

文章编号:1001-1498(2016)02-0234-04

大花蕙兰转齿兰环斑病毒外壳蛋白基因及检测

彭 博¹, 魏 莉², 杨 凯^{3*}, 李潞滨^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091;

2. 邯郸市环境监测中心站, 河北 邯郸 056002; 3. 北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: [目的] 通过植物转基因技术获得抗病毒大花蕙兰种质资源, 优化转化体系和鉴定方法。 [方法] 本研究克隆了齿兰环斑病毒外壳蛋白基因, 并构建了该基因的 pBI121 表达载体, 用根癌农杆菌介导法转化大花蕙兰, 尝试以巢式 PCR 方法检测转基因再生植株。 [结果] 优化了大花蕙兰遗传转化体系, 建立了利用巢式 PCR 技术检测转基因大花蕙兰植株的方法, 获得了 32 株转基因株(系)。 [结论] 优化了以类原球茎为外植体的农杆菌介导转化大花蕙兰的方法, 确定以 5%~10% 类原球茎存活时的抗生素(卡那霉素)浓度为筛选浓度; 获得了转 ORSV CP 基因大花蕙兰植株; 对大花蕙兰转基因植株检测时, 巢式 PCR 较普通 PCR 更灵敏、准确。

关键词: 大花蕙兰; 齿兰环斑病毒; 外壳蛋白基因; 转基因; 巢式 PCR

中图分类号: S432

文献标识码: A

Genetic Transformation and Detection of the *Cymbidium hybridum* Modified by Coat Protein Gene of ORSV

PENG Bo¹, WEI Li², YANG Kai³, LI Lu-bin¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Environmental Monitoring Center of Handan, Handan 056002, Hebei, China; 3. Beijing Key laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: [Objective] To optimize the transformation system and identification methods for obtaining the germplasm resources of anti-virus *Cymbidium hybridum* by plant transgenic technology. [Method] The coat protein gene (CP) of ORSV was cloned from the cDNA of infected *C. hybridum*. After sequencing, the gene was constructed into pBI121 expression vector and transformed to the protocorm-like bodies (PLBs) of *C. hybridum* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. [Result] The genetic transformation system was optimized and the identification method of the transgenic plants was established by nest polymerase-chain-reaction (Nest-PCR). There were 32 transgenic plants of *C. hybridum* detected by Nest-PCR. [Conclusion] The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method of *C. hybridum* was optimized using PLBs as explants. The antibiotics (kanamycin) screening concentration was determined as 5% to 10% PLBs survival rate. Using the Nest-PCR to detected the transgenic plants was more sensitive and accurate than conventional PCR.

Key words: *Cymbidium hybridum*; *Odontoglossum ringspot virus*; coat protein gene; transgenic; Nest-PCR

大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 是以兰科兰属植物为亲本, 通过杂交育种培育形成的品种群, 为五

大盆栽兰花^[1]和重要的切花种类之一^[2]。世界兰花花卉的栽培和生产受病毒危害相当严重, 其中, 齿兰

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: 中国特色花卉种业关键技术研究(2012BAD01B07)

作者简介: 彭 博(1988—), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生。主要研究方向: 园林植物与观赏园艺。E-mail: pengbo0621@163.com

* 通讯作者: 李潞滨, 博士生导师, 研究员。主要研究方向: 园林植物与观赏园艺。E-mail: lilubin@126.com; 杨凯, 博士, 副教授。主要研究方向: 植物分子生物学。E-mail: yangkai8978@126.com

环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)是分布最广、危害最严重的病毒之一^[3-4],可导致植株生长不良,花期缩短,开花质量和数量下降^[5],严重影响花卉的观赏价值,制约了产业的发展。目前,国内外尚无抗该病毒的兰花资源和有效防治药剂。生产上采用的主要手段是茎尖脱毒技术,但存在脱毒率低、易重新感染等缺点。由于兰花抗病毒种质资源的匮乏,育种周期漫长,导致兰花抗病毒育种一直处于停滞状态,基因工程技术的应用为其开辟了一条新的道路。

近年来,随着植物分子病理学的发展,根据病毒的交叉保护机制,在烟草(*Nicotiana tabacum* Linn.)等多种植物中将病毒外壳蛋白基因转入植物基因组并使其成功获得病毒抗性^[6-8]。兰科植物的抗病毒研究也有报道,但大花蕙兰的相关研究则较少。转基因技术不仅可用于兰花抗病毒种质创新,为杂交育种提供种质资源;还可用于兰花品种改良,使改良品种更具有市场竞争力,提高其商业价值,是培育兰花抗病毒品种的有效方法和技术。本研究在克隆ORSV病毒外壳蛋白(coat protein, CP)基因的基础上,采用农杆菌介导方式转化大花蕙兰,获得大花蕙兰转ORSV病毒外壳蛋白基因植株,为兰花转基因抗病育种提供重要的技术参考,并创制了新的兰花抗病毒种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

大花蕙兰品种(*Cymbidium* sp.)类原球茎由中国林业科学研究院林业所花卉中心提供。

类原球茎增殖和分化采用附加不同浓度植物激素的MS改良培养基。

于中国林业科学研究院实验温室采集感染齿兰环斑病毒(ORSV)的大花蕙兰幼叶,于-80℃保存备用。

农杆菌菌株LBA4404由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 ORSV病毒外壳蛋白基因的克隆 采用Trizol法提取总RNA^[9];按Promega试剂盒说明书合成cDNA的第一链。根据GenBank齿兰环斑病毒外壳蛋白基因序列(DQ915440.1)和pBI121载体序列(AF485783.1)设计引物,正、反向引物中分别引入载体构建酶切位点*Bam*H I和*Sma* I,引物序列见表1。

以上述合成的cDNA第一链为模板,PCR扩增

ORSV CP基因,反应体系:模板DNA 50 ng, 10×PCR Buffer 2.5 μL, Primer-F (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, Primer-R (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 1.5 μL, rTaq 酶 0.2 μL, ddH₂O 补足至25 μL。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃ 30 s, (Tm-4)℃ 30 s, 72℃ 45 s, 30个循环;72℃延伸10 min。根据TakaRa公司pMD-18T试剂盒说明克隆PCR产物,挑取单菌落用分步酶切连接的方法构建pBI121-ORSV CP表达载体。经测序检验正确后,转化农杆菌LBA4404。

1.2.2 农杆菌介导的大花蕙兰遗传转化

1.2.2.1 选择培养基抗生素筛选浓度的确定 以继代培养30 d的大花蕙兰类原球茎为材料,在超净台中,按其生长方式用镊子分离,接种于卡那霉素浓度分别为0.0、12.5、25.0、37.5、50.0 mg·L⁻¹的选择培养基中,每个浓度接种60个类原球茎。于(25±1)℃,光强1 200~1 500 lx,光周期14 h·d⁻¹条件下,筛选培养90 d,统计类原球茎的存活率,确定卡那霉素筛选浓度。

1.2.2.2 大花蕙兰的转化 挑取含有植物表达载体pBI121-ORSV CP的农杆菌LBA4404单菌落,接种于YEB液体培养基中,28℃ 220 r·min⁻¹振荡培养至对数期;离心收集菌体,然后用1/2 MS液体培养基重悬菌体,使菌液的OD₆₀₀=0.15,以备侵染使用。用农杆菌LBA4404侵染继代培养30 d的大花蕙兰类原球茎。将生长状态良好的类原球茎在农杆菌菌液中浸泡25 min,用无菌滤纸吸干类原球茎上的菌液,转入共培养基培养基,26℃暗培养5 d后转接到选择培养基中培养^[9];90 d后,将再生的类原球茎单独转接到分化培养基中培养成株。于温室中开盖炼苗3~5 d后移植,温室中高温为25~28℃,低温为15~18℃。

1.2.3 转基因植株的鉴定

1.2.3.1 普通PCR 正、反向引物分别设计在载体的CaMV35S启动子和ORSV CP基因内部,引物序列见表1。普通PCR扩增体系、程序如1.2.1,扩增产物电泳检测并测序。

1.2.3.2 巢式PCR 在CaMV35S启动子和目的基因区域分别设计一组内、外2条特异性的引物,引物序列见表1。以外侧引物(35S₂₁₃-F/ORSV₃₃₂-R)进行第1步巢式PCR扩增,取1 μL扩增产物作为模板,以内侧引物(35S₃₃₀-F/ORSV₁₉₃-R)进行第2步PCR扩增,反应体系、程序参照1.2.1所述方法,扩增产物电泳检测并测序。

表1 引物序列

PCR 方法	引物编号	引物序列	退火温度/°C
CP 基因克隆 PCR	ORSV ₁ -F-BamH I	5'-CTGGCTCCATGCTTACACTATTACAGAC-3'	56
	ORSV ₄₇₇ -R-Sma I	5'-CTCCCGGTTAGGAAGAGGTCCAAGTAA-3'	56
普通 PCR	35S ₆₉₇ -F	5'-AGACGTTCCAACCACGTCTT-3'	60
	ORSV ₄₅₇ -R	5'-AGTCCAGACATCGTCTCAAAT-3'	60
巢式 PCR	35S ₂₁₃ -F	5'-CCAGTATGGACGATTCAAGG-3'	60
	35S ₃₃₀ -F	5'-GACCTAACAGAACTCGCCGT-3'	62
	ORSV ₁₉₃ -R	5'-CAGGGAACCTACTGGTCAAAG-3'	64
	ORSV ₃₃₂ -R	5'-CATCTAATGTTTCCTAGTTGT-3'	60

注:表中F表示正向引物,R表示反向引物;脚标数字为引物在基因中的碱基位置;下划线处为酶切位点。

1.2.3.3 2种PCR方法的灵敏度检测 将初始浓度为 $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的pBI121-_{ORSV} CP质粒依10倍稀释,得到 $1.0\times 10^{-1}\sim 1.0\times 10^{-12}$ 共12个稀释梯度,取 $1\ \mu\text{L}$ 各稀释梯度的质粒为模板进行检测,扩增、检测方法如上述。

1.2.3.4 转基因植株基因组DNA提取 采集温室栽培3a的转基因大花蕙兰嫩叶,用CTAB法提取基因组DNA^[10], -20°C 保存备用。

1.2.3.5 转基因大花蕙兰PCR产物的测序 以转基因大花蕙兰基因组DNA为模板,用普通PCR和巢式PCR进行扩增检验,PCR产物经电泳检测后,由北京宝锐通生物科技公司进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 ORSV病毒外壳蛋白基因的克隆及工程菌的获得

以染毒大花蕙兰叶片反转录cDNA为模板进行PCR扩增,获得的扩增产物经纯化、克隆后测序。测序结果表明:片段长477 bp,经Blast比对分析,与GenBank中的齿兰环斑病毒外壳蛋白基因序列(DQ915440.1)的相似性为99%,可确定扩增产物为目的基因。

目的基因经酶切、连接得到重组植物表达载体pBI121-_{ORSV} CP,经测序验证后,转化农杆菌LBA4404获得转基因工程菌。

2.2 农杆菌介导转化大花蕙兰

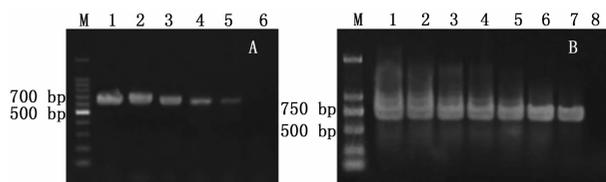
2.2.1 选择培养基抗生素筛选浓度的确定 经统计,接种于卡那霉素浓度为0.0、12.5、25.0、37.5、50.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的类原球茎存活率分别为100.0%、85.3%、7.6%、0.0%、0.0%。将存活率为5%~10%的卡那霉素浓度确定为筛选浓度($25.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2.2 ORSV CP基因的农杆菌介导转化 用农杆菌介导法转化大花蕙兰类原球茎,经暗培养后转入含有 $25.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素和 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cef的选择

培养基。经过90 d筛选培养,将每一再生类原球茎单独转入分化培养基,培养成苗。共转化类原球茎780个,出苗174株(系),植株转化率为22.3%。

2.3 检验方法灵敏度的检测

将pBI121-_{ORSV} CP质粒模板按 $1.0\times 10^{-1}\sim 1.0\times 10^{-12}$ 的稀释梯度进行稀释,用普通PCR和巢式PCR检验。发现普通PCR最低可检测出 1.0×10^{-5} 稀释梯度的质粒模板,扩增产物电泳检测条带亮度随模板稀释度的降低而降低,质粒模板的普通PCR最低检出限为 $5.0\times 10^{-4}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。巢式PCR检测时,稀释梯度为 1.0×10^{-9} 的质粒模板未扩增出条带,巢式PCR最低检出限为 $5.0\times 10^{-7}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,如图1所示。

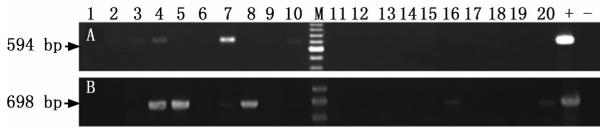


A:质粒pBI121-_{ORSV} CP的PCR灵敏性检测;B:质粒pBI121-_{ORSV} CP的巢式PCR灵敏性检测。图A中M:100 bp Ladder;1~6为质粒pBI121-_{ORSV} CP的稀释梯度,依次为 $1.0\times 10^{-1}\sim 1.0\times 10^{-6}$;图B中M:DL2000;1~8为质粒pBI121-_{ORSV} CP的稀释梯度,依次为 $1.0\times 10^{-2}\sim 1.0\times 10^{-9}$

图1 普通PCR与巢式PCR的灵敏性比较

2.4 转基因植株的检测

转基因大花蕙兰植株瓶苗经壮苗后移植至温室,3a后对存活的154株转基因大花蕙兰株(系)进行检测,普通PCR的扩增片段经测序检验序列正确,序列长度为594 bp,共检测出阳性的转基因株(系)15株,阳性检出率为9.74%;Nest-PCR的扩增片段经测序检验序列正确,序列长度为698 bp,共检测出32株阳性转基因株(系),其中包括所有普通PCR检测为阳性的株(系),阳性检出率为20.78%(图2)。



A:转 ORSV CP 基因大花蕙兰植株普通 PCR 鉴定;B:转 ORSV CP 基因大花蕙兰植株巢式 PCR 鉴定。A、B:1~20 为转 ORSV CP 基因大花蕙兰植株样品;M:100 bp Ladder

图2 转基因大花蕙兰的普通 PCR 与巢式 PCR 鉴定

3 讨论

在兰科植物中,利用病毒外壳蛋白基因介导的抗病毒研究已有报道。2004年,台湾 Liao 等^[11]和 Chan 等^[12]将 CymMV CP 基因转入蝴蝶兰中得到抗病性的蝴蝶兰植株,并初步证明其抗病性是由 siRNA 介导的;而在大花蕙兰中进行的病毒外壳蛋白基因介导的抗病毒研究少有报道。本研究在克隆 ORSV CP 基因的基础上,利用农杆菌介导转化大花蕙兰。据本课题组相关研究发现,转基因兰花中以类原球茎为外植体,以半致死量抗生素浓度筛选获得再生植株,由于类原球茎自身结构和分化特征导致嵌合体过多,阳性的转基因幼苗(瓶苗)在养育2~3a后再检验时多为阴性(另文发表),致使转基因兰花工作在养育转基因幼苗和再检测上投入的精力很大,使转基因兰花种质创新周期延长、效率降低。为解决这一问题,本课题组在2010年开始选用全致死量抗生素浓度为选择培养浓度,虽然一定程度上减少了嵌合体的数量,但得到的抗性材料较少。经过摸索,目前选用类原球茎存活率为5%~10%时的抗生素筛选浓度(25.0 mg·L⁻¹),得到了合适的共培养时间与分化培养基;3a后获得的转基因大花蕙兰植株株(系)中约有20%为阳性转基因株(系)。

由于转病毒 CP 基因植株和被该病毒侵染的植株体内都存在病毒 CP 基因,均可用基于 PCR 技术的方法检验病毒外壳蛋白基因,所以检测转基因植株时必需确定目的基因是人为转入而非病毒侵染所致。本研究设计检测引物时将 PCR 正向引物设计在载体 CaMV35S 启动子区域内,并将反向引物设计在目的基因区域内,排除了病毒侵染致使植物体内存在病毒 CP 基因而产生的假阳性,确保了检测得到的阳性植株为转 CP 基因植株。此外,对普通 PCR 和巢式 PCR 灵敏度进行了比较,巢式 PCR 灵敏度比普通 PCR 高1000倍。巢式 PCR 通过2套引物对有限的 DNA 模板进行2轮 PCR 扩增,能够很大程度地提高对靶 DNA 的特异性和灵敏度,降低了扩增出错误片段的比例^[13-15],减少假阳性的出现,其灵敏

度和特异性均高于普通 PCR。

4 结论

本研究优化了以类原球茎为外植体的农杆菌介导转化大花蕙兰的方法,确定以5%~10%类原球茎存活时的抗生素(卡那霉素)浓度为筛选浓度;获得了转 ORSV CP 基因大花蕙兰植株;对大花蕙兰转基因植株检测时,巢式 PCR 比普通 PCR 更灵敏、准确。本研究为大花蕙兰转基因的研究提供了必要的技术准备和尝试,为今后的工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社,1994:10-16.
- [2] 吴应祥. 中国兰花[M]. 北京:中国林业出版社,1991:141.
- [3] Hu J S, Ferreira S, Wang M, et al. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and *potyviruses* infecting orchids in Hawaii [J]. *Plant Disease*, 1993, 77(5):464-468.
- [4] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C, et al. Viruses of orchids and their control [J]. *Plant Disease*, 1990, 74(9):621-626.
- [5] 肖火根,郑冠标,张曙光,等. 广东兰花病毒病的鉴定和检测研究[J]. 华南农业大学学报,1996,17(1):21-24.
- [6] Powell A P, Nelson R S, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the *tobacco mosaic virus* coat protein gene [J]. *Science*, 1986, 232:738-743.
- [7] Rubino L, Capriotti G. Resistance to *Cymbidium ringspot tobusvirus* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the virus coat protein gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 21(4):665-672.
- [8] Ferreira S A, Pitz K Y, Manshardt R, et al. Virus coat protein transgenic *Papaya* provides practical control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii [J]. *Plant Disease*, 2002, 86(2):101-105.
- [9] 王涛. 兰花转 *CiDREB1*、*PeDREB2*、*CyMV-CP* 基因研究[D]. 保定:河北农业大学,2010.
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic acids research*, 1980, 8(19):4321-4326.
- [11] Liao L J, Pan I Ch, Chan Y L, et al. Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium mosaic virus* is a manifestation of RNA-mediated resistance [J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13(3):229-242.
- [12] Chan Y L, Lin K H, Jay A S, et al. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack [J]. *Transgenic Research*, 2005, 14:279-288.
- [13] 程保平,彭埃天,宋晓兵,等. 三种 PCR 方法检测柑橘黄龙病菌的效果比较[J]. 植物保护,2014,40(5):106-110.
- [14] 吴琼,陈枝楠,范怀忠,等. 16S nested-PCR 技术检测玉米细菌性枯萎病菌[J]. 植物病理学报,2005,35(5):420-427.
- [15] 沈万宽,杨湛端,刘睿,等. 基于 PCR 和巢式 PCR 技术的甘蔗黑穗病早期检测[J]. 热带作物学报,2013,34(9):1756-1760.

(责任编辑:詹春梅)