

DOI:10.11937/bfyy.201611023

基于 RACE 方法的草莓 *Faapx-c* 基因克隆、表达及其生物信息学分析

侯艳霞¹, 汤浩茹², 林源秀², 陈清², 张勇², 郭艳¹

(1. 山西林业职业技术学院 园艺系, 山西 太原 030009; 2. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘要:以草莓栽培品种“丰香”为试材,利用 RT-PCR 和 3'-RACE 技术克隆胞质抗坏血酸过氧化物酶基因 *Faapx-c*,并对其进行了生物信息学分析。结果表明:*Faapx-c* 基因长 1 034 bp,所编码的蛋白 FaAPX-c 是一个结构稳定、亲水性、非分泌型的蛋白质,其二级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲 2 种形式出现,具有可靠的三维结构,属于植物过氧化物酶家族。*Faapx-c* 基因在草莓的根、茎和叶中能被低温诱导,表达量先升高后下降,而在花中的表达随低温时间的延长而消失。该研究为进一步进行 *Faapx-c* 基因的功能研究奠定了基础。

关键词:草莓;*Faapx-c* 基因;RACE;克隆;表达;生物信息学

中图分类号:S 668.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)11-0088-05

草莓(*Fragaria* × *ananassa* Duch.)属蔷薇科草莓属植物,其果实营养丰富,色泽鲜美,味道爽口,香气浓郁,有“水果皇后”的美称^[1-2],受到广大消费者喜爱。但草莓在生长过程中如果遇到高温、低温、光照不足等环境胁迫,就会使得植株体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量大幅度增加,从而使草莓的产量和品质显著下降。

抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)是高等植物体内的一种末端氧化酶^[3-4],在植物体内活性较高,它以抗坏血酸作为电子供体,可清除植物体内的活性氧,特别是细胞质和叶绿体中产生的 H_2O_2 ,将 H_2O_2 氧化分解成 H_2O 和 O_2 ,是抗坏血酸-谷胱甘肽循环中的关键酶^[5-6]。当植物遭遇环境胁迫时,植物体内 *apx* 基因迅速表达,以调节抗坏血酸含量,从而对胁迫作出响应^[7-8]。因此,APX 具有保护植物细胞抵御氧化损伤、增强植物抗逆境能力等重要作用。目前,研究者们已经从甘蔗^[6]、苹果^[9]、蝴蝶兰^[10]、油菜^[11]等不同植物中克隆出了 *apx* 基因。

现以草莓品种“丰香”为试验材料,利用 RACE 方法,克隆到一个胞质 *apx* 基因,并对其进行了生物信息

学分析,同时检测了该基因在草莓不同组织中的表达特征和在低温逆境胁迫下的表达和积累情况,以期为进一步明确基因功能并利用该基因进行深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为草莓品种“丰香”(*Fragaria* × *ananassa* cv. Toyonaka),采自四川农业大学教学科研园区。

1.2 试验方法

1.2.1 *apx* 基因克隆 总 RNA 的提取及单链 cDNA 的合成参照张勇^[12]的方法进行。PCR 扩增以草莓果实的 cDNA 为模板,根据其它植物 *apx* 基因保守区核苷酸序列设计引物,扩增保守区序列,电泳检测扩增结果。根据得到的保守区序列,设计了 1 对向 5' 端延伸的特异引物,扩增该基因 5' 端序列。同时,根据经典 RACE 技术^[13],在已获得序列的 3' 端设计了 1 对嵌套引物并合成了 3 条锚定引物,用锚定引物 Q_{tr} 合成第一链 cDNA。3' 端 PCR 扩增反应体系为 20 μ L,第 1 轮 PCR 模板为 cDNA 50 ng,引物为 Q_0 和 GSP1;第 2 轮 PCR 模板为 1/50 的第 1 轮 PCR 扩增产物,引物为 Q_1 和 GSP2。扩增产物经电泳检测后,回收目的条带,连接转化,挑选阳性克隆测序,试验中所用引物见表 1。

1.2.2 生物信息学分析 利用 NCBI 中 BLAST 程序和 DNAMAN 软件进行基因序列分析;利用 Bioedit 软件及 ExPASy 服务器进行蛋白质的理化性质分析、保守结构域分析、二级结构和三级结构预测;用在线工具 SignalP、

第一作者简介:侯艳霞(1981-),女,博士,讲师,研究方向为园艺植物生物技术和遗传育种。E-mail:yxhou2007@163.com.

责任作者:汤浩茹(1963-),男,博士,教授,研究方向为园艺植物生物技术和遗传育种。E-mail:htang@sicau.edu.cn.

基金项目:山西省基础研究资助项目(2013021026-2);山西林业职业技术学院院级教研教改资助项目(201314)。

收稿日期:2015-12-18

COILS、TMHMM、NetNGlyc、NetOGlyc 和 NetPhos 分别进行蛋白信号肽、卷曲螺旋、跨膜区、糖基化和磷酸化位点分析。

表 1 试验所用引物

Table 1 List of primers in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	备注 Note
APX-1F	GCCTGATGTTCTTTTCCA	保守区扩增引物
APX-1R	ATCCGACGCTATTCTC	保守区扩增引物
Q _r	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTC GAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT	3'-RACE 锚定引物
Q _o	CCAGTGAGCAGAGTGACG	3'-RACE 锚定引物
Q _i	GAGGACTCGAGCTCAAGC	3'-RACE 锚定引物
GSP1	CAAGCCCGAACCACACACAGA	3'-RACE 特异引物
GSP2	GGAAGGCACACAAGGAACGG	3'-RACE 特异引物
APX-2F	CTCATTTTCATCTGCTTCACA	5'端片段扩增引物
APX-2R	CAAGTGGTCAGAACCTTTC	5'端片段扩增引物
FaGAPDH2	CAGACTTGAGAAGAAGGCCACCTA (上游引物) GATACCTTCATCTTTCCCTCAGA (下游引物)	内参基因扩增引物

1.2.3 *Faapx-c* 基因的表达分析 分别提取 0℃ 低温胁迫下不同处理时间的草莓根、茎、叶、花的 RNA,并反转录为 cDNA,用草莓甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*FaGAPDH2*)作为内参,APX-1F 和 APX-1R 为特异扩增引物,运用半定量 RT-PCR 方法检测抗坏血酸过氧化物酶基因的表达情况。

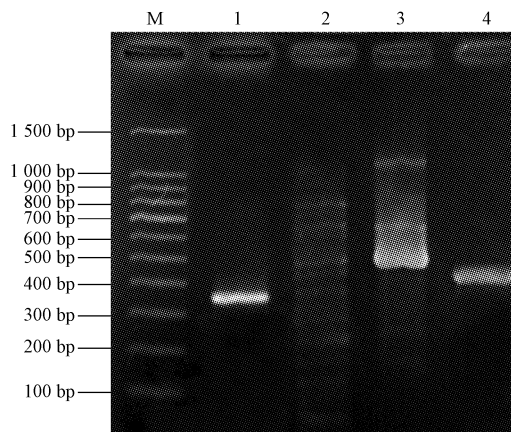
2 结果与分析

2.1 草莓“丰香”*apx* 基因的克隆和序列分析

以草莓“丰香”果实的 cDNA 为模板,APX-1F 和 APX-1R 为引物,经 PCR 扩增获得了 1 条长 352 bp 的特异性条带(图 1),其序列与草莓其它品种 *apx* 基因核苷酸序列同源性高达 97%~99%,与甜瓜(*Cucumis sativus*, D88649)、大豆(*Glycine max*, AB082931)、辣椒(*Capsicum annuum*, DQ002888)、番茄(*Lycopersicon esculentum*, DQ096286)的细胞质 *apx* 基因的核苷酸同源性分别为 82%、81%、80%和 78%,据此可推测所得到的 cDNA 序列片段是草莓“丰香”细胞质 *apx* 基因的保守区序列。

在 3'端 RACE 反应中,第 1 轮 PCR 扩增背景非常模糊,非特异性条带较多;但第 2 轮 PCR 反应后在约 500 bp 的位置获得了 1 条清晰的亮带,5'端扩增在预测的 450 bp 左右得到了 1 条特异性条带(图 1),测序比对证实为草莓 *apx* 基因的 3'和 5'端序列,与已获得的保守区序列拼接后得到了 1 034 bp 的草莓“丰香”*apx* 基因序列,命名为 *Faapx-c*(图 2)。结构分析显示,该序列包括长 753 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 250 个氨基酸;5'端非编码区片段长 33 bp,3'端非编码区长 248 bp,含有加尾信号 aaataa 和长 28 bp 的 poly(A)尾巴。*Faapx-c* 基因与草莓“Yoho”的 *apx* 基因(AF159630)核苷酸和氨基酸序列同源性高达 98.6%和 99.0%,与苹果

apx 基因(EF528482)的核苷酸和氨基酸同源性分别为 80.7%和 88.0%,而与其它植物如葡萄、黄瓜、甜瓜、番茄等植物的 *apx* 基因核苷酸同源性相对较低,为 65.0%~75.0%。



注:M为分子量标准;1为保守区片段扩增结果;2、3分别为 3'端 RACE 第 1 轮和第 2 轮反应的扩增结果;4为 5'端 PCR 扩增结果。

Note:M indicates the molecular weight standard; 1 indicates the PCR product of the conservative region; 2 and 3 indicate the amplification products of 3' end RACE primary and secondary reaction; 4 indicates the amplification product of 5' end.

图 1 草莓“丰香”*Faapx-c* 基因电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis result of *Fragaria × ananassa* cv. Toyonaka *Faapx-c* gene

2.2 生物信息学分析

2.2.1 *FaAPX-c* 蛋白的一级结构分析 对草莓 *Faapx-c* 基因编码蛋白 *FaAPX-c* 的一级结构分析显示,该蛋白分子量为 27.359 kDa,等电点为 5.92,不稳定参数为 33.80,属于结构稳定的蛋白质。进一步分析发现,草莓 *FaAPX-c* 中酸性氨基酸含量为 13.55%,碱性氨基酸含量为 11.16%,脂肪族类氨基酸的含量较高,其中以亮氨酸(Leu)含量最高,达到 11.16%;而含硫类的半胱氨酸(Cys)和芳香族类的酪氨酸(Tyr)含量最低,都只有 0.80%。疏水性分析发现,该蛋白亲水性平均数为-0.345,属于亲水蛋白。

2.2.2 *FaAPX-c* 蛋白的二级结构和三级结构预测 由图 3 可知,*FaAPX-c* 蛋白的二级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主, α -螺旋、 β -折叠、转角和无规则卷曲分别占 39%、13%、12%和 37%。三级结构预测表明,*FaAPX-c* 肽链三维模型中包括 12 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠。

2.2.3 *FaAPX-c* 蛋白保守结构域分析 由图 2 可知,对 *FaAPX-c* 蛋白保守结构域分析发现,该蛋白属于植物过氧化物酶家族中的抗坏血酸过氧化物酶,它的氨基酸序列中存在 2 段保守的多肽序列,即过氧化物酶活性位点序列(APlmLRLaWHSa)和过氧化物酶近端血红素配体序列(DIVALS GGHTL)。

```

1      ctcatttcacatcgtttcacaggcccttttgcc[ATG]GGGAAGTGCTACCCAACCGTGAGCGAGGAGTACAAGAAG
1      M G K C Y P T V S E E Y K K
76     GCCATCGACAAGGCCAAGAGGAAGCTCAGAGGCCCTCATCGCCGAGAAGAACTGCGCTCCTCTCATGCTCCGTCTC
15     A I D K A K R K L R G L I A E K N C A P L M L R L
151    GCATGGCACTCTGCTGGAACCTATGATGTGAAAACCTAAGACCGGAGGCCCATTCGGAACCATGAAGCAGCCGGCT
40     A W H S A G T Y D V K T K T G G P F G T M K Q P A
226    GAGCTCGCTCACGGCGCTAACAATGGTCTTGACATTGCTGTGAGGCTCTTGAGCGGATCAAGGAGCAGTTCCTCT
65     E L A H G A N N G L D I A V R L L E P I K E Q F P
301    ATTCTCTCTTACGCTGACTTCTACCAAGTTGGCTGGAGTTGTTGCTGTTGAGGTCACCGGTGGGCTGATGTTCTCT
90     I L S Y A D F Y Q L A G V G A V E V T G G P D V P
376    TTCCACCCAGGAAGAGAGGACAAGCCGAACCACCACCAAGGCGCTCTTCTGATGCTGGAAGGGTCTTGAC
115    F H P G R E D K P E P P P E G R L P D A G K G S D
451    CACTTGAGGGAAGTGTGTTGGCAAACCATGGGTCTCAGCCACCAGGACATTGTTGCTCTCTGTTGGTGCACACC
140    H L R E V F G K T M G L S H Q D I V A L S G G H T
526    TTGGGAAGGGCACACAAGGAACGGTCTGGATTGAGGGACCTGGACTCCCAACCCCTTATCTTTGACAACCTCA
165    L G R A H K E R S G F E G P W T P N P L I F D N S
601    TATTTCACTGTGCTGTTGAGTGAGAGAAGGAAGGCCTTCTACAGCTTCCAACCTGACAAGGCTCTTCTGTCAGAC
190    Y F T V L L S G E K E G L L Q L P T D K A L L S D
676    CCTGTCTCCGCCCTCTTGTGAGAAATACGCTGCGGATGAAGATGCTTTCTTTGCTGATTATGCTCTAGCTCAT
215    P V F R P L V E K Y A A D E D A F F A D Y A L A H
751    CAGAGGCTCTTGAGCTTGGTTTGTGAAGCT[TAA]gcagtggaaactttactaagataaaggatgatgccaatg
240    Q R L F E L G F A E A *
826    ccaatgcctgcgtgcctttgtattttgtatttctcagttctgggttttaggcagttgggtttgtttttta
901    ttggttaggaaagtgtgattttcattttcagtttgatggatgtgttgaattggatagaatgatttggatgatcc
976    tttgatataataattacacatcttttacttttaaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaa

```

注:小写部分为非编码区; [ATG] 为起始密码子; [TAA] 为终止密码子; 单下划线为 Ploy(A) 尾巴; 双下划线为加尾信号; 加粗部分为过氧化物酶活性位点序列 (APImLRLaWHSa) 和过氧化物酶近端血红素配体序列 (DIALSGGHTL)。

Note: The lower-case characters indicate noncoding regions; [ATG] indicates the start codon; [TAA] indicates the stop codon; single underline indicates poly(A); double underline indicates potential polyadenylation signal; the three portions in bold indicates peroxidase activity bit point (APImLRLaWHSa) and peroxidase heme ligand proximal (DIALSGGHTL) .

图 2 *Faapx-c* cDNA 的核苷酸序列 (上排) 及推导氨基酸序列 (下排)

Fig. 2 Schematic representation of the nucleotide sequence (upper lines) and its deduced amino acid sequence (lower lines) of *Faapx-c* cDNA

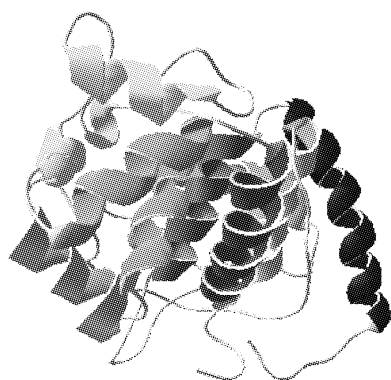


图 3 FaAPX-c 蛋白三维结构模型

Fig. 3 Secondary structures of FaAPX-c protein

2.2.4 FaAPX-c 蛋白的信号肽、卷曲螺旋及跨膜区预测和分析 FaAPX-c 蛋白信号肽预测显示该蛋白没有信号肽, 不属于分泌型蛋白, 其锚定蛋白概率、最大分隔位点概率都为 0; 卷曲螺旋预测显示该蛋白不存在卷曲螺旋结构, 只是在第 3~40 个氨基酸区域有卷曲螺旋存在

的可能; 跨膜区结构预测显示 FaAPX-c 蛋白没有跨膜结构, 不是跨膜蛋白, 不进行跨膜转运, 可推测其是在细胞质中行使催化功能。

2.2.5 FaAPX-c 蛋白翻译后修饰的预测和分析

FaAPX-c 蛋白翻译后修饰预测显示, 该蛋白不存在 N-糖基化位点, 但存在 21 个潜在的 O-糖基化位点和 11 个磷酸化位点, 其中, 有 4 个磷酸化位点分别位于第 152、160、173、196 位的 Ser 残基上, 有 3 个位于第 46、59、180 位的 Thr 残基上, 有 4 个位于第 12、47、97、190 位的 Tyr 残基上。

2.3 *Faapx-c* 基因的表达分析

半定量 RT-PCR 分析表明, 经 0 °C 低温处理后, 根、茎、叶中 *Faapx-c* 的表达随处理时间的延长呈现先升高后下降的趋势, 茎和叶在处理 12 h 时 *Faapx-c* 的表达量最高, 根在 24 h 时最高, 而 *Faapx-c* 在花中的表达呈明显下降趋势, 在 48 h 时已检测不到 *Faapx-c* 的表达 (图 5)。以上结果表明, *Faapx-c* 在草莓根、茎、叶中的转录可被低温诱导。

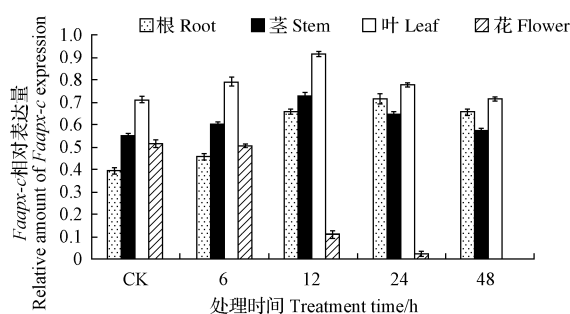


图4 草莓不同组织中 *Faapx-c* 在 0 °C 低温下的表达

Fig. 4 Expression of *Faapx-c* in different tissues of strawberry under 0 °C

3 讨论

抗坏血酸过氧化物酶(APX)是植物体内清除活性氧(ROS)的关键酶之一,存在4种同工酶^[14],其中胞质APX(cAPX)位于植物光合和非光合组织的细胞质中,低温、干旱等逆境都能导致植物体内cAPX产生mRNA,以清除植物体内的H₂O₂造成的伤害^[15]。

该研究利用RT-PCR和3'-RACE技术,克隆到1个包含3'端全长的长1034 bp的草莓“丰香”胞质*Faapx-c*基因。该基因在草莓“丰香”中的表达具有普遍性,但受到低温的诱导,表达量先升高后下降。这与罗娅^[16]对草莓APX的生理活性的研究结果一致,草莓叶片中的APX对低温很敏感,其活性随着低温条件下H₂O₂含量的升降而升降。说明在低温逆境条件下,*Faapx-c*基因能够提高植物抗性,促使APX活性增加,以清除植物体内的活性氧,进行自我保护。但随着低温处理时间的延长,草莓各组织受伤害的程度逐渐加大,植物体内积累过多的活性氧而不能被清除,最终使植物各组织受到低温伤害,抗氧化防御体系无法有效运行,因而*Faapx-c*的表达量也随之下降。

该试验还发现在草莓的根中*Faapx-c*的表达可以更长时间的维持在较高水平,说明草莓根部具有较高的抗寒能力,这种抗寒能力的提高是否是因为低温锻炼的结果,还有待进一步研究。而花中的*Faapx-c*在低温出现较短时间内也可以正常表达,但经过1 d的低温胁迫后,其表达量大幅度下降,在处理24 h时表达量已经很小,48 h后完全检测不到,说明该基因的表达具有组织

特异性,花是最易出现低温伤害的器官。该研究为进一步鉴定*Faapx-c*的功能及其对低温胁迫的响应机制的探索奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 陈敏,朱海生,温庆放,等. UPLC测定草莓果实中类胡萝卜素含量[J]. 果树学报,2013,30(4):706-771.
- [2] 李英华,袁海英,张辉,等. 采后正己醇处理对草莓果实活性氧代谢和衰老的影响[J]. 食品科学,2010,31(4):272-275.
- [3] FOYER C H, HALLIWELL B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbate acid metabolism[J]. Planta, 1976, 133: 21-25.
- [4] MATHEWS M C, SUMMERS C B, FELTON G W. Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects[J]. Archive of Insect Biochemistry and Physiology, 1997, 34(1): 57-68.
- [5] JESPERSEN H M, KAJAERSGARD I V, OSTERGAARD L, et al. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase[J]. Biochemical Journal, 1997, 326(2): 305-310.
- [6] 王竹青,陈云,杨玉婷,等. 甘蔗抗坏血酸过氧化物酶基因(*ScAPX*)的克隆及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 170-180.
- [7] ZHANG Z G, ZHANG Q A, WU J X, et al. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2(*OsAPX2*) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses[J]. PLoS One, 2013, 8(2): 57472.
- [8] 李泽琴,李静晓,张根发. 植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用[J]. 遗传, 2013, 35(1): 45-54.
- [9] 栗霞,张军科,马锋旺. 苹果叶片抗坏血酸过氧化物酶基因cDNA的克隆[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(10): 77-80.
- [10] 许传俊,孙叙卓,李玲,等. 蝴蝶兰抗坏血酸过氧化物酶基因克隆及其表达研究[J]. 园艺学报, 2012, 39(4): 769-776.
- [11] 曾秀存,孙万仓,方彦,等. 白菜型冬油菜抗坏血酸过氧化物酶(APX)基因的克隆、表达及其活性分析[J]. 作物学报, 2013, 39(8): 1400-1408.
- [12] 张勇. 草莓冷诱导转录因子CBF的克隆与结构分析及其抗寒特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007: 18-35.
- [13] SCOTTO-LAVINO E, DU G V, FROHMAN M A. 3' end cDNA amplification using classic RACE[J]. Nature Protocols, 2006, 1(6): 2742-2745.
- [14] URANO J, NAKAGAWA T, MAKI Y, et al. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase[J]. FEBS, 2000, 466: 107-111.
- [15] YOSHIMURA K, YABUTA Y, ISHIKAWA T, et al. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses[J]. Plant Physiology, 2000, 123(1): 223-234.
- [16] 罗娅. 低温胁迫与锻炼对草莓生理特性的影响和草莓几丁质酶基因的克隆[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.

Cloning and Expression of *Faapx-c* Gene and Bioinformatics Analysis in *Fragaria* × *ananassa* Based on RACE

HOU Yanxia¹, TANG Haoru², LIN Yuanxiu², CHEN Qing², ZHANG Yong², GUO Yan¹

(1. Department of Horticulture, Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan, Shanxi 030009; 2. Horticultural College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

微扦插法保存茄子远缘杂交后代技术研究

张婷婷, 罗双霞, 王星, 申书兴, 陈雪平

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以茄子远缘杂交 F_2 代群体为试材,研究了不同杀菌剂、处理时间和培养基成分对接种茎段及其腋芽生长情况的影响。结果表明:酒精处理 30 s 后再用 0.1% 升汞处理 7~8 min, 茎段杀菌效果最好,健康茎段率为 40%~55%;酒精处理 30 s 后再用 0.1% 升汞处理 2~3 min, 新芽杀菌效果最佳,新芽健康可用率最高为 73.33%;适宜的新芽增殖培养基为 $MS+0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 。

关键词:茄子;微扦插;远缘杂交后代;保存

中图分类号:S 641.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)11-0092-04

茄子是人们日常膳食中不可或缺的十大蔬菜种类之一,其世界年产量达 $4.94\times 10^7\text{ t}$,我国茄子年产量位居世界之首。近年来,因设施栽培茄子发展迅猛,使得我国茄子生产基本实现了周年供应。但由于长期人工栽培,许多病虫害及低温逆境引起茄子减产,甚至造成毁灭性损失。而茄子野生种具有许多优良的抗性基因,多年来许多育种工作者试图通过远缘杂交手段向栽培种导入这些珍贵的性状以进行栽培种的品种改良,但远缘杂交障碍限制了茄子野生资源与栽培种间 F_1 代及其衍生后代的获取,阻碍了茄子野生资源中抗性基因的研究与利用。

F_2 代群体是进行遗传作图和 QTL (quantitative trait locus, 数量性状位点) 研究的重要材料,但它是临时分离群体,无法获得多年多点的重复试验数据,严重影响

了 QTL 定位的准确性。因此,探索长期保存茄子远缘杂种及其衍生后代的高效方法,对于茄子野生资源中优异基因的利用和重要数量性状的遗传研究具有十分重要的意义。

微扦插法是指在无需或仅需少量激素条件下,离体培养带 1 个芽的茎段(单个茎节或微型插条),使顶芽或腋芽发育成苗^[6-7]。该方法结合扦插和组织培养技术,具有繁殖系数高、占地面积小、培养周期短^[8-9]、环境条件易控制和适于材料长年保存等特点。目前微扦插法多用于东北红豆杉、欧美山杨等木本植物的快速繁育^[6,10-12],在茄子远缘杂交后代长期保存方面的研究还鲜见报道。现以茄子远缘杂种的 F_2 代群体为试材,比较研究了不同杀菌剂、处理时间和培养基成分对接种茎段及其腋芽生长情况的影响,以期建立高效的茄子远缘杂种及其衍生后代的长期保存方法提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为河北农业大学蔬菜育种课题组提供的茄子远缘杂种 11-435(栽培茄)×11-587(野生茄)的 F_2 代群体。

1.2 试验方法

1.2.1 茄子远缘杂交 F_2 代群体茎段选择与处理 于晴

第一作者简介:张婷婷(1990-),女,硕士研究生,研究方向为蔬菜育种。E-mail:472351822@qq.com.

责任作者:陈雪平(1971-),男,博士,教授,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:chenxueping@hebau.edu.cn.

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2012BAD02B02-3);河北省现代农业产业技术体系蔬菜创新团队资助项目。

收稿日期:2016-02-25

Abstract: Taking *Fragaria*×*ananassa* cv. Toyonaka as material, a cytosolic ascorbate peroxidase gene *Faapx-c* was cloned by RT-PCR and 3'-RACE technology, and the bioinformatic analysis of *Faapx-c* was carried out. The results showed that *Faapx-c* was 1 034 bp in length coding a protein FaAPX-c, which was a stable, hydrophilicity and non-secreted protein. The secondary structure of FaAPX-c contained mainly α -helix and random coil, with reliable 3D structure. And the protein belonging to a member of plant peroxidase superfamily. Expression analysis of *Faapx-c* gene showed that it was induced by low temperature in roots, stems, leafs, and the expression amounts were increased firstly and then decreased, but gradually disappeared in flowers. This study laid the foundation for further research on the function of *Faapx-c* gene.

Keywords: *Fragaria*×*ananassa*; *Faapx-c* gene; RACE; cloning; expression; bioinformatics