

利用SSR标记鉴定当归的真实性

刘新星, 欧巧明, 罗俊杰, 石有太, 李忠旺, 崔文娟

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采集当归及近缘属种材料, 从文献中搜集 SSR 引物, 及从 NCBI 中下载当归 EST 序列并设计若干引物, 采用 SSR 标记技术筛选可用于鉴定当归真实性的特异标记。结果表明, 共合成引物 75 对, 利用 2 个当归模板进行引物筛选, 能够扩增出清晰条带的引物有 21 对, 有效引物扩增率为 28%, 筛选出多态性引物 5 对, 多态引物扩增率为 6.7%。5 对引物在 36 份当归及近缘属种间共检测到 41 个位点, 平均为 8.2 个; 多态性位点 41 个, 多态性比率(PPB)为 100%; 多态信息含量为 0.118 7~0.310 1, 平均为 0.258 8。遗传距离和相似度分析表明, 当归与独活的遗传距离最近, 与红柴胡遗传距离最远。当归与近缘属种间的遗传距离最小值明显大于 4 个产地的当归种内遗传距离最大值, 因此, SSR 标记可有效地鉴定区分当归与其它近缘属药材。

关键词: 当归; SSR; 分子标记; 鉴定; 真实性

中图分类号: R282.12; S567 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)07-0043-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.07.012

当归是伞形科二年生或多年生草本植物^[1-4], 全世界约有 80 个物种, 大部分产

收稿日期: 2020-04-08

基金项目: 甘肃省农业科学院青年基金项目(2019GAAS39); 甘肃省农业科学技术成果转化项目(2019GAAS-CGZH03)。

作者简介: 刘新星(1986—), 女, 甘肃平凉人, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药材种质资源评价研究工作。Email: lxx09860621@163.com。

新疆、宁夏、内蒙古等省区胡麻主产区种植。

5 栽培技术要点

川水地以 3 月下旬至 4 月上旬播种为宜, 山区以 4 月中下旬播种为宜。不覆膜单种采用人工或机械等行距播种, 行距 20 cm, 播深 3~4 cm。播量灌区 75~105 kg/hm²、旱区 60~90 kg/hm²。保苗密度 525 万~630 万株/hm²。覆膜播种采用幅宽 1.4 m (厚 0.08 mm) 的农用白膜或黑膜, 种 9 行, 用单行穴播机播, 穴距 15~16 cm, 播深 3 cm。保苗 525 万~675 万株/hm²。播前结合整地基施有机肥 30~45 t/hm²、磷酸二铵 300~375 kg/hm²、尿素 60~75 kg/hm²。地力较差的田块, 现蕾前结合浇水或降水追施尿素 60~75 kg/hm² 或硝铵 120~150 kg/hm²。枞形期干搂 1 次, 现蕾前中耕 1 次。全生育期浇水 3 次, 分别在枞形期, 现蕾至初花期和青果期。生育期间及时清除田间杂草, 防治蚜虫、苜蓿夜蛾、漏油虫等。成熟后及时收获。

参考文献:

- [1] 党照, 张建平, 王利民, 等. 胡麻新品种陇亚 12 号选育报告. 甘肃农业科技[J]. 2013 (1): 3-3.
- [2] 党占海, 赵玮. 我国胡麻科技五年新进展 [C]//中国作物学会. 油料作物专业委员会第七次会员代表大会暨学术年会综述与摘要集. 2013: 46-50.
- [3] 中华人民共和国农业农村部. 中国农业统计资料(2016)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [4] 党占海, 张建平, 余新成. 温敏型雄性不育亚麻的研究[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 861-864.
- [5] 杜彦斌, 王立军, 张金, 等. 胡麻新品种天亚 11 号选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2018 (2): 24-26.
- [6] 党照, 张建平, 王利民. 胡麻新品种陇亚 14 号选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2018(8): 35-37.

(本文责编: 陈珩)

于北温带和新西兰地区。我国有当归的 26 种 5 变种 1 变型, 主要分布于我国中部、东北部和西南部地区^[1]。2015 版《中华人民共和国药典》收录的当归来源仅为当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 的干燥根, 其余品种与当归在功效上均有较大差异, 严重影响用药安全^[5]。甘肃省栽培的当归为伞形科当归属植物当归干燥根, 被列为上品, 为临床常用中药。《中国植物志》中记载: “当归主产甘肃东南部, 以岷县产量多, 质量好; 其次为云南、四川、陕西、湖北等省, 均有栽培。”^[6]。目前, 当归的分子鉴定主要在 ITS、trnL-F、ISSR 和 RAPD 上有研究^[7-13], SSR 上的研究还未见到。自陈士林^[14]首次提出把 ITS2 作为药用植物鉴定的标准 DNA 条形码以来, ITS2 条形码序列备受关注, 已被广泛用于多种药用植物和药材的鉴定, 表现出较强的鉴定能力。可见, 利用 SSR 分子标记技术同样可获得可用于正品当归鉴定的特异标记。我们以甘肃当归几大主产区的栽培当归和育成当归品种岷归系列及当归同科不同属药材为研究对象, 采用 SSR 分子标记技术进行当归的真实性鉴定, 可为正品当归鉴定及指纹图谱构建提供有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为采自甘肃当归主栽区卓尼县、岷县、渭源县、漳县的 23 种栽培当归, 以及采自渭源县会川镇半阴坡村种质资源圃的当归品种(系)PGIJ2009-0082、岷归 1 号、岷归 3 号、岷归 4 号、岷归 5 号、岷归 6 号; 采自陇西药圃园当归同科不同属药材红柴胡、川穹、柴胡、北沙参、独活、羌活、小防风, 均由甘肃省农业科学院生物技术研究提供(表1)。

1.2 采样方法

选取甘肃当归主栽区卓尼县、岷县、渭源县、漳县的 18 个乡镇 23 个村采集栽培当归。以村为居群单位, 居群间隔 50 km 以上, 每个居群采集 5 个单株(单株间相距 50 m 左右)混样 1 份。同时在渭源县会川镇半阴坡村种质资源圃采集当归品种(系)PGIJ 2009-0082、岷归 1 号、岷归 3 号、岷归 4 号、岷归 5 号、岷归 6 号各 5 个单株(单株间相距 50 m 左右)混样 1 份; 在陇西药圃园采集当归同科不同属药材红柴胡、川穹、柴胡、北沙参、独活、羌活、小防风各 5 个单株(单株间相距 50 m 左右)的混样 1 份。及时摘取

表 1 供试材料的编码及产地来源^①

编号	采样地点	编号	采样地点	编号	采样地点
1	卓尼县喀尔钦乡相俄村	13	岷县茶埠镇大竜村	25	半阴坡村种质资源圃(岷归 4 号)
2	卓尼县柳林镇寺台子村	14	岷县河驮乡石门村	26	半阴坡村种质资源圃(岷归 5 号)
3	卓尼县柳林镇上卓村	15	岷县申都乡青土村	27	半阴坡村种质资源圃(岷归 6 号)
4	卓尼县柳林镇东石沟村	16	岷县申都乡元草村	28	陇西药圃园(红柴胡)
5	卓尼县柳林镇中卓村	17	岷县闫井镇闫井村	29	陇西药圃园(川穹)
6	卓尼县柳林镇草岔沟村	18	岷县锁龙乡寺儿沟村	30	陇西药圃园(柴胡)
7	卓尼县柳林镇下卓村	19	岷县岷阳镇南川村	31	陇西药圃园(北沙参)
8	渭源县田家河乡香卜路村	20	岷县马坞乡旧庄村	32	陇西药圃园(独活)
9	渭源县祁家店乡烟雾沟村	21	渭源县会川镇半阴坡村	33	漳县金钟镇大车厂村
10	岷县西寨镇田家堡村	22	半阴坡村种质资源圃(PGIJ2009-0082)	34	漳县大草滩乡大草滩村
11	岷县石沟乡八步川村	23	半阴坡村种质资源圃(岷归1号)	35	陇西药圃园(羌活)
12	岷县麻子川乡绿叶村	24	半阴坡村种质资源圃(岷归3号)	36	陇西药圃园(小防风)

①1~27 和 33~34 为当归, 28~32 和 35~36 为当归近缘属药材。

混合样品的幼嫩新鲜叶片，置于盛有硅胶颗粒的密封袋内立即干燥。

1.3 样品处理及 DNA 提取

每份样品取约 50 mg，用液氮研磨，采用植物提取基因组试剂盒进行样品 DNA 提取，提取完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行样品质量检测，并用紫外分光光度计测定其浓度和纯度。将 DNA 稀释至 20~50 ng/ μ L，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 SSR 引物设计、扩增和产物检测

根据 NCBI 上公布的 175 条当归 EST 序列，利用 SSR Hunter 软件搜索微卫星，Primer Primer 5.0 软件设计引物 22 对，另搜索得到当归近缘属柴胡的 SSR 引物 53 对，共计合成引物 75 对。其中每条引物根据其理论退火温度(T_m)值 ± 5 $^{\circ}$ C，设置梯度温度，找到最优 T_m 值。PCR 扩增体系总反应体积 15 μ L，包括 2 \times Taq Master Mix 7.5 μ L，DNase-Free Water 4.5 μ L，Forward Primer 1 μ L，Reverse Primer 1 μ L，党参基因组 1 μ L。反应程序：95 $^{\circ}$ C 热启动 3 min，95 $^{\circ}$ C 变性 45 s，48~65 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，34 个循环后，72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min 后结束。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶下检测，采用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物，用银染色法进行多态性检测。

1.5 数据分析

SSR 标记数据采用人工读带的方法，将

电泳图上可重复的、易分辨的条带记为“1”，同一位置无带计为“0”，建立原始数据矩阵。利用 PopGen 32 软件和 NTSYS 软件计算遗传距离，UPGMA 聚类进行鉴定分析。

2 结果与分析

2.1 引物多态性检测

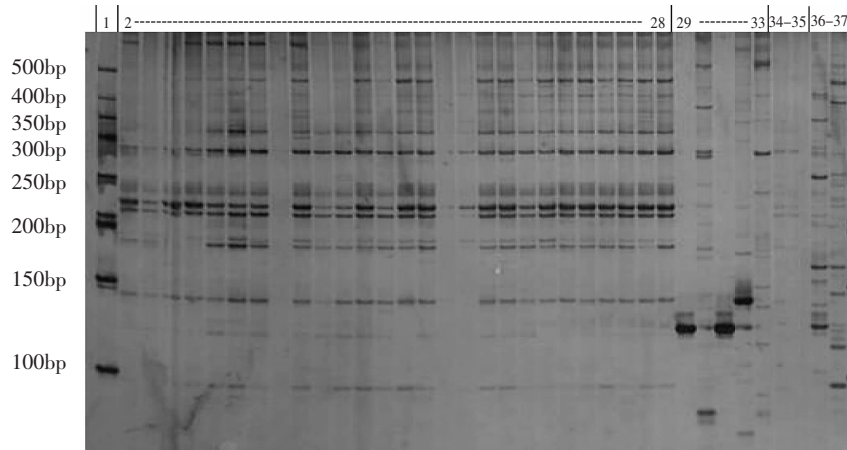
共合成引物 75 对，利用 2 个当归模板进行引物筛选，能够扩增出清晰条带的引物有 21 对，有效引物扩增率为 28%。筛选出多态性引物 5 对，多态引物扩增率为 6.7%。5 对引物在 36 份当归及近缘物种中共检测到 41 个位点，平均为 8.2 个；多态性位点 41 个，多态性比率(PPB)为 100%(表 2)。5 对引物的多态信息含量为 0.118 7~0.310 1，平均为 0.258 8。从图 1 看出，多数当归均在约 145 bp、190 bp、220 bp、230 bp、290 bp、310 bp 处有明显条带，而 7 份近缘物种中只有独活、川芎和北沙参有 1~2 处当归相同位点，其余 4 个近缘物种均没有与当归相同的位点，因此根据引物 CH50 能够构建当归指纹鉴定图谱。

2.2 当归与近缘物种的遗传距离

将 29 份当归按照产地划分为 4 个居群，利用 Popgen 软件计算当归居群之间及与近缘物种之间的遗传距离和遗传相似度。从表 3 可以看出，4 个产地当归之间遗传距离为 0.013 4~0.091 7，遗传相似度为 0.912 3~0.986 7；与 7 个当归近缘物种间遗传距离为

表 2 筛选的 5 对 SSR 引物对供试材料的检测位点数及多态比率

引物编码	引物序列	检测的位点数 /个	多态位点数 /个	多态性比率 /%	多态信息含量
MG14	GTAACAAAGGCCACAAAA GATAGAATAGGTAGAAGGGTT	6.0	6.0	100	0.118 7
CH19	GCGAAGACTGAGTGGCTTGATG AGAAACCATAACCATGCCTGCTA	8.0	8.0	100	0.310 1
CH21	GAGAAGAAAGCGGCTGGTGGT AAGGCGATGAGATGACAAGGGT	10.0	10.0	100	0.294 9
CH50	ACCAAACCACCTATGTCACTAC CTCAAGGAGGCTGGAAACTG	9.0	9.0	100	0.305 2
CH52	ATGATGAACTGGGAAGAGGGT GCTTTGAGGACCTGTTGTTA	8.0	8.0	100	0.265 3
平均		8.2	8.2	100	0.258 8



(泳道 1 为 Marker; 泳道 2-28、34-35 为当归; 泳道 29-33、36-37 为当归近缘物种)

图 1 引物 CH50 对 36 份供试材料的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

表 3 4 种产地当归与近缘物种间的遗传相似度(GI)和遗传距离(GD)^①

物种	卓尼	会川	岷县	漳县	红柴胡	川芎	柴胡	独活	北沙参	羌活	小防风
卓尼		0.935 5	0.986 7	0.921 3	0.555 4	0.646 4	0.519 1	0.754 7	0.768 4	0.656 6	0.665 6
会川	0.066 7		0.953 0	0.957 3	0.447 2	0.649 2	0.419 9	0.619 1	0.741 3	0.619 1	0.617 4
岷县	0.013 4	0.048 1		0.912 3	0.577 3	0.691 7	0.527 3	0.783 4	0.771 6	0.693 2	0.687 5
漳县	0.082 0	0.043 7	0.091 7		0.390 2	0.609 8	0.390 2	0.536 6	0.682 9	0.536 6	0.561 0
红柴胡	0.588 1	0.804 8	0.549 4	0.941 0		0.585 4	0.852 7	0.658 5	0.561 0	0.609 8	0.634 1
川芎	0.436 3	0.441 7	0.368 7	0.494 7	0.535 5		0.536 6	0.682 9	0.682 9	0.682 9	0.609 8
柴胡	0.655 6	0.867 6	0.639 9	0.941 0	0.158 2	0.622 5		0.561 0	0.561 0	0.561 0	0.634 1
独活	0.281 5	0.479 5	0.244 1	0.622 5	0.417 7	0.381 4	0.578 1		0.609 8	0.756 1	0.682 9
北沙参	0.263 5	0.299 3	0.259 3	0.381 4	0.578 1	0.381 4	0.578 1	0.494 7		0.609 8	0.585 4
羌活	0.420 7	0.479 5	0.366 5	0.622 5	0.494 7	0.381 4	0.578 1	0.279 6	0.494 7		0.682 9
小防风	0.407 0	0.482 3	0.374 7	0.578 1	0.455 5	0.494 7	0.455 5	0.381 4	0.535 5	0.381 4	

①上三角是遗传相似度，下三角是遗传距离。

0.244 1 ~ 0.941 0，遗传相似度为 0.390 2 ~ 0.783 4。当归与独活的遗传距离最近，与红柴胡遗传距离最远。当归与近缘物种间的遗传距离最小值明显大于 4 个产地当归种内遗传距离最大值。因此，SSR 标记可有效鉴定当归及近缘物种。

2.3 UPGMA 聚类分析

从图 2 看出，36 份材料可以聚为两大类，其中 29 份当归与独活、北沙参聚为一类，其他 6 份近缘物种聚为一类。在阈值 0.78 处，可以分为 8 支，独活、北沙参、川芎、羌活、小防风各自聚为 1 支，柴胡和红柴胡聚为 1 支，当归 5 和 17 聚为 1 支，其他 27 份当归聚为 1 支。表明筛选出的 SSR 标记能够将当归与其近缘物种进行有效鉴别。

3 结论与讨论

中药材传统的鉴定方法主要是性状鉴

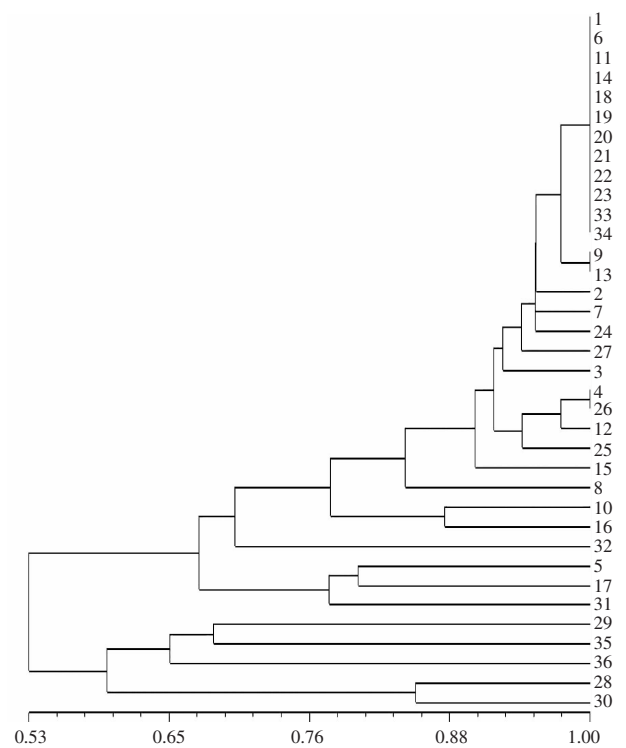


图 2 36 份供试材料聚类分析

定、显微鉴定和化学特征鉴定^[15],受原植物生长环境、生长期及炮制加工工艺的影响较大。DNA 分子鉴定法在作物上应用多年,近年来在药用植物上得到迅速发展。陈士林^[14]对上千种中草药及混伪品的 DNA 条形码经过 10 a 研究,创建了“以 ITS2 为主体的中草药 DNA 条形码鉴定新体系”。本研究发现,利用 SSR 标记技术构建的当归指纹图谱表明,来自 4 个产区的 29 份当归(包括 5 个当归品种 1 个品系)指纹图谱完全一致。从聚类结果看,4 个产地的当归居群之间遗传距离仅为 0.013 4~0.091 7,表明甘肃栽培当归种质资源相似度极高。

甘肃是当归规模化种植的最大省份,其育苗及栽培管理技术相对其他药材成熟,几大主产区的当归种源来源一致性高,这可能是 SSR 标记未检测到产地差异的主要原因。道地药材岷归其品质高于其他产区的当归,主要是由产区气候环境和土壤多因素影响,如若进行产地鉴定从而构建道地药材的独有标记从生境、化学成分结合分子标记更加可行。近年来甘肃省定西市农业科学研究院选育出了岷归系列品种,其中岷归 1 号、岷归 5 号、岷归 6 号、PGIJ2009-0082 为系统选育的当归品种(系),岷归 3 号和岷归 4 号为重离子辐照生物育种选育的当归品种。目前甘肃大面积种植的当归品种为岷归 1 号,采用人工选择的传统育种方法,在人工选育优良品种的过程中只有每一世代里最符合需求的植株的种子才能被继续播种,这样的筛选导致了遗传瓶颈,减少了整个基因组中的遗传多样性^[16-17]。

本研究中,利用筛选出的 SSR 标记能区分当归与其近缘物种。SSR 标记具有共显性,可重复性高,多态性丰富,对 DNA 质量要求低,可通过 PCR 快速检测达到鉴定目的,可作为 ITS2 序列的补充手段。但本研究中所选的参照样本数量较少,还需进一步扩大参试

样本量及混伪品种,反复试验从而开发出切实可行的当归特异标记,以便为快速有效地进行当归的真实性鉴定和遗传多样性分析及资源的评价利用等提供重要技术手段。

志谢:

供试材料的鉴定均在甘肃省农业科学院生物技术研究所石有太老师的指导与帮助下进行。同时感谢渭源县会川镇半阴坡村种质资源圃、陇西药圃园在采样过程中提供的协助。

参考文献:

- [1] 刘学周,康天兰.当归栽培新技术研究综述[J].甘肃农业科技,2016(11):62-66.
- [2] 张立军,蔡子平,张廷红,等.赤霉素浸根对温室当归苗出苗及生长进程的影响[J].甘肃农业科技,2018(8):20-24.
- [3] 赵荣,王富胜,宋振华.起垄覆膜方式对岷县当归生产发育及产量和品质的影响[J].甘肃农业科技,2018(10):16-20.
- [4] 米永伟,龚成文,谢志军,等.一年生当归直播种植技术规程[J].甘肃农业科技,2018(12):88-90.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:133-134.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,2004.
- [7] 张彬.当归属药用植物及药材的条形码鉴定研究—兼论条形码在中药材鉴定中的原则[M].北京:中国中医科学院,2012.
- [8] 闫梦颖,房敏峰,祝娟,等.基于 ITS 条形码标记对当归属药用植物的鉴定[J].中草药,2016,47(6):974-981.
- [9] 辛天怡,姚辉,韩建萍,等.当归药材及混伪品 ITS2 条形码鉴定[J].科研信息化技术与应用,2013,4(3):76-82.
- [10] 罗沛宜.当归及其混伪品的分子鉴定研究[D].泸州:西南医科大学,2016.
- [11] 张春,朱焯,何颖,等.基于内部简单重复序列(ISSR)分析的当归分子鉴定[J].中国药学杂志,2014(10):812-816.
- [12] 朱田田,晋玲,张裴斯,等.基于 ISSR

施氮量对固定道垄作春小麦产量及氮肥利用率的影晌

唐文雪¹, 马忠明²

(1. 甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为确定固定道垄作栽培方式下小麦适宜的氮肥投入量, 分别设置 4 个施氮水平(0、120、180、240 kg/hm²), 研究了固定道垄作栽培方式下不同施氮量对小麦干物质积累、产量和氮肥利用率等的影响。结果表明, 氮肥能够明显促进小麦生长发育, 显著提高小麦产量及氮肥利用率。施氮量为 180 kg/hm² 时, 小麦叶面积指数、干物质积累量较高; 籽粒产量最高, 为 5 883.3 kg/hm²; 氮肥吸收利用率高达 52.10%, 氮肥农学利用率为 18.77 kg/kg, 均显著高于施氮量 240 kg/hm² 的处理。综合分析认为, 河西绿洲灌区固定道垄作栽培方式下小麦的适宜施氮量为 180 kg/hm²。

关键词: 固定道垄作; 施氮量; 春小麦; 籽粒产量; 氮肥利用率

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)07-0048-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.07.013

Effect of Nitrogen Application Rate on Spring Wheat Yield and Nitrogen Utilization in Fixed Ridge Cropping

TANG Wenxue¹, MA Zhongming^{1,2}

(1. Institute of Soil, Fertilizer and Water-saving Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Four nitrogen levels (0, 120, 180, 240 kg/hm²) were set to determine the appropriate n fertilizer input in wheat under fixed ridge cultivation. The effects of different nitrogen application rates on dry matter accumulation, yield and n fertilizer use efficiency of wheat under fixed ridge cultivation were studied. The

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0800806); 甘肃省农业科学院科技创新专项(2019GAAS12和 2017GAAS25)。

作者简介: 唐文雪(1967—), 女, 甘肃临夏人, 研究员, 主要从事作物栽培与农业面源污染研究。Email: gstwx@163.com。

通信作者: 马忠明(1964—), 男, 甘肃民勤人, 研究员, 博士, 主要从事作物栽培与节水农业研究。Email: mazhming@163.com。

- 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究[J]. 中草药, 2015(23): 3549-3557.
- [13] 盛丽. 甘肃省当归资源的 RAPD 分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [14] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [15] 罗煜, 马培, 姚辉, 等. 多基元药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究[J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1710-1717.
- [16] 孙红梅, 张本刚, 齐耀东, 等. 当归药材资源调查与分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 437-441.
- [17] 李鹏程, 刘效瑞. 当归新品种岷归 4 号选育及优化种植技术研究[J]. 中药材, 2011, 34(7): 1017-1019.

(本文责编: 郑立龙)