

不如 AFLP, 但该方法对微生物 DNA 模板的质量和数量要求较低, 在熟练掌握 PCR 扩增技术, 严格控制反应条件和扩增体系的基础上, 试验结果的稳定性能够得到保证^[25]。

土壤微生物是土壤的重要组成部分, 土壤微生物种群结构多样性与土壤养分循环、土壤生态平衡、土壤理化性状保持等密切相关^[26]。本研究尝试从土壤微生物种群遗传多样性变化的角度研究人参栽培过程中人参栽培土壤中微生物种群结构改变与土壤微生态环境恶化的关系。研究表明, 不同栽培年限人参或西洋参根际土及根围土中的微生物种群结构均存在显著差异, 而且不同土壤样品中的微生物种群结构在一定程度上表现有根际效应。

参考文献

[1] 黎 阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-167

[2] 傅 佳, 李先恩, 傅俊范. 重茬种植西洋参对其根区土壤微生物与土壤理化性质影响 [J]. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 63-66

[3] 黄朝晖, 李方元, 郭 靖. 人参连作土壤化学元素检测分析 [J]. 特产研究, 1996, 1: 50-51

[4] 蔡荟梅, 夏 春, 宛志沪. 农田休闲后土壤微生物类群和酶活性的变化及对西洋参种植的影响 [J]. 生物学杂志, 2008, 25(2): 33-35

[5] 傅 佳, 李先恩, 傅俊范. 西洋参生长过程中土壤微生物区系的动态变化 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 371-375

[6] 夏淑春, 鄢洪海, 李如生, 等. 人参根部病害发生类型及防治建议 [J]. 特产研究, 2000, 2: 60-62

[7] Bi X B, Yang J X, Gao W W. Autotoxicity of phenolic compounds from the soil of American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) [J]. *Allelopathy J*, 2010, 25(1): 115-122

[8] 金 慧, 于树莲, 曹志强. 老参地、农田地改造, 连续栽培人参、西洋参 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(1): 84-87

[9] 胡丽云, 庞金钊, 刘文芝, 等. 西洋参真菌病害的生物防治 [J]. 生物技术, 2005, 15(6): 76-78

[10] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil

type and implications for disease suppressiveness [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2004, 42: 243-270

[11] Torsvik V, Vreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(3): 240-245

[12] Kirka J L, Beaudette L A, Hartb M, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. *J Microbiol Meth*, 2004, 58(2): 169-188

[13] Salminen J, Hemesmaa A, Karjalainen H, et al. Activity of nematodes and enchytraeids, bacterial community composition, and functional redundancy in coniferous forest soil [J]. *Biol Fert Soils*, 2010, 46(2): 113-126

[14] Medina Pons F J, Terrados J, Rosselló-Móra R. Application of temperature gradient gel electrophoresis technique to monitor changes in the structure of the eukaryotic leaf epiphytic community of *Posidonia oceanica* [J]. *Mar Biol*, 2008, 155(4): 451-460

[15] Hartmann M, Widmer F. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices [J]. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(12): 7804-7812

[16] 李 勇, 朱殿龙, 黄小芳, 等. 不同土壤浸提物对人参种子生长抑制作用的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1070-1074

[17] 李 勇, 刘时轮, 黄小芳, 等. 人参 (*Panax ginseng*) 根系分泌物成分对人参致病菌的化感效应 [J]. 生态学报, 2009, 29(1): 161-168

[18] 黄小芳, 李 勇, 易茜茜, 等. 五种化感物质对人参根系酶活性的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 117-121

[19] 应益昕, 丁万隆, 李 勇. 人参根际土壤微生物 RAPD 反应体系的建立 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 36-39

[20] 黄庆阴, 樊锐锋, 常 纓. 香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 971-974

[21] 徐 荣, 陈 君, 陈士林, 等. 肉苁蓉种质资源多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1703-1707

[22] 余 琪, 沈晓霞, 沈宇峰. 益母草种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1296-1299

[23] 张瑞福, 曹 慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276-282

[24] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414

[25] 吴凤芝, 王学征. 设施黄瓜连作和轮作中土壤微生物种群多样性的变化及其与产量品质的关系 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2274-2280

[26] Harris J. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? [J]. *Science*, 2009, 325(5940): 573-574

川产麦冬野生资源 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

刘 江, 陈兴福*, 杨文钰, 张树平, 杜 刚, 刘卫国

(四川农业大学农学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 目的 建立川产麦冬野生资源的化学模式识别方法。方法 采用高效液相色谱法, 建立川产麦冬野生资源的 HPLC 指纹图谱, 使用 SPSS17.0 软件对 26 批不同来源川产麦冬样品的 HPLC 指纹图谱进行主成分分析, 在主成分得分系数矩阵的基础上, 对其进行系统聚类分析; 并使用相似度评价软件进行相似度评价验证。结果 26 批麦冬样品共提取出 4 个主成分, 被分为 4 大类; 与共有峰直接聚类相比, 主成分聚类分析更符合相似度评价结果。结论 利用 SPSS 软件对麦冬 HPLC 指纹图谱进行主成分聚类分析, 所建立的模式识别方法, 操作简便, 统计结果具有可靠性, 可对麦冬化学计量学分类及其质量评价提供有效参考。

①收稿日期: 2010-02-12

基金项目: 四川省育种攻关项目“特色种质资源收集整理与创新利用”(2006yzzg12-12)

作者简介: 刘 江(1986-), 男, 四川江油人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生理生态与栽培研究。

* 通讯作者 陈兴福 Tel: (0835)-2882612 E-mail: chenxf64@sohu.com.

关键词: 川产麦冬; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1875-07

HPLC Fingerprint on wild germplasm resource of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan and its chemical pattern recognition

LIU Jiang, CHEN Xing-fu, YANG Weir-yu, ZHANG Shu-ping, DU Gang, LIU Wei-guo

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Objective To establish the method of chemical pattern recognition for wild germplasm resource of *Ophiopogon japonicus* in Sichuan Province. **Methods** To establish chromatographic fingerprint of germplasm resource of *O. japonicus* in Sichuan by HPLC, according to the HPLC fingerprint, 26 wild germplasm resources of *O. japonicus* from different habitats in Sichuan were comprehensively compared by SPSS 17.0 software with principal component analysis and cluster analysis; and the correctness of “principal component—cluster analysis” was verified by the software of similarity evaluation. **Results** Four principal components were extracted from 26 samples of *O. japonicus* and the samples were divided into four major categories; Compared with the direct clustering according to common peaks, the results of “principal component—cluster analysis” were more closer to the truth of similarity evaluation. **Conclusion** The method of chemical pattern recognition is used for “principal component—cluster analysis” according to HPLC fingerprint of *O. japonicus* in Sichuan by SPSS 17.0 software. Its operation is simple and convenient, the result of statistics is reliable and able to provide a reference for the chemometrics classification and quality evaluation of *O. japonicus*.

Key words: *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. in Sichuan; fingerprint, principal component analysis (PCA) clustering analysis

《中国药典》(2010年版) 记载的麦冬药材为百合科沿阶草属多年生草本植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根^[1], 始载于《神农本草经》。具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦、益气润肠等功效^[2]。

中药指纹图谱可以定义为是一种综合的、量化的鉴别手段, 是当前符合中药特色的评价中药真实性、稳定性和一致性的质量控制模式之一。化学模式识别技术(pattern recognition) 是根据物质所含化学成分用计算机对其进行分类或描述, 其能够较好地迎合指纹图谱整体性和模糊性的要求, 主要方法包括: 主成分分析(principle component analysis, PCA)、简单分类算法(simple classification algorithm, SIMCA)、非线性映照(nonlinear mapping, NLM)、星座图技术(constellation graphing technique)、模糊信息分析法(Fuzzy information analysis)、灰色关联聚类法(gray relational grade cluster)、系统聚类分析(hierarchical clustering analysis)等。现在, 化学模式识别技术已广泛地应用于中药指纹图谱^[3-7]。本实验以麦冬黄酮类成分为考察主体, 采用高效液相色谱法, 对四川不同产地野

生麦冬资源进行了 HPLC 指纹图谱的研究, 建立了以主成分-聚类分析为核心的模式识别方法, 该方法操作简便, 统计结果可靠, 可为麦冬化学计量学分类及其质量评价提供有效参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器: Agilent G1311 四元液相色谱泵, Agilent G1314A 可变波长检测器, Symmetry-C18 分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Agilent 1101 色谱工作站, G1316A 自动进样器在线脱气机。

1.2 材料: 根据文献资料, 结合麦冬地道产区生态气候特征, 选择资源搜集地并搜集野生资源。于 2008 年 3 月至 5 月主要从四川丘陵区、盆周山区、川西平原区及重庆等地搜集麦冬野生资源(表 1), 经四川农业大学中药材研究中心陈兴福教授鉴定为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.。

2 方法

2.1 供试液制备

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的槲皮素、甲基麦冬二氢高异黄酮 A、甲基麦冬二氢高异黄酮 B、麦冬二氢高异黄酮 A、麦冬二氢高异黄酮

表 1 供试麦冬样品来源
Table 1 Source of *O. japonicus*

| 编号 | 样品来源 | 生境 | 采集时间 | 编号 | 样品来源 | 生境 | 采集时间 |
|----|----------|-----|------------|----|----------|-----|------------|
| 1 | 乐山市市中区 | 竹林下 | 2008-03-09 | 14 | 绵阳市三台县 1 | 田间 | 2008-03-14 |
| 2 | 自贡市市中区 | 房前后 | 2008-03-09 | 15 | 绵阳市三台县 2 | 田间 | 2008-03-14 |
| 3 | 宜宾市长宁县 | 山坡上 | 2008-03-10 | 16 | 自贡市富顺县 | 杂丛中 | 2008-04-02 |
| 4 | 宜宾市南溪县 | 竹林下 | 2008-03-10 | 17 | 广安市武胜县 | 竹林下 | 2008-05-01 |
| 5 | 宜宾市市中区 | 山坡上 | 2008-03-10 | 18 | 南充市南部县 | 竹林下 | 2008-04-29 |
| 6 | 泸州市市中区 1 | 沿江边 | 2008-03-10 | 19 | 广安市市中区 | 杂丛中 | 2008-05-01 |
| 7 | 泸州市市中区 2 | 沿江边 | 2008-03-10 | 20 | 巴中市平昌县 | 竹林下 | 2008-04-30 |
| 8 | 内江市市中区 | 山坡上 | 2008-03-11 | 21 | 巴中市市中区 | 竹林下 | 2008-04-30 |
| 9 | 资阳市简阳市 | 竹林下 | 2008-03-11 | 22 | 达州市市中区 | 竹林下 | 2008-05-01 |
| 10 | 资阳市市中区 | 房前后 | 2008-03-11 | 23 | 南充市仪陇县 | 山坡上 | 2008-04-30 |
| 11 | 重庆市涪陵区 1 | 房前后 | 2008-02-18 | 24 | 达州市大竹县 | 竹林中 | 2008-05-01 |
| 12 | 重庆市涪陵区 2 | 竹林下 | 2008-02-23 | 25 | 德阳市旌阳区 | 房前后 | 2008-05-02 |
| 13 | 乐山市峨边山市 | 山坡上 | 2008-02-23 | 26 | 眉山市彭山县 | 山坡上 | 2008-05-03 |

除 14、15 号样品为栽培材料外,其他样品均为野生材料

Samples 14 and 15 are cultivation materials, other samples are wild materials

B、大黄酚等麦冬黄酮类对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用色谱纯甲醇定容,置超声清洗器中混匀备用。取各对照品溶液适量,置超声清洗器中混合均匀,并经 0.45 μm 一次性滤膜滤过,即为混合对照品溶液。

2.1.2 样品溶液的制备:称量麦冬样品 3.000 g 至离心管中,加入 50 mL 95% 乙醇溶解,震荡、混匀,超声提取(20 °C, 90 min),滤膜滤过,滤液旋转蒸发至 2~3 mL,用 40 mL 水溶解,转移至离心管内,乙醚萃取 4 次,每次 20 mL,将乙醚层旋转蒸发至 3~5 mL,甲醇定容至 10 mL,过 0.45 μm 一次性滤膜,混匀即得。

2.2 色谱条件:色谱柱 Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为溶剂 A:甲醇, B:0.2% 醋酸水溶液,梯度洗脱,洗脱程序为:0~38 min, 15% A; 38~83 min, 67% A; 83~90 min, 100% A。体积流量 1.0 mL/min,检测波长 280 nm,进样量 15 μL,柱温 30 °C^[8-9]。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,在 2.2 项色谱条件下进样测定、记录,结果表明, HPLC 图谱中各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 0.3%,峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重现性试验:取同一批药材 5 份,按 2.1.2 项下的样品制备方法,在 2.2 项色谱条件下进样测定、记录,结果表明, HPLC 图谱中各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 1.2%,峰面积的 RSD 均小于 4%,表明方法重现性良好。

2.3.3 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于第

0、3、6、9、12、24、48 h 在 2.2 项色谱条件下进样测定、记录,结果显示, HPLC 图谱中各主要色谱峰保留时间的 RSD 均小于 1.0%,峰面积的 RSD 均小于 3.4%,表明样品在 48 h 内稳定。

3 结果与分析

3.1 麦冬 HPLC 图谱的测定:分别精密吸取槲皮素(1)、甲基麦冬二氢高异黄酮 A(2)、甲基麦冬二氢高异黄酮 B(3)、大黄酚(4)、麦冬二氢高异黄酮 A(5)、麦冬二氢高异黄酮 B(6)的混合对照品溶液及供试品溶液各 15 μL,注入液相色谱仪,在 2.2 项色谱条件下,记录色谱图(图 1)。

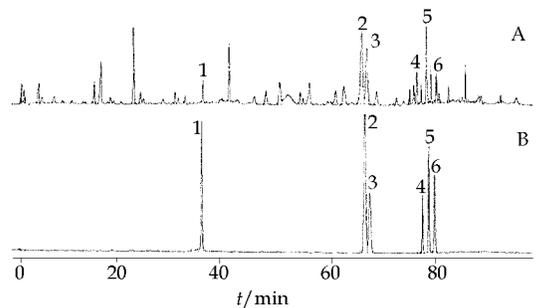


图 1 麦冬 HPLC 图谱特征指纹峰(A)及标准对照峰(B)

Fig 1 HPLC Fingerprint of *O. japonicus* for characteristic peaks (A) and standard control peaks (B)

3.2 共有峰直接聚类:试验结果表明,26 批样品的出峰情况不尽相同,出峰数目存在较大差异,80% 样品共有峰(即 80% 以上样品所共有的色谱峰)的参数统计(表 2)表明,19 个峰为 26 批样品所共有(即匹配数目为 26),峰面积和仅占总峰面积的 37.11%;51 个峰为 20 批样品所共有,峰面积和占总峰面积的 73.15%,代表了麦冬样品中多数化学成分的量,具有一定代表性^[10]。根据这 51 个 80%

共有峰的峰面积信息,对 26 批样品进行系统聚类分析(形成 26×51 矩阵),采用组间联结,欧氏聚类法,其聚类结果如图 2 所示。当阈值 T= 25 时,26 批样品被划分为 2 大类,其中 26 号样品被单列为一类,

其他 25 个样品被划为一大类,随着阈值的减小,这 25 个样品继续被分为 3 类,其中 19 和 24 号样品被划为一类,10 和 11 号样品被划为一类,其他 21 个样品被划为一大类。

表 2 26 批样品 80% 共有峰参数统计

Table 2 Parameter statistics of 80% common peaks in 26 batches of *O. japonicus*

| 编号 | 保留时间 | 累计峰面积/ % | 匹配数目 | 编号 | 保留时间 | 累计峰面积/ % | 匹配数目 | 编号 | 保留时间 | 累计峰面积/ % | 匹配数目 |
|----|-------|----------|------|----|-------|----------|------|----|-------|----------|------|
| 1 | 5.26 | 0.55 | 26 | 18 | 78.97 | 34.21 | 26 | 35 | 40.14 | 56.65 | 23 |
| 2 | 8.37 | 0.83 | 26 | 19 | 80.87 | 37.11 | 26 | 36 | 48.56 | 58.08 | 23 |
| 3 | 17.30 | 1.91 | 26 | 20 | 5.94 | 37.30 | 25 | 37 | 86.95 | 60.27 | 23 |
| 4 | 18.14 | 3.72 | 26 | 21 | 10.05 | 37.58 | 25 | 38 | 32.96 | 60.68 | 22 |
| 5 | 25.31 | 5.26 | 26 | 22 | 26.59 | 38.03 | 25 | 39 | 34.90 | 61.09 | 22 |
| 6 | 30.48 | 5.90 | 26 | 23 | 31.29 | 38.50 | 25 | 40 | 36.04 | 61.69 | 22 |
| 7 | 37.20 | 7.04 | 26 | 24 | 32.40 | 39.22 | 25 | 41 | 40.97 | 62.35 | 22 |
| 8 | 45.31 | 8.09 | 26 | 25 | 34.20 | 39.91 | 25 | 42 | 27.20 | 62.71 | 21 |
| 9 | 46.24 | 9.54 | 26 | 26 | 64.17 | 41.56 | 25 | 43 | 52.92 | 65.66 | 21 |
| 10 | 47.69 | 10.12 | 26 | 27 | 89.14 | 47.04 | 25 | 44 | 59.55 | 66.10 | 21 |
| 11 | 55.29 | 12.06 | 26 | 28 | 11.93 | 47.39 | 24 | 45 | 10.92 | 66.20 | 20 |
| 12 | 60.73 | 14.42 | 26 | 29 | 19.81 | 48.49 | 24 | 46 | 14.73 | 66.48 | 20 |
| 13 | 66.74 | 19.90 | 26 | 30 | 28.95 | 48.95 | 24 | 47 | 41.55 | 68.29 | 20 |
| 14 | 67.65 | 23.77 | 26 | 31 | 51.14 | 52.04 | 24 | 48 | 58.97 | 68.82 | 20 |
| 15 | 69.59 | 24.54 | 26 | 32 | 77.21 | 53.11 | 24 | 49 | 61.41 | 69.77 | 20 |
| 16 | 73.01 | 27.53 | 26 | 33 | 87.66 | 55.02 | 24 | 50 | 83.30 | 71.47 | 20 |
| 17 | 74.70 | 28.60 | 26 | 34 | 28.23 | 55.43 | 23 | 51 | 84.83 | 73.15 | 20 |

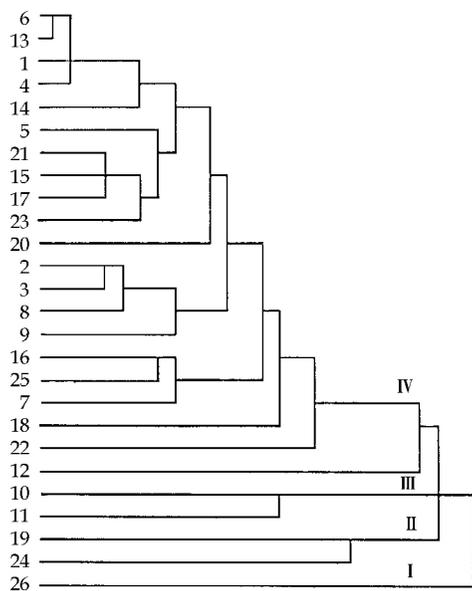


图 2 麦冬样品共有峰直接系统聚类分析图

Fig 2 Results of direct hierarchical clustering analysis of common peaks for *O. japonicus*

3.3 主成分聚类分析

3.3.1 主成分分析:调用 SPSS 17.0 “Data Reduction”中的“Factor”进行主成分分析,得到主成分方差(表 3)及主成分得分矩阵(表 4),表 3 列出了相关系数的特征根和方差贡献率,系统自动提取了前面 4 个特征根大于 1 的主成分,其累计方差贡献率达到 83.675%,可用这 4 个主成分新变量代替原来的 26 个

变量,由此可以初步推断,26 批样品可以分为 4 大类。

3.3.2 聚类分析:对 4 个主成分进行标准化处理,用标准化后的数值进行系统聚类分析,同样使用组间联结,欧氏聚类法分析,其聚类结果如图 3 所示。当阈值 T= 15 时,26 批样品被划分为 4 大类,其中 12、7、22、16 号样品被划为类 1,8、9、3、26、25 号样品被划为类 2,4、18、14、6、17、13、10、11、15、1 号样品被划为类 3,19、5、21、23、2、24、20 号样品被划为类 4。

3.4 相似度评价及两种识别方式的比较:采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度评价系统 2004(A 版)对上述 26 批麦冬的 HPLC 图谱进行了相似度分析,其相似度评价结果如表 5 所示。在主成分聚类分析所得的聚类图中,阈值最底层被划分为一类的样品间的相似度均大于直接聚类分析所得聚类图中被划为一类的样品间的相似度,例如:样 5 和样 19 的相似度为 0.88,样 5 和样 21 的相似度为 0.81;样 13 和样 17 的相似度为 0.81,样 6 和样 13 的相似度为 0.76;样 25 和样 26 的相似度为 0.71,样 16 和样 25 的相似度为 0.41;样 3 和样 9 的相似度为 0.77,样 2 和样 3 的相似度为 0.69,由此可知,主成分聚类分析所得的聚类结果更接近真实水平。按照主成分聚类分析所得的聚类结果,将 26 批样品图谱叠加比较可知,主成分聚类分析划分的 4 大类间,其图谱的整体特征有较明显差异,聚类分析结果符合 HPLC 图谱的真实情况(图 4)。

表 3 主成分方差分析

Table 3 Analysis of variance for PCA

| 主成分序号 | 初始特征值 | | | 提取特征值 | | |
|-------|--------|---------|-----------|--------|---------|-----------|
| | 特征根 | 方差贡献率/% | 积累方差贡献率/% | 特征根 | 方差贡献率/% | 积累方差贡献率/% |
| 1 | 16.520 | 63.538 | 63.538 | 16.520 | 63.538 | 63.538 |
| 2 | 2.216 | 8.524 | 72.061 | 2.216 | 8.524 | 72.061 |
| 3 | 1.630 | 6.270 | 78.331 | 1.630 | 6.270 | 78.331 |
| 4 | 1.389 | 5.344 | 83.675 | 1.389 | 5.344 | 83.675 |

表 4 主成分得分矩阵

Table 4 Component matrix of PCA

| 编号 | 样品 | 主成分 | | | | 编号 | 样品 | 主成分 | | | |
|----|----------|-------|--------|--------|--------|----|----------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 乐山市市中区 | 0.051 | 0.003 | 0.201 | -0.203 | 14 | 绵阳市三台县 1 | 0.054 | -0.136 | 0.121 | 0.025 |
| 2 | 自贡市市中区 | 0.049 | -0.018 | -0.126 | 0.078 | 15 | 绵阳市三台县 2 | 0.054 | 0.013 | 0.098 | -0.207 |
| 3 | 宜宾市长宁县 | 0.049 | 0.180 | -0.131 | -0.089 | 16 | 自贡市富顺县 | 0.037 | 0.182 | 0.115 | 0.246 |
| 4 | 宜宾市南溪县 | 0.052 | -0.019 | 0.190 | 0.163 | 17 | 广安市武胜县 | 0.055 | 0.009 | 0.003 | -0.040 |
| 5 | 宜宾市市中区 | 0.050 | -0.016 | -0.273 | 0.164 | 18 | 南充市南部县 | 0.046 | -0.233 | 0.147 | -0.007 |
| 6 | 泸州市市中区 1 | 0.056 | -0.111 | 0.058 | 0.051 | 19 | 广安市市中区 | 0.046 | 0.009 | -0.311 | -0.007 |
| 7 | 泸州市市中区 2 | 0.035 | 0.237 | 0.130 | 0.089 | 20 | 巴中市平昌县 | 0.055 | -0.098 | -0.056 | 0.000 |
| 8 | 内江市市中区 | 0.043 | 0.194 | -0.137 | -0.225 | 21 | 巴中市市中区 | 0.051 | -0.146 | -0.175 | 0.120 |
| 9 | 资阳市简阳市 | 0.050 | 0.116 | -0.179 | -0.094 | 22 | 达州市市中区 | 0.042 | 0.090 | 0.045 | 0.299 |
| 10 | 资阳市市中区 | 0.047 | -0.123 | 0.249 | -0.186 | 23 | 南充市仪陇县 | 0.051 | -0.080 | -0.184 | 0.063 |
| 11 | 重庆市涪陵区 1 | 0.051 | -0.085 | 0.095 | -0.163 | 24 | 达州市大竹县 | 0.056 | -0.089 | -0.110 | 0.020 |
| 12 | 重庆市涪陵区 2 | 0.018 | 0.094 | 0.173 | 0.474 | 25 | 德阳市旌阳区 | 0.047 | 0.206 | 0.106 | -0.060 |
| 13 | 乐山市峨边山市 | 0.059 | -0.039 | 0.059 | -0.003 | 26 | 眉山市彭山县 | 0.026 | 0.252 | 0.071 | -0.194 |

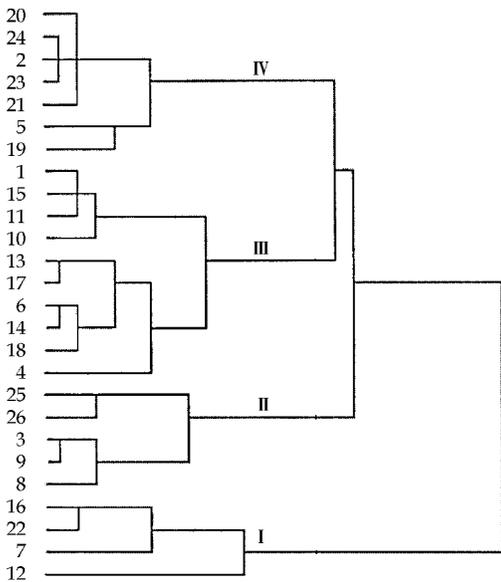


图 3 麦冬样品主成分系统聚类分析图

Fig 3 Results of hierarchical clustering analysis of principal components for *O. japonicus*

4 结论与讨论

在一定范围内, 中药指纹图谱能基本反映中药概貌, 使其质控指标由原有的对单一成分的定量测定上升为对整个中药内在品质的检测, 实现对中药内在质量的综合评价和整体物质的全面控制, 使中药质量达到稳定、可控, 确保中医临床疗效的稳定,

并使中药研究更符合祖国医学的整体观念, 指纹图谱的数据处理方式包括: 直观分析比较、量化数据比较、化学模式识别技术、计算机软件分析等, 化学模式识别技术已经广泛地应用于中药指纹图谱中^[3]。

主成分分析及聚类分析是化学模式识别的重要组成部分, 主成分分析法是用少数的几个变量(因子)来综合反映原始变量(因子)的主要信息, 在主成分分析中, 最终确定的新变量是原始变量的线性组合^[11]; 聚类分析是把研究对象视作多维空间中的许多点, 并合理地分成若干类, 因此它是一种根据量域之间的相似性而逐步归群成类的方法, 它能客观地反映这些变量或区域之间的内在组合关系^[12]。

SPSS(statistical package for the social science), 是一个适合于自然科学、社会科学领域的统计分析软件包, 目前已经是能够在几十种机器上运行的通用性很强的软件, 并成为世界上公认的性能优良的信息处理系统, 是国内外拥有用户最多、应用领域最广的应用软件之一, 随着科技的高速发展和计算机应用范围的日益广泛, SPSS 目前在我国的医疗卫生、体育、经济等领域已得到了深入的应用。

本实验采用主成分分析和系统聚类分析相结合的方法, 使用 SPSS17.0 软件对不同来源野生麦冬资源进行模式识别研究, 建立了主成分-聚类的模式识别方法, 同时, 与共有峰直接聚类分析相比较, 并

表 5 26 批麦冬样品 HPLC 图谱相似度评价结果

Table 5 Similarity evaluation for HPLC chromatograms of 26 batches of *O. japonicus*

| 样品编号 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | S22 | S23 | S24 | S25 | S26 | |
| S1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S2 | 0.71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S3 | 0.74 | 0.69 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S4 | 0.60 | 0.57 | 0.42 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S5 | 0.66 | 0.79 | 0.81 | 0.56 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S6 | 0.86 | 0.84 | 0.71 | 0.68 | 0.83 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S7 | 0.58 | 0.64 | 0.55 | 0.42 | 0.58 | 0.63 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S8 | 0.56 | 0.61 | 0.67 | 0.30 | 0.58 | 0.54 | 0.47 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 | 0.71 | 0.81 | 0.77 | 0.48 | 0.78 | 0.74 | 0.58 | 0.81 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S10 | 0.78 | 0.68 | 0.40 | 0.72 | 0.59 | 0.80 | 0.48 | 0.40 | 0.58 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S11 | 0.88 | 0.75 | 0.70 | 0.62 | 0.74 | 0.84 | 0.58 | 0.53 | 0.73 | 0.79 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S12 | 0.46 | 0.49 | 0.35 | 0.51 | 0.46 | 0.50 | 0.46 | 0.59 | 0.58 | 0.50 | 0.45 | | | | | | | | | | | | | | | |
| S13 | 0.66 | 0.70 | 0.48 | 0.69 | 0.66 | 0.76 | 0.46 | 0.64 | 0.67 | 0.81 | 0.70 | 0.69 | | | | | | | | | | | | | | |
| S14 | 0.73 | 0.75 | 0.48 | 0.72 | 0.70 | 0.87 | 0.53 | 0.40 | 0.60 | 0.88 | 0.75 | 0.48 | 0.85 | | | | | | | | | | | | | |
| S15 | 0.89 | 0.72 | 0.80 | 0.53 | 0.69 | 0.84 | 0.52 | 0.59 | 0.71 | 0.71 | 0.81 | 0.38 | 0.63 | 0.73 | | | | | | | | | | | | |
| S16 | 0.52 | 0.58 | 0.50 | 0.46 | 0.57 | 0.60 | 0.60 | 0.45 | 0.55 | 0.53 | 0.47 | 0.51 | 0.46 | 0.55 | 0.57 | | | | | | | | | | | |
| S17 | 0.63 | 0.66 | 0.50 | 0.73 | 0.69 | 0.74 | 0.45 | 0.38 | 0.55 | 0.81 | 0.71 | 0.43 | 0.81 | 0.82 | 0.59 | 0.46 | | | | | | | | | | |
| S18 | 0.79 | 0.77 | 0.51 | 0.66 | 0.66 | 0.90 | 0.48 | 0.40 | 0.58 | 0.84 | 0.80 | 0.39 | 0.76 | 0.89 | 0.79 | 0.48 | 0.72 | | | | | | | | | |
| S19 | 0.65 | 0.78 | 0.76 | 0.47 | 0.88 | 0.73 | 0.57 | 0.59 | 0.79 | 0.56 | 0.70 | 0.36 | 0.58 | 0.61 | 0.65 | 0.44 | 0.58 | 0.60 | | | | | | | | |
| S20 | 0.58 | 0.62 | 0.46 | 0.61 | 0.65 | 0.72 | 0.42 | 0.40 | 0.55 | 0.74 | 0.67 | 0.49 | 0.73 | 0.78 | 0.60 | 0.51 | 0.74 | 0.67 | 0.57 | | | | | | | |
| S21 | 0.61 | 0.76 | 0.57 | 0.63 | 0.81 | 0.79 | 0.45 | 0.39 | 0.63 | 0.70 | 0.76 | 0.42 | 0.75 | 0.81 | 0.63 | 0.45 | 0.82 | 0.77 | 0.71 | 0.80 | | | | | | |
| S22 | 0.50 | 0.59 | 0.46 | 0.63 | 0.64 | 0.66 | 0.50 | 0.38 | 0.52 | 0.59 | 0.55 | 0.55 | 0.69 | 0.73 | 0.44 | 0.60 | 0.71 | 0.55 | 0.49 | 0.57 | 0.68 | | | | | |
| S23 | 0.57 | 0.67 | 0.55 | 0.61 | 0.78 | 0.75 | 0.42 | 0.45 | 0.59 | 0.69 | 0.68 | 0.45 | 0.75 | 0.76 | 0.64 | 0.50 | 0.83 | 0.68 | 0.63 | 0.85 | 0.86 | 0.58 | | | | |
| S24 | 0.78 | 0.81 | 0.76 | 0.59 | 0.84 | 0.87 | 0.48 | 0.56 | 0.74 | 0.67 | 0.81 | 0.41 | 0.73 | 0.80 | 0.84 | 0.50 | 0.71 | 0.83 | 0.76 | 0.70 | 0.86 | 0.57 | 0.81 | | | |
| S25 | 0.44 | 0.48 | 0.34 | 0.53 | 0.47 | 0.50 | 0.44 | 0.65 | 0.57 | 0.60 | 0.48 | 0.73 | 0.85 | 0.59 | 0.40 | 0.41 | 0.61 | 0.43 | 0.40 | 0.56 | 0.51 | 0.65 | 0.52 | 0.44 | | |
| S26 | 0.31 | 0.39 | 0.25 | 0.44 | 0.34 | 0.37 | 0.35 | 0.51 | 0.44 | 0.49 | 0.36 | 0.55 | 0.63 | 0.46 | 0.29 | 0.34 | 0.55 | 0.31 | 0.30 | 0.45 | 0.38 | 0.51 | 0.43 | 0.33 | 0.71 | |

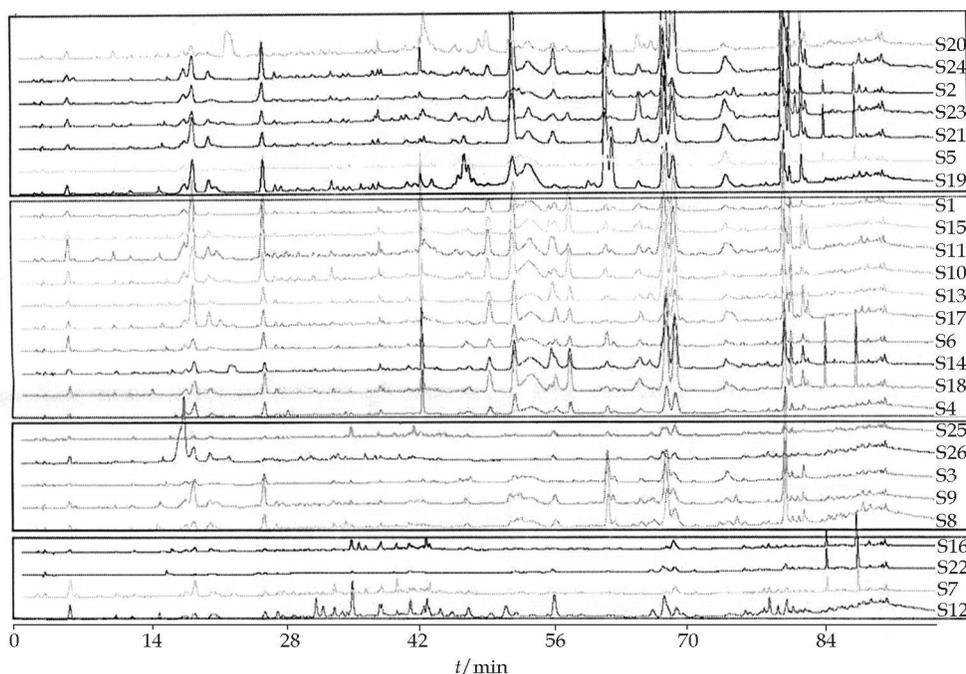


图 4 26 批麦冬样品主成分聚类叠加图

Fig 4 "Principal components clustering" overlay map for 26 batches of *O. japonicus*

通过常规的相似度评价软件进行相似度验证及与真实的 HPLC 图谱整体特征作对比, 结果发现, 主成

分聚类分析方法更能反映 HPLC 图谱的真实特征, 与 Matlab 软件编程建立模式识别的方式相比,

其具有操作简便、统计结果可靠的特点,可为麦冬化学计量学分类及其质量评价提供有效参考。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010
- [2] 谭小燕,罗乔齐,马郑红,等. 不同产地麦冬¹H-NMR 模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(5): 792-797
- [3] Shen Z, Zhang W T, Hua Y F, et al. Fingerprint analysis of four variants of *Chrysanthemi Morifolis Flos* by RP-HPLC[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 153-156
- [4] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1638-1641
- [5] 王文燕,赵强,张铁军,等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1810-1814
- [6] 王文燕,赵强,张铁军,等. 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1980-1983
- [7] 逢楠楠,毕开顺,闫宝庆,等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 818-821
- [8] 陈有根,戴俊东,古海峰. 麦冬药材及其提取物中甲基麦冬黄酮 A 和 B 的 HPLC 法测定[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1640
- [9] 梅孟勤,尹建元,陶婵娜,等. HPLC 法测定麦冬须根中甲基麦冬黄酮 A、B 的含量[A]. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集[C] 北京: 中国药学会, 2007
- [10] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003
- [11] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J]. 山东教育学院学报, 2007(6): 23-26
- [12] 李蓉,李宇. 基于主成分分析与聚类分析方法的我国西部地区划分问题的研究[J]. 科技广场, 2006(3): 66-67

主产区远志种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

李佳¹, 房敏峰¹, 周天华¹, 杨佳¹, 刘夙², 赵桂仿^{1*}

(1 西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069;

2 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要:目的 对主产区远志种质资源进行遗传多样性研究。方法 利用 ISSR 分子标记分析来自于主产区陕西、山西和河北 3 个省的 10 个居群的远志种质资源的遗传多样性。结果 12 条 ISSR 引物扩增出 276 条带, 其中有 271 条为多态性条带, 聚类分析结果表明, 地理来源相同的野生居群和栽培居群先行聚合。野生和栽培远志居群的遗传变异主要发生在居群间, 栽培居群的遗传多样性略低于野生居群, 二者均不符合距离隔离模型。结论 聚类分析结果与栽培居群多为就地取材的事实相符。造成远志这种遗传变异型式的原因在于其本身的繁殖生物学特性以及当前的粗放栽培模式。

关键词:远志; 种质资源; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1881-05

ISSR Analysis for genetic diversity of *Polygala tenuifolia* in its main production area

LI Jia¹, FANG Min-feng¹, ZHOU Tian-hua¹, YANG Jia¹, LIU Su², ZHAO Gui-fang¹

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2 Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Objective To discuss the genetic diversity of *Polygala tenuifolia* in its main production area. **Methods** The genetic diversity of ten populations of *P. tenuifolia* from its main production area Shaanxi, Shanxi, and Hebei Provinces, was analyzed using ISSR markers. **Results** Twelve selected ISSR primers generated a total of 276 fragments, 271 of which were polymorphic fragments. The cluster analysis showed that wild and cultivated populations from the same geographical area were clustered first. Genetic variation of both wild and cultivated populations occurred mainly among populations, and the genetic diversity of cultivated populations was lower than wild ones, but both of them were not consistent with the isolation-by-distance model. **Conclusion** The results of cluster analysis agree with the fact that cultivated populations are derived directly from wild ones nearby. It was its own reproductive biological features and the current extensive cultivation that resulted in the genetic pattern of *P. tenuifolia*. Such analyses can offer necessary molecular biological reasons for the utilization and seed breeding of *P. tenuifolia*.

①收稿日期: 2010-02-25

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(PCSIRT); 陕西省重大科技专项(2006ZK10G3); 陕西省教育厅产业化培育项目(07JC17)

作者简介: 李佳(1984-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 主要从事分子资源植物学方面的研究。

Tel: 13927435825 15910862290 E-mail: doudou1984923413@126.com

* 通讯作者 赵桂仿 Tel: (029) 88305207 Fax: (029) 88303572 E-mail: gzfzhao@nwu.edu.cn