

Ri 质粒介导马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因 (*PVY-CP*) 转化烟草的研究

徐香玲 孟雪征 刘伟华 李集临

(哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080)

任如意

(牡丹江师范学院生物系, 牡丹江 157012)

郭亚华

(黑龙江省农业科学院园艺研究所, 哈尔滨 150069)

摘要 将已克隆在大肠杆菌中的 PBCY-401 质粒 (携带马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因 (*PVY-CP* 基因), 通过三亲杂交导入具 Ri 质粒的发根农杆菌中, 用转化子溶液感染烟草, 在 Ri 质粒介导下, 将 *PVY-CP* 基因导入烟草。首先用烟草的外植体与转化子菌液共培养法诱导毛状根, 以毛状根为外植体在含有抗生素 Km 的分化培养基上诱导愈伤组织和幼芽, 继续培养获得再生植株。再生植株经冠瘿碱、PCR、分子杂交检测, 有 20% 以上的植株表现为阳性, 证明 *PVY-CP* 基因已导入烟草。对转化烟草植株后代用斑点免疫结合法和田间接病毒法检测, 有 30% 左右的植株表现有抗性; 在烟草 8611 的 6 号转化株 36 株自交后代中有 10 株在整个生育过程中完全不发病, 证明 *PVY-CP* 基因通过有性生殖可以遗传并在后代中表达。

关键词 Ri 质粒, 转化烟草, 再生植株

中图分类号 Q37, S572

Studies of *PVY-CP* Gene into Tobacco by Binary Vector with Ri-plasmid

XU Xiangling MENG Xuezheng LIU Weihua LI Jilin

(Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150080)

REN Ruyi

(Department of Biology, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang 157012)

GUO Yahua

(Horticultural Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069)

近年来, 在植物基因工程中利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的 Ri 质粒作为转基因载体, 进行了大量的工作, 并取得很大的成效^[1~4]。Ri 质粒与 Ti 质粒相似^[5], 具 T-DNA 能插入受体植物基因组中, 在转化细胞中有转录与转译的功能。转化的再生植株可通过减数分裂稳定的将 T-DNA 及其携带的基因遗传给后代, Ri 质粒诱导的毛状根是单细胞起源的, 因此由毛状根产生的再生植株是纯合的。Ri 质粒不但可以做为二元载体, 还可以做为中间载体, 故 Ri 质粒比 Ti 质粒更有优越性。

烟草是我国重要的经济作物, 由于病毒病的危害, 已严重影响产量与质量, 特别是近年来马铃薯 Y 病毒的危害日亦严重, 在黑龙江省已成为最危险的病害。病毒的外壳蛋白, 可通过交叉保护的原理, 减少或避免有关病毒

的为害,已被大量的实践所证明。本文的目的是利用 PBCY-401 质粒上携带 *PVY-CP* 基因(马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因),通过转移载体发根农杆菌的 Ri 质粒,导入烟草,再经过检测与继代选择,选出抗 Y 病毒的烟草新品系,为烟草抗病育种开辟一条新途径。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

(1) 烟草品种: NC89、温德尔 8409、G140、8611 均引自黑龙江省烟草研究所。(2) 载体: 发根农杆菌 R1000 (PRiA4b) 带有 Ri 质粒,具 T-DNA 和 SM 抗性位点,引自日本筑波大学遗传子研究中心。(3) 诱动菌: *E. coli* HB101 具诱动 (mob) 和转移 (tra) 功能,有卡那霉素 (Km) 抗性标记,本研究室保存。(4) 供体: *E. coli* C600 具 PBCY-401 质粒,带有马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因 (*PVY-CP* 基因) 和 Km 抗性位点。引自中国科学院微生物研究所。

1.2 方法

(1) 三亲杂交: 以发根农杆菌为受体,以 HB101 为诱动菌,以 PBCY-401 为供体,通过三亲杂交将质粒 PBCY-401 导入发根农杆菌,经 Sm 和 Km 的抗性筛选,选出转化子。经受体菌、供体菌、转化子 DNA 检测,确认 PBCY-401 质粒导入发根农杆菌。培养转化子 (PRiA4b+ PBCY-401) 菌液,用于转化烟草的外植体。(2) 无菌苗的培养: 将烟草种子用 95% 乙醇消毒 1~3 分钟,再用次氯酸钠消毒 15~20 分,用无菌水冲洗 3~4 次,接种于 MS 培养基上,25℃,每天 16 小时光照,光强度为 2 000~3 000lux。(3) 接种: 取烟草无菌苗的叶片切块与转化子菌液共培养。(4) 诱导毛状根与再生植株: 感染菌液的叶片在 MS 培养基上,培养一周左右诱导出毛状根,取毛状根 1cm 左右切段,在不加激素加羧苄青霉素 Cb (500mg/L) 和 km (50mg/L) 的 MS 液体培养基上,28℃暗振荡培养或在同样成分的 MS 固体培养基上培养,转化的毛状根呈分枝状生长,对照的和未转化根不生长,将经过筛选转化的毛状根切段,在 MS+ BA (1mg/L) + NAA (0.1mg/L) 固体培养基上培养 15 天左右诱导出愈伤组织,继续培养两周,将愈伤组织转到分化培养基 (MS+ BA 2mg/L+ NAA 0.1mg/L) 上培养,从愈伤组织上长出绿色的芽点,继续培养发育成幼芽,待幼芽长到适当大小,从愈伤组织上切下,转入 1/2 MS 或 1/2 MS+ NAA 0.5mg/L 生根培养基上,经 7~12 天长出根,再将生根的再生植株移入蛭石中状苗,10 天左右即可移入花盆中栽培。

1.3 导入基因的检测

(1) 冠瘿碱的检测 取再生植株的叶或茎提取物,用纸电泳法检测是否有冠瘿碱;冠瘿碱是 Ri 质粒在真核细胞中的表达产物,如果含有冠瘿碱可证明 T-DNA 已导入受体。

(2) 外源基因的检测 用 PCR 扩增仪检测;分别提取转化植株与 PBCY-401 质粒 DNA,用合成的特异引物: 5' 特异引物: ATCCATGGGAAATGACACAATC, 3' 特异引物: GCAAGACCGCAACA。预变性: 98℃10 分,变性: 94℃1 分,复性: 53℃1 分,延伸: 72℃2.5 分,循环结束延伸 5 分,30 个循环进行 DNA 扩增,检测是否有基因的扩增产物。用 DNA 斑点分子杂交检测;分别提取转化的再生植株与质粒 DNA,用生物素标记 PBCY-401 质粒 DNA 做探针,进行 DNA 斑点分子杂交,检测是否有外源基因导入。

1.4 抗性的检测

用斑点免疫结合法进行抗性鉴定,对转化植株与自交一代植株进行斑点免疫结合检测,确认有 *PVY-CP* 基因的表达产物,证明 *PVY-CP* 基因不仅可以表达而且可以遗传。用田间病毒法进行抗性鉴定;在田间于发病期进行接毒实验,鉴定抗病能力。

2 结果与讨论

2.1 毛状根的诱导

烟草叶片切块与转化子菌液共培养 1~2 小时后, 在无激素的 MS+ Cb (500mg/L) 固体培养基上培养一周左右于切口处膨大, 2 周后产生大量的不定根, 不定根多数生长旺盛, 分枝多, 无向地性, 为典型的毛状根。不同品种诱导毛状根的频率大致相似, 为 58~74% 左右。毛状根进行 Km 抗性筛选, 有 55~64% 的毛状根具 Km 抗性, 在含 Km (100mg/L) 的无激素 MS 固体培养基上, 转化的毛状根可正常生长, 而未转化的毛状根变黄, 死亡。对具有 Km 抗性的转化根进行冠瘿碱检测, 有 70% 的转化根具有冠瘿碱, 未转化根不具冠瘿碱, 说明 Ri 质粒的 T-DNA 已整合到植物细胞的基因组中 (表 1)。

表 1 烟草叶片诱导的毛状根具 Km 抗性和冠瘿碱数

烟草品种	菌液	毛状根检测			Km 抗性检测			冠瘿碱检测		
		数	转化根数		数	抗性根数		数	含碱数%	
NC89	转化子	45	2922	64.44	29	17	58.64	14	11	78.6
	R1000	30		73.33	22	0	0			
	YEB	20	2	10.00	0	0	0			
8409	转化子	50	20	58.0	29	19	58.6	12	9	75.0
	YEB	20	3	15.0	3	0	0	0	0	0
G140	转化子	43	29	67.4	29	16	55.2	6	4	66.7
	YEB	19	2	10.5	12	0	0	0	0	0
8611	转化子	51	29	56.9	31	20	64.5	10	7	70.0
	YEB	21	3	14.2	10	0	0	0	0	0

2.2 用毛状根诱导愈伤组织和再生植株

将转化的毛状根置于 MS + BA 1mg/L + NAA 0.1mg/L 固体培养基上, 经 15 天左右诱导出愈伤组织, 继续培养, 愈伤组织上出现绿色芽点, 形成芽, 待长至适当大小时切下, 转至生根培养基, 7~12 天长出壮根, 再移入蛭石中 10 天左右移栽于花盆中。

2.3 由外植体直接诱导愈伤组织和再生植株

烟草叶片切块接种后, 置于含 Cb 和 Km 抗生素的愈伤组织诱导培养基上, 10 天左右于切口处形成愈伤组织, 待愈伤组织长至适当大小时, 转至分化培养基上培养 15~20 天, 愈伤组织上长出绿色芽点和幼芽, 待幼芽长至适当大小时切下, 转入生根培养基, 经 1~2 周长出状根成苗, 再转入蛭石中, 1 周后移入花盆中。

烟草叶片切块与转化子菌液共培养前, 先置于不加抗菌素的愈伤组织诱导培养基上预培养 10 天左右, 再转入有选择因子的诱导培养基上, 此后一直保持选择压力, 产生抗 Km 的芽数比不经过预培养产生的芽数多。

2.4 DNA 的 PCR 扩增检测

用合成的特定引物, 在 PCR 仪上扩增 *PVY-CP* 基因 DNA, 检测转化的烟草“8611”6 株, 其中有 4 株呈阳性反应, 说明 *PVY-CP* 基因已导入烟草。转化率为 66.6%。

2.5 DNA 斑点分子杂交检测

“烟草 8611”13 株转化植株, 经 DNA 斑点分子杂交检测, 有 5 株表现为阳性, 按斑点分子杂交的转化率为 38.4%。

2.6 斑点免疫结合法检测

随机检测转化植株 43 株, 有 24 株呈阳性反应, 占 55.8%, 对照植株全为阴性反应, 说明 *PVY-CP* 基因不仅整合到受体植物基因组中, 而且在蛋白质水平上得到表达。

2.7 对转化烟草植株后代的抗性检测

(1) 斑点免疫结合法检测: 对转化“烟草 8611”7号植株后代, 随机检测 20 株, 其中有 13 株呈阳性反应, 占 65%, 但斑点的颜色深浅不同, 表明 *PVY-CP* 基因的表达有差异, 对转化“烟草 8611”6号植株后代, 随机检测 20 株, 其中有 18 株呈阳性反应, 阳性植株表达亦有差异。(2) 转化烟草后代植株田间接毒检测: 对转化“烟草 8611”7号植株后代 35 株、对照 20 株, 摩擦接种 PVY 病毒, 转化烟草植株的发病时期明显晚于对照, 有的在整个生长期未发病。接种 60 天发病情况如表 2。6 号未发病的 28 株植株, 移栽中死亡 8 株, 成活后有 10 株陆续发病, 有 10 株在整个生长期未发病, 占 35.7。转基因植株叶片数多于对照, 抗 PVY 病毒病, 对未发病植株的第二代植株继续进行斑点免疫结合法和田间接毒检测, 选育抗 PVY 病毒病品系。

表 2 转化烟草“8611”7号株后代及 6号株后代的发病情况

发病情况	7号株后代 (35株)		6号株后代 (36株)	
	发病株数	%	发病株数	%
严重发病株	10	28.57	2	5.55
轻度发病株	17	48.5	6	16.6
未发病株	8	22.86	28	77.8

用 Ri 质粒介导外源基因导入受体, 易于筛选转化体, 具 Ri 质粒的发根农杆菌感染多种双子叶植物, 其特点是在感染部位能诱导产生毛状根, 毛状根是单细胞起源的, 因此, 由毛状根诱导的再生植株是纯合的, Ri 质粒的 T-DNA 上携带有激素基因, 易于再生植株。再生植株根系发达, 节间短, 幼叶有皱缩, 为转化体筛选提供了方便^[1]。据 Wei 报道^[6], 具 Ri 质粒的发根农杆菌菌液与 *Solanum nigrum* 的原生质体共培养, 由 Ri 质粒转化的组织其毒性一般低于 Ti 质粒。Ri 质粒转化的组织可产生冠瘿碱, 这种冠瘿碱在转化的愈伤组织、毛状根、再生植株中均可检测到, 所以用 Ri 质粒介导外源基因转化植物, 已日亦受到人们的重视。

经预培养的外植体细胞, 对发根农杆菌敏感, 可提高转化率, 转化的细胞易于形成毛状根、愈伤组织和再生植株, 因此, 预培养是一个值得重视的方法。预培养的时间依植物种类不同而异, Rabin 等认为颠茄的预培养时间 6 天最佳, Berthomieu^[7]等认为, 卷心菜的预培养时间 11 天最佳, Christey^[8]等认为, 白菜的预培养时间 7~10 天最佳。Nehra^[9]等认为, 草莓的预培养时间 10 天最佳。原因可能是单细胞不能抵抗抗生素的选择压力, 经预培养产生的细胞群可能比单细胞更能忍受抗生素的选择压力。本实验也看到类似的结果。

参 考 文 献

- 1 李集临, 徐香玲, 陈金山. 发根农杆菌 Ri 质粒及其应用. 生物工程进展, 1993, 14 (2): 8~14
- 2 张毅等. 植物基因工程的新载体——农杆菌 Ri 质粒. 生物工程学报, 1989, 5 (3): 173~178
- 3 徐香玲等. Ri 质粒转化番茄的初步研究. 生物技术, 1993, 1
- 4 徐香玲等. Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究. 大豆科学, 1996, 15 (4): 279~299
- 5 秦明波等. Ri 质粒基因转化植物细胞的机理. 生物工程进展, 1993, 13 (4): 41~44
- 6 Wei Hiroshi kamada *et al.* Transformatio of *Solanum nigrum* L. protoplasts by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant cell Reports, 1986, 5: 93~96
- 7 Pierre Berthomieu *et al.* Transformation of rapid cycling calbage (*Bassica deracea var capitata*) with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant cell Reports, 1992, 11: 334~338
- 8 Mary C christey *et al.* Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleyacea var acephala*.) rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris var rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated trans formation. Plant Sciences, 1992, 87: 161~169
- 9 Narender S Nehra *et al.* Genetic transformation of struberry by *Agrobacterium tumefaciens* vsing a leaf disk regeneration system. Plant Cell Repots, 1990, 9: 293~298

1997-08-16 收稿, 1997-10-15 修回.