

广藿香茎的发育,类似于一般草本双子叶植物。在不同发育阶段,挥发油的分布场所有所不同,这与器官的生长发育节律和不同时期植株对挥发油的需求有密切的关系。在茎的原生和初生分生组织阶段,光镜下未观察到有挥发油分布。由于分生组织幼嫩,易受病虫害侵袭,因此非腺毛和含有刺激性气味挥发油的腺毛明显地具有保护幼嫩组织的作用^[9]。在初生结构和次生结构中,其组成细胞功能逐渐分化,此间挥发油可能逐渐分解,为这些细胞的分化提供所需的能量,同时为另一些代谢活动提供前体物质。在皮层薄壁细胞中,依然有大量的挥发油。究其原因,是因为这些细胞内含有丰富的质体,而它们则正是挥发油的主要合成场所。一部分挥发油分解,同时又有新的挥发油合成,从而分解与合成形成一种动态平衡关系。这样,皮层与周皮一起协同作用,对植物体起到了化学和机械的双重保护作用。广藿香茎的次生结构中,特别是在周皮发生后,木栓层以外部分的营养和水分供应被阻断,表皮毛逐渐死亡,已无挥发油分布。但在残存的皮层中,却有大量的挥发油滴,残存的皮层薄壁细胞成了此阶段挥发油分布的主要部位。

实验结果表明,在广藿香茎发育的各个时期,其内的挥发油都主要分布在茎皮内。如前所述,广藿香的有效成分主要是其挥发油。因此,在选育和评定广藿香的品种是否优良时,可以把广藿香茎皮的厚薄作为一个重要指标。另外,考虑在以广藿香的茎枝入药时,是否可以仅取广藿香茎枝的皮部(新鲜材料的

茎皮容易剥离)。这样即可大量节省药材运输、翻晒、贮藏、炮制等工序的人力和物力,又不会造成有效成分的流失、浪费。当然,这可能与传统饮片用药习惯不相符,但笔者认为,如果进一步根据有效成分的使用量来量化用药量,这不失为一种可尝试的用药方式。同时,也可为用户提供中药标准提取物提供量化方法上的参考和帮助。

References:

- [1] Luo J P, Feng Y F, Guo X L. Analysis of volatile oil of *Pogostemon cablin* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 299-302.
- [2] Du Y M, Chen L Z, Hu B R. Study development of chemical component and pharmacologic action of *Pogostemon cablin* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1998, 9(4): 238-241.
- [3] Hao J D, Xie Z W. Continuity and development of Huoxiang medicinal breed [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1994, 17(8): 44-47.
- [4] Feng C H, Yao H, Wu H, et al. Studies on mature structures and distribution of active constituent of *Pogostemon cablin* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(2): 174-176.
- [5] Jensen W A. *Botanical Histochemistry* [M]. San Francisco: Freeman, 1962.
- [6] Hu S Y, Xu L Y. A cytochemical technique for demonstration of lipids, polysaccharides and protein bodies in thick resin sections [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1990, 32(11): 841-846.
- [7] Schmidt A. Histologische studied an phanerogamen Vegetationspunkten [J]. *Bot Arch*, 1924, 8: 345-404.
- [8] Witztum A, Zamski G. Methods for observations on resin droplets in resin duct cells of *Pinus halepensis* Mill [J]. *Israel J Bot*, 1969, 18: 55-59.
- [9] Black R F. The leaf anatomy of Australian members of the genus *Atriplex*. L., *Atriplex vesicaria* Heward and *A. nummularia* Lindl [J]. *Aust J Bot*, 1954, 2: 269-286.

康定冬虫夏草与人工虫草的 RAPD 指纹图谱比较研究

于超¹, 何俊琳², 曾伟¹, 邓斌²

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆医科大学, 重庆 400046)

摘要:目的 用 RAPD 方法对康定虫夏、人工虫草及虫草发酵菌丝体进行指纹图谱的研究, 为不同虫草的品质和药效差异提供分子依据。方法 从 65 个随机引物中筛选出 7 个引物, 以这 7 个引物进行 PCR 扩增, 电泳得到其指纹图谱。结果 没有发现任何两个样本拥有完全相同的 RAPD 标记, 康定冬虫夏草和人工虫草具有较高的遗传多态性, 而与虫草发酵菌丝体相比差异较大。结论 来自不同产地冬虫夏草群体均表现出其独特的 RAPD 标记, 其差异可能系虫体的不同所致。随机扩增的 DNA 片段的差异是否预示其药效的不同, 有待进一步研究。

关键词:冬虫夏草; RAPD; 指纹图谱

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)02-0274-04

收稿日期:2004-04-24

基金项目:重庆市科委基金资助项目(6962)

作者简介:于超(1963—),男,山东人,副研究员,博士,长期从事中药化学、中药物质基础和中药分子生物学研究,研究方向为药物分析化学和新药开发。Tel:(023)62466269 E-mail:yuchaom@163.com

Fingerprint comparison on *Cordyceps sinensis* and artificial ones by RAPD

YU Chao¹, HE Jun-lin², ZENG Wei¹, DENG Bin²

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

2. Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400046, China)

Key words: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; RAPD; fingerprint

虫草属 *Cordyceps* (Fr.) Link 是一大类昆虫病原真菌,其特定的菌感染特定的昆虫后就会成为具有重要的药用价值的冬虫夏草 *C. sinensis* (Berk.) Sacc.。近年来,发酵培养和人工冬虫夏草成为热点,引发了关于冬虫夏草无性型的学术争论^[1],国内已报道与冬虫夏草有关的丝孢菌,多达10属16种^[2]。此外,人工培养的菌丝体种类也较多。这些菌种与真正野生型菌种的关系如何?用什么样的技术手段来证明就成为当今研究的一个难题。传统的方法一是从菌丝体的各种生活阶段的形态学上进行比较;另一种方法是在实验条件下,将用各种途径分离获得的假定无性型,人工感染寄主昆虫,诱发形成具有成熟子囊壳的虫草子实体,然后再进行比较。但由于操作等方面的技术原因,迄今很少能完成这一程序。本实验拟应用 RAPD 方法^[3]来区分康定冬虫夏草与人工冬虫夏草及发酵菌丝体,并分析它们之间的相关性。

1 材料与方 法

1.1 材料:康定虫草购自四川省甘孜州康定地区。人工虫草及发酵菌种均为我院自行孵育和发酵的品种,菌虫种源来自四川阿坝州。

1.2 仪器与试剂:PE 4800 PCR 扩增仪(美国 PE 公司),Power—Pac300 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),电泳槽(北京六一仪器厂)。随机引物及 PCR 试剂盒(上海 Sangon 公司),*EcoR*-I 和 *Hind* III 分子量标准品(Prommiga 公司),琼脂糖(Bio-Rad 公司),其他为市售分析纯试剂。

1.3 方 法

1.3.1 虫草 DNA 提取:取虫草粗粒干品约 1.0 g,用灭菌 TES 缓冲液浸泡 4 ℃ 过夜。其中换液两次,去除部分可溶性色素。离心去上清液,将样品及乳钵一起于 -20 ℃ 冷冻 1 h 以上,取出后迅速粉碎成粉。加 2 mL 于 60 ℃ 预热的抽提缓冲液 [2% CTAB, 1.5 mol/L NaCl, 0.2% 巯基乙醇, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)], 60 ℃ 提取 1~2 h, 其间混摇数次。离心,去沉淀,上清液用酚和氯仿各抽提 2 次,取水相,加 1/10 体积醋酸钠、等体积异丙醇,沉淀出白色絮状 DNA。75% 乙醇洗两次,置 75% 乙醇中保

存,或溶于适量 TE 备用。

取 DNA 溶液 100 μL,加 1 mL RNA 酶 (20 mg/mL), 37 ℃ 保温 1 h,加 3 倍体积 5 mmol/L NaCl, 30 μL 玻璃粉混匀,放置 30 min。随时混摇, 10 000 r/min 离心 2 min。加洗液 (0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA, 50% 乙醇) 400 μL 混匀,离心,弃上清液,重复洗 3 次,加 150 μL TE 缓冲液, 55 ℃ 保温 15 min,混摇几次,离心,取上清液于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 模板 DNA 的浓度及质量检测:DNA 的浓度和质量的检测使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳的方法,测定 DNA 提取液在 260、280 nm 波长处的紫外吸光度 (A) 值,计算 A_{260}/A_{280} 值,估算其纯度;电泳时用 0.8% 琼脂糖凝胶, 0.5 μg/mL EB 染色,测定 DNA 样品的纯度。

1.3.3 引物筛选:按引物 GC 含量不同随机挑选出 65 个 S 系列引物,从提取的 DNA 模板液中任选一个为模板,对所有引物进行 PCR 扩增,选出电泳条带清晰、数目尽可能多的引物。重复一次,最后确定可重复的、条带相对清晰的引物 7~8 条为最终的实验用引物。

1.3.4 PCR 扩增反应:以不同样品所提取的 DNA 为模板,在以下反应体系中扩增:25 μL 的反应体系中包括 10 倍量稀释的 PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 为 1.5 μL, 4 种 dNTPS (各 2.5 mmol/L) 为 2 μL, 3 μL 引物 (0.18 ng), 模板 DNA 为 4 μL (约 5~25 ng), Taq 酶 4 U, 灭菌去离子水 12 μL。

扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min, PCR 循环 40 次,每循环为 94 ℃ 变性 45 s, 36 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 最后 72 ℃ 延伸 7 min。

PCR 检测:1.2% 琼脂糖电泳,加入 DNA *EcoR*-I 和 *Hind* III 为分子量标准,溴化乙锭 (EB) 的质量浓度为 0.5 μg/mL, 电压为 4 V/cm, 稳压电泳约 2 h, 在紫外透射仪上观察、照相。

2 结果与分析

2.1 康定冬虫夏草与人工冬虫夏草比较:从 65 个引物中筛选出 7 个,使用其中 6 个能够产生清晰而

且呈现多态性条带的引物,按前述 RAPD 方法,得到 12 个受试样本,对其进行统计分析(表 1)。在供试材料中共获得 138 条 DNA 扩增片断,每条引物所能扩增的条带在 8~14 条,平均每条引物扩增的 DNA 带数为 11.4 条,其中 9.6 条具有遗传多态性,约占总数的 84.0%;产生的 DNA 片段主要分布在 0.5~5 kbp 区域,少数片段小于 0.5 kbp 或大于 5 kbp。康定冬虫夏草与人工冬虫夏草的指纹图谱相比较,两者的相似率较高(图 1),说明两者分子基础有较大的相似之处。是否在药效方面也相似值得进一步研究。

2.2 康定虫草与发酵后返接菌种及康定虫草中分离纯菌种比较:应用筛选出的 5 种引物,增加一个 S80 引种,其序列为 ACTTCGCCAC (5'-3');从指纹图谱可以看出:康定虫草与发酵菌种相比(图 2),共产生 DNA 片断 106 条,其中共有 DNA 片断平

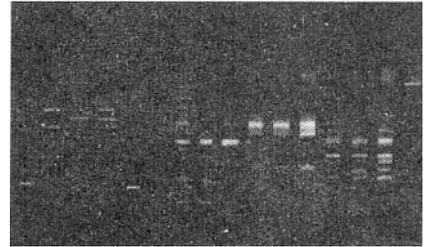
表 1 RAPD 引物及 PCR 扩增结果

Table 1 RAPD primers and PCR amplification

引物	序列(5'-3')	康定虫草 标记数	人工虫草 标记数	共有标 记数
S7	GGTGACGCAG	13	14	12
S10	CTGCTGGGAC	13	14	13
S23	AGTCAGCCAC	12	11	9
S31	CAATCGCCTG	11	12	11
S33	CAGCACCCAC	11	11	8
S61	TTCGAGCCAG	8	8	5
总计		68	70	58
平均数		11.3	11.6	9.6
多态性/%				84.0

均为 6.6 条,多态性标记占 62.3% (表 2)。结果表明虫草与菌丝体的共有标记较少,差异部分可能更多的是来源于虫草的虫体部分的 DNA。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



模板:1、4、7、10、13 为阿坝虫草模板,2、5、8、11、14 为发酵虫草菌丝体模板,3、6、9、12、15 为康定虫草分离菌丝体模板

引物:1~3-S7 4~6-S31 7~9-S33 10~12-S61

13~15-S80

Templates: 1, 4, 7, 10, 13 are templates of *C. sinensis*;

2, 5, 8, 11, 14 are templates of fermented mycelia; 3, 6, 9,

12, 15 are templates of mycelia separated from *C. sinensis*

Primers: 1-3-S7 4-6-S31 7-9-S33 10-12-S61

13-15-S80

图 2 冬虫夏草与不同来源菌丝体的 RAPD 带型

Fig. 2 RAPD bands of *C. sinensis* and different mycelia

表 2 康定虫草与发酵菌种的 PCR 扩增结果

Table 2 Results of PCR amplification between wild *C. sinensis* and fermented mycelia

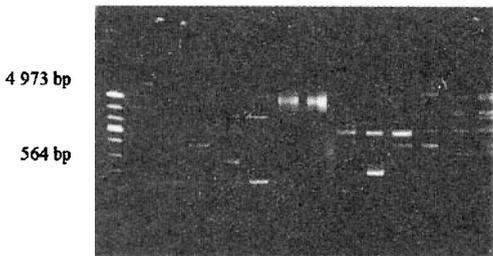
引物	康定虫草的标记数	发酵菌种标记数	共有标记数
S7	7	9	4
S31	7	7	2
S33	17	12	9
S61	10	9	7
S80	14	4	11
总计	55	51	33
平均数	11	10.2	6.6
多态性/%			62.3

而发酵菌种与康定虫草中分离纯化菌种相比,共产生 DNA 片断 107 条,共有片断平均 9.6 条,多态性 89.7% (表 3),表明两者之间菌种部分很可能是同一品种,因为其 DNA 指纹相似率较高。但菌丝体感染昆虫后,作为冬虫夏草的 DNA 提取物与菌丝的 DNA 指纹相似率大大下降,说明昆虫的 DNA 对菌丝体 DNA 有较大干扰。

3 讨论

结果表明,RAPD 技术显示了极好的分辨率,没有发现任何两个样本拥有完全相同的 RAPD 标记,不同来源的冬虫夏草群体表现出其独特的遗传多态性,这种多态性可能系虫体的不同所致。由此可见,RAPD 技术是从分子水平研究虫草之间相互关系的有效方法。不同来源的虫草或菌丝体存在着明

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



模板:2、4、6、8、10、12 为康定虫草模板,3、5、7、

9、11、13 为人工虫草模板。

引物:2、3-S7 4、5-S10 6、7-S23 8、9-S31

10、11-S33 12、13-S61

Templates: 2, 4, 6, 8, 10, 12 are templates of *C. sinensis*;

3, 5, 7, 9, 11, 13 are artificial sample of *C. sinensis*

Primers: 2, 3-S7 4, 5-S10 6, 7-S23 8, 9-S31

10, 11-S33 12, 13-S61

图 1 康定虫草和人工虫草由 S7~S61 产生的 RAPD 带型

Fig. 1 RAPD bands of *C. sinensis* and artificial ones amplified by S7-S61

表 3 发酵菌种与分离纯化菌种的 PCR 扩增结果

Table 3 Results of PCR amplification between fermented mycelia and pure *C. sinensis*

引物	发酵菌种标记数	分离纯化菌种的标记数	共有标记数
S7	9	8	8
S31	8	10	7
S33	13	11	11
S61	8	8	8
S80	16	16	14
总计	54	53	48
平均数	10.8	10.6	9.6
多态性/%			89.7

显的遗传分化,在一定数量引物的实验中,没有发现任何两个样本具有完全的 RAPD 标记,但亲缘关系较近的,则共有标记较多,而不同的标记能否作为不同来源样本的特征性鉴定条带,以供鉴定不同来源的虫草正在进一步的研究当中。

天然康定虫草与本院生产的人工虫草 RAPD 指纹有较大的相似之处,提示两者的药用或营养价

值可能相似。说明虫草的菌种相同,虫体也一致,且生长环境相近似时,天然冬虫夏草与人工虫草的分子水平相差不大;进一步比较天然虫草与发酵菌丝体的 DNA 指纹,相似率并不高。但分离纯化的菌丝与发酵菌丝体的 DNA 比较有较大的相似率(89.7%)。说明虫部的 DNA 差异是造成相似率差异的主要原因。提示进行 DNA 指纹比较时,材料来源部位一致性很重要。

References:

[1] Zhang Y W, Chen Y J, Shen F R, et al. Study of genetic divergence in *Cordyceps sinensis* and *C. crassispora* from northwest of Yunnan Province by using RAPD [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1999, 18(2): 176-183.
 [2] Li Z Z, Huang B, Li R C, et al. Molecular evidence for anamorph determination of *Cordyceps sinensis* (Berk.) SACC. I. Relation between *Hirsutella sinensis* and *C. sinensis* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, 19(1): 60-64.
 [3] Chen Y J, Wang W, Yang Y X, et al. The genetic divergence and RAPD in *Cordyceps sinensis* [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1997, 24(5): 410-416.

马蹄香的生药鉴定及其与华细辛的鉴别

彭 强¹, 赵 桦², 张国柱¹

(1. 汉中市药品检验所, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工学院 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘要:目的 对马蹄香进行生药鉴定,并与易混品华细辛鉴别。方法 原植物特征和药材性状描述,显微镜观察,薄层色谱、高效液相色谱和荧光实验比较。结果 马蹄香和华细辛的原植物主要在是否有地上茎、叶柄是否被毛,花的类型、颜色和果实特征方面有所不同;药材性状在形状、颜色、质地、断面以及气味上存在差异;显微特征在是否检出油细胞或木纤维群以及横断面特征、淀粉粒形态上有区别;薄层、高效液相色谱和荧光特征也有明显差异,并在马蹄香中检出马兜铃酸 A。结论 为马蹄香的生药鉴定及其与华细辛鉴别提供了依据,并提示使用马蹄香应防止可能发生的马兜铃酸的毒性危害。

关键词:马蹄香; 华细辛; 生药鉴定; 薄层色谱; 高效液相色谱; 马兜铃酸 A

中图分类号:R282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)02-0277-04

Pharmacognostic identification of *Saruma henryi* and differentiation of *Asarum siebodii*

PENG Qiang¹, ZHAO Hua², ZHANG Guo-zhu¹

(1. Hanzhong Institute for Drug Control, Hanzhong 723000, China; 2. Bio-Resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Key words: *Saruma henryi* Oliv.; *Asarum siebodii* Miq.; pharmacognostic identification; TLC; HPLC; aristolochic acids A

马兜铃科植物马蹄香 *Saruma henryi* Oliv. 为我国特有单种属植物,分布于陕西、四川、贵州、湖北、江西、河南、甘肃等省。其干燥的根及根茎在民间药用,习称马蹄香、冷水丹、高脚细辛、马头细辛。性

温,味辛、苦,有小毒,具温中散寒、理气镇痛功能,主治胃寒痛、心前区痛和关节痛等症^[1]。马蹄香的人药部位与陕西产的同科植物华细辛 *Asarum siebodii* Miq. 的人药部位相同,其名称与华细辛的别名白细