

橡胶树不同品系橡胶粒子蛋白的比较研究

吴坤鑫, 王震, 姚茂平, 陈健, 陈守才

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737)

摘要 [目的] 对橡胶树不同品系橡胶粒子蛋白进行比较研究。[方法] 以11个橡胶树品系为试材, 采用不同离心速度分级分离方法, 获得不同直径大小的纯化橡胶粒子, 分别洗脱其膜蛋白并作电泳SDS PAGE分析, 并比较了高产品系和低产品系胶乳中的大橡胶粒子膜蛋白质谱。[结果] 14.5、24.0、27.0、32.0、34.0和49.0 kD等蛋白条带的含量在不同直径大小的橡胶粒子上有明显变化, 其中14.5 kD蛋白是橡胶延长因子, 24.0 kD蛋白是小橡胶粒子蛋白。橡胶树各个品系具有各自独立的特征蛋白谱带, 主要表现为在品系之间存在某些谱带表达量上的差异, 其中27.0 kD橡胶粒子膜蛋白在耐乙稀利刺激的PR107中的丰度要显著高于不耐乙稀利刺激的海垦1号。[结论] 橡胶粒子膜表面的一些蛋白条带可能跟橡胶粒子直径大小或发育相关。

关键词 橡胶树; 橡胶粒子膜蛋白; 品系; SDS PAGE

中图分类号 S794.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15785-03

Comparative Study of Electrophoretic Patterns of Rubber Particle Proteins from Different Clones of *Hevea brasiliensis*

WU Kun-xin et al (Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract [Objective] The study aimed to compare the electrophoretic patterns of rubber particle proteins from different clones of *Hevea brasiliensis*. [Method] With 11 clones of *H. brasiliensis* as the tested materials, the rubber particles with different diameter size were fractionated and purified respectively by centrifugal separation methods. Their membrane proteins were eluted for SDS PAGE analysis and the electrophoretic patterns of large rubber particle membrane proteins in the latex between high yielding and low yielding rubber trees were compared by SDS PAGE. [Result] SDS PAGE of rubber particle membrane proteins (RPMPs) shows that the contents of the protein bands with MW at 14.5, 24.0, 27.0, 32.0, 34.0 and 49.0 kD had a significant change among the rubber particles with different size of the diameter, in which the 14.5 kD protein was a rubber elongation factor and the 24.0 kD protein was a small rubber particle protein. Each clone of *H. brasiliensis* had the protein bands with independent characteristic, mainly in the difference on the expressed amount of several protein bands among the clones, among which, 27.0 kD RPMP had a higher quantitative level in clone PR107 that was resistant to ethylene stimulation than the clone HAIKEN1 that was less resistant to ethylene stimulation. [Conclusion] Some protein bands in the membrane surface of rubber particles might be related with the diameter size and the development of rubber particles.

Key words *Hevea brasiliensis*; Rubber particle membrane proteins; Clones; SDS PAGE

橡胶粒子是乳管细胞质中的一种特殊的细胞器, 它是天然橡胶合成与储存的最终部位^[1]。橡胶粒子是由许多天然橡胶分子聚集的球形或梨形的微粒, 粒子外面包被单层生物膜(half-unit membrane), 膜主要由类脂和蛋白质(统称为橡胶粒子蛋白 rubber particle proteins, RPPs)组成^[2-3]。在橡胶树(*Hevea brasiliensis*)乳管的橡胶粒子表面上百种蛋白质^[4-5]中, 目前只对橡胶延长因子(rubber elongation factor, REF)^[6]、小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRRP)^[7]、多聚泛素(polyubiquitin)^[8]、橡胶转移酶(rubber transferase, HRT)^[9]、焦磷酸酶^[10]等少数蛋白进行了研究。

从能学理论上, 橡胶粒子一分为二是不可能的。在橡胶树中除了乳管细胞以外, 还未在有活性的代谢组织中检测到橡胶烃的存在。橡胶树皮被割开以后, 原有的橡胶粒子不断随胶乳移出体外, 橡胶粒子在体内不断更新是肯定的, 但新的橡胶粒子产生的部位和机制至今仍然是一个谜^[1]。乳管中橡胶粒子有一个由小到大的发育过程^[11]: 电镜下最初可辨认的橡胶粒子是电子致密的球状体, 外有单层界膜, 直径约40~60 nm; 当橡胶粒子增大到250~300 nm时, 周缘开始出现一至多个电子致密的突起; 充分发育的橡胶粒子直径可达1~2 μm。橡胶树中橡胶粒子大致分为2类^[12], 一般把直径200 nm以下的橡胶粒子称为小橡胶粒子, 大于300 nm的橡胶粒子称为大橡胶粒子。在胶乳中, 大橡胶粒子约占全部橡胶粒子数量的6%, 但却占了全部橡胶粒子体积之和的

93%^[12]。这说明胶乳中起主要经济价值作用的是大橡胶粒子群体。因此, 研究橡胶粒子形成和发育的分子机制具有重要意义。笔者对部分高、低产橡胶树无性系纯化后的不同直径大小橡胶粒子表面的膜蛋白进行了比较研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 以1987年种植在中国热带农业科学院试验场红星队种质库以及沙田队的橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系RRIM60、PR107、海垦1号、海垦2号、PB86、PB5/51、热研7-33-97、热研4、天任31-45、RO35、ROJP/3为材料, 采集健康树的胶乳用于橡胶粒子蛋白的研究。每个无性系胶乳分别进行2次采集和分析。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸氨、TEMED、Tris、SDS为Bio-Rad公司产品, 甘油、考马斯亮蓝R-250、-巯基乙醇、Triton X-100、CHAPS为Sigma公司产品, 其他试剂为分析纯。SDS PAGE低分子标准蛋白为上海生化所和北京天根公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 大橡胶粒子膜蛋白的提取。橡胶粒子膜蛋白的提取参照文献[13-14]进行, 稍作修改。离心管和溶液经过高压灭菌处理, -巯基乙醇在使用前加入到溶液中。割开橡胶树皮, 让胶乳自流2 min以洗去割面上的杂质。然后按体积比1:1的比例收集胶乳到冰浴的装有2 × 稳定液[100 mmol/L Tris-HCl (pH值8.0), 10 mmol/L EDTA (pH值8.0), 38%甘油, 0.2% -巯基乙醇]的离心管中。每个品系取3棵树, 每棵树采集15 ml胶乳, 收集过程中偶尔振荡离心管混匀。

将离心管置于冰上带回实验室后进行以下操作: 4, 6 000 g离心20 min, 将上层大橡胶粒子转移到另一装有10倍体积1 × 稳定液[50 mmol/L Tris-HCl (pH值8.0), 10

基金项目 国家自然科学基金项目(30460021); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ITBBZD0717, ITB-BYB082)。

作者简介 吴坤鑫(1969-), 男, 福建永定人, 博士, 副研究员, 从事植物分子生物学方面的研究。

收稿日期 2008-11-05

mmol/L EDTA (pH 值8.0), 19% 甘油, 0.1% - 巯基乙醇] 的离心管, 并搅拌使其充分悬浮分散开; 将中间层的乳清转移到干净的离心管中冰浴备用。4 ℃, 6 000 g 离心20 min, 取出上层大橡胶粒子, 用1 × 稳定液再洗涤橡胶粒子一遍。离心后将上层大橡胶粒子充分悬浮分散在10 倍体积的洗涤液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 值8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 值8.0), 0.1% - 巯基乙醇] 中。4 ℃, 6 000 g 离心20 min, 将上层的橡胶粒子转移到装有10 倍体积的洗涤液中, 并使其充分分散开。重复步骤 1 次, 以除去粘在橡胶粒子上的水溶性蛋白。将大橡胶粒子分散于10 倍体积的缓冲液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 值8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 值8.0)] 中, 加入1% SDS 然后在冰上轻轻搅拌4 h。对于海垦2 号, 将1 g (鲜重) 洗涤过后的的大橡胶粒子充分分散于9 ml 缓冲液中, 然后分别取2 ml 悬浮液到4 支15 ml 无菌离心管中, 依次加入0.1% Triton X-100、1% Triton X-100、1% CHAPS、1% SDS, 然后在冰上搅拌4 h。4 ℃, 20 000 g 离心1 h, 保留下层清液, 并用0.22 μm 滤膜 (Millipore 产品) 过滤以除去残余的橡胶粒子。

轻微搅拌下缓缓地往滤液中加入4 倍体积丙酮 (-20 ℃), 低温沉淀过夜。4 ℃, 12 000 g 离心20 min 沉淀蛋白, 弃上清, 用15 ml 的丙酮 (-20 ℃) 洗涤沉淀2 次后 (每次4 ℃, 12 000 g 离心10 min), 再用15 ml 冷的正己烷洗涤沉淀2 次 (每次4 ℃, 12 000 g 离心10 min), 室温下晾干。将蛋白质粉末溶于适量的样品缓冲液 [62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 值6.8), 2% SDS, 10% 甘油, 5% - 巯基乙醇] 中, -20 ℃ 下保存备用。另外, 冰上采集30 ml 胶乳, 然后4 ℃, 6 000 g 离心20 min, 取出上层大橡胶粒子到无菌烧杯, 用10 倍体积灭菌 ddH₂O 洗涤橡胶粒子3 次 (每次4 ℃, 6 000 g 离心20 min) 后用1% SDS 同上处理。

1.2.2 中等橡胶粒子膜蛋白的提取。将步骤“1.2.1”的中间层乳清转移到干净的离心管, 依次进行10 000、12 000 和15 000 r/min 离心20 min, 分别收集各个离心速度下得到的橡胶粒子, 然后分别用10 倍体积的稳定液和洗涤液在相应的离心速度及时间下各洗涤2 次, 然后同步骤“1.2.1”一样用1% SDS 分别提取膜蛋白。最后将蛋白质粉末溶于适量的样品缓冲液后于-20 ℃ 下保存。

1.2.3 小橡胶粒子膜混合蛋白的提取。采集100 ml 胶乳到冰浴的装有100 ml 2 × 稳定液的离心管, 于4 ℃, 15 000 r/min 离心40 min, 小心吸取含有小橡胶粒子的中间层溶液到冰上的无菌烧杯。用双层0.22 μm 滤膜过滤中间层溶液, 然后将滤液于4 ℃, 40 000 r/min 离心30 min, 小心转移上层小橡胶粒子到无菌烧杯。按体积比1:10 的比例加入冷洗涤液并充分悬浮。将溶液于4 ℃, 40 000 r/min 离心30 min, 小心转移上层小橡胶粒子到无菌烧杯。重复上述步骤3 次。然后将洗涤过的小橡胶粒子用1% SDS 提取其膜蛋白。最后将蛋白质粉末溶于适量的样品缓冲液后于-20 ℃ 下保存。

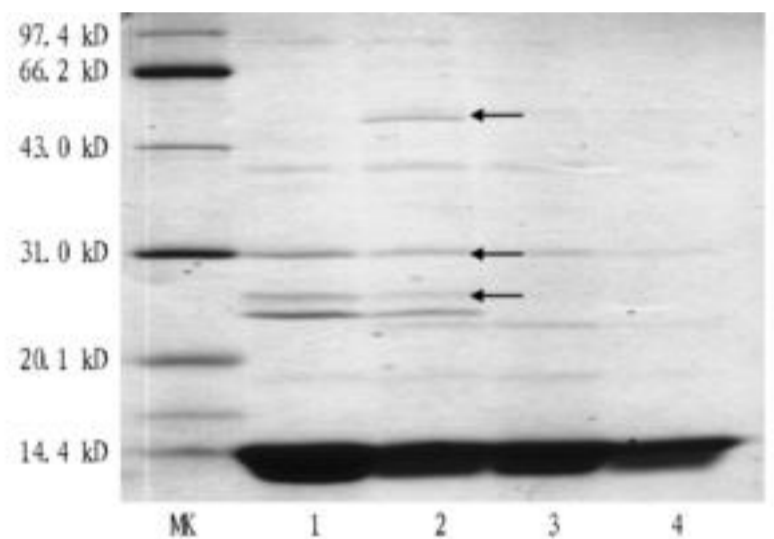
1.2.4 橡胶粒子膜蛋白的 SDS PAGE。电泳前使用 Bio-rad 公司的 RC DC 蛋白浓度测定试剂盒对溶液蛋白含量进行定量, 操作按说明书进行。蛋白电泳参考文献 [15] 进行。采用 Bio-Rad 公司的 PROTEAN xi 电泳槽, 分离胶长度为16 cm、浓度为12%, 浓缩胶浓度为4%, 电泳条件: 电泳温度12 ℃,

恒流15 mA/胶。

1.2.5 凝胶染色与脱色。凝胶染色参考文献 [14] 进行。电泳结束后, 取出凝胶, 置于100 ml 染色液 (0.125% 考马斯亮蓝 R-250, 5% 乙酸, 50% 乙醇) 中轻轻摇荡染色4 h 至过夜。脱色过程: 首先在300 ml 脱色液 (38% 乙醇, 3% 乙酸) 中1~2 h, 然后在300 ml 脱色液 (28.5% 乙醇, 3.5% 乙酸) 中1~2 h; 最后在300 ml 脱色液 (19% 乙醇, 4% 乙酸) 中1~2 h; 脱色好的凝胶经过扫描成像后保存于200 ml 3% 乙酸中。

2 结果与分析

2.1 不同去污剂洗脱的橡胶粒子膜蛋白 SDS PAGE 如图1 所示, 洗涤4 次后的海垦2 号的大橡胶粒子经不同去污剂处理4 h 后洗脱蛋白的 SDS PAGE 谱带有所不同, 1% SDS 处理后得到的蛋白谱带最多、膜蛋白洗脱的最完全 (如图1 泳道3 箭头所示), 1% CHAPS 和1% Triton X-100 处理的次之, 0.1% Triton X-100 处理的最少。



注: MK 为蛋白质相对分子质量标准; 1 为1% CHAPS; 2 为1% SDS; 3 为1% Triton X-100; 4 为0.1% Triton X-100。

Nte: MK, Relative molecular quality markers of protein; 1, 1% CHAPS; 2, 1% SDS; 3, 1% Triton X-100; 4, 0.1% Triton X-100.

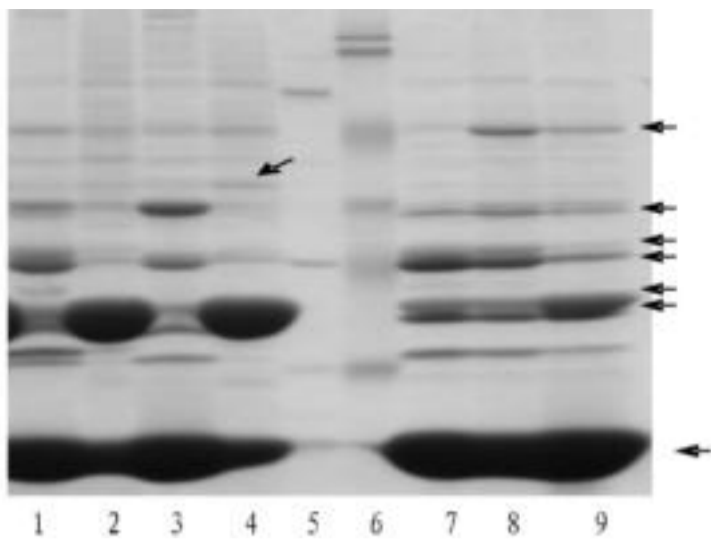
图1 海垦2 号不同去污剂洗脱的大橡胶粒子膜蛋白 SDS PAGE 图谱

Fig.1 SDS PAGE mapping of large rubber particle membrane proteins in Hiken 2 eluted with different detergents

2.2 橡胶树大中小橡胶粒子膜蛋白 SDS PAGE 同一品系大、小橡胶粒子 SDS PAGE 蛋白谱带有明显差异, 小橡胶粒子膜蛋白中24、40 kD 蛋白含量明显多于大橡胶粒子, 但是14.5、21.0、27.0、32.0 和34.0 kD 蛋白则明显少于大橡胶粒子 (图2 泳道1/2、3/4)。对用不同离心速度分级纯化后 (具有不同的直径大小) 的大、中、小橡胶粒子的蛋白电泳发现, 一些蛋白条带可能跟橡胶粒子直径大小或发育相关, 如49.0、34.0、32.0、24.0 kD 等蛋白含量变化明显 (图2 泳道3~4、7~9)。此外, RO/JP/3 橡胶粒子的32.0 kD 蛋白含量要多于海垦2 号, 但是34.0 kD 蛋白含量则明显少于海垦2 号 (图2 泳道1, 3)。

2.3 橡胶树不同品系大橡胶粒子膜蛋白的分析 橡胶树各个品系的大橡胶粒子蛋白图谱具有各自独立的特征蛋白谱带, 主要表现为在品系之间存在某些谱带表达量上的差异 (如图3 箭头所示)。如27 kD 橡胶粒子膜蛋白在海垦1 号橡胶粒子膜上几乎看不见谱带, 而在 PR107 中含量很高 (图3 泳道3)。33 kD 膜蛋白在各品系间也有较大差异; 而36 kD 蛋白的含量则在部分低产品系的橡胶粒子膜上要高于高产

品系(图3泳道6,7)。

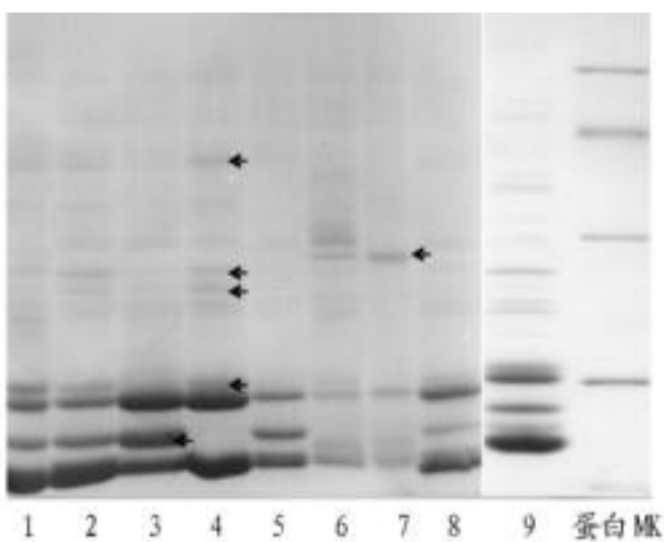


注:1 为 RO/JP/3 大 RPPs;2 为 RO/JP/3 小 RPPs;3 为海垦2 号大 RPPs;4 为海垦2 号小 RPPs;5 为蛋白质相对分子质量标准(依次为 97.4,66.2,43.0,31.0,20.1,14.4 kD);6 为预染蛋白质相对分子质量标准(依次为 117,90,49,34,25,19 kD);7 为海垦2 号10 000 r/min 离心洗涤4 次 RPPs;8 为海垦2 号12 000 r/min 离心洗涤4 次 RPPs;9 为海垦2 号15 000 r/min 离心洗涤4 次 RPPs。

Note:1, RO/JP/3 large RPPs;2, RO/JP/3 small RPPs;3, Large RPPs in Heiken 2;4, Small RPPs in Heiken 2;5, Relative molecular quality markers of protein (being 97.4,66.2,43.0,31.0,20.1 and 14.4 kD respectively);6, Relative molecular quality markers of prestained protein (being 117,90,49,34,25 and 19 kD respectively);7, RPPs in Heiken 2 after 4 times of centrifugal washing at 10 000 r/min;8, RPPs in Heiken 2 after 4 times of centrifugal washing at 12 000 r/min;9, RPPs in Heiken 2 after 4 times of centrifugal washing at 15 000 r/min.

图2 橡胶树不同直径大小橡胶粒子膜蛋白 SDS PAGE 图谱

Fig 2 SDS PAGE mapping of rubber particle membrane proteins in *Hevea brasiliensis* with different diameter



注:1 为热研4;2 为 RRI M600;3 为 PR107;4 为海垦1 号;5 为 PB86;6 为 PB5/51;7 为 RO35;8 为天任31-45;9 为热研7-33-97;蛋白 MK 大小(依次为 94.0,67.0,43.0,30.0,17.5 kD)。

Note:1, Reyan 4;2, RRI M600;3, PR107;4, Heiken 1;5, PB86;6, PB5/51;7, RO35;8, Tianren 31-45;9, Reyan 7-33-97 with protein MK of 94.0,67.0,43.0,30.0 and 17.50 kD resp.) .

图3 橡胶树不同品系大橡胶粒子膜蛋白 SDS PAGE 图谱

Fig 3 SDS PAGE mapping of large rubber particle membrane proteins in different clones of *H. brasiliensis*

3 讨论

3.1 橡胶粒子膜表面的一些蛋白条带可能与橡胶粒子直径大小或发育相关。有研究表明,大、小橡胶粒子积累的橡胶分子的平均分子量不同,小橡胶粒子内积累的橡胶分子的平均

分子量要大于大橡胶粒子内积累的橡胶分子的平均分子量,并且小橡胶粒子通过IPP(isopentenyl pyrophosphate, 异戊烯基二磷酸)合成橡胶的速度比大橡胶粒子快^[12-13]。对大、小橡胶粒子中的橡胶分子的结构分析有2个重要提示^[13,16-17]:其一,大橡胶粒子中的橡胶分子的末端由于磷脂化而钝化,可能无法被橡胶转移酶利用,而小橡胶粒子中的橡胶分子的末端未磷脂化,可以继续延伸;其二,大橡胶粒子中的橡胶分子中高分子量橡胶分子存在分枝结构,即由低分子量的橡胶分子组成,而在小橡胶粒子中的橡胶分子是线状的。这些差异的形成应当与大、小橡胶粒子膜上的相关蛋白因子有关。同时,乳管中橡胶粒子由小到大的发育过程^[11]应该也与其膜上的某些蛋白相关。

Ohya N 等证实,利用不同离心速度分级分离的方法可以将不同直径大小的橡胶粒子分开^[13]。笔者的研究参考了 Ohya N 等的方法获得不同直径大小的纯化橡胶粒子,然后分别洗脱其膜蛋白并作 SDS PAGE,发现 14.5、24.0、27.0、32.0、34.0 和 49 kD 等蛋白条带的含量在不同直径大小的橡胶粒子上有明显变化;已知其中的 14.5 kD 蛋白是橡胶延长因子,24.0 kD 蛋白是小橡胶粒子蛋白,两者在天然橡胶生物合成中起着协助将 IPP 添加到异戊二烯单元上,使橡胶分子延长的作用^[6-7],这提示了这些差异蛋白条带除了参与橡胶生物合成外还可能与橡胶粒子直径大小或发育相关。其他未知差异蛋白的性质和功能有待进一步深入研究。

3.2 橡胶树不同品系大橡胶粒子膜蛋白的 SDS PAGE 分析

研究表明,橡胶树各个品系的大橡胶粒子蛋白图谱具有各自独立的特征蛋白谱带,主要表现为在品系之间存在某些谱带表达量上的差异。如 27.0 kD 橡胶粒子膜蛋白在海垦1 号橡胶粒子膜上几乎看不见谱带,但在 PR107 中含量很高;而在生产上海垦1 号表现为不耐乙稀利刺激,长流胶因而死皮发生率高,而 PR107 则很耐刺激,死皮发生率较低,提示 27.0 kD 橡胶粒子膜蛋白可能与死皮有关,这与 Okoma 等的研究结果相似^[18]。

研究还发现,对第1 次离心分离得到的大橡胶粒子采用灭菌 ddH₂O 洗涤3 次^[5]后大橡胶粒子凝聚严重,而低产品系尤其严重。但是采用该文的洗涤方法可以避免大橡胶粒子凝聚,从而保证试验结果的客观性。

低产品系新鲜采集胶乳的大橡胶粒子在多次洗涤后容易发生凝集,而高产品系一般不发生凝集,表明这些低产品系胶乳中黄色体严重不稳定,提示有必要比较研究高、低产品系的黄色体。关于胶乳中的橡胶粒子凝聚的分子机理,最近 Witsuvanmakul R 等提出了新胶乳凝集素假说^[19-21],证据显示,小橡胶粒子蛋白(SRPP)直接参与橡胶粒子凝聚过程;对于 SRPP 及其他 RPPs 在橡胶粒子凝聚过程中作用的详细机制,值得进一步深入研究。另外,该研究采用的高、低产品系橡胶树的全胶乳的干胶含量与其产量呈正相关(胡东琼等未发表结果),但是橡胶粒子直径的大小在高、低产品系是否有差异目前还不清楚,有待于利用电镜作进一步研究。

参考文献

[1] CORNSH K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1123-1134.

著,其中以椰子汁对铁皮石斛苗的增殖促进作用最大,增殖率达1 804.4%,香蕉泥和马铃薯泥的增殖效果相近。3种天然有机附加物培养的铁皮石斛苗均较粗壮,叶色浓绿。

表2 天然有机附加物对铁皮石斛苗增殖率的影响

Table 2 Effects of natural organic additives on the proliferation rate of *D. candidum* seedlings

天然有机附加物 Natural organic additives	幼苗 g Seedling	出瓶苗 g Bartlets of test-tube	增殖率 % Proliferation rate	健壮度 Hlteness degree
椰子汁 Coconut milk	4.5	85.7	1 804.4 A	+++
香蕉泥 Banana slury	4.2	73.8	1 657.1 B	++
马铃薯 Potato	4.4	72.4	1 545.4 C	++

2.3 光照条件对铁皮石斛苗增殖率的影响 由表3可见,不同光照条件对铁皮石斛苗增殖的影响差异极显著。其中,日光灯照射下的铁皮石斛苗较高,但苗较细弱,叶色浅绿;自然光照下培养的铁皮石斛苗粗壮,叶色浓绿,但苗较矮,增殖率达1 653.3%。

表3 光照条件对铁皮石斛苗增殖率的影响

Table 3 Effects of light conditions on the proliferation rate of *D. candidum* seedlings

光照条件 Light conditions	幼苗 g Seedling	出瓶苗 g Bartlets of test-tube	增殖率 % Proliferation rate	健壮度 Hlteness degree
日光灯 Daylight lamp	4.6	71.3	1 450.0 B	++
自然光 Natural light	4.5	78.9	1 653.3 A	+++

2.4 铁皮石斛组培苗的移栽成活率 当苗高为(6.0 ± 1.0) cm、根达5~6条、根茎较粗壮时,经1周炼苗后,洗净根部培养基,移栽至石灰石碎石滤水层5 cm+ 锯末(杂木粗糙的锯末)8 cm+ 活苔藓2 cm的基质中,成活率在95%以上,且植株

(上接第15787页)

- [2] CORNSH K, WOOD D, WINDLE J J. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron paramagnetic resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, non-layered membrane[J]. *Planta*, 1999, 210(1): 85-96.
- [3] WOOD D F, CORNSH K. Microstructure of purified rubber particles[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2000, 161(3): 435-445.
- [4] CORNSH K, SILER D J, GROSJEAN O K, et al. Fundamental similarities in rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species[J]. *J Nat Rubber Res*, 1993, 8(4): 275-285.
- [5] 段翠芳, 聂智毅, 曾日中. 橡胶粒子膜蛋白双向电泳体系的建立和质谱初步分析[J]. *热带作物学报*, 2006, 27(3): 22-29.
- [6] DENNIS M, LIGHT D. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(31): 18608-18617.
- [7] OHS, KANG H, SHIND, et al. Isolation, characterization and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 17132-17138.
- [8] 彭世清, 陈守才. 巴西橡胶树43 kD 橡胶粒子膜蛋白基因的cDNA克隆和表达[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(3): 325-330.
- [9] ASAWIRERATANAKUL K, ZHANG Y, WIITSUWANNAKUL D, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding dis-prenyl-transferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(23): 4671-4680.
- [10] DUANCF, LI X, ZENGRZ. Molecular regulation and characteristics of vacuolar pyrophosphatase in *Hevea brasiliensis*[M]. *India: IRRDB Conference*, 2005.
- [11] 吴继林, 郝秉中. 巴西橡胶树乳管分化的超微结构研究[J]. *植物学报*, 1990, 32(5): 350-354.

生长良好。

3 小结与讨论

(1) 在N6、B5、MS和1/2 MS 4种基本培养基中,铁皮石斛幼苗的增产以N6的效果最好;3种天然有机附加物(椰子汁、香蕉泥、马铃薯泥)中,以椰子汁对铁皮石斛苗的增殖促进作用最大,香蕉泥和马铃薯泥的增殖效果相近,3种天然有机附加物培养的铁皮石斛苗均较粗壮,叶色浓绿。另外,因马铃薯泥易取价廉,在该地区更有实际应用价值。在日光灯和自然光条件下培养的铁皮石斛苗,以自然光照条件下培养的苗粗壮,叶色浓绿,但苗较矮,增殖率大。基于上述条件培养的铁皮石斛苗,移栽成活率在95%以上。

(2) 经过对铁皮石斛苗培养的系统性研究及对前人所作研究的总结,采用简化培养、降低成本、规模化组培和培育壮苗(开水代替蒸馏水、白糖代替蔗糖、天然有机附加物代替激素、自然光照代替日光灯照)的方法,在优质、高效、低成本、规模化方面培育铁皮石斛组培苗上有所突破,无疑将具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 冉懋雄. 石斛[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2002.
- [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, 1998.
- [3] 张泉锋. 铁皮石斛培养的产业化研究[J]. *中草药*, 2004, 35(4): 438-440.
- [4] LIU H M, LINGHUK Y, FANG X B. The study on induction and proliferation of tube bulbs in *Lilium brownii* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(1): 18-20, 53.
- [5] 付开聪, 冯德强, 张绍云, 等. 铁皮石斛集约化高产栽培技术研究[J]. *中草药*, 2003, 34(2): 177-179.
- [6] DUAN L J, ZHOU J, CAO Y L. Preliminary study on the culture in *Lycium barbarum* L. [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 92-95.
- [7] 李进进, 廖俊杰, 许继勇, 等. 铁皮石斛试管苗栽培技术研究[J]. *中药材*, 2006, 29(11): 1133-1134.
- [12] YEANG H, YIP E, HAMZAHS. Characterisation of zone 1 and zone 2 rubber particles in *Hevea brasiliensis* latex[J]. *J of Rubb Res*, 1995, 10(2): 108-123.
- [13] OHYA N, TANAKA Y, WIITSUWANNAKUL D, et al. Activity of rubber transferase and rubber particle size in *Hevea* latex[J]. *Journal of Rubber Research*, 2000, 3(4): 214-221.
- [14] 吴坤鑫, 张秀春, 彭世清, 等. 巴西橡胶树大小橡胶粒子膜混合蛋白的提取与分析[J]. *热带作物学报*, 2000, 21(S1): 163-167.
- [15] LAEMMI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [16] TANGPA K DEE J, TANAKA Y, WIITSUWANNAKUL R, et al. Possible mechanisms controlling molecular weight of rubbers in *Hevea brasiliensis*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 353-355.
- [17] SAKDAHPANICH J, SUKSJARITPORN S, TANAKA Y. Structural characterization of the small rubber particles in fresh *Hevea* latex[J]. *Journal of Rubber Research*, 1999, 2(2): 160-168.
- [18] OKOMA K M, DANK S, SANGARE A, et al. Proteins bound to rubber particles and sensitivity to the tapping panel dryness in *Hevea brasiliensis*[J]. *J Rubb Res*, 2007, 10(4): 245-254.
- [19] WIITSUWANNAKUL R, PASTIKUL P, KANOKWROON K, et al. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 339-347.
- [20] WIITSUWANNAKUL R, PASTIKUL P, JEWIRAGOON P, et al. *Hevea* latex lectin binding protein in C serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(3): 656-662.
- [21] WIITSUWANNAKUL R, RUKSEREE K, KANOKWROON K, et al. A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(5): 1111-1118.