

tion of the industrialized production of artemisinin through two-step method

References

[1] Geng S, Ma M, Ye H C, et al Effects of *ipt* gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 691-698.

[2] Geng S, Ye H C, Li G F, et al Flowering of *Artemisia annua* L. test-tube plantlets and artemisinin production with shoot clusters induced from flower organ explants [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, 7(3): 201-206.

[3] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228: 1049-1055.

[4] Gabor A B. Artemisinin and its derivatives, an important new class of antimalarial agents [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2001, 90: 261-265.

[5] WHO. Roll Back Malaria *A Global Partnership* [M]. Geneva: World Health Organization, 1998.

[6] He X C, Zeng M X, Li G F, et al Induction and differentiation of *Artemisia annua* L. calli and variation of artemisinin content [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1983, 25(1): 87-90.

[7] Woerdenbag H J, Luers J F J, Uden W V an, et al Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1993, 32(3): 247-257.

[8] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol, Plant*, 1962, 15: 473-497.

[9] Shen X K, Yan K D, Luo Z Y. Determination of artemisinin

content by ultraviolet meter [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 1983, 3(1): 24-26.

[10] Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, et al Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2001, 409(6823): 1060-1063.

[11] Mahonen A P, Bonke M, Kauppinen L, et al A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root [J]. *Genes Dev*, 2001, 14(23): 2938-2943.

[12] Debergh P C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium [J]. *Physiol Plant*, 1983, 59: 270-276.

[13] Ferreira J F S, Janick J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua* [J]. *Acta Hort*, 1995, 390: 41-49.

[14] Nair M S R, Acton N, Klayman D L, et al Production of artemisinin in tissue culture of *Artemisia annua* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(4): 504-507.

[15] Tawfiq N K, Anderson L A, Roberts M F, et al Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8(5): 425-428.

[16] Fulzle D P, Sipahimalani A T, Heble M R. Tissue culture of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production [J]. *Phytother Res*, 1991, 5: 149-153.

[17] Qin M B, Li G Z, Ye H C, et al Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, 36: 165-170.

特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究

杨 靖¹, 江东福², 马 萍^{2*}

(1. 湛江海洋大学 现代生化实验中心, 广东 湛江 524088; 2. 云南大学微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要: 目的 探讨剑叶龙血树血竭的形成与微生物活动之间的关系。方法 用分离自剑叶龙血树根部的内生真菌 9568D 镰孢霉接种于剑叶龙血树材质(经灭活处理)。结果 保湿培养 4~5 个月后, 在接种部位有红色血脂颗粒形成, 经 UV、IR 光谱分析及抗菌活性实验, 初步证实该血脂与来自剑叶龙血树的天然血竭无本质差异。结论 特异性真菌作用于龙血树材质可促成血竭的形成。

关键词: 9568D 镰孢霉; 龙血树材质; 血竭

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)05-0572-03

Study on formation of Dragon's blood in *Dracaena cochinchinensis* inoculated with *Fusarium 9568D*

YANG Jing¹, JIANG Dong-fu², MA Ping²

(1. Experimental Center of Biochemistry, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2 Microbiology Institute of Yunnan University, Kunming 650091, China)

Key words: *Fusarium 9568D*; *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen; Dragon's blood

血竭(Dragon's blood)是中药传统品种之一, 其性味甘、温、咸、平, 兼有活血、化瘀、止血、补血的

* 收稿日期: 2003-07-04

作者简介: 杨 靖(1967—), 男, 苗族, 湖南永顺人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物生态及应用微生物研究。Tel: (0759) 2383477

* 通讯作者 E-mail: yhsne@hotmail.com

功效。剑叶龙血树血竭来自于剑叶龙血树 *D. racaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的树脂, 早期的研究^[1]发现人工割伤可以促进树脂的积累。江东福等^[2]证实剑叶龙血树血竭的形成与真菌相关, 即用特异性真菌接种活体龙血树, 激活龙血树的防御反应, 产生含植物防卫素的血竭^[3-5]。但人们注意到在野外自然环境下, 一些衰老枯死的剑叶龙血树的材质上亦有血竭形成, 其与真菌的作用是否有关联? 为此, 进行了以下的实验。

1 材料与方法

1.1 供试材料: 菌种分离自云南孟连城郊树龄长达数百年以上的剑叶龙血树 *D. racaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 根部, 模式菌株保存于云南大学微生物研究所应用微生物室。

天然血竭为中国科学院西双版纳热带植物园药厂生产的“雨林牌”血竭, 源自天然龙血树。

1.2 酶液的制备: 将 9568D 菌株接种于含 2% 龙血树木屑、8% 棉籽壳的灭菌固体培养基上, 25℃ 培养 5~6 d, 于 30℃ 下, 加入其 3 倍体积蒸馏水并充分振荡 90 min, 经超滤膜滤过, 收集的液体即为酶液。

1.3 接种液的制备: 将 9568D 菌株接种于含 5% 龙血树木屑汁、2% 葡萄糖、3% 棉籽壳汁灭菌培养液中, 25℃ 下, 经 100 r/min 振荡培养 60 h 作为接种液。

1.4 龙血树材质灭活处理: 取直径约 1 cm 的离体龙血树枝条和 1 cm × 2 cm 的龙血树离体木块若干, 钻以数个深 3~5 mm, 直径 1 mm 的小孔, 经沸水浴蒸腾 5 min 灭活后作为接种的龙血树材质。

1.5 接种处理: 龙血树材质——预处理——接种处理——保湿培养。

1.5.1 处理组 I: 将龙血树材质置于 9568D 菌酶液中, 55℃ 下浸泡 8 h 行预处理, 然后晾干, 再将 9568D 接种液注入预处理过的龙血树材质; 置于试管中在室温下保湿培养。

1.5.2 处理组 II, : 分别用 0.1% 葡萄糖液和无菌水预处理, 接种处理皆为菌液。

1.5.3 处理组 III, : 分别用 0.1% 葡萄糖液和无菌水预处理作为对照。

1.6 接种处理效果的观察及测定: 分别于接种后保湿培养 3~5 个月, 观察处理组和对照组红色血脂的形成情况, 红色血脂的乙醇提取物分别以 DU-7 Backman 紫外分光光度计和 FTS-40/HP5890 色谱/红外联用仪测定, 并以天然血竭样品作对照, 抗菌谱测定按圆滤纸片法^[6]。

2 结果与分析

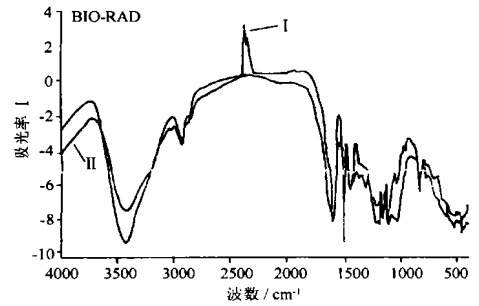
2.1 9568D 镰孢霉接种后的作用效果 (见表 1): 9568D 镰孢霉接种于剑叶龙血树材质后, 保湿培养 10~15 d 即可观察到在接种部位颜色变红, 继续培养 4~5 个月在红色区域有大小不等的血脂颗粒出现, 而对照组却无此现象。试验结果也证明, 在不同的预处理下, 血脂的形成量有差别, 以酶液预处理的效果最佳。处理 I 仅在前期微显红色, 但后期在红色区域内无血脂颗粒形成。

表 1 龙血树材质上血脂形成情况

Table 1 Resin formation in *D. cochinchinensis*

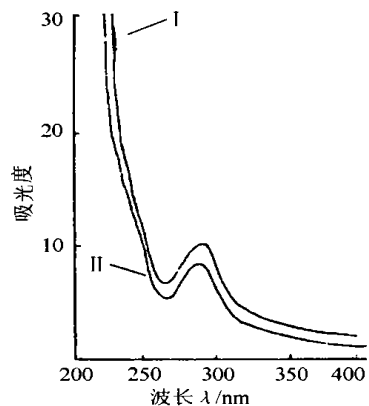
处 理	培养时 间/d	血脂形成量(直径)/mm	
		枝条	木块
酶液+ 菌液	120	0.3~0.5	0.2~0.3
0.1% 葡萄糖+ 菌液	120	0.2~0.3	0.2
无菌水+ 菌液	140	-	-
0.1% 葡萄糖对照	150	-	-
无菌水对照	150	-	-

2.2 光谱分析: 血脂与天然剑叶龙血树血竭的乙醇提取物的光谱分析证明两者的谱形十分相似 (图 1, 2)。



I -天然血竭样品 II-血脂样品
I -natural Dragon's blood II -tested resin

图 1 血脂和天然血竭的红外光谱
Fig 1 IR spectrum of resins and natural Dragon's blood



I -天然血竭样品 II-血脂样品
I -natural Dragon's blood II -tested resin

图 2 血脂和天然血竭的紫外光谱
Fig 2 UV spectrum of resin and natural Dragon's blood

2.3 血脂的抗菌谱: 见表 2。两种提取物的抗真菌活性也一致。

表 2 血脂和天然血竭提取物的抗菌谱

Table 2 Antibiotic spectrum of resin and Dragon's blood

试验菌	抑菌圈(直径)/mm	
	血脂	天然血竭
金黄色葡萄球菌	12.0	15.0
大肠杆菌	-	-
黄曲霉	-	-
烟曲霉	-	-
黑曲霉	-	-
微曲青霉	15.0	13.0
串珠镰孢霉 9568D	12.0	13.0
三隔镰孢霉	11.5	11.5
粉红头孢霉	15.0	12.0
土生交链孢霉	-	-
土色侧孢霉	-	-
枝孢嗜果疮	18.0	21.0
出芽短梗霉	11.0	11.0

3 讨论

实验初步证明 9568D 镰孢霉作用于无生物活性的剑叶龙血树材质可促成血脂的形成和积累, 该血脂与天然剑叶龙血树血竭无本质差异。经灭活处理的龙血树材质无疑已丧失了对微生物侵染的防御反应能力(产生植物防卫素), 故在 9568D 镰孢菌接

种部位产生的血脂显然不是植物防卫素血脂, 但它与天然植物防卫素血竭的组成和抗菌谱却极为相似。在对 9568D 镰孢霉的形态观察中发现其小分生孢子仅见于龙血树茎杆材料诱导培养基, 这说明该菌在一定程度上对剑叶龙血树具适应性。由于内生真菌生存在一个竞争的环境中, 它们可能通过与宿主的共进化或基因转移, 模拟宿主的化学环境, 生产和耐受宿主的某些代谢产物, 从而保证自己的竞争优势。

References:

- [1] Cai X T, Xu Z F. A study on the resource of Chinese Dragon's blood [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1979, 1(2): 1-10.
- [2] Jiang D F. The studies of fungal population and relationship between fungi and forming of Dragon's blood resin in *Draecopis cochinchinensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1995, 17(1): 79-82.
- [3] Bailey J M, Mansfield J W. *Phytoalexins* [M]. Glasgow, Scotland U K: Blackie & Son Ltd, 1982.
- [4] Cruickshank I A M. *Phytoalexins* [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1963, 1: 351-373.
- [5] Harborne J B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1999, 27(4): 335-367.
- [6] Yuan J S. *Basic Taxology of Actinomyces* [M]. Beijing: Science Press, 1997.

HPLC 法测定望春花蕾中望春花黄酮醇苷 I 的含量

于宗渊¹, 孙中砚², 苏本正¹, 刘青^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 2. 山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250012)

中药辛夷主治各种急、慢性, 过敏性鼻炎和鼻窦炎。《中华人民共和国药典》2000 年版一部规定辛夷为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp.、玉兰 *M. denudata* Desr. 和武当玉兰 *M. sprengeri* Pamp. 的干燥花蕾。其中望春花蕾为辛夷的主流品种。其含有望春花黄酮醇苷 I 等化学成分^[1], 但其含量测定方法至今未见报道。本实验建立了 HPLC 法测定辛夷主流品种望春花蕾中望春花黄酮醇苷 I 含量的方法, 并用该法测定了 11 批望春花蕾样品中望春花黄酮醇苷 I 的含量, 为评价和控制辛夷药材的内在质量提供参考。

1 实验材料

Waters 高效液相色谱仪: 600 泵, 7725i 定量进样阀, 进样环体积为 10 μ L, 996 二极管阵列检测器, Millennium³² 色谱工作站; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯; 望春花黄酮醇苷 I 对照品系自望春花蕾中提取并经色谱法分离纯化制得, 经测定其 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 MS 等波谱数据进行了结构鉴定, 并经高效液相色谱归一化法测定其纯度为 99.61%; 11 批望春花蕾样品分别购自河南郑州、陕西西安、河北安国和山东等地(表 1), 经山东省中医药研究院钟方晓副研究员鉴定, 均为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp. 的干燥花蕾。

* 收稿日期: 2003-07-15

作者简介: 于宗渊(1964—), 男, 山东莱西人, 副研究员, 医学硕士, 1984 年毕业于山东医学院药系, 主要从事中药化学成分及质量控制方法等方面的研究工作。Tel: (0531) 2968470-3018 Fax: (0531) 2968473 E-mail: yuzys@sohu.com