天麻简单重复序列与天麻素相关性初探*

□王晓丽** 宋聚先 （贵阳医学院药用植物与生药学教研室 贵阳 550004）
李宝忠 （贵州家诚药业 遵义 563000）
何国栋 郑伟耀 （贵阳医学院药用植物与生药学教研室 贵阳 550004）

摘 要：目的：探讨天麻遗传变异与其品质的关系、为天麻优良种质的选育提供科学途径。方法：采用简单重复序列标记技术和高效液相检测不同种质的天麻，进行相关性分析。结果：本研究特异引物产生的特异带型与天麻素含量具有一定的关系，扩增最大片段为 520bp 最小片段为 320bp，出现单上带及双带的样品天麻素含量≥0.20%，出现单下带的样品天麻素含量约为 0.20%或<0.20%。结论：本研究初步显示出现高分子量条带类型的样品天麻素含量较高，天麻 SSR 特异带型与天麻素含量的相关性具有进一步探讨的价值。

关键词：天麻苷含量 简单重复序列

名贵中药天麻来源于兰科植物（Gastrodieae Elata Bl.）的干燥块茎，是中国药典收载的唯一入药品种。传统以表型特征辅助选育天麻，经多代无性繁殖后，种质退化、产量减低、天麻素含量下降，天麻品质的可持续发展难以保证。2005 年 3 月~2006 年 5 月根据 Genebank 登录的天麻微卫星序列设计特异引物，并采用聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）扩增每个位点微卫星 DNA 序列，再通过电泳分析核心序列长度的多态性，获得天麻简单重复序列多态性标记。本研究同时对贵州不同产区天麻进行天麻指标成分天麻素含量的测定，初步探讨和分析了天麻简单重复序列标记与天麻素含量的相关性，为天麻优良种质的选育提供了科学信息。

一、材 料

为便于记住样品的变型及产地，样品代号以变型天麻拉丁种名的开头字母加产地拼音开头字母构成。

天麻由贵阳医学院生药研究室采集并鉴定（见表 1）。

天麻（箭麻）：由贵阳医学院生药研究室采集并鉴定（见表 1）。

二、方 法

1. DNA 提取

本研究采用 CTAB 法[3]提取天麻 DNA。

收稿日期：2009-08-06
修回日期：2009-09-08

* 科技部国家“十五”攻关课题（2004BA721A33）：天麻种质资源及其评价研究，负责人：王晓丽；贵州省科技厅中药现代化科技产业研究开发专项（黔科合中药专字[2003]51）：天麻分子标记辅助保种与产业化开发，负责人：王晓丽；贵州省“十五”攻关课题（黔科合农社字[2001]1125）：天麻种质资源分子生物学，负责人：王晓丽。

** 联系人：王晓丽，教授，主要研究方向：中草药开发与应用，Tel：0851-6908218，E-mail:wxl596@163.com

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2. PCR 扩增

取天麻 DNA 样品之前，所有缓冲液吸头、离心管等必须经高压处理，常规消耗用品用后作一次性处理；在超净台内进行 PCR，操作前后使用紫外灯消毒；移液品用一次性吸头和活塞的正向排液器；试剂管用前先瞬时离心（10s），使液体沉于管底，加模板 DNA（包括在石蜡油后），马上盖好，混匀。反应体系为 25μL：ddH_2O 12.5μL，10×Buffer 2.5μL，dNTPs（2mM）2.5μL，Mg^{2+}（25mM）1.75μL，Taq 酶（2U·μL^{-1}）0.75μL，模版 DNA 1μL（20ng），上游引物（8pmol·μL^{-1}）2μL，下游引物（8pmol·μL^{-1}）2μL。反应程序为：94.0℃预变性 5min；94.0℃变性 1min，58.0℃退火 1min，72.0℃延伸 1min，35 个循环；最后在 72.0℃继续延伸 5min，4.0℃保存。反应结束后取 8μL 扩增产物于 2.5%的琼脂糖凝胶上电泳检测，电泳条件为：1×TAE 缓冲液，80V 恒压，电泳时间约 1.5h，0.5μg·mL^{-1} 溴化乙锭染色 30min，在凝胶成像仪上观测结果，照相。SSR 扩增条带经 Gel-Pro Analyzer Version 4.5 软件识别。

3. 天麻素含量测定[4]

色谱操作条件：Diamonsil C_{18} 柱（4.6mm×250mm，5μm）；流动相：甲醇-磷酸盐溶液（0.1mol·L^{-1} 磷酸氢二钠和 0.1mol·L^{-1} 磷酸二氢钾溶液等量混合）-水（1.5∶3∶95.5）；检测波长 270nm；柱温为室温；进样量 10μL。理论塔板数按天麻素峰计算应不低于 1500。

对照品溶液配制：精密称取 80℃下干燥 1h 的天麻素对照品适量，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制得每 1mL 含天麻素 0.5mg 的对照品溶液。

样品的制备：参见 2005 版中国药典的方法，将烘干碾细的天麻样品约 0.8g，置 20mL 容量瓶中，精确加入甲醇 5mL。称定重量，超声处理 30min，静置 24h，振摇后再超声处理 15min，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，静置。取上清液离心，并用 0.45μm 滤膜过滤，即得。分别精密吸取对照品溶液 10μL 与供试品溶液 20μL，注入液相色谱仪进行测定。

三、结 果

1. SSR 分子标记（见图 1）

2. 天麻素的 HPLC 含量测定（见表 2）

3. 特异引物（暂不公布）扩增带型与天麻素含量的关系（见表 3）

4. 扩增带型分子量与天麻素含量的关系（见图 2）

表 1 样品编号、分类及产地

样品编号	分类	产地	备注
FDJ	黄天麻（Gastrodia elata Bl. f. flavida）	德江县青龙镇	C
FLL	黄天麻（Gastrodia elata Bl. f. flavida）	龙里县三元镇	C
VZY	绿天麻（Gastrodia elata Bl. f. viridis）	遵义县南白镇	W
VDF	绿天麻（Gastrodia elata Bl. f. viridis）	大方县羊场镇	C
VRJ	绿天麻（Gastrodia elata Bl. f. viridis）	榕江县平江乡	C
EKYW	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	开阳县双流镇	W
EKYC	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	开阳县龙水乡	C
EWD	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	乌当区野鸭乡	C
EDF	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	大方县六龙镇	C
EZY	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	遵义县三合镇	C
EWA	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	瓮安县草塘镇	C
EBJ	红天麻（Gastrodia elata Bl. f. elata）	毕节杨家湾镇	C
GZYW	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	遵义县三岔镇	W
GWAW	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	瓮安县雍阳镇	W
GKY	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	开阳县米坪乡	W
GWD	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	乌当区朱昌镇	W
GZYC	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	遵义县永乐镇	C
GWAC	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	桐梓县楚米镇	C
GDF	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	大方县长石镇	C
GRJ	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	榕江县平阳乡	C
GLP	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	黎平县水口镇	C
GZJ	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	织金县猫场镇	C
GDJ	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	德江县青龙镇	C
GBJ	乌天麻（Gastrodia elata Bl. f. glauca）	毕节县小坝镇	C

注：黄、绿、红、乌天麻分别用 F、V、E、G 表示；W：野生，C：栽培。

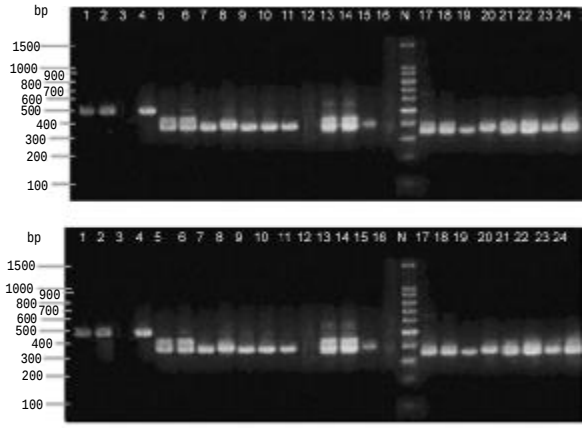

图 1 特异引物对扩增的 SSR 指纹图谱

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 2　天麻苷的 HPLC 含量

样品编号	对照品 1# 峰面积	对照品 2# 峰面积	样品 Y_1 重量（g）	样品 Y_1 峰面积	样品 Y_2 重量（g）	样品 Y_2 峰面积	Y_1 天麻素含量（$mg \cdot g^{-1}$）	Y_2 天麻素含量（$mg \cdot g^{-1}$）	样品天麻素平均量（$mg \cdot g^{-1}$）	备　注
1FDJ	1006131	1002718	0.8109	680356	-	-	2.0883	-	2.0883	单样
2FLL	1006871	1032066	0.7960	940014	0.7991	888648	2.8959	2.7270	2.8145	平行样
3VZY										
4VDF	1006131	1002718	0.7973	1735921	0.8027	1811034	5.4191	5.6155	5.5173	平行样
5VRJ										未检出
6EKYW	1006131	1002718	0.8130	700870	0.8029	654464	2.1457	2.0288	2.0873	平行样
7EKYC	1036474	1015617	0.6019	2091370	0.5988	1953755	8.4659	7.9478	8.2069	平行样
8EWD	1006871	1032066	0.8034	1569656	0.8017	1320792	4.7911	4.0400	4.4156	平行样
9EDF	1012769	1008720	0.7555	5183611	0.7122	4833311	8.4852	8.3928	8.4390	平行样
10EZY										未检出
11EWA										未检出
12EBJ										未检出
13GZYW	1012769	1008720	0.8224	37677	0.8295	54117	0.1133	0.1614	0.1374	平行样
14GWAW	1006131	1002718	0.8035	268838	0.8026	254337	0.8328	0.7887	0.8108	平行样
15GKY										未检出
16GWD										未检出
17GZYC	1036474	1015617	0.8056	194694	-	-	0.5888	-	0.5888	单样
18GWAC	1006871	1032066	0.8110	676043	0.8078	679974	2.0442	2.0642	2.0542	平行样
19GDF	1012769	1008720	0.5991	108783	-	-	0.4491	-	0.4491	单样
20GRJ	1036474	1015617	0.7428	103606	-	-	0.3398	-	0.3398	单样
21GLP										未检出
22GZJ	1012769	1008720	0.8122	3169639	0.8089	3075060	4.8263	4.7014	4.7639	平行样
23GDJ										未检出
24GBJ	1012769	1008720	0.8030	4886653	0.8193	4550069	7.5259	6.8681	7.1970	平行样

注：1.含量 $1mg \cdot g^{-1}$ 等于 0.1%；2.对照品浓度为 50（$\mu g \cdot mL^{-1}$）；3.供试材料为 SSR 试验平行样的干燥品。

图 1 为有效引物对 24 个样品的扩增结果。扩增最大片段为 520bp，最小片段为 320bp，与各对应片段比较，各供试样品相应 DNA 片段迁移率基本相同；3、12、16 号样品未显带，5、6、13、14、17、18、21、22 号样品显双带，其余样品显单带；表 2 为扩增样品对应的天麻素含量，出现单上带及双带的样品天麻素含量≥0.20%，而出现单下带的样品，其中只有样品 1、6 天麻素含量约为 0.20%，其他样品天麻素含量<0.20%。

5. 扩增带型与天麻素含量关系的数据处理

基于被测样品间的 SSR 条带与天麻素两两比较，将天麻素含量≥0.20%的条带记做“1”，天麻素含量<0.20%的条带记做“0”，采用 NTSYS-pc（Ver1.8）计算软件，用非加权配对法（UPGMAM）进行 SAHN 聚类分析，构建了 24 个品种的特异引物扩增带型与天麻素含量的关系图（见图 3）。

表 3　特异引物扩增带型与天麻素含量的关系

样品编号	天麻素含量（$mg \cdot g^{-1}$）	对应特异引物扩增带型分子量
FDJ	2.0883	B
FLL	2.8145	A
VDF	5.5173	A
EKYW	2.0873	B
EKYC	8.2069	A
EWD	4.4156	A>
EDF	8.4390	AB
GZYW	0.1374	B
GWAW	0.8108	B
GZYC	0.5888	AB
GWAC	2.0542	AB
GDF	0.4491	B
GRJ	0.3398	B
GZJ	4.7639	AB
GBJ	7.1970	AB

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

四、讨 论

本研究所用材料均为鲜品，为规范研究方法起见，采用中国药典收录的天麻标准进行含量测定。从图和表上看出，在所测定的样品中，出现 A 及 AB 条带的样品除 GZYC 外，天麻素含量均达到或超过药典标准，即：按干燥品计算，天麻苷含量不得少于 0.20%。而出现 B 条带的样品，天麻素含量只有样品 FDJ，EKYW 刚达到药典标准，其他样品的天麻素含量均不达标。由此结果可以推测，特异引物扩增位点与天麻素含量有一定的联系，即出现 A 条带类型的样品天麻素含量较高。

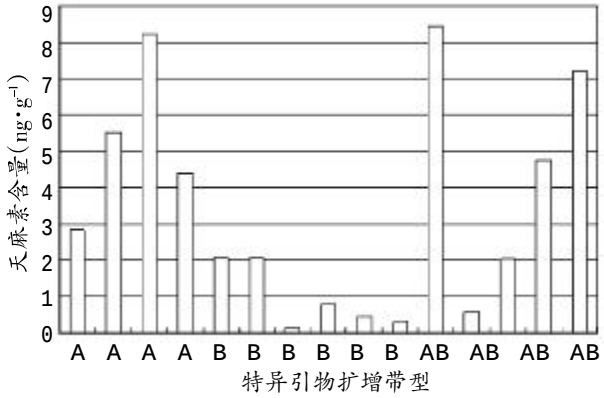

图 2 扩增带型与天麻素含量的关系

注：A：高分子量的条带>320bp，B：低分子量的条带<320bp，AB：双带。

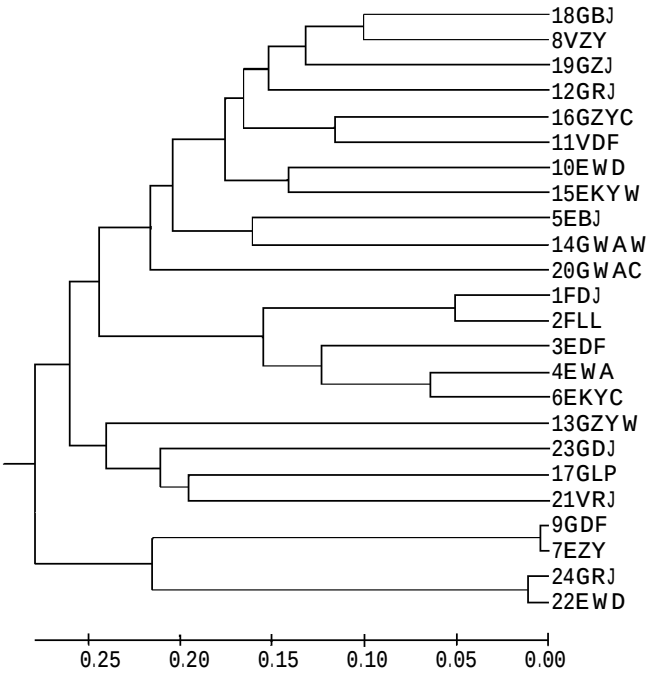

图 3 特异引物扩增带型与天麻素含量的关系图

从扩增结果图还可看出，野生及无性繁殖的天麻的 SSR 位点基本都是纯合型，而杂交栽培的品种基本都是杂合型。分析原因，天麻为自花授粉植物，若本身基因为纯合型，则因不与其他不同类型杂交而保持其纯合型，可稳定遗传。而直接由野生天麻通过无性繁殖产生的变型，由于没有经过授粉，基因型也将保持不变。SSR 为共显性标记，可鉴别出杂合子和纯合子。本实验所用的引物可有效地鉴别各扩增位点的纯合与杂合。目前，大部分栽培天麻为有性繁殖的杂交品种，如红天麻，乌天麻。杂交使得不同的基因型遗传到子代，从而变为杂合型。SSR 分子标记对天麻的野生品种，无性繁殖品种及有性繁殖品种表现出很好的鉴别能力，为天麻的鉴别提供了分子依据[5~7]。

从图 3 可见，7EKYC、9EDF；24GBJ、22GZJ；1FDJ、2FLL；4VDF、6EKYW；18GWAC、8EWD；分别聚到一起，它们的遗传距离较小，依次为 0.005，0.01，0.05，0.07，0.10，表明高天麻素含量与 SSR 高分子量条带有较大的相关性；21GLP、17GZYC、23GDJ、13GZYW、3VZY、20GRJ、14GWAW、5VRJ、15GKY、10EZY、11EWA、16GWD、12EBJ、19GDF 的遗传距离较大，均大于 0.10，虽均有相关性显示，但相关性较小，且由于天麻素含量不符合药典规定的标准，所以没有意义。

本研究将天麻 DNA 分子标记与天麻素含量结合研究，具有打破对中药天麻优良品种选育的传统，为寻找育种和辅助准确选择奠定了基础，若经费和时间充足，可以再扩大检测的样品数量，进一步探讨天麻遗传变异与其次生代谢产物指标性成分天麻素关联的规律性，从分子水平探讨和制定天麻种内优良品种的鉴定和选择指标。

参考文献

1 蒋彦波，揭雨成，周建林，等.苎麻基因组微卫星的分离与鉴定.作物学报.2007，33(1)：158~162.

2 廖国春，黄永芳，刘天颐. 生物技术在油茶育种上的应用研究进展. 河南农业科学，2009，3：13~16.

3 王晓玲，王晓多. 天麻总 DNA 提取的研究. 世界科学技术—中医药现代化，2005，7(2)：110~111.

4 杨章敏，李宝忠. 贵州不同地区天麻中天麻素含量的测定. 现代医药卫生，2006，22(21)：3328~3329.

5 肖璇，乔爱民，王心燕，等.SSR 技术及其在玉米研究中的应用. 仲

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

恺农业技术学院学报,2005,18(1):56~60.
6 Nybom H Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology.2004,13:1143~1155.
7 Pardo B G Fernandez C, Hermida M, Vazquez—Lopez A, et al. Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (Scophthalmus maximus). Genome, 2007, 50(3):329~332.

Primary Study of the Relationship Between the SSR of Gastrodia Elata Blume and the Gastrodin Content

Zheng Weiyao[1], Song Juxian[1], Wang Xiaoli[1], Li Baozhong[2], He Guodong[1]
(1. Department of Medical Plant and Pharmacognosy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;
2. Lab for Molecular Pharmacognosy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: This work aimed to investigate the relationship between the genetic variation of Gastrodia elata Blume and its species, and try to find a rational approach for the selection of the good species. Simple sequence repeat (SSR) and HPLC were used to test different species of Gastrodia elata Blume and explore their relationship. The results showed that there may exist a certain relationship between the SSP fingerprinting amplified by specific primer pairs and the content of Gastrodia elata Blume. The largest amplified fragment was 520bp, while the smallest 320bp.The species showing simple upper tracts and double tracts had the Gastrodin content of more than 0.20%, while the species showing simple lower tract had the Gastrodin content of 0.20% or even lower. This relationship needs to be further studied.

Keywords: Gastrodin content; SSR molecule marker

(责任编辑:王 瑀,责任译审:张立崴)

我国中药领域发展潜力巨大

2006年的调查显示,年销售额在亿元以上的中药保护品种生产企业有114家,单品种年销售额过亿元的达到47个,还出现了年销售额10亿元以上的中药保护品种生产企业8家。近年来,国家启动了多项中药现代化以及与国际评价接轨的研究专项,这将极大的推动中药产业的发展。

在金融危机背景下,跨国医药企业希望通过加大对中国市场的投资,来控制生产和研发的成本,为其全球战略服务,在中国建立起庞大的产学研网络。

中国工程院院士张礼和日前在“第十三届京港经济合作研讨洽谈会主题论坛”上表示,我国中药领域发展潜力巨大。

张礼和首先回顾近20年来我国中药产业发展:1990年,我国产值超亿元的中药企业仅有3家,1993年以前无一个单品种年销售额超亿元。实施中药品种保护制度后的1994年,我国产值超亿元的中药企业一下子突破16家,并出现了单品种产值超亿元的品种2个。1997年发展到53家企业和17个品种,1999年发展到107家企业和28个品种。

2006年的调查显示,年销售额在亿元以上的中药保护品种生产企业有114家,单品种年销售额过亿元的达到47个,还出现了年销售额10亿元以上的中药保护品种生产企业8家。近年来,国家启动了多项中药现代化以及与国际评价接轨的研究专项,这将极大的推动中药产业的发展。

张礼和说,在金融危机背景下,跨国医药企业希望通过加大对中国市场的投资,来控制生产和研发的成本,为其全球战略服务,在中国建立起庞大的产学研网络。国际著名制药企业都已进军我国。去年底,礼来在上海建立了中国研发总部。诺和诺德也于2008年11月斥资近4亿美元,在天津建立胰岛素制剂与灌装工厂。几乎同时,诺华制药全球第三大、亚洲最大的研发中心正在动工。

张礼和认为,外包服务也是实现目前医药增长的一个“势在必行的战略”。目前医药外包业务开始向诸如印度、中国等亚洲新兴市场转移。2008年中国的医药研发外包市场约为2.6亿美元,预计到2010年可增长到4.3亿美元,年增幅高达40%。目前全国几百家生物技术外包企业中,从事新药的化合物筛选的企业占多数,竞争非常激烈,已经出现上千人规模的大公司。北京市也已有不少有规模和影响的外包服务的生物医药企业,但从事生物医药临床前研究、临床研究的还不多。应积极引进国外先进企业的这方面的人才、技术和管理,企业应在外包服务的基础上逐步建立新药研发的完整平台,为我国自主研发打下基础。 (文 摘)

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn