

王婷婷,仇有文,王沛文,等.番茄热激转录因子 HSF 家族的系统进化分析[J].江苏农业科学,2016,44(1):48-53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.012

# 番茄热激转录因子 HSF 家族的系统进化分析

王婷婷,仇有文,王沛文,陈宏宇,杨俊颖,王宾逗,伍 森,王傲雪

(东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150000)

**摘要:**热激转录因子(heat shock factors)普遍存在于整个生物界中,在调控植物生长发育以及对环境的响应中起重要作用。目前,已经对多个物种的 *HSF* 基因进行生物信息学分析,但未见对番茄中 *HSF* 基因家族的分析报道。通过番茄基因组数据库,鉴定和分析番茄 *HSF* 转录因子家族,获得 24 个 *HSF* 基因家族成员。多重序列比对发现番茄 *HSF* 基因具有保守的 DBD 结构域和广泛的保守基序。根据与拟南芥基因系统进化分析将这些基因分类,分成 I、II、III 支,又将 I 支分成 A、B、C 3 个亚支,并且存在 5 对旁系同源蛋白和 10 对直系同源蛋白。染色体分布和遗传分析结果表明,番茄 *HSF* 基因存在于 10 条染色体上,呈不均匀分布。

**关键词:**番茄;热激转录因子(HSF);基因家族;生物信息学;系统进化

**中图分类号:** S641.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0048-05

转录因子又称反式作用因子,其主要功能是激活或抑制基因的转录,在调控植物生长发育以及对环境的响应中起重要作用。热转录因子(heat factor HSFs)是近年来在植物中发现的一类重要的转录因子,广泛分布于植物细胞内,在热胁迫响应基因的中心元件,在植物热胁迫信号转导以及耐热性调控中起着关键作用<sup>[1]</sup>。热激转录因子(heat shock factor, HSF)在本质上是具有转录调节活性的蛋白质,植物遭受高温胁迫的时候热激基因迅速增加,导致热激蛋白快速累积,热激蛋白作为分子伴侣帮助相关蛋白重新折叠、组装、分配和降解,对受损蛋白进行修复起着极其重要的作用。热激转录因子是信号转导途径的末端组分,通过调节基因活性对热激和其他胁迫作出响应<sup>[2]</sup>。这些经热激而活化的热激转录因子可以识别并特异性结合在热激蛋白(heat shock protein, HSP)基因启动子区热激元件(heat shock element, HSE)的保守基序上,从而调控热激蛋白基因的开启与关闭,诱导 HSPs 的转录,完成其相应的生物学功能<sup>[3]</sup>。20 世纪 80 年代,自研究者首次在酵母中克隆 *HSF* 基因以来<sup>[4]</sup>,多种哺乳动物 *HSF* 基因相继被克隆。然而植物的第 1 个 *HSF* 基因是在番茄中克隆得到的,随着基因组测序工作的不断进行,在拟南芥和水稻中也克隆得到相应的 *HSFs* 基因,随后研究者在大豆、玉米等植物分别发现至少具有 52,30 个 *HSFs* 基因<sup>[1-2]</sup>,由此可知,植物 *HSFs* 基因是一个大的基因家族,而且对植物耐热具有重要意义。

典型的热激转录因子一般包括 4 个部分:N 端的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)、寡聚化结构域(HR-A/B)、细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、细胞核输出信号(nuclear export signal, NES),少数还具有 1 个 C 端

激活域(C-terminal activation domain, CTAD)<sup>[5]</sup>。植物热激因子通过形成回文发卡结构,特异地结合高度保守的热激元件,从而控制热激蛋白的表达<sup>[6]</sup>。根据保守 DBD 和 HR-A/B 区的结构特点,热激转录因子又可以分为 A、B、C 3 类。这 3 类基因主要区别表现为:B 类基因 HR-A/B 结构域中 A、B 结构域之间只有 7 个氨基酸残基,在 A 类、C 类中,除了这 7 个氨基酸,还分别有 21 个和 7 个氨基酸的插入;另外,CTAD 和 NES 的结合区域是 A 类 HSFs 所特有的结构,B 类、C 类均不包含 CTAD 结构域<sup>[7-8]</sup>。

番茄是一种重要的蔬菜作物,在夏季栽培或保护地生产中,高温是影响其产量和品质的主要非生物胁迫因素之一。番茄全基因组测序工作的完成,为其遗传育种及相关基因的生物功能鉴定提供重要的信息参考。本研究利用生物信息学方法,在番茄基因组数据库中搜索 *HSFs* 基因,分析这些基因的数量、序列特征、染色体定位以及进化关系等,研究结果不仅有助于鉴定番茄 *HSFs* 基因家族的功能,还可进一步为培育番茄耐热新品种提供理论基础和基因信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 番茄 bZIP 家族成员的确定

从拟南芥基因组数据库 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)获得已经鉴定的 21 个拟南芥 HSF 蛋白序列<sup>[9]</sup>,将其在番茄基因组数据库 SGN(<http://www.sgn.cornell.edu/>)上进行同源性搜索,E 值设定为  $1 \times 10^{-10}$ ;以关键词“HSF”在 SGN 数据库中进行搜索,合并 2 次搜索结果,去除重复,下载候选番茄 HSF 核苷酸序列、氨基酸序列及其内含子-外显子等信息。通过 CELLO(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)<sup>[10]</sup>进行亚细胞定位分析。利用在线工具 Pfam(<http://pfam.janelia.org/>)<sup>[11]</sup>和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)<sup>[12]</sup>对获得的候选番茄 HSF 蛋白家族成员的氨基酸序列进行保守 HSF 蛋白结构域预测。利用 ExPASy Proteomic Server(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)<sup>[13]</sup>对所有番茄 HSF 蛋白氨基酸序列进行分子质量、等电点预测。

收稿日期:2015-01-05

项目基金:国家自然科学基金(编号:31301780);黑龙江省博士后科学基金(编号:LBH-Z13036)。

作者简介:王婷婷(1990—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向为分子生物学。E-mail:15104692740@163.com。

通信作者:王傲雪。E-mail:axwang73@163.com。

1.2 系统进化树的构建及保守 motif 的分析

利用拟南芥和番茄的 HSF 氨基酸全序列构建系统发育树,用以研究 HSF 基因家族成员的进化关系。使用 ClustalX 2.0 程序对氨基酸序列进行多序列联配,将结果输出到 MEGA 6. 0 软件中,使用邻接法 (Neighbor - Joining method)<sup>[14]</sup>构建拟南芥和番茄的 HSF 基因家族的系统发育树,Pairwise Deletion 处理缺失数据,P - distance 模型,Bootstrap 检验 1 000 次,去除 Bootstrap 支持率低于 50% 的节点。通过 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>)<sup>[15]</sup>在线分析番茄 *HSF* 基因的保守 motif,motif 的长度设置 2 ~ 200 bp,最多检测 25 个 motif。

1.3 番茄保守基序分析

通过 MEME 工具 (<http://meme.nbcr.net/meme/>)在线分析番茄 *HSF* 基因的保守 motif,保守基序最小长度为 6,最大长度为 50。最大发现数目为 15 个,其他为默认数值。

1.4 染色体定位分析

根据下载的番茄基因组数据库的染色体数据,绘制番茄染色体图;在利用获得的番茄 HSF 基因信息通过 MapDraw V2.1<sup>[16]</sup>绘制 *HSF* 基因在染色体的定位图。

2 结果与分析

2.1 番茄 HSF 基因家族的鉴定

通过对番茄基因组的比对分析,获得 24 条番茄 HSF 基因家族成员 (HSF01 ~ HSF80) (表 1),以蛋白质生化属性分析结果表示。

2.2 番茄热激转录因子基因家族的鉴定

为了全面获得番茄 *HSF* 基因及其蛋白序列分别对番茄基因组数据库 SGN 进行了搜索,将得到的候选基因在 Pfam 和 SMART 数据库中检测其是否含有 HSF 结构域,同时为了验证获得 *HSF* 基因的准确性将其蛋白质序列在数据库 MARCOIL (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/sections/seqanal>)进行 *HSF* 基因专有的卷曲结构检测,最后鉴定获得了 24 个番茄 *HSF* 基因分别将其命名为 SolyHSF01 ~ SolyHSF24。番茄 *HSF* 基因蛋白质编码的长度介于 142 (SolyHSF14) ~ 527 (SolyHSF01)氨基酸之间;理论等电点位于 4. 68 ~ 9. 44 之间,最高的是 SolyHSF14,高达 9. 44,最低等电点为 SolyHSF07,只有 4. 68,这些蛋白从碱性到酸性分布都有。分子量位于 7. 7 ku (SolyHSF01) ~ 16. 62 ku (SolyHSF14)之间。通过亚细胞定位软件分析 *HSF* 基因分布在细胞外、细胞周质、细胞膜外及细胞质 (表 1)。

2.3 番茄 HSF 基因的多重序列比对分析

为了揭示番茄 *HSF* 基因家族的成员之间序列保守性特征,本研究将获得的 24 条 *HSF* 基因的氨基酸序列进行多序列比对,结果发现在所有参加比对的氨基酸序列中包含高度保守的 DNA 结构域 (DNA binding domain)。DBD 结构域位于 *HSF* 基因的 N 端,包含 3 个  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha_1 \sim \alpha_3$ ) 和 4 个  $\beta$  折叠 ( $\beta_1 \sim \beta_4$ )具有特异性识别和精确定位热应激元件的功能,在其他植物中均发现类似现象。采用 ClustalW 在线比对对番茄 DBD 结构域进行多重序列比对,结果 (图 1)表明,24 个番茄 HSF 蛋白都具有高度保守的 DBD 结构域。氨基酸残基在

表 1 番茄 HSF 基因家族信息

基因名称	基因组登录号	染色体分布	氨基酸长度 (aa)	分子量 (ku)	理论等电点	亚细胞定位	染色体位置
<i>HSF01</i>	Solyc08g005170	8	527	57. 7	5. 16	1	111412. . 116839
<i>HSF02</i>	Solyc08g076590	8	490	55. 01	5. 16	1	60544679. . 60548096
<i>HSF03</i>	Solyc03g097120	3	491	54. 03	5. 07	2	59455163. . 59458326
<i>HSF04</i>	Solyc09g065660	6	372	42. 44	5. 28	1,3	63876345. . 63878476
<i>HSF05</i>	Solyc09g082670	9	356	41. 76	5. 38	1,3	68384249. . 68386509
<i>HSF06</i>	Solyc07g040680	7	356	40. 87	5. 33	1,3	49379261. . 49380929
<i>HSF07</i>	Solyc09g059520	9	389	44. 92	4. 68	2	54774492. . 54781832
<i>HSF08</i>	Solyc12g098520	2	478	71. 59	5. 70	3,4	65999627. . 66003357
<i>HSF09</i>	Solyc02g072000	2	408	46. 17	5. 23	2	41325300. . 41327107
<i>HSF10</i>	Solyc07g055710	7	388	44. 38	6. 09	2,3	63648888. . 63650452
<i>HSF11</i>	Solyc03g006000	3	401	46. 08	5. 33	2,4	678142. . 679948
<i>HSF12</i>	Solyc09g009100	9	509	56. 1	4. 82	3	2445341. . 2448016
<i>HSF13</i>	Solyc12g007070	12	369	41. 17	6. 05	1,3,4	1512824. . 1514090
<i>HSF14</i>	Solyc06g053960	6	142	16. 64	9. 44	2	36843611. . 36846535
<i>HSF15</i>	Solyc08g080540	8	325	35. 29	4. 99	3,4	63819869. . 63821278
<i>HSF16</i>	Solyc02g090820	2	301	33. 14	5. 75	3	52302275. . 52305532
<i>HSF17</i>	Solyc04g078770	4	360	40. 93	7. 72	1,2	63433216. . 63444533
<i>HSF18</i>	Solyc04g016000	4	237	27. 57	8. 87	2	6594909. . 6598451
<i>HSF19</i>	Solyc10g079380	10	255	29. 92	7. 59	2,3,4	60929877. . 60931188
<i>HSF20</i>	Solyc03g026020	3	338	37. 39	5. 34	1	3430355. . 3432146
<i>HSF21</i>	Solyc11g064990	11	251	29. 83	7. 29	1,3,4	50306218. . 50308340
<i>HSF22</i>	Solyc02g078340	2	205	24. 24	9. 39	1	43065811. . 43068209
<i>HSF23</i>	Solyc06g072750	6	482	54. 34	5. 32	2,4	44865452. . 44868448
<i>HSF24</i>	Solyc08g062960	8	351	40. 09	4. 92	1	52379995. . 52382001

注:“亚细胞定位”中 1 表示细胞质;2 表示细胞膜外;3 表示细胞外;4 表示细胞周质。

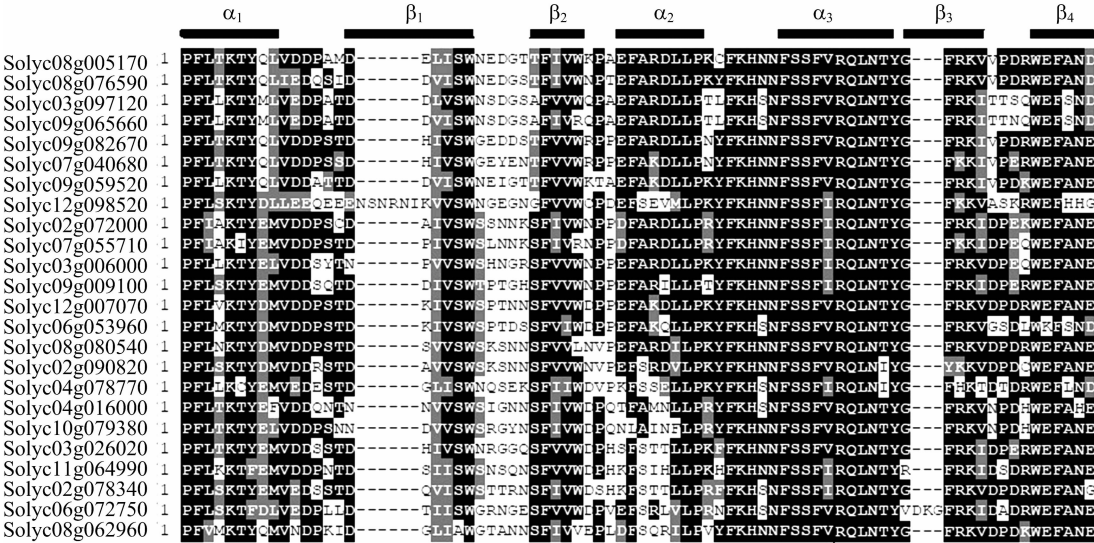


图1 番茄 HSF 蛋白多重序列比对

75 ~ 81 之间,最多的是 Soly02g078340。但是也有少数基因发生了碱基的缺失,其中除了 Soly02g078340、Soly09g009100 外其他基因在  $\beta_1$  和  $\beta_3$  均有缺失,这种缺失可能是番茄 *HSF* 基因的遗传多样化的原因。

2.4 番茄 *HSF* 基因系统发育树的构建及分析

为了揭示番茄 *HSF* 基因在进化过程中的同源关系,将番茄的 24 条 *HSF* 氨基酸序列与模式植物拟南芥的条氨基酸序

列进行聚类分析。结果(图 2)表明,所有的 *HSF* 基因可以分为 3 大类(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ),其中Ⅰ分支可分为 3 个亚类(A、B、C)。在 A 类中番茄的 Soly08g005170、Soly08g076590 与拟南芥中的 AT1G32330、AT4G17750 具有较高的同源性而聚集在一起,其中 Soly08g005170、Soly08g076590 为旁系同源蛋白,而 Soly03g097120、Soly06g072750 分别与拟南芥 AT5G16820、AT3G02990 为直系同源蛋白。在 B 类和 C 类中

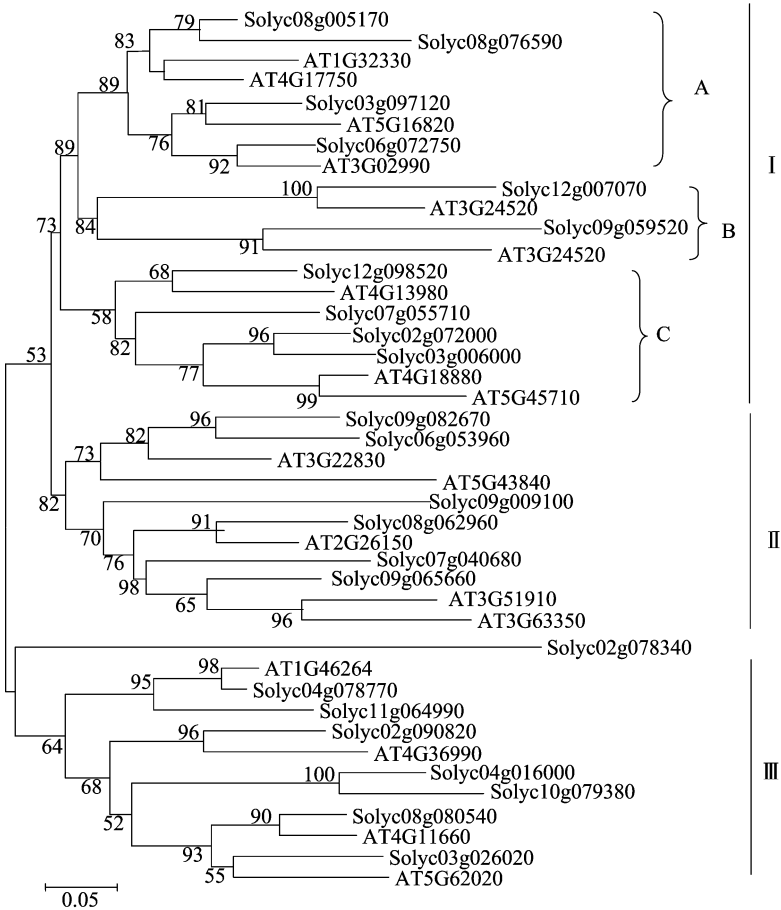


图2 拟南芥和番茄中 HSF 蛋白系统发育树

Solyc12g007070、Solyc09g059520、Solyc12g098520 分别与拟南芥 AT3G24520、AT3G24520、AT4G13980 为直系同源蛋白，Solyc02g072000 与 Solyc03g006000 为旁系同源蛋白，番茄 Solyc07g055710 与 Solyc03g006000、Solyc02g072000，拟南芥 AT4G18880、AT5G45710 有很高的同源性聚集在一起。在Ⅱ分支中，Solyc09g082670、AT3G51910 分别与 Solyc06g053960、AT3G63350 为旁系同源蛋白，AT2G26150 与 Solyc08g062960 为直系同源蛋白。在Ⅲ分支中，Solyc04g078770、Solyc02g090820、Solyc08g080540、Solyc03g026020 分别与 AT1G46264、AT4G36990、AT4G11660、AT5G62020 为直系同源蛋白。番茄 Solyc10g079380 与 Solyc04g016000 为旁系同源蛋白。在番茄的 24 个 *HSF* 基因有 10 对直系同源蛋白，5 对旁系同源蛋白。通过进化关系可以说明 *HSF* 基因在 2 个物种中经历了不同的进化过程。

2.5 番茄 *HSF* 基因的保守基序分析

对番茄 24 个 *HSF* 保守基序的分析结果(图 3)表明,24 个 *HSF* 基因具有 15 个保守基序,长度为 6 ~ 50 个氨基酸(表 2);进一步分析了 15 个保守基序在番茄 HSF 蛋白中的分布情况,结果无一包含所有 15 个保守基序,所有基因中均不同程度存在保守基序的缺失,每个基因保守基序为 4 ~ 13 个。其中,基因 Solyc06g053960.2.1 保守基序缺失最多,只包含 4 个保守基序, Solyc08g005170.2.1、Solyc08g076590.2.1、Solyc03g097120.2.1 含有保守基序最多,包含 13 个保守基序。发现 4 个基序(Motif1、Motif2、Motif3、Motif4)在所有 *HSF* 基因中是完全保守的,这些 *HSF* 基因家族之间具有较高保守型。

2.6 番茄 *HSF* 基因染色体定位

根据番茄基因组测序的数据信息,分析 24 个 *HSF* 基因

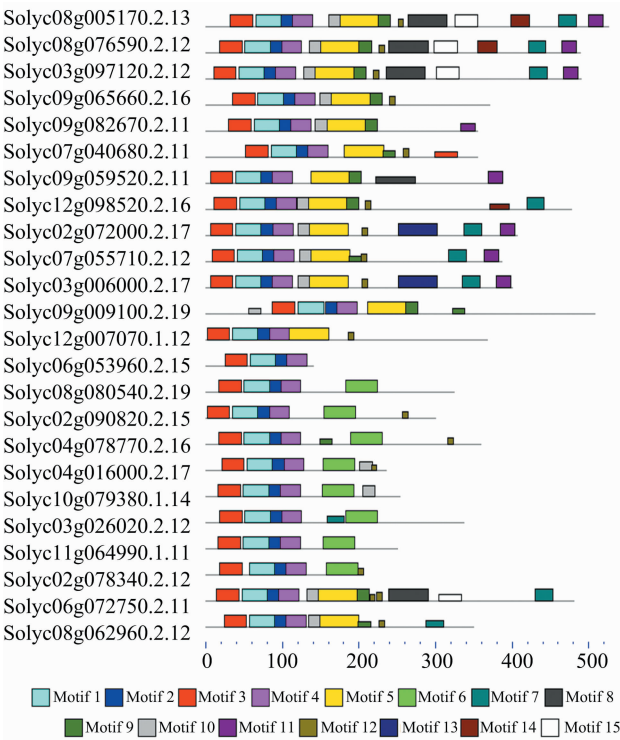


图3 番茄 *HSF* 蛋白的保守基序分布

在染色体上的分布情况。结果(图 4)表明,24 个 *HSF* 基因可以定位在 10 条染色体上,24 条 *HSF* 基因在染色体上的分布并不均匀,其中 8、9 号染色体分布最多均为 4 个,10、11 号染色体分布最少均为 1 个,2、3 号染色体上有 3 个 *HSF* 基因,4、6、7、12 号染色体均有 2 个 *HSF* 基因。

表 2 保守基序序列

基序	宽度	最佳基序匹配
1	33	FVVWDPPEFARDLLPKYFKHNNFFSSFVRQLNTY
2	15	GFRKVPDRWEFANE
3	28	HKNGPPPFLTPTYEMVDDPSTDDIVSWS
4	25	GFLRGQKHLLKNIRRRKPSHSHQSQ
5	50	RLKREKNVLMQELVKLRQQQATENQLQSMTRQLQNMEQRQQQMMSFLAQ
6	40	LVEENERLRKENCVLSELNRMKKLCNDLIYFVSNYVKPP
7	22	VPPGVNDVFWEQFLTETPGSTD
8	50	PVVTPADGQIVRVQDSMNEAAKAMLQQLKLNSPRLNFSNSPESFLTIN
9	15	AMQSPGFLAQLVQQQ
10	15	SCVEVGRFGYEEIE
11	18	GWDNLKNMESLTEQMGHL
12	6	KKRRRLP
13	50	QLESSLTFWEYYLRDVDQTRMRRSSSLQDESTCADSPAISYTQLTVDV
14	24	DMIMPMPSQLQGIVPENNTDVNGT
15	29	RISGVTLQEVSPSTSSQPNLSTSAIAGQS

3 讨论与结论

随着基因组的深入研究,转录因子调控植物基因表达的研究成为现今植物基因功能研究的热点,随着全球变暖气温上升,高温成为影响植物生长及产量的重要因素之一。高温胁迫也为番茄的周年生产带来了困难,选育耐热品种是解决这一难题的主要途径,深入了解和挖掘植物耐热基因是途径之一。近年来,番茄基因组的测序完成为我们在基因组水平

上分析热激转录因子奠定了基础。

通过对番茄基因组进行 Blast 搜索共鉴定出 24 个具有典型 HSF 结构域的热激转录因子,分为 3 个分支,分别包含 10 个、6 个、8 个 *HSF* 基因,每个组中的基因数目都是有差异的,表明番茄 *HSF* 基因家族成员分布不均匀,他们之间存在着广泛的多样性。这些基因的差异性与多样性可能造成 *HSF* 基因功能的多样性,从而为番茄 *HSF* 基因研究提供了资源。

HSF 转录因子 N 端的 DBD 结构域主要负责 HSF 识别热

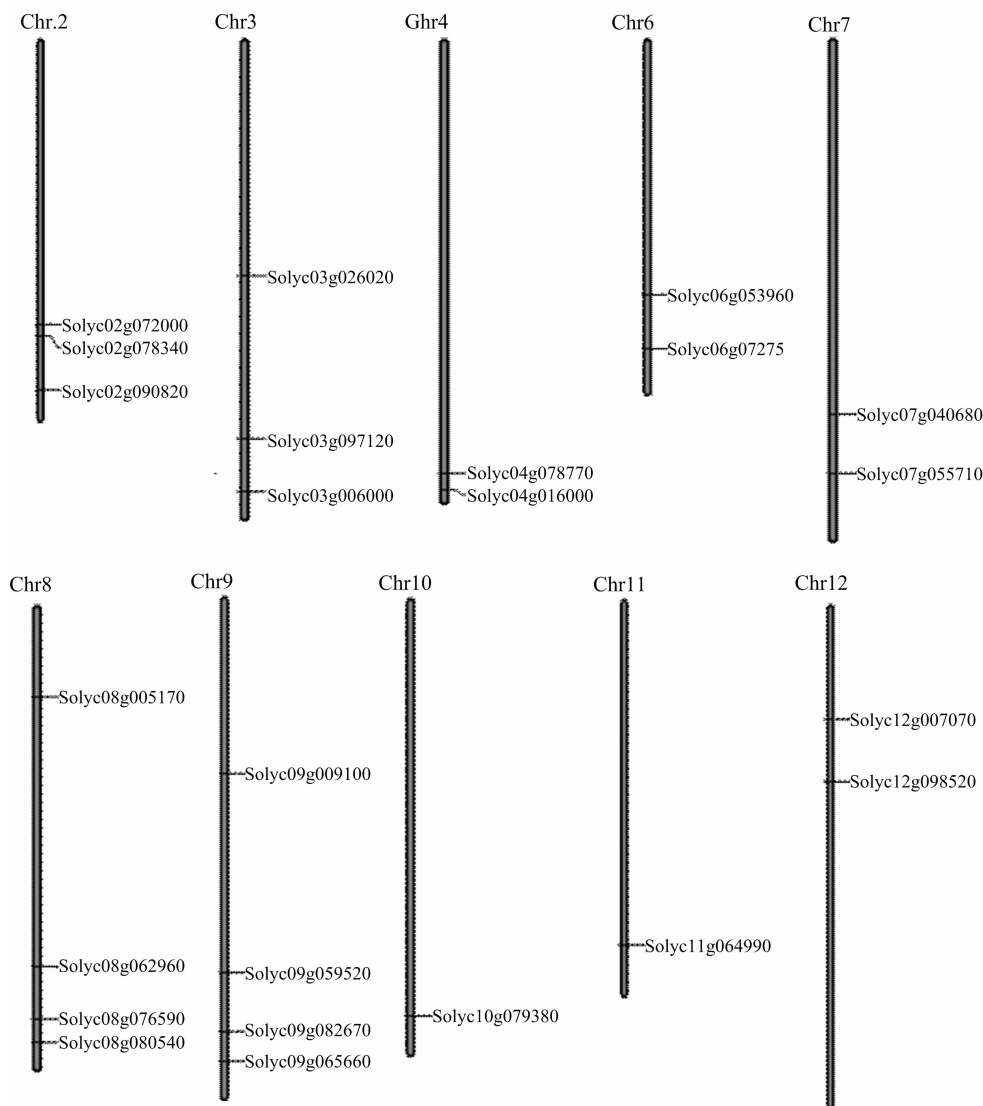


图4 番茄 HSF 基因在染色体上的分布

激元件并与其正确结合,番茄 *HSF* 基因的 DBD 结构域具有高度的保守性,二级结构具有 3 个  $\alpha$  结构和 4 个  $\beta$  折叠组成。从拟南芥与番茄 *HSF* 基因的系统发育关系发现存在 10 对直系同源蛋白和 5 对旁系同源蛋白,表明这些基因家族大部分成员在番茄和拟南芥基因组中按照它们的物种特异性的方式进行了扩展,这种现象在植物其他基因家族中也普遍存在。研究发现番茄 *HSF* 基因以分散的形式存在于 10 条染色体上,表明它们在进化过程中存在片段重复。

近年来,相关研究表明,HSF 不仅参与热胁迫,还参与其他逆境胁迫<sup>[17-18]</sup>,本研究通过对番茄 HSF 蛋白基因家族 24 个成员进行生物信息学分析,及与拟南芥 *HSF* 基因家族聚类分析,为进一步揭示其功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 翁锦周,洪月云. 植物热激转录因子在非生物逆境中的作用[J]. 分子植物育种,2006,5(1):88-94.
- [2] Bharti K, von Koskull - Döring P, Bharti S, et al. Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcrip-

tion coactivator with a histone - like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1[J]. The Plant Cell,2004,16(6):1521-1535.

- [3] 秦丹丹,彭惠茹,倪中福,等. 植物热激转录因子及其与耐热性关系的研究进展[J]. 麦类作物学报,2012,32(1):178-183.
- [4] 欧和生,唐朝枢. 应激活化蛋白激酶研究进展[J]. 国外医学:生理、病理科学与临床分册,1997,17(4):52-54.
- [5] Hübel A, Schöffl F. Arabidopsis heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein[J]. Plant Molecular Biology,1994,26(1):353-362.
- [6] Yamanouchi U, Yano M, Lin Hongxuan, et al. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2002,99(11):7530-7535.
- [7] 易瑾,罗弦,曹兴,等. 百合热激转录因子基因 *LHSF1* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报,2012,39(11):2199-2205.
- [8] 陈先知,王燕,史建磊,等. 黄瓜全基因组热激转录因子(HSFs)的鉴定与表达分析[J]. 遗传,2014,36(4):376-386.
- [9] Baniwal S K, Bharti K, Chan K Y, et al. Heat stress response in

李玉萍,罗凤霞,史慧梅. 春兰与大花蕙兰杂交种原球茎增殖研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):53-55.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.013

# 春兰与大花蕙兰杂交种原球茎增殖研究

李玉萍,罗凤霞,史慧梅

(金陵科技学院园艺学院,江苏南京 210038)

**摘要:**以春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种子萌发所得的原球茎为材料,采用 N6、KC、1/2MS 等 3 种基本培养基配合以 6-BA、KT 和 NAA 的不同浓度设计正交试验,筛选杂交种原球茎增殖的适宜培养基。结果表明:基本培养基是影响杂种后代原球茎增殖的首要因素,N6 增殖效果最好;3 种外源激素对原球茎的增殖率影响都极显著,影响由大到小顺序为 NAA>KT>6-BA,NAA 与 6-BA 浓度为 1:5 或 1:15 的比例,对原球茎增殖效果最好;春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种原球茎增殖最适宜培养基为 N6+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L KT+0.5 mg/L 6-BA 或 N6+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L KT+1.5 mg/L 6-BA。

**关键词:**春兰;大花蕙兰;原球茎;增殖

**中图分类号:**S682.310.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0053-03

杂交育种是兰花育种最重要的方法,利用该方法已培育出 10 万多个洋兰新品种<sup>[1]</sup>。春兰(*Cymbidium goeringii*)为兰属多年生常绿地生草本,花单生,少数 2 朵,花葶直立,花小,直径 4~5 cm,花为浅黄绿色、绿白色、黄白色,香浓。春兰高雅幽香,具有很高的观赏价值,在我国栽培已有 2 000 多年。大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)是以兰属中的一些附生性较强的大花种为亲本获得的人工杂交种,是对兰属中通过人工杂交培育出的色泽艳丽、花朵硕大的品种的一个统称<sup>[2]</sup>。全世界兰属植物近 70 种,中国约 49 种,目前用来作杂交亲本的原生种有近 20 种,主要是大花的附生类以及少量的地生

类<sup>[3]</sup>。兰属植物的果实为蒴果,其形状、大小常因亲本或原生种不同而有较大的差异。但其种子均十分细小,种子内的胚通常发育不完全,且几乎无胚乳,在自然条件下很难萌发,现代育种多采用离体胚培养<sup>[4-7]</sup>。大量扩繁的有利阶段是原球茎的增殖期,本试验采用多因素正交试验,从基本培养基以及外源激素种类及其浓度探讨了春兰与大花蕙兰杂种原球茎增殖的培养基,旨在为春兰与芳香型大花蕙兰杂交育种提供基础。

## 1 材料与方法

以春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种子萌发所得的直径在 0.2~0.3 cm 生长旺盛的原球茎(protocol like-body,简称 PLB)为外植体进行增殖培养,对基本培养基、NAA、6-BA 和 KT 进行 4 因素 3 水平的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,各因素水平见表 1。每处理接种 30 个原球茎,重复 3 次。

通过极差分析法找到较好的增殖培养基,在此基础上调整培养基再次进行 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)正交试验,60 d 后再统计增殖情况,并用 SPSS 统计软件进行方差分析,以邓肯氏(Duncan's)

收稿日期:2014-12-15

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)2021];国家林业局公益性行业科研专项(编号:201304117)。

作者简介:李玉萍(1976—),女,甘肃酒泉人,博士,副教授,主要从事园林植物遗传育种和应用的研究。E-mail:lyp@jit.edu.cn。

通信作者:罗凤霞,硕士,教授,主要从事园林植物遗传育种研究。

E-mail:luofx@jit.edu.cn。

plants;a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors[J]. Journal of Biosciences,2004,29(4):471-487.

[10]Huang B R,Xu C P. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(10):1230-1237.

[11]Finn R D,Bateman A,Clements J,et al. Pfam:the protein families database[J]. Nucleic Acids Research,2014,42:D222-D230.

[12]Letunic I,Doerks T,Bork P. SMART 7:recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research,2012,40:D302-D305.

[13]Wilkins M R,Gasteiger E,Bairoch A,et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology,1999,112(8):531-552.

[14]Yu C S,Lin C J,Hwang J K. Predicting subcellular localization of

proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science,2004,13(5):1402-1406.

[15]Bailey T L,Boden M,Buske F A,et al. MEME SUITE:tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research,2009,37:W202-W208.

[16]刘仁虎,孟金陵. MapDraw,在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传,2003,25(3):317-321.

[17]von Koskull-Doering P,Scharf K D,Nover L. The diversity of plant heat stress transcription factors[J]. Trends in Plant Science,2007,12(7):452-457.

[18]Scharf K D,Berberich T,Ebersberger I,et al. The plant heat stress transcription factor(Hsf) family:structure,function and evolution[J]. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms,2012,1819(2):104-119.