

转 PRSV 复制酶基因 T₂ 代番木瓜植株的抗病性测定

阮小蕾, 李华平, 周国辉

(华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 转 PRSV 复制酶基因的番木瓜植株, 其自交及杂交二代植株经 PCR 检测和 Southern blot 杂交的结果表明: 目的基因整合在番木瓜的染色体上. 人工接种 PRSV 的 Y_s、V_b、S_m 株系于分子检测阳性的 7~8 叶期植株, 转基因植株均表现高抗. 在定植田间的 9 个月中, 转基因植株无一发病, 而对照则全部发病.

关键词: 番木瓜; 复制酶基因; 抗病性

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)04-0012-04

Evaluation of PRSV resistance of T₂ transgenic papaya with replicase gene

RUAN Xiao-lei, LI Hua-ping, ZHOU Guo-hui

(Lab of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Results from PCR and southern-blot analysis conformed that the target gene was integrated into the genome of T₂ transgenic papaya (*Carica papaya*) plants with replicase gene of papaya ringspot virus (PRSV). These transgenic papaya seedlings in 7-8 leaf stages were mechanically inoculated respectively with three severe strains of PRSV in South China. They showed a high resistant to all strains of PRSV. By transplanting these seedlings to field, no any symptom appeared in these transgenic plants during 9 months. On the contrary, the control plants showed very severe symptoms.

Key words: *Carica papaya*; replicase gene; resistance

番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus, PRSV)是番木瓜 *Carica papaya* 生产上的主要限制性因素. 常规栽培种中没有理想抗源. 野生种中的抗性基因往往与不良基因紧密连锁及杂交不亲和, 使得对其的利用至今不能成功^[1]. 华南农业大学植物病毒研究室通过将 PRSV-Y_s株系的复制酶基因(Replicase, rep)导入番木瓜, 获得了转基因 T₀ 植株. 其自交后代 T₁ 与番木瓜本地品种台 5 的杂交组合: 台 5×T₁ 植株经过 PCR 检测, Southern-blot 杂交, 阳性株在苗期和田间均高抗 PRSV^[2]. 本文报道了 T₁ 的自交后代 T₂ 及 T₂ 与常规感病品种杂交组合的重组自交系的苗期和田间抗病性的结果.

1 材料与方法

1.1 材料

转基因 T₂ 番木瓜植株: T₀ 植株的自交后代为

T₁, T₁ 的自交后代即 T₂, T₂ 的 3 个自交系分别为 T₂-6、T₂-7 和 T₂-11; 重组自交系番木瓜植株: 2 个 T₁ 与番木瓜本地品种台 5 的杂交组合的自交后代分别为 (台 5×T₂)₋₁₂ 和 (台 5×T₂)₋₁₇; 供试常规番木瓜品种: “穗中红”购自广州河南园艺场; “台 5”、“红妃”等由华南农业大学植物病毒研究室提供; 西葫芦 *Cucurbita pepo* 种子购自陕西省阳干县种子公司.

供试病毒: PRSV 的 Y_s、V_b、S_m 株系均由华南农业大学植物病毒研究室分离、鉴定和保存.

主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Tris 碱购自上海生工生物工程有限公司, BamHI 和 DL 2000 marker 购自广州宝泰克生物有限公司, 同位素购自北京亚辉生物医学公司, Southern 杂交膜购自 Pharmacia 公司, 其他常规试剂购自广州化学试剂厂及上海化学试剂一厂.

引物合成: PRSV-Y_s 的 rep 基因特异 PCR 扩增引物, 由上海生工生物工程公司合成. 引物序列为:

P1 5'-ATA CCA ATG GTG ATG ATC TC-3'
 P2 5'-TTA CTT AGA CTG GTG AAA CA-3'

1.2 T₂ 与重组自交系植株的 PCR 检测

采用常规 CTAB 法^[3]进行 DNA 提取. 进行 PCR 时, 反应体系为 25 μ L, 含模板 DNA 10 ~ 50 ng, 10 \times buffer 2.5 μ L, 100 mmol/L dNTPs 0.25 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 2.5 μ L, 引物 P1 和 P2 各 1 μ L (均为 50 pmol/ μ L), 用 ddH₂O 补足体系至 25 μ L. 混匀, 置于 UNO II 型热循环仪(德国 Biometra 公司)中. 94 $^{\circ}$ C 下预变性 4 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 55 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min; 后 3 步反应进行 35 个循环之后, 72 $^{\circ}$ C 下保温 10 min. 取扩增样本 10 μ L, 点入含 12 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/ μ L EB)上样孔中, 以 DL 2000 marker 为分子量标准, 用 0.5 \times TBE 缓冲液在 5 V/cm 电场强度下电泳约 1 h, 于 UVP 凝胶成像系统(美国 Ultra-violate 公司)观察照相.

1.3 PCR 产物的序列测定

取上述 PCR 产物约 50 ng, 用 1.1 中的引物从两端进行序列测定. 序列测定由上海生工生物工程有限公司完成. 将测序所得的序列在 Genbank 中查询, 比较它与 PRSV 复制酶基因序列的异同.

1.4 PCR 检测阳性株的 Southern-blot 杂交

1.4.1 DNA 探针的制备 取经 PCR 检测呈阳性的产物 250 μ L, 加入 1/10 体积的 NaAc, 2 倍的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置 1 h 以上, 11 000 g 离心 15 min (Hetaeus labfuge 400T 型冷冻高速离心机, 德国 Hetaeus labfuge 公司), 去上清, 加入 ddH₂O 定容至 20 μ L, 使之溶解, 为探针模板.

用随机引物法^[2]制备探针, 反应体系为 25 μ L. 取 4 μ L 探针模板(约 50 ng), 加入 20 μ L 随机引物, 94 $^{\circ}$ C 下变性 2 min, 放入冰浴中冷却 2 min, 加入 LS 12 μ L, Klenow 聚合酶 2 μ L, 4 μ L α -³²P-dCTP (3.7 \times 10⁵ Bq/ μ L) 37 $^{\circ}$ C 下反应 1~3 h.

1.4.2 基因组总 DNA 的酶切 PCR 检测阳性植株的 DNA 进行酶切. 酶切反应为 50 μ L, 内含 10 μ g 纯化的基因组总 DNA、酶切缓冲液、BamHI 40 U. 于 37 $^{\circ}$ C 下反应过夜. 反应结束后将反应物点入含 8 g/L 琼脂糖凝胶上样孔中, 在 1~2 V/cm 的电场强度下电泳 8~10 h, 检查酶切效果.

1.4.3 Southern-blot 杂交 将酶切产物按常规毛细管转移法从 8 g/L 的琼脂糖中转移到杂交膜上, 放入微波炉中小火干燥 3 min. 用杂交缓冲液 65 $^{\circ}$ C 下预杂交 3 h, 65 $^{\circ}$ C 下杂交过夜(14~16 h). 待杂交结束后, 将杂交膜压入磷屏, 过夜(10 h 以上), 于 FX 磷屏增感仪(美国 Bio-Rad 公司)上观察杂交结果.

1.5 分子检测阳性的 T₂ 与重组自交系植株的苗期抗性测定

取 7~8 叶期的 T₂ 3 个自交系 T₂-6、T₂-7 和 T₂-11 与 2 个重组自交系(台 5 \times T₂)₋₁₂和(台 5 \times T₂)₋₁₇的分子检测呈阳性的植株, 于无虫网室内以常规机械摩擦的方法分别接种 PRSV 的 Y_s、V_b、S_m 株系, 5 d 后进行第 2 次接种. 40 d 后统计其发病率及症状始发期. 以“穗中红”作对照. 取接种 40 d 后植株的叶片回接西葫芦, 观察症状的出现.

1.6 分子检测阳性的 T₂ 与重组自交系植株的田间抗病性测定

取接种后未出现任何症状的 T₂-6、T₂-7、T₂-11 和(台 5 \times T₂)₋₁₂与(台 5 \times T₂)₋₁₇分子检测阳性株定植于田间, 以“穗中红”、“台 5”和“红妃”等多种常规品种(系)为对照. 按月统计其病情指数.

2 结果与分析

2.1 T₂ 与重组自交系植株的 PCR 检测

在检测的 30 株 T₂-6、25 株 T₂-7 和 35 株 T₂-11 中, 分别有 23、18、25 株能特异性扩增出分子量约 460 bp 的条带, 而相应的 7、7、10 株不能扩增出任何条带; 在各 30 株的(台 5 \times T₂)₋₁₂和(台 5 \times T₂)₋₁₇的检测中, 分别有 21、23 株可特异性扩增出分子量约 560 bp 的条带, 各有 9、7 株不能扩增出任何条带. 部分阳性植株的 PCR 检测结果见图 1. 对阳性比例进行 χ^2 检测表明: 不论是自交系还是重组自交系, Rep 基因的分离比均符合 3:1 孟德尔分离规律(表 1). 这表明 Rep 基因在植物染色体上是单拷贝插入, 而且单拷贝基因在后代中分离.



1. 阳性对照; 2. DL2000 DNA marker; 3~5. 部分转基因 T₂ 阳性植株; 6~8. (台 5 \times T₂) 阳性植株; 9. 阴性对照

1. positive control; 2. DL2000 DNA marker; 3~5. some T₂ positive plants; 6~8. some (Tai 5 \times T₂) positive plants; 9. negative control

图 1 转基因 T₂ 与(台 5 \times T₂) 植株的 PCR 检测

Fig. 1 Detection of replicase gene in T₂ and (Tai 5 \times T₂) plants by PCR

2.2 PCR 产物测序后在 Genbank 中的查询

为了确证所扩增的条带为专业化的 PRSV 产物

表 1 转基因 T₂ 与(台 5× T₂) 植株阳性检出率

Tab. 1 PCR positive ratio of T₂ and(Tai 5× T₂) plants

株系 lines	检测总株数 number	阳性株数 positive number	阳性检出率 ¹⁾ χ^2 test
T ₂ -6	30	23	0 *
T ₂ -7	25	18	0.013 *
T ₂ -11	35	25	0.086 *
(台 5× T ₂) ₋₁₂	30	21	0.711 *
(台 5× T ₂) ₋₁₇	30	23	0 *

1) $v=1$ 时, $\chi^2_{0.05}=3.84$ * 表示阳性检出率显著符合预期的阳性检出率

片段,进行了 PCR 产物的核苷酸序列分析. 所测定的约 460 个碱基序列,经 Genbank 查询,与 PRSV-Y_s 复制酶基因的同源率为 100%. 这表明 PCR 扩增的片段是 PRSV 复制酶基因的一部分.

2.3 T₂ 植株的 Southern-blot 杂交

分别取 PCR 检测阳性的转基因 T₂-6、T₂-7、T₂-11、(台 5× T₂)₋₁₂、(台 5× T₂)₋₁₇ 植株以及转基因阴性株的基因组 DNA 进行纯化后,用 BamHI 酶切, Southern-blot 分析,结果(图 2)表明:所有 PCR 检测阳性植株均有杂交信号出现,而阴性植株没有信号出现;而且其单酶切的杂交信号只有 1 条. 这证明 rep 基因整合在转基因 T₂ 代各株系的基因组上,并且整合的拷贝数为 1 个.

表 2 T₂ 与(台 5× T₂) 植株苗期接种 PRSV 各株系的发病情况¹⁾

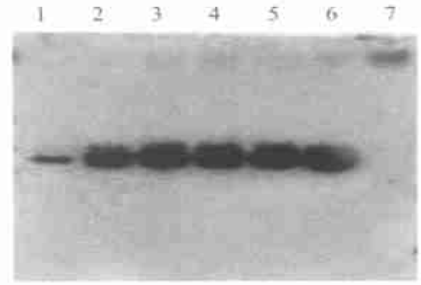
Tab. 2 Plant with symptom after inoculation

株系 lines ²⁾	Y _s		V _b		S _m	
	发病率 disease percentage/ %	始发病期 disease date/ d	发病率 disease percentage/ %	始发病期 disease date/ d	发病率 disease percentage/ %	始发病期 disease date/ d
T ₂ -6 阳	0	0	0	0	0	0
T ₂ -7 阳	0	0	0	0	0	0
T ₂ -11 阳	0	0	0	0	0	0
(台 5× T ₂) ₋₁₂ 阳	0	0	0	0	0	0
(台 5× T ₂) ₋₁₇ 阳	0	0	0	0	0	0
T ₂ 阴	93	12	100	13	100	10
穗中红	100	10	70	15	100	8

1) 空白项表示植株数量少,未做此项实验; 2) 阳:PCR 检测阳性; 阴:PCR 检测阴性

2.5 分子检测阳性的 T₂ 与重组自交系植株的田间抗病性测定

将经分子检测的 T₂-6、T₂-11 与重组自交系(台 5× T)₂₋₁₂、(台 5× T)₂₋₁₇ 的植株定植于田间,以本地常规品系“穗中红”、“台 5”和“红妃”作为对照,按月调查其病情的发展状况,计算其病情指数. 结果见表 3. 从表 3 可以看出,转基因 T₂ 与重组自交系植株在定植的 9 个月内均高抗 PRSV,无任何症状出现. 作为对照的转基因 T₂ 阴性植株,从定植的第 2 个月开始就



1、2 T₂-6 3、T₂-7; 4. T₂-11; 5. (台 5× T₂)₋₁₂(Tai 5× T₂)₋₁₂; 6. (台 5× T₂)₋₁₇(Tai 5× T₂)₋₁₇; 7. 转基因 T₂ PCR 阴性植株 PCR negative plant of T₂

图 2 转基因 T₂ 与(台 5× T₂) 植株基因组 DNA 的 Southern-blot 分析

Fig. 2 Southern-blot analysis of transgenic T₂ and(Tai 5× T₂) plant

2.4 分子检测阳性的 T₂ 与重组自交系植株的苗期抗病性测定

从表 2 可以看出,所有转基因植株在接种后都高抗 PRSV 各株系. 作为对照的“穗中红”和转基因分子检测阴性植株,接种 PRSV 3 个株系后均表现症状,其发病率和症状始发期随病毒株系不同而不同. 将接种后的新生叶片回接西葫芦,结果显示:在番木瓜上表现症状的叶片含有 PRSV 病毒,能使西葫芦发病;而在番木瓜上未显症状的植株则不能使西葫芦发病. 这初步表明:未显症的植株不含有 PRSV 病毒.

陆续出现症状,4 个月后全部发病. 本地常规品系“穗中红”、“台 5”与“红妃”均为感病品种,在定植期间全部发病,且病情严重.

3 讨论

关于番木瓜的转基因研究最早见于夏威夷大学和康乃尔大学的工作. 他们通过将 PRSV 夏威夷株系的衣壳蛋白(coat protein, CP)基因导入番木瓜,获得了高抗 PRSV 的转基因番木瓜品系,可在定植田间

表 3 定植田间的 T₂ 与(台 5× T₂) 植株的病情指数
Tab. 3 Disease index of T₂ and(Tai 5× T₂) plants in the field

株系 lines ¹⁾	日期 date								
	0430	0607	0630	0728	0905	1002	1030	1130	1230
T ₂ -6 阳	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T ₂ -11 阳	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(台 5× T ₂)- ₁₂ 阳	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(台 5× T ₂)- ₁₇ 阳	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T ₂ 阴	0	4	57	57	100	100	100	100	100
穗中红	0	10	50	100	100	100	100	100	100
台 5	0	13	20	25	100	100	100	100	100
红妃	0	22	22	56	100	100	100	100	100

1) 阳: PCR 检测阳性; 阴: PCR 检测阴性

的 2 年内无症状出现^[3,4]。但在随后的研究表明, 这些转基因番木瓜只高抗 PRSV 本地的夏威夷株系, 而对于来自于世界其他国家和地区的 PRSV 株系与分离物则抗性减弱或根本不抗, 具有很强的株系专化性抗性^[5]。周鹏等^[6,7]测定了转 PRSV CP 单价基因及转 CP 和核酸酶 SN 融合基因番木瓜相关基因的表达量与抗病能力的关系, 发现二者呈正相关。

本试验室通过 PRSV 复制酶(rep)基因的转化获得了转基因植株。对转基因 T₁ 植株进行 PCR, 单酶切后 Southern-blot 杂交, 其结果表明 rep 基因为单拷贝插入, 并且已整合到番木瓜染色体上^[2]。对 T₂ 的植株群体进行 PCR 检测, 发现 rep 基因的阳性检出率为 3%。单酶切后 Southern-blot 杂交的结果更进一步表明: rep 基因是单拷贝插入, 并能从 T₁ 稳定遗传到 T₂。由于 rep 基因仍在 T₂ 代群体中分离, 因而这些植株仍是转基因杂合体, 进一步的基因纯合体的筛选正在进行中。

对转 rep 基因的 T₁ 和 T₂ 植株的苗期与田间抗性测定结果表明, T₁、T₂ 植株在苗期均高抗 PRSV 的 Y_s、V_b、S_m 株系。T₁ 已定植田间 2 年, 未出现任何症状; T₂ 定植田间 1 年, 均高抗 PRSV, 甚至达到免疫。

目前的研究结果认为: 复制酶介导的抗病性主要是通过转录后基因沉默来实现的。这种抗性一般表现为高抗, 但抗性谱较窄。Tobacco Mosaic Virus、Potato Virus X、Cucumber Mosaic Virus 等病毒复制酶基因介导的抗病性具有明显的株系专化性^[18-19]。但经过修饰的 TMV 相对分子质量 183 000 的复制酶基因则可介导较为广谱的抗病性^[11]。我们的研究结果显示: PISV-Y_s 株系的 rep 基因可介导相对广谱的抗性。从目前的试验结果看, 至少抗性来源于广东、广西的 Y_s、V_b、S_m 株系。更进一步的工作, 如纯合体的筛选、抗性谱及抗性机制的研究正在进行中。

参考文献:

[1] MANSHARDT R M, WENSLAFF T F. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species[J]. J Am Soc Hortic, 1989, 114: 689-694.

[2] 阮小蕾, 周国辉, 李华平等. 转 PRSV 复制酶基因番木瓜的抗病性测定[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(增刊): 218-222.

[3] FITCH M M, MANSHARDT M R, GONSALVES D, et al. Transgenic papaya plants from agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos[J]. Plant Cell Report, 1993, 12: 245-249.

[4] SUWENZA L, RICHARD M M, MUREEN M M, et al. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus[J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 161-166.

[5] TENNANT P F, GONSALVES C, LING K S, et al. Different protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya[J]. Phytopathology, 1994, 84: 1359-1366.

[6] 周鹏, 郑学勤. PRSV-CP-SN 转基因番木瓜表达与抗病能力的研究[J]. 热带作物学报, 1996, 17(2): 84-87.

[7] 周鹏, 郑学勤. PRSV-CP 转基因番木瓜表达与抗病能力关系的研究[J]. 热带作物学报, 1996, 17(2): 77-83.

[8] GOLEMBOSKI D B, LOMONOSSOFF G P, ZAITLIN M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6311-6315.

[9] BRAUN C J, HEMENWAY C L. Expression of amino-terminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection[J]. The Plant Cell, 1992, 4: 735-744.

[10] ANDERSON J M, PALUKAITIS P, ZAITLIN M. A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 8759-8763.

[11] DONSON J. Broad resistance to tobamoviruses mediated by a modified TMV replicase transgene[J]. Molec Plant-Microbe Interact, 1993, 6: 635-642.