

姚绍嫦, 谭文明, 蓝祖裁, 等. 海南冬青组培快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 22–26.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.007

# 海南冬青组培快繁体系的建立

姚绍嫦<sup>1</sup>, 谭文明<sup>2</sup>, 蓝祖裁<sup>1</sup>, 刘丽辉<sup>1</sup>, 利荣欢<sup>2</sup>, 凌征柱<sup>1</sup>

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 广西万寿堂药业有限公司, 广西南宁 530219)

**摘要:**建立海南冬青(*Ilex hainanensis* Merr.)的组培快繁技术体系。以海南冬青成熟种子为材料,以 MS、1/2MS 为基本培养基,采用正交试验设计法研究不同植物生长调节剂组合对海南冬青种子萌发、初代诱导、增殖培养、生根培养的影响,筛选出组培快繁各环节的最佳培养基配方。研究结果,海南冬青种子萌发的最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L,萌发率达 90% 以上;丛生芽诱导的最适培养基为 MS + 6-BA 3.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,诱导不定芽数为 28.56 个;最佳继代增殖培养基为 MS + 6-BA 2.5 mg/L + KT 0.75 mg/L + NAA 0.1 mg/L,20 d 增殖系数为 7.30;最适的生根培养基为 1/2MS + IBA 0.75 mg/L + NAA 0.5 mg/L,生根率为 91.33%,在菜园土-细河沙(3:1)中移栽成活率为 90%。表明本组培快繁技术体系不但增殖系数高,而且组培苗质量好,可为海南冬青的规模化生产提供优质种苗与技术指导。

**关键词:**海南冬青;组培快繁;丛生芽;正交试验

**中图分类号:**S567.1+90.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0022-04

海南冬青(*Ilex hainanensis* Merr.)为冬青科冬青属常绿小乔木,其干燥叶加工炮制而成的广西少数民族民间草药山绿茶,被收载于《广西中药材标准》(1990 年版)<sup>[1]</sup>,具有清热、解毒、消肿止痛、活血通脉的功效,主要用于降血压、降血脂、降胆固醇以及治疗冠心病、脑血管意外所致的偏瘫、风热感冒、肺热咳嗽、咽喉水肿、扁桃体炎、痢疾等病症<sup>[2]</sup>。以山绿茶为主要原料制成的制剂作为降压、降脂的常用中成药,具有使用量较大、疗效确切、毒副作用小、产品独特等优点,在广西等地区市场占有率高,有较好的经济效益与发展前景。山绿茶是山绿茶降压片、决明山绿茶、山绿茶降压胶囊等产品的主要原料,其中山绿茶降压片已被收载于中药部颁标准(标准编号:WS3-B-2838-98)。目前,山绿茶以采集野生资源为主,随着近年来需求量的不断上升,野生资源已濒临灭绝,难以满足制药企业的需求<sup>[3]</sup>,迫切需要开展人工栽培,但目前对山绿茶的研究主要集中在其制剂的临床疗效<sup>[4-5]</sup>、含量测定和炮制方法<sup>[6-7]</sup>、化学成分与药理活性<sup>[8-9]</sup>等方面,迄今尚未发现海南冬青有关组织培养方面的研究报道。在自然状态下,海南冬青主要依靠种子繁殖,由于果实经常在成熟期被鸟类啄食而造成种子大量损失,以及种子具有休眠特性,在自然状态下萌发率低而导致种子繁殖速度缓慢。为了更好地开发和利用海南冬青,本研究通过组培快繁的技术手段,建立组培快繁的技术体系,为开展海南冬青的规模化人工栽培提供优质种苗与技术指导。

## 1 材料与方法

收稿日期:2014-11-17

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科重 1355001-5-16)。

作者简介:姚绍嫦(1980—),女,广西容县人,硕士,高级工程师,研究方向为药用植物组织培养技术。E-mail:yaoshaochang@163.com。

### 1.1 材料

海南冬青的成熟浆果于 2014 年 10 月采自广西南宁地区武鸣县大明山风景区,标本经广西中医药研究院鉴定为海南冬青(*Ilex hainanensis* Merr.)。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体选择与灭菌** 在海南冬青果实成熟期(每年 10—12 月),选取完全成熟的红色浆果,将果皮搓烂,流水冲洗果皮,挑选沉淀的种子作为外植体进行灭菌。在超净工作台上,用纱布袋将种子包好,用 75% 乙醇(体积分数)浸泡纱布袋 5~10 s 后,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 水溶液(质量分数)分别浸泡 6、8、10、12 min 灭菌种子,用无菌水摇荡洗涤 4 次,用镊子打开纱布袋,再用无菌吸水纸将种子表面水分吸干后,将种子夹起接种到种子萌发培养基上培养。接种后 15 d 统计污染情况。

**1.2.2 种子萌发培养** 将种子接种到含不同质量浓度 6-BA 与 GA<sub>3</sub> 组合的种子萌发培养基上,每处理 10 瓶,每瓶 10 粒种子,记录种子萌发情况,30 d 后统计种子萌发率,筛选出适合打破休眠促进萌发的培养基。

**1.2.3 初代诱导培养** 将萌发的幼苗切取含 2 片真叶的不定芽进行丛生芽诱导培养,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,在 MS 基本培养基上以 6-BA(A)(1.0、2.0、3.0 mg/L)、KT(B)(0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA(C)(0.1、0.2、0.5 mg/L)3 种不同类型的生长调节剂的 3 个水平进行正交试验,对海南冬青丛生芽诱导培养基进行优化,每种培养基 20 瓶,每瓶接种 3 个芽,30 d 统计不定芽诱导数量,比较不同组合诱导不定芽的差异,筛选出适合的初代诱导培养基。

**1.2.4 继代增殖培养** 将初代培养获得的丛生芽切下单个芽进一步转接到继代培养基中进行增殖培养,以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度 6-BA(2.0、2.5、3.0 mg/L)、KT(0.50、0.75、1.00 mg/L)、NAA(0.1 mg/L)组合,每处理 10 瓶,每瓶 3 个芽,观察记录芽的生长情况,20 d 统计增殖情况,

计算芽增殖系数,筛选出继代增殖的最佳培养基。

1.2.5 生根培养 切取长约 2 cm 的不定芽为生根材料,在 1/2MS 基本培养基上,添加不同质量浓度 NAA (0、0.2、0.5 mg/L) 与 IBA(0.050、0.75、1.00 mg/L) 组成 10 个处理,每处理 10 瓶,每瓶 5 个芽,20 d 统计不同处理的生根率与平均生根数,考察 2 种生长素组合对生根的影响。

1.2.6 培养条件 培养基均附加 3.0% 蔗糖和 0.5% 琼脂, pH 值 5.8~6.0,配制分装后,于 121 ℃ 灭菌 20 min。培养条件为 26 ℃、光照强度 2 000 lx、光照时间 10 h/d。

1.2.7 炼苗移栽 待组培苗生根培养 30 d 后进行炼苗移栽,将瓶盖打开炼苗 3~5 d,然后用镊子将瓶苗取出,用流水洗去粘在根部的琼脂,移栽到经过消毒的泥炭土、河沙、菜园土、泥炭土-河沙(3:1)、菜园土-河沙(3:1)5 种不同基质上,移栽后用遮网网遮阴,覆膜保湿,视生长情况逐渐撤去薄膜,20 d 时统计不同基质的移栽成活率。

1.3 数据统计与分析

试验所得数据用 Excel 和 SPSS17.0 方差分析软件处理。萌发率=30 d 后萌发种子数/接种种子数×100%;芽增殖系数=(20 d 后不定芽数量-接种时不定芽数量)/接种时不定芽数量;生根率=生根苗数/接种苗数×100%;平均生根数=总生根数/接种总数;成活率=成活苗数/移栽苗数×100%。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌时间筛选

用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液对海南冬青种子进行灭菌,从表 1 可以看出,用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液灭菌 10 min 以上,效果较好,成功率显著高于用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液灭菌时间少于 10 min 的处理,成功率达 95%。HgCl<sub>2</sub> 作为一种灭菌剂,在对外植体进行灭菌的同时对其生活力也具有一定的伤害作用,灭菌时间越长对其伤害的程度越大,在取得相同灭菌效果的情况下,我们认为灭菌时间越短越有利于外植体生活力的保持。当灭菌时间低于 10 min 时,污染率较高,灭菌 6 min 时外植体全部污染。因此,用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液灭菌 10 min 的效果最佳。

表 1 HgCl<sub>2</sub> 不同灭菌时间对外植体污染率的影响

灭菌时间 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	成功率 (%)
6	20	20	100	0cC
8	20	15	75	25bB
10	20	1	5	95aA
12	20	1	5	95aA

注:同列数据后不同的小写、大写字母分别表示差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ ),表 2、表 5、表 6、表 7 同。

2.2 种子萌发培养

将种子接种到含不同质量浓度 6-BA 与 GA<sub>3</sub> 组合的种子萌发培养基上培养,从表 2 可以看出,灭菌后的种子接种在不同处理的培养基上均能萌发,但是萌发情况差异较大,在添加 GA<sub>3</sub> 的培养基上萌发情况较好,说明 GA<sub>3</sub> 能有效地打破海南冬青种子的休眠,促进种子萌发。随着 GA<sub>3</sub> 浓度的增加,种子萌发率反而出现下降现象,当 6-BA 0.5 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 时,种子初始萌发时间最短,且萌发率最高,达 85%,极显著高于其他处理,达到较好的种子萌发效果。种子在 6-BA 0.5 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 组合的培养基上培养 15 d 后开始萌发,20 d 后胚芽出现,并且开始迅速生长(图 1-A),至 35 d 时,种子苗高已 1~2 cm(具 2 张以上真叶),此时,切取含 2 张真叶的不定芽进行丛生芽诱导培养。因此,适合海南冬青种子萌发的培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L。

表 2 不同植物生长调节剂组合对海南冬青种子萌发的影响

生长调节剂(mg/L)		初始萌发时间 (d)	萌发数 (个)	萌发率 (%)
6-BA	GA <sub>3</sub>			
0.5	0	28	18	18.00eD
1.0	0	26	21	22.00dD
0.5	0.5	15	85	85.00aA
1.0	0.5	17	80	78.33bB
0.5	1.0	19	76	73.00cC
1.0	1.0	20	72	72.33cC

2.3 初代诱导培养

将种子萌发后切取的不定芽转接到以 MS 为基本培养基,不同质量浓度 6-BA 与 NAA 配比的初代诱导培养基上进行丛生芽诱导培养,培养过程中不定芽继续生长,无愈伤组织产生。培养 10 d 后,不定芽的腋芽开始不断分化而形成大量丛生芽(图 1-B),培养 30 d 后,大量丛生芽使得不定芽呈簇状结构,此时可进行继代转接(图 1-C)。

从表 3 可以看出,在初代诱导培养过程中,不同激素组合对海南冬青丛生芽的诱导效果差别很大。在 6-BA 3.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合下,不定芽数量最多,达到 28.56 个。正交试验设计的极差 R 大小决定各生长调节剂对不定芽诱导影响程度依次为 A>B>C,即 6-BA>KT>NAA,最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>。由方差分析可知,6-BA 对丛生芽的诱导作用达到显著水平,KT、NAA 对丛生芽的诱导作用均不显著(表 4)。因此,6-BA 为主要因素,KT、NAA 为次要因素。在 6-BA 浓度保持在 0~3.0 mg/L 之间时,不定芽数量与浓度成正比,适当高浓度的 6-BA 对丛生芽的产生起到积极作用。从不定芽生长状况来看,各处理均



A—种子萌发;B—不定芽培养 10 d 后的丛生芽;C—不定芽培养 30 d 后的丛生芽

图 1 海南冬青种子萌发与初代诱导培养

表 3 海南冬青丛生芽诱导培养基的正交试验设计与结果

序号	激素浓度 (mg/L)			误差列	不定芽数量 (个)
	A: 6-BA	B: KT	C: NAA		
1	1.00	0.50	0.10	1	5.59
2	1.00	1.00	0.20	2	6.83
3	1.00	1.50	0.50	3	7.48
4	2.00	0.50	0.20	3	13.68
5	2.00	1.00	0.50	1	14.21
6	2.00	1.50	0.10	2	16.36
7	3.00	0.50	0.50	2	23.27
8	3.00	1.00	0.10	3	28.56
9	3.00	1.50	0.20	1	25.47
$k_1$	6.633	14.180	16.837	15.090	
$k_2$	14.750	16.533	15.327	15.487	
$k_3$	25.767	16.437	14.987	16.573	
R	19.134	2.353	1.850	1.483	

表 4 丛生芽诱导培养基方差分析

因素	离差平方和	自由度	均方	F 临界值	显著性
6-BA	553.332	2.000	156.397	19.000	*
KT	10.640	2.000	3.007	19.000	
NAA	5.818	2.000	1.644	19.000	
误差	3.540	2.000	0.159		

注：“\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

无玻璃化现象发生,6-BA 3.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 处理组合不定芽长势明显比其他处理强,因此,综合考虑正交试验结果与不定芽生长状况,采用 6-BA 3.0 mg/L、KT 1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 组合,以此组合进行海南冬青丛生芽诱导可获得不定芽更多的数量与更优的品质。

2.4 继代增殖培养

将初代培养获得的丛生芽切下单个不定芽转接到继代培养基中进行增殖培养,在充分考虑初代诱导培养基中各激素影响的情况下,以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度 6-BA、KT 与 0.1 mg/L NAA 组合,对继代增殖培养基进行优化。

从表 5 可以看出,不同质量浓度的 6-BA 与 KT 组合获得的芽增殖系数差异较大,6-BA 是增加芽增殖系数的主导因素,当 6-BA 浓度为 2.5 mg/L 时,与不同浓度的 KT 组合均获得较高的芽增殖系数,其中以 6-BA 2.5 mg/L + KT 0.75 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合获得最好的效果,培养 20 d 后实现芽增殖系数 7.30 倍,极显著高于其他处理,且不定芽生长健壮,展叶良好,长势快,有利于下一步生根诱导(图 2-A)。当 6-BA 浓度增加到 3.0 mg/L 时,芽增殖系数反而出现下降的现象,且不定芽的质量也有所下降,丛生芽容易出现簇状而抑制了芽的伸长生长,不利于下一步生根培养(图 2-B)。当 6-BA 浓度相同时,KT 浓度的增加对芽增殖系数的影响差异不大。因此,MS + 6-BA 2.5 mg/L + KT 0.75 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基是最适宜海南冬青丛生芽增殖的培养基。

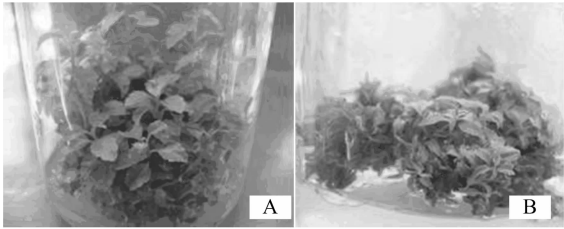
2.5 生根培养

切取长约 2 cm 的不定芽为生根材料,在 1/2MS 基本培养基上添加不同浓度 NAA 或 IBA 进行生根培养,20 d 后统计生根率及平均生根数(表 6)。不定芽转接 7 d 后根原基开始形成,20 d 后苗生长良好,根长且粗壮,茎基部无愈伤组织产

表 5 不同质量浓度 6-BA、KT、NAA 对不定芽增殖的影响

激素浓度 (mg/L)			芽增殖系数
6-BA	KT	NAA	
2.0	0.50	0.1	3.56gF
2.0	0.75	0.1	3.74fE
2.0	1.00	0.1	3.50gF
2.5	0.50	0.1	6.52cC
2.5	0.75	0.1	7.30aA
2.5	1.00	0.1	6.74bB
3.0	0.50	0.1	6.46cC
3.0	0.75	0.1	5.98D
3.0	1.00	0.1	5.85eD

注:每处理接种数为 30 个芽。



A—6-BA 2.5 mg/L 增殖的丛生芽; B—6-BA 3.0 mg/L 增殖的丛生芽

图2 海南冬青的继代增殖培养

生。不同浓度生长调节剂组合对不定芽生根率的影响较明显,IBA 浓度相同时,NAA 浓度增加对生根率与平均生根数的增加均有促进作用,根较细长。2 种生长素同时添加出现了促进生根的叠加效应,生根率、平均根数均比单独使用 IBA 时高,当 IBA 0.75 mg/L + NAA 0.5 mg/L 组合时,生根率为 91.33%,平均生根数为 5.90 条,二者均达到最大值,极显著高于其他处理,且根粗壮、发达,有利于下一步移栽成活(图 3-A、图 3-B)。因此,1/2MS + IBA 0.75 mg/L + NAA 0.5 mg/L 较适合海南冬青诱导生根。

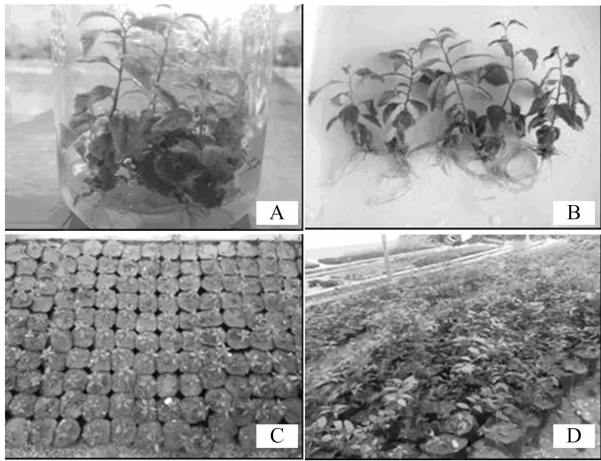
表 6 不同质量浓度 IBA 与 NAA 组合对试管苗生根的影响

生长调节剂 (mg/L)		生根率 (%)	平均生根数 (条)
IBA	NAA		
0	0	0.00gG	0.00hH
0.5	0	54.67fF	2.00gG
0.5	0.2	74.00cC	3.57dD
0.5	0.5	85.33bB	4.29bB
0.75	0	62.00eE	3.24fF
0.75	0.2	76.00cC	3.34eEF
0.75	0.5	91.33aA	5.90aA
1.0	0	68.00dD	3.40eE
1.0	0.2	76.00cC	3.42eE
1.0	0.5	88.00abAB	3.82cC

注:每处理接种数为 50 个。

2.6 试管苗的移栽

待组培苗生根培养 30 d 后进行炼苗移栽。从表 7 可以看出,试管苗在不同基质上的成活率由高到低依次为菜园土-河沙(3:1) > 菜园土 > 泥炭土 > 泥炭土-河沙(3:1) > 河沙,其中,试管苗在菜园土-河沙(3:1)的基质中移栽 30 d 后成活率达到 90%(图 3-C),极显著高于其他处理。移栽 180 d 后,植株高超过 15 cm,生长良好(图 3-D),可进行大田移栽。因此,试管苗移栽最适宜的基质为菜园土-河沙(3:1)。



A—培养 20 d 的生根苗；B—炼苗 3 d 后的生根苗；  
C—移栽 30 d 后的试管苗；D—移栽 180 d 后的试管苗

图3 海南冬青瓶苗生根及移栽

表 7 不同基质对海南冬青试管苗移栽的影响

基质种类	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)
泥炭土	50	31	62cC
河沙	50	16	32eE
菜园土	50	37	74bB
泥炭土—河沙(3:1)	50	28	56dD
菜园土—河沙(3:1)	50	45	90aA

3 讨论

多数冬青属植物的种子具有休眠特性而影响其快速繁育,其休眠期长短因种而异,如大叶冬青(*Ilex latifolia*)种子的休眠期长达 3 年<sup>[10]</sup>。本课题组在前期研究中发现海南冬青种子具有短暂的休眠期,秋季采集的种子需在 4℃低温贮藏 3 个月方可有效解除休眠<sup>[3]</sup>。本试验中,为了解除海南冬青新鲜种子的休眠,我们在种子萌发培养基中添加 GA<sub>3</sub>,结果表明,GA<sub>3</sub> 能有效地打破海南冬青种子的休眠,促进种子萌发,当 6-BA 0.5 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 时,种子初始萌发时间最短,且萌发率最高,达 85%,达到较好的种子萌发效果,与前人采用 GA<sub>3</sub> 在解除大果冬青与狭叶冬青等同属植物的种子休眠上取得较好的积极作用的研究结果<sup>[11-12]</sup>一致。

在植物组织培养中,外植体初代诱导的结果除了与外植体本身取材有关,也与培养过程中使用的生长调节剂密切相关<sup>[13]</sup>。目前尚未发现海南冬青组织培养方面的研究报道,同属植物组织培养方面,研究报道也较少。王慧瑜等以大叶冬青当年生嫩枝为外植体,以 BA 与 NAA 或者 IBA 组合实现了丛生芽的诱导与增殖培养<sup>[14]</sup>。杨灿等以红果冬青的茎段进行组培试验,诱导出丛生芽,并在低浓度的 BA 与 KT 配合下实现芽的继代增殖<sup>[15]</sup>。同属植物多数是以茎段为外植体直接诱导不定芽,我们前期研究发现,海南冬青植株内含多酚类物质较多,选用其嫩芽或者带芽茎段作为外植体十分容易褐化而不利于不定芽诱导,种子是较理想的外植体材料,具有容易消毒、生长力旺盛的特点。本试验采用种子萌发形成的无菌苗切去根部后作为材料进行不定芽的诱导与增殖。植物生长调节剂种类和质量浓度对海南冬青的不定芽诱导与增殖有

较大影响。使用 6-BA、KT 与 NAA 组合进行初代诱导与继代增殖筛选,6-BA 对丛生芽的诱导作用达到显著水平,是海南冬青丛生芽形成与增殖的关键因素,其中以 6-BA 3.0 mg/L 的诱导作用最强,在一定范围内不定芽的诱导数量与增殖系数随着 6-BA 浓度的增加而增加。KT 作为促进侧芽发生发育的外源性细胞分裂素,组织培养中主要用于促进细胞分裂和分化,与五指毛桃<sup>[16]</sup>类似,在培养基中配合使用低浓度的 KT 对海南冬青不定芽的诱导与增殖均具有较大的促进效应。高浓度的细胞分裂素与低浓度的 NAA 配合使用,有利于不定芽的分化,NAA 0.1 mg/L 与高浓度的 6-BA、KT 组合时达到较好的效果,与杨灿等在红果冬青的研究结果相符。在本试验中,以种子萌发产生的无菌苗进行丛生芽诱导,成功诱导出较多的不定芽(不定芽数量 28.56 个),幼小的不定芽继代培养 20 d 后又获得 7.30 的增殖系数,而且在培养过程中无愈伤组织产生,实现了以芽繁芽的技术特点,在有效减少变异的同时大大提高了繁殖的速度。

海南冬青不定芽在附加不同质量浓度 IBA 或 NAA 的 1/2MS 培养基上均可生根,且 2 种生长素同时添加出现了促进生根的叠加效应,其中较适宜的生根培养基为 1/2MS + IBA 0.75 mg/L + NAA 0.5 mg/L,培养 20 d 后可以获得再生植株,生根率达 91.33%。在不添加生长素类植物生长调节剂的空白对照中,未发现生根,说明生长素类对海南冬青生根起到了促进作用。基质的选择对于试管苗的移栽成功与否也十分重要,适宜基质可以确保较高的试管苗移栽成活率。菜园土肥力较高,团粒结构好,但是干时表层易板结,湿时通气透水性差;河沙通气透水性较好,但是肥力与保水性较差。本试验把这 2 种基质按 3:1 的比例混合,可有效弥补这 2 种基质的不足,在海南冬青试管苗移栽上取得了较好的效果,移栽成活率达到 90%。

利用组织培养技术能生产优质种苗,但组培苗能否在生产上迅速应用推广,与其移栽的便捷性、成活率、培养成本等密切相关<sup>[17]</sup>。本研究通过对海南冬青组培快繁过程中各环节的影响因子进行试验与优化,筛选出海南冬青种子萌发、不定芽诱导、增殖、生根培养的最佳培养基,建立了海南冬青组培快繁的技术体系,研究结果具有扩繁系数大、栽培管理便捷、成活率高、成本低等优点,能短时间内生产出大量海南冬青优质种苗,具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(1990 年版)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:137-138.  
[2] 周思祥. 山绿茶的化学成分和生物活性研究[D]. 北京:中国协和医科大学、中国医学科学院,2007:15.  
[3] 姚绍嫔,蓝祖祚,谭文明,等. 山绿茶种子萌发特性研究[J]. 种子,2015,34(3):47-50.  
[4] 陈 勇,甄汉深,李耀华,等. 山绿茶不同炮制品的质量研究[J]. 中成药,2005,27(7):786-790.  
[5] 陈 勇,李艳荃,李 立. HPLC 法测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量[J]. 广西科学院学报,2006,22(增刊 1):416-418,421.  
[6] 藏 吾,马明彦. 山绿茶降压片治疗原发性高血压的疗效观察[J]. 中成药,1997,19(12):21-22.

冯立娟,焦其庆,尹燕雷,等. 石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):26-29.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.008

# 石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析

冯立娟<sup>1</sup>, 焦其庆<sup>1</sup>, 尹燕雷<sup>1</sup>, 李甲梁<sup>2</sup>

(1. 山东省果树研究所, 山东泰安 271000; 2. 枣庄市农业科学研究院, 山东枣庄 277300)

**摘要:**以泰山红石榴果实为试验材料,利用逆转录 PCR(RT-PCR)技术扩增出 980 bp 大小的中间片段,用 3'cDNA 末端快速扩增 PCR(RACE PCR)获得 *DHQ/SDH* 基因的 3'端,拼接后获得 1 585 bp 的 cDNA 片段。结果表明,该基因含有 1 265 bp 编码序列(CDS),编码 421 个氨基酸,其氨基酸序列与苹果(注册号:XP\_008370537.1)、葡萄(注册号:XP\_002270232.1)、白梨(注册号:XP\_009335660.1)的同源性分别为 82%、84%、82%;蛋白质理论分子质量为 133 682.2 u,等电点为 5.01,含量最丰富的氨基酸是丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr),具有 DHQase I、SDH(AroE)2 个保守结构域,为亲水性蛋白;二级结构主要由无规则卷曲(31.12%)、 $\alpha$ -螺旋(30.17%)、伸展链(24.94%)和  $\beta$ -转角(13.78%)组成;GenBank 登录号为 KU133479。

**关键词:**石榴;*DHQ/SDH* 基因;克隆;序列分析

**中图分类号:** S665.401;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0026-04

石榴(*Punica granatum* L.)是一种重要的功能性水果,富含类黄酮、酚酸和鞣花单宁等可溶性酚类物质,市场发展前景广阔<sup>[1]</sup>。没食子酸是石榴果实中重要的酚类物质,具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、抗炎抗菌<sup>[4-5]</sup>等诸多功效,生物学效应广泛<sup>[6]</sup>。莽草酸途径在植物次生代谢途径中起到中心作用,可为其他次生代谢途径提供底物。研究表明,没食子酸主要通过莽草酸途径生成的 3-脱氢莽草酸代谢生成<sup>[7-8]</sup>。

脱氢奎尼酸脱氢酶(3-dehydroquinate dehydratase,简称 DHQ)、莽草酸脱氢酶(shikimate dehydrogenase,简称 SDH)分别催化莽草酸途径中的第 3、第 4 步反应,在大多数微生物中,DHQ、SDH 是单功能的,但是在植物中,DHQ、SDH 可以融合,形成具有 2 种功能的酶<sup>[9]</sup>。3-脱氢奎尼酸脱氢酶(EC4.2.1.10)/莽草酸脱氢酶(EC1.1.1.25)双功能酶(bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydro-

genase,简称 DHQ/SDH)能催化 3-脱氢奎尼酸脱水生成 3-脱氢莽草酸,也能催化 3-脱氢莽草酸、莽草酸之间的可逆还原反应,是没食子酸代谢途径中的关键调控酶<sup>[10]</sup>。编码 SDH 结构基因 *aroE* 的克隆、表达分析和功能鉴定在结核杆菌<sup>[11-12]</sup>、谷氨酸棒杆菌<sup>[13]</sup>中已有报道。*DHQ/SDH* 基因 cDNA 的片段或全长序列已在豌豆<sup>[14]</sup>、烟草<sup>[15]</sup>、番茄<sup>[16]</sup>等植物中被克隆出来,通过全基因组测序推测苹果、葡萄、白梨、桃等果树 *DHQ/SDH* 基因的片段或全长已在 GenBank 上注册,但是关于石榴中 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析等方面的研究在国内外尚未见报道。因此,本研究以山东省主栽石榴品种泰山红为试验材料,利用逆转录 PCR(RT-PCR)技术克隆 *DHQ/SDH* 基因,对其进行生物信息学分析,从而为揭示石榴果实中没食子酸代谢的分子机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2015 年 6—9 月在山东省果树研究所进行。以泰山红石榴果实为试验材料,将其定植于山东省果树研究所石榴种质资源圃。于幼果期(果实直径 2~3 cm)采集石榴果实,洗净擦干后,用削皮刀取果皮,在液氮中速冻后放入 -80 ℃ 冰箱保存备用。

收稿日期:2015-11-17

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014YL022、ZR2015YL056);山东省果树研究所所长基金(编号:2013KY04)。

作者简介:冯立娟(1982—),女,山东聊城人,博士,助理研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:flj\_19820227@163.com。  
通信作者:尹燕雷,硕士,副研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:yylei66@sina.com。

[7]唐耀平,刘 鹰,方显明. 山绿茶治疗老年单纯收缩期高血压 80 例分析[J]. 中医药学刊,2004,22(8):1502-1503.

[8]解军波,李 萍. 冬青属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2002,33(1):85-88.

[9]程齐来,李洪亮,彭金年. 山绿茶化学成分的研究[J]. 光谱实验室,2010,27(1):131-134.

[10]张 蕊,王秀花,章建红,等. 3 种冬青属种子休眠过程中的生理变化[J]. 浙江林学院学报,2010,27(4):524-528.

[11]徐本美,史晓华,孙涛涛,等. 大果冬青种子的休眠与萌发初探[J]. 种子,2002(3):1-2,5.

[12]何彦峰. 狭叶冬青种子休眠与萌发的研究[J]. 浙江林业科技,

2008,28(3):63-65.

[13]朱丽芳,史 俊,朱再标,等. 老鸦瓣芽茎组织培养初步研究[J]. 中草药,2014,45(4):563-568.

[14]王慧瑜,张晓申,赵海红,等. 大叶冬青组培快繁技术研究[J]. 农业科技通讯,2012(10):69-70.

[15]杨 灿,陈丽洁,黄小辉,等. 红果冬青组培快繁技术研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2014,34(4):356-359.

[16]李林轩,吴庆华,蔡锦源,等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药,2014,45(17):2547-2551.

[17]叶祖云,阮少江,杨卓飞. 四倍体太子参种苗繁育技术体系的建立[J]. 中药材,2011,34(3):340-342.