

半胱氨酸蛋白酶基因表达载体的构建及转基因苜蓿的初步研究

康俊梅¹, 乔建江^{1,2}, 王 堃², 杨青川¹

(1 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2 中国农业大学 动物科技学院 草地研究所, 北京 100193)

【摘要】【目的】为培育高抗逆的作物品种提供科学依据。【方法】以耐盐苜蓿“中苜1号”为外植体, 采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的叶盘法转化苜蓿。【结果】成功构建了含有半胱氨酸蛋白酶基因 *MsCP1* 和报告基因 *GUS* 的植物表达载体 pCAMBLA1391-CP-*GUS*, 共获得 47 株抗性再生植株。经 PCR 和 RT-PCR 检测, 表明外源基因已成功整合到苜蓿基因组中, 并在转录水平得到表达。【结论】初步获得了高抗逆的转基因苜蓿新品系。

【关键词】 半胱氨酸蛋白酶; 载体构建; 转基因植株; 紫花苜蓿

【中图分类号】 S541; Q78

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)12-0041-07

Construction of plant expression vectors containing *MsCP1* genes and preliminary study of transgenic alfalfa

KANG Jun-mei¹, QIAO Jian-jiang^{1,2}, WANG Kun², YANG Qing-chuan¹

(1 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2 Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】This study was done in order to give new insights into the breeding of high stress-resistant crop cultivars. 【Method】The genetic transformation of alfalfa cultivars “Zhongmu No. 1” mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was studied by using the transient expression of *GUS* gene. 【Result】A new plant expression vector pCAMBLA1391-CP-*GUS*, containing cysteine protease gene *MsCP1* and *GUS* gene, was successfully constructed through sequential restriction digests and ligations recombination. 47 transformation plants were obtained. PCR and RT-PCR analysis showed that the foreign *MsCP1* and *GUS* gene were inserted into the genome of these plants and expressed in mRNA level. 【Conclusion】New strains of transgenic alfalfa with high stress-resistance were primarily gained.

Key words: cysteine protease; construction of plant expression vector; transgenic plant; alfalfa (*Medicago sativa* L.)

干旱、低温、盐渍等环境因素是影响植物生长和作物产量的主要非生物胁迫, 往往会导致农作物大面积减产, 造成巨大的经济损失。因此, 长期以来,

科研工作者不断探索逆境胁迫对植物体内不同生理生化反应的影响, 为揭示逆境胁迫反应的生物学机制以及培育作物抗逆新品种进行着不懈的努力, 但

* [收稿日期] 2007-12-14

[基金项目] 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费专项基金(ywf-td-3)

[作者简介] 康俊梅(1972—), 女, 内蒙古集宁人, 助理研究员, 博士, 主要从事牧草与草坪草遗传育种及生物技术研究。

E-mail: kangjmei@yahoo.com.cn

[通讯作者] 杨青川(1966—), 男, 内蒙古丰镇人, 研究员, 博士生导师, 主要从事牧草遗传育种与生物技术研究。

E-mail: qchyang66@yahoo.com.cn

由于农作物抗逆境胁迫性状的复杂性,传统育种方法的应用受到很大限制。近几年,随着基因工程的迅速发展,为重要农作物的品质和抗逆性状的改良提供了新途径。

基因工程研究的一个重要目标是改良重要农作物的品质和抗逆性状,如增强农作物的抗虫、抗病、抗逆性及提高作物中某些特定蛋白质或氨基酸的含量等。半胱氨酸蛋白酶(Cysteine protease, CP)是一类重要的蛋白酶家族,具有多种重要的生理功能,参与植物的各种生理过程,在多种逆境条件下可被上调以增强植物的适应性。有研究表明,在环境胁迫(如低温、干旱和盐胁迫)条件下,CP mRNA 会累积^[1-2],并且在植物某些涉及细胞程序化死亡的发育阶段中,CP mRNA 含量也会增加,这表明 CP 与植物细胞程序化死亡有关^[3]。CP 也存在于叶绿体和液泡中,可降解光合作用必需酶 1,5-二磷酸核酮糖脱羧/加氧酶(Rubisco)的大亚基,在遭受水分胁迫而衰老的植物叶片中,CP 负责逆境条件下受损或变性蛋白的降解^[4]。此外,在植物的正常发育过程中,CP 可动员贮存蛋白,以供植物遭受逆境胁迫时这些蛋白可降解实现氮素的再利用;在植物特异组织的形成,如木质部分化和通气组织形成等过程中,也有 CP 的参与。目前,已从许多植物中克隆到编码 CP 的基因^[5-7]。因此该基因已成为研究逆境胁迫基因工程的热点,但将半胱氨酸蛋白酶基因转化苜蓿的研究还未见报道。

本研究构建了半胱氨酸蛋白酶基因(*MsCP1*)的植物表达载体 pCAMBLA1391-CP-GUS,并将其转化“中苜 1 号”紫花苜蓿,获得转基因植株,以期为创造出高抗逆的种质材料奠定基础,并为进一步培育高抗逆的作物品种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 菌株由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草研究室保存;农杆菌 LBA4404 菌株由中国农业大学生物学院赵占军硕士馈赠;质粒 pMD-CP 由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草研究室保存;质粒 pBI121 由北京市农林科学院李瑞芬博士馈赠;真核表达载体 pCAMBIA1391 由中国农业大学生物学院陈珈教授馈赠。

1.1.2 植物材料 耐盐苜蓿品种“中苜 1 号”(Medicago sativa L. cv “Zhongmu NO. 1”),由中国农业科

学院北京畜牧兽医研究所牧草研究室提供。

1.1.3 酶和生化试剂 各种限制性内切酶、工具酶均为宝生物(大连)有限公司产品,氨苄青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)、卡那霉素(Kan)和链霉素(Str)等抗生素购自 Sigma 公司,植物激素 6-BA 和 IAA 等购自奇华盛生物技术有限公司,DNA 回收试剂盒均购自上海生工生物技术有限公司。

1.1.4 PCR 检测引物 PCR 和 RT-PCR 检测引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。GUS 基因部分片段的检测引物:GUSF: 5'-GCA ACT GGA CAA GGC ACT-3', GUSR: 5'-GAG CGT CGC AGA ACA TTA CA-3'。

MsCP1 基因检测引物:CPF: 5'-GC TCTAGA TGAAAGATGGCACAGTGGACG-3', CPR: 5'-CG GGATCC GGCCACAACAGGATA-3', CPF 和 CPR 中限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 的酶切位点分别用方框标出。引物 CPR 中去掉了终止密码子,以便于与 GUS 基因融合。

MsCP1-GUS 片段的检测引物: AnF: 5'-CG GGATCC TTGGAGTCAGCTTAC-3', GUSR: 5'-GAGCGTCGCAGAACATTACA-3', 扩增片段长度约 2 kb。

1.2 苜蓿 *MsCP1* 基因植物表达载体的构建

依据参考文献[8-9]的方法构建植物表达载体 pCAMBLA1391-CP-GUS,构建过程见图 1。

1.2.1 *MsCP1* 基因片段的制备 以质粒 pMD-CP 为模板、CPF 和 CPR 为引物扩增 *MsCP1*(退火温度为 56 ℃),PCR 反应程序:变性 95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 5 min。反应结束后,琼脂糖凝胶电泳检测目的片段,回收 PCR 产物。回收产物用 *Xba* I 和 *Bam*H I 进行双酶切,反应体系如下:*MsCP1* 回收片段 16.0 L, *Xba* I (12 U/L)2.0 L, *Bam*H I (15 U/L)2.0 L, 10 $\times$ K Buffer 2.0 L, ddH₂O 18.0 L,总体积 40.0 L。37 ℃ 保温 12 h,回收目的片段,-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 pBI121 线性大片段的制备 由于本研究所选的酶切位点相邻,为保证酶切完全,采用分步单酶切的方法对质粒 pBI121 进行酶切。先用 *Xba* I 37 ℃ 酶切回收,再用 *Bam*H I 在 30 ℃ 酶切。二者的单酶切体系如下:*Xba* I 单酶切体系:pBI121 载体 3.0 L, *Xba* I (12 U/L)1.0 L,10 $\times$ M Buffer 2.0 L,

BSA 1.0 L, ddH₂O 13.0 L, 总体积 20.0 L; *Bam*H I 单酶切体系: pBI121 载体 3.0 L, *Bam*H I (15 U/L) 1.0 L, 10×K Buffer 2.0 L, ddH₂O 14.0 L, 总体积 20.0 L。回收酶切片段, 进行如下连接反应或 -20 °C 保存备用。

1.2.3 pBI121-CP 表达载体的构建 将回收得到

的 pBI121 线性大片段与 *MsCP1* 基因片段采用 T4 连接酶进行连接, 构建表达载体 pBI121-CP。将 pBI121-CP 转化大肠杆菌 DH5α, 采用 PCR 法, 用引物组合 CPF/CPR 对 *CP* 基因进行检测, 扩增方法同 1.2.1, 选取阳性单克隆进入下一步。

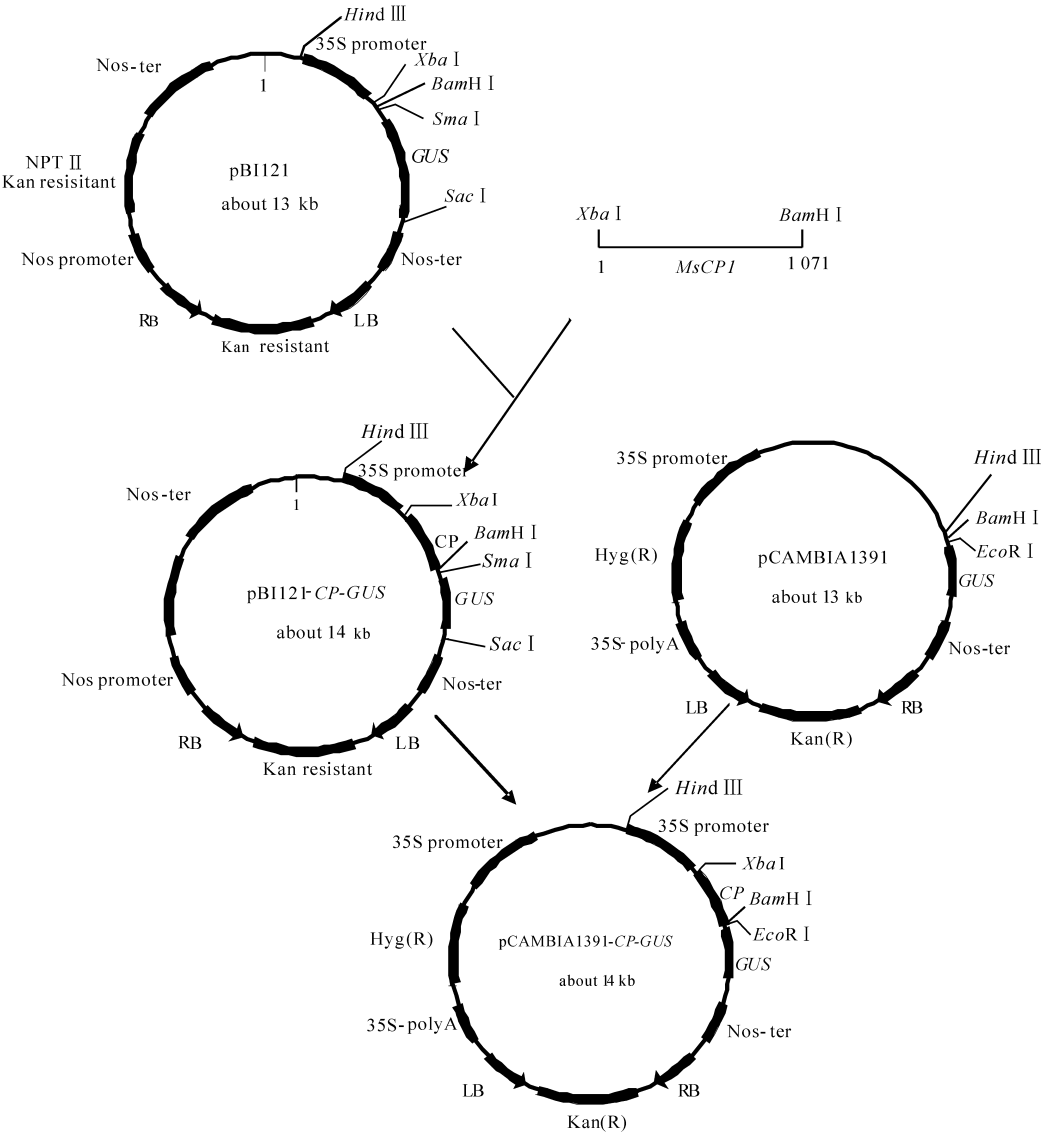


图 1 pCambia1391-CP-GUS 植物表达载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pCambia1391-CP-GUS

1.2.4 pCAMBLA1391-CP-GUS 表达载体的构建 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 分别双酶切表达载体 pBI121-CP 和质粒 pCAMBLA1391, 回收 pBI121-CP 酶切后带有 35S 启动子和 *MsCP1* 基因片段产物, 与 pCAMBLA1391 酶切后的线性大片段在 T4 连接酶的作用下进行连接, 构建表达载体 pCAMB-

LA1391-CP-GUS, 对载体进行酶切鉴定, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α。

1.3 转基因苜蓿的制备

1.3.1 转化根癌农杆菌 LBA4404 提取 pCAMB-LA1391-CP-GUS 质粒, 采用冻融法转化感受态农杆菌 LBA4404, 涂布于含有头孢霉素 (20 mg/L)、卡

那霉素(50 mg/L)和链霉素(100 mg/L)的固体 LB 培养基平皿上,28 ℃ 暗培养 48 h。挑取单菌落采用含有相同抗生素的 LB 液体培养基培养,采用 PCR 法用引物组合 CPF/CPR 对 CP 基因进行检测,阳性克隆即为含有 pCAMBLA1391-CP-GUS 的农杆菌工程菌株。

1.3.2 表达载体向苜蓿的转化 以“中苜 1 号”苜蓿的子叶为外植体,采用叶盘法将农杆菌工程菌株转化苜蓿,不同阶段采用的培养基分别为:基本培养基:UM^[10]+2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)+0.25 mg/L 激动素(KT);筛选培养基:UM+30 mg/L 潮霉素(Hyg)+450 mg/L 头孢霉素(Cef);分化培养基:UMO(不含 2,4-D 和 KT,其他同 UM)+30 mg/L Hyg+450 mg/L Cef;生根培养基:UMO+30 mg/L Hyg+300 mg/L Cef。

1.4 转基因苜蓿的检测

1.4.1 转基因苜蓿的 PCR 鉴定 采用 CTAB 法提取转基因苜蓿叶片的 DNA^[11],对有潮霉素抗性的再生植株进行 GUS 基因、MsCP1 基因和 MsCP1-GUS 片段的 PCR 检测,采用的引物分别为 GUSF/GUSR(扩增片段长约 750 bp),CPF/CPR(扩增片段长度为 1 kb)和 AnF/GUSR(扩增片段长度约 2 kb)。PCR 反应条件为:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 5 min。反应体系:模板 DNA 2 L,引物分别 2 L,dNTP Mix 0.5 L,MgCl₂ 2.5 L,10×buffer 2.5 L,Taq 酶 0.5 L,补充 ddH₂O 至 25 L。

1.4.2 转基因苜蓿的 RT-PCR 鉴定 采用异硫氢酸胍法提取 PCR 检测呈阳性的植株总 RNA^[11],并进行 RT-PCR 检测,以验证其报告基因 GUS 在转录水平上的表达。

2 结果与分析

2.1 中间载体 pBI121-CP 的检测

以 pBI121-CP 表达载体为模板,经 PCR 扩增可得到含有 MsCP1 基因序列(图 2-A);用 Xba I 和 BamH I 双酶切表达载体 pBI121-CP,可得到插入的 1 kb 左右大小 MsCP1 基因全序列(图 2-B)。

2.2 表达载体 pCAMBLA1391-CP-GUS 的鉴定

2.2.1 PCR 鉴定 以 pCAMBLA1391-CP-GUS 表达载体为模板,经 PCR 扩增可得到含有 MsCP1 基因的全序列(图 3)。

2.2.2 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定 由图 4

可以看出,pCAMBLA1391-CP-GUS 质粒经双酶切后,出现了 2 条目的带,大小分别约为 13 和 1 kb,与预期的结果一致。表明 MsCP1 基因已经成功插入到质粒 pCAMBLA1391 中。进一步测序证明整个阅读框没有发生移码突变,表明载体构建成功(图 4)。

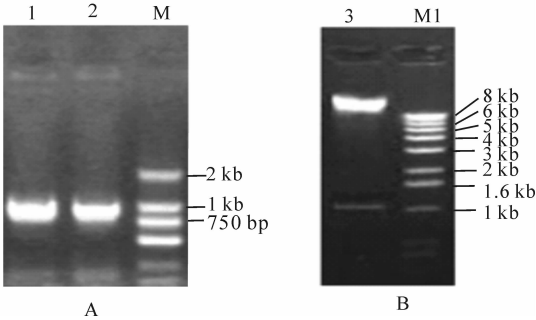


图 2 重组表达载体 pBI121-CP 的鉴定结果
A. 用引物组合 CPF/CPR 对载体 pBI121-CP 进行 PCR 鉴定的结果;
1~2. 阳性载体的 PCR 结果;M. 分子量标准(DL2000);
B. pBI121-CP 的酶切鉴定结果;3. 阳性载体的双酶切(Xba I 和 BamH I)结果;M1. 分子量标准(1 kb DNA ladder)
Fig. 2 Identification of plasmid pBI121-CP
A. PCR identification of plasmid pBI121-CP;1~2. PCR products of plasmid pBI121-CP;M. Molecular markers (DL2000);
B. Identification of pBI121-CP digested with restriction enzyme;
3. Positive vectors digested by Xba I and BamH I ;
M1. Molecular markers (1kb DNA ladder)

2.3 表达载体 pCAMBLA1391-CP-GUS 对苜蓿的转化

将表达载体 pCAMBLA1391-CP-GUS 用冻融法转入根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens) LB4404,叶盘法转化苜蓿“中苜 1 号”,用阳性农杆菌侵染无菌苗子叶,共培养 3 d,转到愈伤组织筛选培养基进行愈伤组织的诱导,2 周左右即可看到愈伤组织产生(图 5-A);取部分未经阳性农杆菌侵染的子叶作对照,结果显示,几乎所有的子叶都未能分化出愈伤组织(图 5-B),并随着时间的推移逐渐褐化死亡;另外取部分未经阳性农杆菌侵染子叶,放入未加抗生素的 UM 培养基上,检测培养基的有效性,结果显示,子叶几乎全部分化出愈伤组织(图 5-C),且发育状态优于转化的愈伤组织。待抗性愈伤组织生长到足够大时,转到诱导体胚的分化培养基中诱导分化(图 6-A),当体胚长出的抗性芽约 2~3 cm 时(图 6-B),将其移入生根培养基诱导生根(图 6-C)。诱导生根的小苗经炼苗再移栽到花盆中(图 6-D),共获得 47 株抗性转化植株。

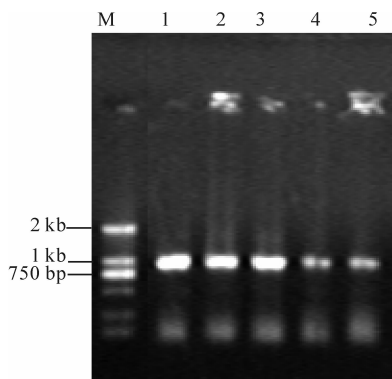


图 3 表达载体 pCAMBLB1391-CP-GUS 的 PCR 鉴定结果

1~5. 阳性载体的 PCR 结果; M. 分子量标准(DL2000)

Fig. 3 PCR identification of plasmid pCAMBLB1391-CP-GUS

1—5. PCR analysis of plasmid pCAMBLB1391-CP-GUS;
M. Molecular markers (DL2000)

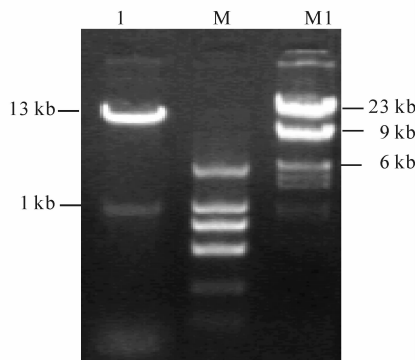


图 4 表达载体 pCAMBLB1391-CP-GUS 的酶切鉴定结果

1. 阳性载体的双酶切(*Xba* I 和 *Bam*H I)结果;

M. 分子量标准(DL2000); M1. 分子量标准(λ DNA/*Hind* III)

Fig. 4 Identification of pCAMBLB1391-CP-GUS digested with restriction enzyme

1. Positive vectors digested by *Xba* I and *Bam*H I; M. Molecular markers (DL2000); M1. Molecular markers (λ DNA/*Hind* III).

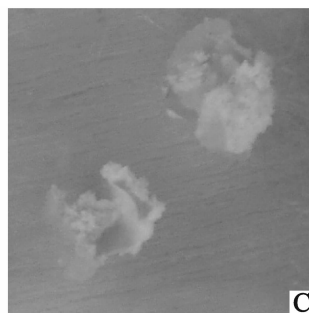
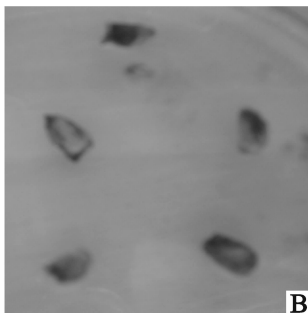
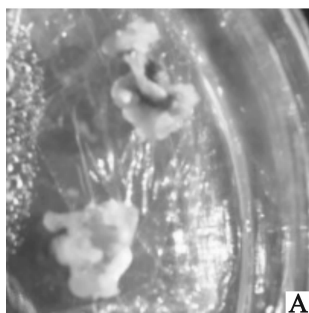


图 5 不同处理苜蓿愈伤组织的分化情况

A. 子叶经阳性农杆菌浸染且经 30 mg/L Hyg+450 mg/L Cef 胁迫的愈伤发育状况; B. 子叶未经阳性农杆菌浸染但经 30 mg/L Hyg+450 mg/L Cef 胁迫的愈伤发育状况; C. 子叶未经阳性农杆菌浸染且在 UM 培养基中的愈伤发育状况(无抗生素胁迫)

Fig. 5 Callus induction situation by different treatments

A. Callus from cotyledon with the *Agrobacterium* inoculation in medium containing 30 mg/L hygromycin and 450 mg/L cefotaxime;
B. Callus from cotyledon without *Agrobacterium* inoculation in UM medium containing 30 mg/L hygromycin and 450 mg/L cefotaxime;
C. Callus from cotyledon without the *Agrobacterium* inoculation in UM medium

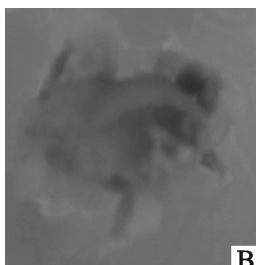
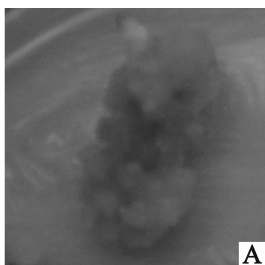


图 6 苜蓿转化植株的再生过程

A. 抗性愈伤组织; B. 具有抗性芽的愈伤组织; C. 生根的转基因植株; D. 移入花盆中的转基因植株

Fig. 6 Regeneration of alfalfa plants at various stages after transformation

A. Callus in UM medium containing 30 mg/L hygromycin and 450 mg/L cefotaxime; B. Callus with shoots in UM medium containing 30 mg/L hygromycin and 450 mg/L cefotaxime; C. Transgenic plant in UMO medium containing 30 mg/L hygromycin and 350 mg/L cefotaxime; D. Transgenic plant in the pot

2.4 转基因苜蓿的 PCR 检测

以转化苜蓿的基因组 DNA 为模板,采用引物组合 CPF/CPR 可扩增得到含有 *MsCP1* 基因全序列,片段大小在 1 kb 左右,与阳性对照质粒 pCAM-BLA1391-CP-*GUS* 扩增结果一致,阴性对照无特异性扩增片段(图 7-A);引物组合 GUSF/GUSR 扩增 *GUS* 基因部分的片段,结果显示扩增片段大小约

750 bp(图 7-B),与 *GUS* 基因片段符合;引物组合 AnF/GUSR 扩增 *MsCP1*-*GUS* 片段,扩增产物约 2 kb(图 7-C),与目的片段长度相符,初步表明 *MsCP1* 基因已整合到受体基因组中。因此可知,采用以上 3 对引物分别扩增转化载体的不同基因片段,检测结果均为阳性的植株,极有可能是真正的转基因植株。

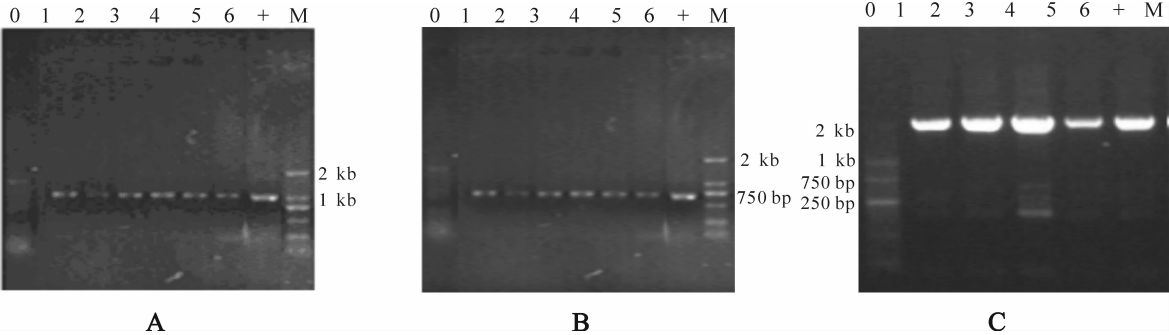


图 7 转基因苜蓿部分植株的 PCR 分析结果

A. 部分转基因植株的 *MsCP1* 基因全长的 PCR 鉴定,0 为未转化植株阴性对照,+为阳性质粒 PCR 对照,1~6 泳道为抗性转化植株 *MsCP1* 基因的 PCR 结果;B. 部分转基因苜蓿植株的 *GUS* 片段检测,0 为未转化植株阴性对照,+为阳性质粒 PCR 对照,1~6 泳道为转化植株 *GUS* 片段的 PCR 结果;C. 部分转化植株的 *MsCP1*-*GUS* 片段 PCR 鉴定,1~5 泳道为 *MsCP1*-*GUS* 片段的 PCR 结果;M 为分子量标准(DL2000)

Fig. 7 PCR analysis of transgenic alfalfa plants

A. PCR identification of *MsCP1* gene fragment,0 indicates negative control,+indicates positive control,1-6 indicate the PCR products of transgenic alfalfa;B. PCR identification of *GUS* fragment,0 indicates negative control,+ indicates positive control,1-6 indicate the PCR analysis of transgenic alfalfa;C. PCR identification of *MsCP1*-*GUS* fragment,1-5 indicate the PCR analysis of transgenic alfalfa;M indicates the molecular markers (DL2000)

2.5 转基因苜蓿的 RT-PCR 检测

以未转化苜蓿植株(阴性对照)和经 PCR 初步鉴定为阳性的转基因苜蓿植株叶片总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA 第一链,用引物 GUSF/GUSR 扩增 *GUS* 部分的片段,结果见图 8。

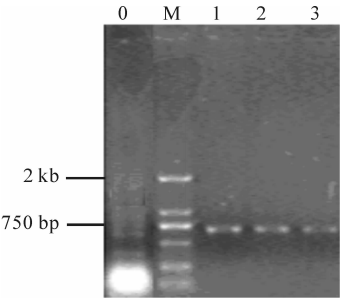


图 8 转基因苜蓿植株的 RT-PCR 鉴定结果

0. 阴性对照;1~3. 阳性转化植株;M. 分子量标准 (DL2000)

Fig. 8 RT-PCR analysis of transgenic alfalfa

0. Negative control;1-3. RT-PCR analysis of transgenic alfalfa;M. Molecular markers (DL2000)

图 8 显示,阴性对照中无扩增条带,而转化的阳性植株中出现了明显的特异条带,长度约 750 kb,与

预期 *GUS* 基因片段一致。表明在经 PCR 初步鉴定为阳性的部分转化苜蓿植株中,表达元件 *GUS* 基因已经整合入苜蓿基因组,并且可以转录为 mRNA。该结果从 RNA 水平证明了转化的 *GUS* 在转录水平上并未沉默,有可能翻译成蛋白质,从而也证明表达元件极有可能已经整合入基因组,且在转录水平上表达。

3 讨论

在苜蓿的转化中,多数研究是以 *NPT-II* 作为筛选标记基因,所以采用 Kan 或 Hyg 作为筛选剂^[12]。本试验在构建表达载体时,选择 Hyg 作为选择性标记,这是因为其对转化体的筛选效率很高。虽然 Kan 已成功用作截形苜蓿(*M. truncatula*)遗传转化的筛选剂^[12],但 Anthony 等^[13]在苜蓿幼苗中发现,植株本身会产生较强的抗 Kan 特性,未经转化的幼苗,在 Kan 浓度高达 250 mg/L 时,需要 10 d 才能死亡。此外,Chabaud 等^[14]发现,在 *Medicago sativa* L. cv “falcate”的转化中,用 Kan 筛选浸染后叶片的筛选效率很低。

共培养时间是影响转化效率的重要因素,共培养时间的长短与农杆菌的种类、菌株、菌液浓度、培养基、侵染方式、外植体、转化对象和温度等因素有关,其中关键过程有农杆菌的吸附、*Vir* 基因的激活表达及 T-DNA 的转化与整合。共培养的效果在某程度上可以作为一个较直接地判断转化率的依据。本研究发现,共培养 3 d 时,整个苜蓿子叶边缘都有菌丝体出现,切口处农杆菌最多,用灭菌水洗后 Cef,能很好地抑制农杆菌的生长;而共培养 4 d 以上时,外植体上农杆菌过度增殖,引起外植体的毒害,使其生活力下降,在以后的筛选中表现出高死亡率。郝贵霞等^[15]认为,不能以共培养时间长短来判断共培养是否成功,有时因温度、菌液浓度等影响,3 d 后并未出现微菌落,此时转入筛选培养基的材料不能出芽,而出现肉眼可见的菌落后,筛选材料具有较高的再生频率,与本研究结果一致。

由于半胱氨酸蛋白酶基因(*MsCP1*)是从苜蓿植株本身克隆获得,所以在转基因苜蓿植株中直接对 *MsCP1* 基因全长的 PCR 和 RT-PCR 检测,并不能证明含有目的基因的表达元件已经成功地整合到基因组中。因此,本研究中不仅对 *MsCP1* 基因全长进行了 PCR 分析,而且对报告基因 *GUS* 片段和 *MsCP1-GUS* 片段也进行了 PCR 检测,结果发现大部分植株呈阳性。此后对转化苜蓿植株进行了 RT-PCR 以检测导入的 *GUS* 的转录情况,结果表明,整合的 *GUS* 能够转录为 mRNA,可以在转录水平上表达。

[参考文献]

- [1] Jennifer T J, John E M. A salt - and dehydration-inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine protease [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28:1055-1065.
- [2] Masahiro K, Kazuko Y, Hideo T, et al. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 1993, 129 (2):175-182.
- [3] Tadamasu U, Shigemitsu S, Yuko O, et al. Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44:649-657.
- [4] Renu K C, Srivalli B, Ahlawat Y S. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 255(2):324-327.
- [5] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49:249-279.
- [6] Malik M K, Slovin J P, Hwang C H, et al. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, HSP17. 7, results in increased or decreased thermotolerance [J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(1):89-99.
- [7] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 285:1256-1258.
- [8] 张红宇, 吴先军, 唐可轩, 等. 转半夏凝集素基因(*pta*)导入水稻及其表达的初步研究 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(11):1013-1019.
Zhang H Y, Wu X J, Tang K X, et al. A primary study of transferring the pinellia tenata agglutinin (*pta*) gene into rice and expression [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(11):1013-1019. (in Chinese)
- [9] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新, 等. 双价抗真菌基因表达载体的构建及转基因西瓜的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2005, 13(5):369-374.
Zhang Z Z, Wu J H, Lv L X, et al. Construction of a plant expression vector carrying two antifungal genes and its transfer to watermelon [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2005, 13(5):369-374. (in Chinese)
- [10] Uchimya H, Murashige T. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells [J]. *Plant Physiology*, 1974, 54:936-944.
- [11] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 26-29, 518-521.
Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning a laboratory manual edition [M]. 3rd Edition. Translated by Hang P T, Wang J X, Zhu H C, et al. Beijing: Science Press, 2002: 26-29; 518-521. (in Chinese)
- [12] 梁惠敏, 夏阳, 孙仲序, 等. 农杆菌介导紫花苜蓿遗传转化体系的建立 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13 (2):152-156.
Liang H M, Xia Y, Sun Z X, et al. Establishment of genetic transformation system of medicago sativa mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(2):152-156. (in Chinese)
- [13] Anthony T, Stephen H. Transformation of medicago truncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. *The Plant Journal*, 2000, 22(6):531-541.
- [14] Chabaud M, Passiatore F. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 7:512-516.
- [15] 郝贵霞, 朱祯, 朱之悌. 毛白杨遗传转化系统优化的研究 [J]. *植物学报*, 1999, 41(9):936-940.
Hao G X, Zhu Z, Zhu Z T. Study on optimization of transformation of populus tomentosa [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(9):936-940. (in Chinese)