

曹艳春,赵振利. 夏蜡梅体外植株再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):39-41.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.009

夏蜡梅体外植株再生体系的建立

曹艳春¹, 赵振利²

(1. 河南职业技术学院, 河南郑州 450046; 2. 河南农业大学, 河南郑州 450002)

摘要:以夏蜡梅幼嫩叶片为材料进行组织培养,研究建立其体外植株再生体系。结果表明,夏蜡梅叶片愈伤组织、芽、根诱导的最适培养基分别为 MS + 0.9 mg/L NAA + 2 mg/L 6-BA、MS + 0.9 mg/L NAA + 2 mg/L 6-BA、1/2MS + 0.3 mg/L NAA, 这为夏蜡梅的快速繁殖及工厂化生产奠定基础。

关键词:夏蜡梅; 体外植株; 培养基; 再生; 愈伤组织

中图分类号: S685.990.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0039-02

夏蜡梅(*Calycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang)为蜡梅科夏蜡梅属落叶灌木,是国家二级保护植物,其花形奇特、色彩淡雅,观赏价值高,是一种在园林绿地中常用的花灌木。夏蜡梅初开之花有解暑、清热、理气、止咳等功效,花、根可治胃痛,叶含有挥发性的芳香油,因此,夏蜡梅具有广阔的开发利用前景。目前,生产上夏蜡梅主要靠种子繁殖,由于其繁殖率低、育苗周期长,根本满足不了生产和科研需要,而国内外对夏蜡梅的研究主要集中在营养器官解剖、逆境胁迫对幼苗生理生态特性的影响等^[1-4],利用茎段进行组织培养的研究相对较少^[5-6],且存在繁殖系数低、组培系统不完善等问题。本研究利用夏蜡梅幼苗叶片,通过筛选其组织培养的基本培养基、植物生长调节剂种类、水平及使用比例,建立其高效的体外植株再生体系,为其新品种培育、分子生物学研究和工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2年生夏蜡梅健康植株,由河南省中牟县白沙镇蜡梅资源圃提供,取其幼嫩叶片作为外植体进行组织培养,建立体外植株再生体系。

1.2 试验方法

1.2.1 夏蜡梅外植体的预培养 将采集的夏蜡梅幼嫩叶片用 75% 乙醇(酒精)消毒 30 s,无菌水清洗 3 次;用 0.1% 氯化汞消毒 5 min,用无菌水清洗 3 次;接种于含有植物激素的 MS 基本培养基(含蔗糖 20 g/L、琼脂粉 4.6 g/L)上,在温度为 25 ± 2 ℃、光照强度为 130 μmol/(m² · s)、光照时间为 16 h/d 的培养室内培养。组织培养条件下同。

1.2.2 夏蜡梅叶片愈伤组织的诱导 以 MS 为基本培养基(蔗糖质量浓度为 20 g/L、琼脂粉质量浓度为 4.6 g/L、聚乙

烯吡咯烷酮质量浓度为 1.5 g/L),分别添加浓度梯度为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.1 mg/L 的萘乙酸(NAA)和浓度梯度为 2、4、6、8、10 mg/L 的 6-苄基腺嘌呤(6-BA,简称 6-BA);将夏蜡梅预培养的叶片切成约 1.0 cm × 1.0 cm 的小块,接种于培养基上,培养室内进行愈伤组织的诱导,每组合 20 瓶,每瓶 3 个外植体;每隔 10 d 统计 1 次愈伤组织诱导率,第 50 天时根据愈伤组织诱导率的大小确定叶片愈伤组织诱导的最适培养基。愈伤组织诱导率 = (诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) × 100%。

1.2.3 夏蜡梅芽的诱导 将诱导产生的夏蜡梅愈伤组织,接种到 MS 添加不同浓度 NAA、6-BA 的芽诱导培养基上, NAA、6-BA 浓度设置与愈伤组织诱导相同,培养室内进行芽的诱导培养,每组合 20 瓶,每瓶 3 块;第 30 天时观察芽的分化情况,以诱导出的芽肉眼可清晰分辨为标准,计算芽的诱导率,确定芽诱导的最适培养基。芽诱导率 = (诱导出芽的外植体数/接种的外植体数) × 100%。

1.2.4 夏蜡梅根的诱导 诱导出的芽长到约 3 cm 高时,从茎基部剪下,转接到添加浓度梯度为 0.1、0.3、0.5 mg/L NAA 的 1/2 MS 生根培养基上,培养室内培养,观察生根情况,第 20 天时统计其生根率,筛选出夏蜡梅根诱导的最适培养基。根诱导率 = (生根的幼芽数/接种的幼芽总数) × 100%。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行分析,采用 LSR 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对夏蜡梅叶片愈伤组织诱导的影响

由表 1 可见,不同激素组合培养基对夏蜡梅叶片愈伤组织(图 1-A)的诱导差异明显;NAA 质量浓度为 0.1 ~ 1.1 mg/L 时,随 6-BA 浓度的升高,夏蜡梅叶片愈伤组织的诱导率逐渐减小,其中,NAA 质量浓度为 0.9 ~ 1.1 mg/L 时,随 6-BA 质量浓度的升高,夏蜡梅叶片愈伤组织的褐化情况逐渐加重;培养基为 MS + 0.9 mg/L NAA + 2 mg/L 6-BA 时,夏蜡梅叶片愈伤组织的诱导率相对最大,为 100.00%,该培养基作为夏蜡梅叶片愈伤组织诱导的最适培养基。

收稿日期:2016-05-11

基金项目:国家公益性行业(林业)科研专项(编号:200904009)。

作者简介:曹艳春(1980—),女,河南商丘人,讲师,从事园林植物保护研究。E-mail: cyc800218@126.com。

通信作者:赵振利,副教授,从事森林培育学研究。E-mail: zhaozh2006@126.com。

表 1 不同激素组合对夏蜡梅愈伤组织、芽诱导的影响

植物激素浓度 (mg/L)		愈伤组织诱导率 (%)	芽诱导率 (%)
NAA	6-BA		
0.1	2	37.67d	0.00i
0.1	4	27.00e	0.00i
0.1	6	10.00f	0.00i
0.1	8	0.00g	0.00i
0.1	10	0.00g	0.00i
0.1	12	0.00g	0.00i
0.3	2	90.23a	0.00i
0.3	4	69.67b	0.00i
0.3	6	52.33c	0.00i
0.3	8	0.00g	30.33d
0.3	10	0.00g	24.42e
0.3	12	0.00g	0.00i
0.5	2	97.67a	22.67e
0.5	4	90.33a	16.33f
0.5	6	11.58f	9.33g
0.5	8	0.00g	5.67h
0.5	10	0.00g	0.00i
0.5	12	0.00g	0.00i
0.7	2	94.28a	51.67a
0.7	4	92.42a	48.46b
0.7	6	89.33a	38.67c
0.7	8	80.33a	11.33g
0.7	10	52.33c	0.00i
0.7	12	0.00g	0.00i
0.9	2	100.00a	59.67a
0.9	4	94.67a	55.68a
0.9	6	60.28b	43.67b
0.9	8	0.00g	36.57c
0.9	10	0.00g	0.00i
0.9	12	0.00g	0.00i
1.1	2	28.20e	19.67e
1.1	4	13.33f	7.48h
1.1	6	0.00g	0.00i
1.1	8	0.00g	0.00i
1.1	10	0.00g	0.00i
1.1	12	0.00g	0.00i

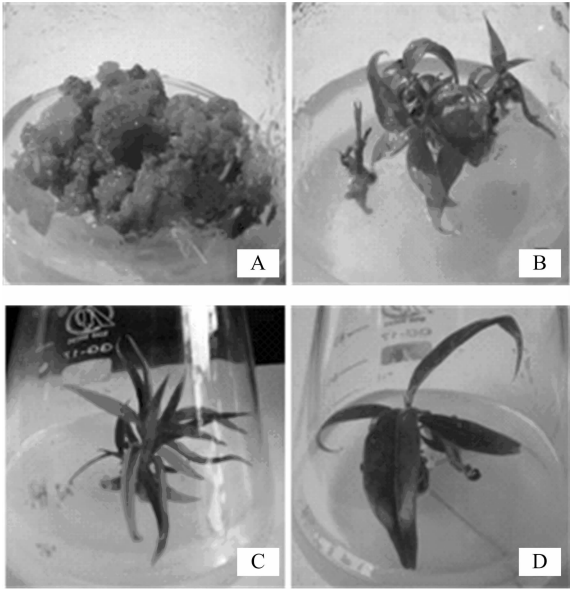
注:表中数据为 2 次重复的平均值;同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

2.2 不同激素组合对夏蜡梅芽诱导的影响

由表 1 可见,NAA 质量浓度为 0.5~1.1 mg/L 时,随 6-BA 质量浓度的升高,叶片芽诱导率逐渐减小,其中,培养基组合为 MS+0.9 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA 时芽的诱导率相对最大,为 59.67%,说明夏蜡梅愈伤组织芽诱导(图 1-B)的最适培养基为 MS+0.9 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA。

2.3 不同激素浓度对夏蜡梅根诱导的影响

由表 2 可见,夏蜡梅芽在没有添加 NAA 的 1/2MS 培养基上也可诱导出根(图 1-C),生根率为 100.00%,但诱导出根的条数相对较少,为 3 条;培养基 1/2MS+0.3 mg/L NAA 诱导出根的条数相对最多、根长相对相对最长,分别为 6 条、3.0 cm,并可形成完整植株(图 1-D),可作为夏蜡梅生根的最适培养基。



A—叶片愈伤组织; B—芽诱导; C—根诱导; D—完整植株

图1 夏蜡梅体外植株再生体系建立

表 2 不同激素浓度对夏蜡梅生根的影响

NAA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)
0.0	100.0	3	2.5
0.1	100.0	3	2.2
0.3	100.0	6	3.0
0.5	100.0	5	2.4

3 结论与讨论

植物体外植株再生与植物品种、基因型和培养条件密切相关。一般情况下,植物基因型在分类学中的亲缘关系越远,体外植株再生体系所需植物生长调节物质的种类和浓度差异就越大^[7-9]。前人用夏蜡梅茎段培养时发现,茎段在培养过程中周围培养基有变绿现象,可能为叶绿体的渗透,同时随培养时间的增长,茎段上皮孔增大,有粉末状物质溢出,影响芽的增殖和分化^[5]。本研究以夏蜡梅幼嫩叶片为材料,在基本培养基中添加植物生长调节物质,筛选出愈伤组织、芽、根诱导的适宜培养基组合分别为 MS+0.9 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA、MS+0.9 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA、1/2MS+0.3 mg/L NAA。研究中发现,当 NAA 质量浓度一致时,随 6-BA 质量浓度的升高,夏蜡梅愈伤组织的诱导率呈下降趋势,这与张变莉等结论^[10-11]吻合;加入 NAA 对根诱导有一定的促进作用,能够增加根的数量,提高根的质量。

参考文献:

[1] 陈模舜,柯世省. 濒危植物夏蜡梅营养器官的解剖结构特征[J]. 植物资源与环境学报,2010,19(3):37-41.
[2] 汪琼,史云云,姚青菊,等. 夏蜡梅和美国蜡梅及属间杂种“红运”营养器官解剖结构特征比较[J]. 植物资源与环境学报,2011,20(3):62-68.
[3] 彭礼琼,金则新,王强. 模拟酸雨对濒危物种夏蜡梅幼苗生理生态特性的影响[J]. 植物研究,2013,33(2):202-207.

杨佳栋,刘月琴,张英杰. 不同哺乳动物 *GDF9* 密码子偏性及聚类分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):41-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.010

不同哺乳动物 *GDF9* 密码子偏性及聚类分析

杨佳栋,刘月琴,张英杰

(河北农业大学动物科技学院,河北保定 071000)

摘要:为更好地认识哺乳动物 *GDF9* 基因在长期进化过程中为适应环境形成的密码子使用模式,通过 CodonW 软件计算不同哺乳动物 *GDF9* 基因的密码子偏性指标,利用 SPSS 软件对密码子偏好性影响因素的相关性进行分析,结合密码子偏性和最小进化法分析其亲缘关系。GCT、TGT、TTT、ATT、CCT、AGA、ACT 为哺乳动物 *GDF9* 基因的最优密码子,该基因偏爱使用以 A 或 T 结尾的密码子;G、C 含量和蛋白质亲水性是影响 *GDF9* 基因密码子偏性的主要因素;聚类分析提示不同哺乳动物间的同源性越高,*GDF9* 基因密码子使用特征的相似性越高。

关键词:哺乳动物;*GDF9*;碱基替换;密码子偏性;聚类分析

中图分类号: Q755 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0041-05

在雌性哺乳动物整个生殖周期过程中,卵母细胞只能来源于原始卵泡库^[1]。有研究表明,原始卵泡形成过程受激素、转录因子和相关通路的介导^[2]。生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*) 作为转化生长因子 β 超家族成员之一,在卵泡的发育过程中有关键的调节作用^[3]。密码子是 DNA 或 RNA 的碱基序列与其编码蛋白序列之间的对应关系^[4]。编码相同氨基酸的密码子为同义密码子,在蛋白合成过程中,同义密码子的使用频率存在差异,且物种和基因对某一种或几种密码子的使用具有偏好性^[5]。对基因密码子偏好参数进行分析,能更好地理解和研究基因水平转移和基因家族分化的发生^[6]。因此对密码子偏好性的研究可在分子的角度为 *GDF9* 基因序列特征、分类和遗传进化规律提供重要信息。前人相关研究表明,*GDF9* 基因具有刺激颗粒细胞减数分裂、抑制素的生成作用^[7],并影响卵泡发育和生殖功能^[8]。Wang 等发现通过 siRNA 敲除 *GDF9* 后能抑制仓鼠原始卵泡的形成,但添加 *GDF9* 纯品培养卵巢会加速原始卵泡的形成^[9]。在人、啮齿类、牛、绵羊和有袋类动物卵巢卵母细胞中,*GDF9* 基因特异性表达,但该基因在山羊卵母细胞和黄体中可同时表达^[10-11]。*GDF9* 基因还能通过多个信号通路

促进颗粒细胞增殖过程^[12]。马会明等通过 RNA 干扰使该基因表达沉默,也能抑制颗粒细胞增殖过程^[13]。这些研究通过探讨不同哺乳动物已被克隆的 *GDF9* 基因,并在卵巢卵母细胞中进行了相关表达分析,但未开展密码子使用偏性的研究,这不利于其异源表达和遗传转化等后续试验的进行。*GDF9* 基因密码子使用偏好性的研究能为该基因的分类和进化提供重要信息。本研究利用 CodonW 软件分析不同哺乳动物 *GDF9* 基因对密码子的使用情况,基于 *GDF9* 基因最小进化法和同义密码子相对使用度的欧式平方距离系数建立聚类关系,为 *GDF9* 基因功能的深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 目的基因的来源

本研究所用基因资料都来源于 Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) 数据库,12 种物种包括灵长目苏门答腊猩猩、普通狨猴和人,食肉目家猫和家犬,偶蹄目家牛、牦牛、绵羊、山羊和野猪,啮齿目小家鼠和褐家鼠。各哺乳动物 *GDF9* 都是完整的 cDNA 序列(表 1)。利用 MEGA 6.0 对上述核苷酸序列进行碱基分析。

1.2 目的基因的筛选

对候选的哺乳动物 *GDF9* 基因 cDNA 序列进行如下规则的筛选:(1) cDNA 序列为完整编码蛋白序列;(2) 该 cDNA 序列长度 > 300 bp;(3) 蛋白翻译部位位于细胞质;(4) 质粒、转座子及病毒上的基因不予考虑;(5) 多拷贝基因不重复计算。

收稿日期:2017-01-10

基金项目:国家现代肉羊产业技术体系项目(编号:CARS-39);河北农业大学青年科学基金(编号:QJ201218)。

作者简介:杨佳栋(1977—),男,河北保定人,硕士,讲师,主要从事反刍动物营养研究。E-mail:hbnydx96@126.com。

[4] 朱琳,芦建国. 干旱胁迫对夏蜡梅幼苗生理特征的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(2):179-182.

[5] 邵果园,蔡荣荣,王力超,等. 夏蜡梅组织培养试验初报[J]. 浙江林业科技,2006,26(5):28-30.

[6] 顾福根,万志刚,孙丙耀,等. 夏蜡梅的离体培养和快速繁殖[J]. 园艺学报,2007,34(4):324.

[7] Bergmann B A, Heungkyu M. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia* [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(5):315-319.

[8] Fan G Q, Zhai X Q, Zhai C J, et al. Callus induction from leaves of

different *Paulownia* species and its plantlet regeneration [J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12(4):209-214.

[9] 余茂云,殷桂香,赵佩,等. 植物组织培养过程中器官发生途径再生植株分子机制研究进展[J]. 科技导报,2015,33(2):91-98.

[10] 张变莉,王杨,刘荣宁,等. 同源四倍体台湾泡桐体外植株再生系统的建立[J]. 河南农业科学,2015,44(7):119-123.

[11] 翟晓巧,聂琳,张晓申. 灰楸体外植株再生体系建立[J]. 江西农业学报,2011,23(3):17-19.