

2个灯盏细辛新品种的选育

王馨¹, 鸭乔², 杨熊明², 晏朴华², 李林玉¹, 董志渊¹, 李绍平^{1*}

1. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650231

2. 云南施普瑞生物工程有限公司, 云南 昆明 650106

摘要: 目的 获得产量高、有效成分高、性状稳定的灯盏细辛品种。方法 采用集团选育和单株系统选育法, 对选育品种田间测评和 AFLP 指纹分析。结果 新品种“艾瑞杰 1 号”平均产量为 3 780 kg/hm², 灯盏乙素量为 1.84%, 总咖啡酸酯量为 1.79%; “艾瑞杰 17 号”平均产量为 3 075 kg/hm², 灯盏乙素量为 1.71%, 总咖啡酸酯量为 1.50%。与经一年驯化的当地野生种(对照)相比, 2 个新品种经济性状更优、一致性和稳定性更高, 且具有独特的 AFLP 指纹。结论 2 个灯盏细辛新品种有较好的推广价值。

关键词: 灯盏细辛; 品种; 集团选育; 系统选育; AFLP 指纹分析

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1831-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.025

Selective breeding of two new varieties from *Erigeron breviscapus*

WANG Xin¹, YA Qiao², YANG Xiong-ming², YAN Pu-hua², LI Lin-yu¹, DONG Zhi-yuan¹, LI Shao-ping¹

1. Medicinal Plant Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650231, China

2. Yunnan Spirin Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650106, China

Abstract: Objectives To obtain the variety of *Erigeron breviscapus* with high yield, high content of active constituents, and stable agronomic characteristics. **Methods** The group bulk selection breeding and individual selection breeding methods were applied respectively, and two varieties were evaluated partially by DUS testing and the fingerprint was analysed by AFLP markers. **Results** The variety “Airuijie No. 1” had the yield of 3 780 kg/hm², the scutellarin content of 1.84 %, and the total caffeic acid esters content of 1.79 %; For the other variety “Airuijie No. 17”, the yield was 3 075 kg/hm², the content of scutellarin was 1.71 %, and the content of total caffeic acid esters was 1.50%. Compared with the wild local *E. breviscapus* after one-year acclimatization, the two new varieties showed better economic traits with higher uniformity, more stability, and unique AFLP fingerprint. **Conclusion** The two varieties of *E. breviscapus* have high value of application and popularization.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz.; variety; group bulk selection breeding; selective breeding; AFLP fingerprint analysis

药用植物育种是实现中药现代化和产业化的客观要求^[1]。我国在药用植物系统选育^[2-3]、杂交育种^[4-5]、倍性育种^[6-9]、诱变育种^[10]及生物工程育种^[11-13]等方面开展了大量的研究,在一定程度上丰富了药用植物的种质材料,但覆盖品种极少,品种间育种水平参差不齐,优质育种材料仍然缺乏,基础研究有待加强。我国近 200 种人工栽培的药用植物中,有育成品种并推广应用的药用植物种类不到 10%^[1],其对产业发展的贡献率远不能与农作物育种相比^[5],药用植物育种的滞后严重制约了中药材产业发展。

灯盏细辛为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬

Erigeron breviscapus (Vant.) Hand. -Mazz. 的干燥全草,有祛风散寒、活血通络止痛的功效^[14]。云南是灯盏细辛的集中分布区,但野生资源数量急剧减少^[15]。灯盏细辛种植仅 10 余年时间^[16],现有栽培品种多为经短期驯化的野生种源,种源混杂问题突出。选育高产优质的灯盏细辛品种是保证原料质量、提高原料产量的最基本、可靠和经济有效的手段。本研究采用系统选育法,选育了 2 个灯盏细辛新品种,即“艾瑞杰 1 号”和“艾瑞杰 17 号”,旨在为促进灯盏细辛规范化生产和产业发展提供科学依据。

收稿日期: 2012-11-23

基金项目: 云南省重点产业创新工程 (IF2008024)

作者简介: 王馨 (1979—), 女, 甘肃省兰州市人, 副研究员, 从事药用植物栽培与育种研究。

Tel: (0871)5198972 E-mail: wangx913@126.com

*通信作者 李绍平 E-mail: kmlshp@126.com

1 材料

收集云南、四川、贵州 22 个居群的灯盏细辛资源 43 份^[17]，作为灯盏细辛品种选育的原始材料。经云南省农业科学院药用植物研究所李绍平研究员鉴定为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz.。

资源圃和选种圃位于云南省昆明市双龙乡大摆村，海拔 2 090 m，年平均气温 12.3 ℃，平均降雨量 830 mm，无霜期 220 d。品种评价和试验示范地点位于云南省大理白族自治州弥渡县密祉乡八士村，海拔 1 985 m，年平均气温 16.4 ℃，平均降雨量 750 mm，无霜期 228 d。

2 方法

2.1 选育方法

2.1.1 选育程序 灯盏细辛品种“艾瑞杰 1 号”采用混合选择法，“艾瑞杰 17 号”采用系统选育法。

2.1.2 育种目标 基于灯盏细辛相关性状与产量及有效成分的关联度分析，选取叶数、冠幅、基生叶高度为单株及群体选择的重点标识性状^[18]。以云南施普瑞生物工程有限公司对原料有效成分种类及其量的需求为依据，育种目标为每公顷产灯盏细辛干品 3 000 kg，灯盏乙素和咖啡酸酯总量 2.5%以上，且咖啡酸酯量接近或略高于灯盏乙素量。

2.1.3 选育过程 2005—2006 年，收集保存灯盏细辛资源 43 份，花期隔离；经初筛，选择滇西北的 5 份资源作为原始群体。2006—2007 年，混合收种得到 10 个群体，从中选出 4 个表现较优的群体并试种；对 13 个优良单株进行单株收种，筛选得到 2 个表现较优的品系并试种。2008 年起，除杂去弱，隔离收种，连续 3 年对选出的 4 个群体进行评价与鉴定，得到优良品种“艾瑞杰 1 号”；对选出的 2 个品系进行评价与鉴定，得到“艾瑞杰 17 号”。

2.2 品种评价

采用田间种植鉴定的方法，对品种的主要数量性状特异性、一致性测试，对产量和主要有效成分进行稳定性测试。“艾瑞杰 1 号”、“艾瑞杰 17 号”与对照地种植在相邻的田块，对照为经 1 年驯化的当地野生种。

2.2.1 植株形态和生物学特性 采用随机抽样法，2 个品种与对照品种各取 50 株处于现蕾前期的植株，进行植株形态和生物学特性的测定。

2.2.2 产量与有效成分量 产量为多个试验示范田块收获后实际测得；灯盏乙素和总咖啡酸酯量的测

定，以每年 2 次在试验示范田块中取样、每次 3 份混合样品的测定结果，取其平均值，取样时期为现蕾期。选育品种连续测定 3 年，对照种为 1 年测定结果。

2.3 AFLP 指纹分析

采用 AFLP 分子标记技术，对对照及 5 份优选出来的育种材料，即 4 个优良群体（包括“艾瑞杰 1 号”）和 2 个优良单株（包括“艾瑞杰 17 号”）进行分子指纹图谱的构建。用 CTAB 法提取供试材料基因组 DNA，0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度及质量。

2.3.1 AFLP 反应体系的建立 (1) 酶切：灯盏花基因组 DNA (100 ng/μL) 10 μL，EcoRI 1 μL，MseI 1 μL，BSA 1 μL，EcoRI 缓冲液 2 μL，ddH₂O 5 μL，共 20 μL。37 ℃ 消化 2 h，65 ℃ 30 min 终止反应，离心后放置在冰上。(2) 连接：双酶切产物 10 μL，EcoRI Adaptor 1 μL，MseI Adaptor 1 μL，T4 DNA Ligase 2 μL，10×缓冲液 2 μL，ddH₂O 4 μL，共 20 μL。22 ℃ 连接 3 h，65 ℃，10 min 终止反应。(3) 预扩增：连接后的 DNA 样品 4 μL，10×PCR 缓冲液 2 μL，pre-primer (MseI/EcoRI) 1 μL，MgCl₂ 1.6 μL，dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μL，Taq 酶 1 μL，ddH₂O 8.8 μL。混匀后，在 PCR 仪上扩增：94 ℃、2 min，94 ℃、20 s，56 ℃、30 s，72 ℃ 2 min，20 个循环；60 ℃ 延伸 10 min；4 ℃ 保温。预扩增产物稀释 20 倍，-20 ℃ 保存备用。

2.3.2 选择性扩增 预扩增产物 4 μL，引物 1 μL，AFLP Core Mix 15 μL，共 20 μL。混匀后，进行 PCR 扩增：94 ℃、2 min，94 ℃、20 s，60 ℃、30 s，72 ℃、min；以后每个循环温度递减 0.7 ℃，扩增 20 个循环，94 ℃、20 s，56 ℃、30 s，72 ℃、2 min；60 ℃ 延伸 30 min，4 ℃ 保温。所用引物为 EcoRI Adaptor 1: 5'-CTCGTAGACTGCGCGTACC-3'，Adaptor 2: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'；MseI Adaptor 1: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'，Adaptor 2: 5'-TACTCAGGACTCAT-3'。EcoRI preprimer: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'；MseI preprimer: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。扩增产物用 5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，AgNO₃ 染色法进行染色。用 NTSYSpc-2.02 软件对数据进行分析。

3 结果与分析

3.1 特异性分析

3.1.1 形态特异性 在与对照相同的栽培措施和

管理水平下, 2 个品种表现出枝繁叶茂、单叶叶面积大、叶被毛短而稀疏的形态特征。2 个品种的重点标识性状与对照存在显著差异。其中, “艾瑞杰 1 号” 的叶片数是对照的 2.34 倍, 冠幅是对照的 1.45 倍, 基生叶丛高是对照的 1.58 倍; “艾瑞杰 17 号” 的叶片数是对照的 2.26 倍, 冠幅是

对照的 1.32 倍, 基生叶丛高是对照的 1.51 倍, 见表 1, 其中变异系数=标准差/均值。

3.1.2 产量与有效成分特异性 如表 2 所示, 2 个品种产量和主要有效成分比较高。“艾瑞杰 1 号” 地上部分单株鲜质量是对照的 2.68 倍, 每公顷产量是对照的 1.84 倍, 灯盏乙素量是对照的 2.36 倍,

表 1 2 个选育品种的主要性状特征

Table 1 Main traits of two new varieties from *E. breviscapus*

类型	性状	株高 / cm	冠幅 / cm	茎数	叶长 / cm	叶宽 / cm	叶片数	基生叶丛高 / cm	单株地上部分鲜质量 / g	叶被毛
艾瑞杰 1 号	变幅	7.9~24.0	15.5~31.5	1~4	8.8~18.3	2.0~4.5	32~120	7.0~17.5	13.8~48.9	稀疏短柔毛
	平均值	13.3	22.0***	2.8**	11.9***	3.0***	60.0***	11.4***	22.8***	
	标准差	3.7	3.2	0.8	2.3	0.5	22.3	2.4	6.4	
	变异系数	27.46	14.34	27.95	18.85	17.55	36.96	21.04	28.22	
艾瑞杰 17 号	变幅	8.0~19.0	15.5~26.0	1~4	9.3~17.3	1.5~3.5	25~105	7.0~17.0	9.0~28.8	稀疏短柔毛
	平均值	12.2	20.1***	2.6*	12.3***	2.5	57.9***	10.9***	15.0***	
	标准差	2.9	2.0	0.9	1.7	0.4	19.70	2.4	4.3	
	变异系数	24.24	9.89	36.62	13.91	15.50	34.06	21.77	28.73	
对照	变幅	4.0~18.4	8.5~21.0	1~3	5.8~12.2	1.6~3.7	8~49	4.0~12.0	3.2~16.3	密生长柔毛, 较硬
	平均值	8.2	15.2	1.8	8.2	2.5	25.6	7.2	8.5	
	标准差	3.0	2.8	0.7	1.4	0.5	13.1	1.8	2.9	
	变异系数	36.97	18.54	39.37	16.55	19.09	51.52	25.30	33.98	

与对照比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 2 2008—2010 年 2 个选育品种的产量和有效成分

Table 2 Yields and active constituent contents of two varieties from *E. breviscapus* in 2008—2010

年份	艾瑞杰 1 号				艾瑞杰 17 号				对照			
	产量 / (kg·hm ⁻²)	灯盏乙素 / %	总咖啡酸酯 / %	比例 / %	产量 / (kg·hm ⁻²)	灯盏乙素 / %	总咖啡酸酯 / %	比例 / %	产量 / (kg·hm ⁻²)	灯盏乙素 / %	总咖啡酸酯 / %	比例 / %
2008	3 645	1.71	2.58	0.66	3 165	1.59	1.67	0.95	—	—	—	—
2009	3 825	1.96	1.12	1.75	2 955	1.80	1.12	1.60	—	—	—	—
2010	3 870	1.85	1.67	1.11	3 090	1.74	1.71	1.02	2 055	0.78	1.55	0.50
平均	3 780	1.84	1.79	1.03	3 075	1.71	1.50	1.14	2 055	0.78	1.55	0.50

总咖啡酸酯量是对照的 1.15 倍; “艾瑞杰 17 号” 地上部分单株鲜质量是对照的 1.76 倍, 每公顷产量是对照的 1.50 倍, 灯盏乙素量是对照的 1.79 倍, 总咖啡酸酯量则比对照低 3.2%。此外, 2 个选育品种的总咖啡酸酯量均与灯盏乙素量较为接近。

3.2 一致性分析

如表 1 所示, 在同一养分条件和管理措施下, 除 “艾瑞杰 1 号” 的基生叶叶长外, 2 个选育品种群体内的数量性状差异均小于对照。

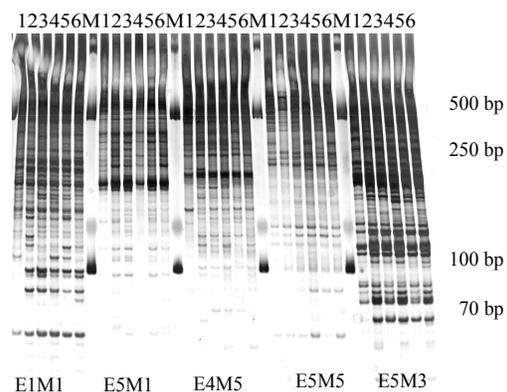
3.3 稳定性分析

基于菊科植物的繁殖特性, 在育种过程中采用物理隔离繁种、去杂除弱的方法使选育品种的形态性状保持稳定。如表 2 所示, 两个选育品种的产量

和有效成分含量在年际间稳定性较好。其中, 同一批次 “艾瑞杰 17 号” 试样 2 种有效成分比例在不同年份间变幅相对较小, 最符合育种目标对 2 种有效成分含量及其比例的要求。

3.4 AFLP 指纹

经综合判断, 得到可用于区别两个选育品种的 AFLP 指纹 (图 1)。其中, 引物 E1M1、E5M3 在 250~70 bp 存在明显的扩增差异条带, 引物 E3M4、E3M5、E5M5 在 250~100 bp 存在扩增差异条带, 且除 E5M3 外, 其他 4 个引物都对两个选育品种产生了特异扩增或特异缺失的条带。两个选育品种与对照及其他优选材料的 AFLP 指纹存在明显的差异, 其遗传物质不同于其他灯盏细辛材料, 可用 AFLP



其中 3 号样品为“艾瑞杰 17 号”，4 号样品为“艾瑞杰 1 号”，6 号样品为对照；1、2 号样品为选育过程中的其他优良群体，5 号样品为其他优良品系。

Left-to-right-primers E1M1, E5M1, E4M5, E5M5, and E5M3; Sample 3-“Airuijie No. 17”, Sample 4-“Airuijie No.1”, Sample 6-control, Sample 1and 2-the other two selected groups, Sample 5-the other one selected strain.

图 1 6 份种质材料的 AFLP 分析

Fig. 1 AFLP analysis on six germplasm materials of *E. breviscapus*

分子指纹图谱将选育品种和野生种及其他栽培种区分开来。

4 讨论

与经 1 年人工驯化的当地野生灯盏细辛相比，选育品种植株长势强、基生叶繁茂，产量和有效成分高，有较明显的形态差异和遗传特征，且具有一致的植物学性状和稳定的经济性状，较好地实现了育种目标。在试验示范中，“艾瑞杰 1 号”经济性状最优，“艾瑞杰 17 号”经济性状较优，但同一年份的灯盏乙素和咖啡酸酯量比例最符合育种目标的要求，两个品种都有较好的推广价值。和大多数药用植物一样，灯盏细辛栽培历史极短，即便是选育品种，其一致性和稳定性，以及相关测试标准也远不能达到农作物新品种的要求，药用植物新品种的选育及 DUS 测试研究亟待加强。

育种方法的选择对育种目标的实现至关重要。多数菊科植物纯合体较少且难以获得，使得杂交育种具有较大的盲目性^[19]。诱变育种和生物工程育种具有常规育种难以比拟的优势，但绝大多数药用植物研究基础薄弱，尚不具备运用新技术的条件^[20]，尤其是生物工程育种本身还要面对消费群体对其产品能否接受的问题^[21]。片面追求高科技育种，忽略对自然变异的选择利用，对药用植物新品种选育的

推进有弊无利^[22]。灯盏细辛为菊科异花授粉植物，具有丰富的遗传多样性^[23]。利用灯盏细辛为杂合体、后代性状分离的特点，采用混合选择、集团混合选择和单株系统选育，以及有性选择和无性繁殖相结合的育种方法，可加速分离混合群体中的优良品系，是生产中较为可行的育种途径。在进行常规育种的同时，本课题组还开展了灯盏细辛倍性育种的基础性研究工作^[24]，以期在灯盏细辛倍性育种技术上有所突破。

药用植物品种应体现出的区域或企业的“专用”性。从区域专用来看，药用植物的育种目标中，产量、质量、熟期 3 个要求都与区域气候有关。云南以丰富多样的立体气候著称，涵盖了 7 个气候类型。灯盏细辛野生资源几乎遍布云南全省，在海拔 1 200~3 500 m 都有分布，单一品种很难覆盖多个产区。从企业专用来看，以灯盏细辛为主要原料的药品剂型丰富，产品种类繁多。根据企业对原料质量，尤其是根据有效成分种类、含量及不同含量比例的特定需求来进行品种选育，可使品种更具实用价值，也可最大程度的降低提取物生产或原料加工的成本。可以说，现有研发成果与需求之间将长期存在较大差距。

志谢：云南省农业生物技术重点实验室程在全研究员对灯盏细辛优良种源指纹图谱分析研究的指导与支持。

参考文献

- [1] 周志军, 武晓阳, 孟义江, 等. 药用植物育种研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1694-1698.
- [2] 马小军, 施力军, 冯世鑫, 等. 蔓性千斤拔新品种“千斤拔 3 号” [J]. 园艺学报, 2009, 36(12): 1851-1852.
- [3] 田义新, 赵寿经, 王黎明, 等. 人参新品种“宝泉山人参”选育报告 [J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(4): 406-407.
- [4] 黄莺, 王康才, 张媛, 等. 药用菊花种间杂交及 F₁ 代鉴定研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 783-787.
- [5] 魏建和. 中药桔梗杂种优势利用基础研究 [D]. 北京: 中国中医科学院中药研究所, 2006.
- [6] 陈素萍, 王莉, 宋秀清. 党参多倍体育种的研究 [J]. 中草药, 1991, 22(5): 224-227.
- [7] 谭忠, 沈华, 徐常青, 等. 四倍体金银花新品种九丰 1 号的特征特性 [J]. 作物杂志, 2005(1): 55-56.
- [8] 向增旭, 高山林. 金银花同源四倍体的诱导和鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 696-697.

- [9] 刘自刚, 张雁, 王新军, 等. 桔梗育种研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 附6-附8.
- [10] 贾彩凤, 李艾莲. 我国药用植物辐射诱变育种的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 633-636.
- [11] 梁清乐, 王秋颖, 曾念开, 等. 茯苓灭活原生质体融合育种研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1733-1735.
- [12] 赵树进, 陈念, 韩丽萍. 药用植物生物工程技术研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1692-1693.
- [13] 王明明, 宋振巧, 王建华. ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 134-137.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [15] 王平理, 杨生超, 杨建文, 等. 云南灯盏花种质资源的考察与采集 [J]. 现代中药研究与实践, 2007, 22(2): 25-28.
- [16] 俞宏渊, 陈宗莲. 灯盏细辛的家化栽培 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 115-120.
- [17] 王馨, 刘有贵, 李林玉, 等. 不同居群灯盏细辛生长势比较研究 [J]. 西南农业学报, 2008, 12(6): 1685-1689.
- [18] 李绍平, 王馨, 刘有贵, 等. 灯盏细辛相关性状与产量及有效成分的灰色关联度分析 [J]. 西南农业学报, 2009, 22(3): 764-766.
- [19] 王伟光. 地被菊新品种选育与花药培养的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- [20] 华国栋, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 药用植物品种选育的特殊性及其对策措施 [J]. 资源科学, 2008, 30(5): 754-758.
- [21] 赵树进, 陈念, 韩丽萍. 药用植物生物工程技术研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1692-1693.
- [22] 杨丽英, 杨斌, 李林玉, 等. 药用植物生物工程技术研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1692-1693.
- [23] 杨生超, 李永芳, 赵峥, 等. 灯盏花资源遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1532-1535.
- [24] 董志渊, 王馨, 李林玉, 等. 短葶飞蓬减数分裂、雄配子体发育过程及其对应的花部形态特征 [J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(6): 685-688.