

阶段,一定部位的突起呈新月形,并且由于进一步的顶端生长和边缘生长,结果最后包住茎尖(图 3-6)。在苗端的下面可见纵行排列的初生分生组织,初生分生组织一般由长方形细胞组成,2~3行纵向排列,染色很深;初生分生组织以向顶的形式进行分化(图 3-6)。

叶基具鞘的植物顶端分生组织最初在局部地方有细胞分裂,再想侧面扩张,结果形成了半月形的原基,这种原基不呈背腹对称,而是在开始发生的地方最厚,两侧逐渐变细。原基开始垂直地生长,细胞分裂也进一步围绕着顶端扩张,因而促使向上形成一圈组织包围茎端,它比起原来的生长地点稍短。这种包围生长的一个结果是顶端叶原基的中央纵切面也经过顶端相对一侧的叶鞘^[3](图 3-5)。叶鞘的发育不同于叶片,它的生长主要是通过边缘分生组织的活动及它所衍生出来的细胞的长大。叶片的分化比叶鞘早,因此,叶的分生组织的活动越来越受到叶鞘基部的限制^[2]。

3 讨论

当植物生长到生殖阶段时,营养顶端会全部或部分变成生殖顶端。当生殖阶段开始时,最容易看到的是体轴的突然迅速生长,伸长的轴上会产生单个花或一花序^[1]。湖北麦冬在生殖阶段会长出花葶,花葶上着生由许多小穗状花序组成复穗状总状花序。开花后期,湖北麦冬的小穗状花序顶端上会长出叶芽,这些叶芽与花簇生于苞片叶腋内。

在自然界中,有一些植物亦有类似湖北麦冬植株上长出小植株的现象,但其发生部位不同。如叶状沼兰 *Malaxis paludosa* 的顶部,经过细胞分裂活动,可以产生许多胚状结构,这种结构叫胚状体,胚状体可萌发,形成小植株^[4]。甘薯、蒲公英、榆、刺槐等在根上发芽^[5],这些根芽常常像侧根那样内生的起源(侧根原基一般在中柱鞘形成,有些植物的内皮层也参加了它们的形成)^[3],这种根芽是由于侧根偶然接近土壤表面,受光的影响控制,发育成芽^[6]。水稻、小麦在结果时,如遇上适宜的条件,胚直接萌发出小植株。根据解剖学观察结果可知,湖北麦冬开花后长出小芽并非由表层薄壁细胞组织恢复分生能力发育而来,而是由于营养顶端部分分化成生殖顶端。在生殖阶段初期,花的生长发育占优势,使得未分化的营养顶端的生长发育受到抑制,到花期后期时,这种抑制被解除,此时,未分化的营养顶端继续生长发育成小芽。

参考文献

- 1 李正理,等著.植物解剖学.北京:高等教育出版社,1986 293
- 2 A. FAAN 著.吴树明,等译.植物解剖学.天津:南开大学出版社,1990 239
- 3 E. G. 卡特著.李正理译.植物解剖学试验和解说.北京:科学出版社,1976 134
- 4 胡适宜著.被子植物胚胎学.北京:高等教育出版社,1987 236
- 5 陆明万,等著.植物学(上册).北京:高等教育出版社,1993 107
- 6 K. 伊稍著.李正理译.种子植物解剖学(第二版).上海:上海科学技术出版社,1982 168

(2000-02-25收稿)

RAPD法结合 TLC鉴别中药牛蒡子及其混淆品[△]

辽宁中医学院中药系(沈阳 110032) 徐朝晖* 涂 为 杨松松 康廷国

摘 要 对中药牛蒡子 *Arctium lappa* L.及其 5种常见混淆品——毛头牛蒡 *Arctium tomentosum* Mill.、大翅蓟 *Onopordum acanthium* L.、水飞蓟 *Silybum marianum* Gaertn.、云木香 *Aucklandia lappa* Decne. 和紫穗槐 *Amorpha fruticosa* L. 的果实进行了 TLC法和 RAPD法鉴别。以 TLC法鉴别出其中的大翅蓟、水飞蓟和紫穗槐,余者以 RAPD法作出鉴别,并对 PCR技术和 TLC法在中药鉴定中的应用进行了初步探讨。

关键词 牛蒡子 RAPD PCR TLC 中药鉴定

Identification of the Chinese Drug Great Burdock (*Arctium lappa*) Seed and Its Substitutes by RAPD and TLC

Department of Chinese Materia Medica, Liaoning College of TCM (Shenyang 110032) Xu Zhaohui, Tu Wei, Yang Songsong and Kang Tingguo

* Address Xu Zhaohui, Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang

徐朝晖 男,1992年毕业于安徽中医学院中药系,获药理学学士学位。1997年于中国医学科学院药用植物研究所获生药学硕士学位。现在辽宁中医学院攻读生药学博士学位。主要研究方向为中药新药的研究与开发,现正从事国家“九·五”科技攻关课题“中药牛蒡子质量标准规范化”的研究工作。已在《中草药》、《Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences》等杂志发表论文数篇。

[△]国家“九·五”科技攻关课题

Abstract The Chinese herbal drug “Niubangzi” (*Fructus Arctii*) and its five easily confusable Chinese materia medica: *Arctium tomentosum* Mill., *Onopordum acanthium* L., *Silybum marianum* Gaertn., *Aucklandia lappa* Decne. and *Amorpha fruticosa* L. were identified by RAPD fingerprinting and TLC analysis. The merits in the application of PCR and TLC to identify Chinese materia medica were discussed.

Key words *Arctium lappa* L. RAPD PCR identification of Chinese drug

牛蒡子性味辛苦寒,具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效,用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹风疹等症^[1]。目前全国各地所用的牛蒡子除《中华人民共和国药典》1995年版规定的菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实外,有的商品尚混有(或单独存在)其同属植物毛头牛蒡及同科不同属植物大翅蓟、水飞蓟、云木香甚至豆科植物紫穗槐的果实^[2,3]。毛头牛蒡虽有同牛蒡子功效一致的记载^[4],但《中华人民共和国药典》尚未收载,其余4种混淆品根本无牛蒡子的功效,以上均应严格鉴别。

我们用 RAPD 技术产生的 DNA 指纹图谱结合 TLC 法鉴定中药牛蒡子及其混淆品。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料:牛蒡子对照药材购自中国药品生物制品检定所,其余药材采集时间和地点见表1。药材标本经辽宁中医学院中药系康廷国教授鉴定,标本保存于辽宁中医学院中药标本馆。

表 1 实验材料

药材	基 源	采集地区	采集时间 (年·月)
牛蒡子	<i>Arctium lappa</i> L.	沈阳	1996-09
毛头牛蒡	<i>A. tomentosum</i> Mill.	新疆	1996-10
大翅蓟	<i>Onopordum acanthium</i> L.	新疆	1996-10
水飞蓟	<i>Silybum marianum</i> Gaertn.	北京	1996-09
云木香	<i>Aucklandia lappa</i> Decne.	昆明	1996-10
紫穗槐	<i>Amorpha fruticosa</i> L.	辽宁本溪	1995-09

1.2 试剂和仪器

1.2.1 TLC 用试剂和仪器:微量点样毛细管(日本岛津公司),超声波清洗仪(CQ-250型,上海必能信超声有限公司),硅胶 G(薄层层析用,青岛海洋化工厂),羧甲基纤维素钠,牛蒡子苷(arctiin,购于中国药品生物制品检定所),牛蒡苷元(arctigenin),自制,从牛蒡子中分离得到,经化学及光谱法鉴定了结构,薄层层析为单一斑点),其它试剂均为国产分析纯。

1.2.2 RAPD 用试剂和仪器:1)试剂:Tris、dNTPs、Buffer、Tag 酶、β-巯基乙醇、引物、BSA、琼脂糖、SDS、100bp DNA ladder 购自上海生工生物工程有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

2)仪器:PCR 仪(PTC-100™ Programmable

Thermal Controller, M J Research, Inc, USA),电泳仪(DYY III 8B型,北京六一仪器厂),紫外可见分光光度计(UV 755B,上海分析仪器总厂),台式高速离心机(TGL-16G,上海医用分析仪器厂),紫外反射透射仪(WFH-201型,上海分析仪器总厂)。

2 方法

2.1 TLC 法

2.1.1 供试品溶液的制备:取中药牛蒡子及其对照药材和5种混淆品干燥粉碎,过40目筛,取粉末1g(精密称定)置50 mL具塞三角瓶中,加入乙醚40 mL,水浴加热回流4 h,过滤并挥去生药残留乙醚,精确加入甲醇25 mL,密塞,超声振荡20 min,放置24 h。牛蒡子苷和牛蒡苷元分别用甲醇溶解,制成1 mg/mL的溶液。

2.1.2 薄层鉴别:将各样品甲醇浸出液减压蒸馏浓缩,浓缩液定量转移至5 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,摇匀。精密吸取各样品溶液6 μL,点于以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G薄层板上,以氯仿-甲醇(10:1)为展开剂,展开距离15 cm,取出,晾干,置碘缸中显色。

2.2 RAPD 法

2.2.1 总基因组 DNA 的提取与纯化:根据王培训^[5]等的植物总 DNA 提取法加以改进,取0.2 g各实验药材样品于乳钵中用液氮冷却研碎成细粉,放入1 mL Ep 管中,加入400 μL 56℃提取缓冲液(100 mmol/L NaOAc, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 2.5% PVP, 3% SDS, 1%β-巯基乙醇, pH 5.5),于56℃水浴30 min后,10 000 r/min离心10 min,取上清液加入2/3体积的 KOAc 溶液(2.5 mol/L, pH 4.8),于4℃放置15 min后,10 000 r/min离心10 min,吸上清液移入另一支1 mL EP管中,加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提,混匀后,10 000 r/min离心10 min,吸取上清液,重复用氯仿-异戊醇(24:1)抽提2次,上清液加入2倍体积无水乙醇混匀后于-20℃冰箱中静置20 min,10 000 r/min离心10 min后所得 DNA 沉淀用70%乙醇洗2次,空气干燥后溶于无菌重蒸馏水中,在4℃保存备用。

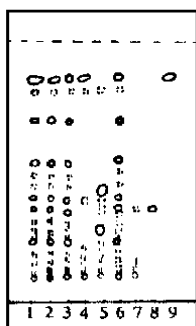
2.2.2 RAPD扩增反应: 反应总体积为 $25\mu\text{L}$, 其成分为: $10\times$ Buffer W / Mg^{2+} 加 $2.5\mu\text{L}$ $200\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.5g/L BSA, 2U TaqDNA聚合酶, 20ng 引物, 26ng 模板。扩增程序为: 94°C , 1min ; 36°C , 35s ; 72°C , 70s ; 2个循环。随后 94°C , 10s ; 36°C , 35s ; 72°C , 70s ; 42个循环。最后 72°C 保温 5min 。

2.2.3 扩增产物检测: 取 RAPD反应液 $10\mu\text{L}$ 于 1% 琼脂糖凝胶上用 $10\times$ TBE电泳缓冲液 (0.045mol/L Tris-硼酸, 0.001mol/L EDTA, $\text{pH}8.0$) 电泳, 经 EB染色, 在紫外透射反射仪下观察并照相, 扩增产物长度与 100bp DNA ladder 标记物比较。

3 结果与讨论

3.1 TLC法鉴定结果: 如图 1所示, 大翅蓟、水飞蓟、紫穗槐与对照药材的 TLC显色斑点差异明显, 但云木香、毛头牛蒡、牛蒡子与对照药材的 TLC显色斑点基本一致, 不能有效区分。

3.2 RAPD鉴定结果: 对 20个引物进行扩增实验, 结果 4个引物扩增出 DNA条带, 其中, 引物 Sl_{367} ($5'-\text{CACGAGTCTC}-3'$) 重现性稳定, 如图 2所示牛蒡子商品药材与对照药材扩增出完全相同的 4条带, 分别在 $500, 700, 900, 1000\text{bp}$ 而云木香和毛头牛蒡的扩增条带则与它们差异显著。与对照药材相比, 云木香缺少 1000bp 的条带, 多出一条 600bp 的条带。毛头牛蒡缺少 900bp 的条带, 多出一条 1100bp 的条带。4者用 RAPD法得到了很好的鉴别。



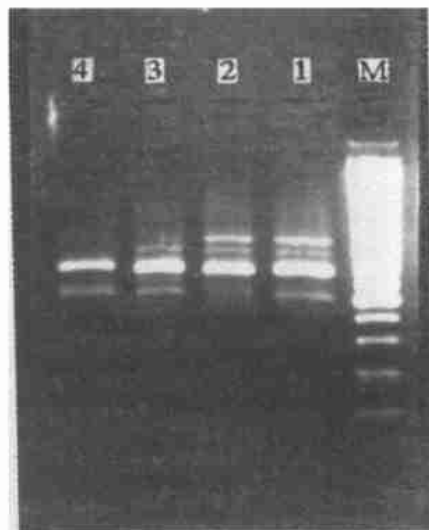
1对照药材 2牛蒡子 3毛头牛蒡 4-大翅蓟 5水飞蓟 6云木香 7紫穗槐 8牛蒡子苷 9牛蒡子苷元

图 1 牛蒡子及其混淆品的 TLC图

3.3 讨论

3.3.1 现代的中药鉴定有植物基源鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定, 其中 TLC法以其操作简便、灵敏度高、成本低的特点在中药的定性鉴别和质量控制方面得到广泛应用。《中华人民共和国药典》(1995年版) 一部收载中药材、中药成方共 920种, 采用 TLC作为鉴别项目的有 417种, 但在用于同属植物的种间鉴别或某些化学成分近似的植物间鉴别时, TLC法常不能得到满意的结果。

随着 80年代中期分子生物学技术 PCR的建立与发展, 尤其是 90年代初 RAPD及 AP-PCR技术的建立, PCR技术在生物亲缘关系的研究领域得到了广泛应用。目前, 已用 RAPD或 AP-PCR技术成



1对照药材 2牛蒡子 3云木香 4毛头牛蒡 M-100 bp DNA ladder

图 2 牛蒡子及其混淆品的 RAPD指纹图谱

功鉴定了中药材人参和西洋参^[6,7]、甘草^[8]、龟板和鳖甲^[9]、苦地胆^[10]、蒲公英^[11]及蛇类药材^[12]等, 虽然存在着试剂昂贵, 对操作者和仪器设备要求高等不利推广的因素, 但由于 PCR扩增的模板 DNA作为遗传信息的载体, 不受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响, 具有较高的化学稳定性, 且 PCR技术本身具有高速、高效和高特异性, 因此在现阶段可作为中药常规鉴定方法的补充。

3.3.2 用何方法及从什么样的中药材中能提取出合乎 PCR扩增反应要求的基因组总 DNA, 是 PCR技术在推广应用面临的两个关键问题。我们在进行基因组总 DNA的提取过程中, 分别用① SDS法、② CTAB法和③ 高盐、低 pH法提取中药牛蒡子样品^[13], 将提取的总 DNA溶液稀释后用紫外可见分光光度计测定 A_{260} 及 A_{280} 值, DNA纯度按 A_{260}/A_{280} 之比值判断, 结果分别为① 1.12, ② 1.13, ③ 1.53。且方法③ 快捷、经济、易于推广, 故本实验采用方法③ 提取样品总 DNA。实验结果说明方法③ 在同类药材提取总 DNA时, 可作为首选。

实验所用药材均为干药材, 但均从中提得纯度符合 PCR扩增要求的 DNA, 各样品的总 DNA纯度测定结果: 对照药材纯度为 1.87, 牛蒡子为 1.53, 毛头牛蒡 1.29, 云木香 1.31^[13]。

致谢: 本实验得到辽宁省农业生物技术重点实验室吴元华教授、李浩戈老师的大力协助。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典. 一部. 广州: 广东科技出版社, 1995. 57

- 2 Kang T G, *et al.* Natural Med, 1999, 53(4): 206
- 3 中国药品生物制品检定所. 中国中药材真伪鉴别图典(3). 广州: 广东科技出版社, 1997 46
- 4 中国药材公司. 中国中药资源志要. 北京: 科学出版社, 1994 1247
- 5 王培训, 等. 中药新药与临床药理, 1999, 10(1): 18
- 6 Shaw P C, *et al.* Planta Med, 1995, 61(5): 466
- 7 Ozeki Y, *et al.* Natural Med, 1996, 50(1): 24
- 8 Yamazaki M, *et al.* Natural Med, 1995, 49(4): 488
- 9 王亚明, 等. 药学报, 1996, 31(6): 472
- 10 曹 晖, 等. 中药材, 1996, 19(12): 608
- 11 曹 晖, 等. 中国中药杂志, 1997, 22(4): (9)
- 12 王义权, 等. 药学报, 1997, 32(5): 384
- 13 王培训, 等. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 112

(1999-11-10收稿)

用 RAPD 技术评估苍术居群间的亲缘关系

江苏省·中国科学院植物研究所 (南京 210014) 任冰如* 贺善安 於 虹 朱晓琴
江苏省植物迁地保护重点实验室

摘 要 用 RAPD 方法分析了苍术不同居群间的亲缘关系。选取 10 个 10 碱基的随机引物对苍术的 10 个居群共 83 个个体进行扩增, 获得 100 个 DNA 片段。用 RAPD distance 软件计算了不同居群间的 Jaccard 遗传距离, 得距离矩阵, 分别用单联法、全联法、类平均法作聚类图, 结果表明, 该 10 个居群可划分为 3 个类群: 即类群 1, 大别山类群 (Ta); 类群 2, 南苍术类群 (Wu Lu Hu Xu Ca Li); 类群 3, 北苍术类群 (Ti Da Lao)。在这 3 个类群中, 南、北苍术之间的遗传距离相对较近, 大别山类群与南、北苍术之间的距离则较远。根据本试验的结果及前人关于苍术精油成分差异的聚类结果, 作者认为大别山类群比较特殊。

关键词 苍术 RAPD 居群

Evaluating the Relationships Between Populations of Swordlike *Atractylodes* (*Atractylodes lancea*) by Random Amplified Polymorphic DNA Technology

The Provincial Key laboratory for Plant Ex Situ Conservation of Jiangsu, Chinese Academy of Sciences (Nanjing 210014) Ren Bingru, He Shan'an, Yu Hong and Zhu Xiaojin

Abstract The relationships between the populations of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. were analyzed with the method of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Choosing 10 primers of 10-base oligonucleotide to amplify the DNA of *A. lancea* which have 10 populations and contain 83 individuals, 100 fragments were obtained. Using RAPD distance software, the Jaccard's distance was calculated and listed in the form of distance's matrix, and from which the dendrograms were drawn using the methods of nearest neighbor clustering, furthestmost neighbor clustering and UPGMA separately. The results showed that the 10 populations could be divided into 3 clusters, namely cluster 1 [Dabieshan (Ta)], cluster 2 [South *A. lancea* (Wu, Lu, Hu, Xu, Ca, Li)] and cluster 3 [North *A. lancea* (Ti, Da, Lao)]. Furthermore, among the three clusters the distance between cluster 2 and cluster 3 was obviously nearer than the distance between cluster 2 and cluster 1 or the distance between cluster 3 and cluster 1. According to this result and that reported elsewhere by other workers concerning the essential oil components, it was suggested that cluster 1 should be listed alone from the south *A. lancea*.

Key words *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. RAPD population relationship

苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 和北苍术 *A. chinensis* (DC.) Koidz. 的根茎^[1]。茅苍术产于江苏、浙江、安徽、江西、湖北、山东, 由于生长在分布区的南部, 故又称为南苍术; 北苍术产于东北、华北及山东、河南、陕西。南北苍术主要是根据其根茎、叶、花等外部形态及根茎的解剖结构存在

的差异而划分的。但在分类学上, 关于南北苍术的等级划分, 意见并不一致, 刘慎谔^[2]把北苍术定为种; 石铸^[3]把北苍术并入南苍术 *A. lancea*; 傅舜谟^[4]则把北苍术定为南苍术 *A. lancea* 的变种 *A. lancea* var. *chinensis* (Bunge) Koidz.

武田^[5]等根据苍术根茎中精油的 6 种主要成分

* Address: Ren Bingru, The Provincial Key Laboratory for Plant Ex Situ Conservation, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing

任冰如, 女, 1991 年毕业于南京农业大学植物生理生化专业, 获硕士学位, 现为江苏省·中国科学院植物研究所助理研究员, 主要从事植物资源的研究与利用。