

## 研究报告

### Research Report

# 多抗马铃薯病毒及类病毒的 amiRNA 双元表达载体的构建及遗传转化

牟芮<sup>1\*</sup> 刘尚武<sup>2\*</sup> 姜丽丽<sup>1,3</sup> 万书明<sup>2</sup> 王绍鹏<sup>2</sup> 孙少慧<sup>1</sup> 李雅南<sup>1</sup> 吴立萍<sup>1</sup> 金光辉<sup>1\*\*</sup> 吕典秋<sup>2\*\*</sup>

1 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆, 163319; 2 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 哈尔滨, 150086; 3 黑龙江省农业科学院博士后科研工作站, 哈尔滨, 150086

\* 同等贡献作者

\*\* 通讯作者, ghjin1122@163.com; smallpotatoes@126.com

**摘要** 马铃薯病毒及类病毒病害严重影响了中国马铃薯的生产。为了培育抗病毒及类病毒的马铃薯新材料, 本研究采用人工 miRNA (artificial microRNA, amiRNA) 策略, 以马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX) 与马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 编码沉默抑制子 P25 蛋白和 HC-pro 蛋白的基因为靶标, 利用 5'RACE 技术对 P25 基因、HC-Pro 基因潜在的剪切热点进行预测。再采用 overlapping PCR 技术, 以拟南芥 miR159a 前体为骨架, 设计特异性引物, 构建分别靶向 P25 和 HC-Pro 基因的 amiRNA 表达载体。同时构建靶向马铃薯内源基因 *Virp1* 的 amiRNA 表达载体, 将构建完成的三个 amiRNA 表达载体串联获得 amiRNAs 三联体, 分别转入根癌农杆菌菌株 *EHA105*, 并用农杆菌介导法转化马铃薯品种克新 13。经 PCR 鉴定, 结果表明, 目的基因片段已成功转入马铃薯中。

**关键词** 马铃薯, 基因沉默, 联合多抗, 马铃薯病毒, amiRNA, 遗传转化

## Construction and Genetic Transformation of Potato Virus and Viroid Multi-resistant amiRNA Binary Expression Vectors

Mu Rui<sup>1\*</sup> Liu Shangwu<sup>2\*</sup> Jiang Lili<sup>1,3</sup> Wan Shuming<sup>2</sup> Wang Shaopeng<sup>2</sup> Sun Shaohui<sup>1</sup> Li Ya'nan<sup>1</sup> Wu Liping<sup>1</sup> Jin Guanghui<sup>1\*\*</sup> Lv Dianqiu<sup>2\*\*</sup>

1 College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, 163319; 2 Institute of Plant Virus-free Seedlings, Heilongjiang Provincial Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086; 3 Postdoctoral Workstation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086

\* These authors contributed equally to this work

\*\* Corresponding authors, ghjin1122@163.com; smallpotatoes@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.015.001320

**Abstract** Potato viruses and viroid disease had seriously affected the production of potato in China. In order to cultivate virus and viroids antiviral new materials of potato. In this study, we utilized the strategy of artificial miRNA (amiRNA) with the silencing suppressor P25 protein and HC-pro protein which encoded by potato viral pathogens potato virus X (PVX) and potato virus Y (PVY) as the target, and we utilized 5'RACE technique to forecast the potential shear hot spots of P25 gene and HC-Pro gene. Then we used overlapping PCR technology, and also using *Arabidopsis thaliana* miR159a precursor as skeleton to design specific primers, so we could construct amiRNA expression vector which was respectively targeting P25 and HC-Pro genes. We constructed the amiRNA expression vector targeting the endogenous gene *Virp1* of potato at the same time. And we could obtain amiRNAs three by seriesing three amiRNA expression vector which were construction completed. And then we transferred

基金项目: 本研究由黑龙江省省院合作项(HZ201312)和黑龙江省博士后资助经费(LBH-Z14191)共同资助

引用格式: Mu R., Liu S.W., Jiang L.L., Wan S.M., Wang S.P., Sun S.H., Li Y.N., Wu L.P., Jin G.H., and Lv D.Q., 2017, Construction and genetic transformation of potato virus and viroid multi-resistant amiRNA binary expression vectors, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 15(4): 1320-1326 (牟芮, 刘尚武, 姜丽丽, 万书明, 王绍鹏, 孙少慧, 李雅南, 吴立萍, 金光辉, 吕典秋, 2017, 多抗马铃薯病毒及类病毒的 amiRNA 双元表达载体的构建及遗传转化, 分子植物育种, 15(4): 1320-1326)

into the *Agrobacterium* strain *EHA105* respectively, we used *Agrobacterium* mediated transformation of potato varieties Kexin13. Detected by PCR, the results showed that the target gene was successfully transferred into potato.

**Keywords** Potato, Gene silencing united multi-resistant, Potato virus, amiRNA, Genetic transformation

马铃薯病毒病害及类病毒病害已成为马铃薯产量减少、块茎品质下降及种薯品质退化的主要因素。其中,马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)一般可引起产量损失 10%左右,马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)引起的产量损失可达 50%,PVX-PVY 复合侵染造成的症状和损失更加严重,可达到 80% (李奇科, 2009)。马铃薯纺锤块茎类病毒病(potato spindle tuber viroid, PSTVd)强致病系可减产高达 60% (吕典秋, 2009)。

PVX 和 PVY 是单链的正义 RNA 病毒, 分别属于 *Potexvirus* 和 *Potycirus* 病毒属。PVX 和 PVY 分别编码沉默抑制子蛋白 P25 和 HC-Pro (Brigneti et al., 1998)。在 PVX 中,P25 是运动蛋白, 其参与了 PVX 的细胞间侵染并可以阻止转录后基因沉默系统信号的传递(Voinnet et al., 2000)。HC-Pro 是 PVY 在植株中的长距离运输所必需的, 并且可以抑制寄主的基因沉默防卫反应(Kasschau and Carrington, 1998)。抑制子的表达削弱了沉默反应的效率, 对于病毒在寄主内的侵染和扩散是必不可少的(Vazquez et al., 2002; Ai et al., 2011)。有研究表明,马铃薯纺锤块茎类病毒(potato spindle tuber viroid, PSTVd)是单链环状的 RNA 分子,359 nt,在寄主的细胞核中依赖寄主因子进行滚环复制,不编码任何蛋白,不能指导合成 RNA 沉默抑制子, 但马铃薯中存在的植物转录因子类病毒 RNA 结合蛋白 1 (viroid RNA-binding protein 1, Virp1)具有 RNA 结合活性,能与 PSTVd 结合。Virp1 具有核定位信号,可以进出细胞核。PSTVd 与 Virp1 结合后, 由 Virp1 携带 PSTVd 进入寄主细胞核中进行复制,因此,Virp1 在 PSTVd 的复制过程中起重要作用。综上所述,抵抗 PSTVd 入侵,虽然不能通过靶向敲除沉默抑制子来实现, 但可以通过沉默植物中的 *virp1* 基因,间接获得 PSTVd 抗性。

microRNA 是 RNA 沉默机制中的一种主要的小 RNA, 利用小 RNA 靶向与其互补的 mRNA 来进行剪切, 可以抑制蛋白质的翻译或产生 DNA 水平的修饰(张献贺等, 2014), 诱导转录水平的基因沉默或转录后的基因沉默。已经有研究证明, 在成熟的 miRNA 中, 只要前体茎环结构中最初的碱基对保持不变, 序列中几个核苷酸的改变不会影响其生物学特性。这就使得了改变天然的 miRNA 序列, 创造

amiRNA 来靶向任意的目的基因成为了可能(Liu et al., 2010)。

人工 miRNA 的作用机制是利用天然 miRNA 前体发夹结构, 将 miRNA 前体骨架替换成人为设计的具有新功能的 miRNA, 通过天然 miRNA 的生成和作用途径, 产生与天然 miRNA 长度相同、但与天然 miRNA 序列完全无关的 amiRNA (李英等, 2012), 然后作用于目标靶基因, 以实现靶基因表达的抑制。利用 amiRNA 防治植物病毒、类病毒病害, 可以有效避免脱靶效应, 具有高效性、高特异性、高安全性等特点, 因此有巨大的应用潜力(王雷等, 2015)。

由于在本实验室的前期工作中已成功获得靶向 Virp1 的 amiRNA 表达载体, 所以本研究主要进行分别靶向 *p25* 基因及 *HC-Pro* 基因的 amiRNA 表达载体的构建及靶向 P25、HC-pro、Virp1 的 amiRNAs 三联体的构建。并且利用农杆菌介导法将三种 amiRNA 表达载体及 amiRNA 三联体成功的转化了马铃薯, 研究结果丰富了 amiRNA 介导的基因沉默的理论基础, 为多抗病毒及类病毒马铃薯的培育提供了方法。

## 1 结果与分析

### 1.1 P25 及 HC-pro 基因序列剪切热点分析

从携带 PVX 病毒的马铃薯中, 提取植物组织总 RNA, 以经反转录得到的 cDNA 为模板, 采用 5'RACE 方法得到所需的扩增产物, 将其连接到 PGM-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 通过 PCR 鉴定, 选取 40 个阳性克隆进行测序。测序结果显示(图 1), P25 的 40 个阳性克隆中, 有两个位点分别检测到 8 次和 11 次以及 HC-Pro 阳性克隆中被检测到 8 次, 说明这三个位点的剪切几率较大, 因此, 以这三个剪切热点作为有效靶点来设计 amiRNA。

### 1.2 靶向 P25、HC-pro 剪切热点的 amiRNA 前体的构建

根据剪切热点分析结果, 选择剪切几率较高的位点作为 amiRNA 的剪切靶点, 以 pre-miR159a 为模板设计特异引物, 分别以 *P25*、*HC-pro* 基因靶点前后 21 bp 基因序列替换 miR159 的基因序列(21 nt), 以 pre-miRNA159a 为模板, 分别进行 PCR 扩增, 将



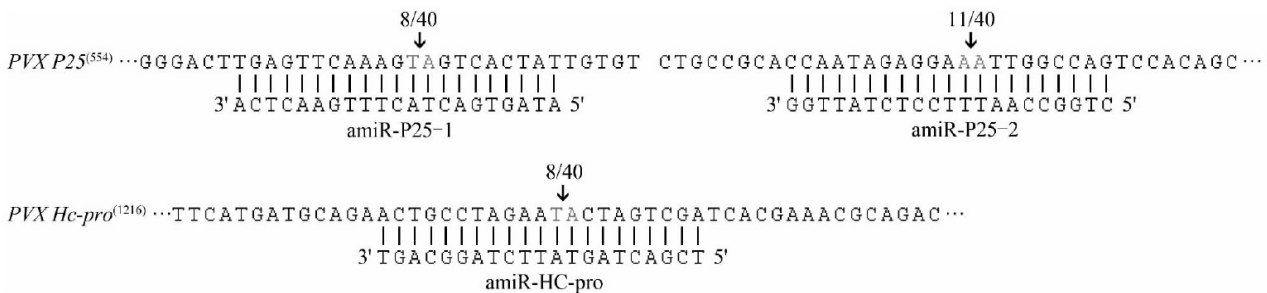


图1 基因片段序列及剪切热点分析

Figure 1 Sequence of gene fragment and analysis of shear hotspot

PCR 产物进行电泳回收, 分别克隆到 PGM-T 载体上, 进行测序验证。测序获得的阳性克隆及 pCAMBIA1300-221 双元载体通过 *Xba* I/*Spe* I 双酶切消化, 获得 pre-amiRNA 片段及 pCAMBIA1300-221 双元载体片段, 将片段回收后进行连接反应, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 进行测序验证。经过测序验证, 获得了含有靶向 *P25*、*Hc-pro* 基因剪切位点的 amiRNA 前体的双元表达载体, 分别命名为 1300221-amiR-P25-1、1300221-amiR-P25-2、1300221-amiR-Hc-pro。

### 1.3 amiRNA 三联体的构建

合成 pre-amiR-P25-1、pre-amiR-Hc-pro、pre-amiR-Virp-301 (黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所前期构建完成)三个 amiRNA 前体的串联序列, 5' 端加 *Xba* I 酶切位点, 3' 端加 *Spe* I 酶切位点。将合成的串联基因及 pCAMBIA1300-221 进行 *Xba* I/*Spe* I 双酶切消化, 酶切产物进行回收、连接, 连接产物进行测序验证。经过测序验证, 获得含有 3 个 amiRNA 前体的双元表达载体, 命名为 1300221-amiRP25/Hc-pro/virp-301

### 1.4 amiRNA 表达载体转化农杆菌及其鉴定

将获得的 5 个载体(1300221-amiR-P25-1, 1300221-amiR-P25-2, 1300221-amiR-Hc-pro, 1300221-amiR-Virp1-301, 1300221-amiRP25/Hc-pro/virp-301) 分别电击转化农杆菌菌株 *EHA105* 后, 用特异性引物进行 PCR 检测, 结果显示, 阳性对照及 1300221-amiR-P25-1、1300221-amiR-P25-2、1300221-amiR-Hc-pro、1300221-amiR-Virp1-301 4 个样品均出现大小为 198 bp 的片段, 与我们设计的目标片段相同(图 2)。同时, 1300221-amiRP25/Hc-pro/virp-301 样品分别扩增出大小约为 200 bp、400 bp、600 bp 的条带, 这是因为, 不同的 amiR 前体的特异引物之间具有较高的相似性, 只有 21 bp 的序列存在差异, 所以可以扩增出不同大小的基因, 并且它们的大小差异

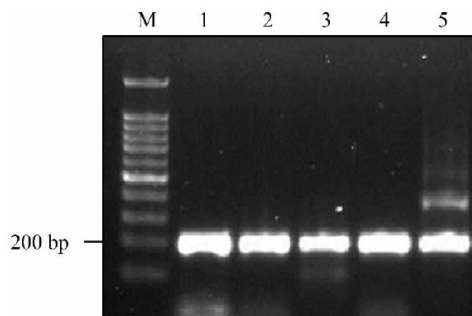


图2 5 个载体分别转化农杆菌菌株 *EHA105* 阳性克隆的 PCR 鉴定

注: M: DL100 maker; 1: 1300221-amiR-P25-1; 2: 1300221-amiR-P25-2; 3: 1300221-amiR-Hc-pro; 4: 1300221-amiR-virp1-301; 5: 1300221-amiR-P25/Hc-pro/virp-301

Figure 2 PCR identification of 5 vector positive clones respectively transformed into *Agrobacterium* strain *EHA105*

Note: M: DL100 maker; 1: 1300221-amiR-P25-1; 2: 1300221-amiR-P25-2; 3: 1300221-amiR-Hc-pro; 4: 1300221-amiR-virp1-301; 5: 1300221-amiRP25/Hc-pro/virp-301

均为 200 bp, 这充分地说明, 我们获得了 amiRNA 前体的三聚体表达载体。所有引物的扩增结果都是符合预期的, 这就可以证明目标载体已成功转入到农杆菌中。

### 1.5 农杆菌介导法转化马铃薯及 PCR 检测

利用农杆菌介导法转化马铃薯微型薯后, 在分化培养基 MS+ZT (5.0 mg/L)+IAA (1.0 mg/L)+潮霉素(30 mg/L)+头孢(300 mg/L)上, 每 15 d 继代 1 次, 直到形成抗性芽(图 3A)。将各抗性芽转入生根培养基进行继续培养, 并且在扩繁后获得了完整的抗性植株(图 3B), 进行分别提取转化不同表达载体的抗性植株基因组 DNA, 分别以特异性引物、Kan 抗性基因引物及 35S 启动子引物进行 PCR 检测, 结果显示(图 4): 未转化植株的 DNA 经 PCR 扩增, 电泳并未出现任何条带, 转基因阳性植株的 DNA 经 PCR 扩增, 都出现与转化农杆菌阳性克隆 3 种引物

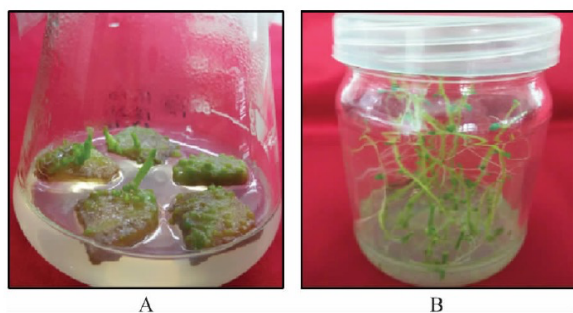


图3 转基因马铃薯植株的获得  
注: A: 薯块上发生的抗性芽; B: 抗性植株离体成苗

Figure 3 The obtain of transgenic potato plants

Note: A: Resistant buds from tuber; B: A resistant potato plantlets formed *in vitro*

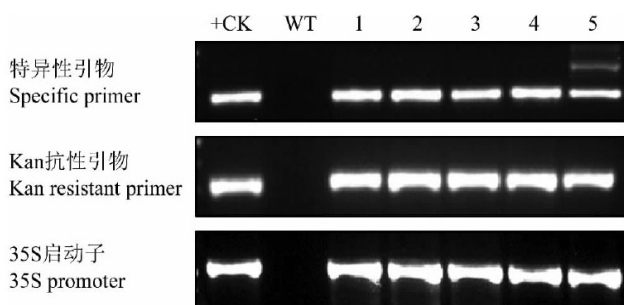


图4 转基因马铃薯阳性植株的 PCR 检测

注: +CK: 农杆菌阳性克隆的 PCR; WT: 未转化植株的 PCR; 1: 转化 1300221-amiRP25-1 植株的 PCR; 2: 转化 1300221-amiR-P25-2 植株的 PCR; 3: 转化 1300221-amiR-HC-pro 植株的 PCR; 4: 转化 1300221-amiR-virp1-301 植株的 PCR; 5: 转化 1300221-amiR-P25/HC-pro/virp-301 植株的 PCR

Figure 4 PCR detection of transgenic potato positive plants

Note: +CK: PCR of positive clones of *Agrobacterium* strain; WT: PCR of non-transformed potato; 1: PCR of transformed 1300221-amiRP25-1 positive plantlets; 2: PCR of transformed 1300221-amiRP25-2 positive plantlets; 3: PCR of transformed 1300221-amiR-HC-pro positive plantlets; 4: PCR of transformed 1300221-amiR-virp1-301 positive plantlets; 5: PCR of transformed 1300221-amiR-P25/HC-pro/virp-301 positive plantlets

PCR 结果相同大小的条带, 这表明目标载体成功转入马铃薯中。

## 2 讨论

近年来,随着人工 miRNA 机理的逐步阐明和技术上的不断成熟,这一策略已经逐步应用到植物抗病育种中来,也取得了快速的发展,但多为针对某一特定种类病毒的。如在拟南芥中,amiRNA 抗病毒策略被第一次用于靶向芜菁黄花叶病毒(turnip yellow mosaic virus, TYMV)和芜菁花叶病毒(turnip mosaic

virus, TuMV) (Niu et al., 2006)。在本氏烟中,amiRNA 被设计来靶向黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)并且也获得了病毒抗性(Duan et al., 2008)。几种病毒协同侵染马铃薯植株的情况在生产中非常普遍,希望得到同时对多种病毒具有抗性的转基因马铃薯新品种,这就需要构建同时针对多种病毒的 amiRNA 表达载体。本研究构建了分别针对 PVX、PVY 这两病毒的表达载体,并将其 amiRNA 前体与靶向马铃薯内源基因 *Virp1* 的 amiRNA 前体串联,最终得到 amiRNA 三联体,并将 5 个载体采用农杆菌介导法直接转化马铃薯原原种,成功地获得了转基因植株。以期诱导转基因植株转录水平或转录后的基因沉默,产生分别靶向 P25、Hc-pro 与 *Virp1* 的 miRNA,同时抑制其基因的表达,增强植株沉默效率,并阻碍病毒侵染植株,获得更具广谱性的抗病植物新材料。在本研究中,获得含有同时针对 3 种马铃薯病毒及类病毒的人工 amiRNA 的转基因马铃薯,为利用基因工程技术获得抗病植物新材料奠定了基础。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

#### 3.1.1 植物与菌株来源

本研究所用的实验材料是由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供的克新 13 号马铃薯,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 为中科院微生物所郭惠珊组馈赠。

#### 3.1.2 供试载体、酶及主要试剂

PGM-T 载体购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶、碱性磷酸酶及 T<sub>4</sub> DNA 连接酶等购自 ThermoFisher 公司。质粒 DNA 小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Tiangen 公司、Taq DNA 聚合酶购自 TsingKe 公司,RT-PCR 试剂盒购自 promage 公司, RNAzol 提取液、5'RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司。植物激素为吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),玉米素(trans-zeatin, ZT),抗生素为硫酸卡那霉素(kanamycin, Kan)、潮霉素(hygromycin, Hyg)、利福平(rifampicin, Rif)、头孢噻肟(Cefotaxime sodium)。

### 3.2 P25、HC-pro 基因序列剪切热点分析

取实验室保存的携带 PVX、PVY 病毒的马铃薯,利用 TRNzol 法分别提取植物组织总 RNA,取 1  $\mu$ g 马铃薯总 RNA,进行 5'RACE Adapter 连接反



应。通过反转录得到连接产物的 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 Nest PCR 扩增, 将扩增得到的产物连接到 PGM-T 载体上, 通过热激法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性克隆培养, 进行测序。根据测序结果预测 P25 及 HC-pro 的剪切热点, 设计 amiRNA。

### 3.3 靶向 P25、HC-pro 剪切热点的 amiRNA 前体的构建

利用 RT-PCR 的方法, 将拟南芥 miR159a 的前体片段扩增出来。扩增后得到的片段凝胶电泳回收后连接到 PGM-T 载体中, 挑选正向克隆进行测序验证, 得到的质粒命名为 pGEM-T-pre-miR159a。为了构建突变后的 miR159a 前体, 我们根据所选取的剪切热点设计了以下引物(表 1), 以 pGEM-T-pre-miR159a 质粒为模板, 以这三对引物进行 PCR 扩增, 得到的片段连接到 PGM-T 载体上后挑选正向克隆进行测序验证, 命名为 PGM-T-pre-amiRNA-P25-1、PGM-

T-pre-amiRNA-P25-2、PGM-T-pre-amiRNA-HC-pro。将经过 *Bgl* II 和 *Spe* I 酶切后得到的 amiRNA 前体片段克隆到经同样酶切消化的 1300221-pre-miR159a 质粒上, 用人工 miRNA 前体代替 miR159a 的前体, 得到的重组质粒命名为 1300221-amiR-P25-1, 1300221-amiR-P25-2, 1300221-amiR-HC-pro。

### 3.4 amiRNA 三聚体的构建

将 1300221-amiR-P25-1 的质粒经 *Xba* I 和 *Spe* I 酶切后得到的 amiR-P25-1 前体克隆到经 *Spe* I 酶切消化的 1300221-amiR-HC-pro 质粒上, 筛选正向克隆得到新的重组质粒 1300221-amiR-P25/HC-pro。同样, 将 1300221-amiR-virp1-301 质粒经 *Xba* I 和 *Spe* I 消化后得到 amiR-virp1-301 前体克隆到经 *Spe* I 消化后的 1300221-amiRP25/HC-pro 重组质粒上并筛选正向克隆, 这样就得到了聚合三个 amiRNA 前体的重组质粒, 命名为 1300221-amiR-P25/HCpro/virp-301 (图 5; 图 6)。

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers used in PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	备注 Note
amiR-P25-1F	TGAGTTCAAAGCCGTCACTAT	1300221-amiRP25-1 上游引物 The upstream primer of 1300221-amiRP25-1 gene
amiR-P25-1R	TGAGTTCAAAGTAGTCACTAT	1300221-amiRP25-1 下游引物 The downstream primer of 1300221-amiRP25-1 gene
amiR-P25-2F	CCAATAGAGGATCTTGCCAG	1300221-amiR-P25-2 上游引物 The upstream primer of 1300221-amiR-P25-2 gene
amiR-P25-2R	CCAATAGAGGAAATTGGCCAG	1300221-amiR-P25-2 下游引物 The downstream primer of 1300221-amiR-P25-2 gene
amiR-HC-F	ACTGCCTAGAACCCTAGTCGA	1300221-amiR-Hc-pro 上游引物 The upstream primer of 1300221-amiR-Hc-pro gene
amiR-HC-R	ACTGCCTAGAATACTAGTCGA	1300221-amiR-HC-pro 下游引物 The downstream primer of 1300221-amiR-HC-pro gene
amiR-virp301-F	GTCTCTTACAATTAAGGCGAG	1300221-amiR-virp1-301 上游引物 The upstream primer of 1300221-amiR-virp1-301 gene
amiR-virp301-R	GTCTCTTACAACAAAGGCGAG	1300221-amiR-virp1-301 下游引物 The downstream primer of 1300221-amiR-virp1-301 gene
35S-F	TGGACGATTCAAGGCTTGCT	35S 启动子上游引物 The upstream primer of CaMV35S promoter
35S-R	TGTGCGTCATCCCTTACGTC	35S 启动子下游引物 The downstream primer of CaMV35S promoter
Kan-F	TGTCATACCACTTGTCGCC	Kanamycin 抗性基因上游引物 The upstream primer of Kanamycin gene
Kan-R	ATCGAGCTGTATGCGGAGTG	Kanamycin 抗性基因下游引物 The downstream primer of Kanamycin gene

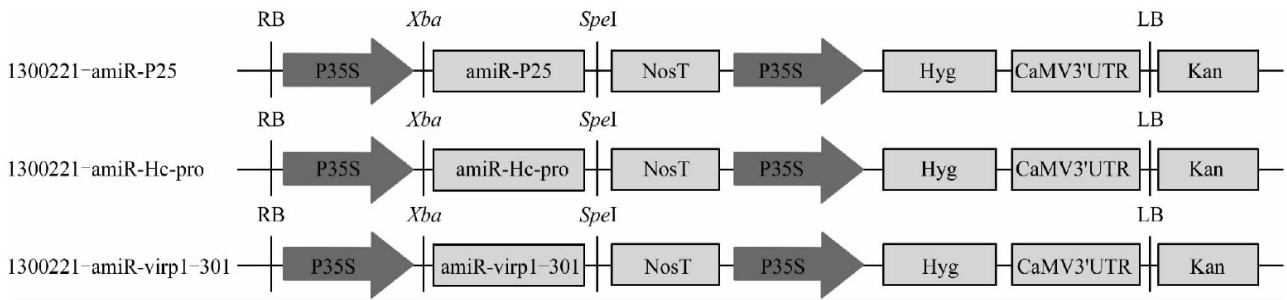


图 5 amiRNA 表达载体 1300221-amiR-P25-1, 1300221-amiR-P25-2, 1300221-amiR-HC-pro 的结构

Figure 5 Construction of amiRNA expression vectors of 1300221-amiR-P25-1, 1300221-amiR-P25-2, 1300221-amiR-HC-pro

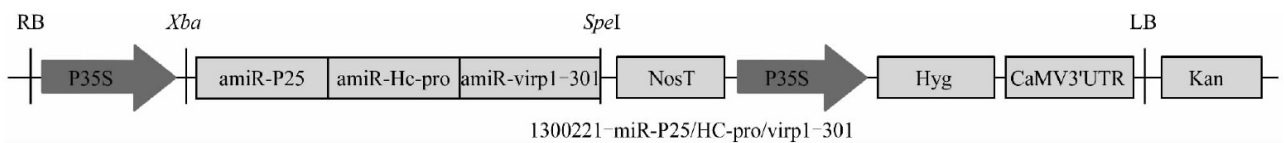


图 6 amiRNA 三联体的结构

Figure 6 Construction of triplet amiRNA expression vector

### 3.5 表达载体转化农杆菌及鉴定

利用电击法将重组质粒转化到农杆菌 *EHA105* 感受态细胞中, 转移到离心管中振荡培养 1 h 后, 均匀涂布在含有 50 mg/L Kan 和 100 mg/L Rif 的 LB 平板培养基上, 28℃ 倒置培养 48 h, 挑单克隆到含有相同浓度的 Rif 和 Kan 的 LB 液体培养基中 28℃ 振荡培养 16 h, 分别用相应的特异性引物进行菌液 PCR 鉴定, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 选择阳性克隆进行摇菌, 保存备用。

### 3.6 农杆菌介导法转化马铃薯及其转基因植株的鉴定

将农杆菌阳性菌株的单菌落活化, 将菌液振荡培养至  $OD_{600}$  值约为 0.5, 离心后收集菌体用 MS 培养基重悬。将马铃薯原原种表面进行消毒处理, 在超净台中去皮, 将薯肉切成 1 cm×1 cm×0.2 cm 的方块, 浸入农杆菌菌液中摇动侵染 5 min 后吸干多余的菌液, 摆入 MS+ZT (5.0 mg/L)+IAA (1.0 mg/L) 的培养基上暗培养 48 h, 然后转移至分化培养基 MS+ZT (5.0 mg/L)+IAA (1.0 mg/L)+潮霉素 (30 mg/L)+头孢 (300 mg/L) 进行培养, 16 h/8 h 的光周期条件下培养, 24℃, 每 15 d 继代一次, 30~40 d 内将 1 cm 的抗性芽转入生根培养基 MS+头孢 (300 mg/L) 中继续培养并扩繁, 选取长势健壮的抗性植株, 提取植物基因组 DNA, 用相对应的引物进行 PCR 检测, 2.0% Agarose 凝胶电泳分析。

### 作者贡献

牟芮和刘尚武对本研究具有同等的贡献, 是本

研究的实验设计和实验研究的执行人, 并完成数据分析, 论文初稿的写作; 金光辉和吕典秋是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 万书明和王绍鹏参与了论文的校对和定稿等工作, 姜丽丽、孙少慧、李雅南和吴立萍参与了实验方法的选取、优化与指导。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由黑龙江省省院合作项目 (HZ201312) 和黑龙江省博士后资助经费 (LBH-Z14191) 共同资助。感谢中国科学院微生物研究所郭惠珊研究员在本研究中的技术指导和实验材料的馈赠。

### 参考文献

- Ai T., Zhang L., Gao Z., Zhu C.X., and Guo X., 2011, Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants, *Plant Biology*, 13(2): 304-316
- Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W., and Baulcombe D., 1998, Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*, *The EMBO Journal*, 34(20): 6739-6746
- Duan C.G., Wang C.H., Fang R.X., and Guo H.S., 2008, Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants, *Journal of Virology*, 82(22): 11084-11095
- Kasschau K.D., and Carrington J.C., 1998, A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional



- gene silencing, *Cell*, 95(4): 461-470
- Li Q.K., 2009, RNAi-mediated multi-virus resistance in potato, Thesis for M.S., Guizhou University, Supervisor: Liu Z.Y., pp.7-9 (李奇科, 2009, RNA 干涉介导的马铃薯抗病毒研究, 硕士学位论文, 贵州大学, 导师: 刘作易, pp.7-9)
- Li Y., Hu W., Cui X.L., Wang X.J., and Wang S.Q., 2012, Progress on the artificial microRNA research, *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 23(6): 870-873 (李英, 胡伟, 崔修亮, 王学军, 王升启, 2012, 人工 microRNA 技术研究进展, *生物技术通讯*, 23(6): 870-873)
- Liu C., Zhang L., Sun J., Luo Y.Z., Wang M.B., Fan Y.L., and Wang L., 2010, A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from *Arabidopsis*, *Molecular Biology Reports*, 37(2): 903-909
- Lv D.Q., 2009, Genetic diversity of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and its induced gene silencing, Dissertation for Ph.D., Northeast Agricultural University, Supervisor: Lv W.H., pp.1-85 (吕典秋, 2009, 马铃薯纺锤块茎类病毒遗传多样性及其诱导的基因沉默, 博士学位论文, 东北农业大学, 导师: 吕文河, pp.1-85)
- Niu Q.W., Lin S.S., Reyes J.L., Chen K.C., Wu H.W., Yeh S.D., and Chua N.H., 2006, Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance, *Nature Biotechnology*, 24(11): 1420-1428
- Vazquez R.C., del Vas M., and Hopp H.E., 2002, RNA mediated virus resistance, *Plant Biotechnology*, 13(2): 167-172
- Voinnet O., Lederer C., and Baulcombe D.C., 2000, A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*, *Cell*, 103(1): 157-167
- Wang L., Liu W.X., Ji F., and Zhang Z.C., 2015, amiRNA antiviral strategy and its application in antiviral study of plants, *He'nan Nongye Kexue (Journal of Henan Agricultural Sciences)*, 44(7): 5-10 (王雷, 刘文轩, 姬峰, 张振臣, 2015, amiRNA 抗病毒策略及其在植物抗病毒研究中的应用, *河南农业科学*, 44(7): 5-10)
- Zhang X.H., Kong W.W., Li Y., and Li J., 2014, Study of gene silencing by artificial miRNA, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (4): 50-56 (张献贺, 孔稳稳, 李勇, 李晶, 2014, 人工 miRNA 沉默基因的研究, *生物技术通报*, (4): 50-56)