

四川盆周山地重楼属植物药用资源的筛选及评价

刘 琴^{1,2}, 樊小莉¹, 杨 莉^{1,2}, 徐智斌¹, 冯 波¹, 王 涛^{1*}

1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: **目的** 挖掘具有药用价值的优异重楼属植物资源, 缓解药用重楼资源压力, 为促进重楼的可持续利用提供材料基础。**方法** 在四川盆周山地采集 21 份重楼资源, 根据表型筛选出大块茎资源 GQ 与 MH, 多芽资源 GK。初步形态鉴定后, 利用 DNA 条形码 ITS、*psbA-trnH* 序列, 采用 Kimura 双参数模型构建 ML 系统聚类树, 进行系统发育分析。采用 HPLC 法检测其主要活性成分皂苷的含量, 以预测其潜在药用价值。**结果** 形态学结合分子鉴定结果表明, GQ、GK 和 MH 分别依次为华重楼、滇重楼和长柱重楼。GQ、GK、MH 和对照滇重楼 (CK) 的重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量及其比例表现各异, 其中总含量表现为 GQ>MH>CK>GK, 重楼皂苷 I 在 GQ 和 MH 中占比较高, 分别较 CK 高出 67.61% 和 73.25%, 而重楼皂苷 VII 在 GK 中占比最高, 表现为 56.38%。**结论** GQ、GK 和 MH 分别为产于四川盆周山地特定居群的华重楼、滇重楼和长柱重楼, 引种至成都平原后性状表现优良, 为后续的重楼的育种研究提供了材料基础; 同时 3 个资源均具药用潜力, 其中长柱重楼 MH 居群资源的重楼皂苷 I 及重楼皂苷总含量较高, 为滇重楼、华重楼替代药材的筛选提供了新选择。

关键词: 重楼资源; 华重楼; 滇重楼; 长柱重楼; ITS; *psbA-trnH*; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; 重楼皂苷 VI; 重楼皂苷 VII

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)02-0526-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.035

Screening and evaluation of three excellent *Paris* resources from mountain area of Sichuan Basin

LIU Qin^{1,2}, FAN Xiao-li¹, YANG Li^{1,2}, XU Zhi-bin¹, FENG Bo¹, WANG Tao¹

1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective Mining *Paris* resources with medicinal value could underlay the breeding selection and relieve the pressure on wild resources. **Methods** Twenty-one *Paris* resources in the mountain area of Sichuan Basin were collected and selected according to their phenotype and rhizome features. Two resources GQ, MH with bigger rhizome and one resource (GK) with polygemmic feature were screened. After preliminary identification, based on Kimura-2-parameter model, molecular phylogenetic trees were constructed based on the different sequence of ITS and *psbA-trnH* between the screened resources and the homologous sequences from NCBI using the Maximum Like (ML) method. Main active saponin was determined by HPLC method to predict its potential medicinal value. **Results** GQ, GK, and MH were special resources of *P. polyphylla* var. *chinensis*, *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, and *P. forrestii*, respectively, in mountains around Sichuan Basin. The content and proportion of polyphyllin I, II, VI, VII in GQ, GK, MH were different. The total content was GQ > MH > CK > GK. The proportion of polyphyllin I in GQ and MH was 67.61% and 73.25% higher than CK, respectively. While the proportion of polyphyllin VII was most in GK (56.38%). **Conclusion** This study specified three Sichuan local *Paris* resources with excellent rhizome features. And they performed well after introduced to Chengdu Plain providing the material basis for the follow-up breeding study of *Paris*. Three resources have medicinal potential, especially the polyphyllin I and polyphyllin content in MH (*P. forrestii*) is higher, which can provide a new choice for screening substitution materials of *P. polyphylla* var. *chinensis* and *P. polyphylla* var. *yunnanensis*.

Key words: *Paris* resources; *P. polyphylla* Smith. var. *chinensis* (Franch.) Hara; *P. polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz; *P. forrestii* (Takht.) H. Li (MH); ITS; *psbA-trnH*; polyphyllin I; polyphyllin II; polyphyllin VI; polyphyllin VII

收稿日期: 2018-06-05

基金项目: 四川省科技计划项目“秦巴山区地道中药材多元化种植示范与推广”(2017SZ0020)

作者简介: 刘 琴 (1992—), 女, 硕士, 主要从事中药重楼资源及快速繁殖方向的研究。E-mail: rgluqin@163.com

*通信作者 王 涛, 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事植物分子遗传及植物育种研究。E-mail: wangtao@cib.ac.cn

重楼为百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物统称, 具有抗肿瘤、抑菌消炎、镇静、止血等作用^[1], 已成为多种中成药和新药的主要原材料。然而, 重楼的个体发育过程十分缓慢^[2], 加之野生资源的过度开采, 已造成重楼市场长期供不应求。因此, 挖掘具有药用价值的优异重楼资源, 是解决重楼产能低下, 保障重楼可持续利用的重要途径。

目前, 全世界已发现 26 种重楼属植物, 主要分布在欧亚大陆的热带与温带地区, 我国多达 19 种, 以西南地区最多, 其中四川分布 13 种^[3]。重楼具有丰富的遗传多样性, 大到不同种, 小到同种的居群间普遍都存在差异, 且差异程度各不相同, 造成了复杂的表型多样性^[4]。所以, 单从形态学上较难准确地对其分类。植物分子系统学结合 DNA 条形码技术, 为探讨植物分类及类群之间的系统发育关系提供了新的方法^[5]。Ji 等^[6]利用 ITS、psbA-trnH 等 DNA 序列对重楼属植物的分子进化进行了研究, 成功揭示了重楼属植物的种间关系。

正品重楼, 按《中国药典》2015 年版规定仅为滇重楼 *P. polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Fanch.) Hand. -Mazz 和华重楼 *P. polyphylla* Smith. var. *chinensis* (Franch.) Hara^[7]。然而, 巨大的市场需求量已造成上述 2 种重楼资源被大量采挖, 资源极度匮乏, 因此实际上几乎所有重楼属植物均已做药用^[3,8]。甾体皂苷类化合物是重楼的主要活性成分, 占总化合物的 70% 以上^[9]。《中国药典》2015 年版以薯蓣皂苷类重楼皂苷 I、II, 偏诺类重楼皂苷 VI、VII 的含量判断其药用潜力^[7]。但受遗传多样性影响, 不仅不同重楼属植物的药效成分含量及其比例具有一定差异^[10], 同一个种来自不同产地、不同居群的重楼, 其药效品质也各具特性^[11]。故挖掘特定产地的重楼属植物资源, 分析其相应的药用潜力, 充分发

挥其药效价值, 保障“各尽其用、对症下药”, 对扩增重楼属药用材料, 缓解药用资源压力有重要意义。

四川作为重楼属植物的重要分布中心和遗传多样化中心之一, 也是重楼药材的道地产区之一, 储备了多种具有药用潜力的重楼属资源。本研究收集并筛选四川盆地周边山地不同居群的野生重楼资源, 基于 DNA 条形码分子鉴定技术和 HPLC 分析技术, 进行系统发育分析和药效活性成分检测, 筛选具有药用潜力的优异地方资源, 以期为重楼的可持续利用提供基础。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

样品分别采自四川省眉山市洪雅县、绵阳市北川县、甘孜州康定县及广元市青川县等地。挖取新鲜活体植株, 根据不同居群划分为 21 份资源 (表 1), 每份资源含 1~21 株材料, 共 177 株, 引种至成都双流和什邡种植基地进行种植。重楼对照药材 (CK) 购自北京索莱宝科技有限公司, 为成品滇重楼。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (G1311B 四元泵、G1322B 脱气机、G1329B 自动进样器、Chemstation 色谱工作站、G1315D 可变波长检测器); Libro AEL-40SM 十万分之一电子分析天平 (岛津公司, 日本); 超声波清洗器 (南京科尔仪器设备有限公司); 低温高速离心机 (赛默飞有限公司, 美国); TissueLyser II 高通量组织研磨仪 (QIAGEN 公司, 德国); 氮吹仪 (杭州奥盛仪器有限公司); 凝胶成像分析仪 (上海培清科技有限公司)。重楼皂苷 I 对照品 (批号 111590-201103)、重楼皂苷 II 对照品 (批号 111591-201103)、重楼皂苷 VI 对照品 (批号 111592-201203)、重楼皂苷 VII 对照品 (批号 111593-200402) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色

表 1 重楼属样品信息

Table 1 Information of plant samples from *Paris* genus

| 居群编号 | 采集地 | 采集时间 | 采集数 | 居群编号 | 采集地 | 采集时间 | 采集数 |
|------|-----|---------|-----|------|-----|---------|-----|
| 1 | 康定 | 2014-05 | 17 | 12 | 洪雅 | 2016-04 | 1 |
| 2 | 康定 | 2016-04 | 20 | 13 | 洪雅 | 2016-04 | 2 |
| 3 | 康定 | 2016-04 | 18 | 14 | 洪雅 | 2016-05 | 2 |
| 4 | 青川 | 2015-04 | 13 | 15 | 洪雅 | 2016-05 | 10 |
| 5 | 青川 | 2016-05 | 3 | 16 | 洪雅 | 2016-05 | 3 |
| 6 | 青川 | 2016-05 | 5 | 17 | 洪雅 | 2016-05 | 15 |
| 7 | 青川 | 2017-03 | 21 | 18 | 洪雅 | 2016-05 | 6 |
| 8 | 北川 | 2015-06 | 12 | 19 | 洪雅 | 2016-05 | 2 |
| 9 | 北川 | 2015-06 | 3 | 20 | 洪雅 | 2016-06 | 8 |
| 10 | 北川 | 2015-06 | 2 | 21 | 洪雅 | 2016-07 | 3 |
| 11 | 北川 | 2016-04 | 11 | 总数 | | | 177 |

谱纯) 购自上海科醚化学科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品筛选

引种至成都平原后, 对表 1 中所收集的 21 份资源的植株表型及生长势进行初步观察, 筛选出居群编号 1、7、17 引种至基地后长势较好的 3 种资源分别代号为 GQ、MH 和 GK, 其中 GQ 和 MH 块茎较大, 而 GK 表现为多芽块茎, 具体表型见表 2。经中国科学院昆明植物研究所纪运恒副研究员初步鉴定为华重楼 *P. polyphylla* Smith. var. *chinensis* (Franch.) Hara (GQ)、滇重楼 *P. polyphylla* Smith. var. *yunnanensis* (Fanch.) Hand.-Mazz. (GK)、长柱重楼 *P. forrestii* (Takht.) H. Li (MH)。

2.2 序列扩增

取新鲜重楼叶片, 利用改良 CTAB 法提取总 DNA。参考之前研究^[6,12], 设计合成多对引物进行初步扩增筛选, 最终确定的 ITS 序列扩增引物为 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'、5'-TC-

CTCCTCCGCTT ATTGATATGC-3'; *psbA-trnH* 序列扩增引物为 5'-GTTATGCATGAACGTAATG-CTC-3'、5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3'。PCR 反应总体系为 25 μ L, 其中 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 1.0 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), KOD-Plus-聚合酶 0.5 μ L (1 U/ μ L), 模板 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳 20 min, 切胶回收, 回收产物连接到 *pEASY-Blunt Cloning Kit* 载体, 转化 Trans1-T1 感受态细胞, 检测阳性克隆, 测序。引物合成及测序服务均由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。测序结果显示, GQ、GK 和 MH 的 ITS 区扩增片段长度为 634 bp (图 1-A), *psbA-trnH* 区扩增片段长度为 1 077 bp (图 1-B)。

表 2 GQ、GK 和 MH 表型信息
Table 2 Phenotype of GQ, GK, and MH

| 代号 | 居群编号 | 根状茎 | 株高/cm | 叶 | 花 |
|----|------|--------------------------|-------|-----------|--------------------------|
| GQ | 1 | 粗壮, 直径 4~6 cm, 长 9~10 cm | 30~40 | 细长, 线状长圆形 | 雄蕊 2 轮, 花瓣短于萼片, 上部扩宽呈狭匙形 |
| GK | 7 | 多芽, 直径 1~2 cm, 长 5~6 cm | 40~50 | 宽, 倒披针形 | 雄蕊 2 轮, 花瓣丝状狭长, 长于萼片 |
| MH | 17 | 中等, 直径 2~3 cm, 长 7~8 cm | 30~40 | 宽, 长椭圆形 | 雄蕊 2 轮, 花瓣线形, 长于萼片 |

A

| | | | | | |
|---|---|-----|---|--|-----|
| MH | TCGAGATGCTAAATCTGGTCGGAAGATTGTGAACCTGTGA | 40 | MH | TGCAGAAATCCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT | 360 |
| GK | TCGAGATGCTAAATCTGGTCGGAAGATTGTGAACCTGTGA | 40 | GK | TGCAGAAATCCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT | 360 |
| GQ | TCGAGATGCTAAATCTGGTCGGAAGATTGTGAACCTGTGA | 40 | GQ | TGCAGAAATCCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT | 360 |
| conse:tcgagata aaat tggtcggaagattgtgaact gtga | | | conse:tgcagaatcccggtgaatcatcagagt tttgaaacgcaagtt | | |
| MH | ACGAATGATGATTATGGTGGAGGGTTCTCCCGAAGCCAA | 80 | MH | GCGCCCGATGTCATTCCGCAAAGGGCAGCGCTGCCTGGGC | 400 |
| GK | ACGAATGATGATTATGGTGGAGGGTTCTCCCGAAGCCAA | 80 | GK | GCGCCCGATGTCATTCCGCAAAGGGCAGCGCTGCCTGGGC | 400 |
| GQ | ACGAATGATGATTATGGTGGAGGGTTCTCCCGAAGCCAA | 80 | GQ | GCGCCCGATGTCATTCCGCAAAGGGCAGCGCTGCCTGGGC | 400 |
| conse:acgaatga gattatgggtgga ggttctcccgaaagccaa | | | conse:gcgcccgatgtcattccg caaagggcagcgctgcctgggc | | |
| MH | AGCCCCCTACACCCCTTGAGTCGAAAGGGAGCCATAGGCGT | 120 | MH | GTCACGCTCTTGCCTCGCTCGGTGCCAACTACGCCCTGTGGG | 440 |
| GK | AGCCCCCTACACCCCTTGAGTCGAAAGGGAGCCATAGGCGT | 120 | GK | GTCACGCTCTTGCCTCGCTCGGTGCCAACTACGCCCTGTGGG | 440 |
| GQ | AGCCCCCTACACCCCTTGAGTCGAAAGGGAGCCATAGGCGT | 120 | GQ | GTCACGCTCTTGCCTCGCTCGGTGCCAACTACGCCCTGTGGG | 440 |
| conse:agcccctaca cc ttgagtcgaaagggagccataggcgt | | | conse:gtcacgctcttgcctcgctcggtgcc aacta gcc gtggg | | |
| MH | GGCACCGCGCATGTGTGGGTGGGGCGCTAACAAAACCTCGG | 160 | MH | TCCAAAGTGTGGCACGGATGTGGATATTGGCCCTCCGCTG | 480 |
| GK | GGCACCGCGCATGTGTGGGTGGGGCGCTAACAAAACCTCGG | 160 | GK | TCCAAAGTGTGGCACGGATGTGGATATTGGCCCTCCGCTG | 480 |
| GQ | GGCACCGCGCATGTGTGGGTGGGGCGCTAACAAAACCTCGG | 160 | GQ | TCCAAAGTGTGGCACGGATGTGGATATTGGCCCTCCGCTG | 480 |
| conse:ggcacg cgcgatgtgtgggtggggcgct aacaaaactcgg | | | conse:tcuaaagtggttggcacggatgtggat attggcctc cgtg | | |
| MH | CGCAACAAGCGTCAAGGAAAGGATATGTGAATCCGCCCA | 200 | MH | TCCTTGTGCGCGCGGTAGCTGAAGAGTGGGATGCCAAATG | 520 |
| GK | CGCAACAAGCGTCAAGGAAAGGATATGTGAATCCGCCCA | 200 | GK | TCCTTGTGCGCGCGGTAGCTGAAGAGTGGGATGCCAAATG | 520 |
| GQ | CGCAACAAGCGTCAAGGAAAGGATATGTGAATCCGCCCA | 200 | GQ | TCCTTGTGCGCGCGGTAGCTGAAGAGTGGGATGCCAAATG | 520 |
| conse:cgcaacaagcgtcaaggaa aggatatgtgaat cc gcccca | | | conse:tccttgtg cgcgcggtagg tgaagagtgggatgccaaatg | | |
| MH | CTGTCAATTAGCGGATGCAGTGGCTTATGTTTCGAGAGT | 240 | MH | CAGACGGACACGGCGAGTGGTGCATCCAGCCGGACGCTCG | 560 |
| GK | CTGTCAATTAGCGGATGCAGTGGCTTATGTTTCGAGAGT | 240 | GK | CAGACGGACACGGCGAGTGGTGCATCCAGCCGGACGCTCG | 560 |
| GQ | CTGTCAATTAGCGGATGCAGTGGCTTATGTTTCGAGAGT | 240 | GQ | CAGACGGACACGGCGAGTGGTGCATCCAGCCGGACGCTCG | 560 |
| conse:ctgtcattag cggatgcagtggcttattgtttc gagagt | | | conse:nagacggacacggcgagtggtgc atccagccggacgctcg | | |
| MH | AATTTTATGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCCCGTA | 280 | MH | TGGTCTCGTCCCTCAAAGGCTCGGGGGCCCTTGTGACAC | 600 |
| GK | AATTTTATGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCCCGTA | 280 | GK | TGGTCTCGTCCCTCAAAGGCTCGGGGGCCCTTGTGACAC | 600 |
| GQ | AATTTTATGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCCCGTA | 280 | GQ | TGGTCTCGTCCCTCAAAGGCTCGGGGGCCCTTGTGACAC | 600 |
| conse:aattttatgactctcggcaacggatattcttggctcccgta | | | conse:tggctctcgtccctcaaaggctcggggggccctt gtgacac | | |
| MH | TCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGATGTGAAT | 320 | MH | CCAGTATGGTTCCGTTGTACCGTTGCCTAGCAT | 634 |
| GK | TCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGATGTGAAT | 320 | GK | CCAGTATGGTTCCGTTGTACCGTTGCCTAGCAT | 634 |
| GQ | TCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGATGTGAAT | 320 | GQ | CCAGTATGGTTCCGTTGTACCGTTGCCTAGCAT | 634 |
| conse:tcgatgaagaacgtagcgaatgcgatacttgatgtgaat | | | conse:ccas atggtt cg tgtacg gttgcctagcat | | |

| | | | | | | |
|---|-------|---|-----|-------|--|-------|
| B | MH | ACAATTTCCCTTCTAGACCTAGCTGCTGTGAAGCTCCATA | 40 | MH | TTTCTCCTTATCATAAGGTTATCCCCACCAATGAATAAA | 600 |
| | GK | ACAATTTCCCTTCTAGACCTAGCTGCTGTGAAGCTCCATA | 40 | GK | TTTCTCCTTATCATAAGGTTATCCCCACCAATGAATAAA | 600 |
| | GQ | ACAATTTCCCTTCTAGACCTAGCTGCTGTGAAGCTCCATA | 40 | GQ | TTTCTCCTTATCATAAGGTTATCCCCACCAATGAATAAA | 600 |
| | conse | acaatttcccttctagacctagctgctgtgaagctccata | | conse | tttctccttatacataaggttatccccaccaatgaataaa | |
| | MH | TACAAATGGATAAGACTTCTGCTTAGTGTATTAGTGTAT | 80 | MH | AAGTGCCTTCTTTATCTACTCACTTTATTTTCTATTTTGA | 640 |
| | GK | TACAAATGGATAAGACTTCTGCTTAGTGTATTAGTGTAT | 80 | GK | AAGTGCCTTCTTTATCTACTCACTTTATTTTCTATTTTGA | 640 |
| | GQ | TACAAATGGATAAGACTTCTGCTTAGTGTATTAGTGTAT | 80 | GQ | AAGTGCCTTCTTTATCTACTCACTTTATTTTCTATTTTGA | 640 |
| | conse | tacaaatggataagacttctgcttagtgtattagtgat | | conse | aagtgccttctttatctact cactttattttctattttga | |
| | MH | ACGAATCGTGAAGGGCAATACCAAAATAGTATATAAAGA | 120 | MH | ATTTTAGATTATATAAAATCAATTAACGACGAGATTGATT | 680 |
| | GK | ACGAATCGTGAAGGGCAATACCAAAATAGTATATAAAGA | 120 | GK | ATTTTAGATTATATAAAATCAATTAACGACGAGATTGATT | 680 |
| | GQ | ACGAATCGTGAAGGGCAATACCAAAATAGTATATAAAGA | 120 | GQ | ATTTTAGATTATATAAAATCAATTAACGACGAGATTGATT | 680 |
| | conse | acgaatcgttgaagg gcaataccaaatagtatata aaga | | conse | attttagattatataaaatcaattaacgacgagattgatt | |
| | MH | GGTTTCGATATGCTCCCATATTTTTTATTTTATTTTTTAT | 160 | MH | ATCGTTCCTTGCATGCTTTGCGAAAGTTAGAGTAGGCGCG | 720 |
| | GK | GGTTTCGATATGCTCCCATATTTTTTATTTTATTTTTTAT | 160 | GK | ATCGTTCCTTGCATGCTTTGCGAAAGTTAGAGTAGGCGCG | 720 |
| | GQ | GGTTTCGATATGCTCCCATATTTTTTATTTTATTTTTTAT | 160 | GQ | ATCGTTCCTTGCATGCTTTGCGAAAGTTAGAGTAGGCGCG | 720 |
| | conse | ggtttctgattgctcccatatTTTT ttttattttttat | | conse | atcgttccttgcattgctttgcgaaagttagagtaggcgcg | |
| | MH | ACCATTTATAGGTAATATAAGCACTTATAAATATAAATTT | 200 | MH | AATTCCTCCCAATTTATGACCTACCATATGATCTGTTATAT | 760 |
| | GK | ACCATTTATAGGTAATATAAGCACTTATAAATATAAATTT | 200 | GK | AATTCCTCCCAATTTATGACCTACCATATGATCTGTTATAT | 760 |
| | GQ | ACCATTTATAGGTAATATAAGCACTTATAAATATAAATTT | 200 | GQ | AATTCCTCCCAATTTATGACCTACCATATGATCTGTTATAT | 760 |
| | conse | accattttataggtaaatataagcacttataaattataaatt | | conse | aattctcccaatttatgacctaccatataatgctgattat | |
| | MH | ATAAATGATTTTCTTCTATCCTTCAATACAATTTTGATAT | 240 | MH | AAATCGTAAATGTTCTTTCCATTATGAATAGCGATTGT | 800 |
| | GK | ATAAATGATTTTCTTCTATCCTTCAATACAATTTTGATAT | 240 | GK | AAATCGTAAATGTTCTTTCCATTATGAATAGCGATTGT | 800 |
| | GQ | ATAAATGATTTTCTTCTATCCTTCAATACAATTTTGATAT | 240 | GQ | AAATCGTAAATGTTCTTTCCATTATGAATAGCGATTGT | 800 |
| | conse | ataaatgatTTTTcttctatccttcaatacaattttgat | | conse | aaata cgtaaatgttcctttccattatgaatagcgattgt | |
| | MH | GACAAGTGGATCTTTTTATCGGATACCTCCGTCCTCGAGC | 280 | MH | ATGGCCAATCATTGTGGGTATAATGGTAGATGCCCTAGAC | 840 |
| | GK | GACAAGTGGATCTTTTTATCGGATACCTCCGTCCTCGAGC | 280 | GK | ATGGCCAATCATTGTGGGTATAATGGTAGATGCCCTAGAC | 840 |
| | GQ | GACAAGTGGATCTTTTTATCGGATACCTCCGTCCTCGAGC | 280 | GQ | ATGGCCAATCATTGTGGGTATAATGGTAGATGCCCTAGAC | 840 |
| | conse | gacaagtggaatctTTTTatcggata cctccgctcctcgagc | | conse | atggccaatcattgtgggtataatggtagatgccctagac | |
| | MH | TCTAGGTCCTTAACTTTTTCACAATAGCACCCCATTTGACT | 320 | MH | CAAGTTACTATAAATTTCTTCTCCTCCCTCATGTTGAGTT | 880 |
| | GK | TCTAGGTCCTTAACTTTTTCACAATAGCACCCCATTTGACT | 320 | GK | CAAGTTACTATAAATTTCTTCTCCTCCCTCATGTTGAGTT | 880 |
| | GQ | TCTAGGTCCTTAACTTTTTCACAATAGCACCCCATTTGACT | 320 | GQ | CAAGTTACTATAAATTTCTTCTCCTCCCTCATGTTGAGTT | 880 |
| | conse | tctaggctcttaactTTTTtcaaatagcaccccatTTgact | | conse | caagttactataaatttcttctcctccctcatgttgagtt | |
| | MH | TCAGCTTGACTAATAAATAAATTTACTTCCTTCAAGCCCA | 360 | MH | TTTCGATTTTTTCCCGATAAATGATTAGCTACAAAAGGATT | 920 |
| | GK | TCAGCTTGACTAATAAATAAATTTACTTCCTTCAAGCCCA | 360 | GK | TTTCGATTTTTTCCCGATAAATGATTAGCTACAAAAGGATT | 920 |
| | GQ | TCAGCTTGACTAATAAATAAATTTACTTCCTTCAAGCCCA | 360 | GQ | TTTCGATTTTTTCCCGATAAATGATTAGCTACAAAAGGATT | 920 |
| | conse | tcaagcttgactaataaataaatt acttccttcaagccca | | conse | tttcgatTTTTtcccgataaattgattagctacaaaaggatt | |
| | MH | GGTTATGAGTAGCGTTTGTGCTGCAGAAATAAACC AATTT | 400 | MH | TTTTTTTAGTGAACGTGTCACAGCGGATTACTCCTTTTTT | 960 |
| | GK | GGTTATGAGTAGCGTTTGTGCTGCAGAAATAAACC AATTT | 400 | GK | TTTTTTTAGTGAACGTGTCACAGCGGATTACTCCTTTTTT | 960 |
| | GQ | GGTTATGAGTAGCGTTTGTGCTGCAGAAATAAACC AATTT | 400 | GQ | TTTTTTTAGTGAACGTGTCACAGCGGATTACTCCTTTTTT | 960 |
| | conse | ggttatgagtagcgTTTTgtgctgcagaaataaacc aattt | | conse | tttttttagtgaacgtgtcacagcggattactcctTTTT | |
| | MH | CAAAATGGGATAAGATGCCCAATAAGGCATGAGTTCAGT | 440 | MH | TACATTTTTCAAATTTGGCATTCTATGTCCAATATCTCGAT | 1 000 |
| | GK | CAAAATGGGATAAGATGCCCAATAAGGCATGAGTTCAGT | 440 | GK | TACATTTTTCAAATTTGGCATTCTATGTCCAATATCTCGAT | 1 000 |
| | GQ | CAAAATGGGATAAGATGCCCAATAAGGCATGAGTTCAGT | 440 | GQ | TACATTTTTCAAATTTGGCATTCTATGTCCAATATCTCGAT | 1 000 |
| | conse | caaaatgggataagatgcccaataaggcatgagtTccagt | | conse | tacatTTTTcaaatttggcattctatgtccaatattctcgat | |
| | MH | ATCATAAGTGTGTCGGCATAGGAACGCCCGCGAATCTGAT | 480 | MH | TTAAGTATGAAGGTAAGAATAAATAACAATAATGATGAATG | 1 040 |
| | GK | ATCATAAGTGTGTCGGCATAGGAACGCCCGCGAATCTGAT | 480 | GK | TTAAGTATGAAGGTAAGAATAAATAACAATAATGATGAATG | 1 040 |
| | GQ | ATCATAAGTGTGTCGGCATAGGAACGCCCGCGAATCTGAT | 480 | GQ | TTAAGTATGAAGGTAAGAATAAATAACAATAATGATGAATG | 1 040 |
| | conse | atcataagtggtgtcggcataggaacgccccggaattctgat | | conse | ttaagtatgaaggtaagaataaataacaataatgatgaatg | |
| | MH | CAATTACTCTTCGTGCTTTGAAAAACAGACATACATATATG | 520 | MH | GAAAAAGAAAAAAGAGAAAAATCCTTTAGCTAGATAAG | 1 077 |
| | GK | CAATTACTCTTCGTGCTTTGAAAAACAGACATACATATATG | 520 | GK | GAAAAAGAAAAAAGAGAAAAATCCTTTAGCTAGATAAG | 1 077 |
| | GQ | CAATTACTCTTCGTGCTTTGAAAAACAGACATACATATATG | 520 | GQ | GAAAAAGAAAAAAGAGAAAAATCCTTTAGCTAGATAAG | 1 077 |
| | conse | caattactcttcgtgctTTTgaaaaacagacatacatatATg | | conse | gaaaaagaaaaaagagaaaaatcctttagctagataag | |
| | MH | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 | MH | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 |
| | GK | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 | GK | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 |
| | GQ | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 | GQ | TTGAGCTAAAACTTTTACTTCTGTACTCGAACGCGAGTTC | 560 |
| | conse | ttgagctaaaactTTTTacttctgtactcgaacgcg agttc | | | | |

图 1 GQ、GK、MH 的 ITS (A) 序列和 *psbA-trnH* (B) 序列

Fig. 1 ITS (A) and *psbA-trnH* (B) sequences of GQ, GK, and MH

2.3 系统聚类树的构建

在 NCBI 中查询并下载已注册的重楼属植物的 ITS、*psbA-trnH* 相关序列 (表 3), 用 MEGA 6.0

将其与候选资源的序列进行比对, 去除头尾不完整的部分, 排好的序列以延龄草科 [*Trillium grandiflorum* (Michx.) Salisb. *Trillium luteum* (Muhl.)

Harb 和 *Trillium rivale* (S. Watson) S. B. Farmer] 为外类群, 进行系统发育树构建, 采用最大似然法, bootstrap 法自检验 1 000 次, 获得系统聚类树。

将 GQ、GK 和 MH 3 种资源与 26 种已知重楼的 ITS 和 *psbA-trnH* 序列 (表 3) 进行比较, 根据

序列比对结果构建系统聚类树 (图 2), 其中: (1) GQ: ITS 序列仅与华重楼在第 215 个位点存在单碱基差异, 序列一致性为 99.84%; *psbA-trnH* 序列与华重楼有 8 个位点的差异, 序列一致性为 99.26%, 2 个聚类树结果都显示 GQ 与华重楼聚在同一支。

表 3 重楼属植物序列登陆号

Table 3 GeneBank accession numbers of ITS and *psbA-trnH*

| 中文名 | ITS 序列号 | <i>psbA-trnH</i> 序列号 |
|--|----------|----------------------|
| 海南重楼 <i>P. dunniana</i> | DQ404225 | DQ404259 |
| 多叶重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>polyphylla</i> | DQ404224 | DQ404258 |
| 滇重楼 <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> | DQ404223 | DQ404257 |
| 华重楼 (七叶一枝花) <i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i> | DQ404218 | DQ404252 |
| 凌云重楼 <i>P. cronquistii</i> var. <i>cronquistii</i> | DQ404214 | DQ404248 |
| 西畴重楼 <i>P. cronquistii</i> var. <i>xichouensis</i> | DQ404221 | DQ404255 |
| 南重楼 <i>P. vietnamensis</i> | DQ404212 | DQ404246 |
| 毛重楼 <i>P. mairei</i> | DQ404213 | DQ404247 |
| 金线重楼 <i>P. delavayi</i> var. <i>delavayi</i> | DQ404215 | DQ404249 |
| 卵叶重楼 <i>P. delavayi</i> var. <i>petiolata</i> | DQ404220 | DQ404254 |
| 大理重楼 <i>P. daliensis</i> | DQ404226 | DQ404260 |
| 花叶重楼 <i>P. marmorata</i> | DQ404222 | DQ404256 |
| 禄劝花叶重楼 <i>P. luquanensis</i> | DQ404219 | DQ404253 |
| 球药隔重楼 <i>P. fargesii</i> | DQ404217 | DQ404251 |
| 黑籽重楼 <i>P. tibetica</i> | DQ404216 | DQ404250 |
| 五指莲 <i>P. axialis</i> | DQ404210 | DQ404244 |
| 长柱重楼 <i>P. forrestii</i> | DQ404208 | DQ404242 |
| 平伐重楼 <i>P. vaniotii</i> | DQ404209 | DQ404243 |
| 皱叶重楼 <i>P. rugosa</i> | DQ404211 | DQ404245 |
| 独龙重楼 <i>P. dulongensis</i> | DQ404207 | DQ404241 |
| 日本重楼 <i>P. japonica</i> | DQ404202 | DQ404236 |
| 四叶重楼 <i>P. quadrifolia</i> | DQ404204 | DQ404238 |
| 巴山重楼 <i>P. bashanensis</i> | DQ404205 | DQ404239 |
| 北重楼 <i>P. verticillata</i> | DQ404206 | DQ404240 |
| 无瓣重楼 <i>P. incompleta</i> | DQ404203 | DQ404237 |
| <i>Trillium grandiflorum</i> | DQ404195 | DQ404229 |
| <i>Trillium luteum</i> | DQ404200 | DQ404234 |
| <i>Trillium rivale</i> | AB018822 | AY727185 |

(2) GK: ITS 序列与滇重楼存在 33 个位点差异, 序列一致性为 94.79%; 而 *psbA-trnH* 序列与滇重楼只有 6 个位点的差异, 序列一致性高达 99.44%, *psbA-trnH* 序列聚类树结果与滇重楼所属的蚤休组 (sect. *Euthyra*) 分在一个支。(3) MH: ITS 序列 151 位点上为碱基 C 而其余重楼均为 T, 与长柱重楼存在 36 个位点差异, 序列一致性为 94.32%, 聚类结果单独分为一支; *psbA-trnH* 序列与长柱重楼有 8 个位点的差异, 序列一致性为 99.26%, 聚类树结果显示与长柱重楼所在支聚在一起。

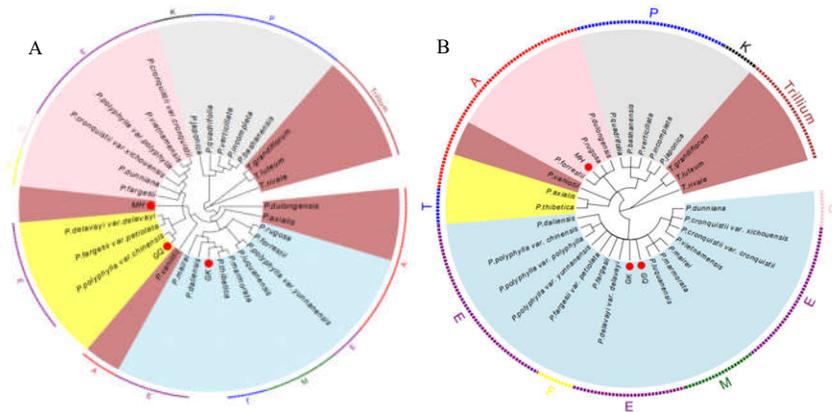
2.4 皂苷类成分的测定

2.4.1 对照品溶液的制备 取重楼皂苷 I、II、VI、VII 对照品各 10 mg, 精密称定, 加甲醇制成混合对照品溶液 10 mL。

2.4.2 供试品溶液的制备 挖取正常倒苗后的块

茎, 洗净、切片、晾干、磨粉、烘干, 精密称取各重楼药材粉末 0.5 g, 精密加入 90% 甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 氮吹仪吹干, 加入 90% 甲醇使溶解并定容至 10 mL, 得到供试品溶液, 低温保存待测^[7]。

2.4.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~40 min, 30.0%~60.0% A; 40~50 min, 60.0%~30.0% A); 检测波长 203 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C。色谱峰理论塔板数按重楼皂苷 I 峰计算不低于 4 000。对照品和样品的色谱图见图 3。由图 3 可知, 在设定的色谱条件下, 对照品和供试品溶液的 HPLC 各个化合物分离良好, 色谱峰的分度均 >1.5。重楼皂苷 I、II、VI、VII 的保留时间为 31.763、28.906、21.785、19.178 min。



不同的色块代表不同的分支，外圈虚线代表李恒在 1998 年对重楼属植物的系统分类，P-北重楼组 A-五指莲组 D-海南组 E-蚤休组 F-球药隔组 K-日本重楼组 M-花叶组 T-黑籽组

Different color blocks represent different branches, dotted line represents packet of Li (1998) P-sect. *Paris* A-sect. *Axiparis* D-sect. *Dummanae* E-sect. *Euthyra* F-sect. *Fargesianae* K-sect. *Kinugasa* M-sect. *Marmoratae* T-sect. *Thibeticae*

图 2 基于 ITS (A) 和 *psbA-trnH* (B) 的系统聚类树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on sequences of ITS (A) and *psbA-trnH* (B)

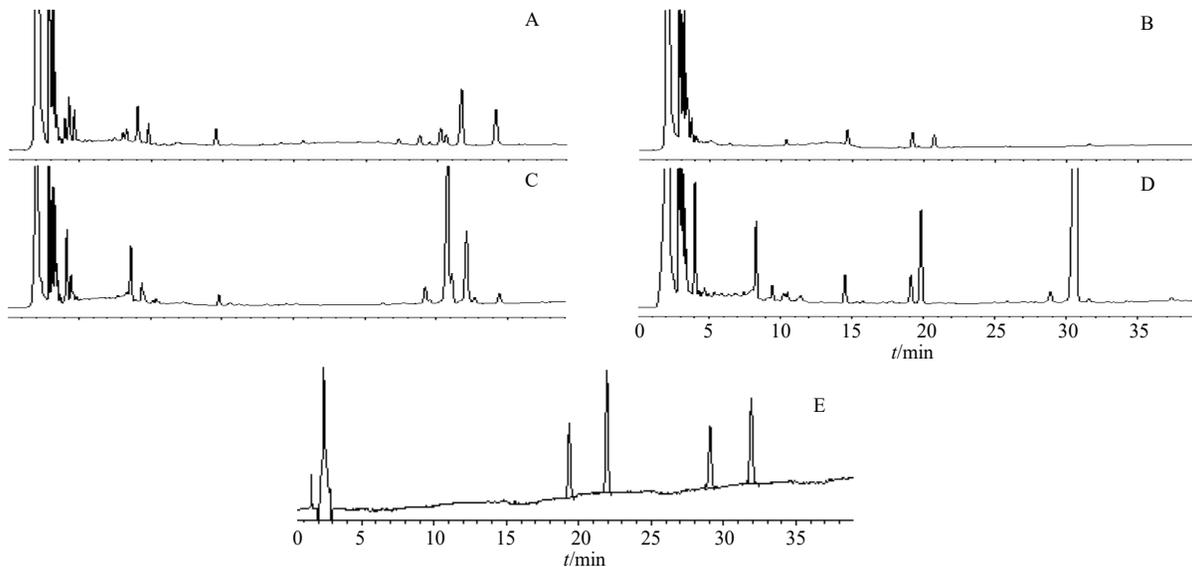


图 3 GQ (A)、GK (B)、MH (C)、CK (D) 和皂苷对照品 (E) 的 HPLC 图谱

Fig. 3 Typical HPLC of GQ (A), GK (B), MH (C), *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (D), and saponin standard (E)

2.4.4 标准曲线的绘制 将“2.4.1”项对照品混合溶液稀释成 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。分别进样 10 μL ，不同的进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归。得到重楼皂苷 I、II、VI、VII 的回归方程分别为 $Y_{\text{重楼皂苷 I}}=2.525 2 X+0.263 6$ ， $r=1.000$ ； $Y_{\text{重楼皂苷 II}}=2.129 9 X-0.832 0$ ， $r=0.999 9$ ； $Y_{\text{重楼皂苷 VI}}=2.974 5 X-1.000 3$ ， $r=0.999 9$ ； $Y_{\text{重楼皂苷 VII}}=2.129 7 X+1.034 8$ ， $r=0.999 9$ 。各项系统适应性考察、测定法均参照《中国药典》2015 年版的含量测定相关操作进行，每个样品 3 个重复，每重复平行测定 3 次，取均值，RSD 均小于 0.3%^[6,10,13]。

2.4.5 样品的测定 取“2.4.2”项供试品溶液，按

“2.4.3”项色谱条件测定，根据标准曲线方程计算各成分含量。由皂苷含量结果可知（图 4、表 4），重复间稳定性较好，但不同资源所含皂苷的类型、含量及其所占比例差异较大。其中：对照药材滇重楼（CK）仅测出重楼皂苷 I、II 和 VII，总含量为 6.15 mg/g ，重楼皂苷 VII 占比最高（62.76%）；GQ 检测出含 4 种待测皂苷类型，与 CK、GK 和 MH 相比 4 种皂苷总含量最高（10.57 mg/g ），且其中重楼皂苷 I 占 4 种皂苷总量的比例最高（74.93%）；GK 未检测到重楼皂苷 II 且总含量最低（2.98 mg/g ），但其重楼皂苷 VII 占比为 56.38%，为 4 种所测样本中重楼皂苷 VII 的最高占比；MH

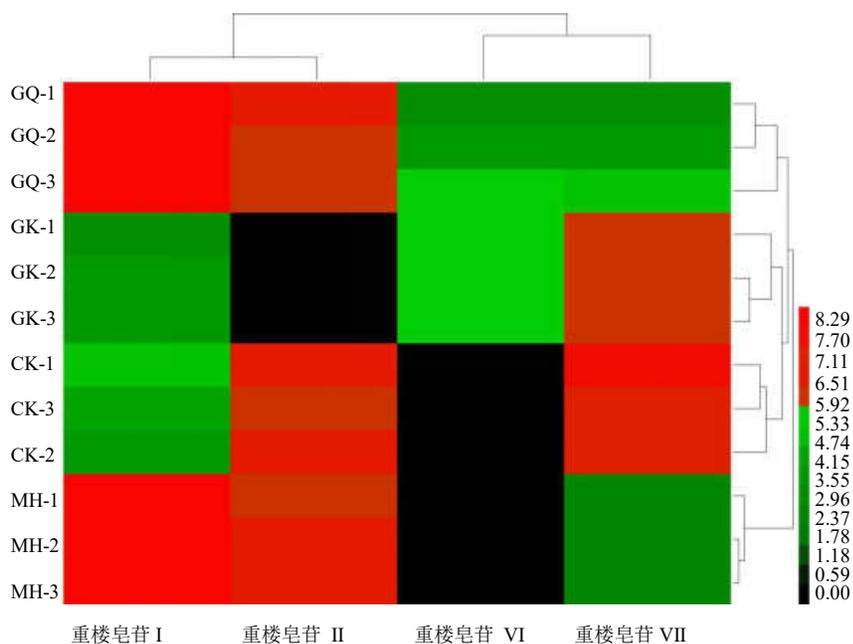


图 4 资源热图

Fig. 4 Thermal map of three resources

表 4 3 个资源重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量 (n = 3)

Table 4 Content of saponins I, II, VI, and VII of three resources (n = 3)

| 编号 | 重楼皂苷 I | | 重楼皂苷 II | | 重楼皂苷 VI | | 重楼皂苷 VII | | 质量分数 (mg·g ⁻¹) |
|----|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|-------------------------------|
| | 质量分数/(mg·g ⁻¹) | 占比/% | |
| GQ | 7.92 | 74.93 | 1.89 | 17.88 | 0.42 | 3.97 | 0.34 | 3.22 | 10.57* |
| GK | 0.27 | 9.06 | — | 0 | 1.03 | 34.56 | 1.68 | 56.38 | 2.98 |
| MH | 8.17 | 80.57 | 1.85 | 18.24 | — | 0 | 0.12 | 1.18 | 10.14* |
| CK | 0.45 | 7.32 | 1.83 | 29.76 | — | 0 | 3.86 | 62.76 | 6.14* |

“*”表示超过药典规定的含量要求 “—”表示未检测出

“*” means that content of *Paris* saponins I, II, VI and VII is more than 6 mg·g⁻¹ “—” means that content of *Paris* saponins I, II, VI, and VII is not detected

同 CK 一样无重楼皂苷 VI，但皂苷总含量较高 (10.14 mg/g)，且各皂苷所占比例与 CK 相比也有较大差异，其中重楼皂苷 I 占比最高 (80.57%)，比 CK 高出 73.25%，而重楼皂苷 VII 占比较低，仅为 1.18%。

3 讨论

重楼作为一种用药量极大的中药，其产量受限于缓慢的发育过程，质量又受遗传多样性影响，造成重楼市场品种混乱，品质参差不齐。优异的种质资源是培育高产、优质、广适品种的重要材料基础，有利于保障药效均一性，解决重楼市场产能低下等问题。因此近年来，重楼属种质资源的评价研究已受到逐渐重视^[14]。在本研究中，基于四川盆周山地高海拔生长环境中储备的野生重楼资源库，收集了 21 个居群的重楼属资源材料，并引种至成都平原，

根据引种成功率、长势及表型，筛选了编号为 GQ、GK、MH 的 3 个表现优异的资源，其中 GQ 资源块茎大，植株健壮，在成都平原适应性强，长势好；GK 资源表现为多芽块茎，但春天出苗时间晚，长势好；MH 资源块茎较大，植株外型与其他材料差异较大，矮壮，倒苗时间晚，长势好。经专家形态学鉴定，GQ、GK、MH 分别为华重楼、滇重楼、长柱重楼。

由于重楼属下的种较多，种下又有不同的变种和变型。不同种、产地及居群的重楼属植物，经长期的自然选择，其表型及药效成分等性状均具差异^[4,11,15-16]，而这些差异性性状往往是受多样化的遗传基础控制的。本研究中，GQ、GK 植株的枝干、叶片等表型分别和重楼属的华重楼、滇重楼相近，但在花特征方面，GQ 和华重楼、GK 和滇重楼

却有明显差异(表 3)。据李恒的记载,华重楼花瓣多呈狭线形,滇重楼花瓣上部扩宽呈狭匙形^[2],而本研究中华重楼 GQ 的花瓣呈狭匙形,滇重楼 GK 花瓣为狭线形。因此,本实验进一步结合 DNA 条形码技术,通过分子鉴定对 3 个资源的“物种”分类关系进行验证。分子鉴定的结果表明:根据 ITS 序列,GQ 与华重楼的亲缘关系十分紧密;GK 与侧膜亚属聚在一亚支上,与滇重楼亲缘关系较近;但 MH 却被单独为一支,与其亲缘关系最近的支为中轴亚属亚支,说明 MH 与包括长柱重楼在内的中轴亚属在进化上应有着很近的亲缘关系。由于 ITS 的序列短,能够提供性状数量有限,且 ITS 在同种的个体间也存在变异,承受的选择压力小,因此,发生突变的概率大大增加,其片段的插入、缺失和替换是常见的,这些有利于获得变异信息来分析物种的遗传多样性,但同时也不可避免地增大了分析的误差^[17]。任保青等^[18]认为单用 1 个基因或 1 个短的 DNA 片段来区别物种几乎是不可能的,但是可以通过多个条形码组合来进行物种的鉴定。国家药典委员会于 2012 年讨论并通过在《中国药典》2010 年版增补本中列入《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》,该指导原则通过对大样本量中药材进行 DNA 条形码分子鉴定研究,建立以 ITS2 序列为核心、psbA-trnH 序列为辅的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系^[19]。而刘涛等^[12]的研究结果表明 psbA-trnH 片段在重楼属的种间变异幅度较大,可以轻易地将不同种重楼区分开来。因此课题组进一步利用 psbA-trnH 序列进行分子鉴定,结果表明 GQ、GK 与华重楼、滇重楼的 psbA-trnH 序列一致性分别达到 99.17%、99.35%,亲缘关系较近,聚类后都被分在了侧膜亚属;MH 则和中轴亚属组下的长柱重楼的序列相似性达到 99.26%,聚类后与中轴亚属的长柱重楼 *P. forrestii*、皱叶重楼 *P. rugosa*、独龙重楼 *P. dulongensis* 分在一支。因此,综合形态学和分子系统学鉴定结果,推测 GQ、GK、MH 分别为华重楼、滇重楼、长柱重楼在四川盆周山地的居群水平上的优良资源材料。

由于重楼属同种植物在不同产地的药效活性成分上具有较大差异,在药效药理上的作用可能也具有偏向性,直接影响了其药用价值^[20]。因此,挖掘并评价不同种源的重楼种质资源的药效活性成分,是发挥药用重楼资源最大效用的前提。本研究中,GQ、GK、MH 作为不同居群水平上华重楼、

滇重楼、长柱重楼资源材料,和对照 CK 在皂苷含量方面也各具特点,其中:华重楼 GQ 资源是唯一检测出同时含 4 种皂苷的材料,总量(10.57 mg/g)最高,显著高于《中国药典》里规定的“不低于 6 mg/g”,且重楼皂苷 I、II 两者的总占比也较高,表现为 92.81%,推测其为华重楼在四川盆周山地的高药用价值资源材料。和 GQ 类似,长柱重楼 MH 资源的重楼皂苷总量(10.14 mg/g)显著高于 CK,重楼皂苷 I 和 II 占比也较高,分别高达 80.57%和 18.24%,两者共占 98.81%,这与李朋等^[21]的研究结果一致,即在长柱重楼中主要含有重楼皂苷 I 和 II 较多,含很少或几乎不含偏诺皂苷 VI、VII。已有研究表明,重楼皂苷 I、II 具有细胞毒活性和免疫调节活性^[22],可能具有抗肝癌、肺癌功效^[23-24]。因此 GQ 和 MH 可作为重楼皂苷 I、II 的专用萃取材料,在肿瘤治疗方面具较大应用潜力,同时,也暗示长柱重楼资源 MH 可能可作为华重楼的替代药材入药。滇重楼 GK 资源材料的 4 种皂苷总含量虽最低(2.98 mg/g),但其重楼皂苷 VII 的占比却最多(56.38%),和滇重楼 CK 的重楼皂苷 VII 占比表现一致(62.76%),而研究表明重楼皂苷 VII 在止血治疗胃炎胃痛等方面效果显著^[25-26]。另外,根据前人研究^[27],重楼皂苷 VI 具有抑制结肠癌细胞转移作用,而作为市面上所用最多的入药材料,许多滇重楼中重楼皂苷 VI 的含量却较低,刘欢等^[28]对 18 批不同产地滇重楼的皂苷含量测定结果显示,其中重楼皂苷 VI 质量分数仅为 0~0.677 mg/g,在所测总皂苷含量中的占比最高也仅为 9.27%,此结果与本研究对照滇重楼 CK 结果一致,即 CK 中未检测出重楼皂苷 VI(表 4)。但本研究滇重楼资源 GK 中,重楼皂苷 VI 却含 1.03 mg/g,占比也较高(34.56%),暗示其在萃取重楼皂苷 VI 方面具有较大应用价值。

综上所述,基于华重楼资源 GQ、滇重楼资源 GK 和长柱重楼资源 MH 在成都平原引种后,生活力和块茎性状等方面的优异表现,结合其各自的活性成分特点,认为以上 3 种资源可作为优良种质资源,用于重楼育种和药用资源的进一步开发,为药材合理使用,提高资源利用率,缓解资源压力及促进重楼的可持续利用提供材料基础。

志谢:中国科学院昆明植物研究所纪运恒副研究员在资源鉴定中给予了帮助。

参考文献

- [1] 何俊, 张舒, 王红, 等. 滇重楼植物的研究进展 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(3): 271-276.
- [2] 李恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 李强, 丁春邦, 李燕, 等. 四川重楼属药用植物种类及地理分布 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 629-631.
- [4] 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.
- [5] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy [J]. *Nature*, 2002, 418(6897): 479-479.
- [6] Ji Y H, Peter W F, Li H, et al. Phylogeny and classification of *Paris* (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data [J]. *Annals Bot*, 2006, 98: 245-256.
- [7] 中国药典 [S]. 二部. 2015.
- [8] 尹鸿翔, 张浩, 薛丹, 等. 川滇地区重楼属药用植物资源质量初评 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1344-1346.
- [9] 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.
- [10] 景松松, 王颖, 李雪娇, 等. HPLC 法测定不同产地重楼属植物中 7 种甾体皂苷成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2435-2437.
- [11] 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, 34(5): 803-806.
- [12] 刘涛, 赵英良, 杨莹, 等. 滇重楼的 psbA-trnH 条形码分子鉴定研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015(27): 758-762.
- [13] 彭世陆, 刘丽芳, 朱华旭, 等. RP-HPLC 测定中药复方癌痛平中重楼皂苷 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4281-4283.
- [14] 王跃虎, 牛红梅, 张兆云, 等. 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 833-839.
- [15] 唐玲, 王艳芳, 李荣英, 等. 滇重楼不同居群的表型多样性研究 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(18): 89-95.
- [16] 赵俊凌, 李学兰, 王艳芳, 等. 云南省不同地区滇重楼 4 种皂苷含量的比较 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(8): 2076-2078.
- [17] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [18] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.
- [19] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [20] Zhao Y, Kang L P, Liu Y X, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75(4): 356-363.
- [21] 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.
- [22] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.
- [23] 景松松, 王颖, 李雪娇, 等. 黑籽重楼化学成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1093-1098.
- [24] 颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷成分体外抗肺癌活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 424-428.
- [25] Fu Y L, Yu Z Y, Tang X M, et al. Pennogenin glycosides with aspirostanol structure are strong platelet agonists: Structural requirement for activity and mode of platelet agonist synergism [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(3): 524-533.
- [26] Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, et al. Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* ethanol-or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(6): 1101-1106.
- [27] 李宇华, 孙阳, 樊磊, 等. 重楼皂苷 VI 抑制结肠癌 LoVo 细胞转移的作用及机制研究 [J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(8): 571-574.
- [28] 刘欢, 何忠俊, 梁社往, 等. 滇重楼高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1846-1851.