

石斛属药用植物鉴定研究

徐程¹, 沈颖, 张铭*

(浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

石斛是一种常用中药,以新鲜或干燥茎入药,有益胃生津、滋阴清热之功效。不同种类石斛药用成分及含量差异较大,药理活性也不尽相同,历代本草著作中称之为医工难辨之种类。近年来,以石斛为原料开发的保健品日益走俏,对石斛的研究也方兴未艾。但目前市场上流通的商品石斛中,药典收载较少,主流品种大多为非药典收载种;植株在采集后,往往就地加工,加工后药材外形相似,形态鉴别比较困难;药材市场鱼目混珠、以次充好的现象时有发生。为确保石斛使用安全有效,有必要对石斛属药用植物进行鉴定。

1 生境及资源概况

石斛生境独特,多附生于悬崖峭壁和高大的乔木上,生长缓慢,对小气候环境要求十分严格,尤其是对湿度的要求较高,分布地域狭窄,资源稀少。由于野生资源紧缺,野外能采集到的石斛均被收购作药用,不但使野生资源遭到毁灭性的破坏,而且造成商品石斛的来源十分复杂。

石斛属(*Dendrobium* Sw.)是兰科第二大属,约 1 500 多种,主要分布于热带东南亚及大洋洲^[1]。从地理分布区来看:西起斯里兰卡,东至太平洋塔希提岛,北至印度西北部及尼泊尔、锡金、不丹和喜马拉雅山一带,经缅甸向东北到我国的南方并远至朝鲜半岛南部沿海岛屿和日本的九州、四国以及琉球群岛,南达大洋洲南边的塔斯马尼亚岛。从种类的数量来看,绝大部分集中分布于热带东南亚。

在我国,分布于秦岭、淮河以南,从纬度而言,大多数种类集中于北纬 15°30' ~ 25°12',向北种类逐渐减少,最北不超过北纬 34°24'。我国已发现的约有 80 种,分布以云南居首位,有 39 种;其次是贵州和广东,各有 28 种;再次是广西,有 24 种;台湾也有 15 种。云南、广西、贵州、广东、台湾是国产石斛的分布中心。我国供作药用的石斛属植物约有 39 种^[2]。

2 商品石斛的鉴定

商品石斛及其原植株鉴定目前还没有规范的质量标准。形态鉴定需要具有一定专业背景知识的人员,而药材加工又增加了形态鉴定的难度,因此研究一种简单易行的鉴定方法将会对商品石斛产业起到极大的规范与促进作用。

传统的石斛鉴定主要是根据石斛的表型特征。广西壮族自治区医药研究所对石斛主要产区广西、贵州、四川、云南等省区原植物和药材进行调查,确定了商品石斛原植物 21 个种,并做了原植物检索表和药材检索表,提供了药材鉴别

和采集加工的方法。徐珞珊等^[3~6]对 34 种石斛药材进行组织鉴定,研究其性状包括表皮、角质层、皮下层细胞、维管束、内、外侧纤维群、木质部导管、基本薄壁组织等。结果表明,不同种类的石斛,某些性状之间存在差异。李满飞等^[7]对 16 种药用石斛属植物的叶鞘进行显微观察的结果表明,表皮细胞的形态、大小,所含草酸钙结晶的性状、大小、分布等种间区别较明显,可作为鉴别石斛种类的科学依据之一。刘学平等^[8]以 10 种较多见的中药石斛粉末为材料进行显微鉴定,依据茎表皮细胞的形状、直径、壁厚、纹孔、束鞘边缘是否突起或分支、壁厚及层纹有无,木纤维是否分支,非腺毛有无、多少、束长等,找到了种间的鉴别特征。孙安慈^[9]对兰科植物的兰属、兜兰属、石斛属 16 个种的叶片及其横断面进行了扫描电镜的观察。发现石斛属各种上、下表皮细胞均为多边形,表面平坦无纹饰,叶片叶肉组织没有栅栏组织及海绵组织的分化。

鉴于形态特征种类繁多,标准难以量化,马国祥等^[10]对中药石斛茎显微构造进行聚类分析。采用最小距离法,选取 35 个具有显微鉴别特征的变量,对市场上常见的 22 种中药石斛的显微构造进行系统聚类分析,分析结果与药材性状及显微鉴定结果基本一致。

石斛的品质取决于有效成分的种类及含量,主要是多糖类及石斛碱类,不同石斛种类差异十分显著。李满飞等^[11]对国内常入药的 25 种石斛属植物 36 个样品的多糖进行了含量测定,发现不同品种间多糖含量差别极大。例如产于广西的加工品一级枫斗中多糖质量分数高达 45.98%,比其原植物铁皮石斛 *D. candidum* Wall. ex Lindl. 中多糖质量分数 (18.20%) 高了一倍多,而产于贵州的细叶石斛 *D. hancockii* Rolfe 中多糖质量分数仅为 6.2%。此外,还发现凡是达到传统标准:“质重,嚼之粘牙,口甜,无渣者为优”的样品其多糖质量分数均高于 30%。可见,多糖是石斛重要的有效成分。对石斛碱类的研究是从 20 世纪 30 年代开始的,到目前为止,已报道分离到 29 种生物碱。此外,还有 stibenoids 成分、甾体糖苷类化合物、倍半萜、香豆素等。由于有效成分复杂,差异大,因此很难从有效成分的含量来确定商品石斛的品质。据此,近年来不少学者探索建立有效的中药石斛鉴定方法。目前,DNA 分子标记技术已广泛用于药用植物多样性、系统学、分类学研究,并逐渐渗透到中药材鉴定领域,如人参、西洋参、沙参、蒲公英、党参等的 DNA 分子鉴定。不少研

* 收稿日期:2003-10-18

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(C03050204)

作者简介:徐程(1970—),男,博士研究生,主要从事药用及观赏植物大规模组织培养技术、次生代谢及植物分子生物学研究。

Tel:(0571)88273341 E-mail:xuc123@zju.edu.cn

研究人员也尝试采用 DNA 分子标记技术进行石斛药材鉴定,并取得了一定的成果。

Lau 等^[12]对 16 种石斛内转录间隔区 ITS2 进行了 DNA 测序,结果表明,种间差异百分率平均为 12.4%,与外类群及杂质(掺杂物)的差异百分率分别为 29.8%和 18.8%,而种内的差异百分率只有 1%,认为 ITS2 区可作为区分石斛种间、石斛与外类群的分子标记。张铭等^[13]用 RAPD 技术对 26 种石斛进行聚类分析,特别对铁皮石斛特异性条带进行测序,从而设计出一对长度大于 15 bp 的高度特异性引物,该引物只能与铁皮石斛基因组中的某一区域特异性结合,具有很高的特异性。徐红等^[14]对黄草石斛 ITS 片段进行遗传多样性分析,结果表明:石斛种间 ITS1 序列的差异百分率为 11.79%~31.58%,ITS2 序列为 10.29%~25.30%;而石斛各类群与外类群的差异百分率 ITS1 序列为 23.56%~36.89%,ITS2 序列为 26.52%~33.31%。金钗石斛种内 ITS1 序列差异百分率为 0.87%,ITS2 无差异,据此认为这两段序列可以作为黄草石斛分子鉴定的标记。丁小余等探讨了束花石斛^[15]、曲茎石斛的品种鉴定^[16],认为其 ITS 序列具有显著而稳定的差异。丁小余等^[17]还建立了枫斗类石斛的 rDNA ITS 区碱基全序列数据库,利用该数据库可对枫斗类石斛待检种进行鉴定。另外,也有报道指出可以利用 mat K 基因(叶绿体基因,编码成熟酶 K)序列将石斛与其混淆品区别开来^[18]。

总之,传统的鉴别方法仍然不失为鉴定石斛的重要依据。但随着现代分子生物技术的迅猛发展,PCR 扩增 DNA 的直接测序资料将成为分子数据的主流。分子标记种类繁多、各有利弊,目前在石斛鉴定方面应用最多的是 rDNA 的 ITS 序列,其他诸如 RAPD、cpDNA/mtDNA-RFLPs、ISSRs、AFLPs 以及共显性 SSRs 等都可以用于种间的鉴定研究。更直接的方法需要在建立基因组文库的基础上,进行单核苷酸多态性分析,从而获得迅速而可靠的鉴定结果。随着分子标记技术的日益成熟,有可能在基因组上寻找多态位点,用以揭示属间、种间、居群间甚至个体间的遗传变异,从而指导人们在植物居群生物学、保护生物学、系统生物学等领域开展研究,并在良种培育以及遗传资源研究、保护和利用过程中采取积极有效的措施。

3 结语

作为一味名贵中药,石斛的市场需求量不断扩大,近年来国内外对石斛进行了大量深层次的开发,相关的研究工作也是不计其数。由于多年来大量收购野生资源,致使野生石斛资源日渐枯竭,例如石斛中的上品——铁皮石斛,已濒临灭绝。

目前,利用组织培养快速繁殖石斛珍贵品种方兴未艾。在科研工作者努力下,霍山石斛、铁皮石斛、束花石斛、兜兰石斛等品种已有大量的试管苗进入市场,从而缓解了石斛市场的燃眉之急。

药用石斛品种的研究是石斛其他研究的基础,因此有必要应用先进的分子生物学技术对石斛进行系统的调查和系统学研究,即对野生资源的种类、亲缘关系、分类地位、野生

资源的生境、药材道地性等情况进行考察研究,并力求建立石斛属植物的种质资源库,保护濒临灭绝的石斛资源。在此基础上,进行良种选育、引种驯化、无性繁殖等工作,因地制宜开展一定规模的栽植。同时,要深入开展研究,确定石斛有效成分,并深入研究其药理作用,扩大石斛的药用价值。

References:

- [1] Ji Z H. Primary study of Chinese *Dendrobium* [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 1980, 18(4): 427-449.
- [2] Li M F, Xu G J, Xu L S. Investigation and authentication of commercial *Dendrobium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(4): 173-180.
- [3] Xu L S, Xu G J, Sha W L, et al. Microscopic identification of Chinese materia medica Shihu I [J]. *J Nanjing Coll Pharm* (南京药学院学报), 1980, 11(2): 1-4.
- [4] Xu L S, Xu G J, Lin H R, et al. Microscopic identification of Chinese materia medica Shihu [J]. *J Nanjing Coll Pharm* (南京药学院学报), 1986, 17(3): 183-185.
- [5] Li M F, Xu G J, Xu L S, et al. Microscopic identification of Chinese materia medica Shihu [J]. *J Nanjing Coll Pharm* (南京药学院学报), 1995, 26(3): 134-138.
- [6] Ma G X, Xu G J, Xu L S, et al. Microscopic identification of Chinese materia medica Shihu [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1995, 26(3): 134-138.
- [7] Li M F, Xu G J, Xu L S, et al. Microscopic identification of leaf sheath of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(2): 139-166.
- [8] Liu X P, Tang M H, Dai Y, et al. Microscopic identification of the powder of Chinese materia medica Shihu (*Caulis dendrobii*) [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1992, 23(3): 148-151.
- [9] Sun A C. Investigations on leaves of *Cymbidium*, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* under scanning electron microscope [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1995, 13(4): 289-294.
- [10] Ma G X, Guo Y L, Xu G J, et al. Microscopic identification studies on *Dendrobium* stems by clustering analysis [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(4): 208-210.
- [11] Li M F, Xu G J, Ping T Y Z, et al. Determination of polysaccharide content of Chinese drug Shihu [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(10): 10-12.
- [12] Lau D T W, Shaw P C, Wang J, et al. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. *Planta Med*, 2001, 67: 456-460.
- [13] Zhang M, Huang H R, Liao S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-447.
- [14] Xu H, Li X B, Wang Z T, et al. rDNA ITS sequencing of *Herba Dendrobii* (Huangcao) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(10): 777-783.
- [15] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, et al. Molecular authentication of *Dendrobium chrysanthum* from its allied species of *Dendrobium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(6): 407-411.
- [16] Ding X Y, Wang Z T, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [17] Ding X Y, Xu L S, Xu H, et al. Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied species of *Dendrobium* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868-873.
- [18] Teng Y F, Wu X J, Xu H, et al. A comparison of mat K sequences between *Herba Dendrobii* (Shihu) and its adulterant species [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(4): 280-283.