

不同板蓝根种质比较研究

谢晓亮^{1,2}, 温春秀¹, 吴志明¹, 田伟¹, 刘铭¹, 刘玉军²

(1. 河北省农林科学院药用植物研究中心, 河北 石家庄 050051; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 板蓝根是防治病毒性感冒的核心药材, 目前我国栽培的板蓝根种质较多, 归纳有大叶板蓝根、小叶板蓝根和四倍体板蓝根三大类型, 针对这三种形态特征明显不同的板蓝根种质, 进行了生物学特征、种子形态特征、农艺性状以及药用成分含量等的比较研究, 通过比较发现, 小叶板蓝根优于四倍体板蓝根, 而四倍体板蓝根优于大叶板蓝根。

关键词: 板蓝根; 种质; 评价

中图分类号: S567 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0126-05

Research on the Comparing Different *Radix Isatidis* Germplasm Resources

XIE Xiaoliang^{1,2}, WEN Chunxiu¹, WU Zhiming¹, TIAN Wei¹, LIU Ming¹, LIU Yujun²

(1. The Medicinal Plant Center of Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences,

Shijiazhuang 050051, China; 2. The College of Biological Science and Technology

of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: *Radix isatidis* is the important Chinese medicinal materials for anti-virus. In this paper the different germplasm resources of *Radix isatidis* in China, which are big-leaf and little-leaf varieties with diploidy and the tetraploidy, are evaluated. We compared the biological characters, seed shape, agricultural characters, molecular evolution and chemical constituents of the three germplasm resources. From these comparings, we concluded that the little-leaf *Radix isatidis* is better than the tetraploidy *Radix isatidis*, and the tetraploidy is better than the big-leaf *Radix isatidis*.

Key words: *Radix isatidis*; Germplasm resources; Evaluation

板蓝根是我国传统常用中药材。2005年版《中国药典》记载: 板蓝根为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根, 别名北板蓝、大青根等, 其叶为大青叶。板蓝根味苦、性寒, 归心、胃经^[1], 具有清热解毒、凉血利咽等功效^[2-4], 具有抗菌、抗病毒、抗内毒素、抗炎、增强免疫功能^[5,6]、抗乙型肝炎^[7]等多种作用; 近年来的研究证实, 板蓝根内含有多种抗病毒成分, 对感冒病毒、腮腺炎病毒、肝炎病毒及流脑病毒等有较强的抑制和杀灭作用^[4,8-10]; 主治流行性感冒、流行性腮腺炎、乙型脑炎、传染性肝炎、咽喉肿痛等症^[11,12]。它是板蓝根冲剂、板蓝根针剂、三九感冒灵、康必得等感冒和抗病毒类中成药的主要原料。

在临床上常用板蓝根单味或与贯众、金银花、野菊花等合用以治疗感冒和流感等传染病及热性病。然而, 由于在板蓝根种质方面的研究基础薄弱, 板蓝

根的种质混杂, 品种混乱, 各种质的板蓝根药效、产量、药材性状均不相同^[13], 因此在投料、服用剂量方面很难控制, 致使药效难以稳定, 即使是同一药方或制剂, 由于采用原料不同, 其效果会有一定差异。目前, 我国正在推行中药材规范化生产, 进行 GAP 基地种植, 要求采用纯正、优良的品种, 进行规范化种植, 从源头上提高和稳定药材质量。为掌握板蓝根不同种质间的药效差异, 本研究针对目前生产上种植的大叶板蓝根、小叶板蓝根和四倍体板蓝根三大种质类型进行了抑菌及抗病毒效果方面的比较研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

小叶板蓝根、大叶板蓝根、四倍体板蓝根种子来源于河北省农林科学院药用植物研究中心“河北省药用植物种质资源库”。

收稿日期: 2007-04-28

作者简介: 谢晓亮 (1962-), 男, 河北清苑人, 在读博士, 研究员, 主要从事中药材栽培、育种研究

通讯作者: 刘玉军 (1962-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源开发利用研究。

1.2 方法

1.2.1 材料种植 3 种板蓝根种子材料在药用植物中心大河试验区种植, 每小区面积 6 m × 6 m, 重复 3 次, 统一管护、统一调查、统一采收。

1.2.2 种子发芽率测定 取板蓝根种子 50 粒, 分散置于 3 cm 厚湿沙的托盘上, 上盖 2 层湿纱布, 置于 20℃ 培养箱中, 12 d 后统计发芽数量, 重复 3 次。

1.2.3 AFLP 鉴定方法 DNA 提取采用小量 CTAB 法, AFLP 方法按照鼎国生物技术公司的产品试剂盒说明书来进行。总 DNA 以 *Eco*R I 和 *Mse* I 双酶切, 然后加入 *Eco*R I 和 *Mse* I 接头和 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 其中所用的 *Eco*R I 接头为: 5'-CTC GTA GACTGC GTA CG 3', *Mse* I 接头为: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'。酶切连接产物用稀释 10 倍后用于 AFLP 预扩增反应模板, 预扩增的引物为 *Eco*R I 预扩引物序列: E1: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3', *Mse* I 预扩引物序列: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AG-3'。扩增反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min; 26 个循环后, 72℃ 再延伸 10 min。预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增的模板。选择性扩增引物序列为 *Eco*R I 和 *Mse* I 的核心引物

序列加上 3 个选择性碱基。采用的引物组合为 *Eco*R I/*Mse* I 引物组合(表 1)。扩增反应条件: 第一轮扩增参数: 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 80 s; 以后每轮循环温度递减 0.7℃, 扩增 12 轮; 接着按下列参数扩增 23 轮: 94℃ 30 min, 55℃ 30 s, 72℃ 80 s。

选择性扩增产物取 1 μL 加入 12 μL 甲酰胺, 0.4 mol/L *lg*s-500 ROX 内标, 混合 94℃ 4 min, 迅速冰上放置 4 min。上样, 胶为 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 在 ABI377 测序仪上进行片段扫描。将电泳图谱的同一位置上的条带视为一个性状, 有条带记为“1”, 无条带记为“0”。数据分析用 GeneScan 和 Genotyper™ 软件分析处理, 峰值大于 200 的 50~500 bp 之间条带记为有效带。运用 NTSYSpc 2.1 软件分析计算 NeiLi 遗传距离和相似系数, 聚类分析采用 UPGMA 方法构建系统发育树。

1.2.4 板蓝根浸出物测定方法 按照《中国药典》2005 年版一部“醇溶性浸出物测定法”项下的热浸法(附录 XA)测定”。

1.2.5 大青叶靛玉红含量测定方法 按照《中国药典》2005 年版一部“高效液相色谱法”(附录 VID)测定。

表 1 不同板蓝根种质叶片性状比较(n= 10)

Tab.1 The comparison of different sperm sources from *Radix isatidis* (n= 10)

种质 Gemplasm	叶片形状 Leaf shape	叶片颜色 Leaf colour	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width	单片叶重/g Weight of per leaf	叶片数/(个/株) No. of leaves	鲜叶总重/(g/株) Fresh leaf weight
小叶板蓝根 Little leaf <i>Radix isatidis</i>	细长平整	浅绿色	26.97	4.190	3.326	26	87
大叶板蓝根 Big leaf <i>Radix isatidis</i>	宽大平整	深绿色	28.03	5.022	3.900	30	145
四倍体板蓝根 Tetraploidy <i>Radix isatidis</i>	宽大皱缩	深绿色	30.87	5.924	4.776	38	290

2 结果与分析

2.1 形态特征比较

从叶型上看(表 1), 3 种板蓝根植株形态明显不同, 小叶板蓝根叶片平整、窄而细长、颜色浅绿、单株叶片数 26 片左右; 大叶板蓝根叶片宽大平整、深绿色、单株叶片数 30 片左右; 四倍体板蓝根叶片宽大, 有明显皱褶、深绿色、单株叶片数 38 片左右, 叶鲜质量为 290 g, 明显高于大叶板蓝根 145 g 和小叶板蓝根 87 g。

2.2 种子生物学特性比较

小叶板蓝根种子为一种角果, 长椭圆形, 颜色蓝紫色, 角果翅质地较薄, 易碎, 角果较细长, 种子较小, 百粒重 0.69 g。

大叶板蓝根种子, 角果, 长椭圆形, 种子较大, 颜色蓝紫较暗, 角果翅质地较好, 不易碎, 角果较宽百

粒重 0.98 g。

四倍体板蓝根种子: 与大叶板蓝根种子形状相似, 角果, 倒卵圆形, 种子较大, 颜色蓝紫较暗, 角果翅质地较好, 不易碎, 角果较宽百粒重 1.04 g。

小叶板蓝根、大叶板蓝根和四倍体板蓝根 3 种种质的种子发芽率都较高, 分别为 91%, 88%, 85% (图 1, 表 2)。



图 1 板蓝根种子形态比较

Fig.1 The seed shape characters of *Radix isatidis*

表 2 板蓝根种子形态特征比较(n= 10)

Tab.2 The seed shape characters of *Radix isatidis*(n= 10)

种质 Gemplasm	种子外形 Seed shape	种子长/mm Seed length	种子宽/mm Seed width	种子厚度/mm Seed thickness	种子百粒重/g 100 seed weight	发芽率/% Germination rate
小叶板蓝根 Little leaf <i>Radix isatidis</i>	长椭圆形	13.5	3.5	0.132	0.691	91
大叶板蓝根 Big leaf <i>Radix isatidis</i>	长椭圆形	14.5	4.6	0.156	0.981	88
四倍体板蓝根 Tetraploidy <i>Radix isatidis</i>	倒卵形	15.5	4.9	0.197	1.037	85

2.3 农艺性状比较

小叶板蓝根植株形态: 茎直立, 叶片较小, 长圆状椭圆形, 叶色灰绿色、浅绿色, 质薄, 向上斜伸, 平均叶长 25.1 cm, 宽 4.2 cm。根冠比为 1/ 1.3; 根部生长量小于叶部生长量; 主根深长, 根较少分枝。平均鲜根粗 2.20 cm; 根平均鲜质量 65 g/ 株, 平均干质量 19.9 g/ 株, 折干率 30.85%。

大叶板蓝根植株形态: 茎直立, 叶片长圆状椭圆形, 叶片较大, 叶色深绿色, 质厚, 向上斜伸。同四倍体板蓝根板蓝根叶子相似。最大鲜叶长 28.0 cm, 叶宽 5.0 cm。主根明显, 多分枝。平均鲜根粗 1.42 cm, 根长 20.25 cm。平均鲜质量 35.5 g/ 株, 平均干质量 9.4 g/ 株, 折干率 26.48%。

四倍体板蓝根植株形态: 基生叶深绿色, 叶片较大, 质肥厚, 基部下延成柄, 长椭圆形, 叶色深暗绿。叶较大, 叶数较多。根冠比为 1/ 4.2。叶的生长量大于根的生长量。主根明显, 多分枝。平均根长 22 cm, 根粗 1.7 cm。平均单株根鲜质量 69.51 g/ 株, 平

均干质量 17.8 g/ 株, 折干率 25.61%。

3 种板蓝根种质, 根的产量小叶板蓝根和四倍体板蓝根产量较高, 大叶板蓝根的产量最低。但就它们的商品性和质量来说, 小叶板蓝根较好, 主根长, 根分枝极少, 而四倍体板蓝根虽然产量也较高, 但其主根较短并且分枝较多。

表 3 板蓝根根性状比较(n= 10)

Tab.3 The comparation on root characters of *Radix Isatidis*(n= 10)

种质 Gemplasm	根长 / cm Root leghgh	根粗 / mm Root diameter	侧根数 /(个/ 株) Amount of side root	根重 /(g/ 株) Root weight
小叶板蓝根 Little leaf <i>Radix isatidis</i>	33.56	2.22	0	64.5
大叶板蓝根 Big leaf <i>Radix isatidis</i>	20.25	1.42	3	35.5
四倍体板蓝根 Tetraploidy <i>Radix isatidis</i>	23.40	1.71	2	69.5

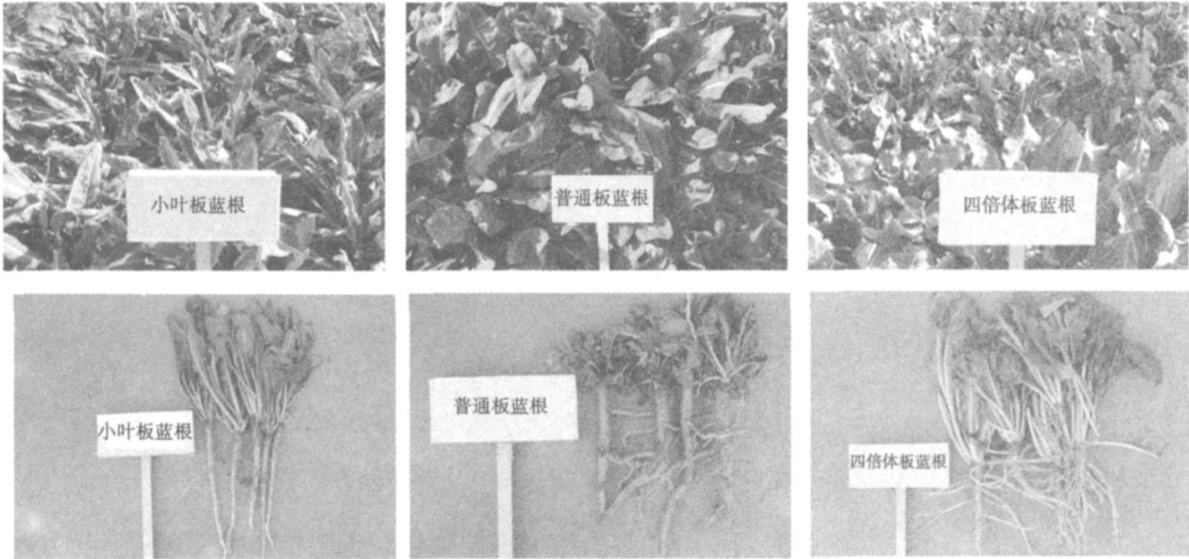


图 2 板蓝根植株形态比较

Fig.2 The comparation on biological characters of *Radix isatidis*

2.4 板蓝根分子生物学(AFLP)鉴定

采用荧光标记的 AFLP 技术, 通过试验筛选出了 8 对扩增片段数较多, 多态位点百分比较高的引物, 对归纳出的 5 个种质的板蓝根材料进行了遗传

多态性分析:

通过选择性引物扩增不同板蓝根种质资源的 AFLP 荧光指纹图谱(图 3), 利用 IFFGA 分析软件计算 Nei Li 遗传距离和相似系数, 根据 8 个选择性引

物对 5 个种质板蓝根检测的数据分析, 结果表明, 板蓝根的种质资源的遗传距离为 0.471 2~ 0.684 0, 平均为 0.581 8, 以上数据说明这 5 个种质的板蓝根的遗传差异较大, 采用 UPGAM 方法构建系统树图, 5 个种质明显分为两组, 种质 1、种质 2 为一类(小叶板蓝根), 种质 4、种质 5 为第二类(四倍体板蓝根), 种质 3 为第三类(大叶板蓝根), 第二和第三类亲缘关系较近, 表明四倍体板蓝根可能是以大叶板蓝根为材料加倍获得的, 与第一类的相似性程度较低, 相似性系数最低为 0.54, 亲缘关系较远(图 4)。

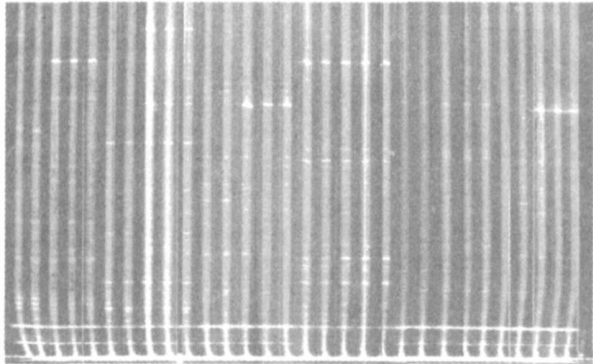


图 3 板蓝根种质资源的 AFLP 片段多态性分析
Fig.3 The AFLP analysis from different *Radix isatidis* sperm resources

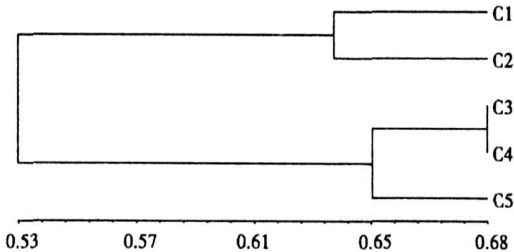


图 4 板蓝根种质资源遗传多样性的 AFLP 聚类图
Fig.4 The dendrogram of genetic relationships of *Radix*

isatidis germplasm resource based on the AFLP fragments

2.4 不同种质板蓝根及大青叶含量比较研究

2.4.1 不同种质板蓝根浸出物比较 对以上小叶板蓝根、大叶板蓝根、四倍体板蓝根的干燥根进行板蓝根浸出物的测定, 按照《中国药典》2005 年版一部“醇溶性浸出物测定法”项下的热浸法(附录 XA)测定”, 用 45% 乙醇作溶剂。结果如下:

结果表明, 小叶板蓝根和四倍体板蓝根浸出物都高于药典标准, 大叶板蓝根浸出物低于药典标准。小叶板蓝根的浸出物比四倍体板蓝根高, 但差异不明显(表 4)。

2.4.2 不同种质大青叶靛玉红含量比较 对小叶板蓝根、大叶板蓝根、四倍体板蓝根的大青叶进行靛玉红含量的测定。大青叶靛玉红含量测定按照《中国药典》2005 年版一部“高效液相色谱法”(附录 VI

D) 测定”。结果如下:

表 4 不同种质板蓝根醇提物出膏率(n= 6)

Tab.4 The quantity of extraction from <i>Radix isatidis</i>	
不同种质板蓝根 Different <i>Radix isatidis</i>	出膏率/ % The quantity of extraction
小叶板蓝根 Little leaf <i>Radix isatidis</i>	34. 3
大叶板蓝根 Big leaf <i>Radix isatidis</i>	20. 3
四倍体板蓝根 Tetraploidy <i>Radix isatidis</i>	31. 5
药典标准 Standard	不少于 25

表 5 不同种质板蓝根大青叶靛玉红含量比较(n= 6)

Tab.5 The comparison of content from different <i>Radix isatidis</i> (n= 6)	
不同种质板蓝根 Different <i>Radix isatidis</i>	靛玉红含量/ % In diubin content
小叶板蓝根 Little leaf <i>Radix isatidis</i>	0.059
大叶板蓝根 Big leaf <i>Radix isatidis</i>	0.036
四倍体板蓝根 Tetraploidy <i>Radix isatidis</i>	0.033
药典标准 Standard	不少于 0.02

结果表明, 小叶板蓝根、大叶板蓝根、四倍体板蓝根的大青叶中靛玉红的含量都达到了《中国药典》规定标准。小叶板蓝根的大青叶中靛玉红的含量较大叶板蓝根和四倍体板蓝根的大青叶中靛玉红含量高。所以做为药用, 小叶板蓝根的大青叶质量较好。

3 讨论

3 种板蓝根种质植株形态上具有明显差别, 小叶板蓝根叶片平整、窄而细长、颜色浅绿、单株叶片数 26 片左右; 大叶板蓝根叶片宽大平整、深绿色、单株叶片数 30 片左右; 四倍体板蓝根叶片宽大, 有明显皱褶、深绿色、单株叶片数 38 片左右。种子形态明显不同, 大叶板蓝根和四倍体板蓝根种子形态、大小基本一致, 百粒重平均为 1.0 g, 而小叶板蓝根种子明显细小, 百粒重约为 0.7 g。小叶板蓝根与大叶板蓝根和四倍体板蓝根之间的遗传差异较大、亲缘关系较远, 大叶板蓝根与四倍体板蓝根遗传差异较小, 亲缘关系较近, 四倍体板蓝根可能由大叶板蓝根加倍获得。小叶板蓝根和四倍体板蓝根产量基本相同, 小区试验平均 65 g/ 株左右, 大叶板蓝根平均 35 g/ 株左右, 药材产量明显较低; 大青叶产量四倍体板蓝根单株平均叶鲜质量为 290 g, 明显高于大叶板蓝根 145 g 和小叶板蓝根 87 g。根浸出物含量小叶板蓝根为 34. 3%, 四倍体板为 31.5%, 高于《中国药典》25% 的规定标准, 但大叶板蓝根浸出物含量低于《中国药典》标准, 小叶板蓝根的浸出物含量比四倍

体板蓝根高,但差异不明显。大青叶靛玉红含量小叶板蓝根为 0.059%,大叶板蓝根为 0.036%,四倍体板蓝根为 0.033%,均符合《中国药典》0.02%标准,其中小叶板蓝根靛玉红含量较高,大叶板蓝根和四倍体板蓝根的靛玉红含量基本一致。从药材产量、药用成分含量综合比较表明,3 种板蓝根种质小叶板蓝根最优,其次是四倍体板蓝根,大叶板蓝根最次。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2005 版一部.
- [2] 陈 民,陈晓锋,顾振纶. 板蓝根药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 3– 6.
- [3] 张 颖. 板蓝根清热解毒及化学有效成分研究进展[J]. 河北中西医结合杂志, 1999, 8(3): 341.
- [4] 胡兴昌,郑伟强. 板蓝根粗提液抑制流感病毒的实验研究[J]. 上海师范大学学报, 2003, 32(1): 62– 65.
- [5] 秦 箐,贺海平,陈 鸣. 板蓝根低极性流分的分离及其免疫活性[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 10(1): 29– 31.
- [6] 许益民,陆平成,王永珍. 板蓝根多糖促进免疫功能的实验研究[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(6): 137– 138.
- [7] 李志华. 板蓝根穴位注射治疗乙型肝炎病毒表面抗原携带者的疗效观察[J]. 新疆中医药, 1995(1): 24.
- [8] 赫媛媛,赵子剑,赵 铭. 板蓝根含片抑菌、抗炎作用的实验研究[J]. 现代中医药, 2006, 26(2): 57– 58.
- [9] 卫琮玲,闫杏莲. 板蓝根的抗炎作用[J]. 开封医专学报, 2000, 19(4): 53– 54.
- [10] 张大志,易井海. 板蓝根提取液抗流感病毒的药效学试验[J]. 药物研究, 2001, 10(5): 51.
- [11] 胡 娅,方建国,刘云海. 板蓝根的药理作用与临床应用[J]. 医药导报, 2005, 24(10): 921– 922.
- [12] Yamada H. Antiviral compositons containing new glycoprotein from *Isatis tinctoria* [P]. JP: 11 60599 [99 60 599], 1999– 03– 03
- [13] 张润珍,张玉文. 板蓝根的研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(6): 474– 476.
- [14] 刘云海,刘彦斌. 不同产地板蓝根抗内毒作用比较研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(2): 8– 9.
- [15] 刘 盛,陈万生,乔传卓,等. 不同种质板蓝根和大青叶的抗甲型流感病毒作用[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 204– 2051.