

改造的马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导高度抗病性

项瑜 杨兰英* 彭学贤** 莽克强

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 提取马铃薯 Y 病毒中国分离株 (PVY-C) 的 mRNA 作为模板, 随机六聚脱氧核苷酸和寡聚 dT 为引物合成了单链 cDNA。通过聚合酶链式反应 (PCR) 获得了 PVY-C 的核内含体 b (Nib) 全长 cDNA 克隆。在对其进行全序列分析的基础上, 构建了 PVY-C Nib 基因全长, 5' 端缺失 381 个碱基和 Nib 反义 RNA 三种不同形式高等植物表达载体。在土壤农杆菌 LBA4404 的介导下, 转化烟草生产品种 NC89, 获得了所有三种表达载体的转基因植株。通过分子生物学检测和抗性分析发现不同形式的 Nib 基因序列的转基因植株对马铃薯 Y 病毒表现不同程度的抗性。其中, 以 5' 端缺失的 Nib 的基因转化植株表现最好, 从总共 20 个这类转化株系中筛选到 4 个株系至少在 100 μ g/ml PVY-C 接种浓度下, 表现完全的抗病效果。从总共 39 个全长 Nib 基因转化株系中, 仅有一个株系, 在 100 μ g/ml PVY-C 的攻毒接种下具有完全的抗病性。所有 33 个 Nib 基因反义 RNA 的转化植株中, 无一株系表现完全的抗病效果, 但是有部分株系能不同程度地延缓或减轻发病程度, 并有部分植株在发病后 50d 左右有恢复健康的趋势。虽然能够在上述 3 种形式的 Nib 基因序列的转基因植物中检测到相应的 RNA 的转录产物, 但是均未能检测到其相应的蛋白表达产物。

关键词 马铃薯 Y 病毒, 复制酶基因, 转基因植物, 抗病性

1990 年, Golemboski 等将 TMV 一个推测的编码 54kDa 蛋白的与病毒复制酶有关的基因转入烟草, 发现对 TMV 有极强的抗病性^[1]。随后在 PEBV^[2]、CMV^[3]、PVX^[4,5]、TMV^[6]和 PVY^[7,8]中都报道了这类利用与复制酶基因有关的组分转化植物获得抗性的报道。这类工作的一个共同特点是 (1) 所转入的外源基因是病毒 RNA 复制酶 (亚基) 基因或其相关片段。(2) 转基因植物内检测不到外源基因的蛋白表达产物。(3) 获得的抗病性强。

本文报道了我们利用马铃薯 Y 病毒中国分离物的复制酶基因的主要组分——核内含体 b 基因的不同改造形式转化烟草所获得的最新研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

马铃薯 Y 病毒 (中国分离物, PVY-C), 质粒 pBin438 由本实验室提供。质粒 pBlue-script SK 或 KS, 购自 Stratagene 公司。

cDNA 合成试剂盒, Taq DNA 聚合酶、限制酶, T7 DNA 聚合酶序列分析试剂盒, 同位素分别购自 Promega、Pharmacia、NEN 公司。各种寡聚脱氧核苷酸引物由本所技术室合成。

本工作得到国家自然科学基金支持并得到国际科学和文化中心世界实验室 (WL, ICSC, 日内瓦, 洛桑) 部分资助。

* 西北农业大学植保系, 咸阳 712100。

** 通讯作者。

本文于 1995 年 1 月 12 日收到。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离和病毒 RNA 的纯化：方法参照文献 [9]。

1.2.2 cDNA 的合成和 Nib 基因的克隆：以 PVY mRNA 为模板，以随机引物和 oligo (dT)₁₅ 为引物按 cDNA 合成试剂盒的要求合成 cDNA 第一条链。根据 PVYn⁽¹⁰⁾、PVY GO16⁽¹¹⁾ 的 Nib 基因序列合成 Nib 基因 5' 端 PCR 引物 (I)，根据 PVY-C 的 CP 基因⁽⁹⁾ 5' 端序列合成 Nib 基因的 3' 端引物 (I)。

引物 I：5' TAGGATCCACCATGGCTAAGCATTCTGCATG 3'

引物 II：5' GTTCTCGAGTTATGCATCAATTGTGTCATT 3'

在引物 I 中引入了 BamH I 位点，起始密码子 ATG 和 Kozak 序列-ACCATGG-，在引物 II 中引入了 Xho I 位点和终止密码子 TAA，其目的都是为了便于基因操作和高等植物体内的基因表达。

PCR 反应条件：以合成的 cDNA 为模板，I、II 为引物，94℃变性 1min，55℃复性 1min，72℃延伸 2.5min，循环 35 次后，在 72℃延伸 5min，回收特异性的约 1.6kb 的片段，克隆入 pBluescript SK 质粒的 EcoR V 位点，得重组质粒 pBSKN，经酶切分析制作相应的限制酶酶谱。利用不同的内切酶酶切 Nib 基因，亚克隆于 pBluescript SK 质粒上，按常规双脱氧链终止法进行序列测定。

1.2.3 植物表达载体的构建：在分析了 Nib 基因全长序列的基础上，构建了三种不同的 Nib 基因的表达形式。用 Xho I 和 BamH I 从质粒 pBSKN 上切下含 Nib 基因全长 cDNA 的 1.6kb 片段，插入 pBin438 的 BamH I 和 Sal I 之间，完成 Nib 基因全长 cDNA 的表达框架 (pRFL 的构建，图 1a)。将质粒 pBSKN 用 Pst I 和 Xho I 双酶切下一 1.17kb 片段 (此片段缺失 Nib 基因 5' 端 381bp)，克隆入质粒 pBluescript SK 的相应位点之间，用 SK 上的 BamH I 和 Xho I 切点切下包含此 1.17kb 片段，克隆入 pBin438 的 BamH I 和 Sal I 之间，得到包含 Nib 基因 5' 端缺失 381bp 的 cDNA 片段的植物表达载体 (pRDE，图 1b)。将质粒 pBSKN 用 BamH I 和 Sal I 双酶切回收约 1.5kb 片段 (此片段缺失 Nib 基因 5' 端的 113bp)，克隆入 pBin438 的 BamH I 和 Sal I 之间，构建了 Nib 基因反向表达载体 (pRAN，图 1c)。

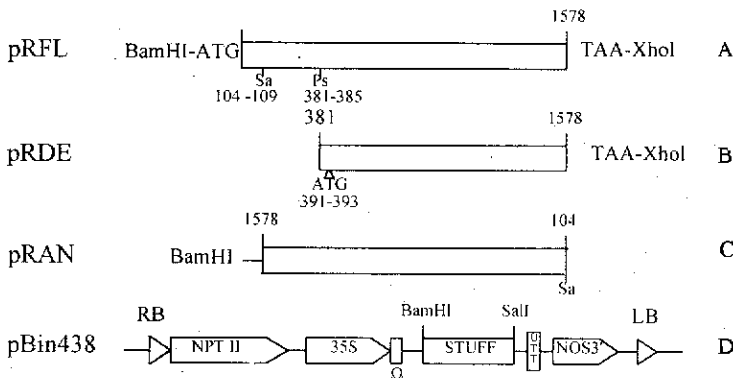


图 1 PVY-C Nib 基因的植物表达载体的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vectors for PVY-C Nib gene

A. The full length Nib gene. B. The Nib gene with 381nt deleted from the 5' terminal region,

C. The antisense gene of Nib, D. The structure of binary vector pBin438

- 1.2.4 农杆菌感受态的制备和质粒 DNA 向农杆菌的转化: 参考文献 [12]。
- 1.2.5 外源基因向烟草组织的转化及转化烟草的再生: 参考文献 [12]。
- 1.2.6 转基因植株的扩繁: 通过以上的选择步骤获得的每一株完整的转基因植株, 我们称为一个单株, 为了获得在同一遗传背景下的重复实验数据, 将所获得的若干单株取其幼嫩叶片切成若干的 1cm^2 见方的小块, 按 1.2.5 的方法进行无性扩繁得到若干株系。
- 1.2.7 PCR 检测转基因植株: 植物总 DNA 的提取方法参考文献 [12]。PCR 扩增方法及条件: 按标准 PCR 扩增反应方法进行^[13]。pRFL 的转基因植株用引物 I 和 II; pRDE 转基因植株用引物 III 和引物 I; pRAN 的转基因植株用引物 I 和引物 IV 分别进行扩增。其中, 引物 III 和 IV 是 35S 启动子和 NOS 终止子通用引物。
- 1.2.8 病毒的抗性试验和 ELISA 检测方法: 将感染 PVY-C 2~4 周的 *Nicotiana tabacum*, var. Xanthi nc.) 的烟叶, 分别加不同体积的 PBS 缓冲液研磨匀浆, 10 000r/min 离心 5min, 取上清液, 摩擦接种已在温室中生长 3~4 周左右的转基因及其对照烟草植株。接种浓度的校准按 1.2.1 所述的方法提纯出的病毒含量来估算, 每 100g 感染叶大致可提纯 2mg 病毒。所以, 我们按每 100g 感染叶含 2mg 病毒来计算攻毒浓度。同时辅以标准 ELISA 校准。
- 在对照植株发病后 (一般为接种后 7d 左右), 记录症状表现并在接种后不同时间用 ELISA 检测抗、感病情况。ELISA 检测按文献 [14] 中的双抗体夹心法。其中一抗是兔抗 PVY 病毒抗体, 二抗为羊抗兔酶标记抗体。
- 1.2.9 转基因植株的 Southern blot 分析: 植物总 DNA 的提取见 1.2.7。DNA 经内切酶酶解后, 按 Bio-Rad 公司推荐的条件进行转移, 按 HYBRID 公司提供的方法进行核酸杂交分析。探针制备: 从 pBSKN 中分离 Nib 基因 1.6kb 片段, 以 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ 为标记底物, 用寡核苷酸随机引物延伸法进行标记, 反应条件参照文献 [13]。
- 1.2.10 植物总 RNA 的提取和 Northern blot 分析: 植物总 RNA 的提取方法参考文献 [12]。用甲醛/琼脂糖电泳系统分离 RNA^[13]。按 Bio-Rad 公司推荐的条件进行电转移。按 HYBRID 公司提供的方法进行核酸杂交分析。
- 1.2.11 植物可溶性蛋白的提取和 Western blot 分析: 方法参考文献 [12]。

2 结 果

2.1 Nib 基因的克隆和序列分析

按照前面介绍的方法, 通过 RT-PCR 扩增出约 1.6kb 大小的片段 (图版 I-A), 与已报道的马铃薯 Y 病毒组 Nib 基因大小相符。将该片段经琼脂糖凝胶分离纯化后, 克隆入 pBluescript SK 质粒的 EcoRV 位点, 得到重组克隆 pBSKN。对此克隆进行内切酶图谱分析, 构建了 6 个亚克隆, 分别对其进行序列测定。结果表明 PVY-C Nib 基因由 1557 个核苷酸组成, 编码 519 个氨基酸。其核苷酸全序列及其推导出的氨基酸序列见我们 1994 年的报道^[15]。

分析 PVY-C 的 Nib 基因, 发现拥有 RNA 病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的典型保守区域及保守氨基酸^[16], 如 KXEXXXXXK (172~180); RX₁₃K (187~201); G (203); DXSXXD (248~253); GXSGXXXTXXXNS (307~320); GDD (351~353);

和 FXS (394~396) 等。PVY-C 的 Nib 基因与 PVYn^{G10}, PVY-H^{G17} 和 PVY GO16^{G12} 的 Nib 基因的核苷酸序列同源性分别为 93.51%, 84.91% 和 82.92%; 氨基酸序列的同源性分别为 94.41%, 94.99% 和 93.45%。

2.2 Nib 基因的不同构建物介导的抗病性分析

通过 Kan 抗性筛选, 共获得 39 个 pRFL (全长 Nib 基因) 的转基因烟草单株, 33 个 pRAN (Nib 基因反义 RNA) 的转化单株和 20 个 pRDE (5' 端缺失 381bp 的 Nib 基因) 的转化单株。在 1 μ g/ml 的 PVY-C 接种浓度下, pRFL 有 14 株, pRAN 有 21 株和 pRDE 有 11 株没有发病。对这些单株进行无性繁殖后, 获得上述抗性株的无性扩繁植株系, 保证每个株系的每次接种都有 10 株以上的重复结果。

对上述株系在 10 μ g/ml PVY-C 的浓度下接种发现转 pRDE 有四个株系, 即 RDE2, 5, 18 和 20 在接种后终生不发病。另有一个株系 RDE14 在所攻毒的 5 株中有 2 株表现病症, 3 株没有感病。转 pREL 的仅有一个株系 RFL14 在所接种的 12 个植株中无一株发病。对上述各株系继续用 50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 病毒接种, RDE2, 5, 18, 20 和 RFL14 仍表现绝对的抗病性, ELISA 检测不出病毒 (表 1)。

表 1 转基因植株的抗性检测

Table 1 Determination of PVY resistance in transgenic lines

Strains	Inoculum doses						
	50 μ g/ml			100 μ g/ml			
	Resistance ^{a)}	ELISA ^{b)}		Resistance		ELISA	
ratio	10dpi ^{c)}	20dpi	35dpi	ratio	20dpi	30dpi	
RFL14	15/15	0.01	0.05	0.10	10/10	0.00	0.11
RDE2	11/11	0.00	0.03	0.12	9/9	0.10	0.10
RDE5	11/11	0.00	0.07	0.15	12/12	0.07	0.09
RDE14	9/11	0.03	0.05	0.04	ND	ND	ND
RDE18	10/10	0.04	0.06	0.11	10/10	0.05	0.08
RDE20	10/10	0.02	0.08	0.10	10/10	0.06	0.10
RAN6	0/10	0.88	0.52	1.09	0/15	0.83	0.99
RAN14	0/10	1.03	0.66	1.11	0/19	1.35	1.55
RAN23	0/10	0.60	0.88	1.21	0/10	1.02	1.22
RAN33	0/10	0.50	0.61	1.19	0/10	ND	ND
+CK ^{d)}	0/15	0.92	1.02	1.37	0/15	1.72	1.60
-CK ^{e)}	15/15	0.01	0.03	0.09	15/15	0.07	0.06

a. Resistance ratio; numbers of un-infected plants/total number of inoculated plants

b. ELISA OD mean values c. Days post-inoculation

d. Infected untransformed control e. Non-infected untransformed control

将转基因植物通过自花授粉获得其 R1 代种子。取株系 RDE2 和 RDE5 的 R1 代种子在含有 300 μ g/ml Kan 的 MS 液体培养基上发芽, 获得其若干株 R1 代植株。当植株在温室中长到 3~5 片叶时, 用 50 μ g/ml 和 100 μ g/ml PVY-C 接种。发现绝大部分由 Kan 选择发芽的 R1 代转基因植株都表现抗病性。在所检测的 29 株 RDE2 中仅有 3 株感病, 31 株 RDE5 中有

表 2 部分转基因植物 R1 代抗性表现

Table 2 Estimation of PVY-C resistance of R1 generation transgenic plants

Infection ratio	Inoculum doses	50 μ g/ml 100 μ g/ml	
		50 μ g/ml	100 μ g/ml
Strains			
	RDE 2	2/14	1/15
	RDE 5	3/16	1/15
	CK	10/10	15/15

Infection ratio: numbers of infected/total number of inoculated plants

4 株发病 (见表 2)。

分别用 $10\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$ 和 $100\mu\text{g/ml}$ 的 PVY-C 对反义的转 pRAN 的各株系进行接种, 发现无一植株表现完全的抗病性。但有数个株系表现或多或少地延缓发病和减轻症状的作用。在 $10\mu\text{g/ml}$ 的攻毒浓度下, 植株 RAN6, 10, 23, 34 能延缓发病 2~4 周, RAN1, 2, 33 能延缓发病 1~3 周。在 $50\mu\text{g/ml}$ 和 $100\mu\text{g/ml}$ 的攻毒浓度下, 绝大部分的反义株系都表现感病性, 但其病症明显轻于对照, 少部分植株, 如 RAN6 和 RAN33 能稍为推迟发病 5~7d。值得注意的是, 部分反义株系虽然在接种后 30d 内检测有较高的 ELISA 值 (如表 1 中的 RAN6, RAN14, RAN23 和 RAN33), 但是生长受到的影响不明显。特别是随着株龄的增加, 表现有恢复正常的趋势。在接种后的 40d 左右发现株系 RAN1, 6, 14, 33 等, 虽然下部叶片仍表现感病, 但是上部少数叶片已无明显病症。特别是在第 70d 左右对 RAN1, 2, 6, 14, 33 的从上数的第 2, 4, 6, 8, 10 叶分别进行 ELISA 检测, 结果发现 RAN2, RAN14 的 2 至 8 叶皆无病毒, RAN6, 33 的 2, 4, 6 叶也无病毒积累。RAN1 的第 2 叶无病毒, 但第 4 叶以后都有病毒积累值。所有检测植株的 ELISA 值都比攻毒后发病初期的 ELISA 值低得多 (比较表 1 和表 3)。必须指出的是, 未转基因的对照植株和 pBin438 空载的转基因植株在 $50\sim 100\mu\text{g/ml}$ 的病毒接种浓度下, 在接种后两个月内绝大部分都已死亡, 少部分存活的对照植株也极度矮化, 生长受到极大限制。在检测 $50\mu\text{g/ml}$ 和 $100\mu\text{g/ml}$ 病毒接种后 70d 左右的 RAN 植株中病毒积累的 ELISA 值时, 所设的感病对照是同期的 $10\mu\text{g/ml}$ 病毒浓度接种的未转基因对照植株和 pBin438 空载对照植株。

表 3 部分 N1b 基因反义形式的转基因植株在
接种 $50\sim 100\mu\text{g/ml}$ PVY 后 70d 左右不同叶位的 ELISA 值

Table 3 Estimation of PVY-C resistance of transgenic antisense lines by ELISA*

ELISA OD Strains	Leaf position	2	4	6	8	10	12
RAN1		0.00	0.11	0.06	0.15	0.34	ND ^a
RAN2		0.01	0.00	0.02	0.01	0.19	0.10
RAN6		0.00	0.04	0.04	0.07	0.28	ND
RAN14		0.01	0.02	0.02	0.01	0.14	ND
RAN33		0.01	0.00	0.00	0.06	0.08	ND
+CK ^b		0.11	0.24	0.24	0.46	0.47	ND
-CK ^c		0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	ND

a. Not determined b. Untransgenic control infected with $10\mu\text{g/ml}$ PVY

c. Untransgenic control not inoculated

* ELISA OD of the leaves from different position on the plant when infected with $50\sim 100\mu\text{g/ml}$ 70 days after inoculation

2.3 转基因植物的 DNA 水平检测结果

我们对部分转基因植物进行了 PCR 检测。对转 pRDE 共检测了 9 个转基因株系 19 个样品, 全部获得阳性结果。对转 pRAN 检测了 8 个株系的 15 个样品, 有 12 个样品检

测出阳性,有3个样品未能确定其结果。对转 pRFL3 个株系的6个样品的检测中有4个阳性结果。部分 PCR 结果见图版 I-B。

提取株系 RDE2、4、5、14、18、20 的植株总 DNA,用 BamH I 和 EcoR I 双酶切消化,与标记的 Nib 基因 cDNA 探针杂交,发现在转基因植株中有至少1个多的可能到3个拷贝数的目的基因插入(见图版 I-C)。

2.4 转基因植物的 RNA 水平分析

提取部分转基因植物及其对照植物的总 RNA,以 PVY Nib 基因的 cDNA 为探针,进行 Northern blot 杂交,分析转基因植物中外源基因转录情况。在所检测 RFL 的2个株系(RFL14 和 RFL23)中均产生大约为 2.0kb 的预期的特异性 RNA 片段;RDE 的7个株系(RDE2、4、5、13、14、18、20)均产生大约 1.6kb 的 mRNA 特异的转录体;RAN 的4个株系(RAN6、14、23、33)都产生大约 1.9kb 的特异性转录产物。说明在这些转基因植物中不同形式的 Nib 基因,都能获得正常转录,但不同的株系间其转录水平有差异(见图版 I-D)。在所有相应的非转基因对照植物中均未检测到类似的特异性转录产物。

2.5 转基因植物蛋白表达水平分析

由于烟草蚀纹病毒(Tobacco etch virus, TEV)的 Nib 抗血清可以与 PVY 的 Nib 蛋白发生特异性血清反应^[18]。所以,我们利用 Florida 大学的 E. Hibert 教授惠赠的 TEV 的 Nib 抗血清与部分转基因植株的总蛋白进行 Western blot 蛋白分析。但是在对转基因植物 FRL, RDE 和 RAN 的总共 32 个样品的多次检测中,均未能检测到特异性的蛋白产生。

3 讨 论

考虑到在植物中的表达情况,我们在 Nib 基因 5'端编码第一个氨基酸的起始密码子前加上了 ATG,在 3'端加上了终止密码子 TAA。但是,在我们的检测水平下,未能检测到 Nib 基因的蛋白表达。从总共 39 个转 pRFL 的转化株系中,仅获得一个株系(占 2.56%)在 100 μ g/ml PVY-C 攻毒浓度下表现抗病效果。从总共 20 个 5'端缺失 381bp 的 Nib 基因转基因株系中至少有 4 个株系(占 20%)表现绝对抗病效果。我们注意到 5'端的 381 个核苷酸不涉及复制酶的所有保守区域,在距 5'端第 390 碱基处恰有一不引起阅读框架改变的 ATG 起始密码子(见图 1b),仔细检查缺失后的序列,未发现再有第二个可能的阅读起始区,所以, pRDE 转基因烟草应能表达除缺失部分外,与 Nib 全长基本一致的蛋白产物。

Donsion 等认为病毒系统侵染是在病毒复制达到一定的临界值的基础上才能发生,因而通过对植物或病毒的修饰降低病毒复制的方法都可以阻止病毒侵染的发展^[6]。我们未能高抗 PVY 的任何转基因的 RFL 和 RDE 植物中检测到特异性蛋白产物,这很可能与我们所使用的血清是 TEV Nib 的抗血清有关,虽然 TEV 的 Nib 抗血清可以与 PVY Nib 发生血清学反应^[18],但是其检测的灵敏度可能要低得多。我们认为,非完整或非正常复制酶基因表达产物干扰了正常的病毒复制过程仍然是复制酶基因序列介导抗病性的一个主要原因^[6]。很可能非正常表达产生的干扰,导致病毒的复制受到抑制,并可能引起病毒非正常表达和繁殖,产生功能不全的病毒体,干扰了病毒的进一步侵染、繁殖和细

胞间的运输等活动。

应用反义 RNA 的策略抑制植物病毒的侵染, 目前大多是利用病毒外壳蛋白基因的反义 RNA。由于 CP 基因常常比病毒的其它基因有更高的表达水平, 而且 CP 基因及其蛋白对病毒的复制过程及症状的表达并不是至关重要的^[19], 所以很少获得满意的结果。在马铃薯 Y 病毒中, N1b 基因与病毒的复制紧密相关, 在受侵染的植物中 N1b 蛋白的含量很低以至于目前尚未检测到。因此我们以 N1b 基因作为靶基因, 设计了利用 N1b 基因的反义形式来研究反义策略的可能作用。我们共获得了 33 个 N1b 基因反义形式的转基因烟草株系, 并在这些转基因植物中检测到 RNA 水平的转录产物。攻毒试验表明没有一个株系表现完全的抗病性, 但部分株系有延缓发病和减轻症状的作用, 并且有部分转基因植株在感病后有恢复健康的趋势。试验表明 N1b 基因的反义 RNA 确实能干扰病毒的积累和进一步的扩展。我们推测在病毒低水平的复制情况下, 靶 N1b 基因的正义转录产物很少, 转基因植物中表达的反义的转录产物与正义转录产物结合, 降低了其进一步翻译出与复制酶有关的蛋白的产量, 减弱了病毒的复制活动, 因而延缓了植物的感病时间和减轻了病症。在我们的实验中, 当用较低病毒浓度接种时, 正反映了这种可能的推测。当用高病毒浓度接种时, 侵染的初期, 由于病毒的浓度很高, 其 N1b 基因的正义转录产物也就多, 而植物中表达的反义转录产物是一定的, 无法明显表现出干扰效果, 虽然这种干扰仍然存在, 并会一直延续下去。随着植物的生长, 在新生叶片中病毒的浓度常低于老的叶片(表 2 中感病对照植株中不同叶位的病毒积累值正反映了这种趋势), 这种干扰作用开始显得越来越明显。这很可能是为什么在接种病毒第 70d 以后, 病毒在植物中的积累从下往上逐渐减弱并至终于检测不到病毒存在的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Golemboski D B, Lomonosoff G P, Zaitlin M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 6311~6315.
- [2] Macfarlane S A, Davies J W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 5829~5833.
- [3] Anderson J M, Palukaitis P, Zaitlin M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 8759~8763.
- [4] Braun C J, Hemenway C L. *The Plant Cell*, 1992, **4**: 735~744.
- [5] Longstuff M, Brigneti G, Boccard F *et al.* *The EMBO J*, 1993, **12**: 379~386.
- [6] Donson J, Kearney C M, Turpen T H *et al.* *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, **6**: 635~642.
- [7] Audy P, Palukaitis P, Slack S A *et al.* *Mol Plant-Microbe Interact.*, 1994, **7**: 15~22.
- [8] Xiang Y, Peng X X, Liu J J *et al.* ABSTRACTS in the 4th International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, 1994, Code 1527.
- [9] 周雪荣, 方荣祥, 王成球等. *中国科学, B 辑*, 1991 (11): 1174~1179.
- [10] Robaglia C, Durand-Tardif M, Tronchet M *et al.* *J Gen Virol*, 1989, **70**: 935~947.
- [12] 田颖川, 秦晓峰, 王桂玲等. *中国科学, B 辑*, 1990 (8): 822~831.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [14] 梁训生, 张成良, 张作芳编. *植物病毒血清学技术*, 北京: 农业技术出版社, 1986.
- [15] 彭学贤, 项 瑜, 刘俊君等. *生物多样性*, 1994, **2** (1): 35~37.
- [16] Bruenn J A. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**: 217~226.
- [17] Verchot J, Koonin E F, Carrington, J C. *Virology*, 1991, **185**: 527~535.
- [18] Purcifull D E, Hiebert E. *Arch Virol*, 1992, Suppl. **5**: 97~122.
- [19] Bejarano E R, Lichtenarein C P. *TIBTECH*, 1992, **10**: 383~388.

High Virus-resistance of Transgenic Tobacco Plants Mediated by Expression of Modified Nib Gene of Potato Virus Y

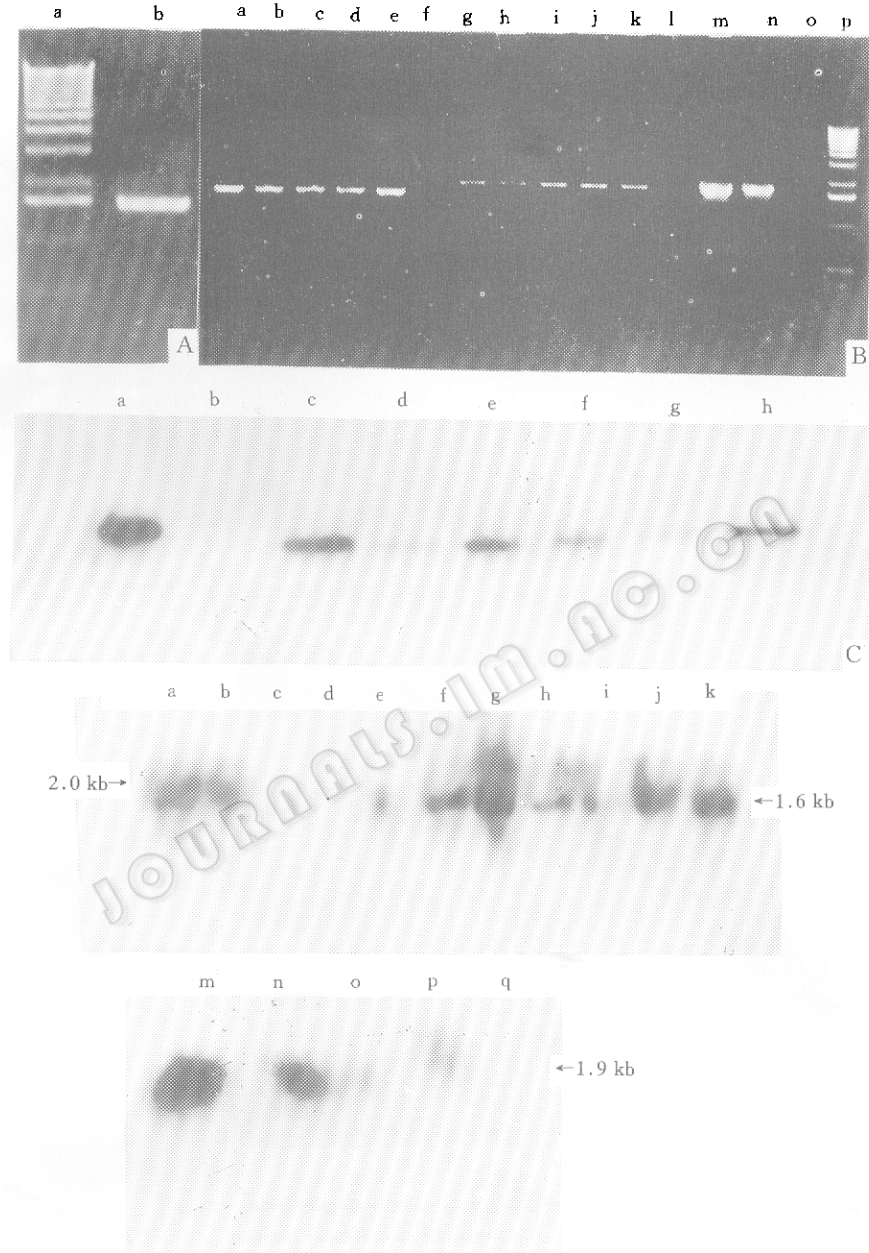
Xiang Yu Yang Lanying* Peng Xuexian Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

*(Northwestern Agricultural University, Xianyang, 712100)**

Abstract The entire nuclear inclusion b (Nib) gene of potato Y virus, Chinese isolate (PVY-C) was synthesized by polymerase chain reaction (PCR) using ss-cDNA of its genomic RNA as template. After sequence analyses to confirm the correctness of the Nib gene, three plant expression vectors harboring the full length, 381nt deleted from the 5' terminal coding region and the antisense of Nib gene were constructed, respectively. *Nicotiana tabacum* NC89 plants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying above vectors, respectively, and transgenic plants were obtained. The results of virus challenge test showed that transgenic plants derived from different forms of Nib gene displayed different degrees of PVY resistance. Among them the transgenic plants expressing 5' terminal deleted Nib gene are the best. Four lines out of total 20 in this transgenic plant group showed complete resistance at an inoculum doses of up to 100 μ g/ml PVY, the highest concentration tested. Just one line out of 39 transgenic lines of full length gene showed complete resistance to PVY-C at the same doses. None of lines from total transgenic lines of 33 antisense gene was resistant to PVY-C completely. But some of them could delay the symptom development and reduce the disease severity. Some of them could recover to normal 50 days post-inoculation. Although the specific RNA transcripts of all of the three forms of Nib gene could be found in transgenic plants, no specific proteins of the gene could be detected in them.

Key words Potato Virus Y, replicase gene, transgenic plant, resistance against virus



A. PCR amplification of PVY-C NIB gene.
 a. 1kb marker, b. PCR product

B. Identification of NIB gene fragment in transgenic tobacco by PCR.

a~e. different transgenic RDE plants 2, 5, 14, 18 and 20, f, l, o; untransformed control, g~k; different transgenic RAN plants 1, 6, 14, 23 and 33, m, n; transgenic RFL plants 14, 23

C. Southern hybridization of total DNA of transgenic tobacco with pRDE digested with BamHI & EcoRI.

a. plasmid pRDE. b. untransformed control. c~h. RDE 2, 4, 5, 14, 18 and 20, respectively.

D. Northern blot analysis of transgenic tobacco plants.

a~b; transgenic RFL plants 23, 14. c, d, q; untransformed control. e~k; transgenic RDE plants 20, 18, 14, 13, 5, 4, 2. m~p; transgenic RAN plants 6, 14, 23, 33.