

苜蓿遗传转化体系的优化与 *AtPCS1* 基因表达载体的构建

王鸣刚^{1,2}, 赵宏¹, 刘晓风¹, 吴亦亮², 陈亮²

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过对6种不同基因型苜蓿愈伤组织的形成能力、愈伤组织的分化能力的比较发现, 不同苜蓿品种间的分化率存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中甘农1号分化率最高(42.9%); 对甘农1号叶片、下胚轴及子叶等外植体的分化再生能力研究发现, 叶片起源的愈伤组织分化时间短, 且丛生芽形成数量高于下胚轴和子叶; 再生芽可在B5培养基上成苗, 并在蔗糖浓度为10 g/L的1/2 MS培养基上顺利生根。据此认为, 苜蓿甘农1号叶片是适于做遗传转化的理想材料。利用RT-PCR方法扩增拟南芥整合肽合成酶(*AtPCS1*)基因全序列构建了*AtPCS1*的植物表达载体pBI121-*AtPCS1*, 为下一步*AtPCS1*基因转化苜蓿奠定了基础。

关键词: 苜蓿; 遗传转化体系; 拟南芥整合肽合成酶基因; 植物表达载体

中图分类号: S 541

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2007)06-0120-06

Study on transformation system of alfalfa and constructed *AtPCS1* plant expression vector

WANG Ming-gang^{1,2}, ZHAO Hong¹, LIU Xiao-feng¹, WU Yi-liang², CHEN Liang²

(1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. School of Life Science, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005; China)

Abstract: Six cultivars of alfalfa with different genotypes were compared with each other in their callus induction capacity and plant regeneration ability. The significant differences were observed ($P < 0.05$) in regeneration ability of these genotypes, and the cultivar *Medicago sativa* 'Gannong No. 1' has that the highest regeneration ability. Then the callus induction and plant regeneration ability of different explants as leaf, hypocotyls and cotyledon of Gannong No. 1 were studied, and found that the calluses coming from leaf differentiated much earlier and had more regeneration buds than others. The *in vitro* regenerated plants were successfully rooted in 1/2 MS medium and 10 g/L sugar. The results above suggested that the leaves of the cultivar 'Gannong No. 1' would be fit for the ideal explants in transgenic researches. Meantime, the full length of *AtPCS1* gene was amplified by RT-PCR from *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). Furthermore, the plant expression vector pBI121-*AtPCS1* was constructed, and that were as basic for transgenic alfalfa research in future.

Key words: alfalfa; transgenic system; *AtPCS1*; plant expression vector

作者简介: 王鸣刚(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学。

资助基金: 福建省自然科学基金(D041004), 甘肃省自然科学基金(3ZS042-B25-011), 兰州理工大学博士基金(SB08200602)。

收稿日期: 2007-09-25

近年来, 环境中重金属的毒性已成为影响环境和人类健康的一个主要问题^[1]。在植物细胞中有重金属离子主要通过整合和隔离从细胞质中去除, 在重金属离子的诱导下, 细胞内的植物整合肽合成酶(phytochelatase, PCs)能够以GSH (glu-

tamylcysteine) 为底物迅速合成植物螯合肽 (phytochelatin, PC), PC 可与金属离子螯合形成复合物, 通过液泡上的 ABC 型转运蛋白运输到液泡从而将重金属离子隔离^[2,3]。目前, *PCs* 基因已分别从拟南芥、水稻等植物中克隆^[4,5], 研究表明, 过量表达 GSH 合成途径中的关键酶, 可明显地提高植物对重金属的耐受和积累^[6,7]。含有 PC 合成酶基因的转基因植株可作为理想的植物, 用于重金属污染土壤的生物修复。

随着苜蓿转基因技术的快速发展, 建立苜蓿高频再生受体系统的研究得以大量开展。Cheyne 和 Dale^[8] 利用 B5 培养基以茎尖分生组织为材料成功地分化出了植株。杨燮荣^[9] 等研究发现, MS 培养基适于苜蓿组织培养, 但所需时间较长。Kenichi^[10] 等研究了 31 个苜蓿品种的体胚发生能力, 发现只有 3 个品种在 SH 培养基上具有体胚发生能力, 而在 MS 培养基上却有 14 个品种具有体胚发生能力。

本试验采用培养基组合 B5h、B5 对阿尔岗金、三得利、陇东、甘农 1 号、大花及天蓝苜蓿 6 个品种愈伤组织形成能力、再生能力进行了比较, 以期获得高频再生的可以用于转基因研究的苜蓿品种。同时, 利用 RT-PCR 方法扩增拟南芥螯合肽合成酶 (*AtPCS1*) 基因全序列, 进一步构建了 *AtPCS1* 的植物表达载体 pBII21-*AtPCS1*, 以期为今后培育能够富集重金属的转基因苜蓿奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

苜蓿品种: 阿尔岗金、三得利、陇东、甘农 1 号、大花及天蓝苜蓿由甘肃农业大学草业学院牧草育种教研组提供。

菌种和载体: 大肠杆菌 DH5⁻, 质粒 pET28a-*AtPCS1*, 载体 pBPF 及 pBII21 均为本实验室保存。

B5 培养基: B5 基础培养基 (pH 5.8, phytigel 5 g/L); B5 h 培养基: B5 基础培养基 + 1.0 mg/L 2, 4-D + 0.1 mg/L KT; 1/2MS^{KT} 培养基: 1/2MS 基础培养基 (蔗糖浓度 10 g/L) + 50 mg/L Kan + 100 mg/L Timentin。

PCR 扩增引物: *AtPCS1*、*NPT II* 引物由 invitrogen (上海) 公司合成, 序列如下:

AtPCS1 - sense - 3': 5' - AA GGA TCCAA TGGCTA GCGCGA GTTTA T - 3';

*Bam*H

AtPCS1 - antisense - 3': 5' - AA GAA TTC ACTAA TA GGCA GGA GCA GCG - 3';

*Eco*R

Npt II - sense: 5' - GGCTA TGACTGGGCA-CAACA - 3';

Npt II - antisense: 5' - GA TACCGTAAAG CACGA GGA - 3';

1.2 方法

1.2.1 外植体的获得 将培养约 1 周无菌苗, 待子叶已完全展开后, 将下胚轴及子叶切下, 置于 B5h 培养基中诱导愈伤组织。

1.2.2 愈伤的诱导及分化 外植体接种于 B5h 培养基中, 每瓶 7 块各 4 瓶, 设 3 个重复; 在 25、14 h/d 光照下培养诱导, 15 d 后统计出愈率, 每 2 周继代 1 次; 继代 1 次后将愈伤转至 B5 培养基中诱导体胚的分化, 25、14 h/d 光照下继续培养; 2 周继代 1 次, 若淡黄色 (或黄绿色) 愈伤上长出绿点, 则该愈伤组织为胚性愈伤组织, 视其为分化状态, 统计分化时间及分化率; 待胚状体长成鱼雷状且可清晰的辨认出单个胚状体 (约 1 cm) 时, 将其分离并转至新的 B5 培养基中继续培养。

1.2.3 生根及成苗 待胚状体发育成小苗并生有少数根后, 将小苗移植到 1/2 MS 生根培养基中, 25、14 h/d 光照下诱导生根, 移植 20 d 后统计根生长情况。

1.2.4 数据统计分析 使用 SPSS 软件。

1.2.5 植物表达载体的构建 以 *AtPCS1* - sense - 3/ *AtPCS1* - antisense - 3 作为引物, 以质粒 pET28a-*AtPCS1* 为模板, PCR 扩增拟南芥植物螯合肽合成酶基因 (*AtPCS1*)。PCR 条件如下: 95 5 min, 95 35 s, 55 35 s, 72 90 s, 72 7 min, 35 个循环。PCR 产物浓缩后经 *Bam*H、*Eco*R 双酶切, 连入中间载体 pBPF, 在基因上游加入 35S 启动子, 下游加入 nos 终止子, 得到中间质粒 pBPF-*AtPCS1*。

Hind 单酶切质粒 pBPF-*AtPCS1* 获得含启动子、目的基因及终止子的 DNA 片断, 回收该片

断;将得到的目的片段连入经 *Hind* 单酶切的 pBI121,得到植物表达载体 pBI121-*AtPCS1*.连接产物转化大肠杆菌 DH5,菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆;提取质粒,经酶切鉴定确定所得表达载体 pBI121-*AtPCS1* 准确无误后,测序.

2 结果与分析

2.1 品种对植株再生的影响

叶片接种于 B5h 培养基中 4~5 d 后,叶片均出现褶皱,在边缘形成淡黄色愈伤组织.约 2 周后,愈伤组织基本覆盖整个叶片表面.继代 1 次后在极少数的愈伤上可看到胚状体的分化(淡黄色愈伤组织上形成小绿点).2 周后,开始出现大量成簇的体胚.将体胚分离置于 B5 培养基中继续培养,1 周左右即可形成芽进而长出叶片,2~3 周可看到细小的根.从表 1 可见,6 个品种苜蓿均有高的出愈率(都在 90%以上),且品种间愈伤组织分化能力差异不显著

($P > 0.05$) (表 1).6 个苜蓿品种之间分化率有差异,甘农 1 号的分化能力最高,为 42.9%;陇东分化能力次之,为 23.8%;这两个品种与其它品种间差异显著.

2.2 不同外植体对植株再生的影响

从表 2 可以看出,甘农 1 号苜蓿不同外植体均能形成愈伤组织,出愈率下胚轴为 90.5%,子叶和叶片均达 100%,这说明对于甘农 1 号苜蓿,不同外植体对愈伤组织的形成没有影响,即不同起源的外植体的分化率差异不显著($P > 0.05$).但是根据实验观察发现,叶片起源的愈伤分化时间相对于子叶及下胚轴要早,且单个愈伤组织上分化形成的丛生芽要多.后续培养中,外植体取材为叶片的胚状体多数可以分化出芽,进而得到再生植株,而子叶或下胚轴来源的外植体芽形成率较叶片低.因此,对于 B5h + B5 的再生系统,甘农 1 号叶片是做苜蓿遗传转化的理想材料.

表 1 苜蓿品种对愈伤组织形成及分化的影响

Tab. 1 Callus induction and plant regeneration ability of six alfalfa varieties

苜蓿品种	愈伤状况	愈伤数/个	出愈率/%	分化时间/d	分化数/个	分化能力	分化率/%
阿尔岗金	淡黄色、浆状	6.67	95.2 ^a	35	0.67	1-3	9.5 ^b
三得利	黄绿色、颗粒状	6.33	90.5 ^a	无分化	0.00	0	0.0 ^b
陇东	淡黄色、浆状	7.00	100.0 ^a	30~40	1.67	2-7	23.8 ^{ab}
甘农 1 号	淡黄色、浆状	7.00	100.0 ^a	25~30	3.00	2-15	42.9 ^a
大花	黄绿色、玻璃化	7.00	100.0 ^a	42	0.67	2-3	9.5 ^b
天蓝	淡黄色松软	7.00	100.0 ^a	无分化	0.00	0	0.0 ^b

表 2 甘农 1 号不同外植体对愈伤组织形成及分化的影响

Tab. 2 Callus induction and plant regeneration ability of different explants of Gannong No. 1

外植体来源	愈伤组织状况	出愈率/%	分化时间/d	分化能力	分化率/%
下胚轴	白色、致密粘连	90.5	50	1~4	23.8
子叶	黄绿色、松软粘连	100	40	3~5	33.3
叶片	淡黄色、浆状	100	25~30	5~15	47.6

注:各参数计算方法同表 2;下胚轴、子叶取材于 2 周龄的无菌苗,叶片取材于大田培养实生苗.

2.3 培养基对再生植株生根的影响

从表 3 可知,MS 或 1/2 MS 培养基对甘农 1 号再生芽根的分化影响不显著,但不同的蔗糖浓度对根分化影响较大.蔗糖浓度为 20 g/L 时再生芽茎叶长势好,但是根发育缓慢,基本上无侧根的发;蔗糖浓度 10 g/L 条件下生根快且生根率明显高于 20 g/L,根粗壮,侧根明显但茎叶长势相对比较缓慢

(表 3).

2.4 *AtPCS1* 植物表达载体的构建及农杆菌转化子的鉴定

根据 *AtPCS1* 基因序列设计引物,在 sense 引物中加入 *Bam*H I 酶切位点,antisense 引物加入 *Eco*R I 酶切位点,通过 PCR 得到目的大小约 1.4 kb 的片段.目的片段通过 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切

后连入中间载体 pBPF,在 *AtPCS1* 基因的上下游分别加入 35S 启动子及 nos 终止子(约 3.2 kb).对中间载体 pBPF - *AtPCS1* 作 *Hind* III 单酶切后,回收上述表达元件,插入到 pBI121 中得到植物表达载体 pBI121 - *AtPCS1*(图 1),转化大肠杆菌.通过限

制性内切酶酶切及 PCR 鉴定获得阳性克隆(图 2).将构建好的质粒测序,结果表明所得基因序列准确无误.提取质粒 pBI121 - *AtPCS1* 转化农杆菌,通过菌落 PCR 鉴定获得阳性转化子(图 3),即获得含 *AtPCS1* 基因的工程农杆菌.

表 3 不同生根培养基对再生苗生根的影响

Tab.3 The seedling rooting ability in different medium

培养基	蔗糖浓度/ $g \cdot L^{-1}$	生根率/ %	生根时间/ d	生根状况
1/2 MS	20	66.7	20 ~ 30	细短、有枯黄、无侧根
	10	100	5 - 10	粗壮、多侧根
MS	20	50	20 - 30	细短、有枯黄、无侧根
	10	100	8 - 12	粗壮、多侧根

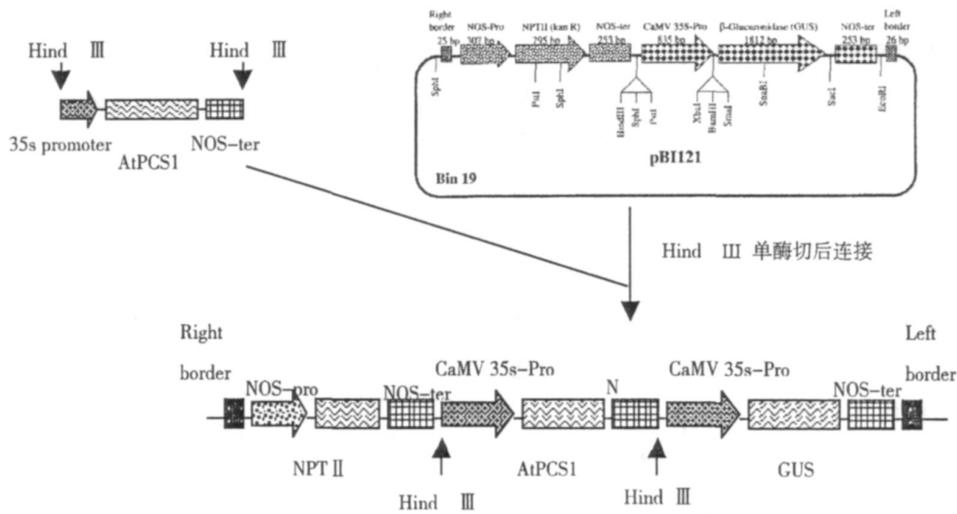
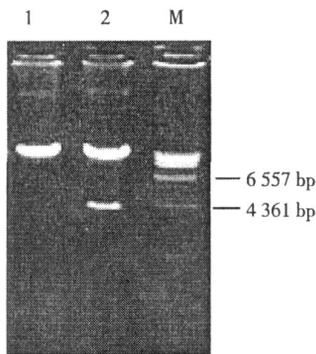


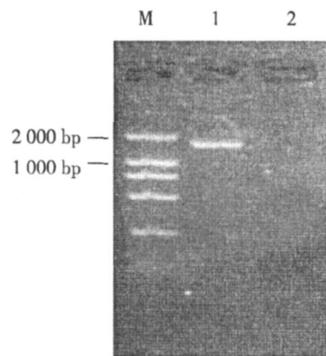
图 1 植物表达载体 pBI121 - *AtPCS1* 的构建

Fig.1 The construction of plant expression plasmid pBI121 - *AtPCS1*



注:1. *Xba*I 酶切重组质粒;2. *Bam*HI 酶切重组质粒;
M. DNA 标准(- *Hind* III 酶切).

图 2 重组植物表达质粒 pBI121 - *AtPCS1* 的酶切鉴定
Fig.2 Enzyme digest of Recombinant expression of plasmid pBI121 - *AtPCS1*



注:M. DNA 标准(DL 2000);1. EHA105 的 PCR 鉴定;2. 阳性对照.

图 3 含 *AtPCS1* 基因的 PCR 鉴定
Fig.3 PCR identity of the *AtPCS1*

3 讨论

3.1 愈伤组织对分化的影响

苜蓿愈伤组织的形成是一个由供体植株来源、生理、基因型、培养基成分和外界环境等诸多因素相互作用的复杂过程^[11,12]。本试验发现,单凭愈伤组织的长势是不能有效地评价或预测苜蓿愈伤组织分化出苗的频率大小。有时,愈伤组织可以单极化疯长,最终却不能分化。那些起初发育迅速、颜色翠绿、质地干燥紧实的愈伤组织通常不能分化出苗,而那些起初生长缓慢、颜色淡黄、质地较松软稀粘的愈伤组织,在2次继代后常会形成胚性愈伤组织,逐渐产生绿色芽点并最终分化成苗。

3.2 基因型对苜蓿分化再生的影响

在众多影响体外再生效率因素中供体植株的基因型是最关键的因素。本试验结果表明,苜蓿叶片形成愈伤组织的能力同基因型关系并不大,这与先前的试验结果是一致的^[13]。苜蓿的分化能力同基因型密切相关,甘农1号的分化能力同其它品种之间差异显著,分化能力最强,陇东次之,阿尔冈金等品种的分化能力弱。进一步试验发现,甘农1号叶片分化再生能力是最强的。

3.3 不同外植体对分化的影响

Kenji Okumura^[14]在诱导紫花苜蓿4个品种的分化实验中发现茎尖是形成胚状体能力最强的外植体,其次为下胚轴,根尖、根及叶片等作为外植体也能产生胚状体。本试验对甘农1号的研究表明,不同起源的外植体之间愈伤组织及胚状体的形成能力都无显著差异,这同甘农1号属于高产品种有关。在遗传转化操作中,考虑到非转化的细胞可被抗生素充分的杀死,从而提高筛选效率,因此认为叶片是遗传转化理想的材料。

3.4 再生苗生根

再生芽能否顺利生根是组织培养从实验室走向大田的关键。研究表明,不同栽培品种的苜蓿分化后在无激素的MS、1/2MS等培养基上均能形成根的分化,进而长成完整的小苗^[15]。对于试验中选用的甘农1号,其再生苗在MS或1/2MS培养基上均能顺利实现根的分化,且两种培养基上生根情况基本无差别,表明再生苗根的分化对培养基营养条件要求并不高。在植物组培体系中,蔗糖除了提供碳源

外,还具有调节渗透压的作用。张万军^[16]等使用蔗糖含量不同的MS及1/2MS培养基诱导苜蓿再生芽生根,结果发现蔗糖含量为10g/L的1/2MS培养基中再生芽的生根率及生根时都是最佳的。本试验比较了10、20g/L的蔗糖浓度对甘农1号再生苗生根的影响,发现在10g/L的蔗糖浓度条件下,甘农1号再生苗10d左右即可长出粗壮的根。但浓度达到20g/L时,植株生根率反而下降,这可能是因为随着培养基渗透压升高,抑制了植株对水分和养分的吸收,进而抑制了其正常的生长发育。蔗糖浓度过低会造成新生苗无法得到充足的碳源,也影响茎叶的生长。

参考文献

- [1] 孙瑞莲,周启星. 高等植物重金属耐性与超累积特性及其分子机理研究[J]. 植物生态学, 2005, 29(3): 497-504
- [2] Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification[J]. Plant Physiol, 2000, 123(3): 825-832
- [3] Lu Y P, Li Z S, Rea P A. *AtMRP1* gene of *A. rabidopsis* encodes a glutathione S - conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP binding cassette transporter gene[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(15): 8243-8248
- [4] Peterson A G, Oliver D J. Leaf-targeted phytochelatin synthase in *A. rabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(11 - 12): 885-892
- [5] Vatamaniuk O K, Mari S, Lu Y P, et al. *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *A. rabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution[J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(12): 7110-7115
- [6] Zhu Y, Pilon-Smits E A H, Jouanin L, et al. Overexpression of glutathione synthetase in *Brassica juncea* enhances cadmium tolerance and accumulation [J]. Plant Physiol, 1999, 119(1): 73-79
- [7] Zhu Y, Pilon-Smits E A H, Terry N, et al. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing glutamylcysteine synthetase [J]. Plant Physiol, 1999, 121(4): 1169-1177
- [8] Cheyne V, Dale P J. Shoot tip culture in forage legumes[J]. Plant Sci Letter, 1980, 19: 303-309
- [9] 杨燮荣, 邵根福, 周荣仁. 苜蓿组织培养及植株的再生

- [J]. 植物生理学通报, 1981, (5): 33-34
- [10] Kenichi S, Tadashi Takamizo. Medium conditions for *in vitro* selection of Aluminum-tolerant cells of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Journal of Japanese Society of Grassland Science, 1991, 37: 157-168
- [11] 李 聪, 熊德邵, 耿华珠. 苜蓿愈伤组织再生植株的研究[J]. 中国草地, 1989, (6): 51-56
- [12] 宫相忠, 黄建渺. 苜蓿组织培养体细胞胚发生的细胞学观察[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27: 504-507
- [13] 王瑞云, 岳文斌, 任有蛇. 不同苜蓿品种对叶片愈伤组织诱导及植株再生的影响[J]. 中国草地, 2004, 26: 36-39
- [14] Kenji Okumura. 应用体细胞进行苜蓿无性系繁殖和保存的研究[J]. 国外畜牧学——草原与牧草, 1997, (3): 44-45
- [15] 危晓薇, 蔡丽娟, 李仁敬. 紫花苜蓿组织培养及其再生植株[J]. 新疆农业科学, 1999, (2): 73-75
- [16] 张万军, 王 涛. 紫花苜蓿愈伤成苗高频再生体系的建立及其影响因子的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35: 1579-1583
- [17] 王鸣刚, 任小换, 刘晓风. 植物修复重金属污染土壤的机理及其应用前景[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(5): 108-113