



研究报告

Research Report

葡萄广谱抗病毒 RNAi 载体构建及对合子胚起源的体细胞胚的遗传转化

田莉莉[✉], 牛良[✉]

中国农业科学院郑州果树研究所, 河南省果树瓜类生物学重点实验室, 农业部果树育种技术重点实验室, 郑州, 450009

✉ 通讯作者, zgstll@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2016 年, 第 14 卷, 第 7 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0007

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

田莉莉等, 2016, 葡萄广谱抗病毒 RNAi 载体构建及对合子胚起源的体细胞胚的遗传转化, 分子植物育种(online), 14(7): 1040-1048 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0007)

引用格式(英文):

Tian et al., 2016, Construction of Broad-spectrum Virus Resistant RNAi Vector of *Vitis* and Genetic Transformation to Zygotic Embryo-derived Somatic Embryos, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (online) (Molecular Plant Breeding), 14(7): 1040-1048 (doi: 10.5376/mpb.cn.2016.14.0007)

摘要 病毒病对世界葡萄生产危害严重。为创制广谱抗病毒植物新材料, 本研究采用 RT-PCR 分别克隆获得了葡萄扇叶病毒、葡萄卷叶病毒、葡萄病毒 A 和葡萄病毒 B 的外壳蛋白基因保守片段, 用重叠延伸 PCR 方法串联获得了 825 bp 的大片段“GV”, 以此串联基因片段用作干扰片段, 采用 Gateway 技术构建了同时含有 4 种病毒 CP 基因片段的 RNAi 植物表达载体“Ph12-GV”, 冻融交替法将其转入农杆菌菌株 EHA105 中。采用根癌农杆菌介导法遗传转化“红宝石无核”葡萄合子胚诱导发生的体细胞胚, RT-PCR 的检测结果显示, 目的基因片段成功转入葡萄中并在 RNA 水平上得到表达

关键词 葡萄, 抗病毒, RNAi 载体, 体细胞胚, 遗传转化

Construction of Broad-spectrum Virus Resistant RNAi Vector of *Vitis* and Genetic Transformation to Zygotic Embryo-derived Somatic Embryos

Tian Lili[✉], Niu Liang[✉]

Key Laboratory of Fruit Breeding Technology, Ministry of Agriculture of China, Henan Provincial Key Laboratory of Fruit and Cucurbit Biology, Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, 450009

✉ Corresponding author, zgstll@126.com; ✉ Author

Abstract Virus diseases have been the most serious problem for grape cultivation around the world. In order to develop novel materials of broad-spectrum virus-resistant plant, we cloned the conserved fragments of coat protein genes of grapevine fanleaf virus, grapevine leafroll virus, grapevine virus A, and grapevine virus B separately by RT-PCR, connecting them to form a big fragment of GV (825 bp) as interference fragment by overlapping PCR. Using this fragment as the interference fragment, the plant RNAi expression vector of Ph12-GV containing 4 kinds of virus CP gene fragments was constructed by gateway technology. And the RNAi vector was transformed into *Agrobacterium* strain EHA105 by alternate freezing and thawing method. Then, it was used to transform the somatic embryos which were induced from zygotic embryos of European *Vitis* c. v. Ruby Seedless by *Agrobacterium* mediated method. Results of RT-PCR showed that the target gene fragment were successfully transformed into the embryos and expressed at the RNA level.

Keywords *Vitis*, Broad-spectrum virus resistance, RNA interfere vector, Somatic embryos, Genetic transformation

研究背景

葡萄是世界上最古老的果树树种之一, 以其味美多汁、营养丰富及具有多种保健功能深受国内外消费者喜爱, 同时也是感染病毒种类最多的果树树种, 目前已知的侵染葡萄的病毒有 63 种(任芳等,

2013)。近年来, 我国葡萄产业得到迅猛发展, 病毒病的传播和发生也日益严重。据调查, 我国各大葡萄产区的主栽品种和砧木多数带毒, 部分品种带毒株率最高可达 100%, 同一品种被不同病毒复合侵染的情况也十分常见(刘晓等, 2006)。植株一旦受到病毒侵染后则会终身带毒, 持久危害, 并且目前尚无用于防治病毒病的有效药剂, 给果树产业造成严重的经济损失, 培育抗病品种无疑是解决这一问题的根本途径。

收稿日期: 2016 年 03 月 01 日

接受日期: 2016 年 04 月 04 日

发表日期: 2016 年 04 月 07 日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31071768)资助。



和传统育种技术相比较, 基因工程的应用大大提高了植物育种效率, 尤其是结合 RNA 干扰(RNAi, 一种特异性靶基因沉默技术)进行的植物基因工程育种, 已成为近年来培育抗病毒植物最有效的技术策略之一(Smith et al., 2000; 朱常香等, 2008)。但截止目前, 将 RNAi 抗病毒策略应用于葡萄基因工程的研究还不多见。

本研究针对生产中广泛存在的 4 种危险性病毒, 葡萄扇叶病毒(*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)、葡萄卷叶病毒(*Grapevine leafroll virus*, GLRaV-3)为我国葡萄的主要致病类型(蔡文启等, 1997)葡萄病毒 A(*Grapevine leafroll virus A*, GVA) 和葡萄病毒 B(*Grapevine leafroll virus B*, GVB), 分别克隆它们的外壳蛋白(*coat protein*, CP)基因保守区段, 将这些区段进行串联, 再将串联之后的片段作为干扰片段, 用于 RNA 干扰表达载体的构建; 并利用根癌农杆菌介导的方法对葡萄体细胞胚进行遗传转化, 诱导转基因植株在体内形成 dsRNA, 通过沉默入侵病毒的外壳蛋白基因阻碍其侵染过程, 从而获得具有抗病毒特性的新种质(材料)。

1 结果与分析

1.1 干扰片段获得

用葡萄总 RNA 反转录获得的 cDNA 作为 RT-PCR 反应的模板, 克隆获得了 4 个目的基因区段, 分别位于 GFLV、GLRAV-3、GVA 和 GVB 这 4 个病毒的 CP 基因保守区域。核苷酸序列比对、分析结果显示: 本试验所获得的 GFLV CP 基因的克隆片段长为 221 bp, 与登录号 AY780901.1 的全长基因一致性为 91.3%; 获得的 GLRAV-3 CP 基因片段长为 201 bp, 与登录号 HQ401017.1 的全长基因一致性为 92.5%; 获得的 GVA CP 基因片段长为 204 bp, 与登录号 AB039841.1 的全长基因一致性为 89.1%; 获得的 GVB CP 基因片段长为 199 bp, 与登录号 AB039842.1 的全长基因一致性为 91.9%。将这 4 个片段顺序连接之后, 序列测定结果显示获得的大片段 GV 长度为 825 bp (图 1)。

1.2 入门载体构建及鉴定

将连接后得到的片段“GV”进行 TOPO Cloning 之后, 用菌液进行 PCR 扩增的结果(图 2): 当以 GV-F 和 GV-R 为引物进行 PCR 扩增后, 其阳性克隆的扩增产物电泳可见约 825 bp 的条带, 与预期片段大小相符合; 而在以 M13-F 和 GV-R 作引物进行 PCR

扩增后, 电泳后出现的片段明显比插入片段要大, 结果表明 GV 片段连接进入到载体 pENTR/SD/D-TOPO 中, 即通过该步骤成功构建了入门克隆载体。进一步的核苷酸测序结果表明, “pEN-GV”上的连接片段与前期获得的“GV”片段相似度为 100%, 证实了该干扰片段以正确的方向插入到入门载体中。

```

ATGGGTGATGAGCTTTGATGCTTACAACCCGGATAACTAGTAGAATCACTGCTAGTGACG 60
ATCCTGTATACACCCTGTCAGTCCACCAITGGCTTATCCACCATAAAGITGGGCAGCTAAT 120
CATGTGAGGTAGACTATGGAGAATTATGTGTCATGCCATGTGGTTATAAACGCACAACA 180
TTTGAATCTCCAGTGTITGCAATTTACAGTGTITGACGGGCAGGTAACACTAGTGATGAAC 240
AGATGTGTAATGGCACAGCATCGGAGTACACCGAAITCTTTCCGTACACGATAGACTGCG 300
TTCTGCCGACGTACGATCTGTTCACAACGACGCAATAATAGCATGGAATTTAGTAGAC 360
AGCAAGCGCTTAGATTCAAGACCGTAACCGCCGATAACACCTTACAGAAGCTCTTCCAAC 420
TAAGGATCGCCACATTTGAGTGTTCAGTCAGCGATGGTCTGCAACGTTGGCTACATTGAGG 480
CAATTTGTCGAAACCGATGCGCAGAAATGCTTACGACTCCTCGTGCTGATGGCTGAACCTGG 540
GAACATATTCACAGTTAGCCATCAAGGATCGACACGATCAGGCATCATAGAGCCACACG 600
TTATGTTGCACTTCGCGTCCGGCTTAATAGGAGATAAGGTAGGTGGCAGAGGTTTATGATA 660
GTATGACGAACTATCAITATCACTGAACAGGTTCTAGAAGATGATCGGCTACTCGAGAGCA 720
GTGCTGGGCGTGTITTCGTAGGGCTGACGCTCCGTCAGATCTGTGTACCGATTGCTGA 780
AGAGGCTCGAGATAGCTTAACCAITTTAGCAAGCTTGAGAGTCTA 825
    
```

图 1 串联基因片段 GV 序列

Figure 1 Sequence of the tandem gene fragment of ‘GV’

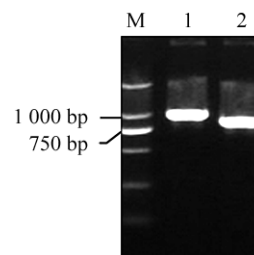


图 2 TOPO Cloning 阳性克隆的 PCR 鉴定

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性克隆以 M13-F&GV-R 作引物 PCR 扩增; 2: 阳性克隆以 GV-F&GV-R 作引物 PCR 扩增

Figure 2 PCR identification of positive clones of TOPO cloning products

Note: M: DL2000 marker; 1: Amplification of PCR products with a positive clone using primers of M13-F&GV-R; 2: Amplification of PCR products with a positive clone using primers of GV-F&GV-R.

1.3 RNAi 载体构建及鉴定

本研究中, 对 PCR 检测为阳性(电泳出现约 825 bp 条带)的阳性质粒进行酶切鉴定的结果(图 3): 重组质粒在经 *Xho I* 和 *Xba I* 单酶切后, 切下的片段大小约为 900 bp, 与未经 LR 反应的空载 Phellsgate12 酶切片大小明显不同, 而空载经 *Xho I* 酶切片大小为 1 429 bp、经 *Xba I* 酶切片大小为 1 419 bp, 各酶切片的大小符合预期结果。这表明, 本试验所构建的 RNAi 载体中, 干扰片段“GV”形成了正确的 Hairpin 结构。

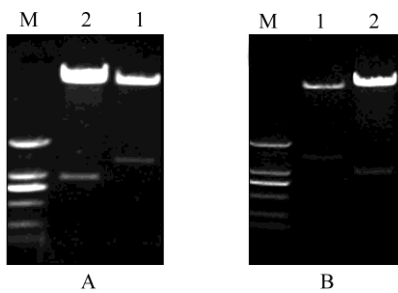


图 3 目标载体 Ph12-GV 的酶切鉴定
 注: 3-A: *XhoI* 酶切鉴定; 3-B: *XbaI* 酶切鉴定; M: DL2000 marker; 1: Ph12-GV 阳性克隆酶切; 2: Phellsgate12 空载酶切
 Figure 3 Restriction enzyme identification of the target vector Ph12-GV
 Note: 3-A: Restriction enzyme identification of *XhoI*; 3-B: Restriction enzyme identification of *XbaI*; M: DL2000 marker; 1: Enzyme digestion of the positive clones from Ph12-GV; 2: Enzyme digestion of the empty vector Phellsgate12

1.4 RNAi 载体转入农杆菌及鉴定

用“Ph12-GV”质粒转化 *Agrobacterium* 菌株 EHA105 以后, 用不同引物进行 PCR 鉴定的结果(图 4), 用 GV-F&GV-R 作引物时, 阳性克隆 PCR 扩增产物电泳出现了与干扰片段大小一致的片段(图 4A); 用 NPT II -F & NPT II -R 作引物时, PCR 扩增产物电泳出现了 714 bp 大小的条带(图 4B), 片段大小均符合预期结果, 由此说明“Ph12-GV”已转入根癌农杆菌中。

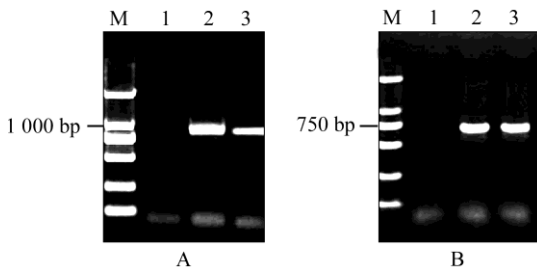


图 4 Ph12-GV 转化农杆菌菌株 EHA105 阳性克隆的 PCR 鉴定
 注: 4-A: GV-F&GV-R 作引物 PCR; 4-B: NPT II -F& NPT II -R 作引物 PCR; M: DL2000 marker; 1: EHA105 空载 PCR; 2-3: EH-GV 阳性克隆 PCR
 Figure 4 PCR identification of Ph12-GV positive clones transformed into *Agrobacterium* strain EHA105
 Note: 4-A: PCR products using primers of GV-F&GV-R; 4-B: PCR products using primers of NPT II -F& NPT II -R; M: DL2000 marker; 1: PCR products of EHA105 empty vector; 2-3: PCR products of EH-GV positive clones.

Figure 4 PCR identification of Ph12-GV positive clones transformed into *Agrobacterium* strain EHA105

Note: 4-A: PCR products using primers of GV-F&GV-R; 4-B: PCR products using primers of NPT II -F& NPT II -R; M: DL2000 marker; 1: PCR products of EHA105 empty vector; 2-3: PCR products of EH-GV positive clones.

1.5 根癌农杆菌介导法转化葡萄体细胞胚及转基因植株的 RT-PCR 检测

农杆菌介导法转化合子胚起源的葡萄体细胞胚的过程(图 5), 转化后的体胚进一步培养在添加 50 mg/L 卡那霉素的筛选培养基上(图 5E), 多数转

化后的体细胞胚在继代培养过程中生长缓慢或变褐死亡, 少数萌发后形成了抗性芽(图 5F), 部分抗性芽在生根培养基上继续培养后生长停滞或死亡, 仅有少数生长正常的抗性芽在离体条件下生根(图 5G), 并形成完整植株(图 5H)。提取再生植株幼嫩叶片中的总 RNA, RT-PCR 结果(图 6)显示, 当用内

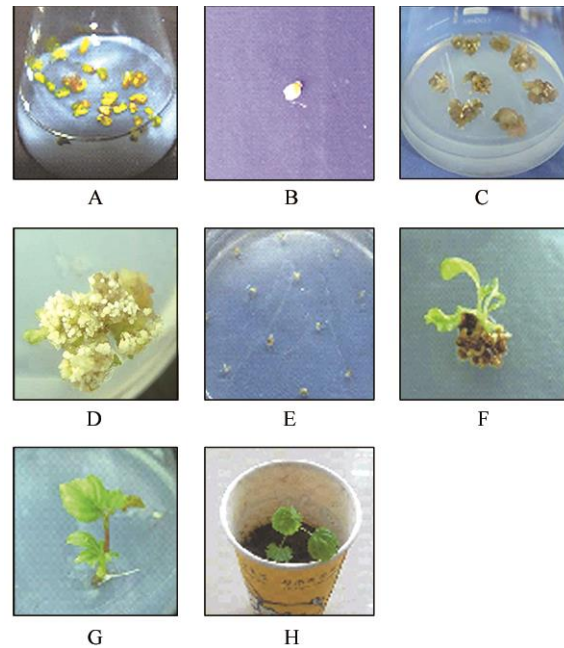


图 5 根癌农杆菌介导法转化“红宝石无核”葡萄体细胞胚
 注: 5-A-5-D: “红宝石无核”葡萄合子胚的获得及体细胞胚的诱导发生; 5-E—5-H: 体细胞胚遗传转化及再生植株的获得
 Figure 5 Somatic embryo transformation of Ruby Seedless grape by *Agrobacterium* mediated method
 Note: 5-A-5-D: Somatic embryos induced from zygotic embryos rescued from ‘Ruby Seedless’ grape; E-F: Transformation of somatic embryos by *Agrobacterium* and plant regeneration

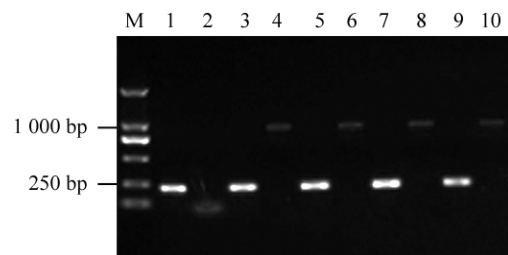


图 6 转基因植株的 RT-PCR 检测
 注: M: DL2000 marker; 1: 未转化植株以 GV-F&GV-R 作引物 RT-PCR; 2: 未转化植株以 GV-F&GV-R 作引物 RT-PCR; 3, 5, 7, 9: 转基因植株以 Actin-F & Actin-R 作引物的 RT-PCR; 4, 6, 8, 10: 转基因植株以 GV-F&GV-R 作引物的 RT-PCR
 Figure 6 RT-PCR detection of the transformed plants
 Note: M, DL2000 marker; 1: RT-PCR of untransformed plants using Actin-F & Actin-R as primers; 2, RT-PCR of untransformed plants using GV-F&GV-R as primers; 3, 5, 7, 9: RT-PCR of transformed plants using Actin-F & Actin-R as primers; 4, 6, 8, 10: RT-PCR of a transformed plants using GV-F&GV-R as primers



参基因的引物(Actin-F & Actin-R)进行扩增后, 对照植株和转基因植株都能扩增出 216 bp 大小的预期条带, 而以 GV-F&GV-R 作引物时, 对照植株的 cDNA 扩增后电泳未见条带, 转基因植株明显可见扩增片段(条带大小约为 825 bp), 显示前期构建的 RNAi 载体所携带的外源基因片段已转入到受体材料葡萄体细胞胚中, 并在转基因植株的 RNA 水平上获得表达。

2 讨论

通过本研究, 我们成功构建了含 4 种病毒 CP 基因片段 RNAi 载体, 并转化葡萄体细胞胚获得了 RT-PCR 检测为阳性的转基因植株, 有助于果树抗病基因工程研究。

在病毒的进化过程中, 外壳蛋白基因序列具有高度的保守性, 这种序列的保守性有助于维持其感染寄主的稳定性。因此, 利用植物病毒来源的基因构建载体进行遗传转化一直是植物获得抗病性的主要方法, 也是葡萄抗病毒基因工程的主要策略。目前已成功转入葡萄的基因多为病毒的外壳蛋白基因, 如 GCMV、GFLV、GLRaV-2、GLRaV-3、GVA 和 GVB 等的 CP 基因(Le Gall et al., 1994; Krastanova et al., 1995; Valat et al., 2006), 其中研究最多的是 GFLV 的 CP 基因(任芳等, 2013), 转入的基因多为单一病毒完整的 CP 基因。

近年来, 利用 RNAi 这一技术策略进行葡萄抗病毒基因工程的研究始有报道(田莉莉等, 2012; 2014)。前人的研究表明, 转化不同病毒外壳蛋白基因的全部或部分片段, 均能获得抗病的转基因植株(朱常香等, 2008)。而选取病毒基因组中相对保守的序列作为 RNAi 的靶片段, 既可以获得抗多个病毒株系的转基因植株, 又可以减少因病毒变异造成的转基因植株抗病性的丧失(Xu et al., 2009), 而且转入较小的片段更利于载体构建和遗传转化。考虑到我国葡萄生产中同一植株受到多种病毒复合侵染的情况十分常见(刘晓等, 2006), 我们分别从 4 种存在广泛的葡萄病毒外壳蛋白基因(GFLV, GLRaV, GVA 和 GVB)之中, 克隆了其保守区段, 经顺序串联形成干扰片段, 并用 Gateway 方法构建了 RNAi 载体, 转入农杆菌中获得了可用于植物遗传转化的工程菌, 最终目的是通过转基因途径获得能同时抵抗这几种病毒病害的转基因植物新材料。

自上世纪九十年代以来, 葡萄转基因技术的研究一直受到国内外研究者的关注。但与其它植物相比, 进展相对缓慢。究其原因, 再生效率低是限制葡萄遗传转化发展的瓶颈。一般认为, 葡萄的再生体系主要有器官发生和胚状体发生两种途径, 由于

后者具有单细胞起源、不易产生嵌合体等优点, 在遗传转化中具有更大的利用价值。根据已有的文献, 迄今获得的转基因葡萄大多是通过胚状体发生途径获得的(Dhekney et al., 2008; Fan et al., 2008; Gambino et al., 2010; Krastanova et al., 1995; Mauro et al., 1995)。前人的研究表明, 葡萄的许多部位如子房(Pradoa et al., 2010)、花药(Pradoa et al., 2010; Dhekney et al., 2012)等都能诱导发生体细胞胚, 并以花药诱导产生的胚状体用于遗传转化的研究最为常见。同时, 也有研究者指出, 合子胚与体细胞胚具有相似的系统发育进程, 是用于体胚发生和遗传转化的理想的原初外植体(Li et al., 2008)。本研究以“红宝石无核”葡萄通过合子胚诱导发生的体细胞胚作为受体材料, 成功进行了葡萄的遗传转化, 进一步丰富了葡萄转基因的受体材料来源。

在植物遗传转化过程中, 筛选培养基中卡那霉素(Kan)的浓度是决定转基因成败的关键。Dhekney (2008)在对圆叶葡萄的体细胞胚进行遗传转化研究时指出, Kan 在 100 mg/L 能较好地抑制非转化子的生长。我们的研究中分别在体胚萌发培养基和生根培养基中添加了 50 mg/L 和 25 mg/L 的 Kan 作为选择压, 这是因为, 我们在前期的试验中发现, “红宝石无核”的体细胞胚对 Kan 比较敏感, 当培养基中加入的 Kan 浓度偏高时, 绝大多数体细胞胚不能萌发, 或萌发后的抗性胚芽发育畸形不能成苗, 这可能是由于葡萄种间差异或体胚来源上的差异造成的。RT-PCR 检测结果显示转基因植株为阳性, 表明目的基因片段已成功转入受体细胞中并在 RNA 水平上得到表达, 说明该技术路线是可行的。

3 材料与方法

3.1 材料

提取总 RNA 所用的葡萄品种为“藤稔”, 6 年生树, 叶片采自郑州果树研究所, 转基因所用受体材料为“红宝石无核”葡萄诱导发生体细胞胚。

3.2 干扰片段的获得

依据 NCBI 数据库发布的基因序列信息(GFLV CP 基因, 登录号为 AY780901.1; GLRaV-3 CP 基因, 登录号为 HQ401017.1; GVA CP 基因, 登录号为 AB039841.1; GVB CP 基因, 登录号为 AB039842.1), 参照文献(田莉莉等, 2012; 2013; 2014)在各自的保守区域设计引物(序列信息见表 1)。从田间采集幼嫩的葡萄叶片, 用 Trizol 抽提植物总 RNA, 取 1 μg RNA, 参照 M-MLV 反转录酶(Takara 产品)说明书, 反转录合成 cDNA 第一链, 并用该 cDNA 为模板进



行 PCR 扩增和电泳分析(Agarose 浓度为 1.0%), 具体步骤参照文献(田莉莉等, 2013)进行。在紫外灯下切下目标条带, 用 DNA 回收纯化试剂盒(Takara 产品)回收后连接到 PMD19-T Vector(Takara 产品)、测序, 获得的重组质粒分别命名为 P19T-GFLV, P19T-GLRAV-3, P19T-GVA 和 P19T-GVB。利用重叠延

伸 PCR 方法将上述 4 个基因的保守区段顺序串联(技术路线见图 7), 获得的大片段(命名为“GV”)转入 PMD19-T 载体后, 采用位于序列两端的引物(P1 和 P8)来进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳, 将阳性克隆(出现 825 bp 条带)委托上海生物工程技术服务公司测序, 序列完全正确的克隆命名为“P19T-GV”

表 1 PCR 扩增所用引物

Table1 Primers used for PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	备注 Notes
P1	ATGGGTGATGAGCTTTGATGC	GFLV 上游引物 The upstream primer of GFLV gene
P2	TGCCCGTCAAACACGTGAAA	GFLV 下游引物 The downstream primer of GFLV gene
P3	GGTAAACTAGTGATGAACG	GLRAV-3 上游引物 The upstream primer of GLRAV-3 gene
P4	TAGTTGGAAGACGTTGTGTAAG	GLRAV-3 下游引物 The downstream primer of GLRAV-3 gene
P5	AGGATGCGCACATTGAGTGTTG	GVA 上游引物 The upstream primer of GVA gene
P6	TAAGCCCGACGCGAAGTCGAA	GVA 下游引物 The downstream primer of GVA gene
P7	ATAGGAGATAAGGTAGGTGGCA	GVB 上游引物 The upstream primer of GVA gene
P8	TAGACTCTCAAGCTTGCTAA	GVB 下游引物 The downstream primer of GVA gene
GV-F	<u>CACCATGGGTGATGAGCTTTGA</u>	GV 上游引物, CACC 为 TOPO 克隆所需序列接头 The upstream primer of GV gene fragment
GV-R	TAGACTCTCAAGCTTGCTAA	GV 下游引物, 同 P8 The downstream primer of GV, the same as P8
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT	通用引物 The universal upstream primer
<i>NPT II</i> -F	ACAATCGGCTGCTCTGATG	<i>NPT II</i> 上游引物 The upstream primer of <i>NPT II</i> gene
<i>NPT II</i> -R	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG	<i>NPT t II</i> 下游引物 The downstream primer of <i>NPT t II</i> gene
<i>Actin</i> -F	CCCCCATGCTATCCTTCG	<i>Actin</i> 基因上游引物
<i>Actin</i> -R	AGGCAGCTCATAGTTCTTCTC	<i>Actin</i> 基因下游引物

3.3 入门克隆载体构建及鉴定

以 GV-F(5'端加上序列接‘CACC’)和 GV-R 为上、下游引物, 对 3.2 所得“P19T-GV”质粒进行 PCR 扩增(所用聚合酶为 pfu 酶, Fermentas 产品), 进行 PCR 扩增, 退火温度 56°C, PCR 产物经 1.0%的 Agarose 凝胶电泳后将目标条带切胶回收后进行 TOPO cloning, 本试验采用 6 μmol/L 反应体系, 各组分用量按照 pENTR™/SD/D-TOPO® TOPO Cloning Kit (美国 Invitrogen 公司)说明书并参照文献(田莉莉等, 2012; 2013; 2014)进行, 加样混匀后置于温箱内 25°C

反应 25 min 后, 用热激法对 *E. coli* Top10 感受态细胞(本实验室制备)进行转化。无菌条件下将转化后的细胞均匀涂布在含 75 mg/L 卡那霉素(Kanamycin, Kan)的固体 LB 培养基上, 将涂有菌液的培养皿倒置, 37°C 过夜培养, 将单克隆挑至 Kan 浓度相同的 LB 液体培养基内, 震荡培养 14 h(培养条件为 37°C, 150 rpm), 以菌液为模板用 2 对引物(GV-F & GV-R 和 M13-F & GV-R)进行 PCR 扩增, 将扩增产物条带正确的克隆委托上海生物工程技术服务公司测序, 序列正确的阳性克隆命名为入门克隆载体“pEN-GV”。

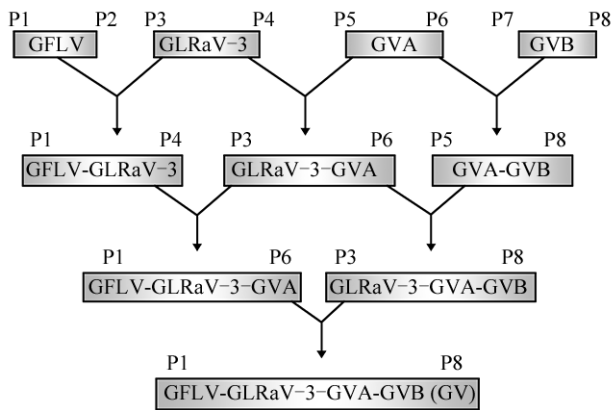


图 7 利用重叠延伸 PCR 获得目的基因干扰片段的技术路线
 Figure 7 The technology sketch of obtaining the interference fragment of target gene using via overlapping PCR

3.4 RNA 干扰载体的构建及鉴定

将目标载体 Phellsgate12(澳大利亚 CSIRO 公司产品)和步骤 3.3 获得的入门克隆载体“pEN-GV”进行 LR 反应, 具体参照 Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix Kit (美国 Invitrogen 公司)说明书及文献(田莉莉等, 2013; 2014)进行, 采用 10 μmol/L 的反应体系, 加样混匀后置于 25℃温箱内 12 h 后终止反应(加入蛋白酶 K)。热激法转化 *E. coli* Top10 感受态细胞(由本实验室制备)后, 在含 100 mg/L 壮观霉素(Spectinomycin, Spec)的 LB 固体培养基上涂布均匀, 将涂有菌液的培养皿倒置, 37℃培养 16 h 后, 将获得的单克隆接种在含 Spec 浓度相同的 LB 液体培养基, 震荡培养 14 h(37℃, 150 rpm)。以菌液为模板进行 PCR 初检, 试验所用特异引物为 GV-F & GV-R, 1.0% Agarose 凝胶电泳后, 对扩增出预期片段(GV)大小的菌液和 Phellsgate12 菌液抽提质粒, 进行进一步的单酶切鉴定, 试验所用内切酶为 *Xho I* 和 *Xba I*(均为 Takara 产品), 切出预期条带的阳性质粒命名为“Ph12-GV”(RNA 干扰载体)(结构见图 8)。

3.5 RNA 干扰载体对农杆菌的转化及鉴定

将步骤 3.4 获得的“Ph12-GV”载体质粒, 采用冻融交替方法对农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞

(由本实验室制备)进行转化, 在添加 50 mg/L 利福平(Rifampicin, Rif)和 100 mg/L Spec 的 YEB 固体培养基上涂布均匀, 将涂有菌液的培养皿倒置, 置于 28℃温箱内培养 46 h, 将获得的单克隆接种在至含有相同浓度的 Rif 和 Spec 的 YEB 液体培养基, 进行震荡培养 36 h (28℃, 180 rpm)。以菌液为模板用 2 对引物(GV-F & GV-R 和 NPT II -F & NPT II -R)分别进行 PCR 扩增和 1.0%琼脂糖凝胶电泳, 鉴定为阳性的克隆命名为“EH-GV”, 可用于农杆菌介导的植物遗传转化。

3.6 葡萄体细胞胚的诱导

花后 40 d 采集“红宝石无核”幼果, 先用流水冲洗果粒 5~10 min, 置于超净工作台上, 用 75%的酒精浸泡 1 min 后无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1%的 Hg Cl₂ 浸泡 5~8 min, 无菌水漂洗 3 次, 消毒后的果粒置于灭菌培养皿中, 无菌条件下纵剖果实, 取出胚珠, 接种在“固-液双相”的 NN 培养基上(图 5A), 培养 6 周后无菌条件下纵剖胚珠, 取出发育的合子胚(图 5B), 选择 1 mm 大小的幼胚接种在固体的 NN+0.5 mg/L, 6-BA+1.0 mg/L 24-D 培养基上诱导胚性愈伤组织, 4 周后将获得的胚性愈伤组织(图 5C)接种在固体的 NN+0.5 mg/L, 6-BA+2.0 mg/L NAA 培养基上诱导发生体细胞胚, 在胚性愈伤组织表面选择发育阶段在子叶型期的体细胞胚(图 5D)用于遗传转化。

3.7 农杆菌介导法转化葡萄体细胞胚及转基因植株检测

将 EH-GV 菌液 28℃震荡培养至 OD≈0.5, 6 000 rpm 离心 10 min 后收集菌体, 用等体积的 WPM 培养基重悬, 将体细胞胚用农杆菌菌液浸泡 8~10 min 后, 接种在 WPM 培养基上暗培养 3 d, 接种在 WPM+0.2mg/L6-BA+50 mg/LKan +200 mg/L Cef (Cefotaxime, 头孢霉素)+200 mg/L Carb (Carbenicillin, 羧苄青霉素)培养基上, 每 2 周继代一次, 光周期为 16 h/8 h, 将抗性芽转至

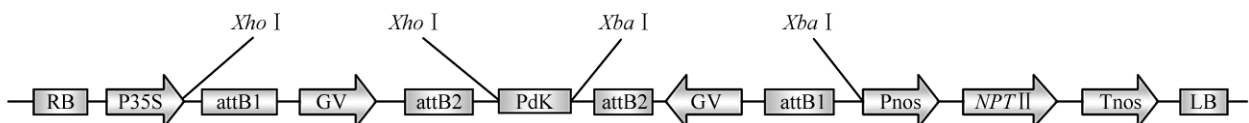


图 8 RNAi 表达载体 Ph12-GV 的结构

Figure 8 Construction of the RNAi vector Ph12-GV



1/2 MS+0.2mg/L IBA+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 的固体培养基培养 4~6 周, 培养条件同上。选择生根情况良好的幼苗, 按照步骤 3.2 所述的方法抽提植物的总 RNA 并合成第一链 cDNA, 再用该 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 引物分别为用于扩增葡萄内参基因 Actin (AF369524.1)的引物 Actin-F & Actin-R (目标片段 216 bp), 以及用于扩增干扰片段的引物 GV-F & GV-R, 产物用 1.0% Agarose 进行凝胶电泳分析。

作者贡献

田莉莉是本研究的实验设计和实验研究的主要执行人, 也是项目的构思者及负责人; 牛良协助完成了论文的写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31071768)资助。

参考文献

- Cai W.Q., Xu S.H., Mang K.Q., Meng B.Z., and Ma Y.X., 1997, Purification, serology and detection of grapevine leafroll virus, *Weishengwu Xuebao (Acta Microbiologica Sinica)*, (5): 385-392 (蔡文启, 徐绍华, 莽克强, 孟保中, 马云霞, 1997, 葡萄卷叶病毒的纯化、血清学研究及其在脱毒组培苗检测的应用, *微生物学报*, (5): 385-392)
- Dhekney S.A., Li Z.T., Dutt M., and Gray D.J., 2012, Initiation and transformation of grapevine embryogenic cultures, *Methods Mol. Biol.*, 847: 215-225
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-558-9_18
- Dhekney S.A., Li Z.T., Dutt M. and Gray D.J., 2008, Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cultures and plant regeneration in *Vitis rotundifolia* Michx. (muscadine grape), *Plant Cell Reports*, 27: 865-872
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-008-0512-2>
- Fan C.H., Pu N., Wang X.P., Wang Y.J., Fang L., Xu W.R., and Zhang J.X., 2008, Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(2): 197-206
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9324-2>
- Gambino G., Perrone I., Carra A., Chitarra W., Boccacci P., Marinoni D.T., Barberis M., Maghuly F., Laimer M., and Gribaudo I., 2010, Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosinemethylation, *Transgenic Research*, 19(1): 17-27
<http://dx.doi.org/10.1007/s11248-009-9289-5>
- Kamachi S., Mochizuki A., Nishiguchi M., and Tabei Y., 2007, Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants resistant to cucumber green mottle mosaic virus based on RNA silencing, *Plant Cell Reports*, 26(8): 1283-1288
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-007-0358-z>
- Krastanova S., Perrin M., Barbier P., Demangeat G., Cornuet P., Bardonnet N., Otten L., Pinck L., and Walter B., 1995, Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of Grapevine fanleaf nepovirus, *Plant Cell Reports*, 14(9): 550-554
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00231936>
- Le Gall O., Torregrosa L., Danglot T., Candresse T., and Bouquet A., 1994, Agrobacterium mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of Grapevine chrome mosaic nepovirus(GCMV), *Plant Science*, 102(2): 161-170
[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90034-5](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(94)90034-5)
- Li Z.T., Dhekney S.A., Dutt M., and Gray D.J., 2008, An improved protocol for Agrobacterium-mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 311-321
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9378-9>
- Liu X., Chen J., Wang J.H., and Liu J.J., 2006, Identification of virus diseases in some grapevine cultivars and evaluation of their sanitary state, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 23(6): 846-849 (刘晓, 陈建, 王建辉, 刘建军, 2006, 部分葡萄品种的病毒病鉴定及健康状况评价, *果树学报*, 23(6): 846-849)
- Mauro M.C., Toutaina S., Walter B., Pinck L., Otten L., Coutos-Thevenot P., Deloire A., and Barbier P., 1995, High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene, *Plant Science*, 112(1): 97-106
[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04246-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(95)04246-Q)
- Pradoa M.J., Grueiroa M.P., González M.V., Testillano P.S., Domínguez C., López M., and Rey M., 2010, Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia(Spain), *Scientia Horticulturae*, 125(3): 342-352
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.019>
- Ren F., Dong Y.F., Zhang Z.P., Fan X.D., Hu G.J., and Zhu H.J., 2013, Review of advances and perspectives in virus-resistant transgenic grapevine studies, *Yuanyi Xuebao*



- (Acta Horticulturae Sinica), 40(9): 1633-1644 (任芳, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 朱红娟, 2013, 葡萄抗病毒转基因研究进展, 园艺学报, 40(9): 1633-1644)
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., and Waterhouse P.M., 2000, Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature*, 407(6802): 319-320
<http://dx.doi.org/10.1038/35030305>
- Tian L.L., and Niu L., 2012, Construction of binary virus resistant RNAi expression vector and genetic transformation in tobacco, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 29(6): 39-45 (田莉莉, 牛良, 2012, 葡萄抗病毒双价 RNAi 植物表达载体构建及其对烟草的遗传转化, 果树学报, 29(6): 39-45)
- Tian L.L., and Niu L., 2013, Construction of virus resistant RNAi expression vector of Malus and genetic transformation to tobacco, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 11(6): 783-789 (田莉莉, 牛良, 2013, 苹果抗病毒 RNAi 表达载体构建及转化烟草研究, 分子植物育种, 11(6): 783-789)
- Tian L.L., and Niu L., 2014, Construction of RNA interference vector of coat protein gene of grapevine fanleaf virus and the effect evaluation in transgenic *Nicotiana benthamiana*, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 29(Supplement): 1-5 (田莉莉, 牛良, 2014, GFLV CP 基因 RNAi 载体构建及其在转基因烟草中的干涉效果, 华北农学报, 29(增刊): 1-5)
- Valat L., Fuchs M., and Burrus M., 2006, Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevinefanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation, *Plant Science*, 170(4): 739-747
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.11.005>
- Xu L., Song Y.Z., Zhu J.H., Guo X.Q., Zhu C.X., and Wen F.J., 2009, Conserved sequences of replicas gene-mediated resistance to Potyvirus through RNA silencing, *Journal of Plant Biology*, 52(6): 550-559
<http://dx.doi.org/10.1007/s12374-009-9071-5>
- Zhu C.X., Song Y.Z., and Wen F.J., 2008, Constructing transgenic tobacco for multiple resistance against potato virus Y, cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(4): 1040-1047 (朱常香, 宋云枝, 温孚江, 2008, 多抗 PVY、TMV 和 CMV 转基因烟草的培育, 中国农业科学, 41(4): 1040-1047)