

TYLCV 外壳蛋白基因植物表达载体构建及转化番茄的研究

李美芹, 裴华丽, 乔 宁, 刘永光, 薛其勤, 吕金浮

(潍坊科技学院 生物工程研发中心, 山东 潍坊 262700)

摘 要:以“特大瑞光”番茄为受体植物,采用农杆菌介导法,将含有番茄黄化曲叶病毒外壳蛋白(TYLCV-CP)基因的植物表达载体 pCambia3301 转入番茄子叶外植体,对获得的 13 株草胺抗性番茄植株进行 PCR 和 Southern Blot 技术检测。结果表明:有 10 株呈阳性检测反应,说明 TYLCV-CP 基因已整合到番茄基因组中,阳性率为 76.9%;番茄转基因植株较非转基因植株对番茄黄化曲叶病毒的抗性明显增强。

关键词:外壳蛋白基因;番茄黄化曲叶病毒(TYLCV);番茄;遗传转化

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0084-05

番茄是一种重要的蔬菜作物,在我国蔬菜周年供应中占有非常重要的地位。但近年来,在番茄主产区相继发现的番茄黄化曲叶病毒病,对番茄植株的生长、开花、坐果等方面均产生了严重的危害,甚至导致绝产。番茄一旦发生该病化学防治难以控制,给当地的番茄生产造成了毁灭性的损失,已成为世界上许多国家和地区番茄生产上的重要限制因素^[1-6]。

番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)属双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)^[4-7]。双生病毒为单链 DNA 病毒,病毒变异频率高,病毒基因组重组现象严重,重组后易产生新病毒,新病毒与原来的病毒复合侵染易导致病毒的大流行^[8-12]。

利用病毒来源的基因获得抗性转基因植物已成为植物抗病毒基因工程的重要途径。目前,通过转化病毒的 CP、复制酶(REP)以及缺陷型移动蛋白(MP)等基因已获得了烟草等多种抗病毒转基因植物。外壳蛋白是形成病毒颗粒的结构蛋白,其功能是将病毒基因组核酸包被起来,保护病毒核酸;与宿主互相识别,决定宿主范围;参与病毒的长距离运输等。自 1986 年 Abel 等^[13]首先将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白(CP)基因导入烟草

获得抗 TMV 的转基因烟草以来,科学家们陆续用黄瓜花叶病毒(CMV)、马铃薯病毒 X 和 Y、大豆花叶病毒(SMV)和苜蓿花叶病毒(AiMV)等病毒的外壳蛋白基因导入植物体后,均使转基因植物获得对相应病毒的抗性^[14]。而通过转番茄黄化曲叶病毒的外壳蛋白基因获得抗番茄黄化曲叶病毒植株的研究尚鲜见报道。现通过转番茄黄化曲叶病毒的外壳蛋白基因研究番茄抗黄化曲叶病毒的特性,以期为解决当前的番茄 TYLCV 问题奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物受体番茄品种“特大瑞光”购于寿光市金田种苗有限公司。

限制性内切酶 *Bgl*Ⅲ、*Eco*911、*T₄*-DNA 连接酶、DNA Marker 购自 MBI 公司, *Taq* DNA 聚合酶、碱性磷酸酶购自宝生物工程(中国)有限公司,植物基因组 DNA 提取试剂盒、凝胶快速纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒等均购自北京全式金公司。重组质粒载体 1304-CP 由潍坊科技学院生物工程研发中心实验室构建。

琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、卡那霉素(Kan)、头孢霉素(Cef)、草胺磷(PPT)、乙酰丁香酮(AS)、利福平(Rif)、链霉素(Str)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、3-吲哚乙酸(IAA)均购自 sigma 公司,其它试剂为国产分析纯。

引物均由北京华大基因科技有限公司合成,其序列如下: F-CP: ATGTCGAAGCGACCAGGCGAT, R-CP: ATTTGATATTGAATCATAG。

基本培养基为 MS 培养基,各培养基附加蔗糖 30 g/L,琼脂 7.5 g/L,pH 调至 5.8。种子发芽培养基:

第一作者简介:李美芹(1968-),女,山东潍坊人,博士,副教授,现主要从事生物学等研究工作。E-mail:mqli901@126.com.

基金项目:山东省高等学校科技计划资助项目(J07WG06/J09LC59/J10LC73/J12LE56);潍坊科技学院校级课题资助项目(W13K029/W13K033/W13K051);山东半岛蓝色工程研究院科研计划资助项目(sdlgy2013y014);大宗蔬菜产业技术体系资助项目(CARS-25)。

收稿日期:2014-01-20

1/2MS(仅大量元素减半);预培养基:MS+6-BA 1.5 mg/L+IAA 0.15 mg/L;共培养基:MS+6-BA 1.5 mg/L+IAA 0.15 mg/L;选择培养基:MS+6-BA 1.5 mg/L+IAA 0.15 mg/L+草胺磷(PPT)8 mg/L+羧苄青霉素(Cb)400 mg/L;生根培养基:1/2MS+IAA 0.5 mg/L+PPT 8 mg/L+Cb 200 mg/L。

1.2 试验方法

1.2.1 TYLCV 外壳蛋白基因植物表达载体的构建 用 *Bgl*Ⅱ、*Eco*911 分别双酶切植物表达载体 pCAMBIA3301 和重组质粒载体 1304-CP,琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收目的基因片段。用 T_4 -DNA 连接酶将目的基因片段插入到酶切回收后的植物表达载体 pCAMBIA3301 的 *Bgl*Ⅱ、*Eco*911 位点之间,连接产物利用冻融法转化农杆菌 LBA4404,用含有 Rif 30 mg/L、Str 30 mg/L、Kan 50 mg/L 的 YEB 平板筛选抗性克隆。

1.2.2 重组质粒的鉴定 随机挑取抗性单菌落,分别接种于 YEB+Rif 30 mg/L+Str 30 mg/L+Kan 50 mg/L 液体培养基中,28℃ 振荡培养过夜,用碱裂解法小量提取质粒,PCR 检测质粒 DNA 中是否有目的基因片段插入,以 TYLCV-CP 基因质粒为阳性对照。同时用 *Bgl*Ⅱ、*Eco*911 双酶切质粒,检测有无目的片段插入。PCR 扩增反应条件:94℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 保温 10 min,4℃ 保存。PCR 产物和酶切产物分别进行 1.0%(W/V)琼脂糖凝胶电泳检测。将鉴定为阳性的重组质粒命名为 3301-CP,并送生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 番茄外植体材料的获得 选取饱满、大小一致、新鲜的番茄种子用清水反复冲洗数次,先后用 75% 的酒精对番茄种子消毒 30 s、20% 次氯酸钠消毒 10 min,无菌水冲洗 4~5 遍,无菌滤纸吸干后,接种于种子发芽培养基中。暗培养至大多数种子发芽露白后,将其放到每天光照 16 h,光照强度 1 600~1 800 lx,温度(24±2)℃ 的条件下培养 1 周后,取番茄无菌苗的子叶,切去叶尖、叶柄,其余部分切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶块,子叶正面向上接种至诱导愈伤的培养基上进行预培养。

1.2.4 农杆菌介导 CP 基因转化番茄 挑取含有重组质粒 3301-CP 的农杆菌(LBA4404)单菌落,接种到加链霉素和卡那霉素的 10 mL 液体 YEB 中,28℃ 200 r/min 振荡培养过夜,以 1:40 加入到新鲜的无任何抗生素的 YEB 培养基中,于 28℃ 恒温摇床振荡培养 3~4 h,取液体 MS 培养基稀释 20 倍后用于侵染。收集预培养基上的子叶放在培养皿中,倒入稀释好的菌液,轻轻摇匀使外植体和菌液充分接触,侵染 10 min 后,取出子叶,置于无菌滤纸上吸去多余菌液,接种到共培养基上,28℃ 暗培养 3 d。经共培养的外植体,转入抑菌培养基上培养 7 d 后转接于筛选培养基中,每 2 周更换新鲜培养基,并

逐渐降低 Carb 浓度至 200 mg/L。经筛选再生的抗性芽长至 1.5~2.0 cm 时,将其切下并剔净基部附着的愈伤组织,接种到生根培养基上进行生根培养,待幼苗生长至 3~4 片真叶时,进行练苗,移栽至营养钵中。

1.2.5 草胺磷筛选浓度试验 在筛选培养基中分别添加 PPT 浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14 mg/L,每个浓度筛选培养基接种 10~15 个外植体;并以非转基因的材料作为对照,温度(25±2)℃,每天光照约 16 h,光照强度 3 000 lx 下培养,20 d 后观察生长情况。

1.2.6 抗性植株的 PCR 检测 再生番茄植株的基因组 DNA 采用 SDS 法微量提取^[15]。以质粒 3301-CP 作阳性对照,以未转基因的番茄基因组 DNA 为阴性对照,利用引物 F-CP 和 R-CP 对再生番茄植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增条件同 1.2.2,PCR 产物经 1.0%(W/V)琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 抗性植株的 Southern Blot 检测 对以上扩增的 PCR 产物进行 Southern Blot 检测,用生物素地高辛标记的 CP 基因杂交探针、Southern 转膜、预杂交、杂交、洗膜、检测等方法,均按 Roche 公司“DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I”中的说明进行。

1.2.8 转基因番茄的抗病性鉴定 利用烟粉虱和 PCR 反应为阳性的转 TYLCV-CP 基因的抗性番茄植株做侵染试验,以非转基因植株为对照,7、14、21 d 后进行观察。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 3301-CP 的 PCR 及酶切鉴定

经 *Bgl*Ⅱ和 *Eco*911 双酶切的质粒 1304-CP 小片段正确插入到植物表达载体 pCAMBIA3301 中,获得了阳性克隆 3301-CP(图 1)。重组质粒 3301-CP 经 PCR 扩增及酶切鉴定,均可见约 770 bp 的目的片段(图 2)。测序结果表明,该序列包含了 TYLCV-CP 基因的 777 bp 编码序列,表明经双酶切获得的质粒 1304-CP 小片段与植物表达载体 pCAMBIA3301 连接正确,没有发生移码,碱基没有改变。

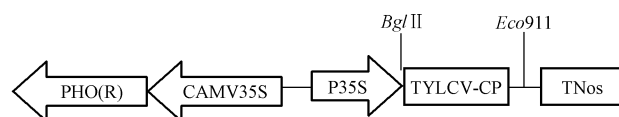


图 1 植物表达载体 3301-CP 的构建图谱

Fig. 1 The construction of 3301-CP expressing vector

2.2 草胺磷筛选浓度试验

由图 3 可知,番茄子叶对草胺磷较为敏感,当草胺磷浓度为 10 mg/L 时,尽管仍然存在子叶增厚的现象,但愈伤组织诱导率急剧下降。当草胺磷浓度为 12 mg/L 时,只有少数子叶加厚,形成愈伤组织。当草胺磷筛选浓度达到 14 mg/L 时,几乎无外植体愈伤组织长出,也

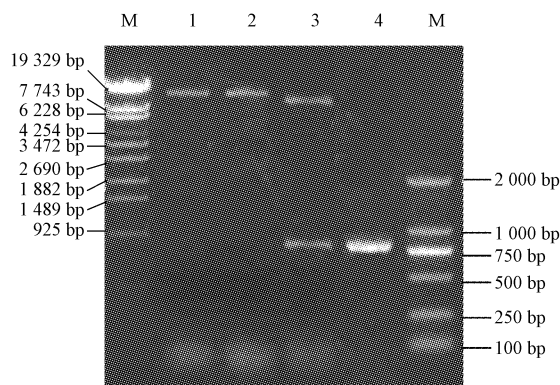


图2 植物表达载体 3301-CP 的鉴定结果

注:M;λ-EcoT14 I digest DNA Marker;1;Bg1Ⅱ 酶切的 1304-CP;2;Eco911 酶切的 1304-CP;3;Bg1Ⅱ和 Eco911 双酶切的 1304-CP;4;3301-CP 的 PCR 产物。

Fig. 2 Electrophoresis analysis of 3301-CP

Note:M;λ-EcoT14 I digest DNA Marker;1;1304-CP digested by Bg1Ⅱ;2;1304-CP digested by Eco911;3;Double digestion of 1304-CP by Bg1Ⅱ and Eco911;4;PCR products of 3301-CP.

无外植体膨大、加厚,外植体在 4~6 d 内相继黄化死亡。

为了抑制杀死非转化细胞,同时又保证转化细胞能正常生长,必须确定合适的草胺磷筛选浓度。当草胺磷浓度为 8 mg/L 时,只有少数子叶有愈伤组织长出,而非转基因的阴性对照则黄化死亡,因此草胺磷浓度为 8 mg/L 是较合适的筛选浓度。在番茄外植体分化培养及抗性植株生根培养时继续在 8 mg/L 草胺磷浓度下筛选,转基因的番茄植株能够正常生根,而假阳性的植株黄化死亡。

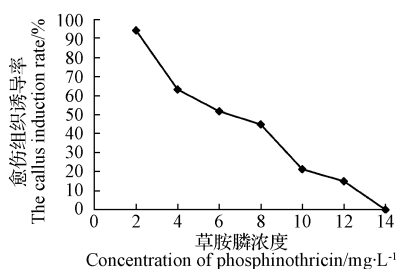


图3 草胺磷对番茄子叶愈伤组织诱导率的影响

Fig. 3 Effect of phosphinothricin on tomato calli

2.3 抗性番茄植株的 PCR 检测

将草胺磷筛选呈阳性的 13 株组培苗移栽到营养钵中,提取 13 株草胺磷抗性番茄植株叶片及阴性对照的番茄基因组 DNA,以 TYLCV-CP 基因的质粒 DNA 为阳性对照,进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,由图 4 可知,13 株抗性植株中,有 10 株能扩增出与质粒 DNA 大小一致的 770 bp 左右的条带,而阴性对照和另外 3 株均未扩增出任何条带,说明 TYLCV-CP 基因已整合到番茄基因组中,阳性率为 76.9%。

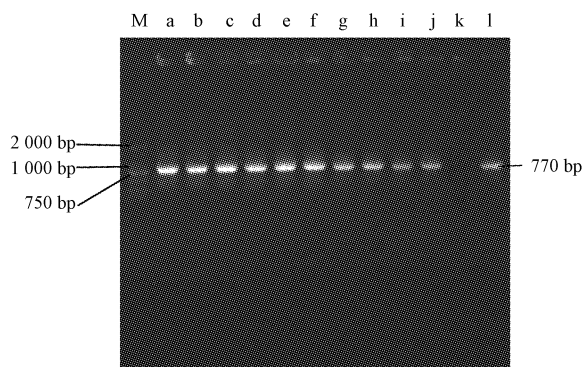


图4 转基因番茄的 PCR 检测

注:M;DL 2 000 DNA marker,下同;a~j:转 TYLCV-CP 基因的番茄植株;k:非转基因植株;l:阳性对照(质粒)。

Fig. 4 PCR analysis on transformed plants

Note:M;DL 2 000 DNA marker, the same below;a-j: Transformed plants of TYLCV-CP gene; k: Non-transformed plants; l: Positive CK (Plasmid 3301-CP).

2.4 抗性番茄植株的 Southern 杂交分析

随机选取 3 株 PCR 反应呈阳性的转基因植株和非转基因植株为样品,用生物素地高辛标记的 CP 基因杂交探针进行 Southern Blot 杂交。PCR 扩增的外壳蛋白基因产物用外壳蛋白基因 cDNA 探针进行杂交。由图 5 可知,转基因植株针对该基因都出现了杂交信号,说明外壳蛋白基因(CP)已经整合进番茄的基因组。

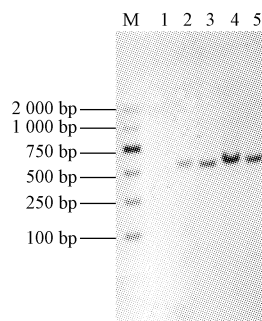


图5 转基因植株 Southern Blot 检测

注:1:非转基因植株;2:阳性对照(质粒);3~5:转基因植株。

Fig. 5 Southern Blot analysis on transformed plants

Note:1:Non-transformed plants;2:Positive CK(Plasmid 3301-CP);3~5:Transformed plants of TYLCV-CP gene.

2.5 转基因番茄的抗病性鉴定

通过观察,侵染 7 d 后转基因及非转基因植株叶片均未发现有异常变化。14 d 后发现非转基因番茄植株叶片出现轻微黄化,转基因植株叶片未发现有异常变化。21 d 后非转基因番茄植株叶片表现出典型的黄化卷曲症状,转基因植株叶片未发现有异常变化(图 6)。表明转基因番茄的抗病性比非转基因植株明显地增强。

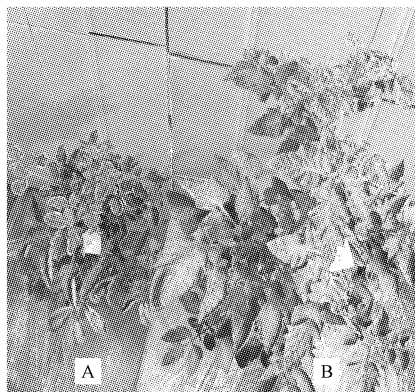


图6 转基因 21 d 番茄叶片症状

注:A:非转基因番茄植株; B:转 CP 基因番茄植株。

Fig. 6 The disease symptoms of tomato leaves
(21 d after inoculation)

Note: A: Non-transformed plants; B: Transformed plants of TYLCV-CP gene.

3 讨论

该研究成功将利用草胺磷筛选抗性的 Bar 基因与 TYLCV 的 CP 基因链接构建植物表达载体。草胺磷属于有机磷类除草剂,是一种高效、低毒的广谱除草剂,能强烈抑制细菌和植物的氨基酸生物合成酶-谷氨酰氨合成酶(Glutamyl synthetase GS)的活性^[16]。GS 活性降低导致细胞内氨的含量迅速积累,而氨的积累直接抑制光系统反应,减少跨膜 pH 梯度,使光合磷酸化解偶联,随之叶绿体结构解体,植物死亡^[17]。由于细胞对抗生素的解毒作用导致的交叉保护,易引起未转化植株和嵌合体也会通过抗生素筛选。有研究表明草胺磷筛选克服了其它抗生素筛选的局限性,细胞产生的假阳性较少^[18]。该研究从选择培养基上获得的 13 株再生植株中经 PCR、Southern Blot 验证有 10 株呈阳性,较其它抗生素筛选阳性率高,阳性率达 76.9%。该研究结果与 Xu 等^[18]的研究结果一致。

Hackland 等^[19]有研究表明,大多数表达 CP 基因的转基因植物对 CP 基因来源的病毒株系及其亲缘关系近的株系才有抗性或者抗性较强。番茄黄化曲叶病毒属于双生病毒,在全世界广泛分布。目前至少有 39 个国家的棉花、木薯和番茄等作物正在遭受此病毒的毁灭性危害,目前尚无有效药剂及措施用于该病的防治。该研究运用农杆菌转化技术把 TYLCV-CP 基因导入番茄,获得的转基因番茄植株表现出对 TYLCV 的高抗性,不仅为进一步利用番茄转基因技术选育抗番茄黄化曲叶病毒的新品种奠定了研究基础,同时也为利用植物转基因技术选育抗双生病毒的植物新品种提供了借鉴,具有较好的应用前景。

王慧中等^[20]研究发现不同转基因品系产生外壳蛋白的量并不相同,且凡外壳蛋白表达量高的株系其对相

应病毒的抗性也高。而该研究获得的转 TYLCV-CP 基因的番茄植株较非转基因植株抗病性明显增强,是否是因为该植株外壳蛋白表达量高所致需要做进一步研究。

参考文献

- [1] 龚一帆. 威胁番茄生产的新病害-番茄黄化曲叶病毒病[J]. 中国蔬菜, 2009(21): 1-4.
- [2] 李廷刚, 李长松. 番茄黄化曲叶病毒研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 90-94.
- [3] 张爱红, 张书敏, 刘帅. 2009 年河北省番茄黄化曲叶病毒病发生危害和分布[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 127-129.
- [4] 蔡健和, 秦碧霞, 朱桂宁, 等. 番茄黄化曲叶病毒病在广西爆发的原因和防治策略[J]. 中国蔬菜, 2006(7): 47-48.
- [5] 何自福, 虞皓. 警惕广东番茄烟粉虱传双生病毒病的发生[J]. 广东农业科学, 2003(4): 41-43.
- [6] 赵统敏, 余文贵, 周益军, 等. 江苏省番茄黄化曲叶病毒病(TYLCD)发生与诊断初报[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 654-655.
- [7] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. New York, Dan Diego: Academic Press, 2000: 285-297.
- [8] Harrison B D, Robinson D J. Natural genomic and antigenic variation in whiefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses) [J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37: 369-398.
- [9] Moriones E, Navas-Castillo J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide[J]. Virus Research, 2000, 71(1): 123-134.
- [10] Moriones E, Navas-Castillo J. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide[J]. Virus Res, 2007, 1(1-2): 123-134.
- [11] Crescenzi A, Comes S, Napoli C, et al. Severe outbreaks of tomato yellow leaf curl Sardinia virus in Calabria, Southern Italy[J]. Commun Agric Appl Bio Sci, 2004, 69(4): 575-580.
- [12] Morales F J, Anderson P K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America[J]. Arch Virol, 2001, 146(3): 415-441.
- [13] Abel P 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, 233: 738-743.
- [14] Nelson R S, Abel P P, Beachy R N. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus[J]. Virology, 1987, 158: 126-132.
- [15] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Thompson C J, Movva N R, Tizard R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(9): 2519.
- [17] William H A. Herbicide handbook (seventh edition) [M]. Illinois: Weed Science Society of America, 1994: 147-149.
- [18] Xu D, Xue Q, Mc Elroy D, et al. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests[J]. Molecular Breeding, 1996, 2(2): 167-173.
- [19] Hackland A F, Rybicki E P, Thomson J A. Coat protein-mediated resistance in transgenic plants[J]. Arch Virol, 1994, 139: 1-22.
- [20] 王慧中, 赵培洁, 徐吉臣, 等. 转 WMV-2 外壳蛋白基因西瓜植株的病毒抗性[J]. 遗传学报, 2003, 30(1): 70-75.

基于成熟期的桃品种遗传多样性 SSR 分析

魏 姍 姍, 刘 兴 菊, 杨 敏 生, 梁 海 永

(河北农业大学, 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

摘 要:以 95 份桃育成品种为试材, 利用 32 对 SSR 分子标记对桃育成品种进行遗传多样性分析。结果表明:筛选的 18 对 SSR 引物共检测出 93 个等位基因, 其中多态性等位基因为 50 个。桃群体的平均 Nei's 基因多样性为 0.5652, Shannon 遗传表型指数为 1.1125, 说明桃总群体遗传变异偏低。针对桃的成熟期进行遗传分析, 发现早熟和中熟类群遗传数据相似, 推测二者亲缘关系相近; 同理, 推测晚熟品种与前二者关系较远。表明桃的成熟期与其等位基因相关, 该研究结果可为进一步研究桃的遗传分析奠定基础。

关键词:桃; 简单重复序列(SSR); 遗传多样性; 成熟期

中图分类号:S 662.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0088-06

桃(*Prunus persica*)属蔷薇科李亚科植物, 是起源于我国最古老的果树之一, 其种质资源极其丰富, 分布很广, 是我国重要的果树种类, 具有很高的经济价值, 其产量和质量水平在国民经济发展中占有重要地位^[1]。

DNA 指纹图谱鉴定技术具有简便、快速、准确的特点, 可供选择的 DNA 分子标记数量多、准确性高, 不受环境的影响, 无器官发育时期的特异性等优点。目前, DNA 指纹图谱鉴定技术在农业品种鉴定中已得到广泛应用, 提升了农作物品种管理工作的水平, 促进了品种

权保护工作的开展^[2]。DNA 指纹图谱鉴定技术在林木个别树种中也进行了研究, 如有在杨树、柳树、桑树及苹果、梨、桃等果树上进行品种鉴定的报道。但分子标记技术目前主要以遗传研究为主, 在生产上实际应用的还很少, 缺少公认的品种鉴定方法和相对固定的测试用核心引物, 更缺少统一的品种鉴定技术标准^[3-4]。

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)分析技术具有染色体上分布均匀、多态性丰富、共显性、分辨率高和易于检测等优点, 自开发以来就成为最为有效构建指纹图谱的工具^[5]。到目前为止, 果树上已经在桃、苹果、梨、葡萄、猕猴桃、香蕉、栗等树种上进行了 SSR 遗传图谱构建、基因标记和定位、倍性鉴别、种质鉴定、父系分析、变异鉴定等方面的研究^[6]; 蔬菜作物上, SSR 技术广泛用于水稻、菜豆、花生、棉花、白菜、玉米等品种的鉴定和种植资源分析^[7]。SSR 技术现已广泛用于桃的品种鉴定和种群资源分类中^[8]。桃的基因组测序现已

第一作者简介:魏姍姍(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为树木分子标记及桃树指纹图库的建立。E-mail:shengfeicia@163.com.

责任作者:梁海永(1973-), 男, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事林业生物技术等研究工作。E-mail:lianghy@hebau.edu.cn.

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项资助项目(201104039)。

收稿日期:2014-01-20

Study on the Construction of Plant Expression Vector of TYLCV-CP Gene and Its Transferring Into Tomato

LI Mei-qin, PEI Hua-li, QIAO Ning, LIU Yong-guang, XUE Qi-qin, LV Jin-fu

(Biological Engineering Research and Development Center, Weifang University of Science and Technology, Weifang, Shandong 262700)

Abstract: Taking 'Tedaruiguang' tomato as material, plant expression vector 3301-CP containing TYLCV-CP genes was transferred into tomato cotyledons using Agrobacterium mediated transformation method. 13 phosphinothricin-resistant plants were constructed and were detected by PCR and Southern Blot detection. The results showed 10 transformed tomato plants were positive reaction among the 13 phosphinothricin-resistant plants, the TYLCV-CP genes had been transferred into the tomato genome, and the transformation efficiency was 76.9%. The resistance to TYLCV of transgenic tomato plants was significantly stronger than non-transgenic tomato plants.

Key words: coat protein gene; tomato yellow leaf curl virus(TYLCV); tomato; genetic transformation