

转化 CMV-cp 基因番茄对 CMV 病毒抗性鉴定

杨荣昌 徐鹤林 余文贵 陆春贵 龙明生

(江苏省农业科学院蔬菜研究所,南京 210014)

刘春清 潘乃穰 陈章良

(北京大学植物基因工程国家重点实验室,北京 100871)

摘要 苗期人工接种,对转化 CMV-cp 基因的番茄品种 8805R₁~R₄ 代进行接种 CMV 病毒试验。结果表明:黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因在番茄中的表达,对抑制 CMV 病毒病症状的表现及延迟其发展均起到一定作用。8805R₃ 代对 CMV 的抗性明显高于 R₁ 代,R₄ 代抗性已基本稳定。当高浓度的 CMV 病毒侵染 R₄ 代植株时,也会出现 100% 的发病率,但它们的新生枝叶能正常生长并开花结果。利用半叶法测定 8805R₄(cp+) 及 8805R₄(cp-) 接种叶和新生叶病毒浓度,结果是:cp(+) 和 cp(-) 在接种叶上病毒含量相当,但 cp(+) 的新生叶中病毒含量明显低于 cp(-) 的等位叶,说明 CMV-cp 基因的存在,限制了 CMV 病毒粒子的迁移和繁衍,最终也减轻了 CMV 病毒的危害程度。

关键词 番茄;CMV-cp 基因;CMV 病毒

1986 年以来,全世界掀起了利用分子生物学和基因工程技术防治植物病毒病害的研究热潮。一般有三条途径:利用病毒的卫星 RNA^[1];利用病毒的反义 RNA^[2] 及通过病毒外壳蛋白基因^[3]。其中又以第三种方法最有效、最普及^[4]。在短短的五六年内已经取得了很大成就^[4]。其主要机理是利用病毒外壳蛋白基因在植物体内的表达,产生对病毒的交叉保护反应,从而使植株获得抗病毒的能力。1989 年,我们成功地克隆了黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因^[5]。并利用根瘤农杆菌 Ti 质粒转化系统,采用叶盘法转化番茄子叶获得 42 株转化 CMV-cp 基因的 8805 番茄植株,经 DNA 杂交检测(Southern blot)和蛋白质检测(Western blot),证明 CMV-cp 基因已进入番茄核染色体中,并能正常表达^[6]。

1991~1993 年,我们对转基因番茄 8805R₁~R₄ 代进行了人工苗期接种 CMV 病毒筛选试验,并探讨了 CMV-cp 基因的遗传动态。

1. 材料与方法

1.1 番茄品种 转化黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-cp)基因的 8805R₀ 番茄植株是经实验室分子检测证明 CMV-cp 基因已进入番茄核染色体中,并能正常表达;对照品种 CK₁ 是 8805 未转基因材料,CK₂ 是感病品种早粉二号。

1.2 毒源 选用南京地区为害番茄最严重的 CMV 蕨叶株系。毒源经蚕豆单斑分离 3 次,在心叶烟上扩繁,取烟叶汁接种。

1.3 接种方法 在日温 25℃ 左右的温室内进行,当番茄二叶一心时,先将带 CMV 病毒烟叶加磷酸缓冲液研碎,然后用金刚砂进行叶面磨擦接种,接种后用装有蒸馏水的洗瓶冲洗叶

面。每份接种材料均重复3次,以蒸馏水接种作空白对照,间隔1周再接种一次。

2. 结果与分析

2.1 转基因番茄 8805R₁(相当于常规育种 F₂ 代)接种 CMV 病毒的结果

选择1株经分子检测证明已转化CMV-cp基因且植株生长旺盛、果实较大的8805番茄植株(R₀)进行自交留种得R₁代种子,将所得种子播种,进行接种CMV病毒试验。从表1可见,8805R₁在接种30d后,发病率为57.9%,病情指数为15.9,第一对照8805(未转基因)发病率为100%,病情指数为57.2;第二对照早粉二号发病率为100%,病情指数为76.2。这一结果表明,转基因番茄R₁代整体抗性水平高于对照,但R₁代植株之间抗性差异很大,这主要是由于R₁代抗性分离现象明显。

表1 8805R₁代接种CMV病毒结果

Table 1 Results of infection for 8805 R₁ progeny inoculated with CMV virus

品种 Cultivar	病级 Grade of disease						总数 Total of plants	发病率(%) Percentage of infected plants (%)	病情指数 Disease index
	0	1	3	5	7	9			
8805R ₁	50	42	16	10			118	57.9	25.9
8805(CK ₁)		12	18	20	35	7	95	100.0	57.2
早粉二号(CK ₂)			12	25	48	40	125	100.0	76.2
Zhaofen No. 2									

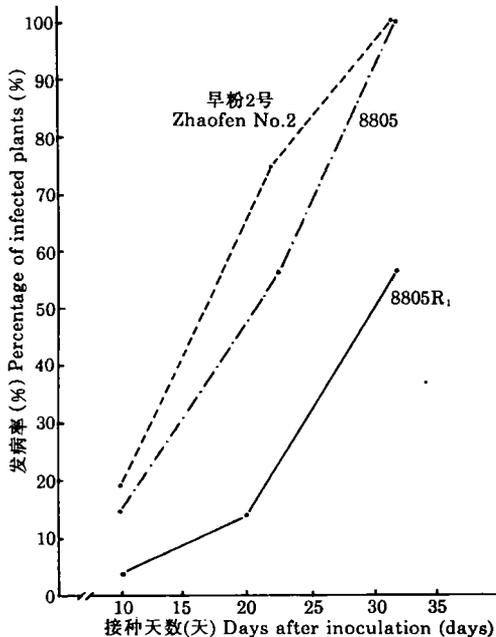


图1 8805R₁接种CMV不同时期发病情况比较
Fig. 1 Percentage of infected plants of 8805 R₁ progeny inoculated with CMV virus at different periods

从图1可知,第一次接种CMV病毒10d后,8805R₁发病率为4.3%,8805(CK₁)为13.5%,早粉二号(CK₂)为18.4%;接种20d后,8805R₁为15.6%,8805(CK₁)为53.3%,早粉二号(CK₂)为73.8%;接种30d后,结果同表1。以上结果表明,转基因番茄8805R₁,不仅发病率及病情指数低于对照,而且病症出现的速率也明显慢于对照,说明黄瓜花叶病毒外壳蛋白能够抑制和延迟CMV病毒病症的表现。Maria等^[2]将CMV-cp基因转入烟草植株体内,其后代对CMV的抗性表现与本文结果相似。

2.2 转基因番茄 8805R₂~R₄代接种筛选结果

从8805R₁代中选择10株抗CMV能力最强的单株留种,R₂代分株系进行苗期人工接种鉴定,结果见表2。从表2知,R₂代的10个株系接种CMV病毒后,其发病率、病情指数绝大部分低于R₁代,其中4号单系抗性最好,发病率为7.69%,病情指数为4.0。在R₂代单株接毒试验中,2号及6号单系的发病率及病情指数偏高,这是由于所选择的R₁单株(2号及6号)在抗CMV方面为杂合状态,亦即CMV-cp基因在其细胞核中尚未纯合,故R₂代出现抗性分离现象。

从8805R₂的4号单系中挑选出抗病单株留种,得R₃单系,再从R₃代中选最佳单株留种,

得 R₄ 代,接毒试验结果见表 2。

表 2 8805R₂~R₄ 代接种 CMV 病毒结果
Table 2 Results of infection for 8805 R₂~R₄ progenies inoculated with CMV virus

品 种 Cultivar	病 级 Grade of disease					总 数 Total of plants	发病率 Percentage of infected plants (%)	病情指数 Disease index	
	0	1	3	5	7				9
8805R ₁₋₁	13		10			23	43.5	14.5	
8805R ₁₋₂	14			14		28	50.0	27.7	
8805R ₁₋₃	14			2		16	16.6	18.5	
8805R ₁₋₄	13			1		14	7.69	4.0	
8805R ₁₋₅	11			7		18	38.9	21.6	
8805R ₁₋₆	11		11	8		30	63.3	27.0	
8805R ₁₋₇	5		3			8	37.5	11.0	
8805R ₁₋₈	9			7		16	43.8	24.3	
8805R ₁₋₉	15		5			20	25.0	14.0	
8805R ₁₋₁₀	9		2			11	18.2	6.0	
CK ₁		6	21	14		17	100	56.0	
CK ₂			15	20	18	5	100	60.5	
R ₃	101		16				14.95	4.98	
CK ₁		4	22	32	20	24	102	100	47.28
CK ₂			18	28	16	30	92	100	69.56
R ₄	126	6	13				145	16.48	5.3
CK ₁		14	26	24	19	25	108	100	49.8
CK ₂			19	31	14	36	100	100	58.6

8805R₃ 发病率为 14.95%, 发病最高级数为 3 级, 病情指数为 4.98, 与 R₂ 代 4 号株系发病程度相当, 8805R₄ 发病率为 16.48%, 病情指数为 5.3。说明 8805R₄ 对 CMV 病毒的抗性已基本稳定。两个对照品种的发病率、病情指数均相当高, 证明所用毒源的致病力有效。

2.3 8805R₄ 多次接种 CMV 病毒, 植株恢复力观察

为了进一步检测转基因番茄对 CMV 病毒的抗性, 在原来接种 2 次病毒的基础上再接种 2 次, 自接种后 10~100d, 观察植株发病情况(图 2)。

8805R₄ 接种 10d 后发病率为 6.8%, 8805 为 16.5%; 接种 20d 后 8805R₄ 发病率为 20.5%, 8805 为 41.3%; 接种 30d 后 8805R₄ 为 43.8%, 8805 为 100%; 接种 50d 后 8805R₄ 发病率亦达到 100%; 接种 100d 后, 8805R₄ 有 47% 的植株新生枝叶正常生长, 并开花结果。由于接种叶相继脱落, 故这些植

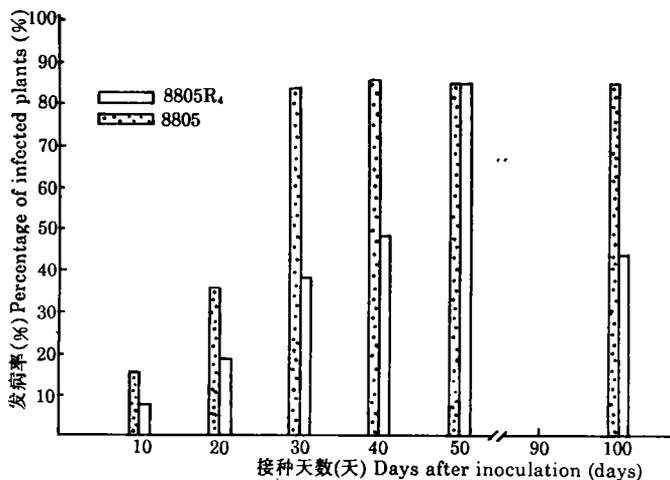


图 2 8805R₄ 4 次接种 CMV 后, 植株恢复力观察
Fig. 2 Recovery of 8805 R₄ plants inoculated four times with CMV virus

株不显示任何发病症状, 视为健康株。而对照 8805 全部发病, 无法开花结果。

2.4 8805R₄(cp+) 和 8805(cp-) 接种叶病毒含量比较

当 8805R₄(cp+) 和 8805(cp-) 苗期接种 CMV 病毒(叶片汁液稀释度为 1:4), 30d 后, 取

这两份材料的接种叶和新生叶,采用半叶法,将它们接种在苋色藜(*C. quinoa*)同一叶片的主脉两侧,共接种 30 株计 50 张叶片,根据枯斑反应数目,比较 cp(+)和 cp(-)叶片中病毒含量,结果见表 3。

表 3 8805R₄(cp+)和 8805(cp-)接种叶、新生叶 CMV 浓度比较

Table 3 Comparison between CMV contents in inoculated leaves and newborn leaves of 8805 R₄(cp+)and 8805(cp-)

叶片种类 Kind of leaf	半叶平均枯斑数 Average number of lesions on <i>C. quinoa</i>		cp(+)/cp(-)×100%
	cp(+)	cp(-)	
	接种叶(Inoculated leaf)	69	
新生叶(Newborn leaf)	27	92	29.3

从表 3 可见,8805R₄ 与 8805 的接种叶 CMV 病毒浓度差异不大,而等位新生叶中 CMV 病毒浓度差异很大,8805R₄(cp+)新生叶在苋色藜上的枯斑数为 27,而 cp(-)为 92 个。由此可见,CMV-cp 基因产物不能降低接种叶中病毒粒子的浓度,但能阻止病毒病症状的表现,而且 CMV-cp 基因的存在使新生叶中病毒含量明显降低,这一结果与本文“2.4”所述一致。

3. 讨 论

3.1 CMV-cp 基因防治番茄 CMV 病毒效果探讨 通过对 8805R₁~R₄ 代人工苗期接种 CMV 病毒试验,我们不难发现黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因在番茄中的表达,对抑制 CMV 病毒病症状的表现及延迟病症的发展均起到一定作用,但利用病毒外壳蛋白基因提高植物抗病毒的机理类同于常规的交叉保护反应,而不是其基因产物消灭病毒粒子。因此,我们绝不能过高地希望通过这一育种途径培育出高抗或免疫 CMV 病毒的番茄品种,但在目前没有更好办法的情况下,这仍不失为上策。

3.2 病毒外壳蛋白介导植物抗性的基本表现 通过半叶法接种测定 8805cp(+)及 cp(-)叶片中 CMV 病毒浓度试验,结果表明 CMV-cp 基因的存在使 cp(+)新生叶中的病毒粒子含量明显低于 cp(-)的等位叶,这可能是病毒外壳蛋白限制了 CMV 粒子的迁移距离和迁移速率。这一结论与 Wilson 等^[7]的结果相似。

3.3 利用 CMV-cp 基因介导番茄对 CMV 病毒抗性的生物安全性探讨 番茄,作为重要的水果型蔬菜,直接与人们的身体健康有关,因此,很容易引起人们对转基因番茄的担忧,其实,CMV-cp 基因介导番茄对 CMV 病毒抗性具有很高的生物安全性。首先,我们将 CMV-cp 基因转入番茄核染色体中,其基因产物为黄瓜花叶病毒外壳蛋白,这种蛋白对人体无害,因为我们平时食用蔬菜时也吸收了大量的病毒粒子,包括病毒外壳蛋白;其次,这种外壳蛋白不会象卫星 RNA 那样能突变成新的病毒,因此,不会产生危害人类的新物质;第三,转化 CMV-cp 基因所用的 NPT II 标记基因为抗卡那霉素基因,过去人们一直怀疑它的代谢产物对人体产生毒副作用,Fush 等^[8]经过反复试验表明,NPT II 蛋白极易为人体消化,并经小白鼠 5 000mg/kg 剂量的 NPT II 蛋白试验,无任何不良反应。因此,本文所采用的方法防治番茄 CMV 病毒具有很好的生物安全性。

参 考 文 献

- 1 赵淑珍,王 昕,王革娇,等.由互补 DNA 单体和双体基因构建的抗黄瓜花叶病毒的转基因番茄.中国科学(B辑),1990,34(7):708~713.
- 2 Maria C,Keith M Conneil,Kaniewski W,et al. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. Bio/Technology,1988,6:549~554.
- 3 Bevan M W,Mason S E,Goelet P. Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by Agrobacterium. EMBO,1985,4:1921~1926.
- 4 Shah D M,Tumer N E,Fischhoff D A,et al. The introduction and expression of foreign genes in plants. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews,1987,5:81~98.
- 5 胡天华,吴 琳,刘 伟,等.黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆和全序列测定及比较.科学通报,1989,21:1652~1655.
- 6 杨荣昌,徐鹤林,余文贵,等.表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄及其对 CMV 的抗性.江苏农业学报,1995,11(1):42~46.
- 7 Wilson T M A,Watkins P A C. Influence of exogenous viral coat protein on the cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus particles *in vitro*. Virology, 1986,149:132~136.
- 8 Fuchs R L,Ream J E,Hammond B G,et al. Safety assessment of the Neomycin Phosphotransferase I (NPT I) protein. Bio/Technology,1993,11:1543~1546.

IDENTIFICATION OF THE CMV-RESISTANCE OF
TRANSGENIC TOMATO PLANTS

Yang Rongchang Xu Helin Yu Wengui Lu Chungui
Long Mingsheng

(*Institute of Vegetable Crops,Jiangsu Academy of Agr. Sci.,Nanjing 210014,China.*)

Liu Chunqing Pan Naisui Chen Zhangliang

(*The Life Sciences Centre of Beijing University,Beijing 100871,China.*)

Abstract The transgenic plants of tomato 8805R₁~R₄ progenies were inoculated with CMV virus at seedling stage. It was shown that the expression of the CMV-cp gene in the transgenic plants resulted in the protection of these plants from infection by CMV. The systemic infection of the virus was reduced or delayed,compared with the control plants. The resistance of 8805R₃ progeny was significantly better than that of 8805R₁ and the identical resistance to CMV was obtained in 8805R₄.

The 100% infected plants appeared in 8805R₄ progeny,when the seedlings were inoculated with CMV virus at higher concentration,but their new shoots and leaves grew vigorously and fruit-setting was normal.

The CMV virus contents in the inoculated leaves and systemic leaves of 8805cp(+)and 8805cp(-)were tested by half-leaf method. It was concluded that the CMV content in the newborn leaves of 8805cp(+)was remarkably lower than that of 8805cp(-).

Key words Tomato;CMV virus;CMV-cp gene