

利用RNA干扰介导抗病性获得兼抗 四种病毒的转基因马铃薯

齐恩芳^{1*} 贾小霞¹ 刘 石¹ 陈晓艳² 文国宏¹ 胡新元¹

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 兰州 730070; 2. 哈密市伊州区种业研究开发中心, 新疆 哈密 839001)

摘要: 为获得兼抗马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯卷叶病毒(*Potato leaf roll virus*, PLRV)和马铃薯潜隐花叶病毒(*Potato virus S*, PVS) 4种病毒的转基因马铃薯新材料, 分别以这4种病毒全长CP基因为模板, 通过设计PCR引物和亚克隆获得4种病毒CP基因相对保守区段的基因片段, 并将其拼接成融合基因, 以载体pHANNIBAL和pBI121为基础, 构建RNA干扰(RNA interference, RNAi)载体, 利用农杆菌介导的转基因体系进行马铃薯遗传转化, 并对获得的转基因马铃薯进行病毒抗性检测。结果表明, 所获得的融合基因片段RH1和RH2, 酶切鉴定分别得到长度为1 200 bp的条带, 与预期片段相符; 构建了含*pdh*内含子和RH1、RH2融合基因的RNAi植物表达载体, 经BamH I/Sac I双酶切, 获得长度约3 200 bp的片段, 表明RNAi植物表达载体pBI121-pRH构建成功; 转化易感病毒马铃薯品种陇薯11号, PCR检测和PCR-Southern杂交分析表明融合基因已整合到陇薯11号马铃薯基因组中; 抗病性检测显示4株转基因马铃薯植株对4种病毒均免疫。表明利用RNAi可筛选出抗多种病毒的转基因马铃薯新种质。

关键词: 马铃薯病毒; RNA干扰; 转基因马铃薯; 多病毒抗性

Production of transgenic potato plants resistant to four viruses via RNAi-mediated virus resistance

Qi Enfang^{1*} Jia Xiaoxia¹ Liu Shi¹ Chen Xiaoyan² Wen Guohong¹ Hu Xinyuan¹

(1. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu Province, China;

2. Seed Industry Research and Development Center, Hami 839001, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China)

Abstract: In order to obtain transgenic potato plants resistant to *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus S* (PVS), specific primers were designed according to the coat protein (CP) genes of PVX, PVY, PLRV and PVS, and then sub-clones of the cDNA fragments were obtained from the conserved regions of CP genes of PVX, PVY, PLRV and PVS, respectively. Then the four cDNA fragments were spliced into a chimeric cDNA. The RNA interference (RNAi) vector pBI121-pRH with the chimeric cDNA was constructed based on the vectors pHANNIBAL and pBI121. Potato transformation was conducted through agrobacterium-mediated system, and then transgenic plants obtained by tissue culture were tested for viral resistance. The fusion gene fragments RH1 and RH2 were obtained, and enzyme digestion resulted in an expected band of 1 200 bp in size, respectively. RNAi vectors containing *pdh* introns and RH1 and RH2 fusion genes were constructed, and BamH I/Sac I bi-enzyme was performed to obtain a fragment of about 3 200 bp in length, indicating that the RNAi vector pBI121-PRH was successfully constructed. The infusion genes were integrated into the

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(2017GAAS39), 国家自然科学基金(31360353, 31560412)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: qefang@126.com

收稿日期: 2017-08-21

genome of Longshu 11 by using PCR and PCR-Southern blotting. Four transgenic potato plants were proved immune to the virus infection by the virus infection resistance analysis. This study indicated that multiple virus-resistant potato varieties could be obtained by using RNAi.

Key words: potato virus; RNA interference; transgenic potato; multi-virus resistance

马铃薯广泛种植于世界各地,是一种产量高、适应性广、分布广、营养丰富、经济价值高的宜粮、宜菜、宜饲、宜作工业原料的经济作物。随着我国马铃薯主食化战略的启动,马铃薯产业在我国农业经济中的地位越来越突出。然而马铃薯容易受多种病毒侵染,目前已报道的马铃薯病毒达30余种(吴兴泉等,2005;马雪青等,2010),而且马铃薯病害比较复杂,经常被2种或者2种以上病毒混合侵染,病毒混合侵染可使马铃薯减产80%以上(黄萍等,2008)。因此,采用新分子生物学技术培育兼抗多种病毒的马铃薯品种对防治马铃薯病害有重要意义。

在育种过程中常采用转基因技术来获得抗多种病毒的转基因植株,其方法是将不同病毒外壳蛋白(coat protein, CP)基因构建到一个或多个表达盒中,通过表达多种病毒CP从而使转基因植株产生对多种病毒的抗性(Kaniewski et al., 1990; Prins et al., 1995; Fuchs et al., 1997)。这种方法获得的植株只对病毒产生中高度的抗性,不能完全抵抗病毒侵染;且该方法存在异源重组等生态安全性问题(周雪平和李德葆,2000;Plasterk, 2002)。20世纪70年代出现的反义RNA技术在较长时间内被用于马铃薯等植物的抗病育种中,但反义RNA技术对病毒RNA的沉默效率常常不到20%(Smith et al., 2000),所以获得的植株达不到理想的抗病效果。近些年在多种生物研究中出现了RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,此技术将与信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)对应的正义RNA和反义RNA组成的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)导入细胞,可以使mRNA发生特异性的降解,导致其相应的基因出现沉默。此后RNAi介导的病毒基因沉默技术成为安全培育抗多种病毒转基因植物的一个新途径(Lindbo & Dougherty, 1992;白庆荣等,2005;高乐等,2014),目前RNAi已被成功用于马铃薯抗病育种研究中。Zamore(2002)和Helliwell & Waterhouse(2005)研究结果表明,转录后RNAi技术的抗病机制发生作用,即启动细胞质内靶mRNA序列特异性的降解机制,其沉默效率可达到60%~100%,明显高于反义RNA技术的沉默效率。研究结果也表明RNAi技术获得的病毒抗性植株具有抗病程度高

(近乎免疫)、抗性持久、生物安全性高等优点,且其抗性表达所需的核酸片段较短,可将不同病毒的有效核酸(complementary DNA, cDNA)片段拼接成融合基因导入植物,从而获得同时抗多种病毒的转基因植株(Prins et al., 1995; Plasterk, 2002;高宜峰等, 2014)。目前, RNAi技术在马铃薯病毒CP基因沉默研究中已取得一定成果(Jan et al., 2000;郭志鸿等, 2006;白云凤等, 2008),但将多种病毒的cDNA片断拼接成融合基因转入到马铃薯植株从而获得抗多种病毒植株的研究鲜有报道。

马铃薯X病毒(Potato virus X, PVX)、马铃薯Y病毒(Potato virus Y, PVY)、马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV)和马铃薯潜隐花叶病毒(Potato virus S, PVS)均属单组分正链RNA病毒,是由蛋白质外壳及其包裹着的RNA组成,其CP的主要功能是保护核酸,参与病毒症状诱导、系统侵染等。本研究以对马铃薯危害最严重的PVX、PVY、PLRV、PVS这4种病毒为研究对象,分别克隆这4种病毒CP基因及其相对保守区段的基因片段,将其拼接后构建包含这4种病毒CP基因片段的融合基因的RNAi植物表达载体,通过农杆菌介导法转化易感马铃薯品种——陇薯11号,培育同时抗PVX、PVY、PLRV和PVS这4种病毒的转基因马铃薯,以期马铃薯抗病毒育种工程提供良好的亲本材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及菌株:自甘肃省农业科学院马铃薯研究所会川育种试验站采集感染PVX、PVY、PVS、PLRV的马铃薯叶片;转化马铃薯受体品种陇薯11号试管苗及非转基因马铃薯陇薯11号试管苗,由甘肃省农业科学院马铃薯研究所种质资源和生物技术研究室提供。根癌农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*菌株LBA4404、大肠杆菌*Escherichia coli*菌株DH5α及植物表达载体pBI121均由本实验室保存,中间载体pHANNIBAL由中国科学院寒区旱区环境与工程研究所惠赠。

培养基:试管薯分化培养基:MS培养基1 L、吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)1.0 mg、赤霉素

(gibberellic acid, GA₃) 0.2 mg、6-苄氨基嘌呤(6-benzyl-aminopurine, 6-BA) 0.5 mg、玉米素核苷(zeatin riboside, ZT) 2.0 mg; 试管薯生根培养基: 1/2 MS 培养基。

试剂及仪器: T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、质粒小提试剂盒、氨苄青霉素(ampicillin, Ampr)、羧苄青霉素(carbenicillin, Crb)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、X-gal 试剂, 日本 TaKaRa 公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒, 瑞士 Roche 公司; 克隆载体 pGEM-T vector、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 培养基基础成分、植物激素、抗生素、添加剂, 美国 Sigma 公司; ELISA 试剂盒, 美国 Agdia 公司; 其它试剂均为国产分析纯。T00 型 PCR 扩增仪、GelDocXR+ 型凝胶成像系统、IMARK 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; CF15RXII 型高速冷冻离心机, 日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 克隆4种马铃薯病毒外壳CP基因及引物设计

根据 GenBank 中检索到的 PVX、PVY、PLRV、PVS 四种马铃薯病毒 CP 基因序列 Z34261.1、X54611.1、AY307123.1、GU319954.1, 通过分子生物学分析软件 Oligo 6.0 设计引物, PVX 的 CP 基因引物 X1/X2 (5'-TAGCACAACACAGGCCACAGGGT-3'/5'-AGCGGTTGTTGTTCCAGTGATACGA-3'); PVS 的 CP 基因引物 S1/S2 (5'-CAGGAGAGACACACAAGCAATA-3'/5'-AGCATCCCTCCAGTGTA CTCAA-3'); PVY 的 CP 基因引物 Y1/Y2 (5'-GCAGGAGGAAGCACTAAGAAGG-3'/5'-CTAATGCCA-CCGTTCAACCCGAAAA-3'); PLRV 的 CP 基因引物 V1/V2 (5'-AAAGGAAATGTCAATGGTGG-3'/5'-CTGATGGTGA CTCTGAAGGA-3'), 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

采用生物分析软件 DNAMAN 5.0 对已克隆的4种病毒 mRNA 进行突变分析, 筛选出约 300 bp 无终止突变区段作为干扰片段。采用 Oligo 6.0 软件设计扩增干扰片段的引物, 在引物设计时加入酶切位点, 引物 X-1 为 5'-CGCGGATCC^{Bam}I¹GCAACTCCTGC-CACGGCTT-3'; 引物 X-2 为 5'-GGTATTGCTTGTG-GTGTCTCTCCAAGTGTGCACACCTCTTTAATT -GCTG-3'; 引物 S-1 为 5'-CAGCAATTAAAGAGGT-GTGCACACTTGGAGAGACACCACAAGCAATA -

CC-3'; 引物 S-2 为 5'-CTTCTTAGTGCTTCCTCCT-GCTGAAAACCGCGAGTATGGATTC-3'; 引物 Y-1 为 5'-GAATCCATACTCGCGGTTTTTCAGCAGGAG-GAAGCACTAAGAAG-3'; 引物 Y-2 为 5'-CAGT-TCTTCTTGAGCGGGATTAGTTTCTCCTATGTCG-TATGCC-3'; 引物 V-1 为 5'-GGCATAACGACATAG-GAGAACTAATCGCCGCTCAAGAAGAACTG-3'; 引物 V-2 为 5'-CCCAAGCTT^{Hind}IIICTAATTTGGAA-TTTGTTGACGTAGGACTG-3'; 引物 X₁-1 为 5'-CC-GCTCGAG^{Xho}I¹GAGCTC^{Sac}I¹GCAACTCCTGCCACG-GCTT-3'; 引物 V₁-2 为 5'-CGGGGTACC^{Kpn}I¹CTAA-TTTGGAATTTGTTGACGTAGGACTG-3', 划线部分为酶切位点, 上标为相应的内切酶, 引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 马铃薯病毒CP基因克隆及融合基因构建

参照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取感病马铃薯叶片总 RNA, 以 X1/X2、S1/S2、Y1/Y2、V1/V2 为特异性引物, 分别扩增 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 的 CP 基因, 将 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经筛选、鉴定, 获得阳性克隆。将筛选出的阳性克隆送交上海赛百盛基因技术有限公司进行测序分析, 用 DNAMAN 5.0 软件将测序结果分别与 4 个 CP 基因全长序列进行比对。以提取的质粒为模板, 由引物 X-1/X-2、S-1/S-2、Y-1/Y-2、V-1/V-2 分别扩增得到 PVX、PVS、PVY、PLRV 的 CP 中间长度约 300 bp 的 cDNA 片段; 将 4 个片段用重叠 PCR 法连接后得到长度约 1 200 bp 的反向融合基因 RH1。以 RH1 模板, 以 X₁-1/V₁-2 为特异性引物扩增得到长度约 1 200 bp 的正向融合基因 RH2。在克隆载体 pGEM-T vector 中进行片段连接, 并送交上海赛百盛基因技术有限公司测序, 利用 DNAMAN 5.0 软件将测序结果与试验预拼接的 4 种基因片段序列进行比对分析。

1.2.3 融合基因RNAi植物表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切含 *pdh* 内含子的质粒载体 pHANNIBAL, 回收大片段将其与同样酶切 RH1 回收的小片段连接, 获得含有反向融合基因片段 RH1 的质粒 pRH1, 再用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切 pRH1, 回收大片段后将其与同样酶切 RH2 回收的小片段连接, 构建由内含子连接的正、反向插入片段的重组子 RNAi 中间载体 pRH。用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 pRH, 回收 pRH 小片段, 与用同样限制性内切酶酶切的植物表达载体 pBI121 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 得到融合基因 RNAi 植物表达载体

pBI121-pRH。

1.2.4 根癌农杆菌介导马铃薯遗传转化及植株再生

根癌农杆菌介导马铃薯遗传转化:参照贾小霞等(2009)和刘莹等(2013)方法进行根癌农杆菌转化,将pBI121-pRH质粒导入根癌农杆菌LBA4404感受态细胞,获得用于植物遗传转化的根癌农杆菌LBA4404(pBI121-pRH)。

马铃薯外植体转化及植株再生:以诱导10周、直径为0.5 cm的陇薯11号试管薯为外植体,参照Si et al.(2003)方法进行转化,将试管薯切成厚度为1 mm的薄片,接种于试管薯片分化培养基上,暗培养2 d后将薯片转移到含50 mg/L Kan、500 mg/L Crb的试管薯片分化培养基上,待抗性芽长至1.0~1.5 cm时剪下,接入含50 mg/L Kan、500 mg/L Crb的生根培养基上培养,再生植株每20 d在含75 mg/L Kan的生根培养基上继代培养1次,继代3次以上均能正常生根及生长的转基因植株为抗性植株。

1.2.5 转基因马铃薯植株的分子鉴定

用十六烷基三乙基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法提取转基因马铃薯植株及非转基因马铃薯植株总DNA,参照贾小霞等(2014)方法对转基因马铃薯植株进行PCR鉴定。用PVX-1/PLRV-2和PVX₁-1/PLRV₁-2两对引物分别对转基因马铃薯植株进行PCR扩增,以非转基因马铃薯植株和pBI121-pRH质粒为阴性对照和阳性对照。25 μ L PCR扩增体系:5 $\times$ Primes STAR Buffer (Mg²⁺plus) 5.0 μ L、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2.0 μ L、10 μ mol/L上下游引物各0.5 μ L、cDNA 0.5 μ L、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.25 μ L、ddH₂O补至25 μ L。反应程序:98 $^{\circ}$ C变性10 s,55 $^{\circ}$ C退火5 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,循环30次;循环结束后,每个PCR管各加0.5 μ L TaqDNA polymerase,于72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取5 μ L PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,分离并观察扩增产物。

以融合基因的cDNA片段为模板采用随机引物标记法合成探针,对阳性植株进行PCR-Southern检测。采用CTAB法提取PCR检测呈阳性的再生马铃薯植株基因组DNA,进行1%琼脂糖凝胶电泳分离,然后将电泳产物通过毛细管法转入带正电荷的尼龙膜上,与合成的探针杂交。按照DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II试剂盒说

明书进行探针标记、标记效率检测、膜杂交及显色处理等。

1.2.6 转基因马铃薯植株的抗性鉴定

待扩繁转基因马铃薯试管苗长至6~8 cm高时,移栽到装有蛭石的长16 cm、宽14 cm的营养钵内,每钵1株,每个转基因株系移栽10株,于玻璃温室内培养,同时移栽非转基因陇薯11号脱毒苗和含PLRV的马铃薯试管苗(饲养桃蚜 *Myzus persicae*)。移栽20 d开始接种病毒,PVX、PVY、PVS采用机械摩擦接种,接种方法参考徐丽等(2010);PLRV采用蚜虫接种,接种方法参考张鹤龄等(1996)。PVX、PVY、PVS、PLRV依次进行接种,间隔3 d,15 d后重复接种1次,第2次接种15 d后,用双抗体夹心酶联免疫吸附鉴定法(double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)检测病毒含量,以接种病毒的非转基因马铃薯陇薯11号脱毒苗为阳性对照(CK1),未接种病毒的非转基因马铃薯陇薯11号脱毒苗为阴性对照(CK2)。检测过程按DAS-ELISA试剂盒说明书进行,显色反应结束后用酶标仪测定405 nm处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 4种马铃薯病毒CP基因克隆及融合基因的构建

感病马铃薯叶片总RNA扩增到PVX、PVS、PVY和PLRV的CP全长基因,经PCR和EcoR I酶切鉴定,基因片段大小与预期片段670、811、701、584 bp一致(图1-A~B),阴性对照未出现任何目标产物。将筛选出的阳性克隆进行测序分析,所得序列与GenBank中序列进行比较,同源性分别为93.76%、94.90%、94.79%、96.68%。

以克隆的PVX、PVY、PVS、PLRV全长的CP基因为模板,分别扩增得到PVX、PVS、PVY、PLRV的CP中间长度约300 bp的cDNA片段,拼接成融合基因,连接于克隆载体pGM-T中,获得了含有长度为1 200 bp反向融合基因的重组质粒RH1,用BamH I、Hind III对提取的质粒进行双酶切鉴定,获得长度为1 200 bp的条带(图2-A),测序结果也与理论预期片段相符。以反向融合基因为模板,以X₁-1/V₁-2为特异性引物扩增得到整合基因,PCR产物与pGM-T载体连接,获得了含有长度为1 200 bp正向融合基因的重组质粒RH2,用Xho I和Kpn I双酶切后获得长度为1 200 bp的条带(图2-B),与预期相符。

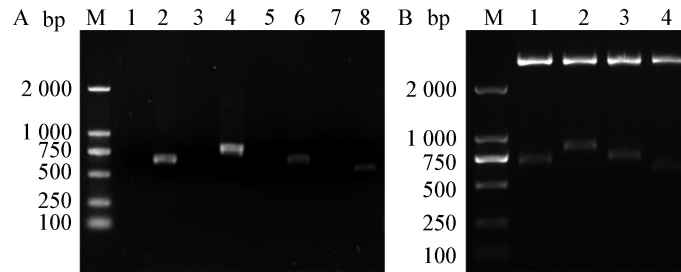


图1 马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒、马铃薯卷叶病毒和马铃薯潜隐花叶病毒的CP基因PCR产物(A)及酶切鉴定(B)

Fig. 1 PCR (A) and enzyme digestion (B) of the CP genes of PVX, PVS, PVY, PLRV

M: Marker D2000. 图1-A中1~2: PVX CP基因的空白对照和扩增产物; 3~4: PVS CP基因的空白对照和扩增产物; 5~6: PVY CP基因的空白对照和扩增产物; 7~8: PLRV CP基因的空白对照和扩增产物。图1-B中1~4: PVX、PVS、PVY、PLRV的CP基因。M: Marker D2000. 1~2 in Fig. 1-A: Negative control and PCR identification of PVX CP gene; 3~4: negative control and PCR identification of PVS CP gene; 5~6: negative control and PCR identification of PVY CP gene; 7~8: negative control and PCR identification of PLRV CP gene. 1~4 in Fig. 1-B: Enzyme-digested products of CP of PVX, PVS, PVY, PLRV.

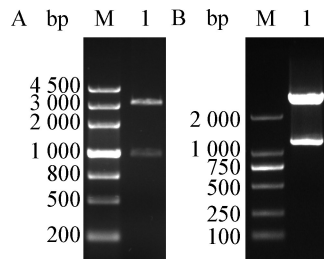


图2 4种马铃薯病毒融合基因重组质粒RH1(A)和RH2(B)的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion of RH1 (A) and RH2 (B) recombinant plasmids incorporated with fusion genes of four potato viruses

M: Marker III; 1: RH1 双酶切 (*Bam*H I/*Hind* III); 2: RH2 双酶切 (*Xho* I/*Kpn* I)。M: Marker III; 1: double enzyme digestion of RH1 (*Bam*H I/*Hind* III); 2: double enzyme digestion of RH2 (*Xho* I/*Kpn* I).

2.2 马铃薯病毒融合基因RNAi植物表达载体构建

用 *Bam*H I/*Hind* III 和 *Kpn* I/*Xho* I 分别酶切 pRH, 均获得一条大小约 1 200 bp 的条带 (图 3-A), 与融合基因 RH1 和 RH2 的条带大小相符; 用 *Bam*H I/*Xho* I 和 *Bam*H I/*Sac* I 分别酶切, 均获得一条长度约为 3 200 bp 的条带 (图 3-B~C), 与 RH1、*pd*k 和 RH2 条带之和大小相符, 表明获得了在 *pd*k 内含子序列两边含有正反向融合基因的中间载体 pRH。用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切载体 pRH 和植物表达载体 pBI121, 回收目的片段, 经 T4 DNA 连接酶构建了植物表达载体 pBI121-pRH。用引物 X-1/V-2 和 X₁-1/V₁-2 对 pBI121-pRH 分别进行 PCR 扩增, 经 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切, 获得长度约 3 200 bp 的片段 (图 4), 与预期片段相符, 表明 RNAi 植物表达载体 pBI121-pRH 构建成功。

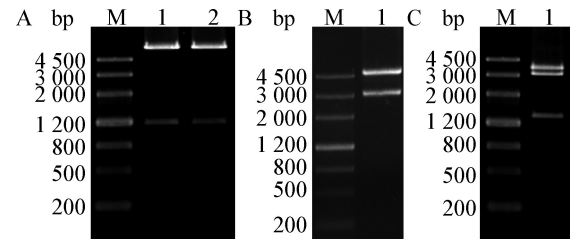


图3 4种马铃薯病毒融合基因RNAi中间载体pRH酶切鉴定

Fig. 3 Verification of RNAi intermediate vector pRH incorporated with fusion genes of four potato viruses by restrictive enzyme digestion

M: Marker III; 1~4: *Bam*H I/*Hind* III 双酶切、*Xho* I/*Kpn* I 双酶切、*Bam*H I/*Xho* I 双酶切和 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切的重组表达载体。M: Marker III; 1~4: recombinant plasmid pRH digested by *Bam*H I and *Hind* III, *Xho* I and *Kpn* I, *Bam*H I and *Xho* I, *Bam*H I and *Sac* I.

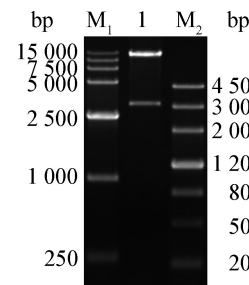


图4 4种马铃薯病毒融合基因RNAi植物表达载体pBI121-pRH酶切鉴定

Fig. 4 Verification of RNAi expression vector pBI121-pRH incorporated with fusion genes of four potato viruses by restrictive enzyme digestion

M₁: Marker 15000; 1: *Bam*H I/*Sac* I 酶切; M₂: marker III。M₁: Marker 15000; 1: *Bam*H I/*Sac* I digestion; M₂: marker III.

2.3 转基因马铃薯植株的获得

试管薯薄片(图5-A)经根癌农杆菌侵染并暗培养2 d后转接到分化培养基上(图5-B),培养12 d后开始膨大并逐渐变绿(图5-C),20 d后薯片中央有绿色凸起(图5-D),30 d后凸起处直接分化出绿色芽点(图5-E),40 d后在薯片凸起处或周边有绿色芽发

出(图5-F),待抗性芽长至1~2 cm左右时剪下接入附加有Kan和Cb的生根培养基上,培养2周后植株茎段切口处生根(图5-G),植株能正常生长,对照组植株不能生根(图5-H),表明再生植株具有Kan抗性,经过3次筛选共得到20株抗性植株。

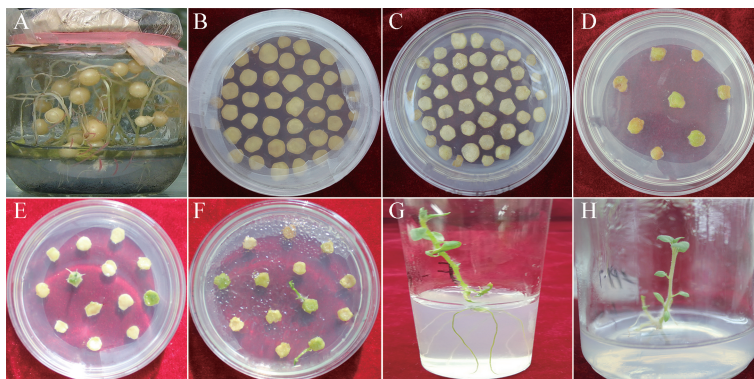


图5 农杆菌介导马铃薯试管薯的转化流程

Fig. 5 Process of agrobacterium-mediated microtuber transformation

A: 试管薯薯片; B-F: 培养2、12、20、30和40 d的试管薯薄片; G: 生根的抗性苗; H: 非转基因的植株。A: Microtuber discs; B-F: microtuber discs after culturing with agrobacterium for 2, 12, 20, 30 and 40 d; G: rooted resistant plant; H: non-transgenic plant.

2.4 转基因马铃薯植株的PCR鉴定

对20株再生植株进行PCR鉴定,用引物X-1/V-2和X₁-1/V₁-2均扩增出长度约为1 200 bp的特异性条带,而空白对照、阴性对照无扩增条带(图6),初

步说明这些株系是阳性转基因植株,PCR-Southern检测结果与PCR鉴定结果相吻合(图7),进一步说明外源基因已整合到陇薯11号马铃薯基因组中。

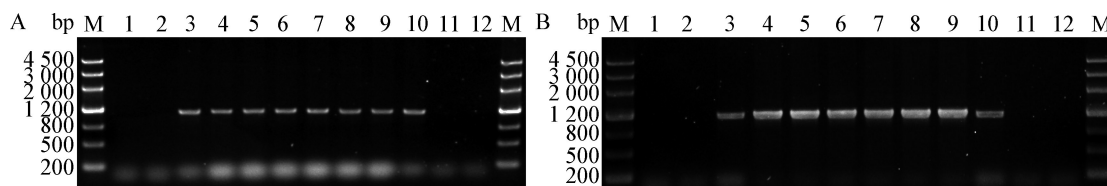


图6 以PVX-1/PLRV-2(A)和PVX₁-1/PLRV₁-2(B)为引物的兼抗PVX、PVY、PLRV、PVS的转基因马铃薯植株的PCR检测

Fig. 6 PCR detection of transgenic potato resistant to PVX, PVY, PLRV and PVS based on primer of

PVX-1/PLRV-2 (A) and PVX₁-1/PLRV₁-2 (B)

M: Marker III; 1, 12: 以ddH₂O为模板的空白对照; 2, 11: 以非转基因植株DNA为模板的阴性对照; 3, 10: 以质粒pBI121-pRH为模板的阳性对照; 4~9: 转基因马铃薯植株。M: Marker III; 1, 12: blank control of ddH₂O; 2, 11: negative control of non-transgenic plant DNA; 3, 10: positive control of pBI121-pRH plasmid; 4~9: positive transgenic plant.

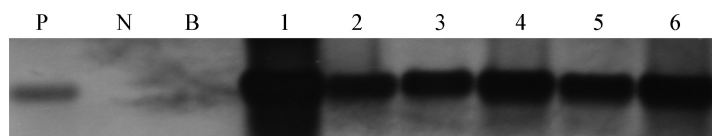


图7 兼抗PVX、PVY、PLRV、PVS的转基因马铃薯植株的PCR-Southern检测

Fig. 7 PCR-Southern analysis of transgenic potato resistant to PVX, PVY, PLRV and PVS

B: 空白对照; N: 非转基因马铃薯植株; P: 阳性对照; 1~6: 马铃薯转基因植株。B: Blank control; N: untransformed potato plantlet; P: positive control; 1~6: potato transgenic plant.

2.5 转基因马铃薯植株的抗病性分析

6株转基因马铃薯植株接种PVX、PVY、PVS、

PLRV 40 d后,4株转基因马铃薯植株的PVX、PVY、PVS、PLRV检测结果均为阴性,说明这4株转基因

植株同时对PVX、PVY、PVS、PLRV四种病毒的抗性较高;1株转基因马铃薯植株的PVX检测结果为阴性,其它3种病毒为阳性,检测数值低于阳性对照,1株转基因马铃薯植株的PVS和PLRV检测结果为阴

性,PVX和PVY检测结果为阳性,检测数值也低于阳性对照(表1)。ELISA检测结果表明,包含4种马铃薯病毒部分CP融合基因的反向重复序列的转基因马铃薯植株表现出对4种病毒有较高的抗性。

表1 兼抗PVX、PVY、PLRV、PVS的转基因马铃薯植株的DAS-ELISA检测结果($OD_{405\text{ nm}}$)

Table 1 DAS-ELISA analysis of transgenic potato plants resistant to PVX, PVY, PLRV and PVS ($OD_{405\text{ nm}}$)

处理 Treatment	PVX	PVY	PVS	PLRV
P1	0.124±0.004	0.572±0.057	1.015±0.780	0.922±0.787
P2	0.123±0.002	0.122±0.004	0.132±0.011	0.123±0.002
P3	0.126±0.006	0.124±0.008	0.119±0.002	0.131±0.014
P4	0.123±0.002	0.122±0.001	0.122±0.004	0.123±0.004
P5	0.922±0.787	1.231±0.351	0.327±0.270	0.275±0.259
P6	0.133±0.002	0.127±0.005	0.120±0.006	0.124±0.006
CK1	1.413±0.397	1.958±0.343	1.281±0.079	2.915±0.198
CK2	0.134±0.004	0.123±0.006	0.123±0.004	0.128±0.004

表中数据为平均数±标准误。P1~P6: 转基因马铃薯植株; CK1: 不接种病毒的非转基因马铃薯植株; CK2: 接种病毒的非转基因马铃薯植株。Data are mean±SE. P1~P6: Transgenic plants; CK1: non-transgenic plants without virus infection; CK2: non-transgenic plants inoculated with PVX, PVY, PVS and PLRV.

3 讨论

PVX、PVY、PLRV、PVS引起的病害是造成我国马铃薯退化的重要原因,严重危害马铃薯生产,尤其是几种病毒混合侵染带来的损失远大于各病毒单独侵染。齐恩芳等(2018)于2015—2016年对采自甘肃省24个马铃薯主栽县(区)146个不同生态区域(乡镇)的757份马铃薯样品进行了调查,共检测到6种马铃薯病毒,其中PVS的检出率最高,达47.03%,病毒复合侵染主要为PVY+PVS,侵染率达10.13%,并发现有PVX、PVY、PLRV、PVS四种病毒的复合侵染。针对PVX、PVY、PLRV国内学者在培育能同时抗2种或3种病毒的转基因马铃薯方面开展了较多研究(Jan et al., 2000; 郭志鸿等, 2006; 白云凤等, 2008),而抗PVS方面的研究则较少。PVS单独侵染时一般不表现症状,通常可使马铃薯减产10%~15%,与其它病毒复合侵染时可减产11%~38%(吴兴泉等, 2002)。本研究从兼抗多种病毒入手构建植物表达载体,培育同时抗4种病毒的马铃薯品种,以减轻病毒混合侵染产生的协生作用。

为了培育同时抗多种病毒的转基因植物,可以将不同病毒的基因连接后导入植物,从而扩大转基因植物的抗病谱。然而完整的病毒基因往往较大,如果将几种病毒的完整基因连接后就会更大,这将对基因转化、转基因稳定性及基因表达等产生不利的影响。研究表明,RNAi不需要完整的基因,而只转基因的部分片段即可,但RNAi对dsRNA有长度

要求,不同病毒用作转基因的核酸片段在病毒基因组中的位置、长短和不同排列结构对RNAi的有效性和效率均有影响(Waterhouse et al., 1998; Smith et al., 2000)。Helliwell & Waterhouse(2003)认为基因片段大小为50~1 000 bp时均能诱发基因沉默,而最短有效片段长度为300~600 bp。因此将几个病毒或病毒株系的基因短片段相连,转入植物而获得多抗转基因植物,从而扩展抗性范围。朱俊华等(2004)认为PVY的CP基因片段的长度介于202~417 bp之间时能够诱发RNA介导的病毒抗性,并认为这是诱发RNA介导抗病性所需的最短有效片段。朱常香等(2008)将PVY、TMV、CMV这3种病毒CP基因小片段融合并构建了RNAi载体,获得了同时高水平抗3种病毒的转基因烟草。本研究选择的4种病毒的CP基因片段分别在与互补小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)亲和力最高的位点为中心的约300 bp区段内,并通过构建融合基因的RNAi载体转化马铃薯得到了马铃薯转基因植株。应用本研究所构建的策略可以将对马铃薯危害严重的所有病毒CP基因的有效核苷酸片段拼接成融合基因,并构建反向重复序列,通过遗传转化获得兼抗多种病毒的马铃薯,其同样可于其它植物中诱导多个病毒的融合基因转录后发生基因沉默,培育多抗转基因植株。

研究表明在构建RNAi植物表达载体时,含有内含子发夹结构RNA的RNA干扰载体沉默效果较好,沉默效率可达90%以上(Smith et al., 2000),内

含子引起高效沉默的可能原因是提高了dsRNA形成的概率,而且内含子自我剪切掉后的dsRNA更容易被dicer酶识别(Stoutjesdijk et al, 2002)。故本研究在构建植物表达载体时选取含有*pdk*内含子结构的pHANNIBAL为中间表达载体,pBI121-pRH载体中的*pdk*不仅增强了载体的稳定性,而且能增强转基因植株的基因沉默效果,进而达到高效抗病的目的。

dsRNA介导的病毒抗性具有抗病性强、特异性显著、生物安全性高等特点,但这种抗病性在后代中的分离现象很复杂,可能与转基因的插入位点、整合方式及拷贝数有关(van den Boogaart et al., 2001)。将在后续研究中对所获得的阳性转基因马铃薯株系进一步开展抗病植株目的基因RNA的积累与抗病性关系的研究,并对RNA介导抗性的遗传稳定性、RNA介导抗病性的强度与转基因拷贝数之间的关系等进行深入研究。另外本研究对转基因植株进行抗性分析时,发现有2株转基因植株对4种病毒表现不完全抗性,究其原因可能是接种病毒时失误造成,也可能是整合过程中基因序列阅读框架被破坏引起,后续将对这2株无性系做重复试验。

参 考 文 献 (References)

- Bai QR, Zhu JH, Liu XL, Zhu CX, Song YZ, Wen FJ. 2005. Production of transgenic tobacco plants resistant to two viruses via RNA-mediated virus resistance. *Acta Phytopathologica Sinica*, 35(2): 148–154 (in Chinese) [白庆荣, 朱俊华, 刘晓玲, 朱常香, 宋云枝, 温孚江. 2005. 利用RNA介导的抗病性获得抗2种病毒的转基因烟草. *植物病理学报*, 35(2): 148–154]
- Bai YF, Guo ZH, Wang XQ, Bai DM, Zhang WF. 2008. Acquisition of anti-virus non marker transgenic potato. *Progress in Natural Science*, 18(11): 1250–1255 (in Chinese) [白云凤, 郭志华, 王小琦, 白冬梅, 张维锋. 2008. 抗双病毒无标记转基因马铃薯的获得. *自然科学进展*, 18(11): 1250–1255]
- Fuchs M, McFerson JR, Tricoli DM, McMaster JR, Deng RZ, Boeshore ML, Reynolds JF, Russell PF, Quemada HD, Gonsalves D. 1997. Cantaloupe line CZW-30 containing coat protein genes of *Cucumber mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, and *Watermelon mosaic virus-2* is resistance to these three viruses in the field. *Molecular Breeding*, 3(4): 279–290
- Gao L, Zhai R, Ding XN, Li K, Liao WL, Zhi HJ. 2014. RNAi vector construction of *Soybean mosaic virus CP* gene and soybean transformation. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 453–460 (in Chinese) [高乐, 翟锐, 丁雪妮, 李凯, 廖文林, 智海剑. 2014. 大豆花叶病毒CP基因RNAi载体的构建及大豆遗传转化. *植物保护学报*, 41(4): 453–460]
- Gao YF, Zhang FF, Zhang JW, Lu YM, Wei GM, Ma TR. 2014. Construction of RNA interference vector against *Tobacco mosaic virus*, *Potato virus M* and *Cucumber mosaic virus* and transformation in pepino (*Solanum muricatum* Ait.). *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 28(1): 44–51 (in Chinese) [高宜峰, 张菲菲, 张金文, 陆艳梅, 魏桂民, 马廷蕊. 2014. TMV, PVM和CMV干扰载体构建及对人参果遗传转化. *核农学报*, 28(1): 44–51]
- Guo ZH, Zhang JW, Chen ZH, Wang LL. 2006. The development of virus resistance transgenic potato plants using RNAi technology and laser microbeam puncture technique. *Acta Laser Biology Sinica*, 15(5): 525–531 (in Chinese) [郭志鸿, 张金文, 陈正华, 王兰岚. 2006. 利用RNA干扰技术及微束激光转化法培育抗病毒马铃薯. *激光生物学报*, 15(5): 525–531]
- Helliwell C, Waterhouse P. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*, 30(4): 289–295
- Helliwell CA, Waterhouse PM. 2005. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods in Enzymology*, 392: 24–35
- Huang P, He QC, Yan Q. 2008. Re-infected virus rate and yield of different gradation virus-free seed potato. *Guizhou Agricultural Sciences*, 36(4): 39–40 (in Chinese) [黄萍, 何庆才, 颜谦. 2008. 马铃薯不同级别脱毒种薯病毒再感染情况及产量变化. *贵州农业科学*, 36(4): 39–40]
- Jan FJ, Fagoaga C, Pang SZ, Gonsalves D. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *Journal of General Virology*, 81(Pt8): 2103–2109
- Jia XX, Qi EF, Wang YH, Wen GH, Gong CW, Wang HM, Li JW, Ma S, Hu XY. 2014. Construction of bivalent plant expression vector of *DREB1A* and *Bar* genes and studies of genetic transformation of potato. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(3): 110–117 (in Chinese) [贾小霞, 齐恩芳, 王一航, 文国宏, 龚成文, 王红梅, 李建武, 马胜, 胡新元. 2014. 转录因子*DREB1A*基因和*Bar*基因双价植物表达载体的构建及对马铃薯遗传转化的研究. *草业学报*, 23(3): 110–117]
- Jia XX, Zhang JW, Wang HN, Ma HY, Liang HG. 2009. Construction of plant expression vectors containing two anti-fungal and one anti-herbicide genes and their expression in transgenic tobacco. *Acta Prataculturae Sinica*, 18(1): 86–93 (in Chinese) [贾小霞, 张金文, 王汉宁, 马怀义, 梁慧光. 2009. 抗真菌和抗除草剂基因多价植物表达载体构建及对烟草遗传转化的研究. *草业学报*, 18(1): 86–93]
- Kaniewski W, Lawson C, Sammons B, Haley L, Hart J, Delannay X, Tumer NE. 1990. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by *Potato virus X* and *Potato virus Y*. *Nature Biotechnology*, 8: 750–754
- Lindbo JA, Dougherty WG. 1992. Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus coat protein* gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 189(2): 725–733
- Liu Y, Cai H, Liu J, Bai X, Ji W, Zhu YM. 2013. Transformation of the *GsCRCK* gene into *Medicago sativa* cv. Nongjing No. 1 and salt tolerance analysis in transgenic plants. *Acta Prataculturae Sinica*, 22(2): 150–157 (in Chinese) [刘莹, 才华, 刘晶, 柏锡, 纪巍, 朱延明. 2013. *GsCRCK*基因转化农菁1号苜蓿及其耐盐性分

- 析. 草业学报, 22(2): 150–157]
- Ma XQ, Wang YG, Zhou XJ, Zhao HB, Li KP, Ma JZ. 2010. Research advances of potato virus. Science and Technology of Food Industry, 31(10): 429–434 (in Chinese) [马雪青, 王永刚, 周贤婧, 赵虎彪, 李昆鹏, 马建忠. 2010. 马铃薯病毒研究新进展. 食品工业科技, 31(10): 429–434]
- Plasterk RH. 2002. RNA silencing: the genome's immune system. Science, 296(5517): 1263–1265
- Prins M, de Haan PD, Luyten R, van Veller MV, van Grinsven MQV, Goldbach R. 1995. Broad resistance to tospovirus in transgenic tobacco plants expressing three-tospoviral gene sequence. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8(1): 85–91
- Qi EF, Liu S, Jia XX, Wen GH, Lü HP, Huang W, Gao YP. 2018. Investigation and analysis of important potato viral diseases in Gansu Province. Plant Protection, 44(4): 171–176 (in Chinese) [齐恩芳, 刘石, 贾小霞, 文国宏, 吕和平, 黄伟, 高彦萍. 2018. 甘肃省马铃薯主要病毒病发生情况调查. 植物保护, 44(4): 171–176]
- Si HJ, Xie CH, Liu J. 2003. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation with microtuber and the introduction of an antisense class I *patatin* gene into potato. Acta Agronomica Sinica, 29(6): 801–805
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. 2000. Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature, 407(6802): 319–320
- Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA, Green AG. 2002. HprRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing. Plant Physiology, 129(4): 1723–1731
- van den Boogaart T, Wen F, Davies JW, Lomonosoff GP. 2001. Replicase-derived resistance against pea early browning virus in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon posttranscriptional gene silencing. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(2): 196–203
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(23): 13959–13964
- Wu XQ, Chen SH, Wei GB, Wu ZJ, Xie LH. 2005. The molecular identification and the distribution of *Potato virus S* in Fujian Province. Journal of Plant Protection, 32(2): 133–137 (in Chinese) [吴兴泉, 陈士华, 魏广彪, 吴祖建, 谢联辉. 2005. 福建马铃薯S病毒的分子鉴定及发生情况. 植物保护学报, 32(2): 133–137]
- Wu XQ, Wu ZJ, Xie LH, Lin QY. 2002. The clone and expression of the coat protein gene of *Potato virus S* in *E. coli*. Virologica Sinica, 17(3): 248–251 (in Chinese) [吴兴泉, 吴祖建, 谢联辉, 林奇英. 2002. 马铃薯S病毒外壳蛋白基因的克隆与原核表达. 中国病毒学, 17(3): 248–251]
- Xu L, Song YZ, Wang WJ, Zhu CX, Wen FJ. 2010. Different virus-resistance to *Potato virus Y* infection mediated by different regions of *Nlb* gene. Journal of Plant Protection, 37(3): 227–233 (in Chinese) [徐丽, 宋云枝, 王文俊, 朱常香, 温孚江. 2010. 马铃薯Y病毒复制酶基因不同位置cDNA区段介导对PVY的不同抗性. 植物保护学报, 37(3): 227–233]
- Zamore PD. 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. Science, 296(5571): 1265–1269
- Zhang HL, Song YR, Peng XX, Li TR, Meng Q, Cui XJ, Hou LL, Zhang LZ, Ma QH. 1996. Engineering resistance to mixed PVX and PVY infection in potato cultivars expressing both PVX and PVY coat protein genes. Chinese Journal of Virology, 12(4): 360–366 (in Chinese) [张鹤龄, 宋艳茹, 彭学贤, 李天然, 孟清, 崔晓江, 侯林林, 张莉枝, 马庆虎. 1996. 表达马铃薯X病毒、Y病毒双价外壳蛋白基因马铃薯转基因植株的抗病性. 病毒学报, 12(4): 360–366]
- Zhou XP, Li DB. 2000. Genetically engineering resistance to viruses and environmental risk assessment of releases of transgenic plants. Chinese Bulletin of Life Sciences, 12(1): 4–6 (in Chinese) [周雪平, 李德葆. 2000. 抗病毒基因工程与转基因植物释放的环境风险评估. 生命科学, 12(1): 4–6]
- Zhu CX, Song YZ, Wen FJ. 2008. Constructing transgenic tobacco for multiple-resistance against *Potato virus Y*, *Cucumber mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus*. Scientia Agricultura Sinica, 41(4): 1040–1047 (in Chinese) [朱常香, 宋云枝, 温孚江. 2008. 多抗PVY、TMV和CMV转基因烟草的培育. 中国农业科学, 41(4): 1040–1047]
- Zhu JH, Zhu XJ, Wen FJ, Bai QR, Zhu CX, Song YZ. 2004. The effect of PVY^{NC}-CP segment length and structure on RNA-mediated virus resistance. Science in China: Series C, 34(1): 23–30 (in Chinese) [朱俊华, 竺晓平, 温孚江, 白庆荣, 朱常香, 宋云枝. 2004. 马铃薯Y病毒外壳蛋白基因片段长度对RNA介导抗病性的影响. 中国科学C辑: 生命科学, 34(1): 23–30]

(责任编辑: 张俊芳)