

• 药材与资源 •

青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 分析

梁洪卉¹, 程舟^{1*}, 杨晓伶¹, 李珊¹, 周铜水², 张文驹², 陈家宽²(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 2. 复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所
生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433)

摘要:目的 探讨青海省不同地区冬虫夏草的鉴定方法, 并评价其遗传变异、亲缘关系及地域分布。方法 利用形态性状和 ISSR 标记分析青海省 11 个县的冬虫夏草样品。结果 青海省不同地区的冬虫夏草无论是形态性状还是 ISSR 多态性都存在很大的遗传变异。根据形态性状数据, 青海省的冬虫夏草大致分成 3 个组, 即分别产于环青海湖地区、青海中东部和南部, 但仅基于形态性状来鉴定特定的冬虫夏草十分费力且不可靠。根据 ISSR 指纹图谱能够鉴定不同产地的冬虫夏草, 而且 ISSR 分析表明青海省的冬虫夏草可分成产于环青海湖地区和其他地区两大类, 其他地区一大类又可分成青海省南部、中部和东部产区 3 个平行分支。结论 青海省的冬虫夏草在分布上表现出明显的地域性。ISSR 分子标记对于冬虫夏草的鉴定和亲缘关系检测是非常有效的手段, 与形态性状分布相结合效果更佳。

关键词: 青海省; 冬虫夏草; ISSR; 亲缘关系; 地域分布

中图分类号: R282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)12-1859-06

Genetic variation and affinity of *Cordyceps sinensis* in Qinghai Province based on analysis of morphologic characters and inter-simple sequence repeat markersLIANG Hong-hui¹, CHENG Zhou¹, YANG Xiao-ling¹, LI Shan¹,
ZHOU Tong-shui¹, ZHANG Wen-ju², CHEN Jia-kuan²

(1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Chinese Ministry of Education Key Laboratory of Biodiversity and Ecological Engineering, Institute of Biodiversity Science, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To identify *Cordyceps sinensis* from different habitats in Qinghai Province of China and estimate their genetic variation, affinity, and regional distribution. **Methods** Morphological characters and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were analyzed among the *C. sinensis* samples from 11 Counties in Qinghai Province. **Results** Significant genetic variations were detected in both morphological characters and ISSR polymorphisms among these *C. sinensis* samples. Data from morphological analysis showed that these *C. sinensis* samples could be approximately divided into three groups, which distributed around the Qinghai Lake, middle east, and south areas in Qinghai Province, respectively. However it was arduous and ambiguous to identify the specific samples only by morphological characters. Based on the analysis of ISSR markers, *C. sinensis* of Qinghai Province could be classified into two major groups. One included the samples from the areas around the Qinghai Lake and another from the other two areas, one of which could be further divided into three subgroups, well correlated with the different habitats of south, center, and east areas in Qinghai Province, respectively. **Conclusion** *C. sinensis* with genetic variation and affinity in Qinghai Province distributes widely according to their living environment. ISSR analysis is an effective tool in identifying *C. sinensis* samples and determining their genetic affinity particularly when combined with the analysis of morphological characters.

Key words: Qinghai Province; *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; inter-simple sequence repeat (ISSR); genetic affinity; regional distribution

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 系 子囊菌纲、肉座菌目、麦角菌科、虫草属 (*Cordyceps*)

收稿日期: 2005-02-24

基金项目: 上海市科委中药现代化专项 (03DZ19547)

作者简介: 梁洪卉 (1972—), 吉林公主岭市人, 同济大学生命科学与技术学院在读硕士生, 主要从事植物遗传多样性的评价及利用研究。

E-mail: susan_liang_gc@hotmail.com

* 通讯作者 程舟 Tel: (021) 65985185 Fax: (021) 65981041 E-mail: chengzhou@mail.tongji.edu.cn

真菌寄生在鳞翅目蝙蝠蛾科昆虫幼虫上所形成的子座及幼虫尸体的复合体^[1~3],具有补肺益肾、止血化痰等功效,是我国珍稀名贵中药材之一。青海省是我国冬虫夏草的主要产地之一,分布在3 000~5 100 m的高寒草甸区。由于过度采挖,其资源已濒临枯竭。为有效地保护青海省的冬虫夏草资源,使其能可持续地开发利用,有必要对青海省不同地区的冬虫夏草资源进行鉴定和遗传多样性的评价分析。陈永久等^[4]用RAPD标记研究了青藏高原部分地区冬虫夏草的遗传分化,没有专门评价青海省冬虫夏草资源的遗传关系。此外,由于冬虫夏草价格昂贵,各种来源的虫草涌入市场,使得市场鱼龙混杂。如何科学、准确地鉴定冬虫夏草真伪及道地性就变得十分重要。

简单序列重复(inter-simple sequence repeat, ISSR)区间扩增多态性^[5~8]是利用生物基因组中常出现的简单序列重复 SSR (simple sequence repeat) 设计引物,检测多态性的一种分子标记。ISSR 分子标记技术具有操作简单、无须预先知道 DNA 序列、比 RAPD 标记更为灵敏、稳定且实验重复性好等优点,已用于甘蔗、乐昌含笑、怀地黄、华木莲等的鉴定和遗传多样性的检测分析^[9~12]。

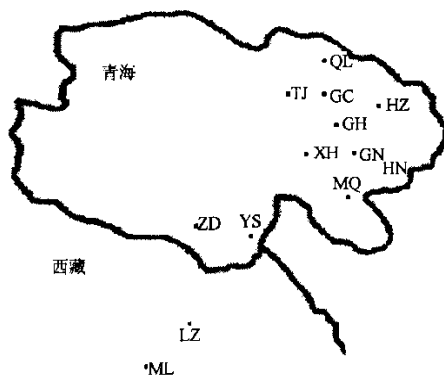
本研究的目的:1)采用形态特征和 ISSR 分析对采自青海省 11 个县的冬虫夏草进行鉴定;2)评价其遗传变异和亲缘关系,探讨青海省冬虫夏草资源的分布格局。

1 材料和方法

1.1 试验材料:冬虫夏草样品分别采自青海省的 11 个县和西藏的 2 个县(图 1),并由青海省畜牧兽医科学院徐海峰鉴定为 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.。西藏的样品和由安徽农业大学提供的中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* X. J. Liu 和中国拟青霉 *Paecilomyces sinensis* Chen et Xiao 菌丝体菌粉作为对照。

1.2 形态特征的观察测定:从各县的冬虫夏草样品中随机选取 10 条虫草,测定虫草单株质量、虫体长度、子座长度、虫体直径、子座直径、观察子囊孢子发育状态。

1.3 基因组 DNA 的提取:上述每个县的 10 个虫草分别取子座 10 mg,中国被毛孢和中国拟青霉的菌丝体菌粉各取 20 mg 提取 DNA。样品用液氮研磨后转入离心管中,加入 600 μ L 预热的 CTAB 缓冲液(2% CTAB、1.4 mol/L NaCl、0.2% β -巯基乙醇、100 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L EDTA, pH



ZD-杂多 YS-玉树 MQ-玛沁 HN-河南 XH-兴海
GN-贵南 GH-共和 HZ-漳中 GC-刚察 TJ-天峻
QL-祁连 LZ-林芝 ML-米林
ZD-Zaduo YS-Yushu MQ-Maqin HZ-Henan XH-Xinghai
GN-Guinan GH-Gonghe HZ-Huangzhong GC-Gangcha
TJ-Tianjun QL-Qilian LZ-Linzhi ML-Milin

图1 青海省冬虫夏草样品分布图
Fig. 1 Distribution of *C. sinensis* from Qinghai Province

8.0), 65 $^{\circ}$ C 保温 1 h。加入 600 μ L 氯仿-异戊醇(24:1),轻摇混匀 5 min,室温 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 500 μ L 氯仿-异戊醇(24:1),轻摇混匀 10 min,12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2 倍体积的预冷的无水乙醇,颠倒混匀后在 -20 $^{\circ}$ C 中保存 30 min。10 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,用 70% 乙醇清洗,5 000 r/min 离心 5 min。取沉淀干燥后用 100 μ L TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解,用 0.7% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 质量。

1.4 ISSR 引物筛选和 PCR 扩增:分别将上述提取的每个县的 10 个虫草 DNA 混合,作为该县冬虫夏草 DNA 模板。用其中的 4 个 DNA 样品筛选 100 条 ISSR 引物(The University of British Columbia (UBC SSR Primer (RAPD) Synthesis Project Oligonucleotide Set 100/9)。反应体积 20 μ L 含:2 mmol/L $MgCl_2$ 、0.25 mmol/L dNTPs、0.2 μ mol/L 引物、10 ng 模板、1 $\times$ buffer 和 0.75 U *Ex Taq* DNA 聚合酶(TaKaR)。使用 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪进行扩增反应,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;40 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,48~55 $^{\circ}$ C 退火 45 s(退火温度随引物变化,见表 1),72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离(以 100 V 恒压电泳 35 min),以 100 bp DNA Ladder

Plus (MBI Fermentas)作为分子量标准,用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭染色后于UVP—GDS8000自动成像仪中拍照、观察、记录并保存电泳图片。

从100条ISSR引物中选出扩增条带清晰、重复性好的14条引物(表1),用于所有样品的扩增。

表1 14条ISSR引物的PCR扩增结果

Table 1 Fragments amplified with 14 ISSR primers by PCR

引物	序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	总条带数	多态性条带数	多态性条带率/%
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	52	10	8	80.0
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	49	8	7	87.5
826	ACACACACACACACACC	49	6	4	66.7
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	54	8	5	62.5
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51	11	8	72.7
840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	48	9	7	77.8
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	51	7	4	57.1
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	50	9	5	55.6
861	ACCACCACCACCACCACC	54	7	6	85.7
864	ATGATGATGATGATGATG	53	7	5	71.4
873	GACAGACAGACAGACA	54.5	15	14	93.3
880	GGAGAGGAGAGGAGA	49	6	1	16.7
889	DBDACACACACACACAC	52	7	4	57.1
891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	53	5	2	40.0
总计			115	80	69.6

表2 青海省11个县的冬虫夏草样品的形态性状特征及差异显著性分析

Table 2 Morphological characters and significant difference of *C. sinensis* from 11 Counties in Qinghai Province

样品	全重/g		虫体长/cm		子座长/cm		虫体直径/cm		子座直径/cm		子囊孢子形态	
	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST
MQ	0.59a	0.80	4.46a	0.19	3.45c	0.28	0.43a	0.48	0.20bc	0.32	3.8a	0.42
YS	0.36b	0.59	3.84b	0.18	3.78bc	1.01	0.41a	0.26	0.21ab	0.37	3.5a	0.53
ZD	0.38b	0.97	3.78b	0.27	3.73bc	0.66	0.40ab	0.38	0.24a	0.41	3.8a	0.42
QL	0.14de	0.24	2.58e	0.12	3.26c	0.93	0.31c	0.21	0.19bc	0.43	0.00e	0.00
HZ	0.23c	0.77	3.12c	0.23	4.09b	1.06	0.40ab	0.59	0.21b	0.27	1.10d	0.32
GC	0.10e	0.33	2.43e	0.14	3.11c	0.79	0.30c	0.31	0.17c	0.19	1.10d	0.32
TJ	0.13de	0.20	2.38e	0.16	2.83c	0.37	0.31c	0.43	0.15c	0.29	0.10e	0.32
GH	0.12de	0.16	2.55e	0.18	3.14c	0.66	0.32c	0.43	0.17c	0.21	0.10e	0.32
XH	0.26c	0.50	3.08c	0.35	3.81b	0.79	0.37b	0.42	0.20b	0.31	2.20c	0.42
GN	0.17d	0.68	2.88d	0.29	3.78ab	1.18	0.30c	0.60	0.17c	0.37	2.00c	0.00
HN	0.26c	0.98	3.21c	0.22	4.76a	0.91	0.37b	0.40	0.23ab	0.30	2.80b	0.42

样品编号同图1 子囊孢子形态:0-子囊孢子不明显,1-子囊孢子较小,2-子囊孢子较肥大,3-子囊孢子肥大,4-子囊孢子极大 M-平均值 ST-标准差 标有不同字母的同列平均值在5%水平上呈显著差异(最小显著差数法)。

Sample codes are same to Fig. 1 Ascus spore form; 0-unobvious, 1-smaller, 2-little big, 3-big, 4-extremely big M-mean. ST-standard deviation Means labelled in different letters within same columne are statistically different at 0.05 level of significance based on protected least significant difference test

主成分分析表明前2个主成分的特征值分别为4.55和0.97,累计贡献率为91.95%(表3)。第1主成分的贡献率为75.83%,其中贡献较大的是单株质量、虫体长度、虫体直径和子囊孢子形态。第2主成分的贡献率为16.12%,贡献较大的是子座长度。冬虫夏草的6个形态特征在分类中都起着非常重要的作用。从第1主成分和第2主成分作成的散点图

1.5 数据处理:形态性状:用SPSS11.5统计软件^[13]计算各县冬虫夏草形态性状的平均值、标准差(standard deviation),用最小显著差数法(LSD法)比较、评估样本间的差异。对各变量(性状)标准化处理后的数据得出6个变量的相关矩阵,并进行主成分分析(PCA分析)。

ISSR:根据ISSR扩增条带的有无分别用“1”和“0”表示。用Jaccard法($a/(n-d)$)计算相似性系数,a为两样品都有的条带,d为两样品都没有的条带,n为多态性条带总数。UPGMA法聚类分析以及系统树状图的绘制均采用NTSYS-pc Numerical Taxonomy System分析软件进行^[14]。

2 结果

2.1 形态性状分析:青海省11个县的冬虫夏草的6个形态性状数据归纳在表2。同一产地的冬虫夏草样品内,从标准差可以看出6个形态性状的差异程度不同。其中单株质量的差异最大,特别是HN和ZD的样品。相对于其他性状,子囊孢子形态的变化明显要小。不同产地的虫草样品之间用最小显著差数法分析表明,其形态性状差异显著,尤其是单株质量、虫体长度和子囊孢子形态。

上可以看出,青海省11个县的冬虫夏草可分成3个组(图2)。QL、GC、TJ和GH构成一个比较紧凑的组(第1组),第1和第2主成分都为负值;HZ、XH、GN、HN构成一个比较松散的组(第2组),第1主成分接近于0,第2主成分都为正值,其中HZ、XH和GN比较接近;第3组由YS、ZD和MQ组成,第1主成分都为正值,第2主成分接近于0,YS和ZD

非常靠近, MQ 则离得较远。青海省的冬虫夏草存在明显的地域分布的差异,产地对冬虫夏草的分类起一定的作用。

表 3 青海省 11 个县的冬虫夏草 6 个形态性状相关矩阵的特征值

Table 3 Eigenvalues of correlation matrix for six morphological characters on samples of *C. sinensis* from 11 Counties in Qinghai Province

性 状	主 成 分		
	1 (4.55, 75.83%)	2 (0.97, 16.12%)	3 (0.24, 4.04%)
单株质量	0.908	-0.385	—
虫体长度	0.951	-0.291	—
子座长度	0.624	0.740	0.130
虫体直径	0.934	-0.109	-0.277
子座直径	0.843	0.410	-0.202
子囊孢子	0.923	—	0.327

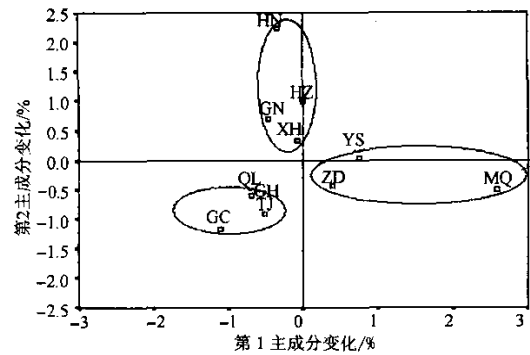
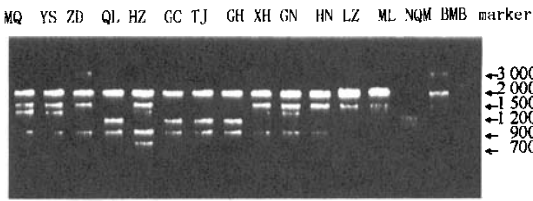


图 2 根据第 1 和第 2 主成分构建的青海省 11 个县的冬虫夏草形态性状变异的散点图(样品编号同图 1)

Fig. 2 Scatter plot showing morphological variation of *C. sinensis* from 11 Counties in Qinghai Province established on first two components of principal component analysis (Sample codes are same to Fig. 1)

2.2 ISSR 分析:从 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、重复性好的 14 条引物,对所有样本的扩增结果见表 1 和图 3。青海省不同地区的冬虫夏草在分子水平上存在明显的差异。14 条引物对青海省 11 个县的冬虫夏草 DNA 总共扩增出 115 条带,多态性条带 80 条,平均多态率为 69.6%。平均每个引物扩增出条带 8.21 条,扩增条带在 300~3 000 bp(表 1)。不同产地的冬虫夏草可根据各自的 ISSR 指纹图谱被区分开来,这 80 条多态性条带可用于鉴定这些冬虫夏草。

根据扩增出的 ISSR 条带的差异构建了聚类分析系统树状图(图 4)。在系统树状图中,青海省 11 个县的冬虫夏草大致可以分成 2 个分支。QL、GC、TJ 和 GH 聚成一支,在相似性系数 0.71 的水平



NQM-中国拟青霉 BMB-中国被毛孢 Marker-100 bp DNA Ladder Plus 其余样品编号同图 1
NQM-*P. sinensis* BMB-*H. sinensis* Marker-100 bp DNA Ladder Plus Other sample codes are same to Fig. 1

图 3 ISSR 引物 889 扩增出的冬虫夏草指纹图谱
Fig. 3 Fingerprint of *C. sinensis* amplified by ISSR Primer 889

上和青海省其他产地的冬虫夏草明显分开。另一个分支又可以分成 3 个小支,1)即 MQ、YS 和 ZD;2) XH、GN 和 HN;3) HZ。作为对照样品的西藏米林县和林芝县的冬虫夏草以及中国被毛孢均在相似性系数 0.67 的水平上和青海省的样品分开,但差异并不大。而中国拟青霉则远离其他样品,在相似性系数 0.36 水平上明显分开。

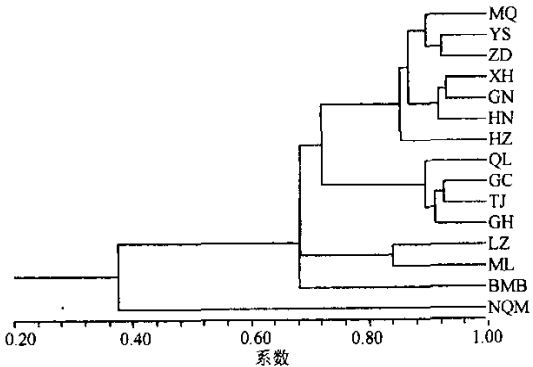


图 4 基于 ISSR 数据用 UPGMA 法构建的冬虫夏草亲缘关系的聚类分析树状图
Fig. 4 UPGMA dendrogram of genetic affinity of *C. sinensis* based on Jaccard similarity coefficient from ISSR data

3 讨论

3.1 冬虫夏草的遗传变异和鉴定:冬虫夏草是菌虫复合体。迄今为止,国内外学者已从冬虫夏草中分离鉴定了 10 个属 10 多个种的无性型菌株^[15];其寄生蝙蝠蛾目前已报道的有 5 属 38 种之多^[2,16]。冬虫夏草的鉴定一直是一个非常复杂的问题。市场上各种似是而非的替代品层出不穷。因此,迫切需要建立一个可用于准确鉴定冬虫夏草的有效方法和标准。此外,对冬虫夏草的遗传多样性和亲缘关系仍缺乏了解。

青海省 11 个县的冬虫夏草的 6 个形态性状尽

管在同一地方的样品内存在不同程度的差异,但有些形态性状在不同地方的样品间的差异则更明显。这表明不同地方的冬虫夏草间的遗传变异较大。虫体长度在同一地方的样品内差异较小,而在不同地方的样品间差异极大,且相对稳定,这可能与不同寄主蝙蝠蛾种群以及生存环境有关。虫体长度可考虑用于地区间冬虫夏草的分类。但所测得的形态性状还不能作为鉴定某一特定地方冬虫夏草的指标。

与形态性状相比,用 ISSR 标记鉴定冬虫夏草更有效。从 ISSR 分析结果可以看出,根据 DNA 指纹图谱能够鉴定不同产地的冬虫夏草。中国被毛孢和中国拟青霉也可通过 ISSR 标记明显地区分开来。因此,ISSR 标记对冬虫夏草的鉴定和亲缘关系以及冬虫夏草无性型的有效检测都是非常有效的手段。

3.2 冬虫夏草的亲缘关系和地域分布:根据形态性状的主成分分析,将 11 个县的冬虫夏草大致分成 3 个组,其地理位置与纬度有关,分别是环青海湖地区、青海中东部和南部的虫草产区。这和陈永久等^[4]的结果一致,他们认为青藏高原的冬虫夏草的遗传分化发生于南北方向,即不同纬度之间。

基于笔者目前的 ISSR 数据分析,青海省的冬虫夏草自成一类,有别于 2 个西藏的样品。环青海湖地区的冬虫夏草的亲缘关系非常接近,形成一个分支。而其余 7 个县的冬虫夏草在系统树状图中另成一支,其中又可细分为 3 个小支,分布包括了青海省南部、中部和东部产区的冬虫夏草。ISSR 分析和形态性状分析结果大致吻合,表明青海省的冬虫夏草在分布上表现出明显的地域性。

青海省的冬虫夏草在传统意义上一直被划分为两大产区;即青南地区和环青海湖地区。笔者的研究在遗传关系上对传统的产区划分提供了有力的支持,同时也提出了新的见解。环青海湖地区的冬虫夏草无论在形态形状还是亲缘关系上都与其他产地有明显的差异,自成一产区。其虫草的特点为虫体小、子座短、子囊孢子不明显。而传统意义上的青南产区,根据本研究的结果又可分为 2 到 3 个区域。从形态性状上可分为青海中部和青海南部 2 个区域,其中 HZ(湟中县)被分在青海中部区域。青海南部的虫草虫体大、子座适中、子囊孢子明显,而青海中部的虫草虫体中等、子座偏大、子囊孢子尚明显。HZ 属于环青海湖地区与青海东部(海东)地区的交界处,由于中间受到日月山的间隔,其气候和植被都具有自身的特点,其虫草的形态特征与青海中部产区相似。ISSR 分子标记分析认为,传统意义上的青南

产区至少可以分为青海省南部、中部和东部 3 个产区。特别是海东地区的虫草在遗传上应该是并行于“青南地区”和“青海中部地区”的第三个分支。因此,青海省的冬虫夏草除了在不同纬度上形成了从南到北的遗传分化外,特定区域的虫草也存在着一定的遗传分化。

冬虫夏草不同种类寄主的分布主要是由生境中植物群落决定的^[16],加上蝙蝠蛾的迁移能力不强等原因,昆虫间存在种间隔离现象。据称青海省冬虫夏草的寄主昆虫大致有 8 个种,进一步对其寄主昆虫的遗传多样性的研究对阐明冬虫夏草遗传分化的原因具有极其重要的意义。尽管用形态性状检测某一特定产地的冬虫夏草依然十分困难,但是考虑到形态性状在检测冬虫夏草的遗传变异和遗传关系方面能起到一定的作用,因此将形态性状和分子标记结合起来用于冬虫夏草的鉴定和亲缘关系检测效果更佳。本研究根据形态性状和 ISSR 分析获得的青海省冬虫夏草的地域分布资料为今后冬虫夏草资源的保护和合理利用提供科学依据。

致谢:安徽农业大学樊美珍教授为本研究提供中国被毛孢、中国拟青霉菌粉样品。此外,青海省畜牧兽医科学院徐海峰对结果的分析提出了宝贵的意见

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 1995.
- [2] Guo H C, Gao J Q, Xi Q Y, et al. Research and development for *Cordyceps sinensis* [J]. *J Microbiol* (微生物杂志), 2003, 23 (1): 50-54.
- [3] Lu L X, Liu S M, Shi L G. Research and development for *Cordyceps sinensis* [J]. *Bull Biol* (生物学通报), 2002, 37 (6): 4-6.
- [4] Chen Y J, Wang W, Yang Y X. Genetic divergence of *Cordyceps sinensis* as estimated by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1997, 24 (5): 410-416.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genome*, 1994, 20: 178-183.
- [6] Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 998-1006.
- [7] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [8] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in *Douglasfir* (*Pseudotsuga menziesii*) and *sugi* (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 40-45.
- [9] Yu A L, Zhang M Q, Chen R K. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in sugarcane and its related genera as DNA markers [J]. *J Fujian Agric Forest*

- Univ; Nat Sci (福建农林大学学报:自然科学版), 2002, 31 (4): 484-489.
- [10] Qiu Y X, Fu C X, He Y F. Identification of *Michelia tosi* types of using ISSR-PCR marker assays [J]. *Sci Silvae Sin* (农林科学), 2002, 38 (6): 49-52.
- [11] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y. Optimization of ISSR-PCR amplification in *Huai Rehmannia Glutinosa* [J]. *Acta Bot Boreal.-Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24 (1): 6-11.
- [12] Liao W F, Xia N H. Study on genetic diversity of *Manglietia deciduas* (Magnoliaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2004, 26 (1): 58-64.
- [13] Hong N. SPSS for Windows Statistical and Analytical Text-book (SPSS Windows 统计分析教程) [M]. Beijing: Electronic Industry Publishing House, 2000.
- [14] Rohlf F J. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [M]. (Version 2.0). New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc., 1998.
- [15] Liu Z Y, Liang Z Y, Liu A Y. Investigation on microcycle conidiation of ascospores and conidiogenous structures of anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2003, 31 (1): 3-5.
- [16] Dong Y C, Luo D Q. Research for *Cordyceps sinensis* in China [J]. *Territ & Nat Resour Stud* (国土与自然资源研究), 1996, 3: 47-51.

莨菪发根培养体系的建立

陆倍倍¹, 张磊¹, 开国银², 张汉明¹, 丁如贤¹, 陈万生^{3*}

(1. 第二军医大学药学院 生药教研室, 上海 200433; 2. 上海交通大学植物生物技术研究中心 农业与生物学院复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心 生命科学技术学院, 上海 200030; 3. 第二军医大学长征医院, 上海 200003)

摘要:目的 建立莨菪 *Hyoscyamus niger* 的发根培养体系。方法 分别用 A4、LBA9402 和 C58C1 三种发根农杆菌菌株转化莨菪子叶受体, 获得发根; 测定发根的生长曲线和比较不同因素对发根生长量的影响; PCR 鉴定转化发根; 莨菪发根中生物碱类含量的测定。结果 首次利用发根农杆菌 A4、LBA9402、C58C1 三种菌株成功从莨菪中诱导出发根, 并建立了莨菪发根最优的培养体系; 经 PCR 鉴定证明 Ri 质粒的 T-DNA 已转化进莨菪的发根中。结论 莨菪发根培养体系的建立为利用遗传代谢工程手段调节莨菪次生代谢物含量和进行药用活性成分的工业化生产奠定了基础。

关键词: 莨菪; 发根农杆菌; 发根

中图分类号: R282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)12-1864-05

Establishment of hairy root culture of *Hyoscyamus niger*

LU Bei-bei¹, ZHANG Lei¹, KAI Guo-yin², ZHANG Han-ming¹, DING Ru-xian¹, CHEN Wan-sheng¹

(1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Plant Biotechnology Research Center of Shanghai Jiao Tong University, School of Agriculture and Biology, Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology Research and Development Center, School of Life Science and Technology, Shanghai 200030, China; 3. Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: **Objective** To establish the cultural system for hairy root of *Hyoscyamus niger*. **Methods** Hairy root of *H. niger* was obtained from cotyledon explants after infected with *Agrobacterium rhizogenes* strains A4, LBA9402, and C58C1, respectively. The growth curves were determined and the effects of different factors on the growth of hairy root were compared. The transformation of Ri T-DNA was examined by PCR. And the contents of alkaloids in hairy root were determined. **Results** The hairy root of *H. niger* was successfully induced by using *A. rhizogenes* strains A4, LBA9402, and C58C1 for the first time and the best system of hairy root culture was established. The transformation of T-DNA from Ri plasmid to the hairy root was confirmed by PCR analysis. **Conclusion** The establishment of cultural system for hairy root of *H. niger* lays foundation for regulating the secondary metabolism of *H. niger* by genetic engineering technique and for the large-scale production of active drug components.

Key words: *Hyoscyamus niger* L.; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots

自从发根农杆菌 Ri 质粒被人们发现和认识以来, 它在许多领域都显示出极其广泛的应用前景。药

收稿日期: 2005-02-21

基金项目: 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放基金(KJS03080)

作者简介: 陆倍倍(1980—), 男, 第二军医大学在读硕士研究生, 从事药用植物代谢工程方面的研究。

* 通讯作者 陈万生 Tel: (021) 25070394 E-mail: chenwansheng@21cn.com