

秦艽的遗传多样性研究进展

程庭峰^{1,4}, 王 环², 周党卫^{1,3,4*}, 陈世龙^{1,3}, 王久利⁵, 师生波^{1,3}, 沈建伟², 雷天翔¹

1. 中国科学院西北高原生物研究所 高原生物适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810008
2. 中国科学院西北高原生物研究所 分析测试中心, 青海 西宁 810008
3. 青海省作物分子育种重点实验室, 青海 西宁 810008
4. 中国科学院大学, 北京 100093
5. 青海民族大学生态环境与资源学院, 青海 西宁 810007

摘 要: 秦艽是我国传统的中藏药材, 为龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 秦艽组植物, 主要分布在青藏高原及周边地区, 在多种疾病的治疗方面具有显著疗效。对近 20 年国内外秦艽组植物的形态多态性、生化多态性及分子多态性的研究进展进行综述与展望, 以期对秦艽的种质资源保护、鉴定及进化适应等研究提供借鉴。

关键词: 秦艽; 青藏高原; 龙胆科; 龙胆属; 形态多态性; 生化多态性; 分子多态性

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)15-3720-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.031

Research advance of genetic diversity of Chinese traditional herb *Gentianae Macrophyllae Radix*

CHENG Ting-feng^{1,4}, WANG Huan², ZHOU Dang-wei^{1,3,4}, CHEN Shi-long^{1,3}, WANG Jiu-li⁵, SHI Sheng-bo^{1,3}, SHEN Jian-wei², LEI Tian-xiang¹

1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota (AEPB), Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China
2. Analysis and Testing Center, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China
3. Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Xining 810008, China
4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China
5. College of Ecological Environment and Resources, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China

Abstract: *Gentianae Macrophyllae Radix* is a Chinese traditional Tibetan herb, belonging to Sect. *Cruciata Gaudin* of *Gentiana* genus. Which originated from Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions and had significant pharmaceutical effect on lots of disease. In this review, we summarized the research advance studies on morphologic, biochemical, and genetic diversity on this species in the past 20 years, which could provide the help for germplasm protection, identification, and evolutionary adaptation works in the future.

Key words: *Gentianae Macrophyllae Radix*; Qinghai-Tibetan Plateau; Gentianaceae; *Gentiana* (Tourn.) L.; morphological polymorphism; biochemical polymorphism; molecular diversity

秦艽为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 多年生草本植物, 全世界约 20 种, 我国产 19 种, 其中青藏高原为秦艽的起源中心^[1]。秦艽作为一种传统的中藏药材在《神农本草经》《晶珠本

草》等典籍中均有记载, 性微寒, 具有祛风湿、舒筋络、清虚热、利湿退黄、下水、利小便等功效^[2]。其中, 秦艽组 (Sect. *Cruciata Gaudin*) 中的大叶秦艽 *G. macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea*

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 青海省科技厅基础科研项目 (2017-ZJ-702); 青海省科技厅基础科研项目 (2019-ZJ-7016); 青海省自然科学基金项目 (2019-ZJ-976Q); 青海省创新平台建设专项项目 (2017-ZJ-Y14)

作者简介: 程庭峰 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为高山药用植物生理学。Tel: 18747554074 E-mail: 172212335@qq.com

*通信作者 周党卫, 博士, 副研究员, 主要从事高山植物生理与分子生物学研究工作。Tel: 17797146826 E-mail: dangweizhou@sina.com

Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 和小秦艽 *G. dahurica* Fisch. 为《中国药典》2015 年版规定的秦艽的药材来源^[3]。

秦艽组具有丰富的药用价值，目前已从中药秦艽和其近缘种中共发现了 166 种化学成分，还有一些化学成分有待鉴定^[4]。由于多种成分具有显著的药理活性和较高的成药价值，因此，也引起国内外学者的广泛关注^[4-6]。

尽管当前，青海、宁夏、甘肃、陕西等地都已经广泛开展了秦艽的人工栽培，并且取得一定进展^[7-8]，满足了部分市场需求，但由于野生秦艽质量好，开采成本低等特点，每年仍有大量野生资源遭到破坏，因而造成其资源日益减少和遗传多样性的降低^[9]。目前，已有研究发现包括大豆、水稻等广泛种植的作物在内，栽培种的遗传多样性显著低于野生种^[10-11]。遗传多样性是生物多样性的基础，决定了物种对外界不良环境的抵御能力和进化能力^[12]，物种遗传多样性的降低意味着其遗传变异水平的降低和适应性的减弱，这将会威胁到物种的长期生存。因此，通过对物种遗传多样性的研究可以开发出具有优质功能的新品种，有效地指导育种和生产^[13]。对药用植物而言，遗传多样性更是影响其次生代谢产物的重要因素^[14]。因此，研究和了解秦艽组遗传多样性不仅有利于秦艽种质资源的鉴定、保护和开发利用，也有助于探究引起其遗传变异的地理因素、近缘物种的起源演化等科学问题^[15]。

尽管目前国内外在秦艽的化学成分、药理学作用等方面已有了系统的报道^[4-6]，但关于其遗传多样性研究的报道较少。近年来，随着分子生物学技术的不断发展，生物遗传多样性的研究方法经历了从形态学、生物化学到分子学水平的演变^[16]。这些技术在秦艽组遗传多样性的研究方面也得到了较为广泛的应用，并取得很大进展。因此，本文对近年来国内外秦艽的遗传多样性研究进行综述，以期对秦艽的优质种质筛选鉴定、遗传多样性保护及遗传改良等提供参考。

1 形态学研究

通过形态学来检测遗传变异是最直接、最简便的方法，可以通过直接观察或者用简单仪器即可测定出来。通常用来检测的性状有 2 类：一类是由单基因决定的质量性状，另一类是由多基因决定的数量性状^[17]。基于表型特征研究物种遗传多样性的方法已经在水稻、大豆等作物上得到了广泛应用^[18-19]。

Davitashvili 等^[20]利用扫描电子显微镜对包括麻花秦艽在内的龙胆科的 42 个类群植物的种子进行分析，发现通过种子侧翼、表皮褶皱以及直径在内的 19 个特征性状，可以将它们进行有效区分，证明利用表型特征对中药秦艽进行遗传多样性分析具有一定的可行性。王义祁等^[21]通过扫描电镜对 5 种甘肃产秦艽组种子进行观察，发现小秦艽种子的微形态和麻花秦艽、秦艽具有显著差别。吴玉泓等^[22]通过对秦艽药用部位即根部表面的颜色、分枝以及横切面的显微镜观察发现青海、甘肃不同产地的秦艽具有差异，但推测可能和当地的土壤、气候、海拔有关。由于自然种群中单基因控制的性状较少，因此，通常情况下选择由多基因决定的数量性状来研究种群的遗传多样性。李冬华^[23]利用主成分分析法对 120 份秦艽样品的 33 个性状进行分析，认为黄管秦艽 *G. officinalis* H. Smith 与秦艽在植株高度、基生叶的宽度、花萼与花冠的长度比例等表型性状上并无绝对界限，因此不能对其进行有效划分。此外由数量性状发展出来的数量遗传学是一种更为科学的方法，该方法通过分子标记对数量性状进行定位，去除了环境因素对数量性状的影响，但其主要应用于经济植物的育种^[18-19]，在秦艽的研究中尚未报道。

形态学标记虽然简单、快速、易于观察，但其易受环境因子影响，虽然部分学者认为利用龙胆属种子的形态学特征不仅可以区分属或组，甚至还可以作为种的区分依据^[1]，但其主要还是应用于属或组的水平^[24]。同时基于形态学分析对于一些形态界限并不清晰的近缘杂交物种的界定较为困难，例如西藏东南部的大部分地区，存在若干形态上介于粗茎秦艽和西藏秦艽 *G. tibetica* King ex Hook. f. 之间的居群和个体^[25]，对它们的区分和鉴定仅仅依赖形态学特征是不充分的，还必须进行更深层次的研究。

2 染色体水平研究

染色体是遗传物质的载体，是基因的携带者。染色体的变异必然导致遗传变异，是生物遗传多样性的重要来源。染色体的变异主要包括数目变异（整倍性或非整倍性）和结构变异（缺失、易位、倒位、重复），此外还包括染色体形态特征的变异如臂长、着丝点位置等，对染色体变异的分析主要是染色体核型和带型的分析^[23]。

当前学术界对染色体的分类多采用李懋学等^[26]建立的核型划分标准。Yuan^[27]对秦艽组的核型进行了细致研究，认为其基本染色体数目为 13，核型属

于“1A”和“2A”型。刘丽莎等^[28]对秦艽和小秦艽的染色体进行核型分析,发现秦艽属于“2B”型,小秦艽属于“1A”型。王岚等^[29]对麻花艽核型进行分析,发现其属于“1A”型,并与秦艽、小秦艽核型进行比较,发现3者在进化关系上秦艽最为进化,麻花艽次之,小秦艽最为原始。而沙伟等^[30]采用相同的分类标准对大叶龙胆即秦艽的核型进行分析,却认为其核型应属于“2A”型。这可能与一些染色体极为相似很难区分有关^[27]。这说明利用染色体形态分析中药秦艽的遗传多样性仍然具有一定的局限性。此外,张小兰等^[25]研究发现云南等地分布的粗茎秦艽均为二倍体,但在西藏东南部过渡为四倍体,导致其与同为四倍体的西藏秦艽形态界限发生模糊,因此对某些表型和染色体特征差别不明显的物种依靠染色体水平并不能进行准确区分。

3 蛋白质多态性研究

蛋白质多态性研究主要是通过基因表达的直接产物即蛋白质作为标记进行的研究,蛋白质主要包括贮藏蛋白和同工酶,贮藏蛋白主要是种子贮藏蛋白,同工酶是指催化相同反应但具有不同分子形式的酶。其中等位酶作为一种特殊形式的同工酶,在遗传多样性的研究中应用广泛,它是由位于1个基因位点的不同等位基因编码的不同形式的一种酶^[31]。

对种子贮藏蛋白的分析多为清蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白和球蛋白这4种蛋白质。唐泽丽等^[32]通过对秦艽种子的4种蛋白进行SDS电泳,发现球蛋白和谷蛋白多态性较好,可用于区分不同的种子。林丽等^[33]则对秦艽种子蛋白的电泳方法进行研究,发现通过SDS-PAGE电泳可以对麻花秦艽、野生秦艽、栽培秦艽进行有效区分。刘丽莎等^[34]利用等位酶方法对甘肃产秦艽遗传多样性进行分析,发现其遗传多样性水平较低,其通过对不同地区秦艽遗传多样性水平的比较,为秦艽自然保护区的建设提出了对策。

虽然生化水平的标记具有简便、经济、快速等优点,但其只涵盖了基因组的小部分信息,只能检测非同义的突变,因此对遗传多样性的检测结果偏低^[13]。此外对材料的制备要求较高,需要保持酶活性,因此,生化标记在实际应用上仍然有一定的限制。

4 DNA 分子水平多态性

DNA 分子标记技术伴随着分子生物学技术的发展而出现,和前几种技术相比,其直接反映个体在DNA水平上的差异,能够更加准确、全面地反

映物种遗传多样性的水平。而这些技术在秦艽遗传多样性的研究中得到广泛应用。

4.1 限制性片段长度多态性 (RFLP)

RFLP 属于第一代分子标记技术,由 Grodzicker 等^[35]在对腺病毒的鉴定中首次得到应用。之后 Botstein 等^[36]在 1980 年利用该技术构建了第 1 张人类遗传连锁图谱,真正开启了分子标记技术的新纪元。RFLP 技术主要是通过限制性内切酶将不同生物个体的 DNA 酶解,然后利用特异性探针与其进行 Southern 杂交,通过反射性自显影检测 DNA 差异。RFLP 属于共显性标记,具有较高的可重复性,但由于其技术操作复杂,对 DNA 量和质量要求度高以及多态性信息较低等缺点,因此在秦艽研究中并未报道。

4.2 随机扩增引物多态性 DNA (RAPD)

RAPD 属于第 2 代分子标记技术,由 Williams 等^[37]于 1990 年建立,该方法基于 PCR 技术,通过随机设计的引物对基因组 DNA 进行扩增。RAPD 由于 DNA 用量少、实验成本低、操作简便等特点,在中药秦艽的研究中得到广泛应用。李小娟^[38]利用 RAPD 分子标记技术确定青海省曲麻莱地区发现的过渡类群属于麻花艽和管花秦艽 *G. siphonantha* Maximowicz ex Kusnezow 的自然杂交后代。徐红等^[39]通过 RAPD 技术对甘肃产秦艽、麻花艽和小秦艽进行了有效区分,同时发现秦艽与小秦艽亲缘关系更近。吴玉泓等^[22]通过该技术对甘肃、青海两地秦艽的遗传多样性进行研究,发现青海湟中地区秦艽种群的遗传多样性更高。石张燕等^[40]利用 RAPD 技术对陕西产秦艽进行分析发现不同产区的秦艽药材质量与遗传多样性之间相关性并不明显,表明环境对秦艽药材质量的影响更大。Li 等^[41]利用 RAPD 技术对青藏高原地区 7 个种群的麻花艽进行分析,发现其物种水平遗传多样性较高,但居群水平偏低,通过对遗传分化系数进一步分析认为其属于混合交配类型。侯茜等^[42]利用 RAPD 技术对 11 个秦艽种群的遗传多样性进行检测,获得 59 条多态性条带,通过聚类分析可将秦艽的 11 个种群聚为两类,四川和陕西 2 省 4 个种群聚为一类;甘肃、宁夏和青海省 7 个种群聚为一类。认为甘肃省环县种群、子午岭种群和华亭种群应作为秦艽的重要种群加以优先重点保护。尽管 RAPD 技术在秦艽遗传多样性的研究中得到了多的应用,但其作为一种早期的分子标记技术仍然存在着诸多问题,例如 RAPD 是

显性标记不能检测杂合子和纯合子,同时重复性较差可靠性较低等缺点,因此,逐渐被新技术所取代。

4.3 扩增片段长度多态性 (AFLP)

AFLP 是由 Vos 等^[43]于 1992 年建立的一种分子标记方法。其原理是利用限制性内切酶将基因组 DNA 酶切后,将特定接头连接到酶切位点上,根据接头和酶切末端序列设计引物,通过 PCR 反应,实现对基因组 DNA 的特定扩增。AFLP 综合了 RFLP 和 RAPD 的优点,具有多样性高、分辨率好、可靠性高等特点,因此,广泛应用于植物遗传多样性的研究当中^[44]。曹晓燕^[45]通过 AFLP 技术对 4 种中药秦艽进行分析,发现其具有丰富的遗传多样性,其中大叶秦艽多样性水平最高,同时发现麻花艽和小秦艽的亲缘关系更近,这和徐红等^[39]通过 RAPD 得出的结果不一致,还需要进一步分析研究。虽然 AFLP 拥有诸多优点,但其操作过于繁琐、对 DNA 质量要求较高,限制了其进一步使用^[44]。

4.4 简单重复序列 (SSR)

SSR 也被称为微卫星序列,早在 1974 年,Skinnner 等^[46]就在蟹中发现了串联重复序列,Moore 等^[47]在 1991 年将 SSR 应用于动物遗传多样性的研究当中。SSR 主要是基于生物基因组中广泛存在的串联重复序列,通过序列两端特征设计特定引物,对重复序列进行扩增^[48]。SSR 为共显性遗传,在基因组中广泛存在且多态性较高,因此在植物遗传多样性研究当中应用较广。目前从植物中开发 SSR 引物的方法主要有文库构建、转录组测序、简化基因组测序和公共数据库开发,这些方法目前已在植物学研究中广泛应用^[48]。Li 等^[49]通过 PCR 技术从粗茎秦艽中开发出 10 个微卫星位点,并成功在秦艽、麻花艽等龙胆科植物中得到扩增。Ni 等^[50]对粗茎秦艽、粗壮秦艽、麻花艽的叶绿体基因组进行测序,总共得到了 118 个 SSR 片段。Sathishkumar 等^[51]基于生物信息学方法从 NCBI 上下载得到龙胆科基因数据,总共检测出 545 个 SSR 片段,最终设计得到 169 对特征引物。Zhou 等^[52]通过对麻花艽的转录组进行测序,鉴定出了 6 类共 7591 个 SSR 引物标记。这些引物标记尚待进一步的验证。虽然 SSR 需要提前知道序列信息,对引物进行筛选,因此前期费用较高,在实用性上较差^[48]。但 SSR 分子标记显然具有可靠稳定的结果,信息量大,重复性好,操作简单、共显性、多态性高等优点。因此,仍为很多研究者喜爱^[48]。随着生物学的不断发展,开发成本逐渐

降低,SSR 标记技术得到不断完善,SSR 标记技术在遗传多样性等方面具有更加广阔的应用前景。

4.5 简单序列重复区间 (ISSR)

ISSR 由 Zietkiewicz 等^[53]于 1994 年发明,其主要是基于 SSR 技术发展而来,利用 SSR 片段特点,设计特定引物对重复序列的间区进行扩增。由于不需要事先知道序列信息,因此成本较低,同时具有实验简便、多态性高、稳定性好等优点^[54]。近 10 年来广泛应用于秦艽遗传多样性的研究当中,ISSR 进行 PCR 扩增时,首先需要摸索出最适反应条件,秦鲜艳等^[55]通过实验对粗茎秦艽 ISSR-PCR 反应体系进行了优化,朱田田等^[56]则建立了麻花艽的最佳反应体系,其通过 6 条 ISSR 引物对 18 个居群的麻花艽进行分析,发现甘肃地区的麻花艽在种群水平上具有较高的遗传多样性,同时居群内的遗传多样性水平更高^[57]。王笠等^[58]则通过 7 条引物对甘肃、青海、西藏、四川等地的麻花艽遗传多样性进行分析,发现居群间的遗传多样性水平更高,和朱田田等的结论相矛盾,推测可能与取样地区有关。张文勇^[59]通过 ISSR 对秦艽、麻花艽、小秦艽进行研究,发现通过 ISSR 能够对 3 种秦艽进行有效区分,同时聚类分析表明小秦艽和麻花艽的亲缘更近,该结果和周文平等^[60]的发现一致,同样和徐红等^[39]通过 RAPD 得到的结果不一致。Zheng 等^[61]通过 9 条 ISSR 引物对甘肃地区的 4 种秦艽进行分析,发现其遗传多样性处于中等水平,其中秦艽遗传多样性最高,粗茎秦艽遗传多样性最低,且其遗传多样性水平和龙胆苦苣含量的相关性不显著。

4.6 单核苷酸多态性 (SNP)

SNP 由 Lander^[62]于 1996 年首次提出,属于第 3 代分子标记技术。它指的是基因组 DNA 的单个核苷酸序列的替换、插入、缺失等变异引起的 DNA 序列的多态性^[63]。与传统 DNA 标记技术相比,其遗传稳定性高、数量多,分布广,当前在植物遗传多样性研究中主要还是部分基因片段的 SNP 分析^[64]。Hikage 等^[65]对和秦艽同为龙胆属的 4 种植物的 W14/15 基因进行克隆,发现了数个 SNP 位点,利用这些特异性位点可以对这 4 种植物进行有效区分。随着高通量等技术的发展,测序的成本不断降低,使得转录组测序在秦艽中逐步得到应用^[51,66],这也为 SNP 等技术在今后秦艽研究中的应用奠定了基础。

4.7 DNA 条形码

DNA 条形码由 Hebert 等^[67]于 2003 年首次提

出,其主要是利用 DNA 片段对物种进行鉴定,同时也可以应用于遗传多样性的研究当中。DNA 条形码片段在植物中主要利用核基因 ITS (内转录间隔区)和叶绿体的部分片段。rDNA 中位于 16 S rDNA 和 23 S rDNA 基因的间隔序列,长度和序列变化都较大,多态性好,能提供更加精准的分子标记,以此建立 DNA 条形码技术也成为秦艽种质鉴定的新兴手段^[68-73]。姬可平等^[68]对野生秦艽、不同家种及麻花秦艽的转录间隔区分析,认为其可以提供足够的遗传信息位点为秦艽的种质鉴定提供依据。刘丽莎等^[69]对秦艽组的大叶秦艽、管花秦艽、小秦艽和麻花秦艽的 ITS、ITS2 研究发现,其序列长度不同可以作为秦艽分子鉴定的依据。罗焜等^[70]对多个秦艽组植物的列 ITS、psbA-trnH、matK、rbcL 和 ITS2 优劣性进行了比较,发现 ITS2 可以 100%有效区分秦艽种质。Liu 等^[71]通过比较不同的条形码推荐片段,发现 matK 结合 ITS 可以更为有效的对中药秦艽进行区分。这些研究为条形码在秦艽组的应用和建立药物 DNA 条形码网络查询系统提供了依据。也有部分学者利用 DNA 条形码研究秦艽的遗传多样性,倪梁红等^[72]通过比较麻花秦艽和粗茎秦艽的 ITS,发现西藏产麻花秦艽 ITS 存在 1 个多态性位点,其遗传多样性更为丰富。王聪聪^[73]对中药秦艽的叶绿体部分片段(trnMV)和 ITS 进行分析,发现秦艽和小秦艽的群体间遗传多样性较高,4 种秦艽间的基因流较为有限。因此,DNA 条形码的研究可以丰富秦艽种质资源鉴别,也为揭示其亲缘关系提供新的手段。

4.8 其他分子标记技术

特征片段扩增区域(SCAR)基于 RAPD 等技术发展而来,将 RAPD 标记的片段回收后进行测序,以此为基础设计特定引物,克服了 RAPD 稳定性差的缺陷^[74]。Shimada 等^[75]利用 SCAR 对日本龙胆属植物进行了有效的鉴定。起始密码子多态性(ScoT)是根据起始密码子和侧翼序列的保守性设计的单引物,结合了 ISSR 和 RAPD 标记的优点^[76]。

此外还有保守 DNA 序列多态性(CDDP)^[77]、相关序列扩增多态性(SRAP)、靶位区域扩增多态性(TRAP)^[78]。以及基于反转录转座子开发出来的反向反转录转座子扩增多态性(IRAP)、特异序列扩增多态性(SSAP)、反转录转座子插入多态性(RBIP)、转录转座子微卫星扩增多态性(REMAP)等技术^[79-80]。这些分子标记技术不仅可以用来研究

物种的遗传多样性,基原药材鉴定,系统发育还可以构建染色体遗传图谱^[81]。Nakatsuka 等^[82]通过 REMAP、SSR、AFLP、RAPD 等标记成功构建了日本龙胆的遗传图谱。可以说这些新技术具有广阔的应用前景,也将使得对秦艽的研究到达一个新的高度。

5 结语与展望

5.1 分析秦艽组遗传多样性,建立秦艽种质甄别系统

秦艽作为一种重要中藏药材,随着市场需求的增加,存在着伪品如黑大艽 *Aconitum barbatum* Patr. ex Pers. var. *hispidum* (DC.) Ser.、红秦艽 *Salvia przewalskii* Maxim.、黄秦艽 *Veratrum baillonii* Franch. 或党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 等冒充现象,影响秦艽的临床应用和市场规模^[83]。在多态性分析中,形态多样性提供的位点多、分析简单。而分子生物学方法精确、先进,但分析耗时、操作复杂。因此,利用形态学、细胞学、分子生物学等方法的结合是鉴定秦艽种质的根本途径。目前,DNA 条形码技术在多种药用植物中得到应用,但不是所有的道地药材形成都会留下 DNA 差异“烙印”,同时这种 DNA 差异也不见得与道地性的形成有直接或间接的相关^[84]。倪梁红等^[72]发现,ITS 序列在麻花秦艽类群中具有多态性,但这种多态性的范围与道地性的关系并不清楚。准确的物种分子鉴定,是利用已知物种的分子序列与未知样品序列进行比较从而判断其归属的过程,其要求首先构建一个充分体现种内变异和种间分化的完整的参考序列数据库,用以进行系统进化分析和准确的物种界定^[85]。因此,结合多种遗传标记方法可能有助于秦艽中这一问题的解决。

5.2 分析秦艽组遗传多样性,建立合适的种质保护区

遗传多样性对种质资源的保护和开发具有重要作用,通过对物种遗传多样性的研究可以提出较为有效的保护措施,比较典型的案例是南方野生稻保护区的建立^[86-87]。侯茜等^[42]利用 RAPD 技术对 5 个秦艽主产省份的遗传多样性进行分析,认为甘肃省环县种群、子午岭种群和华亭种群具有较高的遗传多样性,应优先重点保护。近 30 年来的研究已经在秦艽遗传多样性方面积累了大量数据。比较不同学者的研究结果发现麻花秦艽的遗传分化系数(Gst)普遍偏低(表 1),其遗传变异主要存在于个体间,因

表 1 不同类型分子标记研究在麻花艽遗传多样性研究中的应用

Table 1 Application of different molecular markers in *Gentiana straminea* genetic diversity

方法	采样地点	居群/ 采样数	多态条带 比率/%	群体内变异 (He、H、Hpop)	Gst	Shannon 多样性指数	基因流	参考 文献
RAPD	青海省曲麻莱	7/168	86.61	0.222 0~0.287 5 Hpop	—	0.222 0~0.287 5	—	38
RAPD	青海省曲麻莱、唐古拉山	7/128	86.61	0.153~0.200 H	0.408 0	—	—	41
AFLP	青海湟源、互助	2/21	95.83	—	0.392 9	—	—	45
ISSR	西藏、青海、甘肃、四川	28/83	92.63	0.288 2 He	0.678 3	0.437 1	0.237 1	58
ISSR	青海湟中	1/10	95.45	0.124 0~0.339 2 Hpop	—	—	—	59
ISSR	甘肃甘南	5/24	66.67	0.096 2 He	0.320 7	—	1.059 3	61
ISSR	甘肃武威、张掖	18/368	98.63	0.231 H	0.344 1	0.366 3	0.953 0	57

此,应在遗传多样性较高地区如甘肃环县建立保护区,同时选取较多的数量,进行大范围保护。由于地理因素以及取样的限制,这个保护的建议只是一个初步结论,具体的保护措施还需要进一步结合更多样本数量及多种研究方法交叉来确定。因此,利用多种分子生物学技术分析秦艽组植物遗传多样性和遗传结构,鉴定特有单倍型和较高的核苷酸多态性,选择遗传多态性水平高的地区进行就地保护或建立种质圃进行保护,可能对秦艽组植物遗传多样性保护和遗传资源的挖掘具有重要价值。

5.3 结合新高通量测序技术,开发新的遗传学标记

尽管目前秦艽组植物在遗传多样性研究方面取得一定进展,但这些研究的标记与农作物等遗传标记比较还具有很大差距。然而,基因组测序、转录组测序等组学技术发展迅速,未来对秦艽遗传多样性研究,结合更为精确和有效的组学等新技术,开发更为有效的遗传标记,对于扩大秦艽遗传多样性研究范围,揭示秦艽的道地性及代谢物质、抗逆性等重要农艺性状的分子基础将会产生巨大推动作用。

野生药用植物在遗传上存在着巨大的多样性,不同的种群甚至个体,有效成分含量具有较大差异。而遗传特性差异控制着有效成分的生产。因此,结合多种遗传标记手段,对秦艽种质进行引种驯化和遗传改良,通过人工种植和选育,选择出有效成分含量高且稳定的品系,并有目的地降低非目的成分的含量,使成品药在质量上保持稳定^[88],在秦艽药用工业中具有重大价值。因此,对秦艽组遗传多样性研究,结合现代分子育种技术,培育新的品种,也是秦艽资源开发的重要方面。

此外,秦艽主要生长于青藏高原及周边地区由于长期生长于不同的生态环境中,其不论在种间和

种内均存在着巨大的遗传多样性,利用新的遗传标记,也为人们了解种间亲缘关系、遗传演化等研究提供参考。此外,在秦艽遗传多样性研究中,除扩大研究区域和取样数量外,也应加强与其他学科和研究方向的联系,如秦艽的谱系地理、种质资源的开发以及秦艽栽培种和野生种遗传多样性的比较,活性成分和遗传多样性的关系等问题的研究,为秦艽种质资源的保护以及进一步开发和利用提供基础。

参考文献

- [1] Ho T N, Liu S W. *A Worldwide Monograph of Gentiana* [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] Zhang X, Zhan G, Jin M, *et al.* Botany, traditional use, phytochemistry, pharmacology, quality control, and authentication of *Radix Gentianae Macrophyllae*-A traditional medicine: A review [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.020.
- [5] 穆祯强, 于 洋, 高 昊, 等. 龙胆属秦艽组植物的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2012-2017.
- [6] Aberham A, Pieri V, M Croom J E, *et al.* Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaureum erythraea*, *Frasera carolinensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(3): 517-525.
- [7] 田 丰, 李永平, 俞科贤, 等. 青藏高原麻花艽仿野生栽培技术研究 [J]. 作物杂志, 2012, 32(2): 122-124.
- [8] 李勇慧, 曹晓燕, 李向民, 等. 大叶秦艽不同采收期中龙胆苦苷的分析 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 933-936.
- [9] 张西玲, 晋 玲, 刘丽莎. 濒危药用植物秦艽的资源利

- 用与保护 [J]. 中国现代中药, 2003, 5(9): 27-29.
- [10] Lam H M, Xu X, Liu X, *et al.* Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(12): 1053-1059.
- [11] 朱作峰, 孙传清, 付永彩, 等. 用 SSR 标记比较亚洲栽培稻与普通野生稻的遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1437-1441.
- [12] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护 [J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96.
- [13] Smith S, Bubeck D, Nelson B, *et al.* *Genetic Diversity and Modern Plant Breeding* [M]. America: Springer International Publishing, 2015.
- [14] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1584-1589.
- [15] Arbogast B S. Phylogeography: The history and formation of species [J]. *Integr Comp Biol*, 2000, 41(1): 134-135.
- [16] 夏 铭. 遗传多样性研究进展 [J]. 生态学杂志, 1999, 18(3): 59-65.
- [17] 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [18] 秦 君, 张孟臣, 陈维元, 等. 基于分子和表型性状的大豆骨干品种遗传多样性分析 [J]. 华北农学报, 2013, 28(1): 19-26.
- [19] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 等. 云南稻种资源表型遗传多样性的研究 [J]. 作物学报, 2001, 27(6): 832-837.
- [20] Davitashvili N, Karrer G. Taxonomic importance of seed morphology in *Gentiana* (Gentianaceae) [J]. *Bot J Linn Soc*, 2010, 162(1): 101-115.
- [21] 王义祁, 汪荣斌, 王存琴, 等. 秦艽组植物种子形态研究 [J]. 中药材, 2011, 33(7): 1030-1033.
- [22] 吴玉泓, 吴 迪, 崔治家, 等. 不同产地秦艽的质量和遗传多样性研究 [J]. 中药材, 2011, 34(4): 517-519.
- [23] 李冬华. 甘肃药用植物秦艽的多样性研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [24] Yuan Y M. Seed-coat micromorphology and its systematic implications for Gentianaceae of western China [J]. *Bot Helv*, 1993, 103(1): 73-82.
- [25] 张小兰, 葛学军, 刘建全, 等. 粗茎秦艽与西藏秦艽 (龙胆科) 种间的形态学、染色体与分子界定 [J]. 植物分类学报, 2006, 44(6): 627-640.
- [26] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302.
- [27] Yuan Y M. Karyological studies on *Gentiana* section *Cruciata Gaudin* (Gentianaceae) from China [J]. *Caryologia*, 1993, 46(2/3): 99-114.
- [28] 刘丽莎, 王 岚, 孙少伯, 等. 小秦艽和秦艽核型的比较研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(5): 331-333.
- [29] 王 岚, 刘丽莎, 吴 迪, 等. 麻花秦艽染色体的核型分析 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 171-173.
- [30] 沙 伟, 杨晓杰, 白春和. 大叶龙胆的染色体核型分析 [J]. 齐齐哈尔师范学院学报, 1993, 13(1): 23-25.
- [31] 金文姗. 检测药用植物遗传变异的新技术--等位酶分析 [J]. 中药研究与信息, 2001, 3(2): 25-26.
- [32] 唐泽丽, 李多伟, 王 瑶, 等. 秦艽种子蛋白质的提取及 SDS 电泳研究 [J]. 西北药理学杂志, 2011, 26(2): 94-96.
- [33] 林 丽, 张延红, 陈红刚, 等. 秦艽种子蛋白质电泳提取方法研究 [J]. 甘肃农业科技, 2008(7): 23-25.
- [34] 刘丽莎, 周金霞, 江北岸, 等. 甘肃濒危药用植物秦艽遗传多样性的等位酶分析 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1476-1479.
- [35] Grodzicker T, Williams J, Sharp P A, *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses [J]. *J Mol Biol*, 1975, 3(97): 369-390.
- [36] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.
- [37] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [38] 李小娟. 麻花艽和管花秦艽 (龙胆科) 之间自然杂交的 RAPD 分析 [J]. 吉林农业, 2010(9): 53-55.
- [39] 徐 红, 王峥涛, 胡之璧. 中药秦艽的 DNA 指纹图谱鉴别 [A] // 第一届全国中药商品学术大会 [C]. 北京: 中国商品学会, 2008.
- [40] 石张燕, 陈千良, 赵宇玮, 等. 陕西产秦艽质量变异与遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1705-1709.
- [41] Li X, Yang H, Liu J. Genetic variation within and between populations of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae) revealed by RAPD markers [J]. *Belg J Bot*, 2008, 141(1): 95-102.
- [42] 侯 茜, 雷 英, 刘丽莎, 等. 西部地区濒危药用植物秦艽遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 214-216.
- [43] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [44] 吕振岳, 黄东东. AFLP 标记及在植物中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2001, 11(6): 40-43.
- [45] 曹晓燕. 秦艽种质资源研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2010.
- [46] Skinner D M, Beattie W G, Blattner F R, *et al.* The repeat

- sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (-T-A-G-G-)n(-A-T-C-C-)n [J]. *Biochemistry*, 1974, 13(19): 3930-3937.
- [47] Moore S S, Sargeant L L, King T J, *et al.* The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species [J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 654-660.
- [48] 王玲玲, 陈东亮, 黄丛林, 等. SSR 分子标记技术在植物研究中的应用 [J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(36): 123-126.
- [49] Li Y, Li L F, Chen G Q, *et al.* Development of ten microsatellite loci for *Gentiana crassicaulis* (Gentianaceae) [J]. *Conserv Genet*, 2007, 8(6): 1499-1501.
- [50] Ni L, Zhao Z, Xu H, *et al.* Chloroplast genome structures in *Gentiana* (Gentianaceae), based on three medicinal alpine plants used in Tibetan herbal medicine [J]. *Curr Genet*, 2016, 63(2): 241-252.
- [51] Sathishkumar R, Lakshmi P T, Annamalai A, *et al.* Mining of simple sequence repeats in the Genome of Gentianaceae [J]. *Pharmacogn Res*, 2011, 3(1): 19-29.
- [52] Zhou D, Gao S, Wang H, *et al.* De novo sequencing transcriptome of endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae) to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J]. *Gene*, 2016, 575(1): 160-170.
- [53] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [54] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用 [J]. *生物学通报*, 2004, 39(2): 19-21.
- [55] 秦鲜艳, 赵志礼, 孟千万, 等. 粗茎秦艽 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(10): 25-28.
- [56] 朱田田, 晋玲, 张裴斯, 等. 麻花秦艽 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(6): 74-78.
- [57] 朱田田, 晋玲, 马晓辉, 等. 甘肃祁连山地区麻花秦艽 UPLC 指纹图谱与遗传多样性研究 [J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(14): 31-37.
- [58] 王笠, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于 ISSR 标记的麻花秦艽遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(15): 3168-3174.
- [59] 张文勇. 秦艽及其近缘种的 ISSR 和 HPLC 研究 [D]. 西安: 西北大学, 2010.
- [60] 周文平, 张惠娟, 王亚飞, 等. 秦艽组 6 种植物的 ISSR 扩增结果分析 [J]. *中药材*, 2015, 38(7): 1375-1378.
- [61] Zheng P, Zhang K J, Wang Z Z. Genetic diversity and gentiopicroside content of four *Gentiana* species in China revealed by ISSR and HPLC methods [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2011, 39(4/6): 704-710.
- [62] Lander E S. The new genomics: Global views of biology [J]. *Science*, 1996, 274(5287): 536-539.
- [63] 杨昭庆, 洪坤学. 单核苷酸多态性的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2000, 23(1): 4-8.
- [64] 姚丹青, 楼坚锋, 顾芹芹. SNP 在农作物遗传分析中的应用 [J]. *上海农业科技*, 2015(6): 26-27.
- [65] Hikage T, Kogusuri K, Tanaka-Saito C, *et al.* W14/15 esterase gene haplotype can be a genetic landmark of cultivars and species of the genus *Gentiana* L. [J]. *Mol Genet Genomics*, 2011, 285(1): 47-56.
- [66] Wenping H, Peng Z, Yihan H, *et al.* An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4817-4825.
- [67] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [68] 姬可平, 刘丽莎, 张西玲, 等. 家种及野生秦艽、麻花秦艽的 rRNA 基因间隔区 PCR 产物电泳的初步研究 [J]. *中药材*, 2003, 26(1): 11-14.
- [69] 刘丽莎, 王香梅, 王昕, 等. 甘肃野生秦艽 rDNA ITS 区序列分析 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5): 565-568.
- [70] 罗焜, 马培, 姚辉, 等. 多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究 [J]. *药学报*, 2012, 47(12): 1710-1717.
- [71] Liu J, Yan H F, Ge X J. The use of DNA barcoding on recently diverged species in the genus *Gentiana* (Gentianaceae) in China [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153008.
- [72] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. 西藏麻花秦艽种质资源的遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(22): 3212-3215.
- [73] 王聪聪. 秦艽组四种植物的谱系地理与物种分化研究 [D]. 西安: 西北大学, 2013.
- [74] 马林, 罗昭标, 罗华元, 等. 烟草品种的 SCAR 标记鉴别 [J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(5): 79-84.
- [75] Shimada N, Nakatsuka T, Nakano Y, *et al.* Identification of gentian cultivars using SCAR markers based on intron-length polymorphisms of flavonoid biosynthetic genes [J]. *Sci Hortic*, 2009, 119(3): 292-296.
- [76] 龙治坚, 范理璋, 徐刚, 等. SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(2): 336-343.
- [77] 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 等. 两种新型目标分子标记技术——CDDP 与 PAAP [J]. *植物生理学报*, 2010, 46(9): 871-875.

- [78] 柳李旺, 龚义勤, 黄 浩, 等. 新型分子标记—SRAP与TRAP及其应用 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.
- [79] 肖炳光, 徐照丽. 反转录转座子标记及在作物遗传育种中的应用 [J]. 生物技术通报, 2006(4): 61-66.
- [80] 王明霞, 柳李旺, 龚义勤, 等. RAMP与REMAP分子标记技术及其应用 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 859-865.
- [81] 杨春芳, 曾 阳, 郭凤霞, 等. 分子标记技术在獐牙菜属植物研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3238-3244.
- [82] Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, *et al.* Construction of the first genetic linkage map of Japanese gentian (*Gentianaceae*) [J]. *BMC Genom*, 2012, 13(1): 672-687.
- [83] 马 潇, 罗宗煜, 翟进斌, 等. 秦艽本草溯源 [J]. 中药学报, 2009, 37(5): 70-71.
- [84] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [85] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(12): 2229-2238.
- [86] 高立志, 董玉琛, 洪德元, 等. 中国 3 种野生稻保护策略的初步研究 [A] // 水稻遗传育种国际学术讨论会论文集 [C]. 杭州: 中国农学会, 1999.
- [87] 余丽琴, 陈大洲, 黎毛毛, 等. 东乡野生稻的保护及其现状 [A] // 第一届全国野生稻大会论文集 [C]. 南昌: 中国农学会, 中国农业科学院, 云南农业大学, 2003.
- [88] 刘 萍, 马宏伟, 王掌军. 我国药用植物种质资源遗传多样性及其研究进展 [J]. 农业科学研究, 2008, 29(3): 66-70.