

牛 *Dmrt7* 基因的 cDNA 克隆及遗传变异淮亚红², 许尚忠^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 中山火炬职业技术学院, 广东中山 528436)

摘要 [目的] 探讨牛 *Dmrt7* 基因的生物学功能及群体遗传变异情况, 为进一步研究该基因对牛精液品质的影响奠定基础。[方法] 以牛睾丸组织为材料, 根据 GenBank 上发表的小鼠的 *Dmrt7* 基因序列设计并合成 2 对引物, 通过 RT-PCR 分别进行了扩增并运用 DNAMAN 软件及在线工具对所得到的序列进行了生物信息学分析; 同时, 以牛肾脏、肝脏、睾丸、肺、脾脏、瘤胃、子宫、小肠、心脏、卵巢和肌肉共 11 个组织为材料, 另外设计 2 对引物用于组织表达谱分析。利用 PCR-SSCP 技术和 DNA 测序对 *Dmrt7* 基因的多态性进行检测。[结果] 获得了一个长为 1 616 bp 的 cDNA 片段 (GenBank 登录号为 EF 534775), 该 cDNA 包含由 1 113 个碱基组成的开放读码框 (ORF), 该 ORF 编码 370 个氨基酸; 发现在第四内含子上有一个 C/G 突变, 随后在 277 头本地牛品种和国外牛品种中进行群体多态性检测, 发现 G 等位基因频率分布范围从 0~0.413 8; 基因杂合度, 有效等位基因数和多态信息含量分别为 0~0.485 1、1.000 0~1.942 3 和 0~0.367 5。[结论] 克隆了牛 *Dmrt7* 基因的 cDNA 序列并进行组织表达谱分析, 该 G 等位基因在本地牛品种和外国牛品种中没有差异。

关键词 *Dmrt7* 基因; 遗传变异; 牛; SNP

中图分类号 S823.8[†]1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)30-14607-04

Molecular Cloning and Genetic Variant of the *Dmrt7* gene in Cattle

HUAI Ya-hong et al (Laboratory of Molecular Biology and Bovine Breeding, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract [Objective] The paper aimed to study the biological function and group genetic variation situation of cattle *Dmrt7* gene, which laid a foundation for the future study on the effects of this gene to the quality of cattle sperm. [Method] Cattle testis tissues as materials, 2 pairs primers were designed and combined according to *Dmrt7* gene sequence of mice published by GenBank, amplified through RT-PCR and sequence obtained from DNAMAN software and online tool were used for bioinformatics analysis; Meanwhile, 11 tissues of cattle kidney, liver, testis, lung, spleen, rumen, uterus, small intestine, heart, muscle as materials, besides, 2 pairs primers were designed for tissue expression profile analysis. *Dmrt7* gene polymorphism were determined by PCR-SSCP technology and DNA sequence. [Result] cDNA fragment of 1 616 bp length (accession no is EF 534775), including ORF composed of 1 113 bases, this ORF coded 370 amino acids; and a C/G mutation was found on the 4th intron, and then group polymorphism were tested in the 277 local cattle varieties and abroad cattle varieties, the distribution range of G allele frequency was 0-0.413 8; the contents of gene heterozygosity, effective number of alleles and polymorphism information were 0-0.485 1, 1.000 0-1.942 3, and 0-0.367 5. [Conclusion] The cDNA sequence of cattle *Dmrt7* gene was cloned and tissue expression profile were analyzed, there were no difference between local cattle variety and abroad cattle variety in G allele.

Key words *Dmrt7* gene; Genetic variation; Cattle; SNP

牛精液品质是影响母牛受胎率、提高种用效率的重要因素, 同时, 也是影响生产效益的关键。提高牛精液品质一般只是从引进优秀种公牛, 提高种公牛营养水平等方面着手, 从遗传上很少涉猎, 因此对于产弱精和不产精的种公牛不能了解它的内在原因。

doublesex and mab-3 related transcription factor 7 (*Dmrt7*) 基因在控制性别发育、调节性别分化和雄性不育方面有重要作用^[1]。在动物中, *Dmrt7* 主要含有 DM 结构域 (DNA binding domain) 并且通过结构域去调节性别分化。DM 结构域是一个小 DNA 绑定基序 (DNA-binding motif), 包含 2 个不同的部分: N 端的 DNA 绑定部分和 C 端的无序尾巴。在成年小鼠上, *Dmrt7* 组织特异表达和 *Dmrt1* 组织特异表达相同, 仅在睾丸组织中表达^[2]。*Dmrt7* 基因缺失的小鼠生长正常, 但是它的睾丸比正常的雄性小鼠要小, 活精子也少且雌性小鼠不育。通过组织学分析发现, *Dmrt7* 基因缺失的小鼠生精细胞缺乏且伴随着后粗线期精母细胞标记 mRNA (Cyclin A1 mRNA) 表达的减少和联会丝复合物蛋白 3 (synaptonemal complex protein 3) 精母细胞的聚集, 表明了 *Dmrt7* 基因缺失的小鼠精子发生停留在粗线期^[1,3]。进一步研究发现, 在成

年雄性附睾部分完全没有精子, 但是附睾精索中有精子出现, 在输精管中很难发现有精子存在, 这表明 *Dmrt7* 基因也可能在组织分化和发育方面起着重要作用^[4-5]。目前, 国内对雄性不育多集中牦牛与普通黄牛种间杂交造成的不育方面的研究^[6], 对目前存在的影响种内种公牛产弱精和不产精方面还没有相关报道, 这对一些优秀种公牛来讲造成资源浪费。笔者以 RT-PCR 技术克隆了牛 *Dmrt7* 基因的 cDNA 完全编码区序列, 旨在通过对该基因的功能验证探讨影响牛精子发生的调控机制, 为改良精液品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及其组织。4 岁西门塔尔公牛 2 头, 由沈阳市昌图大兴乡试验牛场提供。屠宰后, 立即用 75% 乙醇预先处理的手术刀片切取适量肾脏组织、肝脏组织、睾丸组织、肺组织、脾脏组织、瘤胃组织、子宫组织、小肠组织、心脏组织、卵巢组织和肌肉组织, 用纱布分别包裹, 投入液氮中, -70℃ 冻存备用。

1.1.2 主要试剂。DL100 DNA Marker I 和 DL600 DNA Marker II, 购自普博欣生物公司; PCR 产物纯化试剂盒, 购自天为时代公司; PMD19-T 载体、反转录 PCR 试剂盒, 均购自 Takara 公司; 总 RNA 提取试剂, 购自 Gibco 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 引物的设计及合成。从 GenBank 上查找小鼠的 *Dmrt7* 基因的 cDNA 序列 (BC 029202), 并采用 NCBI 上的 Blast 工具搜索与小鼠 *Dmrt7* 基因高度同源的牛的 ESTs, 采

基金项目 “十一五”国家科技支撑计划重大项目 (2006BAD01A10); “十一五”国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (2006AA10Z197) 资助。

作者简介 淮亚红 (1977-), 女, 陕西扶风人, 讲师, 从事生物技术与家畜育种研究。* 通讯作者, 博士生导师, E-mail: simmenta@vip.sina.com。

收稿日期 2009-06-05

用 DNASTar6.0 软件中的 Seqman 程序进行拼接形成重叠群 (contig), 与牛的基因组比对后, 大致估计其外显子、内含子

的位置, 并以 contig 为模板, 采用 Primer5.0 进行引物设计 (表 1)。引物由赛百盛公司合成。

表 1 PCR 所用引物、产物大小及退火温度

Table 1 Primer sequences and corresponding PCR product size and anneal temperature

基因符号	引物名称	引物	退火温度//℃	片段大小//bp	备注
Gene symbol	Primer names	Primers (5'→3')	Annealing temperature	Size	Note
Dmrt7	Primer 1	F:5' TTTCGCCTCCTCCAGATTGA 3' R:5' AGGACCCAAGGAAGGTAAGA 3'	59.0	1 378	cDNA 克隆
	Primer 2	F:5' TGTGCCAAGAACCTGCTATC 3' R:5' AGGACCCAAGGAAGGTAAGA 3'	59.0	729	cDNA 克隆
	Primer 3 [*]	F:5' TGGACCCCAGTAAAATGCCT 3' R:5' CCTGGGTTAGGTGCCTCTTT 3'	59.1	296	Intron4 扩增
	Primer 4 [#]	F:5' CCCATCCTTTCCTTTTAGAG 3' R:5' GGGAAAGTAGGGAATAATG 3'	55.1	303	表达谱分析
	β-actin	F:5'-GATGTGGATCAGCAAGCA- 3' R:5' -CCTCACCGTTCCAGTTT-3'	52.0	230	表达谱分析

1.2.2 牛睾丸组织总 RNA 提取。取睾丸组织约 100 mg, 采用 TRIzol 进行总 RNA 提取, 取出 1 μl 粗提总 RNA 在 0.7 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测完整性, 利用分光光度计进行 RNA 浓度检测。测定其 A_{260}/A_{280} 值为 1.7 ~ 1.9^[6]。

1.2.3 牛 Dmrt7 基因的 RT-PCR 反应。cDNA 第一链的合成: 利用反转录酶, 将 mRNA 转录成 cDNA 第一链。反转录的体系为 50 μl: 总 RNA 1 μl, Oligo dT18 (14 nmol/μl) 5 μl, M-MLV (200 U/μl) 反转录酶 1 μl, RNA 酶抑制剂 (40 U/μl) 1 μl, dNTP Mix (10 mmol/L) 6.25 μl, 5 × RT Buffer 10 μl, 无 RNase 去离子水 25.75 μl。反转录条件为: 70 °C 5 min, 37 °C 1 h, 95 °C 5 min。反应产物在 -70 °C 保存。

PCR 反应体系为 20 μl: 2 × Buffer 10 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μl, 模板 cDNA 一链 1 μl, 上、下游引物 (表 1 中的 Dmrt7-1 和 Dmrt7-2 引物对) 各 0.6 μl, LA Taq 酶 0.2 μl, 无菌水 7.0 μl。反应条件为 94 °C 各预变性 90 s; 94 °C 各 30 s, 59 °C 各 30 s, 72 °C 80 s (Dmrt7-1 引物对)/60 s (Dmrt7-2 引物对), 各 40 个循环; 72 °C 各延伸 10 min。PCR 产物用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 牛 Dmrt7 基因 PCR 产物的克隆及重组质粒的筛选和鉴定。按 PCR 产物纯化试剂盒说明将 RT-PCR 扩增产物纯化。将 pMD19-T Vector 和纯化后的 PCR 扩增产物进行连接反应。连接反应产物转化宿主菌 JM110 感受态细胞, 涂布含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的选择平板培养 12 ~ 16 h, 挑取白色菌落于装有 1.5 ml LB 培养基的 1.5 ml 的离心管中, 在空气浴振荡器中摇动 3 h, 等出现白色絮状沉淀后取 1 μl 进行 PCR 扩增。扩增条件和反应参数同上述 PCR 反应体系。PCR 扩增反应结果阳性的菌液 300 μl 送诺赛生物公司进行序列测序。

1.2.5 牛 Dmrt7 基因的序列分析和系统发育树的建立。克隆所得到的 2 个片段的序列经 Seqman 软件拼接成一条序列。然后在线工具 BLASTn 进行同源性比较分析, 再将测序结果与从 GenBank 上选择的 5 种哺乳动物的相应序列用 DNAMAN 软件进行 cDNA 序列的同源性比较并用氨基酸序列构建系统发育树。

1.2.6 牛 Dmrt7 基因的组织表达谱分析。

1.2.6.1 牛各组织总 RNA 提取。各取 100 mg 肾脏、肝脏、睾丸、肺、瘤胃、子宫、小肠、脾脏、心脏、卵巢、肌肉组织, 总 RNA 提取方法同“1.2.2”。

1.2.6.2 牛 Dmrt7 基因的 RT-PCR 反应。取各组织的总 RNA 1 μl, 分别进行 cDNA 第一链的合成。方法同“1.2.3”中 cDNA 第一链的合成。

PCR 反应体系为 20 μl: 2 × Buffer 10 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μl, 模板 cDNA 一链 1 μl, 上、下游引物 (表 1 中的 Dmrt7-bd 引物对) 各 0.6 μl, LA Taq 酶 0.2 μl, 无菌水 7.0 μl。反应条件为 94 °C 预变性 90 s; 94 °C 30 s, 57.8 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.6.3 牛 β-actin 内参的 RT-PCR 反应。取各组织的总 RNA 1 μl, 分别进行 cDNA 第一链的合成。方法同“1.2.3”中 cDNA 第一链的合成。

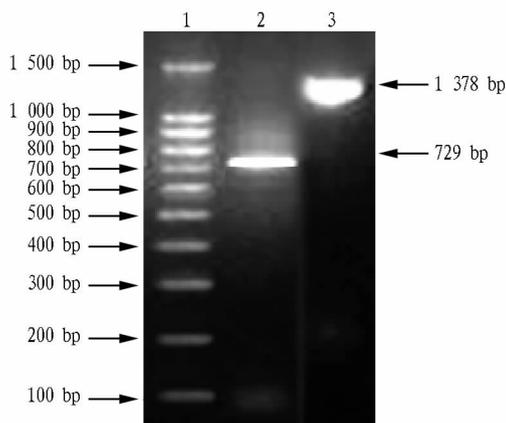
PCR 反应体系为 20 μl: 2 × Buffer 10 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μl, 模板 cDNA 一链 1 μl, 上、下游引物 (表 1 中的 β-actin 引物对) 各 0.6 μl, LA Taq 酶 0.2 μl, 无菌水 7.0 μl。反应条件为 94 °C 预变性 90 s; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.7 牛 Dmrt7 蛋白质结构功能域预测。从 GenBank 上选取人 (XP_001035373)、小鼠 (XP_082008)、大鼠 (XP_001059574)、狗 (XP_855292) 和短尾猿 (XP_001003345) 5 种不同的动物 Dmrt7 蛋白序列, 在 DNAMAN 软件中进行 Multiple Alignment, 用于分析蛋白的跨膜区。同时, 在线通过此网址进行保守结构域预测 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)。

2 结果与分析

2.1 牛 Dmrt7 基因片断的大小分析 以牛睾丸组织总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 结果显示, 扩增出 1 378 bp 的条带和 729 bp 的条带 (图 1), 与预期扩增产物大小一致。

由图 1 可见, 扩增出了 1 378 bp 和 729 bp 的条带, 将该 PCR 产物纯化后, 克隆到 pMD19-T Vector 上, 经蓝白斑筛选



注:1. 分子量标记 Marker; 2~3. *Dmrt7* PCR 扩增产物。

Note: 1. DL100 Marker; 2-3. cDNA of bovine *Dmrt7*.

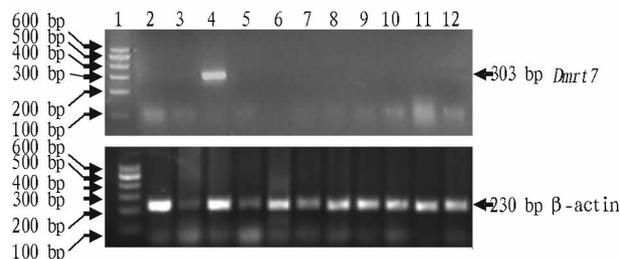
图1 RT-PCR 扩增牛 *Dmrt7* 基因的产物电泳图

Fig. 1 Product electrophoretogram of amplification cDNA fragment of bovine *Dmrt7*

和菌斑 PCR 获得了阳性克隆,序列测定结果表明,所扩增片段实际长为 1378 bp 和 729 bp,经 Lasergene 6.0 的 Seqman 软件拼接后通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf> 在线开放阅读框推测其编码 370 个氨基酸。在 GenBank 中与 *Dmrt7* 基因的核苷酸及其编码氨基酸序列对比显示,所扩增牛 cDNA 片断确实为 *Dmrt7* 基因片断,并在 GenBank 中登录,注册号为 EF 534775。

2.2 组织表达谱分析 以牛各组织总 RNA 逆转录的 cDNA

为模板,用表 1 中的 *Dmrt7*-bd 引物对和 β -actin 引物对进行 RT-PCR 扩增,经 1.5 g/L 的琼脂糖电泳,结果如图 2。由图 2 可见, β -actin 内参在所有组织中都有表达,而 *Dmrt7* 基因仅在睾丸组织中有表达。



注:1. 分子量标记 Marker; 2~12. 分别为肾脏、肝脏、睾丸、肺、瘤胃、子宫、小肠、脾脏、心脏、卵巢、肌肉组织。

Note: 1. DL 600 bp Marker; 2-12. Kidney, liver, testicle, lung, rumen, uterus, small intestine, spleen, heart, ovary, muscle, respectively.

图2 *Dmrt7* 基因及内参在各组织中的表达

Fig. 2 Expression of *Dmrt7* gene and control in various tissues

2.3 牛 *Dmrt7* 与其他哺乳动物的 *Dmrt7* cDNA 序列的同源性比较 利用 DNAMAN 软件对克隆所得序列与其他 5 个物种的序列进行同源性比较的结果表明(表 2):牛的 *Dmrt7* 基因的 cDNA 序列与狗的 cDNA 序列的同源性最高,与短尾猿的 cDNA 序列的同源性次之,与人、小鼠和大鼠的 cDNA 序列的同源性较远。

表 2 *Dmrt7* 基因的 cDNA 同源性比较

Table 2 Homologous comparison of the *Dmrt7* gene from some mammal

种	基因登录号	牛	人	小鼠	大鼠	狗
Species	Accession No.	Cattle	Human	Mouse	Rat	Dog
牛 Cattle	EF 534775					
人 Human	BC 029202	83.9				
小鼠 Mouse	BC 100434	81.5	78.3			
大鼠 Rat	XM_001068636	81.7	78.7	95.7		
狗 Dog	XM_850199	85.6	83.4	81.2	80.5	
短尾猿 Macaque	XM_001103345	84.1	96.4	76.7	76.9	81.0

2.4 牛 *Dmrt7* 与其他哺乳动物 *Dmrt7* 氨基酸序列的遗传进化树分析 从 GenBank 上选取人(XP_001035373)、小鼠(XP_082008)、大鼠(XP_001059574)、狗(XP_855292)和短尾猿(XP_001003345)5 种不同动物的 *Dmrt7* 蛋白序列,与该研究中推断出的牛 *Dmrt7* 蛋白序列进行进化上的分析。通过 DNAMAN 软件进行系统进化分析,结果见图 3。

由图 3 可知,牛首先与狗聚类,在进化上亲缘关系最近,其次与小鼠和大鼠聚类,再与人和短尾猿聚类。说明牛与狗在进化上亲缘关系最近,与人和短尾猿最远。

2.5 牛 *Dmrt7* 蛋白质结构功能域分析 通过 DNAMAN 软件对牛、人、小鼠、大鼠和短尾猿 *Dmrt7* 蛋白的跨膜区进行了预测,发现这种蛋白没有跨膜区,该蛋白只有一个 DM 结构域。同时,通过网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)进行保守结构域预测,结果见图 4。

2.6 牛 *Dmrt7* 基因 PCR-RFLP、群体遗传特征

2.6.1 PCR 产物及其 SSCP 结果。采用表 1 中的引物 3 和退火温度进行 PCR,结果得到扩增片段为 *Dmrt7* 基因第 4 内

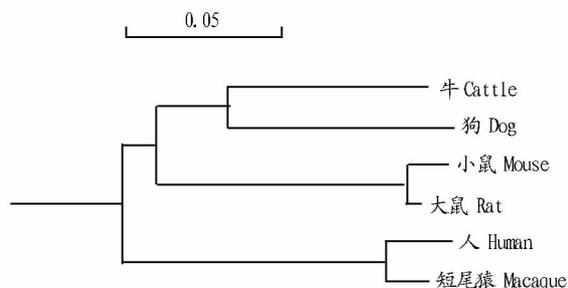


图3 哺乳动物 *Dmrt7* 氨基酸序列遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid *Dmrt7* in mammalian

含子的序列,其大小为 296 bp,结合测序,发现在 27 bp 处存在 C/G 突变,其产物经 SSCP 电泳后出现 3 种条带型:CC、CG 和 GG 型(图 5)。

2.6.2 突变位点的群体遗传多态性。5 个牛群体中的基因频率统计结果见表 3。C/G-27 位点在不同品种中的遗传特性见表 4。等位基因 C 的频率和 G 的频率分别为 0.787 2 和 0.2125。3 种基因型 CC、CG 和 GG 型在群体中的基因型频

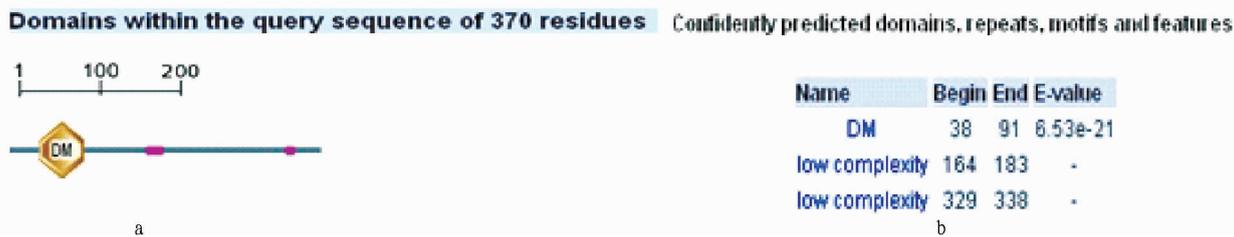
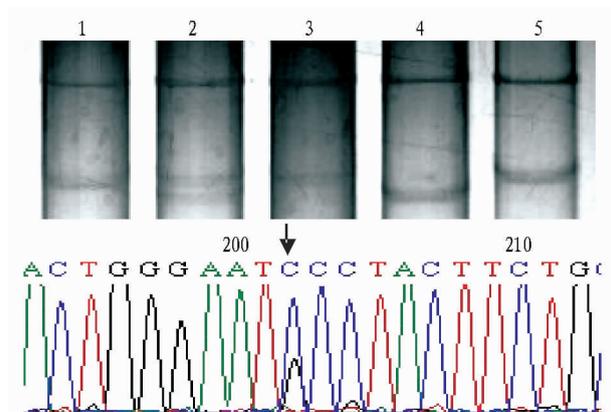


图4 Dmrt7 蛋白的功能域 (a) 和功能域的组成成分 (b)

Fig. 4 Functional field the Dmrt7 protein (a) and Composing element of functional field (b)



注:泳道 1,3,5 为 CC 基因型;泳道 2 为 CG 基因型,泳道 4 为 GG 基因型。

Note: Lane 1,3 and 5, CC; Lane 2, CG; Lane 4, GG and the position of mutation (C/G).

图5 PCR 产物 10% 聚丙烯酰胺凝胶 SSCP 电泳

Fig. 5 SSCP of PCR product in 10% polyacrylamide gel

率分别为 0.732 0、0.110 5 和 0.157 3。西门塔尔牛和秦川牛在该多态位点处于低度多态,其他群体处于中度多态 ($PIC < 0.25$ 为低度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC > 0.5$ 为高度多态)。

3 讨论

该试验结果表明,牛 *Dmrt7* 基因仅在睾丸组织中表达,在所研究的其他组织中没有表达,这与 Masaki 等^[1]对 *Dmrt7* 基因在小鼠各组织中的表达结论是一致的。

Foster 等^[8]提出,基于氨基酸序列系统进化树分析比核苷酸序列分析更可靠,因为 DNA 序列的碱基序列有突变、缺失等现象。该试验结果表明,牛、人、小鼠、大鼠、短尾猿猴和狗在进化关系上可分为 2 大群:人和短尾猿形成第 1 群,牛和其他 3 个物种形成第 2 群。在第 2 群内,又可分为 2 个亚群,牛与狗组成第 1 亚群,小鼠和大鼠形成第 2 亚群。这种聚合表明了偶蹄目动物之中的牛和食肉目动物中的狗亲缘关系比较近。这可能反应了 *Dmrt7* 在牛和狗上的功能是相

表 3 牛 *Dmrt7* 基因在不同品种中的等位基因频率

Table 3 Allele frequencies of the bovine *Dmrt7* gene in different species

品种 Species	数量 No. of animals	基因频率 Allele frequency		基因型频率 Genotype frequency		
		C	G	CC	CG	GG
鲁西牛 Luxi cattle	30	0.633 3	0.366 7	0.500 0(15)	0.266 6(8)	0.233 4(7)
西门塔尔牛 Simmental	80	1.000 0	0	1(80)	0	0
秦川牛 Qinchuan cattle	68	1.000 0	0	1(68)	0	0
晋南牛 Jinnan cattle	29	0.586 2	0.413 8	0.551 7(16)	0.068 9(2)	0.379 3(11)
海福特 Hereford	70	0.717 4	0.282 6	0.608 7(38)	0.217 3(22)	0.173 9(10)

表 4 牛 *Dmrt7* 基因的多态位点在不同群体中的遗传特性

Table 4 Genetic characteristics of polymorphic site of the bovine *Dmrt7* gene

品种 Species	卡方值 χ^2	多态信息含量 <i>PIC</i>	基因杂合度 Gene Heterozygosity	基因纯合度 Gene homozygosity	有效等位基因数 Effective number of alleles
鲁西牛 Luxi cattle	5.440 1	0.356 6	0.464 4	0.535 6	1.867 2
西门塔尔牛 Simmental	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0
秦川牛 Qinchuan cattle	0.000 0	0.000 0	0.000 0	1.000 0	1.000 0
晋南牛 Jinnan cattle	21.341 0	0.367 5	0.485 1	0.514 9	1.942 3
海福特 Hereford	9.898 0	0.323 3	0.405 5	0.594 5	1.682 0

同的,很有可能都是控制性别发展、调节性别分化和雄性不育的基因,这有待于进一步的深入研究。

该试验以牛 *Dmrt7* 基因来研究在不同群体中的遗传变异,采用 SSCP 方法对该基因第 4 内含子的 27 位点在不同牛群的基因型分布进行了检测和统计分析。西门塔尔牛和秦川牛在该多态位点处于低度多态,其他群体在该 C/G-27 位点处于中度多态。说明鲁西牛、晋南牛和海福特牛群体内变

异程度大,存在较大的选择潜力,在世代的选择中有望获得更多的遗传进展。

参考文献

[1] MASAKI K, KATSUHIKO N. Mice deficient in *Dmrt7* show infertility with spermatogenic arrest at pachytene stage[J]. FEBS Letters, 2006, 580: 6442-6446.
 [2] RAYMOND C S, KETTLEWELL J R, HIRSCH B, et al. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role (下转第 14615 页)

由表 2 可知,在激素浓度相同条件下,MS 培养基对蝴蝶兰茎尖原球茎诱导效果最佳,诱导率达 72%,诱导系数为 2.20。此外,茎尖在 4 种培养基上培养 20 d 时,茎尖基部开始出现不规则状突起,淡黄色,表面光滑,约 30 d 时,原球茎开始出现,淡黄色,表面密被白色短绒毛。

2.3 不同培养基对蝴蝶兰增殖的影响 将初代培养且生长正常的蝴蝶兰原球茎转移到增殖培养基上。每个处理 5 瓶,每瓶 5 块,重复 3 次,30 d 后统计数据,结果见表 3。增殖系数 = 增殖原球茎总数/增殖外植体数。

表 3 不同培养基对蝴蝶兰原球茎增殖的影响

Table 3 Effects of different medium on multiplication of *Phalaenopsis amabilis* protocorm

编号 Code	培养基 Medium	增殖系数 Multiplication coefficient
1	MS + NAA 0.50 mg/L + 6-BA 2.00 mg/L	8.36
2	MS + NAA 1.00 mg/L + 6-BA 2.00 mg/L	9.62
3	MS + NAA 2.00 mg/L + 6-BA 2.00 mg/L	6.79
4	MS + NAA 0.50 mg/L + 6-BA 3.00 mg/L	7.47
5	MS + NAA 1.00 mg/L + 6-BA 3.00 mg/L	7.23
6	MS + NAA 2.00 mg/L + 6-BA 3.00 mg/L	7.79
7	MS + NAA 0.50 mg/L + KT 0.10 mg/L	6.82
8	MS + NAA 1.00 mg/L + KT 0.10 mg/L	7.14
9	MS + NAA 2.00 mg/L + KT 0.10 mg/L	6.53
10	MS + NAA 0.50 mg/L + KT 0.20 mg/L	6.81
11	MS + NAA 1.00 mg/L + KT 0.20 mg/L	4.49
12	MS + NAA 2.00 mg/L + KT 0.20 mg/L	7.87
13	MS + NAA 0.50 mg/L + KT 0.50 mg/L	5.35
14	MS + NAA 1.00 mg/L + KT 0.50 mg/L	5.64
15	MS + NAA 2.00 mg/L + KT 0.50 mg/L	6.12
16	MS + NAA 0.50 mg/L + KT 1.00 mg/L	3.88
17	MS + NAA 1.00 mg/L + KT 1.00 mg/L	5.34
18	MS + NAA 2.00 mg/L + KT 1.00 mg/L	4.92

由表 3 可知,2 号培养基的原球茎增殖系数最高,达 9.62,16 号最差,仅为 3.88。6-BA 对蝴蝶兰原球茎增殖的影响比 KT 效果好;当 KT 浓度大于 0.20 mg/L,原球茎增殖系数明显下降。当 6-BA 浓度为 2.00 mg/L 时,NAA 浓度为 0.50 ~ 1.00 mg/L 效果最好。

2.4 不同培养基对蝴蝶兰生根的影响 待芽长至 4 ~ 6 cm 时,截取生长一致的无菌苗幼苗接入不加任何激素的 1/2 MS、MS、White、B₅ 培养基上,每个处理 30 瓶,每瓶 1 株,重复 3 次。10 d 后统计数据,结果见表 4。

由表 4 可知,在 1/2 MS 培养基上根生长较快,生根率达 94.6%,平均根长为 0.86 cm,根长势粗壮,数量多;而在 White 培养基上,生根率仅为 89.17%,平均根长仅为 0.62 cm,且长势较弱,数量较少。B₅、MS 培养基的生根情况处于

中间状态。

表 4 不同基本培养基对蝴蝶兰生根的影响

Table 4 Effects of different basic medium on *Phalaenopsis amabilis* rooting

培养基类型 Medium type	生根率//% Rooting rate	根数量//个 Number of roots	根长度//cm Root length	根粗度 Root richness
White	89.17	3.60	0.62	一般
B ₅	90.83	4.00	0.77	较粗
MS	92.49	4.10	0.84	较粗
1/2 MS	94.42	4.30	0.86	粗壮

3 结论与讨论

(1) 蝴蝶兰原球茎的诱导主要受外植体、培养基和培养条件等因素的共同影响,其中,外植体最难以控制,这与外植体本身的生长发育和生理生化状态有关^[3]。因此,对外植体的筛选是组培中较关键的技术。蝴蝶兰组织培养过程中,采用同样培养基处理时,茎尖比叶片、花梗侧芽作为外植体效果较好。

(2) 在激素浓度相同条件下,1/2 MS、MS、White、B₅ 作为基本培养基均能诱导出原球茎,但 MS 效果最好,且诱导的原球茎数量多,密度大。

(3) 以 MS 作为基本培养基对蝴蝶兰原球茎进行增殖培养,激素浓度为 NAA 1.00 mg/L 和 6-BA 2.00 mg/L 时,增殖效果最好。

(4) 蝴蝶兰生根过程中,在 1/2MS 培养基上根生长最快,生根率可达 94.42%,根长可达 0.86 cm,长势最粗壮,数量最多,说明低浓度的盐分有利于侧根发生。

参考文献

- [1] 张启香,方炎明,张晓平. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物资源与环境学报,2004(3):38-40.
- [2] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- [3] 张秀清,王志武,刘玉敬,等. 蝴蝶兰实生苗不同器官的离体培养[J]. 植物学通报,1996(1):51-54.
- [4] MENG D Q, YUAN D B, ZHANG Y F, et al. Reproduction of the three-line genic male sterile line parent mian 7MB-1 (*Brassica Napus* L.) and seed production of F1 based on somatic tissue culture[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(1):22-25, 114.
- [5] 李向英,尹同萍,牛蕴华,等. 蝴蝶兰的快速繁殖及栽培管理研究[J]. 山东农业科学,2000(4):13-14.
- [6] ZHANG W, GUO X D, WANG Y, et al. Study on tissue culture and effective clone establishment of *Hemistepta lyrata* bunge[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(1):47-50, 104.
- [7] 肖丽红,黄鑫文,陈创国. 蝴蝶兰组织培养与快速繁殖技术研究进展[J]. 广东农业科学,2007(3):39-42.
- [8] ZHAO X J, ZHANG H X. Study on tissue culture and radiation mutation of *astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(2):37-40.
- [9] 王慧瑜,张晓申,杨录军等. 蝴蝶兰的胚培养技术及其快速繁殖研究[J]. 北方园艺,2003(5):57.

(上接第 14610 页)

- in vertebrate sexual development [J]. Dev Biol, 1999, 215:208-220.
- [3] KIM S, KETTLEWELL J R, ANDERSON R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad [J]. Gene Expression, 2003, 3(1):77-82.
 - [4] RAYMOND C S, MURPHY M W, O'SULLIVAN M G, et al. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation [J]. Genes Dev, 2000, 14:2587-2595.
 - [5] SEO K W, WANG Y, KOKUBO H, et al. Targeted disruption of the DM do-

main containing transcription factor Dmrt2 reveals an essential role in somite patterning [J]. Dev Biol, 2006, 290:200-210.

- [6] 余劲聪,潘春,马正花,等. 牦牛远缘杂种雄性不育的研究现状[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2005(S1):16-19.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3 版. 北京:科学出版社,2001:516-532.
- [8] FOSTER P G, HICKEY D A. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions[J]. Molecular Evolution, 1999, 48:284-290.