

66-72

13

马铃薯卷叶病毒基因间隔区转化的马铃薯抗病性研究*

董江丽 李天然 哈斯·阿古拉 张鹤龄

(内蒙古大学生命科学院, 呼和浩特 010021)

5435.32

摘要 将本室合成、克隆的马铃薯卷叶病毒(Potato Leafroll Virus, PLRV)中国分离株的基因间隔区(intergenic sequence, IS)双链 cDNA 以正、反向两种方式分别构建于转化载体 pROK2 中,通过致瘤农杆菌介导,以马铃薯叶圆片为转化材料,转化马铃薯栽培品种 Desiree, 获得了转基因植株。卡那霉素抗性分析和 PCR 检测目的基因,证明 PLRV IS 双链 cDNA 已经整合到转基因马铃薯的染色体基因组中。将转基因植株移栽网棚用蚜虫接种 PLRV, 观察症状并用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测转基因植株中 PLRV 含量。结果表明,表达 PLRV IS 正意和反意 RNA 的转基因植株,接种病毒后表现无症状或症状轻微,PLRV 平均滴度均较未转基因对照植株低。表达正意 RNA 的转基因植株 PLRV 滴度降低 43%~72%,表达反意 RNA 的转基因植株 PLRV 滴度降低 72%~86%,由此可见,表达 PLRV IS 反意 RNA 的转基因马铃薯对 PLRV 抗性较强。

关键词 马铃薯卷叶病毒, 基因间隔区, 转基因马铃薯, 抗性

马铃薯卷叶病毒属黄化病毒组(Luteovirus),是引起马铃薯“退化”的一个主要病毒。PLRV 分布广泛,在田间由蚜虫以持久性方式传播,难于控制,每年使全世界马铃薯减产约 200 万吨^[1]。因此,培育抗 PLRV 的马铃薯新品种具有重要经济意义。

用常规育种方法培育的抗 PLRV 品种需时较长,且抗性常不稳定,脱毒种薯也难以防止后期再感染。1986 年,Abel 等首次利用基因工程手段用烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白(CP)基因转化烟草,获得了对 TMV 具有一定抗性的烟草植株^[2],开辟了一条抗病毒基因工程新途径。在国内,张鹤龄等培育出了表达 PLRV CP 基因的抗病毒转基因马铃薯植株^[3]。自 1990 年 Golemboski 等利用 TMV 聚合酶编码 54 kD 蛋白基因转化烟草获得高水平抗性以来^[4],已获得 TMV、豌豆早褐病毒(PEBV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、雀麦花叶病毒(BMV)、苜蓿花叶病毒(AIMV)、马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、辣椒轻斑驳病毒(PMMT)等病毒聚合酶基因转化的植物^[5,6]。尽管国内外培育出了多种以病毒结构基因——外壳蛋白基因或非结构基因——复制酶基因转化的抗病毒基因工程植株,但对于病毒基因间隔区转化的植株是否具有抗病毒作用,至今未见有关报道。

PLRV 是正链 RNA 病毒,基因组全长 6.0 kb,以中间的一段 197 bp 非编码区——基因间隔区分为 5' 和 3' 两个编码区。3' 编码区以亚基因组方式独立表达 23 kD 外壳蛋白、17 kD 蛋白和 56 kD 蛋白。研究结果表明,在 PLRV 基因间隔区有一个类似于雀麦花叶病毒(BMV)亚基因组启动子序列的富含 U 区域(UAUUU),分析此区域可能为 PLRV 亚基因组启动子^[7]。

收稿日期:1998-01-19, 修回日期:1998-05-20

* 国家自然科学基金资助项目 批准号:39270453

因此,用反向构建于转化载体中的 PLRV IS cDNA 转化马铃薯,转基因植株表达的反意 RNA 必将封闭 PLRV 亚基因组 RNA 的启动子序列,干扰病毒亚基因组的转录;反意 RNA 也可以通过互补碱基和病毒 mRNA 结合,抑制 mRNA 的翻译。鉴于反意 RNA 在转录和翻译两个水平上干扰病毒的复制,该方法有可能建立抗病毒基因工程的新途径。而用正向构建于转化载体中的 PLRV IS cDNA 转化马铃薯,转基因植株表达的正意 RNA 可以通过互补碱基和以 PLRV 亚基因组 RNA 为模板合成的 -RNA 结合,抑制 -RNA 进一步转录为 mRNA,也可能获得抗病毒基因工程植株。

本文报道了分别以正、反向两种方式,构建于转化载体中的 PLRV IS cDNA 转化马铃薯栽培品种 Desiree 所获得的转基因植株,对 PLRV 的抗病性研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

pLRIS 质粒是由本室合成克隆的含有 PLRV 中国分离株基因间隔区 cDNA 的重组质粒,并进行了全序列分析^[8]。

二元载体 pROK2、辅助质粒 pRK2013(HE101)和 pAL4404(LBA4404),是由英国苏格兰作物研究所的 Brian Reavy 博士和约翰·伊诺斯研究所的 David Baulcombe 教授惠赠,由本实验室保存。

马铃薯栽培品种 Desiree 脱毒苗由本实验室保存。将单节的脱毒苗茎段离体转入含有 50 mL 液体 MS 基本培养基的 250 mL 三角瓶内,于光照 16 h/黑暗 8 h,温度为 21~25 ℃ 的条件下培养两周,植株长到 7~8 cm 时,取叶片做转基因实验。

1.2 方法

1.2.1 反向插入载体的构建 pLRIS 质粒 DNA 经 SmaI、BamHI 双酶切后,电泳回收小片段,插入植物表达载体 pROK2 的 CaMV 35S 启动子和胭脂碱合成酶基因(nos)转录终止子之间的 SmaI 和 BamHI 位点,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有卡那霉素(Kan)50 mg/L 的固体 LB 平板上筛选重组子^[9],PCR 检测重组子是否含有目的基因,获得的反向插入克隆命名为“pROK2-ISP”。

1.2.2 正向插入载体的构建 pLRIS 质粒 DNA 经 BamHI 单酶切后,65 ℃ 水浴 10 min 使酶失活,Klenow 补齐粘端,抽提纯化后以 BclI 单酶切,电泳回收小片段,用 2:1 的方法将目的基因插入到 pROK2 质粒的 SmaI 和 BamHI 位点,获得的正向插入克隆命名为“pROK2-ISP”(载体构建见图 1)。

1.2.3 转化马铃薯 插入外源基因的 pROK2 质粒经三亲融合实验被引入仅含 vir 区质粒 pAL4404 的致瘤农杆菌 LBA4404 中,辅助质粒为 pRK2013。挑取三亲融合后的转化用菌单菌落,接种于含有 Kan 100 mg/L 的 YEB 培养液中,于 28 ℃ 150 r/min 振荡培养 2 d。离心,沉淀悬浮于 10 mL 10 mmol/L MgSO₄ 中,再用 3MS (MS+3%蔗糖)重悬沉淀 2 次以去除抗生素,稀释菌液到 OD₆₀₀ = 0.5。选取离体培养的脱毒马铃薯 Desiree 叶片,垂直主脉做 2~3 个切口,将叶片倒置漂浮在稀释菌液上,23~25 ℃ 暗培养 2 d。将叶片转入 MSG1 琼脂培养基(MS+1.6%葡萄糖+5 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA)光照培养 2 d,再转入含有 Kan 50 mg/L、头孢霉素(Cef) 500 mg/L 的 MSG1 琼脂培养基,诱导愈伤组织。培养 8 d 后,将叶片转入含有 Kan 50 mg/L、Cef 500 mg/L 的 MSG2 琼脂培养基(MS+1.6%葡萄糖+0.02 mg/L NAA+0.02 mg/L GA3+2.0 mg/L 玉米素核苷),诱导生芽。待芽长到 2~3 cm 时,将芽转入含有 Kan 50 mg/L、Cef 250 mg/L 的 3MS 琼脂培养基上诱导生根,以获得再生转基因植株。

1.2.4 转基因植株总 DNA 提取和 PCR 扩增 按 K. Edwards 等^[10]的方法提取转基因马铃薯植株总 DNA,并用 50 μ L DNA 扩增体系进行 PCR 扩增,循环参数为 94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,循环 30 次。

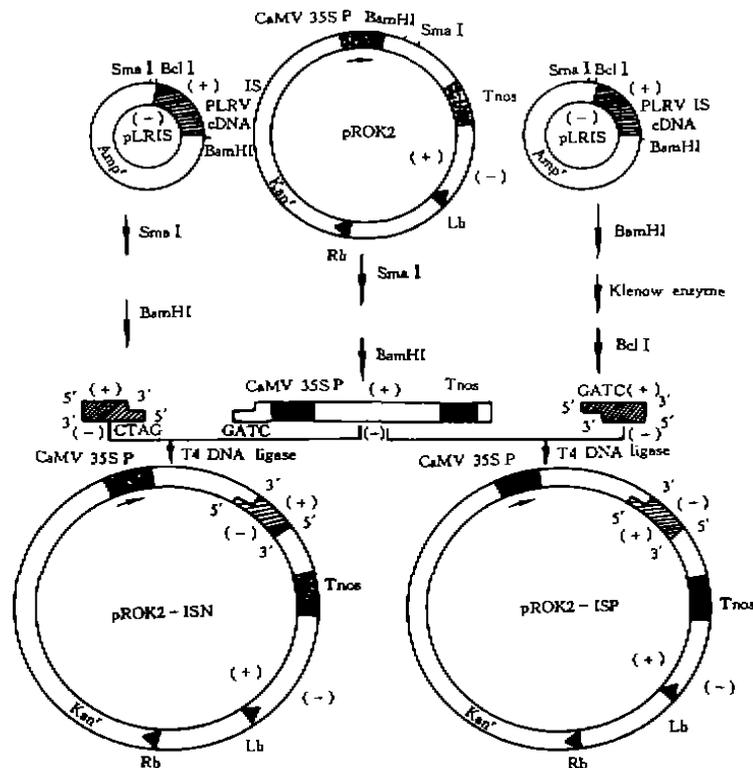


图1 转化载体的构建

Fig. 1 Construction of transformation vector

1.2.5 转基因植株的田间抗性试验 将在3MS培养液中扩繁的转基因植株,在株高4~6 cm时取出,假植于蛭石中约2周,然后移入防虫网室中进行田间抗性试验。当株高15 cm时,用带PLRV的桃蚜(*Myzus persicae* Sulz)接种病毒,每株10头。传毒前先将无毒蚜虫在感染PLRV的马铃薯上饲养3 d,传毒5 d后杀死蚜虫^[3]。接毒4周后,采接叶上部叶片作为待测样品。用ELISA检测转基因植株中PLRV的含量。ELISA以未转基因的马铃薯Desiree脱毒苗为阴性对照,以未转基因的接种PLRV的马铃薯Desiree植株为阳性对照。

2 结果

2.1 重组双元载体的鉴定

重组质粒pROK2-ISP、pROK2-ISN经三亲融合实验被引入仅含vir区质粒pAL4404的致瘤农杆菌LBA4404中。从三亲融合后的农杆菌LBA4404中提取质粒DNA并用琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明,获得了约10 kb的重组双元载体质粒,其迁移率与*E. coli* DH5α中的pROK2-ISP、pROK2-ISN质粒相一致,PCR扩增均检测到0.2 kb大小的目的基因(图2)。

2.2 马铃薯的转化和转基因植株的再生

将脱毒马铃薯Desiree叶片分别与含有重组质粒pROK2-ISP或pROK2-ISN的LBA4404农杆菌共培养2 d后,转入MSG1琼脂培养基,光照培养2 d使叶片充分吸收菌液且免受抗生素(Kan、Cef)的刺激。接着转入含有Kan、Cef的MSG1培养基,于16 h光照/8 h黑暗的条件

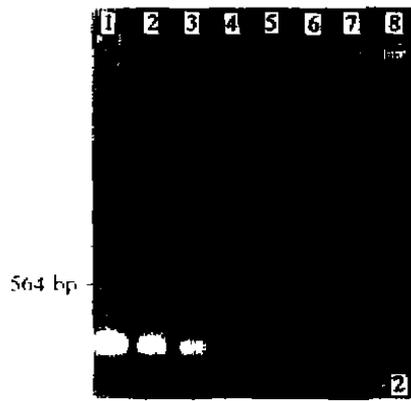


图 2 重组二元载体的检测鉴定

- 1 pLRIS 为模板的 PCR 产物(阳性对照); 2 pROK2-ISP (LBA4404) 为模板的 PCR 产物;
3 pROK2-ISP(LBA4404) 为模板的 PCR 产物; 4 λ DNA/Hind III DNA 分子量标记;
5 pROK2-ISP(*E. coli* DH5 α); 6 pROK2-ISP(LBA4404);
7 pROK2-ISP(LBA4404); 8 pROK2-ISP(*E. coli* DH5 α)。

Fig. 2 Detection of recombinant binary vector

- lane 1 PCR product from pLRIS; lane 2 PCR product from pROK2-ISP (in LBA4404);
lane 3 PCR product from pROK2-ISP (in LBA4404); lane 4 λ DNA/Hind III marker;
lane 5 pROK2-ISP (in *E. coli* DH5 α); lane 6 pROK2-ISP (in LBA4404);
lane 7 pROK2-ISP (in LBA4404); lane 8 pROK2-ISP (in *E. coli* DH5 α)。

下诱导愈伤组织, 3~4 d 开始从叶脉切口处膨胀, 8 d 左右, 在大部分伤口处产生浅黄色的愈伤组织。然后转入含有 Kan、Cef、玉米素核苷的 MSG2 培养基上诱导生芽, 20 d 左右, 由愈伤组织长出深绿色突起的芽原基, 30 d 左右, 即可形成大量的丛生芽。未转基因的马铃薯叶片在含有 Kan 的培养基上培养 10 d 左右变为黄褐色死亡。

当芽长到 2~3 cm 时, 将芽转入含有 Kan、Cef 的 3MS 琼脂培养基上诱导生根, 10 d 左右开始长根, 20 d 左右再生植株即可长到 7~8 cm。未转基因的马铃薯芽在含有 Kan 的培养基上不能生根, 植株长到 3~4 cm 后渐渐枯萎死亡(图 3)。

在实验过程中, 我们选用了多种转化、诱导方案, 结果表明上述方案出芽率最高。

2.3 PCR 检测转基因植株中的 PLRV IS 片段

经过含 Kan 的 3MS 培养基多次筛选, 从 Kan 抗性的转基因马铃薯 Desiree 植株提取总 DNA 进行 PCR 扩增, 同时以未转基因的同一品种马铃薯脱毒苗为阴性对照, 以 pLRIS 质粒为阳性对照。琼脂糖凝胶电泳结果表明, 获得了 0.2 kb 的特异 DNA 带, 迁移率与阳性对照完全一致(图 4)。

2.4 转基因植株对 PLRV 的抗性分析

转基因植株在防虫网室中培养到株高 15 cm 时, 用预先饲毒 3 d 的桃蚜传毒 5 d。传毒 4 周后, 用双抗体夹心 ELISA 方法测定转基因植株中 PLRV 含量(以 OD_{405} 值表示)。结果表明: 表达 PLRV IS 反意 RNA 的转基因植株 PLRV 含量较未转基因对照降低 72%~86%, 表达正意 RNA 的转基因植株 PLRV 含量较对照降低 43%~72%, 高抗单株大多为表达反意 RNA 的转基因植株(表 1)。观察 PLRV 侵染植株的症状并以未转基因马铃薯植株为阳性对照。对照植株的初发症状表现为顶部叶片向上直立, 小叶基部沿中脉向上卷曲且边缘退绿变黄, 底部叶片正常; 转基因植株延迟发病 2~3 周且症状轻微。第二年将接种病毒的植株块茎种植于网室, 6 周后观察植株继发感染症状。对照植株底部叶片卷叶、黄化、边缘坏死, 卷叶症状由底部向中部叶片逐渐扩展, 整个病株外观表现为矮小、黄化。转基因植株中的感病株症状较对照轻微, 高抗株外观正常、植株高大、仅底部有轻微卷叶。

研究证明, 以马铃薯卷叶病毒基因间隔区转化的马铃薯能产生对 PLRV 的抗性, 表达 PLRV IS 反意 RNA 的转基因植株较表达正意 RNA 的转基因植株抗病性更明显。

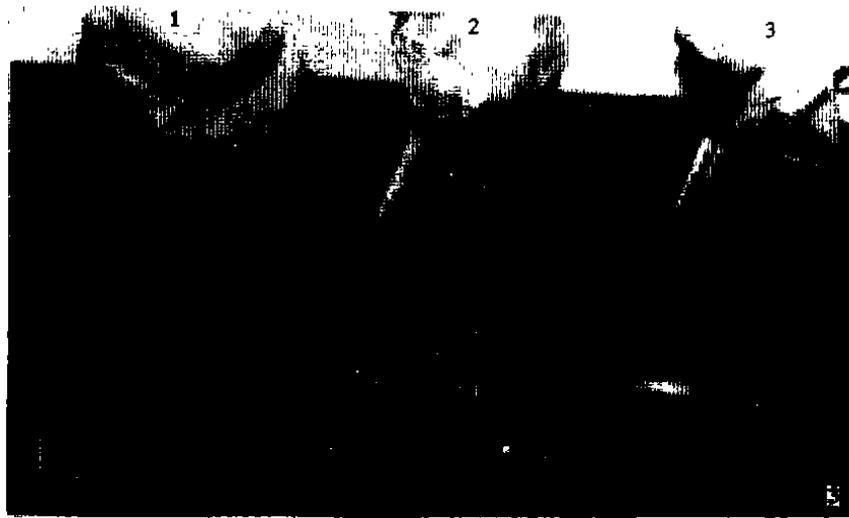


图3 抗性芽在含 Kan(50 mg/L)的生根培养基上培养 10~20 d 后获得转基因植株
1. 表达 PLRV IS 反意 RNA 的转基因植株; 2. 表达 PLRV IS 正意 RNA 的转基因植株; 3. 未转基因的马铃薯芽在含有 Kan 的生根培养基上不能生根, 渐渐枯萎。

Fig. 3 Obtained transgenic lines from kanamycin resistant shoots on the rooted medium containing Kan(50mg/L) after 10 to 20 days

lane 1 Transgenic lines expressing PLRV IS antisense RNA; lane 2 Transgenic lines expressing PLRV IS sense RNA; lane 3 Untransformed potato shoots cannot root on the rooted medium containing Kan

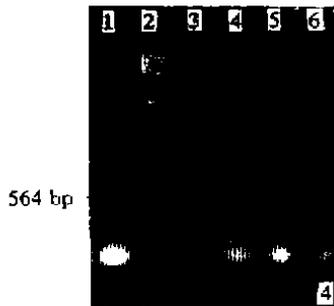


图4 PCR 检测转基因植株中的外源基因

1 pLRIS 为模板的 PCR 产物(阳性对照);
2 λ DNA/Hind III DNA 分子量标记;
3 未转基因的马铃薯植株 DNA 为模板的 PCR 产物(阴性对照);
4 表达 PLRV IS 正意 RNA 的转基因马铃薯植株 DNA 为模板的 PCR 产物;
5~6 表达 PLRV IS 反意 RNA 的转基因马铃薯植株 DNA 为模板的 PCR 产物。

Fig. 4 Detection of foreign gene in transgenic plant

lane 1 PCR product from pLRIS (positive control);
lane 2 λ DNA/Hind III marker;
lane 3 PCR product from nontransgenic potato plant (negative control);
lane 4 PCR product from transgenic plant expressing PLRV IS sense RNA;
lane 5~6 PCR product from transgenic plant expressing PLRV IS antisense RNA.

3 讨论

自 1986 年 Abel 等首次报道用 TMV CP 基因转化烟草获得延迟发病的抗性植株以来, 已先后获得用 14 种植物病毒外壳蛋白基因和 8 种病毒的复制酶基因转化的植物^[5]。马铃薯卷叶病毒是严格蚜虫传播的病毒。有报道表明, 用 PLRV CP 基因转化马铃薯植株能使转基因植株对 PLRV 产生较强的抗性^[4, 11]。同时, 实践已证明外壳蛋白介导的抗性是一种有效的抗

表 1 PLRV 基因间隔区转化的马铃薯 Desiree 各株系中病毒平均滴度
Table 1 Average titer of PLRV in 'Desiree' clones expressing PLRV intergenic sequence RNA

株系号 Clone No.	株 数 No. of plants tested	PLRV 平均滴度 Average titer of PLRV (OD ₄₀₅)	较阳性对照 降低百分率 Reduced %
+ 3	5	0.134	70%
+ 8	5	0.257	43%
+ 21	8	0.124	72%
- 1	5	0.115	74%
- 4	6	0.113	75%
- 5	6	0.061	86%
Positive control	4	0.447	
Negative control	4	0.000	

病毒基因工程途径。但是也有试验表明,转基因植株表达的外壳蛋白有可能包壳其它非蚜虫传播的病毒 RNA。这种异源包壳会导致原本非蚜虫传播的病毒转为蚜虫传播^[12],同时还有可能包壳类病毒 RNA,如马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)RNA,并促使其通过蚜虫传播^[13]。复制酶介导的抗性是通过在转基因植株中表达全长的复制酶基因、其部分片段或缺损的复制酶基因获得的。尽管用于转化植物的复制酶基因序列不同,产生的抗性水平均较高,但其抗性均具有株系特异性。本研究采用正意和反意的 PLRV 基因间隔区转化马铃薯,并获得抗病毒的转基因植株,从而建立了一种抗病毒基因工程新途径,其特点在于:基因间隔区既不是结构基因也不是非结构基因,它只是一段长约 200 bp 的调控序列,易于操作;其次,这段序列在转基因植株中无需表达产物,无需转译,其作用只是在 RNA 水平上干扰病毒亚基因组的转录和表达;第三,用于转化植物的病毒基因组序列虽短,但其干扰作用却并不限于一个具体的结构基因产物或非结构基因产物介导的抗性,而是影响到 PLRV 基因组 3'端整个编码区内三个重要基因(外壳蛋白基因、56 kD 蛋白基因、17 kD 蛋白基因)的表达,从而干扰病毒的增殖,可能对通过亚基因组表达 3'端基因的植物病毒的抗病毒基因工程具有普遍意义。表达 PLRV 基因间隔区的抗病毒机制正在进一步研究,但推测转基因植株表达的反意或正意 IS RNA,可以通过互补碱基和其各自对应的病毒 mRNA 或 -RNA 相结合,从而抑制 mRNA 的翻译或 -RNA 转录为 mRNA。此外,反意 IS RNA 还可以和已产生的亚基因组 RNA 5'端结合,干扰其转译;而正意 IS RNA 则可以和亚基因组 RNA 竞争结合细胞中的有关转译因子,干扰亚基因组的转译。

参 考 文 献

- 1 Kojima N. Potato leafroll virus. In: Smith M *et al.* eds. European Handbook of Plant Disease Oxford: Black-well Scientific Publication, 1988, 23~24
- 2 Abel P P, Nelson R S, De B *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, 1986, 232:738~743
- 3 张鹤龄,李天然,哈斯·阿古拉等.抗卷叶病毒(PLRV)转基因马铃薯栽培种及其抗病性研究.病毒学报,1995,11(4):342~350
- 4 Golemboski D B, Lomonosoff G P, Zaidin M. Plants transformed with a tobacco mosaic nonstructural gene sequence are resistant to the virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6311~6315

- 5 John P C, Milton Z. Replicase mediated resistance. *Seminars in Virology*, 1993, 4: 339 ~ 347
- 6 Tenllado F, Garcia-luque I, Serra M T *et al.* Nicotiana benthamiana plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology*, 1995, 211: 170 ~ 183
- 7 Tacke E, Pruffer D, Salamun F *et al.* Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: differential expression by internal translation initiation and UAG suppression. *J Gen Virol*, 1990, 71: 2265 ~ 2272
- 8 董江丽, 哈斯·阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区的克隆及序列分析. *中国病毒学*, 1996, 11(2): 144 ~ 148
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 10 Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6): 1349
- 11 Kawchuk L M, Martin R R, Mcpherson J. Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Molecular Plant Microbe Interact*, 1990, 3: 301 ~ 307
- 12 Lecoq H, Ravelmandro M, Wipf-Scheibel C *et al.* Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow-mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the coat protein of plum pox potyvirus. *Molecular Plant Microbe Interact*, 1993, 6: 403 ~ 406
- 13 Baulcombe D. Novel strategies for engineering virus resistance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, 5: 117 ~ 124

Resistance of Transgenic Potato Expressing Intergenic Sequence of Potato Leafroll Virus

Dong Jiangli Li Tianran Hasi Agula Zhang Heling

(Faculty of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhehaote 010021)

Abstract The intergenic sequence (IS) cDNA of Potato Leafroll Virus (PLRV) Chinese isolate was constructed into transformation binary vector pROK2 in positive or negative direction, then introduced into the commercial potato cultivar Desiree via *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer. Kanamycin resistance, PCR amplification of transgenic lines showed that intergenic sequence of PLRV-Ch was integrated into the genome of potato plants. The transgenic lines were transplanted into the screen house, then inoculated with PLRV by viruliferous *Myzus persicae* Sulz. After inoculation, the symptom development was observed and the virus titer was detected by ELISA. Results showed that the transgenic plants displayed slight or no symptom. The average PLRV titer in the transgenic lines was lower than the untransformed plants. The transgenic lines expressing sense RNA reduced PLRV titers about 43% ~ 72% in comparison with untransformed plants, while the transgenic lines expressing antisense RNA reduced about 72% ~ 86%. It showed that the antisense RNA conferred higher resistance to PLRV.

Key words Potato Leafroll Virus (PLRV), Intergenic sequence, Transgenic potato, Resistance