

- 1982
- [3] 陈嘉谟(明). 本草蒙荃[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [4] 李时珍(明). 本草纲目(校点本, 上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [5] 陈修园(清). 神农本草经读[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985.
- [6] 卢之颐(明). 本草乘雅半偈(校点本)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [7] 吴其浚(清). 植物名实图考长编[M]. 北京: 商务印书馆, 1959.
- [8] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药用植物栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [9] 中国药材公司. 中国常用中药材[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [10] 温学森, 李允尧, 陈沪宁. 地黄栽培研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(7): 427-429.
- [11] 陶弘景(梁). 名医别录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [12] 胡世林. 中国道地药材[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [13] 张金鼎, 曹鸿云. 河南四大怀药[J]. 中药材, 1987, 3: 55-56.
- [14] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 第二册(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [15] 都恒青, 周素娣. 怀地黄的几个主要品种及其鉴别[J]. 中草药通讯, 1976, (9): 43-47.
- [16] 李光胜, 毛文岳, 黄新生, 等. 地黄夏栽技术的研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(12): 718-719.
- [17] 毛文岳, 蒋立昶, 李效刚, 等. 怀地黄组织培养及其在育种和栽培中的应用[A]. 中国药学会. 中国药学会庆祝建会80周年学术讨论会论文集[C]. 北京: 1987.
- [18] 雷福成, 刘晓娜, 王学增. 防止地黄品种退化的技术措施[J]. 中药材, 1995, 18(11): 545-546.
- [19] 中国医学科学院药物研究所. 药用植物栽培技术[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [20] 山东省革命委员会卫生局, 商业局. 山东中药材栽培[M]. 济南: 山东人民出版社, 1975.
- [21] 郑虎占, 董泽宏, 畚靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1999.
- [22] 杨丽军, 许智宏. 不同来源的怀地黄叶外植体在培养中植株再生的差异[J]. 植物生理学通讯, 1985, (4): 38.
- [23] 陈德恩, 刘田才, 吴友吕, 等. 地黄病毒病及对退化影响研究[J]. 中草药, 1985, 16(9): 28-31.
- [24] 李光胜, 许金梅, 马远真. 地黄种苗的低温(越冬)贮藏试验[J]. 基层中药杂志, 1994, 8(4): 33.
- [25] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中草药栽培技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- [26] 张仁锡(清). 药性蒙求[M]. 咸丰丙辰年.
- [27] 吴其浚(清). 植物名实图考[M]. 北京: 商务印书馆, 1959.

RAPD法在金线莲的鉴别研究中的应用

胡珊梅¹, 张启国¹, 周涵韬², 阮元彬²

(1. 厦门市药品检验所, 福建 厦门 361012; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 金线莲母(金线莲)与金线莲公(无线金线莲)是否为同一种植物 *Anoectochilus roxburghii* 历来有争议, 为了准确鉴别这两种植物并搞清楚二者之间遗传变异。方法 本文运用 RAPD 技术, 对同一采集地的具有不同叶面特征的金线莲进行了 DNA 指纹鉴定。结果 两者的 DNA 指纹图谱具有部分共同的位点, 但又有各自的特征性位点。结论 二者具有较大的遗传变异。

关键词: 金线莲公; 金线莲母; RAPD

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)10-0949-02

Identification of two species of *Anoectochilus* Bl. Jinxianlian by RAPD

HU Shan-mei¹, ZHANG Qi-guo¹, ZHOU Han-tao², RUAN Yuan-bin²

(1. Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen 361012, China; 2. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Key words Jinxianlian Gong; Jinxianlian Mu; RAPD

金线莲为兰科开唇兰属植物, 其化学成分、药用价值已有报道^[1,2]。我们曾对花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Ldl. 两个产地的福建金线莲和广西金线莲及台湾开唇兰 *A. formosanus*

Hay. 进行了 DNA 指纹鉴定, 揭示了两种金线莲的种间差异及同种不同产地的金线莲的遗传变异^[3]。

在福建省金线莲的分布主要是花叶开唇兰, 民间习惯称叶面具有明显的金黄色网脉的为金线莲母

(金线莲),叶面叶脉不明显或无脉的为金线莲公(或无线金线莲)。据报道,这两者常常以伴生形式生长在同一生态环境下,前者分布量较大,在采集金线莲的同时,也有部分无线金线莲夹杂。学者们曾经把无线金线莲订为绒叶斑叶兰 *Goodyera velutina* Maxim. 或分出一个新种^[4];但后来经中科院北京植物研究所兰科专家郎楷永教授鉴定二者为同种植物^[5];郑纯等对此作了解剖和理化鉴别,也认为二者是同种植物^[6]。在外贸出口中曾把无线金线莲视为伪品。为了搞清楚二者是否为同种植物及他们之间的遗传关系,我们在同一生态环境采到了金线莲和无线金线莲,进行了DNA指纹鉴定,为金线莲的正确分类和扩大药用资源提供科学依据。

1 材料与方法

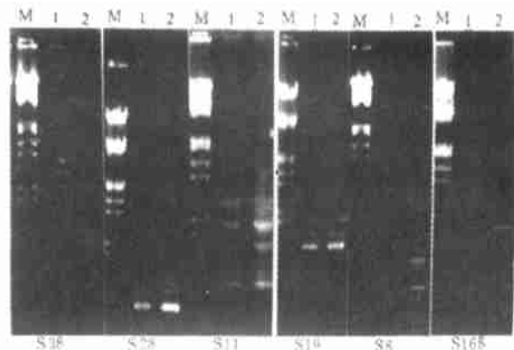
- 1.1 植物材料: 金线莲与无线金线莲均采于福建永安罗坊乡野生。
- 1.2 DNA提取分离: 采用改进的CTAB法,取新鲜叶片0.8g 提取步骤见文献^[4]。
- 1.3 PCR反应: 扩增总体积25μL,其中2.5μL 10× buffer, Mg²⁺ 2mmol/L, dNTP 1mmol/L, 引物15ng(名称及序列见表1), DNA模板50ng, 0.5单位Taq酶,加超纯水至25μL。

表 1 17个引物对两种金线莲的 DNA扩增结果					
引物名称	序列(5→3)	总标记数		特异位点数	
		金线莲公	金线莲母	金线莲公	金线莲母
S108	GAAACACCCC	3	9	1	7
S158	GGA CTGCAGA	3	5	2	1
S188	TTCAGG GTGG	5	9	2	5
S18	CCACAGCAGT	6	8	1	3
S178	TGCCCAGCCT	12	7	5	0
S148	TCACCACGGT	6	8	1	2
S168	TTTGCCCGGT	9	9	1	1
S88	TCACGTCCAC	5	5	1	1
S8	GTCCACACGG	5	6	0	2
S11	GTAGACCCGT	13	14	0	1
S12	CCTTCACGCA	6	7	0	1
S38	AGGTGACCGT	9	12	0	3
S78	CGAGTGGGTG	9	9	1	1
S28	GTGACGTAGG	5	7	0	2
S128	GGGATATCGG	5	10	0	4
S19	ACCCCGGAAG	5	4	1	0
S21	CAGGCCTTTC	4	5	0	1

在 T₃ PCR仪(德国 Biometra)上扩增,扩增程序为 90℃变性 1 min; 36℃复性 1 min; 72℃延伸 2 min; 40个循环,最后 72℃延伸 7 min。扩增产物 20μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,经 EB染色,凝胶成像系统 (GDS8000,英国 UVP)照相并打印。

2 结果与分析

采用改进的 CTAB法,提取了两种金线莲的总基因组,从 22个 10-Mer 随机引物中,筛选出 17个有效引物,获得了清晰稳定重现性好的基因组 DNA 多态性指纹图谱(图 1),每个引物产生的标记数在 3~ 12之间,共得到 244个 RAPD标记和 51个特异位点(表 1)。



1金线莲公 2金线莲母 Mλ DNA EcoRI/ HindIII 分子量标记
图 1 6种引物对 2种金线莲样品的扩增图谱

3 小结与讨论

- 3.1 从 DNA指纹图谱可以看出,二者具有部分共同的谱带,但又有各自的特征性谱带,说明二者的遗传基因已经产生了变异。建议分别独立成种。以上 6种引物可以作为鉴别两种金线莲的特征性引物。
- 3.2 经反复实验,证明 RAPD 分子标记技术可靠性强,重现性好,主要是鉴定中药材的染色体、线粒体或叶绿体的特征基因遗传信息,具有种属专一性,对于外观性状相似且显微组织特征性不强、化学成分复杂,用传统的形态标记方法无法准确鉴定的品种是一种快速、准确的手段。

致谢: 本课题样品采集及文献查阅得到福建亚热带植物研究所陈裕、福建永安罗坊乡陈锦光的大力帮助,特此致谢!

参考文献:

[1] 赖应辉,吴锦忠. 金线莲中无机元素及糖类的分析 [J]. 中药材, 1997, 20(2): 84.
[2] 王振登. 金线莲中微量元素及氨基酸的分析测定 [J]. 福建中医学院学报, 1993, 3(2): 100-101.
[3] 胡珊梅,周涵韬,张启国,等. 珍稀中草药金线莲的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 944-946.
[4] 江海燕,王 建. 珍稀中草药金线莲的研究近况 [J]. 中医药研究, 1997, 13(2): 51-52.
[5] 陈 裕,杜坤瑞,管其宽,等. 金线莲若干栽培技术研究 [J]. 亚热带植物通讯, 1994, 23(1): 46-51.
[6] 郑 纯,黄以钟,潘 馨,等. 金线莲的生药鉴定 [J]. 中药材, 1997, 20(11): 552-524.