

基于性状-显微-指纹图谱的红芪搓条与未搓条样品比较研究

王 燕, 强正泽, 贾妙婷, 魏小成, 王明伟, 李 硕, 李成义*

甘肃中医药大学, 兰州 730000

摘要: 本文通过性状描述、扫描电镜、显微及 HPLC 等方法开展了搓条与未搓条红芪样品的差异性比较研究。结果显示搓条与未搓条样品在性状特征(药材形状、皮部、豆腥味)、一级纹理及皮孔、淀粉粒、木栓细胞、指纹图谱相似度、芒柄花素含量等方面存在差异,二者在二级纹理、导管、薄壁细胞、晶体(方晶)、晶鞘纤维的差异性较小或未观察到,指纹图谱相似度搓条样品均高于未搓条样品;芒柄花素含量二者差异显著,搓条样品均高于未搓条样品,野生搓条样品芒柄花素含量均值是未搓条样品的 2.58 倍,栽培搓条样品芒柄花素含量均值是未搓条样品的 1.87 倍。研究结果为搓条机制及其他药材的搓条加工研究提供了参考。

关键词: 红芪;搓条;未搓条;野生;栽培;化学成分

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)8-1402-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.013

Comparative study on rubbed and unrubbed Hedysari Radix samples based on trait-micro-fingerprinting

WANG Yan, QIANG Zheng-ze, JIA Miao-ting,

WEI Xiao-cheng, WANG Ming-wei, LI Shuo, LI Cheng-yi*

Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: A comparative study of the differences between rubbed and unrubbed Hedysari Radix samples was carried out by character description, scanning electron microscope, microscopic identification and HPLC. The results showed that there were some differences between rubbed and unrubbed Hedysari Radix samples in terms of characteristics (shapes, cortex characteristics, beany flavor), primary textures and lenticels, starch grains, cork cells, fingerprint similarity and formononetin content, but less differences or no differences were observed in secondary textures, ducts, thin-walled cells, crystals (square crystals) and crystal sheath fibres. The fingerprint similarities were higher in the rubbed samples than in the unrubbed ones, and there was a significant difference between the two in terms of formononetin content, with the wild rubbed samples having 2.58 times higher than the wild unrubbed ones, and the cultivated rubbed samples having 1.87 times higher than the cultivated unrubbed ones. It can provide a reference for the research of rubbing mechanism and rubbing processing of other medicinal herbs.

Key words: Hedysari Radix; rubbed; unrubbed; wild; cultivated; chemical composition

红芪(Hedysari Radix)又名独根、黑芪、绵芪,是甘肃主产特色药材之一,来源于豆科岩黄芪属植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根^[1]。商品红芪以栽培为主,主要分布于甘肃陇南、定西地区,其中武都米仓山一带所产红芪享有“米仓红芪”之美誉。产地加工是药材综合品质形

成的重要环节,其历史可追溯至东汉时期。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中规定红芪的加工方法为“春、秋二季采挖,除去须根和根头,晒干”。随着中国红芪之乡的产生及红芪产业的发展,武都等道地产区形成了独具特色、较为系统的产地加工方法和技术体系。经实地调研,红芪药材的产地加工方法为:春、秋二季采挖,除净泥土,去除须根和根头,晒至半干,鲜皮柔软时捆成小把进行搓条 2~3 次,使其皮肉紧贴,条直,边晒边搓,晚上堆积发汗,直至全干。与《中国药典》所载加工方法比较,增加了“搓条”环节,而且揉搓是红芪成为“束

收稿日期:2022-12-19 接受日期:2023-03-28

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(82104345);国家自然科学基金(82160730,81860683);甘肃省中药质量与标准研究重点实验室开放基金(zyzx-2020-26)

*通信作者 Tel:86-931-5161062;E-mail:gslichengyi@163.com

黄芪”的关键步骤。通过“搓条”不仅及时排除鲜红芪药材中的水分,防止红芪药材产生质地松泡等现象,而且使药材变得紧实、油润、柔软,保证了药材的质量。因此阐释红芪搓条加工的科学内涵对道地性特征的转化应用具有实际意义。

查阅文献及实地调查发现,揉搓或搓条加工的中药材有红芪^[2,3]、蒙古黄芪^[4]、白条党参、素花党参、川党参^[5-7]、八仙党参^[8]、洛党参^[9]、房党^[10]、潞党参^[11]、三七、光山药^[2,7]等,说明需要“揉搓”加工的药材具有一定的普遍性,解析红芪等药材搓条加工的科学内涵是其质量控制的关键问题。红芪原产地加工存在搓条与发汗两种独具特色的工艺相结合的特征,加工过程需重复两种工艺直到加工完全为止,其科学问题涉及力学、温度等内容,为控制实验变量,研究产地加工对红芪质量的影响,实验设计优先考虑了搓条工艺。为此,采用性状描述、扫描电镜、显微鉴别及指纹图谱等方法比较了搓条与未搓

条红芪样品的差异性,研究搓条与红芪质量间的关系,为阐释红芪搓条加工的科学内涵提供科学支撑。

1 实验材料

1.1 供试材料

2014年采集样品28份,其中野生样品12份,栽培样品15份,商品药材1份(搓条),样品采集后野生与栽培红芪的每份样品分为2类(搓条与未搓条);2017年样品1份(Z-16),分为3类(鲜品,搓条,未搓条),样品信息见表1,共得到搓条样品29份、未搓条样品28份、鲜品1份。样品搓条加工方法:通过实地采样模拟红芪产地搓条方法,即采集红芪鲜品后(约3 kg),初步抖去泥土,装入已写好编号的塑料袋中。带回实验室后取出样品摊晾,至水分达50%左右时开始搓条:共搓条5次(隔三天搓一次),每次揉搓20次(一次搓一根样品),完成后阴干。未搓条样品直接阴干。样品晾干后,用粉碎机粉碎,过65目筛,装入自封袋密封备用。

表1 红芪样品信息

Table 1 Information of Hedysari Radix samples

样品编号及分类 Sample number and classification			产地 Origin	采集时间 Collection time
搓条 Rubbed	未搓条 Unrubbed	鲜品 Fresh		
Z-01-CT	Z-01-WCT	-	武都区鱼龙镇党家湾村	2014. 10. 17
Z-02-CT	Z-02-WCT	-	武都区鱼龙镇秋林坪村	2014. 10. 17
Z-03-CT	Z-03-WCT	-	武都区安化镇李家庙村	2014. 10. 17
Z-04-CT	Z-04-WCT	-	武都区甘泉镇龙湾村	2014. 10. 17
Z-05-CT	Z-05-WCT	-	武都区安化镇艾湾村	2014. 10. 17
Z-06-CT	Z-06-WCT	-	武都区龙凤乡瓦舌头村	2014. 10. 17
Z-07-CT	Z-07-WCT	-	武都区龙凤乡草沟村	2014. 10. 17
Z-08-CT	Z-08-WCT	-	武都区郭河乡寺山村	2014. 10. 18
Z-09-CT	Z-09-WCT	-	武都区磨坝藏族乡中腰村	2014. 10. 18
Z-10-CT	Z-10-WCT	-	武都区角弓镇角弓山	2014. 10. 19
Z-11-CT	Z-11-WCT	-	武都区两水镇马尾巴村	2014. 10. 19
Z-12-CT	Z-12-WCT	-	宕昌县官亭镇	2014. 10. 23
Z-13-CT	Z-13-WCT	-	宕昌县临江铺乡郭家湾村	2014. 10. 23
Z-14-CT	Z-14-WCT	-	宕昌县临江铺乡临江铺村	2014. 10. 23
Z-15-CT	Z-15-WCT	-	宕昌县南河乡路固村	2014. 10. 23
Z-16-CT	Z-16-WCT	Z-16-XP	武都区安化镇马家沟村	2017. 11. 20
Y-01-CT	Y-01-WCT	-	武都区安化镇李家庙村	2014. 10. 17
Y-02-CT	Y-02-WCT	-	武都区甘泉镇李和村	2014. 10. 17

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品编号及分类 Sample number and classification			产地 Origin	采集时间 Collection time
搓条 Rubbed	未搓条 Unrubbed	鲜品 Fresh		
Y-03-CT	Y-03-WCT	-	武都区龙凤乡瓦舌头村	2014. 10. 17
Y-04-CT	Y-04-WCT	-	武都区郭河乡寺山村	2014. 10. 18
Y-05-CT	Y-05-WCT	-	武都区磨坝藏族乡中腰村	2014. 10. 18
Y-06-CT	Y-06-WCT	-	武都区两水镇马尾巴村	2014. 10. 19
Y-07-CT	Y-07-WCT	-	武都区石门乡马下村	2014. 10. 19
Y-08-CT	Y-08-WCT	-	漳县四族乡石门林场	2014. 10. 25
Y-09-CT	Y-09-WCT	-	漳县马泉乡九眼泉村	2014. 10. 25
Y-10-CT	Y-10-WCT	-	漳县大草滩乡新联村	2014. 10. 25
Y-11-CT	Y-11-WCT	-	漳县殪虎桥乡	2014. 10. 25
Y-12-CT	Y-12-WCT	-	渭源县会川镇梁家坡村	2014. 10. 26
S-01-CT	-	-	武都区角弓镇	2014. 10. 29

注: Z 代表栽培; Y 代表野生; S 代表商品; “-”表示无; CT 代表搓条; WCT 代表未搓条; XP 代表鲜品。

Note: Z: Cultivated; Y: Wild; S: Commercial; “-”: Absent; CT: Rubbed; WCT: Unrubbed; XP: Fresh.

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

电子显微镜(型号: BX51-32H01); 高效液相色谱仪(型号: Agilent 1260 型); Tescan V5 扫描电子显微镜(捷克 TESCAN 公司)。

1.2.2 试剂

无水乙醇、水合氯醛、稀甘油、70% 甲醇、0.1% 磷酸、乙腈(天津市大茂化学试剂厂, 批号: 151201, 色谱纯); 甲醇(天津市大茂化学试剂厂, 批号: 151026, 分析纯; 批号: 151123, 色谱纯); 磷酸(天津市凯信化学工业有限公司, 优级纯); 水(娃哈哈纯净水); 芒柄花素对照品(成都曼斯特生物科技有限

公司, 批号: MUST-13080501, 纯度 $\geq 99\%$); 红芪对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号: 121103-201103)。

2 方法与结果

2.1 水分测定

采用 2020 年版《中国药典》(四部)水分测定法项下, 烘干法测定^[12], 平行三次, 并计算数据, 样品水分数据见表 2。采用单因素方差分析, 比较了搓条与未搓条样品水分的差异性(见表 3), 发现搓条与未搓条样品水分含量之间差异性不显著($P = 0.1708 > 0.05$)。

表 2 水分测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 The results of moisture content ($\bar{x} \pm s, n=3$)

搓条 Rubbed	水分 Moisture (%)	未搓条 Unrubbed	水分 Moisture (%)
Z-01-CT	6.69 \pm 0.04	Z-01-WCT	6.59 \pm 0.13
Z-02-CT	6.72 \pm 0.02	Z-02-WCT	6.83 \pm 0.15
Z-03-CT	6.38 \pm 0.03	Z-03-WCT	6.92 \pm 0.06
Z-04-CT	7.69 \pm 0.01	Z-04-WCT	7.40 \pm 0.10
Z-05-CT	7.54 \pm 0.14	Z-05-WCT	7.84 \pm 0.13
Z-06-CT	6.86 \pm 0.09	Z-06-WCT	6.33 \pm 0.19
Z-07-CT	7.82 \pm 0.06	Z-07-WCT	7.36 \pm 0.04
Z-08-CT	6.87 \pm 0.12	Z-08-WCT	6.13 \pm 0.16

续表 2 (Continued Tab. 2)

搓条 Rubbed	水分 Moisture (%)	未搓条 Unrubbed	水分 Moisture (%)
Z-09-CT	6.71 ± 0.19	Z-09-WCT	7.11 ± 0.11
Z-10-CT	7.64 ± 0.14	Z-10-WCT	7.41 ± 0.10
Z-11-CT	7.05 ± 0.04	Z-11-WCT	6.81 ± 0.16
Z-12-CT	6.74 ± 0.15	Z-12-WCT	6.32 ± 0.09
Z-13-CT	6.99 ± 0.11	Z-13-WCT	6.37 ± 0.11
Z-14-CT	7.53 ± 0.06	Z-14-WCT	6.30 ± 0.11
Z-15-CT	7.33 ± 0.17	Z-15-WCT	6.95 ± 0.18
Z-16-CT	5.70 ± 0.03	Z-16-WCT	5.49 ± 0.04
Y-01-CT	7.17 ± 0.07	Y-01-WCT	7.63 ± 0.07
Y-02-CT	6.95 ± 0.05	Y-02-WCT	6.34 ± 0.08
Y-03-CT	7.54 ± 0.14	Y-03-WCT	7.58 ± 0.12
Y-04-CT	6.74 ± 0.08	Y-04-WCT	6.74 ± 0.07
Y-05-CT	6.67 ± 0.17	Y-05-WCT	6.52 ± 0.10
Y-06-CT	7.25 ± 0.12	Y-06-WCT	7.69 ± 0.03
Y-07-CT	6.96 ± 0.13	Y-07-WCT	6.60 ± 0.14
Y-08-CT	7.59 ± 0.04	Y-08-WCT	7.18 ± 0.12
Y-09-CT	7.12 ± 0.03	Y-09-WCT	7.40 ± 0.01
Y-10-CT	7.31 ± 0.16	Y-10-WCT	7.43 ± 0.18
Y-11-CT	6.66 ± 0.10	Y-11-WCT	6.67 ± 0.13
Y-12-CT	6.65 ± 0.07	Y-12-WCT	6.37 ± 0.11
S-01-CT	8.00 ± 0.07	Z-16-XP	61.16 ± 0.67

表 3 搓条与未搓条样品水分含量的单因素方差分析

Table 3 One-way ANOVA for moisture content of rubbed and unrubbed samples

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
组间 Between groups	0.544 7	1	0.544 7	1.925 8	0.170 8
组内 Within groups	15.557 0	55	0.282 9	-	-
总数 Total	16.101 7	56	-	-	-

2.2 性状比较研究

参考 2020 版《中国药典》(一部)红芪项下的药材性状的描述内容^[1],对野生、栽培红芪搓条与未搓条样品之间的表面性状、颜色、质地、断面、气味等

进行了比较,提取了搓条及未搓条样品的个性特征信息,总结了搓条与未搓条样品之间的差异性(见表 4、图 1)。

表 4 搓条与未搓条样品性状特征

Table 4 Characteristics of rubbed and unrubbed samples

类型 Type	性状特征 Characteristic
搓条 Rubbed	呈圆柱形,药材全身较直,皮孔横生,纵皱纹不明显,皮紧实且较为细腻,表面呈浅褐色,嚼之有豆腥味,味甜,闻之有浓烈的豆腥气,断面纤维性且粉性较强,断面呈浅黄色,质地坚硬,质密,不易折断,揉搓过程须很容易干且易脱落。
未搓条 Unrubbed	呈不规则圆柱形,且具大部分支根和须根,皮松,易折断,部分样品折断显中空,并呈现出一定的柴性,纵皱纹较深,表面深褐色,嚼之、闻之豆腥味较淡或无,断面呈黄白色,味较甜。



图1 搓条与未搓条药材样品对比

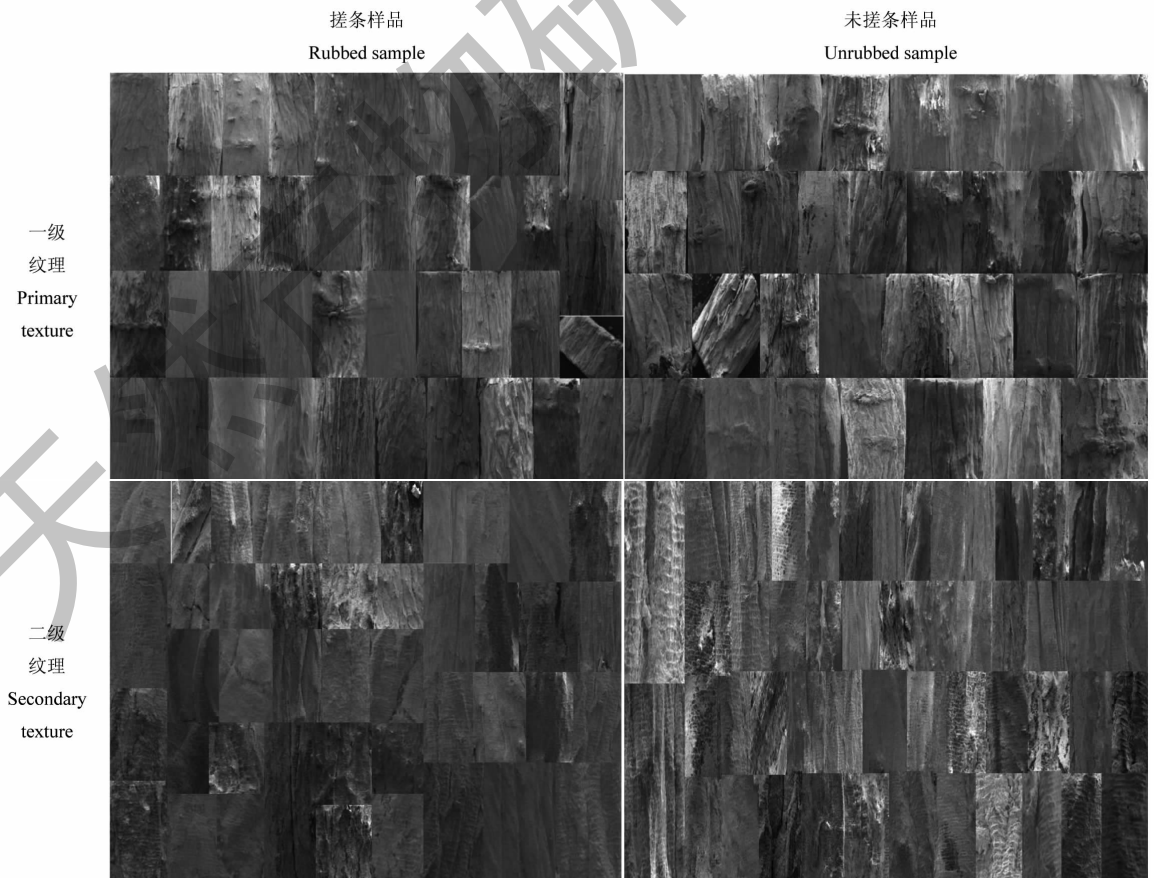
Fig. 1 Comparison of rubbed and unrubbed samples

注:A:搓条样品;B:未搓条样品。Note:A:Rubbed samples;B:Unrubbed samples.

2.3 基于扫描电镜的药材比较研究

一级纹理、二级纹理及皮孔等特征属于药材的微性状特征之一,是药材品质形成过程产生的产物,与药材的品质具有相关关系。在性状比较的基础

上,选取部分药材样品,切取搓条与未搓条药材样品的表皮置于扫描电镜(10 kV 加速电压)下观察,比较二者的一级纹理、二级纹理及皮孔的差异性(见图2),发现搓条与未搓条样品均具有一级纹理、二



续图2(Continued Fig.2)



图2 搓条与未搓条一级纹理、二级纹理及皮孔比较

Fig. 2 Primary textures, secondary textures, lenticels of rubbed and unrubbed samples

级纹理及皮孔,其差异主要存在于一级纹理及皮孔上。图2中红芪样品一级纹理、二级纹理及皮孔比较发现,搓条样品一级纹理较为细腻,药材表面沟壑较小、浅,而未搓条样品一级纹理较为粗糙,沟壑较大、深,搓条样品的皮孔大多数较平,未搓条样品的皮孔大多数凸出药材表面,可能与红芪搓条加工过程中药材表面受到揉搓力有关。二级纹理是将红芪药材表面特征放大后观测的特征,搓条与未搓条样品均呈现出网状的纹理,特征相似,因此二者在二级纹理特征上差异性较小。

2.4 显微鉴别研究

显微特征是鉴定和表征中药材品质的重要参考依据,其与中药材的成分及品质具有密切关系。分别选取 Z-02、Z-03、Y-04、Y-09、Y-12 的搓条与未搓条样品及 S-01-CT 商品药材粉末,用解剖针挑取少量粉末于载玻片上,滴加稀甘油 1~2 滴(或滴加水合氯醛于酒精灯上进行透化,再滴加稀甘油 1~2 滴),用镊子盖上盖玻片,在显微镜下进行观察。同时选取 Z-16 等样品,分离木栓层组织,滴加稀甘油 1~2 滴后于显微镜观察,比较搓条与未搓条红芪样品之间表皮组织的差异性。

通过比较搓条与未搓条样品(见图3)导管、薄壁细胞、晶体(方晶)、晶鞘纤维、淀粉粒、木栓细胞等显微特征发现,搓条与未搓条样品间搓条样品单粒淀粉及复粒淀粉较多,且形态较为明显,而未搓条样品淀粉粒大多数聚集在一起,单粒淀粉及复粒淀粉较少,可能与样品搓条加工过程中揉搓力的挤压效应有关;二者间导管类型多为环纹、具缘纹孔等,

差异性较小或不明显;薄壁细胞呈类圆形,细胞形态差异性较小或不明显;晶体大多为方晶,形态特征未发生明显变化;晶鞘纤维大多为纤维与方晶的结合体,二者间差异性不明显;木栓细胞形态二者间具有差异性,搓条样品木栓细胞排列较为整齐,细胞形态大多呈长方形,而未搓条样品木栓细胞无序排列,细胞形态呈不规则状态,出现这种差异性的原因可能与搓条样品在揉搓过程中受到揉搓机械力的作用有关。因此,搓条与未搓条样品间的导管、薄壁细胞、晶体(方晶)、晶鞘纤维的差异性较小或在此条件下不能够表征出二者之间的差异性,二者间的差异性主要表现在淀粉粒的存在状态与木栓细胞形态,搓条样品单粒淀粉及复粒淀粉较多,且形态较为明显,未搓条样品淀粉粒大多数聚集在一起,单粒淀粉及复粒淀粉较少;搓条样品木栓细胞排列较为整齐,细胞形态大多呈长方形,而未搓条样品木栓细胞排列无序,细胞形态不规则。

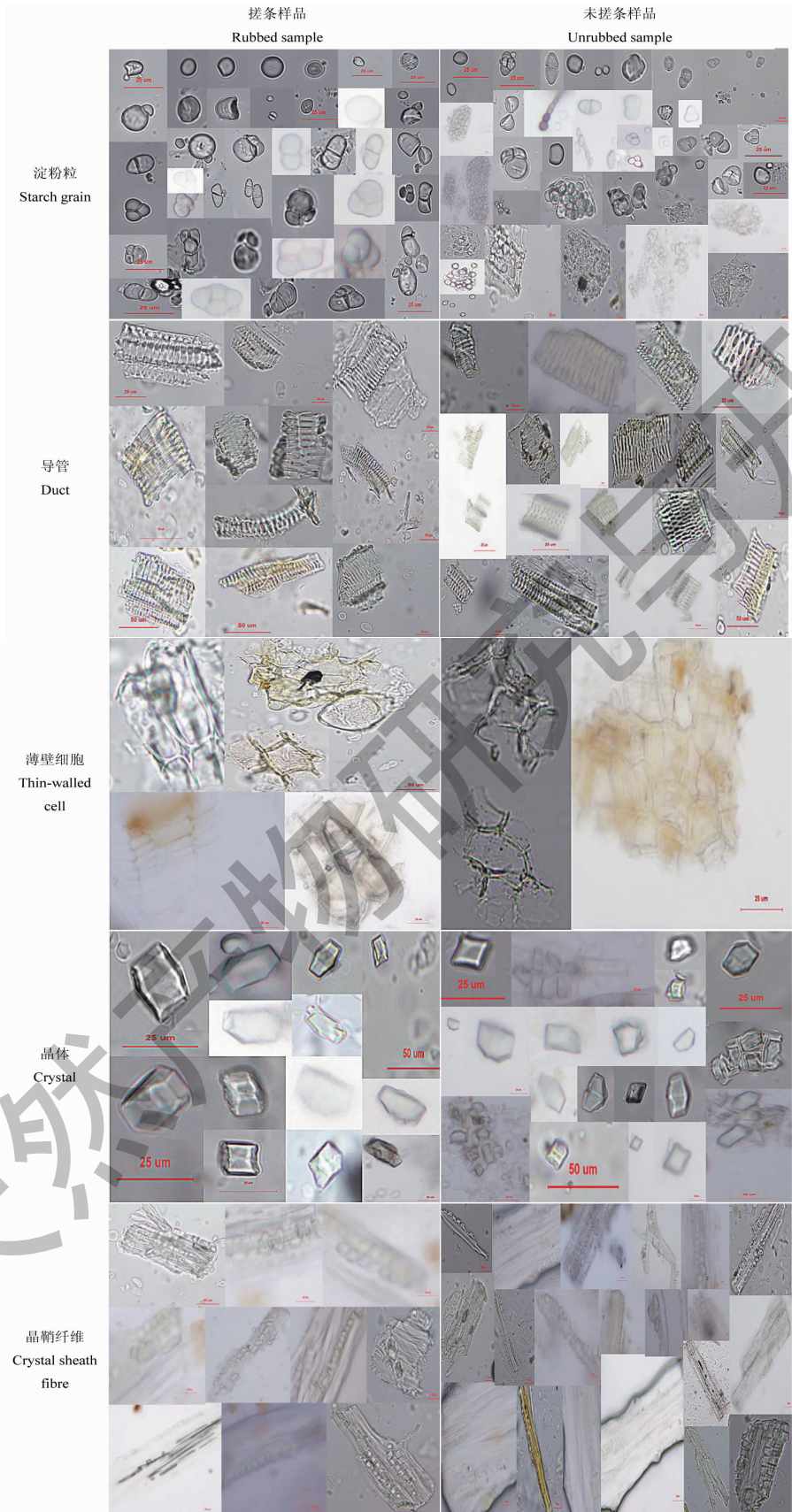
2.5 指纹图谱研究

2.5.1 指纹图谱条件

指纹图谱是能够反映中药整体性化学特征的重要研究技术。此部分内容是在课题组前期建立的指纹图谱方法学基础上开展的^[13]。指纹图谱条件见表5。

2.5.2 样品处理及制备

精密称取搓条与未搓条样品粉末 3 g,置于锥形瓶(150 mL)中,用移液管加入 30 mL 甲醇,水浴(80 ℃)回流 1 h,回流结束后放置室温,抽滤处理,滤液水浴蒸发至近干,放冷后用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶。进样时用 0.45 μm 滤膜过滤至进样瓶



续图 3 (Continued Fig.3)

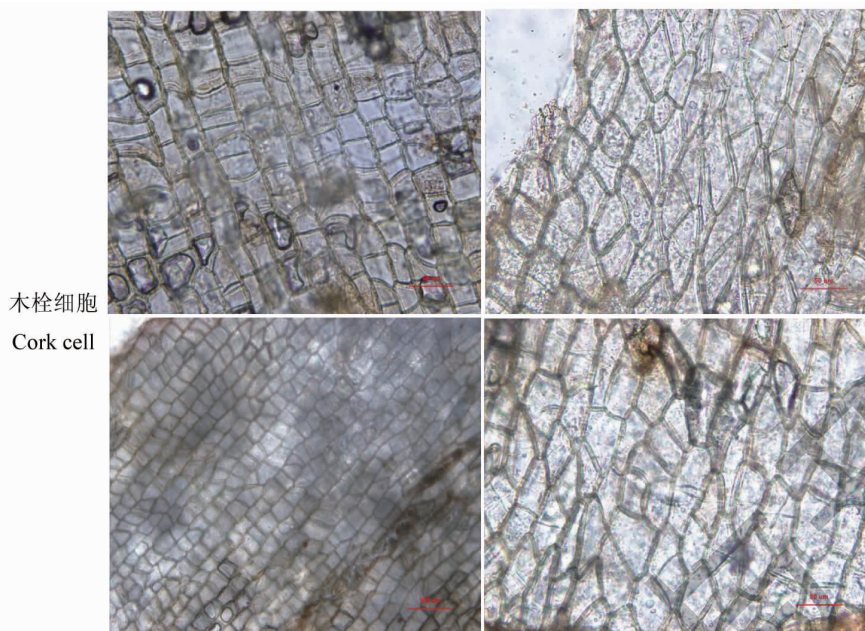


图3 搓条与未搓条样品显微特征

Fig. 3 Microscopic features of rubbed and unrubbed samples

表5 TC-C₁₈(2) 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相组成
Table 5 TC-C₁₈(2) column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) mobile phase

时间 Time (min)	流动相 Mobile phase		流速 Flow rate (mL/min)	波长 Wavelength (nm)	柱温 Column temperature (°C)	进样量 Sampling volume (μL)
	0.1% 磷酸水溶液 0.1% aqueous phosphoric acid solution (%)	乙腈 Acetonitrile (%)				
0	95	5				
5	95	5				
15	82	18				
20	82	18				
40	70	30	1.0	248	30	10
60	40	60				
70	60	40				
75	60	40				

中,即为供试样品溶液,每份样品平行3次。

2.5.3 线性关系考察

此部分实验是在课题组前期建立的质量评价体系的基础开展的,因此为保持研究工作的系统性及可对照性,沿用了前期建立的芒柄花素回归方程:浓度(μg/mL)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标, $Y = 60.769X - 9.0639, r^2 = 0.9999$,线性范围为0.810 ~ 218.700 μg/mL。

2.5.4 精密度试验

取 S-01-CT 样品液,连续进样 6 次,按“2.5.1”

项下色谱条件测定芒柄花素峰面积,其峰面积积分值的 RSD 值为 1.14%,表明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性试验

取 S-01-CT 样品液,于室温下放置,分别于 0、4、8、12、20、24 h 进样检测,按芒柄花素成分的峰面积积分值分别计算其 RSD 值。结果该样品中芒柄花素 RSD 值为 0.72%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 重复性试验

精密称取 S-01-CT 粉末 6 份,按“2.5.2”项下方

法制成6份供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件分别测定。结果该样品中芒柄花素的RSD值为0.76%,表明该测定方法重复性良好。

2.5.7 加样回收率试验

精密称取已知芒柄花素含量的S-01-CT样品9份,每份约1.0g,精密加入一定量的芒柄花素对照品,其加入量分别为该样品中相应成分含量的80%(53.83 μg)、100%(67.29 μg)、120%(80.75 μg),按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件测定。结果芒柄花素回收率的RSD值为2.52%。

2.6 芒柄花素含量测定

采用“2.5.2”项下样品制备的方法制备搓条与未搓条样品液,按照“2.5.1”指纹图谱条件进样,记录芒柄花素峰面积,计算各样品芒柄花素含量。

2.7 数据处理

以实验中获取的搓条与未搓条指纹图谱为数

据形成数据库,并采用2004版中药指纹图谱相似度评价系统进行不同样品间的相似度比较研究,并采用单因素方差分析比较二者芒柄花素含量的差异性。

2.8 结果分析

2.8.1 搓条与未搓条样品相似度比较

以对照药材为对照,计算了搓条与未搓条红芪样品的相似度(见表6),发现搓条与未搓条红芪样品相似度具有一定的差异性,大多数搓条样品的相似度高于未搓条样品的相似度,栽培搓条样品的平均相似度为0.931,栽培未搓条样品的平均相似度为0.893,野生搓条样品的平均相似度为0.917,野生未搓条样品的平均相似度为0.877。搓条与未搓条指纹图谱共有模式图见图4,指纹图谱匹配结果显示,搓条样品与未搓条样品的共有峰为8个,其中8号峰为芒柄花素。

表6 搓条与未搓条样品相似度

Table 6 HPLC fingerprinting similarity of rubbed and unrubbed samples

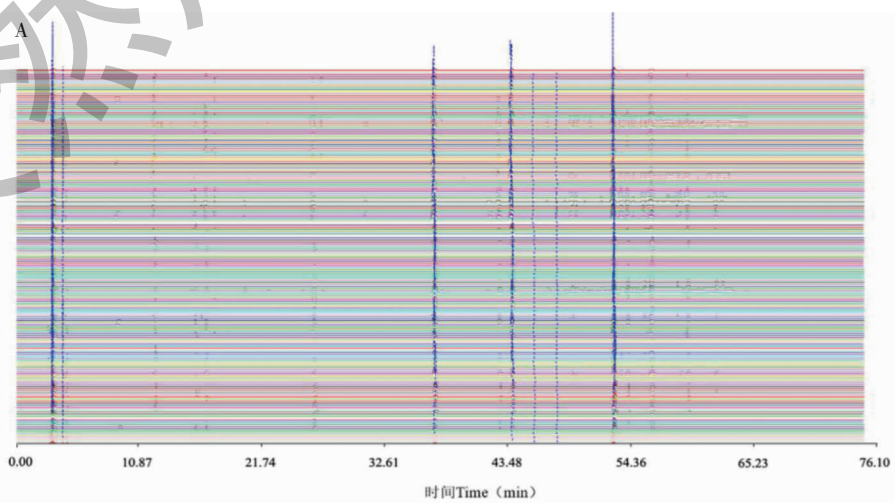
样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity
Z-01-CT-1	0.925 0	Z-01-WCT-1	0.811 0	Y-01-CT-1	0.936 0	Y-01-WCT-1	0.876 0
Z-01-CT-2	0.931 0	Z-01-WCT-2	0.810 0	Y-01-CT-2	0.938 0	Y-01-WCT-2	0.888 0
Z-01-CT-3	0.928 0	Z-01-WCT-3	0.922 0	Y-01-CT-3	0.942 0	Y-01-WCT-3	0.889 0
Z-02-CT-1	0.910 0	Z-02-WCT-1	0.915 0	Y-02-CT-1	0.886 0	Y-02-WCT-1	0.898 0
Z-02-CT-2	0.913 0	Z-02-WCT-2	0.929 0	Y-02-CT-2	0.879 0	Y-02-WCT-2	0.884 0
Z-02-CT-3	0.926 0	Z-02-WCT-3	0.920 0	Y-02-CT-3	0.882 0	Y-02-WCT-3	0.886 0
Z-03-CT-1	0.929 0	Z-03-WCT-1	0.903 0	Y-03-CT-1	0.839 0	Y-03-WCT-1	0.880 0
Z-03-CT-2	0.931 0	Z-03-WCT-2	0.912 0	Y-03-CT-2	0.852 0	Y-03-WCT-2	0.885 0
Z-03-CT-3	0.922 0	Z-03-WCT-3	0.905 0	Y-03-CT-3	0.830 0	Y-03-WCT-3	0.887 0
Z-04-CT-1	0.914 0	Z-04-WCT-1	0.904 0	Y-04-CT-1	0.931 0	Y-04-WCT-1	0.839 0
Z-04-CT-2	0.923 0	Z-04-WCT-2	0.893 0	Y-04-CT-2	0.930 0	Y-04-WCT-2	0.827 0
Z-04-CT-3	0.917 0	Z-04-WCT-3	0.850 0	Y-04-CT-3	0.937 0	Y-04-WCT-3	0.820 0
Z-05-CT-1	0.926 0	Z-05-WCT-1	0.840 0	Y-05-CT-1	0.927 0	Y-05-WCT-1	0.852 0
Z-05-CT-2	0.915 0	Z-05-WCT-2	0.831 0	Y-05-CT-2	0.906 0	Y-05-WCT-2	0.833 0
Z-05-CT-3	0.939 0	Z-05-WCT-3	0.801 0	Y-05-CT-3	0.907 0	Y-05-WCT-3	0.846 0
Z-06-CT-1	0.938 0	Z-06-WCT-1	0.810 0	Y-06-CT-1	0.931 0	Y-06-WCT-1	0.878 0
Z-06-CT-2	0.938 0	Z-06-WCT-2	0.800 0	Y-06-CT-2	0.926 0	Y-06-WCT-2	0.883 0
Z-06-CT-3	0.916 0	Z-06-WCT-3	0.928 0	Y-06-CT-3	0.929 0	Y-06-WCT-3	0.884 0
Z-07-CT-1	0.915 0	Z-07-WCT-1	0.924 0	Y-07-CT-1	0.950 0	Y-07-WCT-1	0.923 0
Z-07-CT-2	0.911 0	Z-07-WCT-2	0.932 0	Y-07-CT-2	0.955 0	Y-07-WCT-2	0.921 0
Z-07-CT-3	0.962 0	Z-07-WCT-3	0.859 0	Y-07-CT-3	0.957 0	Y-07-WCT-3	0.921 0
Z-08-CT-1	0.957 0	Z-08-WCT-1	0.870 0	Y-08-CT-1	0.871 0	Y-08-WCT-1	0.921 0

续表 6(Continued Tab. 6)

样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity	样品编号 及平行 Sample number and parallel	相似度 Similarity
Z-08-CT-2	0.960 0	Z-08-WCT-2	0.861 0	Y-08-CT-2	0.877 0	Y-08-WCT-2	0.917 0
Z-08-CT-3	0.929 0	Z-08-WCT-3	0.929 0	Y-08-CT-3	0.877 0	Y-08-WCT-3	0.920 0
Z-09-CT-1	0.925 0	Z-09-WCT-1	0.934 0	Y-09-CT-1	0.962 0	Y-09-WCT-1	0.869 0
Z-09-CT-2	0.895 0	Z-09-WCT-2	0.931 0	Y-09-CT-2	0.961 0	Y-09-WCT-2	0.872 0
Z-09-CT-3	0.940 0	Z-09-WCT-3	0.926 0	Y-09-CT-3	0.959 0	Y-09-WCT-3	0.870 0
Z-10-CT-1	0.944 0	Z-10-WCT-1	0.910 0	Y-10-CT-1	0.943 0	Y-10-WCT-1	0.914 0
Z-10-CT-2	0.945 0	Z-10-WCT-2	0.921 0	Y-10-CT-2	0.947 0	Y-10-WCT-2	0.917 0
Z-10-CT-3	0.930 0	Z-10-WCT-3	0.902 0	Y-10-CT-3	0.946 0	Y-10-WCT-3	0.916 0
Z-11-CT-1	0.925 0	Z-11-WCT-1	0.897 0	Y-11-CT-1	0.887 0	Y-11-WCT-1	0.762 0
Z-11-CT-2	0.928 0	Z-11-WCT-2	0.911 0	Y-11-CT-2	0.893 0	Y-11-WCT-2	0.767 0
Z-11-CT-3	0.918 0	Z-11-WCT-3	0.946 0	Y-11-CT-3	0.894 0	Y-11-WCT-3	0.768 0
Z-12-CT-1	0.912 0	Z-12-WCT-1	0.941 0	Y-12-CT-1	0.942 0	Y-12-WCT-1	0.912 0
Z-12-CT-2	0.915 0	Z-12-WCT-2	0.946 0	Y-12-CT-2	0.936 0	Y-12-WCT-2	0.919 0
Z-12-CT-3	0.950 0	Z-12-WCT-3	0.827 0	Y-12-CT-3	0.946 0	Y-12-WCT-3	0.919 0
Z-13-CT-1	0.945 0	Z-13-WCT-1	0.835 0	dzyc-1	0.883 0		
Z-13-CT-2	0.951 0	Z-13-WCT-2	0.811 0	dzyc-2	0.882 0		
Z-13-CT-3	0.943 0	Z-13-WCT-3	0.888 0	dzyc-3	0.884 0		
Z-14-CT-1	0.946 0	Z-14-WCT-1	0.881 0	dzyc-4	0.879 0		
Z-14-CT-2	0.946 0	Z-14-WCT-2	0.886 0	dzyc-5	0.871 0		
Z-14-CT-3	0.948 0	Z-14-WCT-3	0.940 0	dzyc-6	0.883 0		
Z-15-CT-1	0.948 0	Z-15-WCT-1	0.913 0	S-01-CT-1	0.800 0		
Z-15-CT-2	0.954 0	Z-15-WCT-2	0.938 0	S-01-CT-2	0.824 0		
Z-15-CT-3	0.967 0	Z-15-WCT-3	0.944 0	S-01-CT-3	0.830 0		
Z-16-CT-1	0.956 0	Z-16-WCT-1	0.930 0				
Z-16-CT-2	0.964 0	Z-16-WCT-2	0.934 0				
Z-16-CT-3	0.806 0	Z-16-WCT-3	0.930 0				

注:dzyc:红芪对照药材。

Note:dzyc:Hedysari Radix control herb.



续图 4(Continued Fig.4)

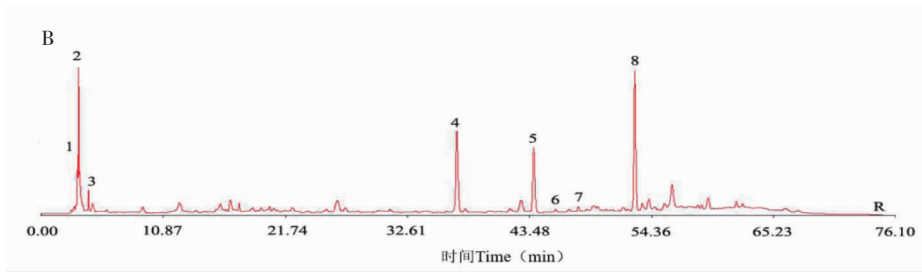


图4 搓条与未搓条样品 HPLC 指纹图谱共有模式图

Fig. 4 HPLC fingerprint common mode of rubbed and unrubbed samples

注:A:指纹图谱;B:共有峰。Note:A:HPLC fingerprint;B:Common peaks.

2.8.2 搓条与未搓条样品芒柄花素含量比较

在指纹图谱建立的基础上,测定了搓条与未搓条红芪样品芒柄花素含量(见表7),由表7可知,每个产地搓条样品中芒柄花素的含量均高于未搓条样品,野生搓条样品均值为 $180.29 \pm 134.29 \mu\text{g/g}$,未搓条样品均值为 $69.81 \pm 25.41 \mu\text{g/g}$,野生搓条样品芒柄花素均值含量是未搓条样品均值的 2.58 倍,栽培搓条样品均值为 $129.64 \pm 55.55 \mu\text{g/g}$,未搓条样品均值为 $68.91 \pm 29.30 \mu\text{g/g}$,栽培搓条样品芒柄花

素均值含量是未搓条样品均值的 1.87 倍。同时单因素方差分析结果显示(见表8),野生搓条与未搓条样品的芒柄花素含量之间存在显著性差异($P = 0.01 < 0.05$),栽培搓条与未搓条样品的芒柄花素含量之间存在极显著性差异($P = 0.001 < 0.01$),且混合样品的搓条与未搓条样品的芒柄花素含量之间存在极显著性差异($P = 0.000 < 0.01$)。以上研究表明,红芪搓条后增加了芒柄花素的含量。

表7 搓条与未搓条样品芒柄花素含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Formononetin content of rubbed and unrubbed samples($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号 Sample number	芒柄花素含量 Formononetin content($\mu\text{g/g}$)	编号 Sample number	芒柄花素含量 Formononetin content($\mu\text{g/g}$)
Y-01-CT	172.23 ± 18.13	Y-01-WCT	53.17 ± 15.55
Y-02-CT	509.16 ± 26.56	Y-02-WCT	70.77 ± 13.25
Y-03-CT	73.80 ± 10.50	Y-03-WCT	56.31 ± 13.07
Y-04-CT	380.55 ± 9.33	Y-04-WCT	119.47 ± 9.62
Y-05-CT	170.79 ± 7.94	Y-05-WCT	106.52 ± 5.03
Y-06-CT	212.94 ± 31.79	Y-06-WCT	73.70 ± 11.96
Y-07-CT	119.50 ± 5.60	Y-07-WCT	58.39 ± 6.06
Y-08-CT	168.56 ± 20.12	Y-08-WCT	89.46 ± 7.51
Y-09-CT	104.93 ± 16.92	Y-09-WCT	36.48 ± 1.12
Y-10-CT	78.42 ± 2.32	Y-10-WCT	61.64 ± 2.64
Y-11-CT	87.12 ± 3.88	Y-11-WCT	36.78 ± 0.80
Y-12-CT	85.51 ± 5.49	Y-12-WCT	75.09 ± 3.10
野生搓条均值 Mean of wild-rubbed samples	180.29 ± 134.29	野生未搓条均值 Mean of wild-unrubbed samples	69.81 ± 25.41
Z-01-CT	122.27 ± 1.26	Z-01-WCT	110.17 ± 16.90
Z-02-CT	132.99 ± 24.50	Z-02-WCT	104.67 ± 5.24
Z-03-CT	71.08 ± 9.92	Z-03-WCT	53.29 ± 2.13
Z-04-CT	141.44 ± 16.70	Z-04-WCT	36.83 ± 4.36
Z-05-CT	82.77 ± 10.42	Z-05-WCT	54.12 ± 5.83

续表 7 (Continued Tab. 4)

编号 Sample number	芒柄花素含量 Formononetin content($\mu\text{g/g}$)	编号 Sample number	芒柄花素含量 Formononetin content($\mu\text{g/g}$)
Z-06-CT	245.73 \pm 26.11	Z-06-WCT	131.81 \pm 7.95
Z-07-CT	105.80 \pm 4.83	Z-07-WCT	66.08 \pm 2.98
Z-08-CT	155.93 \pm 12.82	Z-08-WCT	85.75 \pm 11.73
Z-09-CT	58.82 \pm 8.88	Z-09-WCT	31.09 \pm 3.87
Z-10-CT	253.84 \pm 22.48	Z-10-WCT	60.81 \pm 10.38
Z-11-CT	101.59 \pm 20.96	Z-11-WCT	59.08 \pm 3.46
Z-12-CT	153.90 \pm 18.22	Z-12-WCT	56.53 \pm 6.21
Z-13-CT	147.65 \pm 29.12	Z-13-WCT	65.33 \pm 3.66
Z-14-CT	75.48 \pm 1.06	Z-14-WCT	99.98 \pm 51.17
Z-15-CT	107.49 \pm 17.07	Z-15-WCT	51.88 \pm 8.78
Z-16-CT	117.38 \pm 17.37	Z-16-WCT	35.19 \pm 14.20
栽培搓条均值 Mean of cultivated -rubbed samples	129.64 \pm 55.55	栽培未搓条均值 Mean of cultivated-unrubbed samples	68.91 \pm 29.30
Z-16-XP	53.34 \pm 7.49	S-01-CT	67.29 \pm 5.46
对照药材 Control herb	44.77 \pm 0.11		

表 8 搓条与未搓条样品芒柄花素含量单因素方差分析

Table 8 One-way ANOVA for formononetin content of rubbed and unrubbed samples

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
野生 Wild					
组间 Between groups	73 231.668	1	73 231.668	7.841	0.010
组内 Within groups	205 476.410	22	9 339.837		
总数 Total	278 708.078	23			
栽培 Cultivated					
组间 Between groups	29 497.169	1	29 497.169	14.959	0.001
组内 Within groups	59 154.406	30	1 971.814		
总数 Total	88 651.575	31			
野生与栽培 Wild and cultivated					
组间 Between groups	94 240.989	1	94 240.989	18.031	0.000
组内 Within groups	282 233.073	54	5 226.538		
总数 Total	376 474.062	55			

3 讨论与结论

通过鉴定学研究发现,搓条样品呈圆柱形,皮紧实且较为细腻,表面呈浅褐色,嚼之有豆腥味,味甜,闻之有浓烈的豆腥气,断面纤维性且粉性较强,质地坚硬,质密,不易折断,揉搓过程须根容易干且易脱落,一级纹理较为细腻,药材表面沟壑较小、浅,皮孔大多数较平,单粒淀粉及复粒淀粉较多,且形态较为明显,木栓细胞排列较为整齐,细胞形态大多呈长方形;未搓条样品呈不规则圆柱形,且具分支,皮松,易折断,部分样品折断后显中空的特征,并呈现出一定

的柴性,纵皱纹较深,表面深褐色,嚼之、闻之豆腥味较淡或无,一级纹理较为粗糙,沟壑较大、深,未搓条样品的皮孔大多数凸出药材表面,淀粉粒大多数聚集在一起,单粒淀粉及复粒淀粉较少,木栓细胞无序排列,细胞形态呈不规则状态。搓条与未搓条样品的二级纹理、导管、薄壁细胞、晶体(方晶)、晶鞘纤维的差异性较小或在此条件下不能够表征出二者之间的差异性。在指纹图谱及芒柄花素含量方面,搓条与未搓条红芪样品相似度具有一定的差异性,搓条样品相似度均值均高于未搓条样品,搓条与未搓

条红芪样品中芒柄花素含量具有显著性差异,搓条样品中芒柄花素的含量均高于未搓条样品,野生搓条样品芒柄花素均值含量是未搓条样品均值的2.58倍,栽培搓条样品芒柄花素均值含量是未搓条样品均值的1.87倍。以上研究表明,搓条与未搓条样品在性状特征、一级纹理及皮孔、淀粉粒、木栓细胞、指纹图谱相似度、芒柄花素含量等方面存在一定的差异性,且红芪搓条后增加了芒柄花素的含量。

实地调查及实验过程观察发现,揉搓加工不仅是保证质量的关键步骤,而且揉搓加工涉及中药材红芪“分程变温干燥(边干燥边揉搓)”过程等重要环节,其过程存在摩擦、受力等物理学的特征。中药材有效成分普遍具有热敏性、易氧化特性,揉搓及干燥过程受温度影响,易引起外观性状、有效成分及生物活性的转变,其物理性质(色泽、气味、形态体积、微观结构)和化学性质(多糖、黄酮、其他成分)等发生变化^[14-16],因此揉搓干燥过程伴随着药材中水分减少、能量转换及化学变化等现象的发生,采挖后的红芪等中药材在水分降至药典规定值的过程是一个“缓慢代谢”的过程,随着揉搓及干燥过程的进行,揉搓干燥过程对中药材含水率的影响将打破中药材内部化学成分和分子结构的动态平衡,导致其形态、微观结构和有效成分发生变化^[14]。水分降至一定程度后(揉搓干燥后),中药材作为一个复杂的整体处于一个静态平衡的过程,且药材炮制加工为中药饮片后,从一个平衡转移至另一个平衡,或某些药材保持着原来原药材的平衡,可能与中药经过配伍后煎煮的过程是一个能量变化与化学变化的过程的集合体且煎煮后形成了一个新的平衡体系具有相似之处。此外,红芪产地加工中揉搓的环节主要以人工揉搓为主,因此揉搓机制及“揉搓机”的研制是未来研究的重要方向之一。

在揉搓机制方面,揉搓作为一种机械力或力学刺激,将力学信号施加于“缓慢代谢”的药材表面,并将力学信号向药材内部传输(表面至内部,细胞外至细胞内),引起药材性状、显微特征、化学成分发生变化,其中化学成分的变化可能的原因是揉搓加工过程中红芪药材含有的芒柄花苷转化或类黄酮成分转化为芒柄花素引起的,其机制可能与以下假说有关:(1)力学信号影响植物细胞壁等组织结构,将胞外刺激转导为胞内信号,引起组织结构或次生代谢产物发生变化^[17]。(2)力学信号影响植物中机械敏感离子通道或感受机械力的机械蛋白。红芪药

材中感受力学信号的“分子或结构”感知或力学信号通过植物中感受力学信号的递质传输力学信号,引起机械敏感通道的开合,小分子物质之间相互交换或相互转化,最终使次生代谢产物发生变化^[18,19]。(3)力学信号刺激红芪药材中的电信号。植物电信号广泛存在于植物体内,其具有快速的响应和传导速度,药材受刺激后调节红芪在尽量短的时间内做出生理反应。间断的力学信号可能引起中药材中的电信号的变化,使其作出生理学反应,引起组织结构或次生代谢产物发生变化^[20]。(4)揉搓的机械力施加于药材后产生类似于“机械力化学”(机械力化学:在狭义上是指因机械力作用于固态物质,从而引起的化学反应,广义上则是指由机械力所引发的一切化学现象)的变化,可能产生了热效应或非热的独特效应(生成类等离子体和影响分子中的化学键)或力学信号作为一种机械能在植物体内通过某种装置转化为化学能使药材的组织结构、次生代谢产物发生变化^[21-23]。(5)揉搓的机械力施加于药材后产生类似于“生物力学”的效应。揉搓药材后产生的力学信号传至细胞核,引起相关基因的表达或沉默^[24],揉搓过程中力引起芒柄花素合成途径(苯丙氨酸途径)上关键酶基因(如异黄酮合酶基因等)的表达或沉默,引起次生代谢产物含量发生变化^[25-27]。本文研究结果显示,搓条后野生搓条样品芒柄花素均值含量是未搓条样品均值的2.58倍,栽培搓条样品芒柄花素均值含量是未搓条样品均值的1.87倍,可能的原因是搓条加工时药材由鲜品至干品的过程受机械力刺激,机械力经过传导,引起芒柄花素合成途径上的关键异黄酮合酶基因、苯丙氨酸解氨酶基因、肉桂酸羟化酶基因、香豆酸辅酶A连接酶基因、查尔酮合成酶基因等的表达或沉默,引起芒柄花素的含量升高,具体机制有待于进一步深入研究。

综上所述,我们建立了“基于宏观表型性状-微观结构特征-整体性化学特征解析的三维表征体系”,开展了基于性状-显微-指纹图谱的红芪搓条与未搓条样品比较研究,发现了红芪搓条前后性状、显微、指纹图谱及活性成分均发生了显著的变化,解析了揉搓加工的科学内涵。揉搓加工是保证红芪质量及道地性形成不可或缺的步骤,是提高红芪药材活性成分含量的技术之一,可作为红芪道地性特征应用的切入点,为其他药材活性成分含量的提升提供思路。揉搓机制的研究需在中医药学结合物理学、

化学、分子生物学、机械化学、生物力学、电生理学、结构生物学等学科的基础上进一步深入研究。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 159.
- Lu GP. Empirical Identification of 500 Commonly Used Chinese Herbs (500 味常用中药材的经验鉴别) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1999: 120.
- Niu XM. Chinese Herbal Medicines of Dingxi (定西中药材) [M]. Lanzhou: Gansu People's Press, 2010: 76.
- Li ZG, Chen Y. Effect of kneading on the quality of *Astragalus sinensis* [J]. Gansu Agric Sci Technol (甘肃农业科技), 2013(12): 26-27.
- Dai HR, Li Y, Zhang LJ. Research progress in origin processing of *Codonopsis Radix* [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2018, 25: 127-130.
- He YS, Lu C, Zhang MD, et al. Exploration of preliminary processing technology of Banqiao *Codonopsis Radix* [J]. S Chin Agric (南方农业), 2016, 10: 155-156.
- Li CY. Identification of Chinese Herbs (中药材鉴定学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2006: 110, 191.
- Liu ZB. Origin processing methods of Baxian *Codonopsis Radix* [J]. China J Tradit Chin Med (中国中药杂志), 1992, 17: 345.
- Han F. Cultivation, harvesting and processing of *Radix Goniopsis Tongshen* [J]. Agric Tech Serv (农技服务), 2007, 24: 107.
- Shi SG. Cultivation technology and processing of Fangdang [J]. China J Tradit Chin Med (中国中药杂志), 1993, 18: 277.
- Qi L, Zhang ZH. Research and design of *Codonopsis Radix* rubbing machine [J]. Farm Mach (农业机械), 2017(11): 110-112.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol IV (中华人民共和国药典: 第四部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 114.
- Wang Y. Studies on quality evaluation of *Hedysari Radix* in Gansu region [D]. Lanzhou: Gansu College of Chinese Medicine (甘肃中医学院), 2015: 57.
- Yu F, Wan N, Li YH, et al. Analysis on change rule and mechanism in physical and chemical properties of Chinese herbal medicines during drying [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2021, 52: 2144-2153.
- Duan JA, Su SL, Lv JL, et al. Traditional experiences and modern cognition on primary processing of traditional Chinese medicinal materials [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 3151-3157.
- Li Q, Chong YM, Chen YX, et al. Appearance characters and internal quality of cultivated *Fritillaria cirrhosa* D. Don under different drying methods [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 916-924.
- Zhang FF, Li ZG, Du CK, et al. Responses and signaling transduction of plants to mechanical stimulation [J]. Plant Physiol J (植物生理学通报), 2010, 46: 517-528.
- Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants [J]. Ann Rev Plant Biol, 2015, 66: 113.
- Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, et al. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1 [J]. Nature, 2017, 554: 481-486.
- Zhao DJ. High spatial recording and analyzing of electrical signal in plant [D]. Beijing: China Agricultural University (中国农业大学), 2014.
- Wu X, Tan WH. When chemistry meets force—an essay on mechanochemistry [J]. Science (科学), 2018, 70: 38-42.
- Niu K, Ji QZ, Li GX, et al. Mechanochemical effect of rolling on mung bean starch [J]. J Chin Cereals Oils Assoc (中国粮油学报), 2017, 32: 53-58.
- Niu K, Li GX, Dai YY, et al. Effects of rolling time and frequency on mechanochemical properties of corn starch [J]. Trans Chin Soc Agric Eng (农业工程学报), 2017, 33: 293-301.
- Roberts K. Potential awareness of plants [J]. Nature, 1992, 360: 14.
- Gai QY, Jiao J, Luo M, et al. Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus*, hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. Process Biochem, 2016, 51: 642-649.
- Li P, Dong Q, Ge S, et al. Metabolic engineering of proanthocyanidin production by repressing the isoflavone pathways and redirecting anthocyanidin precursor flux in legume [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14: 1604-1618.
- Liu Y, Hassan S, Kidd BN, et al. Ethylene signalling is important for isoflavonoid mediated resistance to *Rhizoctonia solani* in roots of *Medicago truncatula* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2017, 30: 691-700.