

征信息成分的吸收峰,使得其 NIRS图非常相似,从图 1可以看出,各样品特征信息隐藏于光谱中,不能简单以峰位、峰形鉴别法进行分类,必须经过数学处理,提取到特征信息进行分类鉴别

图 2树状聚类图表明,一个产地的多棵同种药材均先自聚一类,说明 NIRDRS中带有地域性特征,然后再与距离相近的异种生药聚类。3个不同产地的羊蹄最先与巴天酸模归为一类。其中巴天酸模较南京羊蹄更为接近另两个产地的羊蹄,除说明了生长环境对植物的 NIRS有一定的影响外,也从光谱分析的方面说明了巴天酸模与羊蹄化学成分相似、亲缘关系相近,民间把二者混用不无道理。齿果酸模、红丝酸模、酸模与羊蹄的相似程度依次递减并自成一类,说明了不同种间的差异还是很明显的。但 4种羊蹄类生药具有更大的相似性;非线性映射图上的分布情况与聚类结果一致

通过聚类与判别分析可以看出,聚类分析能够通过距离的大小,准确地把同一产地的样品自聚一类,再与同种生药聚类,最后与不同种生药相聚;而

判别分析更直观,可直接从映射图中看出各不同种生药经过数学处理后,反映在特征向量上的差异。两种方法所得结果与植物分类学上的分类一致。

综上所述,我们采用 NIRDRS技术在酸模属植物分类中的应用进行了尝试,通过非入侵方式获得植物内在成分信息,应用聚类分析法和判别分析法进行分类,结果准确可信。表明本方法适用于酸模属植物的分类,能快速准确地鉴别羊蹄类生药。也显示了将 NIRS技术应用于植物类中药鉴别分析及产地判别的良好前景。

参考文献:

- [1] 朱有昌. 东北药用植物 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [2] 谢宗万. 全国中草药汇编 [M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 刘国林, 蔡金娜, 李伟, 等. 近红外光谱技术在中药蛇床子分类中的应用 [J]. 计算机与应用化学, 2000, 17(2): 109-110.
- [4] 吴拥军, 李伟, 相秉仁, 等. 光纤近红外漫反射光谱技术在前胡植物分类中的应用探讨 [J]. 计算机与应用化学, 2000, 17(2): 111-112.
- [5] 何丽一, 陈碧珠, 肖培根. 酸模属中草药的调查鉴定与成分分析 [J]. 药学学报, 1981, 16(4): 289-293.

基因测序技术在中药质量研究中的应用 (II) —— 山药基原的 DNA 测序鉴别

刘玉萍¹, 何报作², 曹晖¹

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 广西中医学院药学院, 广西南宁 530001)

摘要: 目的 分析正品山药 *Dioscorea polystachya* Turcz. 与地方习用品广山药 *D. persimilis* Prain et Burkill 土山药 *D. japonica* Thunb. 和方山药 *D. alata* L. 的核基因组 18S rRNA 基因序列, 为山药基原鉴别及品质评价提供分子依据。方法 采用 PCR 直接测序技术测定山药及其地方习用品的 18S rRNA 基因核苷酸序列并作序列同源性分析。结果 山药、广山药和土山药的 18S rRNA 序列长度均为 1 810 bp, 而方山药为 1 807 bp。根据排序比较, 广山药与正品山药的 18S rRNA 序列完全相同, 而与土山药和方山药的序列同源性分别为 99.89% 和 97.5%。结论 DNA 测序技术可成为山药基原鉴定准确而有效的分子方法。

关键词: 山药; 18S rRNA 基因; DNA 测序; 基原鉴别

中图分类号: R282.71 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)11-1026-05

Application of gene technology in quality control of Chinese materia medica II . Identification of Chinese *Rhizoma Dioscoreae* by DNA sequencing

LIU Yu-ping¹, HE Bao-zuo², CAO Hui¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of TCM, Beijing 100700, China; 2. Department of Pharmacy, Guangxi College of TCM, Nanning Guangxi 530001, China)

Abstract Object To distinguish the genuine *Dioscorea polystachya* Turcz. from other species of *Dioscorea* L. such as *D. persimilis* Prain et Burkill, *D. japonica* Thunb., and *D. alata* L., conventionally

收稿日期: 2001-04-09

作者简介: 刘玉萍 (1963-), 女, 山西长治人, 副研究员, 药学博士。1983年毕业于北京中医药大学中药系, 1987-1995年先后在日本国立富山医科药科大学获得药理学硕士、药学博士及博士后, 1995年回国在中国中医研究院中药研究所生药室工作, 从事中药质量分析及分子鉴定研究开发。Tel: 010-64014411 转 2952 Fax: 010-64013996

used in some localities by sequencing their nuclear ribosomal RNA subunit (18S rRNA), to provide molecular evidences for the quality control of drugs of *Dioscorea* L. **Methods** By direct PCR sequencing to detect the homology of 18S rRNA sequence of different species of *Dioscorea* L. **Results** The 18S rRNA gene sequence of genuine *D. polystachya*, *D. persimilis* and *D. japonica* showed identical length of 1810 bp, whereas that of *D. alata* was 1807 bp. Multiple sequence alignment of 18S rRNA gene showed that the homology was identical between *D. persimilis* and the genuine *D. polystachya*; but a difference of 99.8% with *D. japonica* and 97.51% with *D. alata*. **Conclusion** DNA sequencing can provide an accurate and reliable mean for the identification of the origin and genuineness of *Dioscorea* L.

Key words *Rhizoma Dioscoreae*; 18S rRNA gene; DNA sequencing; origin identification

随着 DNA 分析技术的发展, PCR 测序方法已经应用到了中药品种鉴别领域^[1]。早期 rRNA 序列分析用于中药材鉴定的工作主要在小分子方面,如植物核基因组 5S rRNA, 基因间隔区 (ISR), 一般长度在 300~600 碱基^[2~5], 动物线粒体基因组 12S rRNA, 基因长度为 300~400 碱基^[6~9]。但是核苷酸测序技术的不断完善, 尤其 PCR 产物直接测序技术和全自动测序仪的开发成功, 对大分子 rRNA 包括小亚基 (如 16S~18S, 约 1700~1900 碱基) 和大亚基 (如 25S~28S, 约 2000~5000 碱基) 的结构测定取得了突破性进展。由于它们分子量大, 包含的信息量较 5S 12S rRNA 多得多, 另一方面, 大分子 rRNA 还有分区特性, 即分高度保守区和高变区, 利用其保守区的已知保守序列设计 1 对通用引物就可以同时测定不同进化等级各种生物类群的大分子 rRNA 序列。18S rRNA 是唯一具有信息分子和功能分子两种作用的编码核糖体 DNA 的基因, 为高重复序列, 约 800~10000 拷贝数, 以连续排列方式存在细胞内。同时 18S rRNA 基因序列结构、功能十分保守, 若它们的序列存在变异就能成为一种很好的 DNA 标记, 用于中药材的分子鉴别。目前 18S 25S rRNA 基因测序技术已被用于人参、三七、塞隆骨、杜仲、半夏的基原鉴别^[10~14]。

《中国药典》(2000 年版) 收载山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea polystachya* Turcz. (= *D. opposita* Thunb., *D. batatas* Decais.) 的块茎^[15,16]。目前广西大面积栽种和主要经营的山药是褐苞薯蓣 *D. persimilis* Prain et Burkill 的块茎, 药材名“广山药”, 在广西栽培和使用已有 200 余年, 现已形成大宗商品, 年产量超过 100 万千克, 正式收入《广西中药材标准》^[17]。此外, 广西地区还有将日本薯蓣 *D. japonica* Thunb. (土山药)、参薯 *D. alata* L. (方山药) 就地取材加工后作“山药”代用品入药^[18]。本文报道采用 PCR 直接测序技术对山药及其 3 种地方习用品广山药、土山药和方山药的 18S rRNA 基因

核苷酸序列进行测序分析研究, 以期通过探讨正品与这些习用品间的 DNA 序列同源关系, 为山药基原的准确鉴定及其品质评价提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 样品: 本实验所用山药商品为 1999-05 购自河南文县, 为薯蓣 *Dioscorea polystachya* 的块茎; 广山药商品 1998-12 购自广西容县杨梅乡, 为褐苞薯蓣 *D. persimilis* 块茎; 日本薯蓣 *D. japonica* 和参薯 *D. alata* 系 1999-08 采自广西药用植物园, 新鲜叶片, 学名经作者鉴定。

1.2 试剂与仪器: 2× CTAB 提取缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA; 2% 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB); 0.34% 2-巯基乙醇; 1% PVP (MW 40000)。

× CTAB 沉淀缓冲液: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 10 mmol/L EDTA; 1% CTAB

10% CTAB 溶液: 10% CTAB; 0.7% mol/L NaCl

TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 1 mmol/L EDTA

× TBE 电泳缓冲液: 89 mmol/L Tris-硼酸盐; 89 mmol/L 硼酸; 2 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

× Taq 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶 (perkin-Elmer/Cetus 公司)。

dNTPs dTAP, dTGP, dTCP, dTTP 各 0.2 mmol/L (Perkin-Elmer/Cetus 公司)

HH-S214 型电热恒温水浴槽 (江苏医疗器械厂), 5417R 型离心机与 Master Cycler Gradient 型 PCR 仪 (Eppendorf 公司), 电泳仪 (Bio-Rad 公司), ABI 377 型 DNA 自动测序仪 (Applied Biosystems 公司)。

1.3 引物设计: 18S rRNA 基因 PCR 扩增的通用引物据 Sogin 设计的序列^[19]合成。

18SF 5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAG
T-3'

18SR 5'-CTGATCCTTCTGCAGGTTTAC
CTAC-3'

由于18S rRNA基因长度为1.8 kb左右,利用单个引物进行一次PCR测序反应无法测得此区段全部序列,因此我们还据White等的设计^[20]合成了3对测序引物18SF1, 18SR1, 18SF2, 18SR2和18SF3, 18SR3进行双向测序。

1.4 总DNA制备:根据作者摸索的干燥药材CTAB微量提取方法^[21],取100~130 mg样本细粉加入6倍预热至56℃的×CTAB提取缓冲液,于56℃水浴槽中保温反应30 min,加入等量氯仿-异戊醇(24:1)于离心机上以14 000 g离心10 min,取上清液加0.1倍10% CTAB溶液,室温下放置10 min,再用氯仿-异戊醇提取1次。取上清液加等量×CTAB沉淀缓冲液于室温下过夜,以13 000 g离心30 min,倾去上清液,粗DNA沉淀用65%和85%乙醇各洗两次,然后于60℃烤箱中干燥30 min,加入50 μL TE缓冲液溶解DNA,存于-20℃冰箱备用。

1.5 PCR扩增反应:取50~100 ng DNA作模板,加入dNTPs, 0.25 μmol/L引物,1.5 U Taq DNA聚合酶(Perkin-Elmer/Cetus公司)及×Taq缓冲液使最终反应体积为50 μL,置于PCR仪,按下述参数进行1个PCR循环:94℃, 3 min; 然后按下述参数进行35个PCR循环:94℃, 1 min; 60℃, 1 min; 72℃, 2 min。最后按下述参数进行1个PCR循环:72℃, 30 min。取PCR反应液5 μL于1.0%琼脂糖凝胶上用0.5×TBE电泳缓冲液于电泳仪中电泳,EB染色,UV灯光下照相。DNA长度与1 kb DNA ladder分子标记物(Pharmacia公司)比较。

1.6 测序反应:PCR扩增产物经QIAquick Purification试剂盒(Qiagen公司)按其操作手册进行纯化后直接用于测序循环反应。采用双脱氧末端终止法按Thermo Sequenase循环测序试剂盒(Amersham Life Science公司)实验指南进行测序。测序反应分4管,每管反应体积为5.0 μL,内含3.0 μL纯化的PCR产物,0.2 μL测序引物(0.2 pmol/L),1.8 μL d/ddNTP混合试剂,循环测序反应条件:95℃, 5 min, 1个循环; 95℃, 30 s; 50℃, 30 s; 70℃, 1 min, 40个循环。测序反应结束后加3 μL测序终止缓冲液,离心混匀。取1 μL测序反应液上样于4%聚丙烯酰胺-7 mmol/L尿素凝胶电泳板于测序仪

进行测序。

1.7 序列数据分析:所测单链序列经计算机阅读并人工校阅后,采用AutoAssembler程序(1.3.0版本, Applied Biosystems公司)进行DNA双向排序,并以手工适当调整以减少空位(gap)数目。排好的序列用PAUP软件(4.0版本, Sinauer Associates公司)进行DNA序列同源性比较,并以UPGMA法构建系统分支树。

2 结果与讨论

在本研究中,采用CTAB微量提取法分离山药及其3种习用品总DNA,无论新鲜叶片或干燥根茎药材均能得到23.1 kb的DNA(未发表数据),利用18S rRNA基因通用引物进行PCR扩增,获得预期1.8 kb的双链产物(图1)。经过测序发现,4种山药与习用品18S rRNA基因核苷酸序列中,山药、广山药与土山药的长度相同,均为1810 bp,而方山药为1807 bp。根据排序比较,山药与广山药两者序列完全相同,同源性为100%,而山药与土山药、方山药间的同源性分别为99.8%和97.51%(表1)。

表1 山药与3种习用品18S rRNA基因核苷酸序列同源性(右上角)和碱基变异位点数(左下角)

	%				
	1	2	3	4	5
1 山药 <i>Dioscorea polystachya</i>	-	100	99.89	97.51	94.40
2 广山药 <i>D. persimilis</i>	0	-	99.89	97.51	94.40
3 土山药 <i>D. japonica</i>	2	2	-	97.51	94.40
4 方山药 <i>D. alata</i>	45	45	45	-	96.23
5 黄独 <i>D. bulbifera</i> ^a	101	101	101	68	-

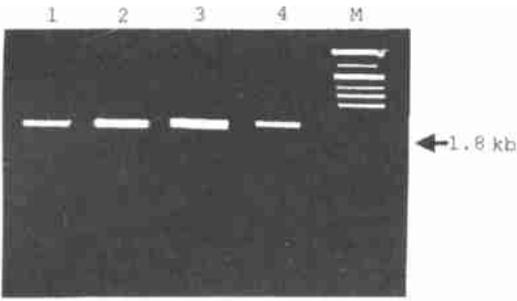
注: * 该种植物选作外类群,其18S rRNA基因序列来自国际基因库 GenBank(登录注册号 AF069203)。

据《中国植物志》记载,薯蓣 *Dioscorea polystachya*、褐苞薯蓣 *D. persimilis*、日本薯蓣 *D. japonica* 和参薯 *D. alata* 同属周生翅组 Sect. *Enantiophyllum* Uline^[16],在广西地区薯蓣与褐苞薯蓣两者具有相同的分布地域^[16, 18]。由于它们的植物形态变异极大,药材加工方法相同^[22, 23],而且《中国药典》中关于山药的药材性状及粉末显微鉴定与《广西中药材标准》中关于广山药的描述几乎一致^[15, 17],这使得山药与广山药在形态、组织上难以区别。长期以来,人们一致认为广山药的原植物是薯蓣 *D. polystachya*^[23],直到1996年经广西有关专家先后数次深入主产地调查、考证和原植物商品药材详细鉴定,确定其原植物是褐苞薯蓣 *D. persimilis*,并正式收入《广西中药材标准》^[17]。

然而,本实验所得18S rRNA序列证明薯蓣和褐苞薯蓣两者不存在核苷酸替代的变异位点,而薯

蕞与日本薯蕞 参薯间存在 2个和 45个碱基替代 (表 1,图 2)。而我们从国际基因库 GenBank检索

到同属基生翅组 Sect. *Opsophyton* Uline的黄独 *D. bulbifera* L. 18S rRNA序列长度为 1 724 bp^[24],通过排序比较发现,后者与基生翅组 4种植物间发生 68-101个碱基替代,同源性仅 94. 40%~ 96. 23% (表 1,图 2)。通过以 Kimura 双参数法作 UPGMA 分支分析,发现薯蕞和褐苞薯蕞两者的遗传距离 (D)为零,与日本薯蕞 D= 0. 000 5,先聚为一支 再与参薯 D= 0. 010 5,共组成一个基生翅组类群。而薯蕞与黄独间遗传距离相对较大 (D= 0. 025 3),后者形成另一个基生翅组外类群基支 (图 3),与形态学特征吻合。这提示保守的 rDNA 片断序列不仅可以分辨同属不同组植物,而且能区分同组不同种近缘植物。

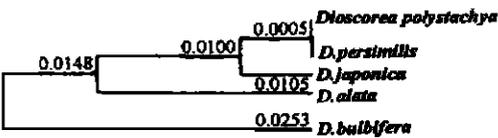


1. 山药 2. 广山药 3. 土山药 4. 方山药
M: 1 kb ladder 分子标记物
图 1 山药及其 3种习用品 18S rRNA 基因 PCR 扩增图谱

137	140	181	200	221	250	1007	1186	1706	1720	
ATGCC-CTA	AAACCCGACCTTGGGAGG	GGTCGATCCGGCTTGCCTGTACCGAT	C	G	GGTGGTTCGCCACT					<i>Dioscorea polystachya</i>
*****	*****	*****	*	*	*****					<i>D. persimilis</i>
*****	*****	*****	T	A	*****					<i>D. japonica</i>
...rTg**	**T*****T*****A**	**C*****C**T**T**	T	*	*C**T*****					<i>D. alata</i>
..*Tg	**T*****TCC**A**	**C**C*****CGT**CC**T**T**	T	*	**CG**T***-CGT*-					<i>D. bulbifera</i>

上方数字为自上游核苷酸位置,* 代表与薯蕞 *Dioscorea polystachya* 相同之碱基

图 2 薯蕞及其近缘植物 18S rRNA 基因部分片段序列同源性比较



分枝上数字代表遗传距离值 (D)

图 3 薯蕞及其近缘植物的 UPGMA 分支系统树

这些结果对广山药的基源究竟是种植物至少产生两个疑点,一是广山药的原植物是否是真正的褐苞薯蕞?据考证,广山药从清乾隆年间由野生引为家种的^[22],经过 200余年的栽培,形态发生了变异,很可能当时它的野生种就是薯蕞,而现在被订为褐苞薯蕞。二是广山药是否是正品山药的一个(栽培)变异类型?由于野生薯蕞很少开花结籽,人工授粉不易,因此山药栽种主要是依靠珠芽(零余子)无性繁殖^[25]。我们观察到广山药的栽培有类似的情况。许多研究证明,在单子叶植物中无融合生殖与细胞多倍体化 (polyploidization) 呈相关性^[26,27]。虽然无性繁殖阻碍了基因重组,对进化不利,但薯蕞是兼性无融合生殖,它能不时地扩大专性无融合生殖群体所代表的基因库。而植物的多倍体化不仅加强了无性繁殖的作用,并且加强了其生态适应的能力,从而扩大了分布范围。薯蕞在亚热带的广西与褐苞薯蕞存

在相同的自然分布,很可能褐苞薯蕞就是薯蕞种内的一个多倍体变异类型(栽培品种)。要进一步解决以上问题,需作深入的细胞学与分子系统学研究,如通过大分子 rRNA 高变区的 ITS 序列进行网状进化 (reticulate evolution) 分析。

参考文献:

- [1] Cao H, Liu Y P, Komatsu K, et al. DNA molecular profiling A new approach to quality control of Chinese drugs[J]. Chin J Integ Trad Western Med, 2000, 6(1): 71-75.
- [2] Mizukami H, Hao B S, Tanaka T. Nucleotide sequence of 5S-rRNA intergenic spacer region in *Angelica acutiloba* [J]. Natural Med, 1997, 51: 376-378.
- [3] Sugimoto N, Kiuchi F, Mikage M, et al. DNA profiling of *Acorus calamus* chemotypes differing in essential oil composition [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22: 481.
- [4] Cai Z H, Li P, Dong T T X, et al. Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis [J]. Planta Med, 1999, 65: 360-364.
- [5] Ma X Q, Duan J A, Zhu D Y, et al. Species identification of *Radix Astragali* (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA A spacer domain [J]. Phytochemistry, 2000, 54: 363-368.
- [6] 吴平,周开亚,张朝晖,等. 海马类药材的分子遗传标记鉴定研究 [J]. 药学报, 1998, 33(3): 226-233.
- [7] 吴平,周开亚,徐璐珊,等. 用聚合酶链反应产物直接测序技术鉴定中药材鳖甲 [J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(1): 28-30.
- [8] 吴平,周开亚,徐璐珊,等. 中药材龟甲的分子鉴定研究 [J]. 药学报, 1998, 33(4): 304-309.
- [9] 杨学干,王义权,周开亚,等. 中药材哈蟆油 PCR 鉴定的初步研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 166-170.
- [10] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA

- gene sequence for identification of three ginseng drugs[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(7): 765-769.
- [11] 曹晖,刘玉萍,伏见裕利,等.三七及其伪品的DNA测序鉴别[J].中药材,2001,(6): 398
- [12] 曹晖,刘玉萍,张绍来,等.塞隆骨原动物高原鼯鼠核基因18S rRNA序列测定与分析[J].中国中药杂志,2001,26(2): 90-94.
- [13] 陈月琴,屈良鹤,周惠,等.杜仲原植物25S rRNA 5'端序列分析及其分子识别[J].中国中药杂志,1998,23(12): 707-709.
- [14] 曹晖,刘玉萍,毕培曦,等.中药半夏的DNA分析与分子鉴别[A].中国药学会杂志编辑部.现代药物分析论坛[C].北京: 新华出版社,2001.
- [15] 中国药典[S].2000年版.一部.
- [16] Wu Z Y, Raven P H. Flora of China[M]. Vol. 24. Beijing: Science Press and St Louis Missouri Botanical Garden Press, 2000.
- [17] 黄燮才,韦家福,陆敏仪.广西中药材标准[S].第2册.南宁:广西壮族自治区卫生厅,1996.
- [18] 广西中医药研究所.广西药用植物名录[M].南宁:广西人民出版社,1986.
- [19] Sogin M L. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies[A]. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [20] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- [21] Cao H, But P P H, Shaw P C. Methodological studies on genomic DNA extraction and purification from plant drug materials[J]. J Chin Pharm Sci, 1998, 7: 130-136.
- [22] 叶强.广西多来源药材及混杂品种的调查及考证[M].南宁:广西科技出版社,1989.
- [23] 广西卫生厅.广西中药志[M].南宁:广西人民出版社,1959.
- [24] Hershkovitz M, Hahn W J, Zimmer E A. Ribosomal DNA sequences and plant systematics [OB/OL] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query?bd=GenBank>, 1998-7-26.
- [25] 赵冰.山药栽培新技术[M].北京:金盾出版社,1998.
- [26] 洪德元.植物细胞分类学[M].北京:科学出版社,1990.
- [27] 李竟雄,宋同明.植物细胞遗传学[M].北京:科学出版社,1993.

药用植物粉花绣线菊的组织培养的建立与快速繁殖研究

胡益明,甘烦远*,彭丽萍,郝小江

(中国科学院昆明植物所,云南昆明 650204)

摘要:目的 建立了粉花绣线菊 *Spiraea japonica* L. f. 愈伤培养系统和快速繁殖方法。方法 通过用 MS 6, 7-V, B₅ 等 3 种不同的培养基对粉花绣线菊植株的茎尖、嫩叶、叶柄等不同部位进行愈伤组织诱导和成苗诱导。结果 通过本研究,建立了愈伤培养系统,实现了快速繁殖。结论 MS 培养基诱导愈伤效果最好,在 MS+ 2, 4-D 2.0 mg/L+ KT 0.3 mg/L 培养基中,幼叶、茎尖、叶柄等外植体均能诱导出愈伤组织,其中以茎尖外植体诱导的效果最好;茎尖外植体在 MS+ 2 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA 能长出丛生苗,将丛生苗转入培养基 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA 可生根成小苗。

关键词: 粉花绣线菊;组织培养;快速繁殖

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)11-1030-04

Studies on establishment of calli culture for rapid propagation of *Spiraea japonica*

HU Yi-ming, GAN Fan-yuan, PENG Li-ping, HAO Xiao-jiang

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

Abstract Object To establish a calli culture system for the rapid propagation of *Spiraea japonica* L. f. **Methods** Callus and shoot induction were carried out on MS, 6, 7-V or B₅ media with different parts of the plant such as stem tip, tender leaves and petiole as explants. **Results** A calli culture system was established for the rapid propagation of *S. japonica*. **Conclusion** MS cultural medium was found to be most suitable for calli induction. MS with 2.0 mg/L 2,4-D+ 0.3 mg/L KT can induce calli when the explants were used for the induction, with stem tips being the most satisfactory explant. Clusters of seedlings can be induced on MS+ 2 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA and when these seedlings were transferred to 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA medium, root were developed to give young seedlings. -

Key words *Spiraea japonica* L. f.; callus tissue; rapid propagation

收稿日期: 2001-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(30070087)资助;中国科学院资源与生态环境研究重点项目(KZ952-31-108)经费资助

作者简介: 胡益明(1971-),男,湖北人,现为中国科学院昆明植物研究所硕博连读生,研究方向:中药重要成分的生物合成。E-mail: Hyiming@yaho.com

* 通讯联系人 Tel: 0871-5223111