

尚洁,赵海燕,朱武政. 枸杞 *DFR* 基因 cDNA 片段的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):33-37.

枸杞 *DFR* 基因 cDNA 片段的克隆及生物信息学分析

尚洁¹,赵海燕¹,朱武政²

(1. 北方民族大学生物科学与工程学院,宁夏银川 750021; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:二氢黄酮醇 4-还原酶(*DFR*, 1.1.1.219)是类黄酮代谢中花青素合成的一种主要调控酶,它依赖 NADPH 还原二氢黄酮醇为无色花色素。以枸杞为材料,利用序列同源原理和 RT-PCR 技术得到 1 条 *DFR* 基因,并对其进行生物信息学分析。结果表明,该基因的 cDNA 片段长为 893 bp,编码 297 个氨基酸,蛋白分子量为 33.94 ku,等电点为 6.08。氨基酸序列和结构分析显示 *DFR* 基因具有典型的 NAD(P)-binding Rossmann-fold 结构域。LyDFR 蛋白很可能定位在细胞质。二级结构和三级结构进行预测,发现 LyDFR 蛋白中无规则卷曲 114 个,α 螺旋和 β 折叠分别为 124 个和 18 个,延伸链 41 个。系统进化分析表明,枸杞 *LyDFR* 基因与马铃薯和番茄的 *DFR* 基因具有很高的同源性。这个基因已在 GenBank 上注册,基因序列登录号为 KC795560。

关键词:枸杞;*DFR* 基因;克隆;生物信息学分析

中图分类号: S567.1⁺90.1;Q785

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)10-0033-04

枸杞(*Lycium barbarum* L.)是多年生灌木,主要生长在中国大多数地区、欧洲各国和地中海地区。在中国枸杞是一味传统常用中药和滋补品。众多研究表明,类黄酮是枸杞叶片中重要的活性成分,在自由基清除、抗氧化、抗癌方面都有一定作用^[1-3]。

二氢黄酮醇 4-还原酶(*DFR*, 1.1.1.219)是类黄酮代谢途径中最先发现的花青素生物合成酶,它与 NADP 偶联催化二氢黄酮醇立体定向还原生成无色花色素(黄烷 3,4-二醇)^[4-5]。花青素是植物常见色素^[6-7],它能够被 *DFR* 进一步还原生成相应颜色的原花青素^[8]。日本研究人员通过采用 RNA 干扰技术,抑制内源 *DFR* 基因的表达,将三色堇的 *F3'5'H* 基因和鸢尾的 *DFR* 基因导入,获得了蓝玫瑰^[9]。

DFR 也是类黄酮代谢途径的限速酶之一。类黄酮是非常重要的次生代谢产物,广泛存在于植物中。目前,超过 8 000 个不同的类黄酮化合物已经被鉴定,其中许多都参与多个生物过程,如花的色素形成、防紫外线伤害、病虫害防御、花粉活力、生长素运输调控等^[10-11]。*DFR* 也参与木质素生物合成途径。在拟南芥中,这个酶利用芥子醛、松柏醛或香豆醛和 NADPH 分别形成芥子醇、松柏醇或香豆醇以及 NADP⁺。

目前,已从很多高等植物中克隆了 *DFR* 基因^[12-17],并对一些植物的 *DFR* 基因表达调控进行了研究^[18-20]。该酶属于氧化还原酶家族,基因在植物基因组中一般为单拷贝,但在矮牵牛(*Petunia hybrida*)、拟南芥(*arabidopsis thaliana*)^[21-22]等中出现多拷贝。不同植物 *DFR* 等电点均小于 7,酸碱平均系数也都大于 1,表明 *DFR* 为酸性蛋白。至 2007 年末,已从这类酶中获得 2 个蛋白质的结构, PDB 代码分别是 2c29 和 2iod^[23]。

本研究对二氢黄酮醇 4-还原酶基因进行克隆、序列分

析,以期利用基因工程技术提高枸杞对不良环境的抵御能力以及为调控枸杞类黄酮的积累奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为枸杞幼苗,立即冰冻于液氮中,置于 -80 ℃ 超低温冰柜中待用。

1.2 试剂与菌种

DNA Polymerase、RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒、DL2000 DNA marker 购自 TakaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物公司;质粒 DNA 小量试剂盒购自 Axygen 公司;pEASYTM-Blunt Zero Cloning Kit、Transl-T1 感受态细胞购自 Transgen 公司;常规试剂均为国产分析纯;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;测序由华大完成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取与 cDNA 链的合成 利用 TakaRa 公司的 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 试剂提取总 RNA,操作步骤参考说明书。按照反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书合成第一条链 cDNA。

1.3.2 引物设计 二氢黄酮醇 4-还原酶的引物是根据 GenBank 上收录的茄科植物 *Solanum tuberosum*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca* 的氨基酸序列,使用 Clustalw2 进行序列比对,根据比对结果为上下游引物确定两个合适的保守区域,应用 Primer Premier 5.0 设计引物。

PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 180 s;98 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 复性 15 s,72 ℃ 延伸 60 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。

1.3.3 枸杞 *DFR* 基因序列的生物信息学分析 通过 Proteomics Server(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测氨基酸序列的分子质量、等电点、稳定性指数等;利用 ProtScale

收稿日期:2013-03-22

基金项目:北方民族大学校级科研项目(编号:2010Y046)。

作者简介:尚洁(1979—),女,宁夏中卫人,硕士,讲师,研究方向为植物分子生物学。E-mail:shangjie@126.com。

(<http://web.expasy.org/protscale/>) 进行疏水性分析;利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构域分析;利用 Eslpred^[24](<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/>) 预测亚细胞定位;利用 signalp 4.1^[25](<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质的信号序列;利用 FoldIndex^[26](<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>) 分析氨基酸序列的无序化特性。用 SUMOsp 2.0^[27](<http://sumosp.biocuckoo.org/down.php>) 进行泛素化预测;用 MotifScan(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 和 CDD^[28](<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测编码蛋白序列上潜在的结构域和功能位点;用 NetPhos^[29](<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白磷酸化位点;使用 SOPMA^[30](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对蛋白质二级结构进行预测;用 SWISS-MODEL^[31-33](<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白三级结构;利用 MEGA5.10 软件,采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

2 结果与分析

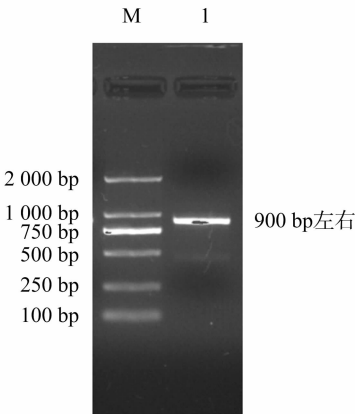
2.1 枸杞 DFR 大片段基因克隆

由表 1 可知,根据亲缘关系最近的几种茄科植物的 DFR 序列比对,并使用 Primer Premier 5.0 软件设计得到 1 对引物。

表 1 DFR 基因克隆引物

引物名称	引物序列(5'→3')	长度
DFR-F	GGCTCTTGCTTGTCATGAGACTC	24
DFR-R	GCCCTTTATACATATCCTCCAAAGTGT	28

采用设计好的引物进行 PCR,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果见图 1。由图 1 可知,在小于并接近 1 000 bp 位置出现 1 条特异性条带,并与目标条带大小相符(约 900 bp),没有出现非特异性条带,表明此引物扩增特异性强。目标条带经回收、克隆、测序后获得 1 条长 893 bp 的 DNA 序列。编码 297 个氨基酸,分子量约为 33.94 ku,命名为 *LyDFR*,提交至 GenBank,基因序列登录号为 KC795560。



M—DNA 分子质量标准;1—RT-PCR 产物

图 1 RT-PCR 产物的电泳

2.3 DFR 蛋白的理化性质

通过 ExPASy Proteomics Server 预测氨基酸序列的分子质

量、等电点、稳定性指数、脂溶性指数、两性性指数。我们了解到 *LyDFR* 基因碱性氨基酸残基(Arg + Lys)总数为 34,酸性氨基酸残基(Asp + Glu)为 39,在溶液中,不稳定性指数为 34.36,脂溶性指数为 87.31,总平均亲水性指数为 -0.188,分子量为 33.94 ku,理论等电点为 6.08,氨基酸 297。

2.4 亲疏水性、亚细胞定位预测

利用位于 Expasy 的 ProtScale 进行疏水性分析,Window size 设置为 9。

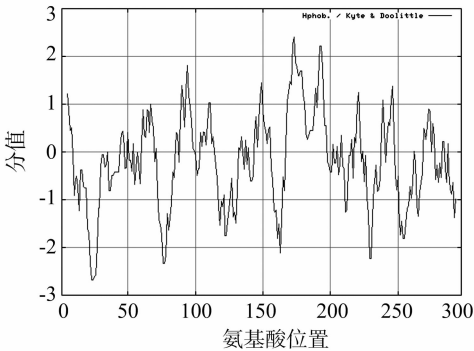


图 2 蛋白疏水区分析

从图 2 返回的分析结果可以得知 *LyDFR* 在第 173 位氨基酸处有最大值 2.411,在第 23、24 位氨基酸处有最小值 -2.678,第 167~197 位氨基酸之间有明显疏水区。第 15~35 位氨基酸之间有明显亲水区。利用 TMHMM 进行分析,枸杞 DFR 蛋白都没有跨膜结构域,该蛋白位于细胞膜外。Eslpred 预测枸杞 DFR 蛋白定位于细胞质的可能性最大为 53%。经 signalp 4.1 预测 DFR 蛋白质序列中无明显的信号序列。

2.5 蛋白质无序化特性分析

利用 FoldIndex 分析来源于枸杞 *LyDFR* 基因编码蛋白氨基酸序列的无序化特性,结果表明,*LyDFR* 蛋白中没有发现无序化区域。

2.6 DFR 的结构域和功能位点预测

用 MotifScan 和 CDD 预测 DFR 蛋白序列上潜在的结构域和功能位点,结果表明,该蛋白可能存在的翻译后修饰位点包括 1 个 N-糖基化位点、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点、4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、1 个 CAMP 磷酸化位点、7 个酪蛋白激酶 II 位点。对该 *LyDFR* 蛋白片段进行结构分析发现具有典型的 NAD(P)-binding Rossmann-fold 结构域(图 3)。用磷酸化位点预测程序 NetPhos 2.0,发现 *LyDFR* 有 5 个潜在的 Ser 磷酸化位点、3 个 Thr 磷酸化位点、6 个 Tyr 磷酸化位点。使用 SUMOsp 2.0 软件对 *LyDFR* 蛋白序列进行泛素化修饰分析,在 *LyDFR* 蛋白序列中可能有一个泛素化位点 K229(EHP-KAEG)(TypeI:Ψ-K-X-E)。利用 Signalp 4.0 Server 在线分析工具分析枸杞 *LyDFR* 蛋白信号情况,结果显示,得到的 *LyDFR* 蛋白片段不含信号肽序列。

2.7 枸杞 DFR 片段的二级结构、三级结构预测

经 SOPMA 对 *LyDFR* 蛋白二级结构进行预测,发现蛋白中以 α 螺旋和无规则卷曲为主,β 折叠和延伸链较少,其中 α 螺旋 124 个(41.75%)、无规则卷曲 114 个(38.38%)、β 折叠 18 个(6.06%)和延伸链 41 个(13.80%)。

利用 SWISS-MODEL Workspace 在线分析工具对 *LyDFR*

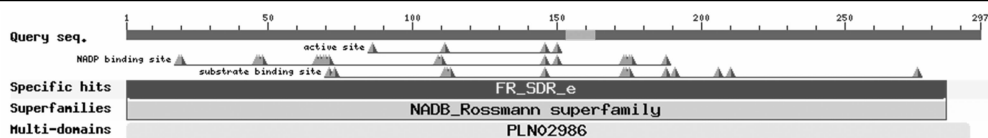


图3 LyDFR的保守结构域

蛋白三级结构进行预测。三级结构预测采用同源建模方法, 搜索蛋白质结构数据库 (PDB), 得到同源序列 2c29D (1.81Å), 将其作为枸杞 LyDFR 蛋白三级结构预测模板, 依据模板调整待预测蛋白序列主链原子位置生成预测蛋白三级结构模型 (图 4), 最后依据能量最小化原理使侧链基团处于能量最小的位置。预测信息显示, 预测模型与同源模板序列同源率为 75.25%。

2.8 枸杞 DFR 编码基因的系统进化分析

在 NCBI 上共选取茄科的 12 种植物 DFR 基因序列, 以小麦 DFR 基因作为外群, 利用 MEGA5.10 软件, 采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 结果见图 5。结果显示, 枸杞 LyDFR 基因在进化上除了与已知枸杞属的 2 种植物亲缘关系较近以外, 与马铃薯、番茄相似度最高。

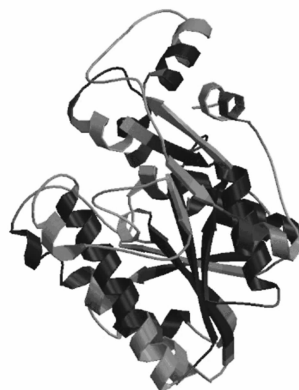


图4 预测的枸杞LyDFR蛋白三级结构

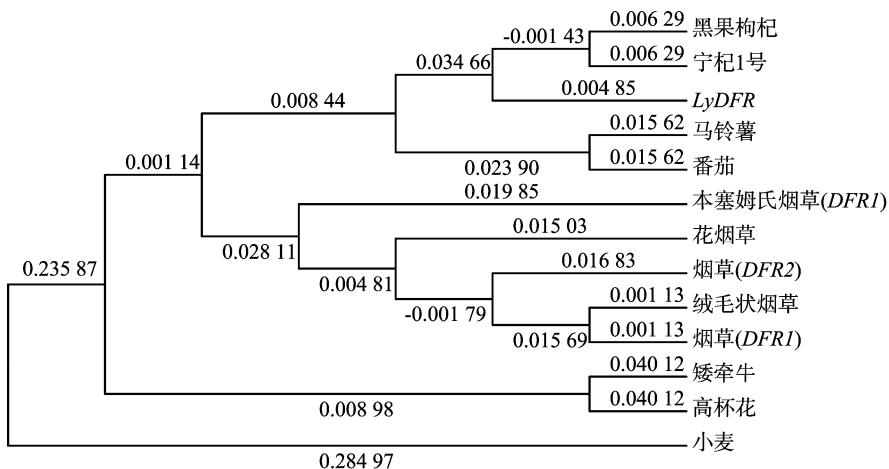


图5 不同种植物DFR基因的系统进化树

3 结论和讨论

本研究利用 RT-PCR 技术, 首次从枸杞中克隆到 DFR 基因家族 cDNA 片段, 命名 LyDFR。该序列长 893 bp, 编码 297 个氨基酸, 已在 GenBank 上注册, 基因序列登录号为 KC795560。该基因编码的氨基酸序列分析显示具有典型的 NAD(P)-binding Rossmann-fold 结构域, 属于 NADB Rossmann 超级家族。二级结构预测中发现, 枸杞的 DFR 蛋白中含有大量的 α 螺旋和无规则卷曲, β 折叠和延伸链较少, 无明显跨膜结构, 蛋白不含有无序化区域, 很可能定位在细胞质。在系统发生树中发现, 除了本属的植物以外, 枸杞 DFR 基因与马铃薯和番茄亲缘关系最近。未来将进一步进行枸杞分子生物学研究, 尝试克隆类黄酮代谢中其他的结构基因, 对其进行表达分析, 揭示枸杞中类黄酮及花青素生物合成途径。

参考文献:

[1] Huang Y, Tan A, Shen Y, et al. Scavenging effect of total flavonoids

of *Lycium barbarum* L on active oxygen radicals and inhibitory effects on heat output from L1210 cells[J]. Journal of Hygiene Research, 1998, 27(2): 109-115.

[2] Huang Y, Lu J, Shen Y. The protective effects of total flavonoids from *Lycium barbarum* L. on lipid peroxidation of liver mitochondria and red blood cell in rats[J]. Journal of Hygiene Research, 1999, 28(2): 115-116.

[3] Dong J, Lu D, Wang Y. Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64(3): 199-204.

[4] Kristiansen K N, Rohde W. Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of ant18 mutants blocked in flavonoid synthesis[J]. Molecular and General Genetics, 1991, 230(1/2): 49-59.

[5] Martens S, Teeri T, Forkmann G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants[J]. FEBS Letters, 2002, 531(3): 453-458.

[6] 朱丽娟, 赵亚敏, 杨秋生. 园林植物花色的生成及影响因素[J].

- 江苏农业科学,2012,40(7):142-145.
- [7] 房欢,焦滇. 花色苷生物合成及代谢工程研究进展[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):5-10.
- [8] Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, et al. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(28):25797-25803.
- [9] Katsumoto Y, Fukuchi M, Mizutani M, Fukui Y, et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin[J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(11):1589-1600.
- [10] Winkel-Shirley B. It takes a garden: How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism[J]. Plant physiology, 2001, 127(4):1399-1404.
- [11] Martens S, Knott J, Seitz C A, et al. Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 14(3):227-235.
- [12] Singh K, Kumar S, adav S K, et al. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. Plant Biotechnology Reports, 2009, 3(1):95-101.
- [13] Zhang P, Wen P F, Wan S B, et al. Molecular cloning of dihydroflavonol 4-reductase gene from grape berry and preparation of an anti-DFR polyclonal antibody[J]. Vitis, 2008, 47(3):141-145.
- [14] Lee W S, You J A, Chung H, et al. Molecular cloning and biochemical analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Chinese cabbage) using a heterologous system[J]. Journal of Plant Biology, 2008, 51(1):42-47.
- [15] Lo Piero A R, Puglisi I, Petrone G. Gene characterization, analysis of expression and *in vitro* synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck[J]. Phytochemistry, 2006, 67(7):684-695.
- [16] Xie D Y, Jackson L A, Cooper J D, et al. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol 4-reductase from *Medicago truncatula*[J]. Plant physiology, 2004, 134(3):979-994.
- [17] Polashock J J, Griesbach R J, Sullivan R F, et al. Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco[J]. Plant Science, 2002, 163(2):241-251.
- [18] Meer I M, van der Stuitje A R, Mol J N M. Regulation of general phenylpropanoid and flavonoid gene expression[M]//Verma D P S. Control of plant gene expression. Boca Raton: CRC Press Inc, 1993:125-155.
- [19] Elomaa P, Mehto M, Kotilainen M, et al. A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae)[J]. The Plant Journal, 1998, 16(1):93-99.
- [20] Huits H S M, Gerats A G M, Kreike M M, et al. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*[J]. The Plant Journal, 1994, 6(3):295-310.
- [21] Beld M, Martin C, Huits H, et al. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 13(5):491-502.
- [22] Østergaard L, Lauvergeat V, Næsted H, et al. Two differentially regulated Arabidopsis genes define a new branch of the DFR superfamily[J]. Plant Science, 2001, 160(3):463-472.
- [23] Petit P, Granier T, d'Estaintot B L, et al. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 368(5):1345-1357.
- [24] Bhasin M, Raghava G P S. ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(Suppl 2):414-419.
- [25] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10):785-786.
- [26] Prilusky J, Felder C E, Zeev-Ben-Mordehai T, et al. FoldIndex®: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded[J]. Bioinformatics, 2005, 21(16):3435-3438.
- [27] Ren J, Gao X, Jin C, et al. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0[J]. Proteomics, 2009, 9(12):3409-3412.
- [28] Hunter S, Jones P, Mitchell A, et al. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40:306-312.
- [29] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5):1351-1362.
- [30] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Computer Applications in the Biosciences: CABIOS, 1995, 11(6):681-684.
- [31] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13):3381-3385.
- [32] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2):195-201.
- [33] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling[J]. Electrophoresis, 1997, 18(15):2714-2723.

潘梅,吕德任,姜殿强,等.铁皮石斛袋式组培快繁技术研究[J].江苏农业科学,2013,41(10):37-40.

铁皮石斛袋式组培快繁技术研究

潘梅,吕德任,姜殿强,黄赛,王景飞,戚华莎

(海南省农业科学院园林花卉研究所,海南海口 571100)

摘要:利用聚丙烯透明薄膜袋作为培养容器,铁皮石斛丛生芽作为外植体,研究铁皮石斛袋式组培快繁的适宜培养基。结果表明:适宜原球茎(PBL)增殖的培养基为 MS + 活性炭 0.5 g/L;适宜原球茎分化的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 活性炭 0.5 g/L;培养基 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 香蕉泥 100 g/L + 活性炭 0.5 g/L,对丛生芽的生长及增殖效果好;适合组培苗生根的培养基为 MS + NAA 2.0 mg/L + 香蕉泥 100 g/L + 活性炭 2.0 g/L。

关键词:铁皮石斛;袋式组织培养;快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0037-03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)是我国名贵中药,被称为“药界大熊猫”,具有免疫调节、延缓衰老等功效。不仅是大家熟悉的“脉络宁注射液”的必需原料,还是数十种中成药及保健品的必要原料。长期以来,人们用此药都是依靠采挖收集野生资源,不仅难以满足市场的需求,而且由于野生铁皮石斛自然繁殖率极低,致使铁皮石斛濒危灭绝。从 20 世纪 70 年代起,国内外有关机构便开始了铁皮石斛的研究工作,并取得了较大的进展。近年来,在浙江、云南、广西等地均有人工栽培铁皮石斛,由于种植密度大,种苗需求量极大,因此快速高效地繁育优质种苗尤为重要。目前有关铁皮石斛组织培养与快速繁殖的研究报道很多,但有关袋式培养的报道极少^[1-2]。我们以聚丙烯透明薄膜袋作为培养容器,研究铁皮石斛的组培快繁技术,为高效规模化培育铁皮石斛种苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

外植体为云南铁皮石斛瓶式培养的丛生芽。

1.2 培养容器

采用不透水耐高温高压的聚丙烯透明薄膜袋代替玻璃瓶进行组织培养,培养袋壁厚 0.05 mm,规格为 120 mm × 140 mm,培养基按常规技术配制后灌入培养袋中,然后装入用牛皮纸制成的外包装袋,于温度 121 ℃、压力 0.14 MPa 的高压锅灭菌 20 min,在超净工作台上取出按常规方法接种,用封口机进行密封后放入培养室培养。

1.3 培养基

以 MS 为基本培养基(生根培养基中设计了大量元素减

量的 1/2 MS 和 1/4 MS 培养基),根据试验目的添加不同浓度的 6-BA(6-苄基腺嘌呤)、NAA(萘乙酸)和 IBA(吲哚丁酸),有机添加物,附加蔗糖 30 g/L,卡拉胶 6 g/L,pH 值 5.8。

1.4 培养条件

材料接种后,在光照度 1 500 lx 光照下培养,光照时间 9 h/d,温度(25 ± 2) ℃。

1.5 培养方法

本研究将丛生芽切断接种在 MS + BA 2.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L 的培养基上诱导原球茎。原球茎增殖与分化试验每袋接种 5 团;丛生芽增殖试验以 2 个小芽为单位切分后接入培养基,每袋接种 6 块(密度试验除外);生根培养小苗高约 2 cm,单株接入各种培养基,每袋 10 株。所有处理均接种 10 袋,重复 3 次,定期观察记录,60 d 后统计结果。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛原球茎的增殖与分化

以 MS 为基本培养基,附加 6-BA 和 NAA 组成 7 种培养基。原球茎培养 30 d 后有明显的生长,60 d 的生长情况见表 1。从表 1 可以看出,在无激素培养基和只添加 NAA 0.2 mg/L 的培养基中,原球茎增殖快,分化少,其中以无激素培养基为最优(图 1)。原球茎在培养过程中均出现不同程度的分化,分化整齐度与激素的作用有关。单独使用 6-BA,原球茎分化少;6-BA 和 NAA 二者配合使用,能明显促进原球茎的分化,其中以低浓度 NAA 与高浓度 6-BA 配用效果好。在 NAA 0.2 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的加大,原球茎的分化率也随之升高,6-BA 为 2.0 mg/L 时效果最好,分化率高,具有 2~4 片叶的分化苗占 90% 以上,而且分化整齐(图 2),因此,选择 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 作为原球茎的分化培养基。

2.2 丛生芽增殖

2.2.1 植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 组合对丛生芽增殖的影响 以 MS 为基本培养基,设置 6-BA 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 和 NAA 0、0.2、0.5、0.8 mg/L 各 4 个浓度水平的配比,共 16 种处理,培养基中附加活性炭 0.5 g/L。小苗接入培养基中培养 15 d 后开始长出新芽,30 d 后芽增长明显,培养

收稿日期:2013-03-09

基金项目:2011 年海南省科学事业费项目(编号:琼财预[2011]207);2011 年海南省引进集成项目(编号:YJJC2011003)。

作者简介:潘梅(1962—),女,广西隆安人,高级园艺师,研究方向为植物组织培养研究与开发。Tel:(0898)65380711;E-mail:panmei200@sina.com。

通信作者:姜殿强,硕士。Tel:(0898)65393907;E-mail:dqjiang2004@163.com。