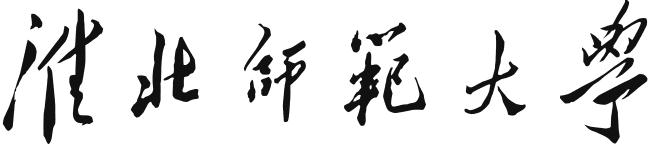
分类号： 学校代码：10373

密 级： 学 号：11015071117



**硕士学位论文**

**题** **目：赤霉素调控半夏块茎形成**

**的相关基因的研究**

**论文作者：**  岳 **二 魁** **指导教师： 薛 建 平 教 授 专业名称： 植 物 学研究方向： 植 物 Th 物 技 术**

淮北师范大学研究生处二○一三年六月

**淮北师范大学学位论文独创性声明及使用授权声明**

**学位论文独创性声明**

学位论文作者及导师郑重声明：本学位论文是作者在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我们所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。学位论文作者和导师均承担本声明的法律责任。

学位论文作者签名：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 导 师 签 名： \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**学位论文使用授权声明**

本人完全了解淮北师范大学有关保留、使用学位论文的规定。学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版；有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅；有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索；有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 导 师 签 名： \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

赤霉素调控半夏块茎形成的相关基因的研究

岳二魁（植物学）

摘 要

半夏作为我国一种特有的药用植物，它的原植物是天南星科多年生宿根草本植物*Pinellia ternata*(Thunb.) Briet，以块茎入药，富含多种有效成份，是一种重要的传统中药材和出口产品。近年来，由于一些农药和除草剂的广泛使用，加上人们对野生半夏资源的过度采集，野生半夏资源已经十分匮乏，而人工栽培繁殖力较低，加之半夏因病毒而引起的品种退化常导致种源不足、产量与品质严重下降，这已成为半夏块茎生产上的主要障碍之一。由于赤霉素对块茎的形成有着重要的调节作用，所以利用完善的半夏组织培养体系，以赤霉素合成抑制剂-矮壮素作为调节因子，研究赤霉素对试管块茎的作用，这在变态器官的发育、农作物产量和品质调控等方面方面都具有非常重要的意义。同时，我们借助SSH技术，构建了赤霉素调控试管块茎形成的相关基因的消减文库。主要研究结果如下：

主要研究结果如下：

1．培养基中浓度的矮壮素，对半夏试管块茎的诱导和块茎内素含量有一定的影响。在半夏试管块茎形成过程中，矮壮素不仅能有效抑制GA3的合成，而且促进块茎的形成，70mg·L-1的矮壮素对诱导块茎的诱导效果影响最显著。

2．对差减文库进行初步筛选和测序，获得300个有效EST片段，经过比对分析发现其中的18条EST为未知功能序列，其余EST均可推测出其同源基因或者蛋白功能。所获得序列涉及糖类代谢、蛋白质代谢、能量代谢、核酸转录与翻译、信号传导、膜转运、细胞结构以及细胞的分裂与生长等一系列生物学过程。利用GO分类标准对EST从细胞组分，生物过程和分子功能进行了2级水平分类。

3. 发现文库中5个特异性EST序列分别与60S核糖体蛋白（60S ribosomal protein, *PtRSP60*），26S核糖体RNA基因（26S ribosomal RNA gene, *PtRAR26*），锌转运蛋白（zinc transporter, *PtZT*），12kD储存蛋白（12kD storage protein，

*PtSP12*），苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, *PtMDH*）基因同源性较高。利用定量PCR技术分析5个基因的表达模式，研究发现试管半夏块茎在形成过程这些基因的表达均有明显变化，推测可能与块茎在形成相关。

关键词：半夏；试管块茎；赤霉素；矮壮素；抑制性消减杂交

**Research on genes related to gibberellin regulation in**

**Formation of tubers from *Pinellia ternata in vitro***

Er kui Yue(Botany)

Abstract

*Pinellia ternata* (Thunb.) Briet is a unique kind of medicinal plants in China; its tubers have been taken as a medicine for thousands years, which is rich in a variety of effective ingredients, and also, as an important traditional Chinese medicine and export products. Wild *P. ternata* resources have been very scarce due to the widespread use of pesticides and herbicides in recent years; furthermore, because of over-harvesting of wild *P. ternata* resources, low fecundity of artificial cultivation, variety degeneration caused by virus, which often leads to insufficient supply and yield and quality of serious decline, it has become one of the main obstacles in the production of tuber. As we all know, gibberellin plays an essential role in the regulation of tuber formation, so the use of complete microtuber culture system, taking gibberellin synthetic inhibitor-chlormequat chloride as a regulator, for studying the effect of gibberellin on microtubers related to the process of its formation in vitro. It has a very important significance in many aspects such as crop production and quality control, breeding innovation, the field of research in the formation and development of metamorphosis abnormal organ tubers, and as well as gibberellin mechanism in tubers. At the same time, we use SSH technology to builds up the relevant gene which is gibberellin-regulated with microtuber formation of the subtractive library.

The main findings are as follows:

1. It has a certain influence on tuber induction and the content of endogenous gibberellin when the culture mediums were added with different concentrations of CCC. In the process of tuber formation, chlormequat could not only effectively

Inhibit the synthesis of GA, but also promote the formation of tubers in some extent, the best concentration of CCC is 70mg**•**L-1 which can significantly influence the tubers induction.

2. Using the method of suppression subtractive hybridization (SSH) to build a tuber formation subtracted libraries. Preliminary screening and sequencing of subtractive

Libraries, obtained 300 valid ESTs, of which 18 EST were unknown function sequence through the Blast analysis, the remaining EST can infer their homologous genes or protein functions. The obtained sequence involves a series of biological process of carbohydrate metabolism, protein metabolism, energy metabolism, DNA transcription and translation, signal transduction, membrane transport, cell structure and cell division and growth. The whole ESTs were classified with 2 levels in the form of cell components, biological process and molecular function via GO classification standard.

3. 5 specific EST sequences respectively have the higher gene homology with the 60S ribosomal protein (60S ribosomal protein PtRSP60), the 26S ribosomal RNA gene (26S ribosomal RNA gene, PtRAR26), zinc transporter protein (the the Zinc transporter, PtZT), 12KD protein (12kD storage protein, PtSP12), malate dehydrogenase (malate dehydrogenase, PtMDH) in the library. Analyse the expression mode of these 5 genes through the quantitative PCR technology, and the results showed that the expression quality of *PtRSP60* gene and others genes change significantly. It's speculated that they may be associated with microtuber formation.

Keywords: *Pinellia ternate*(*Pt*); gibberellin; Chlormequat chloride chlorocholine (CCC); *In vitro tubers*; Suppression subtractive hybridization(SSH)

**缩略语表（Abbreviations）**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **简写符号** | **英文全称** | **中文全称** |
| **Amp** | **Ampicillin** | **氨苄青霉素** |
| **MS** | **Murashige and Skoog(1962)** | **MS 基本培养基** |
| **ddH2O** | **Double distilled water** | **双蒸水** |
| **rpm** | **Revolutions per minute** | **每分钟转速** |
| **BLAST** | **Basic local alignment search tool** | **局部比对基本检索工具** |
| **cDNA** | **Complementary DNA** | **互补 DNA** |
| **DEPC** | **DiEthyPyroCarbonate** | **焦碳酸二乙酯** |
| **RNA** | **Ribonucleic acid** | **核糖核酸** |
| **Ds cDNA** | **Double strand cDNA** | **双链互补 DNA** |
| **EST** | **Expressed sequence tag** | **表达序列标签** |
| **IPTG** | **Isopropylthio-β-D-galactoside** | **异丙基硫代-β-D-半乳糖**  **苷** |
| **LB** | **Luria-Bertani** | **LB 培养基** |
| **NCBI** | **National Center for Biotechnology**  **Information** | **美国国立生物技术信息**  **中心** |
| **CCC** | **Chlormequat chloride** | **矮壮素** |
| **DNA** | **Deoxyribonucleic acid** | **脱氧核糖核酸** |
| **GA3** | **Gibberellic** acid | **赤霉素** |
| **RT-PCR** | **Reverse transcript / Real time PCR** | **反转录/实时定量聚合酶**  **链式反应** |
| **SSH** | **Suppression subtractive hybridization** | **抑制消减杂交** |
| **X-gal** | **5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactocide** | **5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半**  **乳糖苷** |

目 录

[摘 要](#_Toc68636629) 2

[Abstract](#_Toc68636630) 2

[第一章 文献综述及研究背景](#_Toc68636631) 5

[1.1 变态器官研究概况](#_Toc68636632) 5

[1.1.1 变态器官的形成](#_Toc68636633) 5

[1.1.2 植物变态器官离体诱导的研究进展](#_Toc68636634) 5

[1.2 半夏研究概况](#_Toc68636635) 7

[1.3 抑制差减杂交技术（SSH）](#_Toc68636636) 7

[1.3.1 SSH技术的基本特点](#_Toc68636637) 7

[1.3.2 SSH技术在植物研究中的应用](#_Toc68636638) 7

[1.4 本研究的目的和意义](#_Toc68636639) 7

[1.5 技术路线](#_Toc68636640) 8

**[取叶柄倒置培养](#_Toc68636640)**

**[对照组（CK），未添加矮](#_Toc68636640)**

**[壮素，分别取 0d、5d、10d、](#_Toc68636640)**

**[15d 形成的半夏试管块茎](#_Toc68636640)**

**[分子方面](#_Toc68636640)**

**[试验组（CG），添加矮壮素](#_Toc68636640)**

**[分别取 0d、5d、10d、15d](#_Toc68636640)**

**[形成的半夏试管块茎](#_Toc68636640)**

**[生理](#_Toc68636640)**

**[方面](#_Toc68636640)**

**[半夏试管苗的获得](#_Toc68636640)**

[第二章 矮壮素对半夏块茎诱导及形成的影响](#_Toc68636641) 8

[2.1 材料和方法](#_Toc68636642) 8

[2.1.1 材料](#_Toc68636643) 8

[2.1.2 培养基及培养条件](#_Toc68636644) 8

[2.1.3 半夏无菌叶柄的实验处理](#_Toc68636645) 8

[2.1.4 半夏试管块茎赤霉素的测定](#_Toc68636646) 8

[2.2 结果与分析](#_Toc68636647) 8

[2.3 总结](#_Toc68636648) 9

[控网络，为进一步揭示块茎的变态发育机理奠定基础。](#_Toc68636649) 10

[第三章 赤霉素调控半夏块茎形成相关基因抑制性消减文库构建](#_Toc68636650) 10

[3.1 前言](#_Toc68636651) 10

[3.2 试验材料与方法](#_Toc68636652) 10

[3.3 结果与分析](#_Toc68636653) 18

[3.4 小结](#_Toc68636654) 64

[3.5 展望](#_Toc68636655) 65

[参考文献](#_Toc68636656) 65

[攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文](#_Toc68636657) 68

# 第一章 文献综述及研究背景

## 1.1 变态器官研究概况

### 1.1.1 变态器官的形成

植物的变态器官种类繁多、千姿百态，是植物王国的一大类。从系统发育的角度讲，植物变态器官的产生是植物对环境的适应性变异的结果。从个体发育的角度讲，是根、茎、叶三种基本器官在形态结构和生理功能上的改变。根据基本器官的类型，变态器官主要有变态根、变态茎和变态叶。尽管植物变态器官的种类繁多，但是按照达尔文在进化和起源理论中的观点，属于同一基础器官的变态器官即为同源器官，其不同的变态形式是由同源变异产生的，故同源器官在遗传调控机制上具有相似性。植物器官在形态结构和生理功能上的转化称之为变态，发生变态的器官称为变态器官。

对不同植物而言，它们的发育途径是多变的，有的植物的器官（如根、茎、叶）在生长到一定阶段后会改变发育方向。我们熟悉的马铃薯的地下茎（匍匐茎）在伸长的过程中，其顶端膨大，发育成具有营养贮藏功能的块茎。另外一种就是重要的中药材半夏。它在中后期的生长过程中，在叶柄基部，距离地面一定位置的部位，首先产生膨大，然后形成株芽，即类似于具有繁殖功能块茎。植物器官的变态是遗传的性状，它的发生和发育在很大程度上受环境、激素和营养条件的调节。

变态茎是植物营养变态器官的一种类型，一些具有地下变态茎的植物，很多均为重要的农作物或药用植物，其变态茎既是贮藏器官又是繁殖器官，如马铃薯块茎、半夏块茎、ft药块茎、贝母鳞茎、百合鳞茎和大蒜鳞茎等，这些植物与人类生活有着密切的关系，多是我国著名的中药材，加大对此方面的研究，意义很大。

### 1.1.2 植物变态器官离体诱导的研究进展

植物的贮藏变态器官是根、茎、枝生长到一定阶段后，改变发育方向，形成具营养贮藏功能的特殊器官。该类型的器官包括块茎、鳞茎、球茎、根状茎、块根等，一般是植物的贮藏器官或繁殖器官，主要作为人类食用或药用的部分。植物变态器官的形成往往与基因和环境相关，离体条件下模拟自然环境等条件因子，常能诱导出微型变态器官。目前，半夏、马铃薯、甘薯、芋、郁金香、荸荠等植物中都有成功的报道[1-6]。

1.1.2.1植物营养与变态器官离体诱导

植物生长所需要的养料包括有机营养和无机营养。在植物离体培养过程中，无机营养包括是各种大量元素和少量微量元素，而有机营养主要主要是培养基中的碳源。两者的比例分配直接且显著的影响贮存变态器官的离体发生和发育。

1.1.2.1.1有机营养-碳源

国外的研究学者指出培养基中的碳源的种类和浓度对试管薯的诱导具深刻影响，各种碳源中，以蔗糖效果最好。适宜的浓度的蔗糖，一方面提供植物生长发育等所需的能量，另一方面，也可维持器官形成所需的合适的渗透压[7-8]，利于贮藏变态器官的离体形成。

1.1.2.1.2无机元素

无机元素离子浓度对变态器官离体诱导的影响的研究相对较少。有些学者研究发现，培养基中添加4 mg·L -1硫代硫酸钠可增加马铃薯块茎诱导率[9]；钾离子浓度对微型薯的数目和质量有显著的影响[10]；低离子浓度的培养基更容易促进薯蓣块茎的形成[11]，盐离子浓度影响离体结薯[12]。

1.1.2. 2植物Th长物质与变态器官离体诱导

1.1.2.2.1赤霉素

植物茎变态器官的形成和内源激素的调控有着密切的关系，不过这些内源激素对变态器官形成机理的研究还不够深入。赤霉素作为植物体内五大类激素之一，在植物体内发挥着巨大的作用。赤霉素既能促进植物细胞伸长也能促进细胞分裂，进而调控植物株高和器官大小[13-14]。当植物在感知赤霉素信号时，会激活信号传递通道中的某些特异基因的表达，从而影响植株的形态建成和发育。若编码这些信号因子的基因或它们所识别的作用位点发生突变，那么下游基因的表达会发生相应的变化，从而导致植物对赤霉素的反应不敏感或者无法发挥作用。

近年来，研究较多的大都是模式植物拟南芥以及研究较多的水稻、烟草等。随着拟南芥和水稻全基因组的测序完成以及赤霉素类突变体大规模筛选，使得人们对赤霉素的信号转导途径有了更为深入的了解。不过在中药领域，由于此块茎类植物特有的性质，也比较适合作为模式植物来研究，如半夏的试管块茎。由于对此类的研究较少，主要在我国和日本、韩国以及东南亚一些国家有研究。

马铃薯作为经济大类作物，其块茎一直被科学养家所重视。有人指出，在马铃薯发育初期，外源施加赤霉素GA3时，结果会使单节接薯数减少，也使块茎重量有所减轻[15]。另外，在马铃薯试管块茎形成阶段，赤霉素对块茎形成的抑制作用最为明显，认为与赤霉素功能相反的IAA、ABA、ZR及JA等可能对块茎形成起促进作用，是块茎形成促进物质[16]。有研究发现，赤霉素的重要作用在于始终贯穿在整个的生长过程中，外界环境的变化，如光照和温度等，都因能使赤霉素类物质含量的增加而抑制块茎的形成，那么由此可知，外界环境对块茎形成的影响也是通过赤霉素来起作用的[17]。

张志军等[18-19]研究马铃薯离体块茎诱导时发现，赤霉素抑制或延缓其块茎

的形成，指出赤霉素调控马铃薯离体块茎形成主要是通过参与马铃著块茎形成过程中细胞分裂及细胞骨架的调整、光周期诱导块茎形成时的信号传递、以及碳水化合物的合成代谢中多种酶活性的调节等方式进行。薛建平等[20]在试管地黄诱导过程中添加外源赤霉素GA3，发现试管地黄发育缓慢或停滞，并有愈伤出现。国外研究者利用赤霉素生物合成抑制剂和转基因的方法，验证了赤霉素在马铃薯块茎形成过程中的调控作用：低浓度的赤霉素有利于块茎的形成，而高水平的赤霉素抑制块茎的诱导[21-22]。对于其他植物，有关赤霉素对鳞茎、球茎等的离体诱导中无一致结论，多数报道中赤霉素对变态茎的形成主要起抑制效用[23-25]。

1.1.2.2.2矮壮素

矮壮素(Chlorocholine chloride, CCC)作为一种农业生产中常用的植物生长调节剂，即生长延缓剂[26-28]，它在许多方面表现出抗赤霉素作用，它可以有效抑制赤霉素的生物合成。所以作为赤霉素的拮抗剂，它是研究赤霉素作用机理的一种有效的首选试剂。该抑制剂已被广泛应用于小麦、大豆、地被菊、一串红等多种植物中，它不仅可用于试管苗生根、植株矮化、节水栽培，还可用于性别分化和块茎的诱导[29-32]。

该拮抗剂可以促进马铃薯微型薯的形成，CCC同时也能延缓高温对块茎形成的抑制作用[33]。在试管薯生产中，虽然CCC抑制了马铃薯苗和匍匐茎的伸长，减少块茎重量，但是却促进了块茎的形成；另外，CCC处理作用不仅能够降低游离态赤霉素的水平，而且还刺激了结合态赤霉素的形成，增加叶绿素含量

[34]. 在花期施用矮壮素可使马铃薯块茎的形成提早1周，块茎产量增高30-50%

[35]. 另有研究称，矮壮素可促进薯、芋类地下储存营养器官的形成和发育[36-37]。

同时，矮壮素可以通过叶片、幼枝、芽、根系和种子等做种途径，进入到植株的体内，它的作用机制是抑制植物体内赤霉素的生物合成[38]。Dyson 与

Humphries[39]认为矮壮素处理可增大块茎作为同化产物的贮库容量，促进叶子的

净光合率，改变同化产物的分配格式。而Moorby[40]也证明矮壮素的处理，可促进同化产物向块茎的运输。矮壮素（CCC）作为内源激素赤霉素的合成抑制物质，是季铵盐类化合物，主要机理是阻断或延缓古巴焦磷酸合成酶（CPS）活性[102]

（如下图）。



高等植物赤霉素合成与代谢示意图（Yamaguchi, 2008）

1.1.2.3植物变态器官离体诱导与贮藏蛋白

关于植物变态器官如何起源的，在其发生过程，形态结构、生理机能等领域的研究已经取得了很大进展[41-45]。有研究资料显示，植物变态器官的形成与贮藏物质的合成与运输、不同类型内源激素的含量变化、植物生长的光照和温度条件等有密切关系[46-47]。生物化学研究结果表明，一些特异的贮藏蛋白会随着变态器官的形成而之积累，如马铃薯的Patatin、甘薯的Sporamin、薯蓣的

Dioscorin以及芋的Lectin。由于变态器官形成的条件和变化情况和特异蛋白基因表达的诱导和表达一致，因此，在早期推测它们可能与植物变态器官的形成

有相关性。如马铃薯的Patatin蛋白基因的表达和茉莉酸合成途径相关的酶有关

[48]，而茉莉酸又具有促进块茎形成的作用，因此patatin基因的表达可能与块茎形成有关。后来的试验证明，在一些株系中，由于转入patatin基因的增强表达，显著提高了马铃薯试管块茎的形成；而当利用反义RNA抑制体内patatin基因表达时，一些株系中表现出试管薯形成率的下降。近年来，在对内源性patatin基因进行表达分析时发现，该基因对块茎发育的调控作用可能处于整个调控链中的中下游[49-50]，而不是上游。有部分研究结果揭示，大多数变态器官的贮藏蛋白都具有生理活性，其功能主要是和植物的防御反应机制有关[51]。

1.1.2.4植物离体块茎诱导的研究

传统的中药如半夏、ft药、菊芋等，还有农作物马铃薯，在生长发育到一定的阶段以后，生长在地下的部分会产生块状茎，这些产生的变态茎变成了植物的贮藏和繁殖器官，同时也是人类主要的食用或药用部分。

在离体条件下，块茎类植物的特定组织或器官在适宜的光照、温度等环境因子和外源植物生长物质共同作用下，可以诱导形成类似地下的块茎，即形成离体的试管块茎，其模式发育和自然块茎形成模式是无异的。因而，研究离体培养下形成的试管块茎与内源激素的关系，会有利于揭示半夏小块茎形成的某些机制。

近期有资料显示，在马铃薯块茎形成中，植物激素、蔗糖、和光敏色素通过“crosstalk”共同调节着块茎的形态发生[50, 52]，但这些研究未涉及这一网络中相关基因的表达调控情况。随着拟南芥和水稻基因组测序的完成。植物基因组研究已进入功能基因组研究的新纪元。在功能基因组研究中，植物重要发育过程，包括变态器官发生的基因调控研究和关键基因分离是其重要领域之一，也是目前分子研究与发育研究的热点交叉问题。

1.1.2.4.1块茎的发育调控

块茎(tuber)是地下茎先段膨大形成的块状变态茎，含有丰富的淀粉，一般为贮藏器官，通常具有块茎的植物有马铃薯、半夏、菊芋、姜和草食蚕等。块茎的形成发育包括两个方面，一个是块茎的形态发生，另一个是淀粉和贮藏类蛋白等营养物质的积累[53-54]。如果从细胞学角度来看，它的形成及其生长是细胞不断横向或辐射状分裂和扩增的结果[55]。现在研究最多的是以马铃薯为代表的块茎类植物，它同时又是重要的农作物和蔬菜作物。长久以来，植物生理学家、植物解剖学家和形态学家一直钟情于块茎作为马铃薯的产品器官的研究对象。首先，发育着的块茎代表一种主要的库，能够吸收并积累蔗糖和淀粉等有机化合物，并以造粉体的形式贮存起来。其次，块茎是一种典型的变态器官，其形态发生所涉及的分子机制有可能和其他变态器官的调节机制有相似的地

方。

激素在植物的生长发育过程中，起着非常重要的作用。可见，植物块茎的

形成和发育受多种激素共同的调节作用，因而研究其调控机理有重要意义。越来愈多的研究表明，植物的发育过程和代谢过程是一个复杂的遗传调控体系，每个过程都受基因调控[56-59]。只有明确参与某一过程调控的所有基因及其作用方式，才能全面理解其本质。

1.1.2.4.2赤霉素调控块茎形成的分子机制

DELLA蛋白是一类N端含有17 个氨基酸基序，其中前5 个的缩写为

DELLA的蛋白质，被看作转录因子，即DELLA蛋白。在不同植物中其C端非常保守，但N端却是多样性的，这也许与其不同的生物学效应有关系[60]。

由生物信息学分析蛋白序列结构特征和蛋白的核定位表明，DELLA蛋白是一类潜在的转录因子。该DELLA蛋白位于细胞核，有阻遏植物生长发育的效应。1997年，有学者提出了“赤霉素-可去抑制的抑制子模型”(GA de-repressible repressor mode1)用来解释赤霉素调节DELLA蛋白抑制作用[61]。后来很多的试验研究结果都支持这一模型。该模型的具体表述是：通常在没有赤霉素情况下，

DELLA蛋白作为转录因子发挥作用，可阻遏植物的生长发育；当赤霉素存在的情况下，DELLA蛋白上的赤霉素信号感知区会接收赤霉素信号，从而使该蛋白的阻遏作用解除，使植株表现出正常的赤霉素反应和生长发育。同样，若

DELLA结构发生改变，也不能感知赤霉素信号，这时的DELLA蛋白便成为组成性阻遏蛋白。通常，这类突变体多分为显性或半显性，表现在对赤霉素不敏感、植株严重矮化、叶色暗绿、开花较晚、节间短等类似赤霉素生物合成缺乏时的表型或赤霉素抑制剂作用的性状表现，不过此时的赤霉素合成正常，其

GA20氧化酶和赤霉素GA3氧化酶活性增加，只是赤霉素不起作用而已。如：拟南芥的gai、小麦矮秆基因Rht1和玉米d8基因等[61-62]。

尽管对赤霉素的生物合成、生理作用等方面的研究有较大的进展，但是对于赤霉素的信号转导途径而言，我们认识的还很有限。对于DELLA蛋白的上下游基因的相互作用还不清楚，从赤霉素信号的感知到信号的传递过程中，还存在不少问题有待解决和阐明，尤其是对赤霉素受体的研究还相对较少，目前还很难有一个比较完整的赤霉素信号的传导链为学者们所接受。水稻的SD1基因是赤霉素生物合成途径中的一个关键酶之一，小麦的RHT1基因是赤霉素信号转导途径的关键成员—DELLA蛋白本身[62, 63]。关于DELLA蛋白的功能，赤霉素促进植物生长发育依赖于DELLA蛋白降解。下图便是GID1介导DELLA蛋白降解的分子模型。



GA-GID1信号转导的分子模型

研究赤霉素的生理功能与信号转导的分子机制之间的相关性，无论在植物生长发育方面，还是赤霉素作用机理的研究领域，赤霉素类在农业生产以及与其相关的的应用领域，都具有非常重要的意义。

## 1.2 半夏研究概况

我国的半夏原为野生资源，虽然分布十分的广泛，但由于随着城市化的发展和工业科技的进步，环境的破坏污染，现在野生种半夏分布范围逐渐减小，面临严峻的生存问题。加上野生的传播繁殖方式单一，生长区域局限，更是加剧了野生种的恶劣处境。现在大部分人工栽培采用分块茎繁殖、珠芽繁殖、种子繁殖或者三种繁殖方式相结合的方法进行半夏的栽培繁育。

半夏的作为一种比较常用的中药药材，由于其治疗效果明显，特别是对呼吸道疾病的疗效确切。随着我国工业化脚步的加快，雾霾天气的出现，空气污染的加剧，导致肺部疾病的大量返弹，半夏的用量更是需求量更是不断猛增。近年来，由于一些农药和除草剂的广泛使用，加上人们对野生半夏资源的需求越来越大，导致了野生的半夏资源已经十分匮乏，由于技术和方法的问题，即使在传统半夏的种植区域也出现了这样的情况。由于人工栽培繁殖力较低，加之半夏管理欠规范，同时由于因病毒而引起的品种退化等问题，常导致种源不足，产量与品质的下降，已成为半夏生产上的主要限制之一。

1.2.1半夏的Th物学特性

半夏*Pinellia ternat*a(Thunb.) Briet.为天南星科，多年生草本植物，别名三叶半夏，半月莲，三步跳等，主要产于四川、ft东、江西、河南、陕西、湖北、云南、贵州、安徽等地。其完整的植株高一般在15～35 cm之间，而生长在地下的部分被称为块茎，其性状近球形或半球形。在幼苗时期，为单叶；成熟的植株，其叶为三叶；成熟的叶柄长约20cm左右，其下部或者叶片基部会有一白色或棕色的珠芽，该珠芽是植物的适应性的结果。在半夏的生长后期，叶柄的基部微微隆起，以后逐渐生长变大成为珠芽，珠芽生命力很强，遭遇恶劣环境后，虽然植株死亡，只要珠芽没有受到特大损伤，株芽被保留下来，它具有和块茎一样的繁殖能力，往往能加速珠芽的成熟。然后可以在适宜的条件下会萌发并发育成完整的植株。

半夏作为为同株异花传粉的植物，有性繁殖可使其在遗传上保持种质的保守性。少数块茎在生长过程中能够产生子块茎，而大多数块茎又以块茎为母体，发育成完整的植株。半夏的珠芽数远远高于果实，又有非常高的萌发率，它对半夏的增殖具有非常重要的意义[64]。

1.2.2半夏的Th药学成分研究

半夏以块茎入药，其特性是性温、味辛、有毒性，是一种重要的中药材。在《神农本草经》中被列为下品，其性温，味辛，生块茎有小毒，归脾、胃、肺经。有效成分比较复杂，主要含有活性成分生物碱、半夏蛋白、刺激性物质、氨基酸、脂肪酸等多种化学成分[65]。其次生代谢物生物碱具有镇吐痛、抗心率失常、降血脂、护肝、抗肿瘤和提高记忆的功效，是半夏药理作用主要有效成分之一[66]。半夏中的生物碱含有L-麻黄碱、胆碱、鸟苷、胸苷、肌苷、葫芦巴碱等，其中，中国药典规定麻黄碱和鸟苷为半夏的指标性成分，而葫芦巴碱可以用于半夏的质量控制，肌苷被认为是半夏的鉴别性成分[67-69]。在治癌方向上也有着广阔的应用前景。

1.2.3半夏试管块茎离体诱导研究

块茎是半夏的一种休眠和繁殖器官，也可以看成是一种营养储存器官，不过表现出无性繁殖器官的特点并不明显，具有抵御恶劣自然环境、保存种质的作用。在自然条件下，每张叶片以及叶柄都可以产生珠芽，不过数量因种类而异[70, 64]。顾德兴等[71]通过内部解剖结构和外部形态特征的比较，发现珠芽和块茎很相像，推测珠芽是块茎的一种早期存在形式。珠芽先是萌动长出不定根，随后会发芽长叶。随着珠芽的不断长大，最终会长成为块茎。受此启发，薛建平等[72]以半夏试管苗的叶片、叶柄为材料，不经过愈伤组织阶段，可直接再生形成小块茎。而且发现用叶柄诱导小块茎时，无论正置、倒置在培养基上，形成的小块茎总是在原形态学的下端（生理学下端），表现出明显的极性。近年来，

半夏试管块茎离体诱导技术体系有了进一步优化，常莉等[73]，将半夏叶柄倒置在不添加任何植物生长物质的MS基本培养基上，叶柄的生态学下端均可诱导形成小块茎。近期，盛玮等[74]的研究表明，5种内源激素IAA、GA3、ABA、

ZR和JA在半夏块茎形成过程中存在动态变化，其对半夏试管块茎的膨大和内

源激素含量均有显著影响。

目前对宿半夏组织培养的研究已取得较多成果，本实验室对半夏块茎的研究，体系比较成熟，已经建成了宿半夏块茎诱导的成熟体系，可以在很短的时间内获得大量块茎（变异率小，同自然块茎），试验周期大大减小。试验中利用的诱导的块茎在遗传稳定性、生理生化特性上与常规块茎无差异，从而以半夏块茎诱导体系作为模式，为其以后的应用提供了最基本的前提。这样块茎的发育的周期缩短，加快试验研究的进程[75]。因此，以某一变态器官的模式植物为材料，建立其变态器官发育的基因调控网络，明确发育调控的分子机理。有可能在基因表达水平上阐明基因表达和形态改变的内在联系，从本质上解释植物变态器官发生的分子机理。

综上所述，半夏试管小块茎就是利用细胞工程技术的方法，在无菌条件下，通过对培养基成分的调节和对培养条件的控制，诱导半夏叶柄顶端膨大而形成块茎的类似物。因此该块茎在离体条件下的发生是一种比较理想的系统，可以在人工控制条件下用来研究块茎的诱导。

1.2.4半夏试管块茎离体诱导的分子Th物学研究

盛玮等[76]用DDRT-PCR mRNA差异显示技术，在小块茎发育过程中分离到了15个半夏试管小块茎发育过程中特异表达的cDNA片段。张爱民等[77]筛选出了安徽道地药材宿半夏SRAP的最适引物并建立了适宜的SRAP-PCR反应体系，可用于宿半夏的基因定位、遗传多样性分析和图谱构建、分子标记研究。吴林和黄月琴[78-79]对宿半夏块茎的RNA提取技术进行了研究，卢河东等[80]通过SSH文库首次构建了高温胁迫后半夏倒苗相关基因的消减文库，得到242个相关的表达序列标签片段，同时对其中4个基因做了表达分析，推测可能与块茎脱落与半夏倒苗相关。

郭朝阳等[81]以试管半夏离体块茎诱体系为前提，利用根癌农杆菌，成功将小分子热激蛋白（sHSP）导入半夏植株，因此可以利用转基因技术可以对某些相关的特定基因进行功能检测与鉴定。另外如何结合物理技术条件和现代分子生物学的方法与技术来研究半夏，已成为一个研究热点。例如射线诱变和基因工程等方法改变其遗传性状，以获得生长效率高、有效成分含量高的新型再生半夏群体，为获得新型的中药类型打下基础。

## 1.3 抑制差减杂交技术（SSH）

抑制性消减杂交技术，英文名全称 Suppression Subtractive

Hybridization，缩写为SSH，是由生物学家于1996年建立的，是在抑制PCR作用基础上的cDNA消减杂交，由抑制PCR效应[82-83]和消减杂交技术方法而建立起来的差减分离差异表达基因的方法。该方法的富集原理是通过利用物理学上的动力学原理——杂交二级动力学，即高丰度的单链cDNA在退火时产生同源杂交的速度比低丰度的快，从而使本来在丰度上有差别的单链cDNA的相对含量达到基本相当的一致性。

而抑制性PCR技术就是利用非目的序列片段两端的长反向重复序列在退火时产生的类似“发夹”的结构，使其无法与引物配对，进而选择性的抑制了非目的序列的扩增。该技术的全过程利用了差减杂交技术的富集原理，同时又利用了抑制PCR技术的高效动力学富集，从而在一个循环过程中完成了单链的cDNA丰度的均等化以及目标群体和对照群体中相同的cDNA序列的去除，富集特定的差异表达的基因。

### 1.3.1 SSH技术的基本特点

抑制性消减杂交技术（SSH）与以前的方法相比，SSH具有灵敏性更高，速度更快的特点。SSH技术已广泛应用于微生物和动物研究领域，它为研究生命过程中不同差异基因的表达及克隆提供了有力工具[84-85]。在植物研究方面，该技术已被应用于分离植物组织特异表达基因、诱导表达的抗性相关基因等方面

[86]，显示了良好的应用前景。在理论和方法上，本研究所采用的SSH法已经在动植物领域都取得了较好的试验结果，因而采用该技术可以分离出赤霉素调控半夏块茎形成过程中相关表达基因的EST序列（ESTs）。

### 1.3.2 SSH技术在植物研究中的应用

近年来的研究表明，SSH技术作为一种成熟的分子技术，已成功用在不同器官组织间的基因分离，个体的不同发育阶段以及受到外界因子作用而特异性表达的基因等方面与细胞分化、发育、再生、衰老等的关系的研究中。国外学者率先第一次运用SSH技术来研究马铃薯晚疫病，成功将该技术运用于植物领域中[87]。

Kin等[88]以康乃馨未成熟花为Driver，成熟花为Tester，得到了5个与花成熟相关的EST片段。Mathews等[89]通过SSH获得了与番茄叶片花青素合成、转运相关的8个EST序列。Bassani等[90]利用玉米根尖构建了优先表达的cDNA文库。Sylvain等[91]以菊苣无性繁殖的K59植株为实验组，不能自主繁殖的植株

C15为驱动组，发现了33个与菊苣无性繁殖密切相关的基因。

对重要中药材的研究中，罗志勇等[92]研究人参时，获得了6个与人参皂苷合成相关的新基因，为进一步揭示人参皂苷的合成提供了实验依据。Wang等[93]

利用百合花粉研究花粉管萌发过程中的特异表达基因时，获得了与花粉萌发相关的99个特异基因。卢河东等[94]以宿半夏为材料，通过SSH方法分离出半夏高温胁迫和倒苗相关表达基因的EST 序列（ESTs），并构建了高温胁迫相关基因的差减文库，获得了303个差异片段，分析了4个可能与高温胁迫相关的基因。

在抗旱机制的研究领域，刘桂丰等[95]通过SSH技术获得了大量与抗旱相关的基因，如钙调蛋白、脱水诱导蛋白等。Bahn[96]则成功构建了冬大麦低温胁迫相关的SSH文库。Savenstrand, Watt, Sahre, Zhang等[97-100]分别构建了豌豆叶片受紫外线辐射诱导表达的基因文库、甘蔗根被铝离子胁迫诱导的相关基因表达文库、铯元素诱导拟南芥表达的基因表达谱及热胁迫下羊茅茎叶的基因表达文库。这些研究也充分说明，并体现了抑制性差减杂交技术在植物学研究中应用的便利性和广泛性。

## 1.4 本研究的目的和意义

半夏作为中草药中用量较大的药材之一，据558个处方的微机分析结果表

明，半夏在处方中出现的频率位于22位；日本210个法定汉方中含半夏46个，占总数的22%，半夏在其汉方中的应用量约占21位。在东南亚，其他一些应用中医药的国家中半夏应用也十分普遍，所有这些都需要有大量半夏的供应。然而由于生产中长期采用块茎营养繁殖，易受病害侵袭，其中病毒害最为严重，致使田间感染率达100%，病毒在植物体内代代相传，从而引起品种退化，严重影响半夏的药效和产量。同时但是随着全球环境的不断恶化，野生资源逐步受到城市化的威胁，半夏的生存空间日益萎缩，受到的威胁日益明显，从而使半夏资源枯竭。

针对半夏在生产和试验中存在的各类问题，近些年来，国内外学者在半夏的组织培养，茎尖的脱毒培养，微型块茎的离体诱导等方面有了很大的发展，采用组织培养脱毒技术来恢复半夏的种性，提高其产量。目前，薛建平等已成功诱导出半夏试管块茎，但诱导体系仍需要不断完善，因而本文通过添加外源生长物质矮壮素，对试管半夏块茎的诱导体系进行再次优化研究，然后对RNA的抽提方法进行优化，为研究试管块茎发育、内源激素的运输和次生代谢调控奠定基础。

植物激素是控制植物营养生长和生殖生长的生理因素之一。因此，在外施植物生长调节剂后，研究植物激素调控变态茎形成的分子机理、内源激素的变化规律，对更好地控制植株生长有着重要意义。在理论上一方面可以揭示物质积累与转运中的协调机制，进而明确这种协调机制在分子水平上启动变态器官形成的过程；另一方面通过变态茎形成时，对其植物激素的调控研究，还将使

**方面**



**两组中分离**

**mＲＮＡ**

**从对照组和试验组中分别提取混合池总ＲＮＡ**

**从对照组和试验组中分别提取内源激素 GA3**

变态器官形成的发育学、生理学以及进化机理通过植物激素调控的本质统一起来。同时，这一研究也为农作物产量和品质调控以及育种创新提供重要的理论基础。

目前，对半夏块茎形成的研究较少，形成机理尚不清楚，而赤霉素对半夏块茎形成的机理的研究也鲜有报道，由于对赤霉素调控半夏块茎形成的机理了解的欠缺，人工调控技术发展缓慢，从而严重制约了半夏生产以及种质创新。本试验在试管半夏离体块茎诱导体系基础上，应用SSH技术，以未添加赤霉素抑制剂（矮壮素，CCC）处理的半夏cDNA为对照组（Driver），以添加矮壮素处理后半夏cDNA为试验组（Tester），构建赤霉素调控的半夏块茎形成相关基因的cDNA片段消减文库；通过测序得到ESTs，构建ESTs分析平台，经NCBI检索分析获得差异片段可能的功能信息，以及最终获得相关的基因片段，明确赤霉素调控的半夏试管块茎形成的分子机理。

## 1.5

技术路线

**取叶柄倒置培养**

**对照组（CK），未添加矮**

**壮素，分别取 0d、5d、10d、**

**15d 形成的半夏试管块茎**

**分子方面**

**试验组（CG），添加矮壮素**

**分别取 0d、5d、10d、15d**

**形成的半夏试管块茎**

**生理**

**方面**

**半夏试管苗的获得**



**抑制性消减杂交**

**赤霉素相关差异基因的获得**

**两组的酶联免疫测定**

**对照组和试验组的GA3 的变化分析，检测赤霉素相关差异基因在对照组和试**

**验组基因表达分析**

# 第二章 矮壮素对半夏块茎诱导及形成的影响

矮壮素（CCC）作为内源激素GAs的合成抑制物质，是季铵盐类化合物，主要机理是阻断或延缓古巴焦磷酸合成酶（CPS）活性，对内根-贝壳杉烯合成酶（KS）也有微弱的抑制作用，使赤霉素合成受阻，进而影响其内源赤霉素的含量[102]，即通过直接影响植物内源激素GAs的合成来影响植物生长发育，因此，在人工施用植物生长延缓剂时，研究植物内源激素的变化规律，对更为有效地应用植物生长延缓剂控制植株生长发育具有重要意义[103]。

## 2.1 材料和方法

### 2.1.1 材料

宿半夏由淮北师范大学生命科学学院资源植物生物学安徽省重点实验室提供，经薛建平教授鉴定为三叶宿半夏*Pinellia ternata*(Thunb.) Briet.。

### 2.1.2 培养基及培养条件

以MS为基本培养基（对照），蔗糖为碳源，琼脂固化，pH 5.8。添加不同浓度的矮壮素（30 mg·L -1, 50 mg·L -1, 70 mg·L -1, 90 mg·L -1）于试验组培养基中，分装于100 mL塑料宽口瓶中，121℃湿热灭菌20 min。培养温度为(25±1)℃，光照时间为12 h·d -1，光照强度为2 000~3 000 Lx。

### 2.1.3 半夏无菌叶柄的实验处理

准备生长均匀的半夏无菌叶柄为实验材料，将半夏无菌叶柄剪成约2cm左右的茎段，倒置在对照组基本培养基（MS）和含有不同浓度矮壮素的试验组培养基中（MS+CCC）。每瓶接种生长状况相似的叶柄20根，每处理3瓶，实验重复三次。取5 d，10 d，15 d，20 d形成的半夏试管块茎（其中以5 d为开始，是半夏试管茎形成的开始，此时还没有诱导出块茎），测定实验组和对照组中各瓶的总重量，并计算每组块茎的平均质量。观察并记录6-20 d时块茎的诱导率。

同上取材，在优化浓度下，提取对照组和试验组的块茎形成的不同阶段的内源激素，然后再测定其含量。

### 2.1.4 半夏试管块茎赤霉素的测定

2.1.4.1仪器与试剂

高效液相色谱系统:1220 Infinity LC (Agilent Technology); Beckman紫外分光光度计（DU730）；C18固相萃取柱（Agilent, 美国）；色谱柱：Hypersil ODS

（Waters 公司）；0.45μm 有机系针头式过滤器。甲醇色谱纯，甲醇（AR），国药集团化学试剂有限公司；赤霉素为Sigma产品（美国）；CH3COOH为色谱纯，上海晶纯实业有限公司；水为超纯水。

2.1.4.2内源赤霉素的提取及测定

1）称取样品0.5 g，加入液氮后研磨成粉状。

2）将2 ml样品提取液加入研磨好的材料中，在预冷的研钵中继续研磨成匀浆，最后转入试管中。用2 ml提取液分次将研钵冲洗干净，一并转入试管中。3）4℃下提取4 h，4 800 rmp离心20 min，吸取上清液于新管中。

4）剩余的沉淀中加入1 ml的提取液，搅匀置4℃下再提取1 h，然后合并上清液。

5）上清液通过C-18固相萃取柱，并记录滤液样品体积。

6）将过柱后的样品转入5 ml塑料离心管中，氮气吹干，再将样品稀释液定容，处理纯化之后用于液相色谱的测定。

7）利用Agilent公司1220型高效液相色谱系统，在252 nm处检测内源赤霉素的含量。色谱柱为：Hypersil ODS（4.6mmID×150mm, 10μm）浓度梯度洗脱，流速为1.0mL/min。流动相为甲醇：醋酸水体积比为1: 1的溶液；标准样品经高速离心后取上清液进样，进样量为10μL。

2.1.4统计分析方法

运用Excel软件，SPAW Statistic 17.0, Minitab15进行分析。

## 2.2 结果与分析

2.2.1半夏试管块茎形成过程中的形态学观察

对照组中，倒置的半夏叶柄随着时间的增加，其上端（生理学下端）的小块茎逐渐形成。在第5天时，叶柄上端有上稍微的增粗，到第8天时，上端的膨大状况开始明显，12 d以后生长迅速。而叶柄的下端，即小块茎的非形成端没有观察到膨大的现象，即没有块茎的形成，且最终叶柄下端基部会变白。试验组中，培养在含矮壮素培养基中的叶柄形成小块茎的时间明显提前；同时平均形成块茎的大小高于对照组，14 d以后在处理组中，部分处理，半夏块茎的诱导已经基本完成；由图2可见，加入不同浓度的矮壮素的处理组较同期对照

组叶柄膨大形成块茎均有所提高，其中50 mg·L -1和70 mg·L -1的矮壮素浓度对试管半夏块茎形成作用相当。



A. MS培养基中的半夏试管块茎（5d）C. MS培养基中的半夏试管块茎（15d）

B. MS培养基中的半夏试管块茎（10d）D. MS培养基中的半夏试管块茎（20d）图1半夏试管块茎的形态学观察



Fig. 1 Morphological observation of microtubers in vitro*from P. ternata*

A. MS+30 mg·L -1 CCC培养基中诱导的半夏试管块茎 B. MS+50 mg·L -1CCC培养基中诱导的半夏试管块茎C. MS+70 mg·L -1CCC培养基中诱导的半夏试管块茎D. MS+90 mg·L -1CCC培养基中诱导的半夏试管块茎 E. MS+110 mg·L -1CCC培养基中诱导的半夏试管块茎

图2 半夏试管块茎的诱导（14 d）

Fig. 2 Microtubers induction in vitro from*P. ternata* （14 d）

2.2.2不同浓度矮壮素对半夏试管块茎诱导的影响

不同浓度的矮壮素，表现出不同的诱导效应。6 d时，含30 mg·L -1、50 mg·L -1

和70 mg·L -1矮壮素的培养基中，试管块茎均出现轻微膨大，诱导率分别为：1%、

4%、3%，其余均低于1%；14 d时，含70 mg·L -1矮壮素培养基中的试管块茎诱导率达92.92%，其余均低于80%，随着处理组的矮壮素浓度进一步增大，出现明显抑制，试管块茎诱导率降低（图3）。



1.2

6d 9d 10d 11d 12d 13d 14d

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

CK

30

50

70

90

110

矮壮素处理浓度（mg.L-1）

Different concentrations of chlormequat chloride treatment

由此可知，不同浓度的矮壮素的处理组较同期对照组的块茎诱导率均有不同程度的提高，各处理组中的半夏试管块茎诱导率在14d内，一直在增大，其中70 mg·L -1诱导率最高，最先达到的100%。

半夏试管块茎诱导率/%

Induction rate of microtubers in

*P.ternata/%*

图3 矮壮素对半夏试管块茎诱导的影响

Fig. 3 Effect of CCC concentration on induction rate of microtubers*in vitro* from *P. ternata*

2.2.3

不同浓度矮壮素对半夏试管块茎质量的影响



0.06

ab

a

a

0.05

0.04

bc

ab

0.03

d

0.02

0.01

。

0

CK

30

50

70

90

110

不同浓度矮壮素处理（mg·L-1）

Different concentrations of chlormequat chloride

半夏试管块茎质量/g

Average quality of microtubers in *P.ternata*

图4 矮壮素对半夏试管块茎质量的影响（20d）

Fig. 4 Influence of CCC concentration on quality of microtubers*in vitro* from *P. ternata*

同列内不同小写字母表示差异达0.05显著水平

Note: Different letters within the same column are significant at 0.05

研究发现，在试验设计的浓度范围内，一定时期内不同浓度矮状素对半夏块茎质量的影响不同。而在对照组在不同的时间段，半夏试管小块茎均生长良好，且随着时间的延长，块茎的质量不断增加，但增加的幅度不大。比较处理组，半夏块茎的质量随着矮壮素浓度的增加而增加，其对半夏试管块茎质量的影响逐渐凸显：在70 mg. L-1时质量达到最大值，超过该浓度，则出现明显的抑制效应（图2, 4）。另外，通过SPSS软件，Excel处理，发现50 mg·L -1 与70 mg·L -1 的浓度的促进作用达到差异显著，是半夏块茎质量增殖的最佳浓度；对

于110 mg·L -1抑制作用达到显著差异，不适合半夏块茎的增殖，30 mg·L -1与90

mg·L -1影响不显著，影响作用较小。

2.2.4矮壮素对半夏试管块茎中赤霉素含量的影响



6000

5000

4000

3000

2000

1000

0

MS（CK）

MS+chlormequat（EG）

0d 5d 10d 15d 20d

图5 处理前后半夏试管块茎形成过程中赤霉素含量的变化

Fig. 5 Gibberellin content changes before and after treatment in the process of formation of microtubers of P. ternata in vitro

综合数据分析，确定70 mg·L -1的矮壮素适合半夏试管块茎的诱导，从该组培养基和MS空白培养基中，分别取0d、5d、10d、15d、20d试管块茎0.5g，测定内源赤霉素的含量。发现内源赤霉素随块茎发育出现下降再升高趋势，发育不同时期矮壮素对内源赤霉素均有一定程度的抑制（图5）。推测其赤霉素的作用机理是：在块茎形成的初始阶段起作用，即对试管半夏块茎的诱导启动作用强，而在块茎形成后，质量的增加作用降低，甚至不起作用。

## 2.3 总结

2.3.1讨论

块茎的形成是比较复杂的一个过程，涉及到植株的营养生长，生殖生长以及体内的新陈代谢等一系列的动态变化[104]。赤霉素的生理作用之一是促进茎的伸长，细胞分裂和叶片扩大等，其抑制作用则体现在块茎形成过程中，即具有

抑制或延迟块茎形成的作用[105]。有实验研究表明，高浓度水平的GA3阻碍了有机成分蔗糖向淀粉方向的转化，因此不能积累有效物质向块茎运输[106]。本试验中，CCC处理后GA3较同期对照组下降，而块茎的诱导率高于对照组，说明了半夏块茎形成和生长需要低浓度的GA3, CCC抑制了GA3的合成。

本研究中，矮壮素添加在MS培养基中。结果发现，低浓度矮壮素对半夏块茎诱导具促进作用，70 mg. L-1时促进块茎形成的作用达最大，随着矮壮素浓度进一步增大，抑制块茎发育，诱导率也出现下降趋势。说明矮壮素的添加，抑制了叶柄自身赤霉素的合成，导致赤霉素合成受阻，从而使其含量下降，抑制作用减小，与常莉等[107]的研究结果一致。即内源生长物质平衡水平在块茎形成过程中的变化作用体现在块茎形成初期，赤霉素含量在半夏块茎形成初期先是急剧下降的，然后又呈快速上升趋势，说明了内源赤霉素对半夏块茎形成的启动期有抑制作用，对形成后的块茎作用不明显或者不起作用。分析原因，可能是在块茎发育初期抑制作用比较明显，但是在后期由于植物自身的保护机制起作用，抑制作用解除，从而块茎质量明显增加。

有研究表明，在培养基中添加矮壮素后，培养试管半夏叶柄，发现测定其块茎的内源赤霉素GA3明显减少。此外，添加矮壮素后对其他内源生长物质也产生了不同的影响，测定其内源脱落酸、茉莉酸类物质在半夏试管块茎发育的一定时期内呈上升趋势，表明它们在块茎膨大过程中起积极的促进作用[108]。可推知，矮壮素可能亦通过改变块茎中内源生长物质的含量来调控块茎的生长发育，但其具体调控机制尚待继续研究。

试管半夏块茎的形成和马铃薯块茎形成可能有很大的相似性，国内外研究认为矮壮素影响马铃薯块茎中淀粉的运输。CCC对植株可能的影响是破坏植物近顶端分生组织，使其细胞分裂和扩大受到抑制，从而抑制植物的营养生长，改变同化物质在植物各器官间的分配格式，促进经济器官的发育。本次试验中，试管半夏叶柄在经矮壮素处理后，诱导产生的试管块茎膨大明显，70

mg/L的矮状素处理的半夏块茎的质量明显比对照组高。这说明矮壮素有促进有机物质向块茎中运转的作用。

本试验通过对半夏试管块茎诱导培养基中施加不同浓度的矮壮素，探讨半夏试管块茎形态建成中内源激素含量变化的规律。试验结果表明，CCC处理的植株块茎较之同期对照有明显的膨大，其中，浓度为70 mg/L处理下块茎膨大最为明显，内源赤霉素GA3含量亦存在明显的动态变化。

2.3.2展望

众所周知，半夏的块茎（株芽）不仅含淀粉，还含有多种次生代谢产物其中包括多种药用成分。曾有研究称，矮壮素使黄芩中碳源的分配集中于地上部分

的生长和木质素的合成，不利于地下部分生物量和黄酮类成分的累积，因此不适于黄芩的中药材生产，并且可能也不适应于以根或根茎为药用部分的其他中药材的生产[109-110]。矮壮素在促进半夏块茎发育的过程中，是否影响其次生代谢产物的积累还有待于进一步研究。

内源激素对试管半夏块茎形成具有调节用，但究竟是哪种激素起到关键作用还有待进一步研究以确定。另外，内源生长物质间的平衡协调已被认为是调控块茎发生的重要因素。如果半夏块茎形成过程中的主要内源激素间的关系、调控情况被彻底认清之后，半夏以及其他块茎累植物的组织培养及试管块茎的大规模繁育推广必将进入一个新的阶段，本研究进一步优化了半夏试管块茎的诱导体系。今后可以此模型，研究赤霉素在半夏试管块茎形成过程中的基因调

# 控网络，为进一步揭示块茎的变态发育机理奠定基础。

# 第三章 赤霉素调控半夏块茎形成相关基因抑制性消减文库构建

## 3.1 前言

植物块茎为人类提供了大量的食物来源和药物来源，在人类活动中发挥着重要作用，然而块茎的变态发育是一个复杂的生物学过程，涉及众多基因的网络调控。激素调控是一个极其复杂的生物学过程，涉及逆境响应、能量代谢、蛋白质代谢、核酸代谢、脂肪酸代谢等一系列生物学过程。目前，关于赤霉素调控中药半夏块茎的研究的很少。

离体块茎的诱导体系提供了一个相对稳定一致的体系，本试验以半夏试管离体诱导体系为基础，构建差减文库，初步筛选与赤霉素调节半夏块茎形成相关的基因，进一步了解半夏块茎形成的分子机理，为通过基因工程手段改良品种奠定基础，同时对半夏栽培和产业的发展及种质保存等有重要意义。

因此本试验以宿半夏试管块茎为材料，利用抑制消减杂交方法（SSH），通过试验组和对照组，来富集赤霉素调控半夏块茎形成的相关基因，构建相关的消减文库，对筛选的阳性克隆进行随机的大量测序以及生物信息学功能分析，通过对有关基因进行实时定量PCR（Real time PCR）功能验证分析，为进一步揭示块茎形成的分子机理奠定基础。

## 3.2 试验材料与方法

3.2.1试验材料

3.2.1.1材料

宿半夏由资源植物生物学安徽省重点实验室提供，经薛建平教授鉴定为宿半夏。选取大小一致的试管半夏的叶柄倒置于对照组（MS）和处理组（MS+CCC）培养基中，培养温度为25±1℃，光照时间为12 h·d -1，光照强度3000 lx。分别在5 d，10 d，15 d、20 d时，分别收集处理组和对照组半夏叶柄诱导出来的块茎，迅速置于液氮中，标记备用。

3.2.1.2菌株的选择与载体

用大肠杆菌DH5α作为克隆用的菌株，质粒载体则为PMDTM18-T Vector，两者均购自宝生物工程（大连）有限公司。

3.2.1.3试剂及工具酶

总RNA提取采用改进的皂土法、PCR-SeLect TM cDNA削减杂交试剂盒及PCR-Select差异筛选试剂盒均购自Clontech公司、mRNA纯化试剂盒购自大连宝生物（Takara）公司、T4 DNA Ligase（Takara）、氯仿、异丙醇、乙醇、DEPC、X-Gal、IPTG均为分析纯（上海生工生物技术有限公司）。

3.2.1.4仪器与设备

定量PCR仪（ABI7300，美国ABI公司）、热循环仪、超净工作台（上海

sanfa公司）、台式高速冷冻离心机（Z-300K, 德国Sigma）、FA（N）/JA系列电子天平（上海民桥精密科学仪器有限公司）、SHIMADZU精密天平（JAPAN）SSH-W21-420型电热恒温水浴锅、基因扩增仪（东胜科技有限公司）、振荡培养箱、核算蛋白分析仪DU 730(美国贝克曼库尔特公司)、YLN2K分子生物学影像分析系统（北京亚力恩机电技术研究所制造）、微量移液器（大龙）、SZ-1型快速混匀器。

3.2.2方法

3.2.2.1总RNA提取

选取等量试验组与对照组半夏试管块茎材料（两组混合池），采用皂土法和提取总RNA，方法如下：

皂土法：

1）将保存的材料在液氮中迅速研磨成粉末状，然后将其转移到已经预冷的10

mL离心管中。

2）向离心管中加入皂土提取缓冲液3 mL，用涡流震荡器充分振荡混匀。

3）先后加入等体积的氯仿和等体积的水饱和酚，用混匀器振荡器混匀，4 ℃12

000 r·min -1离心15 min。

4）取上清液转移至新管，加入1/2倍体积的5 mol·L -1 KAc(pH4.8)，然后冰上放置10 min左右；利用低温冷冻离心机4 ℃13 000 r·min -1离心10 min。

5）转移上清到新离心管中，加入1/2上清体积的水饱和酚和1/2上清体积的三氯甲烷，涡旋振荡混匀，于4 ℃情况下，10000 r·min -1离心5 min。

6）重复步骤5，直至两相间界面清亮为宜（2-3次即可）。再转移上清至一新离心管并用等体积三氯甲烷重复抽提一次。

7）离心后，转移上清液至新管，加入等体积乙二醇丁醚，冰上放置1 h左右，最后4 ℃情况下14000 r·min -1离心15 min。

8）用移液器小心吸去液相，用配好的75%乙醇冲洗离心管壁2次，短暂离心后吸去液相，再置于空气中干燥，最后将沉淀溶于适量DEPC处理水中，-70℃保存备用。

总RNA提取完成后，取出少部分的RNA样品10μL在1.0%的琼脂糖凝胶中电泳，电泳缓冲液为1×TAE, 5V/cm电泳40-50 min观察。总RNA浓度及纯度用紫外分光光度计测定。

3.2.2.2 mRNA的分离与纯化

按照Oligotex-dT30-mRNA-Purification-Kit mRNA纯化试剂盒使用手册，分别纯化试验组和对照组mRNA。

1）提前将OligotexTM-dT30<Super>、2×Binding Buffer于37℃保温，至溶液内沉淀完全溶解为止。

2）向1.5 mL微量离心管内加入约200μg总RNA，用水（RNase-free）稀释至150μL，加入温浴保存的2×Binding Bμffer 150μL、OLigotexTM-dT30 15μL配制反应液。

3）充分混匀反应液后，70 ℃加热3 min。

4）室温放置10 min。

5）用高速离心机15000 r·min -1离心5 min。

6）吸去上清后弃之，再向管内加入350μL的Wash Buffer，然后用移液枪轻轻吸打使OLigotexTM-dT30充分悬浮，转移到Spin Column Set的Column Cup中。7）将混匀后的离心管用高速离心机15000 r·min -1离心30 s。

8）重新向Column Cup中加入350μL Wash Buffer，充分悬浮OLigotexTM-dT30，然后将Spin Column转移至新的配套离心管上。

9）重复步骤7。

10）将Spin Column转移至新的配套离心管上。

11）向Column Cup中加入20~50μL 70℃预热的DEPC H2O，用移液枪轻轻吸打，使OLigotexTM-dT30充分悬浮，再15000 r·min -1离心约30 s，再从离心管的底部回收纯化后的mRNA。

12）重复上一步骤2~3次（每次都需事先加入70 ℃预热好的DEPC处理水，

每次用量不超过 50 μL 为宜）。将 mRNA 溶液-80℃储存备用。13）最后根据所需mRNA的量，后期需要真空冷冻干燥，使其达到试验所需要的浓度。

3.2.2.3 cDNA第一链合成

1）预热热循环仪70 ℃或16 ℃；空气浴42 ℃。

2）将试验组（tester）和对照组（driver）的2μg的mRNA (2-4μL)分别加入0.5

mL的微量离心管中，标记好备用。

3）向上面的两个离心管中，各自加入cDNA的合成引物（10μM）1μL。然后加入 ddH2O 至终体积 5 μL，混合各组分，短暂离心即可。4）将短暂离心的离心管在热循环仪上70 ℃孵育2 min。

5）接着冰上放置2 min左右后简短的离心。

6）分别每个反应管中依次加入以下组分

First-Strand Buffer（5×）2μL

DNTPs Mix (10 mM) 1μL

AMV Reverse Transcriptase (20 U·µL -1) 1μL

ddH2O 1μL

7）轻轻振荡和简短离心2 min。

8）在42 ℃空气浴中孵育1.5 h。

9）将反应液快速放在事先准备好的冰上，终止cDNA第一条链的合成，随后立即进行其第二链的合成。

3.2.2.4 cDNA的第二链合成

1）在cDNA第一链合成后的离心管中依次加入下列成分：

5×Second -strand Buffer 16.0μL

dNTPs Mix(10 mM) 1.6μL Second-strand Enzyme Cocktail(20×) 4.0μL ddH2O 48.4μL

2）混合各组分简短离心，终体积为80μL，热循环仪上16℃孵育2 h。

3）加入2μL（6Μ）T4 DNA聚合酶，充分混合各组分，热循环仪上16 ℃孵育

30min。

4）将4μl 20×EDTA/Glycogen Mix加入离心管，终止cDNA的第二链的合成。

5）加入试剂体积比为25: 24: 1的苯酚：氯仿：异戊醇100μl。

6）充分振荡，室温下14000 r·min -1离心10 min。

7）小心收集上层水相，置于另一新的0.5 mL微量离心管中。

8）加入100μL氯仿：异戊醇=24: 1。

9）重复步骤6和7。

10）加入40μL的4 mol·L -1 NH4AC和300µL95% 乙醇。

注意：立即处理沉淀，不要放在-20 ℃储存，否则有沉淀生成。

11）充分振荡，室温下14000 r·min -1离心20 min。

12）小心的收集上清液。

13）用80%的500μL乙醇覆盖沉淀。14）14000 r·min -1离心10 min.15）转移上清液。

16）空气中干燥10 min，待残留的乙醇挥发。

17）溶解在50μL新鲜的无菌水中。

18）取6μL至新的微量离心管之中，1.0%琼脂糖凝胶电泳评估cDNA的产率和大小范围。

3.2.2.5 cDNA质量的检测

根据半夏微管蛋白基因作为内参照基因的cDNA序列设计出一对上下游特异性引物，以反转录所得cDNA为模板进行PCR扩增，若最终通过PCR反应能扩增能获得目标片段，则说明mRNA已经转录成完整的cDNA。

微管蛋白基因引物序列：α-tublin F 5'- AACCTACACGAACCTCAACCG -3'

α-tublin R 5'- ATGGATGAAGGCTCAAACGCA -3'

3.2.2.6 Rsa I酶切双链cDNA

1）每个反应中加入以下组分：

上一步已合成的cDNA 43.5µL Rsa I Restriction Buffe(10×) 5.0µL Rsa I (10 U·µL -1) 1.5µL

2）简短混合后离心。

3）热循环仪上37 ℃孵育8 h

4）留出5μL消化后产物，分析酶切消化后的产率。

5）加入2.5μL 20×EDTA/Glycogen Mix 以终止酶切反应。

6）向反应液中加入50μL苯酚：氯仿：异戊醇=25: 24: 1。

7）用移液器充分混合，用高速离心机室温下14000 r·min -1离心10 min。

8）小心收集上层水相，置于另一新的0.5 mL离心管中。

9）加入50μL氯仿：异戊醇=24: 1。

10）重复步骤7和 8

11）加入25μL 4 mol·L-1 NH4Ac和187.5µL 95%酒精。

12）重复步骤7。

13）转移上清液。

14）用200μL 80%的酒精洗涤沉淀。15）14000 r·min -1 离心5 min。16）小心的转移上清液。

17）空气中干燥沉淀10 min。

18）用5μL无菌水溶解沉淀，于-20 ℃的冰箱中保存。

19）用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测酶切效率。

3.2.2.7接头连接

将试验组酶切后的双链cDNA 分成相等的两份，然后分别与Adaptor1、

Adaptor2R连接，具体步骤如下：

1）将酶切后的试验组双链cDNA取出1μL，用5μL ddH2O稀释。

2）将以下配制成连接Master Mix装在0.5 mL离心管中，一般应多配一份反应的体积以保证反应液（Master Mix）足够。

3）每份连接反应液(Master Mix)的配制方法如下：Ligation Buffer（5×）2μL

T4 DNA连接酶 1μL

ddH2O 3μL

4）将配制好的反应液按下表于两个EP中混匀：

Component Tester1-1 Tester1-2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 稀释后的试验组 cDNA | 2 μL | 2 μL |
| 接头 1[Adaptor1 (10μM)] | 2 μL | **/** |
| 接头 2R[Adaptor2R(10μM)] | **/** | 2 μL |
| 预先准备好的反应液 | 6 μL | 6 μL |
| 最终体积（Final volume） | 10 μL | 10 μL |

5）按照步骤4配制完成后，分别取tester1-1和tester1-2各2μL至一新的离心管中混匀，此部分经连接完成后可作为本试验所需要的无差异显示的Tester对照( tester control 1-c)，连接反应后，约1/3的无差异显示的Tester对照cDNA分子同时带有两个不同的接头。

6）用微型离心机轻微离心，以使管壁上的反应液完全位于管底，于16℃连接过夜.

7）连接完成后向反应体系内加入1μL 20×EDTA/Glycogen Mix以终止反应；

72 ℃温育5 min使连接酶失活；至此，加接头的反应全部完成；

8）从无差异显示的tester对照取1μL用1 mL ddH2O稀释后用于PCR检测；

9）连接反应完全后，将以上反应连接产物置于-20℃保存备用。

3.2.2.8接头连接效率的分析

1）分别取上一步骤中连接好接头的的Tester1-1和Tester1-2各1μL，用灭菌的去离子水稀释至200μL。

2）取4个洁净的200μL离心管，按表中显示分别配制接头连接效率检测体系

反应成分Tubes: 1号管 2号管 3号管4号管Tester1-1（连接Adaptor 1）1μL 1μL -- -- Tester1-2（连接Adaptor 2R）-- -- 1μL 1μLα-tublin 3′Primer(10μM) 1μL 1μL 1μL 1μLα-tublin 5′Primer(10μM) -- 1μL -- 1μL PCR Primer 1(10μM) 1μL -- 1μL --

Final volume 3μL 3μL 3μL 3μL 3）取一新的离心管，按下表配制22.0μL Master Mix反应体系，为避免加样造成的损失，一般会配制5倍反应体积的反应液。混匀后，分别取混合液Master Mix

22.0μL至以上4管中，配制成25μL反应液，并加矿物油一滴，多余的一份

Master Mix备用，如下：

每个反应管量 总量（4r×ns）

ddH2O 18.5μL 18.5μL×5

10×PCR reaction buffer 2.5 μL 2.5 μL×5

dNTP Mix(10m M) 0.5μL 0.5μL×5

Advantage cDNA Polymerase Mix(50×) 0.5μL 0.5μL×5

Total volume 22.0 μL 22.0 μL×5

4）将上述25μL反应体系置于热循环仪上75℃反应5 min以补平接头；随后在PCR仪上进行以下反应：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，65℃退火30 s，68℃延伸2 min，35个循环，最后68℃延伸8 min。

5）PCR反应完全后，将PCR产物在浓度为1％的琼脂糖凝胶上进行电泳检测，以检测接头连接效率的高低。

3.2.2.9第一次杂交

根据上一步接头连接效率的高低以确定后续步骤能否进行，只有达到较高的接头连接效率时，才可以进行后续的杂交反应。 1）按照下表显示各组分组成及含量，配制第一次杂交反应体系：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Component | Hybridization sample 1 | Hybridization sample 2 |
| Rsa digested driver cDNA | 1.5μL | 1.5μL |
| Tester1-1(Ligated adaptor1) | 1.5μL | / |
| Tester1-2(Ligated adaptor2) | / | 1.5μL |
| 4×Hybridization Buffer | 1μL | 1μL |
| Final volume | 4μL | 4μL |

2）各组分准确加入后，在反应液上滴加矿物油一滴，以减少反应过程中反应液挥发；简短离心使反应液存于管底。

3）经98 ℃热浴1.5 min，使DNA充分变性；

4）在68 ℃温度下杂交8 h后，立刻进行第二次的杂交反应过程。

3.2.2.10第二次的杂交

第一次杂交完成后混合Hybridization sample 1和Hybridization sample 2，随后加入新变性的对照组cDNA为了更进一步富集不同的表达序列，新的杂交分

子由不同接头的不同表达cDNA组成。

1）在灭菌离心管中加入以下成分：对照组的cDNA 1μL Hybridization Buffer（4×）1μL

ddH2O 2μL

2）取出1μL加到离心管中，加入一滴石蜡油；

3）PCR仪上98 ℃变性1.5 min；

4）用移液器混合Hybridization sample 1、Hybridization sample 2和新变性对照组cDNA，轻轻混匀后，离心收集反应液。

5）将上述杂交反应液于68 ℃杂交过夜。

6）第二天向杂交反应液中加入200μL试剂盒内提供的dilution buffer，混匀后将反应液在68 ℃保温7 min；

7）杂交完成后，将杂交液置于-20 ℃冰箱内保存备用。

3.2.2.11两次PCR扩增

差异表达的cDNA将在这节描述的两步反应中选择性扩增，在扩增前，接头丢失的链会通过75℃的保温而补上；这就是PCR反应的引物1的酶切位点。在第一次扩增时，只有两头连接了不同接头的序列才能扩增。第二次扩增时，以Nested primer 1和Nested primer 2R为引物的巢氏PCR可进一步降低背景干扰，并扩增差异表达序列。

第一次PCR反应：

1）在0.2 mL无菌离心管中配置如下PCR反应体系：组分 加入量

PCR reaction Buffer(10×) 2.5μL

dNTPs (10 mM) 0.5μL

Primer 1(10μM) 1μL

Advantage cDNA polymerase Mix(50×) 0.5μL ddH2O 19.5μL

第二次杂交产物 1μL

终体积（Final volume）25μL

2）涡旋混匀，短暂离心。

3）加一滴矿物油覆盖反应体系。

4）反应程序为：75 ℃5 min（补平接头作用）；94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，66 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，27个循环；72 ℃延伸5 min。5）取8μL的PCR产物，琼脂糖凝胶电泳分析。

第二次PCR反应：

1）取3μL第一次PCR产物，用灭菌后的去离子水（ddH2O）稀释10倍，以此稀释液作为第二次PCR反应的模板。

2）在200μL无菌离心管中配制第二次PCR反应液：

组分加入量

PCR reaction Buffer(10×) 2.5μL

dNTPs (10 mM) 0.5μL

Nested primer 1(10μM) 1μL

Nested primer 2(10μM) 1μL

Advantage cDNA polymerase Mix (50×) 0.5μL

ddH2O 18.5μL

Final volume 24μL

3）涡旋混匀后短暂离心。

4）以下列程序进行PCR反应：94℃预变性3 min；94℃变性30 s，66℃退火30 s，72℃延伸90 s，共27个循环；最后72℃延伸5 min。

（5）取两次PCR产物，用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

3.2.2.12消减效率的检测

用于扩增α-tublin基因引物基因的引物为同3.2.2.5。

（1）各取消减组与未消减组的第二次PCR产物1.0μL用灭菌去离子水(ddH2O)稀释10倍。

（2）依据下表配制20μL反应体系：

反应成分消减组未消减组稀释后消减组cDNA 1.0μL --

稀释后未消减组cDNA -- 1.0μL

α-tublin 3′Primer(10 μM) 1.2 μL 1.2 μL

α-tublin 5′Primer(10 μM) 1.2 μL 1.2 μL

ddH2O 17.4 μL 7.4 μL

PCR reaction buffer(10×) 3.0 μL 3.0 μL

dNTP Mix(10m M) 0.6 μL 0.6 μL

Advantage cDNA Polymerase Mix(50×) 0.6μL 0.6μL

Total volume 25 μL 25 μL 3）涡旋混匀，用微型离心机短暂离心，再加矿物油一滴覆盖反应液。

4）反应液配制完全后，置于PCR仪上进行反应：先94 ℃预变性3 min；然后

94℃变性30 s；接着66℃退火30 s，再72℃延伸90 s，一共35个循环，7最后是72℃延伸5 min。（注意在PCR反应的第20、25、30、35个循环结束时，分别取出5μL PCR反应液，收集完整后在浓度为1.0％琼脂糖凝胶上进行电泳检测）。

3.2.2.13 PCR产物的纯化浓缩

将消减杂交得到的cDNA二次PCR产物进行纯化浓缩，过程为：在PCR产物中加入1/2体积的NH4Ac(4 mol·L -1)，3.75倍体积的95%乙醇，混匀，14000 r·min -1，室温离心20 min；上清用80%乙醇洗一次，14000 r·min -1，室温离心5 min；弃上清，空气中干燥5~10 min，沉淀溶于8μL ddH2O。

3.2.2.14 PCR产物的载体连接反应

3.2.2.14.1大肠杆菌DH5α感受态的制备

感受态制备采用Takara公司SK2301一步法制备高效感受态细胞试剂盒进

行。

1）取1 mL*A*600=0.5~0.6的菌液至无菌的1.5 mL离心管中。4 000 r·min -1 离心 4

~ 5 min，彻底吸去上清，收集菌体。

2）加入0.1 mL冰上预冷的SSCS Solution，轻轻悬浮菌体，此时可冷冻保存于

-70 ℃待用。

3）加入100 pg~10 ng用于转化的DNA。

4）充分混匀，冰上放置30 min后于42 ℃放置90 s，冰上放置15~20 min。

5）加人0.8 mL无抗性的LB培养基至离心管中，37 ℃，200 r·min -1摇床培养

1 h.6）将细胞涂布于含合适抗生素的平板上培养。

大肠杆菌DH5α感受态的制备，步骤如下：

1）首先在37 ℃培养过夜的培养皿中挑取一个单菌落，然后接种于2 mL的LB

培养基中，在37 ℃，250 r·min -1的条件下摇菌培养过夜。

2）取过夜培养的菌液1 mL至100 mL LB培养液中，37℃，250 r·min -1摇菌培养3 h。

3）通过无菌操作把菌转入预冷的50 mL的无菌离心管中，然后冰上放置30 min，

以使培养物冷却至0 ℃。

4）4 ℃，4 000 r·min -1离心10 min，收集细菌。

3.2.2.14.2差异表达条带克隆入PMDTM18-T Vector

1）在200μL无菌离心管中配制10μL反应体系：纯化后的消减组第二次PCR产物4μL PMDTM18-T Vector 1μL

连接Solution I 5μL

Total volume 10μL

2）充分混匀，将反应体系置于热循环仪上16℃连接过夜，反应完成将反应液于-20 ℃保存备用。

3）用全部连接产物10μL转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。

3.2.2.14.3转化反应

1）取感受态细胞悬液100μL，转移到无菌的微量离心管中，每管再加连接产

物10μL，轻轻混合，冰上放置30 min。

2）42℃热激90 s，冰浴5 min。

3）加入890μL不含抗生素的LB培养基，用水浴将培养基升温至37℃后，接着将反应管转移到37℃的摇床上，温育1 h左右（摇动速度为150 r·min -1）。将适当体积已转化的感受态细胞用一无菌的弯头玻棒均匀涂布到含氨苄青霉素(100 μg·mL-1)的 IPTG/X-gal 琼脂培养基上。4)待菌液完全吸收后倒置平皿，37 ℃避光倒置培养过夜，第二天观察结果。

3.2.2.14.4菌液PCR鉴定阳性克隆

1）取白色菌落到含氨苄青霉素的LB培养基中2 mL，于37 ℃培养过夜。

2）别取1μL菌液为模板进行PCR反应（PCR程序见步骤）。其余的加入30%甘油冻存于-70℃。

组分加入量

PCR reaction buffer(10×) 2μL

dNTPs(10 μM) 1 μL

Nested primer 1 (10μM) 1μL

Nested primer 2R(10μM) 1μL

MgC12(25 mM) 2 μL

Tag 酶(5U·μL -1) 1 μL

H2O 12 μL

Total volume 20μL

3）PCR反应：94℃预变性3 min；94℃变性30 s，66℃退化30 s，72 ℃延伸90 s，30个循环；72℃延伸5min。

4）用1%琼脂糖凝胶电泳分析结果。

5）挑选阳性克隆，文库质量检测后，送生工生物工程（上海）有限公司进行测序。

3.2.2.15文库质量的检测

取阳性克隆的菌液为PCR反应模板，以接头引物Nested PCR primer 1和Nested PCR primer 2R进行PCR扩增，检测文库插入片段大小，PCR反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Component | 体积 (μL) |
| 菌液 | 1.0 |
| 10×PCR Reaction Buffer | 2.5 |
| DNTP Mix（10mM） | 2.0 |
| Nested PCR Primer 1（10μM） | 1.0 |
| Nested PCR primer 2R（10μM） | 1.0 |
| Taq Polymerase （5U·μL-1） | 0.5 |
| 灭菌 ddH2O | 17.0 |

总体积25.0

混匀离心，PCR程序为：94℃2 min，94℃10 s，68℃30 s，72℃1.5 min, 35

个循环。取5μLPCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，检测插入片段的大小。

3.2.2.16文库测序、序列分析与功能注释

从文库中随机挑选380个阳性克隆，送上海生工生物公司进行测序。对获得的差异表达EST进行序列BLAST比对，利用BLAST2GO软件（[http: //blast2go. com/](http://blast2go.com/)） 对获得的EST序列进行功能注释和分类功能注释与分类。GO是基因本体论联合会建立起来的一类数据库，适用于对多种基因和蛋白的功能进行限定性的描述，也是目前被科研工作者较为普遍接受的基因及基因产物描述系统之一。Gene Ontology（GO）包含了基因参与的三方面功能信息：生物过程（Biological

Process）、细胞组成（Cellular Component）和分子功能（Molecular Function），并将概念粗细不同的功能概念组织成DAG（有向无环图）的结构。

3.2.2.17定量PCR验证差异基因

由测序结果，用Blast进行序列比对，推测可能与半夏块茎形成相关的EST片段，用Real-time PCR验证其在块茎形成不同阶段的表达模式。选取60S核糖体蛋白（60S ribosomal protein），26S核糖体RNA基因（26S ribosomal RNA gene），锌转运蛋白（zinc transporter），12kD储存蛋白（12kD storage protein），苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase）等相关的5个基因，分别以对照组和试验组在0 d、5 d、10 d、15 d四个时期的RNA为模板，反转录合成cDNA (PrimeScript®RT Master Mix)。以α-tubulin基因为内参，采用Real-time PCR方法，检测该5个基因在半夏试管块茎形成的不同时期的表达情况，Real time-PCR引物见表1。同时将以上几个基因分别命名为*Pt*RSP60, *Pt*RSP26，*Pt*ZT，*Pt*SP12, *Pt*MDH, RNA的反转录体系如下：

5×PrimeScript®RT Master Mix 2.0μL; Total RNA 500 ng; RNase free H2O 8μL; Final volume 10.0μL

反应条件：37℃条件下，反应5 min，然后85 ℃5 s使其失活。

Real-time PCR的反应体系：

DNA模板2.0μL；SYBR®Premix Ex TaqTM II（2×）10.0μL；ROX Reference Dye (50×) 0.4μL；RT Primer-F(10μM) 0.8μL；RT primer-R(10μM)

0.8μL；灭菌ddH2O 6.0μL；Final volume 20.0μL

混匀后离心，PCR反应程序设置如下：95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60℃退

火31 s，40个循环，内参及目的片段均重复至少3次，分析方法按照ABI 7300

定量PCR仪说明书进行。用ABI 7300荧光定量PCR仪进行扩增。PCR扩增后分析扩增曲线和溶解曲线，并计算不同基因在宿半夏试管块茎在形成过程中5个时期的相对表达量。

表1 Real time-PCR分析基因克隆名称、引物序列

|  |  |
| --- | --- |
| Cloning gene namen | Sequence |
| -F | 5’- TAGATTTGGCCCTCACTTCG -3’ |
| *PtRSP60* |
| -R | 5’- GGGAACTTTCGGTTTCATCA -3’ |
| -F | 5’- TGCGTCGGATTATGACTGAA -3’ |
| *PtRSR26* |
| -R | 5’- CCGACTGGAATAACACTCCAA -3’ |
| -F | 5’- CCATTCGGTTTTTGAGGGTAT -3’ |
| *PtZT* |
| -R | 5’- GGCCTCTTCGGTATCAATCTC -3’ |
| -F | 5’- CATCCTGCGTCCTCTTTGTAA -3’ |
| *PtMDH* |
| -R | 5’- AAGAGCCAAGACCTTCTACGC -3’ |
| -F | 5’- GACGACGACTTCAAGAGCATC -3’ |
| *PtSP12* |
| -R | 5’- ATTCACCTTCTCCGTCACCAT -3’ |
|  | 5’- AACCTACACGAACCTCAACCG -3’ |
|  |
| -R | 5’- ATGGATGAAGGCTCAAACGCA -3’ |

Tab. 1 Gene cloning gene name and primer sequences used in real time-PCR analysis

-F

*α-tubulin*

## 3.3 结果与分析

3.3.1总RNA的提取

获得足量高质量的总RNA是进行抑制性消减杂交的前提条件，用分光光度计测定总RNA在260 nm和280 nm处的吸光度值，皂土法所得总RNA 的

*A*260/*A*280的比值界于1.8~2.0之间，图1中，泳道2和3分别分离得到的试验组与对照组的总RNA, 28 s、18 s和5 s rRNA条带均清晰可见，28 s条带的亮度约为18 s条带亮度的2倍，表明RNA未出现降解，条带结构完整。由紫外/可见分光光度计测定总RNA在260nm和280nm处的吸光度值，得出*A*260/*A*280的比值在1.8-2.0之间，说明所提取的总RNA纯度较高，不存在着蛋白质和酚类的污染。由此可知抽提的RNA质量和纯度满足SSH文库构建的要求。1、3：试验组总RNA；2、4：对照组总RNA



图1 宿半夏总RNA提取(皂土法提取的总RNA) Fig.1 The total RNA from *P. ternata*

(RNA extracted by Bentonite)

3.3.2 mRNA纯化

用1.0%琼脂糖凝胶电泳显示，图2- 2分离得到的对照组和试验组的mRNA均呈现清晰慧尾弥散状条带，说明改良的皂土法所提取的总RNA质量稳定，未降解。分离到的mRNA纯化效果良好，可用于cDNA合成。图2-1分离的效果稍差，主要是由于操作中降解的原因。（1：对照组2：试验组）



图2 -1 和2的mRNA在1.0%琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2-1 and2-2. The detection of mRNA by electrophoresis on 1% agrose gel(treated with DEPC) with 1×TAE

3.3.3接头连接效率检测

由图3-1和图4-2显示cDNA质量检测与接头连接效率检测的结果，cDNA合成质量可以满足消减杂交需要，接头连接效率较高。图3-1得到的检测的质

量高（改进的），图3-2得到的内参基因质量差，模板浓度大约比低10倍（按试剂盒量），图4-1的连接效率小于4-2。

A（a）：对照组B（b）：试验组



图3-1、2和3半夏α-tublin基因的RT-PCR扩增

Fig. 3-1,2and 2. RT-PCR amplification production of*P. ternata*α-tublin



图4-1和2接头连接效率检测Fig.4 Efficiency of the adaptor ligation Marker: DL2000 DNA Marker；泳道1，3：Tester-1和Tester-2用actin内部特异引物扩增；

泳道2，4：Tester-1和Tester-2分别用actin内部特异引物与接头引物扩增

M: DNA Marker (DL2000) 1, 3: PCR products using the tester -1 or tester-2 as template and the actin specific primers; 2, 4: PCR products of tester-1 or tester-2 using actin primer and adaptor

Primer, respectively

3.3.4消减效率检测

消减效率的高低是评价消减文库价值的最为主要的参考指标，本试验用内参照α-tubulin基因来检测消减效率。按照试剂盒的说明调整消减和未消减组的半夏试管块茎的ds cDNA的第二次PCR产物，使其浓度大致相等，再作为摸板，下图显示在相同扩增条件下，未经消减的半夏试管块茎组在第25个循环后可见PCR产物条带，而消减后的内参照α-tubulin基因引物在第35个循环时才有很模糊微弱的PCR产物条带出现，说明对照组和试验组的半夏试管块茎之间表达丰度相近的基因得到了较好的消减。本试验通过用PCR方法检测消减与未消减第二次PCR产物中组成型表达基因的丰度变化来判断消减效率，所用引物为α-tubulin内部一对特异引物Primer1和Primer2. PCR结果表明，未消减产物中，α-tubulin片段在30个循环时已经出现（图5 泳道8），而消减产物中actin片段出现时间比对照晚5个循环，在35个循环后才出现（图4-5 泳道5）。说明组成型表达基因的丰度在消减产物中已大大降低，证明消减效率较高。

Marker: DNA分子量标准（DL2000 DNA Marker）；1-4: 消减后样品在扩增20、25、30、



35个循环时的PCR产物；5-8: 未消减样品在扩增20、25、30、35个循环时的PCR产物；图5消减效率检测Fig.5 Evaluation of subtraction Efficiency

M: DNA Marker DL20001-4: PCR products from subtracted sample after 20 cycles, 25 cycles, 30 cycles, 35 cycles of Amplification.5-8: PCR products from un-subtracted sample after 20 cycles, 25 cycles, 30 cycles, 35 cycles of amplification.

3.3.5消减产物两次PCR的结果

PCR扩增产物电泳结果如图6，两轮选择性PCR扩增结束后，电泳结果显示为均匀弥散状，无明显的主带，从图中可以清楚地看出第二次PCR扩增后消减和未消减样品在大小分布和丰度上表现出明显的差异，且扩增片段平均大小集中分布在200 bp-750 bp左右，与预期试验结果相符合。这说明消减杂交成功，连接了接头的tester cDNA经过两轮消减杂交和两次抑制PCR后扩增出了弥散条带，半夏试管块茎形成的差异表达基因得到了较好的均一化和富集。



图6 消减杂交两次PCR产物

Marker: DNA分子量标准（DL2000 DNA Marker）；1, 3：消减杂交产物第一次和第二次

PCR的产物；2, 4：未消减杂交产物的第一次和第二次PCR的产物.

Fig.6 1, 3：The first and secondary PCR products of subtraction; 2, 4：without subtraction first and secondary PCR products；

3.3.6消减（SSH）文库质量分析

对所构建的正向消减文库，重组率大于90%，共获得800个独立的克隆，克隆文库结果符合要求（图7-1）。部分克隆的检测结果显示，经随机挑取的

17个菌落均能够扩增出插入片段，片段长度的大小分布在200～800 bp之间，片段平均集中在250~700 bp左右（图6）；对于PCR检测不到结果的克隆再进行重组质粒的提取和酶切验证，酶切产物经1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测。文库克隆的检测结果与消减杂交第二次PCR扩增结果是相一致的（图7-2）。



图7-1 基因组大小及片段等之间的关系

Fig. 7-1 The relationship between genome size and clips



图7-2 消减文库插入片段大小检测DNA分子量标准（DL2000 DNA Marker）；1-17：消减文库插入片段Fig.7-2 Inserts of subtractive library

DL2000 DNA Marker; 1-17: Inserts of subtractive library

3.3.7差减文库测序结果

对所建文库，随机挑取382个克隆然后进行测序，经NCBI比对后，除去重复序列和低质量序列，获得300个有效EST序列。其中比对后发现18个EST序列无同源序列，131个未知序列，其余EST序列能够找到与之匹配的同源性很高的序列（见表2），对这些匹配序列分析，发现所获得的EST序列涉及到糖代谢、能量代谢、蛋白质代谢、脂肪酸代谢、核酸代谢等多种代谢方式，另外还和信号传导、及膜转运等一系列生物学过程有关，并筛选出了7个可能与半夏试管块茎形成相关的EST片段，结果见表2。

**表2** **部分差异表达cDNA片段的同源比较结果**

Tab. 2 Homology comparison of some differential displayed fragments

| 编号(Seq. Name) | 匹配核酸序列描述(Seq.  Description) | 序列长  度(Seq. Length) | E 值(min. eValue) | 相 似 度  (Mean Similarity) | 基 因 功 能  Putative function of genes(Blast2go) Go 分类(GOs) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05210760(1)-212-M13-\_G05 | Udp-glucose 4-epimerase | 309 | 8.16E-17 | 91.61% | F:coenzyme binding; F:UDP-glucose 4-epimerase activity; P:galactose metabolic process |
| 07020830(PCR)-79-M13-\_B12 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 05211760(1)-185-M13-\_H08 | Zinc transporter | 335 | 4.03E-33 | 92.70% | P:copper ion transmembrane transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity; P:oxidation reduction; F:zinc ion binding; P:zinc ion transport; P:protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleotide binding; P:gravitropism; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; F:copper ion  Transmembrane transporter activity; C:plasma membrane |
| 05211760(1)-93-M13-\_G07 | Usp family protein | 577 | 2.44E-48 | 85.75% | F:ATP binding; P:response to stress; C:nucleus; F:hydrolase activity, acting on  Acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides |
| 05211760(1)-315-M13-\_B04 | Zinc transporter | 408 | 9.44E-47 | 92.05% | P:copper ion transmembrane transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity; P:oxidation reduction; F:zinc ion binding; P:zinc ion transport; P:protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleotide binding; P:gravitropism; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; F:copper ion  Transmembrane transporter activity; C:plasma membrane |
| 05211760(1)-195-M13-\_B10 | Vacuolar sorting protein 4b | 410 | 2.49E-26 | 95.50% | F:nucleoside-triphosphatase activity; F:ATP binding; C:mitochondrion |
| 05211760(1)-329-M13-\_H05 | Zinc transporter | 407 | 1.38E-45 | 92.00% | P:copper ion transmembrane transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity; P:oxidation reduction; F:zinc ion binding; P:zinc ion transport; P:protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleotide binding; P:gravitropism; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; F:copper ion  Transmembrane transporter activity; C:plasma membrane |
| 05211760(1)-67-M13-\_E04 | Usp family protein | 576 | 4.37E-46 | 85.70% | F:ATP binding; P:response to stress; C:nucleus; F:hydrolase activity, acting on |

07020830(PCR) -86-M13-\_A01

Zinc transporter 713 3.01E-45 92.35%

Acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides

P: copper ion transmembrane transport; F: zinc ion transmembrane transporter activity; P: oxidation reduction; F: zinc ion binding; P: zinc ion transport; P: protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C: cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F: nucleotide binding; P: gravitropism; F: transferase activity, transferring glycosyl groups; F: copper ion transmembrane transporter activity; C: plasma membrane

05211760(1) -199-M13-\_F10 unknown [Arachis

hypogaea]

07020830(PCR) -30-M13-\_A06

415 3.29E-06 57.50% C: vacuole; P: biological\_process

P: copper ion transmembrane transport; F: zinc ion transmembrane transporter activity; P: oxidation reduction; F: zinc ion binding; P: zinc ion transport;

Zinc transporter 409 2.42E-47 92.05%

05211760(1) -26-M13-\_F10 transitional endoplasmic

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 571 | 3.46E-98 | 96.40% |
| 335 | 4.03E-33 | 92.70% |

reticulum

05211760(1) -308-M13-\_C03

Zinc transporter

P: protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C: cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F: nucleotide binding; P: gravitropism; F: transferase activity, transferring glycosyl groups; F: copper ion transmembrane transporter activity; C: plasma membrane

F: microtubule-severing ATPase activity; F: ATP binding

P: copper ion transmembrane transport; F: zinc ion transmembrane transporter activity; P: oxidation reduction; P: zinc ion transport; P: protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C: cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F: nucleotide binding; P: gravitropism; F: transferase activity, transferring glycosyl groups; F: copper ion transmembrane transporter activity; C: plasma membrane

07020830(PCR) -26-M13-\_E05 usp family protein 727 1.24E-47 85.75% F: ATP binding; P: response to stress; C: nucleus; F: hydrolase activity, acting on

Acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides

P: copper ion transmembrane transport; F: zinc ion transmembrane transporter activity; P: oxidation reduction; F: zinc ion binding; P: zinc ion transport;

05211760(1) -5-M13-\_G06 zinc transporter 408 9.44E-47 92.05%

05211760(1) -106-M13-\_D09 syntaxin 1b 2 3 1070 6.99E-95 91.35%

P: protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C: cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F: nucleotide binding; P: gravitropism; F: transferase activity, transferring glycosyl groups; F: copper ion transmembrane transporter activity; C: plasma membrane

P: cellular membrane fusion; F: SNAP receptor activity; C: plasma membrane; P: vesicle-mediated transport; P: response to abscisic acid stimulus; P: intracellular protein transport

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-88-M13-\_B07 | Unknown [Arachis hypogaea] | 416 | 3.29E-06 | 57.50% | C:vacuole; P:biological\_process |
| 05210760(1)-235-M13-\_F08 | unknown [Arachis  hypogaea] | 417 | 3.36E-06 | 57.50% | C:vacuole; P:biological\_process |
| 05210760(1)-219-M13-\_F06 | protein | 584 | 6.32E-33 | 64.20% | C:vacuolar membrane |
| 05211760(1)-127-M13-\_F01 | Unknown [Arachis hypogaea] | 513 | 9.55E-19 | 66.15% | C:vacuole |
| 05210760(1)-221-M13-\_H06 | senescence-associated  protein | 317 | 2.22E-18 | 81.00% | - |
| 07020830(PCR)-55-M13-\_B09 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 05211760(1)-350-M13-\_E08 | Protein vernalization insensitive 3-like | 300 | 5.78E-27 | 81.30% | - |
| 07020830(PCR)-99-M13-\_F02 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 05211760(1)-111-M13-\_A10 | Poly -binding protein | 1020 | 3.83E-39 | 92.15% | F:nucleotide binding; F:RNA binding |
| 07020830(PCR)-96-M13-\_C02 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 05210760(1)-226-M13-\_E07 | plastid lipid-associated  Protein chloroplast | 371 | 9.27E-22 | 84.15% | C:plastoglobule; C:chloroplast thylakoid membrane; P:oxidation reduction;  F:structural molecule activity; F:2-alkenal reductase activity |
| 07020830(PCR)-83-M13-\_F12 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 05210760(1)-251-M13-\_F10 | protein | 584 | 6.32E-33 | 64.20% | C:vacuolar membrane |
| 05211760(1)-292-M13-\_C01 | Metallothionein-like protein | 642 | 2.02E-13 | 80.15% | F:metal ion binding |
| 05211760(1)-14-M13-\_B09 | transitional endoplasmic  reticulum | 571 | 3.46E-98 | 96.40% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 05210760(1)-236-M13-\_G08 | protein | 584 | 6.32E-33 | 64.20% | C:vacuolar membrane |
| 05211760(1)-333-M13-\_D06 | transitional endoplasmic  reticulum | 572 | 1.22E-98 | 95.40% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 05211760(1)-8-M13-\_B07 | Mannose-binding lectin | 389 | 2.24E-09 | 78.41% | F:sugar binding |
| 07020830(PCR)-40-M13-\_C07 | Transitional endoplasmic reticulum | 571 | 3.46E-98 | 96.40% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 05211760(1)-54-M13-\_H02 | Malate dehydrogenase | 461 | 3.20E-84 | 94.15% | P:cellular carbohydrate metabolic process; F:binding; C:mitochondrial matrix;  F:L-malate dehydrogenase activity; P:malate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05210760(1)-213-M13-\_H05 | Transitional endoplasmic reticulum | 349 | 1.45E-66 | 93.65% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 05211760(1)-16-M13-\_D09 | Fiber protein fb11 | 344 | 1.11E-29 | 88.50% | C:membrane; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:mitochondrion |
| 07020830(PCR)-62-M13-\_A10 | Transitional endoplasmic reticulum | 574 | 4.09E-97 | 96.40% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 07020830(PCR)-81-M13-\_D12 | Tumor-related protein | 581 | 4.37E-15 | 55.40% | - |
| 07020830(PCR)-21-M13-\_H04 | Senescence-associated protein | 316 | 2.22E-18 | 81.00% | - |
| 05211760(1)-322-M13-\_A05 | protein | 474 | 5.31E-73 | 88.35% | C:chloroplast; C:membrane |
| 05211760(1)-325-M13-\_D05 | Metallothionein-like protein | 642 | 2.02E-13 | 80.15% | F:metal ion binding |
| 05210760(1)-224-M13-\_C07 | Mannose-binding lectin | 484 | 1.09E-44 | 92.95% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-39-M13-\_A01 | Glucose acyltransferase | 544 | 6.82E-16 | 60.60% | F:hydrolase activity |
| 05211760(1)-147-M13-\_B04 | senescence-associated  protein | 317 | 2.22E-18 | 81.00% | - |
| 05211760(1)-175-M13-\_F07 | Mannose-binding lectin | 442 | 1.01E-43 | 93.00% | F:sugar binding |
| 07020830(PCR)-72-M13-\_C11 | Long chain acyl- synthetase 9 | 635 | 5.10E-32 | 83.35% | P:fatty acid biosynthetic process; C:chloroplast envelope; F:long-chain-fatty-acid-CoA ligase activity; C:membrane |
| 07020830(PCR)-82-M13-\_E12 | glycyl-trna synthetase  mitochondrial-like | 310 | 2.29E-30 | 91.65% | C:cytoplasm; P:glycyl-tRNA aminoacylation; F:ATP binding; F:glycine-tRNA  Ligase activity |
| 05210760(1)-220-M13-\_G06 | protein | 584 | 6.32E-33 | 64.20% | C:vacuolar membrane |
| 07020830(PCR)-98-M13-\_E02 | protein | 931 | 4.80E-31 | 63.20% | C:vacuolar membrane |
| 05211760(1)-118-M13-\_H10 | Malate dehydrogenase | 462 | 3.20E-84 | 94.10% | P:cellular carbohydrate metabolic process; F:binding; F:L-malate dehydrogenase activity; P:malate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle;  C:mitochondrion |
| 07020830(PCR)-2-M13-\_E02 | protein | 350 | 8.56E-21 | 89.45% | C:mitochondrial respiratory chain complex III; F:ubiquinol-cytochrome-c reductase activity; P:transport; P:mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; F:electron transporter, transferring electrons within  CoQH2-cytochrome c reductase complex activity |
| 07020830(PCR)-78-M13-\_A12 | Long chain acyl- synthetase  9 | 636 | 5.10E-32 | 83.35% | P:fatty acid biosynthetic process; C:chloroplast envelope; F:long-chain-fatty-acid-CoA ligase activity; C:membrane |
| 07020830(PCR)-47-M13-\_B08 | protein | 350 | 8.56E-21 | 89.45% | C:mitochondrial respiratory chain complex III; F:ubiquinol-cytochrome-c |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | Reductase activity; P:transport; P:mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; F:electron transporter, transferring electrons within CoQH2-cytochrome c reductase complex activity |
| 05211760(1)-10-M13-\_F08 | exocyst complex  Component 2 | 627 | 7.10E-44 | 70.20% | P:pollen germination; C:plasma membrane; C:cytosol; P:pollen tube growth |
| 07020830(PCR)-18-M13-\_E04 | Malate dehydrogenase | 440 | 8.39E-33 | 96.90% | F:copper ion binding; C:cell wall; F:L-malate dehydrogenase activity; P:response to salt stress; P:defense response to bacterium; P:response to cold; P:malate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle; P:cellular carbohydrate metabolic process; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:mitochondrial  Matrix; C:chloroplast; P:response to cadmium ion |
| 07020830(PCR)-84-M13-\_G12 | Fiber protein fb11 | 366 | 1.58E-28 | 86.90% | C:membrane; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:mitochondrion |
| 05211760(1)-152-M13-\_G04 | Mannose-binding lectin | 442 | 1.01E-43 | 93.00% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-25-M13-\_E10 | enolase | 196 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-29-M13-\_H05 | protein | 574 | 3.96E-63 | 80.15% | F:metal ion binding; P:metabolic process; F:phosphoglycerate mutase activity |
| 05211760(1)-345-M13-\_H07 | Exocyst complex | 292 | 1.95E-32 | 80.25% | P:pollen germination; C:plasma membrane; C:cytosol; P:pollen tube growth |
| 07020830(PCR)-60-M13-\_G09 | Metallothionein-like protein | 423 | 1.69E-14 | 81.25% | F:metal ion binding |
| 05211760(1)-95-M13-\_A08 | Fiber protein fb11 | 343 | 1.11E-29 | 88.50% | C:membrane; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; C:mitochondrion |
| 05211760(1)-107-M13-\_E09 | enolase | 194 | 7.26E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-66-M13-\_D04 | Membrane transport family  protein | 480 | 8.68E-69 | 92.05% | C:integral to membrane; F:receptor activity; C:plasma membrane;  P:transmembrane transport |
| 05210760(1)-228-M13-\_G07 | Elongation factor 1-gamma  3 | 386 | 3.73E-18 | 96.75% | F:translation elongation factor activity; C:eukaryotic translation elongation  Factor 1 complex; P:translational elongation |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-27-M13-\_G10 | Mannose-binding lectin | 376 | 1.14E-36 | 93.95% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-299-M13-\_B02 | enolase | 196 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-97-M13-\_D02 | Elongation factor 1-alpha | 290 | 3.28E-49 | 95.60% | F:translation elongation factor activity; P:translational elongation; P:GTP  Catabolic process; F:GTPase activity; C:cytoplasm; F:GTP binding |
| 05211760(1)-150-M13-\_E04 | Mannose-binding lectin | 442 | 1.01E-43 | 93.00% | F:sugar binding |
| 05210760(1)-205-M13-\_H04 | Diguanylate cyclase | 1085 | 1.28E-158 | 99.80% | F:phosphorus-oxygen lyase activity; P:oxygen transport; ; P:cyclic nucleotide biosynthetic process; F:heme binding; F:oxygen binding |
| 05211760(1)-194-M13-\_A10 | Mannose-binding lectin | 456 | 5.35E-49 | 93.10% | F:sugar binding |
| 05210760(1)-223-M13-\_B07 | Diguanylate cyclase | 1087 | 1.64E-159 | 99.80% | F:phosphorus-oxygen lyase activity; P:oxygen transport; ; P:cyclic nucleotide biosynthetic process; F:heme binding; F:oxygen binding |
| 05211760(1)-296-M13-\_G01 | Mannose-binding lectin | 304 | 3.11E-43 | 87.10% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-59-M13-\_E03 | coatomer subunit beta  -2-like | 655 | 7.87E-64 | 91.40% | F:myosin heavy chain kinase activity; F:binding; P:vesicle-mediated transport;  P:intracellular protein transport; C:COPI vesicle coat; F:structural molecule activity |
| 05211760(1)-86-M13-\_H06 | enolase | 195 | 7.26E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-290-M13-\_A01 | Beta-lactamase tem | 1082 | 1.59E-49 | 89.45% | P:beta-lactam antibiotic catabolic process; P:response to antibiotic;  F:beta-lactamase activity |
| 07020830(PCR)-22-M13-\_A05 | Mannose-binding lectin | 353 | 3.28E-33 | 84.50% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-102-M13-\_H08 | beta-galactosidase alpha  fragment | 1079 | 1.86E-67 | 96.50% | P:beta-lactam antibiotic catabolic process; P:response to antibiotic;  F:beta-lactamase activity |
| 05211760(1)-326-M13-\_E05 | Mannose-binding lectin | 444 | 2.27E-42 | 91.75% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-78-M13-\_H05 | enolase | 195 | 7.26E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity; C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-141-M13-\_D03 | Mannose-binding lectin | 389 | 1.56E-08 | 77.06% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-313-M13-\_H03 | Elongation factor 1-gamma 3 | 383 | 9.28E-19 | 96.75% | F:translation elongation factor activity; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; P:translational elongation |
| 05211760(1)-57-M13-\_C03 | enolase | 195 | 7.26E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-89-M13-\_C07 | Glucose acyltransferase | 306 | 7.45E-17 | 60.60% | F:hydrolase activity |
| 05210760(1)-203-M13-\_F04 | enolase | 196 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-94-M13-\_H07 | Glucose acyltransferase | 306 | 7.45E-17 | 60.60% | F:hydrolase activity |
| 07020830(PCR)-58-M13-\_E09 | Cytochrome p450 monooxygenase cyp704g7 | 255 | 1.93E-20 | 85.70% | F:heme binding; F:monooxygenase activity; P:oxidation reduction; F:electron carrier activity |
| 07020830(PCR)-12-M13-\_G03 | enolase | 196 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-85-M13-\_H12 | Mannose-binding lectin | 523 | 8.84E-09 | 77.88% | F:sugar binding |
| 05211760(1)-96-M13-\_B08 | enolase | 195 | 7.26E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus;  P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | Binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity; C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05210760(1)-214-M13-\_A06 | ankyrin repeat-containing  Protein at3g12360-like | 801 | 6.56E-114 | 93.35% | C:plastid; C:membrane |
| 07020830(PCR)-15-M13-\_B04 | Elongation factor 1-gamma  3 | 390 | 9.84E-19 | 96.75% | F:translation elongation factor activity; C:eukaryotic translation elongation  Factor 1 complex; P:translational elongation |
| 05211760(1)-72-M13-\_B05 | exocyst complex  Component 2 | 700 | 1.59E-43 | 70.20% | P:pollen germination; C:plasma membrane; C:cytosol; P:pollen tube growth |
| 05211760(1)-124-M13-\_C01 | enolase | 196 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-176-M13-\_G07 | Glucose acyltransferase | 307 | 7.70E-17 | 60.60% | F:hydrolase activity |
| 05211760(1)-337-M13-\_H06 | coatomer subunit beta  -2-like | 475 | 8.51E-65 | 91.40% | F:myosin heavy chain kinase activity; F:binding; P:vesicle-mediated transport; P:intracellular protein transport; C:COPI vesicle coat; F:structural molecule  activity |
| 07020830(PCR)-59-M13-\_F09 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-97-M13-\_C08 | 60S ribosomal protein l18a | 206 | 2.85E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-187-M13-\_B09 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 88.90% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-300-M13-\_C02 | coatomer subunit beta  -2-like | 475 | 8.51E-65 | 91.40% | F:myosin heavy chain kinase activity; F:binding; P:vesicle-mediated transport;  P:intracellular protein transport; C:COPI vesicle coat; F:structural molecule |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | activity |
| 05211760(1)-181-M13-\_D08 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-25-M13-\_D05 | Elongation factor 1-gamma  3 | 390 | 9.84E-19 | 96.75% | F:translation elongation factor activity; C:eukaryotic translation elongation  Factor 1 complex; P:translational elongation |
| 05211760(1)-346-M13-\_A08 | exocyst complex  Component 2 | 631 | 7.58E-44 | 70.20% | P:pollen germination; C:plasma membrane; C:cytosol; P:pollen tube growth |
| 05211760(1)-69-M13-\_G04 | Alpha a53d | 1090 | 2.76E-57 | 92.80% | - |
| 07020830(PCR)-88-M13-\_C01 | coatomer subunit beta  -2-like | 475 | 1.05E-63 | 90.80% | F:myosin heavy chain kinase activity; F:binding; P:vesicle-mediated transport; P:intracellular protein transport; C:COPI vesicle coat; F:structural molecule activity |
| 05211760(1)-170-M13-\_A07 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-115-M13-\_E10 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-320-M13-\_G04 | gamma-tocopherol  methyltransferase | 1127 | 2.12E-78 | 68.15% | C:plastid; F:transferase activity |
| 07020830(PCR)-35-M13-\_F06 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-37-M13-\_H06 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion  Binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | Cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity; C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-151-M13-\_F04 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-91-M13-\_E07 | enolase | 195 | 7.52E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05210760(1)-222-M13-\_A07 | Alpha a53d | 1068 | 2.28E-57 | 94.10% | - |
| 05211760(1)-327-M13-\_F05 | enolase | 431 | 2.61E-10 | 84.15% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-51-M13-\_F08 | enolase | 218 | 9.57E-11 | 89.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-84-M13-\_F06 | Alpha a53d | 1065 | 2.28E-45 | 84.90% | - |
| 05211760(1)-323-M13-\_B05 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-119-M13-\_A11 | Membrane transport family protein | 480 | 8.68E-69 | 92.05% | C:integral to membrane; F:receptor activity; C:plasma membrane; P:transmembrane transport |
| 05211760(1)-332-M13-\_C06 | enolase | 195 | 2.63E-10 | 86.05% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 05211760(1)-190-M13-\_E09 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-58-M13-\_D03 | Alpha a53d | 1092 | 2.98E-35 | 75.05% | - |
| 05211760(1)-166-M13-\_E06 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-301-M13-\_D02 | Alpha a53d | 1138 | 4.22E-57 | 93.80% | - |
| 05211760(1)-321-M13-\_H04 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.55% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 07020830(PCR)-11-M13-\_F03 | enolase | 434 | 7.94E-11 | 87.11% | F:copper ion binding; P:response to salt stress; P:response to light stimulus; P:response to cold; C:phosphopyruvate hydratase complex; C:cell surface; F:DNA binding; P:response to abscisic acid stimulus; F:magnesium ion binding; P:glycolysis; C:mitochondrial envelope; C:chloroplast; P:response to cadmium ion; F:hydrolase activity; F:phosphopyruvate hydratase activity;  C:nucleus; C:plasma membrane; C:apoplast |
| 07020830(PCR)-92-M13-\_G01 | Alpha a53d | 1027 | 6.43E-40 | 84.50% | - |
| 05211760(1)-331-M13-\_B06 | 60S ribosomal protein l18a | 207 | 2.97E-24 | 95.30% | C:ribosome; F:structural constituent of ribosome; P:translation |
| 05211760(1)-138-M13-\_A03 | Unknown [Arachis hypogaea] | 513 | 9.55E-19 | 66.15% | C:vacuole |
| 05211760(1)-32-M13-\_D11 | transitional endoplasmic  reticulum | 571 | 3.46E-98 | 96.40% | F:microtubule-severing ATPase activity; F:ATP binding |
| 05211760(1)-312-M13-\_G03 | Zinc transporter | 408 | 9.44E-47 | 92.05% | P:copper ion transmembrane transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity; P:oxidation reduction; F:zinc ion binding; P:zinc ion transport; P:protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleotide binding; P:gravitropism; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; F:copper ion  Transmembrane transporter activity; C:plasma membrane |
| 05211760(1)-171-M13-\_B07 | probable  3-beta-hydroxysteroid-delta  -isomerase-like | 379 | 5.27E-32 | 80.15% | F:cholestenol delta-isomerase activity; P:sterol metabolic process; C:integral to membrane; C:endoplasmic reticulum |
| 05211760(1)-156-M13-\_C05 | Zinc transporter | 335 | 4.03E-33 | 92.70% | P:copper ion transmembrane transport; F:zinc ion transmembrane transporter activity; P:oxidation reduction; F:zinc ion binding; P:zinc ion transport; P:protein targeting to vacuole; F:2-alkenal reductase activity; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:nucleotide binding; P:gravitropism; F:transferase activity, transferring glycosyl groups; F:copper ion  Transmembrane transporter activity; C:plasma membrane |
| 05211760(1)-110-M13-\_H09 | Usp family protein | 576 | 4.37E-46 | 85.70% | F:ATP binding; P:response to stress; C:nucleus; F:hydrolase activity, acting on  Acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-114-M13-\_D10 | Senescence-associated protein | 316 | 2.22E-18 | 81.00% | - |
| 05211760(1)-79-M13-\_A06 | Upf0051protein chloroplastic-like | 236 | 1.00E-21 | 92.10% | C:mitochondrial respiratory chain; F:DNA-directed RNA polymerase activity; F:protein binding; P:cellular iron ion homeostasis; P:response to red light; P:regulation of transcription, DNA-dependent; P:transcription initiation; F:sigma factor activity; C:chloroplast; P:iron-sulfur cluster assembly; ; P:response to blue light; F:DNA binding; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; F:transcription factor activity;  P:cytochrome complex assembly; F:ATP binding |
| 07020830(PCR)-66-M13-\_E10 | metallothionein-like  protein | 422 | 1.69E-14 | 81.25% | F:metal ion binding |
| 05210760(1)-239-M13-\_B09 | protein | 584 | 6.32E-33 | 64.20% | C:vacuolar membrane |
| 05211760(1)-99-M13-\_E08 | Glucose acyltransferase | 544 | 6.82E-16 | 60.60% | F:hydrolase activity |
| 05211760(1)-344-M13-\_G07 | protein | 473 | 1.49E-72 | 89.20% | C:chloroplast; C:membrane |
| 05210760(1)-207-M13-\_B05 | Senescence-associated protein | 317 | 2.22E-18 | 81.00% | - |
| 05211760(1)-1-M13-\_C06 | ---NA--- | 252 |  |  | - |
| 05211760(1)-2-M13-\_D06 | ---NA--- | 856 |  |  | - |
| 05211760(1)-3-M13-\_E06 | ---NA--- | 672 |  |  | - |
| 05211760(1)-4-M13-\_F06 | ---NA--- | 256 |  |  | - |
| 05211760(1)-6-M13-\_H06 | ---NA--- | 178 |  |  | - |
| 05211760(1)-7-M13-\_A07 | ---NA--- | 235 |  |  | - |
| 05211760(1)-34-M13-\_F11 | ---NA--- | 306 |  |  | - |
| 05211760(1)-18-M13-\_F09 | ---NA--- | 266 |  |  | - |
| 05211760(1)-11-M13-\_G08 | ---NA--- | 235 |  |  | - |
| 05211760(1)-19-M13-\_G09 | ---NA--- | 237 |  |  | - |
| 05211760(1)-20-M13-\_H09 | ---NA--- | 255 |  |  | - |
| 05211760(1)-38-M13-\_B12 | ---NA--- | 256 |  |  | - |
| 05211760(1)-13-M13-\_A09 | ---NA--- | 309 |  |  | - |
| 05211760(1)-24-M13-\_D10 | ---NA--- | 342 |  |  | - |
| 05211760(1)-33-M13-\_E11 | ---NA--- | 181 |  |  | - |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-41-M13-\_C01 | ---NA--- | 180 | - |
| 05211760(1)-44-M13-\_F01 | ---NA--- | 811 | - |
| 05211760(1)-47-M13-\_A02 | ---NA--- | 181 | - |
| 05211760(1)-49-M13-\_C02 | ---NA--- | 254 | - |
| 05211760(1)-51-M13-\_E02 | ---NA--- | 268 | - |
| 05211760(1)-53-M13-\_G02 | ---NA--- | 299 | - |
| 05211760(1)-55-M13-\_A03 | ---NA--- | 234 | - |
| 05211760(1)-60-M13-\_F03 | ---NA--- | 811 | - |
| 05211760(1)-65-M13-\_C04 | ---NA--- | 442 | - |
| 05211760(1)-71-M13-\_A05 | ---NA--- | 481 | - |
| 05211760(1)-73-M13-\_C05 | ---NA--- | 185 | - |
| 05211760(1)-75-M13-\_E05 | ---NA--- | 612 | - |
| 05211760(1)-77-M13-\_G05 | ---NA--- | 454 | - |
| 05211760(1)-81-M13-\_C06 | ---NA--- | 182 | - |
| 05211760(1)-83-M13-\_E06 | ---NA--- | 304 | - |
| 05211760(1)-87-M13-\_A07 | ---NA--- | 255 | - |
| 05211760(1)-103-M13-\_A09 | ---NA--- | 252 | - |
| 05211760(1)-105-M13-\_C09 | ---NA--- | 369 | - |
| 05211760(1)-109-M13-\_G09 | ---NA--- | 485 | - |
| 05211760(1)-113-M13-\_C10 | ---NA--- | 75 | - |
| 05211760(1)-117-M13-\_G10 | ---NA--- | 359 | - |
| 05211760(1)-121-M13-\_C11 | ---NA--- | 359 | - |
| 05211760(1)-40-M13-\_B01 | ---NA--- | 376 | - |
| 05211760(1)-42-M13-\_D01 | ---NA--- | 322 | - |
| 05211760(1)-46-M13-\_H01 | ---NA--- | 461 | - |
| 05211760(1)-48-M13-\_B02 | ---NA--- | 182 | - |
| 05211760(1)-50-M13-\_D02 | ---NA--- | 338 | - |
| 05211760(1)-52-M13-\_F02 | ---NA--- | 254 | - |
| 05211760(1)-56-M13-\_B03 | ---NA--- | 481 | - |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 05211760(1)-61-M13-\_G03 | ---NA--- | 182 | - |
| 05211760(1)-68-M13-\_F04 | ---NA--- | 321 | - |
| 05211760(1)-70-M13-\_H04 | ---NA--- | 359 | - |
| 05211760(1)-74-M13-\_D05 | ---NA--- | 234 | - |
| 05211760(1)-76-M13-\_F05 | ---NA--- | 249 | - |
| 05211760(1)-80-M13-\_B06 | ---NA--- | 479 | - |
| 05211760(1)-82-M13-\_D06 | ---NA--- | 254 | - |
| 05211760(1)-90-M13-\_D07 | ---NA--- | 224 | - |
| 05211760(1)-98-M13-\_D08 | ---NA--- | 249 | - |
| 05211760(1)-100-M13-\_F08 | ---NA--- | 255 | - |
| 05211760(1)-104-M13-\_B09 | ---NA--- | 385 | - |
| 05211760(1)-108-M13-\_F09 | ---NA--- | 254 | - |
| 05211760(1)-112-M13-\_B10 | ---NA--- | 359 | - |
| 05211760(1)-116-M13-\_F10 | ---NA--- | 413 | - |
| 05211760(1)-120-M13-\_B11 | ---NA--- | 359 | - |
| 05210760(1)-200-M13-\_C04 | ---NA--- | 235 | - |
| 05210760(1)-201-M13-\_D04 | ---NA--- | 240 | - |
| 05210760(1)-204-M13-\_G04 | ---NA--- | 587 | - |
| 05210760(1)-206-M13-\_A05 | ---NA--- | 256 | - |
| 05210760(1)-208-M13-\_C05 | ---NA--- | 256 | - |
| 05210760(1)-209-M13-\_D05 | ---NA--- | 483 | - |
| 05210760(1)-211-M13-\_F05 | ---NA--- | 245 | - |
| 05210760(1)-217-M13-\_D06 | ---NA--- | 483 | - |
| 05210760(1)-225-M13-\_D07 | ---NA--- | 414 | - |
| 05210760(1)-227-M13-\_F07 | ---NA--- | 252 | - |
| 05210760(1)-229-M13-\_H07 | ---NA--- | 599 | - |
| 05210760(1)-230-M13-\_A08 | ---NA--- | 450 | - |
| 05210760(1)-231-M13-\_B08 | ---NA--- | 587 | - |
| 05210760(1)-232-M13-\_C08 | ---NA--- | 235 | - |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 05210760(1)-234-M13-\_E08 | ---NA--- | 252 | - |
| 05210760(1)-237-M13-\_H08 | ---NA--- | 588 | - |
| 05210760(1)-240-M13-\_C09 | ---NA--- | 310 | - |
| 05210760(1)-241-M13-\_D09 | ---NA--- | 457 | - |
| 05210760(1)-243-M13-\_F09 | ---NA--- | 235 | - |
| 05210760(1)-245-M13-\_H09 | ---NA--- | 240 | - |
| 05210760(1)-246-M13-\_A10 | ---NA--- | 203 | - |
| 05210760(1)-247-M13-\_B10 | ---NA--- | 233 | - |
| 05210760(1)-248-M13-\_C10 | ---NA--- | 235 | - |
| 05210760(1)-249-M13-\_D10 | ---NA--- | 235 | - |
| 05210760(1)-250-M13-\_E10 | ---NA--- | 306 | - |

为了进一步获得所测的EST的相关信息，经过Blast2GO工具分析后，对EST的物种分布进行了GO分类统计，可涉及到的物种达28种之多（如下图8-1），其中以大豆、杨树，葡萄、玉米，拟南芥等相似较多。



图8-1 BLASTx分析的物种分布

Fig. 8-1 Species distribution of BLASTx analysised

确定与赤霉素调控响应的功能基因是理解试管半夏的块茎形成机理的关键，通过Blast2GO对cDNA文库中的全部序列进行GO的基因2级水平分类，来一步确定过程中所涉及到的生物过程、细胞组分及具体的分子功能，（图8-2, 8-3, 8-4）。



图8-2 生物过程2级分类

Fig. 8-2 Biological process classification analysis on level 2

由图8-2知，与细胞加工和代谢过程相关的EST数量最多，分别为91和84个，其次为刺激响应相关的EST，为45个。而与繁殖、定位过程、病毒繁殖、细胞成分结构和多细胞器官加工相关的EST分别为22、20、18、15和13个，它们可能在半夏试管块茎的行成过程中起着重要的作用。



图8-3 分子功能2级分类

Fig. 8-3 Molecular function classification analysis on level 2

如上图8-3，发现与结合和催化活性相关的EST数量最多，分别为103 和

95个；其次分别为结构分子活性和转运活性的相关的EST，分别为30、12个；涉及能量代谢和信号转导活性的EST分别为3个和2个。



图8-4 细胞组分2级分类

Fig. 8-4 Cell component classification analysis on level 2

在细胞组分分类中（图8-4），与细胞相关的EST 有91 个，与细胞器相关的EST是78个，与大分子复合物相关的EST为45个，与病毒相关的EST则有18个，而与细胞外区域相关EST为27个，与膜被的内腔相关EST只有2个。

通过对半夏块茎形成相关基因的功能分类可以看出，在块茎形成过程中细胞组分及生物代谢都发生了明显的变化，有许多具有催化功能和结合功能的分子以及细胞器和定位过程相关的基因等大量表达，确定了块茎形成的位置关系，同时也加强了叶柄特定部位内部一些刺激反应和内部细胞、器官、生理代谢等的变化，最终表现为块茎的诱导和生长进程。

3.3.8 **Real-time PCR验**证差异表达基因的结果

以半夏试管块茎为材料，分别以对照组和试验组的0 d、5 d、10 d、15 d四个时期的RNA为模板，然后用Real-time PCR的方法，检测该5个基因在半夏试管块茎形成的不同时期的表达情况。

经试验可知，Real-time PCR的扩增曲线光滑，呈S型曲线；溶解曲线为单峰，说明相对定量PCR的结果准确，很可靠（图9）。

在半夏试管块茎的形成过程中，5-10d是块茎形成的关键时期。通过相对定量表达分析发现，在不同时期，试验组的26S核糖体RNA基因的表达量均高于对照组，对照组表达趋势是先下降后上升，而处理组是先上升后下降；12kD的贮藏蛋白基因在第5天和第10天时，对照组表达量较高，而在第15天时，试验组表达量才略高于对照组，对照组基因表达趋势为下降，试验组表现为上升（图10）。

60S核糖体蛋白基因的表达量是明显大于处理组；苹果酸脱氢酶基因的表达在两组中的表达趋势是相似的，先下降后增大，只是对照组的表达量是大于处理组的（图11）。

对于锌指蛋白的表达，在块茎形成初期的第5天，处理组表达量高于对照组，。对照组中表达量变化是先升后降，而处理组表达量变化不大（图12）。

由此可以说明，对半夏试管叶柄的不同处理和时效性选择，在块茎的形成进程中，引起了基因表达的差异，进一步说明差异基因的时空表达特性。





图9 Real-time PCR的扩增曲线和溶解曲线

Fig. 9 Amplification curve and melt curve of Real-time PCR

RAW RQ(Ralative Quantitation)

Raw RQ(Ralative Quantitation)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | Gene Expression |  |  |  |  | Gene Expression |  |  |  |
| 1000 |  |  |  |  |  |  | 3.5 |  |  |  |  |
| 900 |  |  |  |  |  |  | 3 |  |  |  |  |
| 800 |  |  |  |  |  |  | 2.5 |  |  |  |  |
| 700 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 600 |  |  |  |  |  |  | 2 |  |  |  |  |
| 500 |  |  |  |  |  |  | 1.5 |  |  |  |  |
| 400 |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |
| 300 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 200 |  |  |  |  |  |  | 0.5 |  |  |  |  |
| 100 |  |  |  |  |  |  | 0 |  |  |  |  |
| 0 |  |  |  |  |  |  | CK-5d CK-10d | CK-15d | 5d | 10d | 15d |
|  | 0 | CK-5d | CK-10d CK-15d | 5d | 10d | 15d |  | PtSP12 |  |  |  |
|  |  |  | PtRAR26 |  |  |  |  |  |  |  |  |

图10. 26S核糖体RNA（*PtRAR* 26）基因和贮藏蛋白基因(PtSP12)在试管块茎形成过程中的

表达变化

Fig. 10 Expression of 26S ribosomal RNA gene (PtRSP26) and 12kD storage protein in the process of formation of microtubers of *P.* ternata *in vitro*

Raw RQ(Ralative Quantitation)

Raw RQ(Relative Quantitaion)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Gene Expression |  | Gene Expression |  |  |
| 1.6 |  | 0.45 |  |  |
| 1.4 |  | 0.4 |  |  |
| 1.2 |  | 0.35 |  |  |
| 1 |  | 0.3 |  |  |
|  |  | 0.25 |  |  |
| 0.8 |  |  |  |  |
|  |  | 0.2 |  |  |
| 0.6 |  | 0.15 |  |  |
| 0.4 |  | 0.1 |  |  |
| 0.2 |  | 0.05 |  |  |
| 0 |  | 0 |  |  |
| CK-5d CK-10d CK-15d 5d 10d | 15d | CK-5d CK-10d CK-15d 5d | 10d | 15d |
| PtRSP60 |  | PtMDH |  |  |

图11. 60S核糖体蛋白（PtRSP60）和苹果酸脱氢酶(PtMDH)基因在试管块茎形成过程中的表

达变化

Gene Expression

5

4

3

2

1

0

0d

CK-5

CK-10d CK-15d

PtZT

5d

10d

15d

Fig. 11 Expression of 60S ribosomal protein gene and malate dehydrogenase genein the process of formation of microtubers of *P.* ternata *in vitro*

Raw RQ(Relative

Quantitation)

图12 锌转运蛋白（PtZT）基因在试管块茎形成过程中的表达变化

Fig. 12 Expression of zinc transporter genein the process of formation of microtubers of

*P.* ternata *in vitro*

## 3.4 小结

3.4.1试管半夏块茎的RNA抽提

植物的总RNA的提取方法已经有相关的研究[111-112]，在半夏块茎的组织中，其化学成分比较复杂，含有大量多糖、酚类以及多种次生代谢产物，再加之植物材料细胞壁厚，蛋白质、鞣质、萜烯类等物质积累在细胞内，很不利于总RNA的提取及逆转录等相关后续研究，所以如何改进试验方法，获得高质量的RNA是后续试验的前提。当前，比较普遍的提取方法有TRIZOL试剂盒法、异硫氰酸胍法[113]、CTAB法[114]和SDS-KAc法等[115]。同时，在RNA的提取过程里面，RNA酶、蛋白质、多糖的污染和实验操作是引起RNA提取质量下降和降解的主要因素。通过前人RNA提取方法的设计发现，TRIZOL法优点操作简单易学，缺点是易造成蛋白和多糖的污染。剩下的的方法虽然可大大降低蛋白和多糖的污染，不过RNA的损失较大，得率相对低，不经济实惠，同时造成材料的浪费。本实验室积累了多年的分子操作规程和方法的改进，对皂土法提取RNA很了解，其步骤简单易学，经济、实惠、有效，在RNA提取中应用广泛。本试验用改进的皂土法[78, 116]抽提得到的RNA完整性好、无污染，符合后续试验要求。

3.4.2基因文库构建与相关基因的筛选

基因文库中包含着为数众多的克隆，建成后可供随时选取其中任何一个基因克隆，基因克隆是只包含某些特定基因或DNA片段的克隆。目前，在转录水平上分离所需要的目的基因，已成为研究植物发生、胁迫等相关基因中较为常用的方法[117]。

在本试验中，利用差减杂交技术构建了赤霉素调控半夏试管块茎形成的相关的基因差减文库。在文库中随机挑取的380个克隆测序后，发现有一部分是污染的序列，即载体序列也在其中；有一部分基因出现频率较高，多为同一基因的不同片段；还有的的是完全重复的序列，这也说明在随机挑选的过程中也是不可避免的。

由于逆转录合成的两组cDNA中含有持家基因和某些特异基因信息，两组的cDNA在消减杂交前被酶切成小片段，如果两者有差异基因的存在，消减之后，经PCR反应，可得使低丰度的到高效富集，因而也增强了其出现频率。本试验是建立在试管半夏叶柄诱导块茎体系的基础上，以外源添加矮壮素为前提，将试管半夏块茎作为模型，研究赤霉素与其形成的相关基因的关系。这样在人工控制条件下，大大降低了外界环境干扰，在可控的条件下构建相关的差减文库，大大降低差异基因的假阳性机率。在本试验中，选取的380个克隆，最终得到151个有效ESTs，通过Blast2go功能分析，从中研究5个可能与赤霉素调控半

夏块茎形成相关的EST片段。由于块茎的发育涉及到很多方面，所以参与该过程的基因可能远远超过5个。通过EST比对，并未能直接得到与其赤霉素代谢相关且同时调控半夏块茎形成的基因，只能通过检测内源赤霉素的变化量以及可能与块茎形成有关的基因来研究。由于380个克隆是不够的，文库的量越大，越不容易获得想要的基因。为进一步获得更多参与赤霉素调控半夏试管块茎形成相关的基因，需要扩大相应的测序量，对文库进一步筛选。另外还有131个是未知的序列，是否与块茎形成相关，是否和赤霉素调控基因有联系还是未知的，有待研究。

3.4.3赤霉素调控半夏试管块茎形成相关基因

核糖体RNA基因即编码核糖体RNA的基因，该基因为重复的多基因家族。在生物体的转录翻译方面起着重要的作用。26S 基因曾在中国大麦中有过研究

[118]，但是报道的不多。该基因可能在调控块茎形成中中发挥一定的作用。本试

验中，由基因表达结果知道，26S核糖体RNA基因在对照组的表达趋势相对平缓，有先下降后上升的趋势，而处理组中该基因的表达量远远大于对照组，说明在处理前后基因的表达的确发生了明显的变化，赤霉素的降低导致该基因大量表达，从而使块茎形成进程加快；同时处理前后赤霉素的含量的降低，说明了矮壮素对赤霉素的合成可以有效抑制，其含量变化的趋势和对照组成正相关，而与对照组成负相关，说明了内源赤霉素的降低影响该基因的表达量。

贮藏蛋白是广泛的存在于细胞液泡中的一类有贮藏功能的贮藏蛋白质，在马铃薯和甘薯中，均存在着丰富的营养贮藏蛋白[119]，在其他植物的叶片等各种器官组织中也都有一定的分布。此外，由于贮藏蛋白质具有稳定表达的特性，可用于研究植物分类、植物系统进化和表达药用蛋白质等[120]。贮藏蛋白根据分子量分的话有很多类，12kD贮藏蛋白就是其中的一种。该基因在对照组中的表达量远大于处理组，试验处理后赤霉素含量的降低导致在整体上该基因在处理组中的表达量有所降低。同时也说明处理有效果，而且和基因表达关系密切。

核糖体蛋白是组成核糖体的主要成分，在细胞内蛋白质生物合成中发挥重要作用。近来人们也发现，核糖体具有参与DNA修复、细胞发育调控和细胞分化等核糖体外的功能。目前在真核细胞中发现的核糖体蛋白(riboso-malprotein, RP)有80种，广泛分布于各种组织中，它们与核糖核酸共同组成核糖体，在蛋白质的生物合成中起重要作用。越来越多的证据表明：许多种核糖体蛋白除组成核糖体，参与蛋白质的生物合成之外，还具有独立于蛋白质生物合成作用[121]。而60S核糖体蛋白一般在植物中研究的也很少，和SCF 复合体有一定的同源性，在

DELLA蛋白的表达作用中，可能扮演某种作用。在块茎形成方面，用矮壮素处理前后，基因表达的变化趋势是一致的，但是在表达量上，处理处理组的基因表

达大幅下降，和内源赤霉素的下降表现相似，说明该赤霉素的降低深刻影响该基因的表达，该基因的表达和赤霉素的作用成正相关。

苹果酸脱氢酶(malatedehydrogenase, MDH)普遍存在于动物、植物、细菌等各种生物体中，是生物糖代谢的关键酶之一，能催化苹果酸与草酰乙酸之间的可逆转换。MDHs在细胞的多种生理活动中起着重要的作用，包括线粒体的能量代谢以及植物的活性氧代谢等[122]。苹果酸脱氢酶基因的表达在对照组和处理组上变化趋势一致，变化量比较小，而且基因表达量上，对照组大于试验组，与试验处理前后赤霉素的变化一致，另外在块茎形成初期，即5 d时，前后差异比较大，自然条件下，可能在块茎形成初期，需要大量能量供应，该基因表达量急剧上升，此时的赤霉素含量高，而处理后由于GA3变低，基因表达下降，因此赤霉素的含量与该基因的的表达成正相关。

植物体中的一些转运体对锌的调控起关键性作用，而锌指蛋白通过植物激素控制根毛细胞形成方面，也取得了新的研究进展。锌转运蛋白的研究主要集中在拟南芥，水稻，玉米等模式植物和传统植物上[123]。本研究以半夏试管块茎作为研究对象，锌转运蛋白基因在第10天的时候，对照组中表达量大于处理组，说明赤霉素对该基因的表达有一定的抑制作用，而处理组中基因表达变化不明显，可能由于赤霉素的下降导致的。

综上所述，试管半夏块茎的形成是一个复杂的生物过程，涉及众多基因的时空表达调控。本试验通过SSH技术，在转录水平上筛选了块茎形成过程中差异表达的cDNA片段。虽然这些差异cDNA片段在块茎发育过程中表达量发生变化，但是否为调控块茎的关键基因，还有待于进一步深入研究。

## 3.5 展望

本试验初步筛选了赤霉素调控相关的基因文库，由于文库比较大，找到想要的基因比较困难，检测筛选量还不够大，没能直接找出赤霉素代谢的相关基因，如GA20氧化酶基因。另外也可以通过物种序列比对，根据已知基因的相关序列设计引物，得到想要基因的部分片段或全长进行研究，然后进行后续相关研究，也是一个可行的方案。

另外块茎的形成是由一个完整的发育体系支撑的，这个过程涉及到蛋白质合成，糖类代谢等等各方面的作用。中药领域中，对半夏的研究还是比较少的，大多都是集中在对其代谢产物的研究上。而对中药育种、创新种质资源方面研究的力度还不够，大都是集中在大类作物和常见物种的研究。文库中，根据已知的检测结果，可知涉及到本物种的很多基因信息没有被用来研究，另外未知序列的研究也有待于去探究。

参考文献

[1] 连勇. 马铃薯试管薯诱导与应用[J]. 马铃薯杂志, 1995, 9(4): 237-240.

[2]薛建平，朱艳芳，张爱民等. 半夏试管块茎直接再生技术的研究[J]. 作物学报, 2004, 30(10)：1060-1064.

[3]张立明， 张文兰. 离体条件下甘薯的块根的形成[J]. 国外农学-杂粮作物, 1995(6)：52-53.

[4]杜红梅， 丁明， 唐东梅等. 香酥芋试管球茎诱导的影响因素研究[J].上海交通大学学报

（农业科学版）, 2009, 27(4): 389-393.

[5]李艳，方宏筠. 郁金香叶片直接诱导试管人工种球的快速繁殖的研究[J]. 辽宁师范大学学报, 1998, 21(2)：144-147.

[6]曹碚生，蔡权，李良俊等. 荸荠球茎离体诱导技术的研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(5)：335-336.

[7] Dodds JH, Sliva-Rodriguea D, Tovar P. Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum L.*)[J].

In: Baja YSP(ed) Biotechnology in agriculture and foredtry, 1992, 19: 91-106.

[8] Khuri S, Moorby J. Investigation into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro* [J]. *Ann Bot*, 75: 295-303.

[9] Forti E, Mandolino G, Ranalli P. In vitro tuber induction: influence of the variety and of the media [J]. Acta-Horticulturae, 1992, 300: 127-132.

[10] Naik PS, Sarkar D. Effect of potassium on potato microtuber production *in vitro*[J]. Biologia-Plantarum (Czech Republic), 1998, 41(1): 121-125.

[11] Jasik J, Mantell SH. Effects of jasmonic acid and its methylester on in vitro microtuberisation of three food yam (Dioscorea) species[J]. Plant-Cell-Reports, 2000, 19(9): 863-867.

[12] Silva JAB, Otoni WC, Martinea CA, et al. Microtuberization of Andean potato species (Solanum spp.) as affected by salinity[J]. Scientia hoticulturae, 2001, 89: 91-101.

[13] Achard P, and Genschik P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins [J] *J Exp Bot*, 60(4): 1085-1092.

[14] Ubada-Tomas S, Federici F, Casimiro I, et al. Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size [J]. *Curr Biol*, 2009, 19:1194-1199.

[15]刘梦芸， 蒙美莲， 门福义等. GA3、IAA、CTK和ABA对马铃薯块茎形成调控作用的研

究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997, 18(2):16-20.

[16]柳俊，谢从华. 马铃薯试管块茎发育机制及相关基因表达[J]. 植物学通报, 2001, 18(5)：531-535.

[17]全峰， 张爱霞， 曹先维. 植物激素在马铃薯块茎发育过程中的作用[J]. 中国马铃薯，

2002, 16(1):29-31.

[18]张志军，李会珍，姚宏亮等. 多效唑对马铃薯试管苗生长和块茎形成的影响[J]. 浙江大学学报（农业与生命科学版）, 2004, 30(3)：318-322.

[19]张志军，贾明进，李会珍等. 赤霉素对马铃薯块茎形成的影响[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(5)：295-297.

[20]薛建平， 石乐义， 张爱民等. 试管地黄诱导技术的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27（11）：

824-827.

[21] Radmacher W, Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular and biology, 2000, 51:501-503.

[22] Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez J L. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affects stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants [J]. *Plant J*, 2000, 22: 247-256.

[23] Saos-F-le-Guen, Hourmant-A, Esnault-Fand et al. In vitro bulb development of in shallot (Allium cepa L. Aggregatum Group):effects of anti-gibberellins, sucrose and light. [J]. Annals of Botany, 2002, 89(4):419-425.

[24] Dantu P. K, Bhojwani S. S. In vitro corn formation and field evaluation of corn-derived plants of Gladiolus. Scientia-Hortieulturae(Netherlands), 1995, 61(l-2):115-129.

[25] 李明军， 刘萍. 怀山药微型块茎的离体诱导植物生理学通讯, 2000, 36(1)： l41-42.

[26] 周云龙. 植物生物学（第二版）[M]. 北京： 高等教育出版社, 2004, 244-245.

[27] 潘瑞炽. 植物生理学（第六版）[M]. 北京： 高等教育出版社, 2008, 201-202.

[28] 刘洁， 李润植. 作物矮化基因与 GA 信号转导途经[J]. 中国农学通报, 2005, (1): 37-40.

[29]毛龙生，高勇，姚亚英等. pp333、B9、CCC对盆栽一串红矮化效应研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 177-179.

[30]赖钟雄，陈振光，何碧珠等. 四季桔胚培养离体种质保存研究[J]. 作物品种资源, 1997，(4)：44-46.

[31] Yamamoto T, Nakata K. Effect of CCC and BA on the formation of potato tuber in vitro [J].

日本作物学会纪事, 1997, 66(4): 663-668.

[32]陈龙清，张雨琴，袁芳亭. pp333及矮壮素对地被菊试管苗生根的影响[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(5)：425-427.

[33] Menzel C M. Tuberization in potato at high temperatures: response of physiologically young plants to disbudding and growth inhibitors [J]. Potato Research, 1985, 28:121-124.

[34]王海丽. 三叶半夏脱毒快繁及离体块茎诱导[D]. 浙江大学硕士学位论文, 2005, 15-20.

[35]吕忠恕，王保民，王邦锡. 矮壮素（CCC）对马铃薯块茎产量及同化产物分配的影响[J]. 作物学报, 1981, 7(3)：190-192.

[36]黄月琴.半夏试管小块茎的发育及其相关基因差异表达的研究[D]. 华中农业大学硕士学位论文, 2008, 33(15)：1810-1813.

[37]郭永兵，张友德. 盾叶薯裁根茎中薯孩皂苷元的分布[J]. 湖北农业科学，2002，（5）：106-107.

[38]黄先忠，蒋才富，廖立力等. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5)：499-510.

[39] Humphries E C and Dyson P W. Effects of growth regulators, CCC and B9, on some potato varieties [J]. Annual of Applied Biology, 1967, 60, (2): 333-341.

*[40]* Gifford R M and Moorby J. The effect of CCC on the initiation of potato tubers [J]. *Eur.*

*Potato J*, 1967, l0, (3): 235-238.

[41] P. C. Struik, D. Vreugdenhil, A. J. Haverkort, et al. Possible mechanisms of size hierarchy among tubers on one stem of a potato (Solanum tuberosum L.) plant [J]. Potato Research, 1991, 34(2): 187-203.

[42] Kaien Fujino, Yasunori Koda and Yoshio Kikuta. Reorientation of Cortical Microtubules in the Sub-Apical Region during Tuberization in Single-Node Stem Segments of Potato in Culture[J]. Plant and Cell Physiology, 1995, 36( 5): 891-895.

[43] J. Gopal, J. L. Minocha, H. S. Dhaliwal. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum L.*) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(10): 794-798.

[44]许智宏，李家洋.中国植物激素研究：过去、现在和未来[J]. 植物学通报, 2006, 23 （5）：

433-442.

[45] 熊国胜， 李家洋， 王永红.植物激素调控研究进展[J]. 科学通报, 2009, 54(18): 2718-2733.

[46] Odile Faivre‐Rampant, Linda Cardle, David Marshall, et al. Taylor, Changes in gene expression during meristem activation processes in Solanum tuberosum with a focus on the regulation of an auxin response factor gene [J]. Journal of Experimental Botany, 2004,

55(397): 613-622.

[47] Geigenberger P, Hajirezaei M, Geiger M, et al. Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers [J]. Planta, 1998, 205: 428-437.

[48] Park W D. Molecular appraoches to tuberization in potato. [J]. In: Vayda M. E. ed. Molecular and Cellular Biology of the Potato. Melksham: *CAB International*, 1990, 43-56.

[49]司怀军， 柳俊， 谢从华. 马铃薯class I patatin基因在试管块茎形成中的功能[J]. 作物学

报, 2006, 32(9): 1406-1409.

[50] Si Huaijun, Liu Jun, Huang Jian et al. Functional analysis of a class I patatin gene SK24-1 in

Microtuber formation of transgenic potatoes[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2008, 88(4): 593-598

[51] J. E. GRAY, S. PICTON J. J. GIOVANNONI, et al. The use of transgenic and naturally

Occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening[J]. Plant, Cell & Environment, 1994, 17(5): 557–571.

[52] Gibson S I, Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network [J].

*J Exp Bot*, 2009, 60: 253-264.

[53] Hattori T. Plant Cell Physiol, 1991, 32-79.

[54] Hawker JS. Physiol Plant 1979, 46:25.

[55] Vreugdenhil D, Kiuta Y. Reorientation in potato [J]. PotatoResearch, 1999, 42:471-481.

[56] Xingchun Gao, Wanqi Liang, Changsong Yin, et al. The SEPALLATA-like gene OsMADS34 is required for rice inflorescence and spikelet development. Plant Physiology, 2010, 153,

728-740.

[57] Santner A, Calderon-Villalobos L I A, Estelle M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 301-307.

[58] Wolters H, Jurgens G, 2009. Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet*, 10: 305-317.

[59]盛玮， 薛建平， 张爱民等. 半夏试管块茎形成过程中内源激素的变化[J]. 中国中药杂志，

2010, 35(8):943-946.

[60] 潘瑞炽， 王小菁， 李娘辉.植物生理学[M]. 2010, 179-180.

[61] Peng J Carol P, Richards D E, et al. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses [J]. *Genes Dev*. 1997, 11:3194-320.

[62] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al." Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. Nature, 1999, 400, 256-261.

[63] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, et al. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice[J]. Nature, 2002, 416: 701-702.

[64]刘永红.半夏块茎和细胞培养体系的建立及主要生物碱的代谢调控研究[D].西北农林科

技大学硕士学位论文, 2010, 2-4.

[65]李忠红，聂晶，倪坤仪等.不同产地半夏的化学成分分析及比较[J]. 分析科学学报, 2005, 219(4)：393-395.

[66]王志强， 李炳超. 半夏药理作用研究进展[J].山西医药杂志, 2009, 38(1): 65-68.

[67]王艳华. 半夏质量评价方法研究.沈阳： 沈阳药科大学博士论文, 2001。

[68]吴浩，李伟，张科卫等.半夏药材鉴别成分的研究[J].中国中药杂志, 2003, 28（9）: 836-839.

[69]刘永红， 梁宗锁， 杨东风等.半夏小块茎悬浮培养及其生物碱类化合物的测定[J]. 西北

农林科技大学学报（自然科学版）, 2009, 37(11): 168-174

[70] 陈宏. 半夏研究进展[J].现代农业科技, 2010, (5): 80-81.

[71]顾德兴， 郭巧生.半夏群体生物学特性的研究[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2)：11-16

[72]薛建平，朱艳芳，张爱民等.半夏试管块茎直接再生技术的研究[J].作物学报, 2004, 30(10)：1060-1063.

[73]常莉， 徐有明， 薛建平. 离体培养条件下半夏叶柄形成珠芽过程中内源激素的变化[J].

华中农业大学学报, 2007, 26 (5): 612-615.

[74]盛玮，薛建平，张爱民等. 半夏试管块茎形成过程中内源激素的变化[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8)：943-946.

[75]余书文， 汤张城. 植物变态器官发育的分子基础[M]. 植物生理与分子生物学, 1999，

621-626.

[76]盛玮，张爱民，黄月琴等. 半夏试管小块茎发育过程中相关基因差异表达的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3)：58-62.

[77]张爱民，卢河东，薛建平等. 宿半夏SRAP-PCR反应体系优化的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3815-3818.

[78]吴林，薛建平，徐有明等. 半夏叶片总RNA四种提取方法及效果的比较[J]. 中草药, 2008, 39(6)：901-905

[79]黄月琴，徐有明，薛建平.半夏块茎高质量总RNA提取的一种有效方法[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15)：1810-1813.

[80] Hedong Lu, Tao Xue, Aimin Zhang, et al. Construction of an SSH Library of *Pinellia ternata* under heat stress, and expression analysis of four transcripts [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31:185-194.

[81]郭朝阳， 崔婷婷， 薛建平等. 根癌农杆菌介导sHSP 基因对半夏的遗传转化[J]. 中国中

药杂志, 2012, 37(24): 3758-3762.

[82] Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, et al. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA[J]. *Nucleic Acid Res*, 1995, 23: 1087-1088.

[83] Diatchenko L, Lauy FC, Campbell AP, et al*.* Suppression subtractive hybridization: a method

For generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.

[84]顾克余，翟虎渠. 抑制性扣除杂交技术(SSH)及其在基因克隆上的研究进展[J]. 1999, (2): 13-16.

[85]罗文波， 于淑娟， 高大维. 抑制性扣除杂交技术(SSH)及其研究进展[J]. 生物技术, 2000，

10(3): 37-40.

[86]黄鑫， 戴思兰， 孟丽等. 抑制性消减杂交(SSH)技术在分离植物差异表达基因中的应用

[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 735-746.

[87] Brich PRJ, Avrova AO, Duncan JM, et al. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of hypersensitive responseto *Phytophthora* infestans [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12 (4): 356-361.

[88] Kin JY, Chuang YS, Paek KH, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization [J]. *Mol Cells*, 1999, 9(4):392- 397.

[89] Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification and transport [J]. Plant Cell, 2003, 15: 1689-1703.

[90] Bassani M, Neumann PM, Gepstein S. Differential expression profiles of growth related genes in elongation zone of maixe primary roots [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(3): 367- 380.

[91] Sylvain L, Theo H, Jean L H, et al. Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus L.* [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(27): 1-12.

[92]罗志勇， 陆秋恒， 刘水平等. 人参植物皂昔生物合成相关新基因的筛选与鉴定[J]. 生物

化学与生物物理学报, 2003, 35( 6): 554- 560.

[93] Wang ML, Hsu CM, Chang LC, et al. Gene expression profiles of cold stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(10): 1519-1528.

[94]卢河东. 高温胁迫下半夏SSH 文库的构建及倒苗相关基因的克隆[D].淮北师范大学硕

士学位论文.

[95]刘桂丰，侯英杰，王玉成等. 干旱胁迫下多枝柽柳正反向消减cDNA文库的构建[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33( 5)：1- 5.

[96] Bahn SC, Bae MS, Park YB, et al. Molecular cloning and characterization of a novel temperature - induced gene, blti2, from barley( Hordeum vulgare L.) [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1522(2): 134- 137.

[97] Savenstrand, Brosche M, Strid A, et al. Regulation of gene expression by low levels of iultraviolet B radiation in Pisumsativum: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridization [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43 (4): 402-410.

[98] Watt DA. Aluminium - responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(385): 1163-1174.

[99] Sahre T, Voigt G, Paretzke HG, et al. Caesium-affected gene expression in Arabidop sis thliana[J]. *New Phytol*, 2005, 165(3): 747-754.

[100] Zhang Y, Mian MAR, Chekhovskiy K, et al. Differential gene expression in Festuca under heat stress conditions [J]. *J Exp Bot,* 2005, 56(413): 897- 907.

[101]杨炜茹， 张彦广， 石秀霞. 矮壮素对地榆株高及内源激素含量变化的影[J]. 河北农业

大学学报, 2006, 29(1): 12-15.

[102]许智宏， 薛宏卫. 植物激素作用的分子机理[M].上海科学技术出版社, 2012, 98-123.

[103]张彦广，张启翔，杜鸿云等. 矮壮素对蓝花棘豆IAA、GA及花序生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 2006, 3(29)：16-18.

[104]马崇坚. 马铃薯试管块茎形成与内源生长物质的关系[D]. 武汉：华中农业大学园艺林学学院, 2003, 22(4)：389-394.

[105]柳俊， 谢从华. 马铃薯试管块茎发育机制及相关基因表达[J]．植物学通报, 2001, 18（5）: 31-539.

[106] Mares D J, Marschmer H, and Krauss A. Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of developing tubers of potato[J]. Physiologia Plantarum, 1981, 52: 267-274.

[107]常莉， 徐有明， 薛建平. 离体培养条件下半夏叶柄形成珠芽过程中内源激素的变化[J].

华中农业大学学报, 2007, 26(5): 612-615.

[108]黄月琴.半夏试管小块茎的发育及其相关基因差异表达的研究[D]. 华中农业大学硕士学位论文, 2008。

[109]蔡葛平，郭燕红，姚辉等. 矮壮素和赤霉素对黄芩生物量及根中黄酮类成分产量的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(07)：213-217.

[110]谢丽娟，韩蕾，李永红等. 矮壮素对盆栽黄芩的矮化效果[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(4)：92-93.

[111] Li Y Y, Wang Z H, Zhang Z. An effective method for extracting total RNA fromFagopyrum esculentum [J]. Biotechnology, 2004, 14(3): 23-24.

[112]赵双宜， 吴耀荣， 夏光敏. 介绍一种简单高效的植物总RNA提取方法[J]. 遗传, 2002，

24(3): 337- 338.

[113]顾红雅，瞿礼嘉，明小天. 植物基因与分子操作[M]. 北京：北京大学出版社, 1995, 74-92.

[114] Chang S J, Puryear J, Cainey J. A simple and efficient method for RNA isolationing from pine trees [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 113.

[115]李玉英， 王转花， 张政. 从荞麦中提取总RNA的有效方法从荞麦中提取总RNA的有

效方法[J]. 生物技术, 2004, 14(3): 23-24.

[116]张容，郑彦峰，吴瑶等. 一种简单有效的植物RNA提取方法[J]. 遗传, 2006, 28(5):583-586.

[117] Lin H, Doddapaneni H, Takahashi Y, et al. Comparative analysis of ESTs involved in grape responses to Xylella fastidiosa infection [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7(1):8.

[118]张启发， 段国录， 杨官品. 中国大麦叶绿体DNA和核糖体RNA基因限制性片段长度

多态性[J]. 遗传学报, 1992,19(2):131-139.

[119]张敏. 植物营养贮存蛋白及其生物学功能研究进展[J]. 植物学通报, 2008, 25(5)：624-630.

[120]杨学军， 喻方圆， 张欢喜. 种子贮藏蛋白质表达调控及应用研究进展[J]. 武汉植物学

研究, 2008, 26(2): 203-212.

[121]田媛，张俊平. 核糖体蛋白质的新功能及其与相关疾病的关系[J]. 生命的化学, 2011, 31(04)：488-490.

[122] 汪新颖, 王波, 侯松涛等. 苹果酸脱氢酶的结构与功能[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4):

69-72.

[123]蒲琦，李素贞，李盼. 植物锌铁转运蛋白ZIP 基因家族的研究进展[J]. 河北农业大学学报生物技术通报, 2012, 10: 15-18

### 攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文

1. 岳二魁，张爱民，薛建平等. 马齿苋组织培养技术研究[M]. 植物组织与细胞离体培养技术.北京：中国科学技术出版社, 2011: 174-177.

2. 岳二魁，张爱民，薛建平等.矮壮素(CCC)对半夏块茎诱导以及块茎产量的影响.中国中药杂志.已投（审稿中）

致 谢

时间飞快，到了即将毕业离开母校的时刻了，回想自己三年来的学习生活，可谓充实而快乐，当然也有试验失败时的不悦等等，这些都组成了生活的各个篇章，让人回味无穷。

在论文完成之际，首先要衷心感谢尊敬的导师薛建平教授对学生的关爱与培养。本论文是在薛老师的指导下才完成的，无论在论文的选题、开题、试验过程和论文撰写等方面都给予了耐心细致的指导和帮助。三年的研究生学习生活中，导师对工作保有的热情和对科学的不断的追求，时刻不忘在科研上与时俱进，并且时刻熏陶和激励着学生前进。不曾忘记导师在生活上对学生的关心与爱护，深深记得每一次遇到问题时，导师的循循善诱，可以说没有导师的教诲，一切也就无从谈起了。同时师母张爱民老师在日常生活中也给予学生无微不至的关怀，再此即将毕业之际，再次向敬爱的导师说声：您辛苦了！

论文试验过程中，盛玮老师、高翔老师、宋运贤老师、李进步老师、朱艳芳老师都给予热情指导和无私帮助，在此表示由衷的感谢！

感谢师兄李国兴，陶兴魁、薛涛、卢河东、滕井通；师姐李佳娣、毛春娜，虽然他们已经毕业，但是对我的帮助我也不会忘怀；感谢同窗郭朝阳，崔婷婷、付士龙、周济源等；师妹雷婷、黄铭美以及和实验室其他成员在试验中给予的帮助和支持，我们如同一个大家庭一样，互帮互助和理解。因为你们，紧张的学习和试验不再变得乏味无趣；感谢室友苏根强，刘长洲、张停停的陪伴，谢谢你们陪我度过愉快而充实的研究生生活。

我深深地爱着我的父亲母亲，对于他们，是作儿女的一辈子也还不完的养育恩情！感谢家人对我的支持与理解；感谢我爱的人以及爱我的人，谢谢你们，是你们共同铸就了我安静温馨的港湾，也是我永远不断前进的动力之源。

毕业在即，我衷心祝愿家人健康平安，祝老师们工作顺心如意，祝师兄师姐事业有成，祝师弟师妹学业有成，祝福母校的未来更加美好！