分类号： 学校代码：10373

密 级： 学 号：11015071105



**硕士学位论文**

**题** **目：半夏重要功能基因遗传转化体系的建立**

**论文作者：**  **郭** 朝 阳

**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

半夏重要功能基因遗传转化体系的建立

郭朝阳（植物学）

摘要

半夏*Pinellia ternata*(Thunb.) Briet.为天南星科半夏属多年生宿根草本植物，以块茎入药，首载于《神农本草经》，是一种重要的中药材。半夏在生产栽培上存在一系列问题，例如在气温高于30℃时半夏地上部分随即枯萎，俗称“倒苗”。倒苗缩短了半夏的生长期，严重影响了半夏的产量。在生产技术上，筛选出与半夏栽培问题相关的基因，如抗高温、抗旱、抗虫、抗除草剂基因等，通过农杆菌介导的转基因技术，将相关基因导入半夏植株内，并培育出具有相应抗性的半夏苗，从而解决当前半夏资源短缺和品质低的问题。转基因技术以目的性强、周期短等优点为半夏优良品种的选育开辟了一条新途径。同时，对半夏的长期研究可知，半夏中也含有一些重要的功能基因，如抗高温倒伏基因、半夏凝集素基因等，可将这些新型基因转入烟草等其他模式植物中，验证其基因功能，为分子育种和品种创新提供基因资源。目前，关于半夏转基因技术体系报道较少，而开展转基因研究的前提是首先建立高效的遗传转化体系，国内对半夏的研究，多以叶片、叶柄和块茎作为研究对象。

本课题利用植物组织培养技术和现代分子生物学的知识及手段，建立高效的半夏遗传转化再生体系，根据当前的情况筛选出一些重要的功能基因，并通过根癌农杆菌介导法法及 PCR 等手段，获得具有相应抗性的半夏的转基因试管苗，并验证其基因的功能。主要研究结果如下：

（1）培育出优质的半夏试管苗，建立高效的半夏遗传转化再生体系。半夏叶柄及块茎再生体系的研究已非常成熟，而叶片再生体系的建立至今研究却很少，所以本实验再生体系的研究主要针对的是叶片。叶片在培养20 d后，在6-BA浓度为1.5 mg·L -1, IAA浓度为1.5 mg·L -1, TDZ浓度为0.5 mg·L -1这个梯度的半夏叶片再生形成试管小块茎的能力最强。此外研究表明，叶片的面积较大，比较容易侵染；而叶柄和块茎再生能力则较强、较快，所以应根据实际情况分别进行。

（2）选取对半夏生长具有重要作用的高温基因，如小热激蛋白基因（*sHSP*），作为本试验的目的基因。

（3）构建载体并与目的基因进行体外重组。构建载体的时候，通常应有筛选基因和报告基因的存在，以便于操作。此外还应含有35S强启动子，以利于目的基因的顺利表达。本实验所用的载体为PBI121，含有Kan抗性基因和*gus*报告基因。利用软件Primer Premier 5分析目的基因*sHSP*，发现*sHSP*适合的酶切位点为BamH1GGATCC或者Xba1TCTAGA。分别用限制性内切酶BamH1或Xba1与*sHSP*和载体质粒同时进行酶切反应，酶切液分别混合后加入T4连接酶继续反应。将最终的产物PCR并电泳或者生工测序，构建出我们需要的pBI121-*sHSP*重组质粒。

（4）由于根癌农杆菌EHA105利于单子叶植株的转化，将重组质粒导入EHA105

中，然后通过抗性筛选、PCR、生工测序等手段筛选出含有相应目的质粒的菌株。本实验以半夏叶柄作为研究模型，不经过预培养阶段，功率50HZ超声波辅助处理5 min，直接用浓度*A*600 nm＝0.5-0.6的根癌农杆菌菌液同时含AS 40-80 mg·L -1侵染半夏叶柄10-15 min后共培养3-4 d，然后将叶柄接到含有100 mg·L -1 Kan和350 mg·L -1 Carb的分化培养基上进行筛选培养，25 d左右在叶柄的两端可分化出抗性的试管小块茎。试管块茎在分化培养基中10 d左右就可以生根，20 d后长成健壮的小苗。对抗性转化苗进行*gus*染色和PCR检测，结果表明外源基因*sHSP*已经整合到半夏基因组中。

关键词：半夏；农杆菌介导； EHA105； PBI121； *sHSP*；遗传转化；再生植株

**Establishment of genetic transformation system of important functional genes of *Pinellia ternata***

**GUO Zhao-yang Abstract**

*Pinellia ternata* (Thunb.) Briet. is a perennial herb, the first recorded in Shennong's Herbal with tubers as medicine and was an important medicinal herb. *P. ternata* has a series of problems in the production and cultivation, for example, When the temperature is

Higher than 30℃, the aerial parts will wither, commonly known as the" sprout tumble".

And growth period of *P. ternata* will be decreased, thus influence its production by the sprout tumble. In the technology of production, screening genes associated with cultivation problems of *P. ternata*, such as the high-temperature resistance、the drought resistance、the

Insect resistance and the herbicide resistance genes and so on, through the transgenic

Technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, to transfer the related genes into *P.*

*Ternata*, and produced the corresponding resistance plantlets, so as to solve the problem of shortage of resources and low quality of *P. ternata* . Transgenic technology opened up a new way for the breeding of fine species of *P. ternata* to take advantage of strong purpose,

Short cycle, etc.. Meanwhile, long-term research to *P. ternata* showed that, it also contained some important functional gene, such as the high-temperature resistance gene, the lectin gene of *P. ternata* and so forth, these new genes could be transferred into tobacco and other model plants, to validate their functions, and provided gene resources for the creation of new plant species. At present, the reports about transgenic technology system of *P. ternata* was few, while the premise to carry out transgenic research was the establishment of the

Efficient genetic transformation system, and domestic research on tissue culture of *P. ternata* usually takes the leaves、petioles and tubers as the object of study。

This subject takes use of the knowledge and techniques of plant tissue culture and modern molecular biology, to establish the efficient genetic transformation regeneration system of *P. ternata*, according to the current situation to filter out some important functional genes, and obtain the corresponding resistance transgenic plantlets of *P. ternata* by means of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method and PCR, then verify the role of the functional genes. The main findings are as follows:

(1) The high quality test-tube plantlets were breeded to filter out the fast and efficient genetic transformation regeneration system. The regeneration system of petioles and tubers of *P. ternata* were very mature, but the establishment of regeneration system of leaves had been little research so far, so this experiment of regeneration system was aimed to the leaf

Blade. After cultivation 20 days, when the 6-BA is 1.5 mg•L-1、the IAA is 1.5 mg•L-1and the

TDZ is 0.5 mg•L-1, the strongest regeneration form into test tube tubers is leaf blade. In addition, studies have shown that the area of blade is larger, and it relatively easy to infect; while the capacity of regeneration of petioles and tubers is quicker and stronger, so it should be based on the actual situation.

(2) The high temperature genes of *sHSP*, which influence the growth of *P. ternata* was selected as the target gene.

(3) The carrier was built and the reconstitution of target gene in vitro. The blotting gene and reporter gene should normally be existence in order to be easy to operate. It should also contain strong 35S promoter, so as to the successfully expression of the target gene. This experiment have used the carrier of PBI121, it contained kan resistance gene and the *gus* reporter gene. The software Primer Premier5 had been used to analyse the target gene *sHSP*, it had found the suitable restriction sites of BamH1GGATCC or Xba1TCTAGA. The restriction endonuclease of BamH1 or Xba1 were simultaneously used into digestion reaction with plasmid vector, and the reaction was continued after the T4 ligase was added into the mixed digested solution. The final products were PCR and electrophoresis or sequenced, thus the recombinant plasmid of pBI121-*sHSP* was

constructed。

(4) Due to the *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 was beneficial for transformation of the monocot plants, the recombinant plasmid was introduced into EHA105, then the strains contained the appropriate target plasmid were screened by means of resistance screening, PCR, or sequenced. This experiment was used the petiole of *P. ternata* as an explant, without pre-incubation stage, using the concentration *A600*nm=0.5-0.6 directly and co-cultivation 3-4 days after 10-15 minutes'infection of the bacteria liquid at the

Concentration of AS 40-80 mg·L -1, to delay 7 d after co-cultivation, then put the petioles

Into the differentiation medium contained 150 mg·L -1 Kan and 350 mg·L -1 Carb to select and after approximate 25 days, the globular process will appear by differentiation at both sides of the petioles. The globular process could root after about 10 days incubation in the differentiation medium and 20 days later the robust plants could grow out. The gus staining

And PCR verification of the regenerated plants proved that the exogenous gene of *sHSP* has been successfully integrated into the genome of *P. ternata*。

**Key Words:**; *Pinellia; Ternata*; Mediated; By *Agrobacterium tumefaciens*; EHA105; PBI121; *SHSP*; Genetic transformation; Plant regeneration

**缩略语表**

**Abbreviations**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **简写符号** | **英文全称** | **中文全称** |
| **Amp** | **Ampicillin** | **氨苄青霉素** |
| **AS** | **Acetosyringone** | **乙酰丁香酮** |
| **BA** | **Benzyladenine** | **苄基腺嘌呤** |
| **cDNA** | **Complementary DNA** | **互补 DNA** |
| **Carb** | **Carbenicillin** | **羧苄青霉素** |
| **DEPC** | **DiEthyPyroCarbonate** | **焦碳酸二乙酯** |
| **DNA** | **Deoxyribonucleic acid** | **脱氧核糖核酸** |
| **EDTA** | **Ethylenediaminetetraacetic acid** | **乙二胺四乙酸** |
| **gus** | [**β-glucuronidase**](http://dict.cnki.net/dict_result.aspx?searchword=%ce%b2%e8%91%a1%e8%90%84%e7%b3%96%e8%8b%b7%e9%85%b8%e9%85%b6&amp;tjType=sentence&amp;style&amp;t=%ce%b2-glucuronidase) | **β-葡萄糖苷酸酶** |
| **Kan** | **Kanamycin** | **卡那霉素** |
| **IAA** | **Indole acetic acid** | **吲哚乙酸** |
| **IPTG** | **Isopropylthio-β-D-galactoside** | **异丙基硫代-β-D-半乳糖苷** |
| **LB** | **Luria-Bertani** | **LB 培养基** |
| **mRNA** | **Messenger ribonoucleic acid** | **信使核糖核酸** |
| **MS** | **Murashige and Skoog** | **MS 基本培养基** |
| **NCBI** | **National Center for Biotechnology Infor**  **mation** | **美国国立生物技术信息中**  **心** |
| **PCR** | **Polymerase Chain Reaction** | **聚合酶链式反应** |
| **RNA** | **Ribonucleic acid** | **核糖核酸** |
| **TDZ** | **Thidiazuron** | **苯基噻二唑基脲** |
| **X-gal** | **5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactocide** | **5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳**  **糖苷** |
| **X-gluc** | **5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide** | [**5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-葡**](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_CN_CB3683828.htm)  [**糖苷酸环己胺盐**](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_CN_CB3683828.htm) |
| **YEB** | **Yeast Extract and Beef extract Medium** | **YEB 培养基** |

目 录

[摘要](#_Toc686202379) 2

**[Abbreviations](#_Toc686202380)** 2

[第一章 绪论](#_Toc686202381) 7

**[1.1](#_Toc686202382)** [半夏组织培养研究进展](#_Toc686202382) 7

**[1.1.1](#_Toc686202383)** [半夏的快速繁殖](#_Toc686202383) 7

**[1.1.2](#_Toc686202384)** [半夏的遗传转化体系](#_Toc686202384) 7

**[1.2](#_Toc686202385)** [根癌农杆菌介导单子叶植物遗传转化的研究进展](#_Toc686202385) 7

**[1.2.1](#_Toc686202386)** [单子叶植物能被根癌农杆菌成功转化的原因](#_Toc686202386) 7

**[1.2.2](#_Toc686202387)** [影响根癌农杆菌转化半夏效率的因素](#_Toc686202387) 8

**[1.3](#_Toc686202388)** [热激蛋白研究进展](#_Toc686202388) 8

**[1.3.1](#_Toc686202389)** [热激蛋白](#_Toc686202389) 8

**[1.3.2](#_Toc686202390)** [热激蛋白的产](#_Toc686202390)**[Th](#_Toc686202390)** 8

**[1.3.3](#_Toc686202391)** [热激蛋白的特点](#_Toc686202391) 8

**[1.4](#_Toc686202392)** [本研究的目的和意义](#_Toc686202392) 8

[第二章 半夏叶片再Th体系的建立及优化](#_Toc686202393) 9

**[2.1](#_Toc686202394)** [材料与方法](#_Toc686202394) 9

**[2.1.1](#_Toc686202395)** [材料](#_Toc686202395) 9

**[2.1.2](#_Toc686202396)** [方法](#_Toc686202396) 9

**[2.2](#_Toc686202397)** [结果与分析](#_Toc686202397) 10

**[2.2.1](#_Toc686202398)** [半夏试管块茎的诱导](#_Toc686202398) 10

**[2.2.2](#_Toc686202399)** [数据处理](#_Toc686202399) 10

**[2.2.3](#_Toc686202400)** [半夏叶片在不同培养基中的再Th频率分析](#_Toc686202400) 14

**[2.3](#_Toc686202401)** [讨论](#_Toc686202401) 16

**[2.3.1](#_Toc686202402)****[6-BA](#_Toc686202402)**[对半夏叶片再](#_Toc686202402)**[Th](#_Toc686202402)**[的影响](#_Toc686202402) 16

**[2.3.2](#_Toc686202403)****[IAA](#_Toc686202403)**[对半夏叶片再](#_Toc686202403)**[Th](#_Toc686202403)**[的影响](#_Toc686202403) 16

**[2.3.3](#_Toc686202404)****[TDZ](#_Toc686202404)**[对半夏叶片再](#_Toc686202404)**[Th](#_Toc686202404)**[的影响](#_Toc686202404) 16

**[2.3.4](#_Toc686202405)** [三种植物](#_Toc686202405)**[Th](#_Toc686202405)**[长物质对半夏叶片再](#_Toc686202405)**[Th](#_Toc686202405)**[的诱导](#_Toc686202405) 16

[2.4 小结与展望](#_Toc686202406) 16

[第三章 半夏遗传转化体系中](#_Toc686202407)**[Kan](#_Toc686202407)**[选择压的确定](#_Toc686202407) 16

**[3.1](#_Toc686202408)** [材料与方法](#_Toc686202408) 16

**[3.1.1](#_Toc686202409)** [材料](#_Toc686202409) 16

**[3.1.2](#_Toc686202410)** [方法](#_Toc686202410) 16

[3.2 结果与分析](#_Toc686202411) 17

**[3.2.1](#_Toc686202412)****[Kan](#_Toc686202412)**[胁迫对半夏叶柄存活率的影响](#_Toc686202412) 17

**[3.2.2](#_Toc686202413)****[Kan](#_Toc686202413)**[胁迫对半夏叶柄受害指数的影响](#_Toc686202413) 17

**[3.2.3](#_Toc686202414)****[Kan](#_Toc686202414)**[胁迫不同时间对半夏叶柄再](#_Toc686202414)**[Th](#_Toc686202414)**[率的影响](#_Toc686202414) 18

**[3.3](#_Toc686202415)** [讨论](#_Toc686202415) 19

[第四章 不同条件对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202416)**[EHA105](#_Toc686202416)** [Th长的影响](#_Toc686202416) 20

**[4.1](#_Toc686202417)** [材料和方法](#_Toc686202417) 20

**[4.1.1](#_Toc686202418)** [材料](#_Toc686202418) 20

**[4.1.2](#_Toc686202419)** [方法](#_Toc686202419) 20

**[4.2](#_Toc686202420)** [结果与分析](#_Toc686202420) 22

**[4.2.1](#_Toc686202421)** [不同条件培养对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202421)**[EHA105 Th](#_Toc686202421)**[长的影响](#_Toc686202421) 22

**[4.2.2](#_Toc686202422)** [正交数据的极差分析](#_Toc686202422) 28

**[4.2.3](#_Toc686202423)** [方差分析](#_Toc686202423) 28

**[4.3](#_Toc686202424)** [讨论](#_Toc686202424) 29

**[4.3.1](#_Toc686202425)** [不同温度对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202425)**[EHA105 Th](#_Toc686202425)**[长的影响](#_Toc686202425) 30

**[4.3.2](#_Toc686202426)** [不同培养时间对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202426)**[EHA105 Th](#_Toc686202426)**[长的的影响](#_Toc686202426) 30

**[4.3.3](#_Toc686202427)** [不同浓度](#_Toc686202427)**[Kan](#_Toc686202427)**[对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202427)**[EHA105 Th](#_Toc686202427)**[长的影响](#_Toc686202427) 30

**[4.3.4](#_Toc686202428)** [不同条件对抗性根癌农杆菌](#_Toc686202428)**[EHA105 Th](#_Toc686202428)**[长的影响](#_Toc686202428) 30

**[4.4](#_Toc686202429)** [小结](#_Toc686202429) 30

[第五章 乙酰丁香酮对半夏遗传转化体系建立的影响](#_Toc686202430) 30

**[5.1](#_Toc686202431)** [材料与方法](#_Toc686202431) 30

**[5.1.1](#_Toc686202432)** [材料](#_Toc686202432) 30

**[5.1.2](#_Toc686202433)** [主要仪器与试剂](#_Toc686202433) 30

**[5.1.3](#_Toc686202434)** [实验方法](#_Toc686202434) 30

[5.1.4](#_Toc686202435) **[Kan、Rif](#_Toc686202435)**[、Carb、AS在试验中作用](#_Toc686202435)[[111]](#_Toc686202435) 31

**[5.2](#_Toc686202436)** [结果与分析](#_Toc686202436) 31

**[5.2.1](#_Toc686202437)** [数据分析](#_Toc686202437) 31

**[5.2.2](#_Toc686202438)** [不同浓度的](#_Toc686202438)**[AS](#_Toc686202438)**[对](#_Toc686202438)***[gus](#_Toc686202438)***[瞬时表达的影响](#_Toc686202438) 31

**[5.3](#_Toc686202439)** [讨论](#_Toc686202439) 32

**[5.3.1](#_Toc686202440)****[AS](#_Toc686202440)**[浓度对农杆菌侵染半夏叶柄的影响](#_Toc686202440) 32

**[5.3.2](#_Toc686202441)****[Kan、Rif、Carb](#_Toc686202441)**[三者对半夏叶柄](#_Toc686202441)**[Th](#_Toc686202441)**[长的影响](#_Toc686202441) 32

**[5.3.3](#_Toc686202442)** [最佳的](#_Toc686202442)**[AS](#_Toc686202442)**[浓度](#_Toc686202442) 32

**[5.4](#_Toc686202443)** [小结](#_Toc686202443) 32

[第六章 半夏遗传转化体系中超声波辅助处理对瞬时表](#_Toc686202444) 32

**[6.1](#_Toc686202445)** [材料与方法](#_Toc686202445) 32

**[6.1.1](#_Toc686202446)** [试验材料](#_Toc686202446) 32

**[6.1.2](#_Toc686202447)** [试验方法](#_Toc686202447) 32

[6.2 结果与分析](#_Toc686202448) 32

[6.2.1 数据分析](#_Toc686202449) 32

**[6.2.2](#_Toc686202450)** [半夏叶柄经不同时间超声波辅助处理后](#_Toc686202450)***[gus](#_Toc686202450)***[的瞬时表达率](#_Toc686202450) 33

**[6.3](#_Toc686202451)** [讨论](#_Toc686202451) 34

**[6.3.1](#_Toc686202452)** [超声波的](#_Toc686202452)**[Th](#_Toc686202452)**[物学效应](#_Toc686202452) 34

**[6.3.2](#_Toc686202453)** [辅助处理的最佳时间](#_Toc686202453) 34

**[6.3.3](#_Toc686202454)*****[gus](#_Toc686202454)***[活性组织化学染色检测对植物基因工程发展的作用](#_Toc686202454) 34

**[6.4](#_Toc686202455)** [小结](#_Toc686202455) 34

[第七章 根癌农杆菌的感染浓度及时间对半夏叶柄转化效率的影响](#_Toc686202456) 34

**[7.1](#_Toc686202457)** [主要仪器与试剂](#_Toc686202457) 34

**[7.1.1](#_Toc686202458)** [仪器](#_Toc686202458) 34

**[7.1.2](#_Toc686202459)** [试剂](#_Toc686202459) 34

[7.1.3](#_Toc686202460) ***[gus](#_Toc686202460)***[染色液的配制：](#_Toc686202460) 34

**[7.2](#_Toc686202461)** [材料与方法](#_Toc686202461) 34

**[7.2.1](#_Toc686202462)** [材料](#_Toc686202462) 34

**[7.2.2](#_Toc686202463)** [培养基](#_Toc686202463) 34

**[7.2.3](#_Toc686202464)** [方法](#_Toc686202464) 34

**[7.2.4](#_Toc686202465)** [部分试剂](#_Toc686202465)**[(Kan](#_Toc686202465)**[、](#_Toc686202465)**[Rif、Carb](#_Toc686202465)**[、AS)在试验中作用](#_Toc686202465) 34

**[7.2.5](#_Toc686202466)** [数据统计分析](#_Toc686202466) 34

**[7.3](#_Toc686202467)** [结果与分析](#_Toc686202467) 34

**[7.3.1](#_Toc686202468)** [不同侵染时间对半夏叶柄转化率的影响](#_Toc686202468) 34

**[7.3.2](#_Toc686202469)** [不同侵染浓度对半夏叶柄瞬时表达率的影响](#_Toc686202469) 35

**[7.3.3](#_Toc686202470)** [不同的侵染浓度及时间对半夏叶柄](#_Toc686202470)***[gus](#_Toc686202470)***[瞬时表达率的影响](#_Toc686202470) 35

**[7.4](#_Toc686202471)** [.讨论](#_Toc686202471) 39

**[7.4.1](#_Toc686202472)** [不同侵染时间对半夏叶柄转化率的影响](#_Toc686202472) 39

**[7.4.2](#_Toc686202473)** [不同浓度的农杆菌对半夏叶柄瞬时表达率的影响](#_Toc686202473) 39

**[7.4.3](#_Toc686202474)** [根癌农杆菌的感染浓度及时间对半夏叶柄遗传转化率的影响](#_Toc686202474) 39

[7.5 小结与展望](#_Toc686202475) 39

[第八章 半夏遗传转化体系中预培养和共培养时间对叶柄转化效率的影响](#_Toc686202476) 39

**[8.1](#_Toc686202477)** [材料与方法](#_Toc686202477) 39

**[8.1.1](#_Toc686202478)** [材料](#_Toc686202478) 39

**[8.1.2](#_Toc686202479)** [方法](#_Toc686202479) 39

**[8.1.3](#_Toc686202480)** [数据统计分析](#_Toc686202480) 39

**[8.2](#_Toc686202481)** [.结果与结论](#_Toc686202481) 39

**[8.2.1](#_Toc686202482)** [预培养时间对半夏遗传转化效率的影响](#_Toc686202482) 39

**[8.2.2](#_Toc686202483)** [共培养时间对半夏遗传转化效率的影响](#_Toc686202483) 40

**[8.3](#_Toc686202484)** [讨论](#_Toc686202484) 40

[第九章 根癌农杆菌介导](#_Toc686202485)***[sHSP](#_Toc686202485)***[基因对半夏的遗传转化](#_Toc686202485) 40

**[9.1](#_Toc686202486)** [材料与方法](#_Toc686202486) 40

**[9.1.1](#_Toc686202487)** [材料](#_Toc686202487) 40

**[9.1.2](#_Toc686202488)** [仪器与设备](#_Toc686202488) 40

**[9.1.3](#_Toc686202489)** [试剂及工具酶](#_Toc686202489) 41

**[9.1.4](#_Toc686202490)** [方法](#_Toc686202490) 41

**[9.2](#_Toc686202491)** [结果与分析](#_Toc686202491) 43

**[9.2.1](#_Toc686202492)** [转化植株的获得](#_Toc686202492) 43

**[9.2.2](#_Toc686202493)** [转化植株的](#_Toc686202493)**[PCR](#_Toc686202493)**[检测](#_Toc686202493) 43

**[9.3](#_Toc686202494)** [讨论](#_Toc686202494) 43

[参考文献](#_Toc686202495) 43

[攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文](#_Toc686202496) 47

# 第一章 绪论

半夏（*Pinellia ternata* Briet.）属天南星科半夏属多年生草本植物，广泛分布于我国长江流域以及东北华北等地区。作为重要的传统中药材，其块茎入药，具有润燥化痰、降逆、止呕等功效，在196个处方中出现频率居于第22位[1]。近年来，又有半夏抗肿瘤、抗早孕的报道。另外，半夏蛋白有一定的毒性，还可对其有毒成分作进一步的研究，根据―以毒攻毒‖的 思路，开发一些生物杀虫剂。

半夏是一种浅根性作物，其生活习性特殊，忌旱怕涝，耐阴惧晒。在夏至期间，由于光照剧烈，温度升高，半夏的叶片、叶柄等部分枯萎，俗称“倒苗”[2]。半夏最适生长温度为16-25℃，当温度在26℃以上时生长缓慢，当日极端温度在30℃以上时发生倒苗[3]。半夏每年有2~3次出苗与倒苗现象[4]，但倒苗并不是半夏生长过程中必需的生理过程，而是作为其抵御不良生存环境的一种生存方式。对半夏而言，倒苗虽然有利于半夏在逆境时保存生命，但过早的“倒苗”使半夏的生长期明显缩短，在半夏生产方面会严重影响和制约半夏的产量。因而在半夏生产中，防倒苗是一项非常重要的增产技术[5, 6, 7]。目前关于半夏倒苗的研究虽然已有报道，但大多是从栽培措施、生活习性方面，少数从生理生化方面对其研究。在栽培措施上，潘炳文[8]和刘启先等[9]在夏季用麦秸（糠）覆盖半夏地畦面，可以减少半夏倒苗。在栽培过程中喷施植物呼吸抑制剂亚硫酸钠和植物生长调节剂水杨酸溶液，可以延迟和减少半夏倒苗[5, 7]。薛建平等[5, 10]探讨了在高温胁迫下半夏倒苗前后保护酶活力、内源激素和光合特性等内在生理生化的机理，为防止半夏倒苗提供了一定的信息。但到目前为止，通过基因手段来预防半夏倒苗的研究未见报道。

## **1.1** 半夏组织培养研究进展

### **1.1.1** 半夏的快速繁殖

半夏的快速繁殖，是进行一切半夏研究的物质基础。对半夏快繁工作的研究，最早运用的是以半夏的叶片和叶柄为外植体[11]，通过先诱导形成愈伤，再获得完整的植株。随着培养基的不同，半夏不同组织的分化能力有所差异，通常情况下叶片比较容易先诱导成愈伤组织然后成苗，而叶柄则直接成苗的能力较强[12, 13]。薛建平[14]等人的研究发现，叶片直接诱导形成块茎的最适培养基为MS附加0.5 mg·L -16-BA、0.5 mg·L -1 IAA和3%蔗糖；而叶柄直接诱导形成块茎的适宜培养基为MS附加0.5 mg·L -16-BA、0.5 mg·L -1 IAA、5%蔗糖和MS附加0.5 mg·L -1 6-BA、0.5 mg·L -1 IAA、3%葡萄糖；叶柄的长度以1.5 cm左右为宜，接种方式以平放为最佳。罗成科等[15]在MS+0.5 mg·L -12, 4- D+1.0 mg·L -1KT的培养基上，以半夏的叶片做为材料，先经过愈伤组织阶段，3个月左右可得到再生植株；而在MS+0.5 mg·L -1NAA +0.5 mg·L -1BA的培养基上，2个月后就可直接发育形成完整植株，且分化的块茎数较多。在对贵州珍珠半夏的研究中发现[16]，叶柄为植株直接再生的最佳外植体；叶片由于周期较长、不定

芽再生率较低而次之；珠芽较易不经过中间阶段直接再生成完整的植株[17]；同时还发现，最有利于植株再生的外植体的生长周期为20 d左右。

### **1.1.2** 半夏的遗传转化体系

通过外植体由器官发生途径或通过试管苗由细胞发生途径都可以建立半夏遗传转化再生体系[18]，但通常情况下，经外植体的途径会导致外来菌种的污染或在外植体消毒过程中升汞带来的伤害，因此，一般采用试管苗来建立半夏的遗传转化再生体系，避免一些不必要的影响。

半夏遗传转化体系方面的报道很少，贾永芳[19]以半夏的叶柄和愈伤组织作为转化受体，对农杆菌介导的半夏遗传转化体系进行了初步研究，研究了外植体预培养及共培养时间、菌液浓度、侵染的时间、外源乙酰丁香酮（AS）的浓度、超声波辅助处理等因素对gus报告基因瞬时表达效率的影响，选取最佳的组合对叶柄及愈伤组织进行遗传转化，虽然获得了gus染色呈阳性的抗性愈伤，但最终没有获得完整的转基因半夏植株。王新颖[20]在此基础上，以无菌试管半夏苗的叶柄为实验材料，对半夏遗传转化体系及其相关影响因素进行了进一步的研究。通过对半夏叶柄进行外源基因的遗传转化，最终获得了5株抗性植株，对这些抗性植株运用生理生化及分子生物学手段进行检测，结果初步证明外源基因已经整合到半夏基因组中。此外，近年来，人们尝试从半夏愈伤组织建立起的悬浮培养体系入手，将细胞悬浮液过滤得到的小细胞团接种于分化培养基上，细胞团经一段时间的培养可以分化出小植株，来研究半夏的遗传转化体系，至今还没有成功的报道。

## **1.2** 根癌农杆菌介导单子叶植物遗传转化的研究进展

植物遗传转化的方法很多，常用的有电转化、基因枪转化、农杆菌介导转化等。由于技术水平、科研环境等各种条件的限制，人们趋于采用简单、快捷、方便、有效同时价格合理的方法来研究植物的转基因过程。而作为一种自然界中存在的遗传转化系统，根癌农杆菌介导法的优点倍受重视。从结果来看，其转化的外源DNA片段结构完整，整合位点稳定，拷贝数低，机理清楚，筛选简易，且可转化较大的片断，外源基因的变异较小[21, 22]。由于和双子叶植物在生理和结构上的不同，单子叶植物很难被农杆菌所侵染。然而，随着人们对转化机理的了解以及方法的不断改进，农杆菌介导法已在多种单子叶植物尤其是禾本科植物中获得了成功[23]。

1996年，Ishida等[24]首次报道了农杆菌转化玉米成熟胚的方法，证明了外源基因的整合、表达及稳定的遗传。Cheng等[25]于1997打破了十几年的沉默，首次获得农杆菌介导的转基因小麦。通过农杆菌介导法对3种基因型的小麦进行遗传转化研究，我国的夏光敏等[26]经一系列的分子生物学手段最终获得了转基因植株。贾永芳[19]以半夏的叶柄和愈伤组织作为转化材料，首次获得了*gus*染色呈阳性的抗性愈伤组织。王新颖[20]在此基础上，以无菌试管半夏苗的叶柄为实验材料，成功获得了含有*ipt*基因的转基因半夏植株。农杆菌介导转化法在药用植物新品质的改良上得到了大幅度的进展，获得了大量新的种质资源。

### **1.2.1** 单子叶植物能被根癌农杆菌成功转化的原因

单子叶植物之所以能像双子叶植物一样被根癌农杆菌成功转化，与其转化过程中各种条件的优化及转化方法的改进息息相关。根癌农杆菌介导法转化的主要过程包括[27]：

（l）根癌农杆菌在植物敏感细胞上的吸附；

（2）Ti质粒上与目的基因（T-DNA）转移相关的Vir区基因被激活；

（3）T-DNA的切割和T-DNA复合物的形成；(4) T-DNA复合物经农杆菌介导进入植物细胞；(5) T-DNA与植物基因组整合并进行相关表达。

单子叶植物被成功转化，与农杆菌的种类及多种因素息息相关。仅仅从转化的过程来看，其关键的问题在于：单子叶植物能否释放出酚类化合物信号分子促进农杆菌对植物细胞的吸附、激活vir区基因以及T-DNA能否与植物基因组DNA进行整合等。

#### **1.2.1.1** 农杆菌在植物敏感细胞上的吸附

不同来源、不同部位、不同发育状态的受体细胞都会对农杆菌的侵染产生很大影响[28]。由于单子叶植物细胞壁果胶多糖的高度酯化，一度被认为缺乏农杆菌的附着位点，但是，一系列的研究表明，很多单子叶植物也都可以被农杆菌所吸附。此外，农杆菌的菌株类型（如

EHA105）、处于适当组织年龄和生理状态下的分生细胞及具有一定的细胞壁结构的细胞都有可能是成功吸附的关健[29]。

一般认为，吸附到植物组织或细胞表面的农杆菌越多，植物被转化的机率也就越大。双子植物的外植体细胞在受到伤害时会释放一系列的酚类化合物，此类化合物可提高农杆菌对受损细胞的附着及其转化效率，而单子叶植物则没有释放或释放的化合物较少，致使很难被农杆菌侵染。研究发现，在共培养基中加入表面活性剂[25]并作负压处理[30]，可大幅度提高农杆菌的吸附及遗传转化效率。此外，乙酰丁香酮（AS）等多种外源酚类化合物以及冠瘿碱和精氨酸类物质的添加也可促进根癌农杆菌对多种单子叶植物培养细胞及幼苗的吸附[22, 29, 31]。

#### **1.2.1.2** 外源诱导因子对***vir***基因的活化

通过对多种外源物质[32]的研究发现，AS和羟基乙酰丁香酮(Hydroxyacetosyringone, OH-AS)对Vir基因的诱导效果较明显。随后，儿茶酚、邻苯二酚、没食子酸等一些植物中常见的酚类化合物的混合物[33]以及葡萄糖等一些单糖[25, 34, 35]都被证明可激活*vir*基因。这些诱导物都来自于植物损伤细胞为抵御微生物的侵染或增强自身细胞壁而合成，它们既可作为农杆菌的趋化物，又可作为*vir*基因的诱导物，且与T-DNA的转移和整合有关[36]。

此外，适宜的培养温度(22-25℃)以及诱导培养基的pH值等也是*vir*基因诱导所必需的。温度和pH在植物细胞中作为一种生理活动的信号分子[37]，参与了T-DNA的转移过程，且当

pH值改变0.3时，对多种植物的转化效率具有明显的影响。一般情况下，培养根癌农杆菌的适宜pH值为6.8-7.0，这时农杆菌生长旺盛，vir基因处于不活化状态，而随着共培养的进行，培养基的pH变为5.8-6.0，因而有利于vir基因的活化。

#### **1.2.1.3** **T-DNA**与宿主细胞基因组的整合

一系列单子叶植物遗传转化获得完整转基因植株的例子，表明了T-DNA在单子叶植物基因组中的整合成为可能。但是，越来越多的研究表明，T-DNA与宿主基因组的成功整合，仍是单子叶植物遗传转化的障碍因素之一[38]。

研究表明，在DNA合成[39]及DNA修复[40]过程中，植物细胞的基因组为外源基因的成功整合提供了大量的额外靶位点。此外，T-DNA的整合还需要3’→5’及5’→3’核酸外切酶和内切酶及修复酶的共同作用。通过对辐射超敏感的拟南芥突变株研究发现[41]，低剂量的辐射可引起植物细胞DNA的单链断裂、碱基破坏和双链断裂，而植物细胞能够自发地修复这种损伤且与细菌的修复机制相同，在修复过程中产生的各种酶为T-DNA的整合提供了便利条件。除修复以外，DNA合成与细胞分裂的活跃度也是农杆菌T-DNA 进行整合的一个必要条件

[42]. T-DNA的转移与整合依赖于宿主的细胞周期，因为进行DNA复制的细胞，S期时其细胞核膜尚未形成，此时最有可能接受并整合T-DNA。而对于外源基因的稳定整合与成功表达，处于分裂或分化状态的M期细胞则是必需的[39]。

### **1.2.2** 影响根癌农杆菌转化半夏效率的因素

#### **1.2.2.1** 外植体预培养的时间

在对半夏遗传转化的研究工作中，我们发现受体材料是否预培养是提高遗传转化效率的关键因素之一。不同类型、不同时期以及处于不同生理状态下的植物组织和细胞对农杆菌的感受性均不相同。幼小的的外植体由于代谢活力较强，组织或细胞分裂旺盛，DNA大量合成，且可能含有较少的抑制因子等，因而有利于T-DNA的整合。在农杆菌转化禾谷类作物中，大部分都选用了幼胚作为外植体[24, 43]。但是，在对半夏遗传转化的研究中发现，以半夏的愈伤组织和幼嫩的叶柄为受体材料，不经过预培养阶段的外植体转化率最高[19, 44]。原因可能是由于外植体的预培养会导致其过早进入共培养阶段，而此阶段的细胞已经处于分裂状态，不利于外源DNA与宿主细胞的整合。

#### **1.2.2.2** 酚类化合物对**vir**基因的诱导

苯乙酮及其结构类似物、木质素单体、桂皮酸及其结构类似物、查尔酮衍生物等酚类化合物的添加，能够有效促进vir基因的诱导以及农杆菌在植物细胞上的吸附[29]。许多单子叶植物尤其是草本植物，其自身不能产生酚类化合物或者产生的量不足以作为诱导分子。但是，研究表明，单子叶植物本身确实含有一套独特的高效诱导vir基因表达的信号分子，该信号分子经分离纯化，证明是一种与AS结构及作用类似的酚类黄酮化合物[45]。可见，单子叶植物转化效率低，并不是因为缺少相关的信号分子，而是由于这类信号分子仅在单子叶植物发育特定时期的特定部位产生，同时这类黄酮类化合物不能在单子叶植物维管系统中运输。因此，适宜浓度的外源诱导物以及合适的植物受体材料等，都会很大程度上促进农杆菌对单子叶植物的侵染。根据受体材料的不同，一般认为，酚类化合物的浓度在20-200µmol•L-1的范围时为最佳。

#### **1.2.2.3** 受体材料的伤害处理

实验证明，适度增加受体材料的创伤可提高其遗传转化效率。这是因为，植物在伤口处可产生诱导细菌聚集与吸附及激活vir基因、促进T-DNA转移的酚类诱导分子[32, 36]，并且促使细菌与细胞质膜上的受体位点相接触，增强吸附；同时受伤也刺激了相应部位DNA的复制和细胞分裂，使其更易诱导愈伤组织而成为活跃的分生细胞，产生大量的重组或修复酶，从而提供DNA结合的靶位点[40]，增强T-DNA的整合能力。人们常采用的致伤方法包括：受体材料的简单机械致伤[46]、微弹轰击介导的致伤[47, 48]、超声波辅助处理致伤[49, 50]、酶解致伤

[51]等。

##### **1.2.2.3.1** 超声波处理致伤

超声波处理的生物学效应主要是空化作用导致的细胞膜损伤。同时，用电镜观察可发现在细胞组织表面有大量的微伤口，从而使农杆菌感染植物组织的更深层，增加农杆菌的吸附以及T-DNA的转移能力[50]。将该致伤效应与农杆菌介导法相结合，可大大提高遗传转化的效率，尤其是对于一些利用农杆菌介导难以转化的单子叶植物[49, 52]。王新颖[44]等通过对半夏叶柄遗传转化的研究发现，超声波辅处理5 min，可大幅度提高叶柄的gus瞬时表达率，有助于T-DNA向受体细胞转移，时间过久则会对外植体细胞造成伤害。

##### **1.2.2.3.2** 酶解致伤

农杆菌较易侵染双子叶植物，是因为双子叶植物细胞表面存在着许多与果胶物质相联系的农杆菌附着位点，单子叶植物由于细胞壁上果胶多糖的高度酯化而缺乏这样的附着位点[53]，表现出对农杆菌不敏感。为了提高单子叶植物的遗传转化效率，可用相关的酶处理植物细胞，以去酯化造成细胞表面部分创伤，从而暴露潜在的附着位点。酶解法已被广泛的应用于单子叶植物的遗传转化过程中，其最大的优点是可有效地控制伤口的程度和受害的部位[51]。

##### **1.2.2.3.3** 负压处理

在农杆菌介导遗传转化的研究中还发现，改变外植体侵染时的外界压强，可明显提高农杆菌的转化效率。因为适当的负压处理，能够对细胞产生一定程度的伤害，在其表面形成许多细小伤口，致使细胞分泌一些酚类物质，从而引起农杆菌吸附并激活Ti质粒中T-DNA的剪切和转移[54]。此外，在一定负压的处理下，根癌农杆菌还可通过组织细胞间的空隙渗入到更深层的细胞，从而有助于提高农杆菌的转化效率，在植物的遗传转化研究方面具有普遍意义。

#### **1.2.2.4** 共培养时间

与预培养时间一样，共培养时间的长短对植物遗传转化效率的影响也很大[55]。若时间过短，T-DNA很难完成转移过程；时间过长，则会导致菌体大量繁殖，严重伤害共培养的植物材料，因而不利于完整植株的再生，且后期不易脱菌。在对烟草和玉米的研究中发现[38]，当共培养时间达2 h时才足以产生可被检测到的T-DNA基因表达水平。如果低于2h，即使提高侵染细菌的浓度也很难检测到T-DNA的表达，但是菌液浓度过高又会对转化结果造成严重的

影响。通过对多种单子叶植物遗传转化的研究表明，水稻[56]、小麦[57]、百合[58]以及半夏[19, 44]的最佳共培养时间分别为3 d、2-3d、2-3d及3-4 d。因此，我们认为单子叶植物一般所采用

的共培养时间为3-4 d[59]。

#### **1.2.2.5** 根癌农杆菌感染浓度及时间

根癌农杆菌感染浓度及时间是影响遗传转化效率的重要因子。一般情况下，浓度相同时，在一定的时间范围内，随着感染时间的延长，外源基因的转化效率呈现上升的趋势；而感染时间相同时，在一定的浓度范围内，随着农杆菌浓度的增加，转化率上升。当感染时间过长或者农杆菌浓度很大时，外植体容易因农杆菌的毒害缺氧而软腐，且脱菌困难；感染时间过短或浓度较低时，T-DNA的转移过程没有完成，同时，共培养过程中的农杆菌生长不良，导致转化频率较低。贾永芳等[19]通过对*gus*瞬时表达率的统计发现，感染时间为15 min，农杆菌OD值为0.2时，GUS的瞬时表达率最高。王新颖等[44]以半夏叶柄作为转化材料，探讨不同因素对半夏遗传转化效率的影响，结果表明，适合半夏叶柄的遗传转化条件为：不经过预培养，OD600为0.4-0.8、农杆菌侵染20 min时转化率最高。可以看出，不同部位的半夏材料对农杆菌的浓度及侵染时间的承受能力和要求不同。

#### **1.2.2.6** 抗Th素的选择压

在植物的遗传转化中，转化细胞相比非转化细胞而言，只占受体材料很少的一部分，二者在共同培养的时候存在竞争性生长，而转化细胞的竞争力通常要比正常的细胞弱。因而，通过预试验，选择合适的抗生素以及适宜的选择压，是最终获得完整转基因植株的关键步骤。通常情况下，抗生素都会对细胞的分化产生一定影响，因而，要适当降低分化阶段时的选择压，甚至可以完全除去选择压[60]。此外，选择压的加入时机，也会对转基因植株的筛选产生很大的影响。若选择压加入过早，已转化的细胞往往还没有恢复到正常的生长状态、抗性基因还没来得及表达，就会被所加入的抗生素抑制或杀死；而选择压加入过迟时，细胞大量增殖，未转化细胞则可能会逃避选择，导致出现嵌合现象或假转化体[61]。一般来讲，农杆菌介导的遗传转化，在共培养36 h至5 d时加入选择压最为适宜[62]。

## **1.3** 热激蛋白研究进展

高温容易引起植物热害，对植物本身在生长发育上造成诸多障碍，严重时会导致死亡。高温主要是造成植物体内一连串的生理与生化的改变与破坏，例如细胞脱水、生物膜系统被破坏、酶系统紊乱、光合及呼吸速率变化等。此外，还可以使细胞内糖类和蛋白质转变成可溶性化合物，导致植物死亡。

### **1.3.1** 热激蛋白

生物的热激现象是指当生物体遭受高于自身正常生长温度8-12℃时，生物体的一系列生理、生化反应。例如，植物在热激条件下会主动关闭一些常规基因的表达，取而代之的是一些与热激胁迫相关的基因则大量表达，如热激蛋白基因。热激蛋白（Heat shock protein, HSP）是一类结构相对保守的家族，在正常环境下，热激蛋白的表达量较低；当生物体在遭受热激

胁迫时，热激蛋白就会大量稳定存在。热激蛋白的存在能有效阻止变性蛋白的聚集，防止细胞结构与功能的紊乱。李冰等[63]认为热激蛋白的产生是植物耐热性的重要表现之一。生物耐热性的获得及提高可能与热激蛋白、海藻糖、膜ATP酶、胞内pH的下降等多种因子及生理活动有关，其中热激蛋白与生物耐热性的研究是重点。Cunshuan及Trissieres等[64,65]人研究发现，任何细胞经热激胁迫后都会产生大量的热激蛋白来保护自身结构与组成的稳定性，但高温胁迫解除后细胞内大量表达的热激蛋白又会逐渐消失；Soti等[66]人认为热激蛋白具有分子伴侣的功能，热激蛋白可以有效增加细胞内一系列物质的热稳定性，使细胞在热激情况下能较好地维持细胞活性。有证据表明，一些缺陷型的物种经基因转导并表达HSP后，可以恢复耐热性[67]，因而，生物的耐热机制中最关键的一个因子是热激蛋白，两者直接相关。

HSP除了在细胞质及线粒体出现外，细胞的中心体、微粒体等细胞结构内也发现有热激蛋白的出现[68, 69]。并且热激蛋白的分布位置同功能需要有着密切的联系，如HSP70在逆境胁迫时会选择性地从细胞浆转移到细胞核，以发挥保护功能。由于生理反应的需要，热激蛋白的合成一般极其迅速，Ken等[70]人认为植物在热胁迫的3-5 min内热激蛋白mRNA的含量便会快速合成，在热激20 min后就能植物体内检测到新合成的HSP。同时，随着热激胁迫的持续进行，热激反应会一直进行下去[71]。

### **1.3.2** 热激蛋白的产**Th**

随着热激蛋白研究的不断深入，人们对热激蛋白在分子、生理生化等方面均有了较深入的认识。热激蛋白除了由热激诱导产生外，乙醇等物理化学因子也可以诱导产生热激蛋白。

Wu等[72]人研究发现，同大部分蛋白的合成一样，热激蛋白的合成也是由基因转录表达控制的，热激蛋白基因的表达受热激转录因子（HSF）调控，HSF是一类有DNA结合区、三聚区以及活性区三个功能区组成的调控因子。DNA结合区位于热激调控因子N末端，含有三个α螺旋与四个β折叠；三聚区位于热激调控因子的C末端，由一些疏水氨基酸序列组成，大部分重复序列由7个氨基酸组成。不同HSF的活性区同源性很低，所在的位置也十分多变。

HSP mRNA在常温条件下极不稳定，但在热激条件下却十分稳定。在热应激条件下，除HSP mRNA以外的大部分mRNA都处于非翻译状态，由此可减少与HSP mRNA的翻译竞争。通过对HSP70的序列进行分析后发现，mRNA 3’端非翻译区AU碱基含量比较丰富，删除核酸3’端的非翻译区可增加HSP70在常温下的稳定性，这说明HSP70 mRNA在常温下的降解是受mRNA降解系统控制的，而热休克状态则会影响这种系统活性。正是由于mRNA的特殊结构及其在热应激时的稳定性才保证HSP mRNA在应激时优先转录[73]。

### **1.3.3** 热激蛋白的特点

热激蛋白作为一类蛋白质，有着一些共有的特点：（1）热激蛋白的具有保守性。（2）热激蛋白的表达具有短时性。（3）热激蛋白同时具有非特异性。高温和其他一些逆境胁迫，如寒冷、干旱、高盐、重金属、激素、伤害等均可诱导HSP合成。在热激蛋白家族中，HSP70是重要的分子伴侣蛋白，在热激时它可以起到维护胞内蛋白的稳定、加速热休克的核仁恢复、

维持正常蛋白处于有利的构型状态等作用。分子伴侣(molecular chaperones)是指能够结合和稳定另外一种蛋白质的不稳定构象，并通过有控制的结合和释放，促进新生多肽链的折叠、多聚体的装配或降解以及细胞器蛋白的跨膜运输等的一类蛋白质[74]。它们的功能是帮助其他含有多肽结构的物质在体内进行非共价的组装，但本身并不参与构成被介导的物质[75]。

## **1.4** 本研究的目的和意义

随着全球气温的不断上升，半夏高温等环境胁迫的威胁日益明显，从而使半夏资源枯竭。目前，由于人工调控技术发展缓慢，从而严重制约了半夏生产的发展[76]。本课题利用植物组织培养技术和现代分子生物学的知识及技术手段从基因水平来研究各种重要功能基因（如

*sHSP*）对半夏进行遗传转化，首先从植物中获得与半夏高温倒苗相关的基因，建立高效的半夏遗传转化体系，构建利于目的基因遗传转化的pBI121-*sHSP*重组质粒，通过对一系列影响农杆菌介导单子叶植物遗传转化效率的因素的分析与优化，将目的基因成功与半夏基因组

DNA进行整合，分析比较转基因前后半夏生理生化指标的的变化，以期筛选出在逆境胁迫下具有较强抗性的半夏优质新品种并进一步验证目的基因的相关功能，为半夏种质资源的改良及分子育种奠定基础。

# 第二章 半夏叶片再Th体系的建立及优化

叶片作为植物重要的器官之一，其来源广泛，均一性强，取材方便，是植物离体培养中较为理想的外植体[77]。开展转基因研究的前提是首先建立高效的遗传转化体系，目前国内对半夏组织培养的研究，多以叶片、叶柄和块茎作为研究对象[78]。其中，以半夏的叶片作为外植体，叶片的侵染面积大，有利于利用叶盘法将外源基因导入受体细胞。

## **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 材料

试验材料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*Pinellia ternata* Breit.。选用MS+6-BA 1.0 mg·L-1+IAA 0.5 mg·L-1为基本扩繁培养基（蔗糖3.0%, 琼脂0.7%, pH 5.8～6.0）[14]，经121˚C高温灭菌15 min；通过设计正交实验，选用MS+6-BA+IAA+TDZ培养基，来诱导半夏叶片的再生；培养温度（25±1 ）

˚C；光强2 000～3 000 lx；光照时间12 h·d-1.

### **2.1.2** 方法

#### **2.1.2.1** 半夏叶片再Th体系的建立

采用苗期为一个月的试管苗嫩叶，且大小、形状和色泽基本一致，每个叶片边缘剪四个切口，叶片正面向上，平放于培养基表面，每个锥形瓶放置3~4片叶，每个梯度3-4个重复，完成正交实验的设计（见表2-1）。

表2-1 正交试验设计表

Tab. 2-1 The design table of the orthogonal test

|  |  | 因素 |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 水平 | A  6-BA (mg·L-1) | B  IAA (mg·L -1) | C  TDZ (mg·L -1) |
| 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 3 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 4 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

#### **2.1.2.2** 半夏叶片再Th频率的计算方法

记录整理实验数据，利用以下公式计算每一个梯度半夏叶片的再生频率：再生频率=再生块茎的叶片数**/**被调查叶片数

每叶片平均再生块茎数量=每叶片再生块茎总数**/**被调查叶片个数

根据再生频率的计算结果利用Excel、Minitab15、SPSS17等软件对数据进行统计分析，比较不同浓度的组合对半夏叶片再生的影响，根据分析结果确定半夏叶片再生的最优培养基。

## **2.2** 结果与分析

### **2.2.1** 半夏试管块茎的诱导

结合正交试验表2-2，分析可知：在6-BA浓度为0.5 mg·L-1的四个组合内，部分叶片枯黄，叶片切口边缘坏死，生成少数块茎（如图2-1-A）；6-BA浓度为1.0 mg·L-1的四个组合内半夏叶片长势较好，叶片切口黄并隆起，在切口边缘长出较多块茎（如图2-1-B）；当6-BA浓度为1.5 mg·L-1时，半夏叶片切口处长出的块茎最多，长势最快（如图2-1-C）；6-BA浓度为2.0 mg·L-1的四个组合内半夏叶片的切口处只长出少数的块茎（如图2-1-D）。从半夏叶片再生块茎的长势及数量观察分析，6-BA浓度为

1.5 mg·L-1时，四个组合总体长势最好。



图2-1 半夏叶片试管块茎的形成

Fig 2-1 The formation of microtubers of leaves

A 0.5 mg·L -16-BA; B 1.0mg·L -16-BA; C 1.5 mg·L -16-BA; D 2.0 mg·L -16-BA

### **2.2.2** 数据处理

2-3周后观察每个梯度内叶片上生成的块茎总数，记录数据如表2-2。

表 2-2 植物生长物质对半夏叶片生长的影响

Table 2-2 Effects of plant growth substances on leaves growth

| 培养基序号 | A  6-BA/ mg·L -1 | B  IAA/ mg·L -1 | C  TDZ/mg·L -1 | 块茎数 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 6 |
| 2 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 8 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 0.5 | 1.5 | 1.5 | 9 |
| 4 | 0.5 | 2.5 | 2.0 | 10 |
| 5 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 17 |
| 6 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 10 |
| 7 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 12 |
| 8 | 1.0 | 2.0 | 1.5 | 9 |
| 9 | 1.5 | 0.5 | 1.5 | 10 |
| 10 | 1.5 | 1.0 | 2.0 | 14 |
| 11 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | 26 |
| 12 | 1.5 | 2.0 | 1.0 | 16 |
| 13 | 2.0 | 0.5 | 2.0 | 16 |
| 14 | 2.0 | 1.0 | 1.5 | 13 |
| 15 | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 11 |
| 16 | 2.0 | 2.0 | 0.5 | 9 |

从表2-2中可以看出，6-BA浓度不同的四种培养基总块茎数依次为：33、48、66、

49.6-BA浓度为1.5 mg·L-1梯度内半夏叶片生成的总块茎数最多，1.0 mg·L-1和2.0 mg·L-1梯度次之，0.5 mg·L-1梯度内最少。在实验观察的过程中和记录数据研究分析：在6-BA浓度为1.5 mg·L-1的四个组合里，IAA为1.5 mg·L-1、TDZ为0.5 mg·L-1时，半夏叶片的再生速度最快，生成的块茎数最多。

对上述数据进行极差分析和一般线性模型单因素方差分析，结果见表2-3、表2-4。

*K*值为某一因素同一水平的平均值，*K*值得大小可代表某一水平的优劣，*R*值为*K*值的极差，代表某一因素对试验影响的大小。

表2-3 植物生长物质对半夏叶片块茎生长影响的极差分析

Table 2-3 Range analysis of the effect of Plant growth substances on leaves growth

| 均值 | A  6-BA/ mg·L -1 | B  IAA/mg·L -1 | C  TDZ/ mg·L -1 |
| --- | --- | --- | --- |
| K1 | 8.25 | 12.25 | 12.75 |
| K2 | 12.00 | 11.25 | 13.00 |
| K3 | 16.00 | 14.00 | 10.25 |
| K4 | 12.25 | 11.00 | 13.00 |
| R | 7.75 | 3 | 2.75 |

均值极差越大，说明该因子对半夏叶片诱导块茎的影响越大。从表2-3可知：

6-BA的极差R最大，IAA次之，TDZ最小，即6-BA的影响最大，IAA的影响一般，

TDZ的影响最小。比较6-BA的均值可见*K*3> *K*4> *K*2> *K*1，说明在0.5-1.5 mg·L-1对叶片的再生诱导起促进作用，浓度达到2.0 mg·L-1起到抑制作用[79]，浓度为1.5 mg·L-1时的再生诱导能力最强。比较IAA的均值可见*K*3> *K*1> *K*2> *K*4，说明当IAA的浓度在1.5 mg·L-1时的诱导再生能力最强。TDZ均值相差不大，极差最小，通过与其他植物生长物质共同作用来调节植物的生长，并且在低浓度时就具有很高的细胞分裂素活性，适用的浓度范围较广。综合分析结果显示对半夏叶片再生的适宜培养基为：MS+6-BA

1.5 mg·L-1+IAA 1.5 mg·L-1+TDZ 0.5 mg·L-1 .

表 2-4 植物生长物质对半夏叶片块茎生长影响的方差分析

Table 2-4 Variance analysis of the effect ofplant growth substances on leaves growth

| 因素  Factor | 自由度  Degree of freedom | 偏差平方和  Sum of squares | 均值  Adj MS | F 比  F value | P 值  P value | 显著性  Significance |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6-BA | 3 | 120.5 | 40.08 | 1.78 | 0.251 |  |
| IAA | 3 | 22.5 | 7.42 | 0.33 | 0.805 |  |
| TDZ | 3 | 20.25 | 6.75 | 0.30 | 0.825 |  |
| 误差  Error | 6 | 135.00 | 22.50 |  |  |  |

一般线性模型单因素方差分析的结果表明，3种植物生长物质对半夏叶片再生的影响效应依次为6-BA> IAA> TDZ，其中以6-BA浓度为1.5 mg·L-1影响最大（见表2-4）。当TDZ的浓度达到0.5 mg·L-1时，块茎的再生频率即可达到100%[80]。极差和方差综合分析结果表明，对诱导半夏叶片再生块茎的适宜培养基为：MS+6-BA 1.5

mg·L-1+IAA 1.5 mg·L-1+TDZ 0.5 mg·L-1.

### **2.2.3** 半夏叶片在不同培养基中的再Th频率分析

在半夏叶片再生的适宜培养基中，*A*3*B*3*C*1梯度的整体长势最优，生长速度最快，块茎生成量最多。

计算16个梯度的平均再生频率和总平均再生频率，见表2-5。分析可知，6-BA

浓度为1.5 mg·L-1时，四个组合的平均再生频率最高，均达到100%，并且当IAA 为

1.5 mg·L-1、TDZ为0.5 mg·L-1时，每叶片平均再生块茎量约为2个/叶片，此时半夏块茎长势速度最快，块茎生成量最多（如图2-2）。故经筛选，适合半夏叶片诱导的最优培养基为：**MS+6-BA 1.5** mg·L-1**+IAA 1.5** mg·L-1**+TDZ 0.5** mg·L-1



图2-2 半夏叶片诱导形成的试管苗

Fig 2-2 The formation of the test-tube plantlet of leaves

表2-5 叶片的再生频率

Table 2-5 The regeneration frequency of leaves

| 梯度频率 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 平均再生频率 | 40 | 53% | 47% | 40% | 87% | 67% | 80% | 60% | 100 | 100 | 100 | 100 | 73% | 80% | 73% | 60% |
| 总平均再生频率 |  | 45% | |  |  | 73.5% | |  |  | 100% | |  |  | 71.5% | |  |

## **2.3** 讨论

### **2.3.1** **6-BA**对半夏叶片再**Th**的影响

从本实验研究可以发现，细胞分裂素6-BA的浓度变化对块茎生成的影响最大。在前三个浓度中，块茎生成量逐渐增高，而到第四个梯度时，块茎生成量降低。由此可以的知6-BA的浓度不宜过高，过高会抑制块茎的生成，不利于块茎的直接诱导。此试验结果与薛建平教授等的研究结果一致[14]。

6-BA可促进细胞分裂，诱导愈伤组织的发生，浓度一般在0.5-2.0 mg·L-1，对于要求根、芽同时生长的绝大多数品种不需要BA.6-BA还可抑制植物叶片内叶绿素、核酸和蛋白质的分解，将氨基酸、生长素和无机盐等向处理部位调运。在本试验中要求叶片直接诱导生成块茎，此条件下的6-BA最适浓度为1.5 mg·L-1。

### **2.3.2** **IAA**对半夏叶片再**Th**的影响

从本实验的整体趋势来看，在IAA浓度为1.5 mg·L-1最优利于叶片直接诱导产生块茎，与张志宏研究苹果叶片再生的结果一致[81]。

IAA普遍存在于植物体内，高浓度抑制植物生长，低浓度促进植物生长。低浓度的IAA可活化原生质膜上的ATP酶，引起H+从细胞质流向细胞壁，从而活化细胞壁水解酶如纤维素酶等，或直接打断壁中酸不稳定共价键或氢键，使壁弹性增加，利于生长。

### **2.3.3** **TDZ**对半夏叶片再**Th**的影响

由分析可知，不同浓度的TDZ对半夏叶片再生的影响不如6-BA和IAA显著。当TDZ的浓度达到0.5 mg·L-1左右时，块茎的再生频率即可达到100%，这与梁海永等做的苹果叶片再生体系建立研究的结果相一致[82]。

所有的植物活细胞通过器官发生途径或体细胞胚胎途径都具有发育成完整植株的潜能，这种潜能主要是由植物体内的众多生长物质所调节的。而TDZ在植物组织培养中则通过独立或协同其他生长调节物质，对植物细胞的增殖及分化起诱导和调节作用[7]。研究发现，低浓度的TDZ表现出很高的细胞分裂素活性[83]，同时，植物组织细胞在较短的时间内接触TDZ就能够有效的刺激植株的再生[84]。

### **2.3.4** 三种植物**Th**长物质对半夏叶片再**Th**的诱导

利用TDZ和6-BA分别对花生种子进行处理，TDZ可诱导出体细胞胚，而6-BA可诱导出苗；对外植体进行处理，TDZ仅诱导出一些愈伤组织，而6-BA处理的外植体2-3周后则直接分化出丛生芽[85]。虽然在无IAA的培养基中叶片也能再生出小块茎，但数量少且诱导时间较长。研究发现，6-BA与IAA配合使用，对半夏叶片直接诱导形成小块茎具有良好的作用，其中以1.5 mg·L-16-BA和1.5 mg·L -1IAA组合较适宜，诱导的小块茎最多。当TDZ的浓度在达到0.5 mg·L-1时，再生频率就可达到100%，故本试验优化出的培养基为半夏叶片直接诱导形成块茎的最佳培养基。

## 2.4 小结与展望

在植物的组织培养中，从外植体形成愈伤组织，大致要经历三个时期即启动期、分裂期和形成期。启动期的细胞开始准备进行分裂，此时外源植物激素的添加对诱导细胞开始分裂的效果最好，常用的有萘乙酸、吲哚乙酸、细胞分裂素等，且常使用1∶1的细胞分裂素和生长素的组合来诱导植物材料愈伤组织的形成。本实验得出，在6-BA和IAA的浓度均为1.5 mg·L-1时，半夏叶片再生的能力较强，而适宜叶片再生的TDZ浓度范围则较广。

在当前药用资源日益枯竭的状况下，加强半夏诱变育种的研究，进行半夏种质的优化将成为一个重要的研究方向。转基因技术是创造药用植物新种质，选育优良品种的有效途径之一。半夏叶片取材方便，并且有效的侵染面积较大，利于转基因技术中农杆菌的介导。而建立高效的半夏叶片再生体系，培育出稳定性较高的苗，为以后转基因体系的建立奠定良好的基础。

# 第三章 半夏遗传转化体系中**Kan**选择压的确定

抗生素作为一种筛选标记，在植物遗传转化中的应用已十分广泛。当抗生素浓度过高时，会对外植体造成很强的毒害作用，从而导致其死亡；而浓度过低，抗性芽的筛选不严格，会产生假阳性株或嵌合体，对遗传转化工作的进行造成了不利的影响，因而，适宜抗生素筛选浓度的确定是遗传转化获得成功的重要前提。在本研究中，结合以农杆菌介导法转化半夏的试验，确定Kan对半夏叶柄筛选的适宜浓度。

## **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 材料

试验材料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*Pinellia ternata* Breit.. 选用MS + 1.0 mg·L -1 6-BA + 0.5 mg·L -1 IAA + 3.0%蔗糖+ 0.7% 琼脂[14]为基本快繁培养基。

#### **3.1.1.1** **Kan**对半夏遗传转化的影响

Kan作为一种抗生素，在农杆菌介导的遗传转化体系中，具有一定的筛选压力作用。此外，Kan能够抑制叶绿素及其细胞内叶绿体和线粒体中蛋白质的合成，引起植物黄化，最终导致其死亡[86]。

对半夏进行扩繁培养，取约1.5 cm长，长势良好，较健壮，形状和色泽基本一致的半夏叶柄，水平接种到含有不同浓度Kan的培养皿上进行胁迫处理，Kan的筛选浓度设为0,25,50,75,100,125 mg·L -1，其中0浓度为空白对照。胁迫30 d后统计每种处理的存活率和受害指数，以确定Kan的筛选浓度。

从叶柄的颜色观察，受害指数的分级标准可分为4个等级：0级，生长正常：1级，少量有白化；2级，50 %左右的叶柄白化；3级，80 %左右的叶柄出现白化或畸形；4级，完全死亡[87]。

#### **3.1.1.2** 半夏组织的选取

Kan选择压的筛选是进行遗传转化的基础，后期的试验还需要进行下一步的处理。考虑到半夏叶片再生体的时间较长，而块茎形状不规则，颜色不均一，不易侵染也不易染色，染色后更不易观察结果，因此叶柄是最佳的试验对象，它不但比叶片易培养成幼苗而且比块茎易染色和易观察。在诱导胚状体的研究中，白雨[88]等发现，最佳外植体是半夏的叶柄基部，诱导率为43.6%，月生长率达24.43倍，所以本试验选取半夏叶柄作为半夏遗传转化体系中Kan选择压初探的材料。

### **3.1.2** 方法

将培养基高温灭菌，在该培养基未凝固前加入不同浓度Kan，倒平板，冷却后使用。以0浓度为空白对照，每个浓度3平行，每个平行接入约30根叶柄，3 d观察1次，分别记录每个梯度的不同培养皿中半夏叶柄的颜色变化及其两端的膨大状况。

#### **3.1.2.1** 结果计算

培养30 d后统计存活率和受害指数。

存活率=存活数/总接种数×100 %

受害指数=∑﹙代表级数×株数﹚／∑﹙最高级数×总株数﹚×100 %

#### **3.1.2.2** 数据分析

运用Excel2003、Mintab15、SPSS17.0等软件对试验数据进行分析。

## 3.2 结果与分析

### **3.2.1** **Kan**胁迫对半夏叶柄存活率的影响

试验发现，3 d左右，高浓度Kan的培养皿中，从叶柄两端开始出现轻微的白化现象。6 d后，在含有Kan的所有培养皿中，几乎都出现白化现象。随着培养时间的延长和胁迫浓度的升高，在含有Kan的培养皿中，半夏叶柄的白化现象越来越严重，逐渐出现完全白化的叶柄，存活率大幅度降低。到30 d时，高浓度Kan胁迫组的存活叶柄几乎没有，而对照组的半夏叶柄却仍然为鲜绿色，见图3-1。

a

a

b

c

d

e

120

100

80

存活率/%

Survival rate

60

40

20

0

0 25 50 75 100 125

Kan浓度/mg•L-1 Concentration of Kan

图3-1 Kan浓度对半夏叶柄存活率的影响

Fig. 3-1 Effect of Kan concentration on the survival rate of*P. ternata* petioles

叶柄培养30 d后，统计数据发现，对照组半夏叶柄的存活率的均为100 %。当浓

度增加到25 mg·L -1时，存活率基本不变，随着Kan浓度继续增加，在50 mg·L -1时，

达到了半夏叶柄的半致死浓度[87]，存活率为46.67 %. Kan为75 mg·L -1时，叶柄存活率继续下降，生存的叶柄只有原来的1/5左右，进一步增加Kan至100和125 mg·L -1时，叶柄的存活率急剧下降，几乎为0。

### **3.2.2** **Kan**胁迫对半夏叶柄受害指数的影响

试验结果显示，对照组的半夏叶柄，长势良好，叶柄两端膨大，无白化死亡的现象，受害指数为0；而生长在含Kan培养皿上的半夏叶柄，3 d就出现伤害现象；6 d左右，在100, 125 mg·L -1 Kan胁迫下的半夏叶柄已经出现完全白化苗；到了18 d以后，半夏叶柄的受害指数明显升高。在30 d的胁迫过程中，随着时间的延长，实验组的受害指数呈现逐渐上升的趋势，其中100和125 mg·L-1 Kan胁迫受害指数较高，30 d

时分别达到了96.67 %和100 %，见图3-2.

a

a

b

c

e

f

120

100

80

受害指数/%

Damage index

60

40

20

0

0 25 50 75 100 125

Kan浓度/mg•L-1 Concentration of Kan

图 3-2 Kan浓度对半夏叶柄受害指数的影响

Fig. 3-2 Effect of Kan concentration on the index of damage of*P. ternata* petioles

### **3.2.3** **Kan**胁迫不同时间对半夏叶柄再**Th**率的影响

不同浓度的Kan对半夏叶柄的再生有很大影响。半夏叶柄的再生能力随着Kan浓度的增加而显著下降，当浓度达100 mg·L -1时，半夏的分化受到明显抑制，大部分叶柄分化成白化苗，不能继续生长。在100 mg·L -1Kan三个平行的90个半夏叶柄中，最终存活率只有3.3%，即使有分化芽长出，也会逐渐变为白色，再生率较低，因此本试验选择100 mg·L -1作为抗性筛选压。

在30 d的培养中，随着Kan胁迫浓度的上升，半夏叶柄的再生率逐渐下降，尤其是在18 d后，再生率呈现显著下降趋势，见图3-3。

1.2000

1.0000

0.8000

再生率/%

Regenerate rate

0.6000

0.4000

0.2000

0.0000

0(mg•L-1) 25 50 75 100 125



0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30

培养天数/d Culture days



图3-3 Kan胁迫对半夏叶柄再生率的影响

Fig. 3-3 Effect of different Kan concentration on regenerate rate of*P. ternata* petioles

对上述数据进行一般线性模型单因素互作分析可知，同一浓度不同时间之间再生

率的差异达到极显著水平（*P*<0.01）；而相同时间不同浓度间的差异也达到了极显著水平（*P*<0.01），从而说明不同浓度的Kan对半夏叶柄再生的影响较大。

表3-1 方差分析

Table 3-1 Analysis of variance

| 来源 | 自由度 | SS | MS | F | P | 极差 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 浓度 | 5 | 3.45792 | 0.691583 | 25.61 | 0.000 | 0.58586 | \*\* |
| 时间 | 10 | 2.42714 | 0.242714 | 8.99 | 0.000 | 0.5537 | \*\* |
| 误差 | 50 | 1.35003 | 0.27001 |  |  |  |  |
| 合计 | 65 | 7.23509 |  |  |  |  |  |

备注：\*表示在0. 05水平上差异显著；Note: \*means significant difference at *P*=0.05;

\*\*表示在0. 01水平上差异显著；Note: \*\*means significant difference at *P*=0.01

在相同的Kan胁迫浓度下，随着培养时间的增加，半夏叶柄的存活率和再生率逐渐降低。100和125 mg·L -1Kan的处理组，在3-18 d时存活率显著下降，到28 d时，几乎所有的半夏叶柄都死亡。在相同的处理时间内，不同浓度的Kan对半夏叶柄的生长也有很大影响。随着Kan浓度的上升，除了对照组和25 mg·L -1Kan处理组外，实验组叶柄的存活率和再生率逐渐下降。30 d时，对照组叶柄的再生率为100%（如图3-4-A），几乎都再生出小芽；而100 mg·L -1的叶柄生长明显受抑制，再生率较低（如图3-4-E）；125 mg·L -1时芽的分化完全受到抑制，再生率为0（如图3-4-F）。由于采用过高浓度的Kan对外植体的伤害作用太大，可能会迅速杀死植物细胞，而死细胞会对邻近活细胞的生长产生强烈的抑制作用，不利于转化细胞的存活和再生。综合分析，我们选择100 mg·L -1作为半夏叶柄遗传转化的筛选压。



图3-4 不同Kan胁迫下的半夏叶柄

Fig. 3-4 *P. ternata* petioles under different Kan stress

A. 不添加Kan的半夏叶柄；B. 25 mg·L -1Kan胁迫的半夏叶柄；C. 50 mg·L -1Kan胁迫的半夏叶柄；D. 75 mg·L -1Kan

胁迫的半夏叶柄；E. 100 mg·L-1Kan胁迫的半夏叶柄；F. 125 mg·L -1Kan胁迫的半夏叶柄

## **3.3** 讨论

正常情况下，植物体内各项代谢的生理生化指标都是稳定而协调的，植物受到逆境胁迫时，处于逆境下的植物并不是被动承受伤害，而是主动调节适应。Kan作为一种常用的筛选剂，通过产生选择压来对转化株进行筛选，转化的细胞可以正常生长，而非转化的细胞则受到抑制而死亡。在进行抗生素的筛选过程中，如果外植体的伤口部位没有接触培养基时，会出现筛选不准确的情况[89]。

适宜的抗生素浓度对植物的遗传转化起着至关重要的作用。李乃坚等[90]在Kan对烟草种子发芽影响的研究中得出，100 mg·L -1能有效筛选转化体与非转化体；而刘尚前等[91]试验中得出50-100 mg·L -1为大豆最佳的筛选浓度，说明不同的物种之间对

Kan的抗性不同。在以Kan为筛选标记的半夏遗传转化研究中，Kan的用量确定为

100 mg·L -1。当Kan浓度为100 mg·L -1时，非转化细胞不能正常生长，只有成功转化

Kan抗性基因的半夏叶柄能够存活，可以认定在此浓度下筛选出的叶柄为转化株。虽然叶柄的存活率和再生率在低浓度Kan的环境下较高，但是在对叶柄进行遗传转化试验时，较容易出现假阳性现象，会对后面的试验产生严重影响。而在高浓度的Kan胁迫下，抗生素会迅速杀死植物细胞，并影响周围转化细胞的正常生长，抑制转化细胞的存活[20]。

选择合适的抗生素选择压，是要在选择压力下杀死未转化细胞，而允许转化的细胞存活，确定最小的选择压及最适的选择时间是成功的关键[92]。在100 mg·L -1的筛选压力下，培养时间太短，不能使Kan的伤害现象表现出来，例如3 d时，100 mg·L -1Kan的选择压下，只有14.44 %表现出伤害现象；而培养时间太长，随着营养物质的消耗，在没有Kan胁迫的情况下，叶柄的生存也会受到一定影响；此外，Kan长期处于培养基中，其活性会逐渐下降，导致非转化芽也生长起来[93]。因此，对外植体及转化芽进行及时的转移，不仅可以使转化芽正常生长，同时也可以避免一系列外界因素对试验最终筛选效果的影响[94]。本试验采用10 d转接一次外植体，处理的适宜时间为28 d。

随着转基因技术的广泛应用，利用抗生素作为筛选压的转基因研究成果会大量出现，通过检测相关的生理生化指标，从而进行更深层次的综合研究。目前，转基因技术已给人类带来了巨大的经济效益和社会效益，同时为生物技术的发展提供了一个更广阔的空间和平台，但是，其潜在的危害性和风险性还不能预测，培养无抗生素抗性基因的转基因植物值得进一步研究。

# 第四章 不同条件对抗性根癌农杆菌**EHA105** Th长的影响

农杆菌对外植体敏感细胞的吸附与菌株类型密切相关，研究发现，胭脂碱型农杆菌由于冠瘿碱结构的不同，比章鱼碱型农杆菌更易于附着在单子叶植物细胞的表面[19]，而EHA105则是胭脂碱型农杆菌的代表。

卡那霉素（Kan）在农杆菌转化过程中起到筛选作用，如果转化农杆菌的质粒中

含有Kan抗性，那么Kan就能够用于后期的筛选。但是，并非所有能正常生长的农杆菌都能较好的完成基因转化过程，且但转化的外植体未必全呈阳性的[95]，所以本试验旨在筛选农杆菌进行转化之前的最佳生长条件。

## **4.1** 材料和方法

### **4.1.1** 材料

试验材料由资源植物生物学安徽省重点实验室提供的含有PBI121质粒的抗性根癌农杆菌菌种EHA105，Kan，利福平(Rif)。

#### **4.1.1.1** 培养基

农杆菌单菌落增殖培养基即YEB固体培养基：900 mL去离子水+胰蛋白胨5.0 g·L -1 +酵母抽提物1.0 g·L -1 +蔗糖5.0 g·L -1 + MgSO4•7H2O 5 g·L -1 +琼脂15.0 g·L -1，pH7.0.

继代培养基即YEB液体培养基：900 mL去离子水+胰蛋白胨5.0 g·L -1 +酵母抽提物1.0 g·L -1+蔗糖5.0 g·L -1 + MgSO4•7H2O 4 g·L -1，pH7.0.

将两种培养基分装于50 mL的三角烧瓶中，于121℃湿热灭菌15-20 min。

#### **4.1.1.2** 培养条件

固体培养基上的根癌农杆菌在28℃条件下倒置培养36 h，液体培养基里的农杆菌在摇床上28℃培养36 h，同时，培养基里中均加入50µg・mL-1的Rif和Kan。

### **4.1.2** 方法

#### **4.1.2.1** 设计正交表进行条件筛选的实验

在无菌的条件下，挑取冻存的含有Kan 抗性的EHA105 菌株，接种到含有 5

µg・mL-1Kan和50µg・mL-1利福平的YEB固体培养基中，在恒温28℃下倒置培养。两天后挑取农杆菌单菌落，接种于含有50µg・mL-1 Kan和Rif的YEB液体培养基中，于28℃、200 r·min-1摇床上活化20 h左右取出，用移液枪吸取1mL菌液，分别加入含有不同浓度Kan的YEB液体培养基中，根据预设的条件进行培养，并测定OD600的值[95]。

选用L16（43）正交表来研究Kan浓度、培养温度及时间对单菌落继代培养的影响，实验重复3次，每个平行为3瓶，见表4-1。

表4-1 正交设计表格

Table 4-1 The table of orthogonal design

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | 因素 Factor |  |
| 处理  Treatment | A | B | C |
| 温度  ℃ | 时间  h | 卡那霉素  µg·mL-1 |
| 1 | 24 | 28 | 40 |
| 2 | 24 | 32 | 50 |
| 3 | 24 | 36 | 60 |
| 4 | 24 | 40 | 70 |
| 5 | 26 | 28 | 50 |
| 6 | 26 | 32 | 40 |
| 7 | 26 | 36 | 70 |
| 8 | 26 | 40 | 60 |
| 9 | 28 | 28 | 60 |
| 10 | 28 | 32 | 70 |
| 11 | 28 | 36 | 40 |
| 12 | 28 | 40 | 50 |
| 13 | 30 | 28 | 70 |
| 14 | 30 | 32 | 60 |
| 15 | 30 | 36 | 50 |
| 16 | 30 | 40 | 40 |

#### **4.1.2.2** 数据统计分析

取生长在特定条件下的抗性根癌农杆菌菌液，稀释五倍后，测定其OD600值，记录数据，运用Minitab15、Excel、SPSS17等软件对数据进行统计分析处理。

## **4.2** 结果与分析

### **4.2.1** 不同条件培养对抗性根癌农杆菌**EHA105 Th**长的影响

试验发现，Kan浓度为40µg・mL-1、26℃下培养时间32 h时，农杆菌EHA105长势最佳，OD值平均接近0.5（见表4-2），而当OD值为0.5时菌体抗性芽分化率最高，最适合进行基因转化[96-98]。

表 4-2 600nm处吸光值均值分析

Table 4-2 Average value analysis of the OD at 600nm

| 处理 | 温度  ℃ | 时间  h | 卡那霉素  µg·mL-1 | OD600 吸光值  A | | 平均值/A |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 24 | 28 | 40 | 0.620 | 0.618 | 0.621 |
|  |  |  |  | 0.618 | 0.626 |  |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 24 | 32 | 50 | 0.604 | 0.602 | 0.607 |
|  |  |  |  | 0.610 | 0.613 |  |
| 3 | 24 | 36 | 60 | 0.622 | 0.626 |  |
|  |  |  |  | 0.628 | 0.630 | 0.627 |
| 4 | 24 | 40 | 70 | 0.616 | 0.618 |  |
|  |  |  |  | 0.624 | 0.620 | 0.620 |
| 5 | 26 | 28 | 50 | 0.553 | 0.555 |  |
|  |  |  |  | 0.555 | 0.557 | 0.555 |
| 6 | 26 | 32 | 40 | 0.517 | 0.515 |  |
|  |  |  |  | 0.515 | 0.513 | 0.515 |
| 7 | 26 | 36 | 70 | 0.552 | 0.556 | 0.553 |
|  |  |  |  | 0.554 | 0.550 |  |
| 8 | 26 | 40 | 60 | 0.530 | 0.533 | 0.532 |
|  |  |  |  | 0.531 | 0.534 |  |
| 9 | 28 | 28 | 60 | 0.740 | 0.736 | 0.734 |
|  |  |  |  | 0.742 | 0.738 |  |
| 10 | 28 | 32 | 70 | 0.624 | 0.626 | 0.623 |
|  |  |  |  | 0.620 | 0.622 |  |
| 11 | 28 | 36 | 40 | 0.739 | 0.737 | 0.739 |
|  |  |  |  | 0.740 | 0.741 |  |
| 12 | 28 | 40 | 50 | 0.646 | 0.648 | 0.643 |
|  |  |  |  | 0.650 | 0.628 |  |
| 13 | 30 | 28 | 70 | 0.558 | 0.556 | 0.564 |
|  |  |  |  | 0.569 | 0.571 |  |
| 14 | 30 | 32 | 60 | 0.525 | 0.527 | 0.526 |
|  |  |  |  | 0.525 | 0.526 |  |
| 15 | 30 | 36 | 50 | 0.562 | 0.560 | 0.565 |
|  |  |  |  | 0.568 | 0.569 |  |
| 16 | 30 | 40 | 40 | 0.545 | 0.543 | 0.543 |
|  |  |  |  | 0.545 | 0.540 |  |

### **4.2.2** 正交数据的极差分析

对上述数据进行极差分析发现，温度的极差最大，而Kan浓度的极差最小，故温度的影响最大，浓度的影响较小，且各个因子对抗性根癌农杆菌EHA105生长的影响作用大小依次为温度>培养时间>浓度（见表4-3）。

表4-3 正交试验的极差分析

Table 3-3 Range analysis of the effect of orthogonal examination 、

|  | 温度/T | 时间/h | Kan/µg·mL -1 |
| --- | --- | --- | --- |
| K1 | 0.619 | 0.619 | 0.605 |
| K2 | 0.539 | 0.568 | 0.593 |
| K3 | 0.685 | 0.621 | 0.605 |
| K4 | 0.550 | 0.585 | 0.590 |
| R | 0.146 | 0.053 | 0.015 |

### **4.2.3** 方差分析

由表4-4可看出，Kan浓度及培养时间对EHA105的生长有显著影响，温度对

EHA105生长的影响极显著，与极差分析结果相符合（见表4-4）。

表4-4 正交试验的方差分析

Table 4-4 Analysis of variance of the effect of orthogonal examination

| 来源 | 自由度 | Seq SS | Adj SS | Adj MS | F | P |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A | 3 | 0.0552757 | 0.0552757 | 0.0184252 | 25.44 | 0.001﹡ |
| B | 3 | 0.0081862 | 0.0081862 | 0.0027287 | 3.77 | 0.078 |
| C | 3 | 0.0007282 | 0.0007282 | 0.0002427 | 0.34 | 0.801 |
| 误差 | 3 | 0.0043449 | 0.0043449 | 0.0007241 |  |  |
| 合计 | 15 | 0.0685349 |  |  |  |  |

A：温度；B：时间；C：卡那霉素浓度

## **4.3** 讨论

### **4.3.1** 不同温度对抗性根癌农杆菌**EHA105 Th**长的影响

人们常以最和最高生长温度来描述微生物的生长温度特性。微生物的生长速率会受到外界环境温度的影响，当微生物处于不适温度中时，可根据不同微生物的温度向性能力选择适宜温度而生长；或者微生物可忍受此环境的温度，且在微生物的生长受影响的情况下，持续进行分裂生长；或产生具有较高耐受性的孢子，可借此状态度过温度不适宜的时期，此时微生物分裂生长的速率将暂时停止或大为降低[99-101]。资料显示，农杆菌EHA105的最适生长温度为28℃，与本试验得出的结果并不相符，原因可能是以上分析的三种情况。从方差分析结果也可以看出，温度对EHA105生长的影响最大。

### **4.3.2** 不同培养时间对抗性根癌农杆菌**EHA105 Th**长的的影响

[微生物生长曲线](http://baike.baidu.com/view/725321.htm)是以菌体的量为纵坐标，培养时间为横坐标得到的曲线，通常微生物重量的变化比个数的变化更能在本质上反应出生长的过程。曲线可分为三个阶段

即生长率上升阶段（对数生长阶段）、生长率下降阶段及内源呼吸阶段。单细胞微生物典型生长曲线分为延滞期（适应期）、指数期、稳定期和衰亡期4个时期。实验中常用的是处于对数期的细菌，因此要把握好培养时间，若时间不够，细菌的量不足是，影响实验结果；如果培养时间过长，比如到了稳定期或者衰亡期，则细菌死亡数目增加，也会影响到实验结果的准确性[30, 96]。

### **4.3.3** 不同浓度**Kan**对抗性根癌农杆菌**EHA105 Th**长的影响

抗生素是某些微生物在生长代谢过程中产生的能抑制或杀死其他微生物的一种次生代谢产物，每种抗生素都有它固定的抗菌范围和抗菌谱。本实验中所加入的抗生素有Rif和Kan，但是Rif是作为平行因子进行讨论的，主要研究Kan的浓度对EHA105生长的影响，而根据极差和方差分析的结果显示，Kan的浓度变量范围并没有对抗性根癌农杆菌EHA105生长有显著影响。可能是所设置的变化范围与农杆菌EHA105正常生长所需的Kan浓度相差不大，由于偏离范围小而造成此试验中Kan浓度对

EHA105生长的影响不明显。

### **4.3.4** 不同条件对抗性根癌农杆菌**EHA105 Th**长的影响

通过对本实验所得出的数据进行统计分析，可以很明显的得出温度对于抗性根癌农杆菌EHA105生长的影响最大，此实验得出的抗性根癌农杆菌EHA105的生长的最适温度为26℃，因为温度是控制细菌生长活性的，即使在小范围的变化也可能对细菌生长产生很大的影响。培养时间对抗性根癌农杆菌EHA105生长的影响不显著，因为已知农杆菌在培养36 h时细菌处于对数期，但是EHA105具体何时越过对数期或者进入对数期并没有明确的界限，所以在设置的时间变化范围内，结果不显著。对于

Kan浓度对抗性根癌农杆菌EHA105生长的影响不显著，其原因也可能是变化范围过小或者实验过程中由于某些操作上的不严谨而造成的误差[30]。

## **4.4** 小结

随着植物基因工程技术与原理的发展与完善，植物基因转化领域取得了丰硕的成果。据统计，已有50多个物种的近20种植物成功的进行了基因转化并取得了转基因植株。其中，单子叶植物的基因转化研究，如小麦、大麦、水稻、玉米等的基因转化都取得了突破性进展[102]。由于农杆菌介导的基因转化具有转化效率高，转化的DNA片段较大，可以直接用不同植物组织进行转化，不需要原生质体，外源基因整合到宿主植物中拷贝数低，基因重排及基因沉默现象较少等诸多优点[96, 98]，因而被广泛应用。但是对于农杆菌何时最适宜转化，还需要进一步的验证。本实验通过正交设计不同的条件对抗性根癌农杆菌EHA105生长的影响，筛选出EHA105 生长的最优组合为26℃、Kan浓度为40µg・mL-1时培养36 h，可为基因的转化提供优质的材料[98]

# 第五章 乙酰丁香酮对半夏遗传转化体系建立的影响

植物组织受伤后会分泌一些酚类物质，这些酚类物质可以促进质粒PBI121进入植物组织[103]。乙酰丁香酮（AS）和这些酚类物质的作用相似，人为的增加或减少

AS的量可以确定何种浓度的AS能最大限度的转化PBI121质粒。此外，PBI121质粒上含有利于目的检测的*gus*报告基因，在一定的的条件下，具*gus*活性的部位或位点会呈现肉眼可见的蓝色，因此利用该方法可观察到外源基因在特定器官、组织，甚至单个细胞内的表达情况[104]。以半夏叶柄为材料，研究不同浓度的AS对含PBI121质粒的农杆菌EHA105的遗传转化影响，为半夏基因工程研究奠定基础。

## **5.1** 材料与方法

### **5.1.1** 材料

试验材料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

*Pinellia ternata* Breit.；含有PBI121质粒的抗性根癌农杆菌菌种EHA105.

#### **5.1.1.1** 对数期农杆菌的获得

在超净工作台上，挑取EHA105的单菌落于YEB液体培养基中，在其生长的第

12-36小时的时间段内，每隔3-5个小时用分光光度计测量一次OD值。当农杆菌的

OD600值达到0.5左右时，抗性芽分化率均较高，适宜转化[101, 105, 106]，这时就可以进行下一步的侵染实验。

#### **5.1.1.2** 培养基及培养条件

农杆菌YEB固体培养基、YEB液体培养基[107]，半夏快繁BXK培养基[14]，MS液体培养基，MS固体培养基。农杆菌接种后放在摇床中振荡培养，培养温度28±2℃，转速为110±5 r·min -1[108]。

### **5.1.2** 主要仪器与试剂

#### **5.1.2.1** 仪器

UV-4802型可见-紫外分光光度计；CP-213型电子天平；KQ-50B超声波清洗机；

TGL-16G-A型高速冷冻离心机；电冰箱；79HW-1型恒温磁力搅拌器；摇床；恒温箱

#### **5.1.2.2** 试剂

染色液（磷酸钠缓冲液，Na2EDTA，K3Fe(CN) 6，K4Fe(CN) 6，TritonX-100，甲醇，ddH2O，X-Gluc）；Kan；Rif；Carb；其他试剂均为市售分析纯（蔗糖、琼脂等）

### **5.1.3** 实验方法

#### **5.1.3.1** 不同浓度梯度的AS的选定

AS的浓度梯度定为：40、60、80、100、120、140、160，单位是µg・mL-1。

#### **5.1.3.2** 植物取材

取长度约为1-1.5 cm的无菌苗叶柄，接入半夏快繁（BXK）培养基。

#### **5.1.3.3** 摇菌

1、向YEB液体培养基中加入Rif，Kan，使其在培养基中的浓度为50µg・mL-1，

摇匀后分装至小三角瓶中，每瓶约50 mL。

2、取出已处于对数期的农杆菌，吸取1 mL菌液加入YEB内，然后放在28℃、

160 r·min-1的摇床上摇荡培养。

3、培养36 h后菌体处于对数期，取1 mL作为保留的菌种。

#### **5.1.3.4** **36 h**后侵染

1、**离心**将摇至对数期的菌液倒入50 mL的离心管内，于5000 r·min-1离心6-8

min。同时倒平板。

2、**悬浮**将离心管内的上清液去掉，加入MS液至50 mL悬浮，吸取10 mL至空离心管中，稀释5倍，测其吸光值，一般OD600值达到0.5为宜。再取悬浮的菌种稀释同种倍数，加入不同浓度的AS。

3、取半夏叶柄放入离心管中侵染10-15 min，然后放在滤纸上吸干菌液，接入平板。每个浓度做等量的平板，平板里的叶柄数目相同，并用Parafilm封口膜封口。

4、将做好的平板置于暗室中内培养3-4 d。

#### 5.1.3.5 光照下培养[109]

1、先将固体MS培养基融化，待培养基冷却至仍感烫手但能握于手中时，向其内部加入Kan 150µg・mL-1, Carb 400µg・mL-1。

2、将暗培养3-4 d的半夏叶柄侵入含Carb 400µg・mL-1的MS液体培养基中，10-15

min后，用无菌水冲洗1-2次，时间不可过长。

3、将冲洗好的半夏叶柄接入平板内，用Parafilm封口膜封口，放在光照下培养。等待观察结果。

#### 5.1.3.6 **gus**活性组织化学染色检测**:**瞬时染色[110]

1、将上面已制备好的材料浸泡在染液中，于25~37℃保温1 h至过夜。

2、甲醇中脱色2～3次，至阴性对照材料呈白色为止。

3、肉眼或显微镜观察，白色背景上的蓝色斑点即为*gus*表达位点。

### 5.1.4 **Kan、Rif**、Carb、AS在试验中作用[111]

Kan是一种抗生素，农杆菌中的PBI121质粒有Kan抗性，它的存在对农杆菌的PBI121质粒有一定的筛选压力作用，不致使PBI121消失，确保实验的可行性。此外Kan还能够抑制绿色素的合成以及无抗性菌的生长。Carb是一种抗菌素，可以纯化农杆菌，还能够抑制农杆菌的生长但对质粒无影响。另外，它还有生长素的作用，量要适中，不能加入的太多，否则同时会抑制半夏的生长。Rif能够从农杆菌中除去质粒，而AS能够促进质粒进入受伤的半夏组织内。四者共同完成PBI121质粒顺利进入半夏的过程。

## **5.2** 结果与分析

### **5.2.1** 数据分析

不加入AS时只有极少的半夏叶柄能够被染成蓝色，加入AS后，半夏叶柄的*gus*

瞬时表达率明显提高。当AS的浓度在40~60 mg·L -1时，转化效果较好，与其他浓度的差异显著，因此AS的浓度采用40-60 mg·L -1为宜，见表5-1。

表 5-1 AS对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响

Table 5-1 Effects of AS concentrations on gus transient expression of petiole

| AS 浓度/mg·L-1 | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 120 | 140 | 160 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| gus 瞬时表达率/℅ | 1.22d | 23.45c | 46.78a | 42.12ab | 37.28ab | 32.76bc | 29.08c | 21.69c |

注：同行内不同小写字母表示差异达显著水平（*P*＜0. 05）。

### **5.2.2** 不同浓度的**AS**对***gus***瞬时表达的影响

不同浓度梯度的AS作用后的半夏叶柄经染色后见下图：



图 5 外源AS作用后半夏叶柄的*gus*瞬时表达位点

Fig. 5 *gus* transient expression site of petiole after effect of exogenous AS

A 40 mg·L -1AS作用后*gus*瞬时表达位点图；B 60 mg·L -1AS作用后gus瞬时表达位点图；C 80 mg·L -1AS作用后

gus瞬时表达位点图；D 100 mg·L -1AS作用后gus瞬时表达位点图；E 120 mg·L -1AS作用后gus瞬时表达位点图；

F 140-160 mg·L -1AS作用后gus瞬时表达位点图

在低浓度的AS作用下，*gus*表达位点在半夏叶柄的两端及中间部分均有分布，说明PBI121质粒不仅转入了半夏叶柄的切口同时也转进了半夏叶柄内部，转化效果较好，见图5-A。随着AS浓度的升高，gus表达位点主要在半夏叶柄的两端集中分布，中间较两端少，虽然有个别叶柄可能因甲醇脱色不充分而表现出良好的转化效果，但整体的转化效果较40 mg·L -1的差，见图5-B、5-C。随着AS浓度的进一步提升，高浓度的AS会反向抑制外植体的生长，造成*gus*表达位点只在叶柄的两端分布，偶尔漂移到中间（如图5-D、5-E），甚至在过高浓度的AS作用下，叶柄两端的gus表达位点都极少（如图5-F），严重影响了外源基因的遗传转化。结果表明，低浓度的

AS对外源基因的转化具有促进作用，而AS浓度过高，则对基因的转化具有一定的抑制作用。

## **5.3** 讨论

AS通过诱导vir基因的活化，激活其他基因的表达，促进T-DNA的导入，从而提高转化的效率。AS加入的方式有多种，一般认为，农杆菌在共培养16 h后才进行遗传转化，而外源AS可缩短共培养的时间，因此，在共培养基中加入为最佳。此外，农杆菌中的PBI121质粒上含有*gus*报告基因，通过*gus*基因的瞬时染色并观察，是筛选最佳AS浓度的较优手段。

### **5.3.1** **AS**浓度对农杆菌侵染半夏叶柄的影响

不同浓度的AS对质粒遗传转化的影响不同，浓度较低或较高均不理想。浓度较低时，AS的量不足，不利于PBI121质粒转入半夏叶柄内；而浓度较高时则会抑制外植体的正常生长，从结果来看也不利于PBI121质粒的转入，只有AS浓度适宜（40-60

µg・mL-1）时，才能较大限度的促进PBI121质粒转入半夏叶柄[112] 。

### **5.3.2** **Kan、Rif、Carb**三者对半夏叶柄**Th**长的影响

半夏叶柄在预配养之后的暗培养中，培养基加入了Kan和Rif；暗培养后又继续在光照下生根培养，所用的培养基中加入了Carb，三者在半夏叶柄的生长中有着不可忽略的作用。从结果来看，Rif、Kan作为广谱抗生素，会抑制半夏叶柄的正常生长。Carb是一种抗菌素，同时也可以作为生长素使用，但加入过多时则不利半夏叶柄的生长；加入的量适宜则对半夏叶柄的生长无影响或稍有促进作用[113] 。

### **5.3.3** 最佳的**AS**浓度

从染色后半夏叶柄的*gus*表达情况可以看出，AS在40-60µg・mL-1时为最佳的浓度，其他的浓度下*gus*的表达位点则较少。分析发现，高浓度的AS都只使*gus*表达位点分布在半夏叶柄两端或偶有分布在半夏叶柄内，虽然有染色程度的差异，但没有太大的变化，说明高浓度的AS并不利于农杆菌的侵染。半夏叶柄两端的*gus*表达位点比较集中是因为叶柄两端有伤口，受伤的半夏组织更利于农杆菌的侵染，也更利于

AS作用于二者的共培养体系。AS的浓度为40-60µg・mL-1时，*gus*表达位点比较多且在叶柄的两端和内部均匀分布，故为最佳的浓度选择。

## **5.4** 小结

*gus*作为农杆菌PBI121质粒的报告基因，经组织化学法可染成蓝色，结果表明，As能够促进*gus*基因在半夏叶柄中的瞬时表达，这对于今后开展半夏基因组研究和品质改良工作具有一定意义。然而，转基因植物的组织或细胞发生蓝色反应，并不能说明它就是真正的转基因植株，如果植物体内的农杆菌没有脱干净或被其他含有*gus*基因的细菌所污染，也会出现蓝色反应，从而严重干扰了检测工作。

虽然农杆菌介导单子叶植物的基因转化已成为研究的热点之一，但是，外源基因的成功转化和结果检测仍比较困难，通过一些报告基因或分子生物学手段可以达到目的，却存在阳性误差，因此，如何高效的将含有目的基因的农杆菌转入植物组织中并成功有效的表达仍是一个有待于继续研究的问题。

# 第六章 半夏遗传转化体系中超声波辅助处理对瞬时表

**达率的影响**

半夏优良品种的选育，是解决半夏产量和品质问题的重要方法之一。已有研究表明，超声波处理可以提高*gus*瞬时表达率和抗性植株获得率[44]。本课题以半夏叶柄为材料，研究不同时间的超声波辅助处理对农杆菌EHA105中PBI121质粒遗传转化的影响，为今后半夏基因工程的研究及优良品种的选育奠定基础。

## **6.1** 材料与方法

### **6.1.1** 试验材料

试验材料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

*Pinellia ternata* Breit.；含有PBI121质粒的抗性根癌农杆菌菌种EHA105.

### **6.1.2** 试验方法

对数期农杆菌的获得、植物的取材、摇菌、侵染、瞬时染色等操作方法同第五章。侵染时，同时辅助以不同时间的功率为50HZ的超声波处理，总侵染时间相同。

## 6.2 结果与分析

### 6.2.1 数据分析

由图6-1可以看出，超声波辅助处理对gus瞬时表达率的影响整体上呈先上升后下降的趋势，当处理时间为5 min时，*gus*瞬时表达率最高，为89.47 %。超声波处理时间较短，所产生的伤口较小，农杆菌的侵染效率较低；随着超声波时间的增加，产生的伤口相对较大，一定程度上促进了PBI121质粒对半夏叶柄的遗传转化；但是，高强度或长时间的超声波处理可能会损伤半夏叶柄及其核基因组DNA，从而降低转化效率。

100

gus瞬时染色率/%

gus instantaneous staining rate

80

60

40

20

0

a

b

c

d

d

0 1 5 10 15

超声波处理时间/min Ultrasonic treatment time

图6-1 不同时间超声波辅助处理对瞬时表达率的影响

Fig. 6-1 Effect of ultrasonic treatment time on transient expression rate

对上述数据采用SPSS17做一般线性模型单因素方差分析可知，不同时间超声波处理的差异达极显著水平（*P*＜0.001），见表6-1。

表6-1 方差分析

Table 6-1 Analysis of variance

| 来源 | 自由度 | SS | MS | F 值 | P | 极差 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 超声波辅助处理时间 | 4 | 0.42430 | 0.10607 | 92.19 | 0.000 | 0.05162 | \*\* |
| 误差 | 5 | 0.00575 | 0.00115 |  |  |  |  |
| 合计 | 9 | 0.43005 |  |  |  |  |  |

**注：**\*\*表示极显著

### **6.2.2** 半夏叶柄经不同时间超声波辅助处理后***gus***的瞬时表达率

****

图6-2 超声波辅助处理下半夏叶柄染色后的*gus*瞬时表达位点

Fig. 6-2 The*gus* transient expression of petiole with ultrasonic treatment

A超声波辅助处理0 min，染色后的*gus*瞬时表达位点；B 超声波辅助处理1 min，染色后的*gus*瞬时表达位点；

C 超声波辅助处理5 min，染色后的*gus*瞬时表达位点；D 超声波辅助处理10 min，染色后的*gus*瞬时表达位点；

E超声波辅助处理15 min，染色后的*gus*瞬时表达位点

通过*gus*基因的瞬时染色并观察，是目前筛选最佳超声波辅助处理时间的较优手段。图6-2-A可知，*gus*表达位点只集中在半夏叶柄的两端，中间部分没有*gus*表达。说明无超声波处理时，PBI121质粒只转入了半夏叶柄的切口处而没有转进半夏叶柄内部，转化效果较差。当超声波处理1 min时，*gus*位点在两端分布并向中间延伸。说明PBI121质粒不仅在两端集中分布，叶柄中间也偶有PBI121质粒转入，转化效果较0 min的好，见图6-2-B。当时间达到5 min时，由图6-2-C可知，*gus*表达位点在

叶柄的两端及中间均有分布。说明PBI121质粒已经转入了整个半夏叶柄中，转化效果最好。随着时间的继续延长，导致组织、细胞有较大的损伤，由图6-2-D可以看出，

*gus*表达位点只分布在半夏叶柄的两端。说明PBI121质粒只转入了半夏叶柄的两端且与超声波辅助处理5 min的半夏叶柄相比，*gus*表达位点少，效果较差。当时间达到15 min时，外植体所受的伤害严重，很难再生成植株，同时，*gus*表达位点只在半夏叶柄的两端较少的分布，*gus*表达位点最少，效果最差，如图6-2-E所示。

## **6.3** 讨论

### **6.3.1** 超声波的**Th**物学效应

超声波处理对植物细胞具有空化和微机械损伤的作用，而普遍观点认为，空化作用在转基因中起主导因素。在空化泡崩溃的瞬间，其内部的高温高压能在空化泡表面产生强大的射流和冲击波，甚至电离效应和发光，导致空化泡周围细胞的细胞壁和质膜被击穿，造成质膜的可逆透性或非可逆透性的改变，使细胞内外物质发生交换，外源DNA顺着小孔进入受体细胞从而发生遗传转化现象[49, 52]。超声波转化是一个复杂的过程，在超声波作用下，还会引起外源DNA分子的断裂，因此，在转化时应采取合适的超声波处理参数，以确保目的基因的完整性，进而使目的基因在转基因植物细胞中能够顺利表达[114]。其优点是操作简单，处理量大，设备便宜，具有良好的均衡性和持续性，不受宿主范围的限制，特别是可将外源基因直接导入植物的组织或带壁细胞。

### **6.3.2** 辅助处理的最佳时间

超声波的功率和辅助处理的时间是决定农杆菌介导转化效率的两个最关键的参数。本试验在利用农杆菌侵染半夏叶柄的同时辅助以恒定频率的超声波清洗机处理不同的时间，5 min时，*gus*基因的瞬时表达率是最高的，为89.47%。超声波功率一定时，与无超声波辅助处理的对照组相比，适宜的超声波处理时间可明显提高*gus*的瞬时表达率。超声波辅助处理时间较短或较长对PBI121质粒转入半夏叶柄内的影响均不理想。从0 min到5 min，随着时间的增加*gus*基因瞬时表达率增加，但是，从5 min到15 min，随着时间的增加，*gus*基因瞬时表达率却有所下降。较短时间的超声波处理，如0 min中所产生的伤口较小使农杆菌侵染效率较低，而时间较长则会对细胞产生的伤害较大，不利于外源质粒的转入，只有当时间适宜（5 min）时才能较大限度的促进PBI121质粒对半夏的遗传转化。影响超声波辅助农杆菌介导遗传转化的因素较多，也较复杂，最佳处理条件的选择也因仪器设备、转化材料等条件不同而有所差异，因而，超声波辅助对瞬时表达率的影响还有待进一步的完善。

### **6.3.3** ***gus***活性组织化学染色检测对植物基因工程发展的作用

农杆菌中的PBI121质粒上含有*gus*报告基因，通过*gus*基因的瞬时染色并观察，是筛选最佳超声波辅助处理的较优手段。*gus*作为农杆菌PBI121质粒的报告基因，经组织化学法染可以成蓝色，并染色成功。结果表明超声波能够促进*gus*基因在

半夏叶柄中瞬时表达，这对于今后开展半夏基因组研究和品质改良工作具有一定意义。随着植物基因工程的发展，尤其是在转基因方面，报告基因在转基因植物的检测中具有十分重要的作用，*gus*基因则是目前检测转基因植物的常用报告基因之一。

## **6.4** 小结

在植物遗传转化的研究中，如何提高外源基因在植物中的表达效率是目前亟待解决的重要问题之一。超声波辅助农杆菌介导法可在一定程度上促进基因的转化效率，是因为超声波引起的气穴可在植物组织表面或者以下产生的数个微小伤口，这些伤口促使农杆菌进入组织更深部，增加了农杆菌的感染面积，利于外源基因的转化[115]。转基因技术是创造药用植物新种质、选育优良品种的一种有效途径。在当前药用资源日益枯竭的状况下，培育半夏新种质将成为一个重要的研究方向。

# 第七章 根癌农杆菌的感染浓度及时间对半夏叶柄转化效率的影响

遗传转化体系的建立是转基因技术的基础，影响遗传转化的因素有很多，包括外植体的预培养时间、酚类化合物的添加、植物材料的受伤处理、农杆菌的浓度及侵染时间等[19, 103]。本课题以半夏叶柄为材料，研究不同浓度的根癌农杆菌EHA105及不同的侵染时间对半夏叶柄转化效率的影响，旨在优化农杆菌介导的半夏遗传转化体系，从而为半夏的遗传转化奠定基础。

## **7.1** 主要仪器与试剂

### **7.1.1** 仪器

755B 型紫外可见分光光度计；CP-213 型电子天平；KQ-50B 超声波清洗机；

TGL-16G-A型高速冷冻离心机；电冰箱；79HW-1型恒温磁力搅拌器；摇床；恒温箱。

### **7.1.2** 试剂

*gus*染色液（磷酸钠缓冲液，Na2EDTA，K3Fe(CN) 6，K4Fe(CN) 6, TritonX-100，甲醇，ddH2O，X-Gluc）；Kan；Rif；Carb；其他试剂均为市售分析纯（蔗糖、琼脂等）。磷酸缓冲液制备方法：A液：称取NaH2PO4·2H 2O 3.12 g溶于蒸馏水，定容至100 mL. B液：称取Na2HPO4·12H 2O 7.17 g溶于蒸馏水，定容至100 mL. 取100 mL

B液与40 mL A液混合，用NaH2PO4·2H 2O 调至pH 7.0.

### 7.1.3 ***gus***染色液的配制：

取磷酸钠缓冲液10 mL, 50 mmol·L -1Na2EDTA 0.5 mL, 40 mmol·L -1K3Fe(CN) 6 0.5 mL, 40 mmol·L -1 K4Fe(CN) 6 0.1 mL, TritonX-100 0.1 mL, 甲醇4 mL, X-Gluc 10 mg, 补ddH2O至20 mL。

## **7.2** 材料与方法

### **7.2.1** 材料

试验材料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

*Pinellia ternata* Breit.；含有PBI121质粒的抗性根癌农杆菌菌种EHA105.

取冻存的农杆菌并在附有Kan、Rif的LB固体培养基上培养出单菌落，挑取单菌落至YEB液体培养基中培养，在其生长的第12-36 h的时间段内，每隔2 h左右用分光光度计测量一次*A*值，分别取*A=*0.2、0.5、0.6、1.0[116]的菌液浓度侵染半夏。

### **7.2.2** 培养基

YEB固体培养基、YEB液体培养基[107]；BXK培养基[14]；BXK液体培养基。

### **7.2.3** 方法

半夏组织的选取、摇菌、侵染及*gus*活性组织瞬时染色同第五章。侵染时间设为

5 min、10 min、15 min、30 min[105]

### **7.2.4** 部分试剂**(Kan**、**Rif、Carb**、AS)在试验中作用

Kan是一种抗生素，农杆菌中的PBI121质粒有Km抗性，外源Kan对农杆菌的PBI121质粒具有一定的筛选压力作用，不致使PBI121消失，确保实验的可行性。此外Kan还能够抑制绿色素的合成以及无抗性菌的生长[101]。Carb是一种抗菌素可以纯化农杆菌，Carb还能够抑制农杆菌的生长但对质粒无影响。另外它还有类似生长素的作用，量要适中，不能加入的太多，否则会抑制半夏的生长。Rif能够从细菌中除去不含抗性的质粒。AS能够促进PBI121质粒进入受伤的半夏组织内。四者共同完成PBI121质粒顺利进入半夏的过程[27, 117]。

### **7.2.5** 数据统计分析

运用Excel、Minitab 15、SPSS17等软件对实验数据进行极差分析和方差分析

## **7.3** 结果与分析

### **7.3.1** 不同侵染时间对半夏叶柄转化率的影响

在一定的时间范围内，随着农杆菌侵染时间的延长，*gus*瞬时表达率显著上升，当时间达到15 min时，*gus*瞬时表达率达到最大值61.48%，超过15 min后，*gus*瞬时表达率明显下降，如图7-1。



70

*gus* 瞬时表达率/%

Rate of transient expression of *gus*

60

50

40

30

20

10

0

5 10 15 30

侵染时间/min Infection Period

图7-1 侵染时间对转化的影响

Fig. 7-1 Effects of infection period on transformation frequency

### **7.3.2** 不同侵染浓度对半夏叶柄瞬时表达率的影响

农杆菌的浓度小于0.502时，对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响并不明显；随着农杆菌浓度的增大，*gus*瞬时表达率有所上升；当农杆菌的浓度超过0.502时，表达率却明显下降。所以，浓度*A*值为0.502时，*gus*瞬时表达率最大，为47.06%（见图7-2）。

50

45

*gus* 瞬时表达率/%

Rate of transient expression of *gus*

40 0.22

35

30

25

20

15

10

5

0

0.502

0.615

0.985



0.2 0.5 0.6 1

菌液浓度/*A*

Concentration

图7-2 农杆菌的侵染浓度对半夏转化率的影响

Fig. 7-2 Effects of*Agrobacterium* concentration on transformation frequency

### **7.3.3** 不同的侵染浓度及时间对半夏叶柄***gus***瞬时表达率的影响

农杆菌的浓度较低，且感染时间过短时，*gus*瞬时表达率也相对较低；当感染时间为15 min、农杆菌的浓度为0.502时，*gus*瞬时表达率最大，为86.21%；之后由于时间过长，菌液浓度过高，对叶柄的正常生长造成了一定的影响，*gus*瞬时表达率下降（见图7-3）。

100

90

*gus* 瞬时表达率/%

Rate of transient expression of *gus*

80

70

60

50

40

30

20

10

0



0.22

0.502

0.615

0.985

5 10 15 30

感染时间/min Infection Period

图7-3 根癌农杆菌感染浓度及时间对半夏叶柄转化的影响

Fig. 7-3 Effects of*Agrobacterium* concentration and infection period on transformation

对上述数据进行极差分析和方差分析可知，农杆菌的感染时间对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响极显著；虽然实验所得出的农杆菌浓度对*gus*瞬时表达率影响不显著，但农杆菌的侵染浓度仍是影响转化率的一个非常重要的因素（见表7-1）。

表7-1 方差分析

Table 7-1 Analysis of variance

| 来源 | 自由度 | SS | MS | F | P | 极差 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 浓度 | 3 | 708.41 | 236.14 | 2.87 | 0.096 | 18.0625 |  |
| 时间 | 3 | 3838.21 | 1279.40 | 15.56 | 0.001 | 42.9875 | \*\* |
| 误差 | 9 | 740.00 | 82.22 |  |  |  |  |
| 合计 | 15 | 5286.61 |  |  |  |  |  |

运用SPSS17.0再对上述数据进行多重比较可知，菌液浓度*A*为0.502、时间为15 min时，半夏叶柄*gus*瞬时表达率最大，为86.21%，且与其他组合之间差异显著，为最佳组合，见表7-2。

表 7-2 菌液浓度和侵染时间对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响

Table 7-2 Effects of bacterial concentration and infection time ongus transient expression of petiole

| 菌液浓度/A  Concentration | 感染时间/min  Infection Period | gus 瞬时表达率/%  Rate of transient expression of gus |
| --- | --- | --- |
|  | 5 | 19.44h |
| 0.22 | 10 | 38.89ef |
|  | 15 | 70.97b |
|  | 30 | 42.42de |
|  | 5 | 26.67gh |
| 0.502 | 10 | 36.67ef |
|  | 15 | 86.21a |
|  | 30 | 40de |
|  | 5 | 23.33gh |
| 0.615 | 10 | 46.67d |
|  | 15 | 60c |
|  | 30 | 30.3fg |
|  | 5 | 15.79h |
| 0.985 | 10 | 30.56fg |
|  | 15 | 40de |
|  | 30 | 30.95fg |

注：同列内不同小写字母表示差异达显著水平（*P*＜0. 05）

由实验结果可知，当侵染的浓度较低、时间过短时，半夏叶柄只是两端有蓝色斑点，中间很少被染色；而农杆菌的浓度过高、感染时间较长时，半夏叶柄受到农杆菌的毒害作用较大，所以，染色效果也较差；当农杆菌浓度为0.502、感染时间为15 min时，半夏叶柄的染色效果较好，整个叶柄都有均匀的蓝色出现，如图7-4所示。



图7-4 部分叶柄染色效果图

Fig. 7-4 Part of petiole of the staining result

## **7.4**.讨论

### **7.4.1** 不同侵染时间对半夏叶柄转化率的影响

外植体的侵染时间与筛选培养时叶柄的污染率及农杆菌对外植体的毒害作用都有很大的关系。侵染时间较短，农杆菌与伤口还没有完全接触，侵入半夏叶柄的农杆菌少，*gus*瞬时表达率就相对较低；在一定范围内，延长侵染时间有利于农杆菌的附着及*gus*瞬时表达率的提高，但是当侵染时间过长时，较多的农杆菌附着在叶柄表面，造成对叶柄的严重伤害，*gus*瞬时表达率就会下降。实验证明，侵染时间对半夏的遗传转化效率具有直接的影响，如图7-1所示。在一定范围内，随着时间的延长，半夏叶柄的瞬时表达率上升；当侵染时间为15 min时，效果最好；时间继续延长，*gu*s瞬时表达率反而下降。本实验中，要注意侵染后的外植体在滤纸上吸干要适度，明确滤纸吸干的原则是除去过量的菌体，若吸得太干会致使共培养时切口无农杆菌生长，从而影响转化效率[20]。

### **7.4.2** 不同浓度的农杆菌对半夏叶柄瞬时表达率的影响

农杆菌的浓度对半夏叶柄瞬时表达率也有较大的影响。从图7-2可以看出，当农杆菌液浓度小于0.502时，随着农杆菌浓度的增高，*gus*瞬时表达率上升，但并不明显；当浓度超过0.502时，*gus*瞬时表达率明显降低。农杆菌浓度偏低，侵入半夏叶柄的农杆菌数较少，因此*gus*瞬时表达率较低；在农杆菌浓度适中时，半夏叶柄受到农杆菌的毒害相对较小，转化率也相对较高；当农杆菌的浓度过高时，外植体受到农杆菌毒害作用较大，且容易缺氧而软腐，故*gus*瞬时表达率明显下降，同时后期脱菌困难，外植体难以存活。

### **7.4.3** 根癌农杆菌的感染浓度及时间对半夏叶柄遗传转化率的影响

根癌农杆菌的浓度及感染时间都是影响遗传转化频率的重要因子。本试验以无菌半夏叶柄为受体，对不同菌液浓度与侵染时间的组合进行研究，发现半夏叶柄对农杆菌不敏感，需较长的感染时间，同时应采用相对低的菌液浓度。

结果发现，农杆菌浓度*A*为0.502、侵染时间为15 min时，*gus*瞬时表达的蓝点最多，染色效果最好，为最佳组合。一般情况下，在浓度或侵染时间相同时，随着感染时间的延长或侵染浓度的增加，*gus*的瞬时表达率均会呈现先上升后下降的趋势。

感染时间过短或浓度较低时，在其共培养阶段农杆菌生长不良，转化频率较低；而感染时间过长或浓度很大则会对外植体产生严重的毒害作用，且脱菌较困难[19]。

## 7.5 小结与展望

影响半夏遗传转化体系建立的因素有很多，本研究对农杆菌的浓度及侵染时间进行探讨，根癌农杆菌侵染半夏幼嫩叶柄的最佳时间为15 min，最适浓度为*A*=0.5。

在基因工程学手段中，由于农杆菌介导基因转化具有一系列的优点，近年来引起了科学家们的高度重视，成为研究的热点之一[118]。但是，农杆菌的成功转化和检测比较困难，虽然通过一些报告基因或分子生物学手段可以达到目的，但却存在阳性误差，因此，如何高效的将含有目的基因的农杆菌转入植物组织中并成功有效的表达仍是一个有待于继续研究的问题[19, 110]。

# 第八章 半夏遗传转化体系中预培养和共培养时间对叶柄转化效率的影响

相关实验证明，受体材料是否预培养是提高植物遗传转化效率的关键因素之一，但是，在对半夏的遗传转化研究中发现，不经过预培养阶段半夏叶柄的转化率较高

[19,44]. 外植体与细菌在共培养阶段，主要进行的是T-DNA转移的过程，时间过短，则转移过程不能完成；若时间过长，则会因为菌体的大量繁殖而对共培养材料造成严重的伤害，不利于植物的再生且不易脱菌。因而，共培养时间和预培养时间对转化效率的提高一样重要[55]。本课题旨在找到以半夏叶柄为受体材料的遗传转化体系中，预培养和共培养时间对叶柄转化效率的影响，进一步优化半夏的转基因技术。

## **8.1** 材料与方法

### **8.1.1** 材料

供试材料“宿半夏”试管苗由资源植物生物学安徽省重点实验室提供，将生长30 d左右无菌试管苗的叶柄剪成1 cm左右的小段，作为遗传转化接种的外植体，分化培养基为MS+1.0 mg·L -1 6-BA+0.5 mg·L -1 IAA+5％蔗糖[14]。含有PBI121质粒根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens)*菌株EHA105有本实验室保存，该质粒上含有Kan抗性基因和*gus*报告基因。

### **8.1.2** 方法

先将叶柄置于分化培养基上预培养一段时间，再用农杆菌侵染。预培养时间为0 d，2 d，4d；共培养时间设为1-5 d，共培养后进行选择培养。

细菌的培养、农杆菌的侵染、*gus*报告基因的检测等详见第五章。

### **8.1.3** 数据统计分析

统计不同时间处理下的叶柄中*gus* 的瞬时表达率，运用Excel、Minitab 15、

SPSS17.0等软件对实验数据进行极差分析和方差分析

## **8.2**.结果与结论

### **8.2.1** 预培养时间对半夏遗传转化效率的影响

试验发现，不经过预培养的半夏叶柄，其瞬时表达率较高，达到了63.30%。而随着预培养时间的延长，叶柄的瞬时表达率显著降低，见表8-1。研究发现，虽然预培养可以促进细胞的分裂，但延长预培养时间，可能会导致外植体进入共培养阶段时细胞的分裂状态已经不利于外源DNA的整合，从而使转化率降低。

表8-1 预培养时间对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响

Table 8-1 Effects of pre-culture time on gus transient expression of petiole

| 预培养时间/d | 0 | 2 | 4 |
| --- | --- | --- | --- |
| 瞬时表达率/℅ | 63.30a | 46.00b | 30.30c |

注：同行内不同小写字母表示差异达显著水平（*P*＜0. 05）。

### **8.2.2** 共培养时间对半夏遗传转化效率的影响

作为整个遗传转化过程中的重要环节，在农杆菌和外植体的共培养期间，主要完成的是附着和T-DNA的转移与整合。共培养时间的长短直接影响到目的基因整合及得到转化细胞的数量，从而影响转化效率。随着共培养时间的增加，半夏叶柄的瞬时表达率呈先上升后下降的趋势。在3 d时达到最高，为58.41℅（见表8-2），此时叶柄的周围出现肉眼可辨的微菌落。若共培养时间继续延长，农杆菌大量繁殖从而包裹在叶柄的周围，后期脱菌较困难，同时造成叶柄白化死亡，转化率反而会下降。此外，为了使叶柄与共培养基充分接触，有利于AS作用于农杆菌，半夏叶柄要平铺于共培养基上。

表 8-2 共培养时间对半夏叶柄*gus*瞬时表达率的影响

Table 8-2 Effects of co-culture time on gus transient expression of petiole

| 共培养时间/d | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 瞬时表达率/℅ | 24.30c | 33.64bc | 58.41a | 36.67b | 30.30bc |

注：同行内不同小写字母表示差异达显著水平（*P*＜0. 05）。

## **8.3** 讨论

分生细胞的生理状态[29]、细胞分裂及DNA合成的活跃程度[42]都是植物组织在生长发育过程中影响农杆菌吸附和整合的必需条件。对小麦[57]等植物遗传转化的研究中发现，预培养可促进外植体的细胞分裂，提高基因的遗传转化效率，然而，在北海道黄杨的报道中，外植体预培养反而使转化率降低[119]。本试验通过预培养时间对遗传转化效率的影响，确定半夏叶柄对农杆菌最敏感的时期。研究发现，不经预培养的半夏叶柄有可能在共培养阶段具有细胞分裂的最佳状态，从而有利于农杆菌的附着和T-DNA的转移，瞬时表达率最高。此外，共培养时间过短，则不利于农杆菌的附着、T-DNA的转移及整合；若过长，则农杆菌大量繁殖，对受体材料造成严重的伤害，同时后期脱菌较困难，抑制了外源基因的遗传转化。

# 第九章 根癌农杆菌介导***sHSP***基因对半夏的遗传转化

植物热激蛋白（*HSP*）是一组非常保守的蛋白质分子家族，它们主要起分子伴侣、热防御和稳定细胞结构等功能[120]。小热激蛋白(small heat shock proteins, *sHSP*)是一类分子量为15–42 kD的小分子热激蛋白，在植物体中作为分子伴侣具有抵抗高温、低温、盐害、干旱和氧化胁迫等各种逆境胁迫的功能[121]。半夏热激反应是半夏抵抗不良环境的一种防御机制，在高温胁迫过程中，如果能用基因工程方法增强半夏体内热激蛋白基因的表达，使半夏能忍受热或冷及其后环境的影响，无疑会带来巨大的经济价值。

在植物转基因技术中，农杆菌介导法虽然具有一系列的优点且应用广泛[122]，但由于半夏属单子叶植物，不是农杆菌的天然寄主，农杆菌介导的单子叶遗传转化比较困难，因而，目前有关半夏农杆菌遗传转化方面的报道很少。贾永芳[19]等利用农杆菌介导法初步探索了贵州半夏的遗传转化，获得了抗性愈伤，但未获得转基因植株；王新颖[44]等利用农杆菌介导法获得转*ipt*基因贵州珍珠半夏植株，但是转化效率仍较低，为1.27%。本研究以道地药材“宿半夏”为材料，以含有目的基因的根癌农杆菌EHA105为介导受体，对半夏叶柄进行了目的基因的遗传转化，为半夏分子育种奠定基础。

## **9.1** 材料与方法

### **9.1.1** 材料

根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105和表达载体pBI121由甘肃农业大学司怀军教授赠送；*sHSP*基因（852 bp）由本实验室克隆并通过GeneBank注册（JQ390411）；含*CaMV35S*: *sHSP* 表达元件的表达载体pBI121-*sHSP*（图9-1）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构建并保存，该载体上携带有新霉素磷酸转移酶基因（*npt*Ⅱ基因）和*gus*报告基因。供试材料“宿半夏”试管苗由资源植物生物学安徽省重点实验室提供，将生长30 d左右无菌试管苗的叶柄剪成1 cm左右的小段，作为遗传转化接种的外植体，分化培养基为MS+1.0 mg·L -1 6-BA+0.5 mg·L -1 IAA+5％蔗糖[14]。



### **9.1.2** 仪器与设备

图9-1 表达载体pBI121-*sHSP*

Fig. 9-1 Construct of expression vectors pBI121- *sHSP*

ABI7300定量PCR仪（美国ABI公司）、热循环仪、超净工作台（上海sanfa公司）、Z-300K 型台式高速冷冻离心机（德国Sigma 公司）、CP 213 型电子天平、

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）、Fluor Chem FC2凝胶成像系统、微量移液器（大龙）、SZ-1型快速混匀器、Ultra Genetic超纯水纯化系统。

### **9.1.3** 试剂及工具酶

总DNA提取采用生工植物基因组DNA小量抽提试剂盒、RNA提取采用皂土法、质粒提取采用上海生工生物SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒、PCR-SeLect TM cDNA 反转录试剂盒购自Clontech 公司、mRNA 纯化试剂盒购自大连宝生物

（Takara）公司、T4 DNA Ligase （Takara）、限制性内切酶XbaⅠ和BamHⅠ、氯仿、异丙醇、乙醇、DEPC、X-Gal、IPTG、水饱和酚，醋酸钾等均为分析纯，购于上海生工生物技术有限公司。

### **9.1.4** 方法

#### **9.1.4.1** **s*HSP***基因的获得

通过GeneBank（JQ390411）查询，得到s*HSP*基因的序列，然后通过上海生工生物人工合成s*HSP*基因。利用Primer Premier 5软件设计特异性引物，同时加入酶切位点，sense primer: （BamH1GGATCC 或Xba1T'CTAGA ）ATGGACGTCAGGATGTTGGGA; Antisense primer: （BamH1GGATCC 或

Xba1TCTAGA）AAAAAGACCATTAGACGACC，对人工合成的目的基因T-Easy载体进行PCR扩增。PCR反应体系为25μL: ddH2O14 mL，10×PCR buffer 2.0μL，25 mmol·L -1 MgCl22.0μL，10μmol·L-1 dNTP 1.0μL，10μmol·L-1正反引物各2.0μL，模版cDNA 1.0μL(50-80 ng), 5 U·µL -1 Taq聚合酶1.0μL. PCR循环为94 ℃预变性3 min，

94℃变性30 s，52℃退火30 s，72℃延伸1 min，循环30次，最后72 ℃充分延伸5 min。取PCR产物10μL经1℅琼脂糖凝胶电泳分离并照相**。**

#### **9.1.4.2** **PCR**产物的载体连接反应

##### **9.1.4.2.1** 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。4000 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。

##### **9.1.4.2.2** **PCR**产物克隆入**PMD**TM**18-T Vector**

（1）在200μL无菌离心管中配制10μL反应体系：纯化后的PCR产物4μL

PMDTM18-T Vector 1μL

连接Solution I 5μL

总体积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。

##### **9.1.4.2.3** 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，每管加连接产物10μL

轻轻混合，在冰上放置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，用水浴将培养基加温至37℃，然后将反应管转移到37℃摇床上，温育1 h左右（摇动速度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节青霉素(100μg·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。

##### **9.1.4.2.4** 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。

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 加入量 |
| 10×PCR reaction buffer | 2 μL |
| dNTPs(10 μmol·L-1) | 1 μL |
| sense primer (10 μmol·L-1) | 1 μL |
| Antisense primer (10 μmol·L-1) | 1 μL |
| MgC12(25 mmol·L -1) | 2 μL |
| Tag 酶(5U·μL-1) | 1 μL |
| H2O | 12 μL |
| 总体积 | 20 μL |

（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℃。

（3）PCR反应程序为：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，送生工生物工程（上海）有限公司进行测序检验。

#### **9.1.4.3** 目的基因重组质粒的构建

##### 9.1.4.6.1 载体质粒PBI121的提取

采用上海生工生物SanPrep 柱式质粒DNA 小量抽提试剂盒提取大肠杆菌中的

PBI121质粒，电泳检测，一般有三条带，超螺旋（CCC）、开环(OC) 和线型(LC)，以超螺旋型质粒为主。

##### **9.1.4.3.2** 酶切反应

将测序验证合格的PMDTM18-T Vector与上述提取出的PBI121质粒混合，外源片段与载体按DNA 摩尔含量3: 1加入，然后加入限制性内切酶BamH1GGATCC或者

Xba1TCTAGA进行酶切。反应程序如下：

|  |  |
| --- | --- |
| ddH2O | 16 μL |
| 10×buffer | 2 μL |
| 质粒 DNA(1-2 μg•μL-1) | 1 μL |
| 限制性酶（15 U•μL-1） | 1 μL |
| 总体积 | 20 μL |

混匀，稍离心，37℃酶切3-4 h。65℃保温10 min，灭活限制酶

##### **9.1.4.3.3** 目的基因与植物载体重组

（1）取8μL上述产物，加入1μLT4连接酶，10×连接缓冲液1μL，在50 ℃处理10 min

使粘端变性，然后立即放入冰中5 min。

（2）粘端连接采用16℃，连接4 h以上，为获得较高的连接效率，一般要求连接过夜。

（3）制备大肠杆菌感受态细胞100μL，取过夜连接产物2-5μL加入1.5 mL的离心管中，混匀，冰上放置30 min。

（4）42 ℃热激90 s。（不要摇动）

（5）立即置冰上3-5 min。

（6）加1 mL LB培养基。

（7）37 ℃培养1-1.5 h(约150 rpm摇动)。

（8）离心，去上清，余下的100-150μL混匀涂皿（抗生素/IPTG/X-Gal）。

（9）37 ℃培养16-24 h，非转化子为蓝斑，转化子为白斑。

##### **9.1.4.3.4** **pBI121-*sHSP***重组质粒的获得

挑取上述转化子白斑，加入LB液体培养基行培养，获得含有重组质粒的大肠杆菌。提取质粒，PCR检测后，用与以上相同的方法将重组质粒转入根癌农杆菌EHA105中。

#### **9.1.4.4** 根癌农杆菌介导法转化半夏叶柄及抗性植株的获得

从含50 mg·L -1Kan和50 mg·L -1Rif的平板上挑单菌落，加入含有同样浓度抗生素的YEB液体培养基中，振荡培养（28℃，160 r·min-1，暗培养）36 h左右，将摇至对数期的菌液倒入50 mL的离心管内，于5000 r·min-1离心6~8 min。将离心管内的上清液去掉，加入液体分化培养基至50 mL重悬菌体，吸取10 ml至空离心管中，稀释5倍，在波长600nm下测其吸光度*A*，使其*A*600 nm＝0. 5~0. 6。再取悬浮的菌体稀释同等倍数，定容至约20 mL，加入浓度为40-80 mg·L -1的AS。取出不经预培养的

半夏叶柄放入菌液中，侵染10-15 min，无菌滤纸吸去多余的菌液，接种于无抗生素但含有相同浓度AS的分化培养基上，黑暗共培养3-4 d，转接在筛选培养基（MS+1.0 mg·L -1 6-BA+0.5 mg·L -1 IAA+5％蔗糖+100 mg·L -1 Kan+350 mg·L -1 Carb）上进行选择

培养，25 d左右在叶柄的两端分化出抗性的试管小块茎。试管块茎在含有100 mg·L -1

Kan分化培养基中进行分化培养，10 d左右就可以生根，20 d后长成健壮的小苗。对抗性转化苗进行*gus*染色和PCR检测，结果表明外源基因*sHSP*已经整合到半夏基因组中。

#### **9.1.4.5** 转基因植株的鉴定

##### **9.1.4.5.1** 植物总**DNA**的提取

采用上海生工生物植物基因组DNA小量抽提试剂盒提取半夏的基因组DNA，电泳并紫外吸收法检测DNA纯度和浓度。DNA纯品OD260/OD280为1.8，当核酸样品中污染有蛋白质或酚，其OD260/OD280值将明显偏低（280 nm 为蛋白质的吸光值）；当样品中有RNA污染时，其比值将偏高。

##### **9.1.4.5.2** **PCR**鉴定

用上述方法提取抗性半夏植株幼嫩组织的基因组DNA. 根据s*HSP*基因的序列设计特异性引物sense primer: (BamHⅠGGATCC 或XbaⅠTCTAGA) ATGGACGTCAGGATGTTGGGA ; Antisense primer :

（BamHⅠGGATCC或XbaⅠTCTAGA）AAAAAGACCATTAGACGACC. 以未转化植株

DNA为阴性对照，以质粒DNA为阳性对照同时进行PCR扩增。PCR反应体系为25μL: ddH2O14 mL，10×PCR buffer 2.0μL，25 mmol·L -1 MgCl22.0μL，10μmol·L-1 dNTP 1.0μL，10μmol·L-1正反引物各2.0μL，模版DNA 1.0μL(50~80 ng), 5 U·µL -1 Taq聚合酶1.0μL。

PCR循环为94℃预变性3 min，94℃变性30 s，52℃退火30 s，72℃延伸1 min，循环30

次，最后72℃充分延伸5 min。取PCR产物10μL经1℅琼脂糖凝胶电泳分离并照相。

#### **9.1.4.6** 数据统计分析

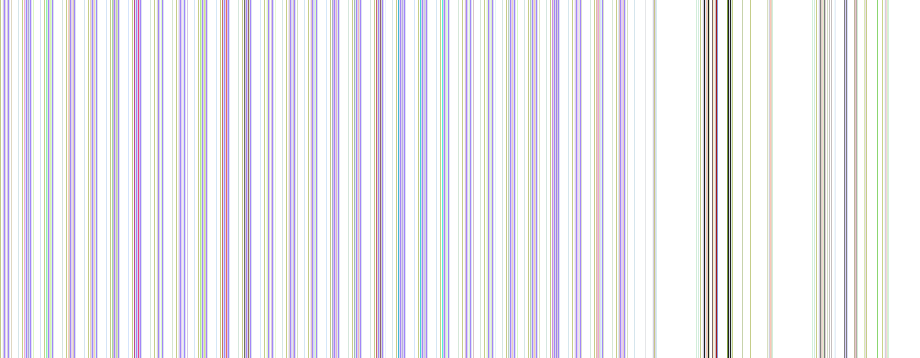
采用Excel 2003、Minitab 15、SPSS17对数据进行统计分析。

## **9.2** 结果与分析

### **9.2.1** 转化植株的获得

用上述优化的过程对叶柄进行感染，共培养3~4 d（图9-2-A），经Kan筛选后可得到由叶柄再生的抗性试管小块茎（如图9-2-B）。结果发现，多数叶柄逐渐出现白化

46



**A**

**B**

**C**

**D**

现象，最终死亡，为逃逸体；少数出现半白半绿的现象，为嵌合体。将*gus*染色呈阳性叶柄上的小块茎剪下并直接接种到含有100 mg·L -1Kan选择压的分化培养基内，诱导可获得抗性小苗（图9-2-C），抗性小苗在无激素的MS基本培养基上可形成正常的小植株（图9-2-D）。对215个半夏叶柄进行外源*sHSP*基因的遗传转化，共得到39株抗性植株。对抗性植株进行*gus*组织化学染色，仅有6株染色呈阳性。然后对这6株抗性半夏进行PCR检测，全部可以扩增出852 bp的特异性片段（图9-3），转化率为2.79℅。

**图9-2** **半夏遗传转化的结果**

**Fig.** **9-2** **Transformation of*Pinellia ternata* Breit**

**A**叶柄的共培养 **B** 叶柄再生的抗性组织 **C** 抗性组织分化出的抗性小苗 **D** 抗性苗形成的正常小植株

### **9.2.2** 转化植株的**PCR**检测

剪取抗性植株试管苗的幼嫩叶片或叶柄，试剂盒提取基因组DNA。根据*sHSP*基因的已知序列设计特异性引物，以未转化植株的DNA为阴性对照（－），重组质粒pBI121-*sHSP*为阳性对照(+)进行PCR检测。如图9-3所示，抗性转化植株扩增出的特异条带虽然比较微弱，但与阳性对照的特异条带一致，阴性对照则没有扩增出任何条带，表明外源*sHSP*基因已整合进半夏植株的基因组中。



图 9-3 转基因植株的PCR检测

Fig. 9-3 PCR assay for transgenic plants

M: DNA maker；－：阴性对照；＋：阳性对照；P：转基因植株

## **9.3** 讨论

半夏喜温和、[湿润气候](http://baike.baidu.com/view/1303591.htm)，耐阴；怕干旱，忌高温，畏强光，在阳光直射或水分不足条件下，易发生倒苗。半夏属单子叶植物，尽管试验证明单子叶植物可以被农杆菌所转化[123]，但其本身对农杆菌不敏感等一些生理特点造成转化效率较低[124]。因而，农杆菌介导法进行半夏的遗传改良，首要问题是建立和优化农杆菌介导的遗传转化体系[44]。在此基础上，将*sHSP*基因转入半夏植株，有望获得抗“倒伏”的半夏新种质。

研究发现，一系列因素影响着农杆菌介导半夏外源基因的遗传转化效率，其中菌

液浓度和侵染时间尤为重要[125]。菌液浓度较低或侵染时间较短，农杆菌不易附在外植体上，T-DNA与植物基因组DNA不能有效进行整合，转化效率较低；而菌液浓度过高或侵染时间过长，农杆菌会外植体造成过度伤害而致使切口处褐化、腐烂严重，且后期除菌困难，从而大大降低转化效率[126]。本试验选取浓度*A*为0.5、侵染15 min作为适宜的转化条件。此外，加入一定浓度的外源酚类化合物如AS等，能够有效的诱导Vir区，激活其他基因的表达，进一步促进T-DNA的转移[6]，提高遗传转化效率。

AS加入的方式有多种[122]，一般认为，农杆菌在共培养16 h后才进行遗传转化，而外源AS可缩短共培养的时间，因此，在共培养基中加入为最佳[103]。

Kan能干扰植物细胞中叶绿体及线粒体的蛋白质合成，引起绿色植物的黄化，最终导致死亡[86]，有些叶柄由于成功转化pBI121质粒而对其产生抗性，从而可以筛选出抗性株。在基因的遗传转化过程中，假转化体的出现是不可避免的，我们只能尽量降低其发生的频率。本试验发现，多数转化叶柄在含有100 mg·L -1 Kan选择压的培养基上筛选效果较好，假转化体相对较少，视为最适筛选压。

分生细胞的生理状态[29]、细胞分裂及DNA合成的活跃程度[42]都是植物组织在生长发育过程中影响农杆菌吸附和整合的必需条件。研究发现，不经预培养的半夏叶柄有可能在共培养阶段具有细胞分裂的最佳状态，从而有利于农杆菌的附着和T-DNA的转移，瞬时表达率最高。同时，共培养3~4d，转化效率普遍较高，共培养时间过短或过长都不利于外源基因的遗传转化。此外，pBI121质粒上含有*gus*报告基因，通过*gus*基因的瞬时染色并观察，是进行外植体筛选的最佳手段。然而，农杆菌本身因含*gus*基因而呈现蓝色会给检测工作带来严重的干扰。如果外植体上农杆菌没有脱干净，即使通过检测发生了蓝色反应，也不能说明它就是转基因植株[104]。

本研究只进行了报告基因的*gus*组织化学检测和目的基因的PCR检测，然而获得优良的半夏转基因植株是个漫长的历程，还要对阳性植株进行进一步的检测，以提供外源基因整合和表达的强有力分子证据。此外，进行抗逆性试验，检测与其相关的生理生化指标，并对半夏产量和品质进行全面综合性评价，是将来必要的研究方向[44]。

参考文献

[1]中国医科学院药物研究所.中药志：第2册[M].第2版.北京：人民卫生出版社,1993: 38。

[2]吴林.半夏高温倒苗过程中总RNA及基因差异表达片段的研究[D].2008,华中农业大学.

[3]刘跃辉，周哲健.人工栽培半夏的气候条件分析[J].中国农业气象，2005,26(2)：129-130.

[4]顾德兴，李云香，徐炳声.半夏的繁殖生物学研究[J].植物资源与环境，1994, 3(4)：44-48.

[5]薛建平，张爱民，方中明，等. 水杨酸对半夏植株生长的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(12):1134-1136.

[6]冉懋雄.名贵中药材绿色栽培技术—半夏、水半夏、附子[M].北京：科学技术文献出版社，

2002:1.

[7]宋金斌，黄裔，徐光生，等. 喷施亚硫氢钠液对半夏的增产效应[J]. 时珍国药研究,1997,8(1):94-96.

[8]潘炳文，沙启营，毛文岳，等.半夏覆盖麦秸（糠）预防半夏倒苗实验观察[J].中国中药杂志，1996, 21(9)：532。

[9]刘启先，朱秀芳.宿半夏倒苗机理及预防技术研究[J].安徽农业科学，2003,31(4)：692-693.

[10]薛建平，丁勇，张爱民，等.高温胁迫下半夏倒苗前后保护酶活力的变化[M].中国中药杂志，2004,29(7)：641-643.

[11]任家惠，陈克润，徐琼芳.三叶半夏试管苗器官的诱导[J].植物生理学通讯,1983, 4: 44。

[12]万美亮，陈宏康，詹亚华，周吉源。半夏组织培养与快速繁殖研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(9):526.

[13]张丽梅，陈蓄瑛，陈瑞云. 半夏组织培养一次性成苗技术研究初报[J]. 福建农业科技,2003，(l):20.

[14]薛建平，朱艳芳，张爱民，柳俊。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.

[15]罗成科，彭正松，蔡鹏.三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术[J].广西植物，2007,27(2)：260-264.

[16]胡鹏，宋常美，季祥彪，文晓鹏，乔光，王新颖.贵州珍珠半夏高频再生体系的建立与优化[J].种子，2008(5)：35-38.

[17]武宗信，郝建平，王晓立，解红娥. 半夏快速繁殖研究[J]. 山西大学学报（自然科学版）,2005,28(3)：315-317.

[18]吴伯骥，肖亮，覃章铮.中国科学院成都生物研究所从三叶半夏(*Pinellia ternata* Breit)叶肉原生质体再生植株[J].中国科学，1986,16(3)：267-272.

[19]贾永芳.半夏离体培养研究及遗传转化的初探[D].西南农业大学园艺园林学院硕士毕业论文,2003。

[20]王新颖.农杆菌介导法转ipt基因创造半夏新种质[D].贵州大学硕士毕业论文,2009。

[21]王关林，方宏绮，那杰.外源基因在转基因植物中的遗传特性[J].遗传，1996, 18(6)：37-41.

[22]余淑文.《植物生理与分子生物学》.北京：科学出版社（第一版）,1992, 63-83.

[23]蒋玉宝，于元杰.农杆菌在单子叶植物上的研究进展[J].中国农学通讯，2005,21(10)：4.7-52.

[24] Ishida Y, SaitoH, Ohta S, HdeiY, Komari T, KumashiroT. High effieieney Transformation of maize(Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. *Nat Biotechnol*.1996,14(6):745-750.

[25] Cheng M, Fry J E, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. Genetic transformation of Wheat mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. *plant Physiol*,1997,115(3):971-98.

[26]夏光敏，李忠谊，贺晨霞，陈惠民，RichardB.根癌农杆菌介导的小麦转基因植株再生[J].植物生

理学报,1999,25(l):22-28.

[27]贺晨霞，夏光敏. 农杆菌介导单子叶植物基因转化研究进展[J]. 植物学通报,1999,

16(5):567-573.

[28]王钰.农杆菌介导玉米自交系受体材料筛选及遗传转化体系的建立[D].四川农业大学硕士毕业论文,2006。

[29]李宝健，欧阳学智.应用农杆菌Ti 质粒系统将外源基因转入籼稻细胞研究[J].中国科学 B

辑,1990,20(2):144-149.

[30]刘志学，马向前，何艺园，徐亚南，叶鸣明，唐克轩.农杆菌介导遗传转化中辅助处理方法的改良[J].复旦大学学报（自然科学版）,1999,38(5)：601-604.

[31]杨剑波，许智宏. 影响根癌农杆菌附着禾谷类作物培养细胞的因素[J]. 实验生物学报，1993, 26(1)：1-7.

[32] Stachel S E, Messens E. Identification of the signal molecules produeed by wounded Plant cells that activateT-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens[J]. *Nature*,1985,318:624-629.

[33] Bolten G W, Nester E W, Gordon M P. Plant Phenolic compounds induce expression of the Agrobacterium tumefaciens loci needed for virulence[J]. *Science*,1986,232(4753):983-985.

[34] Cangelosi G A, Ankenbauer G, Nester E W. Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal Protein[J]. *Proc Natl Acad sci USA*,1990,87(17);6708-671

[35] Shimoda N, Toyoda-Yainamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Machida Y. Control of expression of *Agrobaeterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides[J]. *Proc Natl Acad sci USA*,1990,87:6684-6688.

[36] Zambryski P. Basie processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells[J]. *Ann Rev Genet*,1988,22: l-30.

[37] Jia W, Davies W J. Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced ABA signals[J]. *Plant Physiol*,2007,143:68-77.

[38] Narasimhulu S B, Deng X B, Sarria R, Gelvin S B. Early TranseriPtion of Agrobacterium T-DNA Genes in Tobacco and Maize[J]. *Plant Cell*,1996,8(5):873-886.

[39] Kartzke S, Saedler H, Meyer P. Molecular analysis of transgenic Plants derived from transformation of protoplasts at various stages of the cell cycle[J]. Plant Sci,1990,67:63-72.

[40] Villemont E, Dubois F, Sangwan R S, Vasseur G, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel B S. Role of the host cell cycle in the Agrobacterium-mediated genetic transformation of Petunia: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer[J]. *Planta,*1997,201:160-172.

[41] Sonti R V, Chiurazzi M, Wong D, Davies C S, Harlow G R, Mount D W, Signer E R. Arabidopsis mutants deficient in T-DNA integration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1995,92:11786-11790.

[42] Gheysen G, Van Montagu M, Zambryski P. Integration of Agrobaeterium tumefaciens transfer DNA(T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1987,84(17):6169-6173.

[43] Schlappi M, Barbara H. Competence of immature maize embryos for Agrobacterium-mediated gene transformation[J]. *PlantCell*,1992,4:7-16.

[44]王新颖.文晓鹏.胡鹏.利用农杆菌介导法获得转ipt 基因半夏植株[J]. 华中农业大学学

报.2009.28(6):664-668.

[45]许东晖，李宝健，刘煌，黄志纤，古练权，对根癌土壤杆菌矶r区基因具诱导作用的水稻信号分子的分离和确定[J].中国科学C辑，1996,26(6):535-541.

[46] Horsch B, Fry T E, Hoffmann N L, Eichholtz D, Rogers S G, Fraley R T. A simple and general method for transferring genes into Plants[J]. *Science*,1985,227(4691):1229-1231.

[47] Tingay S, Mcelray D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R. Agrobacterium

Tumefaciens-mediated barley transformation[J]. *Plant J*.,1997,11:1369-1376.

[48] Uze M, Wunn J. Plasmolysis of Precultured immature embryos improves Agrobacterium mediated gene transfer to rice(Oryza sativa L.)[J]. *Plant Sci*,1997,130:87-95.

[49] Trick H N, Finer J J. SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation[J].

*Transgenic Res,*1997,6:329-336.

[50] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of sobean[Glycine max(L) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. *Plant Cell ReP*,1998,17:482-488.

[51] Mooney P A, Goodwin P B, Dennis E S, LIewellyn D J. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer into wheat tissues[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*,1991,25(3):209-218.

[52]丛郁，渠慎春，乔玉山，姚泉洪，章镇.超声波直接转导外源基因转化八棱海棠的技术研究[J].

南京农业大学学报.2007, 30 ( 3): 42-46.

[53] Lippincott J A, Lippineott B B. Microbial adherence to Plants[J]. *Recept Recognition Ser B*,1980,6:377-398.

[54] ZuPan J R, Zambryski Y T. Transfer of T-DNA for *Agrobacterium tumefaciens* to the Plant cell[J].

*Plant Phsiol*,1995,107:1041-104.

[55]刘稚，樊梦康，崔澄.土壤根癌杆菌体外转化胡萝卜悬浮培养细胞[J].中国科学，1987, 17(5)：507。

[56] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice(Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *PlantJ*,1994,6(2):271-282.

[57] Ding L, LI S, GAO J, et al. Optimization of *Agrobacterium* mediated transformation condition in mature embryos of elite wheat[J]. *Mol Biol Rep,* 2009, 36: 29-36.

[58]徐品三,刘岚，夏秀英.农杆菌介导东方百合“西伯利亚”遗传转化体系建立[J].大连理工大学

学报,2008,48(5):641-645.

*[59]* Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium*

In Indica rice[J]. *Plant Cell ReP*,1996,15(10):727-730.

[60] Vanber K rol R. A., M. Leoln, B. Beld, N. M. Joseph, and R. S. Anoine. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited marker of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. *Plant Cell*.1990,2:921-299.

[61] Degreef W., R. Delon, M. DeBlock, J. Leemans, and J. Botterman. Evaluation of herbicide resistance in transgenetic crops under field conditions[J]. *Biotechnology*.1989, 7: 61-64.

[62] Sterber W. R, and L. Willmtzer. Transgenetic tobacco plant expressing abacterial detoxifying enzymeare resistance to 2, 4-D[J]. *Biotechnology*. 1989, 7: 811-816.

[63]李冰，刘洪涛，孙大业，等.植物热激反应的信号转导机理[J].植物生理与分子生物学学报

2002,28(1):l-10.

[64] Cunshuan X., Zehua X., Jinyun Y., Advance in research on biological function and transcriptional control of heat shock proteins[J]. *Developmental& Repreducetive biology*. 2002,11:130-136.

[65] Trissieres A., Mitehell A. K. Some new Proteins induced by temperature shock in Drosophila [J]. *Mol. Biol*. 1974, 84:389-398.

[66] Soti C., Csermely P., Molecular chaperones and the aging process[J]. *Biogeronol,*2000,22:8-12.

[67] Lindquist S, Kim G Heat shock protein 104 expression is sufficient for the Molecularance in yeast[J]. *Proc. Natl. Aead. Sci. USA*,1996,93: 5301-5306.

[68] Liu J., Shono M. Molecular cloning mitochondria and endoplasmic retiunlum locatized small heat shock protein from tomato[J]*. Acta Bot Sin*(植物学报),2001,43:138-145.

[69] Goorpoulos C. The emergence of the chaperone mechanism[J]. *Ternds Biochem. Sci*,1992,

17:295-299.

[70] Ken J. L., Gurley W. B., Nagao R. T., et al. Molecular from and Function of the plant[J]. *genonce New York: plenum press*,1985,81-85.

[71] Song S. Q, Kenneth, Fredlund, et al. Changes in Low-Molecular weight Heat shock Protein 22 of Mitochondria During High temperature Accelerated Ageing of Beat vulgaris[J]. *Seeds*,2002,1577(l):17-21.

[72] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 1995,11:444-469.

[73]计红，杨焕民，吴永魁.热应激蛋白研究进展及其应用前景[J].生物学杂志，2005,22（4）:1-4.

[74] Sandra A. H., Fred D. J., Roles of molecular chaperones in protein degradation[J]. *The Journal of Cell Biology*,1996,132(3),255-258.

[75]王彦波，周绪霞，许梓荣.热应激蛋白的研究进展[J].免疫学杂志，2003, 19(3)：79-82.

[76]郭巧生，贺善安，刘丽。半夏种内不同居群生长节律的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(4):233-236.

[77]李成慧，蔡斌，单丽丽，顾铭洪.应用正交设计法探讨蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导[J].扬州大学学报（农业与生命科学版）, 2004, 25(2)：76-78.

[78] 张瑾，谈献和.半夏资源研究进展[J].中国医药信息杂志,2010,17(5):104-105.

[79]薛建平，黄月琴，张爱民. 怀姜试管姜诱导技术的研究[J].中国中药杂志，2007, 32（16）：1621-1624.

[80]秦静远. TDZ在植物组织培养中的应用[J].杨凌职业技术学院学报，2005,4（2）:72-76.

[81]张志宏，景士西，王关林. TDZ对苹果叶片离体再生不定芽的效应（简报）[J].植物生理学通讯

*Plant Physiology Communications*,1997,33(6):420-423.

[82]梁海永，姚伟明，杜鸿云，郑均宝，杨敏生. 苹果叶片再生体系建立研究[J]. 河北林果研究，2005,20（3）:247-254.

[83] Preece J E, Huetteman CA, Ashby W C. Mictoand cutting propagation of silver maple: Results with adult and juvenilepr opagules[J]. *Jam Soc Hortic, Sci,* 1991,116: 142-148.

[84]陈肖英，叶庆生，刘伟. TDZ研究进展（综述）[J].亚热带植物科学*Subtropical Plant Science*，

2003,32(3):59-63.

[85]汉丽萍，赵月玲. 半夏叶片愈伤组织诱导和快速繁殖研究[J]. 通化师院学报（自然科学）,1995,2(2):50-51.

[86]王紫萱，易自立.卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J].中国生物工程，2003, 23(6)：9-12.

[87]朱艳芳，郭朝阳，薛建平，张爱民，盛玮，宋运贤.离体条件下药用菊花不同品种羟脯氨酸耐受性比较研究[J].中国中药杂志，2011,36(19)：2625-2628.

[88]白雨，高山林. 半夏组织培养诱导胚状体的正交试验[J]. 植物资源与环境学报,2003, 12(4)：16-20.

[89]李竹英，钱艳红，毛绍春. 不同激素对金鱼草茎尖组织培养效果初探[J]. 北方园艺，

2006(3):130-131.

[90]李乃坚，袁四清。Kan胁迫对转基因烟草种子发芽的影响[J]. 广东农业科学, 1998，(4)：13-15.

[91]刘尚前，王罡，季静.大豆体细胞胚对Kan和PPT敏感性的研究[J]. 河北北方学院学报（自

然科学版）, 2007, 23(1):91-92.

[92] Lee L. Turfgrass bioteehnology[J]. Plant Sci, 1996, 115: l-8.

[93]杨广东，朱祯.几种抗生素对大白菜种子发芽及离体下胚轴再生的影响[J].华北农学报,2002,

17(1):55-59.

[94]黄俊轩，倪志明，桂毓，解瑞彬，刘艳军，杨静慧，吕成功.金鱼草遗传转化中Kan筛选压力的确定[J]. 天津农学院学报，2009(16)：2-3.

[95]周春丽，郭卫东，路梅，陈瑾，李玉萍.农杆菌介导佛手遗传转化主要影响因素的研究[J].热带亚热带植物学报，2006,14(5)：374-381.

[96]胡繁荣，夏英武. 结缕草农杆菌介导遗传转化影响因子的研究[J]. 西北农业学报,2004,13(1):24-27.

[97]张荣，王国英，张晓红，等.根癌农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立[J].农业生物技术学报，2001, 9(1)：45。

[98]张振霞，刘萍，杜雪玲，等.农杆菌介导的GUS基因对多年生黑麦草转化的研究[J].广西植物，2007,27(1)：121-126.

[99]王罡，季静，王萍，等. 大豆基因型对根癌农杆菌菌株敏感性的研究[J]. 遗传,2002,24(2):297-300.

[100]赵桂兰，刘尚前，季静，等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[J]. 大豆科学，2001.20(2)：84-88.

[101]周思军，李稀臣，刘昭军，等.大豆农杆菌介导转化系统的优化研究[J].东北农业大学学报.2001.32(4)：313-319.

[102]傅荣阳，孙勇如，贾世荣，等编著.高等植物遗传转化研究的发展与应用[M].植物遗传转化技术手册.中国科学技术出版社.1994.

[103]邓艺，曾炳山，赵思东，刘英.乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J]. 安徽农业科学，2009, 38(5)：1-4.

[104]陶兴林. *gus*基因在农杆菌和甜瓜中的表达研究[J].北方园艺，2008(4)：215-217.

[105]许耀，贾敬芬，郑国昌.酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效表达[J].科学通报，1988,32(22)：1745-1748.

[106]付永彩，孙传清，李自超.农杆菌介导的抑制衰老的嵌合基因转化籼米稻的研究[J].农业生物技术学报，2000,8(1)：8447-8551.

[107]郝贵霞，朱桢，朱之悌. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨研究[J]. 植物学报,1999, 41：(12)：1276-1282.

[108]王雪景，孙毅.农杆菌介导的植基因转化研究进展[J].植物技术通报,1999, 1: 7-13.

[109]张天宇.农杆菌介导的拟南芥rd129A 基因转化苜蓿的研究及柳树组织培养再生技术初探

[D].兰州：甘肃农业大学,2007。

[110]徐勤青，刘风珍，万勇善.影响农杆菌介导花生转化率主要因素的研究[J].山东农业大学学报：自然科学版，2008,39(2)：161-165.

[111]冯新华，邵启全. Ti质粒基因在单子叶植物朱顶兰和吊兰中的表达[J]. 科学通报,1987,32(8):163-165.

[112] GRMSLEY N, HOHN T, DAVIS JW, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch(Betula plalyphylla var japonica)[J]. *Plant Sci*,1997,127:53-60.

[113] HOOYKAASP J J, SCHILPEROORT R A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering [J]. *Plant Mol Biol,*1992,19.15-18.

[114]周蓓蓓，陈月红，章镇等**.**超声波辅助对农杆菌介导“美人指”葡萄遗传转化中GUS瞬时表

达的影响[J].江西农业学报,2010,22(4):6-8.

[115]杜鹃，赵峰，曹越平**.**超声波辅助农杆菌介导转化大豆*gus*基因在不同外植体中的瞬时表达[J]**.** 上海交通大学学报，2010,28(5)：441-442.

[116]段晓昱，栾春光，郝彦玲，罗云波.向日葵遗传转化中抗生素适宜筛选浓度的研究[J].甘肃农

业大学学报,2004,39(3):239-244.

[117]李庆芝，尚志华，房玉洁.姜基因转化系统的建立和优化[J]. ft东农业科学，2006，(3)：11-14.

[118]吴关庭，胡张华，郎春秀，陈笑芸，王伏林，金卫，陈锦清，夏英武.农杆菌介导高羊茅遗传转化体系的建立[J].核农学报，2005,19(5)：340-346.

[119]尚爱芹，田传卫，赵梁军，等.根癌农杆菌介导北海道黄杨遗传转化体系的建立[J].园艺学报，2008,35(3)：409-414.

[120]邓家术，段彬江，刘中来。植物热激蛋白的研究进展及其应用[J]. 生命的化学,2003,23(3):226-228.

[[121]郭尚敬](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E9%83%AD%E5%B0%9A%E6%95%AC)，[陈娜](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E9%99%88%E5%A8%9C)，[孟庆伟](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E5%AD%9F%E5%BA%86%E4%BC%9F).叶绿体小分子量热激蛋白介绍[J].植物学通报，2005,22(2)：223-230.

[122]薛建平，司怀军，田振东.植物基因工程.合肥：中国科学技术大学出版社[M],2008.

[123]唐微，杨宙.转*cry*1Ab基因抗虫水稻的培育[J].华中农业大学学报,2007,26(2):157-160.

[124]罗红梅，李琦，姜丹，李洪艳.农杆菌介导的单子叶植物基因转化研究进展[J].牡丹江师范学院学报（自然科学版）2002, 3: 6-8.

[125] 袁维风, 钱玉梅, 徐德聪, 高贵珍. 影响草莓遗传转化率的因子及转*CBF1*基因植株的获得[J]. 江苏农业学报(*Jiangsu J. of Agr. Sci.* ), 2009, 25(5): 1124-1128.

[126]谢志兵，钟晓红，邓子牛.农杆菌介导几丁质酶基因对草莓转化条件的建立[J].湖南农业大学学报：自然科学版，2008, 34(1)：25-28.

# 攻读硕士学位期间出版或发表的论著、论文

1、**郭朝阳**，崔婷婷，薛建平，朱艳芳，张爱民，盛玮，滕井通. 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. 2、**郭朝阳**，盛玮，薛建平.药用菊花组织培养研究进展.《植物组织与细胞离体培养技术》[M]，北京：中国科学技术出版社，2011: 48-52.

3、朱艳芳，**郭朝阳**，薛建平，张爱民，盛玮，宋运贤.离体条件下药用菊花不同品种羟脯氨酸耐受性比较研究[J].中国中医药杂志，2011，36(19)：2625-2628.

致 **谢**

光阴荏苒，转眼间就要离开学习生活了七年的母校，回首往事，三年的研究生生活给我带来了太多的回忆与留恋，可谓五味俱全，这一切都将化为一生中点点滴滴难以忘却的情怀。

值此论文付梓之际，首先衷心感谢敬爱的导师薛建平教授对我的关爱和培养。本文是在我的导师薛建平教授的悉心指导下完成，导师在论文的选题、开题、试验过程及论文撰写等方面都给予了大量耐心细致的指导和帮助。三年来，恩师广博的学识、敏捷的思维、严谨的治学态度、锲而不舍的探索精神，时刻感染着我，不曾忘记导师的每一次批评，也难以忘记导师的肯定与鼓励，导师的谆谆教诲，使我一生受益。至此，再次向尊敬的导师说声：您辛苦了！

论文试验过程中，师母张爱民老师在精神上给了我莫大的支持，在生活上细致的照顾与教导让我在三年的研究生生活中能够全力以赴的学习；在试验过程中淮北师范大学盛玮教授、高翔老师、宋运贤老师、李进步老师、滕井通老师以及朱艳芳老师一直给予热情指导和无私帮助；师姐常莉、毛春娜、李佳娣；师兄王兴、陈奇、李国兴、陈飞、卢河东、薛涛，在试验过程中细节上的耐心指导；同窗岳二魁、崔婷婷、付士龙和师弟于方、李纪明、杨杰等在试验过程中的帮助；师妹雷婷、黄铭美在生活上的照顾和帮助及试验室其他成员为本研究提供了无私的帮助，在此，表示最衷心的谢意！同时感谢同窗苏根强、张停停、刘长洲等陪我度过愉快而充实的三年研究生生活。

最后，我要深深的感谢我勤劳善良的父母，谢谢你们的养育之恩和多年来对孩儿的默默理解与支持；感谢姐姐对我学业的支持与鼓励；特别感谢愿意把人生最美的青春和我一起分享的崔婷婷，你是我一生最大的收获。你们给予我幸福、安全和温馨，是我不断前进的动力源泉。

在即将离开母校的此刻，衷心祝愿家人健康平安，祝老师工作顺利，祝师弟师妹学业有成，祝愿母校的明天会更好！

郭朝阳

2013年5月10日于淮北