

基于SSR标记与化学成分构建十堰地区 天师栗核心种质库*

刘志格¹, 叶利春¹, 熊超², 刘义飞¹, 郑国华¹, 石召华¹, 胡志刚¹,
许攀³, 施川^{3,4**}, 张景景^{1**}

(1. 湖北中医药大学药学院 武汉 430065; 2. 武汉轻工大学生命科学与技术学院 武汉 430023;
3. 武汉爱民制药股份有限公司 鄂州 436070; 4. 湖北李时珍药物研究有限公司 鄂州 436070)

摘要:目的 利用筛选出十堰的天师栗中高多态性SSR位点评价天师栗种质资源的遗传多样性,结合有效药用成分含量,构建十堰地区天师栗核心种质库。方法 收集十堰地区114份天师栗种质资源,以七叶树基因组为参考,采用荧光毛细管电泳筛选出高多态性SSR位点,对天师栗种质资源进行遗传多样性分析。利用HPLC测定不同种质干燥娑罗子中七叶皂苷的含量。采用最小距离逐步聚类取样策略(LDSS),根据遗传多样性保留程度初步筛选出核心种质,并对该核心种质与原始种质的遗传多样性参数进行T检验,选择与原种质差异不显著的核心种质为最佳核心种质。结果 筛选出13对高多态性SSR分子标记,遗传多样性评价结果表明十堰地区天师栗种质资源遗传多样性较高,遗传分化较小,存在着较大的基因流,114份种质资源未分为不同的亚群,周家坝和辽叶居群间具有较近的遗传亲缘关系,且周家坝居群娑罗子中的七叶皂苷A及七叶皂苷B含量普遍较高。最终筛选出的核心种质共23份,占总种质资源的20.17%,其中周家坝12份样本、辽叶6份样本、普龄5份样本。结论 将SSR分子标记与主要有效药用成分结合,采用LDSS取样策略构建十堰地区天师栗种质资源核心种质库的方法具有可行性,能够有效的保存与管理天师栗种质资源,也为当地天师栗品种改良、新品种选育研究等提供了研究基础。

关键词: 天师栗 娑罗子 SSR 遗传多样性 核心种质库

doi: 10.11842/wst.20210826004 中图分类号: R282 文献标识码: A

天师栗(*Aesculus chinensis* var. *wilsonii*)是七叶树科七叶树属落叶乔木,主要产于河南西南部、湖北西部、四川东部等地^[1],是《中国药典》(2020版)收录的中药材娑罗子的基原植物之一^[2]。娑罗子具有疏肝理气,和胃止痛的功效,用于治疗肝胃气滞,胸腹胀闷,胃脘疼痛等。历代本草中记载其功效有《肘后备急方》、《药性考》等,主治心腹痛,宿食不消,胃脘胀痛、痈疽疗肿,解毒等^[3-4]。现代药学研究表明其主要药用成分为七叶皂苷,具有抗炎、抗渗出、提高毛细血管的

张力、加快静脉回流、改善血液循环等药理作用^[5-8],临床上常用于脑水肿、伤口肿胀及静脉回流障碍性疾病的治疗^[9-14],近年较多学者探索发现七叶皂苷钠对坐骨神经慢性压迫性损伤所致神经性疼痛的改善^[15]、治疗慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)合并肺心病心力衰竭改善患者肺功能^[16]、对糖尿病大鼠心脏自主神经病变的减弱^[17]等作用。已在国内外上市的七叶皂苷系列制剂如七叶皂苷钠冻干粉针剂、搽剂、复方凝胶、片剂、胶囊等剂型

收稿日期:2021-08-26

修回日期:2022-03-12

* 国家科学技术部重点研发计划中医药现代化研究(2017YFC1701002):娑罗子规范化种植及精准扶贫示范研究,负责人:石召华。湖北省科技厅产业技术研究院前资助项目(2020DEB012):多组分药物七叶皂苷钠注射剂的在评价关键技术研发及其应用,负责人:熊富良;湖北省科技厅支持企业技术创新发展项目(2021BAB119):娑罗子肠溶胶囊临床前研究,负责人:施川。

** 通讯作者:张景景,博士,主要研究方向:中药资源评价与组学研究;施川,高级工程师,主要研究方向:天然药物开发。

被广泛用于治疗心脑血管系统、软组织损伤和其他渗出性疾病,国外也开发用于缓解运动后肌肉局部酸痛的外用乳霜^[18]等。随着上述产品临床应用范围和市场规模的扩大,市场对娑罗子中药材需求量逐年上涨。目前娑罗子药材多为野生资源,极少量为引种栽培,由于缺乏系统的种质资源保护和规范化种植技术研究,引种混乱,导致药材基原混乱,导致娑罗子药材品质良莠不齐,伪品掺杂使用常见,无法满足监管法规要求及市场需求。

随着现代科学技术和理论的快速发展,对药品的监管日趋科学和严谨,要求固定其基原、产地等,以保证原料质量稳定^[19]。据《本草纲目》记载,十堰所产娑罗子即是宋代《益部方物略记》中记载的天师栗,表明十堰地区为天师栗道地产区之一^[20],国内已有学者对娑罗子药材资源开展了品质评价等研究,湖北十堰地区的娑罗子品质优良^[21]。但还未见有报道基于分子标记结合化学成分筛选娑罗子优良种质的研究,在道地产区筛选优良的种质资源,构建天师栗的核心种质库,筛选出优良的天师栗种质资源对七叶皂苷钠系列药品的生产企业从源头保证优质中药材的品质尤为重要。近年较多的学者基于简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)分子标记,开展药用植物的遗传多样性及遗传结构分析、物种鉴别、遗传连锁图谱等研究,其是基于串联重复序列两侧的保守序列设计引物进行PCR扩增,通过凝胶电泳分析扩增产物多态性的技术,其具有结果稳定,重复性好,多态性丰富等特点^[22],可为药用植物育种和种质资源保护等提供基因资源和材料选择^[23-28]。本研究收集了湖北十堰娑罗子产区的114份天师栗种质,根据天师栗近缘物种七叶树基因组开发高多态性SSR分子标记,结合遗传多样性数据和有效成分七叶皂苷A和七叶皂苷B的含量,构建十堰地区天师栗的核心种质库。

1 材料与方法

1.1 材料

选择湖北十堰地区三个居群共114份生长良好且已挂果的天师栗为研究对象,详细记录地理位置,于展叶期采集其幼叶,用硅胶干燥保存后用于总DNA提取。于白露采集果实,用于成分含量检测。所有样本经湖北中医药大学胡志刚教授鉴定为天师栗(*A. chinensis* var. *wilsonii*)。

1.2 基因组DNA提取

取约30 mg天师栗叶片,按改良CTAB(十六烷基三甲基溴化铵, Cetyltrimethylammonium Bromide,)法提取DNA,利用NanoDrop超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳评估基因组DNA的总量和质量,合格后调整每份样品DNA浓度至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,并保存至 -20°C 冰箱中备用。

1.3 SSR引物的筛选和PCR扩增

利用MISA(微卫星识别工具, Micro Satellite identification tool)软件,以天师栗近缘种七叶树基因组DNA为参考进行SSR位点筛选,在Primer3.0软件中进行SSR引物设计,引物设计完成后合成荧光引物。PCR反应体系总体积为 $10 \mu\text{L}$,含DNA模板 $2 \mu\text{L}$ 、 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ $5 \mu\text{L}$ 、正向引物 $0.04 \mu\text{L}$ 、反向引物 $0.25 \mu\text{L}$ 、M13通用引物 $0.15 \mu\text{L}$ 、 DDH_2O $2.6 \mu\text{L}$ 。PCR反应程序为:预变性(95°C , 5 min),变性(95°C , 30 s),退火($50\text{--}55^\circ\text{C}$, 30 s),延伸(72°C , 30 s),共35个循环,最后 72°C 延伸 10 min 。

1.4 核心种质库构建

采用最小距离逐步取样策略(the least distance stepwise sampling strategy, LDSS),结合遗传多样性数据和有效成分含量数据进行取样,连续去除遗传相似性大且有效成分含量相对较低的种质,多次聚类直至获得占总种质资源50%的第一个核心种质,再按照相同方法依次获得分别占总种质资源40%、30%、20%、10%的4个核心种质。对上述初步得到的5个比例的核心种质库进行遗传多样性评价,结合遗传多样性与七叶皂苷含量确定最终核心种质,并利用SPSS软件对原始种质与核心种质、原始种质与保留种质进行T检验,以验证最终核心种质是否具有显著性差异。

1.5 数据统计分析

利用Popgen1.32软件对以下遗传多样性参数进行评估,包括:等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon's信息指数(I)、近交系数(F_{is})、遗传分化系数(F_{st})、基因流(N_m)、Nei's基因多样性指数(H);利用PIC_CALC软件计算多态性信息含量(PIC);使用NTsys1.2软件基于UPGMA进行聚类分析;采用GenALEx 6.5软件进行PCoA和AMOVA分析;采用Structure3.0软件进行遗传

表1 13对SSR引物信息

SSR位点	重复单元	正引物(5'-3')	反引物(5'-3')
SQ3	(CTT)*8	TGAGCAGCACTTTAGAGTATG	CAGCTTATGAGGACGACAC
SQ6	(CCA)*8	AAATCATCTCAGCCAGTCC	ATGGCTCACCTTGTTTCCG
SQ7	(ATA)*6	ACCTAATTTTTCCCATGCTC	CCAAGTTCATCCAGTCAAAT
SQ8	(GAA)*8	ACATACATTCCTGTCCCACC	GGCAAAGAAAGCCAAAGA
SQ18	(TA)*14	GGTAAATCAGTCCCCACA	CGATTTCGCTTACTTTATCAG
SQ22	(AGA)*11	GCAGAATCTTGGTGGTTG	TGCTTTGGGTGTTGAGTT
SQ24	(TA)*6	TGCCTCAAAGTCCACAAC	ACTCCGCTCCATAAGAA
SQ29	(CTA)*5	TCTGAACATGATGGACGGA	TGGGCGAAGCTCTACTTT
SQ30	(TTCT)*5	TCGTTTCATCTCCCTATTCC	CGACCCCATTTTGTTCAT
SQ34	(TCCAA)*7	CAAACAAAGGGCGGTACT	GGGAAAGAATGGCACTAA
SQ44	(GAT)*9	TGAAGGACTGGATTAGGGTT	CTCAAAGTGAAGTGGCAA
SQ49	(GTA)*5	GCACTACTGTCCCACCTT	ATAACCACCTGCTCCTG
SQ53	(GTAT)*5	TCCAAACATGGGATAAGC	GAAATCACCGAAAACAGC

表2 筛选出的13对SSR引物的多态性水平

引物	等位基因数(N_a)	有效等位基因数(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态性信息含量指数(PIC)	Shannon's 信息指数(I)	Nei's 遗传多样性指数(H)	近交系数(F_{is})	遗传分化系数(F_{st})	基因流(N_m)
SQ3	7	2.4465	0.5000	0.5939	0.5316	1.1414	0.5913	0.1459	0.0421	5.6936
SQ6	7	1.4824	0.2368	0.3268	0.3134	0.7511	0.3254	0.3613	0.0529	4.4798
SQ7	2	1.7808	0.4211	0.4404	0.3423	0.6303	0.4384	-0.0177	0.0237	10.2809
SQ8	2	1.7709	0.3772	0.4372	0.3406	0.6270	0.4353	-0.0143	0.0760	3.0406
SQ18	15	9.9624	0.6667	0.9036	0.8911	2.4446	0.8996	0.2749	0.0213	11.4938
SQ22	14	4.0900	0.7105	0.7588	0.7313	1.8240	0.7555	-0.0219	0.0326	7.4111
SQ24	9	4.4355	0.6316	0.7780	0.7393	1.6283	0.7745	0.2204	0.0205	11.9200
SQ29	7	2.0982	0.4912	0.5257	0.4894	1.0789	0.5234	0.1525	0.0392	6.1297
SQ30	6	2.3640	0.3684	0.5795	0.5340	1.1411	0.5770	0.2910	0.0995	2.2634
SQ34	8	4.3868	0.6930	0.7754	0.7379	1.6565	0.7720	0.1049	0.0439	5.4410
SQ44	8	5.1490	0.6579	0.8093	0.7795	1.8087	0.8058	0.0708	0.0336	7.1922
SQ49	3	1.6646	0.3509	0.4010	0.3491	0.6907	0.3992	0.0694	0.0631	3.7109
SQ53	6	2.1945	0.4825	0.5467	0.4911	1.0603	0.5443	0.1376	0.0163	15.1299
平均	7.2308	3.3712	0.5067	0.6059	0.5593	1.2679	0.6032	0.1374	0.0406	5.9112

结构分析。

2 结果与分析

2.1 基于SSR标记分析天师栗的遗传多样性

2.1.1 SSR分子标记开发

采用天师栗的近缘种七叶树的全基因组序列,共发掘出57,349个SSR位点,以复合形式存在的SSR有7,246个。从基因组染色体序列总共获得PCR扩增效果好、多态性高的SSR引物13对(表1)。

2.1.2 SSR位点的多态性水平检测

13对SSR位点在114份天师栗种质中共扩增出

94个等位基因(表2),等位基因(N_a)数量从2(SQ7和SQ8)到15(SQ18)不等,平均扩增出7.2308个等位基因;有效等位基因(N_e)的范围从1.4824(SQ6)至9.9624(SQ18),平均值为3.3712;观测杂合度(H_o)和预期杂合度(H_e)的范围分别是0.2368(SQ6)-0.7105(SQ22)和0.3268(SQ6)-0.9036(SQ18),平均值分别为0.5067和0.6059;13个位点的多态性信息含量指数(PIC)范围在0.3134(SQ6)-0.8911(SQ18)之间,平均值为0.5593,表明所选SSR位点具有较高的多态性。Shannon's 信息指数(I)的变化范围是0.6270(SQ8)-2.4446(SQ18),平均值为1.2679。Nei's 基因多样性指

表3 天师栗3个居群的遗传统计情况

采样点	样本量	等位基因数 (<i>N_a</i>)	有效等位基因 数 (<i>N_e</i>)	观测杂合度 (<i>H_o</i>)	期望杂合度 (<i>H_e</i>)	Shannon's 信息指数 (<i>I</i>)	Nei's 遗传多样性 指数 (<i>H</i>)
周家坝	75	6.6154	3.3270	0.5179	0.6045	1.2460	0.6005
辽叶	20	4.6923	3.0195	0.5269	0.6325	1.1671	0.6167
普龄	19	5.0000	2.9969	0.4413	0.5227	1.0512	0.5089
Total	114	7.2308	3.3712	0.5067	0.6059	1.2679	0.6032

表4 天师栗3个居群的分子方差分析(AMOVA)分析

变异来源	自由度	平方和	均方	方差 组分	变异百分 比/%
Among populations	2	45.028	22.514	0.468	5
Within populations	111	993.121	8.947	8.947	95
Total	113	1038.149	-	9.415	100

表5 3个天师栗居群间的成对遗传分化系数矩阵

居群	周家坝	辽叶	普龄
周家坝	-		
辽叶	0.024	-	
普龄	0.061	0.105	-

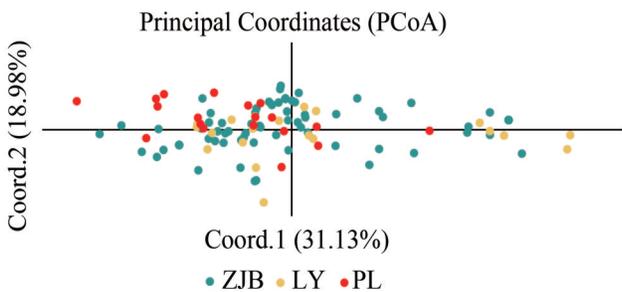


图1 天师栗主坐标分析图

数(*H*)平均为0.6032。基因流(*N_m*)水平为2.2634(SQ30)-15.1299(SQ53)。遗传分化系数(*F_{st}*)和近交系数(*F_{is}*)分别为0.0406和0.1374。以上结果表明,天师栗的遗传分化水平较小,存在着较大的基因流。其中,SQ6和SQ18具有较高的识别效率及鉴定效率,将在未来娑罗子DNA指纹数据库构建和品种鉴定中发挥关键作用。

2.1.3 天师栗居群遗传多样性分析

在3个居群中,周家坝居群扩增出最多的等位基因(6.6154)和有效等位基因(3.3270),且Shannon's信息指数(1.2460)最高,表明在3个采样点中,周家坝居群拥有较丰富的遗传变异。普龄的遗传多样性最低(表3)。AMOVA分析结果显示,遗传变异主要发生在居群内部(95%),只有5%的变异发生在居群间(表4)。3个居群间遗传分化较小(0.024-0.105),表明存

在着较大的基因流。其中,周家坝和辽叶居群间具有较近的遗传亲缘关系(表5)。

2.1.4 天师栗居群遗传结构分析

通过对基因分型得到的SSR等位基因数据进行主坐标分析和UPGMA聚类分析,发现114份天师栗样本未明显的划为不同的亚群(图1-图2)。

2.2 不同种质的娑罗子七叶皂苷的含量测定

2.2.1 方法学考察

用甲醇制备七叶皂苷钠对照品储备液,浓度为4.30 mg·mL⁻¹,并逐级稀释成每1 mL含七叶皂苷A 1.44 mg、0.72 mg、0.36 mg、0.18 mg、0.09 mg,含七叶皂苷B 1.35 mg、0.675 mg、0.3375 mg、0.1688 mg、0.0844 mg,参照2020版《中华人民共和国药典》娑罗子中含量测定项下^[5],记录色谱峰面积。七叶皂苷A的回归方程为: $y=7,279,566x+136,717$ ($R^2=0.9997$);七叶皂苷B的回归方程为: $y=6,176,833x+125,733$ ($R^2=0.9997$),表明七叶皂苷A和七叶皂苷B线性良好;制备供试品溶液连续重复进样6次,七叶皂苷A和七叶皂苷B的峰面积RSD值分别为0.52%、0.43%,结果表明仪器精密度良好;将供试品溶液分别放置0、4、8、12、24、36 h后开展稳定性考察,得到七叶皂苷A和七叶皂苷B峰面积的RSD值分别为0.62%和0.58%,表明在36 h内供试品溶液稳定性良好;平行制备6份供试品溶液,七叶皂苷A和七叶皂苷B的峰面积的RSD值分别为1.27%、1.22%,结果表明该测定方法重复性良好。制备9份供试品溶液,分三组,每组分别加入相当于含七叶皂苷浓度50%、100%、150%的对照品溶液,七叶皂苷A、七叶皂苷B平均回收率分别为99.87%、100.31%,RSD分别为1.28%、1.04%,表明该方法的准确性良好。

2.2.2 不同种质娑罗子有效成分含量测定

114份娑罗子样品按上述方法制备娑罗子样品供试品溶液,计算每份娑罗子药材中七叶皂苷A和七叶皂苷B的含量(%),3个居群的两种七叶皂苷化合物含量测定结果见表6。3个居群的娑罗子药材均达到了

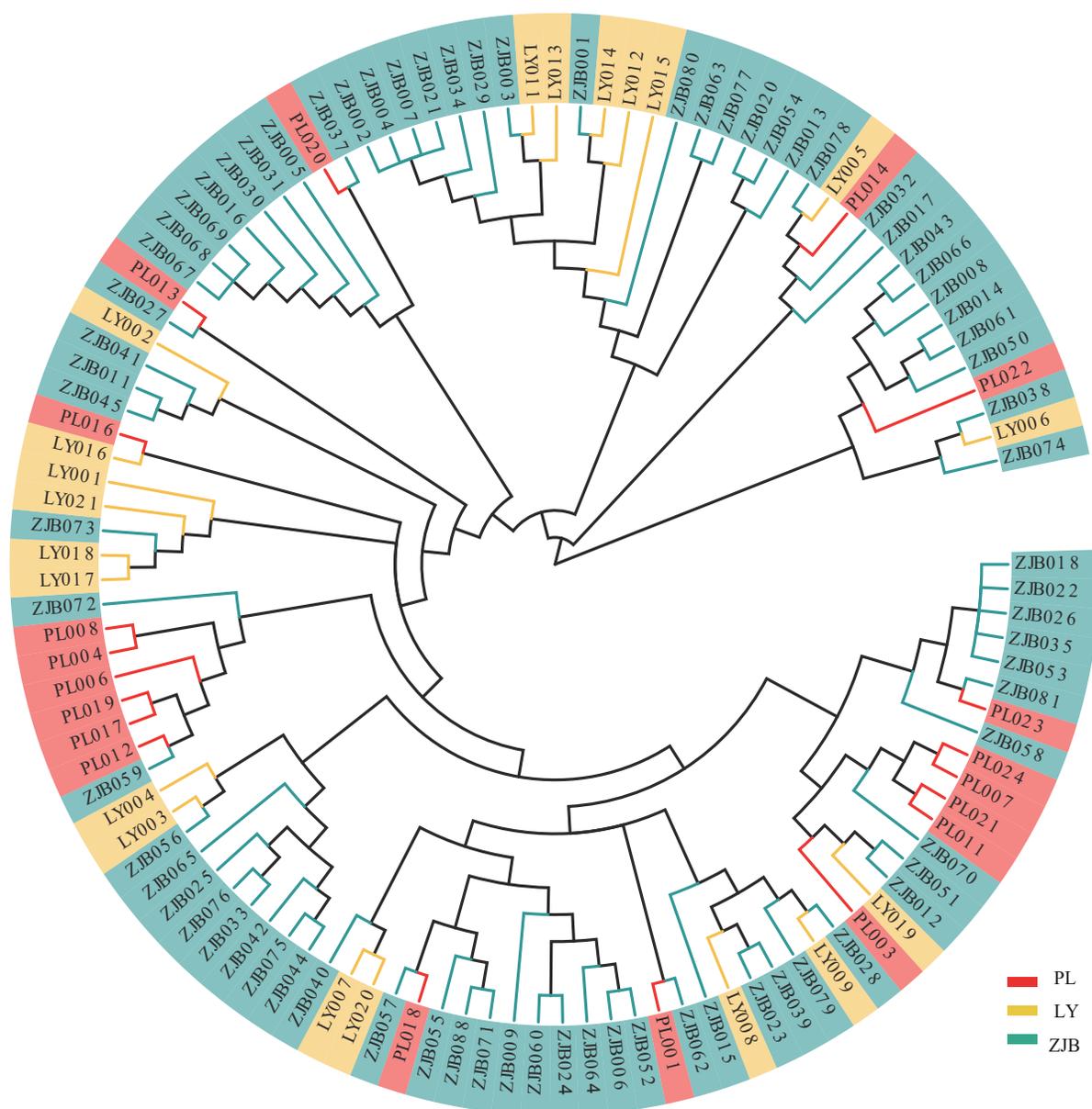


图2 114份天师栗样本UPGMA构建聚类树

2020版《中华人民共和国药典》中规定的含量要求,即七叶皂苷A含量不低于0.7%。其中周家坝居群中娑罗子的七叶皂苷A和七叶皂苷B含量均最高,而在辽叶居群中含量均最低。

2.3 天师栗核心种质库构建

2.3.1 核心种质库的初步构建及评价

采用LDSS取样策略基于遗传距离进行逐步聚类,在全部样本中不断删除遗传相似性大且有效成分较低的样本,多次聚类后分别得到57份、46份、34份、23份、5份,分别占原始种质的50%、40%、30%、20%、10%(表7)。随着取样比例的减小,等位基因数量

表6 3个居群的七叶皂苷A及七叶皂苷B含量测定结果

居群	七叶皂苷A(%)	七叶皂苷B(%)
周家坝	4.65±2.33	3.08±1.85
辽叶	2.53±1.31	1.78±0.74
普龄	3.05±1.21	2.00±0.99

注:数据表示为平均值±标准差。

(N_a)逐渐降低,观察杂合度(H_o)、预期杂合度(H_e)、香农信息指数(I)和Nei's基因多样性指数(H)分别在0.5734–0.5067、0.6593–0.6059、1.3170–1.2594和0.6400–0.6032范围内变化。遗传参数值除等位基因数量(N_a)和有效等位基因数量(N_e)外,其余均在抽样

表7 不同取样比例下原始种质和五个初步核心种质的遗传多样性特征

合集名称	取样比例	样本大小	等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	香农信息指数 (I)	Nei's 遗传多样性指数 (H)	等位基因保留率 (R_a %)
原始种质	100%	114	7.2308	3.3712	0.5067	0.6059	1.2679	0.6032	100
抽样1	50%	57	7.0000	3.5491	0.5088	0.6214	1.3014	0.6160	96.81
抽样2	40%	46	7.0000	3.6094	0.5251	0.6278	1.3144	0.6210	96.81
抽样3	30%	34	6.5385	3.5851	0.5362	0.6368	1.3152	0.6274	90.42
抽样4	20%	23	5.9231	3.5316	0.5385	0.6542	1.3170	0.6400	81.91
抽样5	10%	11	5.0000	3.3586	0.5734	0.6593	1.2594	0.6294	69.15

表8 原始种质和核心种质的 N_e, I, H 的 T 检验结果

评价指标	种质组别	平均值	标准误差	平均差	标准误差	T 值	P 值
N_e	原始种质	3.3712	0.6491	-0.1604	0.8959	-0.179	0.859
	核心种质	3.5316	0.6175				
I	原始种质	1.2679	0.1560	-0.0491	0.2088	-0.235	0.816
	核心种质	1.3170	0.1388				
H	原始种质	0.6032	0.0503	-0.0368	0.0664	-0.553	0.585
	核心种质	0.6400	0.0435				

4中达到最大值,表明取样比例为20%时更丰富的遗传多样性被保留,最终确定20%抽样比例下的23份种质作为核心种质。

2.3.2 核心种质的检验及评价

T 检验结果表明20%抽样比例下的核心种质在遗传上与原始种质间无显著性差异($\alpha=0.05$),且遗传多样性参数值均高于原始种质,表明20%抽样比例下构建的核心种质可以充分代表原始种质的遗传变异,且相对于原始种质来说具有更加丰富的遗传多样性。3个居群在该核心种质中均有保留,其中周家坝居群保留种质最多,有12份,辽叶居群保留6份、普龄居群保留5份(表8)。

3 讨论

本研究筛选出了13对高多态性SSR分子标记用于不同种质资源的天师栗遗传多样性分析,对十堰地区3个居群114份天师栗样品进行SSR-PCR扩增,共扩增得到94个等位基因,平均扩增出6.5个等位基因;物种水平上观测杂合度和期望杂合度分别为0.4233和0.5035;13个SSR位点的 F 统计量检测显示,天师栗的遗传分化水平很小;各位点的多态性信息含量指数

(PIC)平均值为0.4653,表明13个SSR位点均具备较高的多态性。在3个居群中,天师栗种质在周家坝居群中具有更丰富的遗传变异,且居群间可能发生较高水平的基因流动,其种子娑罗子作为注射用七叶皂苷钠中药材原料,从遗传角度保持较小差异,固定基原及固定种植基地,有利于从源头控制药材品质。但持续的高水平基因流动会极大地减弱种群间的遗传变异,不利于物种延续,也会引起种质退化,需引进其他区域优质天师栗种群以增加该地区天师栗种群的多样性。

娑罗子含有皂苷类、黄酮类、有机酸类等多种化合物,主要有效药用成分为七叶皂苷类化合物^[29-31]。本研究以七叶皂苷A、七叶皂苷B为评价指标,114份娑罗子药材中七叶皂苷A的平均含量(3.99%)远高于药典标准,七叶皂苷B的平均含量为2.66%;3个居群中的娑罗子药材的七叶皂苷A的含量均达到且高于药典标准,其中周家坝居群两种成分的含量最高,而辽叶的最低,表明周家坝的娑罗子药材质量比普龄和辽叶的好,为下一步该地区品种选育提供参考。

核心种质可有效地代表原始种质的特征并保留丰富的遗传多样性^[32]。对于中药材而言,在构建核心种质库时,应综合遗传参数和有效成分两个指标。最小距离逐步采样策略(LDSS)方法在很多核心种质库构建中被使用,且具有较好的可行性^[33]。LDSS方法在对遗传相似性较高的材料进行选择时,会优先保留有效化学成分相对丰富的个体,同时保留遗传变异丰富的材料。本研究最终得到34份核心种质,占原始种质的20%,且3个居群均有种质保留。本研究将为天师栗的遗传资源保护、新品种选育及种质创新提供科学依据。

参考文献

- 1 石召华, 张一娟, 关小羽, 等. 七叶树属植物研究进展. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(2):322-328.
- 2 宋祁. 益部方物略记. 北京: 中华书局, 1985:1-24.
- 3 李时珍. 本草纲目. 北京: 人民卫生出版社, 1979:1754.
- 4 葛洪. 肘后备急方. 北京: 中国中医药出版社, 2016:188.
- 5 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2020:305.
- 6 薄文集, 石召华, 王平, 等. 七叶皂苷钠冻干粉对出血性脑水肿大鼠脑组织 MMP-9 及 AQP4 的影响. 中华中医药杂志, 2018, 33(3):1060-1062.
- 7 范永会, 王星利, 张永丽, 等. 七叶皂苷钠通过上调 SOCS-1 表达抑制脑内出血诱发的炎症反应. 实用药物与临床, 2018, 21(6):632-636.
- 8 Chang J C, Song G, Wang J Y, et al. Escin suppresses HMGB1-induced over-expression of aquaporin-1 and increased permeability in endothelial cells. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(5):891-900.
- 9 Zhang Q, Zhao C, Zhang L, et al. Escin sodium improves the prognosis of acute pancreatitis via promoting cell apoptosis by suppression of the ERK/STAT3 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:9921839.
- 10 程春泉, 徐佳洁, 杨晓蕾, 等. 激光联合表皮营养液及七叶树皂苷修护敷料治疗面部毛细血管扩张症疗效分析. 中国美容医学, 2017, 26(9):61-64.
- 11 刘慧娜. 不同剂型七叶皂苷钠联合应用治疗跟骨骨折术后肿胀的有效性分析. 海峡药学, 2018, 30(5):160-161.
- 12 张伟, 王莹莹, 王涓, 等. 注射用七叶皂苷钠在骨折内固定术后肿胀的临床疗效分析. 影像研究与医学应用, 2018, 2(14):225-226.
- 13 Ding Y X, Eerduna G W, Duan S J, et al. Escin ameliorates the impairments of neurological function and blood brain barrier by inhibiting systemic inflammation in intracerebral hemorrhagic mice. *Exp Neurol*, 2021, 337:113554.
- 14 蔡子军. 注射用七叶皂苷钠在髋关节置换术患者中的应用效果. 中国当代医药, 2020, 27(5):82-84.
- 15 Zhang L, Chen X, Wu L, et al. Ameliorative effects of escin on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of sciatic nerve. *J Ethnopharmacol*, 2020, 267:113503.
- 16 唐三辉, 龚放华, 吴兆黎. β -七叶皂苷钠注射剂治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺心病心力衰竭的临床研究. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(21):2651-2653, 2660.
- 17 Suryavanshi S V, Kulkarni Y A. Attenuation of cardiac autonomic neuropathy by escin in diabetic rats. *Pharmacology*, 2021, 106(3-4):211-217.
- 18 Shu H U, Belcaro G, Cesarone M R, et al. A sport cream (Harpago-Boswellia-ginger-escin) for localized neck/shoulder pain. *Minerva Med*, 2021, 112(2):255-260.
- 19 国家药监局药审中心. 关于发布《中药新药用药材质量控制研究技术指导原则(试行)》等3个指导原则的通告(2020年第31号), 2020.10.12.
- 20 杜文杰, 石召华, 叶利春, 等. 娑罗子本草考证. 中成药, 2018, 40(2):425-428.
- 21 石召华, 关小羽, 张一娟, 等. 娑罗子药材的化学品质研究. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):144-147.
- 22 卓蕾, 向成丽, 肖杰, 等. SSR 标记在植物种质资源鉴定的应用进展. 现代园艺, 2021, 44(15):3.
- 23 唐小慧, 任超翔, 陈江, 等. 利用 SSR 分子标记分析我国红花主要栽培品种遗传多样性. 中药材, 2017, 40(12):2800-2804.
- 24 刘新星, 陈玉梁, 石有太, 等. SSR 标记甘肃栽培党参种质资源的遗传多样性分析. 中药材, 2016, 39(8):1742-1747.
- 25 杨正久, 代建忠, 梁大敏, 等. 贵州金钱草形态学性状和 ISSR 标记的遗传多样性分析. 中药材, 2019, 42(10):2247-2252.
- 26 张明明. 大黄酒地产区核心种质构建及优良种质筛选研究. 北京: 北京中医药大学硕士研究生学位论文, 2020.
- 27 刘曼. 资丘独活的核心种质库构建. 武汉: 湖北中医药大学硕士研究生学位论文, 2021.
- 28 杨欣超, 张凯权, 王静, 等. 基于 SSR 分子标记的刺槐遗传多样性分析及核心种质的构建. 分子植物育种, 2020, 18(9):3086-3097.
- 29 陈光宇, 石召华, 李海池, 等. 娑罗子油超临界 CO₂ 萃取工艺研究及其成分分析. 中药材, 2013, 36(3):475-478.
- 30 熊艳, 李海池, 彭银, 等. 娑罗子中七叶皂苷类成分的最新研究进展. 中药材, 2016, 39(5):1195-1199.
- 31 杨岚, 赵晓昂, 马立斌. 天师栗中三萜皂甙元成分研究. 中国中药杂志, 1996(10):41-42, 65.
- 32 Brown A H D. Core collections: a practical approach to genetic resources management. *GENOME*, 1989, 31(2):818-824.
- 33 章秋平, 刘威生, 郁香荷, 等. 基于优化 LDSS 法的中国李(*Prunus salicina*)初级核心种质构建. 果树学报, 2011, 28(4):617-623.

Construction of *Aesculus wilsonii* Core Germplasm Library in Shiyan Area Based on ISSR Markers and Chemical Constituents

Liu Zhige¹, Ye Lichun¹, Xiong Chao², Liu Yifei¹, Zheng Guohua¹, Shi Zhaohua¹, Hu Zhigang¹,
Xu Pan³, Shi Chuan^{3,4}, Zhang Jingjing¹

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University academy, Wuhan 4530023, China; 3. Wuhan Aimin

Pharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436070, China ;4.Hubei Li Shizhen Pharmaceutical Research Co. Ltd,
Ezhou 436070, China)

Abstract: Objective To construct the Core Germplasm Bank of *A. wilsonii* in Shiyan, by evaluating the genetic diversity of germplasm resources, screening high polymorphic SSR loci in *A. wilsonii* in Shiyan, and combined with the content of medicinal ingredients. Methods 114 *A. wilsonii* germplasm resources were collected, and SSR loci with high polymorphism were screened by fluorescence capillary electrophoresis based on the genome of *A. chinensis* to analyze the genetic diversity of *A. wilsonii* germplasm resources. HPLC was used to determine the contents of Aescines in different germplasm of *A. wilsonii*. The least distance stepwise sampling method (LDSS) was used to select the core germplasm according to the degree of genetic diversity retention, and *T* test was performed on the genetic diversity parameters between the core germplasm and the original germplasm. The core germplasm which had no significant difference from the original germplasm was selected as the best core germplasm. Results 13 pairs of highly polymorphic SSR markers were screened out. The genetic diversity evaluation results showed that the germplasm resources of *A. wilsonii* in Shiyan area had low genetic diversity, low genetic differentiation and large gene flow. The genetic differentiation was small and there was a large gene flow. The 114 germplasm resources were not divided into different subgroups. There was close genetic relationship between Zhoujiaba population and Liaoye population. Moreover, the contents of Aescin A and Aescin B were generally higher in seeds of *A. wilsonii* in Zhoujiaba population. A total of 23 core germplasm resources were screened out, accounting for 20.17% of the total germplasm resources, including 12 samples from Zhoujiaba, 6 samples from Liaoye and 5 samples from Puling. Conclusion It is feasible to combine SSR molecular markers with main effective medicinal ingredients and adopt LDSS sampling strategy to construct the core germplasm library of *A. wilsonii* germplasm resources in Shiyan area. The core collection will contribute to preserving and managing the wild germplasm resources of *A. wilsonii* and also provide the research foundation for the improvement and breeding of new varieties of *A. wilsonii*.

Keywords: *Aesculus wilsonii*, Aesculi Semen, SSR, Genetic diversity analysis, Core Germplasm

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)