



夏伟,谭政委,余永亮,等.分子标记技术在连翘研究中的应用[J].黑龙江农业科学,2019(8):157-160.

分子标记技术在连翘研究中的应用

夏伟,谭政委,余永亮,许兰杰,杨红旗,董薇,梁慧珍

(河南省农业科学院 芝麻研究中心,河南 郑州 450002)

摘要:为促进连翘资源的综合利用与开发,本文通过查阅大量文献,对分子标记技术在连翘中的应用进行综述,发现分子标记技术在连翘中的应用主要分为以下几方面:分子标记引物的开发、种质差异研究、遗传多样性分析、物种鉴别与中药饮片鉴定。本文主要概述了 RAPD、SSR、ISSR 三种分子标记技术在连翘中的应用研究情况。

关键词:连翘;分子标记;遗传多样性;种质鉴别

连翘为木犀科植物连翘[*Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl]的干燥果实,分为“青翘”和“老翘”^[1]。连翘始载于《神农本草经》下品,在我国,连翘被归在“40 种常用药”之中,从 1963 年以来一直被《中国药典》收录。我国连翘植物基本为野

生品种,自然分布在我国中部地区,主要分布在山西、河南、陕西、河北等地,另外在甘肃、宁夏、山东、江苏、湖北及四川等省也有少量分布,遍及全国 99 个县^[2]。连翘作为我国常用大宗药材之一,其性味苦、微寒;归肺、心、小肠经;具清热解毒,消肿散结,疏散风热的功效,被誉为“疮家圣药”^[1]。现代药理研究表明:连翘还具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、保肝的药理作用^[3]。

近年来,随着分子标记技术的开发与应用,研究人员利用分子标记技术对连翘的种质差异、遗传多样性、SSR 引物的开发等做了部分研究。本文主要从以下几方面对分子标记在连翘中应用进行综述。

收稿日期:2019-03-03

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-21);国家农业科研杰出人才及其创新团队项目[农财发(2016)45 号];河南省重大科技专项(181100110300);河南省科技攻关计划项目(182102310062);院科研发展专项资金项目(YNK201710601, YNK20177502, 2018XKYH07);河南农科院自主创新基金项目(2018ZC75)。

第一作者简介:夏伟(1989-),男,硕士,研究实习生,从事药用植物栽培研究。E-mail: m18300677220@163.com。

通讯作者:梁慧珍(1968-),博士,研究员,从事花类药材育种研究。E-mail: lhzh66666@163.com。

[7] 魏明,薛正莲,杨超英,等.生物技术专业产学研相结合创新人才培养模式探索和实践[J].科技创新导报,2014(25):245.

[8] 白璐,田晓柱,牛炳滔,等.生物技术专业人才培养模式的实践与探索[J].高校实验室工作研究,2016(4):94-96.

[9] 阳泽平,徐水,成国涛.生物技术专业人才培养模式管

理及运行机制的研究与实践[J].蚕学通讯,2011,31(4):44-50.

[10] 张海龙,王玮琳.“合格+卓越”土木工程师培养模式及路径探索[J].价值工程,2017(22):203-205.

Exploration and Practice of Training Mode of Innovative Talents in Biotechnology Specialty Under the Background of ‘Internet +’

LIU Guo-hua, PANG Min

(College of Forestry and Life Sciences, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan 402160, China)

Abstract: In the 21st century, with the rapid development of network and the continuous expansion of big data, the society has put forward higher requirements for the cultivation of biotechnology professionals. In order to improve the quality and adaptability of personnel training, this paper combined the latest concepts and technologies of ‘Internet +’ to explore and practice the training mode of innovative talents in biotechnology. Through the construction of ‘trinity’ training mode, building cooperation platform, promoting teaching informationization, strengthening teaching staff and strengthening extra-curricular expansion, we had improved personnel training, and good practical results had been achieved.

Keywords: biotechnology; Internet +; innovative talents; training mode

1 分子标记技术概述

分子标记是根据基因组 DNA 存在丰富的多态性而发展起来的可直接反映生物个体 DNA 水平上的差异的一类新型的遗传标记,它是继形态学标记、细胞学标记、生化标记之后最为可靠的遗传标记技术。通常所说的分子标记是指以 DNA 多态性为基础的遗传标记^[4]。

目前常用分子标记技术:一是建立在 Southern 杂交基础上的分子标记 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)限制性内切酶片段长度多态性标记,CISH(Chromosome In Situ Hybridization)染色体原位杂交;二是以重复序列为基础的分子标记技术 SSR(Simple Sequence Repeat)简单序列重复,即微卫星 DNA^[4];ISSR(Inter-simple Sequence Repeat)简单序列重复区间扩增多态性^[5];三是以 PCR 为基础的分子标记技术 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)随机扩增多态性 DNA,AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)扩增片段长度多态性等^[4]。其中,ISSR 分子标记是第 2 代分子标记中应用最广的分子标记之一,兼具 RAPD、SSR、RFLP 和 AFLP 的几大优势,具有多态性高、操作简便、经济实用、引物通用等优点^[6]。

2 DNA 分子标记技术在连翘中的应用研究进展

作为一种新型的分子生物学技术,DNA 分子标记技术在鉴定、育种、遗传多样性、种质亲缘关系、指纹图谱构建等多方面有应用。随着科技的进步,分子标记技术与 DNA 试剂盒提取、自动化分析电泳胶片、计算机数据处理相结合后,加快了遗传图谱的构建、基因的定位及克隆、物种亲缘关系鉴别和人类相关的致病基因的诊断与分析进程^[7]。而在对药用连翘的应用中,分子标记技术主要用于研究连翘的遗传多样性,种质差异,物种与饮片鉴别、亲缘关系分析等方面,但相对于山茱萸、丹参、地黄等常用河南道地药材来说,分子标记技术在连翘的应用中报道较少。本文主要从 RAPD、SSR、ISSR 等分子标记技术在连翘中的应用进行论述。

2.1 RAPD 技术在连翘研究中的应用

RAPD 技术主要应用于研究不同地区、不同器官连翘的遗传多样性,亲缘关系、并且在真伪鉴

别方面也有较多研究。Jeung Keun Suh 等^[8]收集来自荷兰、韩国、美国的连翘叶片样品,用 RAPD 和 AFLP 分子标记技术研究连翘不同种群的基因组,通过探究种群之间不同杂交品种的遗传多样性、与亲本基因的关系,对连翘的种质资源进行鉴定和评估。结果显示:通过研究可以清楚的分开来自卵叶连翘的连翘品种;通过长距离传送到欧洲的连翘和中国的连翘无近缘关系;连翘和金钟花不是杂交连翘的亲本,并且导致这一结果的原因是自然杂交或者后期的育种工作。

李汉伟等^[9]采用 RAPD-PCR 技术对不同产地、不同花柱类型的连翘进行遗传多样性和亲缘关系分析。结果表明:连翘不同产地之间的差异大于不同花柱类型之间的差异,地理环境的差异引起连翘的遗传多样性。吴婷等^[10]运用 RAPD 技术对来自不同产地的 14 批连翘进行遗传多样性研究。通过构建 DNA 指纹图谱,分析得出:来自不同产地的药材间的遗传多样性比较丰富;连翘的遗传多样性不仅与连翘药材的来源地有明显的相关性,而且与其亲缘关系远近有关。吴婷^[11]运用 RAPD 技术,将山西的连翘药材同陕西、河北、河南等地区的连翘药材相比较,并筛选出多态性好的引物,进行不同产地连翘 DNA 图谱的构建及遗传多样性研究,结果表明:山西连翘的“道地性”体现在 DNA 遗传信息、活性成分及抗菌、抗病毒药效作用等方面。冯帅等^[12]以 PAGE、RAPD、DNA 条形码技术等建立了连翘的生物指纹图谱,通过比较市售连翘药材及常见伪品金钟花的相应图谱,系全面研究与连翘品质的相关因素,并且从生物和化学指纹图谱品一质相关的角度,建立中药质量系统评价体系。

2.2 SSR 技术在连翘研究中的应用

关于 SSR 技术对连翘的研究主要集中于 SSR 引物的开发,物种多样性和遗传结构的研究。Zi-Zhen Fu 等^[13]用微卫星位点研究中国温带地区灌木连翘种群遗传学特征,分析连翘遗传多样性和物种结构,结果表明:连翘种群的遗传分化与连翘分布的地理距离、温度、纬度显著相关;连翘应分为两个遗传群体;生态位模型表明:这两个群体可能被气候适宜度低的地区隔离。孟令芝^[14]利用全国 16 个地区的连翘进行多态性检测,筛选出可用于不同产地连翘聚类分析的 SSR 引物,获得 3 199 个分子标记,并初步从设计的 76 对引物中筛选到 11 对具有多态性的引物,指

出这 11 对引物可以用于不同产地连翘遗传多样性分析。王兴春等^[15]通过分析不同部位连翘的转录组,研究了 41 552 连翘基因序列,深度挖掘了对有效成分合成相关的基因序列,并开发了 3 199 个 SSR 分子标记。

2.3 ISSR 技术在连翘研究中的应用

ISSR 技术主要用于连翘易混淆品的区分、不同种群以及种间的遗传多样性、基因图谱的构建、分析地区差异对连翘遗传多样性的影响等方面。汤正辉等^[16]通过正交设计方法得出连翘 ISSR-PCR 反应的最佳反应体系,为野生连翘遗传多样性亲缘关系的分析、遗传育种和构建基因物理图谱等研究奠定了基础。汤正辉等^[17]应用 ISSR 分子标记技术对来自河南省不同地区连翘 *Forsythia suspensa* 6 个自然种群进行遗传多样性分析,得出连翘具有较高的遗传多样性;连翘种群间遗传距离与地理距离没有相关性;河南连翘种群现有遗传格局是由连翘本身的生物学特性与不同种群所处生境的差异造成;由连翘种群遗传变异分析得出:连翘各个种群间存在较大的遗传分化;由 6 个连翘种群遗传距离聚类分析得出:6 个种群间的遗传距离较小,遗传相似度较高;不同种群间基因交流多,个体间遗传距离与地理距离无相关性,并且在育种中可以依据遗传多样性分析和聚类结果进行亲本选择,节省人力物力。王琳^[18]用 ISSR 分子标记技术对采自山西、河南、陕西、河北省份的 18 个不同产地的连翘及其混伪品金钟花、东北连翘、紫丁香进行遗传多样性分析,结果表明:四个省份相比,陕西省连翘遗传信息量与遗传多样性最少;居群遗传分化程度大小顺序为:山西>河南>陕西>河北,河北与陕西居群间基因流较强;18 个产地相比,山西陵川遗传多样水平最高;河南林县遗传多样水平最低。聚类分析结果表明:连翘与 3 种混伪品可以清晰分开。

2.4 其他分子标记在连翘研究中的应用

分子标记现在已经越来越受研究者的青睐,其他的分子标记也被应用在连翘的基源鉴定、饮片质量鉴别,在分子水平调控育种等方面。Carlo Rosati 等^[19]从转化的连翘花瓣中提取 DNA,对总长 DFR 和调控查尔酮合成酶、控制黄酮合成的基因进行 PCR 扩增,研究转化植株与野生植株间花色苷的含量、花瓣中 DFR 的转录浓度和酶活性的差异,对连翘花瓣中花青素含量进行测定。结果表明:转化植株花瓣中花青素含量、DFR 转录

浓度和花瓣酶活性高于野生型植株。刘伟等^[20]用 RACE 法成功构建了连翘花蕾全长 cDNA 文库,为后期连翘在分子水平上调控育种奠定基础。崔占虎等^[21]用分子标记技术对连翘败毒丸中 19 种原料药进行分子鉴别,通过聚类分析可以清楚分开连翘败毒丸中的原料药材。袁王俊等^[22]采用 PCR 产物测序法对连翘及其易混淆原植物进行区别以及引种栽培前原植物的鉴定,结果表明:PCR 产物测序法可以区分连翘和易混淆原植物。

3 连翘资源现状分析与研究展望

近 20 年来,虽然我们对连翘的研究取得了非常大的进展,但是随着人们生活水平的提高,人们对健康越来越重视,而连翘不仅是常用大宗药材,更是保健用品常用药材之一,还被用于制备天然防腐剂。例如连翘叶绿茶含有丰富的对人体具有保健作用、减肥作用的活性成分^[23-25]。据市场调查显示,连翘近几年其市场流通量逐年升高,人们对连翘的需求也在逐渐增大,但由于连翘主产区近年来受自然因素、人为采摘、产地加工粗犷及连翘资源品种退化等原因,导致市场上连翘品质良莠不一,连翘野生连翘资源蕴藏量下降,从而直接影响其临床用药的安全性。经调查发现,引起连翘资源品质下降的主要原因有以下几点:我国连翘主要为野生品种,资源蕴藏量有限,又人口过快增长,近几年恶劣天气加剧,特别是连翘花期遭遇倒春寒的影响,使连翘的生长遭到破坏,导致减产或质量下降;产地药农采摘不规范,随着连翘价格上涨,产地药农抢青严重,采摘时甚至直接折枝或将连翘灌丛大面积砍伐等情况,导致连翘资源减少,品质下降;连翘产地加工主要以小作坊为主,加工粗犷,干燥时主要以煤炭烘烤或是晾晒,导致产区连翘硫超标或有害物质增加而影响连翘质量;另外,连翘主要以野生为主,连翘资源更新较慢也是影响连翘产量及质量的因素。

有前文概述可知,分子标记可以准确、快速的地对连翘进行种质鉴定,遗传多样性分析,物种转化,饮片质量鉴定和种质选育,从基源、育种、和遗传分化等多方面对连翘资源进行研究。除此之外,可以借助分子标记技术建立连翘优质品种基因文库,并对优良品种进行育种,实现资源的可持续化,促进连翘资源 GAP 和 SOP 管理体系的形成,实现连翘药材种植、栽培、生产和加工、储藏的规范化和标准化^[2]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 九部. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [2] 郭巧生. 药用植物资源学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [3] 胡静, 马琳, 张坚, 等. 连翘的研究进展[J]. 中南药学, 2012(10): 760-764.
- [4] 姚红伟, 张立冬, 孙金阳, 等. DNA 分子标记技术概述[J]. 河北渔业, 2010(7): 42-46.
- [5] 林志坤, 孙威江, 陈志丹, 等. ISSR 分子标记技术及其在茶树研究中的应用[J]. 广东农业科学, 2014(9): 139-142, 146.
- [6] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子, 2010(2): 55-59.
- [7] 白玉. DNA 分子标记技术及应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7422-7424.
- [8] Suh J K, Hettterscheid W, Lee A K, et al. Identification and evaluation of *Forsythia* germplasm using molecular markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2011, 58: 1225-1235.
- [9] 李汉伟. 不同花柱类型连翘的 RAPD 分析[J/OL]. [2019-03-03]. [http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CPFD&dbname=CPFD0914&filename=ZGZO201108001182&-uid=WEEvREdxOWJmbC9oM1NjYkZCbDdrdXQxTU1VaE1rSjdIL3QwTmhnUmVaTVc=\\$R1yZ0H6jyaa0en3RxVUd8df-oHi7XMMDo7mtKT6mSmEvTuk11l2gFA!!&-v=MjIyMzVobmo5OFRuanFxeGRFZU1PVUtyaWZadTl2RUN2c1U3ak1JRm9jUHlyUlliRzRIOURNcDQ5Rlplb0hEaE5LdWhk](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CPFD&dbname=CPFD0914&filename=ZGZO201108001182&-uid=WEEvREdxOWJmbC9oM1NjYkZCbDdrdXQxTU1VaE1rSjdIL3QwTmhnUmVaTVc=$R1yZ0H6jyaa0en3RxVUd8df-oHi7XMMDo7mtKT6mSmEvTuk11l2gFA!!&-v=MjIyMzVobmo5OFRuanFxeGRFZU1PVUtyaWZadTl2RUN2c1U3ak1JRm9jUHlyUlliRzRIOURNcDQ5Rlplb0hEaE5LdWhk).
- [10] 吴婷, 魏珊, 米丽华, 等. 不同产地连翘的 DNA 指纹图谱构建与聚类分析[J]. 中草药, 2016(5): 816-820.
- [11] 吴婷. 山西连翘药材道地性和品质评价研究[D]. 太原: 山西中医学院, 2015.
- [12] 冯帅. 基于化学——生物指纹图谱技术的连翘药材质量评价与品质相关研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [13] Fu Z Z, Lei Y K, Peng D D, et al. Population genetics of the widespread shrub *Forsythia suspensa* (Oleaceae) in warm-temperate China using microsatellite loci: implication for conservation[J]. Plant Systematics and Evolution, 2016, 302: 1-9.
- [14] 孟令芝. 基于高通量测序技术的连翘转录组分析及 SSR 分子标记的开发[D]. 太古: 山西农业大学, 2014.
- [15] 王兴春, 谭河林, 陈钊, 等. 基于 RNA-Seq 技术的连翘转录组组装与分析及 SSR 分子标记的开发[J]. 中国科学: 生命科学, 2015(3): 301-310.
- [16] 汤正辉, 祝亚军, 谭运德, 等. 连翘 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013(10): 53-56, 60.
- [17] 汤正辉, 祝亚军, 谭晓风, 等. 河南连翘种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2013(8): 32-37.
- [18] 王琳. 基于 ISSR 的连翘遗传多样性研究[D]. 太古: 山西农业大学, 2015.
- [19] Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia* × *intermedia*[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 303-311.
- [20] 刘伟, 孙海峰, 郭小青, 等. RACE 法在连翘花蕾全长 cDNA 文库构建中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2009(10): 902-905.
- [21] 崔占虎, 蒋超, 李旻辉, 等. 连翘败毒丸中原料药材的分子鉴别[J]. 药学报, 2013(4): 590-596.
- [22] 袁王俊, 许守明, 张维瑞. 连翘原植物的分子鉴定[J]. 中药材, 2009(10): 1524-1526.
- [23] 原江锋, 邱智军, 刘建利, 等. 连翘叶绿素制备及活性成分分析[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2015(2): 78-82.
- [24] 李飞鹤. 连翘叶的减肥作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [25] 秦臻. 利用连翘叶制备天然防腐剂的初步研究[D]. 太原: 山西大学, 2013.

Application of Molecular Marking Technology in the Research of *Forsythia suspensa*

XIA Wei, TAN Zheng-wei, YU Yong-liang, XU Lan-jie, YANG Hong-qi, DONG Wei, LIANG Hui-zhen

(Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to promote the comprehensive utilization and development of *Forsythia suspensa* resources, this paper based on the literature review to summarize the application of molecular marker technology in *Forsythia suspensa*, found that the application of molecular marker technology in *Forsythia suspensa* mainly divided into the following aspects: such as the development of molecular markers, primers germplasm differences, genetic diversity analysis, species identification and identification of Chinese herbal medicine. This paper provided an overview of the RAPD SSR, ISSR, application of three kinds of molecular markers in *F. suspensa*.

Keywords: *Forsythia suspensa*; molecular marker; genetic diversity; germplasm identification