

药活性成分的生物合成及其调控机制,有可能会给制药工业带来巨大变革,同时也可以解决一些药用植物资源的问题。本研究通过酶的保守域来设计引物,采用RACE技术克隆其基因,这对进一步研究黄连N-甲基乌药碱-3⁴羟化酶的功能、表达特征以及利用基因工程技术促进黄连生物碱合成具有重要意义。

参考文献

- [1] Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, *et al.* Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 38557-38565.
- [2] Okada N, Koizumi N, Tanaka T, *et al.* Isolation, sequence, and bacterial expression of a cDNA for (S)-tetrahydroberberine oxidase from cultured berberine-producing *Coptis japonica* cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 534-538.
- [3] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, *et al.* Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 367-372.
- [4] 李海涛,张万年,周有骏,等. 细胞素P450超家族蛋白质基于结构知识的序列联配[J]. 生物物理学报, 1999, 15: 419-426.
- [5] Imai M, Shimada H, Watanabe Y, *et al.* Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: A possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 7823-7827.
- [6] Pauli H H, Kutchan T M. Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3⁴hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent monooxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis [J]. *Plant J*, 1998, 13: 793-801.

真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响

陈晓梅, 郭顺星*, 孟志霞

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 生物技术中心, 北京 100094)

摘要:目的 研究固体培养条件下2种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响。方法 筛选获得铁皮石斛原球茎的继代培养基及其生长曲线。根据生长曲线,在原球茎生长的不同时期加入真菌诱导子,考察诱导子对原球茎鲜质量和干质量的影响。结果 铁皮石斛原球茎继代培养基: 1/2MS+20%土豆+3%蔗糖+0.8%琼脂。与对照相比,第11周和第13周加入MF23诱导子使原球茎鲜质量分别提高了16.4% ($P < 0.01$)和23.4% ($P < 0.01$),干质量分别提高了6.7% ($P < 0.05$)和17.9% ($P < 0.01$),继代培养基中加入MF23诱导子使原球茎干质量降低了9.9% ($P < 0.01$)。与对照相比,第11周和第13周加入MF24诱导子使原球茎鲜质量分别提高了17.7% ($P < 0.01$)和12.0% ($P < 0.05$),第11周加入MF24诱导子使原球茎干质量提高了9.2% ($P < 0.05$),继代培养基中加入MF24诱导子使原球茎干质量降低了13.9% ($P < 0.01$)。结论 在原球茎培养的早期加入真菌诱导子,对原球茎的生长有一定抑制作用;在原球茎培养的后期加入真菌诱导子,对原球茎的生长有促进作用。

关键词: 铁皮石斛; 原球茎; 真菌诱导子

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0423-04

Effects of fungal elicitors on growth of *Dendrobium candidum* protocorms

CHEN Xiao-mei, GUO Shun-xing, MENG Zhi-xia

(Biotechnology Center, Institute of Medicinal Plants Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of two fungal elicitors on the growth of *Dendrobium candidum* protocorms cultured on the solid medium. **Methods** The medium for propagation of protocorms was selected and the growth curve on that medium was obtained. According to the curve, the two fungal elicitors were added at the different growth stages of protocorms. The fresh weight (FW) and dry weight (DW) of protocorms were measured. **Results** The medium for propagation of protocorms was 1/2MS+20% potato extract+3% sucrose+0.8% agar. Compared with the control MF23 elicitor added at weeks

* 收稿日期: 2007-05-07

基金项目: 国家杰出青年科学基金专项资助项目(30325047)

作者简介: 陈晓梅(1970—),女,北京市人,副研究员,博士,从事药用植物菌根生物学和药用真菌化学研究。

Tel: (010)62819871 E-mail: xmchen@implad.ac.cn

* 通讯作者 郭顺星 Tel: (010)62829619 E-mail: sxguo2006@yahoo.com.cn

11 and 13 could significantly increase the FW by 16.4% ($P < 0.01$) and 23.4% ($P < 0.01$), respectively, and the DW by 6.7% ($P < 0.05$) and 17.9% ($P < 0.01$), respectively, and MF23 added into the medium for the whole culture could significantly decrease the DW by 9.9% ($P < 0.01$). Compared with the control, MF24 elicitor added at weeks 11 and 13 could significantly increase the FW by 17.7% ($P < 0.01$) and 12.0% ($P < 0.05$), respectively, added at week 11 could significantly increase the DW by 9.2% ($P < 0.05$), and MF24 added into the medium for the whole culture could significantly decrease the DW by 13.9% ($P < 0.01$). **Conclusion** The growth of protocorms can be inhibited when the fungal elicitor is added at the early stage of culture and be improved when the fungal elicitor is added at the later stage of the culture.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; protocorms; fungal elicitor

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 是《中国药典》2005年版收载的石斛属3种植物之一,也是该属药用植物中最为珍稀名贵的一种。铁皮石斛生长在北亚热带雨林,以半自养半异养的方式进行生长和发育^[1],其种子极小、无胚乳,自然繁殖率极低^[2],被列为国家二级保护植物。铁皮石斛原球茎是利用铁皮石斛种子进行人工繁殖的起点,有较高的增殖效率^[3],药理研究证明其具有提高机体免疫功能的作用,且作用强度与原药材相似^[4]。本实验研究固体培养条件下2种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响,为进一步研究利用真菌诱导子提高铁皮石斛原球茎的内在质量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:铁皮石斛由中国医学科学院药用植物研究所生物技术中心郭顺星教授鉴定。铁皮石斛原球茎由铁皮石斛种子通过无菌培养诱导繁殖形成。原球茎在1/2MS+3%蔗糖+0.8%琼脂的培养基上继代培养保存^[5]。

真菌MF23和MF24均分离自野生铁皮石斛的根部,经首都师范大学生物系范黎博士鉴定,均为小菇属真菌(*Mycena* sp.)。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:原球茎的固体培养,培养基A为MS培养基;培养基B为MS培养基大量元素减半;培养基C为MS培养基大量元素减半,土豆200 g/L(煮20 min,取汁);培养基D为67-v培养基,土豆200 g/L(煮20 min,取汁);培养基E为B5培养基。以上培养基中都要加入蔗糖30 g/L,琼脂8.0 g/L, pH 5.8。培养条件:温度24~26 °C,光照强度1 500~2 000 lx,光照时间10 h/d。

真菌的液体培养:培养基为麦麸30 g/L(煮30 min,取汁),葡萄糖20 g/L,磷酸二氢钾3.0 g/L,硫酸镁1.5 g/L, pH 自然。培养条件:温度24~26 °C,暗培养,摇床转速100 r/min,培养21 d。

1.2.2 真菌诱导子的制备:真菌液体培养21 d,将发酵产物打碎,121 °C灭菌20 min,为真菌诱导子。

1.2.3 原球茎固体培养的培养基筛选:原球茎分别接入培养基A、B、C、D、E中,接种量(0.851±0.089) g。原球茎培养12周后收获,以瓶为单位称量原球茎的鲜质量;收获的原球茎于50 °C干燥恒重,以瓶为单位称量干质量。采用完全随机实验设计,每种处理重复10次。

1.2.4 原球茎生长曲线实验:原球茎接入培养基C中,接种量(0.856±0.114) g。从培养的第6周开始,每周收获原球茎。称量原球茎鲜质量和干质量的方法同1.2.3。根据结果绘制原球茎在培养基C上的生长曲线。采用完全随机实验设计,每种处理重复6次。

1.2.5 真菌诱导子对原球茎生长的影响:原球茎接种量(2.201±0.311) g。真菌诱导子的加入量均为150 mL/L(诱导子/培养基)。诱导子的加入时间分别为:配制培养基时、培养的第11周和培养的第13周。各处理的原球茎均在培养的第14周收获。称量原球茎鲜质量和干质量的方法同1.2.3。以在培养基C上培养14周的原球茎为空白对照。采用完全随机实验设计,每种处理重复7次。

1.2.6 统计学处理:对原球茎的鲜质量和干质量进行单因素方差分析,如果 F 检验各均数间存在显著或极显著差异,再对各均数进行 q 检验(Newman-Keuls检验)的多重比较,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示^[6]。

2 结果

2.1 原球茎固体培养的培养基筛选:在不同的培养基上生长,对原球茎的鲜质量和干质量都有极显著性影响($P < 0.01$)。多重比较结果表明:在培养基C和D上生长的原球茎的鲜质量和干质量均极显著地高于在其他3种培养基上生长的原球茎的鲜质量和干质量($P < 0.01$);在培养基E上生长的原球茎的

鲜质量极显著地高于在培养基A和B上生长的原球茎的鲜质量($P < 0.01$);在培养基E上生长的原球茎的干质量极显著地高于在培养基A上生长的原球茎的干质量($P < 0.01$),显著地高于在培养基B上生长的原球茎的干质量($P < 0.05$);在培养基B上生长的原球茎的干质量显著地高于在培养基A上生长的原球茎的干质量($P < 0.05$),见表1。

表1 不同培养基对铁皮石斛原球茎鲜质量和干质量的影响

Table 1 Effects of different media on FW and DW of *D. candidum* protocorms

组别	鲜质量/(g·瓶 ⁻¹)	干质量/(g·瓶 ⁻¹)
培养基A	3.061±1.802	0.168±0.084
培养基B	4.236±2.267	0.249±0.113 [▲]
培养基C	16.177±1.572 [*]	0.725±0.053 [*]
培养基D	15.678±2.148 [*]	0.742±0.080 [*]
培养基E	7.937±1.150 [△]	0.331±0.035 ^{★★☆}

与培养基A、B和E比较: $^*P < 0.01$; 与培养基A和B比较: $^{\Delta}P < 0.01$; 与培养基A比较: $^{**}P < 0.01$; 与培养基B比较: $^{\star}P < 0.05$; 与培养基A比较: $^{\Delta}P < 0.05$

Compared with media A, B, and E, $^*P < 0.01$; Compared with media A and B, $^{\Delta}P < 0.01$; Compared with medium A, $^{**}P < 0.01$; Compared with medium B, $^{\star}P < 0.05$; Compared with medium A: $^{\Delta}P < 0.05$

2.2 铁皮石斛原球茎的生长曲线: 铁皮石斛原球茎在培养基C上生长的鲜质量变化曲线表明: 原球茎生长的第7周之前为延迟生长期, 第7~8周为指数生长期, 第9~13周为线性生长期, 第14~16周为减速生长期, 16周以后停止生长(图1)。铁皮石斛原球茎在培养基C上生长的干质量变化趋势与鲜质量的变化基本一致(生长曲线实验的数据未列出)。

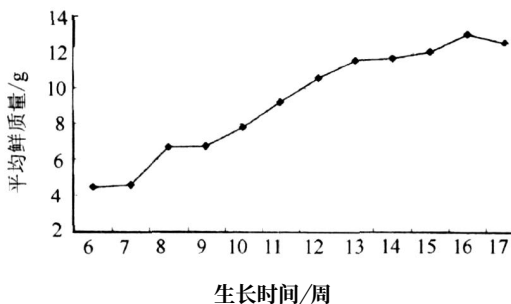


图1 铁皮石斛原球茎生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *D. candidum* protocorms

2.3 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响

2.3.1 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎鲜质量的影响: 2种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎的鲜质量均有极显著性影响($P < 0.01$)。

对MF23诱导子处理的原球茎鲜质量的多重比较结果表明: 与对照相比, 第11周和第13周加入诱导子

极显著地提高鲜质量($P < 0.01$), 分别提高了16.4%和23.4%; 与培养基中加入诱导子的处理相比, 第11周和第13周加入诱导子, 极显著地提高鲜质量($P < 0.01$), 分别提高了12.1%和18.8%(表2)。

表2 两种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎鲜质量和干质量的影响

Table 2 Effects of two fungal elicitors on FW and DW of *D. candidum* protocorms

组别	鲜质量/(g·瓶 ⁻¹)	干质量/(g·瓶 ⁻¹)
MF23 培养基加诱导子	30.537±1.386	1.205±0.055 ^{***}
第11周加诱导子	34.222±0.586 ^{**▲▲}	1.427±0.100 ^{***▲}
第13周加诱导子	36.283±3.767 ^{**▲▲}	1.576±0.077 ^{***▲▲▲}
MF24 培养基加诱导子	28.086±1.884	1.151±0.081 ^{**}
第11周加诱导子	34.585±3.331 ^{**▲▲}	1.460±0.115 ^{***▲▲}
第13周加诱导子	32.908±2.052 ^{**▲▲}	1.409±0.092 ^{***▲▲}
对照	29.392±2.309	1.337±0.075

与对照比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与培养基加诱导子比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与第11周加诱导子比较: $^{**\star}P < 0.01$

Compared with control, $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, respectively; compared with adding elicitors into medium, $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, respectively; compared with adding elicitors in week 11, $^{**\star}P < 0.01$

2.3.2 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎干质量的影响: 2种真菌诱导子对铁皮石斛原球茎的干质量均有极显著性影响($P < 0.01$)。

对MF23诱导子处理的原球茎干质量的多重比较结果表明: 与对照相比, 培养基中加入诱导子极显著地降低干质量($P < 0.01$), 降低了9.9%, 第11周加入诱导子显著地提高干质量($P < 0.05$), 第13周加入诱导子极显著地提高干质量($P < 0.01$), 分别提高了6.7%和17.9%; 与培养基中加入诱导子的处理相比, 第11周和第13周加入诱导子极显著地提高干质量($P < 0.01$), 分别提高了18.4%和30.8%; 与第11周加入诱导子的处理相比, 第13周加入诱导子极显著地提高干质量($P < 0.01$), 提高了10.4%(表2)。

对MF24诱导子处理的原球茎干质量的多重比较结果表明: 与对照相比, 在培养基中加入诱导子的处理极显著地降低干质量($P < 0.01$), 降低了13.9%, 第11周加入诱导子显著地提高干质量($P < 0.05$), 提高了9.2%; 与培养基中加入诱导子的处理相比, 第11周和第13周加入诱导子极显著地提高干质量($P < 0.01$), 分别提高了26.8%和22.4%(表2)。

3 讨论

通过实验筛选确定1/2MS+20%土豆+3%蔗糖+0.8%琼脂为铁皮石斛原球茎的适宜培养基。在

此培养基上原球茎继代培养5代以上,能保持较高的增殖率,且原球茎不易分化。本研究结果与文献报道^[5]的结果有所不同,文献报道添加土豆提取物时原球茎增殖量最大,但原球茎易分化成小苗。

铁皮石斛原球茎固体培养的线性生长期为第9~13周,随后进入减速生长期。研究结果表明在原球茎生长的初期加入真菌诱导子,对原球茎的生长有一定抑制作用。在原球茎线性生长的后期加入真菌诱导子,能提高原球茎的鲜质量和干质量,说明诱导子对原球茎的生长有促进作用,并能影响原球茎的物质代谢过程,促进其干物质的积累。这些结果与已有的研究报道^[7]结果相符合。

上述研究结果显示,2种真菌对原球茎的作用有一定差别:原球茎与MF23诱导子作用时间延长,鲜质量和干质量有降低的趋势;原球茎与MF24诱导子作用时间延后,鲜质量和干质量有增加的趋势。

但它们的这种不同作用之间没有显著性差异。推测MF24对原球茎的作用较温和。对于菌根真菌对铁皮石斛原球茎的作用,还有待于从生理、生化及次生代谢产物等方面进行深入研究。

参考文献

- [1] 李铭宗. 铁皮石斛的生物学特性和人工栽培[J]. 福建热作科技, 1999, 24(1): 29-31.
- [2] 邵华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(1): 109-112.
- [3] 张铭, 朱峰, 魏小勇, 等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制[J]. 浙江大学学报(理学版), 2000, 27(1): 92-94.
- [4] 高建平, 金若敏, 吴耀平, 等. 铁皮石斛原球茎与原药材免疫调节作用的比较研究[J]. 中药材, 2002, 25(7): 487-489.
- [5] 张治国, 刘骅, 王黎, 等. 铁皮石斛原球茎增殖培养条件研究[J]. 中草药, 1992, 23(8): 431-433.
- [6] 张勤, 张启能. 生物统计学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [7] 刘长军, 侯嵩生. 真菌诱导子对新疆紫草悬浮培养细胞的生长和紫草素合成的影响[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 6-10.

肉苁蓉细胞悬浮培养体系的建立

欧阳杰¹, 武彦文², 王晓东³, 赵兵³, 王玉春^{3*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院 食品科学与工程系, 北京 100083; 2. 清华大学 化学系 生命有机磷化学教育部重点实验室, 北京 100084; 3. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 目的 研究由肉苁蓉愈伤组织建立细胞悬浮培养体系的培养条件。方法 在固体培养基上添加不同比例的生长激素, 考察生长激素、细胞种龄和接种量对细胞生长和次生代谢产物苯乙醇糖苷(PeG)量的影响。结果 在添加1 mg/L 2, 4-D的B5固体培养基上形成的愈伤组织松散易碎, 适于进行悬浮培养。细胞种龄为25 d和接种量为3%~4%时细胞悬浮培养的结果最好, PeG产量达到最大, 为0.82 g/L。细胞在悬浮培养时聚集体由大变小, 直径小于0.5 mm的细胞聚集体由接种时的5%逐渐增加至第20天时的81%, 其PeG量为10.1%。结论 通过摇瓶培养建立了较好的细胞悬浮培养体系。

关键词: 肉苁蓉; 悬浮培养; 苯乙醇糖苷(PeG)

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)03-0426-04

Establishment of *Cistanche deserticola* cell lines in suspension culture

OU YANG Jie¹, WU Yan-wen², WANG Xiao-dong³, ZHAO Bing³, WANG Yu-chun³

(1. Department of Food Science and Engineering, College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Bioorganic Phosphorous Chemistry & Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: **Objective** To investigate the culture conditions for the establishment of suspension cell lines from *Cistanche deserticola* callus. **Methods** Adding different kinds and ratios of plant growth regulator to solid B5 medium, the effects of cell age, inoculation size, and plant growth regulator on the cell growth and the second metabolite accumulation, phenylethanoid glycosides (PeG) were studied. **Results**

* 收稿日期: 2007-05-10

作者简介: 欧阳杰(1971—), 男, 湖南省安仁县人, 博士, 副教授, 主要从事生化工程方面的研究, 已在国内外发表论文30余篇。

Tel: (010) 62336700 Fax: (010) 62338221 E-mail: ouyangjy@sohu.com