

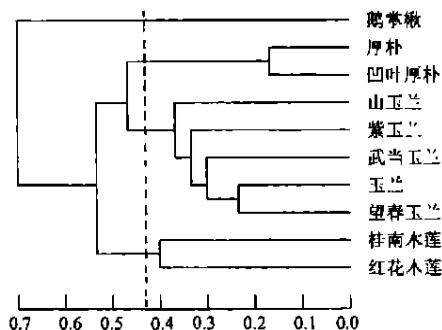


图 2根据 AP-PCR 数据,使用 1-*F* 距离系数 UPGMA 法聚类分析产生的树状图

本实验使用的 AP-PCR 技术对厚朴及其伪、混品所进行的鉴定具有快速准确、直观方便等特点。厚朴 *Magnolia officinalis* 凹叶厚朴 *M. biloba* 与其余 8 个样品之间存在着明显的 DNA 指纹差异 (图 1)。利用这些差异可以帮助直接鉴别厚朴、凹叶厚朴及其伪品、混清品。

聚类分析结果 (图 2) 显示,所研究的 10 种植物被为分 4 类: (1) 鹅掌楸单独组成一支; (2) 厚朴与凹叶厚朴归为一类; (3) 玉兰、望春玉兰、武当玉兰、紫玉兰和山玉兰等 5 种植物聚合为一类; (4) 桂南木莲和红花木莲构成一类。此结果同经典的系统分类较为吻合。鹅掌楸属木兰科鹅掌楸属 (*Liriodendron* L.), 是古老的子遗植物,在该科中地位特殊。本研究也提示它同木兰科的其余植物亲缘关系较远。厚朴与凹叶厚朴之间的关系非常密切,相似度

指数 *F* 值达 0.81,它们同属木兰属 (*Magnolia* L.) 木兰亚属 (Subgen *Magnolia*) 的皱皮木兰组。玉兰、望春玉兰、武当玉兰及紫玉兰都是木兰属中玉兰亚属 (Subgen *Pleurochasma*) 的成员。传统分类将山玉兰归在木兰亚属, AP-PCR 分析也显示山玉兰与厚朴的 *F* 值为 0.59,在所研究的玉兰类植物中同厚朴的相似性最大。桂南木莲和红花木莲隶属于木兰科另一属木莲属 (*Manglietia* Bl.)。

分子生物学研究表明,通过 DNA 分子遗传标记技术所揭示植物的亲缘关系越近,它们所含化学成分也越相似^[3]。事实上,山玉兰中厚朴酚和厚朴酚的总量大于 0.1%,较除厚朴、凹叶厚朴外的其余样品都高 1 倍以上^[3],说明在一定地区将山玉兰 (野厚朴) 入药是有根据的。但是,桂南木莲、红花木莲经测定其厚朴酚和厚朴酚含量极低,而木兰箭毒含量较高,不宜作厚朴入药^[4]。本实验中二者与厚朴的 1-*F* 值分别为 0.50 和 0.49,仅低于鹅掌楸 (0.60),也在一定程度上映证了这一观点。

参考文献:

- [1] 周子静. 商品厚朴中几种混用品的原植物调查及其生药的鉴定研究 [J]. 药学通报, 1964, 10: 261-269.
- [2] Welsh J, McClenlland M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18 (24): 7213-7218.
- [3] 陈林娇,陈月琴,屈良鸽,等. 中药溪黄草及其药用近缘种的 RAPD 分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38 (1): 102-106.
- [4] 许春泉,曹立稳,向飞军. 厚朴混清品——4 种木莲属植物树皮的生药学鉴定 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19 (10): 597-583.

浙江省天南星族药用植物块茎的蛋白质电泳分析

孙红祥*

(浙江大学华家池校区动物科学学院,浙江 杭州 310029)

摘要: 目的 探讨天南星族药用植物间生理生化特征的相关性和差异性,分析它们的亲缘关系,为其分类鉴定提供科学依据。方法 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对天南星族植物 11 种 5 变种 1 变型共 29 个样品进行蛋白质电泳分析,从电泳谱中取 49 个数量化特征,以单链法对这类植物进行聚类分析。结果 同种植物的蛋白质电泳谱较相似,而不同种植物之间有明显差异。结论 (1) 此类植物的蛋白质电泳谱具有一定的稳定性和可靠性, (2) 蛋白质电泳分析结果与传统经典分类结果基本吻合, (3) 长管半夏 *Pinellia longitubulosa* 应建立新种;粉背盾叶半夏 *P. peltata* var. *chunanensis* 和绛斑湘南星 *Arisaema hunanense* var. *ningpoense* 宜成立新变种;全缘灯台莲 *Arisaema sikokianum*, 灯台莲 *A. sikokianum* var. *serratum* 及七叶灯台莲 *A. sikokianum* var. *henryanu* 3 变种应予归并。

关键词: 天南星族;药用植物;新鲜块茎;蛋白质电泳;聚类分析

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)06-0548-04

Protein electrophoresis analysis in medicinal plant tubers of tribe Araceae in Zhejiang Province

SUN Hong-xiang

(College of Animal Sciences, Huajiachi Campus, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310029, China)

Abstract **Object** To discuss the correlation and difference of physiological and biochemical characteristic among the plants of the tribe Araceae in genotypes, to provide scientific evidences for the classification and identification of their consanguinity. **Methods** Protein electrophoresis analysis in the fresh tuber of 29 samples from 11 species, 5 varieties, 1 new form of the tribe Araceae in Zhejiang Province was done by polyacrylamide gel electrophoresis. Based on the 49 numerical characters obtained from their electrophoretograms, cluster analysis of the plant was carried out in single linkage method. **Results** The electrophoretograms of the same species were quite similar, but those of the different species were clearly distinct from each other. **Conclusion** 1. The protein electrophoretograms of these plants exhibited certain reliability and stability. 2. The results of protein analysis were accordance with those from the classical taxonomy on the whole. 3. *Pinellia longitubulosa* H. X. Sun should be established as a new species. *P. peltata* Pei var. *chunarensis* H. X. Sun and *Arisaema hunanense* Hand. -Mazz. var. *ningpoense* H. X. Sun should be considered as new varieties, respectively, their electrophoretograms were obviously different from those of original varieties. *Arisaema sikokianum* Franch. et Sav., *A. sikokianum* Franch. et Sav. var. *serratum* Makino H. Li should not be kept as independent varieties, which should be incorporated with *A. sikokianum* var. *henryanu*.

Key words tribe Araceae; medicinal plants; fresh tuber; protein electrophoresis analysis; cluster analysis

天南星族 (Araceae) 是天南星科 (Araceae) 中最具药用价值的一类植物,其中天南星、半夏和虎掌是传统的燥湿化痰中药,在我国应用已有两千多年的历史。现代研究表明此类植物具有抗肿瘤、抗生育和抗心律失常等药理作用,并普遍含有外源性凝集素,因而引起国内外学者的普遍重视。天南星族包括 5 个亚族、14 个属、300 余种植物,我国分布 4 个亚族、6 个属、110 多种^[1,2],浙江省有 3 属、12 种、1 变种^[3,4]。我们经 2 年多的广泛调查和野外采集,确认我省该族植物有 3 属、14 种、4 变种、3 变型(包括 1 新种、3 新变种、1 新变型、1 新等级、3 新记录、1 栽培种)均作药用^[5~7]。本文试图通过对浙江省天南星族植物新鲜块茎进行蛋白质电泳分析,以探讨该族植物种间生理生化特征的相关性和差异性,分析各植物之间的亲缘关系,为此类植物的分类鉴别提供依据。

1 实验材料

实验材料均系作者采集所得并经鉴定,材料来源见表 1。分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液、单体交联剂、电极缓冲液、样品稀释液、考马斯亮蓝染色液及 10% 过硫酸铵溶液,均按文献^[8,9]配制。

2 方法

2.1 样品液制备:取健康无病的新鲜块茎除去外皮,称取 2 g 于 4℃ 冰箱中冷藏固定,加 5 mL 冰水

研磨制成匀浆,在 4℃ 以下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2 mL 加样品稀释液 1 mL 混匀,置冰箱中备用。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶浓度及加样量条件摸索:按表 2 分别配制凝胶浓度为 6%、7.5%、10% 和 13.5% 的分离胶溶液,立即灌制分离胶板,用注射器轻轻注水封顶,待凝胶面与水层间出现明显界面时,用滤纸吸去上层水,速加入按表 2 配制的浓缩胶液,至浓缩胶凝聚完毕,用微量加样器分别加样品液 25、50、75 μ L,然后立即电泳,调节电流为 1 毫安/份,待示踪剂溴酚蓝进入分离胶后,将电流调至 3 毫安/份,当示踪剂行至距凝胶板下端 1 cm 处停止电泳,立即取出置考马斯亮蓝染色液中染色。

结果表明:蛋白质电泳分析的分离胶凝胶浓度为 7.5% 的分离效果最理想;加样量以 50 μ L 最合适。

2.3 样品蛋白质电泳分析:29 个样品按上述摸索确定的条件进行电泳。结果见图 1。

2.4 聚类分析

2.4.1 数量化特征的提取:参考文献^[10~12]方法从蛋白质电泳谱中提取数量化特征,共计 49 个。

2.4.2 样品间相似性的度量:选用适于二元数据的联合系数 S_{rr} 作为相似性的度量指标^[13]。

$$S_{rr} = \frac{a}{a + b + c + d}$$

表 1 实验材料来源

序 号	原植物学名	产 地	备 注
1	鞭檐犁头尖 <i>Typhonium flagelliforme</i>	缙云互镇	
2	滴水珠 <i>Pinellia cordata</i>	安吉龙王山	
3	盾叶半夏 <i>P. peltata</i>	乐清雁荡山	
4	粉背盾叶半夏 <i>P. peltata</i> var. <i>chunanensis</i>	浙江医科大学百草园	
5	半夏 <i>P. ternata</i>	杭州九溪	
6	半夏	东阳东白山	
7	半夏	龙泉风阳山	
8	长管半夏 <i>P. longitubulosa</i>	安吉龙王山	
9	掌叶半夏 <i>P. pedatisecta</i>	金华北山	
10	天南星 <i>Arisaema heterophyllum</i>	普陀大兴水	♂
11	天南星	普陀桃花岛	♂
12	湘南星 <i>A. hunanense</i>	宁波天童寺	♂
13	绛斑湘南星 <i>A. hunanense</i> var. <i>ningboense</i>	宁波天童寺	♂
14	云台南星 <i>A. du-bois-reymondiae</i>	安吉龙王山	♂
15	云台南星	安吉龙王山	♀
16	一把伞南星 <i>A. erubescens</i>	临安天目山	♂, 叶片 1枚
17	一把伞南星	临安天目山	♀, 叶片 1枚
18	一把伞南星	东阳东白山	♂, 叶片 1枚
19	一把伞南星	东阳东白山	♀, 叶片 2枚
20	一把伞南星	安吉龙王山	♂, 叶片 1枚
21	紫序一把伞南星 <i>A. erubescens</i> f. <i>dongyangense</i>	东阳东白山	♀, 叶片 1枚
22	一把伞南星	东阳东白山	♂, 叶片 1枚
23	灯台莲 <i>A. sikokianum</i> var. <i>serratum</i>	德清莫干山	♀, 叶片 2枚
24	灯台莲	临安天目山	♀, 叶片 2枚
25	灯台莲	安吉龙王山	♂, 叶片 1枚
26	全缘灯台莲 <i>A. sikokianum</i> var. <i>sikokianum</i>	临安天目山	♀, 叶片 2枚
27	白苞灯台莲 <i>A. sikokianum</i> var. <i>albescens</i>	德清莫干山	♂, 叶片 1枚
28	七叶灯台莲 <i>A. sikokianum</i> var. <i>henryanum</i>	东阳东白山	♂, 叶片 2枚
29	七叶灯台莲	临安天目山	♀, 叶片 1枚

表 2 分离胶和浓缩胶溶液的制备

试 剂	分离胶				浓缩胶
浓缩胶缓冲液 (mL)	—	—	—	—	1. 20
分离胶缓冲液 (mL)	2. 00	2. 50	3. 33	5. 00	—
单体交联剂 (mL)	4. 00	5. 00	6. 67	9. 00	0. 70
蒸馏水 (mL)	13. 8	12. 3	9. 80	5. 80	2. 50
10% 过硫酸铵溶液 (mL)	0. 15	0. 15	0. 15	0. 15	0. 15
TEMED(mL)	0. 05	0. 05	0. 05	0. 05	0. 05
胶浓度 (%)	6. 0	7. 5	10. 0	13. 5	4. 6

式中 $S_{ij} \leq 1$ 表征 2 个分类单位 (OTUs) 的相似程度; a 表示 2 个 OTUs 的状态均为 1 的性状个数; b 和 c 表示 2 个 OTUs 的状态分别 0 和 1 时的性状个数; d 表示 2 个 OTUs 的状态都为 0 的性状个数。

2. 4. 3 聚类分析: 建立联合系数矩阵后, 用单链法 (Single linkage method) 进行系统聚类分析, 树系图见图 2 并借助结合线的分析确定等级划分线 L。

3 结果

3. 1 蛋白质电泳结果: 由图 1 可见, 29 个样品的电泳谱带均较多, 直观分析较难发现各样品间的相似程度。因此, 我们应用系统聚类方法进一步分析。

3. 2 聚类分析结果: 图 2 所示, 划分线 L 将 29 个样品分为二大类: I : 1; II : 2~ 29; 即犁头尖属鞭檐犁头尖孤立成一类; 其余 28 个样品聚为一类。根据

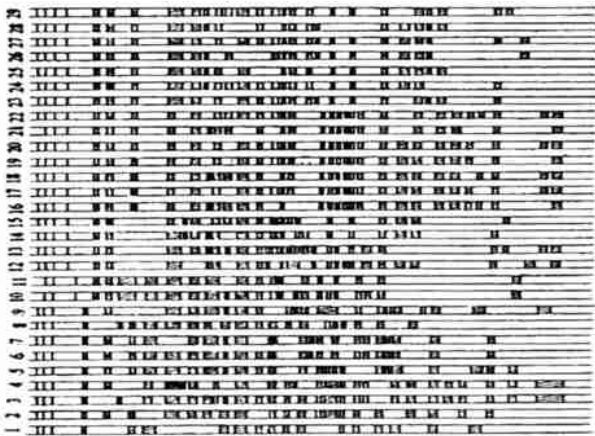


图 1 天南星族植物块茎蛋白质电泳谱图

划分线 L₂, 样品 2~ 29 被分为三类: I : 2~ 9; II : 10, 11; III: 12~ 29, 即半夏属植物样品为一类; 天南星 2 个样品聚成一类; 天南星属植物其余 18 个样品聚为一类。样品 12~ 29 被划分线 L₃ 进一步分成二类: I : 14, 15, 23~ 29; II : 12, 13, 16~ 22; 前一类包括天南星组 (Sect. *Arisaema*) 植物的所有样品; 最后一类为湘南星和一把伞南星样品。

4 讨论

4. 1 同一种植物的蛋白质电泳谱相关性较好, 而不

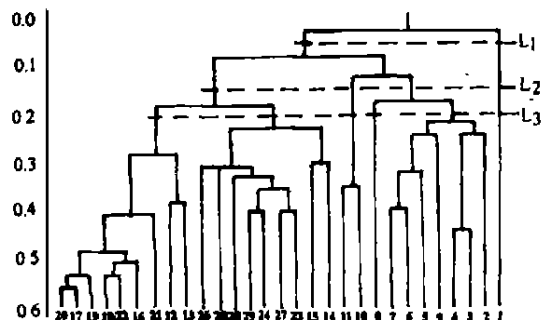


图 2 蛋白质电泳分析聚类树系图

同种植物显示出明显的差异性,这种差异大于不同产地和不同生长环境对同一种植物造成的电泳谱变异。表明了这些植物的蛋白质分析具有一定的稳定性和可靠性

4.2 本实验聚类分析结果与此类植物的传统经典分类结果以及同工酶分析结果基本一致。唯天南星的归类存在歧异。在图 2 中,天南星样品 10, 11 与半夏属植物样品先聚合,呈较好的相关性。天南星肉穗花序多雌雄同株,且附属器鼠尾状,与半夏属植物肉穗花序特征较相似;花粉粒形态学研究结果也表明其特征更相似于半夏属植物,而与天南星属其它植物有明显的区别^[14-16]。天南星是否可能为半夏属和天南星属之间的过渡类型值得研究

4.3 长管半夏 *P. longitubulosa* H. X. Sun 粉背盾叶半夏 *P. peltata* Pei var. *chunanensis* H. X. Sun 和绛斑湘南星 *A. hunanense* Hand. -Mazz. var. *ningpoense* H. X. Sun, 系我们在对浙江省天南星族药用资源调查和野外采集中所发现的新类群。这些类群与其亲缘种或原变种不仅植物形态和解剖学特征有一定区别^[5],而且同工酶谱也有明显差异。本实验结果也表明这些类群新鲜块茎的蛋白质电泳谱与其亲缘种或原变种有明显区别,从生理生化特征角度进一步支持它们为新类群。

4.4 灯台莲早在 1835 年 Buerg 将该种放在疆南星属 (*Arum* L.) 中,1879 年 Franchet 等在 Enum Pl Jap 中将其归入天南星属 (*Arisaema* Mart.)。在此后在一百多年中,该种植物误订学名达 5 个。这主要是由于本种植物性状不稳定、变异较大之故。该种植物叶 2 枚,鸟足状 5 裂或 7 裂,裂片全缘或具锯齿。《中国植物志》等根据裂片数和叶缘特征分为 3 个变种:裂片 5 全缘者为全缘灯台莲 *Arisaema sikokianum* Franch. et Sav.;裂片 5,具不规则的粗锯齿至细的啮状锯齿的种群为灯台莲 *A. sikokianum* Franch. et Sav. var. *serratum* (Maki-

no) Hand. -Mazz.;而裂片 7,边缘具粗锯齿或细牙齿者订为七叶灯台莲 *A. sikokianum* Franch. et Sav. var. *henryanum* (Engl.) H. Li。我们在调查和野外采集中,发现此种植物的叶枚数、叶裂片的数目、形状、大小和叶缘状态均变异较大,叶 1~2,裂片 3, 5, 7, 许多植株 2 枚叶的分裂情况也不同,裂片数分别为 3 和 5 或 5 和 7,裂片卵形、卵状长圆形或长圆形,有时侧裂片明显耳状,边缘有的仅中上部具细锯齿,鸟足状 7 裂叶有的全缘,裂片大小相差 4~5 倍,很难划清这些变种间的界限。由此可见,裂片数和叶缘形状在本种植物似乎处于变异中,尚未分化到足以成为划分变种依据的程度。我们观察和比较了这 3 变种不同产地的新鲜标本叶的显微特征,发现它们的显微特征变异也较大,但各变种间无明显区别^[5]。Hiroyoshi 等对灯台莲花粉粒扫描电镜观察结果表明:其原种和变种间的花粉粒形态特征无区别^[18]。同工酶分析以及本实验结果表明:叶枚数、裂片数、叶缘形状和雌雄状态对该种植物的同工酶谱和蛋白质电泳谱影响均不大,这种差异小于产地对其造成的图谱变异。因此,我们认为该种上述 3 个变种宜予归并。

参考文献:

- [1] 李恒. 中国植物志 [M]. 第十三卷第二分册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 李恒, 肖溶, 曾孝濂. 我国天南星科植物 [M]. 植物分类学报, 1997, 15 (2): 87.
- [3] 浙江药用植物志编写组. 浙江药用植物志 [M]. 下册. 杭州: 浙江科技出版社, 1980.
- [4] 薛祥骥, 见林泉. 浙江省植物志 [M]. 第七卷. 杭州: 浙江科技出版社, 1993.
- [5] 孙红祥, 叶益萍, 薛祥骥, 等. 浙江省天南星族药用植物叶的显微特征 [J]. 中草药, 2000, 31 (21): 933.
- [6] 孙红祥, 叶益萍, 薛祥骥, 等. 浙江省天南星族药用植物的数量分类学研究 [J]. 中药材, 2000, 23 (12): 735.
- [7] 孙红祥, 叶益萍, 薛祥骥. 浙江省天南星族药用植物新鲜块茎等电聚焦电泳分析 [J]. 中国现代应用药学, 2001, 18 (5): 281.
- [8] 《生物化学》编审小组. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
- [9] 袁晓华. 植物生理生化实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1983.
- [10] 孙红祥, 薛祥骥, 连秋荣. 聚类分析在浙江省绞股蓝分类中的应用 [J]. 现代应用药学, 1993, 12 (10): 9.
- [11] 刘晓民, 孙红祥, 曾宪武. 聚类分析在冬虫夏草化学分类中的应用 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18 (10): 585.
- [12] 漏新芬, 孙红祥. 聚类分析在姜科果实类药材化学鉴定中的应用 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19 (9): 520.
- [13] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类学的方法和程序 [M]. 武昌: 武汉大学出版社, 1990.
- [14] 李申, 李颖. 天南星属等 16 种药用植物的花粉形态比较 [J]. 上海医科大学学报, 1994, 21 (2): 191.
- [15] 黄秀兰, 吕植桢, 苏中武. 掌叶半夏、半夏和天南星的比较研究 [J]. 中药材, 1986, (3): 23.
- [16] Hiroyoshi O, Murata J, Takahashi M. Pollen morphology of the Japanese *Arisaema* Araceae [J]. Sci Rep Tohoku Univ Fourth Ser (Biol), 1983, 38 (3): 219.