论文

基于化学成分及分子特征中药材肉苁蓉生态型研究

黄林芳^①, 郑司浩^①, 武拉斌^①, 降雪^①, 陈士林^{②*}^① 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;^② 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: slchen@implad.ac.cn

收稿日期: 2013-08-31; 接受日期: 2013-10-04; 网络版发表日期: 2014-03-10

国家自然科学基金(批准号: 81274013, 30801519)资助项目

doi: 10.1360/052013-279

摘要 中药材生态型多样性是道地药材研究的重要组成部分。道地药材——“沙漠人参”肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)是中国最具特色的干旱区濒危药用植物和关键物种, 新疆和内蒙古是其重要主产区 and 传统道地产区。前期研究表明, 内蒙古阿拉善高原和新疆北疆是肉苁蓉两大生态适宜生产集中区(两类生态型), 本文进一步对两大产区肉苁蓉化学成分、分子地理标识及生态因子进行考察。应用 UPLC-QTOF/MS 技术对肉苁蓉苯乙醇苷及环烯醚萜苷类成分进行分析; 基于 *psbA-trnH* 序列对不同产地肉苁蓉进行分子鉴别及分析; 通过“中国气象科学数据共享服务网”, 获得两大产区包括温度、水分、光照等生态因子数据; 运用生物统计、数量分类等分析方法, 对肉苁蓉进行生态型划分。UPLC-QTOF/MS 分析表明, 内蒙古与新疆产肉苁蓉明显不同, 鉴定出 16 种成分, 其中 2'-乙酰毛蕊花糖苷可作为区分两大产地肉苁蓉的指标成分; *psbA-trnH* 序列比对分析发现, 肉苁蓉不同产地间序列位点存在差异, 新疆产肉苁蓉在 191 位点为 G, 内蒙古产则为 A, NJ tree 分析表明, 肉苁蓉两个产地明显分为两支, 差异显著; 生态因子数据亦表明, 肉苁蓉的两大气候地理分布格局。本文为研究不同生态区域中药生态型及品质变异的生物学本质提供了一种新思路, 也为深化道地药材理论研究奠定重要基础。

关键词

肉苁蓉

生态型

psbA-trnH 序列

化学成分

地理分布

中药材生态变异与生态型的分化和形成是种内对不同环境生态条件长期适应与自然选择, 在生理生化上表现差异的结果^[1]。中国多样的气候地理生态条件形成了特有的中药材多道地、多产地现象, 即中药材生态型的多样性, 如川麦冬与浙麦冬(*Ophiopogon japonicus* (L.f) Ker-Gawl)、川泽泻与建泽泻

(*Alisma orientale* (Sam.) Juzep.)、关外西洋参与关内西洋参(*Panax quinquefolium* L.)等, 种内变异是中药材品质差异的实质^[2]。道地药材品质特征及其成因的系统揭示是 10000 个科学难题(医学卷)之一^[3]。生态型的研究已成为值得探索的重要科学问题。

“沙漠人参”——肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)为

引用格式: 黄林芳, 郑司浩, 武拉斌, 等. 基于化学成分及分子特征中药材肉苁蓉生态型研究. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 318–328

Huang L F, Zheng S H, Wu L B, et al. Ecotypes of *Cistanche deserticola* based on chemical component and molecular traits. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 318–328, doi: 10.1360/052013-279

列当科肉苁蓉属多年生专性全寄生草本植物, 其干燥带鳞叶的肉质茎入药, 是中国沙漠地区特有的名贵药材, 性甘、咸、温, 归肾、大肠经. 具有补肾阳、益精血、润肠通便的功能, 为历代补肾助阳处方中使用频率最高的中药, 抗衰老方剂使用率仅次于人参居第二位^[4,5]. 肉苁蓉主要分布在古尔班通古特沙漠、乌兰布和沙漠、巴丹吉林沙漠等地, 西东横跨新疆-甘肃-宁夏-内蒙古等地. 新疆和内蒙古是中国肉苁蓉资源蕴藏量最大的道地产区^[6,7]. 肉苁蓉中含有多种类型的化学物质, 主要有苯乙醇苷类、环烯醚萜及其苷类、木脂素及其苷类、挥发性成分、酚苷、单萜苷、生物碱、糖类、糖醇、甾醇等成分^[8]. 崔光红等人^[7]利用随机扩增多态性(random amplified poly- morphic DNA, RAPD)技术分析肉苁蓉的遗传多样性, 发现肉苁蓉在居群间存在一定程度的分化, 且已明显分化成两个生态型; 甘晓燕等人^[9]利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术对肉苁蓉种内不同花冠类型进行标记鉴定, 同样发现肉苁蓉种内具有明显的差异性. 本课题组前期研究表明, 内蒙古阿拉善高原和新疆北疆是肉苁蓉两大生态适宜生产集中区(两类生态型)^[10]. 本文进而对该地理分布格局差异的两个道地产区的肉苁蓉进行化学及分子地理标识的研究. 首次应用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(ultra- performance liquid chromatography-quadrupole time of flight/mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS)技术结合多变量模式识别方法主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)以及正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)对不同产地肉苁蓉的化学成分进行分析, 并运用 *psbA-trnH* 序列成功对两个产地的肉苁蓉进行区分与鉴别. 本研究为阐明中药资源品质差异及生态驱动, 对其他多产地中药材生态适应性研究有重要示范作用, 对保护濒危物种、丰富生物多样性、维护可持续的生态系统具有重大科学价值.

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2012 年 5 月(肉苁蓉主要采收期)赴主产区新

疆、内蒙古、甘肃、宁夏等地进行实地调研和药材样品采集, 图 1A 示调研地及 2 种肉苁蓉生态型分布, 图 1B 示肉苁蓉及其寄主梭梭(*Haloxylon ammodendron* (C. A. Mey.) Bunge ex Fenzl). 样品收集 36 份, 其中新疆样品编号 R1, R2, R5, R6; 内蒙古样品编号 R3, R4, R7, 均野生(表 1). 样品由中国医学科学院药用植物研究所林余霖教授鉴定为列当科植物肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y.C. Ma)的干燥带鳞叶的肉质茎. 凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所标本馆.

1.2 实验方法

(1) UPLC-QTOF/MS 分析. (i) 仪器与试剂. Acquity UPLC-Synapt G2 MS 色谱-质谱联用仪(Waters 公司, 美国)、MassLynx V4.1 质谱工作站(Waters 公司)、ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m, Waters 公司)、ELGA PURELAB Classic-UVF 纯水仪(英国). 乙腈(色谱纯, Fisher, 美国)、甲酸(色谱纯)、超纯水. (ii) 供试样品制备. 分别取肉苁蓉药材粉末(过四号筛)约 1 g, 精密称定, 精密加入 70%甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 浸泡 30 min, 超声处理 40 min (功率 250 W, 频率 35 kHz), 放冷, 再称定重量, 加 70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 8854×g 高速离心 10 min, 取上清液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 待测. (iii) 超高效液相色谱条件. 采用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m, Waters 公司); 柱温为 25℃, 流速为 0.30 mL/min, 进样量为 2 μ L; 流动相 A 为 0.1%甲酸水, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱(0~3 min, 10%~22%B; 3~4 min, 22%~23%B; 4~6 min, 23%~35%B; 6~8 min, 35%~37%B; 8~11 min, 37%~42%B; 11~12 min, 42%~48%B; 12~15 min, 48%~10%B). (iv) 质谱条件. 采用电喷雾电离离子源(electrospray ionization, ESI), 负离子模式检测. 质量校正质荷比 m/z 为 50~1200, 毛细管电压为 3.0 kV, 锥孔电压为 10~40 kV, 离子源温度为 120℃, 脱溶剂温为 450℃, 雾化气(N_2)流速为 60 L/h, 脱溶剂气(N_2)流速为 600 L/h. 碰撞能量(collision energy, CE)为 6 V, 质量校正质荷比 m/z 为 554.2615. (v) 数据分析. 采用 MarkerLynx 4.1 软件对负离子模式下不同产地肉苁蓉的质谱数据进行分析, 利用 PCA 方法、PLS-DA 方法和 OPLS-DA 方法

图1 肉苁蓉野外实地考察

A: 采样点及两种生态型分布; B: 肉苁蓉及其寄主梭梭

对不同产地的样品进行区分, 并寻找指标成分.

(2) 基于 *psbA-trnH* 序列的分子鉴别. (i) 基因组总 DNA 提取. 每份样品取 30~40 mg, Retsch MM400 DNA 提取震荡粉碎研磨仪(30 r/s, 4 min)研磨样品成粉末, 使用天根-植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型, 北京)提取样品 DNA, 具体步骤: 加入 65℃ 提前水浴的 GP1 缓冲液 700 μ L, 巯基乙醇 1 μ L, 65℃ 水浴 2 h(期间振荡 3~5 次); 加入氯仿-异戊醇 (24:1)混合液 700 μ L, DH-II 旋转混合仪摇匀 5 min; 10625 $\times$ g 离心 5 min, 取上清液(换收集管), 加入异丙醇 700 μ L, 混合仪混匀 15~20 min; 混合液分装至吸附柱, 放入离心管内 10625 $\times$ g 离心 40 s; 弃废液, 加入缓冲液 GD 500 μ L, 10625 $\times$ g 离心 40 s; 弃废液, 加入漂洗液 PW 700 μ L, 10625 $\times$ g 离心 40 s; 弃废液, 加

入漂洗液 PW 500 μ L, 10625 $\times$ g 离心 40 s; 弃废液, 空管离心 2 min, 室温风干; 加 100 μ L ddH₂O 入吸附柱洗脱 DNA, 静置 2 min(溶解 DNA), 10625 $\times$ g 离心 2 min, 即得总 DNA 模板. (ii) *psbA-trnH* 序列引物 PCR 扩增、电泳检测. 本研究经过前期预实验, 发现 *psbA-trnH* 序列对于肉苁蓉的扩增在扩增效率以及测序质量方面表现最好, 而核基因序列 ITS(internal transcribed spacer), ITS2 与叶绿体基因 *rbcL* 序列相对欠佳, 因此本研究运用 *psbA-trnH* 序列作为鉴别不同产地肉苁蓉的条形码序列. PCR 体系总体积为 25 μ L, 包括双蒸水 8.5 μ L, 2 $\times$ PCR 扩增混合液 12.5 μ L, PA/TH 上下游引物 1/1 μ L, 总 DNA 模板 2 μ L. PCR 反应条件为 94℃ 1 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 7 min. 1%琼脂糖凝胶电泳

表 1 肉苁蓉样品信息表

样品编号	药材名	植物拉丁名	采集地	经纬度	GenBank 登录号
R11~R13	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	新疆, 乌鲁木齐	N43.88°, E84.73°	KF289954
				N43.88°, E87.85°	KF289955
				N43.88°, E87.86°	KF289956
R21~R23	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	新疆, 甘家湖	N44.91°, E83.38°	KF289957
				N44.91°, E83.39°	/
				N44.90°, E83.39°	KF289958
				N39.74°, E102.61°	KF289964
R51~R56	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	新疆, 和布克赛尔蒙古自治县	N46.79°, E85.70°	KF574740
				N46.78°, E85.70°	KF574741
				N46.78°, E85.71°	KF574742
				N46.79°, E85.71°	KF574743
				N46.80°, E85.71°	KF574744
				N46.80°, E85.71°	KF574745
R61~R66	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	新疆, 克拉玛依	N45.58°, E84.93°	/
				N45.58°, E84.92°	/
				N45.58°, E84.93°	KF574746
				N45.60°, E84.92°	KF574747
				N45.61°, E84.89°	KF574748
				N45.63°, E84.88°	KF574749
R31~R33	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	内蒙古, 阿拉善左旗	N38.90°, E105.54°	KF289959
				N38.90°, E105.56°	KF289960
				N38.90°, E105.55°	KF289961
R41~R43	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	内蒙古, 巴丹吉林沙漠	N39.73°, E102.60°	KF289962
				N39.73°, E102.61°	KF289963
R71~R82	肉苁蓉	<i>C. deserticola</i>	内蒙古, 巴丹吉林沙漠	N39.34°, E101.75°	KF574750
				N39.43°, E101.58°	KF574751
				N39.52°, E101.40°	KF574752
				N39.21°, E102.13°	KF574753
				N39.10°, E101.96°	KF574754
				N39.08°, E102.25°	KF574755
				N39.17°, E102.39°	KF574756
				N39.12°, E102.50°	KF574757
				N39.22°, E102.38°	/
				N39.25°, E101.98°	KF574758
				N39.56°, E101.20°	KF574759
				N39.65°, E101.06°	KF574760

140 V 25 min 检测 PCR 产物, 凝胶成像仪分析并记录电泳结果. (iii) 扩增产物测序、序列拼接、比对及分析. ABI3730 测序仪直接对 PCR 产物测序; 运用 CondonCode Aligner 对序列进行拼接, 去低质量区等; MEGA 对拼接好的序列进行比对, 并计算遗传距离、建立邻接树(NJ tree); 利用计算机 Perl 语言统计分析不同序列种内、种间遗传距离的分布频度, 评价不同 DNA 条形码的序列的 barcoding gap, 并运用最近距离法(nearest distance)和相似性搜索算法(BLAST 1)考

察序列的鉴定成功率^[11].

(3) 生态因子数据获取. 通过“中国气象科学数据共享服务网”(http://cdc.cma.gov.cn/home.do), 查找采样点附近气象站所记录的气象数据. 所提取的生态因子包括有年均温、1 月均温、1 月最低温、7 月均温、7 月最高温、年均相对湿度、年均日照时数和年均降水量等. 新疆产区选取奇台、乌鲁木齐和布克赛尔气象站提取生态因子, 内蒙古产区选取吉兰泰、巴彦毛道和鄂托克旗气象站提取生态因子.

2 结果与分析

2.1 UPLC-QTOF/MS 分析

(1) 肉苁蓉化学成分的鉴定. 供试品负离子模式下 UPLC-QTOF/MS 不同产地代表性样品总离子流色谱图如图 2 所示, 对 16 个主峰的质谱结果进行分析, 负离子模式下主要产生[M-H]⁻的分子离子峰. 根

据 Q-TOF(quadrupole-time of flight)高分辨质谱计算各个主要成分的元素组成、二级质谱信息, 并结合相关参考文献^[5,12~17], 共推断了 16 个主要成分的可能结构, 类型主要为苯乙醇苷类和环烯醚萜苷类化合物, 鉴定结果见表 2. 峰 6~9 以及 12 的保留时间、分子量、以及质谱碎片数据与文献^[12~14]报道一致, 鉴定为松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷以

图 2 不同产地肉苁蓉 UPLC-QTOF/MS 谱图

表 2 肉苁蓉负离子模式下主要离子峰的鉴别

峰编号	保留时间 (min)	化合物	分子式	[M-H] ⁻ <i>m/z</i> 实测值 (Da)	[M-H] ⁻ <i>m/z</i> 理论值(Da)	误差	离子碎片	参考文献
1	3.69	肉苁蓉苷 F	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487.1454	487.1452	0.4	—	[15]
2	4.00	mussaenoside acide	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.1289	375.1291	-0.5	—	[16]
3	5.89	cistanbinoside C1/C2	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₁	801.2449	801.2453	-0.5	—	[5]
4	6.58	紫葳新苷	C ₄₇ H ₂₈ O ₃	639.1947	639.1960	-2.0	621.2183, 179.0359, 161.0235	[12]
5	6.66	紫葳新苷异构体	C ₄₇ H ₂₈ O ₃	639.1947	639.1960	-2.0	621.2183, 179.0359, 161.0235	[12]
6	6.89	松果菊苷	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	785.2517	785.2504	1.7	623.2201, 477.1612, 461.1643, 161.0244, 135.0445	[12~14]
7	7.64	肉苁蓉苷 A	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	799.2673	799.2661	1.5	637.2346, 623.2080, 491.1746, 161.0241	[12~14]
8	8.28	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.1989	623.1976	2.1	421.1646, 319.0787, 161.0237	[12~14]
9	9.48	异毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.1989	623.1976	2.1	421.1646, 319.0787, 161.0237	[12~14]
10	9.57	syringalide A-3'-α-L-rhamnopyranoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	607.2023	607.2027	-0.7	445.1716, 299.1123, 201.0165, 161.0235	[12]
11	9.89	肉苁蓉苷 C	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637.2137	637.2132	0.8	475.1777, 461.1655, 315.1072, 179.0344, 161.0245	[12]
12	10.35	2'-乙酰毛蕊花糖苷	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	665.2086	665.2082	0.6	645.1805, 623.2011, 503.1779, 461.1668, 315.1097, 179.0339, 161.0242	[12~14]
13	11.43	osmanthuside B	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	591.2076	591.2078	-0.3	467.1423, 45.1707, 161.0224, 145.0284	[12]
14	11.74	肉苁蓉苷 D	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651.2287	651.2289	-1.7	—	[17]
15	12.17	管花苷 B	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	665.2086	665.2082	0.6	645.1774, 461.1671, 319.0785, 161.0231	[12]
16	12.38	cistancinenside A	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₆	679.2253	679.2238	2.2	—	[5]

及 2'-乙酰毛蕊花糖苷. 峰 4, 5, 10, 11, 13 和 15 的出峰时间、分子量、以及质谱碎片数据与文献^[12]报道一致, 鉴定为紫葳新苷、紫葳新苷异构体、syringalide A-3'- α -L-rhamnopyranoside、肉苁蓉苷 C、osmanthuside B 和管花苷 B. 峰 3, 16 系通过比对其出峰时间、分子量数据, 与文献报道相符^[5], 鉴定为 cistanbuploside C1/C2 和 cistancinenside A. 峰 1, 2 和 14 的分子量信息与文献报道的数据相符^[15-17], 故初步推测为肉苁蓉苷 F, mussaenoside acide 和肉苁蓉苷 D.

(2) 不同产地肉苁蓉药材的 PCA, PLS-DA 及 OPLS-DA 分析. 采用 MarkerLynx 软件对负离子模式下不同产地肉苁蓉药材指纹图谱中的原始数据进行 PCA 模式识别分析. 通过不同产地药材的得分图可以看出, 新疆和内蒙古两个产地药材能明显区分开来, 但内蒙古阿拉善地区 R32 样品有偏离(图 3A). 为了排除较大的组内误差, 进一步对实验结果进行了 PLS-DA 分析, 由得分图可以看出, 新疆和内蒙古两产地的药材明显区分开来(图 3B).

经对不同产地的肉苁蓉指纹谱图分析, 并对原始数据进行 OPLS-DA 分析, 得到 S-Plot 图(图 3C), 从中找出 4 个化学标志物, 10.36 min-665.2085(保留

时间 t_R -质荷比 m/z)和 10.36 min-687.1898 为新疆产肉苁蓉的标志物, 1.61 min-363.1290 和 11.15 min-966.6597 为内蒙古产肉苁蓉的标志物. 结合表 2 分析, 标志物 10.36 min-665.2085 和 10.36 min-687.1898 为 2'-乙酰毛蕊花糖苷的 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 准分子离子, 故鉴定其结构为 2'-乙酰毛蕊花糖苷. 其在新疆产肉苁蓉中含量很高, 而在内蒙古产肉苁蓉中则几乎没有, 所以 2'-乙酰毛蕊花糖苷可以作为区分两个产地肉苁蓉的指标成分, 其他化学标志物均未能鉴定其结构.

2.2 *psbA-trnH* 序列鉴别不同产地肉苁蓉

(1) 序列变异位点分析. 运用 CondonCode Aligner, MEGA 软件对测序得到的序列文件进行拼接、比对, 发现新疆产肉苁蓉样品 R1, R2, R5 和 R6 在 191 位点都为 G, 而内蒙古样品都为 A(图 4), 表明两个产地肉苁蓉药材在序列位点存在明显差异.

(2) 遗传距离分析. MEGA 对拼接好的序列进行比对, 基于 Kimura 2-Parameter model 计算肉苁蓉种内遗传距离, 得出肉苁蓉种内最大遗传距离为 0.03205, 种内最小遗传距离为 0.00000, 种内平均遗传距离为 0.00802. 数据显示肉苁蓉种内存在一定的

图 3 不同产地肉苁蓉药材的 PCA 和 PLS-DA 分析

A: PCA 得分图; B: PLS-DA 得分图; C: OPLS-DA S 曲线图

图 4 新疆与内蒙古产肉苁蓉样品序列比对分析结果

遗传差异。

(3) NJ tree 构建. 本实验结合 GenBank 数据库序列, 并查阅对应文献确定序列样品产地信息^[18,19], 通过序列的比对分析, 建立肉苁蓉不同产地邻接树 (图 5), 可见肉苁蓉两个产地新疆和内蒙古明显分为两支, GenBank 数据库数据与本实验结论一致, 两产地差异显著, 分型明显。

2.3 肉苁蓉生长区域气候因子分析

通过“中国气象科学数据共享服务网”提取生态

因子, 对主产区内蒙古、新疆气候生态因子进行 PCA 分析(图 6A)。结果表明, 内蒙古、新疆气候明显分为两种类型。得分图对应分析 PCA 载荷图(图 6B), 可知新疆产区年均降水量以及年均相对湿度的贡献值最大, 表明新疆的年均相对湿度和年均降水量要高于内蒙古; 而生态因子温度则对内蒙古产区的贡献值大, 表明内蒙古年均温、年均日照时数、7 月均温、7 月最高温、1 月均温、1 月最低温要高于新疆。正是这种生态因子的差异, 导致肉苁蓉两大产区呈现不同的气候地理生态型。

图 5 肉苁蓉两大产地 NJ tree 分析

图 6 肉苁蓉两大产地生态因子的 PCA 分析

A: PCA 得分图; B: PCA 载荷图

3 讨论

不同产地中药材在特定的自然生态环境下长期趋异适应形成较为稳定的生态型(即生态适应的概念),并在基因表达、生化等表型上表现差异,而这种差异是产生药材品质优劣和疗效差异的实质^[1]。作为沙生药材的代表,肉苁蓉分布横亘新疆、甘肃、宁夏、青海、内蒙古的沙漠和沙地,经度跨度为 20 多度。既往研究表明^[1],肉苁蓉形成了以内蒙古阿拉善高原和新疆北疆为中心的两大生态适宜生产集中区(两类生态型)。本文进而对该地理分布格局差异的两个道地产区的肉苁蓉进行化学、分子地理标识及气候生态因子的研究。

3.1 基于 UPLC-QTOF/MS 技术分析肉苁蓉生态型

肉苁蓉化学组成之间的特有相互关系是其对极端干旱环境适应的生态策略与生态进化。薛德钧和章明^[20]对不同产地肉苁蓉的甘露醇及糖类进行测定,表明不同产地该类成分含量不同。本实验结合 PCA、PLS-DA 以及 OPLS-DA 分析对不同产地肉苁蓉的苯乙醇苷及环烯醚萜苷类化学成分分析结果表明,肉苁蓉品质呈现地理分布格局差异性。以东经 100°为界,明显东西向分化成新疆与内蒙古 2 种化学生态型;其中 16 个成分得以鉴定,并发现成分 2'-乙酰毛蕊花糖苷可作为区分两大产地肉苁蓉的指标成分。

3.2 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列分析肉苁蓉生态型

肉苁蓉属种内存在分化与差异,崔光红等人^[7]、李雅丽等人^[21]应用 RAPD 技术发现,新疆与内蒙古产肉苁蓉及内蒙古阿拉善盟和巴彦淖尔盟两个地区的肉苁蓉存在种内分化;本课题组^[19]前期已运用 *psbA-trnH* 序列成功鉴别肉苁蓉及其混伪品。本研究在前期研究基础上,成功运用分子地理标识 *psbA-trnH* 序列对新疆与内蒙古产肉苁蓉进行分析,发现肉苁蓉不同产地间序列位点存在差异,新疆产肉苁蓉在 191 位点为 G,内蒙古产则为 A; NJ tree 分析表明肉苁蓉两个产地明显分为两支,呈现明显的两大地理生态型,为从分子角度阐明肉苁蓉生态型

划分提供科学依据。

3.3 基于生态因子分析肉苁蓉生态型

在气候及地理特征上亦明显分为新疆与内蒙古两类气候地理生态型。生态因子的 PCA 分析表明,新疆与内蒙古生态特征差异明显,呈现为两种类型,其中新疆的生态因子降水量和相对湿度要高于内蒙古,而内蒙古的生态因子温度和日照要高于新疆。从地理分布格局和中国生物地理区划角度,肉苁蓉也明显归属东西不同区域:北疆准格尔盆地温带荒漠和阿拉善高原温带荒漠(内蒙古阿拉善高原、甘肃河西走廊)^[22]。

植物对气候地理环境的适应一直以来备受科学家关注。近年来学者研究了水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的气候生态适应遗传基础,并在 *Cell, Science* 发表文章^[23-25]。生态气候因子的变化可促使生物遗传物质及次生代谢产物的改变,同时生物也能通过基因及化学成分的改变以适应气候变化^[26,27]。本研究表明,新疆与内蒙古产肉苁蓉分为两种明显的生态型,其在产地气候因子、化学成分、基因序列组成方面均存在明显差异。2'-乙酰毛蕊花糖苷可作为两地产肉苁蓉化学成分标识;*psbA-trnH* 序列 191 位点可作为两地产肉苁蓉分子标识。生态学家夏拉波夫指出:“植物界的进化是沿着形态适应于水分不足的方向进行,植物旱生化在防止植物丧失水分的某些特殊物质的发展方面有一定反应”^[28]。由此可见,肉苁蓉的生态型与其所在干旱气候地理的生态环境驱动密切相关。肉苁蓉化学组成之间的特有相互关系和遗传分化是肉苁蓉对极端干旱环境适应的生态策略与生态进化。

本文通过研究两产地气候因子差异,并找到肉苁蓉显著差异化学成分及基因序列的差异,为进一步探讨肉苁蓉各因素相关关系提供理论基础,也为探讨肉苁蓉资源品质变异及其生态驱动,对保护濒危物种、丰富生物多样性、维护可持续的生态系统具有重大科学价值,并对同类多道地不同生态区域中药生态型及品质变异的生物学本质提供了一种新思路,也为深化道地药材理论研究奠定重要基础。

参考文献

- 1 黄林芳,付娟,陈士林. 中药材生态变异的学术探讨. 中草药, 2012, 43: 1249-1258

- 2 黄林芳, 索风梅, 宋经元, 等. 中国产西洋参品质变异及生态型划分. 药学学报, 2013, 48: 580–589
- 3 10000 个科学难题医学编委会. 10000 个科学难题(医学卷). 北京: 科学出版社, 2011
- 4 程齐来, 陈君. 肉苁蓉属植物研究概况. 中药材, 2004, 27: 789–791
- 5 Jiang Y, Li S P, Wang Y T, et al. Differentiation of *Herba Cistanches* by fingerprint with high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. J Chromatogr A, 2009, 1216: 2156–2162
- 6 孙永强, 郑兴国, 陆中元, 等. 新疆肉苁蓉资源及人工种植研究初探. 干旱区资源与环境, 2003, 17: 123–126
- 7 崔光红, 陈敏, 黄璐琦, 等. 药用肉苁蓉的遗传多样性 RAPD 分析. 中国中药杂志, 2004, 29: 727–730
- 8 龚立冬. 肉苁蓉有效成份分析及指纹图谱研究. 硕士论文. 无锡: 江南大学, 2007. 1–8
- 9 甘晓燕, 李苗, 马洪爱, 等. 肉苁蓉种内变异的 AFLP 标记研究. 北方园艺, 2011 (3): 141–143
- 10 陈君, 谢彩香, 陈士林, 等. 濒危药材肉苁蓉产地适宜性数值分析. 中国中药杂志, 2007, 32: 1396–1401
- 11 Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. Syst Biol, 2008, 57: 216–230
- 12 Han L F, Yiadom M B, Liu E W, et al. Structural characterisation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanches deserticola* Y.C. Ma by UHPLC/ESI-QTOF-MS/MS. Phytochem Anal, 2012, 23: 668–676
- 13 Li L, Tsao R, Yang R, et al. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography. Food Chem, 2008, 108: 702–710
- 14 Lu D Y, Zhang J Y, Yang Z Y, et al. Quantitative analysis of *Cistanches Herba* using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods. J Sep Sci, 2013, 36: 1945–1952
- 15 Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, et al. Studies on the constituents *Cistanchis Herba*. IV. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanosides C and D. Chem Pharm Bull, 1984, 32: 3880–3885
- 16 Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, et al. Studies on the constituents of *Cistanchis Herba*. VI. Isolation and structures of a new iridoid glycoside, 6-deoxyeatalpol. Chem Pharm Bull, 1985, 33: 3645–3650
- 17 Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, et al. Studies on the constituents *Cistanchis Herba*. V. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanoside E and F. Chem Pharm Bull, 1985, 33: 1452–1457
- 18 Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS One, 2010, 5: e8613
- 19 韩建萍, 宋经元, 刘昶, 等. 基于叶绿体 *psbA-trnH* 基因间区序列鉴定肉苁蓉属植物. 药学学报, 2010, 45: 126–130
- 20 薛德钧, 章明. 三种肉苁蓉糖类成分的分析. 中药材, 1994, 17: 36–37
- 21 李雅丽, 张凯, 王红霞. 用 RAPD 技术对两个地区药用植物肉苁蓉多态性的比较分析. 包头钢铁学院学报, 2005, 24: 185–187
- 22 解焱, 李典谟, John M K. 中国生物地理区划研究. 生态学报, 2002, 22: 1599–1615
- 23 Nagano A J, Sato Y, Motohiro M, et al. Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. Cell, 2012, 151: 1358–1369
- 24 Fournier-Level A, Korte A, Cooper M D, et al. A map of local adaptation in *Arabidopsis thaliana*. Science, 2011, 334: 86–89
- 25 Hancock A M, Brachi B, Faure N. Adaptation to climate across the *Arabidopsis thaliana* genome. Science, 2011, 334: 83–86
- 26 吴建国, 吕佳佳, 艾丽. 气候变化对生物多样性的影响: 脆弱性和适应. 生态环境学报, 2009, 18: 693–703
- 27 张艺, 范刚, 耿志鹏, 等. 道地药材品质评价现状及整体性研究思路. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11: 660–664
- 28 丁国栋. 沙漠学概论. 北京: 中国林业出版社, 2002. 74

Ecotypes of *Cistanche deserticola* Based on Chemical Component and Molecular Traits

HUANG LinFang¹, ZHENG SiHao¹, WU LaBin¹, JIANG Xue¹ & CHEN ShiLin²

¹ Institute of Medicinal Plants Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

² Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Diversity of ecotypes in Chinese medicine materials is an important part of research on genuine medicinal materials. *Cistanche deserticola* named desert Panax is the most distinctive endangered medicinal plant and keystone species distributed in arid areas. Xinjiang and Inner Mongolia are the main producing areas and traditional authentic region of *C. deserticola*. Preliminary research shows that Alxa Plateau in Inner Mongolia and north of Xinjiang are the main ecological adaptable and concentrated productive regions (two ecotypes), and we further investigated the chemical component, molecules of geographical indications and ecological factors of *C. deserticola* in this two main producing areas. Phenylethanoid glycosides and iridoids of *C. deserticola* were analysed using UPLC-QTOF/MS; *C. deserticola* from different areas were identified and analysed based on *psbA-trnH* sequences; the data of temperature, moisture, illumination and other ecological factors of the two main producing areas were obtained through “China Meteorological Data Sharing Service System”; ecotypes of *C. deserticola* were divided using analytical methods of biostatistics and quantitative classification. The result of UPLC-QTOF/MS shows that *C. deserticola* of two main areas had striking differences: 16 components were identified, and 2'-acetylacteosid was recommended to differentiate *C. deserticola* from two producing areas as index component; aligned analysis of *psbA-trnH* sequences revealed that *C. deserticola* had differences in locus and structure of sequence. *C. deserticola* originating from Xinjiang had G base in number 191 locus, while *C. deserticola* originated from Inner Mongolia had A base in number 191 locus. The analysis of NJ tree indicated that two areas of *C. deserticola* clustered into two branches obviously. The data of ecological factors also show that *C. deserticola* presented two geographical distribution patterns. This study provided a new idea to investigate ecotypes of Chinese medicine in different ecoregions and the biological nature of product variation, and laid an important foundation for further studies of the theory of genuine medicinal materials.

***Cistanche deserticola*, ecotype, *psbA-trnH*, chemical components, geographic distribution**

doi: 10.1360/052013-279