

中药黄芪原植物的分子遗传学研究及其分类地位探讨

钱 丹¹, 陈 敏¹, 袁庆军¹, 崔光红¹, 黄璐琦^{1*}, 肖培根²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国医学科学院, 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 中药黄芪原植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.、蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 和淡紫花黄芪 *A. pallidipurpureus* stat. nov. 的分类学地位至今仍然存在一定的争议。通过分子生物学实验对三者的叶绿体 *trnH-psbA* 序列进行了比较研究, 结果表明, 三者在 DNA 分子水平上存在差异。结合形态特征考察, 建议将淡紫花黄芪作为独立的种处理。

关键词: 膜荚黄芪; 蒙古黄芪; 淡紫花黄芪; 叶绿体 *trnH-psbA* 序列

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1429-05

A taxonomic study on the original plant of *Radix Astragali*

QIAN Dan¹, CHEN Min¹, YUAN Qing-jun¹, CUI Guang-hong¹, HUANG Lu-qi^{1*}, XIAO Pei-gen²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: There are dispute about the status of taxonomy among *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge, *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. and *A. pallidipurpureus* stat. nov. The varieties and taxa of the complex are still in need of revision. With molecular biology study used *trnH-psbA* intergenic region, the taxonomic revision of *Radix Astragali* has been made. *A. pallidipurpureus* stat. nov. is suggested as a new species.

Key words: *A. membranaceus* (Fisch.) Bge; *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao.; *A. pallidipurpureus* stat. nov.; *trnH-psbA* intergenic region

2005 版《中国药典》中收载蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根作为正品^[1]。淡紫花黄芪 *A. pallidipurpureus* stat. nov. 是中国黄芪属特有植物, 《中国植物志》记载^[2]淡紫花黄芪分布于甘肃、宁夏、青海及四川 (西北部), 与膜荚黄芪具有同样的药用价值。

中药黄芪原植物即膜荚黄芪、蒙古黄芪和淡紫花黄芪中存在多个变异类群, 它们在形态上十分相似, 难以区分, 不同学者对三者的分类学地位持不同观点。本文在前人研究的基础上, 采用居群的观点, 借

助现代分子生物学技术, 从 DNA 分子水平上研究黄芪原植物的亲缘关系, 拟探讨中药黄芪原植物的分类学地位, 明确中药黄芪的基源。

材料与方法

研究所用材料采自甘肃、内蒙古、山西、黑龙江、吉林和山东六省 (表 1), 为野外硅胶快速干燥的新鲜叶片, 凭证标本保存于中国中医科学院中药研究所标本馆 (CMMI), 经中国科学院植物研究所朱相云教授鉴定。

采用改进溴化十六烷基三甲基铵 (cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB) 法提取总 DNA, *trnH-psbA* 片段的扩增引物为 *trnH* (5'-CGCGCATGGTGGATTC ACAATCC-3') 和 *psbA* (5'-GTTATGCATGAACGTAA

收稿日期: 2009-05-11.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI08B05-03).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2956, Fax: 86-10-84027175,

E-mail: huangluqi@263.net

TGCTC-3')。扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Personal PCR 扩增仪上进行, 反应体系为 20 μL , 内含: DNA 50 ng、10 $\times$ PCR Buffer 2 μL 、dNTP 2 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物 0.5 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下游引物 0.5 μL 、ExTaqDNA 酶 1 u、ddH₂O 补足总体积 20 μL 。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物直接用美国应用生物系统公司的 BDT (BigDye Terminator) v3.1 试剂盒进行测序 PCR 扩增, 反应体系为 10 μL , 包括: 1 μL 上述 PCR 产物、引物 (3.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL 、BigDye 染料 1 μL 、ddH₂O 6 μL 。测序程序为: 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 共 25 个循环。产物用酒精/EDTA/NaAc 法纯化, 在 Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer 上进行测序。

测序结果用 Contig Express 软件进行序列的校对排序, 并加以手工适当校正。然后用软件 ClustalX version 1.81 比对排列, 所有的插入 (indels) 或缺失 (gaps) 视同相同的突变。所有的序列校对正确后, 统计 cpDNA 单倍型。用程序 HAPLONST 计算 cpDNA 的居群内遗传多样性 h_s 和总的遗传多样性 h_T , 居群

间遗传分化系数 G_{ST} 。用 TCS version 1.13 软件构建单倍型网状进化树。

结果

1 序列变异分析

黄芪 21 个居群 407 个个体叶绿体的 *trnH-psbA* 基因间序列排列后的长度为 331 bp, 没有长度多样性。A/T 含量丰富, 达 74.29~74.45%, 这与大多数叶绿体 DNA 基因间区碱基组成成分相符。12 个位点发生了核苷酸的变异, 形成了 10 个单倍型 (Hap1~Hap10)。这 10 种单倍型序列注册于 GenBank 数据库中, 注册号分别为 GQ139474~GQ139483。单倍型序列进行比较后共发现 8 个变异位点 (表 2)。插入或缺失分别为: 15 bp、31 bp、89 bp、108 bp、109 bp、131~132 bp (2 bp)、133~139 bp (7 bp)、240 bp。

2 多样性指数和单倍型分布

通过 HAPLONST 程序计算出全部黄芪原植物的居群内遗传多样性 h_s 值、总的遗传多样性 h_T 值、居群间遗传分化系数 G_{ST} 分别为: 0.326、0.766、0.575。黄芪的每个居群单倍型数量、单倍型组成及频率见表 3。

在黄芪 21 个居群 407 个个体中, 10 种单倍型的频率分别是: Hap1=0.098、Hap2=0.467、Hap3=0.130、

Table 1 Origin of materials

Serial number	Locality	Taxon	Samples
AMGSSCW	Zhangxian, Gansu, China	<i>A. pallidipurpureus</i>	20
AMGSWYW	Weiyuan, Gansu, China	<i>A. pallidipurpureus</i>	20
AMNMGYW	Guyang, Inner Mongolia, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMSXHYW	Hunyuan, Shanxi, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMSXYXW	Yingxian, Shanxi, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMNMERW	E'ergula, Inner Mongolia, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMGLXC	Longxi, Gansu, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	19
AMNMGYC	Guyang, Inner Mongolia, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	19
AMNMWCC	Wuchuan, Inner Mongolia, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMNMWLC	Wulate, Inner Mongolia, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMSXHYC	Hunyuan, Shanxi, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMSXYXC	Yingxian, Shanxi, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMGSWYC	Weiyuan, Gansu, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMGSSCC	Zhangxian, Gansu, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMMHLJC	Hegang, Heilongjiang, China	<i>A. membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	20
AMJLTHW	Tonghua, Jilin, China	<i>A. membranaceus</i>	14
AMSDLYC	Linyi, Shandong, China	<i>A. membranaceus</i>	15
AMSDZBC	Zibo, Shandong, China	<i>A. membranaceus</i>	20
AMSDHZC	Heze, Shandong, China	<i>A. membranaceus</i>	20
AMJLSPC	Siping, Jilin, China	<i>A. membranaceus</i>	20
AMJLTHC	Tonghua, Jilin, China	<i>A. membranaceus</i>	20

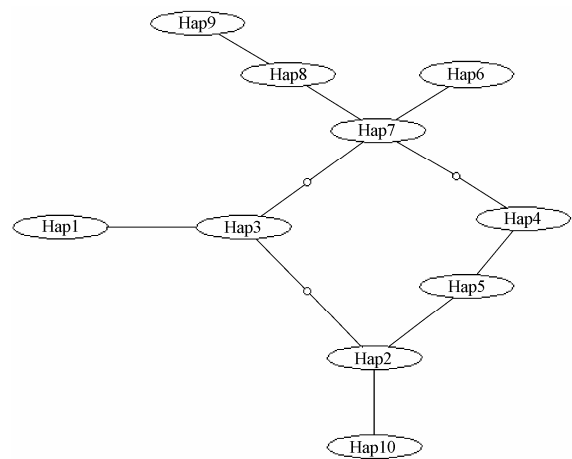
“W” and “C” denote wild and cultivation in Serial number

Variable site (No)	<i>trnH-psbA</i> / bp							
	15	31	89	108	109	131	133	240
Hap1	T	T	-	-	-	-	#	-
Hap2	-	T	-	-	T	-	#	A
Hap3	T	T	-	-	T	-	#	-
Hap4	-	T	-	-	T	*	-	A
Hap5	-	T	-	-	T	*	#	A
Hap6	T	T	-	T	T	*	-	-
Hap7	T	T	-	-	T	*	-	-
Hap8	T	T	A	-	T	*	-	-
Hap9	T	-	A	-	T	*	-	-
Hap10	-	T	-	T	T	-	#	A

Hap4 = 0.025、Hap5 = 0.002、Hap6 = 0.032、Hap7 = 0.182、Hap8 = 0.052、Hap9 = 0.002 和 Hap10 = 0.010。

应用 TCS 程序构建 10 个单倍型的网状进化树(图 1)。这种方式应用溯祖理论来推测单倍型间的亲缘关系,可信度在 95%以上。

膜荚黄芪、蒙古黄芪和淡紫花黄芪皆隶属于豆科蝶形花亚科黄芪属黄芪亚属膜荚组。对于蒙古黄芪的



分类学地位,不同学者观点不尽相同。主要的观点如下:① 蒙古黄芪为变种:经典分类学主要依据子房有毛与否,小叶大小和数目将蒙古黄芪作为膜荚黄芪的变种处理^[3, 4]。② 蒙古黄芪为亚种:朱相云^[5]根据花粉形态特征,认为蒙古黄芪为膜荚黄芪的亚种较为合适。③ 蒙古黄芪为独立的种:王尔彤^[6]根据膜荚黄芪和蒙古黄芪的花期,一年生茎的直立,匍匐状态,花中小苞片的着生位置及染色体的差异,提出将蒙古黄芪作为独立种处理的意见。许多研究者支持将蒙古黄芪作为独立种处理的观点^[7-9]。④ 也有作者认

Population	Samples	CpDNA haplotype									
		Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10
AMGSSCW	20	20									
AMGSWYW	20	20									
AMMNMGYW	20		16	1	2	1					
AMMSXHYW	20		17	3							
AMMSXYXW	20		16	3	1						
AMMNMERW	20			20							
AMMGSLXC	19		14	4	1						
AMMNMGYC	19		17	2							
AMMNMWCC	20		17	3							
AMMNMWLC	20		13	2	3						2
AMMSXHYC	20		18	2							
AMMSXYXC	20		19								1
AMMGSWYC	20		15	5							
AMMGSSCC	20		15	5							
AMMHLJC	20		13	3	3						1
AMSDLYC	15						2	10	3		
AMJLTHW	14						6	5	2	1	
AMSDZBC	20							18	2		
AMSDHZC	20						1	16	3		
AMJLSPC	20						1	10	9		
AMJLTHC	20						3	15	2		

为膜荚黄芪、蒙古黄芪应作为一个种处理^[10]。

对于淡紫花黄芪的分类学观点如下：① 淡紫花黄芪为变型：肖培根等^[3]在1964年，将淡紫花黄芪作为变型 (*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *membranaceus* f. *pallidipurpureus* Hsiao f. nov.) 处理。1980年，何业祺将淡紫花黄芪处理为一新变种，1993年，何又将淡紫花黄芪降级处理为变型^[4]。傅坤俊等在《中国植物志》中亦作为上述处理。② 淡紫花黄芪为变种：史刚荣^[10]根据核型分析，认为淡紫花黄芪为膜荚黄芪的变种 (*A. membranaceus* var. *purpurinus* Y.C.Ho)。③ 淡紫花黄芪为亚种：朱相云^[11]通过对药用黄芪野生资源的调查，结合查阅大量标本及考证模式标本，认为淡紫花黄芪作为膜荚黄芪的亚种 (*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. Sub sp. *Pallidipurpureus* (Hsiao) X.Y.Zhu et C.J.Chen.) 比较合适。

本研究结果表明，淡紫花黄芪的2个居群的40个个体拥有特有单倍型 Hap1。蒙古黄芪所有居群拥有单倍型 Hap2、Hap3、Hap4、Hap5 和 Hap10。大部分蒙古黄芪 (190/258 = 73.6%) 拥有单倍型 Hap2。膜荚黄芪拥有单倍型 Hap6、Hap7、Hap8 和 Hap9 4种单倍型，大部分膜荚黄芪 (74/109 = 67.9%) 拥有单倍型 Hap7。从单倍型的分布和网状进化树可以看出，在所研究的 407 份材料中淡紫花黄芪拥有独特的单倍型 Hap1，能与蒙古黄芪和膜荚黄芪明显地区分开。膜荚黄芪和蒙古黄芪拥有一些专属单倍型，相互之间没有交叉。

根据由叶绿体单倍型绘制的网状进化树，可以看出淡紫花黄芪与蒙古黄芪的单倍型，都由进化树的中心即膜荚黄芪的单倍型衍射开^[12]。可见膜荚黄芪是较原始类群，而蒙古黄芪和淡紫花黄芪是先后从膜荚黄芪分化出的变异类群。单倍型进化树对于各种黄芪间的系统位置的处理显示出与形态学处理有明显的相似性，特别是淡紫花黄芪独特的单倍型与紫色花。

主要基于中国科学院植物研究所标本馆 (PE) 馆藏腊叶标本的研究，同时辅以对我国黄芪分布比较集中的甘肃地区进行了野外考察，黄芪3种不同来源的原植物在形态上的区别以检索表的形式表示如下：

1. 花黄色或黄白色，花较大，12~20 mm
2. 小叶排列稀疏，6~13 对，小叶椭圆状卵形，较大，长达 15 cm，……膜荚黄芪 *A. membranaceus*
2. 小叶排列紧密，12~18 对，较小，通常不超过 10 mm。……蒙古黄芪 *A. membranaceus* var. *mongholicus*

1. 花紫色或紫黑色，花较小，8~15 mm。……淡紫花黄芪 *A. pallidipurpureus*

传统的形态鉴别上，选取尽可能多的性状，主要观察它们的变异幅度以及各个性状之间的相互关系就可区分开3种原植物。运用现代的分子生物学手段，利用单倍型，在实验所使用的材料中也可以达到100%的鉴别。*trnH-psbA* 片段成功地应用于中药黄芪原植物的鉴别，对 *trnH-psbA* 片段在中药鉴定中的应用做出有益的尝试，是对传统鉴别方法的一个很好的补充和验证。

综上，作者支持蒙古黄芪为变种 *Amembranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao.) 的观点，建议淡紫花黄芪作为独立种 (*A. pallidipurpureus* stat. nov) 处理，墨线图见图2。



Figure 2 *A. pallidipurpureus* stat. nov

致谢：本文承蒙韦家福先生绘制墨线图，在此表示感谢。

References

- [1] The State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 59.
- [2] Fu JK. Flora of China (V 42) (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1993: 131–135.
- [3] Xiao PG, Feng YJ, Cheng JR, et al. The research on original plant and pharmacognosy of *Radix Astragali* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1964, 11: 114–128.
- [4] He YQ. Prascursores florae *Astragalum sinensium* (1) [J]. Bull Bot Lab North - East Forest Inst (东北林学院植物研究室汇刊), 1980, 8: 53–54.
- [5] Zhu XY. Revision of the *Astragalus penduliflorus* complex

- (Leguminosae Papilionoidae) [J]. Nord J Bot, 2003, 23: 283–294.
- [6] Wang RT, Liu MY. A comparative biology study on the two medicinal *Astragalus* [J]. Bull Bot Res (植物研究), 1996, 16: 85–91.
- [7] Bai XL, Zhang L, Qiao YX, et al. On the ultrastructure of Mongolian Milkvetch (*Astragalus mongholicus*) and a comparison of their isozymes and lipase [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1994, 25: 479–481.
- [8] Shi GR. Analysis on female stamen and embryonic development of *Astragalus membranaceus* Bung. and *A.membranaceus* var. *mongolicus* (Bunge) Hsiao [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2000.
- [9] Zhao YZ. Taxonomy and floristic geographical distribution of the Chinese medicinal Huangqi [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2006, 26: 532–538.
- [10] Shi GR. Cluster analysis for karyotype of *Astragalus penduliflorus* Lam.complex (Leguminosae) [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2003, 23: 220–223.
- [11] Zhu XY, Chen JR. A new gradation of *Astragalus* L. [J]. Bull Bot Res (植物研究), 1995, 15: 50–51.
- [12] Templeton AR. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes [J]. Mol Ecol, 2001, 10: 779–791.

超越系列 XP 天平新增质量管理功能

继 2008 年推出良好的称量管理规范 (GWP®) 后, 梅特勒-托利多又在 2009 年将这一规范内置在超越系列 XP 天平中, 推出了全新质量管理体系 GWP Excellence™, 帮助客户避免风险, 保证质量, 降低成本, 符合法规。GWP Excellence™ 集成了独特的安全功能, 包含了砝码管理、测试程序管理、任务管理和测试数据记录储存等等实际功能, 您只需将 GWP® 建议书或自己系统中的标准操作规程 (SOP) 信息输入至天平, 在天平触摸屏上轻触数次, 就能轻松设置参数, 确保天平始终正确而准时地进行测试, 确保您的流程符合法规和质量管理体系要求。GWP Excellence™ 质量管理功能不但包含在新超越系列 XP 天平中, 对于客户正在使用中的超越系列 XP 天平也可通过升级的方式获得此项功能。如需升级服务, 请致电 4008878989。

如想获取更多有关 GWP® 的信息, 请登陆 www.good-weighing-practice.com。