

同山药成分的差异,它们之间的热效应也互有差别; 400℃ 以后失重峰与放热峰位置一致,应是山药中某些成分发生氧化分解而放热,但不同山药的最后一个尖峰位置、峰高差异较大,这与其成分、含量有何关系,需进一步探究。

3 结论

由以上结果可以看出,不同产地的山药,其热分析谱图体现出相当大的差异。 N_2 气氛下的 DTA 曲线体现了不同品种间的差异,空气气氛下的 DTG-DTA 曲线不仅体现了不同品种间的差异,同时也体现了相同品种因产地不同所造成的差异。此方法较为灵敏,结果较直观,且样品处理很简单。若用于中草药鉴别中,将对中药质量的规范化起到一定的积极作用。

致谢: 山药样品由河南省中药研究所陈蕴副研究员、河南中医学院冯卫卫生教授、河南中医药研究院张留记研究员等提供。部分测试工作由河南大学郑广水先生完成,在此一并致谢。

References

- [1] Nie G H, Zhou K F, Zhang C. Identification of *Rhizome Dioscoreae* and its misuses by gelatin electrophoresis [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1993, 16 (2): 27.
- [2] Yin A Q, Jiang H Z. Identification of *Rhizome Dioscoreae* and *Dioscorea alata* L. [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18 (1): 47.
- [3] Fang X C, Yin X, Xiang B R, *et al*. Classification of Chinese traditional medicine *Shanyao* (*Dioscorea opposita* Thunb.) by pyrolysis/high resolution gas chromatography/pattern recognition [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 21 (2): 91.
- [4] Lin J M, Zhang H M, Zhao C W. Identification of *Guan Cortex Phellodendri* and *Chuan Cortex Phellodendri* by differential thermal analysis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20 (8): 457-458.
- [5] Lin J M, Zheng H C, Zhang J C, *et al*. Identification of herbs of *Radix Phytolacca* and their misuses by differential thermal analysis [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1995, 18 (12): 611.
- [6] Du H Q, Chen J C, Zhao X. *The Variety Coordination and Quality Investigation of Chinese Medicinal Materials*. Northward Edition (常用中药材品种整理和质量研究·北方编·第二册.) [M]. Vol 2. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Publishing House, 1995.

农杆菌介导枳壳转化系统的建立及 PCR 鉴定

贺红¹, 韩美丽², 李耿光³⁽²⁰⁾

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405; 2. 广西林业科学研究院, 广西 南宁 530001; 3. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 目的 建立农杆菌介导的枳壳转化体系。方法 以枳壳实生苗上胚轴为转化外植体, 农杆菌 Ti 质粒上插入了外源目的基因——柑桔衰退病毒外壳蛋白基因 (CTV- ϵ p), 转化植株用 GUS (β -葡萄糖苷酸酶) 染色及 PCR 进行鉴定。结果 枳壳转化试验中, 20 d 苗龄的外植体转化再生率较高; 外植体与农杆菌共培养时间以 2~3 d 为宜; 乙酰丁香酮能较大提高转化效率, 转化再生频率为 27.5%。转化获得的抗性植株中, GUS 反应呈阳性所占比例为 70.0%。PCR 分析证实外源目的基因已整合到枳壳转化株的核基因组中。结论 成功地建立了农杆菌介导的枳壳转化系统, 为利用基因工程的手段进行枳壳的抗病育种奠定了基础。

关键词: 农杆菌; 枳壳; 遗传转化; 聚合酶链式反应 (PCR)

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)02-0171-04

Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Poncirus trifoliata* and PCR analysis

HE Hong¹, HAN Mei-li², LI Geng-guang³

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Guangxi Academy of Forestry Science, Nanning 530001, China; 3. South China Institute of Botany, CAS, Guangzhou 510650, China)

Abstract **Object** To establish an effective system for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Poncirus trifoliata* Raf. **Methods** The explants used for transformation were the epicotyls from *P. trifoliata*; the *Agrobacterium tumefaciens* strain was EHA101, provided with the vector plasmid

(20) 收稿日期: 2002-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (39870539)

pGA482GG; the coat protein gene (CTV- cp gene) was introduced into the transformation plasmid. The transformation was proved by PCR and histochemical GUS assay. **Results** In trans for mation of *P. trifoliata*, 20 days epicotyls were suitable for transformation. Shoot regeneration frequency was high when cocultivation time was 2–3 days. The presence of acetosyringone during cocultivation could enhance the efficiency of transformation. Histochemical GUS assay showed that 70.0% of the resistant plants were GUS-positive. Extra gene was proved to be transformed into *P. trifoliata* plant by PCR analysis. **Conclusion** An effective genetic transformation system has been established for *P. trifoliata*. This system will be useful for resistant breeding of *P. trifoliata*.

Key words *Agrobacterium*; *Poncirus trifoliata* Raf; genetic transformation; PCR

枳壳 *Poncirus trifoliata* Raf. 为芸香科植物, 其幼果及成熟果实入药。目前枳壳生产中面临一种由病毒引起的衰退病, 由桔蚜和棉蚜传播。常见的防治措施为烧毁病株、喷洒农药杀虫以切断传染源, 但均不能从根本上解决问题, 解决这一问题的根本途径是抗病新品种的选育。遗传转化技术是近年来兴起的一项新型生物育种技术, 自问世以来, 就以其严格的定向性、高效性受到育种工作者的欢迎。常用的遗传转化方法主要有生物法、物理法、化学法。在这 3 种方法中, 以农杆菌介导的转化方法应用最为广泛, 所取得的转基因植株最多^[1]。本研究以农杆菌为载体, 衰退病病毒外壳蛋白基因为目的基因, 建立了一套根癌农杆菌介导的外源基因转入的方法, 并探讨了各种因素对转化体系的影响。

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 20 d 时, 剪取上胚轴, 切成约 1 cm 长的小段, 用作转化的外植体。

1.2 离体再生培养: 诱导芽分化的培养基: MT+BA (6-苄氨基嘌呤) 1 mg/L; 生根培养基: MT+NAA (萘乙酸) 0.5–1 mg/L^[2]。

1.3 细菌菌株与质粒: 农杆菌菌株为 EHA101, 含有质粒载体 pGA482GG, 质粒上插入 35S 启动子驱动的外源基因: CTV- cp (柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因) 及 GUS (β -葡萄糖苷酸酶) NPTII (新霉素磷酸转移酶) 基因。农杆菌划线培养在含有 50 mg/L 卡那霉素的 YEP 培养基上, 28℃ 黑暗培养, 待长出菌落后, 挑取单菌落接于 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。

1.4 外植体的转化: 枳壳上胚轴切段预培养 2 d 后, 浸入到准备好的菌液中 20 min, 随后转到无菌滤纸上吸掉多余的菌液, 将外植体接种于不含卡那霉素 (Kanamycin, Km) 及头孢霉素 (Cefotaxime,

Cx) 的 MT 培养基上共培养 3 d 后, 再转到选择培养基 (即诱导芽分化培养基+ Km 50 mg/L+ Cx 300 mg/L) 上^[3], 诱导抗性芽的产生。

1.5 组织化学法检测 GUS 基因表达活性: GUS 组织化学染色法参见文献^[4]。

1.6 植物 DNA 及质粒 DNA 提取: 分别采用 SDS 法、碱裂解法^[5]。

1.7 PCR 扩增条件: 反应采用 25 μ L 反应体系。反应体系中含: 20 ng 植物 DNA, dNTP 200 μ mol/L, Primer 1, Primer 2 各 0.1 μ mol/L, TaqDNA 合成酶 1 单位, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L (含 15 mmol/L MgCl₂)。反应程序为: 样品 DNA 先在 94℃ 下变性 6 min, 然后经过 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 并在紫外透射仪上分析结果。引物 Primer 1, Primer 2 分别来自 CTV- cp 序列的 130–149 bp 及 650–669 bp 基因片段。扩增片段预计长度 539 bp。

每处理有培养瓶 6 瓶, 每瓶约接种 17 个外植体。转化再生频率为每处理中产生绿芽外植体数占外植体总数的百分比。多处理的多重比较采用新复极差测验, 显著水平 0.05。

2 结果与分析

2.1 根癌农杆菌感染和抗性植株再生: 枳壳上胚轴切段与农杆菌共培养 3 d 后, 转至选择培养基中进行培养, 出芽过程大大延缓, 1 个多月后才可看到抗性芽的产生 (图 1)。随后, 每过两周更换一次培养基, 随着选择次数增加, 部分再生芽变白、死亡。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。

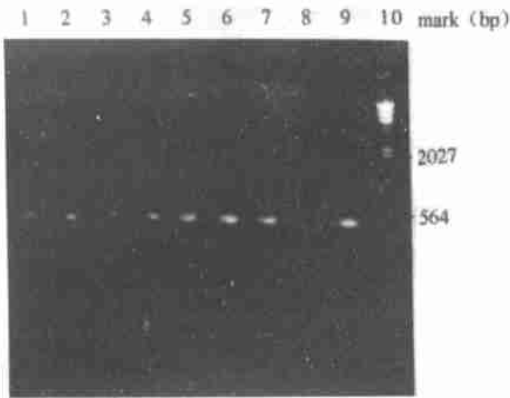
2.2 GUS 基因表达检测: 转化处理获得的抗性植株生长 5 个月后, 进行 GUS 基因表达活性检测, 结果表明, 没有经转化处理的对照无 GUS 阳性反应, 转化处理获得的抗性植株检测, 70.0% 的植株茎段



图 1 在选择培养基上获得抗性芽

Fig. 1 Putatively transformed shoots on selection medium
染色结果呈阳性,叶片 GUS 染色结果,大多数呈阳性反应,说明大多数植株已有稳定的 GUS 基因表达,也有些植株可能是嵌合的转化体。

2.3 转化体的 PCR 鉴定:从所得的 GUS 阳性无性系材料中随机选取 7 个无性系的 DNA 样品作为模板,进行体外扩增,结果见图 2



1~7 转化植株 8 对照 9 质粒 10 标准相对分子质量
1~7-transformed plant 8-non-transformed control plant
9-plasmid 10-DNA marker

图 2 CTV-cp 序列的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR analysis of CTV-cp sequence

从图 2 可看出,7 个枳壳 GUS 阳性无性系与质粒的 DNA 样品在所扩增条件下,均在预期的 539 bp 位点扩增出一条可分辨的 DNA 迁移带,对照则无。不同无性系之间扩增带强度有所不同,反应出不同材料模板 DNA 量的差异。由此可基本确定所测 GUS 阳性无性系为转基因无性系。

2.4 外植体年龄对转化的影响:取枳壳萌发至 20, 30, 40 d 的上胚轴为材料,研究外植体年龄对转化效率的影响。3 种苗龄的对照外植体 (即未感染) 在选择培养基上均未出芽 (未列入表内), 感染处理结果见表 1。苗龄为 20 d 时,转化再生频率最高,为 15.5%,随着苗龄增加,转化率下降,30 和 40 d 时,分别为 11.0% 和 5.9%。说明低苗龄的外植体对农杆菌更为敏感。

表 1 外植体年龄对转化效率的影响

Table 1 Effect of explant age on transformed efficiency

外植体年龄 /d	转化再生频率 %
20	15.5±1.50 c
30	11.0±1.32 b
40	5.9±1.85 a

注:有相同字母者表示在 0.05 显著水平上差异不显著。

Note: The treatments with same letter indicate no evident difference, while the significance is 0.05.

2.5 共培养时间对转化的影响:枳壳外植体预培养 2 d 后,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。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%,2,3 d 时,GUS 表达频率及转化再生频率均表现较高,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 2~3 d 为宜。

表 2 共培养时间对转化效率的影响

Table 2 Effect of cocultivation time on transformed efficiency

共培养天数 /d	GUS 基因瞬时表达	转化再生频率 %
1	++	9.6±1.97 a
2	+++	18.2±2.42 bc
3	+++	20.1±2.15 c
4	+++	14.6±2.08 b

注:+++ 表示 GUS 基因瞬时表达强;++ 表示 GUS 基因瞬时表达中等;有相同字母者表示在 0.05 显著水平上差异不显著。

Note: +++ indicates a strong transient expression of GUS gene; ++ indicates a medium transient expression of GUS gene; the treatments with same letter indicate no evident difference, while the significance is 0.05.

2.6 乙酰丁香酮对转化的影响:取 20 d 苗龄的枳壳上胚轴,设 3 种处理:对照 (未感染)、感染但未加 As (乙酰丁香酮)、感染并加入 100 μmol/L As。在选择培养基上观察的结果表明:对照无芽形成,而经农杆菌感染的外植体,1 个月后,部分开始出芽,无 As 时转化再生频率为 18.5%,加入 As 转化率有较大提高,为 27.5%。说明乙酰丁香酮可提高农杆菌的转化效率。

3 讨论

在植物的遗传转化中,经常用 GUS 基因作为报告基因。组织化学法检测 GUS 基因表达活性的原理是:GUS 组织化学分析中最常用的底物是 X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide, 5-溴-4-氯-3-吲哚糖醛酸)。在 GUS 活性作用下,X-Gluc

产生蓝色沉淀,一种不可溶的 5,5'-二溴,4,4'-二氯靛蓝染料。这种染料不是 GUS 直接作用的结果,而是 GUS 水解 X-Gluc 产生无色吡啶衍生物发生氧化二聚作用形成。只有在有 GUS 基因表达的植物组织中,才有阳性反应。本试验通过对生长 5 个月的抗性植株进行 GUS 基因表达活性检测,可以初步说明 GUS 基因导入情况

References

- [1] Lin Z P. *Vegetable Molecular Biochemistry for 21st Century* (走向 21 世纪的植物分子生物学) [M]. Beijing: Science Press, 2000.

- [2] He H. A study on the tissue culture and plant regeneration of Trifoliate-orange (*Poncirus trifoliata*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29 (12): 824-825.
- [3] He H, Pan R C, Han M L, et al. *In vitro* culture of ex plants and the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Poncirus trifoliata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1998, 20 (4): 459-463.
- [4] Fu R Z, Sun Y R, Jia S R. *Handbook of Plant Genetic Transformation* (植物遗传转化手册) [M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 1994.
- [5] Sun J S. *Handbook of Plant Cell Engineering*. (植物细胞工程手册) [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1995.

广藿香药用部位成熟结构及有效成分分布研究

冯承浩,姚 辉,吴 鸿*,赵 晟,孙同兴⁽²⁰⁾

(华南农业大学生命科学学院 药用植物研究中心,广东 广州 510642)

摘 要: 目的 揭示广藿香根、茎和叶的成熟结构及挥发油在其内的分布部位,为合理的评价和采收该药用植物提供科学的理论依据。方法 石蜡切片法、半薄切片法、组织化学法。结果 在根的成熟结构中,挥发油主要分布在木薄壁组织细胞中;在茎中,主要分布在皮层和韧皮部薄壁细胞中;在叶中,主要分布在叶肉组织和叶脉的韧皮部薄壁细胞中。结论 广藿香全草均含挥发油;另外,根内木质部的粗度、茎皮和叶片的厚度可作为评价广藿香品种优良的 3 个指标。

关键词: 广藿香;成熟结构;有效成分

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)02-0174-03

Studies on mature structures and distribution of active constituent of *Pogostemon cablin*

FENG Cheng-hao, YAO Hui, WU Hong, ZHAO Sheng, SUN Tong-xing

(Research Center of Medicinal Plant Development, College of Life Science,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract **Object** To find out the mature medical part structures and the distribution of essential oil of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. and provide thoretical basis for reasonably evaluating and harvesting this medicinal plant. **Methods** Paraffin method, semi-thin sectioning, histochemical method were used. **Results** In the mature structures of *P. cablin* the essential oil was mainly stored in xylem parenchyma cells in root, in phloem and cortex parenchyma cells in stem, and in tissue cells and phloem parenchyma cells in leaf. **Conclusion** The whole herb of *P. cablin* contains essential oil. The thickness of root xylem, the stem skin and mesophyll tissue may be used as three indexes to evaluate *P. cablin*.

Key words *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth; mature structure; active constituent

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco.) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物,是常用的芳香化湿中药,传统以其地上部分入药,有效成分为挥发油^[1],有芳香

化湿、开胃止呕、发表解暑之功效,是著名成药“藿香正气丸(水)”的“君”药。被历代医家视为暑湿时令之要药,在临床上应用广泛。广藿香原产菲律宾^[2],

⁽²⁰⁾收稿日期: 2002-09-11

基金项目: 广东省中医药管理局基金项目 (F01032); 广东省科技攻关项目 (C20147)

作者简介: 冯承浩 (1973-) 男, 山东省泰安市人, 华南农业大学在读硕士研究生, 主要从事药用植物方面的研究。

Tel (020) 85280193 E-mail fchenghao@163.com

* 通讯作者