

棕叶片 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD) 基因 全长 cDNA 的分离与表达研究

赵 利^{1,2}, 王玉珍^{1,2}, 吕恃衡¹, 潘东明^{1,2}, 姜翠翠³, 陈桂信^{1,2}

(1. 福建农林大学 园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 园艺产品贮运保鲜研究所, 福建 福州 350002;
3. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013)

摘 要:以棕(*Prunus salicina* Lindl. var. *cordata* J. Y. Zhangetal) 5 个不同生长发育时期叶片为试材, 根据已构建棕的 5 个不同生长发育时期叶片的均一化全长 cDNA 文库, 分离得到了一个羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)基因, 命名为 *PsHCD*。对 *PsHCD* 基因生物信息进行分析, 同时利用 Real-time PCR 检测 *PsHCD* 基因在叶片中 5 个不同生长发育时期的表达量。结果表明: 该基因的 cDNA 开放阅读框编码区为第 322 个核苷酸到第 987 个核苷酸, 编码 221 个氨基酸残基, 5'UTR 长度为 321 bp, 3'UTR 长度为 156 bp。利用 TMHMM server 软件分析, 该基因编码的蛋白质有 4 个跨膜区域, PSORT II Prediction 软件分析推测, 亚细胞定位于内质网、微体和溶酶体中。实时荧光定量 PCR 结果表明, *PsHCD* 的表达量随着叶片生长逐渐升高, 在展开叶时达到最高峰, 在幼叶到成熟叶时处于一种稳定水平, 随后降低, 老叶表达量最低。

关键词:棕; β -羟脂酰-CoA 脱水酶; 全长 cDNA; 表达分析

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0100-06

植物中 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)催化脂肪酸延伸反应中的第三个反应, 脂肪酸延长酶复合体催化超长链脂肪酸的(>20 个碳原子)合成, 而超长链脂肪酸的合成是在从头合成的 16C/18C 饱和脂肪酸作为底物, 丙二酰-CoA 以 2C 单位供体由锚定在膜上的脂酰-CoA 延长酶复合体催化合成超长链脂肪酸(VLFAs)^[1]。脂肪酸延长酶反应过程中需要的 4 种酶的催化反应, 这 4 种酶分别是 β -酮脂酰-CoA 合酶(KCS)、 β -酮脂酰-CoA 还原酶(KCR)、 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)、烯酰基-CoA 还原酶(ECR)。其中, KCR、HCD 与 ECR 被认为是所有微粒体脂肪酸延长酶所共有的, 没有底物特异性^[2]。目前对其它 3 个酶的基因有较多的研究, 只有 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)的研究相对较少。在脂肪酸延长酶反应过程中, 只有 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)的相关基因未克隆出来^[3]。最早是通过体外酶学揭示 HCD 的一些相关信息。HCD 的酶学活性早在 1999 年在银扇草

(*Lunaria annua*)和韭葱(*Allium porrum*)2 种植物中通过分离延伸反应过程的中间产物— β -羟脂酰-CoA、反式- β -烯脂酰-CoA 而得到证明。韭葱幼苗的 HCD 对催化底物 R 构型的 β -羟脂酰-CoA 比对 S 构型的底物有更强的亲和性^[4]。油菜籽在发育过程中的 HCD 活性是通过加入表面活性剂 TritonX-100 来促进了底物进入酶催化中心, 使酶活性增强^[5]。在拟南芥上有与 HCD 同源的基因为 PAS2 基因^[6], 该基因可以互补酵母 *phs1* 的突变体、拟南芥中 *pas2* 的突变体在细胞分化以及繁殖方面存在着缺陷。Samuels 等^[7]对拟南芥该基因突变体的研究表明, 将该基因敲除是致死的, 该基因表达下降的突变体表现出严重的发育缺陷表型, 且表型的严重程度依赖于超脂肪酸合成受影响的程度。而植物表皮蜡质主要是由复杂的 C20~C34 直链脂肪族化合物组成, 但是, 这些物质主要来源于超长链脂肪酸(VLCFAs)。表皮蜡质的物理和化学性质对植物生命活动功能有着至关重要的作用。其限制了非气孔性失水, 防止紫外线对植物的损害^[8-9], 还可以减少水在植物表皮的滞留, 从而减少灰尘、花粉和空气污染物^[10-11]在其表面的沉积。此外, 植物表皮蜡质对细菌和真菌病原体^[12]的防御中有着重要的作用。

棕(*Prunus salicina* Lindl. var. *cordata* J. Y. Zhangetal.) 属蔷薇科李属, 桃形李实, 是福建省名、特、优的核果类

第一作者简介:赵利(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。

责任作者:陈桂信(1969-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树生物技术教学与科研工作。E-mail: guixinchen@126.com。

基金项目:国家科技部科技支撑计划资助项目(2007BAD07B01); 福建农林大学创新团队资助项目(cxtld12013)。

收稿日期:2014-03-28

果树,生产上棕常常遭受流胶病、细菌性穿孔病、白粉病、缩叶病等病害^[13]的侵袭和危害,严重影响树势、产量和果实品质,甚至缩短树体的生产寿命,植物病原菌很多是从叶片气孔侵入的,植物叶片表面覆盖着一层蜡质的角质层,可以阻止病原菌的侵入和减少叶片失水,对提高植物抗逆性具有重要意义。

该试验是基于棕叶片 cDNA 文库构建基础之上,利用 96 孔板法,从棕叶片 cDNA 文库中分离得到一个 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(HCD)cDNA 阳性克隆,将得到的序列进行生物信息学分析,用实时荧光定量 PCR 测定其在棕叶片中 5 个不同时期中的表达量动态,从分子水平上,阐明棕芽叶蜡质形成的分子机制,以期对棕抗逆性育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为棕叶芽(2012 年 2 月中旬采枝条水培)、展开叶(2012 年 3 月初)、幼叶(2012 年 4 月中旬)、成熟叶(2012 年 5 月中旬)、老叶(2012 年 8 月中旬),分别采自福建宁德周宁棕果园,将上述样品迅速冻存于液氮中,放于 -80°C 。

SmartTM cDNA Library Construction Kit、LA Taq 购自 Clotech 公司; SuperScriptTM II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase 购于 Invitrogen 公司、DH10B 感受态购自 Invitrogen 公司; DSN(duplex-specific nuclease)购自 Evrogen 公司; Prime ScriptTM RT reagent Kit 和 SYBR Premix Ex TaqTM 购自大连宝生物公司。RNA 的提取主要采取 CTAB 结合 lici 沉淀的方法^[14]。

1.2 试验方法

1.2.1 cDNA 文库的构建 以棕 5 个不同生长发育时期叶片为材料提取总 RNA,然后将这些总 RNA 按相同比例等浓度混合,采用郑鸿昌^[15]的方法构建棕均一化全长 cDNA 文库,该文库是以 pBluescript II KS(+)为载体,原始文库的滴度为 2.0×10^8 pfu/mL,其重组率为 98%,插入片段大小为 1 800 bp 左右,文库质量良好。由此可知,HCD 可用于基因的分离后续试验。

1.2.2 棕叶片 HCD 基因的分离与序列分析 在 NCBI 上下载不同种植物的 HCD 序列,利用 DNAMAN 软件设计简并引物(HCDF: 5'-GCCGCTCTCTGAGAT-TCTTCATC-3'; HCDR: 5'-ATCTCRGTRATRGAC-CAGCT-3')用于分离基因 HCD 的阳性克隆,委托铂尚生物技术(上海)有限公司合成。用通用引物 M13R、M13F(M13R: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3', M13F: 5'-GTAAAACGACGCCAGT-3')验证筛选分离 HCD 阳性克隆的大小,采用基于 PCR 技术的 96 孔板法进行 cDNA 文库的筛选^[16],PCR 反应程序为: 95°C 5 min, 95°C 12 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s,共 35 个循环, 72°C 10 min,

4°C pause。根据目标克隆在文库中的丰度取适量稀释度的文库用 DH10B 菌株铺于 96 板,建立一级库,每孔大约有 40 个克隆,放于培养箱中培养 8~10 h,利用 PCR 反应,进行阳性克隆的筛选,将筛选到的阳性孔再次进行克隆的稀释,建立二级库,每孔大约有 6 个阳性克隆,操作步骤同上。将二级库中筛选到的阳性克隆铺于含有 AMP 抗性的 LB 平板上培养过夜,挑单克隆进行 PCR 鉴定,以确定阳性单克隆。

1.2.3 棕叶片 HCD 基因序列分析 将得到的阳性克隆送至铂尚生物技术(上海)有限公司测序,利用 DNAMAN 软件以及 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 等网站提供的各类生物信息学软件对序列进行在线分析。利用 ProtParam 程序(<http://web.expasy.org/prot-param/>)预测蛋白质的分子量和等电点;利用 MEGA5.2 做进化树分析。通过 Proteinblast 进行比对,下载甜橙 [*Citrus sinensis* (XP_006466305.1)],番茄 [*Solanum lycopersicum* (XP_004236696.1)],拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (NP_001078566.1)],二穗短柄草 [*Brachypodium distachyon* (XP_003568759.1)],陆地棉 [*Gossypium hirsutum* (AHA62438.1)],粟米 [*Setaria italica* (XP_004968216.1)],乌拉尔图小麦 [*Triticum urartu* (EMS50644.1)] 等几种植物与 *PsHCD* 同源性较高的序列,将 9 个氨基酸序列用 MEGA 5.2 软件进行系统进化分析,采用邻位连接法(Neighbor-joining, NJ)构建 *PsHCD* 的系统进化树。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 与差异分析 分别提取棕叶芽、展开叶、幼叶、成熟叶、老叶 5 个不同发育时期的芽叶 RNA,用 TaKaRa 的逆转录试剂盒反转录成 cDNA,稀释 10 倍作模版,以棕的 *ACTIN* 基因^[17]为内参,上下游引物分别为 Nai-tubulinF、Nai-tubulinR (Nai-tubulinF: 5'-TCGGATGATGATGACCTTCTCTGTG-3'; Nai-tubulinR: 5'-CATACACTCGTCTGCGTTCTCCA-3') 序列。运用 Beacon Designer 7 软件,根据荧光定量 PCR 引物设计的原则,设计荧光定量 PCR 引物,上下游引物分别为 HCD1F、HCD1R (HCD1F: 5'-TGATCCAACCTGGCATCA-3'; HCD1R: 5'-GGCAGCATAGAAGTAATCG-3')。参照 SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa) 说明书,反应体系为 20 μL , cDNA 模板 1 μL , $2 \times$ SYBR Premix Ex-TaqTM 10 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL ,用 Rnase-free H_2O 补足至 20 μL 。运行程序为: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 20 s, 40 次循环,每个样品 3 个生物重复 2 个技术重复。表达水平计算方法为 ΔCT , 计算公式: 表达水平 = $2^{-\Delta\text{CT}}$ 。

1.3 数据分析

试验数据应用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 棕叶片 *HCD* 基因的分离与分析

从 NCBI 上下载不同植物 *HCD* 基因进行设计筛库的简并引物 HCDF、HCDR, 建立二级库, 经 2 轮 96 孔板筛选以及 DH10B 菌株平板上单克隆的鉴定, 获得 *HCD* 基因 cDNA 的单克隆(图 1A), 将得到的 cDNA 单克隆,

用通用引物 M13R、M13F 进行 PCR 验证上述得到阳性克隆片段大小, 其大小为 1 100 bp 左右(图 1B)。测序结果表明, 此 cDNA 开放阅读框编码区为第 322 个核苷酸到第 987 个核苷酸, 编码 211 个氨基酸残基(图 2), 5'UTR 长度为 321 bp, 3'UTR 长度为 156 bp。将此基因命名为 *PsHCD*。

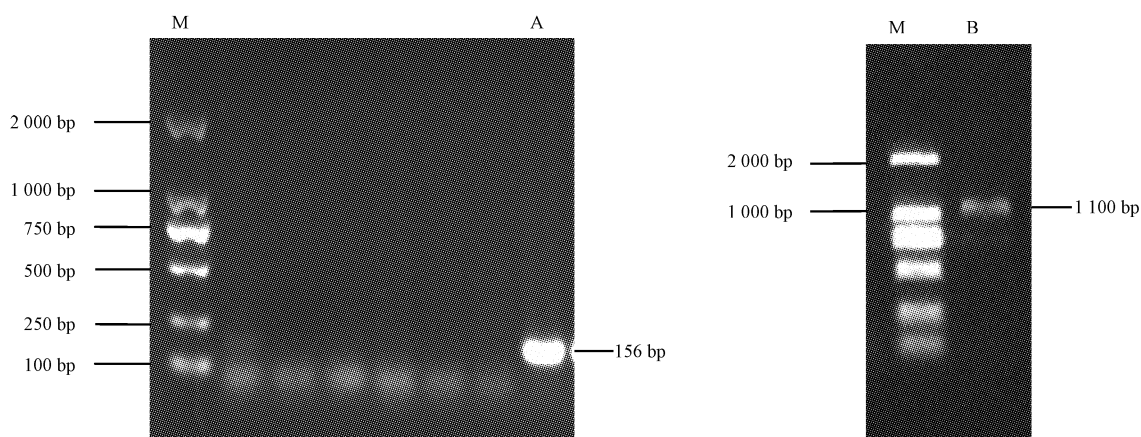


图 1 棕 *PsHCD* 不同引物扩增片段的琼脂糖电泳检测

注: M: DL 2 000 marker; A: 简并引物 PCR 产物片段; B: 通用引物(M13R、M13F) PCR 产物片段。

Fig. 1 Detection by agarose electrophoresis of *PsHCD* amplified from *the Prunus salicina* with different primers

Note: M: DL 2 000 marker; A: Degenerated primers PCR product; B: Universal primers PCR product.

```

1      CTAAGGGACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCCTCTAGAACTAGTGGATCC
61     CCCGGGCTGCAGGAATTCGGCCATTACGGCCTAGTTACGGGGGGGACTCCGTTGGGGGTT
121    GGATGTTGGGAAATACATCCGAAACAGAGTAAACAAAATTCAGACGCCGTGCAAGC
181    AAGTAGAAGTAGTTGGGCGTTGAGCTAATAACTCACCTACATGCCTTCACTCTATTTA
241    TTATCCTTCCCATCTATCTTTCTCTCTCTCCCTCTATAGATTAGTGTGTAGGCTGCT
301    AGATCCGCCATAGCGTCATCAATGCGGGAGCATTATCCGCTCTCAGGCGCCTGTACCTC
      M A G A L S A L R R L Y L
361    TCTCTATAACTGGACCGTCTTCTCGGATGGTTGCAGGTACTGTATCTTGCTCTCAAG
      S L Y N W T V F L F W L Q V L Y L A L K
421    ACTCTCAACGAATCGGGCCACCCGCATGTTACAAAGCCGTTGAACGCCCACTTCTCTT
      T L N E S G H P H V Y K A V E R P L L L
481    GCTCAATCCGCCCGCTTTGGAGATTCTTCATGGTCTAGTAGGTTGGTCAGATCTCCG
      A Q S A A V L E I L H G L V G L V R S P
541    ATATCAGCGACGCTGCCGAAATGGTTCAAGATTGTATCTTACTTGGGAATCCTCTGG
      I S A T L P Q I G S R L Y L T W G I L W
601    AGTTTCTGAGACTCAGAGTCATATACTGTGAGCTCTTGGTCATCAGCTGGTCTATC
      S F P E T Q S H I L V S S L V I S W S I
661    ACTGAGATTATTCGATACTCTTCTTGGCATGAAGGAGGCATTGGTTTGCACCTTCA
      T E I I R Y S F F G M K E A L G F A P S
721    TGGCTCTTGGCTCAGGTATAGCACATTATCTTGTGTATCCAAGTGGCATCACAACT
      W L L W L R Y S T F I L L Y P T G I T S
781    GAAGTTGGTCTAATTTATATTGCCTTACAATCCATTCAGAACTCTGAAAAGTATTCTATA
      E V G L I Y I A L Q S I Q K S E K Y S I
841    AGGATGCCAAACAAGTGAAGTCTCTTTCGATTACTTCTATGCTGCCATTATCGCTCTA
      R M P N K W N F S F D Y F Y A A I I A L
901    GAATCTATGTCCAGGCAGCCCTACATGTACCGGTATATGCTTAGTCAGAGGAAGAAA
      G I Y V P G S P H M Y R Y M L S Q R K K
961    GCTCTTTCAAAACCAAGCAGCGTAGATGGCGACAAAGGTTAATGTGTTTCTCATGGT
      A L S K T K A A *
1 021  CATGATAATATCAGTCATATGGTTGTGTGAAGATGGAATTTTATTCTTGAAAAGGCTAT
1 081  TGATTTAAAAAAGGCGCCCTCGGCCCTCGAGGGGGGCCGTTACCCAATC
1 141  GCC
  
```

图 2 *PsHCD* 基因 cDNA 全长核苷酸序列和推测氨基酸序列

注: [ATG]: 起始密码子; [TAA]: 终止密码子。

Fig. 2 Nucleotide sequence of *PsHCD* cDNA and deduced amino acid sequence

Note: [ATG]: Initiation codon; [TAA]: Termination codon.

2.2 生物信息学分析

利用 DNAMAN 把核酸序列转化为氨基酸序列,用 ExPASy 系统中的 Prot Param(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)在线工具对 *PsHCD* 的蛋白进一步分析,结果表明该序列表达的蛋白质分子量为 25 147.6;理论等电点为 9.28;不稳定系数(Instability index)为 55.74,表明该蛋白为不稳定蛋白;脂肪系数(Alipathic index)为 116.11,总平均亲水性[Grandaverageof-hydropathicity(GRAVY)]为带正 0.376,表明该蛋白为疏水性蛋白;电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为 20;带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为 9。

2.3 蛋白质跨膜区域分析

跨膜受体是参与细胞与外界通信的特殊整合膜蛋白,在信号转导中发挥独特和重要的作用。通过 TM-HMMserver. 2.0-CBS 软件对 *PsHCD* 进行分析,结果见图 3,蛋白质跨膜区域从外膜到内膜和内膜到外膜,存在 4 个明显的跨膜区,分别为 13AA~32AA、100AA~122AA、143AA~165AA、185AA~204AA,表明此蛋白可能为跨膜蛋白。同时,通过 PSORT II Prediction 软件进行分析,得到在内质网中的得分为 0.550;微体为 0.3880;溶酶体为 0.361,可以推测该蛋白亚细胞定位于内质网、微体和溶酶体。运用 Sopma 在线软件对 *PsHCD* 进行蛋白质的二级结构进行分析,该蛋白质含有 126 个 α -螺旋(Alpha-helix),占总数的 57%;31 个延伸链,占 14.3%;9 个 β -转角,占 4.07%;55 个无规则卷曲,占 24.89%。进一步采用 Phyre² 在线软件,对 *PsHCD* 进行同源建模,棕的 *PsHCD* 的蛋白质三维结构如图 4 所示。

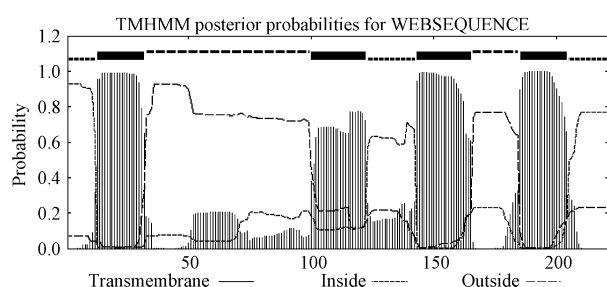


图 3 跨膜区预测结果

Fig. 3 Predicted results of *PsHCD* transmembrane domain

2.4 棕的 *PsHCD* 基因系统进化分析

由图 5 可知,*PsHCD* 蛋白系统进化树分析结果表明,单子叶植物(狗尾巴草、二穗短柄草、乌拉尔图小麦) *PsHCD* 蛋白聚为一支,甜橙、拟南芥、陆地棉等双子叶植物聚为一类,总体来看 *PsHCD* 的系统发育树中与粟米的亲缘关系相对较近一些。

2.5 棕的 *PsHCD* 基因在叶片不同生长时期的表达分析

实时荧光定量 PCR 结果表明,*PsHCD* 的表达量在

整个生长发育过程中大体上呈现先增长后下降的趋势(图 6),其中,在幼叶到成熟叶时,*PsHCD* 处于一种稳定水平。

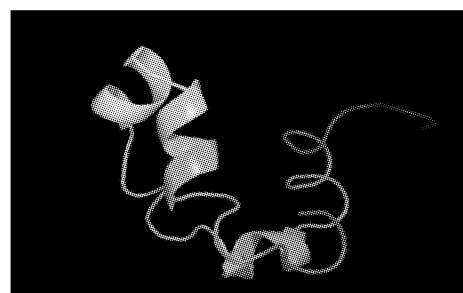


图 4 *PsHCD* 蛋白质三维结构

Fig. 4 The three dimensional protein structure of *PsHCD*

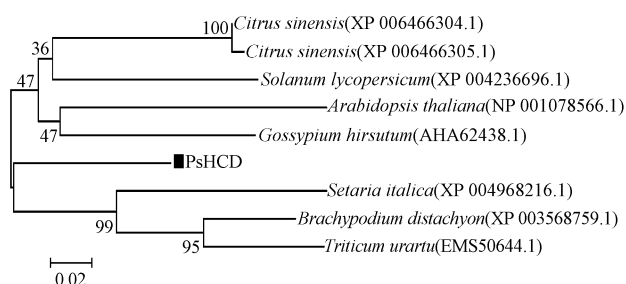


图 5 棕 *PsHCD* 蛋白与其它物种 HCD 蛋白进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *PsHCD* from *Prunus salicina* and other plants

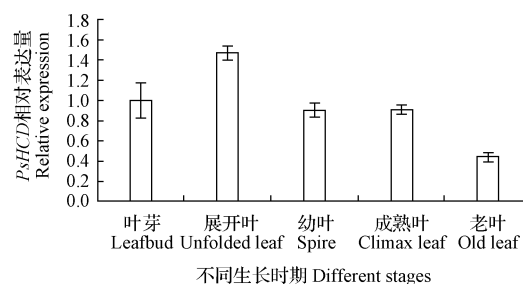


图 6 *PsHCD* 基因在棕叶片不同生长时期的表达分析

Fig. 6 Expression of *PsHCD* gene during leaf of different stages in the *Prunus salicina*

3 讨论与结论

超长链脂肪酸(Verylongchainfattyacids, VLCFAs)合成是植物体蜡质基因合成的前提物质,在生物体内有着广泛的生理功能,其主要参与种子甘油酯、鞘脂以及生物膜脂的合成^[18-19]。植物的表皮蜡质是覆盖在陆生植物的地上部分与外界环境之间的重要的保护屏障^[20],植物蜡质主要防止植物叶片、水果以及其它高等植物的非气孔性水分的损失^[21]。植物表皮蜡质能够防止机械伤害、冻害、病原菌的入侵以及各种草食昆虫的伤害等等,有研究表明,芸苔和豌豆叶面突起的蜡质,能够减少

甲虫对叶片的侵食可以防止食草昆虫的侵害^[22]。而 *HCD* 基因是超长链脂肪酸合成过程中所需要的第 3 种酶,在蜡质合成过程有一定的作用,但是,目前有关 *HCD* 的酶研究相对较少,近几年,研究者们利用酿酒酵母 *FAD* 脂蛋白体重建的方法,在内质网上发现了一种跨膜蛋白 *PHS1p*,且证明 *HCD* 具有脱水性。此发现有可能推动对 *HCD* 酶的研究^[23]。近几年来,有人在拟南芥中发现了 *PASTICCINO2* 基因,且证明它编码 *HCD*,并得到 *PASTICCINO2* 是拟南芥表皮蜡质生物合成过程中所需的一种关键酶。该研究首次从 cDNA 文库中筛选出蔷薇科木本植物中的羟酰基辅酶 A 水解酶(*HCD*)的全长序列,填补了蔷薇科植物中 *HCD* 基因克隆研究的空白。虽然其确切的生物学功能有待于进一步的研究,但是该基因全长序列的获得为深入认识其生物学功能和了解 *HCD* 在超长链脂肪酸合成过程中起到重要作用。*PsHCD* 蛋白系统进化树分析结果表明,单子叶植物(狗尾巴草、二穗短柄草、乌拉尔图小麦)*PsHCD* 蛋白聚为一支,甜橙、拟南芥、陆地棉等双子叶植物聚为一类,总体来看 *PsHCD* 的系统发育树中与粟米的亲缘关系相对较近一些。通过 PSORT II Prediction 软件预测,其编码蛋白质亚细胞定位主要在内质网、微体和溶酶体中,这与植物细胞中通过质壁分离的方法研究脱羧反应定位于内质网的细胞质一侧或者细胞质膜和细胞壁紧密结合的区域^[24-25]的结果相符合。由实时荧光定量的结果,可知 *PsHCD* 的表达量随着叶片生长逐渐升高,在展开叶时达到最高峰,随后降低,在幼叶到成熟叶时处于一种稳定水平,老叶时表达量最低。由此可以推测,这可能是叶芽在生长的前期主要是有树体提供营养物质,由叶芽到展开叶的过程中可能是光合作用效率日渐增加,可能导致 *PsHCD* 的表达量逐渐增加;由幼叶到成熟叶过程中,此时光合作用系统处于一种稳定的状态,*PsHCD* 的基因表达量也处于一种相对稳定的水平,到老叶光合作用效率逐渐下降,其表达量也逐渐下降。*PsHCD* 随叶片生长呈现从少到多,又从多到少的变化规律,其表达模式与叶片生长状态相吻合。进一步说明了,*PsHCD* 参与了整个植物表皮蜡质生物合成的整个过程。

参考文献

- [1] Kunst L, Samuels L. Plant cuticles shine; advances in wax biosynthesis and export[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(6): 721-727.
- [2] Kunst L, Samuels A. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax[J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42(1): 51-80.
- [3] 倪郁, 郭彦军. 植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状[J]. 遗传, 2008, 30(5): 561-567.
- [4] Lessire R, Chevalier S, Lucet-Levannier K, et al. Study of the 3-hydroxyicosanoyl-coenzyme A dehydratase and (E)-2,3-enoyl-coenzyme A reductase in volved in acyl-coenzyme A elongation in etiolated leek seedlings[J]. Plant Physiology, 1999, 119(3): 1009-1016.
- [5] Domergue F, Chevalier S, Créach A, et al. Purification of the acyl-CoA elongase complex from developing rape seed and characterization of the 3-ketoacyl-CoA synthase and the 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase[J]. Lipids, 2000, 35(5): 487-494.
- [6] Bellec Y, Harrar Y, Butaeye C, et al. *Pasticcino 2* is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell Proliferation and differentiation in Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2002, 32(5): 713-722.
- [7] Samuels L, Kunst L, Jetter R. Sealing plant surfaces; cuticular wax formation by epidermal cells[J]. Plant Biology, 2008, 59(1): 683-795.
- [8] Semerdjieva S, Phoenix G, Hares D, et al. Surface morphology, leaf and cuticle thickness of dwarf shrubs from sub-Arctic heath following long-term exposure to enhanced levels of UV-B[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 117(2): 289-294.
- [9] Reicosky D A, Hanover J W. Physiological effects of surface waxes I. Light reflectance for glaucous and non-glaucous *Picea pungens*[J]. Plant Physiology, 1978, 62(1): 101-104.
- [10] Järn M, Heikkilä M, Lindén M. Bioinspired synthesis of superhydrophobic coatings[J]. Langmuir, 2008, 24(19): 10625-10628.
- [11] Kerstiens G. Cuticular water permeability and its physiological significance[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47(12): 1813-1832.
- [12] Jenks M A, Joly R J, Peters P J, et al. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. Plant Physiology, 1994, 105(4): 1239-1245.
- [13] 黄月淑. 油茶主要病虫害的发生与防治[J]. 植物医生, 2001, 14(6): 25-25.
- [14] 陈桂信. 棕多酚氧化酶基因及 5'端调控序列的克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [15] 郑鸿昌. 夜来香均一化全长 cDNA 文库的构建与花香相关基因的遗传转化[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [16] Yim Y S, Moak P, Sanchez-Villeda H, et al. ABAC pooling strategy combined with PCR-based screenings in a large, highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps[J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 47-55.
- [17] 姜翠翠. 棕均一化全长 cDNA 文库的构建及果实褐变相关基因的分离与表达分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [18] Leonard A E, Pereira S L, Sprecher H, et al. Elongation of long-chain fatty acids[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(1): 36-54.
- [19] Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2003, 1632(1): 1-15.
- [20] Jenks M A, Eigenbrode S D, Lemieux B. Cuticular waxes of Arabidopsis[J]. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists, 2002, 1(56): 14-28.
- [21] Riederer M, Schreiber L. Protecting against water loss; analysis of the barrier properties of plant cuticles[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(363): 2023-2032.
- [22] Bodnaryk R P. Distinctive leaf feeding patterns on oil seed rapes and related *Brassicaceae* by flea beetles, Phyllotreta-cruciferae (Goeze) (Coleoptera: Chrysomelidae)[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1992, 72(2): 575-581.
- [23] Denic V, Weissman J S. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length[J]. Cell, 2007, 130(4): 663-677.
- [24] Kohorn B D. Plasmalemma cell wall contacts[J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 31-38.
- [25] Wyatt S E, Carpita N C. The plant cytoskeleton-cell-wall continuum[J]. Trends in Cell Biology, 1993, 3(12): 413-417.

正交实验优化“神农”香菊顶芽的离体培养条件

雷霄飞¹, 杨学领²

(1. 武汉生物工程学院 学报编辑部, 湖北 武汉 430415; 2. 武汉生物工程学院 科技处, 湖北 武汉 430415)

摘要:以湖北神农架地区采集的“神农”香菊顶芽为外植体,研究了不同消毒剂种类及方法的灭菌效果,通过芽增殖培养基和生根培养基的激素配比试验,筛选出“神农”香菊试管苗快速繁殖的最佳培养基组成。结果表明:“神农”香菊顶芽的最佳消毒方案为 75% Alcohol 30 s+0.1% HgCl₂ 2 min+2% NaClO₃ 8 min;顶芽最适增殖培养基为 MS+0.7 mg/L 6-BA+0.5 mg/L KT+0.3 mg/L NAA,生根的最适培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。

关键词:“神农”香菊;组织培养;快繁技术;正交实验

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0105-04

“神农”香菊(*Dendranthema indicum* var. *aromaticum*)是菊科菊属植物野菊的一个新变种,原植物产于湖北神农架地区,是目前湖北生长的稀缺本草植物,资源有限,主要分布在海拔 2 000 m 以上的向阳开阔的山坡、路旁、岩石缝、灌木丛边的空旷地中^[1-2]。其形似野菊花,金黄

色,虽然朵小茎细,却郁香无比,具有平肝明目、清咽利喉、清热解毒、散风降压等功效。由于“神农”香菊现在广泛应用于医药、香料工业和日用化学工业中,其用量急剧增加,因此,开发利用率高,经济价值十分明显。“神农”香菊地理分布范围不大,资源非常有限,因此需要积极进行人工组培和栽培,并合理地开发利用^[3-4]。

长期以来“神农”香菊的繁殖一直采用种子、分株和扦插等方法,繁殖速度较慢,受材料、季节、地理条件等的约束无法形成规模化种植,不能满足大面积生成的需要。而采用组培育苗繁殖系数大、速度快,种苗质量优。

第一作者简介:雷霄飞(1979-),男,硕士,讲师,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:48729155@qq.com。

基金项目:湖北省教育厅资助项目(B20129002);武汉市教育局科研资助项目(2010087)。

收稿日期:2014-03-19

Study on Isolation of Full-length cDNA of HCD from Leaf of *Prunus salicina* and Its Expression

ZHAO Li^{1,2}, WANG Yu-zhen^{1,2}, LV Shi-heng¹, PAN Dong-ming^{1,2}, JIANG Cui-cui³, CHEN Gui-xin^{1,2}

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013)

Abstract: Taking five different growth period of *Prunus salicina*'s leaves as material, a clone named *PsHCD* was separated from cDNA library prepared of five different growth and development periods of leaf in the *Prunus salicina*. The biological information of *PsHCD* was analyzed and gene expression levels in five different growth periods of *Prunus salicina*'s leaves were tested using Real-time PCR. The results showed that the gene cDNA open reading frame coding regions for the 322th nucleotide to 987th, encoding a 221 amino acid proteins, with 321 bp in the 5'UTR and 156 bp in the 3'UTR. Using TMHMM server software to analysis, the gene encoding the protein had four transmembrane domains. *PsHCD* was localized in endoplasmic reticulum, micro-bodies and lysosomes by PSORT II Prediction software. The results of Real-time PCR showed that the *PsHCD* gene was gradually increasing with development of leaves, reached to maximum at stage of unfold leaves, was stable during spire to climax leaves, then decreased, reached to minimum at stage of old leaves.

Key words: *Prunus salicina*; β -hydroxyacyl-CoA dehydratase; full-length cDNA; expression analysis