

茯苓原生质体融合种栽培试验初报

安徽中医学院(合肥 260038) 朱泉娣* 唐荣华 程晓昱

摘要 首次报道用原生质体融合技术对茯苓作生物工程育种,取得融合菌种,在安徽霍山县境内进行野外栽培试验的结果。亲本 P_1 、 P_{578} 经茯苓菌丝体原生质体分离、融合、标记和融合子检出、培养和鉴定等步骤后,制成栽培种 F_1 、与 P_1 、 P_{578} 同时进行了对比栽培。试验结果: P_1 均产为0.5kg/窖; P_{578} 为2.20kg/窖; F_1 为1.73kg/窖; F_1 产量介于2个亲本之间,产量不够理想,对其原因作了初步分析。

关键词 茯苓 原生质体融合 融合子 栽培 产量 质量

用原生质体融合技术对茯苓作生物工程育种,改良茯苓*Poria cocos* (Sohw.) Wolf性状、选育抗逆力强、稳产、高产的新品系,是当前茯苓育种的一种新尝试。我们在对安徽大别山茯苓主产区进行深入调查及品比试验的基础上^[1],以经过多年筛选获得的2个优株作亲本,进行茯苓菌丝原生质体分离、融合和标记,取得了融合子。经纯化稳定后制种,于1991年在安徽霍山县高山乡长冲村新茯苓基地进行了野外栽培试验,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 茯苓菌丝原生质体的分离与融合:

1.1.1 亲本来源:2个亲本为 P_1 与 P_{578} 号菌株。前者系霍山县漫水河区野苓驯化而得,后者系从中科院微生物所引进,已为当地苓农采用多年。两者都是经我们做了大量野外栽培试验,后筛选出来的优株^[1]。

1.1.2 亲本原生质体的分离、融合与标记:将 P_1 与 P_{578} 的新鲜斜面分别接入培养基中,经33℃振荡培养后,离心收集菌丝体,用缓冲液洗两次,然后将菌丝体酶解、保温、镜检适宜后制成原生质体悬液。在酶解过程中,采用荧光色素标记法,用两种不同颜色的荧光染料,标记两个亲本的原生质体,然后混合,同时加入融合剂,促进原生质体的融合。原生质体融合、原生质体再生及形成率、再生率计算按文献^[2]。融合诱导剂选用聚乙二醇(PEG)—钙离子系统。

1.2 融合子的检出、培养和鉴定:根据亲本荧光显色的特征用机械分离方法选出融合子,接种在再生培养基中,在33~35℃下培养形成融合菌丝体,再经纯化,多代培养,淘汰不稳定的融合子,达到稳定时将其保存并交付试验。融合子鉴定根据:a)融合子与2个亲本菌丝体自然形态、生理性状及原生质体荧光标记之不同。b)酸性磷酸酶和酯酶同功酶谱电泳分析之差异。

1.3 栽培试验:

1.3.1 栽培菌种: P_1 、 P_{578} 、 F_1 ;前两者为亲本对照组;后者为融合子第1代栽培种。

1.3.2 制种和栽培:栽培种配方(%):松木棒60,松木屑15,麸皮20,石膏粉1,蔗糖3,尿素0.5,磷肥0.5,含水量约65%。

1.3.3 栽培规格:窖长95cm,宽45cm,深45cm,每窖段木干重20kg,每个菌株栽10窖。

1.3.4 栽培时间:1991-06-07上窖,1991-12-08采收。

2 试验结果

2.1 融合株与亲本的产量比较: F_1 单窖最高产量和均产均处于两亲本之间; F_1 最大个苓重

*Address: Zhu Quandi, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei

量达1.65kg，与P₅₇₈相似，见表1。

2.2 茯苓切片质量比较：从外观色泽、组织致密度、透明度、传统饮片收购等级等项来看，F₁均和2个亲本相似，无明显区别，见表2。

表1 融合株与亲本的产量比较

菌株	客	最大个苓	单客最高	均产	空客率
号	数	(kg)	产量	(kg/客)	(%)
			(kg)		
P ₁	10	0.55	0.60	0.50	10
F ₁	10	1.65	2.25	1.73	0
P ₅₇₈	10	1.55	5.75	2.20	0

表2 融合株与亲本茯苓切片质量比较

编号	色泽	细密度	透明度	等级
P ₁	纯白	细密	半透明网状	1
F ₁	纯白	细密	同上	1
P ₅₇₈	纯白	细密	同上	1

注：切片厚度1~2mm

3 讨论

鉴定融合菌株，我们除采用统计融合菌种菌丝体与亲本菌丝体的形态和生理状况的差异外，还采用了同功酶谱电泳分析法。同功酶是基因表达的直接产物，对不同品系和个体其同功酶可存在差异。本试验用的融合种（F₁），在相同条件下，出现浅色新谱带，在相同谱带中，也有加深加宽的结果，显示了与亲本的差异，因而证明为融合种。从栽培试验的结果看，融合种的产量介于2个亲本之间，平均每客产鲜苓1.73kg，明显高于P₁，其个体成形好，质量坚实，结苓大，但产量仍低于P₅₇₈，而P₁则没有显示其以往栽培试验中的优势^[1]，显示性状不够稳定，分析其原因可能与1991年栽培季节正遇安徽遭到特大洪灾，大别山区困于雨水过多，苓场条件变劣有关。由于杂种优势是一复杂的遗传现象，是多基因的综合结果，即使在原生质体融合技术中，我们筛选了异核体，并保证了它的纯度，但在多大比重上，实现了基因重组或互补，并能在野外栽培试验中，稳定地、定向表达出具有2个亲本的优良性状，成为希望得到的“目的融合子”，还待进一步探索。

参 考 文 献

- 1 朱泉娣，等。中草药，1992，23（11）：597（1994-01-25收稿）
- 2 王岳五，等。生物工程学报，1988，4（3）：23（上接第254页）

代谢的影响中，银杏内酯可能起重要作用。

致谢：陈大为副教授为本研究给予大力支持。

参 考 文 献

- 1 游松，等。沈阳药学院学报，1988，5：142
 - 2 Le Poncin Lafitte M, et al. Arch Int Pharmacodyn, 1980, 243: 236
 - 3 Karcher L, et al. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1984, 327: 31
 - 4 Subham z, et al. Int J Clin Pharmacol Res, 1984, 4: 89
 - 5 Winter E. Pharmacol Biochem Behav, 1991, 38: 109
 - 6 Porsolt R D, et al. Pharmacol Biochem Behav, 1990, 36: 963
 - 7 Morier-Tessier E, et al. Biogen Amines, 1987, 4: 351
 - 8 Michel P F, et al. Ginkgolides: Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives, Braquet P (ed), Barcelonai, J.R. Prous SA, 1988, 1: 1
 - 9 张林魁，等。药学报，1987，22（8）：591
 - 10 吴春福，等。中药药理与临床，1992，8：5
 - 11 Schwarting R K W, et al. Pharmacol Behav, 1992, 41: 675
 - 12 Commission J W. Biochem Pharmacol, 1985, 34: 1127
 - 13 Clostre F, et al. Ginkgolides, Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives, Braquet P (ed), Barcelona, J R Prous S A, 1988, 1: 649
 - 14 Porsolt R D, et al. Eur J Pharmacol, 1979, 57: 201
- （1994-05-07收稿）

Quantitative Analysis of Oleanolic Acid from the Fruits of Glossy Privet (*Ligustrum lucidum*) in Different Growing Periods

Mi Hemin, Cao Yongbing, Song Hongtao

By means of TLC-densitometry, the contents of oleanolic acid extracted from the fruits of *Ligustrum lucidum* were determined to be 8.04% (g/g) in the unripened fruit collected in August and 2.73% (g/g) in ripened fruit gathered in December.

This result showed that the oleanolic acid content in fructus *L. lucidum* decreases gradually with growing until the fruit is fully ripened.

(Original article on page 258)

A Preliminary Study on Cultivation Test of Protoplast Fusion Strain of Fulin (*Poria cocos*)

Zhu Quandi, Tang Ronghua, Cheng Xiaoyu

Result of field cultivation test by protoplasmic fusion technique for biological engineering breeding of *Poria cocos* in Huoshan county, Anhui Province was reported for the first time. A fusion strain F_1 was obtained from parents P_1 , P_{578} by separation, fusion, marker of hypha protoplast and identification of recombinant. It was cultivated simultaneously with P_1 , P_{578} for comparison. Results showed that the average cellular outputs were 1.73, 0.5 and 2.20kg respectively. As the output of strain F_1 is intermediate between its parent P_1 and P_{578} , the result is considered to be unsatisfactory. The reason for such result was discussed.

(Original article on page 261)

Bencaological Studies on Changpu

Wang Wen, Xu Jingdong, et al

Result of Bencaological studies on Changpu showed that it originated from two different sources, one is Shuichangpu (*Acorus calamus*) while another is Shichangpu (*A. tatarinowii* and *A. gramineus*). Usually, Changpu grown on stony ground was referred to as Shichangpu. Jujiechangpu is a kind of Changpu with 9 nodal rings within an "inch" on its root stock, but that which is used in Northwest China is an entirely different herb *Anemone altaica*.

(Original article on page 263)

(上接第273页)

参 考 文 献

- 1 魏江春,等.中国药用地衣.北京:科学出版社, 1982.
- 2 孙汉董,等.云南植物研究,1983,5(3): 310
- 3 张振杰,等.植物学报,1983,25(1): 93
- 4 李波,等.中草药,1992(3): 120
- 5 孙汉董,等.云南植物研究,1986,8(4): 483
- 6 孙汉董,等.植物学报,1990,32(10): 783

(1994-09-12收稿)