

怀菊花种质资源品质评价

代震¹, 利顺欣², 陈随清^{3*}, 朱昱³

(1. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 2. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473061;
3. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**对怀菊花种质资源品质评价,分析不同地域菊花的遗传关系及其药材的质量差异。**方法:**实地观察、走访药农等方法调查分析怀菊花种质资源;以2015年版《中国药典》中方法对绿原酸,木犀草苷,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸的含量测定;紫外-可见分光光度法总黄酮测定,2015年版《中国药典》中方法对水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、挥发油测定为主要评价指标,对不同产地的菊花药材的质量进行评价;采用随机扩增多态性DNA分子标记(RAPD)法分析不同产地菊花的遗传关系。**结果:**通过对菊花6项指标的分析,其有效成分含量均符合2015年版《中国药典》标准,表明温县、武陟县适合怀菊花的生长,是道地产区;7条引物共扩增出50条带,其中46条呈多态性,多态性比率为92.00%,怀菊和杭菊、贡菊、野菊都未能聚类,表明它们之间的亲缘关系较远,也证明在菊花种质资源中存在较丰富的遗传多样性,怀菊花聚为一大类,表明怀菊花栽培品种的遗传纯度较高。**结论:**对怀菊花种质资源分析研究,为怀菊花的规范化种植提供科学的参考依据;保护怀菊花资源、合理开发利用药材提供了科学依据。

[关键词] 怀菊花;种质资源;随机扩增多态性DNA分子标记

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0048-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060048

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1141.038.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 11:41

Quality Evaluation on Germplasm Resources of Huai Chrysanthemi Flos

DAI Zhen¹, LI Shun-xin², CHEN Sui-qing^{3*}, ZHU Yu³

(1. Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450004, China;
2. Nanyang Medicine College, Nanyang 473061, China; 3. Henan University of
Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the genetic relationship and quality differences among different regional Chrysanthemi Flos by evaluating the quality of germplasm resources of Huai Chrysanthemi Flos. **Method:** The methods of field observation, visiting herbalist were adopted to investigate and analyze the germplasm resources of Huai Chrysanthemi Flos. The contents of chlorogenic acid, luteoloside and 3, 5-*O*-double coffee acyl quinic acid were determined by the method in the *Chinese Pharmacopoeia* of 2015. The content of flavonoids was determined by ultraviolet-visible spectrophotometry. The contents of moisture, total ash, acid insoluble ash content, extract, volatile oil were determined by using the method in the *Chinese Pharmacopoeia* of 2015 to evaluate the quality of medicinal materials from Chrysanthemi Flos of different regions. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker method was used to analyze the genetic relationship among Chrysanthemi Flos from different regions. **Result:** By analyzing the six indicators of Chrysanthemi Flos, its effective composition all conform the *Chinese Pharmacopoeia* of 2015. The results show that Wen county and Wuzhi county are suitable for the growth of

[收稿日期] 20160615(021)

[基金项目] 中医药公共卫生专项(财社[2011]76号)

[第一作者] 代震, 硕士, 主管药师, 从事中药资源开发与质量标准研究, Tel:13939057135, E-mail:82591968@qq.com

[通讯作者] * 陈随清, 教授, 博士生导师, 从事中药品种整理与质量标准研究, Tel:13015543061, E-mail:suiqingchen@sohu.com

Chrysanthemi Flos to be original regions. Seven RAPD primers had amplified into 50 clear bands including 46 polymorphic bands, so the polymorphism ratio was 92.00%. Huai Chrysanthemi Flos, Hang Chrysanthemi Flos, Gong Chrysanthemi Flos and Chrysanthemi Indici Flos can't be clustered, not only indicating that the genetic relationship among them was far, but also proving that abundant genetic diversity existed in the Chrysanthemi Flos germplasm resources. Huai Chrysanthemi Flos was clustered into a broad category, showing that the genetic purity of Huai Chrysanthemi Flos was higher. **Conclusion:** Analysis on Huai Chrysanthemi Flos germplasm resources, not only provided scientific reference basis for the standardization of Huai Chrysanthemi Flos planting, but also offered a scientific foundation for protection of Huai Chrysanthemi Flos resources and reasonable development and utilization of medicinal materials.

[**Key words**] Huai Chrysanthemi Flos; germplasm resources; random amplified polymorphic DNA molecular marker

怀菊花为四大怀药之一,具有散风清热、平肝明目、解毒消肿之功效^[1],中医临床用于治疗风热感冒,头痛眩晕,目赤肿痛,眼目昏花,疮痈肿毒等证^[2]。其有效成分绿原酸,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸等显示了抗炎、抗过敏、抗癌、抗人类免疫缺陷病毒(HIV)等药理活性^[3-4]。

怀菊花栽培和药用历史悠久,经过长期的自然环境的改变和人工干预,其种质可能发生变异与分化,优良的种质能够从源头上提高怀菊花的产量和质量,满足中医药的使用,近年来,盛蒂、刘大会等采用多种手段对不同栽培类型的药用菊花进行了研究和探讨^[5-6],徐文斌等^[7-8]分别对各道地产地或不同栽培类型药用菊花进行了调查并对其内在质量进行了比较并对药用菊花 22 个栽培类型进行了遗传多样性研究,虽然近些年对菊花的研究较多,但大多集中在杭菊、亳菊、贡菊、滁菊这几个品种上,对怀菊花研究较少,对其种质资源的研究几乎为空白,所以怀菊花种质资源现状目前为止依然没有清晰的科学理论和数据支持,种质资源作为一种遗传资源,直接关系到药材质量的好坏,因此,分析研究怀菊花种质资源现状、如何保护、合理开发和利用怀菊花种质资源,提高药材品质,已经成为亟待解决的问题。

本研究从怀菊花的种质资源入手,通过实地观测和寻访药农,确定了怀菊花的资源现状。对怀菊花绿原酸,木犀草苷,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、总黄酮、水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、挥发油含量测定。利用现代分子生物学技术,对怀菊花 26 份样品及野菊花、贡菊、杭菊进行随机扩增多态性 DNA 分子标记(RAPD)法分析,分析不同产地之间的遗传关系,为怀菊花种质资源的开发利用和资源保护提供科学依据。

在河南地区菊花主要有大怀菊、小怀菊、小黄菊

和野菊花,其在株高、叶长宽、花颜色、花直径各不相同且差别较大,而怀菊花的质量和药效较其他品种有很大优势,其炮制品销往国内外,产生很大的经济效益和社会效益,但在怀菊花种植有较大规模的温县、武陟县等地实地走访发现,怀菊花现状不容乐观,种植面积较前几年大幅减少,首先怀菊花价格较前几年低了许多,农户种植积极性不高。再者怀菊花为呈不规则球形或扁球形,直径 1.5 ~ 2.5 cm。多数为舌状花,舌状花类白色或黄色,不规则扭曲,内卷,边缘皱缩,有时可见腺点;管状花大多隐藏^[2]。怀菊花外观性状多有记载,多为黄白色,少带有浅红色或棕红色的花,花心细小、浅棕色,质松而柔软^[9],然而在走访调查中发现带有紫色或者棕红色花的怀菊花占一定比例,这与当地不合理种植及其管理有很大关系。然而仅仅从外观性状上的变化并不能说明怀菊花种质资源发生了变化,需要进一步的研究分析。

1 材料

怀菊花样品(花序和叶片)采自河南省温县、武陟县,共 26 个样品,另在温县和武陟县采集 4 个野菊花样品、同时购买杭菊、贡菊作为对照,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* 的干燥头状花序。见表 1。

LC-20AT 系列高效液相色谱仪(SPD-20A 型紫外检测器,CTO-10AS vp 型柱温箱,CBM-102 型工作站,日本岛津公司);Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);HP-01 型无油真空泵(上海金凯德分析仪器有限公司);BS2242S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。GeneAmp PCR System 9700 PCR 扩增仪(Applied Biosystems),AmpGene 凝胶分析系统(北京鼎永科技有限公司);DYY-III-

表 1 菊花样品信息

Table 1 Specific information of Chrysanthemi Flos

No.	采集地点	品种	No.	采集地点	品种
1	祥云镇祥云村	小怀菊	17	祥云镇王羊店村	野菊花
2	赵堡镇南平阜村	小怀菊	18	大虹桥乡赵北古村	大怀菊
3	赵堡镇赵堡村	小怀菊	19	大虹桥乡刘村	大怀菊
4	大丰镇西岩村	小怀菊	20	大虹桥乡刘村	大怀菊
5	北郭乡刘村	小怀菊	21	张仲景大药房	贡菊
6	老百姓大药房	杭菊	22	大丰镇东岩村	小怀菊
7	赵堡镇西水运村	小怀菊	23	大虹桥乡赵北古村	小怀菊
8	南张羌镇马庄村	小怀菊	24	大丰镇东唐郭村	小怀菊
9	西陶镇中东陶村	小怀菊	25	大丰镇前孔村	小怀菊
10	大丰镇大丰村	大怀菊	26	祥云镇大玉兰村	小怀菊
11	祥云镇太康村	大怀菊	27	大虹桥乡高庄	小怀菊
12	北郭乡西余会村	大怀菊	28	赵堡镇北平阜村	小怀菊
13	大虹桥乡高庄	大怀菊	29	大虹桥乡刘村	小怀菊
14	大丰镇东岩村	野菊花	30	温县农科所	小黄菊
15	温县农科所	野菊花	31	西陶镇中东陶村	小黄菊
16	祥云镇东南王村	野菊花	32	大虹桥乡刘村	小黄菊

12B 型三恒多用电泳仪, DYY-III-12B 型电泳槽 (北京六一仪器厂); KDC-160HR 型高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司); SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); 0.5 ~ 10, 2 ~ 20, 20 ~ 100, 20 ~ 200, 100 ~ 1 000 μ L 微量移液器 (日本立洋公司)。

绿原酸、木犀草苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110753-200413, 111720-200905); 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 (四川维科奇生物制品有限公司, 批号 111782-201003, 经 HPLC 检测纯度为 98.6%); 黄酮对照品芦丁 (中国食品药品检定研究院, 批号为 111730-201105, 检测纯度为 93.7%); 所有试剂均为分析纯。琼脂糖 (Agarose, OXOID 公司, 批号 900570); *Taq* DNA 聚合酶, 10 \times Buffer, $MgCl_2$, dNTP, 溴酚蓝, DNAMarke: DL1000 随机引物 (大连宝生物提供, 批号分别为 090112, 090712, 090712, 314J1012, 100722, 100813)。

2 方法与结果

2.1 绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 按表 2 中的规定进行梯度洗脱; 检测波长为 348 nm。理论板数按 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸峰计算不低于 8 000。

2.1.2 供试品溶液的制备 取祥云镇祥云村小

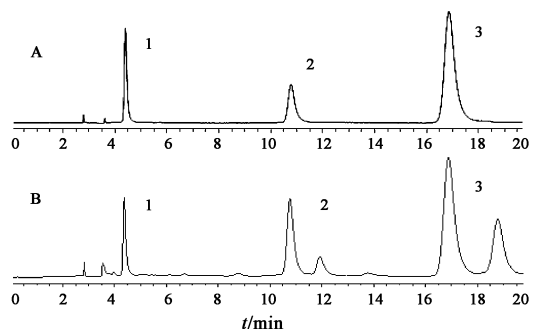
表 2 菊花样品 HPLC 梯度洗脱条件

Table 2 HPLC conditions of Chrysanthemi Flos

<i>t</i> /min	流动相 A	流动相 B
0 ~ 11	10 ~ 18	92 ~ 82
11 ~ 30	18 ~ 20	82 ~ 80
30 ~ 40	20	80

怀菊 (打粉) 粉末 (过一号筛) 约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 45 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

系统适用性试验、对照品溶液的制备、含量测定方法同 2015 年版《中国药典》^[2]。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品 (祥云镇祥云村小怀菊); 1. 绿原酸; 2. 木犀草苷; 3. 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸

图 1 怀菊花样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Huai Chrysanthemi Flos

2.1.3 线性关系考察 精密吸取绿原酸、木犀草苷、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μ L, 注入色谱仪中, 分别测定峰面积积分

值,以其为纵坐标,相应进样量为横坐标,绘制标准曲线,求得绿原酸回归方程: $Y = 65\ 158X - 13\ 862$, $R^2 = 1$,线性范围 $0.034 \sim 0.68\ \mu\text{g}$;木犀草苷回归方程 $Y = 66\ 941X - 34\ 020$, $R^2 = 0.999\ 8$,线性范围 $0.026 \sim 0.52\ \mu\text{g}$;3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁

酸木犀草苷回归方程 $Y = 152\ 980X - 76\ 485$, $R^2 = 0.999\ 8$,线性范围 $0.078 \sim 1.56\ \mu\text{g}$ 。

精密度试验、重复性试验、稳定性试验、加样回收率试验(表 3)均符合 2015 年版《中国药典》规定。含量测定结果见表 4。

表 3 绿原酸,木犀草苷,3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸加样回收率

Table 3 Recovery rate of chlorogenic acid, luteoloside and 3, 5-*O*-double coffee acyl quinic acid

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.125 2	0.403 8	0.385 3	0.786 8	99.40	99.46	1.4
	0.125 6	0.405 1	0.383 6	0.782 6	98.41		
	0.125 0	0.403 1	0.395 5	0.806 2	101.92		
	0.125 8	0.405 7	0.408 3	0.813 2	99.80		
	0.125 3	0.404 1	0.413 4	0.814 5	99.27		
	0.125 7	0.405 4	0.413 3	0.810 3	97.97		
木犀草苷	0.125 2	0.209 6	0.185 6	0.396 5	100.70	99.6	1.4
	0.125 6	0.210 3	0.188 9	0.402 2	101.59		
	0.125 0	0.209 3	0.215 5	0.419 7	97.63		
	0.125 8	0.210 6	0.197 3	0.406 5	99.29		
	0.125 3	0.209 8	0.221 4	0.430 1	99.50		
	0.125 7	0.210 4	0.234 7	0.442 5	98.89		
3,5- <i>O</i> -双咖啡酰基奎宁酸	0.125 2	1.962 6	2.015 1	4.032 0	102.68	100.61	1.5
	0.125 6	1.968 9	2.125 7	4.092 0	99.88		
	0.125 0	1.959 5	1.853 6	3.786 9	98.59		
	0.125 8	1.965 8	1.955 2	3.953 0	101.64		
	0.125 3	1.964 2	2.112 3	4.102 6	101.24		
	0.125 7	1.962 6	1.896 3	3.852 3	99.65		

2.2 黄酮类成分的含量测定

2.2.1 供试品溶液制备 分别精密称定样品各 1 g 于锥形瓶中,加 70% 乙醇 30 mL,在 60 ℃ 水浴恒温萃取 30 min 取出,抽滤并洗涤至 100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇至刻度,振荡摇匀后备用。精密吸取供试品溶液 3 mL 置于 10 mL 量瓶中,用 30% 的乙醇定容到刻度,分别精密吸取已定容的溶液 2 mL 置于 10 mL 试管中,再加入 5% 亚硝酸钠的溶液 0.3 mL,振荡摇匀后放 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,振荡摇匀后放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,振荡摇匀后用 30% 乙醇定容到刻度,放置 15 min 后于比色皿中在 512 nm 处测定吸光度 A 。以 30% 乙醇溶液放入比色皿中作为空白溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定芦丁对照品 10.2 mg,置于 50 mL 量瓶中,用 70% 乙醇溶解,定容至刻度后振荡摇匀,配制成质量浓度为 $0.204\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶

液 0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,振荡摇匀后放置 6 min,再加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,振荡摇匀后放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,振荡摇匀后用 30% 乙醇定容到刻度,振荡摇匀后放置 15 min 后采用分光光度法在 512 nm 处测定 A ,以质量浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.636\ 3X - 0.004\ 6$ ($R^2 = 0.999\ 6$)。芦丁在 $0 \sim 1.224\ \text{mg}$ 呈良好线性关系。黄酮类成分含量测定结果见表 4。

2.3 挥发油含量测定 精密称取菊花粉末(过二号筛)30 g,精密称定,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加蒸馏水 300 mL 振荡混匀,浸泡 30 min,连接挥发油测定器装置系统,自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶为止。置电热套中缓缓加热至沸,并保持微沸 5 h,至测定器中挥发油含量不在增加,停止加热,放置片刻,开启测定器下端的活塞,将水缓缓放出,至油层达到刻度 0 线

上面 5 mm 处为止。放置 1 h,在开启活塞使油层下降至上端与刻度 0 线齐平,读取挥发油量,并把挥发油放于精密称定的量瓶中,用少量石油醚冲洗挥发油测定器的刻度部分,一并收入量瓶中,挥干石油醚,称定质量,并计算各菊花供试品中挥发油的含

量。结果见表 4。

2.4 水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物的含量测定 水分、总灰分和酸不溶性灰分、浸出物分别参照《中国药典》2015 年版附录 IX H 第二法;附录 IX K;附录 X A。结果见表 4。

表 4 32 份菊花样品中不同成分的质量分数测定

Table 4 Results of content determination of chrysanthemi Flas samples

No.	绿原酸	木犀草苷	奎宁酸	总黄酮	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物	挥发油
1	0.316 1	0.343 6	1.007	4.281	7.47	6.42	1.22	5.85	0.387 6
2	0.346 8	0.353 9	1.175	3.622	12.49	7.10	1.41	7.91	0.395 8
3	0.297 7	0.358 3	1.196	3.497	10.97	6.60	0.82	7.08	0.325 8
4	0.361 5	0.284 2	0.824	4.896	9.97	6.45	1.04	7.35	0.336 9
5	0.322 5	0.347 4	1.067	4.683	11.95	8.20	1.52	5.68	0.402 1
6	0.433 1	0.461 2	0.831	5.356	12.48	7.50	1.48	6.69	0.434 5
7	0.301 2	0.295 7	1.252	4.175	11.50	7.90	1.24	8.01	0.413 9
8	0.391 6	0.277 6	1.332	3.152	11.97	7.24	1.05	8.15	0.449 5
9	0.354 5	0.261 2	0.947	4.086	10.98	7.71	1.51	8.12	0.338 8
10	0.238 3	0.230 7	1.024	2.561	12.30	6.42	0.69	6.09	0.274 3
11	0.331 0	0.297 9	1.261	4.167	9.96	7.29	1.06	7.06	0.359 0
12	0.320 3	0.271 5	1.345	4.451	11.67	5.32	1.05	7.11	0.346 5
13	0.290 6	0.343 3	1.470	3.872	12.24	7.11	1.07	5.96	0.387 5
14	0.429 8	0.161 3	0.949	2.331	11.83	7.78	1.26	7.10	0.179 4
15	0.382 9	0.153 9	0.866	2.787	10.67	7.53	1.05	7.36	0.198 7
16	0.400 8	0.190 8	0.947	2.143	11.65	7.02	0.87	7.91	0.157 6
17	0.422 9	0.185 3	1.023	2.069	10.04	7.76	1.07	7.11	0.134 2
18	0.261 5	0.193 5	1.267	2.390	9.81	8.02	1.35	5.27	0.313 2
19	0.307 4	0.349 7	1.517	3.722	9.35	7.37	1.09	7.35	0.322 4
20	0.316 1	0.333 6	1.407	3.969	8.83	7.33	1.53	7.49	0.423 5
21	0.316 7	0.282 2	0.956	5.224	10.07	7.79	1.07	7.78	0.499 2
22	0.349 0	0.294 6	1.255	3.544	9.94	8.07	1.26	5.68	0.342 5
23	0.349 3	0.349 3	1.545	4.722	8.10	6.51	0.67	7.07	0.400 5
24	0.359 4	0.352 1	1.521	3.820	11.15	5.13	0.65	7.36	0.310 3
25	0.282 0	0.332 1	1.185	3.189	10.74	6.73	1.24	7.05	0.269 1
26	0.308 0	0.267 7	1.217	4.549	10.78	7.97	0.85	7.91	0.340 7
27	0.358 7	0.294 4	1.303	3.312	9.92	6.64	0.55	7.14	0.376 3
28	0.238 5	0.261 2	0.583	2.862	10.05	7.78	0.86	6.66	0.398 3
29	0.385 3	0.338 6	1.449	4.986	11.15	7.93	0.83	6.65	0.328 9
30	0.359 7	0.350 4	1.321	4.742	9.81	7.64	0.97	7.77	0.286 4
31	0.335 8	0.330 7	1.429	4.764	9.99	6.45	1.24	7.64	0.340 3
32	0.340 1	0.356 3	1.201	4.705	11.27	7.03	0.86	7.12	0.346 2

2.5 怀菊花种质资源的 RAPD 分析 RAPD 技术是在 PCR 技术的基础上发展而来的一种运用随机引物扩增以此来寻找 DNA 片段遗传标记的分子生物学技术,具有敏感性高、操作简便、且容易发现 DNA 的多态性和通用性等优点。本研究在对怀菊花实地调查的基础上,运用 RAPD 分子标记技术,研究 26 份怀菊花样品的遗传多样性,为怀菊花的种质资源研究,有效保护和合理应用提供了科学的依据,为怀菊花优良品种的选育提供遗传背景。

用变色硅胶快速干燥怀菊花 *C. morifolium* 的叶片,共 26 个产地怀菊花叶片和 4 个产地野菊花叶

片,野菊花叶片和贡菊、杭菊作为对照药材。样品信息见表 1。

2.5.1 植物总 DNA 提取 经典 CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)法提取植物总 DNA。见图 2。

2.5.2 RAPD-PCR 反应体系的设计 对 dNTP, Mg²⁺, Taq 酶,模板 DNA 摸索条件,结果 RAPD-PCR 最佳反应体系为 buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, Mg²⁺ 1.5 μL,引物 1 μL, Taq 酶 0.5 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 反应条件的优化,对变性时间、退火温度、退火时间、循环次数摸索。结果见表 5。

PCR 最佳反应条件为 94 °C 预变性 3 min,然后

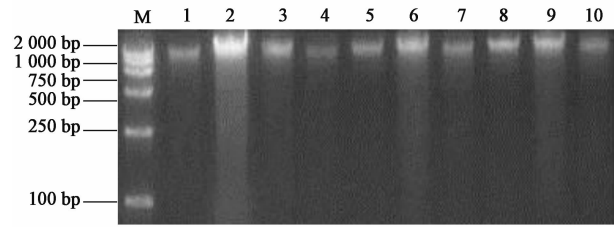


图 2 部分菊花样品(1~10)基因 DNA 提取
Fig.2 Gene DNA extraction of some samples

进入 35 个循环(94 °C 变性 1.5 min, 35 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 2 min), 72 °C 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。

扩增产物在 1 × TAE 电泳缓冲液中用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳完毕用 0.5 mg · L⁻¹ 的 EB 染色 1 h, 用凝胶成像系统观察并拍照, 保存。见图 3。

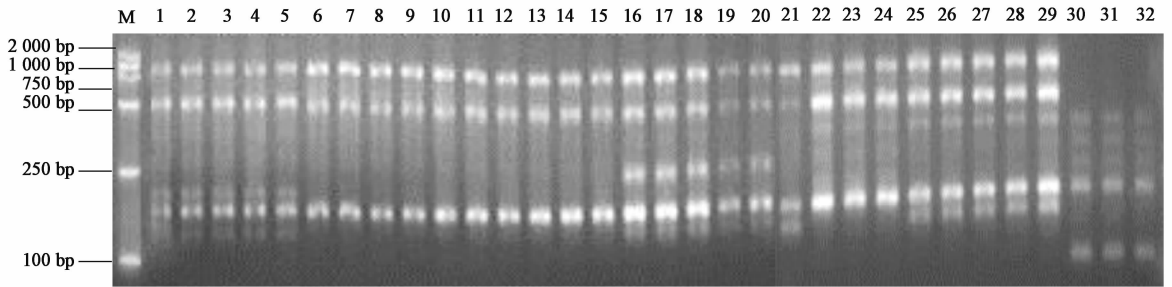


图 3 32 份菊花样品 DNA 引物 SW34 扩增
Fig.3 Amplification figure of Primer SW34 of Chrysanthemi Flos samples

2.5.3 引物筛选方法及统计 采用确定的 RAPD 反应体系对 80 条引物进行筛选, 用筛选出的 7 条引物对 32 个不同模板进行扩增, 每条引物连续扩增 3 次, 最后选择多态性好, 扩增条带多, 稳定性较高的引物。用筛选出的 7 条引物对 32 个不同模板进行扩增, 每次扩增重复 3 次, 分析结果用 SPSS 17.0 聚类。RAPD-PCR 引物序列及扩增结果见表 5。

2.5.4 数据统计与处理 电泳图谱中的每一条带代表了模板 DNA 上与引物互补的一对结合位点, 可记为 1 个分子标记。选取清晰、稳定且重复性好的条带作为谱带记录, 有 DNA 扩增带的记为“1”, 无带的记为“0”, 形成原始 1/0 矩阵图输入电脑。根据形成的“0”与“1”的数据矩阵, 统计 RAPD 数据, 采用 Between-groups Linkage 方法进行聚类分析, 构建亲缘关系树状图。见图 4。

2.5.5 样品多态性分析 本实验从 80 条引物中, 筛选出 7 条多态性丰富、重复性好的引物。用筛选出的 7 条引物对 32 份怀菊花样品的 DNA 多态性进行检测, 共扩增出 50 条谱带, 其中多态性谱带为 46 条, 多态性比率为 92.00%。

表 5 RAPD-PCR 引物序列及扩增结果统计

Table 5 Primer sequences of RAPD-PCR and statistic of amplification results

引物编号	引物序列(5'-3')	总扩增带数	多态性扩增带数	多态位点比/%
C02	CAATCGCCGT	7	6	85.71
C04	CCACAGCAGT	6	5	83.33
C08	ACCGCGAAGG	5	4	80.00
SW30	GGACCCAACC	10	10	100.00
SW34	TGAGCGGACA	8	7	87.5
SW35	TTGGCACGGG	7	7	100.00
SW37	GTGACGTAGG	7	7	100.00

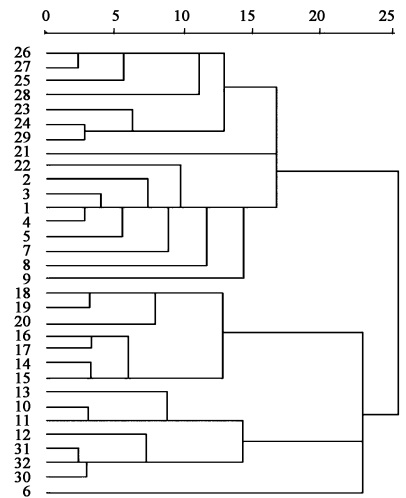


图 4 菊花样品聚类分析
Fig.4 Analysis of samples clustering

2.5.6 多态性分析结果 根据树形图可以明确的看出供试样品的遗传分化程度及相互之间遗传关系的大小, 在阈值为 25 的条件下, 将供试品的 32 个样品分为 3 大类, 小怀菊为一类, 大怀菊小黄菊为一类, 野菊花为一类, 而杭菊和贡菊都未能聚类。

3 讨论

怀菊花在河南焦作一带栽培历史悠久,相当一段时间给当地农民带来了客观的收入,也使四大怀药声名远扬。但随着近些年当地中青年外出打工,使得怀菊花栽培面积逐年减少,甚至在河南当地中药材市场、中医院中怀菊花份额也很小。所以当地政府部门应该鼓励种植怀菊花,不仅在怀菊花的种植、采收、加工炮制上指导农户,更应该在怀菊花的市场推广上多做宣传,这样不仅促进地方经济,更保护了道地药材。

通过对怀菊花质量分析,其有效成分含量都符合2015年版《中国药典》标准,且有一部分样品有效成分含量较高,说明温县、武陟县适合怀菊花的生长,是道地产区。贡菊的挥发油含量较高,而杭菊的总黄酮和木犀草苷含量较高,怀菊的3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸含量较高,这与当地气候条件和地理环境密切相关。这与郭巧生等^[10]药用菊花种质资源形态变异的数量分析,王德群等^[11-12]对药用菊花的主产地及品种演变研究的结论相类似,表明地理气候因子对种质资源品质影响较大。

通过对怀菊花种质资源的RAPD分析,采用Between-groups Linkage方法进行聚类分析,构建亲缘关系树状图,亲缘关系树状图表明其亲缘关系和地理位置有直接的关系,同一产地不同栽培品种间也存在较大的遗传差异,虽然怀菊花有3个样品含量低于其他样品,但是依然和其他怀菊花样品聚类,说明其亲缘关系很近,也同样说明3个产地怀菊花有效成分含量偏低绝大部分原因是农户种植方法和当地的环境因素造成的,说明怀菊花栽培品种的遗传纯度较高。

该实验采用RAPD分子标记技术,从分子水平上研究菊花的遗传多样性水平。结果表明,怀菊花在总体上具有较丰富的遗传多样性,能适应环境的变化,可保证其药材质量和临床疗效,并为怀菊花种

质资源的综合评价、合理利用及品种保护提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 2008.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 310.
- [3] Motohiko U, Toshihiro A, Ken Y, et al. Constituents of composite plants triterpene diols trioh and their 3-O-triterpene fatty acid esters form edible chrysanthemum flower extract and their antiinflammatory effects [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(7): 3187-3197.
- [4] Alvarez-Castellanos, Pino P Bishop, Chris D Pascual-Villalobos, et al. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum agricultural pathogens (*Chrysanthemum comnarium*) against [J]. Phytochemistry, 2001, 57(1): 99.
- [5] 盛蒂, 郭亚勤, 王旭东, 等. 七种栽培类型菊花的植物学特征、产量及有效成分比较研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 914-917.
- [6] 刘大会, 朱端卫, 周文兵, 等. 氮、磷、钾配合施用对福田白菊产量和品质的影响[J]. 中草药, 2006, 37(1): 125-129.
- [7] 徐文斌, 郭巧生, 李彦农, 等. 药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1645-1648.
- [8] 徐文斌, 郭巧生, 王长林, 等. 药用菊花遗传多样性的RAPD研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 18-21.
- [9] 宋·苏颂. 图经本草[M]. 福州: 福建科技出版社, 1988: 58.
- [10] 郭巧生, 李育川, 邵清松, 等. 药用菊花种质资源形态变异的数量分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1261-1265.
- [11] 王德群, 梁益敏, 刘守金. 中国药用菊花的品种演变[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(10): 584-587.
- [12] 王德群, 刘守金, 梁益敏. 中国药用菊花的产地考察[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 522-525.

[责任编辑 邹晓翠]