

西藏不同生长地砂生槐群体种子生物碱含量及其相关性分析

王玉婷¹, 普布次仁^{1*}, 麻文俊², 刘莹², 单增罗布¹

(1 西藏自治区林木科学研究院, 拉萨 850000; 2 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 为了明确不同群体间和群体内砂生槐天然种子富含生物碱含量与组成的差异, 该研究选取来自西藏“一江四河”流域、海拔 2 900~4 100 m 范围内 10 个群体的砂生槐种子作为研究材料, 采用高效液相色谱法, 测定 10 个群体 300 个单株种子重要生物碱(氧化苦参碱、苦参碱、槐果碱、槐定碱)含量, 应用 SPSS 软件分析了地理分布特征与生物碱含量之间的相关性及其群体遗传变异关系, 以筛选生物碱含量较高的群体, 为砂生槐药物开发利用提供依据。结果表明: (1) 10 个群体的砂生槐种子中均含有氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱, 含量依次为: 氧化苦参碱(46.18~64.08 mg/g) > 苦参碱(1.14~9.82 mg/g) > 槐果碱(0.08~1.16 mg/g), 其中氧化苦参碱占生物碱总量的 90% 以上, 且群体 4 中含量最高(64.08±7.37 mg/g); 其他微量生物碱在群体 3 中含量最高; 群体间氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱均差异极显著($P < 0.01$)。 (2) 氧化苦参碱群体内和群体间变异相对较小, 苦参碱和槐果碱群体内和群体间变异系数均较大, 而且氧化苦参碱和槐果碱的群体间变异均大于群体内变异, 苦参碱的群体间变异小于群体内变异。 (3) 氧化苦参碱与海拔呈显著正相关关系($r = 0.117^*$), 苦参碱与海拔、经度和纬度均呈极显著负相关关系($r < -0.326^{**}$), 其他关系不显著。氧化苦参碱与苦参碱和槐果碱均呈显著负相关关系($r < -0.162^{**}$), 而苦参碱与槐果碱呈显著正相关关系($r = 0.789^{**}$)。 (4) 聚类分析将 10 个群体聚为 4 类, 各类间的距离差异比较大, 且大多与地理因素有关。

关键词: 砂生槐; 生物碱; 群体; 种子

中图分类号: Q946.88; S718.43

文献标志码: A

Analysis on Contents and Correlation of Alkaloids in *Sophora moorcroftiana* of Different Growing Populations in Tibet

WANG Yuting¹, PUBU Ciren^{1*}, MA Wenjun², LIU Ying², DANZENG Luobu¹

(1 Forest Science Research Institute of Tibet Municipality, Lhasa 850000, China; 2 Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: To clear the differences of alkaloid content and composition in natural *Sophora moorcroftiana* seeds among groups and within the group, the study chose *S. moorcroftiana* seeds from 10 groups lived at altitudes ranging from 2 900 meters to 4 100 meters in Tibet “one river and four streams” basin, adopted high performance liquid chromatography to measure important alkaloid content including oxymatrine, ma-

收稿日期: 2018-06-20; 修改稿收到日期: 2018-09-17

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201504109); 国家林业(含竹藤花卉)种质资源平台; 西藏自治区科技计划重大专项(XZ201801-GA-12)

作者简介: 王玉婷(1991—), 女, 硕士, 主要从事林木遗传育种学研究。E-mail: 18008902413@163.com

* 通信作者: 普布次仁, 副研究员, 副院长, 主要从事森林培育学研究。E-mail: 1412294990@qq.com

trine, sophocarpine and sophoridine in 300 single plant seeds from 10 groups, used software SPSS for variance analysis, correlation analysis and cluster analysis, analyzed the relationship between geographic distribution and alkaloid content as well as heredity and variation among groups and screened out groups with higher alkaloid to provide *S. moorcroftiana* medicine exploitation and utilization with evidence. The result showed that: (1) oxymatrine, matrine and sophocarpine were all detected in *S. moorcroftiana* seeds of 10 groups and their contents were oxymatrine (46.18–64.08 mg/g) > matrine (1.14–9.82 mg/g) > sophocarpine (0.08–1.16 mg/g) in descending order, where oxymatrine content accounted for over 90% of total alkaloid, highest in group 4 (64.08 ± 7.37 mg/g); others were little alkaloid, highest in group 3. There were significant differences of oxymatrine, matrine and sophocarpine among groups ($P < 0.01$). (2) Oxymatrine had relevant less variation within the group and among groups; matrine and sophocarpine had relevant more variation within the group and among groups; moreover oxymatrine and sophocarpine had relevant more variation among groups than within the group; matrine had relevant less variation among groups than within the group. (3) Oxymatrine had significant positive correlation with altitude ($r = 0.117^*$). Matrine had extremely significant negative correlation with altitude, longitude and latitude ($r < -0.326^{**}$). Others did not have obvious relationship. Oxymatrine had significant negative correlation with matrine as well as sophocarpine ($r < -0.162^{**}$), while matrine had significant positive correlation with sophocarpine ($r = 0.789^{**}$). (4) We could clarify 10 groups into 4 categories through cluster analysis. There were great differences among categories and most of differences were related to geography.

Key words: *Sophora moorcroftiana*; alkaloids; population; seeds

砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 是豆科 (Leguminosae) 槐属 (*Sophora*) 落叶矮灌木, 又名“西藏狼牙刺”, 青藏高原特有种, 主要分布于雅鲁藏布江流域海拔 2 800~4 500 m 的山坡、河谷沙滩等地, 是该流域干旱、半干旱河谷的主要建群、先锋灌丛植物^[1-2]。砂生槐结实量大、种子中含有大量可入藏药成分的生物碱, 因此具有一定的开发价值。

生物碱是植物次生代谢产生的特殊含氮碱性有机化合物, 大多数有复杂的环状结构, 不溶或难溶于水, 多具苦味^[3-4]。苦参类生物碱广泛存在于豆科槐属植物中, 主要包括苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱、槐醇碱等。近些年广泛使用苦参类生物碱过程中, 发现了其多方面的药理活性和临床功能, 具有抗癌、抗肿瘤、抗炎、抗心律失常等方面的作用^[5-7]。早在 1986 年, 崔建芳等研究发现, 砂生槐种子含有氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦参碱, 并具有一定的药效作用^[8], 但未涉及群体遗传方面的研究, 针对不同群体砂生槐种子生物碱含量的研究还较少。为此, 本研究进行了地理因子对不同群体砂生槐种子生物碱含量的影响探究, 以及群体内和群体间的遗传变异模式分析, 为探究砂生槐群体遗传分化关系及进一步开发利用砂生槐药物提供参考。

1 材料和方法

1.1 种源和取样

2017 年 8~10 月在西藏砂生槐分布区进行野

外植株种子收集, 以一江(雅鲁藏布江)四河(年楚河、雅砻河、拉萨河和尼洋河)为主线, 采种范围覆盖砂生槐的全部典型分布区域, 最低海拔为东部边缘的林芝县米瑞乡群体(海拔 2 955 m), 最高海拔为日喀则市拉孜县查务乡群体(海拔 4 117 m)。综合考虑海拔和生境差异, 最终确定 10 个群体进行采种, 每个群体采集 30 个单株, 每个单株距离 50 m 以上, 共 300 株种子, 测定苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和槐定碱的含量。群体编号和地理位置见表 1。

1.2 生物碱含量测定

采用 Waters 2695 高效液相色谱仪将砂生槐种子样品中各种生物碱分离并测定含量。参照张爱华等同时分离测定 5 种生物碱时的色谱条件, 色谱柱: Waters XTerra™ RP C₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 8.5)-甲醇 (78 : 22), 流速为 1 mL · min⁻¹, 检测波长为 220 nm^[9]。色谱峰用峰面积法得到的碱含量记为 C_x (μg/mL), 实际测得生物碱含量计算公式为:

$$C(\text{mg/g}) = \frac{C_x(\mu\text{g/mL}) \times V(\text{mL}) \times \text{稀释倍数}}{M(\text{g}) \times 1\,000}$$

式中: C 为实际检测出的生物碱含量, C_x 为经过校正后的碱含量测试原始值, V 为测试种子体积, M 为测试种子质量。

1.3 统计分析

采用 SPSS22.0 统计软件包和 Excel 进行统计分析、方差分析、多重比较和相关性分析^[10]。

表 1 西藏砂生槐 10 个群体采样地基本信息

Table 1 Basic information of 10 *S. moorcroftiana* populations for sampling in Tibet

群体编号 Population code	地点 Location	海拔 Altitude/m	经度 Longitude(E)	纬度 Latitude(N)
1	拉孜县查务乡 Chawu, Lazi	4 117	87. 53°	29. 16°
2	江孜县县城附近 Jiangzi	4 105	89. 61°	28. 91°
3	日喀则市东南尼仓村 Dongnannicang, Rikaze	3 832	88. 92°	29. 32°
4	墨竹工卡县工卡镇恰嘎村 Qiaga, Gongka, Mozhugongka	3 800	91. 73°	29. 84°
5	曲水县才纳乡协荣村 Xierong, Caina, Qushui	3 621	91. 07°	29. 66°
6	山南地区乃东县泽当镇日苏村 Risu, Zedang, Naidong, Shannan	3 620	91. 86°	29. 06°
7	贡嘎县岗堆镇森布日村 Senburi, Gangdui, Gongga	3 582	90. 75°	29. 29°
8	山南地区泽当镇以北 Zedang, Shannan	3 560	91. 78°	29. 25°
9	工布江达县城以东附近 Gongbuijiangda	3 365	93. 19°	29. 90°
10	林芝县米瑞乡色果拉村 Seguola, Mirui, Linzhi	2 955	94. 45°	29. 43°

2 结果与分析

2.1 生物碱含量比较

采集的 10 个西藏砂生槐群体天然种子中均检测出含有氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱(表 2),未检测出槐定碱。其中,氧化苦参碱的含量占 3 种生物碱含量的 90%以上,而其他 2 种生物碱含量较少,故称为微量生物碱。不同群体氧化苦参碱含量变幅为 46.18~64.08 mg/g,苦参碱含量变幅为 1.14~9.82 mg/g,槐果碱含量变幅为 0.08~1.16 mg/g。群体间氧化苦参碱、苦参碱和槐果碱均存在极显著差异($P<0.01$)。同时,氧化苦参碱含量以群体 4 最高,群体 2 最低;苦参碱和槐果碱含量均为群体 3 最高,群体 5 最低。

2.2 砂生槐群体间和群体内变异分析

变异系数可在一定程度上揭示群体的遗传变异^[11]。从生物碱含量的变异系数(表 3)看,氧化苦参碱含量在群体内和群体间变异相对较小,苦参碱和槐果碱含量在群体内和群体间变异系数均较大,并以 7 号群体的槐果碱含量变异系数最大(119.92%),说明 2 个微量生物碱遗传变异大,差异明显。从群体间变异系数和群体内变异系数看,氧化苦参碱和槐果碱的群体内变异大于群体间变异(13.17%>10.37%, 64.79%>63.49%),苦参碱的群体间变异大于群体内变异(51.94%<68.00%)。

2.3 生长地理环境对生物碱的影响

相关分析结果表明(表 4),砂生槐种子中的生物碱含量与海拔、经度和纬度呈不同的相关关系。氧化苦参碱与海拔呈显著正相关关系,与经度呈负相关关系,与纬度呈正相关关系;苦参碱与海拔、经度和纬度均呈极显著负相关关系;槐果碱与海拔呈正相关

表 2 西藏砂生槐 10 个群体的生物碱含量

Table 2 Alkaloid content of 10 *S. moorcroftiana* populations in Tibet/(mg/g)

群体编号 Population code	氧化苦参碱 Oxymatrine	苦参碱 Matrine	槐果碱 Sophocarpine
1	62.95±7.41	5.60±3.44	0.77±0.40
2	46.18±6.69	7.70±2.66	0.69±0.28
3	51.11±8.41	9.82±5.42	1.16±0.75
4	64.08±7.37	2.29±1.24	0.43±0.27
5	53.69±4.27	1.14±0.33	0.08±0.04
6	55.98±8.16	5.28±2.86	0.56±0.31
7	54.68±4.78	1.74±1.28	0.22±0.27
8	58.86±7.41	1.48±0.55	0.11±0.05
9	49.84±8.65	3.47±1.74	0.97±0.66
10	52.08±8.49	3.71±2.62	0.72±0.68
平均值 Mean value	54.91	4.22	0.57
F	18.07**	35.39**	20.48**

注: * 表示差异性显著($P\leq 0.05$); ** 表示差异极显著($P\leq 0.01$)。下同

Note: * indicates significant difference ($P\leq 0.05$); ** indicate extremely significant difference ($P\leq 0.01$). The same as below 关系,与经度和纬度呈负相关关系。氧化苦参碱和槐果碱均随着生长海拔的升高含量增高,而苦参碱含量减少;3 种碱含量均随经度的增加而减小;苦参碱和槐果碱随纬度的升高而减小,而氧化苦参碱增高。总体上,高海拔、低经纬度的群体 3 种生物碱含量较高。

从生物碱含量间的相关分析(表 5)可知,氧化苦参碱与苦参碱和槐果碱呈显著负相关关系,而苦参碱与槐果碱呈显著正相关关系。说明主要碱和微量碱的占比总和一定,此增彼减,而 2 个微量碱占比大致相同,同增同减。

表 3 西藏砂生槐各群体生物碱含量的变异系数

Table 3 The variable coefficient of alkaloid content of <i>S. moorcroftiana</i> populations in Tibet/%			
群体编号 Population code	氧化苦参碱 Oxymatrine	苦参碱 Matrine	槐果碱 Sophocarpine
1	11.77	61.55	51.90
2	14.49	34.54	40.80
3	16.45	55.21	64.19
4	11.50	54.21	62.45
5	7.96	28.69	47.01
6	14.57	54.24	54.50
7	8.74	73.58	119.92
8	12.59	36.93	45.78
9	17.35	50.04	67.62
10	16.30	70.62	93.75
群体内 Within the group	13.17	51.94	64.79
群体间 Among the groups	10.37	68.00	63.49

表 4 西藏砂生槐地理因子与生物碱含量的相关系数

Table 4 Correlation coefficient of geographical factors and alkaloid content of <i>S. moorcroftiana</i> populations in Tibet			
生物碱 Alkaloid	海拔 Altitude	经度 Longitude	纬度 Latitude
氧化苦参碱 Oxymatrine	0.117*	-0.099	0.101
苦参碱 Matrine	-0.326**	-0.372**	-0.361**
槐果碱 Sophocarpine	0.051	-0.103	-0.017

2.4 聚类分析

为了研究砂生槐群体间的相似性,基于 3 种生物碱含量对 10 个群体进行聚类分析(图 1),当欧氏距离为 10 时,10 个群体被聚为 4 类,各类间的距离较大,说明各类差异比较大,相关性较小。第一类共包含 3 个群体,分别是群体 5(曲水县才纳乡)、群体 7(贡嘎县岗堆镇)和群体 8(山南地区泽当镇),由于群体 5 是雅鲁藏布江分支拉萨河下游,群体 7 和群体 8 均为分支后雅鲁藏布江的下游,且采种地理位置很近,说明这 3 个群体的原始群很可能在雅鲁藏布江上游;第二类共包含 3 个群体,分别是群体 9(工布江达县)、群体 10(林芝县米瑞乡)和群体 6(山南地区乃东县),群体 9 和群体 10 均在尼洋河流域,可能是水流原因将种子进行传播,而群体 6 的聚类,属于特别现象,有待进一步探究;第三类共包含 2 个群体,分别是群体 1(拉孜县查务乡)和群体 4(墨竹工卡县工卡镇);第四类共包含 2 个群体,分别是群体

表 5 西藏砂生槐 3 种主要生物碱的相关矩阵

Table 5 Correlation matrix of three main alkaloids of <i>S. moorcroftiana</i> populations in Tibet			
生物碱 Alkaloid	氧化苦参碱 Oxymatrine	苦参碱 Matrine	槐果碱 Sophocarpine
氧化苦参碱 Oxymatrine	1		
苦参碱 Matrine	-0.238**	1	
槐果碱 Sophocarpine	-0.162**	0.789**	1

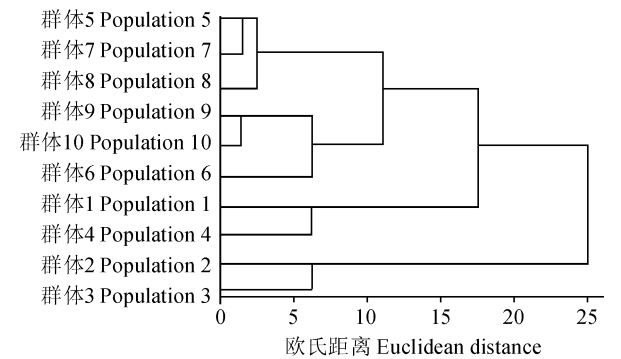


图 1 西藏砂生槐 10 个群体的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of 10 *S. moorcroftiana* populations in Tibet

2(江孜县)和群体 3(日喀则市尼仓村),由于群体 3 采种点为雅鲁藏布江与分支年楚河的交汇处,而群体 2 采种点江孜县位于年楚河上游,说明群体 2 和群体 3 很可能是一个原始群,遗传背景可能比较相似。

经聚类分析后,正常情况下将比较近的群体都聚在了一起,但是目前出现了将距离很远的群体聚在一起,这可能是由于虽然距离远,但是 3 种生物碱的含量分配比例或模式较为一致所致。

综合生物碱含量与聚类分析结果,认为在砂生槐种子生物碱开发上,群体 1、3、4 为“一江四河”流域的优良群体。

3 讨论

3.1 砂生槐生物碱含量

生物碱的开发利用在烟草上较为广泛且成熟,随着现代相关研究的深入,农业和医药界也发现了生物碱带来的优良功效,而进行了大量深入挖掘和提取^[5,12-13]。生物碱的含量和种类在一定程度上反映了生物的遗传变异及遗传多样性,诸燕等^[14]对不同种质和年龄的铁皮石斛总生物碱含量进行了研究,结果表明不同年限和地域的铁皮石斛总生物碱含量差异很大。砂生槐种子中含有大量氧化苦参碱和少量苦参碱及槐果碱,3 种生物碱总含量以拉孜

县群体含量最高(69.32 mg/g),工布江达县群体含量最低(54.28 mg/g)。10 个砂生槐群体种子生物碱含量在群体内和群体间的变异系数均存在极显著的差异,达到 10% 以上,说明砂生槐种子生物碱含量存在较为丰富的遗传变异,从而为高生物碱含量群体或个体的筛选奠定了物质基础。

3.2 不同群体砂生槐相关性分析

砂生槐种子生物碱的含量与地理因子也存在一定相关性,生物碱含量随海拔而变化的原因,可能是海拔变化,光照强度不同;同时,海拔变化导致的昼夜温差及太阳辐射量的改变也可能对生物碱合成起到了一定的促进或抑制作用,最终导致生物碱含量随生长海拔而变化。海拔高度对不同生物碱的影响

程度不同,可能是对生态因子的敏感程度不同。这与简永兴等^[15]研究烤烟种植海拔对生物碱影响的规律恰好相反,可能是因为植物生理特性、地理位置、环境和气候不同,导致本研究中影响规律不明显,相关系数绝对值较小。

综上所述,由于砂生槐自然分布区的海拔、经纬度跨度大,覆盖的河流多,自然环境多样,经过长期的自然生长和选择,种子内生物碱含量发生了显著的群体内和群体间变异,进而导致丰富的遗传变异。因此,砂生槐种子内生物碱含量的探究对选育优良群体、优良种质资源保存、开发利用及遗传改良具有极为重要的意义,期望能够将西藏特有乡土树种推广到各个行业进行具有民生意义的利用。

参考文献:

[1] 林少敏. 西藏砂生槐[J]. 草业科学, 2002, **19**(3): 34.
LIN S M. Review of *Sophora moorcroftiana* in Tibet [J]. *Pratacultural Science*, 2002, **19**(3): 34.

[2] 林 玲,王军辉,罗 建,等. 砂生槐天然群体种实性状的表型多样性[J]. 林业科学, 2014, **50**(4): 137-143.
LIN L, WANG J H, LUO J, *et al.* Phenotypic diversity of seed and fruit traits in antural populations of *Sophora moorcroftiana* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, **50**(4): 137-143.

[3] 梁 丹,李志伟,李 明,等. 天然生物碱的研究与应用[J]. 安徽农业科学, 2007, **35**(35): 11 340-11 342.
LIANG D, LI Z W, LI M, *et al.* Research and application of natural product alkaloids[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, **35**(35): 11 340-11 342.

[4] 胡淑平,徐惠波,赵守瑞,等. 苦参类生物碱抗肿瘤作用[J]. 特产研究, 2004,**43**(3): 43-46.
HU S P, XU H B, ZHAO S R, *et al.* Sophora alkaloids anti-tumor effects[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2004,**43**(3): 43-46.

[5] 杨武振,杨 涛,王 荔,等. 02428×合系 35 的 RIL 群体糙米总黄酮与总生物碱含量的遗传分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, **12**(3): 477-480.
YANG W Z, YANG T, WANG L, *et al.* Genetic analysis on total flavonoids and total alkaloids content in brown rice of 02428×Hexi 35 RIL population [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, **12**(3): 477-480.

[6] 杨少芳. 苦参生物碱药理作用研究进展[C]// 中华中医药学会中成药学术研讨会论文集,中华中医药学会, 2007: 5.

[7] 陈 闯. 苦参类生物碱抗肿瘤的研究概况[J]. 中医药研究, 2001,**17**(1): 54-56.
CHEN C. Overview of research on resistance of Sophora alkaloids to antitumor[J]. *Research of Traditional Chinese Medicine*, 2001,**17**(1): 54-56.

[8] 崔建芳,章观德. 苦参等四种槐属植物药中生物碱的分析[J]. 中药通报,1986, **2**(11): 38-39.

[9] 张爱华,张悦晗. 高效液相色谱法同时分离测定氧化苦参碱、

槐定碱、槐胺碱、苦参碱、槐果碱[J]. 药物分析杂志, 2008, **28**(6): 964-966.
ZHANG A H, ZHANG Y H. HPLC simultaneous separation and determination of sophoridine, matrine, oxymatrine, sophoramine, sophocarpine [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2008, **28**(6): 964-966.

[10] 王苏斌,郑海海,邵谦谦. SPSS 统计分析[M]. 北京: 机械工业出版社,2003.

[11] 李清超,梁黔云,罗仕文,等. 不同供体基因渗入对玉米群体的改良效果[J]. 农业科技通讯,2013, (2): 63-69.
LI Q C, LIANG Q Y, LUO S W, *et al.* Effects of introgression of different donor genes on maize population[J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2013, (2): 63-69.

[12] 陈乃东,高 峰,林 欣,等. 不同种源霍山石斛生物碱比较研究[J]. 中药材, 2014,**37**(6): 953-956.
CHEN N D, GAO F, LIN X, *et al.* Comparative study on alkaloids of tissue-culture seeding and wild plant of *Dendrobium huoshanense* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2014,**37**(6): 953-956.

[13] 朱泳妍,黄浩集,刘睿轩,等. 长春花生物碱载药纳米粒的制备及评价[J]. 中华中医药杂志, 2018, **33**(5): 2 041-2 046.
ZHU Y Y, HUANG H J, LIU R X, *et al.* Preparation and evaluation of Changchun flower alkaloid drug loaded nanoparticles [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2018, **33**(5): 2 041-2 046.

[14] 诸 燕,张爱莲,何伯伟,等. 铁皮石斛总生物碱含量变异规律[J]. 中国中药杂志, 2010, **35**(18): 2 388-2 391.
ZHU Y, ZHANG A L, HE B W, *et al.* Variation of total alkaloid content in *Dendrobium officinale* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, **35**(18): 2 388-2 391.

[15] 简永兴,董道竹,杨 磊,等. 种植海拔对烤烟生物碱组成的影响[J]. 烟草科技, 2006,(11): 27-31.
JIAN Y X, DONG D Z, YANG L, *et al.* Effects of altitude on alkaloid composition in flue-cured tobacco [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2006,(11): 27-31.