

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201605020

引文格式: 邹淑涵, 陈胤睿, 徐文芬, 等. 基于灰色关联的苗药红禾麻总黄酮含量影响因子分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(4):461-469
ZOU SH, CHEN YR, XU WF, et al. Impact factors of the total flavonoid contents in Guizhou miao medicine *Laportea bulbifera* based on grey correlation analysis [J]. Guihaia, 2017, 37(4):461-469

基于灰色关联的苗药红禾麻总黄酮含量影响因子分析

邹淑涵¹, 陈胤睿¹, 徐文芬^{1,2*}, 黄仕清¹, 赵丽婷¹, 齐维娜¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省苗医药重点实验室, 贵阳 550002)

摘要: 采用 $AlCl_3$ 比色法对苗药红禾麻 42 个居群中的总黄酮含量进行分析测定, 并用土壤养分测定仪测定对应产地土壤中的铵态氮、速效磷、有效钾、pH 值和水分, 通过向距产地较近的气象部门查询和以全球卫星定位系统 GPS、海拔表等测定地理气候因子, 结合 42 个居群红禾麻 ISSR 遗传多样性分析结果, 运用灰色关联度分析法对红禾麻不同种质资源药材中总黄酮的含量与各影响因子进行相关性分析。结果表明: 42 个红禾麻不同种质资源药材总黄酮含量为 0.42%~2.16%, 平均加样回收率为 97.86%, RSD 为 1.5%; 环境因子和遗传因子中与总黄酮含量关联度较大的因素分别为无霜期和 Shannon 信息指数 I , 而各影响因子与总黄酮含量的关联度中, 以 Shannon 信息指数 I ($r = 1.03$) 最大, 土壤 pH ($r = 0.49$) 最小, 表明遗传因子对红禾麻药材总黄酮含量的影响大于环境因子。该研究结果为红禾麻药材优良种质资源筛选及野生变家种研究提供了依据。

关键词: 红禾麻种质资源, 总黄酮, 遗传因子, 环境因子, 灰色关联度分析

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)04-0461-10

Impact factors of the total flavonoid contents in Guizhou miao medicine *Laportea bulbifera* based on grey correlation analysis

ZOU Shu-Han¹, CHEN Yin-Rui¹, XU Wen-Fen^{1,2*}, HUANG Shi-Qing¹, ZHAO Li-Ting¹, QI Wei-Na¹

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Key Laboratory of Miao Medicine of Guizhou Province, Guiyang 550002, China)

Abstract: The total flavonoids content of 42 groups of Guizhou miao medicine *Laportea bulbifera* were analyzed and determined by $AlCl_3$ colorimetric. The ammonium nitrogen, available phosphorus, available potassium, pH and water were determined in the soil by soil nutrients tester and the origin of geographical climatic factors of *L. bulbifera* from different producing areas were consulted. In order to analyze the total flavonoids contents of different germplasm resources and impact factors by grey correlation degree analysis, geographical climate factors were determined by the closed meteorological department who had been inquired data and GPS, combined with the ISSR results of genetic diversity of 42 groups with the above measured data. The result revealed that the flavonoid contents of *L. bulbifera* in 42 groups of differ-

收稿日期: 2016-07-18 修回日期: 2016-10-24

基金项目: 国家自然科学基金(81260687); 贵州省省长基金(黔省专合字[2011]61号); 国家工程技术研究中心组建项目(2014FU125Q09); 贵阳中医学院大学生创新计划项目[贵中医大创合字(2014)33号] [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81260687); Foundation of Governor of Guizhou Province ([2011]610); Building Program of Chinese National Engineering Research Center(2014FU125Q09); Innovation Program for College Students of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine([2014]33)]。

作者简介: 邹淑涵(1991-), 女(土家族), 贵州思南人, 硕士研究生, 研究方向为中药、民族药质量控制与新药开发, (E-mail)346141313@qq.com。

*通信作者: 徐文芬, 教授, 主要从事中药资源及质量控制研究, (E-mail)wenfenu@126.com。

ent germplasm resources was at 0.42% - 2.16%, the average recovery rate was 97.86% and RSD was 1.5%, respectively. Frostfree period and the Shannon information index I were the biggest factors with the flavonoid contents in the environment factors and genetic factors. And the biggest correlation degree was Shannon information index I ($r=1.03$) and the smallest was the soil pH ($r=0.49$) in all of correlation degrees. It could be judged that genetic factor had more influence on the quality of medicinal materials *L. bulbifera* than environmental factor. The results provide the reference for choosing good germplasm resources and change the wild to the domestic.

Key words: *Laportea bulbifera* germplasm resources, total flavonoids, genetic factors, environmental factors, grey correlation degree analysis

红禾麻系荨麻科 (Urticaceae) 艾麻属 (*Laportea*) 植物珠芽艾麻 (*L. bulbifera*) 的新鲜或干燥全草, 又名红合麻 (国家中医药管理局, 2005)。红禾麻为贵州重要的苗族药物, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》中 (贵州省药品监督管理局, 2003), 苗药名为 Uabdetdend 蛙斗等, 性味辛、温, 有小毒, 归肝、脾、胃经, 具有祛风除湿, 活血化瘀之功效, 用于治疗风湿麻木, 跌扑损伤, 骨折等疾病 (罗迎春和孙庆文, 2013)。该药材为贵州同济堂有限公司民族药“润燥止痒胶囊”的主要原料药材, 对治疗老年血虚引起的皮肤瘙痒有独特疗效, 市场竞争力较强。一直以来, 红禾麻的原材料供给主要依靠采挖野生资源, 随着市场需求量逐年增加, 野生资源逐年锐减, 药材质量良莠不齐, 已不能满足生产需要, 目前亟需筛选优良红禾麻种质资源进行野生驯化研究。

种质资源是提高中药材质量的关键和源头, 种质的优劣对中药材的产量和质量有决定性的作用, 是进行中药材规范化基地建设的先决条件。红禾麻种质资源药材质量是由不同生境中的某种环境因子造成, 还是不同居群的遗传背景不同造成? 它们与环境因子或遗传背景之间是否存在某些关联? 这对筛选红禾麻优良种源非常重要。通过查阅国内外相关文献对红禾麻的研究报道, 红禾麻主要含有黄酮类和香豆素类化合物, 黄酮类具有较强抗氧化活性 (Mincheol et al, 2003), 香豆素类具有较好的镇痛抗炎和免疫抑制作用 (向明等, 2006, 2009; 苏志强等, 2009; 侯文睿等, 2010; 马琳等, 2012)。因此, 本文采用比色法, 以总黄酮为测定指标, 建立含量测定方法, 分析测定红禾麻不同种质资源药材中总黄酮含量, 并与对应种源 ISSR 遗传多样性分析结果 (内因) 和环境因素 (外因), 通过灰色关联度分析红禾麻不同种质资源药材总黄酮含量与各影响因子的关联度, 探讨内因和外因对红禾麻药材总黄酮含量的影响, 为红禾麻药材优良种质资源筛选及相关产业

的可持续发展提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

UV1800 紫外—可见分光光度计 (日本岛津公司); TPY-6 型土壤测试仪 (浙江托普仪器有限公司); etrex venture 手持 GPS 基准定位仪 (中国台湾) 等。芦丁对照品 (购于中国食品药品检定研究院, 批号 100080-200707, 供 UV 测定的含量为 92.5%), 三氯化铝、甲醇、乙醇等其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

所有供试样品均为课题组于各分布点采集, 经贵阳中医学院孙庆文教授鉴定为荨麻科艾麻属植物珠芽艾麻 (*L. bulbifera*) 的地上部分, 凭证标本存放于贵阳中医学院生药实验室。同时以深度约 20 cm、对角线布点采集相应产地土壤。药材置于 40 °C 鼓风干燥, 粉碎过 3 号筛, 置干燥器中备测。土壤样品自然风干, 粉碎过 2 号筛, 置干燥器中。药材样品信息详见表 1, 土壤样品信息详见表 2。

1.2 红禾麻不同种质资源药材中总黄酮含量测定方法的建立

1.2.1 对照品溶液及显色剂制备 精密称取芦丁对照品 30.80 mg, 置于 100 mL 的容量瓶中, 加 70% 乙醇溶解制成 0.284 9 mg · mL⁻¹ 芦丁对照品溶液。称取 AlCl₃ 25 g, 加水溶解, 制成 10% AlCl₃ 溶液, 备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末约 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定重量, 置于水浴中加热回流 1 h, 放冷至室温, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失重量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 10 mL, 分别等量加入石油醚 (30~60 °C) 萃取 4~5 次, 至石油醚层无明显变化后, 取下层萃取液, 即得供试品溶液, 精密量取该溶液 0.5 mL, 按照标准曲线的绘制方法, 自“加入 10%

表 1 红禾麻不同种质资源药材产地地理气候因子数据

Table 1 Climate factors of *Laportea bulbifera* in different germplasm resources

药材 对应的 居群号 Population code	产地 Location	采集时间 Sampling time	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude	年均气温 Average annual temperature ($^{\circ}\text{C}$)	年均日 照时数 Average annual sunshine time (h)	年均 降水量 Average annual precipitation (mm)	7月均温 Average temperature in July ($^{\circ}\text{C}$)	无霜期 Frost- free period (d)
SCDW-01	贵州水城县大湾镇 Dawan Town of Shuichen County in Guizhou	2013.05.30	2 320.30	26°50' 49.73" N	104°38' 12.29" E	10.0	1 555.6	1 223.6	19.8	216
HZLB-02	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 546.20	26°49' 19.82" N	104°43' 49.20" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-03	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 555.90	26°49' 16.86" N	104°43' 50.66" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-04	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 572.90	26°49' 24.75" N	104°43' 53.56" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-05	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 580.19	26°49' 28.44" N	104°44' 00.18" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-06	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 614.90	26°49' 29.31" N	104°44' 00.19" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-07	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 615.50	26°49' 29.64" N	104°44' 00.56" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZLB-08	贵州赫章县罗布石林 Luobushilin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 550.20	26°49' 17.42" N	104°43' 46.60" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZJC-09	贵州赫章县韭菜坪 Jiucapin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 588.60	26°50' 09.83" N	104°42' 04.22" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZJC-10	贵州赫章县韭菜坪 Jiucapin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 517.30	26°51' 35.87" N	104°41' 49.28" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZJC-11	贵州赫章县韭菜坪 Jiucapin of Hezhang County in Guizhou	2013.05.31	2 516.60	26°51' 35.51" N	104°41' 49.06" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
HZST-12	贵州赫章县水塘乡 Shuitang of Hezhang County in Guizhou	2013.06.01	2 095.60	27°04' 27.57" N	104°36' 55.97" E	13.4	1 445.8	854.1	22.0	245
WNYC-13	贵州威宁县盐仓镇 Yancang Town of Weining County in Guizhou	2013.06.01	2 444.20	26°56' 56.07" N	104°25' 02.86" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
WNYC-14	贵州威宁县盐仓镇 Yancang Town of Weining County in Guizhou	2013.06.01	2 363.80	26°56' 38.78" N	104°24' 28.27" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
WNYC-15	贵州威宁县盐仓镇 Yancang Town of Weining County in Guizhou	2013.06.01	2 388.40	26°56' 37.37" N	104°24' 29.77" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
WNYC-16	贵州威宁县盐仓镇 Yancang Town of Weining County in Guizhou	2013.06.01	2 380.60	26°56' 38.57" N	104°24' 30.77" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
WNET-17	贵州威宁县二塘镇 Ertang Town of Weining County in Guizhou	2013.06.02	2 474.40	26°42' 22.12" N	104°37' 43.22" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
GYST-18	贵州贵阳市水田镇 Shuitian Town of Guiyang County in Guizhou	2013.06.11	1 346.00	26°26' 35.42" N	106°27' 19.49" E	15.3	1 354.0	1 129.5	24.0	270

续表1

药材 对应的 居群号 Population code	产地 Location	采集时间 Sampling time	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude	年均气温 Average annual temperature (°C)	年均日 照时数 Average annual sunshine time (h)	年均 降水量 Average annual precipitation (mm)	7月均温 Average temperature in July (°C)	无霜期 Frost- free period (d)
GYLL-19	贵州修文六屯 Liutun of Xiuwen County in Guizhou	2013.07.13	1 113.00	26°18' 19.90" N	107°00' 54.78" E	15.3	1 354.0	1 129.5	24.0	270
WNHS-20	贵州威宁县黑石头镇 Heishitou Town of Weining County in Guizhou	2013.08.01	1 811.80	26°45' 47.65" N	104°08' 12.72" E	11.2	1 812.0	950.9	17.0	210
FJS-21	贵州梵净山零步 Lingbu of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.19	1 700.20	27°53' 46.65" N	108°43' 20.24" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-22	贵州梵净山蘑菇石 Mogushi of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	2 285.30	27°54' 45.84" N	108°41' 36.11" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-23	贵州梵净山拜佛台 Baifotai of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	2 260.80	27°54' 44.59" N	108°41' 35.24" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-24	贵州梵净山拜佛台 Baifotai of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	2 283.50	27°54' 52.89" N	108°05' 31.78" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-25	贵州梵净山拜佛台 Baifotai of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	2 289.30	27°54' 55.56" N	108°41' 31.90" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-26	贵州梵净山新金顶 Xinjinding of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	2 243.10	27°54' 36.90" N	108°41' 31.78" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
FJS-27	贵州梵净山回香坪 Huixiangpin of Fanjinshan in Guizhou	2013.08.20	1 791.10	27°54' 05.73" N	108°42' 14.06" E	16.0	1 300.0	1 240.0	27.5	295
STWL-28	贵州松桃县乌罗镇 Wuluo Town of Songtao County in Guizhou	2013.08.22	819.80	27°58' 15.40" N	108°46' 33.73" E	16.5	1 228.0	1 378.3	27.3	293
STWL-29	贵州松桃县乌罗镇 Wuluo Town of Songtao County in Guizhou	2013.08.22	816.2	27°58' 16.09" N	108°46' 41.76" E	16.5	1 228.0	1 378.3	27.3	293
TJHY-30	贵州台江县金红阳 Jinghongyang of Taijiang County in Guizhou	2013.10.02	908	26°35' 36.49" N	108°18' 44.92" E	16.5	1 239.3	1 133.0	25.4	286
TJHY-31	贵州台江县金红阳 Jinghongyang of Taijiang County in Guizhou	2013.10.02	948	26°35' 03.80" N	108°19' 15.11" E	16.5	1 239.3	1 133.0	25.4	286
TJHY-32	贵州台江县金红阳 Jinghongyang of Taijiang County in Guizhou	2013.10.02	1 149	26°34' 40.60" N	108°19' 51.49" E	16.5	1 239.3	1 133.0	25.4	286
TZXC-33	贵州台江县展新村 Zhanxin of Taijiang County in Guizhou	2013.10.03	1 650.4	26°34' 36.51" N	108°20' 43.66" E	16.5	1 239.3	1 133.0	25.4	286
JHBD-34	贵州剑河县白道村 Baidao of Jianhe County in Guizhou	2013.10.04	639.9	26°23' 19.72" N	108°24' 52.54" E	16.7	1 186.0	1 220.0	26.4	300
KYZJ-35	贵州开阳县紫江地缝 Zijiangdifeng of Kaiyang County in Guizhou	2013.11.17	1 015.8	26°54' 59.48" N	107°02' 01.02" E	12.8	1 084.7	1 258.5	22.3	277

续表1

药材对应的居群号 Population code	产地 Location	采集时间 Sampling time	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude	年均气温 Average annual temperature (°C)	年均日照时数 Average annual sunshine time (h)	年均降水量 Average annual precipitation (mm)	7月均温 Average temperature in July (°C)	无霜期 Frost-free period (d)
KYZJ-36	贵州开阳县紫江地缝 Zijiangdifeng of Kaiyang County in Guizhou	2013.11.17	1 024.4	26°55′ 22.82″ N	107°02′ 19.47″ E	12.8	1 084.7	1 258.5	22.3	277
GYST-37	贵州贵阳水田上水村 Shuitian Town of Guiyang County in Guizhou	2014.08.24	1 320.5	26°45′ 07.78″ N	106°49′ 38.69″ E	12.8	1 084.7	1 258.5	22.3	277
XWTJ-39	贵州雷山县雷公山 Leigongshan of Leishan County in Guizhou	2014.06.27	1 258.3	26°55′ 54.52″ N	106°35′ 26.01″ E	12.6	1 324.9	1 235.2	22.5	270
XWLT-40	贵州修文县六屯 Liutun of Xiuwen County in Guizhou	2014.06.27	1 245.50	26°58′ 17.12″ N	106°50′ 35.35″ E	12.6	1 324.9	1 235.2	22.5	270
DYDP-41	贵州都匀斗篷山 Doupengshan of Duyun County in Guizhou	2014.07.23	1 945.2	26°03′ 11.57″ N	107°41′ 46.47″ E	16.1	1 158.0	1 431.1	24.8	300
JLCB-42	吉林抚松县松江河 Songjianghe of Fusong County in Jilin	2014.09.07	2 350.4	42°11′ 40.03″ N	127°29′ 04.14″ E	4.0	2 352.5	800.0	23.9	140
YNKN-43	云南昆明富民县老青山 Laoqingshan of Fumin County in Yunnan	2014.10.23	2 515	25°09′ 11.34″ N	102°15′ 38.52″ E	15.8	2 287.0	846.5	19.7	245

AlCl_3 ”起,依法测定其吸光度值。

1.2.3 标准曲线绘制 分别精密吸取“1.2.1”下芦丁对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 10 mL 的容量瓶中,各加入 10% AlCl_3 溶液 2 mL,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得一系列浓度的芦丁对照品溶液,于 40 °C 水浴中显色反应 30 min,取出,摇匀,以相应试剂为空白,于 406 nm 波长处分别测定其吸光度,以芦丁对照品溶液的浓度为横坐标,对应的吸光度值为纵坐标,计算其回归方程。

1.2.4 样品测定 分别称取 42 个不同种质资源红禾麻药材样品粉末约 1 g,精密称定,分别按“1.2.2”项下的方法制备供试品溶液,依照标准曲线项下方法,自“加入 10% AlCl_3 ”起,依法测定其吸光度值,将测得的吸光度值代入上述回归方程,分别计算其以芦丁计总黄酮的含量。

1.3 红禾麻不同种质资源产地的环境因子采集及测定

1.3.1 地理气候因子的采集及查询 采用手持 GPS 基准定位仪,测定红禾麻不同种质资源产地的海拔、经度及纬度,并通过当地气象部门查询气象资料,获取年平均温度、7 月平均温度、年均降水量、年均日照时数以及无霜期等数据。

1.3.2 土壤养分测定 采用土壤养分速测仪,测定 42 个居群红禾麻产地土壤样品中铵态氮、速效磷、有效钾的含量以 pH 值;依照《中国药典》2015 年版四部 0832 水分测定第二法(烘干法)测定其水分含量(国家药典委员会,2015)。

1.4 红禾麻不同种质资源遗传多样性测定分析

1.4.1 总 DNA 的提取及 ISSR 引物的合成与筛选 采用 CTAB 法提取红禾麻总 DNA,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳法检验 DNA 质量,核酸定量分析仪检测 DNA 纯度, -20 °C 保存备用。ISSR 引物设计参照加拿大哥伦比亚大学公布的序列(No.801-900),由上海生工生物工程股份有限公司合成。从 70 条 ISSR 引物中筛选出 10 条多态性好,条带分布均匀,清晰易辨的引物来扩增。

1.4.2 PCR 扩增与产物检测及数据分析 反应体系为 25 μL 的体系中包含模板 DNA 1 μL , $2\times\text{Taq PCR MasterMix}$ 13 μL ,引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL ,用灭菌超纯水补至 25 μL 。扩增程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 52~58.2 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 1.5 min, 40 次循环; 72 °C 后延伸 7 min。PCR 产物 7 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 1.0 h 左右,溴化乙锭染

表2 土壤因子的含量测定结果
Table 2 Content result of soil factors

土壤样品编号 Soil sample code	铵态氮 N Ammonium nitrogen (mg · kg ⁻¹)	速效磷 P Available phosphorus (mg · kg ⁻¹)	有效钾 K Available potassium (mg · kg ⁻¹)	pH 值 pH value	水分 Water (%)
t-SCDW-01	13.6	30.0	256.5	5.96	9.54
t-HZLB-02	35.3	45.0	228.0	5.93	9.22
t-HZLB-03	26.6	10.0	99.5	6.47	10.84
t-HZLB-04	30.5	70.0	110.0	6.80	9.61
t-HZLB-05	33.6	15.0	264.0	6.01	8.14
t-HZLB-06	32.5	20.0	550.0	6.01	15.99
t-HZLB-07	87.0	70.0	284.0	7.16	10.30
t-HZLB-08	27.5	95.0	400.0	7.39	8.06
t-HZJC-09	46.0	50.0	512.5	6.43	11.82
t-HZJC-10	151.0	60.0	495.0	6.55	13.92
t-HZJC-11	61.0	60.0	825.0	6.71	11.48
t-HZST-12	57.0	30.0	111.5	5.91	15.77
t-WNYC-13	34.0	20.0	562.5	5.96	8.28
t-WNYC-14	18.0	100.0	78.0	6.99	7.40
t-WNYC-15	63.0	85.0	221.0	6.89	11.28
t-WNYC-16	54.0	150.0	224.5	7.37	14.44
t-WNET-17	18.0	120.0	281.5	7.63	7.30
t-GYST-18	9.5	55.0	74.5	5.96	2.22
t-GYLL-19	9.0	30.0	42.0	6.22	3.16
t-WNHS-20	22.0	35.0	96.0	7.06	6.12
t-FJS-21	51.0	32.5	485.0	7.55	10.22
t-FJS-22	22.0	32.5	349.5	7.37	5.31
t-FJS-23	87.0	52.5	207.0	6.59	9.02
t-FJS-24	26.0	45.0	207.0	6.96	5.10
t-FJS-25	15.0	25.0	99.5	6.24	3.73
t-FJS-26	11.0	32.5	178.0	7.66	3.85
t-FJS-27	40.0	127.5	578.0	6.53	8.43
t-STWL-28	107.0	30.3	128.0	4.55	5.37
t-STWL-29	28.0	50.0	128.0	6.70	3.12
t-TJHY-30	59.9	6.0	358.0	5.07	4.29
t-TJHY-31	75.3	8.4	699.5	5.09	7.01
t-TJHY-32	26.0	5.0	449.5	5.86	3.57
t-TZXC-33	28.6	5.1	533.0	5.78	4.42
t-JHBD-34	31.3	5.2	458.0	5.81	5.09
t-KYZJ-35	23.3	16.6	849.5	7.87	7.08
t-KYZJ-36	21.3	17.4	174.5	7.89	4.30
t-GYST-37	22.4	18.9	133.0	7.80	8.18
t-XWTJ-39	20.8	5.4	663.0	5.93	7.24
t-XWLT-40	32.5	5.4	3 150.0	5.62	3.86
t-DYDP-41	20.8	7.0	299.0	6.55	2.76
t-JLCB-42	46.3	8.1	1 966.0	6.06	11.12
t-YNKN-43	15.1	6.7	1 100.0	8.58	10.75

色,在凝胶成像系统下观察拍照。同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带有带记为“1”,无带记为“0”,形成 0/1 矩阵。采用 Popgene 32 软件计算 42 个居群红禾麻的多态位点、多态性位点百分率 (*PPL*)、Nei's 遗传多样性指数 (*H*)、Shannon's 多态性信息指数 (*I*)、遗传分化系数 (*Gst*) 和基因流 (*Nm*),分析其遗传多样性水平。

1.5 红禾麻总黄酮含量与影响因子的灰色关联度分析

灰色关联度分析法,是对一个动态变化系统发展态势的量化比较。本研究以 42 批红禾麻药材中总黄酮含量作为母序列,对应产地的环境因子(外因)及遗传因子(内因)为子序列,先对原始数据进行标准化,根据下述公式计算出红禾麻药材中总黄酮含量与各影响因子的灰色关联系数。其中,分辨系数 ρ 为 0.5。

$$\zeta_{ij} = \frac{\min_i \min_k \Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)}{\Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)}$$

再根据下述公式计算灰色关联度:

$$r_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \zeta_{ij}(k)$$

2 结果与分析

2.1 红禾麻种质资源药材中总黄酮含量测定结果

实验结果显示,标准曲线绘制,计算得回归方程和相关系数为 $A = 28.03C + 0.0283$, $r = 0.9995$,表明芦丁对照品溶液浓度在 $5.698 \sim 28.49 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。其方法学考察结果:精密度,计算相应芦丁对照品溶液吸光度值的 RSD 值为 0.15%,表明仪器的精密度良好;重复性,计算以芦丁计总黄酮含量的 RSD 值为 1.1%,表明本法测定的重复性良好;稳定性,计算相应供试品溶液吸光度值的 RSD 值为 0.19%,表明供试品溶液显色在 60 min 内基本稳定;加样回收率,计算以芦丁计总黄酮含量的平均回收率为 97.86%,RSD 值为 1.5%,表明该方法测定的准确度较高。42 个红禾麻种质资源药材中总黄酮含量为 0.42%~2.16%,含量差异较大(表 3)。

2.2 红禾麻不同种质资源产地的环境因子采集及测定结果

红禾麻种质资源不同产地地理气候因子数据见表 1,土壤样品中铵态氮、速效磷、有效钾、土壤 pH 值及水分含量结果见表 2。

表 3 42 个红禾麻不同种质资源药材中总黄酮含量测定结果 ($n=3$)Table 3 Results of total flavonoids content of *Laportea bulbifera* in different germplasm resources

药材对应的居群号 Population code	总黄酮平均含量 Average content of total flavonoids (%)	药材对应的居群号 Population code	总黄酮平均含量 Average content of total flavonoids (%)	药材对应的居群号 Population code	总黄酮平均含量 Average content of total flavonoids (%)	药材对应的居群号 Population code	总黄酮平均含量 Average content of total flavonoids (%)
SCDW-01	1.21	HZST-12	1.07	FJS-23	0.64	JHBD-34	0.51
HZLB-02	1.75	WNYC-13	1.23	FJS-24	2.16	KYZJ-35	0.70
HZLB-03	1.24	WNYC-14	0.90	FJS-25	0.42	KYZJ-36	1.27
HZLB-04	1.79	WNYC-15	0.71	FJS-26	1.12	GYST-37	0.62
HZLB-05	1.34	WNYC-16	0.82	FJS-27	1.06	XWTJ-39	1.22
HZLB-06	1.15	WNET-17	1.12	STWL-28	1.10	XWLT-40	0.92
HZLB-07	1.49	GYST-18	1.51	STWL-29	1.24	DYDP-41	1.30
HZLB-08	2.08	GYLL-19	1.18	TJHY-30	0.55	FSSJ-42	1.22
HZJC-09	1.43	WNHS-20	0.81	TJHY-31	0.71	YNKN-43	0.61
HZJC-10	0.77	FJS-21	0.67	TJHY-32	0.62		
HZJC-11	0.87	FJS-22	1.39	TZXC-33	0.86		

注: 因 38 号居群量过少(威宁县黑石镇), 未采集药材分析样品, 无测定数据。

Note: Because of the lack of Group 38, we did not collect medicinal materials for measuring data.

2.3 红禾麻不同种质资源的 ISSR 遗传多样性分析结果

多态性位点数 (PPB)、多态位点百分率 (PPL, %)、等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、 N_ei 's 基因多样性 H 、Shannon 信息指数 I 等 6 个指标均可用于评价遗传多样性水平, 它们的值越大, 说明遗传多样性水平越高(表 4)。

2.4 红禾麻总黄酮含量与环境因子及遗传因子的灰色关联度分析

红禾麻药材中总黄酮含量与各影响因子的灰色关联度结果见表 5。表 5 结果显示, 各影响因子对红禾麻药材中总黄酮含量影响为 Shannon 信息指数 $I(r=1.03)$ > 经度 ($r=0.97$) > 无霜期 ($r=0.95$) > N_ei 's 指数 $H(r=0.91)$ > 7 月均温 ($r=0.84$) > 年均气温 ($r=0.82$) > 土壤有效钾 ($r=0.81$) > 土壤铵态氮 ($r=0.77$) > 年均日照数 ($r=0.75$) > 土壤水分 ($r=0.72$) > 土壤速效磷 ($r=0.71$) > 年均降水量 ($r=0.69$) > 海拔 ($r=0.64$) > 纬度 ($r=0.63$) > 土壤 pH 值 ($r=0.49$), 环境因子中无霜期和经度与总黄酮含量关联度较大, 其中总黄酮含量较高的产地贵州省赫章县罗布石林 (8 号居群)、贵州省梵净山蘑菇石 (22 号居群)、贵州省梵净山拜佛台 (24 号居群)、贵州省松桃县乌罗镇 (29 号居群), 这四个产地经度较大无霜期较长, 研究结果提示可以通过大棚培育调整无霜期天数以

增加有效成分积累, 可提高红禾麻药材总黄酮含量。而在所以影响因子中 Shannon 信息指数 I 和 N_ei 's 指数 H 与红禾麻总黄酮含量关联度最大, 表明遗传因子是影响红禾麻药材总黄酮含量的主导因子, 结果显示 Shannon 信息指数 I 和 N_ei 's 指数 H 越大, 即遗传多样性水平越高的居群, 总黄酮平均含量较大, 如: 居群贵州省赫章县罗布石林 (4 号居群)、贵州省赫章县罗布石林 (8 号居群)、贵州省赫章县韭菜坪 (9 号居群)、贵州省梵净山拜佛台 (24 号居群) 遗传多样性水平较高 (Shannon 信息指数 I (0.302 8 ~ 0.441 9), 而其总黄酮含量也较高 (1.43% ~ 2.16%)。

3 讨论

灰色关联度分析是一种根据因素间发展趋势的相似或相异程度, 利用各子因素间的数值关系对一个动态变化的系统进行量化分析的方法。该方法简单易行, 克服了回归、相关性等分析方法的局限性。李倩等 (2010) 运用灰色关联度分析法确定了影响丹参品质的主导气候因子, 王宗权等 (2010) 运用灰色关联度分析法确定了影响黄芪 3 种皂苷成分的主导环境因子分别为年均气温和平均无霜期, 蔡萍等

表 4 红禾麻 42 个居群的遗传变异结果

Table 4 Results of genetic variation of *Laportea bulbifera* in 42 groups

居群编号 Population code	多态性位点数 <i>PPB</i>	多态位点 百分率 <i>PPL</i> (%)	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	Nei's 基因多样性 <i>H</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>
SCDW-01	35	28.46	1.284 6 ± 0.453 0	1.195 2 ± 0.337 5	0.111 7 ± 0.185 7	0.164 0 ± 0.268 1
HZLB-02	40	32.52	1.325 2 ± 0.470 4	1.207 9 ± 0.345 0	0.119 3 ± 0.188 0	0.176 6 ± 0.270 9
HZLB-03	65	52.85	1.528 5 ± 0.501 2	1.360 4 ± 0.402 2	0.202 9 ± 0.213 4	0.297 4 ± 0.302 8
HZLB-04	84	68.29	1.682 9 ± 0.467 2	1.456 2 ± 0.392 1	0.259 1 ± 0.205 0	0.381 3 ± 0.288 0
HZLB-05	49	39.84	1.398 4 ± 0.491 6	1.262 7 ± 0.381 1	0.147 5 ± 0.203 6	0.216 8 ± 0.289 7
HZLB-06	84	68.29	1.682 9 ± 0.467 2	1.356 6 ± 0.351 3	0.215 4 ± 0.187 6	0.329 3 ± 0.265 9
HZLB-07	42	34.15	1.341 5 ± 0.476 1	1.210 8 ± 0.344 3	0.121 4 ± 0.188 3	0.180 4 ± 0.270 9
HZLB-08	67	54.47	1.544 7 ± 0.500 0	1.364 8 ± 0.403 9	0.205 7 ± 0.211 8	0.302 8 ± 0.300 0
HZJC-09	97	78.86	1.788 6 ± 0.410 0	1.546 0 ± 0.399 7	0.302 4 ± 0.200 0	0.441 9 ± 0.273 4
HZJC-10	65	52.85	1.528 5 ± 0.501 2	1.336 7 ± 0.383 5	0.193 8 ± 0.206 1	0.287 3 ± 0.294 3
HZJC-11	47	38.21	1.382 1 ± 0.487 9	1.245 4 ± 0.361 3	0.140 7 ± 0.197 4	0.207 9 ± 0.283 4
HZST-12	40	32.52	1.325 2 ± 0.470 4	1.223 3 ± 0.363 8	0.125 2 ± 0.195 5	0.183 3 ± 0.279 4
WNYC-13	47	38.21	1.382 1 ± 0.487 9	1.254 5 ± 0.361 9	0.146 3 ± 0.199 1	0.215 5 ± 0.287 1
WNYC-14	45	36.59	1.365 9 ± 0.483 6	1.236 5 ± 0.370 7	0.132 6 ± 0.198 4	0.195 2 ± 0.282 2
WNYC-15	62	50.41	1.504 1 ± 0.502 0	1.358 8 ± 0.407 1	0.200 5 ± 0.216 0	0.292 1 ± 0.306 8
WNYC-16	41	33.33	1.333 3 ± 0.473 3	1.200 6 ± 0.335 6	0.120 5 ± 0.185 4	0.179 5 ± 0.268 7
WNET-17	34	27.64	1.276 4 ± 0.449 1	1.153 5 ± 0.300 5	0.090 7 ± 0.165 5	0.137 3 ± 0.241 1
GYST-18	43	34.96	1.349 6 ± 0.478 8	1.219 9 ± 0.341 8	0.128 2 ± 0.188 9	0.190 7 ± 0.273 9
GYLL-19	65	52.85	1.528 5 ± 0.501 2	1.324 3 ± 0.378 6	0.187 6 ± 0.204 0	0.279 4 ± 0.291 0
WNHS-20	49	39.84	1.398 4 ± 0.491 6	1.266 9 ± 0.384 8	0.149 3 ± 0.205 1	0.218 9 ± 0.291 7
FJS-21	49	39.84	1.398 4 ± 0.491 6	1.261 5 ± 0.373 9	0.148 9 ± 0.200 4	0.220 0 ± 0.287 2
FJS-22	38	30.89	1.308 9 ± 0.463 9	1.204 1 ± 0.353 3	0.114 5 ± 0.189 9	0.168 3 ± 0.271 0
FJS-23	58	47.15	1.471 5 ± 0.501 2	1.302 7 ± 0.399 4	0.169 1 ± 0.209 6	0.249 3 ± 0.295 8
FJS-24	68	55.28	1.552 8 ± 0.449 2	1.394 5 ± 0.408 0	0.220 6 ± 0.216 6	0.321 2 ± 0.307 3
FJS-25	80	65.04	1.650 4 ± 0.478 8	1.413 0 ± 0.384 6	0.238 4 ± 0.202 3	0.353 9 ± 0.286 3
FJS-26	63	51.22	1.512 2 ± 0.501 9	1.292 2 ± 0.373 2	0.169 7 ± 0.198 8	0.255 4 ± 0.283 1
FJS-27	47	38.21	1.382 1 ± 0.487 9	1.219 6 ± 0.349 1	0.127 1 ± 0.188 1	0.191 0 ± 0.269 8
STWL-28	63	51.22	1.512 2 ± 0.501 9	1.280 0 ± 0.362 6	0.164 7 ± 0.194 4	0.249 7 ± 0.277 7
STWL-29	53	43.09	1.430 9 ± 0.497 2	1.256 8 ± 0.373 2	0.146 7 ± 0.197 4	0.219 3 ± 0.281 1
TJHY-30	57	46.34	1.463 4 ± 0.500 7	1.301 4 ± 0.378 9	0.172 5 ± 0.206 0	0.254 6 ± 0.294 9
TJHY-31	65	52.85	1.528 5 ± 0.501 2	1.355 9 ± 0.393 6	0.202 3 ± 0.211 1	0.297 2 ± 0.300 8
TJHY-32	40	32.52	1.325 2 ± 0.470 4	1.222 7 ± 0.364 0	0.124 8 ± 0.195 4	0.182 7 ± 0.279 1
TZXC-33	41	33.33	1.333 3 ± 0.473 3	1.215 7 ± 0.355 7	0.122 5 ± 0.190 9	0.181 0 ± 0.273 8
JHBD-34	68	55.28	1.552 8 ± 0.499 2	1.346 0 ± 0.375 8	0.201 6 ± 0.203 2	0.299 9 ± 0.291 2
KYZJ-35	62	50.41	1.504 1 ± 0.502 0	1.277 1 ± 0.360 3	0.163 3 ± 0.194 1	0.247 2 ± 0.278 1
KYZJ-36	69	56.10	1.561 0 ± 0.498 3	1.329 3 ± 0.368 9	0.193 6 ± 0.198 9	0.290 8 ± 0.284 7
GYST-37	36	29.27	1.292 7 ± 0.456 9	1.199 7 ± 0.347 1	0.112 9 ± 0.188 1	0.165 5 ± 0.270 0
XWTJ-39	61	49.59	1.495 9 ± 0.502 0	1.280 2 ± 0.365 0	0.163 7 ± 0.197 0	0.246 6 ± 0.281 5
XWLT-40	79	64.23	1.642 3 ± 0.481 3	1.399 5 ± 0.391 8	0.229 2 ± 0.204 9	0.340 8 ± 0.288 4
DYDP-41	56	45.53	1.455 3 ± 0.500 0	1.287 2 ± 0.374 0	0.165 0 ± 0.203 2	0.244 4 ± 0.290 9
JLCB-42	59	47.97	1.479 7 ± 0.501 6	1.295 6 ± 0.368 7	0.172 2 ± 0.200 6	0.256 5 ± 0.288 5
YNKN-43	71	57.72	1.577 2 ± 0.496 0	1.399 3 ± 0.409 6	0.223 4 ± 0.215 3	0.326 7 ± 0.304 0
平均 Mean	56.74	46.13	1.567 4 ± 0.484 2	1.293 0 ± 0.371 0	0.167 6 ± 0.198 9	0.248 3 ± 0.283 8
物种水平 Species level	114	92.68	1.926 8 ± 0.000	1.756 6 ± 0.237 7	0.418 5 ± 0.092 1	0.605 2 ± 0.104 2

Note: *PPB*. No. of polymorphic band; *PPL*. Percentage of polymorphic loci; *Na*. Observed number of alleles; *Ne*. Effective number of alleles; *H*. Nei's (1973) gene diversity; *I*. Shannon information index(1972).

表 5 红禾麻药材中总黄酮含量与环境因子及遗传因子的灰色关联度结果

Table 5 Grey correlation degree between total flavonoid contents and environmental factors or genetic diversity in Guizhou miao medicine *Laportea bulbifera*

影响因素(内因和外因) Impact factor	关联度 Correlation degree
Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity (<i>H</i>)	0.91
Shannon 信息指数 Shannon information index (<i>I</i>)	1.03
海拔 Altitude (m)	0.64
纬度 Latitude (N)	0.63
经度 Longitude (E)	0.97
年均气温 Average annual temperature (°C)	0.82
年均日照时数 Average annual sunshine time (h)	0.75
年均降水量 Average annual precipitation (mm)	0.69
7 月均温 Average temperature in July (°C)	0.84
无霜期 Frostfree period (d)	0.95
铵态氮 N Ammonium nitrogen (mg · kg ⁻¹)	0.77
速效磷 P Available phosphorus (mg · kg ⁻¹)	0.71
有效钾 K Available potassium (mg · kg ⁻¹)	0.81
pH 值 pH value	0.49
水分 Water (%)	0.72

(2014)运用灰色关联度法分析影响杜仲中 4 种有效成分含量产地差异的主要环境因子。本研究运用灰色关联度分析法,以红禾麻不同种质资源药材中总黄酮含量作为母因素,以各环境因子和评价遗传多样性水平的指数作为子因素进行分析,通过对苗药红禾麻种质资源 42 个地理居群的各影响因子与总黄酮含量变化的分析,Shannon 信息指数 *I*、Nei's 指数 *H*、经度、无霜期 4 个影响因子的关联度较大 (>0.90),其中 Nei's 指数 *H* 关联度最大,表明各影响因子中内因(遗传因子)对红禾麻药材总黄酮含量影响最大,因此选择遗传变异较小的优良种质资源,能够更好地控制药材品质,其中贵州赫章县罗布石林(4、8 号居群),贵州赫章县韭菜坪(9 号),贵州梵净山拜佛台(24 号居群)4 个居群的遗传多样性指数和总黄酮含量较高,不仅可以作为人工育种的选育材料,而且对于苗药红禾麻种植适生地区划研

究有很好的参考价值。

本研究所建立的红禾麻药材总黄酮含量测定方法简便快速、准确可行,可作为苗药红禾麻药材的质量控制方法,为《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 年版)收录的红禾麻药材质量标准提升奠定一定的实验基础。

参考文献:

- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. Chinese pharmacopoeia: the fourth part [M]. Beijing: China Medical Science Press; 37-40, 103-105. [国家药典委员会, 2015. 《中国药典》第四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 37-40, 103-105.]
- CAI P, LIU CY, LIANG XJ, et al, 2014. Grey correlation degree analysis between active ingredients in barks or leaves of *Eucommiae cortex* and environmental factors in their habitats [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 20(23): 10-14. [蔡萍, 刘才英, 梁雪娟, 等, 2014. 杜仲药材有效成分与环境因子的灰色关联度分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 20(23): 10-14.]
- Food and Drug Administration of Guizhou Province, 2003. Quality standard of Chinese medicinal materials and national medicines in Guizhou Province [S]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House Co., Ltd; 187. [贵州省食品药品监督管理局. 2003. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 贵阳: 贵州科技出版社; 187.]
- HOU WR, SU ZQ, PI HF, et al, 2010. Immunosuppressive constituents from *Urtica dentata* Hand [J]. JANPR, 12(8): 707-713. [侯文睿, 苏志强, 皮慧芳, 等, 2010. 红活麻免疫抑制活性成分研究 [J]. 亚洲天然产物研究杂志, 12(8): 707-713.]
- LI Q, LIANG ZS, DONG JE, et al, 2010. Grey correlation for main climatic factors and quality of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) [J]. Acta Ecol Sin, 30(10): 2569-2575. [李倩, 梁宗锁, 董娟娥, 等, 2010. 丹参品质与主导气候因子的灰色关联度分析 [J]. 生态学报, 30(10): 2569-2575.]
- LUO Y, SUN QW, 2013. National common natural medicine in Guizhou: Vol.2 [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House Co., Ltd; 231-232. [罗迎春, 孙庆文. 2013. 贵州民族常用天然药物: 第 2 卷 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社; 231-232.]
- MINCHEOL YANG, SANG ZIN CHOI, OK LEE, et al, 2003. Flavonoid constituents and their antioxidant activity of *Laportea bulbifera* Weddell [J]. Kor J Pharmacogn, 34(1): 18-24.
- MA L, LIANG B, ZHU Z, et al, 2012. Effects of analgesic pharmacological of national medicine *Laportea bulbifera* Weddell [J]. J Guiyang Coll Trad Chin Med, 3(1): 26-26. [马琳, 梁冰, 朱珠, 等, 2012. 民族药珠芽艾麻醇提取物镇痛药理作用的研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 3(1): 26-26.]
- State Administration of Traditional Chinese Medicine, the Chinese Material Medical the Editorial Committee, 2005. The Chinese material medical (Miao medicine volume) [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House Co., Ltd; 283-284. [国家中医药管理局, 《中华本草》编委会. 2005. 中华本草(苗药卷) [M]. 贵阳: 贵州科技出版社; 283-284.]
- SU ZQ, ZHAO ZY, XIE SN, et al, 2009. Effects of analgesic anti-inflammation and immune suppression of acetic ether extract of (下转第 452 页 Continue on page 452)