

立了兰科植物无菌试管苗与内生真菌双重培养方法,使植物与有益真菌在一段时间内共同生长。实验证明,这是一个研究内生真菌与兰科植物苗之间相互作用的良好体系。

3.2 3种菌对铁皮石斛生长的作用:在实验室的双重培养条件下,3种内生真菌早期表现出对铁皮石斛有促生长作用,此时 03号菌尚未接触到石斛苗,已表现出对石斛原球茎增殖及苗的生长有明显促进作用,原因可能是菌的代谢产物对石斛有一定的作用。张集慧等^[10]从开唇兰小菇、石斛小菇和兰小菇发酵液的乙酸乙酯萃取部分中分离出了 5种植物激素,产生植物激素也是真菌促生长的机制之一。后期菌丝生长旺盛,侵入原球茎后造成原球茎死亡,促生长作用减弱,并有死苗现象,说明共生促生长是有条件和相对的。

3.3 3种菌对金线莲生长的作用:金线莲的接种材料为单株试管苗,在不接种菌时,没有侧芽和侧根萌出,接种 03或 05菌后,则明显有新侧芽和侧根萌出,我们认为与菌产生激素有关。接种菌的金线莲苗生长量均明显低于对照,原因可能是培养瓶中的营养有限,菌生长消耗了部分营养,从而影响了植株的生长。

大量研究已经证明,兰科植物与菌根真菌之间

的关系不是高度专一的,铁皮石斛和金线莲为两种不同属、不同生态型的植物,3种菌对两种植物均有促生长作用,说明它们对兰科植物的生物活性没有明显的种属专化性,对这些内生菌的利用,无疑为促进铁皮石斛及金线莲试管苗移栽成活,提供了更多的机会,也为其它兰科植物的栽培,提供了新途径。

参考文献:

- [1] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等.铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J].药学学报,1983,23(8):636-640.
- [2] 张治国,王黎,刘骅,等.铁皮石斛原球茎分化适宜培养基研究[J].中国中药杂志,1993,18(1):16-19.
- [3] 陈泽宇,江秉华,陈钢.金线莲快速繁殖研究[J].中草药,1992,23(2):108-109.
- [4] 王建勤,陈钢,林兰英.金线莲原球茎的组培诱导[J].中药材,1995,18(1):3-5.
- [5] Guo S X, Fan L, Cao W Q. *Mycena anoectochila* sp. nov. isolated from macorrhizal root of *Anoectochila roxburghii* from Xishuangbanna of China [J]. Mycologia, 1997, 89(6): 952.
- [6] Guo S X, Fan L, Cao W Q. *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus [J]. Mycosystema, 1999, 18(2): 141.
- [7] 范黎,郭顺星,肖培根,等.墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生活活性[J].真菌学报,1996,15(4):251.
- [8] 郭顺星,徐锦堂.促进石斛等兰科药用植物种子萌发的真菌分离与培养[J].中草药,1990,21(6):30.
- [9] 郭顺星,徐锦堂.真菌及其培养物提取液在细叶石斛种子萌发中的作用[J].中国中药杂志,1990,15(7):13-14.
- [10] 张集慧,王春兰,郭顺星,等.兰科药用植物的5种内生真菌产生的植物激素[J].中国医学科学院学报,1999,21(6):460-465.

厚朴的任意引物 PCR 指纹图谱分析

苏应娟¹,朱建明¹,王艇^{1*},李雪雁¹,曾庆文²,夏念和^{2*}

(1. 中山大学生命科学学院,广东 广州 510275; 2. 中国科学院华南植物研究所,广东 广州 510520)

摘要:目的 鉴别中药材厚朴、凹叶厚朴及其常见的伪品和混淆品。方法 采用任意引物 PCR (arbitrarily primed PCR, AP-PCR) 技术扩增植物基因组 DNA 样品。结果 AP-PCR 技术获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱,根据琼脂糖凝胶上显示的 DNA 带型差异可迅捷地区分厚朴、凹叶厚朴及其伪品、混淆品。结论 为应用 AP-PCR 技术在分子水平上鉴别中药材厚朴,保证引种的准确性奠定了基础。

关键词: 中药材;厚朴;AP-PCR

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0545-04

Fingerprint of arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for *Magnolia officinalis*

SU Ying-juan¹, ZHU Jian-ming¹, WANG Ting¹, LI Xue-yan¹, ZENG Qing-wen², XIA Nian-he²

(1. School of Life Sciences, Sun yat-set University, Guangzhou Guangdong 510275, China; 2. South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Guangdong 510520, China)

Abstract **Object** To identify *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. and *M. biloba* Rehd. et Wils. as well as their counterfeits and easily confusable substitutes. **Methods** Total genomic DNA samples of ten

* 收稿日期: 2001-08-06

* 通讯作者

plant species were amplified by arbitrarily primed PCR (AP-PCR). **Results** Ten samples were distinguished through their amplified DNA banding patterns on the agarose gels after electrophoresis, so as to differentiate the counterfeits and easily confusable substitutes of *M. officinalis* and *M. biloba*. **Conclusion**

AP-PCR is useful for identifying *M. officinalis* at molecular level, as well as valuable to guarantee introducing original plant correctly.

Key words Chinese medicinal materials; *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils; arbitrarily primed polymerase chain reaction AP-PCR

厚朴是我国重要的传统中药材。药用正品是厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils 和凹叶厚朴 *M. biloba* (Rehd. et Wils.) Cheng 的干皮、枝皮与根皮。由于药材长期供不应求,商品不断出现厚朴的代用品或伪品,曾报道有 6 科 30 余种植物的树皮作厚朴药用^[1]。

AP-PCR 技术是由 Welsh 领导的小组在 PCR 基础上发展起来的一项旨在获得基因组 DNA 指纹图谱的技术^[2],近年来在中药材的鉴定中得到较为广泛的应用。本文尝试使用 AP-PCR 技术对中药材厚朴的正、伪进行区分,供参考研究。

1 材料与方法

1.1 材料:本实验共采集植物样品 10 种,分别是:

1. 厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils.
 2. 凹叶厚朴 *M. biloba* (Rehd. et Wils.) Cheng
 3. 玉兰 *M. denudata* Desr.
 4. 望春玉兰 *M. biondii* Pamp.
 5. 武当玉兰 *M. sprengeri* Pamp.
 6. 紫玉兰 *M. liliflora* Desr.
 7. 山玉兰 *M. delavayi* Franch
 8. 桂南木莲 *M. chingii* Dandy
 9. 红花木莲 *M. insignis* (Wall) Bl
 10. 鹅掌楸 *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg
- 原植物皆采自中国科学院广州华南植物园,由曾庆文高级工程师鉴定,凭证标本皆存于该院。

1.2 主要试剂:提取植物基因组 DNA 用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、Tris (三羟甲基氨基甲烷)、 β -mercaptoethanol (β -巯基乙醇) 购自 SIGMA 公司;标准分子量 λ DNA/HindIII 购自美国 Promega 公司 (21 226, 7 421, 5 804, 5 634, 4 878, 3 530 bp);琼脂糖 (Agarose) 购自 Gene 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、超纯水等购自上海生工生物技术和服务公司,引物由上海生工生物技术和服务公司合成; λ DNA/EcoRI+ HindIII DNA Ladder (21 227, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 947, 831, 564, 125 bp) 购自华美 (SABC) 生物工程公司;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器:Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corporation); Ultraspec 2000 UV/Visible

Spectrophotometer (Pharmacia Biotech); TGL-16G 台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂); DK-8D 型电热恒温水槽 (上海医用恒温设备厂); PAC 3000 电泳仪 (Bio-Rad corporation); 水平电泳槽 (北京东方仪器厂)。

2 实验方法

2.1 植物 DNA 提取与纯化:从每种植物的 3 个个体中共取新鲜叶片材料 1 g,置于已经灭菌的研钵中,加液氮迅速研磨成粉末,分装于 4 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,每管加入 1 mL -20°C 预冷的丙酮,快速上下颠倒 6~7 s, 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,重复 1 次。每管加入 60°C 预热的 2% CTAB 提取液 1 mL,充分混匀, 60°C 水浴 4 h,其间每隔 0.5 h 上下翻动浮板 1 次。 0°C 预冷 500 μL 氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提 10 min, 15 000 r/min 离心 10 min,取上清,重复 1 次。取上层水相加入 2/3 体积 4°C 预冷异丙醇,轻轻混合, -20°C 静置沉淀过夜。5 000 r/min 离心 5 min,可见管底有半透明沉淀,弃上清液,取沉淀。每管加入 800 μL 70% 4°C 预冷乙醇, 0°C 冰盒中上下颠倒漂洗 20 min, 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重复 1 次。取沉淀于干净的 0.5 mL Eppendorf 管中,开管盖置干燥器中干燥 1 h。50 μL TE (pH 8.0) 溶解沉淀。

采用北京原平生物技术公司的 Glass-milk Kit 纯化 DNA。50 μL DNA 溶液中加入 3 倍体积的溶胶液,混匀。加入 10 μL 玻璃奶,混匀,室温静置 5 min 离心 8 000 r/min 数秒,吸弃上清液。加 125 μL 漂洗液,用加样器吸漂洗液将玻璃奶冲散均匀,离心弃上清液,重复 2 次。加入 TE (pH 8.0) 20 μL 混匀, 60°C 水浴 5 min,离心 15 000 r/min 数秒,回收上清,重复 1 次,可得纯化后 DNA 溶液 40 μL 。

2.2 AP-PCR 扩增:在 Gene Amp PCR System 2400 上进行扩增,反应体系总体积为 25 μL ,其中:引物 2 $\mu\text{mol/L}$,模板 DNA 1.0 ng μL , dNTPs 每种各 200 $\mu\text{mol/L}$, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 10 $\times$ buffer (10 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.3) 2.5 μL 。1.125 unit Taq DNA 聚合

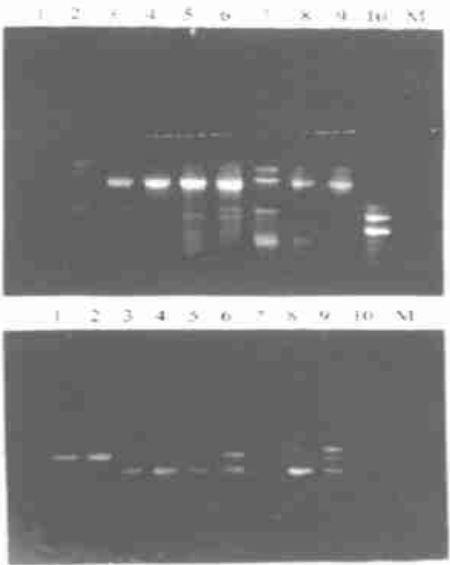
酶。 每组反应均设不含模板 DNA 的空白对照。
扩增程序为: 95℃ , 3 min 20 s 预变性, 随后进行 45 个循环: 94℃ , 1 min; X℃ , 1 min; 72℃ 1 min; 最后 72℃ , 6 min 完全延伸一个循环。 其中 X℃ 根据每一种引物的理论退火温度减低 8℃~ 12℃ , 见表 1

表 1 AP-PCR 所用引物的序列与退火温度

引物编号	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃
AP-1	CGA TTT AAA GCT GGT GT	40
AP-2	CAT GTA CCT GCA GTA GC	42
AP-3	CTT TCC ATA CTT CAC AA	40
AP-4	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT	50
AP-5	TTA CGA GCT TGC ACA CAA GC	50
AP-6	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT	50
AP-7	CCT TCA TTA CGA GCT TGC ACA	52
AP-8	CAT TTC TTC ACA TGT ACC TGC	50
AP-A	CAT CGG ATC CAC CAC GTC	46
AP-B	GCT TCT CAA GCA GGA CCT	44
AP-C	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC G AC	54
AP-D	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GAA	54
AP-E	TAC GGT GGC GGA GCG CAG CA	52
AP-F	CTG GTC AAG GCA CAA GAG AT	48
MG-1	CAT CTG CAG AAC TAG TCG GAT GGA GTA GAT	54
MG-15	ATC TGG GTT GCT AAC TCA ATG	50

2.3 PCR 扩增产物检测: PCR 扩增产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测样品扩增情况, 于 254 nm 手提紫外灯下观察并拍照 (图 1)。
2.4 数据分析: 任意 2 个样本间的相似度指数 (F), $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, 其中 N_X , N_Y 分别是样本 X 样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数, N_{XY} 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数 进一步计算出任

意 2 个样本间 $1-F$ 遗传距离系数并通过 UPGMA 法聚类, 构建树系图 (图 2)。



1-厚朴 2-凹叶厚朴 3-玉兰 4-望春玉兰 5-武当玉兰
6-紫玉兰 7-山玉兰 8-桂南木莲 9-红花木莲 10-鹅掌楸
M λ DNA /EcoRⅠ HindⅢ DNA Ladder

图 1 AP-PCR 指纹图谱

3 结果

使用 16 个上海生工公司合成的长短不一的随机寡核苷酸链引物对 10 种基因组总 DNA 样品进行任意引物 PCR 扩增, 共获得可区分的 DNA 扩增片段 657 条, 其中多态性片段 497 条, 占总数的 75.6% (表 2)

4 讨论

表 2 厚朴与其它样品 AP-PCR 扩增片段比较

引物	$N_{XY} / (N_X + N_Y)$									多态性带数 / 扩增总带数
	1vs 2	1vs 3	1vs 4	1vs 5	1vs 6	1vs 7	1vs 8	1vs 9	1vs 10	
AP-1	3/8	2/8	2/8	3/8	3/8	2/6	1/7	1/8	3/10	29/39
AP-2	3/6	3/8	2/8	3/9	4/9	2/8	4/8	4/8	2/7	29/39
AP-3	5/11	3/9	3/11	1/8	2/9	2/9	3/9	2/8	2/8	32/42
AP-4	3/9	2/9	2/9	2/9	2/9	3/10	1/9	1/10	3/10	34/44
AP-5	3/7	3/8	3/8	3/9	3/9	4/10	3/8	3/9	0/6	42/42
AP-6	2/5	1/4	1/4	1/5	1/4	1/4	1/4	1/6	0/3	23/23
AP-7	3/8	3/8	3/8	3/8	2/8	2/8	2/7	2/7	2/10	20/40
AP-8	5/12	3/10	2/8	3/12	2/12	3/9	2/10	4/13	3/11	39/49
AP-A	4/8	2/7	2/7	2/7	3/8	2/7	3/7	2/7	1/6	23/22
AP-B	3/7	2/6	2/7	2/8	2/7	3/9	2/8	2/8	2/8	30/40
AP-C	2/4	2/5	2/5	2/5	2/5	2/6	2/7	2/5	1/4	20/30
AP-D	3/7	2/8	2/7	2/6	2/8	2/5	1/6	2/9	1/7	29/39
AP-E	4/9	3/8	3/8	2/8	2/8	2/7	2/8	2/7	2/7	20/30
AP-F	5/10	3/11	3/12	3/10	3/10	3/9	3/11	3/11	2/9	33/43
MG-1	3/11	3/12	3/14	3/13	3/15	3/12	3/14	2/12	2/10	45/65
MG-15	1/2	0/3	0/4	0/5	1/5	0/4	0/4	0/4	1/4	29/29

注: (1) 表中样品编号为: 1-厚朴 2-凹叶厚朴 3-玉兰 4-望春玉兰 5-武当玉兰 6-紫玉兰 7-山玉兰 8-桂南木莲 9-红花木莲 10-鹅掌楸
(2) N_{XY} 是两样品共有扩增片段数, $N_X + N_Y$ 是两样品总扩增片段数

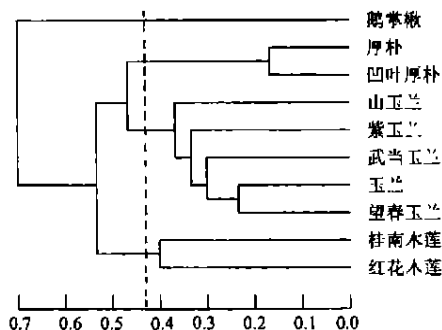


图 2根据 AP-PCR 数据,使用 1-*F* 距离系数 UPGMA 法聚类分析产生的树状图

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