

传因素、生态环境和人文因素综合作用的结果,根据各种因素对道地药材形成的贡献大小,有人将道地药材的形成模式分为生境主导型、种质主导型、技术主导型、传媒主导型以及多因子关联决定型^[8]。本研究的结果表明,遗传因素是影响细辛道地药材微量元素含量的内在因素,也是主要因素。从微量元素的角度来看,遗传因素是细辛道地药材形成的主要影响因素。此外,土壤等生态环境条件是构成道地药材最重要的外在条件,虽然这些外在条件在某些情况下起着关键的作用,但这些外在条件是在优良种质的基础上通过对药用植物内在基因的表达及某些生理生化反应施加影响而起作用的,是道地药材形成的外因,是次要因素。综上所述,从微量元素的角度来看,细辛道地药材的形成模式可能是以种质为主导的多因子关联决定型。

3.5 细辛道地药材中的重金属和砷盐含量:对重金属和砷盐的检测,国际国内均提到议事日程,面临我国开放改革的大好形势,若在药品质量的要求上与国外更好接轨,必须要重视质量标准的提高,检查项中重金属与砷盐为其内容之一,许多国家均有具体质量要求。如对砷、铜、铅、汞,新加坡的要求依次为 5, 150, 20, 0.5 $\mu\text{g/g}$, 马来西亚为 6, 20, 10, 0.5 $\mu\text{g/g}$, 香港砷限量为 10 $\mu\text{g/g}$ ^[9]。我国对中药材中铅和砷

的含量限度尚无明确而具体的规定,根据国内现有资料,一般要求中药材中铅的含量 < 20 $\mu\text{g/g}$, 砷的含量 < 10 $\mu\text{g/g}$ 。

从表 2 中可知,细辛道地药材中铅的含量在 2.22~ 17.13 $\mu\text{g/g}$ 之间,平均 6.83 $\mu\text{g/g}$; 砷的含量在 8.75~ 33.82 $\mu\text{g/g}$ 之间,平均 19.12 $\mu\text{g/g}$ 。铅的含量虽高于 Bowen 值 (2.7 $\mu\text{g/g}$),但各样品均不超标 (20 $\mu\text{g/g}$); 而砷的含量不仅远高于 Bowen 值 (0.2 $\mu\text{g/g}$),而且多数样品超标 (10 $\mu\text{g/g}$)。作者认为在栽培药材前,有必要先检测土壤中的重金属和砷盐含量;此外,在药材上也不能喷施含重金属和砷盐的农药,以控制药材中重金属和砷盐含量。

参考文献

- 1 米秋雯,等.中国药学杂志,1990,25(3): 173
- 2 米秋雯,等.中国药学杂志,1989,24(12): 712
- 3 Bowen H J M. Trace elements in biochemistry. Academic Press, London and New York, 1966 260
- 4 王 夔主编.生命科学中的微量元素(第二版).北京:中国计量出版社,1996 132
- 5 孔祥瑞编.必需微量元素的营养、生理及临床意义.合肥:安徽科学技术出版社,1982 86
- 6 刘钟栋主编.植物生理学.北京:高等教育出版社,1989 201
- 7 范俊安,等.中药材,1991,14(1): 3
- 8 肖小河,等.中国中药杂志,1995,20(6): 323
- 9 王北婴主编.中国新药研制与申报.北京:中国中医药出版社,1995 152

(1999-12-03 收稿)

农杆菌介导的 GUS 基因在枳壳中的转移

广州中医药大学中药学院 (510405) 贺 红*
广西林业科学院 韩美丽

摘 要 用枳壳 *Poncirus trifoliata* Raf. 实生苗的上胚轴为材料,探索以根癌农杆菌介导的 GUS 基因在枳壳中的转移,结果表明:抑菌剂选择头孢霉素较好;卡那霉素作为选择试剂,浓度为 50 mg/L;外植体与农杆菌共培养时间以 2~ 3 d 为宜。GUS 基因瞬时表达检测,80% 的外植体呈阳性反应;GUS 基因稳定表达检测,抗性植株中,GUS 反应呈阳性所占比例为 70.0%。

关键词 枳壳 农杆菌 GUS 基因

A Study on the *Agrobacterium*-mediated GUS Gene Transfer to Trifoliate Orange (*Poncirus trifoliata*)

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM and Chinese Materia Medica (Guangzhou 510405)
He Hong
Guangxi Academy of Forestry Han Meili

* Address: He Hong, College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Guangzhou

贺 红 女,33 岁,1997 年毕业于华南师范大学生物系,获理学博士学位。现为广州中医药大学中药资源室副研究员。长期从事植物细胞工程方面的研究工作,作为主要成员,参加了国家自然科学基金及香港 Croucher 基金等课题的研究,现主持广东省自然科学基金博士启动项目。目前主要研究方向为中药生物工程。发表论文 20 余篇。

Abstract The transformation of GUS gene by *Agrobacterium*-mediation was studied. The explants used for transformation were the epicotyls from *Poncirus trifoliata* Raf. The results indicated that Cefotaxime used as antibiotics was better than carbenicillin. The concentration of kanamycin used as the reagent of choice was 50 mg /L. Shoot regeneration frequency was high when cocultivation time was 2~ 3 days. Histochemical GUS assay showed that 80. 0% of the explants had the transient expression of GUS gene and 70. 0% of the resistant plants were GUS-positive.

Key words *Poncirus trifoliata* Raf. *Agrobacterium tumefaciens* GUS gene

随着对植物形成冠瘿瘤分子机制的阐明,植物细胞培养技术的发展及以根癌农杆菌和 Ti质粒为载体的植物细胞转化系统的建立,大大推动了植物遗传转化的研究,转基因成功的植物种类不断扩大,特别是在重要农作物及经济作物方面有重大的突破^[1~ 3],但在药用植物方面的研究较少报道。枳壳 *Poncirus trifoliata* Raf.为芸香科植物,其幼果及成熟果实入药。枳壳的离体培养工作,国内已有报道^[4~ 5]。本文在离体培养的基础上,采用农杆菌转化法,研究了 GUS基因转化枳壳的过程,旨在通过建立高效的转化系统,为导入有价值的目的基因,获得具有预期性的优良品种创造条件。

1 材料与方法

1. 1 植物材料: 枳壳种子经表面消毒培养无菌苗,当苗长至一定大小时,采取上胚轴切成约 1 cm 长的小段作转化的外植体

1. 2 细菌菌株及培养: 农杆菌菌株为 EHA101,含有质粒载体 PGA482GG,质粒上插入了 GUS及 NPTII 基因。菌株在含 50 mg /L卡那霉素的 YEP培养基上繁殖保存,感染前,在 YEP液体培养基中,28℃振荡 20~ 25 h,达到菌对数生长期,培养物即可用于感染

1. 3 外植体的转化: 将枳壳上胚轴切段浸入到准备好的菌液中 20 min,随后转到无菌滤纸上以吸掉多余的菌液,将外植体接种于 MT培养基上共培养 3 d后,再转到含卡那霉素 (Kanamycin, Km) 50 mg /L和头孢霉素 (Cefotaxime, Cx) 300 mg /L的选择培养基上,诱导抗性芽的产生

1. 4 组织化学法检测 GUS活性: GUS组织化学染色法参见《植物遗传转化手册》^[6]。

2 结果与分析

2. 1 抑菌剂的选择: 在用农杆菌转化植物细胞时,常用羧苄青霉素和头孢霉素抑制农杆菌的过量生长。试验结果表明,两种抗菌素在浓度为 500 mg /L时,对外植体出芽均无明显影响。抑菌试验中,300 mg /L的头孢素能完全抑制农杆菌的生长,而相同

浓度的羧苄青霉素杀菌效果不太好,农杆菌仍少量生长。因此,枳壳转化试验中,抗菌素采用头孢霉素较好,浓度为 300 mg /L

2. 2 选择培养基中卡那霉素浓度的优化: 以卡那霉素作为选择试剂,筛选抗性芽的产生。枳壳上胚轴感染后平放于选择培养基上,本试验观察了不同浓度的卡那霉素对出芽的影响,1个月后统计结果。在无 Km的对照中,出芽率较高。Km处理中,Km 25 mg /L仅个别外植体有芽形成,当 Km增加至 50 mg /L以上时,所有外植体均无芽形成,外植体逐渐变白。因此以 Km 50 mg /L作为常用的选择水平。

2. 3 共培养时间的选择: 枳壳外植体分别与农杆菌共培养不同时间 (1~ 4 d)后,取部分外植体小块检测 GUS基因的瞬时表达活性,其余转入选择培养基,1. 5个月后测定其转化再生频率 (表 1)。结果表明: 共培养 1 d时,GUS表达频率中等,转化再生频率为 9. 6%,2 d与 3 d时,GUS表达频率及转化频率均表现较高,4 d时,转化效率有所下降,同时还可观察到,共培养 4 d时,培养基上形成菌斑,难以除去。因此共培养时间以 2 d~ 3 d为宜。

表 1 共培养时间对转化效率的影响

共培养天数 (d)	GUS基因瞬时表达	转化再生频率 (%)
1	++	9. 6
2	+++	18. 2
3	+++	20. 0
4	+++	14. 0

注: ++ 示中等 +++ 示强

2. 4 转化外植体分化成苗及初步鉴定: 枳壳上胚轴切段与农杆菌共培养 3 d后,转至附加 300 mg /L头孢霉素和 50 mg /L卡那毒素的选择培养基中进行培养,1个多月后可看到抗性芽的产生 (图 1),待芽长至 2 cm左右,从外植体上切下诱导生根,生根培养基为 MT+ NAA 1 mg /L

外植体与农杆菌共培养 3 d后,进行 GUS基因瞬时表达活性的检测,取部分外植体进行 GUS检测,发现 80. 0%的外植体,在切口处细胞中可测到

GUS活性,显蓝色(图 2)。

转化处理获得的抗性植株生长 5 个月后,进行 GUS 基因稳定表达活性的检测,结果表明: 70. 0% 的植株呈阳性反应,这是茎段染色的结果,又取其叶

片进行 GUS 染色,大多数呈阳性反应,少数不显蓝色,说明有些植株已有稳定的 GUS 基因表达,也有些植株可能是嵌合的转化体(图 3)



图 1 在选择培养上获得抗性芽

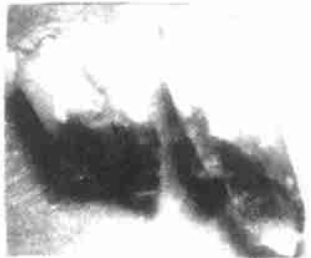


图 2 GUS 基因在被感染的上胚轴中的瞬时表达

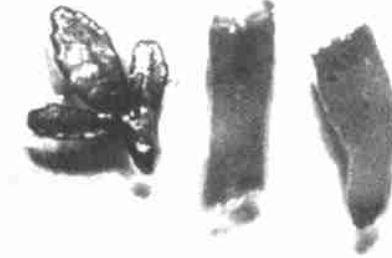


图 3 GUS 基因在抗性植株的叶片、茎段及根尖中的稳定表达

参考文献

- 1 余叔文. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1992 63
- 2 Hooykaas P J J, *et al.* Plant Mol Biol, 1992, 19 153
- 3 Pena L, *et al.* Plant Cell Reports, 1995, 14 616
- 4 张进仁, 等. 中国柑桔, 1985, (1): 22

5 贺红. 中草药, 1998, 29(12): 824

6 傅荣昭, 等. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994 168

(1999-06-11 收稿)

香青藤的生药鉴定

广西中医学院(南宁 530001) 廖月葵* 潘小姣 辛宁

摘要 利用药材性状、显微特征、紫外吸收光谱和薄层层析等鉴别方法对香青藤进行生药鉴定研究,为该药材的鉴别和开发利用提供科学依据。

关键词 香青藤 性状鉴定 显微鉴定 理化鉴定 紫外分光光度法 薄层层析

Pharmacognostic Identification of Xiangqingting (*Illigera aromatica*) Stem

Guangxi College of TCM (Nanning 530001) Liao Yuekui, Pan Xiaojiao and Xin Ning

Abstract Pharmacognostic identification of the stem of *Illigera aromatica* S. Z. Huang *et* S. L. Mo was carried out by studying its microscopic characteristics, UV spectra and TLC. The results may provide a scientific basis for the comprehensive development and utilization of the drug.

Key words *Illigera aromatica* S. Z. Huang *et* S. L. Mo characteristic identification macroscopic identification physicochemical identification UV spectra TLC

香青藤又名吹风散,为青藤科植物香青藤 *Illigera aromatica* S. Z. Huang *et* S. L. Mo 的干燥藤茎。具有祛风活血等功效,用于风湿骨痛,跌打损伤,肥大性脊椎炎等症^[1],对解痉镇痛,降温和局麻有显著功效^[2],生药鉴别未见有报道,为利于开发利用,就此进行研究

1 仪器与材料

1.1 仪器: UV-160A 可见紫外分光光度仪(岛津) 2F-型三用紫外分析仪

1.2 材料: 香青藤采于广西南宁市郊区,经广西药品检验所黄燮才教授鉴定为青藤科植物香青藤 *Illigera aromatica* S. Z. Huang *et* S. L. Mo 的藤茎。硅胶 H (青岛海洋化工厂),实验试剂均为分析纯

2 药材性状

* Address: Liao Yuekui, Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanning