

· 药材 ·

国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[△]

解放军 302 医院药学部 (北京 100039)

肖小河^{*} 刘峰群 史成和^{**} 李隆云^{***} 秦松云^{***} 乔传卓^{****} 苏中武^{****}

摘要 运用 RAPD 技术刻划了国产姜黄属药用植物的遗传背景差异,并结合经典分类和异地栽培观察和聚类分析,初步澄清了姜黄属植物的一些分类学争议,从 DNA 分子水平上为姜黄属植物分类与中药鉴定提供了参考依据。

关键词 姜黄属 RAPD 植物分类 中药鉴定

RAPD Polymorphism and Authentication of Medicinal Plants from Turmeric (*Curcuma* L.) in China

Department of Pharmacy, 302th Hospital of PLA (Beijing 100039) Xiao Xiaohu and Liu Fengqun

Department of Pharmacy, Navy General Hospital Shi Chenghe

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica Li Longyun and Qin Songyun

College of Pharmacy, the Second Military Medical University Qiao Chuanzhuo and Su Zhongwu

Abstract By the biological technique RAPD, the differences among their genetic background and its significance in the classification of the medicinal plants from *Curcuma* L. in China were scored with morphological classification and cluster analysis. Consequently, some controversies on the classification and identification of *Curcuma* plants were clarified. These results have provided some valuable information and bases from DNA molecular level for the authentication of medicinal plants of *Curcuma* L., and also showed that RAPD is effective and practicable in taxonomy and pharmacognosy especially in the classification and identification of those plants which are close in biosystematics or confusable in morphology.

Key words *Curcuma* L. RAPD plant taxonomy authentication

姜科姜黄属 (*Curcuma* L.) 植物全世界约有 60 种,我国 10 余种,常用中药郁金、莪术和姜黄等都来源于该属。姜黄属分布广,生态和栽培变异大,并且不少种类不易采到具花标本,因而该属植物的亲缘关系、系统分类和中药鉴定一直存在很大的争议^[1]。我们运用随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 分析技术,定性定量地刻划了姜黄属药用植物的遗传背景差异及其分类学意义,为姜黄属中药鉴定提供了新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料:供试材料为新鲜叶片,来源于姜科姜黄属 10 个种,均系肖小河等于 1994~1995 年分别从中科院华南植物园、广西药用植物园及各道地药材产地引种至重庆市中药研究院 (原四川省中药研究所) 标本园栽培而得。植物学名为中科院华南植物园刘念教授、重庆市中药研究院陈善塘教授、广西

药用植物园吴忠发高级工程师和李德荣高级工程师、肖小河博士鉴定 (表 1)。

1.2 主要仪器和试剂

DNA 扩增仪: Gene CyclerTM 型, Bio-Rad 公司。
超速离心机: BECKMAN J2-21M 型。Taq DNA 聚合酶: 购于 Promega 公司。随机引物: 为 Operon Technologies 公司生产的十聚体核苷酸。

1.3 DNA 提取方法: 采用 CATB 法^[2], 略有改动。取叶片 1 g, 用液氮研磨成粉状, 研磨时加入 0.2 g PV P 粉, 立即加入 2 mL CTAB 提取缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mmol/L EDTA pH 8.0, 250 mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 0.5% β -巯基乙醇), 60℃ 水浴保温 45 min, 加入等体积的氯仿-异戊醇混合液 (24: 1), 反复轻摇混匀, 5 500 r/min 离心 10 min。取上层水相, 再加入等体积氯仿-异戊醇 (24: 1), 5 500 r/min 离心 10 min。重复 2~

* Address: Xiao Xiaohu, Department of Pharmacy, No. 302 Hospital of PLA, Beijing

** 海军总医院药局 *** 重庆市中药研究院 **** 第二军医大学药学院

△ 国家自然科学基金项目 (No. 39470058)

3次,直至水相层绿色不明显。在水相中加入 2/3 体积的预冷的异丙醇,于 - 20℃ 静置 30 min 以上或过夜。10 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 300 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mmol/L EDTA pH 8.0)溶解,加入 Rnase A,终浓度 20 μg/mL,37℃ 保温 1 h,然后分别用等体积平衡酚、平衡酚-氯仿(1∶1)及氯仿-异戊醇(24∶1)各抽提 1 次。吸取上层水相,加入等体积异丙醇沉淀 DNA,1 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 75% 冰醋酸洗涤 1~2 次,干燥后 200 μL TE 溶解,- 20℃ 保存备用。

表 1 用于 RAPD 分析的姜黄属植物		
序 号	植物名称	产地来源
1	姜黄 <i>Curcuma longa</i>	从四川双流县引种,道地产区
2	川郁金 <i>C. chuanyujin</i>	从四川双流县引种,道地产区
3	温郁金 <i>C. wenyujin</i>	从浙江瑞安县引种,道地产区
4	毛郁金 <i>C. aromatica</i>	从广西药用植物园引种
5	蓬莪术 <i>C. phaeocaulis</i>	从四川双流县引种,道地产区
6	顶花莪术 <i>C. yunnanensis</i>	从华南植物园引种,原产云南
7	黄莪术 <i>C. zedoaria</i>	从华南植物园引种,原产美国
8	广西莪术 <i>C. kwangsiensis</i>	从广西横县引种,道地产区
9	印尼莪术 <i>C. xanthorrhiza</i>	从华南植物园引种,原产印尼
10	细莪术 <i>C. exigua</i>	从华南植物园引种,原产四川

1.4 PCR 反应

参照 William 的方法^[11],稍加改动。反应总体积 25 μL,引物 0.2 μmol/L, dNTPs 各 0.1 mmol/L, TaqDNA 酶 1 单位, Tris-HCl(pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, geatin 0.001%,上覆 25 μL 石蜡油。

反应温度循环为: 94℃, 1 min; 35℃, 2 min; 72℃, 2 min; 5 个循环后改为 94℃, 30 s; 35℃, 1 min; 72℃, 2 min; 40 个循环后于 72℃ 延伸 5 min。

扩增产物于 1.3% 琼脂糖(内含 1 μg/mL EBF)凝胶电泳检测(图 1)。

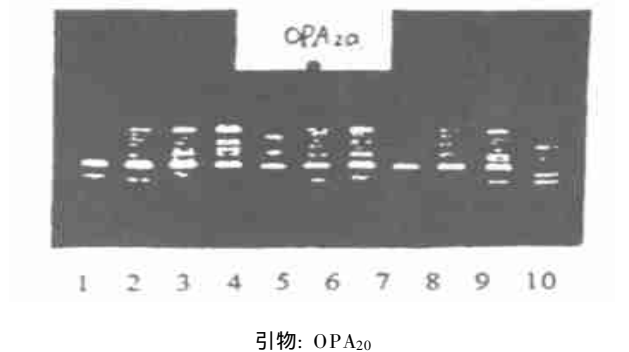


图 1 姜黄属植物基因组 RAPD 指纹图谱

2 结果与分析

在筛选的 50 余个随机引物中有 25 个在供试

材料上获得了较好的基因组 DNA 多态性指纹图谱,其中 OPA₂₀、OPB₅、OPD₁₈、OPD₂₆、OPB₁₄、OPC₆、OPA₄、OPA₁₅、OPA₁₆、OPC₃、OPC₁₃、OPB₁₅、OPB₁₆、OPA₈、OPA₁₈ 等引物的扩增产物条带信号强,重现性和特征性好。根据姜黄属植物叶绿体基因组 DNA 的 RAPD 多态性,笔者运用聚类分析方法,并结合经典分类和异地栽培观察,定性定量地刻划了姜黄属药用植物的遗传背景差异及其系统分类学意义。结果见图 2。

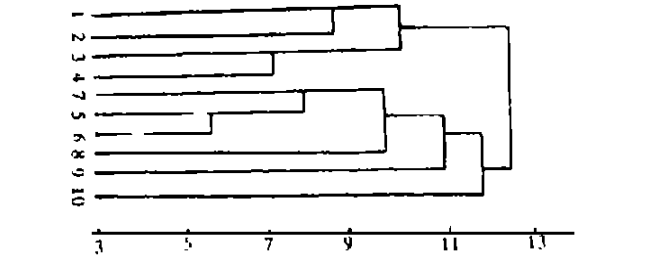


图 2 姜黄属植物 RAPD 聚类分析图

2.1 RAPD 分析与姜黄属植物分组:当取分类阈值 $\lambda=12.4$ 时,国产姜黄属 10 种药用植物可分为 2 大组,即绿脉组和紫脉组。绿脉组包括 *C. longa*, *C. chuanyujin*, *C. aromatica*, 和 *C. wenyujin*;紫脉组包括 *C. phaeocaulis*, *C. yunnanensis*, *C. zedoaria*, *C. kwangsiensis*, *C. xanthorrhiza* 和 *C. exigua*。两组的主要区别是后者叶中脉两侧有紫色斑,而前者则无紫色斑。

2.2 RAPD 分析与姜黄属植物分类:当取分类阈值 $\lambda=9.0$ 时,可将国产姜黄属原 10 种划为 6 组,分述如下:

2.2.1 姜黄 *C. longa* L. 和川郁金 *C. chuanyujin* C. K. Hsieh et H. Zhang:包括 1 和 2 号材料。1 号材料即 *C. longa*,分布最广,变异亦最大,栽培措施和产地对 *C. longa* 形态影响较大,如在印度和中国四川双流县为 *C. longa* 根茎发达,块根不发达,主要产出物是姜黄;在中国四川双流县 *C. longa* 块根发达,主要产出物为黄丝郁金。

2 号材料即川郁金 *C. chuanyujin*, 稀见,与 *C. longa* 混生或逸为野生,是当地药农栽培黄丝郁金和姜黄药材的淘汰品种。植株较高大,根茎发达,比 *C. longa* 根茎粗大,但色较淡,为淡黄色至黄色;根系入土深,郁金生成少。块根作黄白丝郁金或黄丝郁金用,根茎主要作姜黄用。过去 *C. chuanyujin* 常被列入 *C. aromatica* 项下,但后者根茎断面类白色,侧根茎不发达,叶片两面茸毛明显,二者差异较大。笔者认为将川郁金 *C. chuanyujin* 订为姜黄 *C. lon-*

ga L. 的栽培变种比较合理,即:川郁金 *C. longa* L. cv. *duanyujin*

2.2.2 毛郁金 *C. aromatica* Salisb. 和温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling

指 3和 4号材料 温郁金 *C. wenyujin* 和毛郁金 *C. aromatica* 十分接近,主要区别是后者叶背有毛,前者叶背未见柔毛,但手触多少有毛感,在显微镜下观察亦偶见毛茸,可见叶片有无毛茸在 *C. wenyujin* 与 *C. aromatica* 之间并无严格间断。鉴于物种生物学的发展趋势和本草沿革历史,建议将二者合为 1个种,并沿用国内外曾经通过的学名郁金 *C. aromatica* Salisb. 亦可考虑将温郁金作为毛郁金之栽培变种处理,即温郁金为 *C. aromatica* Salisb. cv. *wenyujin*。^[6]

2.2.3 黄莪术 *C. zedoaria* (Christm) Rosco.、蓬莪术 *C. phaeocaulis* Valet 和顶花莪术 *C. yunnanensis* N. Niu et Senjen Chen

包括 5,6和 7号材料,即原蓬莪术 *C. phaeocaulis* 顶花莪术 *C. yunnanensis* 和黄莪术 *C. zedoaria*。中药莪术主流品种蓬莪术的原植物学名更迭频繁,曾先后被订为 *C. zedoaria*, *C. aeruginosa*, *C. phaeocaulis*,三者是独立的种?还是同一所指或学名误订?顶花莪术 *C. yunnanensis* 与 *C. phaeocaulis* 和 *C. zedoaria* 的 RAPD 聚光谱系十分接近,新种顶花莪术 *C. yunnanensis* 是否成立?这些问题均有待进一步研究。

文献记载蓬莪术 *C. phaeocaulis* 顶花莪术 *C. yunnanensis* 和黄莪术 *C. zedoaria* 的主要区别在于根茎断面的颜色^[7-9]。如 *C. zedoaria* 根茎断面淡黄色或类白色,而 *C. phaeocaulis* 根茎断面淡蓝色或黄绿色至墨绿色或深褐色。但据我们多年观察,它们的根茎断面在不同发育时期、不同干燥过程中甚至同一主根茎纵剖面的上下方颜色都是不尽一致的。一般来说,老根茎断面为淡黄色至黄绿色,幼嫩根茎断面为灰蓝色或黄绿色至墨绿色;干燥后常为墨绿色至黑褐色或铅灰色或深褐色;同一剖面上方一般为淡黄色、淡蓝色或类白色,下方多为深蓝色或黄绿色至墨绿。

综上,建议将顶花莪术 *C. yunnanensis* 与中药莪术主流品种蓬莪术合并,同时恢复中药蓬莪术原植物学名 *C. zedoaria* (Christm) Rosco.^[6]。组织图像定量分析和化学成分分析亦基本支持上述观点^[10,11]。

2.2.4 广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee & C.

F. Liang

指 8号材料,即广西莪术 *C. kwangsiensis* (紫脉型)。广西莪术 *C. kwangsiensis* 系一多型种^[6,9];叶片既有紫脉型,又有无紫脉型(即绿脉型);花序既有从根茎单独抽出,亦有从叶鞘内直接抽出;有的叶背被毛,有的则无毛。但是其地下部分根茎和块根的形态和色泽基本一致。本试验中绿脉型 *C. kwangsiensis* 栽培成活差,提取的 DNA 材料大多未扩增出 RAPD 谱带,未做统计分析。鉴于广西莪术种内性状的多态性,建议将广西莪术作为种复合体或多型种处理,即:广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee & C. F. Liang complex

2.2.5 印尼莪术 *C. xanthorrhiza* Robx.

指 9号材料,即 *C. xanthorrhiza* 该种系从印尼爪哇引种,体型粗大,株高可达 2 m,叶脉两侧具有紫色带,类似“莪术类”;但叶脉本身及叶背叶脉处均着紫色斑,主根茎特别发达,郁金少见,根茎和块根断面均为黄红色,又近“姜黄类”;并且该种既含酚性姜黄素类成分,又含非酚性姜黄素类成分。近年我国云南发现有分布^[12]。

2.2.6 细莪术 *C. exigua* N. Liu

指 10号材料,即 *C. exigua* 该种系四川野生,体型细小,株高 30~50 cm,叶脉两侧具有狭长紫色带,近“莪术类”^[7];但主根茎不发达,侧根茎发达,其形态断面颜色和气味均类似“姜黄类”。

可见 *C. exigua* 和 *C. xanthorrhiza* 都是比较独特的类群,二者叶片叶脉两侧均具紫色带,近“莪术类”,但根茎和块根断面淡黄色至黄色,又类似姜黄,但二者植株大小和主根茎发达程度等方面区别明显。

3 小结与讨论

姜黄属植物的分类名称及其与商品药材的关系一直比较混乱,近年来新种不断有发表和学名不时更迭,更增添了分类与鉴定的困难。本文基于 RAPD 多态性的数值分类将从分子水平上为研究姜黄属遗传背景差异及植物分类与中药鉴定提供了支持依据。

RAPD 分析用于分类和鉴定,有其独到的优势,但目前尚属探索阶段,亦存在一定的局限性,如 RAPD 片段的基因组来源不明(细胞核或细胞器)以及凝胶电泳迁移率相同的谱带的核苷酸同源性不明等情形易造成干扰,有时电泳迁移率相同的片段并非同源;RAPD 反应条件繁杂而严格,扩增产物的稳定性难以控制。笔者认为,包括 RAPD 分析在

内的 DNA 分子遗传标记技术可作为分类鉴定的一种有益的辅助手段,但不能替代传统的分类学

目前分子标记技术在生物多样性及系统分类与中药鉴定中的应用方兴未艾。我们认为利用包括 RAPD 在内的现代分子生物学技术,筛选和寻找药用植物重要性状的分子标记,开展中药材分子标记育种,中药材品质人工调控及生产基因工程药物,将是 21 世纪生药学的新课题。

参 考 文 献

1 肖小河,等. 中草药, 1997, 28(2): 114

2 Scott O R, *et al.* J Plant Mol Biol Manual, 1988, A6 1

3 Williams J G, *et al.* Nucleic Acids Res, 1990, 18 6531

4 陈秀香,等. 广西植物, 1984, 4(2): 133

5 张浩,等. 华西医科大学学报, 1990, 21(2): 179

6 吴德邻,等. 中国植物志. 16 卷(2 册). 北京: 科学出版社, 1981 59

7 刘念,等. 广西植物, 1987, 7(1): 15

8 吴德邻,等. 中科院华南植物所汇刊. 第 5 集. 1987 26

9 陈毓亨,等. 药学报, 1981, 16(50): 385

10 肖小河,等. 中国药学杂志, 1998, 33(2): 76

11 夏文娟,等. 中国中药杂志, 1999, 24(7): 423

12 董绍全. 云南植物研究, 1986, 8(1): 37

(1999-04-19 收稿)

异地栽培大青叶和原栽培品种的抗内毒素作用比较[△]

第二军医大学药学院(上海 200433) 王寅* 乔传卓

摘 要 比较异地栽培后的大青叶和其原栽培品种的抗内毒素作用,结果显示生态环境改变后,大青叶仍能保持其原栽培品种品质;不同居群大青叶在药理活性方面的差异也不因生态环境的趋同而丧失。表明大青叶是一类种质主导型的药材,环境因素对药材品质的形成不起主要作用。

关键词 大青叶 异地栽培 药材品质 抗内毒素活性

Comparison of the Antiendotoxic Activities of Transplanted Indigoblue Woad (*Isatis indigotica*) with the Originally Cultivated Breeding

College of Pharmacy, the Second Military Medical University (Shanghai 200433) Wang Yin and Qiao Chuanzhuo

Abstract The antiendotoxic activity of transplanted *Isatis indigotica* Fort. was compared with the originally cultivated breedings. The result showed that the former kept the character of the latter while altering the mode of life and relations to their environment and that differences in pharmacological effect of *I. indigotica* from different populations still remained after they were transplanted in the same place, which indicated that *I. indigotica* is a gemplasm-dominant type crude drug and the environmental factor showed little effect on its quality.

Key words *Isatis indigotica* Fort. transplantation quality of crude drug antiendotoxic activity

大青叶是常用的清热解毒中药材,主要来源于十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶^[1]。临床应用发现药材质量参差不齐,有必要进行品种选育,保证药材质量。我们将各地不同居群菘蓝移栽于一处,考察异地栽培前后大青叶药理作用的变化,探讨环境因素对药材品质形成的影响,为筛选优良品种、稳定和提高药材的质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料: 1996 年 9 月至 12 月间在全国采集了 13 个栽培居群的大青叶药材(I)和种子;1997 年 5 月下旬将种子异地栽培于上海市新海农场试验田,按

常规方法进行田间作物管理,同年 11 月收获移栽一年的大青叶药材(II),并将剩余的大青叶以居群为单位,间距 5~ 10 km 左右重新分隔种植,避免在开花结果时互相传粉,在 1998 年 5 月时收获种子,将其种植在同一块试验田,收获移栽两年的大青叶药材(III)。所有药材经乔传卓教授鉴定均为十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* Fort.。

1.2 试剂和仪器: 鲎试剂:福州东方鲎试剂厂,批号 971208,0.1 毫升/皮,灵敏度 0.5 EU/mL;细菌内毒素工作标准品:福州东方鲎试剂厂,批号 980105,10 EU/皮,以 NS 溶解备用;0.9% 生理盐水(NS),

* Address: Wang Yin, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai

△国家自然科学基金资助项目,编号 39670878;上海市委星火计划项目,编号 98X H02028