维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：1007－3213（2006）01－0065－04

马兜铃的组织培养与植株再生

杨雪芹， 曾庆平
（广州中医药大学热带医学研究所，广州 510405）

摘要：【目的】探讨马兜铃经组织培养再生植株的条件。【方法】以马兜铃叶片作为外植体，以1/2MS、MS和改良MS培养基为基本培养基，在这些基本培养基上分别添加相应的植物激素而成为诱导马兜铃愈伤组织的培养基，观察：①3种基本培养基对诱导马兜铃愈伤组织的优劣；②不同pH值环境对诱导马兜铃愈伤组织的影响；③在相同的基本培养基中分别或同时加入不同种和不同量的植物激素（包括细胞分裂素KT或6-BA和生长激素NAA）后，对诱导马兜铃愈伤组织的影响。【结果】①在3种基本培养基中加入相同的植物激素（0.1 mg/L的KT和0.2 mg/L的NAA）后，MS和改良MS培养基均能诱导大量的愈伤组织，而1/2MS培养基则未能诱导；②相同的培养基（改良MS培养基加入0.1 mg/L的KT和0.2 mg/L的NAA）分别置于pH＝5.8、pH＝7.0、pH＝8.0的环境中时，后两者均能诱导大量的愈伤组织，而前者则只能诱导很少量的愈伤组织；③在相同的基本培养基（改良MS培养基）中分别单独加入细胞分裂素和单独加入生长激素，前者未见诱导出愈伤组织，而后者能诱导出来；将不同种和不同量的植物激素组成各种组合加入到相同的基本培养基（改良MS培养基）中，所形成的各种培养基对诱导马兜铃愈伤组织的影响观察显示，加入生长激素过多时，细胞分裂过快，导致愈伤组织松散而不利于芽的分化，加入过少时愈伤组织诱导率不高；最佳的培养基组合是在改良MS培养基中加入1 mg/L KT、0.5 mg/L NAA的培养基。【结论】以MS或改良MS为基本培养基，并在此基础上添加1 mg/L的KT和0.5 mg/L的NAA组成诱导愈伤组织的培养基，在pH＝7.0～8.0的碱性环境下培养，是马兜铃经组织培养能较好地诱导愈伤组织的条件。

关键词：马兜铃； 中药培育
中图分类号：S567 **文献标识码：**A

马兜铃为马兜铃科马兜铃属植物，它含一种具有肾毒性的物质马兜铃酸，同时这种物质也存在于许多有药用价值的植物中[1]。如果可以培育出不含马兜铃酸的新型植物，就可以发掘出马兜铃酸类中药的潜在药用价值，而更重要的是可将它作为改造其他有毒中药的模式系统。在基因工程中可以通过基因敲除等技术去除有毒成分的合成基因或改变代谢途径阻止有毒物质的合成[2]。马兜铃的组织培养获得再生植株这一技术为在马兜铃酸类植物中进行基因改造提供必要的技术支持。本文试图探讨马兜铃组织培养诱导愈伤组织的条件。

1 材料与方法

1.1 植物 马兜铃（*Aristolochia contorta* Bunge）来源于广州中医药大学药圃。取马兜铃嫩叶先用香皂水浸泡去污5～7 min，然后自来水冲洗干净；在超净工作台上，再用12.5 mol/L的乙醇消毒30 s，倒去乙醇，最后用0.05 g/mL的升汞消毒10～18 min，用无菌水冲洗8～10次。

1.2 植物激素 6-糠氨基嘌呤（KT）为上海化学试剂公司产品；腺素（Ad）为上海丽珠东风生物技术有限公司产品；6-苄氨基嘌呤（6-BA）为新华活性材料研究所产品；α-萘乙酸（NAA）为上海曹杨第二中学化工厂产品。

1.3 培养基[3] 基本培养基分别为1/2MS、MS和改良MS培养基（其中蔗糖改为20 g/L，NaH_2PO_4为170 mg/L），试验中根据具体要求在基本培养基中添加不同的植物激素，pH值为5.5～8.0。

1.4 培养 愈伤组织的诱导为暗培养，培养温度为(25±1)℃；根以及芽的分化为每天光照16 h，光照强度为3 000 lx（勒克斯），培养温度为（25±1)℃。

2 结果

2.1 不同培养基对外植体诱导培养的影响

在1/2MS培养基、MS培养基和改良MS培养基中同时分别加入0.1 mg/L KT和0.2 mg/L NAA，结果

收稿日期：2005－05－16
作者简介：杨雪芹（1980－ ），女，实习研究员
基金项目：国家自然科学基金资助新技术探索项目（编号：30271591）

维普资讯 http://www.cqvip.com

显示在pH为7.5的环境下培养10 d后，外植体在1/2MS培养基上未能诱导出愈伤组织，而在MS培养基和改良MS培养基上则能诱导出大量愈伤组织（见表1）。

2.2 pH值对外植体诱导培养的影响 选用改良MS培养基加0.1 mg/L的细胞分裂素KT和0.2 mg/L的生长激素NAA，马兜铃在酸性环境下诱导出愈伤组织少，而在碱性环境下诱导出愈伤组织多、快（见表2）。

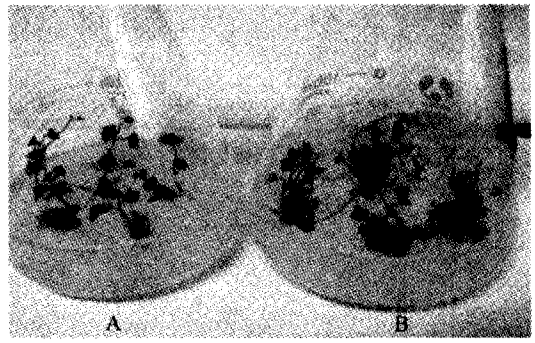
2.3 不同植物激素及其不同组合对外植体诱导培养的影响 在改良MS培养基中分别添加不同类型的植物激素，结果显示，单独添加细胞分裂素的培养基上（如6-BA、KT、6-BA + KT）未能长出愈伤组织，而在单独添加生长激素NAA或同时添加两种激素的培养基上均能长出愈伤组织。说明生长激素在诱导外植体愈伤组织时起着重要的作用。

进一步观察在改良MS培养基中分别加入不同种类和不同量的细胞分裂素，结果显示当生长激素用量过多时，出现细胞分裂生长过快，使得愈伤组织变得松散而不利于芽的分化。细胞分裂素用量少时，愈伤组织的诱导率不高，而以在改良MS培养基中添加1 mg/L的KT和0.5 mg/L的NAA所诱导的愈伤组织最多（见表3和表4）。

2.4 不同激素组合对芽分化的影响 以改良MS培养基分别添加0.5 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA + 2 mg/L Ad、0.5 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA + 2 mg/L Ad、1 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA + 2 mg/L Ad均可诱导60%分化芽，而添加1 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA + 2 mg/L Ad时可诱导100%分化芽。结果表明：细胞分裂素KT用量低时，芽的分化效果不理想；生长素用量大时，对芽分化反而有抑制作用。而添加1 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA + 2 mg/L Ad者芽分化效果较理想（见图1）。

图1 愈伤组织的分化芽
Figure 1 Formation of differentiated buds from ACB calluses

2.5 不同激素组合对芽增殖的影响 将分化出的芽转移到芽增殖培养基中培养15 d，在添加0.02 mg/L NAA、2 mg/L Ad的改良MS培养基中，当细胞分裂素KT的用量在0.3 ~ 1 mg/L时，丛生芽的诱导率为80% ~ 100%，其中以0.7 mg/L KT的诱导率最高；在添加0.5 mg/L NAA、2 mg/L Ad的改良MS培养基中，当KT用量在3 ~ 10 mg/L时，丛生芽的诱导率为20% ~ 40%，最大只有40%，长芽培养20 d增殖情况见图2。以1/2MS培养基添加0.2 mg/L NAA的芽生根培养情况见图3。



A、B分别是在添加5 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 2 mg/L Ad和0.7 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA + 2 mg/L Ad的改良MS培养基上培养20 d芽的增殖情况

图2 长芽培养
Figure 2 Growth of buds

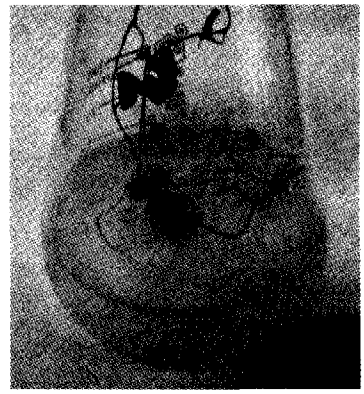


图3 生根培养
Figure 3 Growth of roots

表1 不同基本培养基对外植体诱导培养的影响
Table 1 Influence of different kinds of basic medium on ACB calluses induction

组别	愈伤组织
1/2MS	无
MS	大量
改良MS	大量

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 不同pH值对马兜铃外植体诱导培养的影响

Table 2 Influence of pH value on ACB calluses induction

组别	愈伤组织	
	$t=6$ d	$t=10$ d
pH=5.8	无	少
pH=7.0	少	多
pH=8.0	少	多

表3 不同植物激素组合作用对诱导愈伤组织的影响

Table 3 Influence of different concentrations of KT and NAA on ACB calluses induction

组别	愈伤组织情况	
	$t=8$ d	$t=13$ d
改良MS加①	有愈伤组织	30%有愈伤组织但松散
改良MS加②	有愈伤组织	60%有愈伤组织但松散
改良MS加③	有愈伤组织	50%有愈伤组织且较多
改良MS加④	有愈伤组织	60%有愈伤组织且较多

注：①：添加0.05 mg/L 6-BA和1 mg/L NAA；②：添加0.01 mg/L KT和1 mg/L NAA；③：添加0.1 mg/L KT、1 mg/L 6-BA和0.2 mg/L NAA；④：添加0.3 mg/L KT、1 mg/L 6-BA和0.2 mg/L NAA

表4 加入不同量的KT和NAA培养10 d后诱导的愈伤组织比例

Table 4 Comparison of ACB calluses induction rate in modified MS medium with different concentrations of KT and NAA added after 10-day culture

组别	$P_{愈伤组织}$/%
改良MS加①	30
改良MS加②	80
改良MS加③	100

注：①：添加0.1 mg/L KT和0.05 mg/L NAA；②：添加0.5 mg/L KT和0.1 mg/L NAA；③：添加1 mg/L KT和0.5 mg/L NAA

3 讨论

本实验结果表明，以马兜铃嫩叶为外植体，诱导愈伤组织和丛生芽，基础培养基的选择以MS和改良MS培养基为好，在环境要求上pH=7.0、pH=8.0均可诱导较多的愈伤组织，而pH=5.8只能诱导出少量，说明以碱性环境为好，与文献[3]认为培养植物材料大多数要求的碱性环境相似。本研究显示，在培养基中单纯添加细胞分裂素则未能诱导出愈伤组织，而单纯添加生长激素NAA则可诱导，说明在愈伤组织的诱导中，细胞生长素NAA起到很大的作用，主要是因为它能促进细胞生长、细胞分裂和诱导受伤的组织表面一至数层细胞恢复分裂能力。通常使用较高浓度的生长素，以诱导脱分化和促进愈伤组织生长[4]。本研究还显示在改良MS培养基基础上添加1 mg/L KT和0.5 mg/L NAA的培养基诱导效果最好。在诱导的第13天转到添加1 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA + 2 mg/L Ad的培养基中，则5 d后可分化出根状茎，再过5 d即可由根状茎长出芽。在添加0.3～1 mg/L KT、0.2 mg/L NAA和2 mg/L Ad的培养基中，丛生芽的增殖效果最好。

参考文献：

[1] 杨瑞仪，曾庆平．马兜铃酪氨酸脱羧酶基因克隆、测序及同源性分析[J]．广州中医药大学学报，2005，22(2)：152.

[2] 冯丽玲，曾庆平．青蒿酯烯合酶基因及其cDNA的克隆与测序[J]．广州中医药大学学报，2004，21(5)：387

[3] 李浚明．植物组织培养教程[M]．北京：中国农业大学出版社，1996：41.

[4] 谭文澄，戴策刚．观赏植物组织培养技术[M]．中国林业出版社，1991：61，70，116.

Tissue Culture and Plant Regeneration of *Aristolochia contorta* Bge

YANG Xueqin, *ZENG Qingping*

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract 【Objective】To explore the culture conditions of inducing callus from tissue of *Aristolochia contorta* Bge (ACB). 【Methods】The leaves of ACB were used as the explants. Basic medium (including 1/2 MS medium, MS medium and modified MS medium) containing corresponding phyto-hormones was applied for the induction of ACB callus. The influences of different culture conditions such as three kinds of basic medium, different pH values and addition of different kinds of phyto-hormones at different concentrations into the basic medium respectively or simultaneously, on the

维普资讯 http://www.cqvip.com

callus induction of ACB were observed. 【Results】(1) After the three kinds of basic medium were added with the phyto-hormones of 0.1mg/L kinetin (KT) and 0.2mg/L α-naphthalene acetic acid (NAA), a large amount of ACB calluses were induced in the MS medium and modified MS medium, while ACB calluses did not occur in the 1/2 MS medium. (2) When the pH value of the culture medium composed of modified MS medium and 0.1mg/L KT and 0.2mg/L NAA was at 5.8, 7.0 and 8.0, a large amount of ACB calluses were induced in the medium with pH value being 7.0 and 8.0 while a few calluses occurred in the medium with pH value being 5.8. (3) ACB calluses were induced in modified MS medium with NAA added , but calluses did not occur in modified MS medium with KT added. When the modified MS medium was added with different kinds of phyto-hormones at different concentrations, ACB calluses were loose in the medium with high-concentration NAA and this did not benefit to the differentiation of buds for too fast cell division, and the callus induction rate was low in the medium with low-concentration NAA. The optimized culture medium was modified MS medium with 1mg/L KT and 0.5mg/L NAA added. 【Conclusion】The optimum culture conditions of inducing callus from ACB tissues are: MS medium or modified MS medium with 1mg/L KT and 0.5mg/L NAA added being the culture medium, and pH value being 7.0~8.0.

Key words: *ARISTOLOCHIA CONTORTA* BGE ; MEDICINAL HERB ANIMAL RAISING

(Continued from page 64)

Construction and Analysis of cDNA Expression Library from the Leaves of *Dendrobium candidum* Wall. *ex* Lindl.

WEI Xiaoyong

(College of Basic Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: 【Objective】cDNA expression libraries from the leaves of *Dendrobium candidum* Wall. *ex* lindl. were constructed to supply evidence for the clones of the full-length genes involved in the biosynthesis of bioactive compounds. 【Methods】Total RNA was isolated and purified from tender leaves of 4-year-growing *Dendrobium candidum* by using Trizol single-step method. cDNA was synthesized by long distance polymerase chain reaction (LD-PCR) and then was connected to λTriplEX2. After that, the recombinant bacteriophages were packaged and cDNA library of *Dendrobium candidum* was constructed. The titer of cDNA library was expressed as the number of phage formation unit (pfu) per milliliter and the inserted fragment was identified by PCR amplification. 【Results】cDNA expression libraries from the leaves of *Dendrobium candidum* were constructed successfully. The titer of the original library was 4.3×10^5 pfu/mL and 3.1×10^5 clones in total, with a recombinant rate of 97.6%. The amplified titer was 6.8×10^9pfu/mL. PCR amplification suggested that the inserted cDNA fragments ranged from 0.5 to 2.0 kb, mostly from 1.2 to 1.7 kb. 【Conclusion】The constructed *Dendrobium candidum* cDNA library has a higher titer, a higher recombinant percentage and larger inserted fragments.

Key words: *DENDROBIUM CANDIDUM* WALL. *EX* LINDL. /chemistry;
DENDROBINE /biosynthesis; GENE LIBRARY