

刘 珊,何伟明,陈 宇. 金龙胆草 SRAP 遗传多样性及主要成分相关性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(19):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.007

金龙胆草 SRAP 遗传多样性及主要成分相关性分析

刘 珊^{1,2}, 何伟明¹, 陈 宇¹

(1. 攀枝花学院生物与化学工程学院, 四川攀枝花 617000; 2. 干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室, 四川攀枝花 617000)

摘要:为明确攀西金龙胆草种质资源情况,对 16 个居群的样品进行 SRAP 分析,并比较总黄酮、总皂苷和苦蒿素含量。采用 SRAP 进行遗传多样性分析,使用高效液相色谱法和分光光度法进行样品间成分含量相关性研究。SRAP 标记聚类分析将 16 个不同来源地的样品聚为三大类;总黄酮、总皂苷和苦蒿素 3 种有效成分含量相互存在正相关关系,但差异不显著性($P>0.05$)。DNA 分子聚类和成分含量聚类对样品亲缘划分的结果一致性不高。野生金龙胆草资源遗传多样性具有较强的区域相似性,有效成分含量则更依赖生长环境。这些结果对金龙胆草育种开发能提供数据支持。

关键词:金龙胆草;含量测定;相关性分析;遗传多样性

中图分类号: S567.23+9.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0030-04

金龙胆草(*Conyza blinii* H. Lév)是一种菊科白酒草属 2 年生草本植物,为川滇的民间药材,被 2015 年版《中华人民共和国药典》^[1]收录,该植物目前主要分布在四川攀(攀枝花市)西(凉山州)地区,呈野生状态。该植物含有丰富的萜类、生物碱、皂苷、黄酮和挥发油等次生代谢物^[2-4],已有成药商品“金龙胆草浸膏片”用于治疗慢性支气管炎,其中黄酮类和皂苷为该植物的主要药用成分,其总皂苷具有较强的抗肿瘤活性而在近年来得到持续研究^[5]。化合物苦蒿素是一种新克罗烷型二萜内酯,为药典中规定的该药材质量标准

控制物。金龙胆草在一些文献中常被误记载为 1 年生草本,但经笔者所在实验室实际栽种后发现为 2 年生植物,可见该药材的研究仍须要大力加强。本研究对攀西地区金龙胆草进行遗传多样性分析,并对其 3 种主要成分进行含量测定和分析,探究金龙胆草有效成分的相关性,为金龙胆草开展栽培药材的长期研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试用野生金龙胆草样品于同时期采集自四川省攀枝花市和凉山州,按照均衡抽样的原则,两两居群之间的地理距离>30 km,居群内样品间距离>15 m,每个居群采集>20 株的样品,分布点见表 1,由四川农业大学陈惠教授鉴定为金龙胆草。所有试验于 2017 年 1—7 月在干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室进行。

收稿日期:2018-01-13

基金项目:四川省教育厅重点项目(编号:16ZA0409);四川省高等学校重点实验室项目(编号:GR-2013-E-01)。

作者简介:刘 珊(1980—),女,四川夹江人,博士,副教授,主要从事药用植物生物化学与分子生物学研究。Tel:(0812)3371938; E-mail:chuannong2010@126.com。

the monopartite *Begomovirus* DNA β complex causing cotton leaf curl disease in Pakistan[J]. Tokyo University of Agriculture Repository, 2013,58(2):64-70.

[27] Guo W, Jiang T, Zhang X, et al. Molecular variation of satellite DNA beta molecules associated with *Malvastrum yellow vein virus* and their role in pathogenicity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008,74(6):1909-1913.

[28] Kon T, Hidayat S H, Hase S, et al. The natural occurrence of two distinct *Begomoviruses* associated with DNA beta and a recombinant DNA in a tomato plant from Indonesia[J]. Phytopathology, 2006,96(5):517-525.

[29] 何自福,虞 皓,罗芳芳. 广东番茄曲叶病毒 G3 分离物基因组 DNA-A 的分子特征[J]. 植物病理学报,2005,35(3):208-213.

[30] Padidam M, Beachy R N, Fauquet C M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons [J]. Journal of General Virology, 1995,76(2):249-263.

[31] Hong Y G, Harrison B D. Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographical

separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses[J]. Journal of General Virology, 1995,76(8):2043-2049.

[32] 李正和,李桂新,谢 艳,等. 云南番茄曲叶病是由烟草曲茎病毒引起的[J]. 病毒学报,2002,18(4):355-361.

[33] 刘 怡. 中国番茄黄化曲叶病毒与烟草曲茎病毒卫星 DNA β 分子上症状决定因子的定位[D]. 杭州:浙江大学,2007:26-46.

[34] 青 玲. 伴随卫星分子的两组单组分双生病毒 TbCSV 和 TYLCCNV 之间的拮抗互作[J]. 植物保护学报,2010,37(1):12-18.

[35] 崔晓峰,周雪平. 中国番茄黄化曲叶病毒和烟草曲茎病毒 AC2 和 AC4 蛋白为 RNA 沉默的抑制子[J]. 科学通报,2004,49(23):2431-2436.

[36] 郑慧新,夏吉星,周小毛,等. 警惕烟粉虱传播的番茄褪绿病毒病在我国快速扩散[J]. 中国蔬菜,2016(4):22-26.

[37] 阮 涛,于云奇,包凌云,等. 四川米易赛葵上粉虱传双生病毒的分子鉴定及复合侵染检测[J]. 植物保护学报,2011,38(5):419-424.

表 1 16 个金龙胆草采样点地理位置

序号	采集地	海拔(m)	经度(E°)/纬度(N°)
1	攀枝花撒莲	1 800	102.01/26.49
2	攀枝花头碾	2 012	102.05/26.42
3	攀枝花新九	2 100	101.57/26.37
4	攀枝花总发	1 500	101.45/26.26
5	攀枝花拉蚌	1 600	101.55/21.56
6	攀枝花太平	1 800	101.34/26.32
7	攀枝花市机场路	1 916	101.47/26.32
8	凉山州龙泉	2 400	102.13/26.51
9	凉山州新云	2 000	102.31/26.36
10	凉山州俱乐	2 000	102.40/27.02
11	凉山州新田	1 800	102.55/26.23
12	凉山州布拖	1 750	102.48/27.42
13	凉山州德昌	1 800	102.10/27.24
14	凉山州西昌	1 900	102.15/27.53
15	凉山州盐源	2 050	101.30/27.25
16	凉山州冕宁	1 200	102.10/28.33

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 程序 按照 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio - Tek) 进行 DNA 提取,并以 λ DNA/*Hind* III 为 maker,以质量浓度为 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 分子量,并按照 $\text{DNA}(\mu\text{g}/\text{mL}) = 50 \times D_{260\text{nm}} \times \text{稀释倍数}$ 测定样品浓度。引物序列如表 2 所示,按照预先筛选的 12 对引物进行扩增。RCR 反应程序和产物的银染检测程序均按照文献 [6] 进行。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相, $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 15 : 40 : 45$, 等梯度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

1.2.3 样品及对照品溶液的制备 为了更好地研究金龙胆草总皂苷、总黄酮和苦蒿素含量的相关性,笔者采用其所在课题组前期对该药材各成分优化后的提取工艺分别对 3 种成分进行提取,其中总黄酮含量采用超声波辅助提取, $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色法测定含量,以芸香苷为标准品,回归曲线为 $y_1 = 10.946x_1 - 0.0071$, $r_1^2 = 0.9997$,式中 x_1 表示芸香苷含量, y_1 表示吸光度^[7];总皂苷采用纤维素酶法辅助微波提取,醋酸 - 香草醛 - 高氯酸显色测定含量,以齐墩果酸为标准品,回归曲线为 $y_2 = 0.2343x_2 - 0.1227$, $r_2^2 = 0.9997$,

表 2 SRAP 引物序列

序号	引物序列 (5'→3')	序号	引物序列 (5'→3')
1	F: TGAGTCCAAACCGGATA R: GACTGCGTACGAATTAAT	7	F: TGAGTACAAACCGGACT R: GACTGCGTACGAATTAAT
2	F: TGAGTCCAAACCGGATA R: GACTGCGTACGAATTGAC	8	F: TGAGTCCAAACCGGATA R: GACTGCGTACGAATTGCA
3	F: TGAGTCCAAACCGGAGC R: GACTGCGTACGAATTAAT	9	F: TGAGTCCAAACCGGAGC R: GACTGCGTACGAATTTGA
4	F: TGAGTCCAAACCGGAGC R: GACTGCGTACGAATTAAC	10	F: TGAGTCCAAACCGGACC R: GACTGCGTACGAATTTGA
5	F: TGAGTCCAAACCGGAGC R: GACTGCGTACGAATTGAC	11	F: TGAGTCCAAACCGGAAT R: GACTGCGTACGAATTTGA
6	F: TGAGTCCAAACCGGAAT R: GACTGCGTACGAATTTGC	12	F: TGAGTCCAAACCGGACC R: GACTGCGTACGAATTAAT

式中 x_2 表示齐墩果酸浓度, y_2 表示吸光度^[8];苦蒿素采用索氏提取,高效液相色谱法测定精确含量,以苦蒿素为标准品,回归方程为 $y_3 = 44.380x_3 + 140.89$, $r_3^2 = 0.9993$,式中 y_3 表示吸收峰面积, x_3 表示苦蒿素含量^[9]。

1.2.4 样品及对照品溶液的制备 利用 Alpha Innotech ChemImage5500 CCD 成像仪将电泳图谱照片转换成 .tif 格式,再用 Quantity One 软件将 100 ~ 1 000 bp 范围内清晰的条带进行标记,经过 Match 比对,有条带记为 1,无条带记为 0,形成一个“0、1”矩阵,计算每 2 个样品间的 Nei's 遗传相似性系数 S , $S = 2N_{ji}b/N_j + N_i$ (N_{ji} 是二者共同的带数, N_j 、 N_i 分别为二者特有的带数)。遗传距离为 $(1 - S)$ 。采用 Popgen32 软件进行基因多样性指数 (H)、Shannon 信息指数 (I)、等位基因平均数 (N_a) 及每位点有效等位基因数 (N_e) 分析,并计算多态位点数、多态位点比例;用 NTSYSpc 2.1 软件计算金龙胆草的 Jaccard 遗传相似系数 (GS),并按照不加权成对群算数平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。利用 SPSS 20.0 进行样品间有效成分含量相关性的分析。

2 结果与分析

2.1 金龙胆草 SRAP 遗传多样性分析

12 对引物的 PCR 扩增结果显示,每对引物扩增得到 7 ~ 25 条扩增带 (图 1),分子量在 200 ~ 1 000 bp。共得到 318 条清晰且重复性好的条带,其中 275 条为多态性条带,多态位点率为 86.48%,遗传多样性结果分析见表 3,说明金龙胆草资

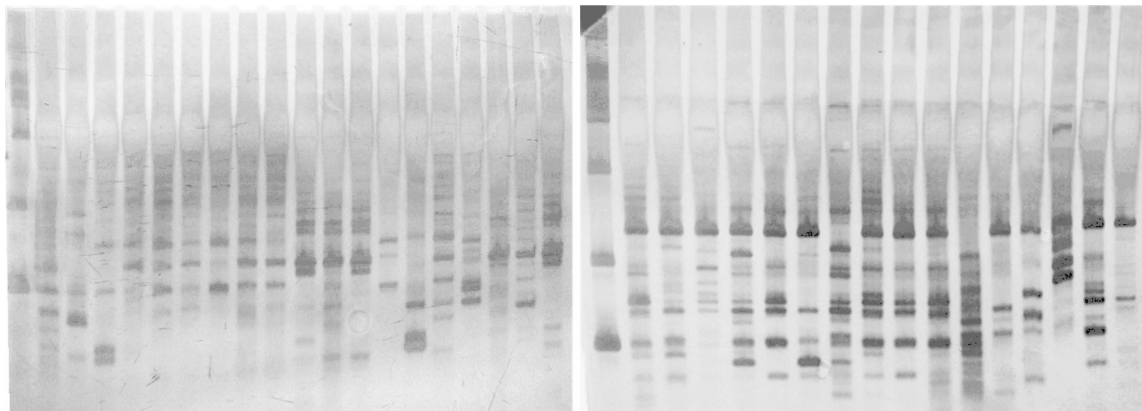


图 1 第 1 对引物(左)和第 6 对引物(右)扩增结果

表3 SRAP 遗传多样性分析

指标	等位基因数 <i>N_a</i> (个)	有效等位基 因 <i>N_e</i> (个)	Nei's 基因 多样性 <i>H</i>	Shannon's 信息 指数 <i>I</i>
平均值	1.924	1.419	0.258	0.401
标准差	0.266	0.330	0.165	0.218

源存在着一定的遗传差异,这为其育种研究提供了较好的选择基础。

分析结果显示,各来源地样品之间的相似性系数值在 0.496~0.880,平均相似系数为 0.680,系统聚类树矩阵和距离矩阵的相关度可信度较高(Mat 检测相关系数 $r=0.748$),遗传距离(1-*S*)的极值间差距不大(0.384),这与 SRAP 多

态性分析结果相符。系统聚类(图 2)在相似系数 0.699 0 处将样品聚为三大类:1~9 号为第Ⅰ类,该类含攀枝花市区域样品(除 6 样)和与该区域地理位置相近的凉山州样品(8、9 号)。凉山州的样品聚为 2 类,第Ⅱ类为 10~11 号,第Ⅲ类为 12~16 号。聚类分析中同一群类中间杂有部分不同地理来源的样品,例如 6 号样品从地理位置的角度更应聚在第Ⅰ类,可见野生金龙胆草样品的分支并未严格按照地理来源划分,遗传多样性虽然与地理位置有很大关系,但植物的亲缘关系具有一定的复杂性,部分样品在自然分化时地理区域的影响小于遗传漂移,不能简单地依据地理位置划分。

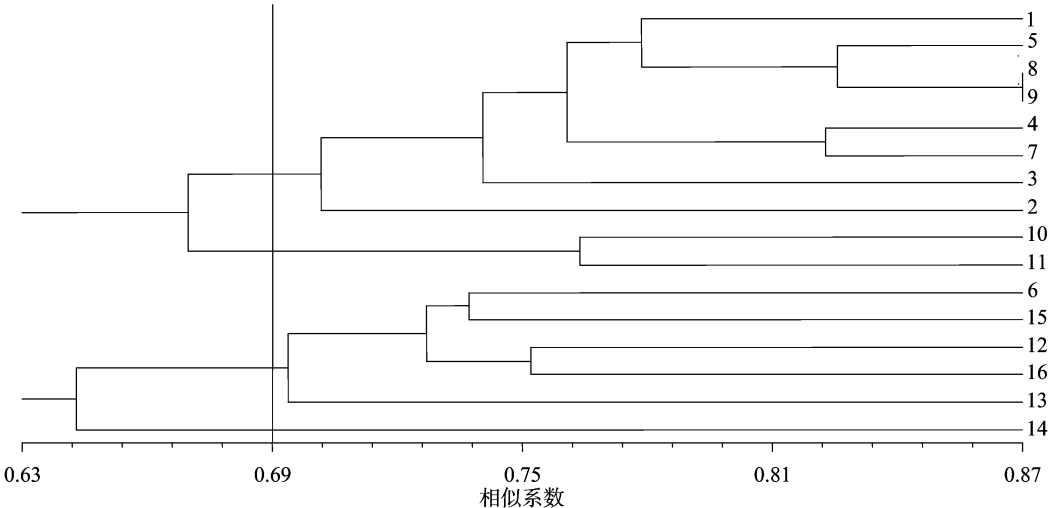


图2 基于 SRAP 标记的 UPGMA 聚类

2.2 有效成分含量测定

表 4 显示,以芸香苷为标准品测得的总黄酮含量普遍较高,平均含量达到 6.31%;而以齐墩果酸为标准品测得的总皂苷含量居群间差异不大,平均含量为 0.77%,与早前文献报道结果符合;高效液相色谱法测得的苦蒿素含量较早前文献[10]相比含量普遍较高,平均值为 0.80%,均远超出 2015

版《中华人民共和国药典》中对金龙胆草药材所作出的质量要求(>0.3%)。本次 3 种主要成分含量的试验测试结果比之前文献资料中的含量都高,可能是因为本试验立足产地,使用的均是新鲜植物材料,避免了长途运输、存放时长等不利因素带来的差异。

2.3 有效成分的相关性和聚类分析

攀西地区野生金龙胆草有效成分含量相关性分析基于 16 个来源地样品中的总黄酮、总皂苷和苦蒿素这 3 种有效成分含量,结果(表 5)显示所测有效成分含量间相互存在正相关关系($r>0$),其中只有总黄酮和苦蒿素的含量存在较显著相关性($P<0.05$)。由图 3 可以看出,当聚类欧氏距离<15 时,不同来源样品被分为 4 类,其中有效成分含量较为接近的 6、7、9、10、15、16 号聚为Ⅰ类,但该类海拔和地理位置均有差异;3 号独自聚为Ⅱ类,2 号和 8 号聚为Ⅲ类,这 2 类的所在地均具有较高的海拔(>2 000 m),且所测成分含量都不高;1、4、5、11~14 聚为Ⅳ类,其特征为采样点海拔均<2 000 m。

表4 金龙胆草 3 种主要成分含量测定结果($n=3$)

编号	各主要成分的含量(%)		
	总黄酮	总皂苷	苦蒿素
1	5.00	0.93	0.68
2	7.53	0.92	0.85
3	6.29	0.93	1.19
4	5.99	0.91	0.59
5	6.11	0.79	0.68
6	7.03	0.61	0.83
7	7.10	0.70	1.00
8	7.24	1.04	0.62
9	6.09	0.73	0.89
10	7.27	0.67	0.96
11	5.35	0.75	0.62
12	5.54	0.64	0.65
13	5.32	0.61	0.62
14	4.66	0.57	0.56
15	7.19	0.74	0.99
16	7.19	0.74	0.99

表5 金龙胆草有效成分相关性分析

有效成分	总黄酮含量		总皂苷含量		苦蒿素含量	
	Pearson 相关性	<i>P</i> 值	Pearson 相关性	<i>P</i> 值	Pearson 相关性	<i>P</i> 值
总黄酮含量	1.000		0.249	0.353	0.575	0.020
总皂苷含量	0.249	0.353	1.000		0.076	0.780
苦蒿素含量	0.575	0.020	0.076	0.780	1.000	

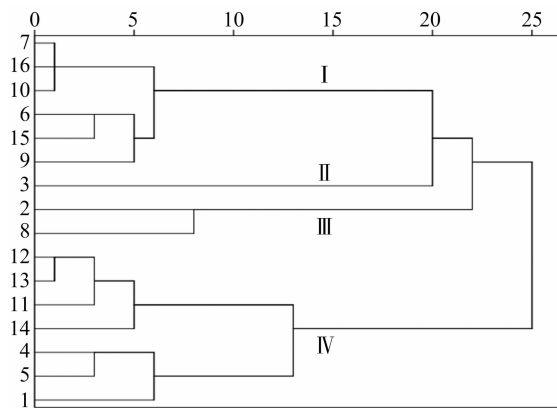


图3 基于主要成分含量的聚类

由于攀西地区土地面积并不大,气候差异较多地体现在海拔不同,样品间差异不太明显,使得聚类结果和地理分布没有太大相关性。以主要成分含量为考查指标可以看出,7号样品(攀枝花机场路样品)具有高出各样品平均水平的有效成分,其与处于最低水平的14号样品(凉山州西昌市)来自几乎同样的海拔高度,这说明海拔不是金胆草药材优劣的主要影响因素,气候和土壤环境等生态因子更值得考量,这一结果可指导后续选育研究时可用7号样品所在地为研究对象进行深入的生态因子研究,摸索出最佳的金胆草栽培生境。

3 讨论

分光光度法和高效液相色谱法都是植物次生代谢物含量研究的常用方法^[11-13],分光光度法有较大的背景干扰,对测定单一成分存在误差,高效液相色谱法能较准确分析单组分含量,但无法全面反映一类物质的总量。因此,本研究分别采用分光光度法测定金胆草总黄酮和总皂苷的含量,采用高效液相色谱法测定苦蒿素成分的含量。分光光度法测量总黄酮时,显色反应发生在邻二酚羟基、3-羟基-4-酮基、5-羟基-4-酮基部位,不发生在-羰基、5-羟基部位^[14-15],因此具备此母核的黄酮类成分均能被检测到。金胆草总黄酮类成分主要为此结构,含有少量的槲皮素和山奈酚,不具备上述结构,可能无法计入总量^[15],但由于这2种成分在金胆草中含量极少,对结果影响不大,因此使用芸香苷为标准品可满足金胆草总黄酮的检测需求。金胆草皂苷以齐墩果烷型三萜皂苷为主,因此使用齐墩果酸为标准品,采取经典醋酸-香草醛-高氯酸显色法进行检测也具备准确性和代表性。

4 结论

本研究对攀西地区野生金胆草的16个主要居群进行SRAP遗传多样性分析,并检测了样品间总黄酮、总皂苷和苦蒿素含量。结果显示,金胆草在攀西地区遗传多样性并不丰富,这可能与该植物还是以野生为主、区域间流动较小有关。对金胆草主产区不同来源样品的有效成分相关性分析结果显示,成分含量均为正相关,但除苦蒿素和总黄酮外,其余成分间相关性不显著($P > 0.05$)。以成分含量进行的聚类

分析结果和分子标记结果相比较,显示成分的含量高低与遗传关系聚类有一定相关性,如2种分析下11~14号样都聚为一类,但有效成分的积累可能与生态因子更为相关,这也符合其他学者提出的中药材道地性与其生物学基础相关性的假说^[16-18]。要深入研究本药用植物,还须在今后的研究中对金胆草生境的影响因子如温度、湿度、光照、土壤成分等进行详细测量,与本试验数据相结合,以便获得全方位的植物生长信息参数。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005:338.
- [2] 苏艳芳,陈磊,罗洋,等. 金胆草化学成分及其抗溃疡活性研究(I)[J]. 中草药,2007,38(3):332-334.
- [3] 徐丽萍,刘建生. 金胆草的化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志,1998,23(9):293-295.
- [4] Yang C R, He Z T, Li X C, et al. Blinin, a neoclerodane diterpene from *Conyza blinii* [J]. Phytochemistry, 1989, 28(11):3131-3134.
- [5] Ma L, Liu H, Qin P, et al. Saponin fraction isolated from *Conyza blinii* H. Lév. demonstrates strong anti-cancer activity that is due to its NF- κ B inhibition [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 483(1):779-785.
- [6] 刘珊,高玉莲,孙蓉,等. 金胆草 SRAP 银染反应体系的建立与优化[J]. 广东农业科学,2014,41(1):121-126.
- [7] 刘珊,胡洪利,陈惠. 响应面法优化金胆草总黄酮的超声波提取工艺研究[J]. 河南农业科学,2013,42(1):148-151,159.
- [8] 刘珊. 攀西金胆草种质资源及其查尔酮合酶基因和 β -香树酯合酶基因的克隆研究[D]. 雅安:四川农业大学,2014.
- [9] 孙蓉. 金胆草苦蒿素途径两个关键酶基因的克隆以及表达分析[D]. 雅安:四川农业大学,2014.
- [10] 王瑞,李文艳,徐红,等. 金胆草药材质量标准研究[J]. 中药材,2010,33(6):884-886.
- [11] 梁永锋. 桃花中黄酮含量的测定及超声波辅助下提取工艺优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):329-331.
- [12] 牛艳,王晓菁,王彩艳,等. 铁、铜配施对宁夏枸杞中有效成分、微量元素积累的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):228-230.
- [13] 查冲,杜亚填,刘磊磊,等. 南方红豆杉枝叶中 10-DAB Ⅲ 与紫杉醇 HPLC 检测及检测样的制备[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):140-145.
- [14] 胡冠时,姜淑琴,杨进. 黄酮化合物的邻位二羟基显色反应的探讨[J]. 中国药理学杂志,1980,15(5):2-3.
- [15] 郭亚健,范莉,王晓强,等. 关于 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2):97-99.
- [16] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说[J]. 中国中药杂志,2004,29(6):494-496.
- [17] 郑司浩. 中药道地性生物学机制研究[D]. 北京:北京协和医学院,2016.
- [18] 袁媛,魏渊,于军,等. 表观遗传与药材道地性研究探讨[J]. 中国中药杂志,2015,40(13):2679-2683.