· 药材 ·

藏药雪莲原植物水母雪莲及其混淆种类的 ITS 序列比较和分子鉴定

刘建全[1], 陈之端[2], 路安民[2*]

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院植物研究所 系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘 要: **目的** 比较藏药"雪莲"原植物水母雪莲及其混淆种类的 ITS 序列, 为分子序列鉴定提供参照系统。**方法** 利用 PCR 扩增和 ABI377 自动测序。**结果** 水母雪莲不同居群间的序列相同, 与其混淆种类之间存在一定的分子序列差异。**结论** ITS 序列可正确鉴定水母雪莲与其混淆种类。

关键词: 藏药; 雪莲; ITS 序列; 分子鉴定

中图分类号: R282.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2670(2001)05-0443-03

Comparison on internal transcribed spacers (ITS)* sequences of Tibetan medicine Saussurea medusa and its easily confusable species

LIU Jian-quan[1], CHEN Zhi-duan[2], LU An-min[2]

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai 810001, China; 2. Laboratory of Sytematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: **Object** In order to identify the medicine at the molecular level, the internal transcribed spacers (ITS) of *Saussurea medusa* Maxim. and its easily confusable species were sequenced. **Methods** The double-stranded DNA was amplified using PCR systems 9 600 kits and sequenced on an ABI 377 automated sequencer from both directions. **Results** The ITS sequences of *S. medusa* of different populations showed no variation, but there existed distinct variation between *S. medusa* and its confusable species. **Conclusion** ITS sequences can be used for the molecular authentication between *S. medusa* and its confusable species.

Key words: Tibetan medicine; *Saussurea medusa* Maxim.; internal transcribed spacers (ITS) sequences; molecular authentication

中药雪莲花常采用的是菊科(Compositae)风毛菊属(*Saussurea* DC)中的大苞雪莲花 *S. involucrata* Kar. et Kir[1], 而藏药"雪莲"药材的原植物, 是分布在我国青海、甘肃、西藏等地的水母雪莲花 *S. medusa* Maxim.[2]。水母雪莲是藏药中的名贵药材, 具有散寒除湿、活血通络、抗癌、抗炎及抗疲劳等功效, 可治疗风湿性关节炎、妇女月经不调、痈疮肿毒和高山不适应等多种疾病[3]。然而天然水母雪莲由于长期的掠夺性采挖, 已成为濒危物种; 因而一些非正品种类常混入雪莲药材中充当水母雪莲出售。近年来, 我们发现市场出售的藏药雪莲中含有许多非水母雪莲种类, 其中最多的为黑毛雪兔子 *S. hypsipeta* Diels。黑毛雪兔子外观与水母雪莲相近, 在干药材中最难以区别; 其次还有唐古特雪莲 *S. tangutica* Maxim. 等。快速、简易鉴别商品流通中的各种药材, 成为藏药"雪莲"药材市场上急需解决的问题之一。

根据分子标记建立准确、快速的分子鉴定试剂盒进行中草药鉴定是今后中草药生药鉴定研究的重要研究方向[4]。ITS (Internal transcribed spacers) 是核糖体DNA 中介于 18 S 和 5.5 S 之间(ITS1)以及 5.8 S 和 26 S 之间(ITS2)的非编码转录间隔区。在一些类群中, 通过比较发现同一种类不同生境居群间的 ITS 序列没有变异[5]; 因而 ITS 序列有时也可作为物种的特异性分子标记。同时, 由于 ITS 片段短、多拷贝, 在药材分子鉴定中不受药材部位、保存时间的限制, 是药材分子鉴定的理想片段。

本研究采用直接 PCR 测序方法, 对藏药"雪莲"

* 收稿日期: 2000-10-02
基金项目: 中国科学院生物科学与生物技术特别支持费课题资助。
作者简介: 刘建全(1969-), 男, 四川井研县人, 博士。现为日本森林与森林产品研究所特别研究员, 研究方向为资源植物学与进化植物学。已发表论文 50 余篇。Tel: (0971)6153387 E-mail: ljqdxy @ public.xn.qh.cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原植物水母雪莲及近年市场使用非正品种类共 4 种植物的 ITS 序列进行测序; 主要目的是比较它们之间的 ITS 分子序列是否存在差异, 为雪莲原植物的分子序列鉴定以及根据序列差异进一步设计特异性“雪莲”药材分子快速鉴定试剂盒提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料: 水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim. 有 3 种来源: 青海北部门源县祁连山, 青海南部玛多县的巴颜喀拉山和西宁藏药市场购买的雪莲药材。黑毛雪兔子 *S. hypsipeta* Diels 分别来自青海北部门源县祁连山和药材市场。唐古特雪莲 *S. tangutica* Maxim. 采自青海南部玛多县的巴颜喀拉山, 弯齿风毛菊 *S. przewalskii* Maxim. 采自青海的玉树县。野外采集的样品直接采用硅胶干燥叶片。药材样品取药材上的干叶片和花序下的苞片。

1.2 总 DNA 提取: 总 DNA 提取基本依照 CTAB 法进行。在每个样品中取混合叶片约 2 cm^2, 加入 2 倍体积的石英沙, 充分研磨, 加入 700 μL 含 0.3% β-巯基乙醇的 2×CTAB 提取液, 混匀, 倒入 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中, 于 65 ℃水浴 50 min。加入 700 μL 氯仿-异戊醇 (24∶1) 混合液, 轻轻摇匀后, 10 000 r/min 离心 5 min, 收回的上层水相再加入 2/3 体积的异丙醇, 置于室温下 10 min, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 70% 乙醇洗涤 1～2 次, 风干后加入 100 μL 1 ×TE, 备用。

1.3 核糖体 DNA ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 片段 PCR 扩增、产物纯化和测序: 采用双链 PCR 反应扩增 ITS1-5.8 S rDNA-ITS2 整个片段, 引物 P1 位于 18 S (5′-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3′) 和位于 26 S 上的 P4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)。扩增反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行, 反应体积均为 50 μL, 内含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.025 g/L BSA, 2 mmol/L $MgCl_2$, 1.5 U Taq DNA 聚合酶 (中国农业大学产品), dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 200 μmol/L, 10～20 mg 总 DNA, 相应的正反向引物各 12.5 pmols。PCR 产物经 Sephaglas TM Bandprep Kit (Pharmacia Co.) 或 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) 纯化后直接用于测序反应。

1.4 测序反应及检测: 测序工作在 ABI377 自动测序仪上进行, 测序反应程序基本同扩增反应程序, 仅退火温度变为 60 ℃, 延伸温度变为 72 ℃, 延伸时间变为 30 s。

1.5 序列比较: ITS-1 及 ITS-2 的范围根据已发表的菊科植物的序列确定, 序列排列用 CLUSTAL V 软件完成。

2 结果和讨论

4 种植物的 ITS1, 5.8 S rDNA 和 ITS2 序列分别注册到 GenBank, 其序列号分别为: 水母雪莲 AF257787, 黑毛雪兔子 AF257788, 唐古特雪莲 AF257785 和弯齿风毛菊 AF257786, 可直接调阅。笔者对 4 种植物 ITS 序列排序后的序列矩阵及序列差异已作排列。

水母雪莲及其 4 种植物的 5.8 S rDNA 长度完全相同, 全长 163 bp, 未发现碱基变异。4 个种 ITS1 的长度也相等, 为 258 bp。ITS2 的长度为 216～222 bp。利用 PAUP 分析得到“雪莲”及其搀杂种类 ITS 的绝对遗传距离 (核苷酸差异数) 和平均遗传距离, 见表 1。从表 1 可看出, 4 种植物之间的遗传距离较大, 最大有 31 个碱基的差异, 最小也有 18 个碱基的区别。水母雪莲与黑毛雪兔子、唐古特雪莲和青海风毛菊 ITS 碱基差异分别为 18, 27 和 31。

表 1 4 种植物的 ITS 绝对遗传距离和平均遗传距离

类群	弯齿风毛菊	唐古特雪莲	黑毛雪兔子	水母雪莲
弯齿风毛菊	-	0.043	0.029	0.047
唐古特雪莲	28	-	0.034	0.041
黑毛雪兔子	19	22	-	0.028
水母雪莲	31	27	18	-

水母雪莲两个地方居群的测序结果完全相同, 说明雪莲所在的风毛菊属中, 同一种类不同居群间的 ITS 序列较为稳定, 可用来鉴定与标记该属不同的植物种类。在本研究中我们对水母雪莲和黑毛雪兔子的药材与原植物在 DNA 提取、扩增和测序方面均设置了对照, 药材 DNA 测序结果与原植物也完全一致, 说明利用药材标本进行 DNA 提取、扩增和测序工作在“雪莲”药材中是可行的, 所得结果也是可靠的。因而, 可利用分子方法来进行“雪莲”药材的鉴定。

根据目前我们得到的 ITS 序列, 可对藏药市场上出现的“雪莲”进行检测, 即测出待检样品的 ITS 片段, 与水母雪莲进行比较, 即可鉴别出所检样品是否是水母雪莲。但 DNA 提取、扩增和测序工作费时、费力, 且成本高。根据已知序列, 设计特异性分子鉴定试剂盒来检测药材种类, 较之更为方便。关于这种分子试剂盒的设计目前有两种途径: 一是选择限制性内切酶对碱基变异位点进行酶切[6]; 二是设计特异性引物进行 PCR 扩增[7]。对于“雪莲”药材, 我们发现利用后者更为简捷。有关“雪莲”药材的分子鉴定试剂盒, 我们正在进行实验、比较与完善, 以求

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

获得最佳的分子鉴定程序。

参考文献:

[1] 连文琰, 肖培根. 雪莲原植物的调查整理[J]. 中药材, 1985, 6: 19.

[2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1992.

[3] 李观海, 刘 法, 赵荣春. 雪莲对大鼠实验性关节急性炎症的作用[J]. 药学学报, 1980, 15(6): 368-370.

[4] 王义权, 徐珞珊, 徐国钧, 等. DNA 分子遗传标记鉴别在生药鉴定中的作用前景[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 583-586.

[5] Yuan YM, Kupfer P. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. Pl Syst Evol, 1995, 196: 207-226.

[6] Shaw P C, But P H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. Planta Med, 1995, 61: 466-469.

[7] Cai Z H, Li P, Dong T T X, *et al*. Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis[J]. Planta Med, 1999, 65: 360-364.

天麻的组织培养及快速繁殖

蔡永萍[1], 于力文[1], 张鹤英[1], 陈帮国[2*]

(1. 安徽农业大学 生物工程系, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽省金寨县科委, 安徽 金寨 237300)

摘 要: 目的 利用组织培养方法快速繁殖成米麻作为种麻, 为寻找出一条简便可行的快繁天麻种麻的新途径提供理论依据。**方法** 天麻块茎或茎尖无菌离体培养, 米麻块茎诱导培养基为 1/2 MS+ 6-BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 香蕉 50 mg/L; 箭麻茎尖诱导培养基为 1/2 MS+ 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L。**结果** 小米麻经 50 d 无菌培养后开始生长出新米麻, 70 d 后原小米麻块茎上生长出多个分枝的新米麻; 箭麻茎尖超过 140 d 组织培养, 茎尖分化、诱导形成原球茎, 超过 160 d 培养原球茎长大并开花。**结论** 天麻可以用组织培养方法快速繁殖成米麻作为种麻。

关键词: 天麻; 块茎; 茎尖; 组织培养; 原球茎

中图分类号: R567 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-2670(2001)05-0445-02

Tissue culture and clonal propagation of Gastrodia elata

CAI Yong-ping[1], YU Li-wen[1], ZHANG He-ying[1], CHEN Bang-guo[2]

(1. Department of Biotechnology, Anhui Agricultural University, Hefei Anhui 230036, China; 2. Committee of Science and Technology of Jinzhai County in Anhui Province, Jinzhai Anhui 237300, China)

Abstract: Object To develop a new method for the culturing of *Gastrodia* Bl. *in vitro*, which may provide the theoretical basis of clonal propagation for its rapid reproduction. **Methods** The small stem tubers and the stem buds were used as explants to culture *in vitro* under sterile conditions. In the 1/2 MS medium containing 6-BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L and banana 50 mg/L, the small stem tuber was induced to form protocorm. In the 1/2 MS medium containing 6-BA 2 mg/L and NAA 0.2 mg/L, the stem bud was induced to form protocorm. **Results** Each stem tuber formed a new protocorm within 50 d, which can be separated again to form rosette protocorm within 70 d. The stem bud was cultured *in vitro* to form the protocorm within 140 d. The protocorm bloomed within 160 d. **Conclusion** The protocorm of *G. elata* may be induced from the stem tuber and stem bud. By subdividing these rosette protocorms a virtually indefinite clonal propagation can be achieved.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; stem tuber; stem bud; tissue culture; protocorm

天麻 *Gastrodia elata* Blume 是兰科植物中比较特殊的植物, 为兰科真菌营养型多年生草本植物, 没有根和绿叶, 自然条件下不能独立生存, 主要靠消化外部侵入的蜜环菌 *Armillariella mellea* 菌丝体过异养生活, 俗称赤箭、定风草、仙人脚等。自古以来均被列为名贵中药材, 以地下茎的干燥体入药, 不仅可治疗多种疾病, 而且还是极好的高级保健滋补食品。

近年来, 虽然天麻已由野生采挖发展成为人工栽培, 但随着药材部门需求量增多和出口量的增大, 加之人工栽培一直采用无性繁殖方法栽培, 所用的种麻已延用了十几代, 乃至几十代, 因长期多代繁殖, 带病毒植株逐年增多, 引起品种退化和产量下

* 收稿日期: 2000-07-18

作者简介: 蔡永萍(1964-), 女, 安徽省太湖人, 副教授。1988 年毕业于安徽师范大学生物系植物生理专业, 获农学硕士学位。同年分配到安徽农业大学生物工程系工作。主要从事植物生理生化、植物生物技术的研究工作。E-mail: cyphfnge@mail.hf.ah.cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net