厚朴 DNA分子标记的研究——正品的 RAPD研究

郭宝林[1*] , 吴 勐[1] , 斯金平[2] , 李家实[1] , 肖培根[3]

(1 . 北京中医药大学 ,北京 100029 ; 2 . 浙江省景宁县科委 ,浙江 景宁 323500 ;
3 . 中国医学科学院 、中国协和医科大学药用植物研究所 ,北京 100094)

摘要 : 目的 利用 RAPD技术探讨厚朴种内关系 、道地性问题 ;寻找正品厚朴 DNA指纹特征 。方法 选择代表厚朴主要分布区的 11 个产地 33 个的个体材料作为样本 ,经 DNA提取 ,用 74 个随机引物进行 PCR扩增 。结果 从 17 个引物中得到 116 条带 ,用于种内关系探讨 ,经聚类分析 ,得到 3 个主要分支及反映正品种及优良品种的特异性引物和条带 。结论 (1) 将厚朴分为 3 个地理宗更合适 ,分别是 :典型的厚朴 、典型的凹叶厚朴及中间类型 ,这与叶的形态等性状一致 ; (2) “川朴”及“温朴”有明显的遗传分化 ,且与有效成分相关 ,故厚朴的道地性主要来源于遗传差异 ; (3) 具有代表性的样品研究结果可用于正品厚朴 DNA指纹鉴别库的建立 。

关键词 : 厚朴 ; 凹叶厚朴 ; 过渡类型 ; RAPD; 道地性

中图分类号 : R282 .5 文献标识码 : A 文章编号 : 0513 - 4870(2001)05 - 0386 - 04

厚朴 Cortex *Magnoliae officinalis* 是最常用的中药之一 ,为木兰科植物厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils .) 和凹叶厚朴(*M. officinalis* var *biloba* Rehd . et Wils .) 的树皮 、根皮和枝皮 。由于市场的需求 ,药材被无控制采挖 ,野生资源已近枯竭 。厚朴现属于国家珍稀濒危保护植物 ,国家二级保护野生中药材 。目前药材厚朴几乎都来源于栽培 ,但栽培管理粗放 ,过度和不适当采收仍十分严重 ,药材质量极不稳定 。宋万志等曾先后报道市场上药材厚朴的地方习用品或伪品有 10 余种之多[1 - 4] ,反映出厚朴药材的紧缺和混乱 。

DNA分子标记技术在中药中正得到日益广泛的应用 ,引入该技术 ,可对药材进行真伪鉴别及优劣评价 。

两种正品——厚朴和凹叶厚朴的区别在于叶端的形态 ,前者先端短急尖或圆钝 ,后者凹缺呈二钝裂片 ,历来认为 ,四川东部和湖北西部产的厚朴药材紫色油润 ,统称紫油厚朴或川朴 ,是著名的道地药材 ,质量最好 ,其原植物为厚朴 *M. officinalis* ,而厚朴的第 2 大产区——浙江和福建产的药材 ,质量稍次 ,但又优于其他地区 ,作为厚朴的另一类道地药材——温朴 。宋万志等将温朴归为凹叶厚朴 *M. officinalis* var *biloba* ,《中国植物志》[5] 中记述分布于该地区的厚朴为凹叶厚朴 ,但《中国植物红皮书》[4] 引述的两种厚朴的产区是交叉的 ,即在浙江和福建 ,两种厚朴均有分布[6] 。斯金平等对全国厚朴的野生和栽培情况进行广泛调查后发现 ,以地理分布划分的温朴 ,其叶端形态呈现短急尖 、圆钝 、微凹 、凹缺呈或大或小的两裂片等连续的变异 ,这种变异普遍存在于居群内 ,甚至存在于个体内 。此外还观察了厚朴的其他形态特征 ,如芽鳞被毛与否 ,叶背具白粉或具柔毛等情况 ,认为正品厚朴应分为 3 个类型 : (1) 道地之“川朴” ,叶端形态稳定为急尖或圆钝 ,属于 *M. officinalis* ; (2) 道地之“温朴” ,叶端形态呈现连续变化 ,暂称之为中间类型(middle type) ; (3) 分布于广西北部和江西的为一类 ,叶端稳定为凹缺 ,属 *M. officinalis* var *biloba*[7,8] 。

斯金平将采自 11 个主要产区(包括了 3 种类型的分布区) 的厚朴种子种植于浙江省景宁县 ,加上原产地的 2 个居群 ,共 13 个居群 ,本文对其中的 11 个居群样本进行 RAPD研究 ,为这 3 种类型的划分提供佐证 ,也可为厚朴药材优劣及道地性的评价提供遗传学上证据 ,并可建立正品药材的 DNA指纹鉴别数据库 。为药材真伪的分子鉴别奠定基础 。

材 料 和 方 法

材料 1999 年 12 月 28 日采自浙江景宁 7 年生厚朴种源试验地 ,共采 11 个种源的 33 个个体(每个种源 3 个个体) 的厚朴叶芽 ,经硅胶快速干燥 。见表 1 ,其中叶片先端形态是划分厚朴和凹叶厚朴的

收稿日期 : 2000-07-17 .

作者简介 : 郭宝林 ,女 ,副研究员 .
* Tel :(010)64286974 , Fax :(010)64287510 ,
E- mail :blguo @btamail .net .cn

主要依据,斯金平[9]发现叶型与质量有一定的相关性。

仪器和试剂　离心机为 Heraeus 公司生产的 Biofuge Stratos,PCR 仪为 Perkin Elmer 公司生产的 GeneAmp PCR System 9600,电泳仪为 Bio-Rad 公司生产 Power PAC 300。常用试剂有:Taq 酶、DNA ladder(华美公司),dNTP、随机引物(上海 Sangon),EB(Sigma),β-巯基乙醇(Merck),Tris 碱(Gibco),EDTA(Amresco),琼脂糖凝胶(Spanish),其他溶剂均为分析纯。

DNA 提取　参照文献[6]并加以改进,将厚朴芽剥去外皮,在液氮环境下研磨成细粉状约 0.3 g。加入已预热的 2 × CTAB(β-巯基乙醇 1 %) 3 mL,65 ℃恒温 45 min,期间振摇几次。取出放置至室温,离心取上清液加氯仿-异戊醇(24∶1) 3 mL,离心,重复此步骤至界面澄清。取上清液加 2/3 体积的异丙醇,-20 ℃冷藏 1 h,12 000 r·min^{-1} 离心 15 min。弃去上清液,将沉淀晾干,用 TE 100 μL 溶解。

Tab 1　The sample resources of Cortex *Magnolia officinalis* and morphology of the leaf

Species	Leaf morphology	Samples No	Sources
M. officinalis	acute, obtuse	3,4,5	Hubei, Wufeng
		13,14,15	Hubei, Hefeng
		31,32,33	Hubei, Enshi
M. officinalis var *biloba*	emarginated, 2 lobates	1,2,6	Jiangxi, Lushan
		7,8,9	Guangxi, Ziyuan
Middle type	acute, obtuse, emarginate, 2 lobates	10,11,12	Zhejiang, Jinning
		16,17,18	Fujian, Pucheng
		19,20,21	Zhjiang, Suichang
		22,23,24	Sichuan, Guanxian
		25,26,27	Zhejiang, Tiantai
		28,29,30	Fujian, Guangze

PCR 扩增　反应体系 25 μL。模板 DNA 5 μL (5 - 10 ng),10 × Reaction Buffer 2.5 μL,2.5 mmol·L^{-1} dNTP 2 μL,25 nmol·L^{-1} Mg^{2+} 2 μL,ddH_2O 12 μL,Taq 酶 0.5 μL (1.5 U),引物 1 μL (15 ng)。

PCR 扩增程序为:预变性:94 ℃,10 min;扩增循环(45 cycles):94 ℃,1 min,36 ℃,1 min,72 ℃,2 min;延伸:72 ℃,10 min。

先进行引物筛选,再将筛选好的引物对所有的样本扩增,设不加模板的空白对照,每个引物重复 2 - 3 次。

结　果

从 S1 - S74(上海生工合成的随机引物,每一编号对应一个十碱基的核苷酸,序列略)筛选出 17 个条带清晰、多态性强而且重现性好的引物,分别是 S4,S10,S11,S17,S18,S20,S22,S27,S28,S29,S34,S37,S38,S39,S42,S43 和 S45。共得到 116 条带,其中多态性带 105 条,一致性带 11 条。引物 S20 对部分样本的扩增果见图 1。对扩增条带进行统计,每一位点有带记为"1"(强带和弱带同记),无带记为"0",得到数据矩阵,用 DICE 相似性系数计算相似性,用 UPGMA 法得到聚类图(计算软件为 NTSYS-pc),见图 2,以便进行样本间遗传关系的讨论。

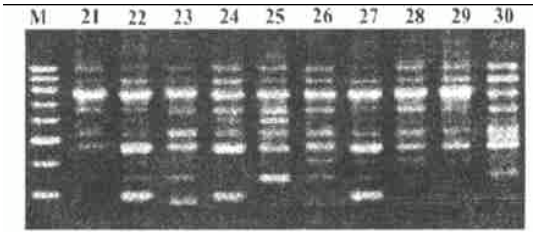

Fig 1　The amplified results of primer S20 for part samples

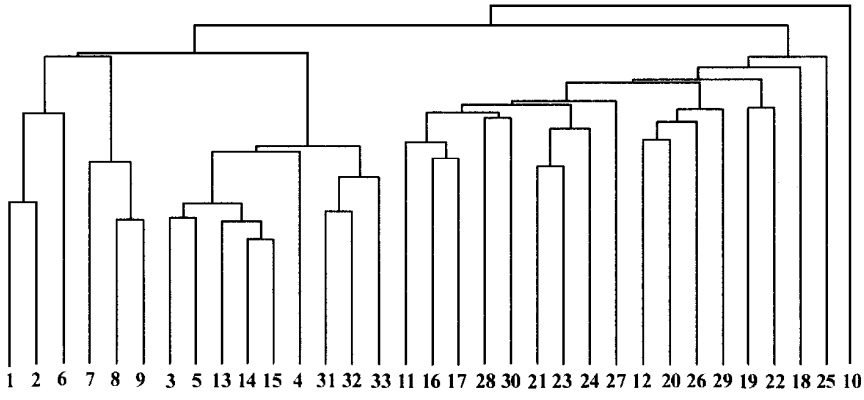

Fig 2　Cluster map from RAPD results (for the sample numbers see Tab 1)

由于 S23 ,S33 ,S53 和 S68 等 4 个引物的扩增产物完全一致,而且上述 116 条带中的 11 条带各样本表现也完全一致,可作为正品厚朴的鉴别特征参考引物和条带,但尚需进行伪品比较。在 116 条带中,6 条与样本 3 - 5 ,13 - 15 及 31 - 33 相关的相对特异条带,分别是 S10-4 ,S11-1 ,S11-3 ,S12-8 ,S29-1 和 S42-4 。

结 论 和 讨 论

1 根据 RAPD 结果建议将厚朴按叶型分为 3 个地理宗

从图 2 可见,RAPD 结果明显地把 33 个样本聚为 3 群,所划分的 3 个类群与叶形分化类型基本一致,与表型性状相关性研究的结论基本吻合[7,8]。其中典型厚朴的样本(3 - 5 ,13 - 15 ,31 - 33)分支的分辨率最好,不同来源间有一定的遗传分化;典型凹叶厚朴群(1 ,2 ,6 ,7 - 9)的支持率较差,但群内两个来源的样本遗传分化明显;中间类型的样本(10 - 12 ,16 - 30)则不同来源间与同一来源不同个体间的差异不明显(包括四川灌县的样本 22 - 24)形成一个复合的群体。三群在地理分布上有一定的区别,在叶端形态上呈现由凸尖至凹成 2 裂片的系列过渡变异,界限不清,建议在分类上分为 3 个地理宗。对照《中国植物志》等文献[5,6]的记述,原来属于凹叶厚朴的多数居群(分布于浙、闽)应属于中间类型。四川灌县在植物志中被归为厚朴的分布区,但由于研究样本来自栽培,种源不清,因而无法判断川西的野生居群是否可归入中间类型。

2 厚朴药材的道地性主要来源于遗传差异

斯金平等认为,传统产区的厚朴质量差异并非完全由当地的气候、土壤等环境因素作用于植物,而是厚朴群体已产生遗传分化,形成了有遗传差异的地理种源,“川朴”(典型厚朴)最好,“温朴”(中间类型厚朴)次之,而其他种源(凹叶型厚朴)最差,传统观点认为质量上乘的“川朴”(川鄂产厚朴)实际上应归功于其地方品种,品种类型决定了厚朴的质量[9]。由本研究结果可见,不同群体的遗传变异比较明显,并与厚朴酚类研究结果完全吻合[9],从遗传学的角度支持了“厚朴药材的道地性主要来源于遗传差异”的观点。

3 建立起正品厚朴的初步的 RAPD 指纹鉴别库

本研究取样面广,样品具有代表性,可以基本代表正品厚朴的所有类型,得到的扩增结果有着重要的参考价值。如 S23 ,S33 ,S53 和 S68 等 4 个引物及 11 条样本表现完全一致的条带,可作为正品厚朴的鉴别特征参考引物和条带,但还需进行伪品比较;而 6 条与优良药材-川朴(及典型厚朴)相关的相对特异条带 S10-4 ,S11-1 ,S11-3 ,S12-8 ,S29-1 ,S42-4 ,可用于道地之川朴的鉴定。其他药材也可用类似的反应条件和同样的引物,得到的结果与本研究进行比较而确定其来源。

4 RAPD 技术为厚朴良种选育提供了新的途径

RAPD 聚类图上可看出不同群体的遗传变异比较明显,并与厚朴酚类研究结果完全吻合[9],对于药材厚朴,RAPD 技术不受其含量的因素如药材来源、采收部位、生长年限、树皮厚度及储藏时间等的影响,可利用与药材质量相关的 RAPD 图谱特征在厚朴幼林阶段或苗期进行质量早期预测,加快厚朴良种选育的进程。

REFERENCES:

[1] Song WZ, Chen JM, Ji QY. Studies on the medicinal plants of *Magnoliaceae* [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1984, **19**(3):213 - 219.

[2] Song WZ, Cui JF, Zhang GD. Studies on the medicinal plants of *Magnoliaceae* Turhourpo of *Manglietia* [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1989, **24**(4):295 - 299.

[3] Xu CQ, Su SW, Sui CH. Species systematization and quality evaluation of commonly used Chinese Traditional drugs [A]. *Studies on Material Medicine of "Houpo" in Lou Zhi-qin Qin Bo* [M]. North-China edition vol. 2, Bejing: Peking Union Medical College United Press and Bejing Medical University, 1995.211 - 297.

[4] Li SF, Zhu F, Wang JH. Identification of Cortex *Magnoliae officinalis* and its adulterants in Zhejiang [J]. *J Chin Med Mater* (in Chinese), 1992, **15**(2):16 - 18.

[5] Liu YH, Magnoliaceae [A]. Wu ZY. *Flora of China* [M]. Vol. 30(1). Beijing: Scientific Press, 1996.119 - 121.

[6] Fu LG. *Red Book of Chinese Plants* [M]. Beijing: Science Publishing House, 1992.416 - 417.

[7] Si JP. Study on genuineness of traditional Chinese medicine Cortex *Magnoliae officinalis* [J]. *J Chin Med Mater* (in Chinese), 2000, **23**(7):373 - 375.

[8] Si JP, Pan JP, Tong ZK, *et al*. Study on the relationship between provenance, leaf tupe and quality in *Magnolia officinalis* [J]. *J Chin Med Mater* (in Chinese), 1998, **21**(11):541 - 543.

[9] Gu HY, Qu LJ, Ming XT, *et al*. *Plant Genes and Molecular Manipulations* [M]. Beijing: Peking University Press, 1995.19 - 23.

RESEARCH ON DNA MOLECULAR MARKER OF *MAGNOLIA OFFICINALIS* REHD. ET WILS. —— RAPD STUDY ON CERTIFIED SPECIES

GUO Bao-lin[1] , WU Meng[1] , SI Jin-ping[2] , LI Jia-shi[1] , XIAO Pei-gen[3]

(*1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine , Beijing 100029 , China ; 2. Sciences and Technology Association of Jingning of Zhejiang Province , Jingning 323500 , China ; 3. Institute of Medicinal Plant Development , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Beijing 100094 , China*)

ABSTRACT: AIM To discuss the intraspecific relationship in *Magnolia officinalis* and the genuineness of Cortex *Magnoliae officinalis* , and to find some DNA characters of certified " Houpo" . **METHODS** Thirty-three samples from eleven locations , which can represent most of the distribution of *M. officinalis* , were selected. The total DNA was extracted. Severty-four random primers were tried to get good amplification. **RESULTS** One hundred and sixteen bands amplified from seventeen primers , were clustered by NTSYS-pc software. Three branches were obtained. Some distinctive primers and bands , which represent certified species or fine breed , were obtained also. **CONCLUSION** 1) *M. officinalis* should be divided into three geographic clans instead of two subspecies or varieties , they are , a) typical *officinalis* , b) typical *biloba* and c) Middle type. This conclusion agrees with the leaf form and other characters. 2) The genetic difference between " Chuanpo" and " Wenpo" is evident and the difference is in correspondence with the quantities of their chemical constituents. So , the genetic difference is the main reason of the genuineness of Cortex *Magnoliae officinalis* . 3) These results may be used to establish DNA database for identification of Cortex *Magnoliae officinalis* .

KEY WORDS: *Magnolia officinalis* ; *M. officinalis* var *biloba* ; Middle type ; RAPD; genuineness