

中图分类号: Q 75; Q 949.95 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)01-0030-03

分子生物学与药用植物研究

张彦桃

自从 Watson 和 Crick 发现了 DNA 的双螺旋结构, 标志着分子生物学的诞生。以此为理论基础产生的生物技术不断在生命科学领域得到应用。药用植物作为植物研究的一个特殊领域, 有着与普通植物不同之处, 即它的品质鉴别是以临床疗效为最根本和最终标准。随着人们对药用植物的开发以及植物药产品在人们生活中的地位的不断提商, 也出现了一些问题, 如野生资源的破坏性开发引起的生态问题以及濒危野生种的出现、药材道地性的保持、药材来源的纯正性等。因此应用分子生物学方法可科学地解决这些问题, 并促进药用植物的可持续发展。

1 药用植物基因资源

中国医学科学院药物研究所卫生部天然药物生物合成重点实验室的程克煌教授指出: “自人类基因组计划(HGP)实施以来, 针对基因资源展开的争夺战已经打响, 现在国际上对于药用植物基因资源的争夺日趋激烈。尤其以欧洲、美国和日本在药用植物功能基因的专利保护方面已

经远远地走在我们的前面”。这是因为药用基因资源有其重要的意义, 一方面药用基因资源的多样性是可持续发展的基础, 另一方面这一资源已经成为可争夺的又一重要战略资源。药用植物基因资源大体分为三类: 第一, 有效成分生源途径中代谢关键酶基因; 第二, 优良农艺性状或特殊生理现象基因; 第三, 重要标志基因, 它们在构建基因组谱和分子标记辅助育种方面起重要作用。

1.1 药用植物功能基因

从 20 世纪 90 年代开始, 药用植物基因克隆工作进展非常迅速。朱平等^[1]对 GeneBank 中 1992 年至 2003 年注册的药用植物功能基因情况进行统计, 发现在 32 属 42 种药用植物中共注册基因序列 255 条, 其中长春花、甘草、青蒿素和红豆杉是注册基因最多的植物。日本注册基因数最多, 美国次之, 德国第三, 中国排在第四位。美国科学家在药用植物次生代谢相关基因研究方面作的研究较为其他国家突出, 他们在红豆杉、薄荷和

黄芪有关基因片段克隆、注册较多。虽然还没有利用这些基因解决天然产物来源问题, 但在理论上更接近目标, 增强了研究者信心。

黄酮类化合物是一类重要的次生代谢物, 它可以作为治疗心脑血管疾病的药物, 并且还有镇咳止痰、抗菌消炎、抗癌等活性, 与花的颜色密切相关的花青素也是黄酮类化合物。已经被克隆的主要黄酮合成相关基因有查尔酮合酶、催化黄酮母核羟基化的酶类及与糖基转变有关酶类等。植物细胞色素 P450 基因是一类具有多种催化功能含血红素蛋白的氧化酶系, 在植物体内可以催化许多初级反应和次级反应。由于其在植物次生代谢及植物抗逆性(主要是抗除草剂)中的重要作用以及可能在生物除污方面的应用, 这类酶的研究也较为深入。到 2002 年底, 有 600 多个 P450 基因被克隆, 有 100 多个基因在细菌、酵母、杆状病毒等异源表达系统中表达并鉴定了功能^[2]。另一类研究比较多的药用植物功能基因是紫杉醇生物合成途径基因, 从 1996 年开始已经从不同的红豆杉中克隆了 11 个紫杉醇合成相关基因, 其中有紫杉醇母核形成基因、催化母核氧取代的 3 个羟基化酶基因和 5 个与侧链形成有关的酰基转移酶基因。这些基因均在大肠杆菌、酵母等系统中得到表达, 其产物的功能同时也得到鉴定。Huang K X^[3]等及 Huang Q^[4]等以大肠杆菌为宿主菌组合了紫杉烯合酶等 4 个基因, 使重组大肠杆菌产生紫杉烯, 产率达到 1.3 mg/L, 开创了天然产物生物合成基因应用的先河。

1.2 药用植物 EST 序列

ESTs (expressed sequence tags, 表达序列标签)是在人类基因组计划实施过程中, 由美国国立卫生研究院生物学家 Venter J 提出的发现基因的新战略。它是指从 cDNA 文库中随机挑取克隆并对其 3' 端和 5' 端进行单轮测序所获得的短的 cDNA 序列, 代表一个完整基因的一小部分, 一般长度为 300~500bp。ESTs 的序列长度足以包含其所代表基因的必要信息。

药用植物能够有药用生物学价值, 其基础就是所含的有效化学成分。而这些天然有效成分的产生又是由相应的生物合成基因编码的。目前从植物中克隆的次生代谢相关酶类还很有限, 但通过 EST 可以得到一定的生物信息, 从而以这一段核苷酸序列为起点, 利用各种生物技术的方法克隆到目的基因。所以 EST 可以为新基因的克隆、基因组谱的绘制等工作提供依据, 促进相关工作的进行。王伟等^[5]对 GeneBank 中注册的药用植物 ESTs 进行分析, 表明枸橼、甜叶菊、买麻藤、银杏和藏红花、大戟的注册数较多, 超过了 250 条。其中美国是注册 EST 最多的国家, 其次是法国、加拿大, 而日本注册

的很少。

2 分子标记在药用植物研究中的应用

分子标记指反映生物个体或群体间在基因组上某种差异特征的 DNA 片段。其特点有:①直接以 DNA 的形式表现,在植物的各组织、各发育阶段皆可检测到;②数量多,遍布整个基因组;③多态性高,自然存在许多变异,不需要专门创造特殊的遗传材料;④表现为“中性”,几乎不影响目标性状的表达,与不良性状无必要的连锁^[6]。分子标记按其技术基础大致可以分为(1)以 Southern 杂交为基础的分子标记。如 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性),它是 Hooten 首先提出的,是最早发展的分子标记技术。原理是检测 DNA 的限制性内切酶酶切后形成的特定的 DNA 片段的大小。(2)以 PCR 为基础的分子标记。如 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性),它是由荷兰科学家 Zabeau 等发展起来的一种检测 DNA 多态性的方法,其特点是把 RFLP 和 PCR 结合起来。RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA, 随机引物扩增多态性),它是建立在 PCR 基础上的一种快速、简便、多态性检出率高、可自动分析的一项 DNA 分子标记技术,该技术的优越性是:所需 DNA 样品少,但对纯度要求很高;能直接对基因组进行检测;不需要 Southern 杂交、银染等步骤;操作安全,不需同位素示踪,对人体没有危害。(3)特定序列位点分子标记。如 SSR (Simple Sequence Repeat, 简单序列重复)标记,它是 2~6 个碱基组成的基本序列串联重复组成的短片段,为共显性,均匀地分布在真核生物基因组中,侧面有保守的 DNA 序列。研究表明 SSR 位点的等位基因数目比其他分子标记揭示的等位基因数目多,同时因其使用程度简单、快速、重复性好,是一种理想的分子标记^[7]。其他的还有几种分子标记 DAF (DNA Amplification Fingerprinting, DNA 扩增产物指纹分析)、CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, 酶切的扩增多态性序列)、SNPs (Single nucleotide polymorphisms, 单核苷酸多态性)等。

2.1 分子标记在中药鉴别中的应用

2.1.1 中药材的“道地性”鉴定 “道地药材”是一个约定俗成的概念,是一个古代药物标准化的概念,在生物学上是指某一物种的特定居群,它是基因型与环境互作的产物^[8]。孙坤等^[9]认为特定的基因产生特定的酶,进而调控次生代谢产物等有效成分的产生,所以特定的基因是药材道地性形成的关键。因而采用 DNA 分子标记诊断技术并辅以其其他生物技术,可以从分子水平揭示药材的“道地性”。分子标记技术已经应用于很多药物植物的道地性研究。

陈永久等^[10]采用 RAPD 技术对冬虫夏草不同地理

群体间的遗传分化研究发现,来自同一地方的冬虫夏草样品间的遗传差异非常小,同一区域不同地方的样品间遗传差异较大,而来自不同区域的冬虫夏草样品间的遗传差异最大,即冬虫夏草的遗传变异与地理距离具有明显的相关性,为冬虫夏草药材道地性的成因提供了分子依据。杜鹤等^[11]以全国 10 个主要产地的半夏为材料,采用 AFLP 方法研究,筛选的 12 对引物,共扩增出 1673 条带,进行聚类分析,绘制的系统进化树不同种源之间的遗传关系与利用总生物碱含量差异趋势一致,研究所获得的特征带和缺失带体现了 AFLP 的高特异分辨率,为中药道地性研究提供了分子水平的生物学依据。

2.1.2 中药材真伪及纯度鉴定 随着人们生活水平的提高,保健意识越来越强,植物药品从而也得到重视,所以中药市场尤其是一些珍贵药材出现了一些“鱼目混珠”现象。传统的中药材鉴别方法主要依据外观形状特征,人们依赖多年的经验积累,利用感官和简易方法对药材进行鉴别。随着分子生物学技术的发展,尤其是各种分子标记的应用,不仅可以对药材整体进行鉴定,而且还可以对其粉末进行真伪、纯度等方面的鉴定。并且采用 DNA 分子遗传标记技术鉴定,取样量少,避免了贵重药品的损耗,即使从植物生物标本上直接取样也不会造成标本整体的破坏^[12]。

杨美华等^[13]对大贵从 64 条引物中筛选的 4 条引物进行 RAPD 扩增,证实它们不仅能在分子水平上区别大贵的真伪品,而且能对正品大贵的 3 个种进行区分。Cheng 等用 RAPD 技术从复方中药制剂玉屏风散中检出黄芪、白术、防风 3 个组分的 DNA 片段,使成药的真伪分子鉴定成为可能。此外还可以利用分子标记对中药材的种子纯度及雌雄进行鉴定,从而保证药材的质量。

2.2 分子标记在濒危药用植物保护中的应用

在 1992 年公布的《中国植物红皮书》中,在所收录的 398 种濒危植物中,药用植物达 168 种,占 42% 还多。这是因为,一方面,由于我国人口基数比较大,对中药材需求方面的增加很迅速;另一方面,随着中医科技的走向世界,以植物药材为主的中药产品的出口逐年增加,加剧了中药稀、缺资源的供需紧张关系,因此如何科学地规划、保护中药资源已经成为迫在眉睫的问题了。应用 DNA 分子标记技术可以分析药材濒危的原因,确定其分类地位和生态型,以及在确定重点保护地点和范围等问题中都可以起到理论指导意义。崔光红等^[14]对荒漠肉苁蓉 (*Cistanche deserticola*) 和管花肉苁蓉 (*Cistanche tubulosa*) 进行群体遗传多样性研究,发现荒漠肉苁蓉的遗传多样性明显高于管花肉苁蓉,并且已经分化为内蒙和新疆两个生态型,对于管花肉苁蓉由于其遗传多样性主要来源于居群内,所以应该以遗传多样性大的居群作

为优先保护对象,建议将新疆民丰的安迪尔和于田的大河沿列为管花肉苁蓉的自然保护地。

3 药用植物遗传转化

药用植物遗传转化研究起步较晚,并且我们应用的药用植物的有效成分是植物的次生代谢产物,而不像我们主要应用其碳水化合物等代谢产物的作物,所以针对药用植物的遗传转化研究,主要集中在提高有效成分含量上,如利用控制有效成分的关键酶转基因技术培育优良品种;诱导发状根培育高产细胞等。另外有一部分也集中在通过转基因改变药用植物农艺性状,达到抗逆,使得逆境不能或尽量小地影响其有效成分的充分产生。至今为止药用植物遗传转化也已经取得了很好的成绩,如已获得转基因紫草和人参植株,并已有规模^[15]。

总之,随着药用植物越来越受到人们的重视,在分子生物学日新月异的今天,针对药用植物在开发利用中出现的资源紧缺、真伪难辨、珍稀品种的濒危等现象,研究者有更多的、新的、更精确的手段来解决这些问题。其中一些有效成分代谢途径关键酶的发现甚至可以利用普通植物来生产这些有效成分。所以药用植物分子生物学研究任重道远,并且有很广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 朱平,王伟,程克穆. 药用植物功能基因[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 3-8.
- [2] 程克穆,朱平,程克穆. 植物细胞色素 P450 基因的异源表达系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 32-37.
- [3] Hang K X, Hang Q L, Wüding M R, et al. Overproduction in *Esche-*

richia coli of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the Taxol biosynthetic pathway[J]. Protein Expr Purif. 1998, 13(1): 90-96.

[4] Hang Q, Reesner C A, Croreau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol[J]. Bioorg Med Chem. 2001, 9(9): 2237-2242.

[5] 王伟,朱平,程克穆. 药用植物基因组及 EST 研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 1-5.

[6] 肖复明,熊彩云,刘江毅. 分子标记技术与物种多样性保护[J]. 江西林业科技, 2002, (1): 25-28.

[7] 立新等. 田间灌溉用电系统对 SSR 标记多态性的影响[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 42-48.

[8] 黄璐琦,肖光红,陈美兰,等. 中药对 GAP 实施的复杂系统论——中药药材质量资源的现状、问题及方向[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 481-483.

[9] 孙坤,张辉,陈效,等. 应用 DNA 分子遗传标记研究药用植物道地性的进展[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2003, 39(3): 100-103.

[10] 陈永久,王文,杨斌雄,等. 冬虫夏草随机扩增多态 DNA 及其遗传分化[J]. 遗传学报, 1997, 24(5): 410-416.

[11] 杜胜,马小军,李学东. 半夏不同种质资源 AFLP 指纹图谱分析及其应用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 30-32.

[12] 肖小河,刘峰群,贺承山,等. 中药 DNA 分子标记鉴定研究进展[J]. 中草药, 2000, 31(8): 561-564.

[13] 杨美华,张大明,刘德全. 正品和伪品大黄的 RAPD 指纹图谱鉴定研究[J]. 中草药, 2003, 34(6): 557-560.

[14] 崔光红,陈敏,黄璐琦,等. 药用肉苁蓉的遗传多样性 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(8): 727-730.

[15] 周坤强. 分子生物学与中药开发[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000. 184.

(内蒙古大学生命科学学院生物工程中心,呼和浩特 010021)

冬春季如何调整棚室番茄植株

抓好棚室番茄植株调整,是冬春季种植棚室番茄成功和获得高产、优质、高效的关键措施。其技术如下:

1 搭架。一般在初花期前后较适宜,过迟不便操作,易损伤茎叶、碰掉花果;架材,可用竹竿、树枝、棉杆或吊绳,长度一般 0.7~1.5 m;搭架形式:一是简易支架。在每植株旁直插或斜插一根短架材,将植株绑地或倚靠在架材上,此法适宜高密植、较矮小或早摘顶番茄栽培;二是“人”字架。手在小行两边的架材成对交叉在上部或顶部,扎好呈“人”字形;三是四角架。将小行两边的两两成对交叉,上部扎在一起;四是绳子架。用固定在高处垂下的绳子替代架材牵引植株直立。

2 绑蔓。一般在搭架后即进行;材料,可用麻丝、棕丝、塑料绳等;方法,每隔 2~3 叶绑一道,使茎杆和架材间形成“8”字形,不能将花序绑在架材上,以防影响果实生长。

3 整枝。可采用以下 3 种方式,一是单杆整枝。即只留主杆,将所有侧枝陆续摘除,此方式适于早熟密植和无限生长类型;二是双杆整枝。

除主杆外,再留紧靠第一花序下部的一根强侧枝,其它侧枝全部摘除,此适于早中熟和中熟品种;三是一杆半整枝。先采用双杆整枝,待侧枝着生 1~2 个花序后即摘心,此法适于自封顶品种。

4 打杈摘心。打杈有 2 种方法,一是将杈枝与主茎连接处推断;二是在侧枝第二叶与第三叶之间剪断。打杈时间,一般以杈枝 6~7 cm 为宜。摘心,即将植株的生长点打掉。方法:摘时在顶部花序上方留 2~3 片叶。打杈摘心都应在晴天 10~12 时进行。

5 疏花疏果。应尽早摘掉畸形花,并在坐果后及时疏去畸形果、太小的果实及同一花序上的剩余花蕾,一般大果型品种每个花穗留 2~3 个果,中等果型留 3~4 个果。

6 去除老叶。在番茄生长中后期,植株基部老叶开始衰老、黄化并干枯,应及时去除,以节省养分,利于通风透光,并防病菌传播与扩散等。

