

裴华丽,刘永光,乔宁,等.番茄黄化曲叶病毒 *Rep* 基因植物表达载体的构建及对番茄的遗传转化[J].江苏农业科学,2015,43(2):41-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.012

番茄黄化曲叶病毒 *Rep* 基因植物表达载体的构建 及对番茄的遗传转化

裴华丽,刘永光,乔宁,李美芹,薛其勤,杨天慧

(潍坊科技学院,山东寿光 262700)

摘要:克隆番茄黄化曲叶病毒的复制酶基因(TYLCV-*Rep*),并构建其植物表达载体,通过农杆菌介导法转入番茄子叶外植体。经过共培养、潮霉素筛选和分化再生,获得 21 株潮霉素抗性植株。PCR 检测和 Southern Blot 检测结果表明,有 3 株呈阳性检测反应,说明 TYLCV-*Rep* 基因已整合到番茄基因组中,阳性率为 14.3%。烟粉虱接种试验结果表明,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:复制酶基因;黄化曲叶病毒;番茄;遗传转化;表达载体

中图分类号:S436.412.1⁺1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2015)02-0041-04

番茄在中国各蔬菜产区均有大面积的种植,在我国蔬菜周年供应中占有非常重要的地位。随着温室大棚的推广及蔬菜反季节栽培效益的提高,温室番茄栽培面积连年增长,其病害的发生也呈现逐步加重的趋势。近年来,在番茄主产区相继发现的番茄黄化曲叶病毒,对番茄植株的生长、开花、坐果等方面均产生严重的危害,给当地的番茄生产带来巨大的经济损失^[1-6]。番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)属双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)^[4-7],是一类世界范围内广泛发生的单链环状 DNA 病毒。自 1986 年首次将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白(coat protein, CP)基因导入烟草培育出抗 TMV 植株以来,利用病毒本身的基因导入植物获得抗病毒植株已成为抗病毒基因工程的重要手段。在番茄转基因抗病育种中,主要利用病毒的外壳蛋白基因和复制相关蛋白(replication-associated protein, Rep)基因。

复制酶是指由病毒编码的,能特异合成病毒正负链 RNA 的 RNA 聚合酶,其核心功能是合成全长的病毒基因组 RNA。在病毒编码的复制酶组分中存在多个保守序列,这些序列对聚合酶的活性必不可少^[8]。自 1990 年 Golemboski 等将 TMV U1 株编码的复制酶的一部分基因序列转入烟草中,得到了高抗的烟草植株^[9]以来,人们已对许多病毒的复制酶基因介导的抗病性及其抗性机制开展了深入研究^[10-13]。但利用转番茄黄化曲叶病毒的复制酶基因来获得番茄抗黄化曲叶病毒的

实例还未见报道。本研究从番茄黄化曲叶病毒株中克隆黄化曲叶病毒的复制酶基因,并将其转入番茄中以期获得抗番茄黄化曲叶病毒植株,从根本上解决当前番茄普遍存在的病害问题,尽快培育出适合山东乃至国内主要番茄种植区的抗番茄黄化曲叶病毒株系,以满足目前番茄产业的需求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 植物受体番茄品种菜都六号购于山东省寿光市金田种苗有限公司。TYLCV 病毒样品采自山东省寿光市,番茄植株上部卷曲黄化及矮缩等具有感染番茄黄化曲叶病毒典型症状的叶片。

1.1.2 菌株与试剂 限制性内切酶 *Bgl* II、*Eco* 911、*T₄*-DNA 连接酶、DNA Marker 均购自 MBI 公司, *Taq* DNA 聚合酶、碱性磷酸酶购自宝生物工程有限公司,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。植物表达载体 pCambia1304、农杆菌 LBA4404 由山东农业大学竺晓平老师惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21 由笔者所在实验室保存。琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、头孢霉素(Cef)、潮霉素(Hyg)、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,其他试剂为国产分析纯。引物均由北京华大基因科技有限公司合成,其序列如表 1 所示。

1.1.3 培养基 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 值调至 5.8。种子发芽的培养基为 1/2MS; 预培养基为 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L; 共培养基为 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L; 选择培养基为 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Hyg 10 mg/L + Cb 400 mg/L; 生根培养基为 1/2MS + NAA 0.05 mg/L + Hyg 10 mg/L + Cb 200 mg/L。

1.2 试验方法

1.2.1 TYLCV-*Rep* 基因的克隆 用植物基因组 DNA 提取

收稿日期:2014-03-19

基金项目:国家大宗蔬菜产业技术体系建设专项(编号:CARS-25);

山东省高等学校科技计划(编号:J07WG06、J09LC59、J10LC73、J12LE56);潍坊科技学院校级课题(编号:W13K029、W13K033、W13K051);山东半岛蓝色工程研究院科研计划(编号:sdlgy2013y014)。

作者简介:裴华丽(1978—),女,山东潍坊人,硕士,讲师,主要从事蔬菜分子育种研究。E-mail:peihuali2@163.com。

通信作者:刘永光,硕士,讲师,主要从事植物病理方面的研究。E-mail:ygliu425@163.com。

表 1 供试引物的序列情况

引物	引物序列(5'→3')	备注
Rep - F	CCATTAGGTGTCCAGGTAT	
Rep - R	TACACGCTTACGCCTTAT	
Rep - 1304 - F	GC AGATCTATGCCTCGTTTATT	下划线为 <i>Bgl</i> II 酶切位点
Rep - 1304 - R	ACTAGTTTACGCCTTATTGGTTTCT	下划线为 <i>Spe</i> I 酶切位点

试剂盒提取番茄病叶总 DNA,根据 GenBank 中双生病毒序列设计引物 Rep - F 和 Rep - R,以提取的番茄病叶总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系如下:2 × Taq MasterMix 12.5 μL,Rep - F (10 pmol/L) 1.0 μL,Rep - R (10 pmol/L) 1.0 μL,模板 DNA 1.0 μL,加 ddH₂O 至终体积 25.0 μL。反应条件为:94 ℃变性 45 s,53 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃继续延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 TYLCV - Rep 基因片段的回收及克隆载体的连接、转化 用凝胶快速纯化试剂盒对符合预期大小的片段进行回收、纯化。采用冻融法将连接产物转入 TransI - T1 感受态细胞中,将菌液涂布于 LB + Tet 100 mg/L + Amp 50 mg/L 的平板上,室温放置 1 h,待菌液完全被吸收后,倒置平板放于 37 ℃ 培养过夜。

1.2.3 转化子的鉴定 从转化平板上挑取白色菌斑,用含有 50 mg/L 氨苄青霉素的液体培养基于 37 ℃ 振荡培养箱中培养 6 h,用质粒小量提取试剂盒提取质粒,用引物 Rep - F、Rep - R 进行 PCR 检测,限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Spe* I 进行双酶切鉴定阳性克隆的正确性,将含有的重组质粒阳性克隆命名为 pT - Rep - 1,并送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 植物表达载体的构建 按照图 1 所示基因图谱构建植物表达载体。用 *Bgl* II 和 *Spe* I 将 TYLCV - Rep 基因从克隆载体 pT - Rep - 1 上切下,然后与同样双酶切的植物表达载体 pCambia1304 连接后,转化至大肠杆菌中,在含有 50 mg/L Kan 抗性的平板上进行培养。挑取阳性克隆进行 PCR 及 *Bgl* II、*Spe* I 双酶切鉴定。将连接正确的重组质粒命名为 1304 - Rep,并送上海生工生物工程技术有限公司测序。

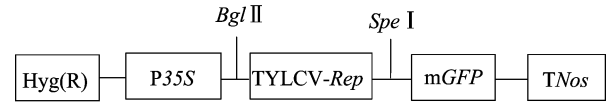


图1 1304-Rep 植物表达载体的构建图谱

1.2.5 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% 乙醇对番茄种子消毒 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,将其放到光照 16 h/d、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。

1.2.6 农杆菌介导 Rep 基因转化番茄 采用冻融法将重组

质粒 1304 - Rep 转入农杆菌 (LBA4404) 中,于 YEB + Rif 30 mg/L + Str 30 mg/L + Kan 50 mg/L 平板上 28 ℃ 培养 48 h。挑取含有重组质粒 1304 - Rep 转入农杆菌 (LBA4404) 单菌落,接种到加 Str 和 Kan 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 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 张真叶时,进行炼苗,移栽至营养钵中。

1.2.7 潮霉素筛选浓度试验 在筛选培养基中分别添加 0、2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20 mg/L Hyg,每个浓度筛选培养基接种 10 ~ 15 个外植体;在 (25 ± 2) ℃、光照约 16 h/d、光照强度 3 000 lx 条件下培养,20 d 后观察生长情况。

统计愈伤组织诱导率 and 不定芽分化率。

1.2.8 番茄抗性植株的检测

1.2.8.1 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^[14]。以质粒 1304 - Rep 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 Rep - 1304 - F 和 Rep - 1304 - R 进行 PCR 扩增,扩增条件同“1.2.3”节,PCR 产物经 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8.2 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 Rep 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 Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I”中的说明进行。

1.2.8.3 转基因番茄 T₁ 代植株的 PCR 检测 待转基因番茄 T₁ 代植株长至 2 叶 1 心时,采取尚未脱落的子叶提取基因组 DNA。利用 TYLCV - Rep 基因上对应的特异引物进行目的基因的 PCR 扩增,扩增条件同“1.2.3”节,PCR 产物经 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8.4 转基因番茄 T₁ 代植株的抗病性鉴定 2013 年 3 月在潍坊科技学院蔬菜育种基地将转基因 T₁ 番茄种子及同品种的非转基因番茄种子播种于托盘中,当待测番茄植株长到 3 ~ 4 张真叶时,分别移栽于温室大棚及繁殖保存烟粉虱的防虫温室,每个番茄材料设计 3 个重复,每个重复 10 株,植株随机排列,常规管理,分别于移栽后 7、14、21、42 d 观察叶片感病情况。

对病情调查及抗性评价时,由病级计算病情指数 (DI)。

根据 Hanson 等的分级方法^[15-16]进行病级分级。本研究以 42 d 时调查的病情指数为鉴定依据。

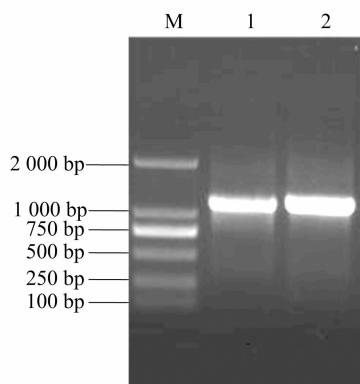
病情指数(DI) = [(各级发病株数 × 病级数) / (最高发病级数 × 调查株数)] × 100。

按病情指数(DI) 分别划分为免疫, 不侵染, $DI = 0$; 高抗(HR), $0 < DI < 6.7$; 抗病(R), $6.7 \leq DI < 20.0$; 中抗(M), $20.0 \leq DI < 33.3$; 感病(S), $33.3 \leq DI < 46.7$; 高感(HS), $46.7 \leq DI \leq 100$ 。

2 结果与分析

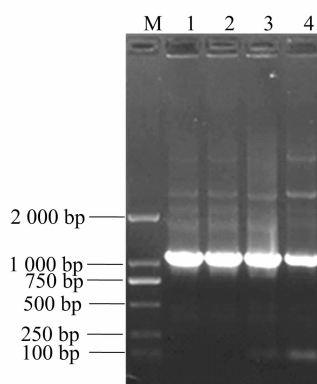
2.1 TYLCV-Rep 基因的 PCR 扩增

以 F-Rep 和 R-Rep 为引物, 番茄病叶总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到约 1 200 bp 的特异性扩增带, 与预期结果一致(图 2)。以经过 PCR 检测的重组质粒为模板, 用 Rep-1304-F 和 Rep-1304-R 为引物进行 PCR 扩增, 均得到约 1 100 bp 的片段。



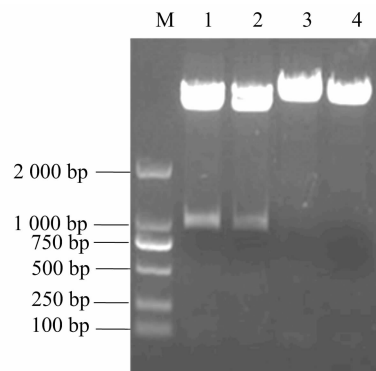
M—DNA marker (DL2000);
1~2—TYLCV-Rep 基因

图2 番茄黄化曲叶病毒 Rep 基因的扩增结果



M—DNA marker (DL2000);
1~4—TYLCV-Rep 基因的 PCR 产物

图3 番茄黄化曲叶病毒 Rep 基因重组质粒 PCR 鉴定结果



M—DNA marker (DL2000); 1~2—*Spe* I
和 *Bgl* II 双酶切; 3—重组表达载体;
4—pCambia1304 载体

图4 重组表达载体 pRep-1304 的酶切鉴定结果

2.4 潮霉素浓度筛选试验

如图 5 所示, 番茄子叶对潮霉素较敏感, 当潮霉素浓度为 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。当潮霉素浓度为 12.5 mg/L 时, 只有少数子叶加厚, 极少诱导出愈伤组织。当潮霉素筛选浓度达到 15 mg/L 时, 无外植体愈伤组织长出, 也无外植体膨大、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, 所以选择潮霉素浓度为 12.5 mg/L 作为番茄转基因材料的筛选浓度。

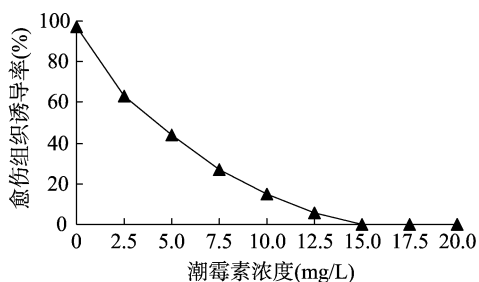


图5 潮霉素对番茄子叶愈伤组织诱导率的影响

2.2 基因序列测定及分析

将所得 DNA 序列输入 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast 检索, 选择并下载相应序列, 采用 DNASTAR、DNAMAN 和 MEGA 3.1 软件对所得到的核苷酸序列与 GenBank 中收录的相应基因的核苷酸序列进行比较和分析。结果证明, 番茄黄化曲叶病毒复制酶基因核苷酸序列 1 074 bp, 编码 357 个氨基酸, 与 GenBank 中相应的复制酶基因序列一致。

2.3 植物表达载体的构建及其转化

将构建好的 1304-Rep 转化至农杆菌, 提取重组质粒 DNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增, 分别得到约 1 100 bp 特异性扩增带(图 3), 片段大小与预期结果一致; 经 *Spe* I 和 *Bgl* II 进行双酶切均得到 1 条约 1 100 bp 的条带(图 4), 测序结果表明, 1 074 bp 的不含终止密码的 TYLCV 的 Rep 基因序列已正向插入 pCambia1304 载体中, 没有发生移码, 碱基没有改变, 与 GenBank 中报道的序列完全一致。

2.5 番茄抗性植株的检测

2.5.1 番茄抗性植株的 PCR 检测 将潮霉素筛选呈阳性的 21 株番茄植株组培苗移栽到营养钵中, 提取 21 株 (TYLCV-Rep) 潮霉素抗性番茄植株叶片及阴性对照的 DNA, 以相应质粒 DNA 为阳性对照, 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 10 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测(图 6)。结果发现, 21 株抗性植株中, 有 3 株能扩增出与质粒 DNA 大小一致的 1 200 bp 左右的条带, 而阴性对照和另外 18 株均未扩增出任何条带, 说明 TYLCV-Rep 基因已整合到番茄基因组中, 阳性率为 14.3%。

2.5.2 转基因番茄植株的 Southern Blot 检测 选取 PCR 反应呈阳性的转基因番茄植株和非转基因番茄植株叶片的总 DNA, 以非转基因番茄植株叶片总 DNA 为阴性对照, 以质粒酶切产物为阳性对照, 分别经 *Spe* I 和 *Bgl* II 进行双酶切后的酶切产物进行 Southern Blot 杂交。结果表明, 质粒及转基因番茄植株出现了相应的杂交信号, 而未转基因番茄植株则没有相应的杂交信号(图 7)。说明 TYLCV-Rep 基因都已经整合进番茄的基因组中。

2.5.3 转基因番茄 T₁ 代的 PCR 检测 转基因番茄 T₁ 代植株长至 2 叶 1 心时, 采取尚未脱落的子叶提取基因组 DNA。

利用 TYLCV-Rep 基因上对应的特异引物进行目的基因的 PCR 扩增,扩增片段长度分约为 1 200 bp,部分样品的电泳结

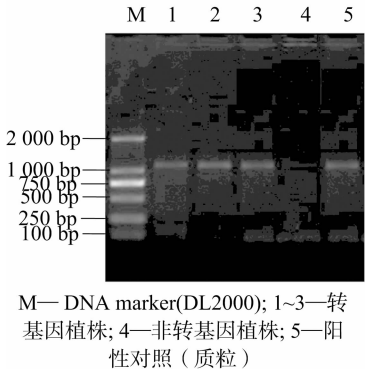


图6 番茄抗性植株 TYLCV-Rep 基因的 PCR 检测结果

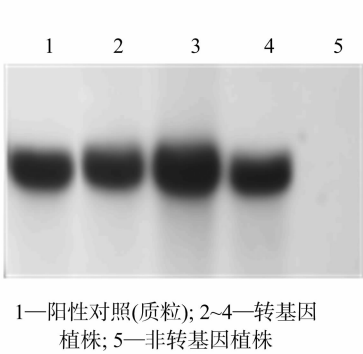


图7 转 TYLCV-Rep 基因植株的 Southern Blot 检测结果

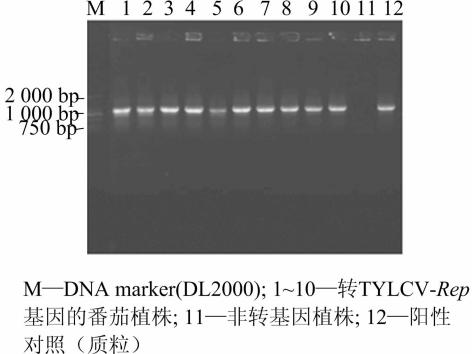
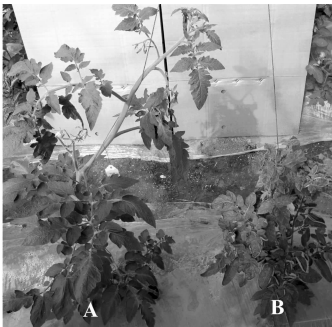


图8 转基因番茄 T₁ 代的 PCR 检测结果

2.5.4 转基因番茄 T₁ 代的抗病性鉴定 利用烟草虱对转基因番茄进行侵染试验。用 PCR 反应为阳性的转 TYLCV-Rep 基因的番茄抗性植株做侵染试验,以非转基因植株作对照,防虫温室中植株表现如表 2 所示,非转基因植株对 TYLCV 表现高感(HS),而转基因植株对 TYLCV 表现出抗性(R)。田间抗病性观察发现,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;42 d 后非转基因番茄植株叶片表现出典型的严重黄化卷曲症状,转基因植株叶片未发现有异常变化(图 9)。表明转基因番茄植株的抗病性较非转基因植株明显增强。

表 2 番茄黄化曲叶病毒病抗性鉴定结果

品种	侵染接种鉴定		田间鉴定抗性
	病情指数	抗级	
转基因番茄	6.8	R	R
非转基因番茄	52.3	HS	HS



A—转TYLCV-Rep 基因番茄; B—非转基因番茄

图9 传毒 42 d 番茄叶片症状

3 结论与讨论

与传统育种方式相比,通过转基因手段获得抗性更具优越性,转基因操作将有效单基因转入优良的栽培品种中,避免了常规杂交育种中,受多基因控制及数量性状遗传等复杂性,从而使植株有效获得相应的抗性。本研究 TYLCV-Rep 的全

果见图 8。转基因番茄 T₁ 代植株分别检测到 45 个阳性植株,显示 TYLCV-Rep 基因可以在后代中稳定遗传。

长序列通过构建相应的植物表达载体将其转入番茄中,获得了抗病性明显增强的转基因株系,该结果与 Carr 等的研究结果^[17-18]一致。

在植物对病毒产生抗性的过程中可能涉及到一系列基因的表达,有些膜上基因的优先表达在植物的防御机制中起非常重要的作用。Carr 等认为,转基因植物表达的复制酶在病毒的侵染过程中作为一种调节蛋白发挥功能,打破了病毒正链和负链复制的平衡^[19];而 Baulcombe 则认为,复制酶基因是在 RNA 水平上介导对病毒的抗性^[20]。利用这些与抗性表达有关的关键基因通过生物工程手段来提高番茄抗性的调控机理,仍需进一步研究;另外,对获得相应抗性的番茄在某些条件下(如高温)会部分丧失抗性的原因,也将是番茄抗病育种的研究内容之一。

本研究成功克隆了番茄黄化曲叶病毒的复制酶基因,通过基因工程手段,将抗病基因导入番茄基因组,获得了抗病性增强的转基因番茄植株,通过 PCR、Southern-blot 检测表明该复制酶基因已成功转入番茄基因组中,烟草虱侵染的抗性鉴定结果表明转基因番茄对 TYLCV 的抗性明显增强。本研究为培育番茄抗黄化曲叶病毒的抗病品种提供了可靠的理论依据和相应的技术保障。

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,等. 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):127-129,137.
[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. 警惕广东番茄烟草花叶病毒病的发生[J]. 广东农业科学,2003(4):41-43.
[6] 赵统敏,余文贵,杨玛丽,等. 番茄黄化曲叶病毒病在江苏的暴发与综合治理[J]. 江苏农业科学,2008(6):114-115.
[7] Van R V, Fauquet C M, Bishop D L, et al. Virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. Dan Diego: Academic Press, 2000: 285-297.

徐 岩, 吴友根, 张军锋, 等. 广藿香根际土壤微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 45–47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.013

广藿香根际土壤微生物总 DNA 提取方法的优化

徐 岩, 吴友根, 张军锋, 杨东梅, 胡新文

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

摘要:提取高质量的土壤微生物 DNA 是进行后续分子生物学试验的前提。在 3 种常用土壤微生物 DNA 提取方法的基础上, 提出了 1 种新的优化方案, 包括使用添加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的磷酸缓冲液对土壤进行预洗、联合使用 SDS-CTAB 和蛋白酶 K 来破碎细胞、用酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)除蛋白质和淀粉等杂质、使用 PEG8000 沉淀 DNA、用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 DNA 等。比较分析了优化的方法与其他 3 种常用方法所获得的总 DNA 产率和纯度的差别, 结果表明, 优化的方法所提取 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均高于其他 3 种方法, 且 PCR 扩增条带清晰、DNA 产率高, 土壤中 DNA 得率达 88.76 $\mu\text{g/g}$, 表明该方法适宜提取土壤中的微生物 DNA, 从而为研究广藿香根际土壤微生物种类及其多样性奠定了基础。

关键词:广藿香; 总 DNA; 根际土壤; 微生物; 提取方法

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0045-03

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科刺蕊草属植物, 原产于东南亚地区, 如马来西亚、菲律宾、印度尼西亚等国, 在我国引种可追溯到梁代或以前^[1], 我国的主要栽培地为海南、广东两省。广藿香以其干燥地上部分入药, 是我国常用的芳香化湿类中药之一, 常用于治疗湿浊中阻、脘痞

呕吐、暑湿倦怠、胸闷不舒、寒湿闭暑、腹痛吐泻、鼻渊头痛等^[2]。广藿香不仅是 30 多种中成药的主要原料, 而且从其中提取的广藿香油还是医药和轻化工业的重要原料^[3]。然而, 广藿香在种植过程中连作障碍十分明显, 通常认为根系分泌物会破坏土壤微环境、改变土壤微生物群落结构及多样性, 从而影响植物自身生长^[4-5]。因此, 研究广藿香土壤微生物的区系状况和变化是解决广藿香连作障碍的重要环节。传统的分离鉴定法可培养土壤微生物的数量仅占总微生物数量的 0.1%~1.0%^[6], 不能全面地反映根际土壤微生物的区系状况, 局限性十分明显。目前, 通过基于土壤微生物群落总 DNA 的现代微生物分子生态学方法研究土壤中微生物, 能较全面获得土壤微生物种类与多样性的信息。此方法作为微生

收稿日期: 2014-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360210); 海南省中药现代化专项资金(编号: 2012ZY015)。

作者简介: 徐 岩(1988—), 女, 吉林白山人, 硕士研究生, 研究方向为南药种质资源与活性成分。E-mail: 490329151@qq.com。

通信作者: 张军锋, 硕士, 副教授, 研究方向为南药种质资源与活性成分。E-mail: zhangjunfengvip@qq.com。

[8] 徐 丽. 马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导的病毒抗性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 46–62.

[9] Golemboski D B, Lomonosoff G P, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco Mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(16): 6311–6315.

[10] 饶雪琴, 李华平. 番木瓜美中红品种体胚转化体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 293–296.

[11] 饶雪琴, 李华平. 番木瓜环斑病毒融合基因植物表达载体的构建[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 325–329.

[12] 鲁瑞芳, 吕鹏飞, 彭学贤. 马铃薯 Y 病毒 N1b 复制酶基因在转录水平介导的相对广谱抗病性[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 162–166.

[13] Hellwald K H, Palukaitis P. Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber Mosaic virus[J]. Cell, 1995, 83(6): 937–946.

[14] 王美林, 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.

[15] Hanson P, Bemacchi D, Green S, et al. Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line[J]. Journal of the American Society of

Horticultural Science, 2000, 125: 15–20.

[16] Hanson P, Green S K, Kuo G. Ty-2 a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato [J]. Tomato Genetic Cooperative Report, 2006, 56: 17–18.

[17] Carr J P, Marsh L E, Lomonosoff G P, et al. Resistance to tobacco Mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1993, 5(5): 397–404.

[18] Guo H S, Garcia J A. Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene; involvement of a gene-silencing mechanism [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(2): 160–170.

[19] Carr J P, Gal-On G A, Palukaitis P, et al. Replicase-mediated resistance to cucumber Mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement original research article [J]. Virology, 1994, 199(2): 439–447.

[20] Baulcombe D. Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants? [J]. Trends in Microbiology, 1994, 2(2): 60–63.