

辣椒花药胚状体发育相关基因的克隆与分析

张菊平^{1,2}, 巩振辉¹, 马继鹏¹, 马 维¹, 张兴志²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

【摘 要】 **【目的】**从辣椒花药中克隆与胚状体发育相关的基因, 并对其进行序列分析。 **【方法】**以 *LTP* 基因、*GST* 基因同源序列设计简并引物, 采用 RT-PCR 方法对辣椒小孢子胚状体发育相关基因进行克隆, 测序后对其进行分析。 **【结果】**获得 2 个可能与辣椒花药胚状体发育相关的基因片段 *PELTP* (GenBank 登录号为: EF583618) 和 *PEGST* (GenBank 登录号为: EF583619), 其长度分别约为 750 bp 和 1 000 bp。序列分析表明, *PELTP* 基因与辣椒 *LTP* 基因同源性为 98%, *PEGST* 基因与辣椒 *GST* 基因的同源性为 99%。 **【结论】***PELTP* 和 *PEGST* 基因可能在辣椒小孢子胚状体发育早期起着重要作用。

【关键词】 辣椒; 花药培养; 胚状体; 基因克隆
【中图分类号】 S641. 3; Q785 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)09-0123-05

Cloning and analysis of embryogenesis related gene in pepper anther culture

ZHANG Ju-ping^{1,2}, GONG Zhen-hui¹, MA Ji-peng¹, MA Wei¹, ZHANG Xing-zhi²

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: **【Objective】** The objective of this study was to clone embryogenesis related gene from pepper anther culture and analyze their sequences. **【Method】** Homologous sequence amplification method was used in gene isolation. The RT-PCR method was used to identify differential gene expression in the process of microspore-derived embryogenesis in pepper. **【Result】** Two gene sequences *PELTP* (accession number: EF583618) and *PEGST* (accession number: EF583619) were obtained, which proved to be expressed at the embryoids. The sequence lengths were 750 bp and 1 000 bp respectively. Blast results showed that *PELTP* was highly homologous to *LTP* gene of pepper and *PEGST* to *GST* gene of pepper. Homology was 98% and 99% respectively. **【Conclusion】** It is presumed that the two genes may play an important role in the early stages of pepper microspore embryogenesis.

Key words: pepper (*Capiscum annuum* L.); anther culture; embryoid; gene cloning

鉴定雄核发育过程中特殊的发育基因, 对于雄核发育机制的研究和发现特殊的标记具有重要意义。有学者认为, 正常的小孢子发育、合子胚发生以及体细胞胚胎发生, 与特定的基因表达有一定关系。小孢子再生的主要问题是如何诱导其进入雄核发育途径。在诱导雄核发育过程中, 改变胚性小孢子内

* [收稿日期] 2007-09-26
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771467); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A7); 西北农林科技大学植物育种专项(05YZ024-1)
[作者简介] 张菊平(1968—), 女, 河南汝阳人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。
E-mail: jupingzhang@163.com
[通讯作者] 巩振辉(1957—), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究。
E-mail: gzhh168@yahoo.com.cn

mRNA 以及蛋白质的合成与积累非常必要,这将会导致细胞分裂产生孢子体类型。目前,只有几个在小孢子胚胎发生早期阶段特殊表达的基因被分离出来^[1],如在小麦小孢子胚胎发生早期表达的的 ABA 的应急基因^[2],在芸薹属小孢子胚胎发生中高效表达的种子贮藏 *napin* 基因^[3-4],在具有胚胎发生潜力的大麦花药细胞中,优势表达 peroxiredoxin 抗氧化剂基因^[5]。利用 cDNA 文库差异显示技术,已鉴定出大麦早期小孢子胚胎发生的 3 个 cDNA 标记,其中 *ECLTP* 与 *LTPS*、*ECGST* 与 *GSTS* 有同源性^[6]。EP2 作为胚胎发生潜力标志的一种脂质转移蛋白,在胡萝卜体细胞悬浮液中已被报道^[7]。显然,与小孢子胚胎发生有关的基因鉴定仍处于初期研究阶段。在小孢子再生过程的早期阶段,有很多的基因需要分离、鉴定,并确定其功能^[8]。巩振辉等^[9]、张菊平^[10]在辣椒小孢子培养研究中,获得了大量由小孢子发育的胚状体与双单倍体植株,为研究辣椒小孢子胚状体发育相关基因提供了有利条件。本试验对辣椒小孢子胚状体发育相关基因进行了克隆分析,以期从分子水平上揭示雄核发育的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 辣 椒 辣椒杂交种 P53,由西北农林科技大学辣椒种质资源与育种课题组提供。

1.1.2 试 剂 反转录酶 M-MLV 为大连宝生物有限公司生产;DNA 聚合酶为北京鼎国生物技术中心生产;DNA 分子量标准 DL-2000 购自 TaKaRa 公司;克隆所用的受体菌株 *E. coli* DH5 α 由国家小麦改良中心杨凌分中心实验室提供;pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物有限公司。

1.1.3 引物设计与合成 用 DNAMAN 软件,根据脂质转移蛋白基因(*LTP*)同源序列设计简并引物为:上游引物 P1:5'-YAS AMM MWA TGGCTT CCA AGA-3';下游引物 P2:5'-WTA RAC WWC TKY AWA TTG KKA AG-3'。根据谷胱甘肽硫转移酶基因(*GST*)同源序列设计 1 对引物:上游引物 P3:5'-TTC TTG AAG TCC CAG GAG TTG-3';下游引物 P4:5'-CAA CAT GCA GAC AAC TGT ATT ATA-3'。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 辣椒花药的培养

用 MS+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L KT+8

g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖+2 g/L 活性炭(pH 5.8)培养基培养辣椒花药。当胚状体露出花药时收集胚状体,同时收集形成愈伤组织的花药,以处于单核靠边期末培养的花药为对照,3 种样品收集后用液氮速冻并保存于-80 ℃超低温冰箱中,用于 RNA 的提取。

1.3 辣椒总 RNA 的提取与纯化

采用改良异硫氰酸胍法^[11]提取辣椒总 RNA。将提取的总 RNA 42.5 μ L 转移至另一干净离心管中,加入 10 $\times$ DNase I 缓冲液 5 μ L, DNase I (RNase free, 5 U/ μ L) 2 μ L, RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L。稍离心,37 ℃反应 30 min。加 450 μ L DEPC 处理过的超纯水、250 μ L 氯仿-异戊醇 (V(氯仿):V(异戊醇)=24:1)、250 μ L Tris-饱和酚,充分混匀,4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入等体积的氯仿-异戊醇 (V(氯仿):V(异戊醇)=24:1),上下颠倒数次,4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加入等体积的异丙醇,混匀后-20 ℃放置 30 min,4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,沉淀用体积分数 75%乙醇 500 μ L 洗涤,8 000 r/min 离心 3 min,弃上清室温干燥,沉淀溶于 15 μ L DEPC 水,-20 ℃保存备用。

1.4 辣椒花药胚状体相关基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 cDNA 第一链的合成 取总 RNA 10 μ L,加六碱基随机引物(0.2 μ g/ μ L) 2.5 μ L,70 ℃水浴 5 min,冰上 5 min,然后加入 RNasin(40 U/ μ L) 0.5 μ L,5 $\times$ RT buffer 5.0 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 1.8 μ L,dNTP(10 mmol/L) 2.0 μ L,M-MLV (1 U/ μ L) 1.0 μ L,DEPC-H₂O 2.2 μ L,置 PCR 仪中反应。反应条件为 37 ℃ 60 min,95 ℃ 5 min,4 ℃保存。

1.4.2 PCR 反应 反应体系为 25 μ L:cDNA 模板 1.0 μ L,10 $\times$ buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L,dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, *Taq* DNA polymerase(5 U/ μ L) 0.2 μ L,上游引物(10 mmol/L) 1.0 μ L,下游引物(10 mmol/L) 1.0 μ L,ddH₂O 16.8 μ L。扩增 *PEGST* 基因反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃保存。扩增 *PELTP* 基因反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,47 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min 35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃保存。

1.5 目的基因片段的回收、克隆和测序

取 PCR 扩增产物,进行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下切下目的条带,用 DNA 凝胶回收

试剂盒回收目的片段。将回收的目的片段与 pMD18-T 载体相连,连接反应条件为:ligation mixture 2.5 μ L,回收 DNA 溶液 2.0 μ L,pMD18-T 载体 0.5 μ L,16 $^{\circ}$ C 反应 2 h,4 $^{\circ}$ C 保存。从-70 $^{\circ}$ C 冰箱中取 100 μ L DH5 α 感受态细胞悬液,室温下使其解冻后立即置冰上,加入上述连接产物,轻轻摇匀,置冰上 30 min,42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s,然后迅速置冰上 3~5 min,再向管中加入 1 mL LB 液体培养基(不含 Amp),混匀后 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h。将上述菌液摇匀后取 200 μ L 涂布在含有 40 μ g/mL X-gal、0.5 mmol/L IPTG 和 50 μ g/mL Amp 的 LB 固体培养基上,正面向上放置 0.5 h 后倒置培养皿,37 $^{\circ}$ C 培养 16~24 h。对菌落进行蓝白斑筛选和 PCR 分析。挑取白斑溶于 10 μ L 无菌水中,取 2 μ L 作为模板,以通用引物(T₁、T₂)进行 PCR。PCR 反应体系为

25 μ L:模板 2 μ L,10 $\times$ buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L,10 mmol/L dNTP 0.5 μ L,5 U/ μ L Taq DNA polymase 0.2 μ L,50 mmol/L T₁ 0.2 μ L,50 mmol/L T₂ 0.2 μ L,ddH₂O 17.4 μ L。反应条件同前。每个材料随机挑选 3~5 个阳性克隆送上海捷瑞生物工程有限公司测定 DNA 序列。利用 DNAMAN、DNAclub 软件及 NCBI 网站对测定结果进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒胚状体相关基因的扩增结果

结果(图 1)显示,以 P₁、P₂ 为引物扩增的条带长度为 750 bp 左右,以 P₃、P₄ 为引物扩增出的条带长度为 1 000 bp 左右,而且两者的表达量均较高,将其分别命名为 *PELTP* 和 *PEGST* 基因。

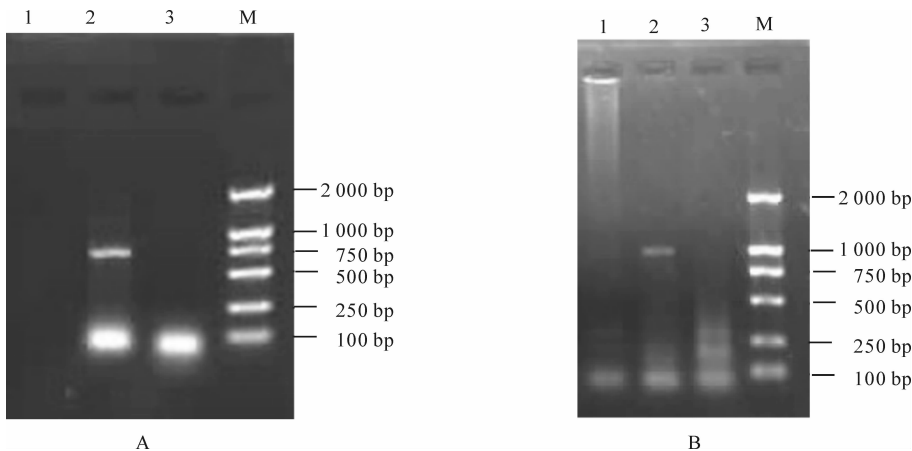


图 1 辣椒花药胚状体发育相关基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

A. *PELTP* 基因的扩增产物;B. *PEGST* 基因的扩增产物;

1. 对照花药;2. 胚状体;3. 无反应花药和形成愈伤的花药;M. DNA 标样 DL2000

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis analysis on PCR amplified production of embryogenesis related gene in pepper

A. Amplified result of *PELTP* gene;B. Amplified result of *PEGST* gene;

1. Controlled anther;2. Embryoid anther;3. Non-responded and callus anther;M. DNA Marker DL2000

2.2 辣椒胚状体相关基因的克隆、测序及序列分析

由图 2 可知,回收产物片段长度分别约为 750 bp 和 1 000 bp,与预期结果一致。菌落 PCR 鉴定结果(图 3)表明,扩增出约 750 bp 和 1 000 bp 的片段,表明目的片段已连接到 T 载体上。为了排除 PCR 扩增反应过程中可能引入错配碱基,重复进行了 2 次 PCR 扩增反应和扩增产物的克隆测序,2 次的试验结果完全一致。测序结果表明,*PELTP* 片断长 682 bp,*PEGST* 片断长 993 bp。*PELTP* 和 *PEGST* 基因与辣椒属中已报道的脂质转移蛋白基因(LTP,登录号:AJ879120)和谷胱甘肽硫转移酶基因(GST,登录号:AJ143431)片段的同源性分别

为 98%和 99%,其中 *PELTP* 与脂质转移蛋白酶基因有 9 个碱基差异,*PEGST* 与 A 谷胱甘肽硫转移酶基因有 3 个碱基差异。

将克隆的 *PEGST* 基因所推测的氨基酸序列与已知的 GST 酶的多肽序列(AAN39918.1)进行比对分析,两者之间有 2 个氨基酸差别。将克隆的 *PELTP* 基因所推导的氨基酸序列与 LTP 蛋白的多肽序列(CAI51313.1)进行比对分析,两者只有 1 个氨基酸差异。

由此可以推测,谷胱甘肽硫转移酶基因和脂质转移蛋白基因,可能在辣椒花药培养胚状体形成早期起重要作用。

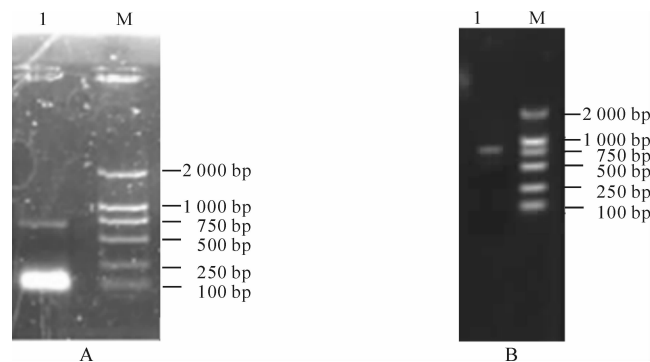


图 2 辣椒花药胚状体发育相关基因的 PCR 产物回收结果

A. *PELTP* 检测;B. *PEGST* 检测;1. PCR 目的片段;M. DNA 标样 DL2000

Fig. 2 Detection result of PCR production of embryogenesis related gene in pepper

A. Detection of *PELTP*;B. Detection of *PEGST*;1. PCR objective segment;M. DNA Marker DL2000

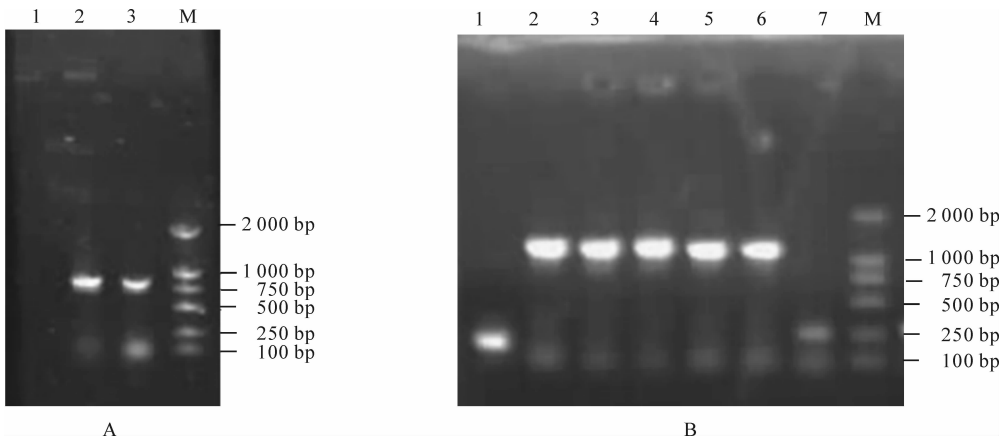


图 3 转染辣椒 *PELTP* 和 *PEGST* 基因菌落的 PCR 鉴定结果

A. *PELTP* 基因;B. *PEGST* 基因;1,7. 空白菌落;2~6. 阳性克隆;M. DNA 标样 DL2000

Fig. 3 Detection map of bacterium drop PCR production of *PELTP* and *PEGST*

A. *PELTP* gene;B. *PEGST* gene;1,7. Blank bacterium drop;2-6. Masculine clone;M. DNA Marker DL2000

3 讨 论

迄今为止,对植物胚胎发生早期基因的克隆还很少,主要原因是早期胚胎取样困难,而且缺乏有关基因的分子及细胞标记。研究植物体细胞胚胎发生、发育过程中基因的差异表达,可为了解胚胎发生早期的分子及细胞变化提供重要信息。植物体细胞脱分化后再分化为胚性细胞的过程受细胞内、外多种因子的调控,这些因子作用的实质是调节特定基因的表达。在胚性细胞分化和体细胞胚胎发育过程中,均伴随着特定遗传信息的表达,其实质是基因按顺序表达调控的结果,是相应基因产物作为胚性细胞形成和体细胞胚胎发育的分子基础^[12]。

目前,从大麦中克隆的小孢子胚胎发生早期表达的基因有 3 个:*ECA1*(登录号为 AF109193)、*ECGST*(登录号为 AF109194)和 *ECLTP*(登录号

为 AF109195)。在小孢子培养过程中,*ECGST* 编码的蛋白可能对保护细胞免遭氧化胁迫有重要作用;*ECLTP* 的表达类型与 *LTP* 相似,而 *LTP* 被作为胡萝卜体细胞胚状体发育早期阶段的标记^[6]。本试验克隆获得的 *PELTP* 和 *PEGST* 2 个基因片段,分别与辣椒上已报道的 *LTP* 和 *GST* 基因的同源性达到 98% 和 99%,其在 GenBank 上登录号分别为 EF583618 和 EF583619。辣椒上这 2 个基因与大麦上的 *ECGST* 和 *ECLTP* 基因没有同源性,这可能与作物种类不同有关(大麦为单子叶禾本科作物,辣椒为双子叶茄科作物)。由此可以推测,本试验得到的 2 个基因片断可能与辣椒小孢子早期胚胎发生有关,至于其具体功能尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Touraev A, Vincente O, Heberle-Bors E. Initiation of micro-

spore embryogenesis by stress [J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(8): 297-302.

[2] Reynolds T L, Crawford R L. Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cyateine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32(5): 823-829.

[3] Boutilier K A, Ginés M J, DeMoor J M, et al. Expression of the BnmNAP subfamily of napin genes coincides with the induction of *Brassica* microspore embryogenesis [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(6): 1711-1723.

[4] Custers J B M, Cordewener J H G, Dons H J M, et al. Regulation of the inductive phase of microspore embryogenesis in *Brassica napus* [J]. Acta Horticulturae, 1996, 407: 209-217.

[5] Stirn S, Mordhorst A P, Fuchs S, et al. Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare* L) cell cultures [J]. Plant Science, 1995, 106(2): 195-206, 12.

[6] Virntén P L, Nakamura T, Kasha K J. Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L) [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 41(4): 455-463.

[7] Sterk P, Booij H, Schellekens G A, et al. Cell specific expression of carrot EP2 lipid transfer protein gene [J]. The Plant Cell, 1991, 3(9): 907-921.

[8] Reynolds T L. Pollen embryogenesis [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33(1): 1-10.

[9] 巩振辉, 张菊平, 刘珂珂, 等. 一种辣椒小孢子诱导获得胚状体的培养方法: 中国, CN1836496 [P]. 2006-09-27.

Gong Z H, Zhang J P, Liu K K, et al. A culture method of obtaining embryoid of induced microspore in pepper: China, CN1836496 [P]. 2006-09-27. (in Chinese)

[10] 张菊平. 辣椒花药小孢子培养及其胚状体发育机理研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

Zhang J P. Study on anther & microspore culture and mechanism of embryogenesis in pepper [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

[11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. Huang P T (translation). Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)

[12] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚胎发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.

Cui K R, Dai R L. The Molecular biology of somatic embryogenesis in plant [M]. Beijing: Science Press, 2000. (in Chinese)

(上接第 122 页)

[9] 韩磊, 张洪平, 艾应伟. 不同激素对春石斛组织培养影响研究初报 [J]. 北方园艺, 2007(3): 177-178.

Han L, Zhang H P, Ai Y W. Preliminary study on the effect of different hormones on tissue culture of nobile-type *Dendrobium* [J]. Northern Horticulture, 2007(3): 177-178. (in Chinese)

[10] 李杰, 黄敏仁, 王明麻, 等. 大花蕙兰不同基因组培繁殖系数的差异性 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(1): 98-100.

Li J, Huang M R, Wang M X, et al. Differences of *Cymbidium hybridum* propagation ratio in different genotype [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2005, 29(1): 98-100. (in Chinese)

[11] 蒋泽平, 梁珍海, 朱军, 等. 不同基因型梅花组织培养增殖率差异 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2005, 6(6): 550-552.

Jiang Z P, Liang Z H, Zhu J, et al. Differences in tube-shoot propagation ratio of *Prunus mume* in different genotypes [J]. Journal of Beihua University: Natural Science Edition, 2005, 6(6): 550-552. (in Chinese)

[12] 黄燕, 吴平, 汪安, 等. SAS 统计分析及应用 [M]. 北京: 机械工业出版社, 2006: 49-129.

Huang Y, Wu P, Wang A, et al. Statistical analysis and application with SAS [M]. Beijing: China Machine Press, 2006: 49-129. (in Chinese)

[13] 徐雨. 春石斛繁殖及花期调控技术的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006.

Xu Y. Study on the propagation and florescence regulation of nobile-type *Dendrobium* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006. (in Chinese)

[14] 廖福琴, 郑作莉, 黄萍萍, 等. 石斛兰组织培养技术研究 [J]. 龙岩师专学报, 2003(6): 77-78.

Liao F Q, Zheng Z L, Huang P P, et al. Study on tissue culture of *Dendrobium* [J]. Journal of Longyan Teachers College, 2003(6): 77-78. (in Chinese)