

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201312015

简兴, 苗永美, 隋益虎 等. 黄瓜 *LDC* 克隆、表达载体的构建及烟草转化研究[J]. 广西植物 2015, 35(2):255-260Jian X, Miao YM, Sui YH *et al.* Cloning and expression vector construction of cucumber *LDC* and transformation to tobacco[J]. *Guihaia* 2015, 35(2):255-260

## 黄瓜 *LDC* 克隆、表达载体的构建及烟草转化研究

简兴<sup>1</sup>, 苗永美<sup>2\*</sup>, 隋益虎<sup>2</sup>, 边卓吾<sup>2</sup>, 陈存款<sup>2</sup>, 黄春景<sup>2</sup>, 李振兴<sup>2</sup>

(1. 安徽科技学院 城建与环境学院, 凤阳 233100; 2. 安徽科技学院 生命科学学院, 凤阳 233100)

**摘要:** 赖氨酸脱羧酶 (*LDC*) 催化赖氨酸脱羧形成尸胺。该研究采用 RT-PCR 技术从耐冷黄瓜 ‘Chipper’ 中分离到一段 cDNA 序列, 利用 DNAMAN6.0 软件进行氨基酸序列分析, 用 BLASTp 对蛋白的保守序列进行比对, 用双酶切法和 T4DNA 连接酶构建了植物超表达载体 pCAMBIA1304-*LDC*, 通过在烟草不定芽诱导和生长培养基中添加不同浓度的潮霉素 (Hyg) 以确定不定芽分化和生长的筛选压力浓度, 同时优化了菌液浓度、侵染时间和预、共培养时间 4 个农杆菌侵染条件。结果表明: 该序列的 CDS 全长具有 648 bp, 编码 216 个氨基酸, BLASTp 结果显示该蛋白具有赖氨酸脱羧酶的保守序列, 认为分离到的序列为黄瓜 *LDC* 基因, 在 GenBank 中的登录号是 KC202438; 当在叶块不定芽诱导培养基中添加 10 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg 时, 芽诱导率明显降低, 为 5.41%; 当芽生长培养基中的 Hyg 浓度为 20 mg · L<sup>-1</sup> 时, 芽苗成活率为 33.33%, 明显低于对照, 因此认为 10 mg · L<sup>-1</sup> 和 20 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg 浓度是抗性芽诱导和生长的筛选浓度; 农杆菌侵染时, 烟草叶盘不需要预培养, 农杆菌 OD<sub>600</sub> 值为 0.6, 侵染 5 min、共培养 4 d 时, 侵染效果最好, 能获得较高的抗性芽分化率。获得的抗性植株移栽成活后, 叶片 DNA 经过 PCR 鉴定, 获得了 29 株转化植株, 转化率达 93.55%。转化植株的获得为下一步基因功能分析提供了材料。

**关键词:** 黄瓜; 赖氨酸脱羧酶; 烟草; 遗传转化

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)02-0255-06

## Cloning and expression vector construction of cucumber *LDC* and transformation to tobacco

JIAN Xing<sup>1</sup>, MIAO Yong-Mei<sup>2\*</sup>, SUI Yi-Hu<sup>2</sup>, BIAN Zhuo-Wu<sup>2</sup>,  
CHEN Cun-Kuan<sup>2</sup>, HUANG Chun-Jing<sup>2</sup>, LI Zhen-Xing<sup>2</sup>

(1. College of Urban Construction and Environment, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. College of Life Sciences, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**Abstract:** Lysine decarboxylase (*LDC*) catalyzed the decarboxylation of lysine to form cadaverine. To research the molecular biology function of *LDC* gene, the cDNA of *LDC* was cloned by RT-PCR technique from chilling tolerant ‘Chipper’ cucumber treated under low temperature. The sequence of amino acids and conserved sequence of protein were analysed with software DNAMAN6.0 and by BLASTp. A plant expression vector pCAMBIA1304-*LDC* was constructed by the methods of double restriction enzyme digestion and T4DNA ligase. The selective concentrations of Hyg for adventitious buds induction and shoots growth were confirmed by adding different concentration of Hyg to the media, and the infection condition of agrobacterium was optimized. The results showed that the coding sequence of the *LDC* gene had 648

收稿日期: 2014-02-09 修回日期: 2014-05-17

基金项目: 安徽省科技厅青年基金 (1208085QC55); 安徽省教育厅重点科研计划项目 (KJ2013A074); 安徽省大学生创新创业训练计划项目 (AH201310879097); 安徽科技学院第十批大学生创新课题 (13XSZ52)。

作者简介: 简兴 (1975-), 男, 广西桂林人, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物生物技术研究, (E-mail) jianx@ahstu.edu.cn。

\*通讯作者: 苗永美, 博士, 讲师, 主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究, (E-mail) mym416@163.com。

bp in length encoding 216 amino acids which contained lysine decarboxylase conserved sequence so the sequence was firmly believed as *LDC* gene. The accession number was KC202438. The induction rate of adventitious buds reduced to 5.41% when the concentration of Hyg was  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and the survival rate was significantly lower than control group when adding  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Hyg into medium. The optimized transformation condition was no preculture, the suitable concentration  $\text{OD} = 0.6$ , infection for 5 min and coculture duration 4 d. and higher resistant buds differentiation rate were gained under the optimized condition. 29 T0 plants were identified by PCR technique on DNA level, the transformation rate reached 93.55%. The gene modified plants would be used for the research of *LDC* gene function in future.

**Key words:** cucumber; lysine decarboxylase; tobacco; genetic transformation

赖氨酸脱羧酶 (Lysine decarboxylase, LDC) 具有催化赖氨酸脱羧形成尸胺的功能 (Cadaverine, Cad)。Cad 是一种多胺 (polyamine, PA), PAs 包括 Put、Spd、Spm 和 Cad 等。PA 能影响植物 DNA、RNA 和蛋白质的生物合成、促进生长和发育、延迟衰老, 并且与植物的抗逆性关系密切 (刘俊 2004)。在几种 PA 的作用机制研究中, Cad 的研究报道相对较少。LDC 最早是 1944 年在尸体杆菌和大肠杆菌中发现的, 关于植物中 LDC 的最早报道是在 1979 年 (Michael *et al.*, 1979)。LDC 主要分布和合成部位是根, 在豌豆根伸长区中, LDC 活性是其它部位的 2 倍, 根中 Cad 含量比其他部位高 90 多倍, Cad 具有能促进植物不定根生长和发育的作用 (Gamarnik *et al.*, 1991; Niemi *et al.*, 2002)。Gamarnik *et al.* (1991) 用 LDC 抑制剂二氟甲基鸟氨酸 ( $\alpha$ -difluoroethyl-ornithine, DFMO) 处理发芽的大豆种子, Cad 含量减少, 胚根发育畸形, 而用 DFMO 和 Cad 同时处理, 则观察不到胚根畸形现象。关于 LDC 活性、Cad 含量与抗逆性的关系也开展了一些研究, 如 Kuznetsov *et al.* (2007) 用  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 处理冰叶日中花, 体内 LDC 活性和 Cad 量均有了提高; 油菜叶片中 Cad 含量在渗透胁迫处理时也发生急剧增加 (Aziz *et al.*, 1997); 逯明辉等 (2005) 利用 AFLP 技术从萌芽耐冷存有差异的黄瓜中获得了 132 bp 长的 *LDC* 部分片段, 推测该基因可能在提高种子低温发芽力方面起作用; Somnuk *et al.* (2012) 将生物碱源植物羽扇豆的 *LaLDC* 转入拟南芥和烟草, 结果尸胺的含量发生变化, 但与逆境的关系没有展开研究; 苗永美 (2013) 通过 qRT-PCR 证明黄瓜 *LDC* 受低温和盐胁迫诱导而上调表达。

以上研究主要从生理层次和基因表达方面揭示了 LDC、Cad 与抗逆的关系, 关于 *LDC* 的分子生物学以及在抗逆中的作用机理有待深入研究。目前研究基因功能的主要途径是使基因超量表达和基因沉默, 受体常选用模式植物烟草或拟南芥。因此, 本研

究从相对耐冷的黄瓜中克隆到 *LDC*, 构建了超量表达载体, 优化了农杆菌介导的烟草遗传转化, 并获得了转 *LDC* 的烟草植株, 为进一步研究该基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 美国加工型黄瓜品种 ‘Chipper’, 烟草受体为 ‘本氏烟’。

1.1.2 载体和菌株 克隆载体 pMD19-T 购自大连 TAKARA 公司; 表达载体为 pCABIA1304、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和农杆菌菌株 EHA105 为本实验室保存。

1.1.3 试剂 Trizol 试剂、PCR 相关试剂、M-MLV 反转录试剂盒及 DNaseI 试剂盒购自大连 TAKARA 公司; 限制性内切酶 *Bgl* II、*Bcu* I 和 T4DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 凝胶回收试剂和质粒小提试剂盒购自杭州爱思进生物技术公司; 潮霉素 (Hyg)、卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif) 和羧苄青霉素 (Cab) 购自南京鼎国公司。

### 1.2 方法

1.2.1 材料处理及总 RNA 提取 ‘Chipper’ 种子温水浸种、催芽后播种在草炭基质中, 常规育苗, 待幼苗长至 2~3 片真叶时,  $4^{\circ}\text{C}$  低温处理 24 h 后取嫩叶, 采用 Trizol 法 (Promega) 提取总 RNA。

1.2.2 黄瓜 *LDC* 的克隆 以 Oligo dT 为反转录引物, 参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>TM</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录盒说明书合成 cDNA 第一链。为了构建超表达载体, 在上游引物 5' 端加入 *Bgl* II 酶切位点, 在下游引物 5' 端加入 *Bcu* I 酶切位点, 黄瓜赖氨酸脱羧酶基因克隆的引物设计参照张万萍 (2009) 的研究, 引物序列: 上游引物 S1: 5'-GCCAGATCTGATGGAGCGTTTGATTATGAATC; 下游引物 S2: 5'-TATACTAGTCTAGAGATAGC-CAAGCTGCTCT, 引物委托上海英骏生物技术有限

公司合成。PCR 反应体系为 DNA 20 ng、0.2 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 和 10 × Buffer 各 2.0 μL、25 mm · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (TaKaRa), 加双蒸水至 20 μL 体积。扩增程序为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 7 min, 10 °C 终止; 整个 PCR 反应在 PTC-100T PCR 仪上完成。

1.2.3 PCR 产物的回收与测序 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶分离, 利用 Biosciences AxyPrep DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 在含有 100 mg · L<sup>-1</sup> Amp 的 LB 平板上挑选单克隆, 经菌液 PCR 鉴定后将阳性单克隆后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.4 *LDC* 超表达载体的构建及农杆菌工程菌株的获得 阳性克隆经过测序验证后, 将克隆扩大培养, 同时培养含 pCAMBIA1304 的 DH5α 获得菌液。按试剂盒说明分别提取两种质粒 pCAMBIA1304 和 pMD19-T-*LDC*, 并用限制性核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Bcu* I 进行双酶切, 酶切产物经凝胶电泳分离后回收目的片段, T4DNA 酶连接回收产物过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 转化菌液涂布 LB + kan 50 mg · L<sup>-1</sup> 的固体平板上, 挑选阳性单克隆用于 PCR 菌液检测, 并提取重组质粒做酶切鉴定。冻融法转化农杆菌 EHA105, PCR 检测鉴定, 获得用于转化的阳性工程菌株。

1.2.5 烟草转化条件的研究 (1) Hyg 致敏浓度的筛选: 烟草无菌苗叶盘和芽苗分别接种在 M1: MS + 6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 和 M0: MS0 的培养基上并附加 0 ~ 50 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg, 进行不定芽分化和芽苗伸长的 Hyg 临界浓度的筛选, 20 d 统计实验结果。(2) 侵染条件的优化: 叶块于 M1 培养基上、黑暗条件下预培养 2 d, 工程菌株在 YEB + Rif 50 mg · L<sup>-1</sup> + Kan 50 mg · L<sup>-1</sup> 上, 28 °C、200 rpm 振荡培养至合适浓度, 离心收集菌液, 用 MS0 液体培养基重悬, 调整 OD 值至 0.2、0.4、0.6, 将预培养 2 d 的叶盘在各浓度菌液中分别侵染 5、10、15 min; M1 上共培养 2 d, 转到 M2: M1 + Hyg 10 mg · L<sup>-1</sup> + Carb 200 mg · L<sup>-1</sup> 做选择培养, 每 15 d 转接 1 次, 30 d 统计抗性芽分化率。叶盘做 0、1、2、4 d 的预培养, 用 OD = 0.6 的菌液侵染 5 min, 分别共培养 1、2、3、4 d 后做选择培养, 研究预培养和共培养时间对侵染效率的影响。

1.2.6 转基因植株的鉴定 生根良好的抗性苗经过炼苗、驯化移栽, 15 d 后等到长出新叶, 用 CTAB 法提取 DNA。以转化植株 DNA 为模板, 野生型为阴性对照, 重组表达载体为阳性对照, 用 S1 和 S2 引物做 PCR 鉴定。PCR 扩增体系和扩增程序同 1.2.2, 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜 *LDC* 基因的克隆

以低温处理黄瓜的 mRNA 为模板, 用 S1 和 S2 为引物, 经过 PCR 扩增、回收、连接、转化、测序, 拼接, 获得了长度为 648 bp 的核酸序列, 利用 DNA-MAN 6.0 软件对测序结果进行拼接并推测了氨基酸序列, BLASTp 结果表明该蛋白具有赖氨酸脱羧酶保守序列 (61 ~ 191 位), 将该基因命名为 (*Cucumis sativus lysine decarboxylase*, *CsLDC*)。

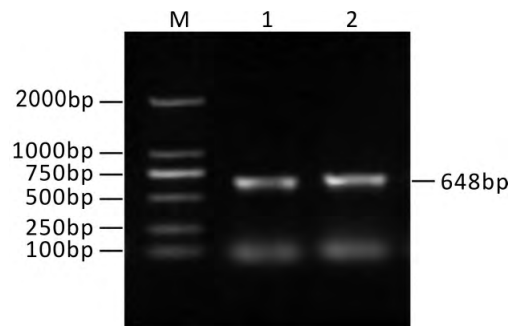


图 1 *CsLDC* 编码区的扩增

M. DL2000 DNA 分子标记; 1-2. PCR 扩增产物。

Fig. 1 Amplification of *CsLDC* coding region

M. DL2000 DNA marker; Line 1-2. Amplification of PCR.

### 2.2 黄瓜 *LDC* 超量表达载体的构建

将 pCAMBIA1304 和 pMD19-T-*CsLDC* 进行双酶切 (图 2:A), 回收载体的大片段和 648 bp 的目的基因片段, T4DNA 连接, 产物转化感受态 *E. coli* DH5α, 用引物 S1 和 S2 进行菌液的 PCR 鉴定 (图 2:B), 并进行双酶切鉴定, 构建的超表达载体命名为 pCAMBIA1304-*CsLDC* 图谱 (图 3)。重组质粒冻融法转化农杆菌 EHA105, PCR 法鉴定转化子 (图 2:C), 有目的条带的菌落即为含重组表达载体的农杆菌, 用于烟草的遗传转化。

### 2.3 Hyg 对叶片芽分化、生长和生根的影响

烟草叶块在添加不同浓度 Hyg 的 M1 上的生长情况见表 1。当不加 Hyg 时, 不定芽分化率达 91。

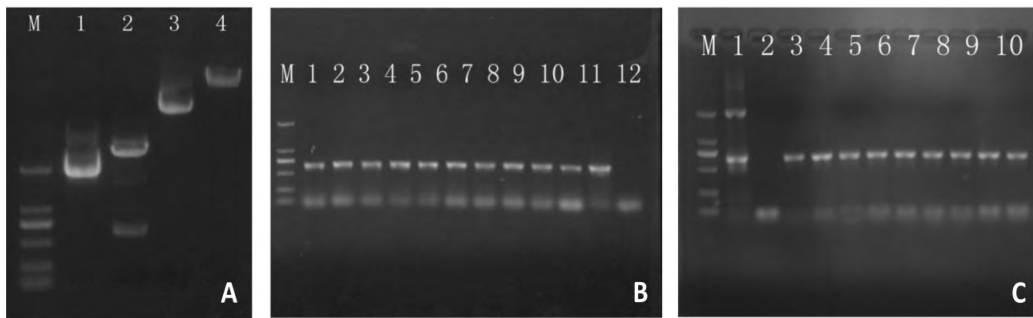


图2 *LDC* 和 *pCambia1304* 的双酶切及重组表达载体菌液 PCR 检测 A. *LDC* 和 *pCambia1304* 的双酶切 1 2 分别是 *pMD19T-sense-LDC* 酶切前、后产物; 3 4 分别是 *pCambia1304* 酶切前、后产物。B. *DH5α* 的菌液 PCR 检测 1-10 为单菌落 PCR 产物; 11, 12 分别为阳性和阴性对照。C. *EHA105* 的菌液 PCR 检测 1 2 分别为阳性和阴性对照; 3-11 为单菌落 PCR 产物。

Fig. 2 *LDC* and *pCambia1304* digested by *Bcu* I and *Bgl* II, identification of recombinant vector using colony PCR method A. *LDC* and *pCambia1304* digested by *Bcu* I and *Bgl* II 1, 2 are the products of *pMD19T-sense-LDC* before and after digested by *Bcu* I and *Bgl* II respectively; 3, 4 are respectively that of *pCambia1304*. B. Identification of *DH5α* using colony PCR method 1-10 are single colony PCR products; 11, 12 are positive and negative control respectively. C. Identification of *EHA105* using colony PCR method 1, 2 are positive and negative control respectively; 3-11 are single colony PCR products.

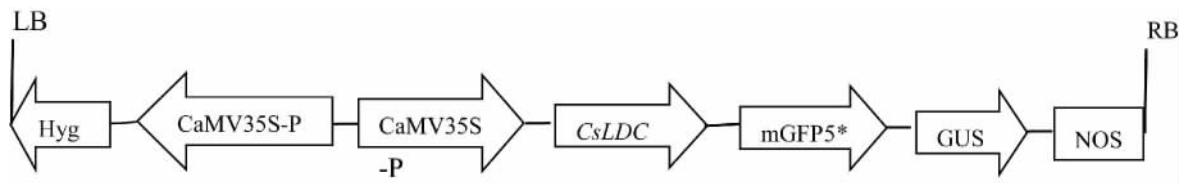


图3 表达载体的构建图谱  
Fig. 3 Structure of the express vectors

43% ;添加 Hyg 后 ,叶盘颜色变浅 ,随着浓度的升高 ,黄化程度加重 ,当浓度提高至 10 mg · L<sup>-1</sup> 时 ,外植体黄化率为 83.78% ,芽的分化率仅为 5.41% ,比对照大大降低。因此认为 10 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg 可以抑制非转化细胞的生长 ,是筛选烟草叶块不定芽分化的敏感浓度。

将叶盘诱导产生的小芽苗转至 M0 附加 0 ~ 50 mg · L<sup>-1</sup> 的 Hyg 培养基上 ,研究 Hyg 浓度对芽苗生长的影响。含有 Hyg 的培养基上 ,部分材料接触培养基部位变黄 ,叶片颜色变浅 ,20 d 统计成活率 ,结果见表 2。当 Hyg 浓度为 5 mg · L<sup>-1</sup> 时 ,成活率比对照下降了 7.24% ,差异不明显 ,随着浓度的升高 ,成活率逐渐降低 ,Hyg 大于 20 mg · L<sup>-1</sup> 时 ,绝大多数材料黄化死亡 ,因此认为芽苗的伸长培养所选用的 Hyg 浓度至少是 20 mg · L<sup>-1</sup>。

表 1 Hyg 浓度对不定芽分化的影响

Table 1 Effects of Hyg on adventitious buds differentiation

Hyg 浓度 Concentration of Hyg (mg · L <sup>-1</sup> )	叶盘数 No. of explant	黄化数 No. of yellowing explant	黄化率 Yellowing rate (%)	产生芽的 叶盘数 No. of budding	分化率 Budding rate (%)
0	35	0	0	32	91.43
5	32	18	56.25	10	31.25
10	37	31	83.78	2	5.41
15	34	31	91.18	0	0
20	35	35	100	0	0
40	24	24	100	0	0
50	24	24	100	0	0

2.4 侵染条件对转化率的影响

根据表 3 结果 ,农杆菌浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.2、0.4、0.6 三个浓度下的抗性芽平均分化率分别是 15.71%、18.41%、33.78% ,平均分化芽数为 0.26、0.25、0.91 ,菌液浓度为 0.6 时 ,侵染率最高 ;侵染 5、10、15 min 三个时间的抗性芽平均分化率分别是 22.73%、25.28%、19.88% ,平均分化芽数为 0.74、0.3、0.37 ,综合考虑认为侵染 5 min 时 ,侵染效果最好。此条件下抗性芽分化率达 41.94% 平均每叶盘

表 2 Hyg 浓度对烟草伸长生长的影响  
Table 2 Effects of Hyg on the growth of tobacco shoots

Hyg 浓度 Concentration of Hyg ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0	5	10	15	20	30	40	50
接种苗数 No. of shoot	38	40	41	44	42	45	45	47
成活数 No. of survival	36	35	32	25	14	8	3	0
成活率 Survival rate (%)	94.74a	87.50ab	78.05bc	56.82cd	33.33cd	17.78de	6.67e	0e

表 3 菌液浓度和侵染时间对转化率的影响  
Table 3 Effects of infection concentration and time on transformation rate

OD <sub>600</sub>	侵染时间 Infection time (min)	叶盘数 No. of explant	产生芽的 叶盘数 No. of budding	分化率 Budding rate (%)	芽总数 Sum no. of bud	平均芽数 Average no. of bud
0.2	5	27	4	14.81	11	0.41
0.2	10	27	3	11.11	3	0.11
0.2	15	33	7	21.21	9	0.27
0.4	5	35	4	11.43	5	0.14
0.4	10	29	8	27.59	8	0.28
0.4	15	37	6	16.22	12	0.32
0.6	5	31	13	41.94	52	1.68
0.6	10	35	13	37.14	18	0.51
0.6	15	36	8	22.22	19	0.53

分化 1.68 个芽数。

烟草叶盘在不同的预培养和共培养条件下的转化率见表 4, 预培养四个时间水平的抗性芽分化率分别是 9.28%、6.28%、8.50%、0, 平均分化芽数 0.16、0.12、0.12、0; 共培养四个时间水平的抗性芽分化率分别是 1.38%、3.79%、4.45%、14.44%, 平均分化芽数 0.04、0.06、0.08、0.25。根据抗性芽分化率和平均每块外植体两个指标综合考察两个因素对转化率的影响, 认为不做预培养、侵染后做 4 d 的共培养条件下, 抗性芽分化率最高, 达 27.03%, 平均分化芽数为 0.49。

### 2.5 T0 代转基因烟草的 PCR 鉴定

通过农杆菌介导的叶盘转化法将 *CsLDC* 基因导入烟草, 经过 Hyg 筛选培养后获得 31 株抗性苗, 用 *LDC* 基因引物 S1 和 S2 进行 PCR 检测, 其中有 29 株烟草植株扩增出目的片段, WT 型没有扩增出条带, 表明 *CsLDC* 已经整合到烟草基因组中, 转化率达 93.55%。

## 3 讨论与结论

植物在受到逆境胁迫时会产生特异表达基因及蛋白(杨猛等, 2013; 马廷臣等 2013)。本研究从低

表 4 预培养和共培养时间对转化率的影响  
Table 4 Effects of preculture and coculture times on transformation rate

预培养时 Preculture time (d)	共培养 Coculture time (d)	叶盘数 No. of explant	产生芽的 叶盘数 No. of budding	分化率 Budding rate (%)	芽总数 Sum No. of bud	平均芽数 Average No. of bud
0	1	40	1	2.50	3	0.08
0	2	41	2	4.88	2	0.05
0	3	37	1	2.70	1	0.03
0	4	37	10	27.03	18	0.49
1	1	33	1	3.03	2	0.06
1	2	42	1	2.38	4	0.10
1	3	43	1	2.32	1	0.02
1	4	46	8	17.39	13	0.28
2	1	30	0	0	0	0
2	2	38	3	7.89	3	0.08
2	3	47	6	12.77	9	0.19
2	4	45	6	13.33	10	0.22
3	1	41	0	0	0	0
3	2	40	0	0	0	0
3	3	43	0	0	0	0
3	4	48	0	0	0	0

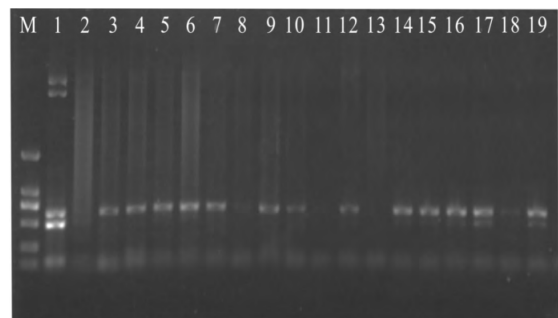


图 4 转基因植株 DNA 水平上的 PCR 检测  
M. DL2000 DNA 分子标记; 1. 阳性对照;  
2. 阴性对照; 3-19. 部分检测植株。

Fig. 4 PCR detection of transgenic plants M. DL2000 DNA marker; 1. Positive control; 2. Negative control; 3-19. Partial of detection plants.

温处理的黄瓜幼苗叶片中分离到了 *LDC* 基因, *LDC* 催化 Cad 的合成, 关于植物中 *LDC* 蛋白研究报道较少。Somnuk *et al.* (2012) 利用抑制性消减杂交 PCR 技术从苦味羽扇豆中克隆了 *La-LDC*, 编码 1 320 bp, 编码 440 个氨基酸, 通过转化拟南芥和烟草证明

Cad 含量发生变化。CsLDC 蛋白含有 216 个氨基酸,属于一个保守的蛋白家族,其生物学功能有待通过转基因烟草验证。烟草常用转基因受体,不同的烟草品种、菌株和表达载体类型所需要的转化条件不同(张哲敏等 2013)。烟草遗传转化中,常用的筛选剂是 Kan 和 Bar,Hyg 用的较少(田苗苗等, 2011)。抗生素浓度是遗传转化体系的关键因素,决定着转化和筛选效率。不同基因型材料对 Hyg 的敏感程度不同,在不同阶段存在敏感差异,王丹等(2010)研究了几种杨树叶片分化、生长和生根对 Hyg 的敏感程度,发现新杨和欧美杨叶片分化时敏感浓度为  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,小黑杨为  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;山新杨和小黑杨不定芽生长时的敏感性浓度为  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,欧美杨为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;茎段生长和生根时山新杨和小黑杨的敏感性为  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,欧美杨为  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;李建安等(2006)研究证实拟南芥在愈伤诱导、增殖和细胞悬浮继代所用的浓度分别为 1.5、2.5、25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而且在液体和固体培养条件下敏感差异极大。张志忠等(2005)的试验表明,西瓜子叶块外植体对 Hyg 较为敏感,15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  是适宜的筛选浓度,可明显抑制非转化组织的生长。在本研究中筛选烟草叶片抗性芽分化的临界浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;而在芽苗伸长阶段,需要提高筛选压力浓度,不能低于  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,因为烟草的再生能力强,叶盘产生的芽量多,通过在伸长培养阶段加大 Hyg 浓度以避免出现过高的假阳性。通过该筛选方案,取得了较高的转化率,达 93.55%。

转化效率是菌液浓度、侵染时间和共培养时间综合作用的体现,不同的基因型需要转化条件不同。本研究就外植体的预培养时间、侵染液的活力状态、侵染时间和共培养时间进行了比较和筛选。在农杆菌介导的多数植物遗传转化中,一定时间的预培养可提高转化率,而在本研究中,烟草可以不需要经过预培养,可能是因为烟草的再生能力强的原因。王关林等(1998)认为共培养时间必须长于 16 h。在理论上,农杆菌与植物共培养的时间越长,受侵染的细胞越多,目的基因的转化频率也就越高,因为共培养时间过短,T-DNA 转移过程不能完成。在本研究考察的共培养四个水平中,延长共培养可提高转化率。但在有些研究中发现,共培养的时间太长,农杆菌过度增殖,子叶会受农杆菌过度感染变褐而死亡,达不到转化效果,如苗永美(2013)在黄瓜遗传转化中,发现共培养 3 d 比 4 d 效果好。

## 参考文献:

- Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F. 1997. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment [J]. *Plant Growth Regul* **21**: 153-163
- Gamarnik A, Frydman R. 1991. Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds [J]. *Plant Physiol* (97): 778-785
- Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E *et al.* 2007. NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress [J]. *Plant Sci* **172**: 363-370
- Li JA (李建安), Hu FM (胡芳名), Tan XF (谭晓风). 2006. Impact of hygromycin on Arabidopsis suspension cells and calli (拟南芥悬浮细胞及其愈伤组织对潮霉素的反应) [J]. *J Centr S For Univ* (中南林学院学报) **26**(3): 42-46
- Liu J (刘俊). 2004. Regulation of polyamine metabolism and its relation to salt tolerance and signal transduction in plants (植物多胺代谢的调节与抗盐性的关系及多胺在其信号转导中的地位) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Agriculture University (南京农业大学)
- Lu MH (逯明辉), Li XM (李晓明), Chen JF (陈劲枫) *et al.* 2005. Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene (黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达) [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学) **38**(12): 2492-2495
- Ma TC (马廷臣), Yu RR (余蓉蓉), Chen RJ (陈荣军) *et al.* 2013. Global genome expression change of transcription factors in conventional indica rice roots under different drought stress (全基因组表达分析不同强度干旱胁迫下常规籼稻根系转录因子表达变化) [J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报) **27**(9): 1258-1269
- Miao YM (苗永美). 2013. Establishment of chilling tolerance evaluation system for cucumber (*Cucumis sativus* L.) and cloning and transformation of *CsLDC* (黄瓜耐冷评价体系的建立及 *CsLDC* 的克隆及转化黄瓜研究) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Agriculture University (南京农业大学)
- Michael W, Thomas H, Hans-Martin S. 1979. A model mechanism for the enzymatic synthesis of lupin alkaloids [J]. *Zeitschrift für Naturforsch* **34**: 704-708
- Niemi K, Haggman H, Sarjala T. 2002. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro [J]. *Tree Physiol* **22**(6): 373-381
- Somnuk B, Kae K, Emi I *et al.* 2012. Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae [J]. *The Plant Cell* **24**(3): 1202-1216
- Tian MM (田苗苗), Liu YJ (刘艳菊), Li M (李敏) *et al.* 2011. Study on the construction of antisense expression vector of glycine max oleic acid desaturase gene and its transfer to *Nicotiana tabacum* (大豆 *fad* 基因反义表达载体构建及转化烟草研究) [J]. *Guihaia* (广西植物) **31**(1): 111-116
- Wang D (王丹), Zou L (邹莉), Wang Y (王义) *et al.* 2010. Study on the sensitivity of poplar to hygromycin (杨树对潮霉素的敏 (下转第 165 页 Continue on page 165))

2. 地衣体灰白色 灰绿色 表面全被白粉霜 ..... 3
2. 地衣体褐色 橄榄色 表面全被白粉霜或无 ..... 4
3. 地衣体散生或不规则覆瓦状排列 小鳞片弱凸具泡状隆起 橄榄绿色至灰绿色 囊层基淡红褐色  
..... 小叶泡鳞衣 *Toninia sedifolia* (Scop.) Timdal
3. 地衣体由鳞片组成 有规则的莲座状排列 表面全被霜而成雪白色 囊层基褐色至暗红褐色  
..... 白泡鳞衣 *Toninia candida* (Weber) Th. Fr.
4. 鳞片状地衣体呈泡状至圆筒形 少有分枝 呈绿色 橄榄色 上有密集的白色粉霜 具假杯点  
..... 泡状泡鳞衣 *Toninia physaroides* (Opiz) Zahlbr
4. 地衣体鳞片状 栗色棕色至深褐色 光泽 不被粉霜 上有许多小黑点.....暗色泡鳞衣中亚种 *Toninia tristis* subsp. *asiae-centralis* (H. Magn.) Timdal

褐色、上有许多小黑点的鳞片状地衣体等都是在野外很容易鉴别的特征。

### 3 结论

泡鳞衣属是广泛分布的地衣 生境类型多样 在野外主要生长在土壤、沙漠结皮、岩石、苔藓以及岩面石浮土上。鳞片状的地衣体 上表面的颜色 地衣体和子囊盘上粉霜的有无 囊层基、子实层和囊盘被在 K 和浓硝酸中呈现的颜色 孢子形状及其细胞数量等作为该属地衣种类的主要鉴别特征。

*Toninia alutacea* ,*T. candida* 和有些 *T. caeruleonigricans* (*T. sedifolia*) 种类在颜色和形状上很类似 但后两者孢子 2 胞。*T. caeruleonigricans* (*T. sedifolia*) 的地衣体和子囊盘表面上被粉霜情况不比 *T. alutacea* *T. candida* 强烈。*T. physaroides* 的橄榄色泡状至圆筒形鳞片状地衣体、泡状鳞片顶部的粉霜 ,*T. tristis* subsp. *asiae-centralis* 的光泽、栗色棕色至深

### 参考文献:

- Abbas A ,Mijit H ,Tumur A *et al.* 2001. A checklist of the lichens of Xinjiang ,China [J]. *Harv Pap Bot* **5**(2) :359 - 370
- Brodo IM ,Sharnoff SD ,Sharnoff S. 2001. Lichens of North America [M]. New Haven and Landin:Yale University Press
- Culberson CF ,Kristinsson H. 1970. A standardized method for the identification of lichen products [J]. *J Chromatog* **46**:85 - 93
- Lumbsch HT ,Huhndorf SM. 2007. Outline of Ascomycota - 2007 [J]. *Myconet* **13**:1 - 58
- Nash III TH ,Ryan BD ,Gries C *et al.* 2002. Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region [M]. Dexter:Thomson ,**1**: 488 - 502
- Timdal E. 1992. A monograph of the genus *Toninia* (Lecideaceae , Ascomycetes) [J]. *Opera Bot* **110**:1 - 137
- Wei JC. 1991. An Enumeration of Lichens in China [M]. Beijing: International Academic Publishers

( 上接第 260 页 Continue from page 260 )

- 感性研究) [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报) **32** (1) : 47 - 50
- Wang GL(王关林) ,Fang HJ(方宏筠) . 1998. Thory and Technology of Plant Genetic Engineering (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing(北京) : Science Press(科学出版社) : 224
- Yang M(杨猛) ,Zhuang WF(庄文锋) ,Wei S(魏滢) *et al.* 2013. Cloning of *zmpc* gene from maize and transformation spring wheat (玉米苗期受低温胁迫蛋白表达差异研究) [J]. *J Nucl Agric Sci*(核农学报) **27**(11) :1 742 - 1 748
- Zhang WP(张万萍) . 2009. Molecular cloning of a cold-tolerant gene and investigation of cold-tolerance related physiological mechanisms in *Cucumis sativus* (黄瓜耐冷相关基因(*CsLDC*)克隆分析及外源

- 生长物质调节耐冷性生理机制研究) [D]. Nanjing(南京) : Nanjing Agriculture University(南京农业大学)
- Zhang ZM(张哲敏) ,Sun P(孙萍) ,Wang WT(王旺田) *et al.* 2013. Bioinformatics analysis of *CBF2* in three different chilling resistance grapes and construction of plant expression vector(三种不同抗冻性葡萄中 *CBF2* 基因的生物信息学分析及植物表达载体构建) [J]. *Guihaia*(广西植物) **33**(1) :82 - 88
- Zhang ZZ(张志忠) ,Wu J(吴菁) ,Hua LL(华吕柳) . 2005. Studies on agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation of watermelon(新根癌农杆菌介导的西瓜遗传转化研究) [J]. *J Fruit Sci*(果树学报) **22**(2) : 134 - 137