

PLO 介导 PLRV—CP 基因转化马铃薯获转基因抗性植株^{*}

南相日¹, 刘文萍¹, 韩玉琴¹, 黄金亮², 张春安²

(1. 黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 敦化市马铃薯繁育开发中心, 敦化 135000)

摘要: 利用 PLO (Poly—L—Ornithine) 将外源 PLRV—CP 基因导入到马铃薯加工型品种大西洋原生质体中, 获得了转化后代, 经过 PCR 和 RT—PCR 分析均显阳性, 蚜虫接种 PLRV, 结果比对照明显抗 PLRV。

关键词: 马铃薯; 原生质体; PLRV—CP 基因

中图分类号: S 532.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1002—2767(2004)03—0001—03

PLRV—CP Gene Transferring Potato Gain Disease Resistant Transplant by Poly—L—Ornithine

NAN Xiang-ri¹, LIU Wen-ping¹, HAN Yu-qin¹, HUANG Jin-liang², ZHANG Chun-an²

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin 150086, 2. Dunhua Potato Breeding and Development Center Dunhua 135000)

Abstract: The external PLRV—CP gene was transferred into processing Potato protoplasts and got transferred progeny by PLO. The PCR and RT—PCR analysis was positive. After inoculating PLRV with aphid, the transplant was much more resistant to PLRV than control.

Key words: potato; protoplast; PLRV—CP gene

随着我国市场经济的发展和种植结构的调整以及马铃薯加工业的快速兴起, 生产上对马铃薯品种亦提出了更多更高的要求, 尤其是对专用抗病加工型品种要求更为迫切。利用转基因手段改良原有的加工型品种, 提高其抗病水平, 对发展马铃薯加工业, 提高我国马铃薯产业的国际竞争能力, 具有重要的意义。马铃薯卷叶病毒 (Potato Leafroll Virus, PLRV) 是由蚜虫以持久方式传播的一种病毒^[1], 可侵染马铃薯, 引起卷叶、黄化、矮缩、僵化。由于 PLRV 很难控制, 给马铃薯生产造成巨大的经济损失。本研究以马铃薯加工品种大西洋原生质体作为受体, 直接导入马铃薯卷叶病外壳蛋白基因, 获得抗性植株, 以防治马铃薯卷叶病毒的侵染。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用经过脱毒检测合格的大西洋试管苗为原生质体分离的材料。

1.2 质粒 pPCP 的提取

PLRV—CP 基因由韩国农业振兴厅高龄地农业试验场徐孝源博士惠赠。质粒 pPCP 含有能够在植物中表达的 PLRV—CP 基因、GUS 基因和新霉素磷酸转移酶 (NPT II) 基因。这三个基因分别带有花椰菜花叶病毒的 35S 启动子和胭脂碱合成酶酶的 NOS 启动子。用碱裂解法^[2]提取质粒, 最终浓度调整为 1 mg/mL。

* 收稿日期: 2004—02—12

基金项目: 省科委攻关资助项目 (GA01B101—08)

第一作者简介: 南相日 (1966—), 男, 吉林省辉南县人, 1991 年毕业于东北农学院生物工程系植物生理生化专业, 获硕士学位。毕业后在黑龙江省农业科学院生物技术研究中心一直从事生物技术服务。

1.3 原生质体的游离及提纯

采用扩繁 20 d 左右的大西洋试管苗,取叶片和茎段,用刀片切成 1 mm 左右,置于酶液中, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 50rpm 振荡条件下酶解 4 h,静置 1 h。酶液的组成为 2.0% Cellulase Onozuka RS (Sigma), 0.25% Pectolyase Y-23 (Sigma), 0.6 g/L MES, CPW-9M pH 值 5.8。原生质体纯化参照卫志明^[3] 的方法,纯化后的原生质体浓度调整为 1×10^6 个/mL。

1.4 转化外源 PLRV-CP 基因及筛选

利用 PLO (Sigma) 法^[4], 将 PLRV-CP 基因导入到马铃薯原生质体中,用初始培养基 $\text{K}_8\text{p} + 1.0 \text{ mg/L NAA} + 0.4 \text{ mg/L 6-BA} + 250 \text{ mg/L CH} + 40 \text{ mg/L AS}$ pH 值 5.6,把原生质体培养浓度调整到 1×10^4 个/mL,采用液体浅层培养, $24 \pm 1^\circ\text{C}$,暗培养 7 d 之后,加入 50 mg/L 卡那霉素筛选,当愈伤组织长至约 1 mm 左右时,将其移至 $\text{K}_8\text{p} + 0.1 \text{ mg/L IAA} + 0.5 \text{ mg/L 6-BA} + 0.1 \text{ mg/L KT} + 40 \text{ mg/L AS} + 100 \text{ mg/L Km} + 0.8\% \text{ Agar}$ 固体培养基,在散射光下培养,当愈伤组织长至 5 mm 左右时移至 $\text{K}_8\text{p} + 0.1 \text{ mg/L IAA} + 3 \text{ mg/L ZT} + 100 \text{ mg/L Km} + 0.8\% \text{ Agar}$ 分化培养基中,2 000Lx 光照条件下进行分化,当芽分化成 3 cm 左右时移至 $\text{MS} + 100 \text{ mg/L Km}$ 无激素培养基中生根培养,快速扩繁。

1.5 GUS 检测

挑选有卡那霉素抗性的愈伤组织,进行组织化学活性鉴定^[5]。

1.6 PCR、RT-PCR 分析

卡那霉素和 GUS 染色显阳性的植株叶片中,提取 DNA,进行 PCR、RT-PCR 扩增分析。

1.7 抗性鉴定

蚜虫接种马铃薯卷叶病毒,酶联免疫 (ELISA) 测定抗病性。

2 结果与分析

2.1 获得转化植株

利用 PLO 法,将 PLRV-CP 基因导入到马铃薯原生质体中,培养 7 d 之后,加 50 mg/L 卡那霉素进行筛选,45 d 后得到了肉眼可见的细胞团(见图版 1,2)。相对转化效率达到 0.4% (卡那霉素筛选的愈伤组织数和未经卡那霉素筛选的愈伤组织数之比 $\times 100\%$)。经过筛选的愈伤组织长到 1 mm 左右时,将其移至 $\text{K}_8\text{p} + 0.1 \text{ mg/L IAA} + 0.5 \text{ mg/L 6-BA} + 0.1 \text{ mg/L KT} + 40 \text{ mg/L AS} + 100 \text{ mg/L Km} + 0.8\% \text{ Agar}$ 固体培养基,在散射光下培养,当愈

伤组织长至 5 mm 左右时,分出一半愈伤组织,用 0.1% X-Gluc 染色,结果多数显蓝色反应(见图版 3)。将蓝色反应的另一半愈伤组织移至 $\text{K}_8\text{p} + 0.1 \text{ mg/L IAA} + 3 \text{ mg/L ZT} + 100 \text{ mg/L Km} + 0.8\% \text{ Agar}$ 分化培养基中,2 000 Lx 光照条件下进行分化,当芽分化成 3 cm 左右时,移至 $\text{MS} + 100 \text{ mg/L Km}$ 无激素培养基中生根培养,获得了 3 株再生植株(见图版 4)。

2.2 分子验证

取卡那霉素和 GUS 染色显阳性的再生植株叶片,用 CTAB 法^[6] 提取总 DNA,利用 PCR 扩增部分 PLRV-CP 基因的目标序列。PCR 引物由大连宝生物公司合成,两个引物序列是: 5'-CGT GCG ATC AAT TGT TAA TG-3' 5'-GAG GTC TAT TTG GGG TTT TG-3',反应体积为 $30 \mu\text{L}$,模板 DNA 为 0.2-0.5 μg 。95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,然后在 94 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,48 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s 的反应条件下进行 30 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 再延伸 10 min。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测,最终在 3 株再生植株中扩增出长度为 610bp 左右的目标 DNA 片断(见图版 5),说明导入的外源 PLRV-CP 基因已经整合到马铃薯基因组中。

PCR 阳性植株移栽到网室内,在第一片复叶长出前,用 200 mg/L 卡那霉素喷洒筛选,当植株长到 5~6 片复叶时,提取植物总 DNA,利用通用 RT-PCR 试剂盒,通过特殊引物 5'-CGT GCG ATC AAT TGT TAA TG-3' 合成第一个 cDNA,然后在上述 PCR 条件下进行了 PCR 扩增。结果 3 株后代中都扩出了 610bp 目标带(见图版 6),说明整合到马铃薯基因组中的 PLRV-CP 基因在叶片中有稳定的表达。

2.3 抗性鉴定

移栽于土壤中 10 周的马铃薯叶片为接种对象,把马铃薯上繁殖的蚜虫放入卷叶病毒源植株,对照

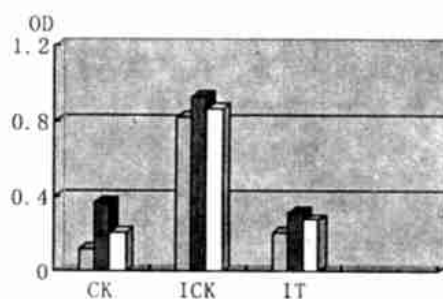


图 1 ELISA 检测马铃薯卷叶病毒

植株和转基因植株的封闭室中, 接种 3 d 后, 用酶联免疫法测定叶片中的病毒含量。结果如图 1 所示, 转 PLRV-CP 基因植株 IT 的 OD 值比一般感染植株 ICK 的 OD 值低, 也就是说叶片中病毒含量低, 说明转 PLRV-CP 基因植株对马铃薯卷叶病毒有很强的抗性。

3 讨论

本试验获得了 3 株转 PLRV-CP 基因植株, PCR 和 RT-PCR 结果均显阳性反应, 蚜虫接马铃薯卷叶病毒比对照明显抗 PLRV, 说明 PLRV-CP 基因已经整合到马铃薯基因组中, 而且在叶片中有很强的基因表达。由此可见, 利用 PLO 法转化外源 PLRV-CP 基因, 虽然转化效率不高, 但是所获得的后代假阳性少, 因此是一种转化外源基因行之

有效的方法。

参考文献:

[1] 张成良, 张作芳. 植物病毒的分类和命名[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 124-127.

[2] J. 萨姆布鲁克. E. F. 费里奇. T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 19-22.

[3] 卫志明, 许智宏. 大豆原生质体培养和植株再生[J]. 植物学报, 1990, 32(8): 582-588.

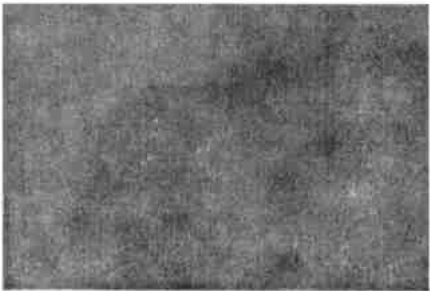
[4] 南相日, 卫志明. 利用聚鸟氨酸提高大豆原生质体外源基因的转化效率[J]. 实验生物学报, 1999, 32(4): 409-413.

[5] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 168-170.

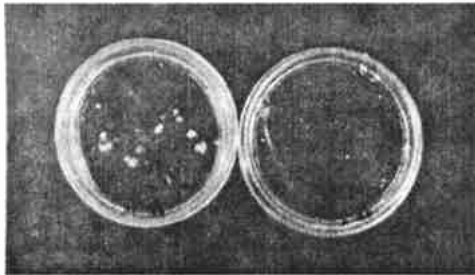
[6] Stewart CN Jr. Via LE A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. Biotechniques. 1993 14: 748-751.



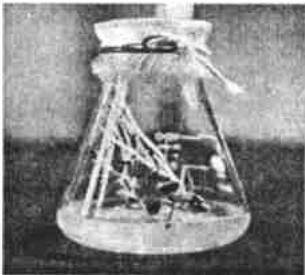
1 卡那霉素筛选



3 GUS 染色



2 卡那霉素筛选

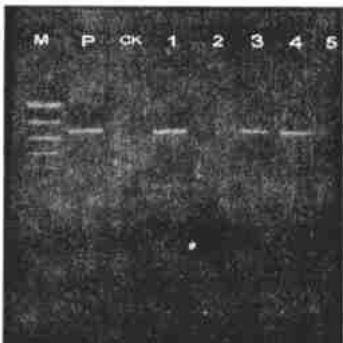


4 抗性植株



5 PCR 分析

1: Marker 2: 质粒 3: 未转化植株
9-10: PLO 转化植株 12-13: 农杆菌转化植株



6 RT-PCR 分析

M: Marker P: 质粒 CK: 未转化植株
1、3、4: 转基因植株