



云南重楼ITS序列单核苷酸多态性与甾体皂苷特征的相关性分析

尹鸿翔, 张开元, 任梓萱, 赵家雯, 蒋桂华, 陈蓉

引用本文:

尹鸿翔,张开元,任梓萱,赵家雯,蒋桂华,陈蓉. 云南重楼ITS序列单核苷酸多态性与甾体皂苷特征的相关性分析[J]. [热带亚热带植物学报](#), 2022, 30(5): 676–686.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4494>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[绵萆三萜皂苷类成分研究](#)

Triterpenoid Saponins from the Rhizome of *Dioscorea spongiosa*

热带亚热带植物学报. 2016, 24(5): 589–594 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.05.016>

[二年生三七农艺和质量性状对环境光强的响应特征](#)

Agronomic and Quality Traits of Two-year-old *Panax notoginseng* Response to Environmental Light Intensity

热带亚热带植物学报. 2018, 26(4): 375–382 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3844>

[药用植物华重楼\(黑药花科\)叶绿体全基因组研究](#)

Complete Chloroplast Genome of the Medicinal Plant *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Melanthiaceae)

热带亚热带植物学报. 2015(6): 601–613 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.06.001>

[紫菀根的结构与主要药用成分积累研究](#)

Studies on Structure and Accumulation of Main Chemical Constituents of *Aster tataricus* L.f. Roots

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 98–104 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3621>

[杭白菊花水提物的UHPLC-ESI-Orbitrap质谱联用分析](#)

Chemical Constituents of Water Extract from *Chrysanthemum morifolium* Flowers by UHPLC-ESI-Orbitrap MS

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 96–104 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4256>

[向下翻页，浏览PDF全文](#)

云南重楼 ITS 序列单核苷酸多态性与甾体皂苷特征的相关性分析

尹鸿翔¹, 张开元², 任梓萱¹, 赵家雯¹, 蒋桂华¹, 陈蓉^{1*}

(1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 彭州 611930)

摘要: 为了解云南重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*) ITS 序列的单核苷酸多态性(SNP)特征与其甾体皂苷构成特征的相关性, 并探讨其对药材质量稳定性的影响, 利用 MegAlign 软件对 37 份云南重楼样本的 ITS 序列进行对比, 根据 SNP 位点进行分型; 采用 HPLC 法测定 7 种甾体皂苷成分(重楼皂苷I、II、V、VI、VII、H 和薯蓣皂苷); 用 SPSS 25.0 软件和 SIMCA-P 15.0 软件对各基因型甾体皂苷构成特征进行统计分析。结果表明, 云南重楼 ITS 序列存在 40 个双等位多态性位点, 其中碱基转换 32 个, 碱基颠换 8 个, 根据 SNP 特征可划分为 2 类基因型 YN-I 和 YN-II。6 种甾体皂苷(重楼皂苷I、II、VI、VII、H、薯蓣皂苷)在云南重楼广泛分布, 而重楼皂苷V稀少。YN-I 和 YN-II 的药典指标成分总含量分别为 1.070%和 0.93%, 样本合格率分别为 68.42%和 77.78%; YN-I 的甾体皂苷总含量为 1.65%, YN-II 为 1.32%。方差分析表明, 2 类基因型的甾体皂苷特征存在一定程度的区别, 但药典指标成分无显著差异, 药材应该具有等效性。聚类分析和主成分分析表明, YN-I 的离散度更高, YN-II 的聚集度更好, 表明 YN-II 的药材质量更加稳定, 植株个体的甾体皂苷合成和累积差异更小, YN-II 的 SNP 特征对云南重楼良种选育的分子遗传标记筛选具有重要意义。

关键词: 云南重楼; ITS; 单核苷酸多态性; 基因型; 甾体皂苷

doi: 10.11926/jtsb.4494

Correlation Analysis Between Single Nucleotide Polymorphism of ITS Sequences and Profile of Steroidal Saponins Composition of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

YIN Hongxiang¹, ZHANG Kaiyuan², REN Zixuan¹, ZHAO Jiawen¹, JIANG Guihua¹, CHEN Rong^{1*}

(1. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Tradition Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co. Ltd., Pengzhou 611930, Sichuan, China)

Abstract: In order to understand the correlation between characters of single nucleotide polymorphism (SNP) of internal transcribed spacer (ITS) sequences and composition of steroidal saponins of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, the effect of SNP on the quality stability of medicinal materials, the ITS sequences of 37 samples were compared by MegAlign, and then classified according to SNP loci. In addition, 7 steroidal saponins (polyphyllin I, II, V, VI, VII, H, dioscin) in samples were determined by HPLC-DAD. The steroidal saponin composition characteristics of each genotype were statistical analysis by SPSS 25.0 & SIMCA-P 15.0. The results showed that there were 40 double-allelic polymorphic sites in ITS sequences of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*,

收稿日期: 2021-08-05

接受日期: 2021-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573545); 成都市科技局技术创新研发项目(2019-YF05-00346-SN); 成都中医药大学杏林学者学科人才计划项目(QNXZ2018039)资助

This work was supported by National Sciences Foundation of China (Grant No. 81573545); the Project for Technology Innovation and Research and Development of Chengdu Science and Technology Bureau (Grant No. 2019-YF05-00346-SN); and the Program for Apricot Grove Scholars of Chengdu University of TCM (Grant No. QNXZ2018039).

作者简介: 尹鸿翔, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药及民族药资源可持续利用及质量评价。E-mail: hongxiangy@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 498064364@qq.com

including 32 base conversion sites and 8 base inversion sites. According to SNP characteristics, 37 samples were divided into two genotypes: YN-I and YN-II. Six kinds of steroidal saponins (polyphyllin I, II, VI, VII, H, dioscin) were widely distributed in samples, while polyphyllin V was relatively rare. The mean total content of pharmacopoeia index components in YN-I and YN-II were 1.070% and 0.93%, which the sample pass rate were 68.42% and 77.78%, respectively. The mean total content of 7 steroidal saponins were 1.65% and 1.32%, respectively. ANOVA analysis showed that there was significant differentiation of steroidal saponins profile between two genotypes, while there was no significant difference in the index components of pharmacopoeia, so the medicinal value of two genotypes should be equivalent. Cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA) showed the dispersion of YN-I was higher than that of YN-II, indicating the quality of medicinal materials of YN-II was more stable and the individual differences in steroidal saponins synthesis and accumulation in YN-II was smaller than YN-I. Therefore, the SNP characteristics of YN-II were of great significance for the screen of molecular genetic markers in the breeding of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; ITS; Single-nucleotide polymorphism; Genotypes; Steroidal saponin

云南重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)是重楼属的多年生草本植物, 又名滇重楼, 与七叶一枝花(*P. polyphylla* var. *chinensis*)共同作为中药重楼的法定基原, 收载于《中国药典》^[1]。云南重楼主产于我国西南地区, 随着重楼栽培产业的发展, 因其优良的药材质量, 成为主要的栽培种源^[2]。中药材 DNA 条形码研究表明云南重楼种内遗传变异丰富, ITS 序列存在明显的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)^[3-4], 并由此划分为 2 种基因型(YN-I 和 YN-II)。为了避免 2 种基因型并存导致真伪鉴定结果出现“假阴性”, 开发了同时鉴别 2 种基因型的多重 PCR 鉴别体系^[4]。

然而, 目前尚无报道云南重楼 ITS 序列的 SNP 现象是否会引起植株在化学成分构成上的分化, 进而在种内衍生出不同的化学型? 研究这一问题对于丰富云南重楼种质资源多样性具有重要意义, 并可能发现具有筛选价值的分子遗传标记。同时, 根据 2018 年国家药品监督管理局发布的《中药材生产质量管理规范》(征求意见稿)的要求, 中药材的优良品种选育, 禁用人工选育的多倍体或者单倍体品种、种间杂交品种和转基因品种。因此, 从云南重楼野生种群的自然变异类群中优选良种, 将是未来重楼育种的主要途径, 探索 ITS 区的 SNP 现象与药材质量的关联性将为实现这一目标提供重要参考。

本研究对云南重楼 YN-I 和 YN-II 型植株进行田间观察, 发现形态学特征并无明显的分化^[4]。为进一步了解是否会引起植株化学型的分化, 进而影

响药材质量, 本研究收集了云南重楼不同产区的样品, 根据其 ITS 序列的 SNP 特征进行基因型的鉴别, 然后对不同基因型的 7 种甾体皂苷类成分(重楼皂苷 I、II、V、VI、VII、H、薯蓣皂苷)进行测定, 分析基因型与甾体皂苷构成的相关性, 探讨其对药材质量的影响, 为云南重楼的质量控制和良种选育提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

云南重楼样本共 37 份, 分别于 2019—2021 年采自云南、贵州、四川 3 省的主产区, 根据采集年月编号凭证标本, 样本详细信息见(表 1)。样品经成都中医药大学尹鸿翔副教授进行原植物鉴定, 根据李恒系统, 均符合云南重楼的特征(图 1); 再经 ITS 序列同源性比对鉴定为云南重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*), 凭证标本藏于成都中医药大学标本馆(CDCM)。

1.2 仪器和试剂

Legend Micro 21R 离心机(美国 Thermo); BSA 124S 分析天平(Sartorius 科学仪器有限公司); MK-10 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); PCR 仪(杭州博日科技有限公司); DDY-12 电泳系统(北京六一仪器厂); 激光成像仪 Typhoon 7000 (通用电气医疗集团生命科技部); 微量紫外-分光光度仪(Thermo Nanodrop 2000)。Agilent technologies 1200series

表 1 云南重楼样品

Table 1 Samples of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

序号 No.	编号 Code	基因型 Genotype	采集地点 Collection location	生境 Habitat	凭证标本 Voucher
1	I-1	YN-I	贵州兴义市七舍镇 Qishe Town, Xingyi City, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190702
2	I-2	YN-I	贵州兴义市马岭镇 Maling Town, Xingyi City, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20190703
3	I-3	YN-I	贵州兴义市郑屯镇 Zhengtun Town, Xingyi City, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20190704
4	I-4	YN-I	贵州长顺县广顺乡 Guangshun Township, Changshun County, Guizhou	阔叶林 Broad-leaved forests	20200601
5	I-5	YN-I	贵州长顺县新寨乡 Xinzhai Township, Changshun County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200602
6	I-6	YN-I	贵州长顺县摆塘乡 Baitang Township, Changshun County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200603
7	I-7	YN-I	四川石棉县草科乡 Caoke Township, Shimian County, Sichuan	灌丛 Bushwood	20200501
8	I-8	YN-I	四川石棉县田湾乡 Tianwan Township, Shimian County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200502
9	I-9	YN-I	四川石棉县安顺乡 Anshun Township, Shimian County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200501
10	I-10	YN-I	云南宣威县龙场乡 Longchang Township, Xuanwei County, Yunnan	阔叶林 Broad-leaved forest	20190601
11	I-11	YN-I	云南宣威县来宾乡 Laibin Township, Xuanwei County, Yunnan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190602
12	I-12	YN-I	云南宣威县板桥乡 Banqiao Township, Xuanwei County, Yunnan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190603
13	I-13	YN-I	云南宣威县西泽乡 Xize Township, Xuanwei County, Yunnan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190604
14	I-14	YN-I	贵州六枝县郎岱乡 Langdai Township, Liuzhi County, Guizhou	阔叶林 Broad-leaved forest	20200604
15	I-15	YN-I	贵州省六枝县箐口乡 Qingkou Township, Liuzhi County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200605
16	I-16	YN-I	四川盐源县梅雨镇 Meiyu Town, Yanyuan County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20210601
17	I-17	YN-I	四川盐源县卫城镇 Weicheng Town, Yanyuan County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20210602
18	I-18	YN-I	四川盐源县渔门乡 Yumen Township, Yanbian County, Sichuan	阔叶林 Broad-leaved forest	20210603
19	I-19	YN-I	四川省盐源县白坡乡 Baipo Township, Yanbian County, Sichuan	灌丛 Bushwood	20210604
20	II-1	YN-II	贵州兴义市则戎乡 Zerong Township, Xingyi City, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20190705
21	II-2	YN-II	贵州兴义市顶效乡 Dingxiao Township, Xingyi City, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190706
22	II-3	YN-II	贵州兴义市敬南乡 Jingnan Township, Xingyi City, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190707
23	II-4	YN-II	贵州长顺县广顺乡 Guangshun Township, Changshun County, Guizhou	阔叶林 Broad-leaved forest	20200610
24	II-5	YN-II	贵州长顺县新寨乡 Xinzhai Township, Changshun County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200611
25	II-6	YN-II	四川会理县凤营乡 Fengying Township, Huili County, Sichuan	阔叶林 Broad-leaved forest	20190605
26	II-7	YN-II	四川会理县太平镇 Taiping Town, Huili County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190606
27	II-8	YN-II	四川德昌县永朗乡 Yonglang Township, Dechang County, Sichuan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20190607
28	II-9	YN-II	贵州安顺市幺铺镇 Yaopu Town, Anshun City, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20200612
29	II-10	YN-II	贵州安顺市大山镇 Dashan Town, Anshun City, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20200613
30	II-11	YN-II	贵州安顺市宋旗镇 Songqi Town, Anshun City, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200614
31	II-12	YN-II	云南宣威县龙场乡 Longchang Township, Xuanwei County, Yunnan	阔叶林 Broad-leaved forests	20210605
32	II-13	YN-II	云南宣威县来宾乡 Laibin Township, Xuanwei County, Yunnan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20210606

续表(Continued)

序号 No.	编号 Code	基因型 Genotype	采集地点 Collection location	生境 Habitat	凭证标本 Voucher
33	II-14	YN-II	云南宣威县西泽乡 Xize Township, Xuanwei County, Yunnan	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20210607
34	II-15	YN-II	贵州六枝县郎岱乡 Langdai Township, Liuzhi County, Guizhou	阔叶林 Broad-leaved forest	20200606
35	II-16	YN-II	贵州六枝县箐口乡 Qingkou Township, Liuzhi County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200607
36	II-17	YN-II	贵州六枝县中寨乡 Zhongzhai Township, Liuzhi County, Guizhou	针阔混交林 Coniferous-broadleaf mixed forest	20200608
37	II-18	YN-II	贵州六枝县岩脚乡 Yanjiao Township, Liuzhi County, Guizhou	石灰岩灌丛 Limestone bushwood	20200609



图 1 云南重楼。A: YN-I 型; B: YN-II 型。

Fig. 1 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. A: YN-I genotype; B: YN-II genotype.

高效液相色谱仪(DAD 检测器), 色谱柱 COSMOSIL Cholesterol RP-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), BP121S 电子分析天平(万分之一), ULUP-I-10T 优普超纯水机(成都超纯有限公司), SB-5200D 超声波清洗器(宁波新艺超声设备有限公司), SHZ-DIII型循环水式多用真空泵(上海一科仪器有限公司), BCD-202D 型冰箱(北京海信电器), DTF-100A 型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司), DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司), 101-3-BS 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

琼脂糖(广州赛国生物科技有限公司), Goldview I 型核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司), Easy Taq DNA 聚合酶, 10×EasyTaq Buffer (Mg²⁺ plus) (北京全式金生物技术有限公司), DNA Marker-B, dNTPs Mixture Solution (生工生物工程股份有限公司), 植物组织 DNA 提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司), α-高聚淀粉酶(思科生物科技有限公司)。色谱纯乙腈(TEDIA), 超纯水, 分析纯乙醇为(Fisher), 重楼皂苷 I (批号: 111590-201604, 纯度 93.6%)、II (批号: 111591-201103, 纯度 93.4%)、VI (批号: 111592-201604, 纯度 98.0%)、VII (批号: 111593-201604, 纯

度 94.0%)均购自于中国食品药品检定研究院; 薯蓣皂苷(批号: 19057-60-4)购于上海甄准生物科技有限公司。重楼皂苷 H (纯度 98.3%)、V (纯度 97.1%)由本课题组制备^[5]。

1.3 单核苷酸多态性分析

参照张开元等^[4]的方法, 采用 ITS 序列通用性引物 ITS-4/ITS-L 对 37 份样本进行扩增, 扩增产物送成都擎科梓熙生物科技有限公司测序, 利用 Megalign 软件对测序结果进行校对与分析, 找出具有稳定差异的 SNP 位点, 然后进行基因分型。

1.4 甾体皂苷构成特征分析

采用李朋等^[5]的方法, 对 37 份样品的 7 种甾体皂苷含量进行测定, 平行测定 3 次, 取平均值, 完成定性、定量对比分析。根据《中国药典》一部重楼项下含量测定标准^[1]进行合格率评价。

1.5 聚类分析和主成分分析

采用 SPSS 25.0 基于平均联结(组间)谱系图法对样本的甾体皂苷构成特征进行聚类分析(CA), 采用 SIMCA-P 15.0 软件进行主成分分析(PCA)。

2 结果和分析

2.1 SNP 和基因型划分

采用 Megalign 软件对 37 份样本的 ITS 序列进行校对, 扩增的 ITS 序列包含 ITS1、5.8s rDNA 和 ITS2 等 3 个片段。SNP 有 40 个位点, 其中 ITS1

区有 SNP 位点 18 个, 5.8s rDNA 区 1 个, ITS2 区 21 个。40 个位点均为双等位多态性, 其中发生碱基转换的有 32 个, 碱基颠换的有 8 个(表 2)。依据 SNP 位点多样性可以划分为 2 种基因型, 分别编号为 YN-I 和 YN-II, 其中 YN-I 型有 19 份(1~19 号), YN-II 型 18 份(20~37 号)。

表 2 云南重楼 ITS 区的 SNP 位点特征

Table 2 SNP characteristics of ITS of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

基因型 Genotype	SNP 位点 SNP locu											分区 Region
	9	10	34	36	42	55	62	93	127	131	180	ITS1
YN-I	T	G	C	T	C	T	A	C	G	A	T	
YN-II	C	T	T	C	T	C	G	T	A	T	C	
	183	193	197	201	211	212	223					
YN-I	G	A	C	C	A	T	C					
YN-II	A	G	T	T	C	C	T					
	395											5.8S rDNA
YN-I	T											
YN-II	C											
	411	412	413	439	443	462	471	476	482	500	520	ITS2
YN-I	G	C	G	G	A	T	G	T	C	C	G	
YN-II	A	T	A	A	G	C	A	C	T	T	T	
	521	526	527	594	596	599	604	612	615	622		
YN-I	T	G	G	A	G	A	A	G	C	T		
YN-II	G	C	A	G	C	G	G	T	T	C		

灰色底纹为碱基颠换, 其余为碱基转换。

Gray shading indicate base transversion and the rest indicates base transition.

2.2 甾体皂苷构成特征分析

以 7 种甾体皂苷对照品的进样量(μg)为横坐标, 色谱峰峰面积(A)为纵坐标, 绘制对照品的标准曲线, 拟合回归方程。7 种甾体皂苷色谱峰面积的 RSD 为 0.316 5%~1.261 4%, 表明方法的精密度良好; 重复性试验的 RSD 为 0.613 6%~2.115 5%, 表明重复性良好; 且对照品和供试品溶液中 7 种甾体皂苷在 24 h 内基本稳定; 7 种甾体皂苷的平均加样回收率为 99.71%~99.60%, 均符合测定要求。

37 份样品的测定结果见表 3, 7 种甾体皂苷对照品、YN-I 型和 YN-II 型的 HPLC 特征见图 2。根据 2020 年版《中国药典》一部重楼项下规定, 重楼皂苷 I、II、VII 之和不少于 0.6% 评价合格率。从表 3 可见, 重楼皂苷 I、II、VI、VII、H 和薯蓣皂苷等 6 种甾体皂苷在云南重楼中广泛分布, 但重楼皂苷 V 较稀少, 37 份样品中仅有 8 份出现。除样品 1、2、3、4、5、6、24、28、31 和 34 外, 其余 27 个样品均达到《中国药典》的含量标准, 整体合

格率达 72.97%, 其中 YN-I 型的合格率为 68.42%, YN-II 型为 77.78%。YN-I 型的药典指标成分总含量平均为 1.070%, YN-II 型为 0.93%; YN-I 型的 7 种甾体皂苷总含量平均为 1.65%, YN-II 型为 1.32%。以基因型为影响因素, 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 结果表明 YN-I 型和 YN-II 型的药典指标成分含量无显著差异($P>0.05$), 但 7 种甾体皂苷总含量有显著差异($P<0.05$), 说明 2 类基因型的甾体皂苷构成存在一定的分化。

2.3 聚类分析

采用 SPSS 25.0 软件对 37 批样品的甾体皂苷构成特征进行聚类分析, 构建树状聚类图(图 3)。当相似性距离为 5~10 时, 37 个样品聚为 4 支, 其中 I-14、I-15 聚为第 1 支(A); I-8、I-18、I-19 聚为第 2 支(B); II-8 独立成第 3 支(C); 其余 31 个样品聚为第 4 支(D)。第 4 支成员众多, 当相似性距离 <5 时明显分为 2 个亚支, I-16、II-3、II-4、II-11、II-16 和 II-18

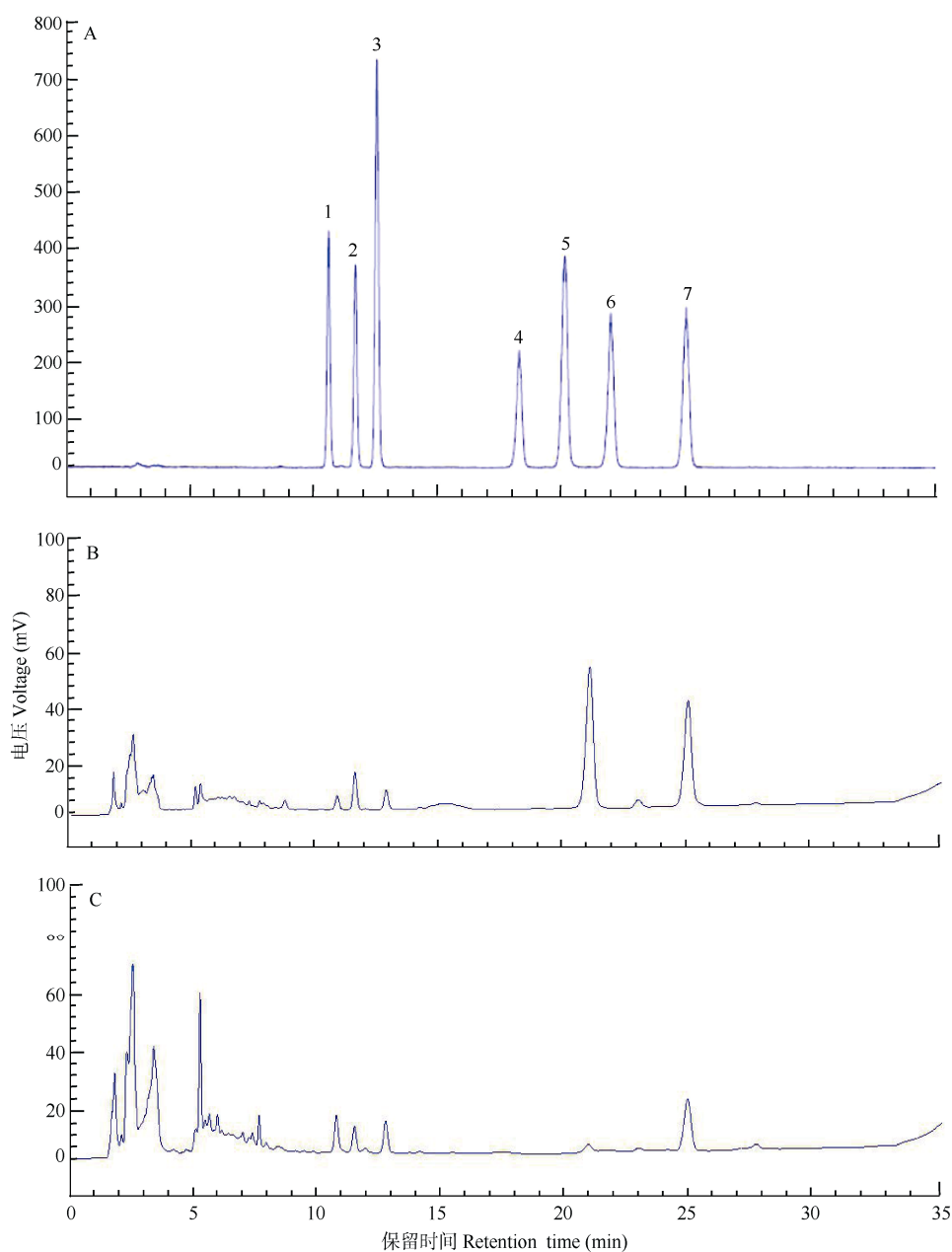


图 2 云南重楼和对照品 HPLC 图。A: 7 种甾体皂苷对照品; B: YN-I 型; C: YN-II 型; 1: 重楼皂苷 VII; 2: 重楼皂苷 H; 3: 重楼皂苷 VI; 4: 重楼皂苷 II; 5: 薯蓣皂苷; 6: 重楼皂苷 I; 7: 重楼皂苷 V。

Fig. 2 HPLC chromatograms of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and reference substance. A: 7 Steroidal saponins; B: YN-I; C: YN-II; 1: Polyphyllin VII; 2: Polyphyllin H; 3: Polyphyllin VI; 4: Polyphyllin II; 5: Dioscin; 6: Polyphyllin I; 7: Polyphyllin V.

表 3 样品的甾体皂苷成分含量

Table 3 Steroid saponin contents in samples

序号 No.	编号 Code	重楼皂苷 VII Polyphyllin VII /%	重楼皂苷 H Polyphyllin H /%	重楼皂苷 VI Polyphyllin VI /%	重楼皂苷 II Polyphyllin II /%	薯蓣皂苷 Dioscin /%	重楼皂苷 I Polyphyllin I /%	重楼皂苷 V Polyphyllin V /%	I+II+VII ^[1] /%	总皂苷 Total /%
1	I-1	0.061±0.002	0.050±0.001	0.039±0.001	0.124±0.003	-	0.162±0.004	-	0.346±0.010	0.435±0.011
2	I-2	0.275±0.003	0.048±0.002	0.108±0.003	0.141±0.004	-	0.062±0.002	-	0.478±0.012	0.633±0.014
3	I-3	0.193±0.003	0.112±0.002	0.082±0.001	0.148±0.002	-	0.150±0.003	-	0.491±0.009	0.686±0.011
4	I-4	0.050±0.001	0.466±0.003	0.437±0.003	-	-	-	-	0.050±0.001	0.952±0.007
5	I-5	0.189±0.002	0.581±0.004	0.384±0.002	-	-	-	-	0.189±0.002	1.153±0.008

续表(Continued)

序号 No.	编号 Code	重楼皂苷 VII Polyphyllin VII /%	重楼皂苷 H Polyphyllin H /%	重楼皂苷 VI Polyphyllin VI /%	重楼皂苷 II Polyphyllin II /%	薯蓣皂苷 Dioscin /%	重楼皂苷 I Polyphyllin I /%	重楼皂苷 V Polyphyllin V /%	I+II+VII ^[1] /%	总皂苷 Total /%
6	I-6	0.074±0.001	0.326±0.002	0.536±0.004	-	-	-	-	0.074±0.001	0.936±0.007
7	I-7	0.487±0.004	0.065±0.002	-	0.424±0.004	-	0.102±0.002	-	1.013±0.010	1.078±0.012
8	I-8	0.116±0.003	0.104±0.002	0.037±0.002	1.214±0.012	0.708±0.010	0.902±0.009	0.227±0.002	2.233±0.026	3.308±0.030
9	I-9	0.682±0.005	0.053±0.002	0.041±0.002	0.272±0.005	-	0.338±0.004	-	1.292±0.016	1.386±0.018
10	I-10	0.694±0.007	0.034±0.001	0.043±0.003	0.409±0.004	-	0.284±0.003	-	1.388±0.017	1.465±0.018
11	I-11	0.674±0.009	0.032±0.002	0.033±0.001	0.064±0.002	-	-	0.182±0.003	0.739±0.012	0.985±0.017
12	I-12	0.447±0.008	-	-	0.190±0.005	-	0.102±0.003	-	0.738±0.016	0.738±0.016
13	I-13	0.245±0.007	0.054±0.002	0.063±0.003	0.061±0.002	0.133±0.003	0.414±0.005	-	0.721±0.017	0.970±0.022
14	I-14	0.211±0.004	0.036±0.001	0.057±0.002	0.144±0.003	2.187±0.023	0.360±0.003	-	0.715±0.012	2.994±0.036
15	I-15	0.289±0.005	0.048±0.002	0.041±0.002	0.281±0.006	1.701±0.013	1.229±0.007	0.051±0.002	1.799±0.020	3.640±0.037
16	I-16	0.073±0.002	0.096±0.003	0.184±0.005	0.362±0.009	0.125±0.004	0.837±0.011	-	1.272±0.027	1.676±0.030
17	I-17	0.236±0.005	0.091±0.002	0.057±0.002	0.507±0.010	0.238±0.004	0.304±0.005	-	1.047±0.022	1.433±0.028
18	I-18	0.107±0.003	0.203±0.005	0.108±0.004	1.861±0.017	0.081±0.002	1.355±0.012	-	3.323±0.036	3.715±0.043
19	I-19	0.345±0.009	0.430±0.006	0.233±0.005	1.036±0.009	0.164±0.004	1.054±0.015	-	2.434±0.038	3.261±0.048
20	II-1	0.556±0.010	0.169±0.005	0.094±0.002	-	-	0.372±0.006	-	0.928±0.018	1.190±0.023
21	II-2	0.231±0.006	0.168±0.004	0.094±0.002	0.163±0.003	-	0.437±0.005	-	0.830±0.016	1.092±0.020
22	II-3	0.444±0.008	0.095±0.002	0.059±0.001	0.276±0.004	0.056±0.002	0.928±0.010	-	1.649±0.023	1.859±0.027
23	II-4	0.166±0.004	0.480±0.009	0.223±0.005	0.268±0.006	0.131±0.005	0.910±0.012	0.057±0.002	1.344±0.027	2.235±0.042
24	II-5	0.123±0.003	0.339±0.005	0.266±0.004	-	-	0.215±0.004	-	0.339±0.007	0.943±0.016
25	II-6	0.282±0.005	0.134±0.003	0.151±0.002	0.069±0.001	-	0.580±0.009	0.083±0.001	0.932±0.017	1.299±0.021
26	II-7	0.433±0.007	0.202±0.003	0.172±0.002	-	0.124±0.002	0.283±0.003	-	0.715±0.012	1.213±0.017
27	II-8	0.928±0.011	0.280±0.002	0.086±0.001	0.191±0.002	0.894±0.007	-	-	1.119±0.014	2.379±0.023
28	II-9	0.226±0.003	0.088±0.002	0.053±0.002	0.074±0.001	-	0.266±0.004	-	0.566±0.010	0.707±0.012
29	II-10	0.307±0.003	0.301±0.002	0.085±0.001	0.102±0.002	-	0.608±0.004	-	1.017±0.010	1.404±0.012
30	II-11	0.291±0.002	0.137±0.001	0.089±0.001	0.086±0.001	0.111±0.002	0.833±0.004	-	1.210±0.008	1.546±0.011
31	II-12	0.111±0.001	0.032±0.001	0.027±0.002	0.135±0.002	0.090±0.001	0.197±0.002	-	0.442±0.007	0.591±0.009
32	II-13	0.253±0.002	0.046±0.001	0.028±0.001	0.103±0.002	0.064±0.002	0.388±0.003	-	0.744±0.008	0.881±0.011
33	II-14	0.225±0.002	0.030±0.001	0.034±0.001	0.201±0.003	0.071±0.001	0.224±0.003	-	0.650±0.009	0.786±0.011
34	II-15	0.339±0.003	0.042±0.001	0.047±0.001	-	0.599±0.007	0.159±0.002	-	0.498±0.006	1.186±0.014
35	II-16	0.222±0.002	0.117±0.001	0.112±0.002	0.298±0.003	-	1.184±0.012	0.057±0.002	1.704±0.019	1.990±0.020
36	II-17	0.141±0.002	0.135±0.002	0.115±0.001	0.127±0.002	-	0.525±0.004	0.041±0.001	0.794±0.008	1.084±0.011
37	II-18	0.079±0.002	0.111±0.002	0.102±0.001	0.214±0.002	-	0.921±0.007	0.034±0.001	1.214±0.011	1.460±0.014

聚为一亚支(D-1),其中 YN-I型 1 个和 YN-II型 5 个;其余 25 个样品聚为另一亚支(D-2),包括 YN-I型 13 个和 YN-II型 12 个。可见,不同基因型的样品可以聚类到同一分支中(如 D-1 和 D-2)。

产地对甾体皂苷构成特征具有一定程度的影响,A 支的I-14、I-15 均来自贵州六枝;II-8 是唯一的单独产地样品(四川德昌),独立成 C 支;I-4、I-5、I-6 和II-5 虽然分属 2 个基因型,但均来自贵州长顺而聚在一起。

2.4 主成分分析

采用 SIMCA-P 15.0 软件对 37 份样品的甾体皂

苷含量进行主成份分析(PCA),标定了 3 个主成份,分别绘制了基于 2 个主成分的二维得分图(图 4: A)和基于 3 个主成分的三维投影图(图 4: B)。从图 4 可见,37 个样品的甾体皂苷成分构成特征虽无明显的基因型分化,但仍然表现出一定程度的影响,图 3 中聚在一起 I-4、I-5、I-6 和 II-5 等 4 份样品在图 4: A 中出现了分化,前三者仍然聚为一簇,但和 II-5 明显分离。另外,YN-I样品的离散度较高,而 YN-II样品的聚集度更好,其中I-8 号和I-18 号样品在 Hotelling's T² (95%)下甚至表现为强异常值;这一特征也进一步在图 4: B 的三维投影图中得到体现。

同时,地理位置对甾体皂苷构成特征同样表

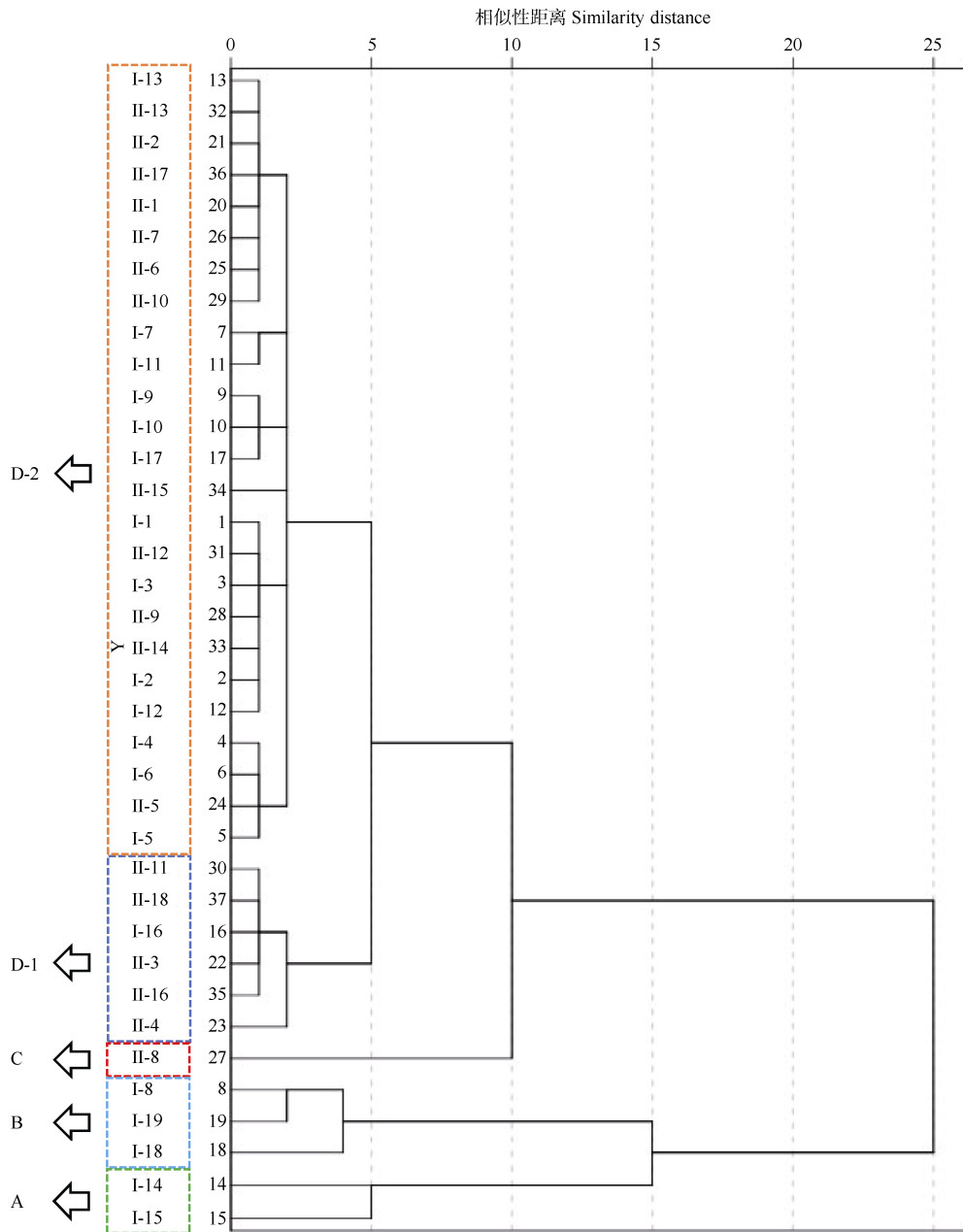


图 3 基于甾体皂苷特征的聚类图

Fig. 3 Dendrogram based on steroid saponin characters

现出一定影响, 在图 4: A 中, I-1、I-2 和 I-3 号样品(均来自贵州兴义)明显聚集, I-4、I-5 和 I-6 号样品(均来自贵州长顺)明显聚集, 和图 3 的聚类分析结果一致; II-12、II-13 和 II-14 (均来自云南宣威)明显聚集, 在图 4: B 中, 单一产地样品 II-8 (四川德昌)明显偏离其他样品, 也和图 3 的聚类结果一致。

3 结论和讨论

重楼栽培种的种内甾体皂苷特征被相继报道^[5-6],

对云南重楼的种内变异研究涉及了分子遗传标记、形态学特征及其与甾体皂苷类成分的关联性^[7-11], 然而遗传多样性与甾体皂苷特征的相关性却未见报道。本研究首次报道了云南重楼 ITS 序列的 SNP 特征和甾体皂苷类成分的相关性。结果表明, 重楼皂苷 V 的分布稀少, 与吴钰颖等^[12]的报道相似, 这应该是重楼皂苷 V 没有纳入《中国药典》含量指标的原因之一。2 个基因型在《中国药典》合格率上有一定差异, YN-II 型 > YN-I 型, 但是 7 种甾体皂苷总含量上 YN-I 型却显著大于 YN-II 型。二者在这两

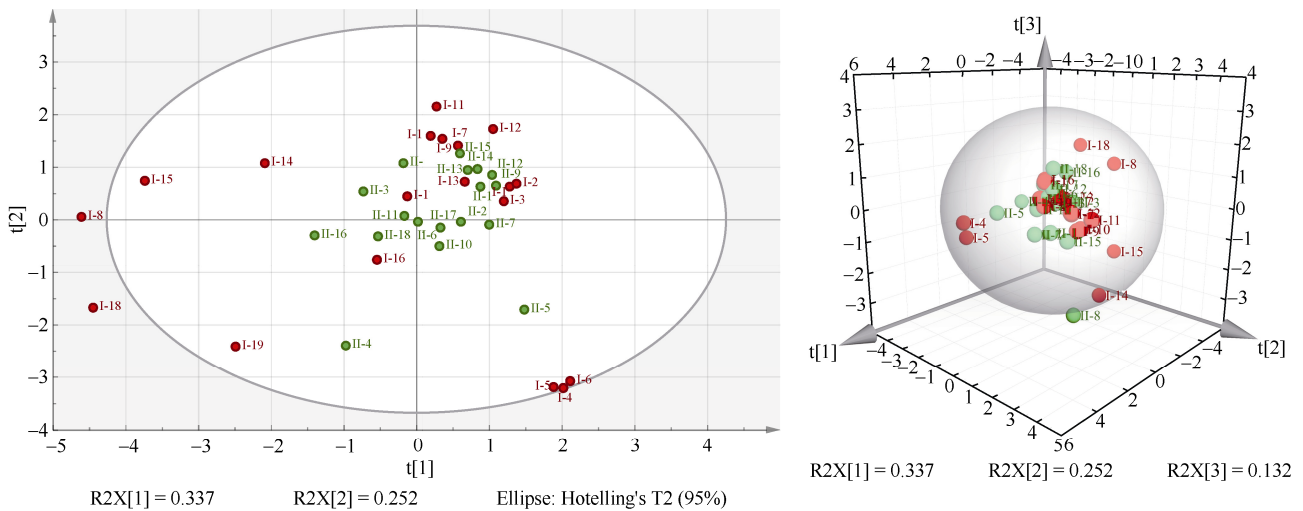


图4 主成分分析。A: 二维得分图; B: 三维投影图。

Fig. 4 Principal component analysis. A: Two dimensional drawing; B: Three dimensional drawing.

项指标的不同反差提示, YN-II型在甾体皂苷合成与累积方面个体差异小, 更加稳定一致。PCA 分析表明, YN-II样品的聚集度更好, YN-I样品的离散度更高, 也印证了上述推测。究其原因, 虽然绝大多数 SNP 存在于非编码区(ITS1 和 ITS2), 但 5.8S rDNA 区的 SNP 却可能会影响核糖体的转运功能, 进而影响甾体皂苷累积的稳定性。这是否对已知的甾体皂苷合成途径及关键酶基因的表达产生影响, 如甲羟戊酸途径(MVA)^[13-14]、鲨烯合酶(SQS)^[15]、鲨烯环氧酶(SE)^[16]、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶(MVD)^[17]、环阿屯醇合酶(CAS)^[18]、细胞色素 P450 单加氧酶^[19]等, 还需要进一步验证。另外, 参考华重楼基因组结构^[20]对 2 类基因型的叶绿体基因组进行分析, 探讨光合作用效率是否影响皂苷合成也是一个探索方向, 在云南重楼良种选育的遗传标记筛选中具有独特价值。

相对于基因型, 地理位置对甾体皂苷构成特征具有更明显的影响, 出现了 3 类现象: (1) 产地相同的样品聚在一起, 甚至单独产地样品独立成一支(如 II-8); (2) 不同产地样品聚在一起; (3) 相同产地样品不聚在一起。究其原因, 甾体皂苷作为次生代谢产物, 其合成与累积也受到环境因子的调控, 相同的地理位置往往具有相似的生态环境, 导致相似的化学特征, 因此聚在一起, 特殊生境的植株甚至独立成支。同理, 不同产地的植株若小生境相似, 也可能聚在一起; 反之, 产地相同但是小生境差异较大, 植株化学特征则必然分化^[21]。这提示, 地理位置及其小生境对于甾体皂苷构成具有明显的影响, 为保证重楼药材质量稳定, 一定要选择生态适

宜区并保持种植地的小生境一致。

综上, 云南重楼 YN-I型和 YN-II型的甾体皂苷构成特征存在一定程度分化, 但药典指标成分仍无显著性差异, 二者在生产、监管和临床使用上不必区分对待。YN-II型植株甾体皂苷累积的个体差异小, 其 SNP 标记对于云南重楼的良种选育具有明显意义。虽然 YN-I 型的合格率较低, 但是平均总皂苷含量更高, 在重楼总皂苷的生产中可作为优良的提取原料。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 271-272.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 271-272.
- [2] LI H, SU B, ZHANG Z Y, et al. An assessment on the rarely medical *Paris* plants in China with exploring the future development of its plantation [J]. *J W China For Sci*, 2015, 44(3): 1-7. doi: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2015.03.001.
李恒, 苏豹, 张兆云, 等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策 [J]. *西部林业科学*, 2015, 44(3): 1-7. doi: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2015.03.001.
- [3] LIU Q, FAN X L, YANG L, et al. Screening and evaluation of three excellent *Paris* resources from mountain area of Sichuan Basin [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2019, 50(2): 526-534. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.035.
刘琴, 樊小莉, 杨莉, 等. 四川盆周山地重楼属植物药用资源的筛

- 选及评价 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 526–534. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.035.
- [4] ZHANG K Y, RAO W X, YIN X M, et al. Multiplex PCR system for the identification of *paridis* rhizoma's legal origins and its closely related species from genus *Paris* [J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 30(12): 2193–2202. doi: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.025.
- 张开元, 饶文霞, 尹显梅, 等. 重楼法定基原与其同属近缘种的多重 PCR 鉴别体系研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(12): 2193–2202. doi: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.025.
- [5] LI P, XUE D, WEN F Y, et al. Description and supplement of morphology and the characteristics of saponin components of *Paris forrestii* (Takht) H. Li [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2016, 27(1): 200–202. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.01.079.
- 李朋, 薛丹, 文飞燕, 等. 长柱重楼形态描述补充及其皂苷类成分特征 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 200–202. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.01.079.
- [6] WEN F Y, YIN H X, CHEN C, et al. Chemical characteristics of saponins from *Paris fargesii* var. *brevipetala* and cytotoxic activity of its main ingredient, paris saponin H [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 627–635. doi: 10.1016/j.fitote.2012.01.003.
- [7] LI L Y, LI S P, YANG B, et al. Morphological variations of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* in different population [J]. Chin J Chin Mat Med, 2010, 35(22): 2959–2962. doi: 10.4268/cjcm20102205.
- 李林玉, 李绍平, 杨斌, 等. 滇重楼不同居群形态变异研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2959–2962. doi: 10.4268/cjcm20102205.
- [8] ZHANG K Y. The fluorescent visual identification of two genotypes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and the study of their chemical characteristics correlation [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2018: 11–32.
- 张开元. 两种基因型云南重楼的荧光可视化真伪鉴定及化学特征相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018: 11–32.
- [9] CHEN Z S Z, TIAN B, CAI C T. Genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by SSR marker [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2017, 48(9): 1834–1838. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.021.
- 陈中苏直, 田波, 蔡传涛. 基于 SSR 分子标记的滇重楼遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1834–1838. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.021.
- [10] LI G, WANG Y F, TANG L, et al. Phenotypic trait variation, principal component, correlation and path analysis of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. J Chin Med Mat, 2015, 38(7): 1339–1342. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2015.07.001.
- 李戈, 王艳芳, 唐玲, 等. 滇重楼表型性状变异、主成分、相关及通径分析 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1339–1342. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2015.07.001.
- [11] WANG Q, DING Y, YANG M, et al. Correlation analysis of quality, origin and phenotypic characters of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Chin J Chin Mat Med, 2019, 44(15): 3203–3212. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190527.102.
- 王骞, 丁媛, 杨敏, 等. 滇重楼品质与产地和表型性状相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(15): 3203–3212. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190527.102.
- [12] WU Y Y, JIN L, MA Y J, et al. A comparative study on the fingerprint of *Paris polyphylla* var. *polyphylla* and *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from different origins in Dali and seven main steroidal saponins by HPLC [J]. Chin Pharm J, 2020, 55(11): 875–882. doi: 10.11669/cpj.2020.11.004.
- 吴钰颖, 金琳, 马永军, 等. 大理不同产地多叶重楼与云南重楼 HPLC 指纹图谱及 7 种主要甾体皂苷成分的比较研究 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(11): 875–882. doi: 10.11669/cpj.2020.11.004.
- [13] CHEN L, ZHANG J B. Biosynthesis of steroidal saponins [J]. Nat Prod Res Dev, 2007, 19(2): 316–320. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2007.02.037.
- 陈莉, 张剑波. 甾体皂甙的生物合成 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 316–320. doi: 10.3969/j.issn.1001-6880.2007.02.037.
- [14] HUANG X X, GAO W Y, MAN S L, et al. Advances in studies on saponins in plants of *Paris* L. and their biosynthetic approach [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2009, 40(3): 483–489. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2009.03.044.
- 黄贤校, 高文远, 满淑丽, 等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 483–489. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2009.03.044.
- [15] GAO F, LUO X P, TAO L, et al. Molecular cloning of squalene synthase gene from *Paris polyphylla* and its expression in *Escherich coli* [J]. Chin J Chin Mat Med, 2013, 38(13): 2086–2091. doi: 10.4268/cjcm20131310.
- 高飞, 雒晓鹏, 陶亮, 等. 滇重楼鲨烯合酶基因 *PpSQS* 的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 2086–2091. doi: 10.4268/cjcm20131310.
- [16] XU Y, ZHAO S, DONG X, et al. Cloning and expression of squalene epoxidase from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2017, 48(9): 1839–1844. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.022.
- 许燕, 赵爽, 董翔, 等. 滇重楼鲨烯环氧化酶基因的克隆及原核表达研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1839–1844. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.022.

- [17] YANG L, FAN X L, LIU Q, et al. Molecular cloning and analysis of pyrophosphomevalonate decarboxylase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2019, 50(6): 1435–1441. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.027.
杨莉, 樊小莉, 刘琴, 等. 滇重楼甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因的分子克隆与分析 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1435–1441. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.027.
- [18] YUAN M Q, DING C B, TAO L, et al. Cloning and sequence analysis of cycloartenol synthase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2012, 43(11): 2250–2256.
袁梦求, 丁春邦, 陶亮, 等. 滇重楼环阿屯醇合酶基因的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2250–2256.
- [19] YIN Y, GAO L H, ZHANG X N, et al. A cytochrome P450 monooxygenase responsible for the C-22 hydroxylation step in the *Paris polyphylla* steroidal saponin biosynthesis pathway [J]. Phytochemistry, 2018, 156: 116–123. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.09.005.
- [20] LI X J, YANG Z Y, HUANG Y L, et al. Complete chloroplast genome of the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Melanthiaceae) [J]. J Trop Subtrop Bot, 2015, 23(6): 601–613. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.06.001.
李晓娟, 杨振艳, 黄玉玲, 等. 药用植物华重楼(黑药花科)叶绿体全基因组研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(6): 601–613. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.06.001.
- [21] LI H T, LUO X W, GUAN Y H, et al. Comparison between content of saponins of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* in different areas of Yunnan Province [J]. Chin J Chin Mat Med, 2014, 39(5): 803–806. doi: 10.4268/cjcmm20140509.
李海涛, 罗先文, 管燕红, 等. 云南省不同地区滇重楼皂苷含量的对比及影响因子分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 803–806. doi: 10.4268/cjcmm20140509.