

采用分子标记和次级代谢产物研究利川大黄的道地性

吴琳绯¹, 居楚翔¹, 陈久明², 李立忠¹, 刘虹¹, 覃永华^{1*}

(1 中南民族大学 a. 生命科学学院; b. 国家民委生物技术重点实验室; c. 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074; 2 利川市南坪乡农业农村服务中心, 湖北 恩施 445400)

摘要 利川大黄面临野生资源枯竭、品种退化、遗传背景不清等问题, 严重制约了利川大黄产业的可持续发展和品牌价值。利用ISSR和RAPD两种分子标记组合, 结合标志性次级代谢产物来评估利川大黄的道地性。筛选了12个ISSR和8个RAPD分子标记引物, 将ISSR和RAPD引物两两组合, 得到5对引物组合可直接区分利川大黄与其他产地大黄。基于聚类分析利川大黄与其他地区大黄被分为不同组, 且利川大黄被分为两大类, 表明大黄种质资源遗传多样性与地理分布存在相关性, 受到气候环境的显著影响。HPLC结果显示利川大黄的大黄素、大黄酚和大黄素甲醚这三种蒽醌类衍生物含量均高于其他产地。研究通过分子标记对利川和其他地区大黄进行了遗传多样性分析, 初步揭示了利川大黄以及其他地区大黄的亲缘关系, 为利川大黄这一地标性产品的鉴定和辨别提供了有效手段, 为利川大黄资源的道地性研究提供了理论依据和技术支持。

关键词 大黄; 分子标记; 遗传多样性; 道地性

中图分类号 Q756 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2025)06-0802-08

doi: 10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250702

The authenticity research of Rhubarb Lichuan based on molecular markers and secondary metabolites

WU Linfei¹, JU Chuxiang¹, CHEN Jiuming², LI Lizhong^{1a}, LIU Hong¹, QIN Yonghua^{1*}

(1 South-Central Minzu University, a. College of Life Sciences; b. Key Laboratory for Biotechnology of National Ethnic Affairs Commission; c. Hubei Province Key Laboratory for the Plant Germplasm Conservation and Utilization of Wuling Mountainous Area, Wuhan 430074, China; 2 Nanping Township Agricultural Rural Service Center, Lichuan City, Enshi 445400, Hubei China)

Abstract Lichuan Rhubarb faces the problems of wild resource depletion, variety degradation and unclear genetic background, which seriously restricts the sustainable development and brand value of Lichuan Rhubarb industry. ISSR and RAPD molecular markers were used to evaluate the authenticity of Rhubarb Lichuan in combination with the signature secondary metabolites. Twelve ISSR and eight RAPD primers were screened, and the combination of ISSR and RAPD primers showed that five primers could be used to distinguish Rhubarb Lichuan from Rhubarb from other regions. Rhubarb in Lichuan and other regions were divided into different groups based on cluster analysis, and Rhubarb in Lichuan was divided into two categories, indicating that the genetic diversity of Rhubarb germplasm resources was correlated with the geographical distribution, and was significantly affected by climate environment. HPLC results showed that the contents of emodin, chrysophanol and emodin methyl ether were higher in Lichuan Rhubarb than in other areas. In this study, genetic diversity of Rhubarb from Lichuan and other areas was analyzed by molecular markers, and the kinship relationship

收稿日期 2024-09-12

* 通信作者 覃永华(1979-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 植物分子生物学, E-mail: qinyonghua@mail.scuec.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY23002, CZZ25006); 中南民族大学校级科研重点机构平台资助项目(PTZ24021, PTZ25018)

between Rhubarb from Lichuan and other areas was preliminarily revealed, which provided an effective means for the identification and identification of Rhubarb from Lichuan as a landmark product, and provided theoretical basis and technical support for the research on the authenticity of Rhubarb resources in Lichuan.

Keywords *Rheum officinale*; molecular marker; genetic diversity; authenticity

大黄隶属蓼科(Polygonaceae)大黄属(*Rheum*),为多年生草本植物.全世界约60种,我国有39种,2变种,约占全部种数的2/3,主要分布于我国西北、西南及华北地区^[1].利川大黄是湖北恩施土家族苗族自治州利川市的特色产品,又称马蹄大黄、药用大黄.利川大黄的功效主要表现在破瘀活血,攻下泻热,抗菌消炎,保肝利尿,调解免疫,延缓衰老等.作为市场紧缺的名贵中药材,由于得不到有效保护,遭遇过度采挖的困境,大黄天然资源已近于枯竭^[2].同时,由于人工的大规模种植和长期的遗传变异,导致大黄的种性退化严重、遗传背景不清晰.开展遗传多样性鉴定对于筛选优质利川大黄品种、保护利川大黄地标产品的品牌价值具有重要的实际生产意义.

遗传多样性在种群水平上不仅包括遗传变异的大小,还包括遗传变异分布格局,即种群的遗传结构^[3-5].目前,分子标记技术已成为植物遗传多样性研究和种质资源鉴定的重要技术.一方面,分子标记技术因数量丰富、遗传稳定、多态性高、多为共

显性等优点被广泛应用于植物遗传多样性的分析研究^[6-8],另一方面高效液相色谱仪分析速度快、重复性好、分辨率高、灵敏度高,被广泛应用在药用植物的次级代谢产物定量检测中^[9-11].本研究通过ISSR及RAPD两种分子标记手段对利川大黄资源及全国7个不同地区的大黄进行遗传多样性分析,为利川大黄这一地标性产品的鉴定和溯源提供了的依据,并通过高效液相色谱技术对利川、四川、甘肃、云南四个地区大黄饮片中的五种蒽醌含量进行了检测,研究对利川大黄质量评价及地标产品的品牌保护具有重要意义.

1 实验部分

1.1 实验材料

1-22(利川大黄种质资源圃)、24-29均为马蹄大黄(*Rheum officinale*),23为牛舌大黄(*Rumex dentatus* L.)(表1),取叶片提取DNA.

表1 大黄采集地分布表

Tab. 1 Distribution of Rhubarb Collection Sites

编号	采集地	海拔/m	经度(N)	纬度(E)
1	恩施市建始县龙坪乡龙平五组	1550.2	110.0947	30.4825
2	恩施市巴东县大支坪乡西堡村农场组	1473.1	110.0275	30.8043
3	恩施市建始县官店乡毛家槽村二组毛家槽	1754.7	109.9693	30.1704
4	恩施市巴东县野三关镇石牛垭村十一组桥湾	1324.1	110.3370	30.6328
5	恩施市巴东县野三关镇石牛垭村十组桥湾	1406.2	110.3420	30.6308
6	恩施市巴东县野三关镇清吉坪村三组	1348.8	110.3978	30.5370
7	恩施市巴东县野三关镇石牛垭村四组马口湾	1328.7	110.3567	30.5503
8	重庆市奉节县云雾乡红椿村二组(恩施重庆交界)	1367.5	108.1615	30.7545
9	重庆市奉节县云雾乡红椿村五组(恩施重庆交界)	1664.6	109.1305	30.5972
10	重庆市奉节县云雾乡马头村二组(恩施重庆交界)	1379.3	109.1498	30.6134
11	重庆市奉节县云雾乡红椿村三组(恩施重庆交界)	1486.2	109.1336	30.6024
12	恩施市利川市柏杨坝水井村四组	923.9	109.0346	30.5740
13	恩施市利川市柏杨坝水井村楼门子	1465.2	109.0350	30.5739
14	恩施市利川市凉雾乡小青垭村新龙坪	1332.7	108.8943	30.3612
15	恩施市利川市凉雾乡小青垭村白果槽	1445.4	108.8303	30.2675
16	恩施市利川市柏杨乡水井村十三组彭家坡	1847.2	109.0282	30.0533
17	恩施市利川市谋道乡富强村	1451.6	108.6363	30.4523
18	恩施市利川市谋道乡富强村羊圈榜	1456.2	108.6850	30.4360
19	重庆市石柱县冷水乡福镇(恩施重庆交界)	580.1	108.5509	30.1297
20	恩施市利川市凉雾乡东罗村十一组凉水井	1398.4	109.6221	30.3192
21	恩施市利川市谋道镇得生塘三组齐岳山	1349.0	108.6634	30.3336
22	恩施市板桥乡新田村响水洞	1695.4	109.2845	30.5853
23	宁夏省固原市	1836.6	105.7198	35.9678

续表

编号	采集地	海拔/m	经度(N)	纬度(E)
24	陕西省榆林市上塔湾	1746.0	109.1180	37.7736
25	甘肃省陇南市礼县	1828.4	105.0650	34.0809
26	河南省平顶山市汝州市玉皇村	647.7	112.9228	34.1995
27	河北省保定市唐县齐家佐乡杨家庵村	601.0	114.8383	38.9625
28	湖北省湖北省十堰市张湾区方滩乡转头沟村	574.0	110.6477	32.7255
29	江西省赣州市会昌县白沙村	205.5	115.6599	25.6782

四川、甘肃、云南和利川(中药材市场)大黄根部干燥切片,用于次级代谢产物检测。

DNA提取试剂:CTAB、Tris·HCl、EDTA、异丙醇、异戊醇、氯仿、乙醇和NaCl等均购自国药集团。

引物筛选试剂:10×PCR buffer、r-Taq酶、dNTP(宝生物)、琼脂糖凝胶、TAE(国药集团)、100个ISSR引物、50个RAPD引物(北京擎科)。

高效液相色谱相关试剂:对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚(中国食品药品检定研究院),纯度均大于等于98%。甲醇、磷酸均为色谱纯(国药集团),其余试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 大黄DNA的提取

CTAB法参考吴翼等^[12]方法。

1.2.2 DNA浓度检测

紫外分光光度计检测:取1μL上述提取的DNA样品,用紫外分光光度计测定DNA浓度以及OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀,判断DNA的纯度。

1%琼脂糖凝胶电泳检测:取2μL DNA样品,与2μL的Loading buffer混匀后在1%的琼脂糖凝胶上电泳,并在凝胶成像系统下观察拍照。

1.2.3 分子标记引物的筛选

(1)ISSR引物扩增体系及程序

扩增体系:10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTPs 1.0 μL, ISSR引物0.6 μL, r-Taq酶0.1 μL, 模板DNA 0.5 μL, 补ddH₂O至20 μL。

扩增程序:94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 52℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 39个循环, 72℃延伸10 min; 4℃保存。

(2)RAPD分子标记扩增体系及程序

扩增体系:10×PCR Buffer 2.0 μL, dNTPs 1.6 μL, RAPD引物0.2 μL, r-Taq酶0.2 μL, 模板DNA 1.0 μL, 补ddH₂O至20 μL。

扩增程序:94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 36℃退火1 min, 72℃延伸1 min 20 s, 40个循环, 72℃延伸10 min; 4℃保存。

每个PCR反应重复两次,使用3%琼脂糖凝胶

电泳检测PCR产物并在凝胶成像系统下观察拍照。

1.2.4 次级代谢物含量测定

(1)色谱条件

色谱柱:Waters XBridge C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)—0.1%磷酸溶液(B),等度洗脱(0~20 min, 90% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样体积:10 μL。

(2)混合对照品溶液

精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量,加甲醇分别制成每1 mL含芦荟大黄素87.4 μg、大黄酸83.3 μg、大黄素80.7 μg、大黄酚81.8 μg、大黄素甲醚43.4 μg的对照品母液;分别精密量取上述对照品母液各2 mL,混匀,即得每1 mL中含芦荟大黄素17.5 μg、大黄酸16.7 μg、大黄素16.1 μg、大黄酚16.4 μg、大黄素甲醚8.7 μg的混合对照品储备液^[13]。

(3)游离蒽醌供试品溶液

取待测样品粉末(过四号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇25 mL,称定重量,加热回流1 h,冷却至室温,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取滤液作为供试品溶液。

(4)总蒽醌供试品溶液

提取方法参考张楠楠等^[13]方法。

1.2.5 数据处理

两种分子标记的PCR扩增结果通过3%的凝胶进行电泳分离,选择重复性好,清晰的条带进行统计,扩增条带有记为“1”,扩增无条带记为“0”,分别建立两种分子标记的“0/1”矩阵图。导入POPGENE.32软件计算遗传距离和遗传相似系数,并分析各样品间的亲缘关系,使用MAGE.7进行聚类分析,最后使用iTOL美化聚类树。

2 结果与分析

2.1 ISSR分子标记的结果

在ISSR分子标记中,共筛选出了12条可以扩增出清楚条带的引物(表2),多态性百分率为100%。

表2 ISSR引物序列
Tab.2 ISSR primer sequences

引物	序列(5'→3')
807	AGAGAGAGAGAGAGT
814	CTCTCTCTCTCTCTA
815	CTCTCTCTCTCTCTG
824	TCTCTCTCTCTCTCG
827	ACACACACACACACG
841	GAGAGAGAGAGAGAYC
849	GTGTGTGTGTGTGTYA
854	TCTCTCTCTCTCTCRG
857	ACACACACACACACYG
864	ATGATGATGATGATG
873	GACAGACAGACAGACA
880	GGAGAGGAGAGGAGA

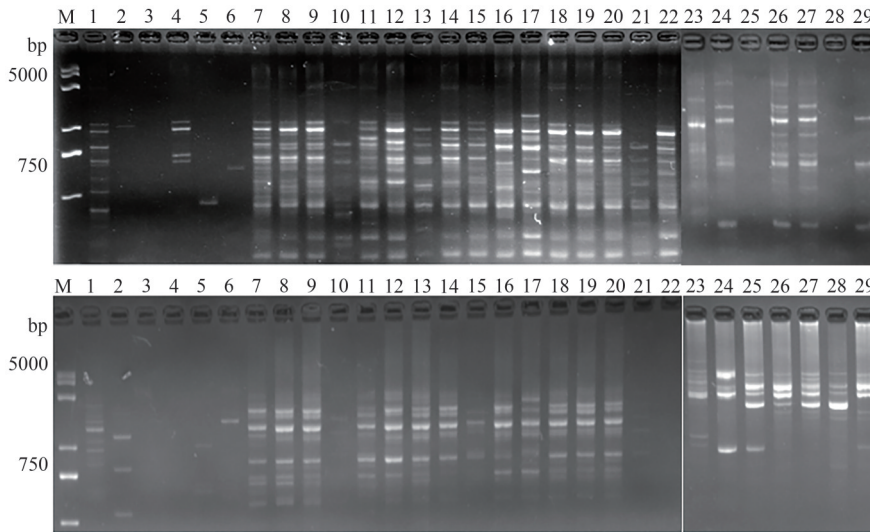
扩增出的 DNA 条带的分子大小在 250~5000 bp 左右(图 1).

2.2 RAPD 分子标记结果

在 RAPD 分子标记中共筛选出了 8 个可扩增出清楚条带的引物,多态性百分率为 98.56%. 扩增出的条带的分子大小在 250~5000 bp 左右(图 2).

2.3 两种分子标记的优化组合

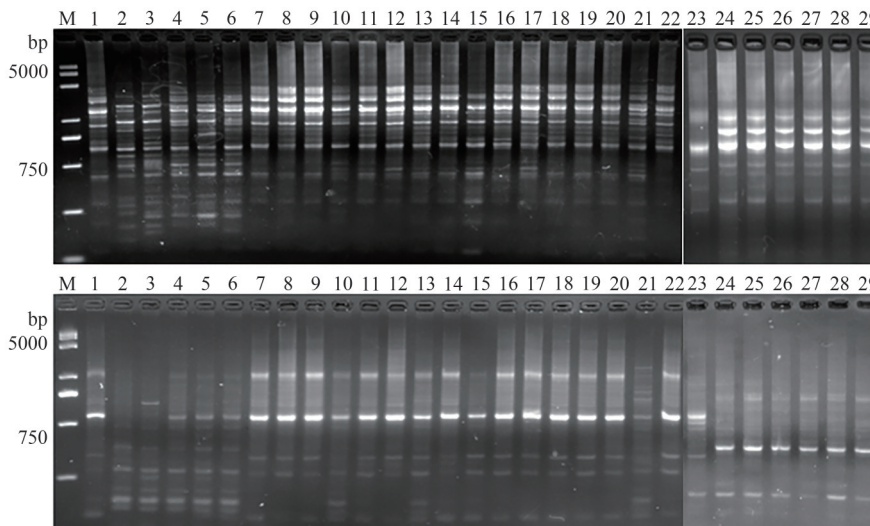
将可扩增条带的 ISSR 引物与 RAPD 引物两两组合,得到 96 对不同组合,其中 ISSR 814+RAPD S436、ISSR 815+RAPD S436、ISSR 824+RAPD S436、ISSR 815+RAPD S439、ISSR 849+RAPD S436 均可通过聚类将利川大黄和其他产地大黄区分开来,两种分子标记的结合实现了利川大黄样品的有效鉴别(图 3).



M:DL5000;1-22:恩施利川大黄样品;23-29:其他产地大黄.

图1 ISSR引物 807 和 827 的琼脂糖凝胶电泳结果

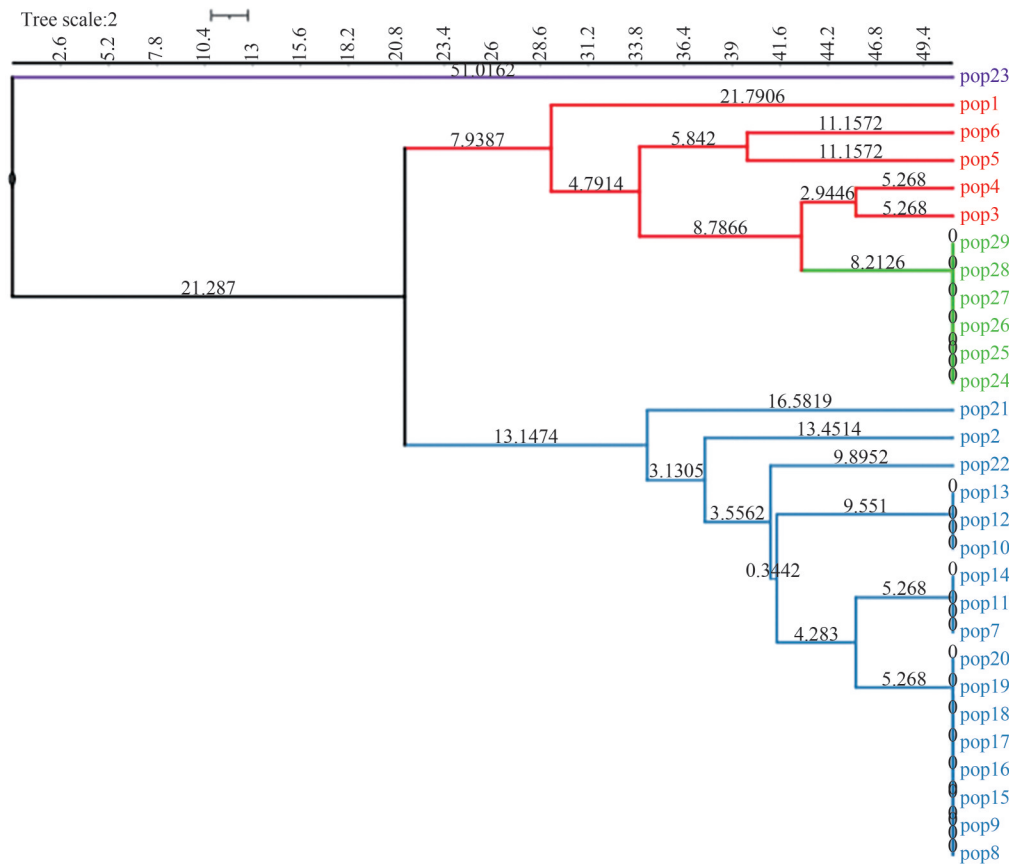
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of ISSR primers 807 and 827



M:DL5000;1-22:恩施利川大黄样品;23-29:其他产地大黄.

图2 RAPD引物 S436 和 S450 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results of RAPD primers S436 and S450



1-22:利川大黄样品;23-29:其他产地大黄.

图3 ISSR 815+RAPD S436 分子标记聚类结果

Fig. 3 ISSR 815+RAPD S436 molecular marker clustering results

2.4 两种分子标记的相似系数和遗传距离分析

综合利用筛选出来的 12 条 ISSR 和 8 条 RAPD 分子标记引物,对其扩增条带进行统计并制作“0”、

“1”矩阵,利用 POPGENE.32 软件计算各品种间的遗传相似系数和遗传距离(表 3). 大黄各品种间的遗传相似系数在 0.4059~0.9604 之间,其中样本 18 和 19、

表 3 基于 ISSR 和 RAPD 分子标记的 29 份大黄品种间的相似系数和遗传距离

Tab. 3 The genetic identity coefficient and genetic distance of 29 rhabarb varieties based on ISSR

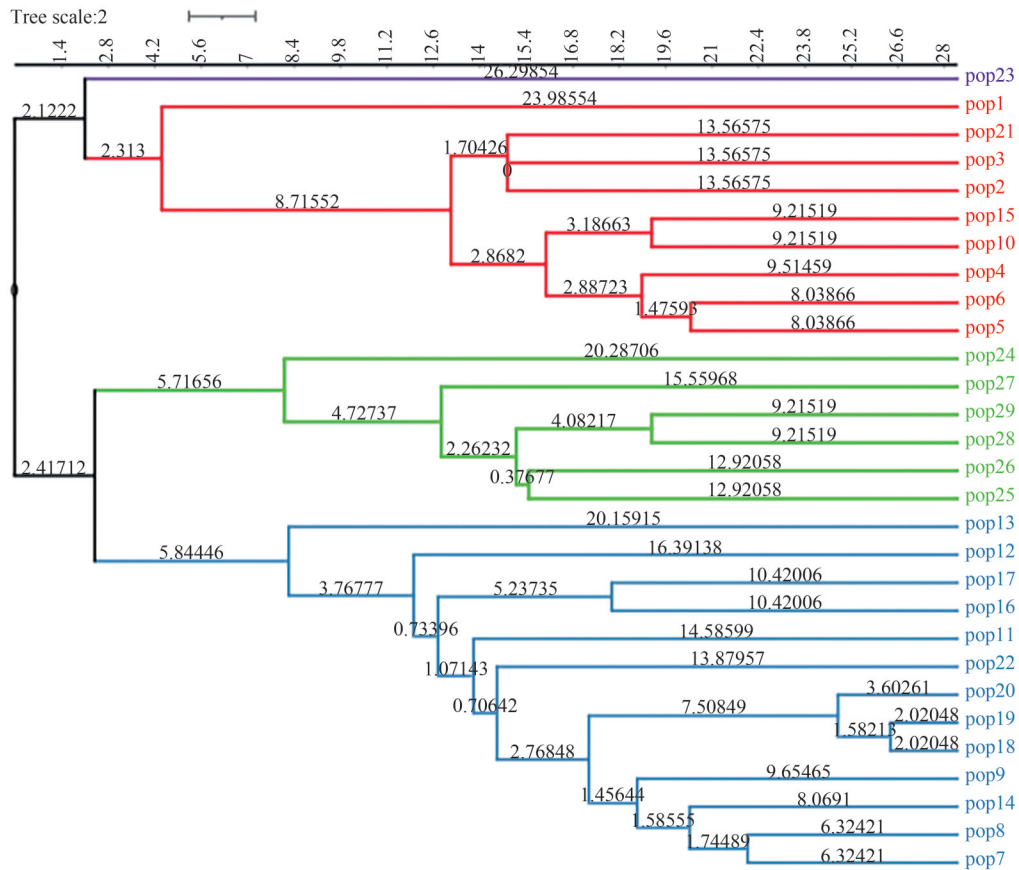
popID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29			
1	****	0.6634	0.5644	0.6733	0.6406	0.6337	0.5248	0.5050	0.4950	0.6040	0.4950	0.4851	0.5743	0.5248	0.5941	0.5050	0.5347	0.4851	0.4851	0.5149	0.5842	0.5743	0.5248	0.4851	0.5347	0.5248	0.4851	0.5248	0.4653	0.4851	0.5347	
2	0.4104	****	0.7624	0.7723	0.7822	0.7129	0.5842	0.5644	0.5743	0.7822	0.6838	0.5050	0.6535	0.6406	0.7027	0.5446	0.5545	0.5248	0.5248	0.5347	0.7624	0.5941	0.5842	0.5644	0.5941	0.5446	0.5050	0.6040	0.5941	0.5941	0.5941	
3	0.5721	0.2713	****	0.7327	0.7822	0.6931	0.5248	0.5050	0.4950	0.7030	0.5941	0.4287	0.5545	0.5050	0.6838	0.4287	0.4782	0.4287	0.4488	0.4884	0.7624	0.5149	0.6436	0.5446	0.5446	0.5446	0.4851	0.5644	0.4851	0.5644	0.5545	
4	0.3896	0.2654	0.3111	****	0.8317	0.8218	0.5743	0.5941	0.5644	0.7723	0.6040	0.4950	0.6436	0.5743	0.7822	0.5545	0.6238	0.5545	0.5743	0.5842	0.7723	0.6238	0.5941	0.5941	0.6832	0.6337	0.5941	0.6733	0.6634	0.6733	0.6634	
5	0.4407	0.2457	0.2457	0.1843	****	0.8515	0.5446	0.5644	0.5347	0.7822	0.6139	0.4653	0.6139	0.5842	0.7822	0.5545	0.5545	0.5545	0.5545	0.5545	0.5347	0.7624	0.6139	0.5842	0.5644	0.6337	0.6436	0.5842	0.6436	0.6733	0.6436	
6	0.4562	0.3355	0.3656	0.1963	0.1608	****	0.6139	0.6337	0.6040	0.8119	0.6634	0.5545	0.6832	0.6139	0.7822	0.5743	0.6040	0.5743	0.5941	0.5842	0.7129	0.6832	0.6139	0.5545	0.6238	0.6535	0.6139	0.7533	0.7030	0.7533	0.7030	
7	0.6445	0.5376	0.6445	0.5547	0.6078	0.4880	****	0.8312	0.8119	0.6832	0.8119	0.7624	0.6931	0.8312	0.6931	0.6832	0.6931	0.8218	0.8218	0.7921	0.5644	0.7723	0.6040	0.5446	0.5347	0.5050	0.5644	0.6238	0.5743	0.5743	0.5743	
8	0.6833	0.5721	0.6833	0.5208	0.5721	0.4562	0.1265	****	0.8713	0.7030	0.7525	0.7426	0.6733	0.8218	0.7129	0.7030	0.6931	0.8218	0.8218	0.8416	0.8119	0.5446	0.7723	0.4851	0.5842	0.5743	0.6238	0.6040	0.6436	0.5941	0.5941	0.5941
9	0.7031	0.5547	0.7031	0.5711	0.6261	0.5042	0.2084	0.1378	****	0.7129	0.8020	0.7723	0.7030	0.7921	0.6634	0.7129	0.7030	0.7030	0.7030	0.7129	0.7723	0.7822	0.6931	0.5149	0.5941	0.5446	0.6139	0.5743	0.6139	0.6040	0.6040	0.6040
10	0.5042	0.2457	0.3524	0.2884	0.2457	0.2084	0.3810	0.3524	0.3385	****	0.8119	0.6436	0.7327	0.7228	0.8317	0.6238	0.6733	0.6040	0.6238	0.6139	0.7822	0.6931	0.5842	0.5842	0.5941	0.6634	0.5842	0.6436	0.6733	0.6733	0.6733	0.6733
11	0.7031	0.4255	0.5208	0.5042	0.4880	0.4040	0.2084	0.2844	0.2207	0.2084	****	0.7327	0.6832	0.8119	0.7030	0.6931	0.7426	0.6931	0.6931	0.6832	0.7525	0.7426	0.6535	0.5941	0.5446	0.6337	0.5743	0.6139	0.6040	0.6040	0.6040	
12	0.7233	0.6833	0.5839	0.7031	0.7650	0.5998	0.2713	0.2976	0.2584	0.4107	0.3111	****	0.6535	0.7228	0.5347	0.6832	0.6931	0.7624	0.7129	0.5248	0.6139	0.6535	0.5644	0.5347	0.5644	0.5347	0.5644	0.5842	0.5842	0.5842	0.5842	
13	0.5547	0.4285	0.5895	0.4407	0.4880	0.3810	0.3666	0.3666	0.3524	0.3111	0.3810	0.4285	****	0.7525	0.6436	0.6139	0.6436	0.6535	0.6535	0.6832	0.5941	0.6238	0.5347	0.5941	0.5842	0.6139	0.5545	0.5941	0.6634	0.6634	0.6634	
14	0.6445	0.4407	0.6833	0.5547	0.5376	0.4880	0.1265	0.1963	0.2331	0.3247	0.2084	0.3247	0.2844	****	0.7327	0.7426	0.7525	0.8020	0.8020	0.8119	0.5644	0.7327	0.4851	0.6040	0.5743	0.5542	0.5644	0.6436	0.6337	0.6337	0.6337	
15	0.5208	0.3111	0.4255	0.2457	0.2844	0.2457	0.3666	0.3385	0.4104	0.1843	0.3524	0.4407	0.3111	****	0.6337	0.6634	0.6139	0.6337	0.6634	0.6931	0.6832	0.5743	0.5347	0.5842	0.5743	0.5743	0.6139	0.6139	0.6139	0.6139	0.6139	
16	0.6833	0.6078	0.5839	0.5998	0.6078	0.5547	0.3810	0.3524	0.3385	0.4720	0.3666	0.3810	0.4880	0.2976	0.4562	****	0.8119	0.8020	0.8020	0.7921	0.5248	0.4257	0.6238	0.5743	0.6238	0.6238	0.6238	0.6238	0.6238	0.6238	0.6238	
17	0.6261	0.5898	0.7439	0.4720	0.5898	0.5042	0.3666	0.3666	0.3524	0.3956	0.2976	0.3666	0.4407	0.2844	0.4104	0.2084	****	0.7723	0.7525	0.7228	0.5545	0.7030	0.4950	0.6139	0.6238	0.6535	0.6139	0.5743	0.5842	0.5842	0.5842	
18	0.7233	0.6445	0.5839	0.5898	0.6833	0.5547	0.1963	0.1963	0.2884	0.5042	0.3666	0.2713	0.4255	0.2207	0.4880	0.2207	0.2884	****	0.9604	0.9109	0.5050	0.7723	0.4039	0.5842	0.5941	0.5842	0.5842	0.6436	0.5743	0.5743	0.5743	
19	0.7233	0.6445	0.5085	0.5547	0.6445	0.5208	0.1963	0.1725	0.2844	0.4720	0.3666	0.2976	0.4255	0.2207	0.4562	0.2207	0.2844	0.0404	****	0.9805	0.5050	0.7921	0.4039	0.6040	0.6139	0.6238	0.6040	0.6337	0.6040	0.6337	0.6337	
20	0.6639	0.6161	0.7865	0.5376	0.6261	0.5376	0.2331	0.2084	0.2713	0.4880	0.3810	0.3385	0.3810	0.2084	0.4104	0.2331	0.3247	0.0933	0.0933	****	0.5149	0.7624	0.4386	0.5941	0.6040	0.6139	0.6139	0.6139	0.6139	0.6139	0.6139	
21	0.5376	0.2713	0.2713	0.2884	0.2713	0.3385	0.5721	0.6078	0.5208	0.2457	0.3956	0.4448	0.5208	0.5721	0.4666	0.6448	0.5898	0.6833	0.6833	0.6639	****	0.6139	0.6238	0.5842	0.5743	0.5644	0.5248	0.5644	0.5941	0.5941	0.5941	
22	0.5547	0.5208	0.6639	0.4720	0.4880	0.3810	0.2584	0.2584	0.3524	0.3666	0.2976	0.4880	0.4720	0.3111	0.3810	0.3385	0.3524	0.2331	0.2713	0.4880	****	0.5149	0.5941	0.5644	0.5941	0.5941	0.5941	0.5941	0.5941	0.5941	0.5941	
23	0.6445	0.5376	0.4407	0.5208	0.5376	0.4880	0.6833	0.7233	0.6639	0.5376	0.5898	0.7650	0.6261	0.7233	0.5547	0.5839	0.7031	0.9015	0.9015	0.8309	0.4720	0.6639	****	0.4059	0.4356	0.4653	0.4257	0.4653	0.4356	0.4356	0.4356	
24	0.7233	0.5721	0.6078	0.5208	0.5721	0.5898	0.6078	0.5376	0.5208	0.5376	0.5208	0.5721	0.5208	0.5042	0.6261	0.4720	0.5208	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	
25	0.6261	0.5208	0.5898	0.3810	0.4255	0.4720	0.6261	0.5547	0.6078	0.5208	0.6078	0.6261	0.5376	0.5547	0.5376	0.5547	0.4720	0.5208	0.4880	0.5042	0.5547	0.5721	0.8309	0.3385	****	0.7723	0.7327	0.8119	0.7238	0.7238	0.7238	
26	0.6445	0.6078	0.6078	0.4562	0.4407	0.4255	0.6833	0.4720	0.4880	0.4104	0.4562	0.5721	0.4880	0.5376	0.5547	0.4720	0.4255	0.5376	0.4720	0.4880	0.5721	0.5208	0.7650	0.3810	0.2884	****	0.7426	0.7426	0.7426	0.7426		
27	0.7650	0.6833	0.7233	0.5208	0.5376	0.4880	0.5721	0.5042	0.5547	0.5376	0.5547	0.5376	0.5898	0.5721	0.5547	0.4720	0.4880	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	0.5042	
28	0.7233	0.5042	0.5721	0.3956	0.4104	0.3956	0.4720	0.4407	0.4880	0.4407	0.4880	0.5376	0.5208	0.4407	0.4880	0.5376	0.5547	0.4407	0.3810	0.4255	0.5721	0.5208	0.7650	0.3810	0.2084	0.2976	****	0.8317	0.8317	0.8317	0.8317	
29	0.6261	0.5208	0.5898	0.4104	0.3956	0.3524	0.5547	0.5208	0.5042	0.3956	0.5042	0.4562	0.4104	0.4562	0.4720	0.5547	0.5376	0.5547	0.4880	0.4720	0.5208	0.5042	0.8309	0.4562	0.3247	0.2331	0.3385	0.1843	****	****	****	

注:遗传距离(左下角),遗传相似系数(右上角).

样本 19 和 20 的遗传相似系数最大,说明它们两者之间的亲缘关系最近,结合采样地图可知,18、19 和 20 号样本地理位置较近,加大了种群间基因交流的机率,造成了种群间基因的相似性。

导入 POPGENE.32 软件后,进行聚类分析(图 4)。

在相对距离为 4.2 处,29 份大黄样品被分为 4 大类。结果表明 ISSR 和 RAPD 分子标记的结合应用能够准确实现正品利川大黄基原产地的鉴别,也表明不同产地大黄在亲缘关系上表现出了显著的地域性,与大黄道地性具有一定相关性。



1-22: 利川大黄样品;23-29: 其他产地大黄。

图 4 两种分子标记聚类结果

Fig. 4 Cluster results of two molecular markers

2.5 次级代谢物的测定

2.5.1 线性关系考察

吸取 0.5、2、8、12、16 μL 上述对照品母液,注入液相色谱仪,绘制标准曲线,得 5 种次级代谢产物的线性回归方程。结果表明,5 种次级代谢产物线性关系良好(表 4)。

表 4 五种蒽醌的标准曲线

Tab. 4 Standard curves of five anthraquinones

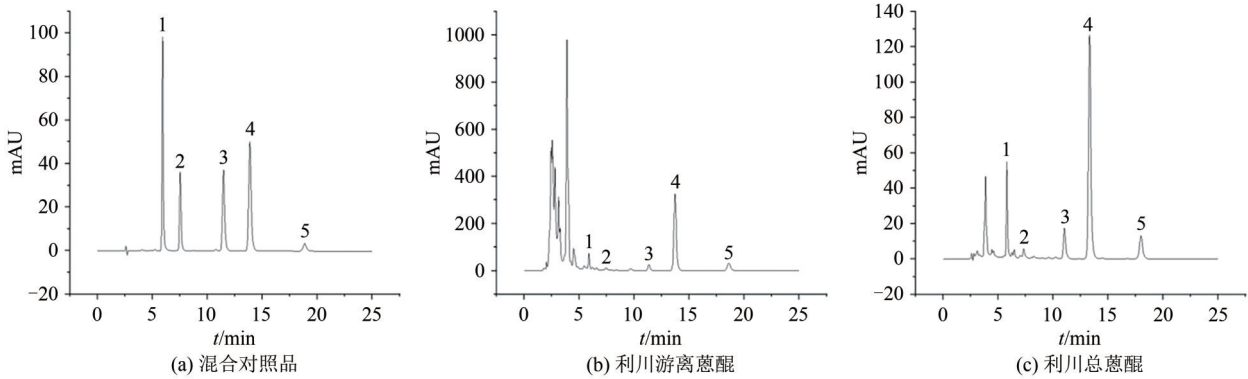
分析物	回归方程	R^2	线性范围/ ng
芦荟大黄素	$y=4504.9x-2.1384$	1	87.4~1398.4
大黄酸	$y=2989.1x-4.8369$	1	83.3~1332.8
大黄素	$y=3291.7x-6.1671$	1	80.7~1291.2
大黄酚	$y=4611.3x-4.2737$	1	81.8~1308.8
大黄素甲醚	$y=643.08x-3.7546$	0.9998	43.4~694.4

2.5.2 样品含量测定

取利川、甘肃、四川和云南四个不同产地大黄

样本进行高效液相色谱分析(图 5);通过峰面积计算游离蒽醌和总蒽醌含量后,再计算结合蒽醌含量(结合蒽醌=总蒽醌-游离蒽醌)。四个不同产地大黄总游离蒽醌含量分别为 12.69、10.06、8.66、1.38 mg/g ,总结合蒽醌含量分别为 23.16、4.78、25.53、15.06 mg/g ,总蒽醌分别为 38.85、14.84、34.19、15.58 mg/g ,利川大黄所产蒽醌类衍生物总量高于其他产地大黄。《中国药典》2020 年版以游离蒽醌含量总量计不得低于 0.35% 来评价大黄饮片质量。本研究利川、甘肃和四川大黄样品均达到《中国药典》要求。

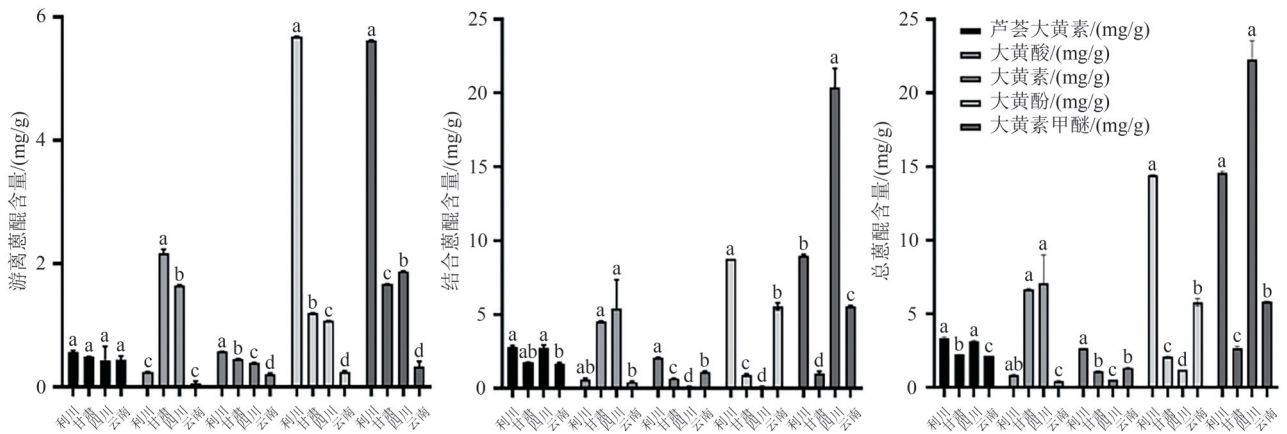
由图 6 知,游离蒽醌中产自利川大黄所含 5 种次级代谢产物均高于其他产地大黄,其中大黄酚、大黄素甲醚显著高于其他样品;结合蒽醌中,利川大黄所含芦荟大黄素、大黄素、大黄酚均高于其他产地大黄,其中大黄酚显著高于其他样品;总蒽醌同上所述。综



1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚.

图5 混合对照品及利川大黄样品 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of mixed reference and Lichuan Rhubarb sample



图中不同小写字母表示处理间存在显著差异 ($P < 0.05$).

图6 各样品中蒽醌含量比较

Fig. 6 Comparison of anthraquinone content in each sample

合来看,利川大黄除所含大黄酸低于其他产地外,其他四种次级代谢产物含量均高于其他产地。

3 讨论

(1)本研究从 100 个 ISSR 引物和 50 个 RAPD 引物中筛选出了 12 个 ISSR 引物和 8 个 RAPD 引物,所筛选出 20 个引物可以应用于大黄的遗传多样性分析^[14],同时利用两种分子标记 5 对单一组合,不仅可以将利川大黄同其他地区大黄区分开,也可将利川大黄种质资源划分的更为准确。

(2)结合采集地和综合聚类结果来看,地理位置相近的样品被聚为一类,它们之间的遗传多样性小、遗传距离近,因此,从居群水平上来说,被聚类为一组的物种在居群间遗传分化均较高,在居群内遗传分化均较低^[15]。本研究中利川大黄与其他地区大黄被分为不同组,在基因水平上此两类大黄资源的遗传多样性更高、亲缘关系更远,证明了利川大

黄独特的道地性。此外,所有的恩施利川大黄被分为两大类,可能是由于这两类样本分属不同乡,所以亲缘关系较远,说明地理分布和生存环境对大黄遗传变异的影响不容忽视。

(3)利川大黄作为知名道地药材,从次级代谢物含量检测结果来看,大黄酚及大黄素甲醚明显高于其他产地大黄;综合采样地图及分子标记结果,利川大黄在遗传多样性和次级代谢产物含量方面均有其独特的道地性,这可能是由于恩施利川特殊的地理环境和气候所造成。分子标记和高效液相色谱技术联用,证明利川大黄独特的遗传背景决定了其优良的药用价值,同时为探究利川大黄产醌类衍生物相关基因提供了参考。

参 考 文 献

[1] 李安仁. 中国植物志, 第 25 卷, 第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 166.
 [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-二部: 2020 年

- 版[M].北京:中国医药科技出版社,2020:24-25.
- [3] LOVELESS M D, HAMRICK J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1984, 15: 65-95.
- [4] 文亚峰,韩文军,吴顺.植物遗传多样性及其影响因素[J].*中南林业科技大学学报*,2010,30(12):80-87.
- [5] 孙林,耿其芳.珍稀濒危植物遗传多样性研究方法及其影响因素[J].*安徽农业科学*,2014,42(13):3793-3798.
- [6] 李超,罗淑萍,曾斌,等.新疆核桃种质资源遗传多样性的ISSR分析[J].*中国农业科学*,2011,44(9):1871-1879.
- [7] 孙坤,王瑞雪,陈纹,等.山西五台山不同海拔中国沙棘居群的遗传变异[J].*西北师范大学学报(自然科学版)*,2013,49(2):75-79.
- [8] 赵青松,陈振伦,赵云云,等.广东5个野生大豆居群的遗传多样性分析[J].*西北植物学报*,2013,33(9):1768-1774.
- [9] 初雷,薛永常.DNA分子标记及其在啤酒大麦种质鉴定中的应用[J].*中国酿造*,2011,30(2):1-4.
- [10] 张园秀,徐榕青,林文津.DNA分子标记技术在枇杷种质鉴定中的应用[J].*海峡药学*,2013,25(10):27-29.
- [11] 李娟,彭洪兵,向玉林,等.利用指纹图谱和网络药理学预测牵牛子抗炎Q-marker[J].*中南民族大学学报(自然科学版)*,2024,43(1):45-52.
- [12] 吴翼,武耀廷,马子龙.椰子基因组DNA的提取及SSR反应体系的优化[J].*中国农学通报*,2008,24(3):417-422.
- [13] 张楠楠,汪海斌,吕光达.HPLC法比较5种产地掌叶大黄蒽醌类成分含量[J].*广州化工*,2020,48(19):96-100.
- [14] LAST L, WIDMER F, FJELLSTAD W, et al. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe[J]. *BMC Genetics*, 2013, 14: 102.
- [15] 杨春芳,刘力宽,曾阳,等.基于分子标记技术的大黄属植物研究应用进展[J].*时珍国医国药*,2016,27(10):2486-2489.

(责编&校对 姚春娜)