

amiRNA 介导的兼抗 PVX、PVY、PSTVd 马铃薯植株获得及抗性鉴定

姜丽丽^{1,2}, 牟 芮¹, 刘尚武², 张桂芝¹, 金光辉¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 农学院 黑龙江 大庆 163319; 2. 黑龙江省农业科学院 马铃薯研究所 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为获得兼抗多种病毒(类病毒)的马铃薯植株,分别克隆了靶向 PVX、PVY 和 PSTVd 蛋白的 *P25*、*HC-Pro* 和 *Virp1* 基因,以拟南芥 pre-miR159a 为骨架设计了针对 *P25*、*HC-Pro* 和 *Virp1* 基因的 amiRNA 序列,通过 Overlapping PCR 将 3 个 amiRNA 片段连接,并导入植物双元表达载体 pCambia1300-221 构建植物表达载体 p1300-221-pre-amiR-P25-HC-Pro-Virp1,经 PCR 及酶切验证,表达载体构建正确。农杆菌介导法将含目的基因质粒菌液侵染马铃薯品种费乌瑞它脱毒微型薯片,经再生、压力筛选、抗性植株分化及植株壮苗共获得转化株系 15 株,PCR 检测结果表明,其中 10 株检测到与目的基因大小一致的片段(729 bp)。qRT-PCR 结果显示,外源 *amiR-P25-HC-Pro-Virp1* 基因在 10 个转化植株中均有表达,相对表达量在 7.68~21.37。对 T₀ 阳性转化植株的攻毒试验,将 PVX、PVY 和 PSTVd 病毒等量混合液摩擦接种至 6~8 叶期的植株叶片,20 d 后观察发现,对照植株感病严重,出现植株矮小、叶片斑驳等症状,而转化植株未表现出感病症状,生长正常。RT-PCR 进行病毒特异性检测,结果显示,转化植株中也未检测到病毒序列,这表明转 *amiR-P25-HC-Pro-Virp1* 在转化植株中能稳定表达,转化植株能够兼抗 PVX、PVY 和 PVSTd 3 种病毒(类病毒)。得到了同时兼抗 PVX、PVY 和 PVSTd 转化植株,且抗性显著,为马铃薯抗病育种提供了新的遗传资源。

关键词: 马铃薯; amiRNA; PVX; PVY; PSTVd

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2021)03-0195-08

doi: 10.7668/hbxb.20192041



Transgenic Potato with Resistant to PVX, PVY and PSTVd Simultaneously by amiRNA-mediated and Resistance Evaluation

JIANG Lili^{1,2}, MU Rui¹, LIU Shangwu², ZHANG Guizhi¹, JIN Guanghui¹

(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to obtain potato plants which could be resistant to multiple viruses (viroid) simultaneously, *P25*, *HC-Pro* and *Virp1* gene targeting PVX, PVY and PSTVd proteins were cloned, respectively. Three types of amiRNAs targeting sequences encoding the silencing suppressor *P25*, *HC-Pro* and *Virp1* were designed by using *Arabidopsis thaliana* miR159a as backbone. These three amiRNA sequences were connected by Overlapping PCR. The synthetic of *P25*, *HC-Pro* and *Virp1* gene was inserted into the expression vector pCambia1300-221 to form p1300-221-preamiR-P25-HC-Pro-Virp1, and the vector was verified by PCR and restriction enzyme digestion. Pre-amiR-P25-HC-Pro-Virp1 was transformed into minituber of potato cultivar Favorita by *Agrobacterium tumefaciens* infection. 15 transformed plants were obtained through regenerating, pressure screening and differentiation. PCR results showed that 10 of them were detected the same size fragment (729 bp) as the target gene. Further qRT-PCR testing confirmed that *amiR-P25-HC-Pro-Virp1* gene was expressed in 10 transformed plants, and the relative expression was between 7.68-21.37. Inoculated the T₀ transgenic plants with the mixture virus of PVX, PVY and PSTVd by friction into the leaves of the plants at the 6-8 leaf stage. The plant growth was observed after 20 days and the results showed that the control plants were severely susceptible, with symptoms such as short plants and

收稿日期: 2021-02-19

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2018YFD020080706)

作者简介: 姜丽丽(1982-),女,黑龙江鸡西人,助理研究员,博士,主要从事马铃薯生物技术育种研究。

mottled leaves ,while the transformed plants did not show infection symptoms and growth normally. There was no virus detected by RT-PCR either. This indicated that the transfected *amiR-P25-HCPro-Virp* could be stably expressed in the transformed plants ,and the transformed plants were resistant to PVX ,PVY and PVSTd viruses (viroid) . Transformed plants resistant to PVX ,PVY and PVSTd were obtained ,and the resistance was significant ,which provided new genetic resources for potato virus-resistant breeding.

Key words: Potato; amiRNA; PVX; PVY; PSTVd

马铃薯是我国第四大主粮作物 ,2019 年中国马铃薯种植面积 478.95 万 hm^2 ,总产量 9 193.8 万 t ,种植面积和总产量均占世界第一位^[1]。

马铃薯生长过程中会遭受病毒的威胁 ,导致马铃薯种性退化、产量下降以及品质变劣。马铃薯 X 病毒(*Potato virus X* ,PVX) 是传播范围最广的马铃薯病毒^[2] ,马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y* ,PVY) 是对马铃薯危害最为严重的病毒^[3-4] ,马铃薯纺锤块茎类病毒(*Potato spindle tuber viroid* ,PSTVd) 可造成马铃薯块茎裂口且不能通过茎尖脱毒汰除^[5]。当 2 种或者 2 种以上病毒复合侵染马铃薯植株时 ,带来的损失要远高于单一病毒侵染^[6-7]。

转化病毒外壳蛋白基因而获得抗病毒植株是植物抗病毒基因工程的重要方法^[8]。利用 RNA 干扰技术将病毒来源的基因转化植物获得抗性植株 ,可提高植物对病毒抗性 ,且此法安全有效^[9]。amiRNA 技术是利用植物体内固有的通过 miRNA 进行基因沉默的系统 ,以拟南芥 miR159a 等前体序列作为 amiRNA 的基本骨架序列 ,通过人工设计特异的 miRNA ,经重叠 PCR 扩增将天然 miRNA 的成熟序列替换成 amiRNA 的成熟序列来沉默目的基因的方法^[10]。amiRNA 技术具有高沉默效率、稳定遗传、高特异性等优点^[11]。利用 amiRNA 技术培育抗病毒植物已有大量报道^[12-15] ,然而关于利用 amiRNA 策略培育多抗病毒的转基因植株方面的报道还较少。

本研究以拟南芥的 pre-miR159a 为骨架 ,分别针对 PVX 编码的 *P25*、PVY 编码的 *HC-Pro* 以及 PSTVd 编码的 *Virp1* 基因设计 amiRNA 并构建表达载体 ,利用农杆菌介导法转化马铃薯品种费乌瑞它转基因植株并对 T_0 转基因植株进行病毒抗性鉴定 ,amiRNA 定量分析等。本研究利用 miRNA 介导兼抗 PVX、PVY 和 PSTVd 马铃薯植株为实现马铃薯兼抗多种病毒提供了新途径 ,也为获得马铃薯抗病病提供理论依据和基因资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料: 以马铃薯品种费乌瑞它为植物材料 ,费

乌瑞它脱毒试管苗由黑龙江八一农垦大学马铃薯研究所保存。费乌瑞它是早熟鲜食型品种 ,中抗 PVY ,但在 PVX 和 PVY 混合侵染下 ,表现为重花叶、植株皱缩严重 ,产量下降 45.7%^[16]; 费乌瑞它感染 PSTVd 时块茎变细长、呈现豌豆状 ,部分芽眼突起^[17]。

载体和菌株: pCambia1300-221 双元植物表达载体、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 ,由黑龙江八一农垦大学马铃薯研究所保存。

毒源马铃薯 KX-PVX、PVY^N和 351-PSTVd ,由黑龙江省农业科学院马铃薯研究所病毒实验室提供。

1.2 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 基因序列获得

TRIzol 法分别提取感染 PVX、PVY、PSTVd 的马铃薯植株 RNA ,并反转录成 cDNA。根据 NCBI 中公布的 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 基因序列分别设计引物 ,分别为: *P25*-F(5'-TGTCACCGACGTGGGGTAG-3') ,*P25*-R(5'-TGACCGGAGCGGTCAGTCT-3') ; *HC-Pro*-F(5'-GCTGCCGACTCAGACATTAT-3') ,*HC-Pro*-R(5'-TGCATTAGGAACACCACCAAG-3') ; *Virp1*-F(5'-CGGAACTAAACTCGTGGTTC-3') ,*Virp1*-R(5'-TGGAACCGCAGTTGGTTCCT-3')。进行 RT-PCR 扩增 ,并将扩增产物进行回收测序。

1.3 靶向 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 人工 miRNA 前体的构建

本试验前体骨架选择拟南芥 miR159a ,以拟南芥 DNA (CATB 法提取) 为模板 ,扩增拟南芥 pre-miR159a ,引物为: *miR159a*-F(5'-CGATAGATCTTGA TCTGACGATGG-3') 和 *miR159a*-R(5'-GAGAAGGTG AAAGAAGATGTAGAG-3')。

利用在线软件 WMD(<http://wmd2.weigelworld.org/>) 设计针对 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 基因的 amiRNA ,序列分别为 5'-ATAGTGACTACTTTGAACTCA-3' (*P25*) ; 5'-TCGACTAGTATTCTAGGCAGT-3' (*HC-Pro*) ; 5'-ATCTCTTACAATTAAGGCGAG-3' (*Virp1*)。

以拟南芥 DNA 为模板 ,通过 PCR 把拟南芥 miR319a 的 21 个核苷酸分别替换为 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 基因的 amiRNA ,引物序列见表 1。

表 1 pre-amiR-P25、pre-amiR-HCPro、pre-amiR-Virp1 引物

Tab. 1 Sequence primers of pre-amiR-P25, pre-amiR-HCPro, pre-amiR-Virp1

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
amiR-P25-F	CGATGGAAGTGAGTTCAAAGCCGTCA
amiR-P25-R	TCTAGATCT ATGTGAGTTCAAAGTAGT
amiR-HCPro-F	ATCTATGTTCTACCCTGATGTTTCATGAT
amiR-HCPro-R	ACTAGT ATGTTCTACCCTGATGTTTCAT
amiR-Virp1-F	GACGATGGAAGGTCTCTTACAATTA
amiR-Virp1-R	CTGCAGATGCTCTTACAACAAAGG

1.4 pre-amiR-P25、pre-amiR-HCPro、pre-amiR-NA-Virp1 序列连接

为使 pre-amiR-P25、pre-amiR-HCPro、pre-amiR-Virp1 3 段序列连入 pCAMBIA1300-211 载体,分别在 pre-amiRNA-P25 中引入 *EcoR* I、*Bgl* II 酶切位点,pre-amiR-HCPro 引入 *Spe* I、*Bgl* II 酶切位点,pre-amiRNA-Virp1 引入 *Spe* I、*Pst* I 酶切位点,并进行 PCR 反应,结束后分别回收产物并保存。

采用 over-lapping PCR 将 pre-amiR-P25、pre-amiR-HCPro 和 pre-amiR-Virp1 3 段序列连接,在 pre-amiRNA-P25 中引入 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切位点,pre-amiR-HCPro 中引入 *Bgl* II 和 *Spe* I 酶切位点,pre-amiR-Virp1 引入 *Spe* I 和 *Pst* I 酶切位点,连接过程见图 1。将连接片段命名为 pre-amiR-P25-HCPro-Virp1 转化大肠杆菌 DH5 α ,并连入 pMD18-T 载体,对重组质粒进行 PCR 鉴定。

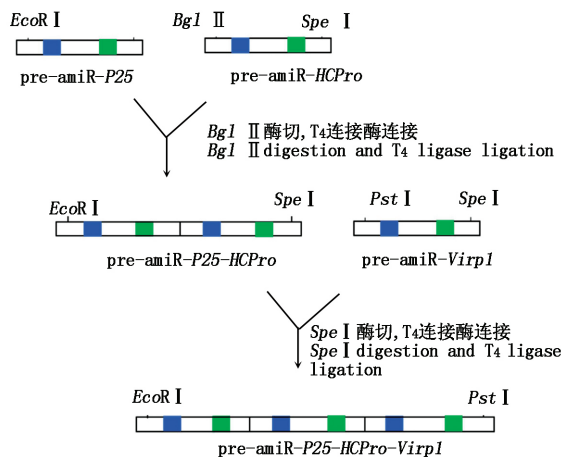


图 1 pre-amiR-P25、pre-amiR-HCPro、pre-amiR-Virp1 序列连接过程

Fig. 1 Pre-amiR-P25 pre-amiR-HCPro and pre-amiR-Virp1 sequence connection process

1.5 pre-amiR-P25-HCPro-Virp1 植物表达载体构建

将 pCR 回收产物与含 pCAMBIA1300-221 载体的质粒,分别用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切 pMD18-T-pre-amiR-P25-HCPro-Virp1 质粒和 pCAMBIA1300-

221 载体,37 °C 酶切 2~4 h。将质粒与载体酶切产物按 3:1 的比例混合,用 *T*₄ 连接酶 16 °C 连接过夜;连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,将重组质粒命名为 p1300-221-amiR-P25-HCPro-Virp1,并对重组质粒进行 PCR 鉴定与酶切鉴定,阳性重组载体质粒电击法转化农杆菌 EHA105 感受态细胞。

1.6 根癌农杆菌介导的马铃薯脱毒微型薯片遗传转化

取度过休眠期的费乌瑞它脱毒微型薯,自来水冲洗 30 min,酒精浸泡 30 s,次氯酸钠消毒 20 min,无菌纯净水冲洗 3~4 遍后,置于超净工作台中,去皮将薯肉切成 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm 的方块。侵染含 p1300-221-amiR-P25-HCPro-Virp1 载体农杆菌菌液,具体方法参照姜丽丽^[18]进行。将侵染后的微型薯片接种至分化培养基中(MS + 0.5 mg/L IAA (吲哚乙酸) + 4 mg/L ZT (玉米素) + 0.25 mg/L GA₃ (赤霉素) + 300 mg/L Cef (头孢霉素) + 50 mg/L Hyg (潮霉素)),培养条件为(24 ± 2) °C,光照强度为 2 000 lx,光照周期为光 16 h/暗 8 h;7 d 后转入抗性筛选培养基中(分化培养基中添加 50 mg/L Hyg)培养,培养条件不变。

1.7 转 amiR-P25-HCPro-Virp1 植株 PCR 检测

提取转化 amiR-P25-HCPro-Virp1 费乌瑞它潮霉素筛选阳性植株 DNA,以未转化植株作为阴性对照,上下游引物分别为 amiR-P25-F 和 amiR-Virp301-R,进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 转基因植株荧光定量 PCR 表达分析

为检测费乌瑞它转化植株中 amiRNA 的表达量,用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 amiR-P25-HCPro-Virp1 基因在转基因植株中的表达情况。以马铃薯的看家基因 *StEF-1 α* 作为内参基因,内参基因引物序列为: *StEF-1 α -F* (ATTGGAAACGGATATGCTCCA), *StEF-1 α -R* (TCCTTACCTGAACGCCTGTCA),目的基因引物为 amiR-P25-F 和 amiR-Virp301-R。

根据 SYBR Premix Ex TaqTM 的说明书要求,在荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, CFX-96) 上进行 3 次重复。PCR 体系含 2 × SYBR Premix Ex Taq 10 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.2 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加 RNase-free ddH₂O 至终体积 20 μ L。PCR 条件为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 7 s,61 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,45 个循环;68 °C 延伸 5 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。数据由荧光定量 PCR 仪自动读取,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对结果进行相对定量分析,计

算 amiRNA 的表达水平。

1.9 转 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 植株的抗病性鉴定

1.9.1 试管苗移栽 费乌瑞它阳性转化植株及未转化对照移栽至装有蛭石和珍珠岩的花盆中,并转移至网棚中培养,定期喷施 Hoagland 营养液壮苗,保持温室温度在 25~30 °C,每天光照 12 h。

1.9.2 汁液摩擦法接种 PVX、PVY、PVSTd 病毒 取 PVX、PVY、PVSTd 毒源植株叶片各 2 g 置于灭菌研钵中加入 20 mL 的研磨缓冲液(1 × PBS Buffer,pH 值

7.4) 研磨成匀浆备用 转化植株长至 6~8 片叶时,在植株上部完全展开的叶片上均匀喷洒过直径为 20 μm 筛的金刚砂,用消毒毛刷蘸取少量混合毒源汁液均匀涂抹在费乌瑞它转化植株及未转化植株(CK)嫩叶上,接毒 120 min 后用无菌超纯水将叶片清洗干净。定期观察植株的症状,并对植株进行 RT-PCR 分子检测。

根据 PVX、PVY 和 PSTVd 的基因保守序列,设计引物,序列见表 2。其中 PVX 目的片段为 711 bp,PVY 目的片段为 447 bp,PSTVd 目的片段为 356 bp。

表 2 PVX、PVY 及 PSTVd 病毒检测引物

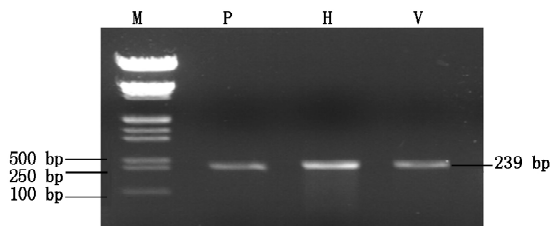
Tab.2 Primers of PVX、PVY and PSTVd virus detection

病毒 Virus	引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primers sequence	序列大小/bp Sequence length
PVX	PVX-F	5'-ACAGTCCACAGGCTCAACTTC-3'	711
	PVX-R	5'-CAGTTAGGCTGGCAAAGTCGT-3'	
PVY	PVY-F	5'-AAGCATCTCAATCACAGTTTGATAT-3'	447
	PVY-R	5'-CGAACTTCACTCCAAGTAGAGTATC-3'	
PSTVd	PSTVd-F	5'-CCAGCGGTAATTCGAC-3'	356
	PSTVd-R	5'-ACCGACGGGTTCCGGACT-3'	

2 结果与分析

2.1 *amiR-P25*、*amiR-HCPro*、*amiR-Virp1* 前体的构建

以拟南芥 DNA 为模板,特异性引物(*amiR-P25-F*/*amiR-P25-R*,*amiR-HCPro-F*/*amiR-HCPro-R*,*amiR-Virp1-F*/*amiR-Virp1-R*)分别进行 PCR 扩增,将拟南芥 pre-miR159a 分别改造为 pre-*amiR-P25*、pre-*amiR-HCPro*、pre-*amiR-Virp1*,均得到大小为 239 bp 的条带(图 2),与所预测的片段大小相符。



M. Marker (DL5000); P. pre-*amiR-P25* 序列;
H. pre-*amiR-HCPro* 序列; V. pre-*amiR-Virp1* 序列。
M. Marker (DL5000); P. Sequence of pre-*amiR-P25*;
H. Sequence of pre-*amiR-HCPro*; V. Sequence of pre-*amiR-Virp1*。

图 2 pre-*amiR-P25*、pre-*amiR-HCPro*、
pre-*amiR-Virp1* 电泳检测

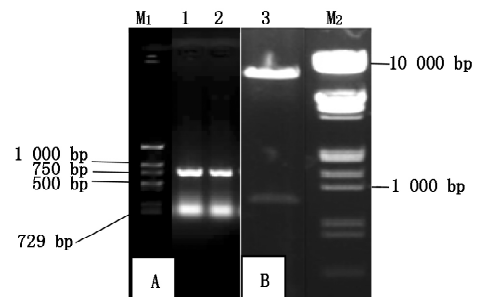
Fig.2 Result of agarose gel electrophoresis of

pre-*amiR-P25* pre-*amiR-HCPro* and pre-*amiR-Virp1*

2.2 p1300-221-*amiR-P25-HCPro-Virp1* 植物表达载体的构建

连接后的 pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1* 序列克隆到 pMD18-T 载体上,为了与目的载体连接,扩增序列时在引物中引入了 *EcoR* I 和 *Pst* I 位点。本试

验采用的植物表达载体 pCambia1300-221 二元载体,构建载体时用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切 p1300-221 质粒及 pMD18-T-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1*,回收两片段并进行连接,经 PCR 及不同的酶切验证,结果表明载体构建正确(图 3)。p1300-221-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1* 载体构建图谱见图 4。



A. p1300-221-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1* 表达载体 PCR 验证: M1. Marker (DL1500); 1~2. 表达载体 PCR 检测结果。B: M2. Marker (DL15000); 3. *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切验证。
A. PCR results of p1300-221-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1*: M1. Marker (DL1500); 1-2. PCR results of expression vector. B: M2. Marker (DL15000); 3. Identified by enzyme digestion of *EcoR* I and *Pst* I.

图 3 p1300-221-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1* 表达载体验证
Fig.3 Verification of p1300-221-pre-*amiR-P25-HCPro-Virp1* expression vector

2.3 转 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 植株获得

农杆菌侵染后的费乌瑞它微型薯片在分化培养基中培养 14 d 后,薯块边缘逐渐泛绿,21 d 后,薯片颜色加深,转为深绿,当培养至 28 d 左右时,在薯块表面形成多个生长点,继续培养至生长点发展成再生芽,再生芽长至 1.5~2.0 cm 时,剪下来接入添加 50 mg/L Hyg 的 MS 培养基中(图 5)。

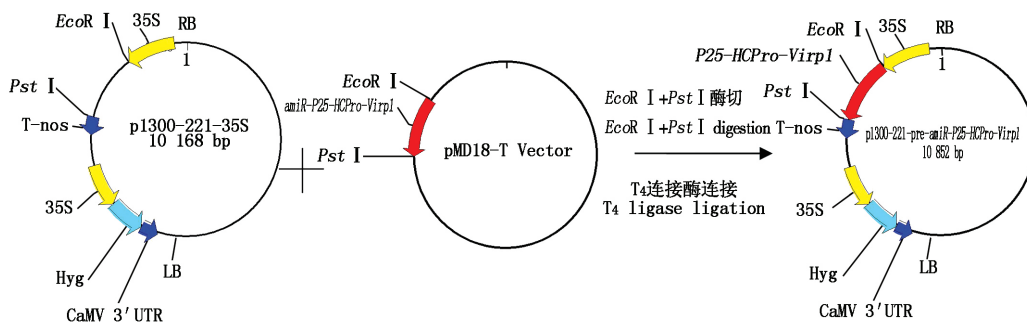
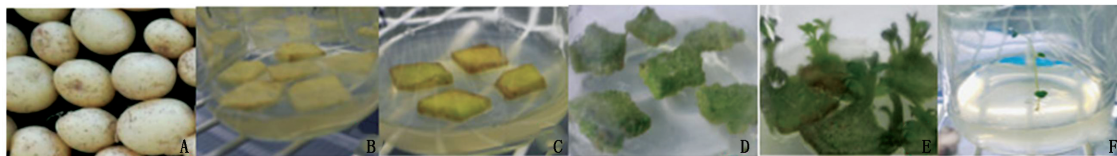


图 4 p1300-221-pre-amiR-P25-HCPro-Virp1 表达载体的构建过程

Fig. 4 Construction process of p1300-221-pre-amiR-P25-HCPro-Virp1 expression vector



A. 费乌瑞它微型薯; B. 微型薯片侵染; C. 侵染 14 d 的微型薯片; D. 接种 21 d 微型薯片; E. 接种 28 d 微型薯片; F. 再生植株移至 MS 培养基中培养。

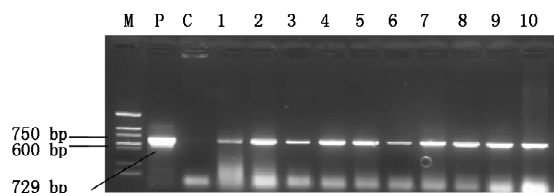
A. Minituber of Favortia; B. Infection of minituber slice; C. Infection of minituber slice for 14 days; D. Infection of minituber slice for 21 days; E. Infection of minituber slice for 28 days; F. The regenerated plants were transferred to MS medium for culture.

图 5 费乌瑞它转化植株获得

Fig. 5 Obtaining and transplanting transgenic plant of Favortia

2.4 T₀ 植株 PCR 检测

费乌瑞它微型薯片经含 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 质粒农杆菌侵染、再生、压力筛选、抗性植株分化及植株壮苗共获得转化株系 15 株,用 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 特异性引物对转化株系 PCR 检测。检测结果如图 6 所示,有 10 个转化株系扩增出与质粒正对照同样大小约 729 bp 的片段,而未转化植株没有扩增片段,可以初步说明 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 基因转化至马铃薯中。

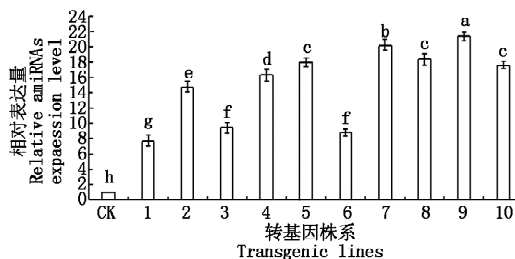


M. Marker (DL2000); P. 质粒对照 (+); C. 未转化植株对照 (-); 1-10. 转化植株。
M. DNA Marker (DL2000); P. Plasmid CK; C. Negative control of untransformed CK; 1-10. Transgenic plants.

图 6 转 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 植株 PCR 鉴定
Fig. 6 PCR analysis of the transgenic plants of *amiR-P25-HCPro-Virp1*

2.5 T₀ 转化植株的 qRT-PCR 检测

为检测 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 基因在马铃薯植株中的表达水平,对 PCR 阳性转化株系进行 qRT-PCR 检测。各转化株系相对表达量如图 7 所示, *amiR-P25-HCPro-Virp1* 基因在 10 个转化植株中均有所表达,从相对表达量来看,各转化株系间相对表达量差异显著,9 号转化株系相对表达量最高为 21.37,1 号转化株系最低为 7.68。



数据为 3 次重复平均值,不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。数据统计分析采用 LSD 法。

The data were the average of three replicates, and the difference was significant in different lowercase letters ($P < 0.05$). The LSD method was used for statistical analysis of the data.

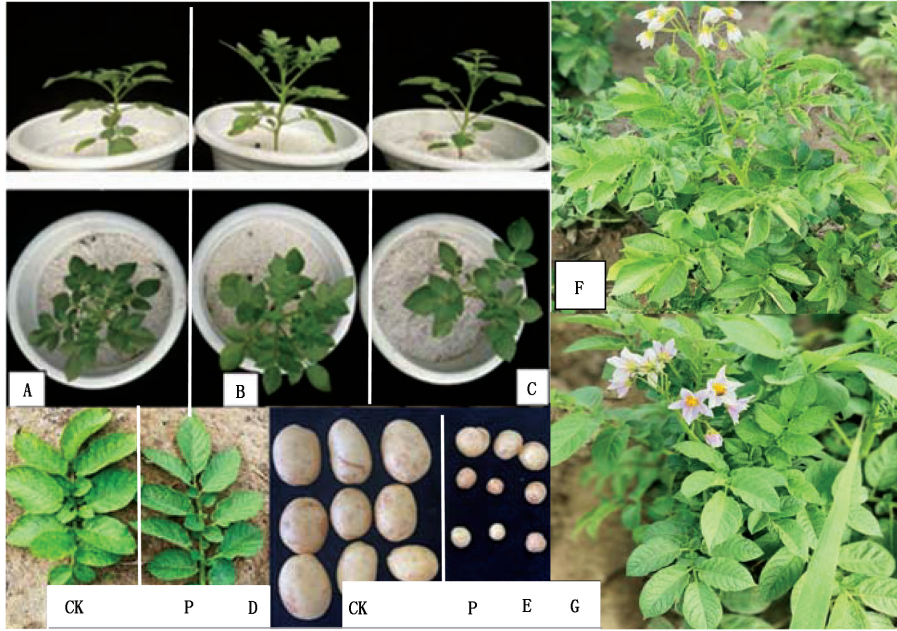
图 7 不同转基因株系中 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 基因表达量
Fig. 7 Transcription level of *amiR-P25-HCPro-Virp1* in different transgenic lines

2.6 T₀ 转化植株病毒抗性评价

PVX、PVY 和 PVSTd 病毒等比例混合液摩擦接种转化植株感病情况如图 8。接种病毒混合液后费乌瑞它未转化植株矮小,节间缩短,叶缘上卷,叶片斑驳;随着植株的生长感染植株会出现花期滞后,少量块茎表皮裂口等情况。转 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 植株则生长正常,叶片嫩绿、平展,块茎表皮光滑。

接种病毒混合液 20 d 后取叶分别以 PVX、PVY、PVSTd 检测引物进行 RT-PCR 检测结果如图 9。在未转化对照植株中分别检测到与 PVX 病毒基因长度一致的 711 bp 片段(图 9-A),与 PVY 病毒基因长度一致的 450 bp 片段(图 9-B),与 PVSTd 病毒基因长度一致的 356 bp 片段(图 9-C),而接种病毒混合液的转化植株未出现任何扩增条带。这表明,

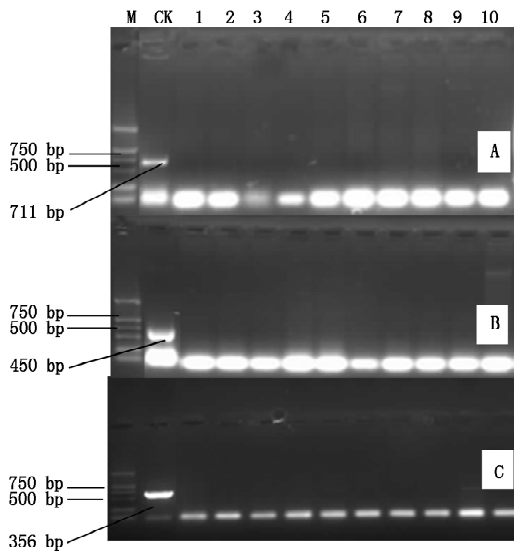
转 *amiR-P25-HCPro-Virp1* 基因植株对 PVX、PVY、PVSTd 这 3 种病毒具有抗性。



A. 未转化植株 (CK); B - C. 费乌瑞它转化植株; D. 转化植株与对照植株叶片比较;
E. 转化植株与对照植株块茎比较; F. 对照植株田间生长情况; G. 转化植株田间生长情况。
A. Non transformed plants (CK); B - C. Transgenic plants of Favorita; D. Comparison of leaves between transgenic plants and CK;
E. Comparison of tubers between transgenic plants and CK; F. Field growth of non-transformed plants; G. Field growth of non-transformed plants.

图 8 T₀ 转化植株病毒抗性检测

Fig. 8 Test of virus resistance in transformed T₀ plants



A. 转化植株 PVX 病毒检测结果; B. 转化植株 PVY 病毒检测结果;
C. 转化植株 PVSTd 病毒检测结果; M. Marker; CK. 接种病毒混合液的未转化植株; 1 - 10. 接种病毒混合液的费乌瑞它转化植株。
A. PVX virus detection results of transgenic plants; B. PVY virus detection results of transgenic plants; C. PVSTd virus detection results of transgenic plants; M. Marker; CK. Non transgenic plants by inoculating with virus mixture; 1 - 10. Transgenic plants of Favorita by inoculating with virus mixture.

图 9 T₀ 转化植株的 RT-PCR 病毒检测结果

Fig. 9 Verification of T₀ transgenic plants by RT-PCR for virus infection

3 结论与讨论

合适的植物内源 miRNA 前体骨架是获得

amiRNA 前体的基础^[19]。已有研究表明, miR156、miR159、miR164、miR165、miR167、miR169、miR171、miR172、miR319、miR528 等多个植物内源 miRNA 被用于构建人工 miRNA 骨架^[20-24]。尽管在 amiRNA 构建中最好是用自身固有的 miRNA 前体作为骨架, 然而目前已被证实功能的前体骨架中并没有马铃薯内源 miRNA 前体, 而拟南芥中已有多个 miRNA 前体骨架被证明具有加工功能且已经应用到多种外源作物中, 艾涛波^[25]通过比较拟南芥 miR159a、miR167b、miR171a 3 种前体骨架沉默效率结果表明, 与 pre-miR167b 和 pre-miR171a 相比, miR159a 的茎环结构更稳定, 更容易被 DCL1 所识别, 提高了 miR159a 沉默靶基因的效率, 且以 miR159a 为前体构建的靶向体用于抗 PVX 和 PVY 的 amiRNA 已有研究, 本研究以拟南芥 miR159a 为前体骨架分别改造并构建了 *amiR-P25*、*a-miR-HCPro* 和 *amiR-Virp1*, 为进一步构建兼抗 PVX、PVY 和 PSTvd 表达载体奠定基础。

人工 miRNA 序列与目的基因靶序列之间的互补性对于转化植株的抗病能力至关重要^[26-27]。本研究设计 *P25*、*HC-Pro*、*Virp1* 基因人工 miRNA 序列时利用在线软件 WMD 进行设计同时也参考了这 3 个基因测序中出现频率较高的位点, 最大程度保证了沉默效率。自 amiRNA 技术应用于植物基因工程以来, 已有多项研究报道了向植物体中转入 amiRNA 不仅可

以改变植物的表型特征,还能使植物获得抗病毒特性以及其他优良特性,如烟草^[28]、黄瓜^[29]、草莓^[30]、番茄^[13]、马铃薯^[31]等。如果将 2 种或 2 种以上针对不同病毒基因的 amiRNA 转入同一植物中,可同时沉默多个基因,进而使植物获得 2 种或 2 种以上病毒的抗性^[32]。Ai 等^[33]构建了靶向 PVX、PVY 的 amiR-P25-HC-Pro 表达载体转化烟草,使转化植株获得同时抗 PVX 和 PVY 的双重抗性。Kung 等^[34]将西瓜银斑斑病毒(*Watermelon silver mottle virus* WSMoV) 中的 5 个靶向区段 A、B1、B2、C、D 和 E 中的 AB1E 和 B2DC 构建了 amiRNA 表达载体并转化烟草,结果表明转化植株对 WSMoV 具有完全抗性。

已有研究表明,PVX 和 PVY 复合侵染会产生协同作用而使植株的病情加重^[35],PVY 和 PSTVd 混合感染会导致马铃薯产量下降加剧^[17]。本研究中,费乌瑞它未转化植株感染病毒混合液后同时检测到了 PVX、PVY 和 PSTVd,这表明病毒混合液中 3 种病毒(类病毒)均具感染性,本研究未对非转化植株进行 PVX、PVY 和 PSTVd 的定量分析,因此,无法判断三者之间感染力的差别。在今后工作中,将进一步完善此方面的研究。此外,本研究仅对 T₀ 转化株系进行了抗性研究,且转化株系表现出兼抗 PVX、PVY 和 PSTVd 的特性,然而 Petchthai 等^[36]在 amiRNA 获得兼抗烟草研究建兰花叶病毒(*CymMV*)和齿兰环斑病毒(*ORSV*)中发现,F₄ 转基因烟草对 *CymMV* 表现 100% 抗性,而对 *ORSV* 仅有 16% 的抗性。分析原因,可能与前体骨架选择及病毒中存在沉默抑制子有关。尽管本研究优选拟南芥 miR159a 为前体骨架,且设计 amiRNA 时针对 3 种病毒(类病毒)的沉默抑制子,仍会继续评价高世代转化植株兼抗病毒特性和稳定性。

本研究针对马铃薯 PVX、PVY、PVSTd 蛋白的 P25、HC-Pro、Virp1 基因,以拟南芥 pre-miR159a 为骨架分别构建靶向这 3 个基因的 amiRNA,并构建植物表达载体 p1300-221-pre-amiR-P25-HC-Pro-Virp1,农杆菌介导转化费乌瑞它脱毒微型薯片,经抗性筛选、PCR 检测共获得 10 株阳性转化植株,荧光定量 PCR 结果表明,外源基因在阳性转化植株中均有表达。对 T₀ 阳性转化植株摩擦接种病毒混合液接结果表明,转化植株对 PVX、PVY 和 PVSTd 混合感染下具有兼抗的特性。

参考文献:

[1] 张玉胜. 中国马铃薯产品国际竞争力及出口潜力研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. doi: 10. 27630/d.cnki. gznky. 2020. 000468.
Zhang Y S. International competitiveness and export po-

tential of potato products in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.

[2] 陈虞超, 聂峰杰, 张丽, 巩楠, 甘晓燕, 石磊, 宋玉霞. 马铃薯 X 病毒研究进展 [J]. 长江蔬菜, 2016(18): 39-44. doi: 10. 3865/j. issn. 1001-3547. 2016. 18. 015.
Chen Y C, Nie F J, Zhang L, Gong L, Gan X Y, Shi L, Song Y X. Research progress of *Potato virus X* [J]. *Journal of Changjiang Vegetables* 2016(18): 39-44.

[3] 张华鹏, 张剑峰, 刘俊莹, 王聪聪. 马铃薯上 PVY、PVS 和 PLRV 的三重 RT-PCR 检测 [J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 40-45. doi: 10. 7668/hbxb. 2011. 05. 009.
Zhang H P, Zhang J F, Liu J Y, Wang C C. Triplex-RT-PCR detection of PVY, PVS and PLRV in potato [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 2011 26(5): 40-45.

[4] 贺振, 陈春峰, 张志想, 李世访. 马铃薯 Y 病毒科分子进化研究进展 [J]. 植物保护, 2017, 43(3): 13-22. doi: 10. 3969/j. issn. 0529-1542. 2017. 03. 003.
He Z, Chen C F, Zhang Z X, Li S F. Advances in molecular evolution of viruses in the family Potyviridae [J]. *Plant Protection* 2017 43(3): 13-22.

[5] Flores R, Hernández C, de Alba A E M, Daròs J A, Serio F D. Viroids and viroid-host interactions [J]. *Annual Review of Phytopathology* 2005 43(1): 117-139. doi: 10. 1146/annurev. phyto. 43. 040204. 140243.

[6] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 张威, 张抒, 申宇, 刘凯, 喻江. 中国马铃薯主要病毒病发生情况调查与分析 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 74-79. doi: 10. 3969/j. issn. 1005-9369. 2013. 07. 014.
Fan G Q, Bai Y J, Gao Y L, Zhang W, Zhang S, Shen Y, Liu K, Yu J. Investigation and analysis on potato viral disease in China [J]. *Journal of Northeast Agricultural University* 2013 44(7): 74-79.

[7] 邱彩玲, 吕典秋, 董学志, 魏琪, 刘尚武, 王绍鹏, 宿飞飞, 李勇, 白艳菊. 我国在防治马铃薯类病毒病中存在的问题及防治对策 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(10): 140-144. doi: 10. 3969/j. issn. 1005-9369. 2011. 10. 029.
Qiu C L, Lü D Q, Dong X Z, Wei Q, Liu S W, Wang S P, Su F F, Li Y, Bai Y J. Problems and countermeasures on potato spindle tuber viroid (PSTVd) control in China [J]. *Journal of Northeast Agricultural University* 2011 42(10): 140-144.

[8] Zhao J P, Rios C G, Song J Q. *Potato virus X*-based microRNA silencing (VbMS) in potato [J]. *Journal of Visualized Experiments* 2020(159): e61067. doi: 10. 3791/61067.

[9] 许宗宏, 郝青南, 陈李淼, 孙佃臣, 田星星, 单志慧. 基于大豆花叶病毒衣壳蛋白基因的 RNA 干扰植物表达载体的构建 [J]. 华北农学报, 2010, 25(S2): 1-4. doi: 10. 7668/hbxb. 2010. S2. 001.
Xu Z H, Hao Q N, Chen L M, Sun D C, Tian X X, Shan Z Z. Plant expression construct based on RNAi for *Soybean mosaic virus* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 2010, 25(S2): 1-4.

[10] Zhao L Q, Li H L, Li R, Li W, Hua J P, Guo Y D. Cloning of cotton delta-12 oleate desaturase gene FAD2-1 and construction of its ihpRNA and amiRNA interference vectors [J]. *Agricultural Science & Technology* 2012, 13(11): 2281-2283, 2286. doi: 10. 1617/5/j. cnki. 1009-4229. 2012. 11. 028.

[11] 周香艳, 杨江伟, 唐勋, 文义凯, 张宁, 司怀军. amiRNA 技术沉默 C-3 氧化酶编码基因 *StCPD* 对马铃薯抗旱性的影响 [J]. 作物学报, 2018, 44(4): 512-521. doi: 10. 3724/SP. J. 1006. 2018. 00512.
Zhou X Y, Yang J W, Tang X, Wen Y K, Zhang N, Si H J. Effect of silencing C-3 oxidase encoded gene *StCPD* on potato drought resistance by amiRNA technology [J]. *Acta Agronomica Sinica* 2018 44(4): 512-521.

[12] Carbonell A, Daròs J A. Artificial microRNAs and synthetic *trans*-acting small interfering RNAs interfere with

- viroid infection [J]. *Molecular Plant Pathology* 2017 ,18 (5): 746 – 753. doi: 10. 1111/mpp. 12529.
- [13] Sharma N ,Prasad M. Silencing *AC1* of *Tomato leaf curl virus* using artificial microRNA confers resistance to leaf curl disease in transgenic tomato [J]. *Plant Cell Reports* , 2020 ,39(11): 1565 – 1579. doi: 10. 1007/s00299-020-02584-2.
- [14] Meyers B C ,Axtell M J. MicroRNAs in plants: key findings from the early years [J]. *The Plant Cell* 2019 ,31 (6): 1206 – 1207. doi: 10. 1105/tpc. 19. 00310.
- [15] Zubair M ,Khan M Z ,Rauf I ,Raza A ,Shah A H ,Hassan I ,Amin I ,Mansoor S. Artificial micro-RNA (amiRNA) – mediated resistance against whitefly (*Bemisia tabaci*) targeting three genes [J]. *Crop Protection* ,2020 ,137: 105308. doi: 10. 1016/j. cropro. 2020. 105308.
- [16] 范国权 ,高艳玲 ,张威 ,张抒 ,申宇 ,邱彩玲 ,白艳菊 ,刘凯 ,喻江. 马铃薯主要病毒侵染不同品种症状及对产量的影响 [J]. 中国马铃薯 2019 ,33(1): 34 – 42. doi: 10. 3969/j. issn. 1672-3635. 2019. 01. 006. Fan G Q ,Gao Y L ,Zhang W ,Zhang S ,Shen Y ,Qiu C L ,Bai Y J ,Liu K ,Yu J. Symptoms and yields of different Potato varieties infected with main potato viruses [J]. *Chinese Potato Journal* 2019 ,33(1): 34 – 42.
- [17] 邱彩玲 ,吕文河 ,吕典秋 ,白艳菊 ,魏琪 ,刘尚武 ,董学志 ,耿宏伟 ,万书明 ,魏峭嵘. 4 个马铃薯品种感染马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 的症状 [J]. 植物保护 2014 ,40(6): 159 – 163. doi: 10. 3969/j. issn. 0529-1542. 2014. 06. 030. Qiu C L ,Lü W H ,Lü D Q ,Bai Y J ,Wei Q ,Liu S W ,Dong X Z ,Geng H W ,Wan S M ,Wei Q R. Symptoms of four potato varieties infected with *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) [J]. *Plant Protection* 2014 ,40(6): 159 – 163.
- [18] 姜丽丽. 农杆菌介导的 *BcBCPI* 基因转化马铃薯抗旱性研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学 ,2008: 21 – 22. doi: 10. 7666/d. y1403917. Jiang L L. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato with drought resistance gene *BcBCPI* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University 2008: 21 – 22.
- [19] Kis A ,Tholt G ,Ivanics M ,Várallyay É ,Jenes B ,Havelda Z. Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to *Wheat dwarf virus* in barley is highly efficient at low temperature [J]. *Molecular Plant Pathology* 2016 ,17(3): 427 – 437. doi: 10. 1111/mpp. 12291.
- [20] Sánchez-Gutiérrez A ,Ovando-Medina I ,Adriano-Anaya L ,Vázquez-Ovando A ,Salvador-Figueroa M. Dynamics of miR156 and miR172 involved in the flowering of *Jatropha curcas* L. [J]. *Acta Botanica Brasilica* 2018 ,32 (1): 99 – 106. doi: 10. 1590/0102-33062017abb0179.
- [21] Castrob Á ,Quiroz D ,Sánchez E ,de los Angeles Micconoa M ,Aguirre C ,Ramírez A ,Montesa C ,Prieto H. Synthesis of an artificial *Vitis vinifera* miRNA 319e using overlapping long primers and its application for gene silencing [J]. *Journal of Biotechnology* 2016 ,233: 200 – 210. doi: 10. 1016/j. jbiotec. 2016. 06. 028.
- [22] Wang X M ,Yang Y ,Yu C L ,Zhou J ,Cheng Y ,Yan C Q ,Chen J P. A highly efficient method for construction of rice artificial microRNA vectors [J]. *Molecular Biotechnology* , 2010 ,46(3): 211 – 218. doi: 10. 1007/s12033-010-9291-4.
- [23] Liu C ,Zhang L ,Sun J ,Luo Y Z ,Wang M B ,Fan Y L ,Wang L. A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from *Arabidopsis* [J]. *Molecular Biology Reports* 2010 ,37(2): 903 – 909. doi: 10. 1007/s11033-009-9713-1.
- [24] Li H ,Deng Y ,Wu T L ,Subramanian S ,Yu O. Misexpression of miR482 ,miR1512 ,and miR1515 increases soybean nodulation [J]. *Plant Physiology* ,2010 ,153 (4): 1759 – 1770. doi: 10. 1104/pp. 110. 156950.
- [25] 艾涛波. amiRNA 介导抗性转基因烟草植株的抗病性分析 [D]. 泰安: 山东农业大学 ,2010: 82 – 83. doi: 10. 7666/d. y178 6172. Ai T B. Analysis of the resistance mediated by amiRNA silencing in transgenic tobacco plants [D]. Taian: Shandong Agricultural University 2010: 82 – 83.
- [26] Brodersen P ,Sakvarelidze-Achard L ,Bruun-Rasmussen M ,Dunoyer P ,Yamamoto Y Y ,Sieburth L ,Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs [J]. *Science* ,2008 ,320(5880): 1185 – 1190. doi: 10. 1126/science. 1159151.
- [27] Meister G ,Landthaler M ,Patkaniowska A ,Dorsett Y ,Teng G ,Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs [J]. *Molecular Cell* 2004 ,15(2): 185 – 197. doi: 10. 1016/j. molcel. 2004. 07. 007.
- [28] Zhao J P ,Liu Q T ,Hu P ,Jia Q ,Liu N ,Yin K Q ,Cheng Y ,Yan F ,Chen J P ,Liu Y L. An efficient *Potato virus X*-based microRNA silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Scientific Reports* 2016 ,6: 20573. doi: 10. 1038/srep20573.
- [29] 梁超琼. 响应黄瓜绿斑驳花叶病毒侵染的黄瓜 miRNA 功能分析及人工 miRNA 介导的病毒抗性评价 [D]. 北京: 中国农业大学 2018. Liang C Q. Functional analysis of *Cucumber green mottle mosaic virus*-responsive miRNA in cucumber and evaluation of artificial miRNA-mediated virus resistance [D]. Beijing: China Agricultural University 2018.
- [30] Li H ,Dong X X ,Mao W J ,Guan Y H ,Zhang Z H. An effective artificial microRNA vector based on Fv-miR166 precursor from strawberry [J]. *Scientia Horticulturae* ,2019 ,256: 108643. doi: 10. 1016/j. scienta. 2019. 108643.
- [31] Li S G ,Zhang N ,Zhu X ,Ma R ,Yang J W ,Tang X ,Si H J. Enhanced drought tolerance with artificial microRNA-mediated *StProDHI* gene silencing in potato [J]. *Crop Science* 2020 ,60(3): 1462 – 1471. doi: 10. 1002/csc2. 20064.
- [32] Zhang N N ,Zhang D D ,Chen S L ,Gong B Q ,Guo Y J ,Xu L H ,Zhang X N ,Li J F. Engineering artificial MicroRNAs for multiplex gene silencing and simplified transgenic screen [J]. *Plant Physiology* 2018 ,178(3): 989 – 1001. doi: 10. 1104/pp. 18. 00828.
- [33] Ai T ,Zhang L ,Gao Z ,Zhu C X ,Guo X. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants [J]. *Plant Biology* 2011 ,13(2): 304 – 316. doi: 10. 1111/j. 1438-8677. 2010. 00374. x.
- [34] Kung Y J ,Lin S S ,Huang Y L ,Chen T C ,Harish S S ,Chua N H ,Yeh S D. Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus [J]. *Molecular Plant Pathology* 2012 ,13(3): 303 – 317. doi: 10. 1111/j. 1364-3703. 2011. 00747. x.
- [35] Hameed A ,Tahir M N ,Asad S ,Bilal R ,Van Eck J ,Jander G ,Mansoor S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato [J]. *Molecular Biotechnology* ,2017 ,59(2/3): 73 – 83. doi: 10. 1007/s12033-017-9995-9.
- [36] Petchthai U ,Yee C S L ,Wong S M. Resistance to CymMV and ORSV in artificial microRNA transgenic *Nicotiana benthamiana* plants [J]. *Scientific Reports* ,2018 ,8 (1): 9958. doi: 10. 1038/s41598-018-28388-9.