; 种质资源; 系统选育; 分子育种

中图分类号: S567; S503 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1349-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.028

Germplasm resource status and breeding prospects of *Bupleuri Radix* in China

YAO Ru-yu¹, CHEN Xing-fu¹, ZHANG Bao-lin², LI Zhi-fei¹, YANG Xing-wang³

1. Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest China, Ministry of Agriculture, Agronomy College of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

2. Food and Drug Inspection Department of Neijiang City in Sichuan, Neijiang 641000, China

3. Sichuan Depeiyuan Traditional Chinese Medicine Technology Development Co., Ltd., Mianyang 621000, China

Key words: *Bupleuri Radix*; breeding; germplasm resource; systematic breeding; molecular breeding

柴胡 *Bupleuri Radix* 已有 2 000 年以上的药用历史, 是最常用的药用植物之一, 用于治疗发热、流感、胸部扩张性疼痛、月经紊乱等症^[1-2], 具有抗病毒感染、抗溃疡、抗肿瘤、免疫调节和保肝等多种作用^[3-7]。柴胡是一种世界性的植物药, 药材来源于伞形科 (Umbelliferae) 柴胡属 *Bupleurum* L. 多种植物的干燥根, WHO 于 1999 年将 *B. falcatum* L.、*B. falcatum* L. var. *scorzonerifolium* (Willd.) Ledeb.、柴胡 *B. chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 等作为药用柴胡的来源^[8]。《中国药典》2010 年版仅收录了后两种植物的干燥根作为正品柴胡药材原植物^[9]。柴胡药用价值高, 化学成分复杂, 随着提取分离技术与波谱识技术技术的发展, 目前已从柴胡中分离得到了多种皂苷、多糖、黄酮、脂肪酸、香豆素、多炔、类固醇和吡啶生物碱等几大类次生代谢产物^[8,10]。但是柴胡属物种繁多, 种间质量参差不齐^[11], 不利于柴胡药材质量的稳定和有效控制; 因

其生长特性不一致, 也不便于规范化生产; 另一方面, 有效成分低、产量低的柴胡品种种植的效益也很低。针对柴胡优质高产、稳产已经做了许多卓有成效的工作, 本文总结柴胡种质资源与育种研究进展, 并对今后发展提出展望。

1 我国柴胡种质资源概况

种质资源是资源开发的基础, 是指具有特定种质或基因、可供育种、栽培及相关研究利用的各种生物类型, 又称为遗传资源 (genetic resources)、基因资源 (gene resources)、品种资源或育种的原始材料, 包括品种、类型、近缘种和野生种的植株、种子、无性繁殖器官、细胞、染色体、基因甚至 DNA 片段等^[12]。柴胡属植物全世界大概有 200 种, 《中国植物志》记载有 59 种 (含变种、变型), 我国幅员辽阔, 药用柴胡广布于除海南岛以外的各个地区。调查显示, 我国药用柴胡主要是来自柴胡属 25 种、8 变种、3 变型植物^[13]。仅就其生物学种而言, 柴

收稿日期: 2013-01-20

基金项目: 国家星火计划项目 (2010GA810056); 四川省科技富民强县专项计划项目“青川县柴胡现代化科技产业基地建设”

作者简介: 姚入宇 (1988—), 男, 在读硕士研究生, 药用植物学专业, 主要研究方向为药用植物生理生态与栽培。E-mail: yry0255@126.com

*通信作者 陈兴福, 教授, 博士生导师。Tel: (028)86290970 E-mail: chenxf64@sohu.com

胡种质资源丰富,不同变种、变型、生态型柴胡的存在更扩充了我国柴胡种质资源库。

1.1 柴胡种质资源的形态多样性

柴胡种质资源的多样性,最直观的表现其在外观形态上的不同。舒璞等^[14]主要依据柴胡属植物的形态性状采用聚类分析和主成分分析的方法,选取了根、茎、总苞片、小总苞片、果实等器官的49个主要形态性状,对国产17种柴胡属植物进行了分类,探讨了柴胡属药用植物各种间的亲缘关系及种间、种下单位的分类关系,首次提出中国柴胡属植物的分类系统,将柴胡属分为大叶柴胡亚属和真柴胡亚属,后者又可分为大苞组和小苞组。此外,通过不同柴胡的根形、油管、气味、叶表皮特征、花粉形态、薄层色谱特征等也能将其各类型区分开来^[15-18],说明不同类型柴胡具有特定的形态学标记和理化标记,展示了我国柴胡的种质资源多样性。由此可知,我国柴胡种质资源丰富,并且形态多样,而迥异的外观性状既可以作为其种质资源的一种标记,也可作为柴胡育种工作中的选种目标性状。

1.2 柴胡种质资源的细胞核型多样性

目前对柴胡染色体数已有数百个记录,染色体基数有4、6、7、8,以6、7、8为常见,大多是二倍体。姜传明等^[19]揭示了柴胡核型特征,分析了北柴胡、狭叶柴胡、柞柴胡 *B. komarovianum* Lincz.、锥叶柴胡 *B. bicaule* Helm.、大叶柴胡 *B. longiradiatum* Turcz. 和柴胡五里木居群的染色体数目,发现不同种质来源的柴胡细胞核型各有特点,并根据核型特征分析了东北地区各种柴胡间的演化关系。王奇志等^[20]对横断山区柴胡6个种2变种进行了染色体研究,结果表明,不同种间染色体的数目、形态、大小、长度均存在差异,表现出多样的细胞核型。因此,柴胡的核型可作为其细胞学辅助标记,能够代表柴胡种质资源的多样性。

1.3 柴胡种质资源的分子遗传多样性

随着分子生物学技术的发展,对柴胡种质资源的研究已深入到分子水平。梁之桃等^[21]通过RAPD技术对柴胡属5种植物进行了标记分析,阐明了这些植物的亲缘关系,该技术也能用于柴胡种源道地性鉴定^[22]。ISSR标记可以揭示更高层次的DNA多态性,隋春等^[23]建立了适于柴胡ISSR分析的反应体系,并采用ISSR分子标记分析了3份栽培柴胡种质个体间及种质间差异。白杨^[24]以保康柴胡GAP种植基地北柴胡为研究重点,并与收集的其他2个

种植基地北柴胡及2个野生北柴胡进行比较,以三岛柴胡和银州柴胡作为种外参照,采用ISSR技术标记不同产地柴胡的DNA,分析了不同产地、不同品种柴胡的遗传多样性和亲缘关系及其与药材品质的相关性。武莹等^[25]将rDNA ITS序列分析技术用于柴胡的基源鉴定中,通过对《中国药典》收载品种柴胡、狭叶柴胡,各地常用品种竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC.、黑柴胡 *B. smithii* Wolff.、小叶黑柴胡 *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li.,以及柴胡近缘属孜然芹属植物孜然芹的序列分析表明,ITS1、ITS2序列信息位点较为丰富,不同种的柴胡均有特异性的变异位点。柴胡属内差异率较低,与近缘属植物间差异率较高。国外学者使用核糖体DNA的ITS序列对主要来源于欧洲西南部和非洲西北部的柴胡属植物32个种进行了属内系统学研究^[26]。王奇志等^[20]对横断山区柴胡10个种4个变种,及产于河北和黑龙江的柴胡3个种的nrDNA ITS进行测序,同时从GenBank中下载同属的来自非洲和地中海西部16种柴胡nrDNA ITS序列数据,结合染色体数目变化结果,探讨了横断山区柴胡属植物的系统发育状况,认为横断山区可能是现代柴胡属植物的频度中心和多样性分布中心之一。分子标记的联合使用在种质资源鉴定中更为有效,结果更为可靠。郑亭亭^[27]以核型分析为参考,结合SSR和ITS标记进一步分析发现红根型红柴胡和白根型红柴胡的种质不同。可见柴胡种质资源存在广泛的分子遗传多样性,这些特征一方面是柴胡种质多样性的证据,另一方面也能说明柴胡种质间的亲缘进化关系,而多种分子标记合用是柴胡基源鉴定的可靠方法。

由以上研究可知,我国柴胡种质资源丰富,表现在其形态多样性、细胞核型多样性和分子遗传多样性方面。收集柴胡种质资源是柴胡育种的基础,应当广泛收集形态上、细胞及分子水平上有不同特征的个体样本,建立柴胡种质资源库,从而为充分利用我国丰富的柴胡种质资源提供素材。

2 我国柴胡育种的研究进展

我国素有人工栽培柴胡的习惯,长期以来无新品种,家种柴胡主要靠自留种,各地农家栽培类型构成了家种柴胡的品种来源。农户的柴胡种子多是本地野生资源留种、药材市场购种或名产地引种,使得品种混杂的现象严重^[28],且存在许多非药典收载品种,即使同一产地也有多种类型。据报道,山

西省的农家栽培北柴胡就有多支根型、少支根型和单根型3类^[29]。三岛柴胡是最早在日本选成的柴胡商品品种，其品质优良，萌发率较野生种高，我国从20世纪80年代开始试引种，目前已掌握完备的种植技术，但其仍为非药典品种，不能满足中国市场需求。随着我国柴胡的需求量加大，人们对符合《中国药典》规定、品质纯正优良、利于生产管理的品种的需求也日渐增大，一系列新品种在此情形下应运而生。

2.1 “中柴1号”的成功选育

“中柴1号”是国内外首个北柴胡新品种，采用混合选育法，从河北省的1份休眠浅、种子萌发率高的地方品种中选育而成。“中柴1号”具有浅休眠特征，与其他家种或野生柴胡比较，表现出萌发率高、药材根形好、柴胡皂苷量稳定、产量高、效益好等优势，于2003年正式被北京种子管理站鉴定认可。杨成民等^[30]还对其中皂苷量的动态变化进行了研究，确定有效成分产量为采收指标，建立其规模化生产的理论与技术，目前已得到较广泛的推广。作为第1个被鉴定认可的柴胡商品品种——“中柴1号”对缓解柴胡市场供求和规范柴胡药源功不可没。

2.2 “中柴2号”和“中柴3号”的成功选育

“中柴2号”和“中柴3号”则是在“中柴1号”的基础上以系统选育法选育的良种。采用单株选育法，以几种柴胡品种的整齐度、株型、产量、根色和有效成分量为特征指标，得到新选品种，具有根色深、株型矮的特征，其他品质性状更优秀。这2个品种也在2009年获得北京市非主要农作物品种鉴定证书。相比于“中柴1号”，“中柴2号”和“中柴3号”在整齐度、皂苷量和产量等性状均有所提高^[31]。由此可见，以中柴系列为代表，我国柴胡新品种品质性状逐代优化，表现出良好的发展势头。但其对某些生态环境适应性不佳，笔者发现，四川省青川县马公乡引种的中柴系列良种在植株生长过程中与当地特殊气候不适应，生长期推迟。一方面柴胡花期遇雨季，不利于授粉和结实；另一方面，引种的植株长势不佳，药材生产情况也不及原产区优良。为此，有必要继续选育性状多样，适应多种生态环境的柴胡新品种。

2.3 分子育种在柴胡育种中的应用

柴胡的遗传标记辅助育种也取得一定成绩，在DNA标记方面，陈怀琼等^[32]采用磁珠富集法筛选

出具有多态性、可重复的SSR引物，隋春等^[33]建立并优化了柴胡的ISSR-PCR反应体系，对栽培柴胡种质遗传的混杂度进行了ISSR分析，并利用ISSR和SSR分子标记构建了北柴胡遗传图谱^[34]。基因工程方面取得的成果，已经对北柴胡皂苷合成途径上游的5个关键酶基因进行了克隆和序列分析^[35-37]，还构建了北柴胡根的全长富集cDNA文库，并获得了3111个高品质EST序列^[38]，而454焦磷酸测序技术也已应用于北柴胡皂苷生物合成途径相关基因的分析中^[39]，为北柴胡功能基因组研究和各种生理现象的分子机制研究提供了基础。北柴胡中可能参与柴胡皂苷合成的UGT基因的全长cDNA克隆及其RNAi转基因载体的成功构建^[40]，又为柴胡的转基因育种奠定了基础。以上研究工作为今后利用植物基因工程改良柴胡性状、培育高质量的柴胡新品种奠定了理论和技术基础。

3 结语与展望

我国柴胡种质资源丰富，表现在形态多样性、细胞核型多样性和分子遗传多样性方面，柴胡育种基础工作已经较为完备，并取得一定成效。采用传统的混选法获得的“中柴1号”良种，开启了我国柴胡商品品种的序幕；以单株系统选育得到的“中柴2号”和“中柴3号”品种在品质和整齐度上更进一步，我国柴胡品种选育呈现出良好的发展势头。此外，柴胡分子育种也取得一定成果。

近年来，国内外学者对柴胡的传统用法、植物化学、药理学和生物活性机制进行了深入研究^[41]，使得柴胡的功效更为明确，柴胡及其产品备受关注，市场需求量大，是柴胡产业发展的机遇。中药现代化的时代背景要求适宜大规模规范化栽培良种，而目前我国柴胡育种工作仍在起步阶段，建议柴胡育种工作主要从以下3个方面入手：一是扩大育种目标，既要注重优质高产、稳产，还要兼顾抗病虫育种，培育抗病虫品种以减少甚至替代在种植中农药的使用；二是建立种质资源库，广泛收集具有特征性状的种质资源，并深入研究其生理特性，为充分发掘其中的优良遗传性状准备材料；三是就育种方法而言，既要传统选种法在现有的品种中优中选优，又要借鉴如杂交育种、杂种优势育种、倍性育种和诱变育种等手段培育良种，还要推广分子育种技术，筛选、克隆关键基因，在基因水平上创造良种。如此选育柴胡优良品种，促进品种纯正、性状均一，药材质量安全、有效、稳定、可控的全面发展。

参考文献

- [1] Chen F P, Kung Y Y, Chen Y C, *et al.* Frequency and pattern of Chinese herbal medicine prescriptions for chronic hepatitis in Taiwan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(1): 84-91.
- [2] Ikegami F, Sumino M, Fujii Y, *et al.* Pharmacology and toxicology of *Bupleurum* root-containing Kampo medicines in clinical use [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2006, 25(8): 481-494.
- [3] Cheng P W, Ng L T, Chiang L C, *et al.* Antiviral effects of saikosaponins on human coronavirus 229E *in vitro* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(7): 612-616.
- [4] Matsumoto T, Sun X B, Hanawa T, *et al.* Effect of the antiulcer polysaccharide fraction from *Bupleurum falcatum* L. on the healing of gastric ulcer induced by acetic acid in rats [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(1): 91-93.
- [5] Kang S J, Lee Y J, Kim B M, *et al.* Effect of *Bupleuri Radix* extracts on the toxicity of 5-fluorouracil in HepG2 hepatoma cells and normal human lymphocytes [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 103(4): 305-313.
- [6] Wang Z, Li H, Xu H, *et al.* Beneficial effect of *Bupleurum* polysaccharides on autoimmune disease induced by *Campylobacter jejuni* in BALB/c mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(3): 481-487.
- [7] Zhao R Z, Yuan D, Liu S J, *et al.* Liver targeting effect of vinegar-baked *Radix Bupleuri* on rhein in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 421-428.
- [8] World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* [M]. Vol 1. Geneva: World Health Organization, 1999.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [10] Kuang H X, Sun S W, Yang B Y, *et al.* New megastigmane sesquiterpene and indole alkaloid glucosides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 35-38.
- [11] Huang H Q, Zhang X, Xu Z X, *et al.* Fast determination of saikosaponins in *Bupleurum* by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 1048-1055.
- [12] 肖凤回, 郭巧生. 药用植物育种学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [13] 潘胜利, 顺庆生, 柏巧明, 等. 中国药用柴胡原色图志 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002.
- [14] 舒璞, 袁昌齐, 余孟兰, 等. 中国柴胡属药用植物的数量性状分类研究 (I) [J]. 西北植物学报, 1998, 18(2): 277-283.
- [15] 黄玮, 孙平, 张文生, 等. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 453-457.
- [16] 逢云莉, 唐自慧, 王奇志, 等. 中国柴胡属植物叶表皮特征及系统学意义 [J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(2): 133-144.
- [17] 舒璞, 余孟兰. 中国伞形科植物花粉图志 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2001.
- [18] 胡双丰. 柴胡与其混淆品小叶黑柴胡及锥叶柴胡的鉴别 [J]. 药学实践杂志, 2006, 24(4): 222-225.
- [19] 姜传明, 徐娜, 王好友, 等. 东北柴胡属细胞分类学研究 I. 6种柴胡的核型分析 [J]. 植物研究, 1994, 14(3): 267-271.
- [20] 王奇志, 何兴金, 周颂东. 基于染色体计数和 ITS 序列初步探讨横断山区柴胡属植物 (伞形科) 的系统发育 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(2): 142-154.
- [21] 梁之桃, 秦民坚, 王峥涛, 等. 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定 [J]. 中草药, 2002, 33(12): 1117-1119.
- [22] 王秀全, 李玉新, 李会成, 等. 北柴胡种源地性的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2003, 26(12): 855-856.
- [23] 隋春, 魏建和, 王跃虎, 等. 柴胡栽培种质遗传混杂的 ISSR 分析 [J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2007, 24(7): 227-230.
- [24] 白杨. 不同产地柴胡的 ISSR 分子标记及品质研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.
- [25] 武莹, 刘春生, 刘玉法, 等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 732-734.
- [26] Neves S S, Watson M F. Phylogenetic relationships in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. *Ann Bot*, 2004, 93: 379-398.
- [27] 郑亭亭. 柴胡选育品系和主要栽培种质的品质及遗传整齐度评价 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.
- [28] 秦雪梅, 王玉庆, 岳建英. 栽培柴胡资源状况分析 [J]. 中药研究与信息, 2005, 7(8): 30-32.
- [29] 岳建英, 秦雪梅, 王玉庆. 北柴胡不同农家栽培类型调查初报 [J]. 中药材, 2005, 28(8): 650-651.
- [30] 杨成民, 魏建和, 程惠珍, 等. 北柴胡皂苷含量动态变化 [J]. 中药材, 2006, 29(4): 316-318.
- [31] 郑亭亭, 隋春, 魏建和, 等. 北柴胡二代新品种“中柴 2 号”和“中柴 3 号”的选育研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1931-1934.
- [32] 陈怀琼, 郑亭亭, 魏建和, 等. 磁珠富集法开发北柴胡多态性简单序列重复标记 [J]. 生物技术通讯, 2010, 21(2): 186-191.
- [33] 隋春, 魏建和, 陈士林, 等. 柴胡 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2008, 8(19): 1837-1839.
- [34] 战晴晴, 隋春, 魏建和, 等. 利用 ISSR 和 SSR 分子标记构建北柴胡遗传图 [J]. 药科学报, 2010, 45(4):

- 1-6.
- [35] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(5): 56-60.
- [36] 隋 春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1178-1184.
- [37] 隋 春, 魏建和, 战晴晴, 等. 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 283-290.
- [38] Sui C, Wei J H, Chen S L, *et al.* Construction of a full-length enriched cDNA library and analysis of 3111 ESTs from roots of *Bupleurum chinese* DC. [J]. *Bot Stud*, 2010, 51(1): 7-16.
- [39] Sui C, Zhang J, Wei J H, *et al.* Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 539-554.
- [40] 隋 春, 徐洁森, 赵立子, 等. 北柴胡 UGT 基因的克隆及其过量表达和 RNAi 转基因载体的构建 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 558-563.
- [41] Ashour M L, Wink M. Genus *Bupleurum*: A review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(3): 305-321.