

· 药材与资源 ·

黄连 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的克隆及序列分析

周嘉裕^{1,2}, 彭书明¹, 雷泞菲¹, 廖海², 陈放^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064 2. 西南交通大学药学院, 四川 峨眉 614202)

摘要:目的 克隆黄连 *Coptis chinensis* *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶 [(*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase] 基因并做序列分析。方法 采用 RT-PCR 方法, 以新鲜的黄连嫩叶 cDNA 为模板, 克隆出黄连 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的全部序列。结果 克隆到的基因 (命名为 CYP80B3) 全长为 1 680 bp, 编码一个 488 个氨基酸残基组成的多肽。其氨基酸序列与日本黄连、唐松草、罂粟和花菱草的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶的氨基酸序列同源性分别达 95%、82%、70%、68%。将得到的序列提交 Genbank, 序列号为 EF492879。通过与日本黄连的氨基酸序列比对, 具有相同功能区域, 因而可以参与 *N*-甲基乌药碱的 3' 位羟基化反应。结论 黄连 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的成功克隆为黄连植物中原小檗碱型苜基异喹啉类生物碱的基因工程等研究打下了良好的基础。

关键词: 黄连; *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)03-0419-05

Molecular cloning and sequence analysis of (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase gene in *Coptis chinensis*

ZHOU Ja-yu^{1,2}, PENG Shu-ming¹, LEI Ning-fei¹, LIAO Hai², CHEN Fang^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. College of Pharmacy, Southwest Jiaotong University, Emei 614202, China)

Abstract Objective To clone and sequence the cDNA encoding (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase from *Coptis chinensis*. **Methods** The cDNA, encoding (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase, was amplified by RT-PCR with cDNA library of tender leaf as the template. **Results** The full-length cDNA of (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase (named as CYP80B3) had 1 680 bp with an open reading frame encoding 488 amino acids of protein. The CYP80B3 had 95%, 82%, 70%, and 68% amino acid sequence homology to the sequence of (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase from *C. japonica*, *Thalictrum flavum*, *Eschscholtzia californica* and *Papaver somniferum*, respectively. The sequence was reported to the GenBank and coded as EF492879. Comparison of sequence with (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase from *C. japonica* showed CYP80B3 possessed the same functional regions involved with 3'-hydroxylation of (*S*)-*N*-methylcoclaurine. **Conclusion** The cDNA encoding CYP80B3 from *C. chinensis* was cloned and reported. This work underlays the first step for exploring the pathway of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis and for improving the content of benzylisoquinoline alkaloid in *C. chinensis*.

Key words *Coptis chinensis* Franch.; (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase; cloning; sequence analysis

N-甲基乌药碱-3'-羟化酶属于细胞色素 P450 酶系, 是苜基异喹啉类生物碱生物合成途径的关键酶, 它催化 *N*-甲基乌药碱转变为 3'-羟基-*N*-甲基乌药碱的羟基化反应 (图 1)^[1]。3'-羟基-*N*-甲基乌药碱是小檗碱、黄连碱和罂粟碱的合成前体, 经甲基化与环化反应后, 形成原小檗碱苜基异喹啉类生物碱的

基本骨架——金黄紫堇碱^[1]。目前已克隆了来自毛茛科的日本黄连 *Coptis japonica* Makino, 唐松草 *Thalictrum flavum* L. 和罂粟科的罂粟 *Papaver somniferum* L., 花菱草 *Eschscholtzia californica* Cham. 等多种植物的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因, 长度在 1 500~1 800 bp, 表达 5×10⁴ 范围的蛋白

* 收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (104151)

作者简介: 周嘉裕 (1976-), 女, 在读博士, 从事药用植物基因工程研究。

Tel (028) 86372508 E-mail: spinezhou@sohu.com

* 通讯作者: 陈放 Tel (028) 85412142 E-mail: fang-chen807@hotmail.com

质,其表达产物的氨基酸序列有不低于 60% 的同源性。

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 俗称味连,广泛种植于中国西南部海拔 1 000~ 1 500 m 区域,为我国传统中药,属毛茛科黄连属植物,具有抑菌、消炎、健胃和降压等作用,其主要活性成分为小檗碱和黄连碱

碱等原小檗碱型苄基异喹啉类生物碱^[2]。笔者以黄连为材料,采用 RT-PCR 技术克隆 *N*-甲基乌药碱-3' 羟化酶基因,并进行序列分析,从分子水平上探讨原小檗碱型苄基异喹啉类生物碱的生物合成机制,并为下一步利用转基因技术来提高小檗碱和黄连碱产量的研究奠定基础。

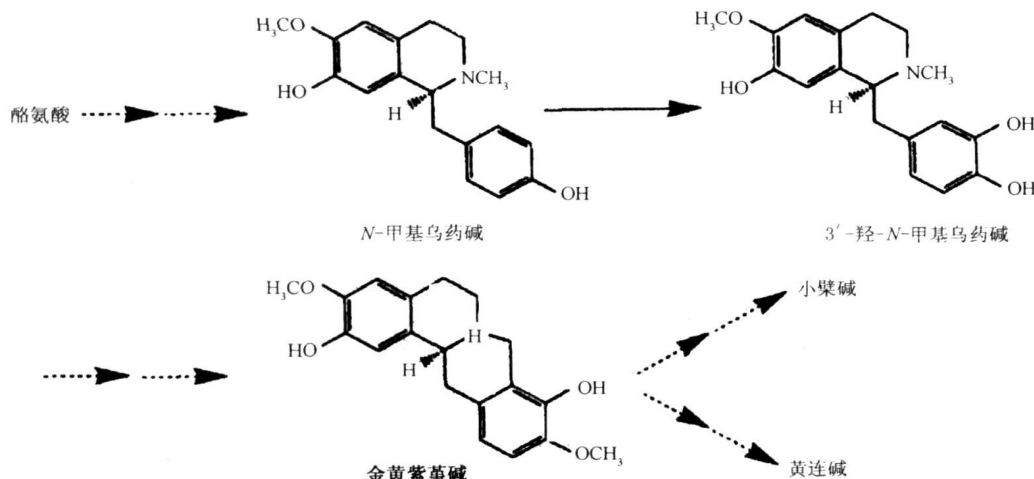


图 1 苄基异喹啉类生物碱的生物合成途径的简要步骤

Fig. 1 Biosynthetic pathway for benzylisoquinoline alkaloid

1 材料和方法

1.1 材料: 黄连 *C. chinensis* Franch. 采用四川省峨眉山市龙池镇,黄连 GAP 生产基地,采集 3~ 5 年生的黄连

用于引物设计与数据分析的已知细胞色素 P450 酶见表 1

表 1 部分细胞色素 P450 酶的基本信息

Table 1 Basic information of several cytochrome P450

编号	Genbank 登录号	物种	长度(氨基酸)
CYP80B2	AB025030	日本黄连	1 671 bp /488
TF	AY610509	唐松草	1 620 bp /491
PS	AF191772	罂粟	1 583 bp /481
CYP80B1	AF014801	花菱草	1 613 bp /488
CYP71A1	P24465	鳄梨	1 687 bp /502
CYP76A1	X71658	茄	1 571 bp /467
CYP82A1	AF175278	豌豆	2 787 bp /540
CYP82B1	AF014802	花菱草	1 915 bp /560
CYP77A1	X71656	茄	1 683 bp /499
CYP719	AB026122	日本黄连	1 658 bp /491
CYP72	L10081	长春花	1 854 bp /524
CYP86A1	NM125276	拟南芥	1 779 bp /513

1.2 试剂: *Taq* 酶、限制性内切酶、相对分子质量 Marker 为 Takara 产品; DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;其余试剂均为上海生工生物工程公司产品

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取: 剪取黄连幼嫩的叶片,加液

氮研磨成粉末, RNA 的提取使用华舜公司的小量 RNA 提取试剂盒,具体步骤按说明书进行。

1.3.2 cDNA 的获得: 以纯化的 RNA 为模板,以 oligo (dT)₁₈ 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈-3' 为反转录引物,采用 AMV 反转录酶进行反转录获得 cDNA

1.3.3 引物设计与合成: 根据 Genbank 所报道的已知植物的 *N*-甲基乌药碱-3' 羟化酶基因的 cDNA 序列,使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,由北京赛百盛生物技术服务有限公司合成所有引物,序列为: 中间片段引物,正向引物 (P1): 5'-GAAGTC (A/G) ACAAATCCAGCTGAT-3' (742 bp); 反向引物 (P2): 5'-CTA (A/T) TTCCAT (G/A) AG-CAAGGCAT-3' (947 bp) 3' RACE 引物, 3P1 5'-TGGACAAAGA AGAGCAGTGCC-AG- 3' (795 bp); 3P2 5'-TGTGGATGTCTTGC-TCAATGCTG-3' (903 bp) 5' RACE 引物, 反转录引物: 5'-GT TGGAGGGTGT AATCTGAGTGT-3' (1 144 bp); 5P1 5'-GTTGAAGAACCTCTGCC-ACTGCT-3' (933 bp); 5P2 5'-GCAAGGCAT-TGATCTTCTG GTCT-3' (807 bp)。

1.3.4 PCR PCR 扩增采用 BioRAD 公司的 MG96G 梯度 PCR 仪,反应条件按引物的碱基组成

进行设置,具体反应条件见表 2,各步 PCR在循环 35 次后,72℃再延伸 7 min 最后 PCR产物于 4℃保存。

1.3.5 克隆与测序:PCR产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳后,利用 OMEGA 公司的凝胶回收试剂盒回收产物,连接到 pMD18-T 载体,构建重组质粒。转化大肠杆菌感受态细胞,筛选重组子并用菌落 PCR 检测,送由北京赛百盛生物技术有限公司测序。

1.3.6 序列分析:利用 NCBI(美国国家生物技术信息中心)的 Blast 进行分析。同时采用 DNAMAN 软件进行序列分析与进化树绘制。

表 2 各个步骤 PCR 的反应条件
Table 2 Reaction parameters of PCR at various steps

步 骤	预变性 / 热变性 / 退火 / 延伸 / 循环次数	℃, min	℃, s	℃, s	℃, s	循环次数
中间片段 PCR		95, 4	94, 30	55, 30	72, 900	35
3' RACE 第 1 轮		95, 4	94, 30	57, 30	72, 120	35
3' RACE 第 2 轮		95, 4	94, 30	54, 30	72, 120	35
5' RACE 第 1 轮		95, 4	94, 30	55, 30	72, 120	35
5' RACE 第 2 轮		95, 4	94, 30	55, 30	72, 120	35

2 结果与讨论

2.1 黄连的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的中间片段 PCR 3' RACE 和 5' RACE 的扩增结果见图 2,中间片段引物进行 PCR 扩增后得到约 240 bp 的片段(图 2-A), 3' RACE 扩增出约 780 bp 的片段(图 2-B), 5' RACE 扩增出约 830 bp 的片段(图 2-C)。

2.2 PCR 产物的测序: 分别将 PCR 产物进行测序,克隆的中间片段 3' 和 5' 片段分别测得为 236 780 830 bp

2.3 黄连 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的全序列: 根据 3 个片段的测序结果,利用 Vector NTI

Suite 7 软件拼接得到黄连 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因(命名为 CYP80B3)的全长序列。该基因全长为 1 680 bp,翻译起始位点为 110 bp 处, poly A 信号位于 1 663 bp,开放阅读框共 1 467 bp,编码 488 氨基酸长度的多肽,相对分子质量为 5.5×10^4 (图 3)。

```

1  ATTCGGCGTAGCAATTTTCTGCCAAGCCATAAATAACATCATCGAAGTAACCA
61  ACTACTACACATAGTTCCAGAGGGAACATCTCTGGATAGGAAAACCTGGAGGTGT
    M E V V
121 TTCTATAGCAATTTGTTTCTTTTGGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
    S I A I V S F S F L L F L F F I I R D P
181 ACGCCAAAGAACCTTCCGCCAGACAGCTCCATTACCAATTTGTGGAAATCTTCTCCG
    R Q K N L P P P G P R P L P I V G N L I Q
241 ACTTGGTGATAAAGCAGCGCTGAGTTTGGCAAAITAGCAGAAAATGGCAAGCTTTT
    L G D K P R A E F A K L A Q K Y G Q L F
301 TTCACTGAAACTAGGCTCTCAGACAGTAGTTGCTTCTTCCAGCTGACAGCTGCA
    S L K L G S Q T Y V V A S S P A A A A E
361 AGTCTCAAAACTCATATAAACTCTCTGGTGATATGTTGTTTCAAGCTTTAGGGT
    V L K T H D K I L S G R Y V F Q S F R Y
421 AAGAGAACCTTCGAGACAGCTGATTTTGGTCTGAATGCAATGACAATGGAAGTTGT
    K E H V E N S I V W S E C K N D N W K L L
481 AAGAAAGTTTTCAGACAGAAATTTGCTACCTCAGATGATTAATGCAATGCAATGAG
    R K V C R T E L F T P K M I E S Q S E T
541 AAGAGAACGCAAGCCAGGAAAGTGGTGAAGTTCTTGAGAAATGAGAAAGTGAAGTGT
    R F G K A R E L V M V K F L R S K E G E V Y
601 GAAGATAGTCGAGGTGGTATTTGGAACTTGTAAATCTTTGGAACTTAAATTTTC
    K I V E V V F G T L V N I F G N I T F S
661 GAAGAGCTTTTCAGCTTGGAGACCTCTGCTGGAGTGTGAGCTGAAAGAACATIT
    K D V F D L E D P T G G S V E L K E H I
721 ATGGAATTTTGGAAATGGGAACTCAACAAATCAGCTGATTTTCCAATCTATGGG
    W K L L E M G N S T N P A D Y F P I M G
781 AAGATATGATTTTGGACAAAGAAAGCGGTGGCAGAGCTTCTTCAACAAATCATGA
    N Y D L F F G Q R R A V A D A V I Q Q I I G
841 TGCTGGGGTATTATTTGAAGGAGCTGAGGATGAAAGGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA
    V W G I N L K E R R G M K G S E S N N D
901 TTTTGGATGCTTCTTCAATGCTGGACTTGAAGACGAGATCAATGCTGCTTAT
    F V D V L L N A G L E D Q K I N A L I M
961 GGAATATTTGTCAGAGCAGAGAGACATGATCAACATAGAAATGGGCAATCACTGA
    E I P G T G T E T S A S T I E W A I T E
1021 ACTGACGAAAAAAGCTGCTGCTGTCACAAATAGAGTTGGAGTTGTTAATGTTTGG
    I T K K P L V V S K I R L E L V N V V G
1081 TGACAAACAGTCAAGATCAGATTCGCTTCACTTCCATACCTCCAGCTTTTGTGA
    D N T V K E S D L P H I P Y L Q A F V K
1141 GGAACACTCAGATTCACCTCCACACACCTTGTCTTCCAGCTGCTGCTTGAAC
    E T I R L H P P T P L L L P R R A I E T
1201 ATGTCAGCTATGATCAACCACTCCCAAGGATGCAAAATGCTAAATGAGGAGG
    C T V M N Y T I P K E C Q I M V N A W A
1261 TATAGGAGAGATCCAAAACATGGGATGATCCCTTGAATTTCAAGCAGAGAGGTTT
    I C R D P K T W D D P L N V F R P E R F L
1321 GAGTTCTGATGATGATTATAAGGGAAGGATTTGAGTTGATACCATTTGGCGCGGTAG
    S S D V D Y K G N D P E L I P P G G G R
1381 AAGAAATTTGCCAGACTTCTTTGGCAAGTCAATTAATAGCTTAATTTGGCAACTTT
    H I C P G L P I A S Q F I S L I V A T L
1441 GGTTGAGAAATTCAGAGTGGAGTTTACCTCAAGGAATGAGTGTGAGTTGAGTGTGA
    V Q N F E W S L P Q G M S T S E L S M D
1501 TGAGAAATTTGAGTTGACCTTACAAAGGATGCACTCTCTCATTTGCTCAATGAGCTAG
    E K F G L T L Q K D P P L L I V L K A R
1561 GCTTCTCATATTTAGACACAGTGTCTTTTCTTTTATCTTCGATCTTACTTTTGT
    P S Y I stop
1621 GAAAGCTCTCTCAACAAAAAATGTCATCTTTATAAATTAAGAAAAAAGAAAAA
    
```

图 3 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of cDNA encoding (S)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase

利用 ExPASy 网站的蛋白质组学工具 (www.expasy.org/tools/protparam.html) 预测 CYP80B3 蛋白质的等电点为 6.38 使用 NCBI Blast 查询,发现黄连 CYP80B3 的氨基酸序列与日本黄连、唐松草、罂粟和花菱草的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶的氨基酸序列的同源性分别为 93%、82%、70%、68%。核苷酸序列同源性分别为 83%、74%、64%、62%,同时在 Genbank 中未查询到黄连的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因。该序列已提交 Genbank,序列号为 EF492879 将上述几种植物的 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶和其他植物的细胞色素 P450 酶用 DNAMAN 软件构建系统进化树,见图 4

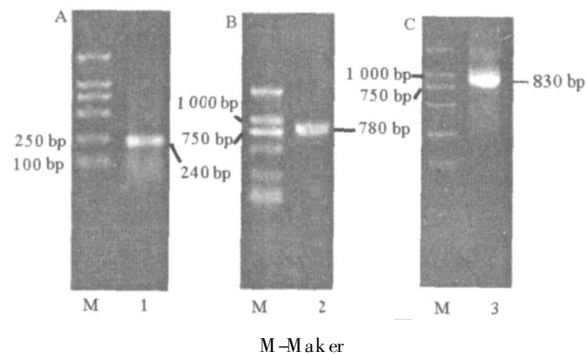


图 2 *N*-甲基乌药碱-3'-羟化酶基因的中间片段 PCR (A) 3' RACE (B) 5' RACE (C) 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of (S)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase fragment amplified by PCR (A), 3' RACE (B), and 5' RACE (C)

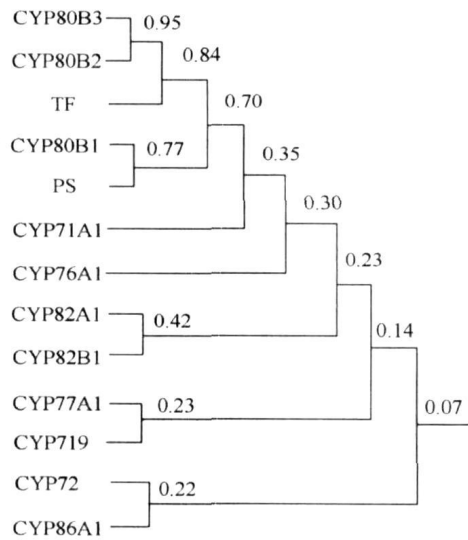


图 4 植物细胞色素 P450 酶氨基酸序列进化树
(各编号见表 1)

Fig. 4 Dendrogram of amino acid sequence of plant cytochrome P450 families (No. seen in Table 1)

进化树分析表明, CYP80B3 与日本黄连 CYP80B2 的亲缘关系最近, 唐松草次之, 而与拟南芥 CYP86A1 亲缘关系最远

细胞色素 P450 酶是植物中的一个家族酶系, 参与植物多个代谢途径, 具有高度的底物专一性, 包括羟化酶、去甲基化酶和亚甲基双氧桥环化酶等多种酶^[1]。真核细胞的细胞色素 P450 羟化酶

的分子结构中都具有系列保守域, 分别分为跨膜区、K 螺旋区、芳香残基区与血红素结合区。N-甲基乌药碱-3'-羟化酶也具有类似的结构(图 5)。如 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶的 N 端含疏水氨基酸, 这一区域能形成较强的 α 螺旋结构, 并锚定于内质网膜上形成跨膜区^[1], 推测其合成产物 3'-羟基-N-甲基乌药碱可能位于内质网膜附近, 这也与小檗碱的生物合成路径基本吻合^[3]。在 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶氨基酸序列的中段, 有一个由 4 个氨基酸残基 (E-X-X-R) 组成的 K 螺旋区。其中, E 和 R 残基参与盐键的形成^[4], 从而起到稳定 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶高级结构的作用。K 螺旋区的下游是芳香族氨基酸残基群, 其功能尚不明确。N-甲基乌药碱-3'-羟化酶的 C 末端是血红素辅基结合区, 该区域负责与血红素辅基结合, 参与酶促反应过程中电子的传递^[1]。更为重要的是在 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶分子中都含有一个保守的 Thr 残基 (用* 号表示), 其侧链上的羟基参与了氧分子的激活, 是 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶的必需氨基酸^[5,6]。

3 讨论

随着对中药活性成分的应用研究的深入, 对天然活性成分的实际需求不断增加。植物基因工程开辟了一条十分广阔的新途径。通过克隆与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基因入手, 阐明中

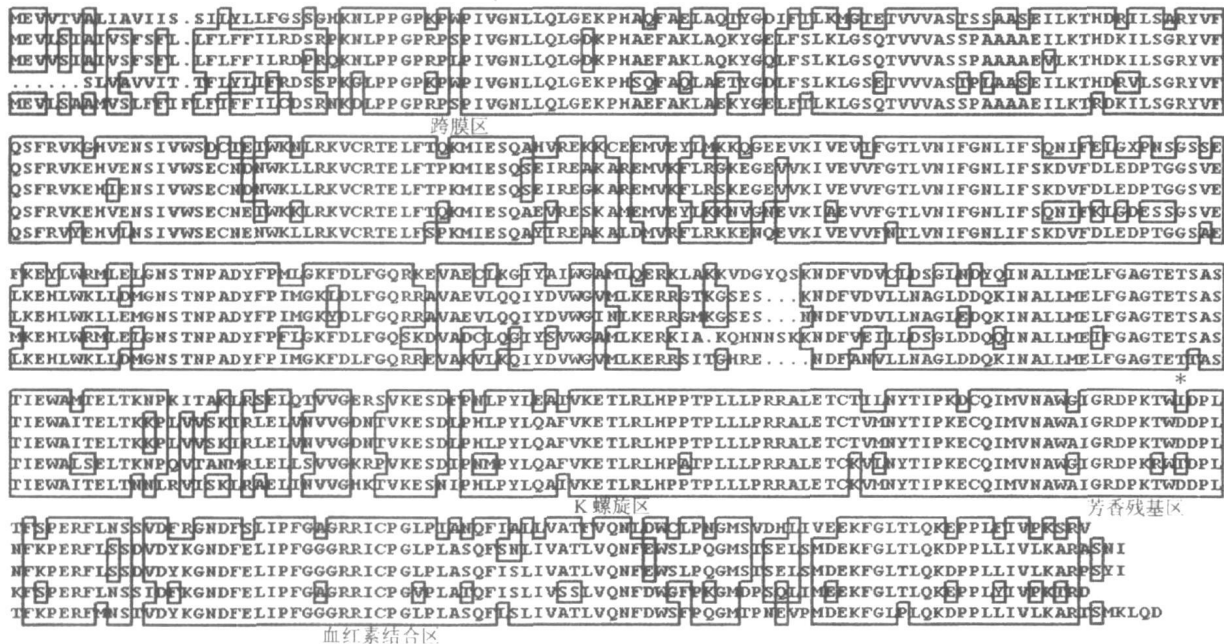


图 5 黄连、日本黄连、花菱草、罂粟和唐松草的 N-甲基乌药碱-3'-羟化酶氨基酸序列比较

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of (S)-N-methylcoclaurine-3'-hydroxylase from *C. chinensis*, *C. japonica*, *Eschscholzia californica*, *Papaver somniferum*, and *Thalictrum flavum*

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-3'-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, Ko Izumi N, Tanaka T, *et al.* Isolation, sequence, and bacterial expression of a cDNA for (*S*)-tetrahydroberberine oxidase from cultured berberine-producing *Cop-*

tis 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. 细胞色素 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-450:cam 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 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase 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: xmcher@implad.ac.cn

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