

# 用农杆菌介导将 WCMV 基因导入白三叶的研究

赵桂琴<sup>1</sup>, Paul CHU<sup>2</sup>

(1 甘肃农业大学 草业学院, 甘肃 兰州 730070; 2 Plant Industry, CSIRO, Australia)

**摘要:**以白三叶 *Trifolium repens* L. 吸胀种子的子叶为转化体,用农杆菌介导将外源的白三叶花叶病毒外壳蛋白基因 WCMV 转入白三叶,经过筛选、分化和再生,得到了具有卡拉霉素抗性的转基因植株。对这些植株进行 PCR、Southern 和 Northern 分析,结果表明,外源目的基因已经整合到白三叶基因组中并且得到了表达。

**关键词:**白三叶花叶病毒;农杆菌;白三叶;分子检测

中图分类号:S541

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)S2-0001-04

## White clover transformation using WCMV coat protein gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHAO Gui-qin<sup>1</sup>, Paul CHU<sup>2</sup>

(1 College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;  
2 Plant Industry, CSIRO, Australia)

**Abstract:** The white clover mosaic virus coat protein gene was successfully introduced into white clover, *Trifolium repens* L., plants through their cotyledons, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic plants resistant to Kanamycin were obtained after selection, differentiation and regeneration. All of the transgenic plants were tested by PCR, Southern blot and Northern analysis, which indicated that white clover mosaic virus coat protein gene had integrated into the plant genome and got expressed.

**Key words:** white clover mosaic virus; *Agrobacterium tumefaciens*; white clover; molecular test

白三叶 *Trifolium repens* L. 是温带地区主要的多年生豆科牧草,为各种家畜所喜食,广泛分布在欧洲、美国、澳大利亚和新西兰等国家,我国西南地区也有种植。白三叶不仅是优质的饲草,更是良好的豆科草坪草,广泛用于各种类型的草坪和绿地建植,是我国北方地区主要的豆科观赏性草坪草之一。白三叶性喜温暖湿润的气候条件,它可以提高饲草品质,通过固氮每年可向草地提供丰富的氮素,其发达的匍匐茎和表型的可塑性使它成为多数混播草地和草坪的理想组分。但温暖湿润的生长条件为各种病虫害提供了滋生蔓延的机会,根结线虫、白粉病、病毒病及锈病等发生率比较高<sup>[1~3]</sup>。病毒病是除根结线

虫之外的一大病害,其中尤以白三叶花叶病毒(white clover mosaic virus, 简称 WCMV)、苜蓿花叶病毒(alalfa mosaic virus, 简称 AMV)和三叶草黄脉病毒(clover yellow vein virus, 简称 CYVV)最为猖獗<sup>[4,5]</sup>。我国白三叶花叶病毒的发病比较普遍,各地苜蓿、三叶草和豆类作物种植面积较大,为其发生提供了广泛的寄主,并以此为接种源通过蚜虫或其他途径传播而使一些对 WCMV 敏感的作物发病,暂时还没有安全有效的防治方法<sup>[6,7]</sup>。随着生物技术的发展,分子育种方兴未艾,给植物育种带来了前所未有的曙光,它能够克服种间障碍、打破生殖隔离,而且能够控制基因表达的位点和水平,大大提高了育种的准

确性和预见性。基因工程已经被证明是提高植物抗病性的一种行之有效的方法,转基因方法已被成功地用于许多病害的防治。本文拟对白三叶的转化、再生和转基因植株的分子检测进行探讨,为进一步的育种工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

白三叶花叶病毒(WCMV)是正链多分体 RNA 病毒,具有三分段基因组 RNA1、sgRNA2、sgRNA3 和 1 个编码外壳蛋白的亚基因组 RNA4。质粒由澳大利亚维多利亚农业部植物生物技术中心提供,含 CaMV35S 启动子调控的 WCMV4 外壳蛋白基因,大小

为 13 000 bp,为 *Hind* III 酶切。另外还有选择标记基因 *NPT* II,为 pNOS 启动子调控,大小为 795 bp,结构如图 1 所示<sup>[8,9]</sup>。以根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 AGL1 为载体介导转化,26~28℃条件下,在含有 50 mg/L 卡拉霉素和 20 mg/L 利福平的 MGL 培养基(5 g/L tryptone + 2.5 g/L yeast extract + 1.2 g/L L-glutamic acid + 5 g/L Mannitol + 0.25 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0.1 g/L NaCl + 0.1 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)中振荡培养过夜,次日将 1 mL 培养液接入 25 mL 含 50 mg/L 卡拉霉素和 20 mg/L 利福平的 MGL 培养基,在 26~28℃下振荡过夜,培养至对数生长期后,重新悬浮于新鲜的 MGL 培养基中,调节浓度,使  $D_{600\text{ nm}} = 0.35$ <sup>[10]</sup>。

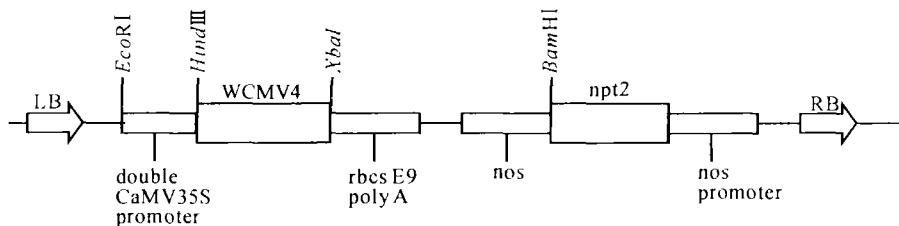


图 1 白三叶花叶病毒外壳蛋白基因 WCMV 的构建

Fig. 1 Transgenic structure of WCMV

### 1.2 植物材料

白三叶 *Trifolium repens* L. 种子先在小筛子上用自来水冲洗 5 min,再转入无菌的三角瓶中,加入 70% 的乙醇搅拌消毒 5 min,然后用 0.2% 的升汞搅拌消毒 5 min,用无菌水冲洗 8~10 次,最后加入无菌水过夜,吸胀后即可进行转化试验。

### 1.3 转化及培养方法

取吸胀的白三叶种子,在解剖镜下去掉种皮,用解剖针在子叶基部 1.5 mm 处切去上胚轴,再将 2 片子叶从基部均匀切开,一片直接置于 RM73 培养基(MS macro + MS micro + MS vitamins + 1.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 30 g/L sucrose + 8 g/L agar)上作为对照,另一片放入 96 个孔的培养板,每孔中预先注入 MGL 液体培养基。做满一板后吸出 MGL,加入  $D_{600\text{ nm}} = 0.35$  并含有 50 mg/L 卡拉霉素和 20 mg/L 利福平的菌液,轻轻震荡培养 40 min。然后吸出菌液,用无菌水冲洗子叶 2~3 次,再用无菌滤纸吸干子叶表面的水分,将子叶置于 RM73 培养基上。每片子叶的位置应与其对照相一致,便于以后比较。将对照和处理置于 25℃、每日光照 16 h 的组培室培养 3 d。第 4 d 将对照转入新鲜的 RM73 培养基继续培养,

将处理的子叶用无菌水冲洗以除去多余的细菌,用无菌滤纸吸干后置于含 50 mg/L 卡拉霉素和 250 mg/L 头孢霉素(cefotaxime)的选择性 RM73 培养基上培养,温度为 25℃、每日光照 16 h,进行转化体的筛选。每 3 周继代 1 次,继代 3 次后将再生苗转入 RIM 培养基(MS macro + MS micro + MS vitamins + 3 mg/L IBA + 15 g/L sucrose + 8 g/L agar)诱导生根,生根后 2~3 周即可移栽于温室中。

### 1.4 转化体的分子检测

1.4.1 PCR 检测 用 CTAB (cetyltriethylammonium bromide) 法提取转化后的白三叶植株基因组 DNA<sup>[9]</sup>,以此为扩增模板,用 *NPT* II 基因已知序列为引物进行 PCR 扩增,引物序列为:

Primer 1: 5'-TCGGCTATGACTGGGCACAAACAGA -3';

Primer 2: 5'-AAGAAGCCGATACAAGCCGATGCG -3'.

PCR 总反应体系 25 μL,含 1 μg 植物 DNA,1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶,2 mmol/L 的 dNTP,1 pmol/L 的引物。反应程序为:94℃预变性 4 min,94℃变性 1 min,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环后 72℃延伸 10 min。对扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖电泳进行检测。

1.4.2 Southern 印迹杂交 待 PCR 检测阳性的植株

分枝逐渐增多时,挑选幼嫩的新叶,用 CTAB 法提取植株总 DNA,用 *Hind* III 消化后,进行琼脂糖凝胶电泳。PBSDCMV4 的质粒 DNA 用 *Hind* III + *Xba* I 酶切后再用 Wizard DNA clean-up system 提取纯化,以地高辛(DIG)标记,在尼纶膜上与消化后的白三叶 DNA 进行印迹杂交,杂交温度 42 ℃,时间 12~15 h。

1.4.3 Northern 分析 采样时间与 Southern 印迹杂交相同,用 Trizol 提取转化体总 RNA, WCMV4 探针用<sup>32</sup>P 标记后与样品 RNA 在 42 ℃ 杂交 12~15 h。

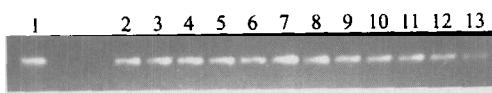
## 2 结果

### 2.1 转化体的获得

根癌农杆菌感染的白三叶外植体经共培养 3 d 后转至筛选培养基,此时子叶外植体已经膨大,1 周左右开始出现不定芽,以后再生芽丛生,长势良好。外植体在 TDZ 的作用下,再生情况非常好,再生频率达到了 98%。以后随着卡那霉素的选择作用,大多数再生芽逐渐褪绿变白,最后死亡。只有少数继续存活。对照的外植体生长良好,色泽翠绿,再生芽数量较多。将继代 3 次的外植体再生芽切下,转人生根培养基,将那些没有对应转化体的对照再生芽弃而不用,只保留成对的诱导生根。一般情况下,95% 以上的再生芽都能正常生根。统计转化率为 4%。

### 2.2 白三叶转化体的分子检测

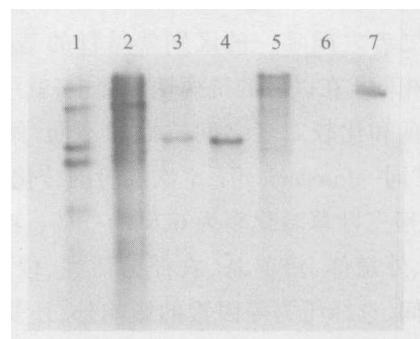
PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳后,转化体显示出约 795 bp 大小的特异带(图 2),而对照则无此带,表明外壳蛋白基因已经整合在白三叶基因组中。实验获得的 48 株转化体中有 40 株为 PCR 阳性。对所有阳性植株用 CTAB 法提取总 DNA 进行 Southern 印迹杂交,发现 WCMV 外壳蛋白基因不仅已经整合到转化体基因组中,有的还出现了多个拷贝(图 3),有个别的 PCR 阳性植株经 Southern 检测为阴性。为了进一步检测外源基因的表达情况,又对 Southern 阳性的供试材料进行了 Northern 分析,结果如图 4 所示,所有参试的 35 株转化体中,有 30 株表达了 WCMV 外壳蛋白基因。



1. 阳性对照;2~13. 样品

图 2 转基因植株的 PCR 检测

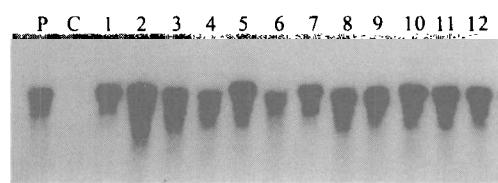
Fig. 2 PCR screening of transgenic plants.



1. 相对分子质量标记;2~5.DNA 样品;  
6. 阴性对照;7. 阳性对照

图 3 转基因植株的 Southern 印迹杂交

Fig. 3 Southern hybridization of transgenic plants



P. 阳性对照;C. 阴性对照;1~12. RNA 样品

图 4 转基因白三叶的 Northern 杂交

Fig. 4 Northern hybridization of transgenic white clover plants

## 3 讨论

白三叶花叶病毒(WCMV)具有十分广泛的寄主分布,且容易经蚜虫以非持久性方式传播,是三叶草和苜蓿属植物引起严重病毒病的主要病原,并可在烟草、辣椒、番茄和瓜类作物上引起典型病害。国内关于 WCMV 引起植物病害及防治方面的报道较少。本文用苜蓿花叶病毒外壳蛋白基因对白三叶进行了遗传转化,并对转基因植株进行了分子生物学检测。用吸胀种子的子叶作外植体再生频率非常高,平均在 98% 左右,远高于用无菌苗的下胚轴和子叶,而且不经过愈伤组织阶段,直接从子叶柄切口处产生丛生芽,大大节约了实验时间。但这种方法需要在解剖镜下用解剖针操作,比较精细,一次只能获得 200~300 个外植体;无菌苗可大量获得,下胚轴和子叶外植体一次可获得近千个,尽管再生频率较低,但总数仍比较可观,在具体使用过程中也是仁者见仁,智者见智。

由于白三叶是四倍体异花授粉植物,遗传背景复杂,品种内的差异远远大于品种间的,为了从根本上杜绝其对转基因植株性状和抗性方面的影响,本试验采用了一对一的做法,即同一个种子的 2 瓣子叶,一瓣用来做转化,另一瓣作对照。这样,经过再生

和转化后二者之间唯一的区别就是目的基因,其他条件完全相同。在以后的抗病性检测中,就可以轻而易举地发现和比较二者之间抗性的不同,做到严格意义上的“同一(isogenic)”。本次实验的转化率较高,为4%,一般三叶草转化率为0.5%~3%。转化率除受基因型、外植体、培养基、农杆菌活性、侵染时间、共培养时间、选择压力等因素的影响外,还受再生频率的影响。同等条件下,再生频率越高、单位外植体获得的再生苗越多,则转化率越高。本试验中白三叶不仅再生频率高,从侵染到获得转化体所用时间短,而且单位外植体获得的再生芽也多,平均每个外植体可产生10个左右的再生芽,大大提高了转化效率。

假阳性在PCR、Southern和Northern等分子检测中均有发现,个别PCR阳性植株经Southern检测为阴性,而有的Southern杂交阳性的植株并没有表达外源目的基因,表现出基因沉默。这在外源基因的遗传转化中比较常见,同时也反映出植物系统的复杂性<sup>[11,12]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] KALLA R, CHU P, SPANGENBERG G. Molecular Breeding of Forage Crops [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001. 219~237.
- [2] GARRETT R. Impact of viruses on pasture legume productivity [A]. Proceeding of the white clover conference [C]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991. 123~127.
- [3] TAYLOR N. Clover science and technology [M]. TAYLOR L. Clover science and technology [C]. Wisconsin: Madison Press, 1995. 34~39.
- [4] GIBSON B, COPE A. White clover [A]. TAYLOR L. Clover science and technology [C]. Wisconsin: Madison Press, 1995. 132~139.
- [5] JOHNSTONE R, CHU P. Viral disease of white clover [J]. Australian Journal of Agriculture Research. 1993, (45): 1903~1908.
- [6] MCLAUCHIN R, PEFERSON A, EVANS R. Virus disease and stand decline in a white clover pasture [J]. Plant Disease, 1992, (76): 158~162.
- [7] CARRAN J, GIBBS A. Studies on alfalfa mosaic virus and alfalfa aphids [J]. Australian Journal of Agriculture Research. 1982, (33): 657~664.
- [8] RICHARD S, FORSTER L, JONY J. Engineering for resistance to virus diseases [A]. SPANGENBERG G. Biotechnology and the improvement of forage legumes [C]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1997. 291~307.
- [9] SAMBROOK J, FRISCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M], 2nd edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 439~450.
- [10] JOHN Z, THEODORE R, OLGA D, et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights [J]. The Plant Journal, 2000, (23): 11~28.
- [11] POWELL A P, NELSON R S, de HOFFMAN B. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. Science, 1986, (233): 738~743.
- [12] 程英豪,吴光,王继伟,等.表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄抗黄瓜花叶病毒侵染 [J].植物学报,1997, 39 (1): 16~21.

【责任编辑 周志红】