

测到黄酮合成并且量略有提高。已知灯盏乙素是灯盏花中的有效成分之一^[13],它是一个由黄酮苷元和糖基配体组成的黄酮类化合物,在次生代谢中以终产物的形式存在。在毛状根培养物中检测到大量黄酮存在而灯盏乙素的量很低,这可能与毛状根中合成灯盏乙素下游相关的代谢调控酶有关,笔者将在已建立的短葶飞蓬毛状根转化体系的基础上进一步开展灯盏乙素生物合成关键酶的研究。

References:

- [1] Cheng S F, Zhang Y N, Zhang X P, et al. Recent Research of *Breviscapin* in clinical applications [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(2): 177-178.
- [2] Wei N. Advances of breviscapin in clinical applications and its side-effects [J]. *Chin Pharm* (中国药师), 2001, 4(2): 144-146.
- [3] Ma Q, Li Y L, Hang Y P. Clinical applications of breviscapin [J]. *Her Med* (医药导报), 2003 (22) (Supplement): 79.
- [4] Yu H Y, Chen Z L. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24 (3): 115-120.
- [5] Yang S C, Yang Z X, Zhang Q Q, et al. Preliminary studies on growing of *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 318-321.
- [6] Liu C H, Zhang M K, Deng H, et al. Establishment of rapid propagation system of *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 597-599.
- [7] Aleksandra K, Izabela S, Krzysztof B, et al. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus* [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 259-264.
- [8] Wu Z C, Liang W Y, Ding Y S. Study on ultrasonic extraction of total flavones of *Erigeron breviscapus* [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater* (云南中医中药杂志), 2004, 25(3): 35-36.
- [9] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [10] Zhang H, Zhang Z F. Ecological and biological analysis of scutellarin in *Erigeron multiradiatus* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(1): 60-62.
- [11] Feng D X, Chen B, Dang C L, et al. Study on variation of total flavonoids in *Erigeron breviscapu* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(4): 362-365.
- [12] Zeng H Y, Zhou P H, Pei G. Total flavonoid contents in cultural materials of *Hypericum sampsonii* [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2002, 11(1): 59-60.
- [13] Cui J M, Wu S. The advance on the research of breviscapine [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15 (3): 255-258.

茯苓灭活原生质体融合育种研究

梁清乐, 王秋颖*, 曾念开, 王怀凯

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

原生质体融合是一项重要的生物工程技术,近30年来发展迅速,该技术比基因工程法和原生质体转化法简便易行,可以克服传统育种法中细胞壁和交配系统对育种的障碍,实现种间、属间以至远缘的杂交。由于原生质体融合是整套基因组连同细胞在内的其他组分一起融入另一细胞,就为遗传物质的充足和有效表达提供了更多的机会,且并不需要预先了解有关基因组或单个基因太多的具体细节,就能改变物种的生物学特性,获得新品种,甚至可以通过将几个优良品种的融合而将多种优良性状组合到单个菌株中,所以,这是一个有可能在较短时期内取得明显成效的育种方法^[1],并被广泛应用于微生物遗传育种工作中^[2]。灭活原生质体融合是对原生质体融合技术的重大发展。自1977年以来,人们开始了用灭活原生质体进行微生物融合育种的尝试^[3]。

茯苓 *Poria cocos* (Fr.) Wolf 是传统名贵中药,近年来,茯苓菌种退化严重,给生产带来巨大的损失。笔者在对茯苓原生体制备与再生条件进行探索

的基础上^[4],通过原生质体融合技术,得到了茯苓融合重组子,并对融合子进行了初步的鉴定。

1 材料和方法

1.1 出发菌株: Z_{10-2} 为中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所真菌室保藏; Z_{10-3} 来自福建三明真菌研究所。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, VB 0.001%, 琼脂 1.5%, pH 值 6.5。

1.2.2 发酵培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, VB 0.001%, 琼脂 1.5%, pH 值 6.5。

1.2.3 再生培养基: 马铃薯 10% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 酵母粉 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.1%, 硫酸铵 0.1%, VB 0.001%, 琼脂条 1.5% (煮溶)。

1.2.4 高渗再生培养基: 再生培养基中加入 0.5

mol/L 甘露醇作为稳渗剂。

1.3 试剂:0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA,0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 配制的 0.2% 巯基乙醇;稳渗剂 KCl,NaCl,甘露醇,蔗糖;50 mmol/L CaCl_2 30% 聚乙二醇(PEG6000)(北京欣经科试剂公司);溶壁酶(广东省微生物研究所);蜗牛酶(北京欣经科试剂公司)。

1.4 原生质体的制备

1.4.1 酶液制备:用灭菌的 0.5 mol/L 渗透压稳定剂配制,酶溶解后 5 000 r/min 离心 10 min 去掉沉淀杂质,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.4.2 菌种培养:将菌株 Z_{10-2} 、 Z_{10-3} 从试管斜面挑取数小块,分别接种于 150 mL 麦麸液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床培养 7 d,然后滤过收集菌丝,用无菌水冲洗后,用研钵磨,取 Z_{10-2} 、 Z_{10-3} 各 10 mL 分别再接入 150 mL 新培养基中培养,温度为 28 $^{\circ}\text{C}$,做以下处理。

1.4.3 制备:分别取培养 72 h 的 Z_{10-2} ,培养 56 h 的 Z_{10-3} 菌丝,铜网滤过收集菌丝,用无菌水将菌丝冲洗干净,用 0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 冲洗后,0.2% 巯基乙醇处理 30 min,温度为 28 $^{\circ}\text{C}$,振荡,用铜网收集菌丝,用 0.5 mol/L 甘露醇冲洗,将收集的菌丝在 1 500 r/min 下离心 10 min,称取 0.25 g 菌丝体加上 1 mol 3% 酶液,28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡酶解 2 h,铜网滤过,滤液离心 500 r/min,5 min 2 次,去掉菌丝段,3 500 r/min 下离心 10 min,得到沉淀即为原生质体,然后将沉淀用稳渗剂洗涤离心 2 次,并用血球计数板计数。

1.5 原生质体再生:采用 0.5 mol/L 甘露醇,作为稳渗剂加入到完全培养基中,取制备好的原生质体 0.1 mL 涂皿,使每皿原生质体数目达到 10^4 个/mL,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,观察平皿中的再生菌落数,计算再生率。

1.6 原生质体灭活与融合^[5]:取 Z_{10-2} 原生质体悬浮液 10 mL,58 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,检测存活率为 0;取 Z_{10-3} 原生质体悬浮液 10 mL 倒入直径 9 cm 无菌平皿中,在 30 W 紫外灯管正下方 30 cm 处,打开皿盖照射灭活处理 10 min,检测存活率为 0。

将两亲株灭活的原生质体各取 1 mL 混合到无菌带塞的离心管内,加入 1 mL 预热的聚乙二醇 2 000 r/min 离心 20 min,28 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,加入数毫升稳渗剂,离心洗涤,25 $^{\circ}\text{C}$ 预培养 24 h,取 0.1 mL 涂于高渗的融合再生培养基。

1.7 融合株的分析

1.7.1 形态学分析:将充分活化的融合株及亲株转接于固体平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养后,观察菌落形态。

1.7.2 亲和性分析:将充分活化的融合株及亲株转接于固体平板上,亲株接于平皿两旁,融合株接于中间,相距 2 cm;于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下进行培养;至两个菌株的菌丝长满培养皿,观察不同菌株菌落之间菌丝交界处的反应类型。

1.7.3 酯酶同工酶的分析:参照文献方法进行^[6],通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析融合株与双亲株酯酶同工酶的差异。

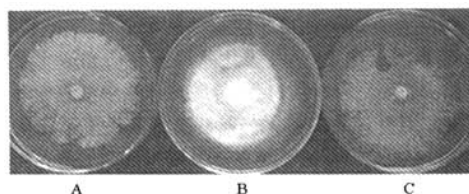
2 结果与分析

2.1 灭活原生质体融合频率: Z_{10-2} 和 Z_{10-3} 原生质体分别采用热灭活和紫外线灭活法处理,混合后在聚乙二醇诱导下发生融合,融合后重组频率为 4×10^{-4} 。

2.2 融合株的性状分析

2.2.1 形态学分析:将充分活化的融合株及亲株转接于固体平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养后,对它们之间的形态学特征进行了比较(图 1)。

融合子的菌丝要比两亲本都要白,而且菌落菌丝致密,气生菌丝浓密。其菌落性状、气生菌丝量要优于两亲本,说明两亲本的基因在融合子中发生重组,表现出了优于两亲本的性状。



A-亲本菌株 Z_{10-2} B-融合菌株 R C-亲本菌株 Z_{10-3}

A-parent strain Z_{10-2} B-fusant R C-parent strain Z_{10-3}

图 1 融合子与两亲本菌株的菌落性状

Fig. 1 Colony characteristics of fusant and two parent strains

2.2.2 亲和性分析:通过融合子与两亲本间的拮抗反应,可以看到融合子与两亲本之间有明显的拮抗线,说明融合株有新的基因产生,而与两亲本有明显的不同,证实融合子为新的菌株。

2.2.3 酯酶同工酶分析:从双亲株与融合子的酯酶同工酶结果来看,融合株和双亲株的酶带有明显的不同,融合子的酶带明显多于双亲;融合株与双亲株的主要酶带相同,但其酶带加深明显,而且融合株出现了两条新的酶带(图 2)。

对融合菌株进行同工酶分析能直接反映出融合

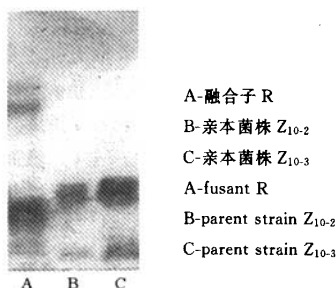


图 2 酯酶同工酶谱

Fig. 2 Zymograms of esterase isozymes

菌株的遗传背景及双亲株的关系。从酶谱中发现,融合株的同工酶谱中存在双亲株的特征性酶带并有新的酶带产生,说明融合菌株同时具有来自双亲株的基因组,而且融合过程中双亲株的基因发生重组,引起同工酶基因间的抑制表达发生变化或有新酶基因的产生。

2.3 融合重组子分析:茯苓菌种采用灭活原生质体融合技术可以获得理想的杂交新菌株。双亲灭活原生质体融合的特点是可以省去遗传标记菌株的筛选,还有利于排除双方亲本类型的再生菌株,便于选择融合重组子^[7]。原生质体灭活主要包括 3 种不同的方式:热灭活、紫外线灭活以及化学灭活。热灭活是目前采用最广泛的手段。但热灭活必须配合其他灭活方式,温度对双亲菌株原生质体作用位点在不同细胞中差异很小,灭活后致死损伤部位基本相同,不能做到互补融合,而得不到融合子再生菌株。双亲

原生质体均用紫外线灭活处理。大剂量的 UV 处理在不同位点上损伤 DNA,因而有可能使融合子的某些代谢途径受到干扰,最终影响生产中产量,但紫外线灭活法的优点是可以刺激双亲菌株基因组间的交换。因此,在试验过程中,Z₁₀₋₂选用原生质体热灭活,Z₁₀₋₃选用原生质体紫外线灭活,融合后双亲原生质体损伤部位得到互补,就很容易从再生平板上挑选出融合子再生菌株。

利用该方法笔者已选出融合子再生菌株,并通过形态学、亲和性、酯酶同工酶分析,确定该再生菌株为双亲融合子;该菌株是否为优质高产菌株,还有待于进一步生产中试验结果来证明。

References:

- [1] Liu Z T, Luo X C. *The Biotechnology and Appliance of Edible Mushroom* (食用真菌生物技术及应用) [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2002.
- [2] Xin M X, Ma Y E. The protoplast fusion and appliance of microorganism [J]. *Bull Microbiol* (微生物学通报), 1995, 22(6): 365-370.
- [3] Zhou D P, Ping W X. *The Protoplast Fusion of Microorganism* (微生物原生质体融合) [M]. Harbin: Heilongjiang Scientific and Technical Press, 1990.
- [4] Liang Q L, Wang Q Y, Zeng N K, et al. Separation and regeneration of *Poria cocos* protoplast [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 773-775.
- [5] He J C, He Y X. Study on the breeding of *Pleurotus ostreatus* by inactivated protoplast fusion [J]. *Edib Fungi* (食用菌), 1999, 6: 10-11.
- [6] He Z X, Zhang S Z. *Electrophoresis* (电泳) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [7] Chang S T, Lin F C. *The Heredity and Breeding of Mushrooms* (真菌遗传与育种) [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1997.

不同部位、不同产地南五味子中木脂素类成分的比较

徐丽华^{1,2}, 梁春霞³, 孙 萌², 李桂凤³, 余伯阳^{1*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009; 2. 苏州大学药学院, 江苏 215007;

3. 苏州市思源医药科技有限公司, 江苏 苏州 215011)

南五味子为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥成熟果实。性味酸、甘、温, 归肺、心、肾经, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效。用于久嗽虚喘、津伤口渴、短气脉虚、心悸失眠等症^[1]。南五味子主要分布于华中、西南等地, 其化学成分主要有挥发油、木脂素、三萜、多糖、有机酸等^[2~5]。木脂素类成分是南五味子的主

要活性部位^[6,7], 其中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲具有降酶保肝活性, 五味子乙素、醇甲具有安神作用, 本实验采用 HPLC 法检测了南五味子果肉、种皮、种仁中五味子甲素、乙素、酯甲及醇甲的量, 并用紫外-可见分光光度法检测了总木脂素的量, 同时检测了 5 个不同产地南五味子中五味子甲素、乙素、酯甲、醇甲及总木脂素的量。检测结果显示, 检测部位

收稿日期: 2006-01-13

作者简介: 徐丽华(1968—), 中国药科大学博士研究生, 苏州大学药学院讲师, 主要从事中药和天然药物研究。

* 通讯作者 余伯阳 E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn