

# 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

<sup>1</sup>杨荣昌 <sup>1</sup>徐鹤林 <sup>1</sup>龙明生 <sup>1</sup>余文贵 <sup>1</sup>陆春贵 <sup>2</sup>吴光 <sup>2</sup>潘乃遂 <sup>2</sup>陈章良

(<sup>1</sup>江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京 210014; <sup>2</sup>北京大学植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

**摘要** 利用根瘤土壤杆菌 Ti 质粒转化系统, 采用叶盘法将 CMV-cp 基因转入番茄细胞中, 获得 42 株转基因植株, 经 Southern blot 和 Western blot 检测, 证明 CMV-cp 基因已进入番茄核染色体中, 并能正常表达。通过对转基因植株 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 代苗期人工接种 CMV 鉴定, 发现 CMV-cp 基因产物对 CMV 有一定抗性, 其抗性遗传符合孟德尔一对基因控制性状的遗传规律并能稳定遗传。

**关键词** 根瘤土壤杆菌; 叶盘转化法; CMV-cp 基因; 蕃茄

## Transgenic Tomato Plants Expressing Cucumber Mosaic Virus Coat Protein and Their Resistance to CMV

<sup>1</sup>YANG Rongchang, <sup>1</sup>XU Helin, <sup>1</sup>LONG Mingsheng, <sup>1</sup>YU Wengui, <sup>1</sup>LU Chungui

<sup>2</sup>WU Guang, <sup>2</sup>PAN Naisui and <sup>2</sup>CHEN Zhangliang

(<sup>1</sup>Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; <sup>2</sup>The Life Sciences centre of Beijing University, Beijing 100871)

**Abstract** A chimeric gene containing a cloned cDNA of the coat protein (cp) of cucumber mosaic virus (CMV) was transferred into tomato cells, and 42 transgenic tomato plants have been produced by means of a novel leaf disk transformation with the help of a modified Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. The results of DNA Southern blot analysis confirmed that the CMV-cp gene was stably integrated into the genome of the transgenic plants. CMV coat protein was expressed in the plant cells tested by Western blot and Dot blot. It was shown that the transgenic plants of tomato were protected from infection by CMV. The rate of systematic infection of the virus is reduced or delayed compared with the control plants. The segregation of the R<sub>1</sub> progeny of CMV resistance in a 3 : 1 ratio indicates a single insertion inherited in a Mendelian fashion.

**Key words** *Agrobacterium tumefaciens*; leaf-disk transformation; CMV-cp gene; tomato

黄瓜花叶病毒(CMV)是一种蚜传病毒, 在番茄上危害十分严重, 我国对番茄抗 CMV 的育种工作高度重视, 先后被列为国家“七五”、“八五”番茄抗病育种攻关目标, 但由于栽培番茄中至今尚未找到抗源, 因此, 通过常规育种手段很难解决这一问题。赵淑珍等利用 CMV 卫星 cDNA 基因转化番茄, 获得的转基因番茄植株具备抵抗 CMV 的能力<sup>[2]</sup>, 但这种方法存在一些不足之处<sup>[4]</sup>。利用病毒外壳蛋白基因, 培育抗病品种, 无论从抗

性强弱, 对植株生长的影响, 对周围环境的影响和广泛适用性等方面都是可取的<sup>[1]</sup>。因此, 我们选择了这一途径, 培育抗 CMV 番茄品种。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及其培养

转化番茄所用的带有 CMV-cp 基因的

衍生 Ti 质粒由胡天华构建<sup>[3]</sup>;CMV-cp 基因首先被克隆在 PBS(Bluescript)质粒上,然后将之转移至 Ti 质粒的中间载体 PCo24 上,得到整合的载体 PHCM39(图 1),最后经三亲杂交,被整合到根癌农杆菌 GV-3111SE Ti 质粒的 T-DNA 区段,CMV-cp 基因所用的启动子为花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子,载体 PHCM39 带有 Npt II 基因,使转化愈伤组织或转化芽能够在含有卡那霉素的培养基上生长。

菌株 GV-3111SE 培养在附加卡那霉素(Kanamycin)50 mg/l、壮观霉素(Spectinomycin)50 mg/l、氯霉素(Chloromycetin)30 mg/l 的 LB 液体培养基中,于 28℃下,100 rpm 的摇床中过夜培养,即可用于转化。

1.2 番茄材料

从 30 多份中选择苏 8805、苏 8807、丽春和强力米寿 4 个品种,其中苏 8805 和苏 8807 园艺性状优良,故转化工作以这两个品种为主。

1.3 培养基

1 号培养基:MS+2 mg/l Zeatin+0.2 mg/l IAA。

2 号培养基:1 号培养基+50 mg/l 羧苄青霉素+100 mg/l 卡那霉素。

3 号培养基:生根培养基 MSO

1.4 CMV-cp 基因转化番茄

按叶盘法进行<sup>[5]</sup>。取培养 7—10 天的番茄无菌苗的子叶及下胚轴,用解剖刀切成 0.5 cm 小段或方块,取出一部分材料分别置于 1 号和 2 号培养基上作为正负对照,另一部分材料置于看护培养基上暗培养两天(看护培养基:胡萝卜或烟草细胞悬浮液 5~10 ml,加到 1 号培养基上均匀分布,上盖一层无菌滤纸),然后转入 2 号培养基,每两周换一次培养基,3~4 周后便有芽长出,待长到 3~5 cm 时,将芽切下转入 3 号培养基中诱导生根。由于芽诱导培养基上已进行抗卡那霉素的筛选,故通常生根培养基中不加选择压。

1.5 植物 DNA 提取及 Southern 印迹法

剪取约 0.1 g 叶片在液氮中磨碎,用酚-氯仿抽提和异丙醇沉淀,再用乙醇沉淀得 ds DNA。利用 EcoR I 限制性内切酶对每个样品及对照(非转化叶片的 DNA 作负对照,PHCM39 质粒 DNA 的一段 CMV-cp 片段作正对照)进行消化。杂交所用的探针是中间载体 PHCM39 的 EcoR I 酶切的 764 bp 的片段,用同位素<sup>32</sup>p 进行标记。按照 Molecular cloning 一书介绍的方法进行印迹分析<sup>[6]</sup>。

1.6 番茄叶片总蛋白的提取及 West blot 和 Dot blot 检测

在冰浴条件下,取 1 克番茄叶片加研磨缓冲液 1 ml(0.285 M Tris HCl pH7.6)研磨成浆状,在沸水中煮 10 分钟后,于 10000 ppm 条件下离心 10 分钟,取上清液于 4℃下保存备用。West blot 和 Dot blot 按照 Xie 等人介绍的方法<sup>[7]</sup>。第一抗体是 CMV 抗血清,第二抗体是能与碱性磷酸酶偶联的抗鼠 IgG。

1.7 CMV 病毒接种方法

选用对番茄具有最强致病力的蕨叶株系,接种在三生烟(*Nicotiana tabacum samsun* NM)上进行扩繁,取其叶片汁液,稀释

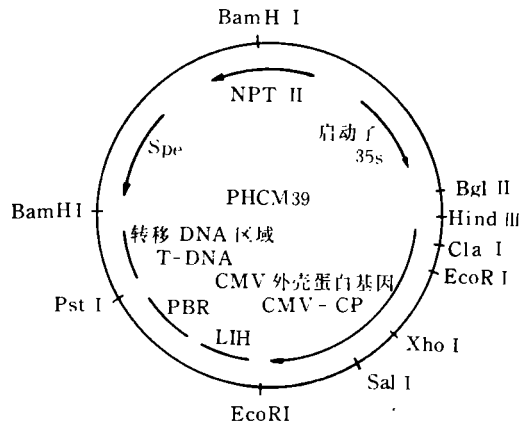


图 1 PHCM39 质粒的酶切图谱

Fig. 1. Map of PHCM39 plasmid cut by restriction enzymes.

20 倍后接种到喷有金刚砂的转基因番茄幼苗上,接种后用蒸馏水冲洗叶面,间隔一星期后再接种一次,从第一次接种后一个月开始统计发病情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 转基因番茄再生株的获得

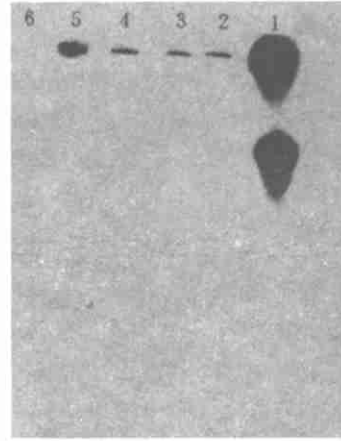
按照上述方法,共转化 26000 块外殖体,在卡那霉素筛选培养基上共获得 437 个芽(表 1),其中在卡那霉素培养基上正常生长的只有 300 个。将 152 个长得较好的芽转移至生根培养基上,82 个长出根,并生长良好,而叶片呈斑驳状态的有 9 株,叶片和根生长均正常的只有 42 株,将其中 35 株生长发育良好的植株定植于花盆中。

### 2.2 DNA 分子杂交

CMV 外壳蛋白的基因全长为 1008 bp,为方便起见,选用 EcoRI 酶切外壳蛋白基因中的 764 bp 片段作探针,结果如图 2 所示,所检测过的 5 株中 6 号株为未转基因株(对照),其它 4 株均有杂交带,证明 CMV-cp 基因已整合到这些植株中。

### 2.3 转基因番茄植株中 CMV-cp 基因表达检测

许多实验证明工程植株对病毒的抗性需要病毒外壳蛋白的参与,而且抗性的强弱与蛋白质的表达量直接相关,用 Western blot 的方法可以测定番茄工程植株中能否表达 CMV 外壳蛋白。取样 8 株(苏 8807 1 株、丽春 2 株、苏 8805 5 株)转化植株都能合成同



1 号为标准样品; 2—5 号为转化 CMV-cp 基因工程植株; 6 号为未转化 CMV-cp 基因植株(ck)。

No. 1 is the standard sample; Nos. 2—5 are the samples of transgenic tomato; No. 6 is the sample of non-transgenic tomato(ck).

图 2 转基因番茄核 DNA Southern blot 分析结果

Fig. 2. Southern blot analysis of genomic DNA in transgenic tomato plants.

一分子量并能与 CMV 抗血清起特异免疫性反应的蛋白,而未转化基因的番茄叶片总蛋白则未能与 CMV 抗血清起特异免疫反应。因而没有此种蛋白的杂交带。Dot blot 检测结果见图 3。

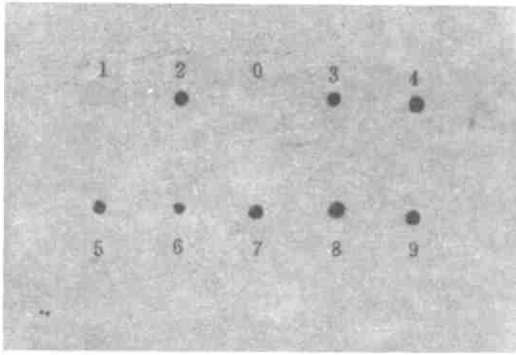
### 2.4 转基因番茄植株对 CMV 病毒抗性鉴定

2.4.1 苏 8805 R<sub>1</sub> 代抗性鉴定 选择 1 株苏 8805 转基因株(R<sub>0</sub>)自交得 R<sub>1</sub>,对 R<sub>1</sub> 代苗二叶一心时进行接毒鉴定,苏 8805 作为第一

表 1 GV 3111 SE 转化番茄外植体结果

Table 1. Results of tomato explant transformation with GV 3111 SE.

品种名称 Cultivar	外殖体块数 No. of inoculated explants	产芽数 No. of shoots produced	转基因植株数 No. of transgenic plants
苏 8805 Su8805	23000	350	31
苏 8807 Su8807	2000	70	5
丽春 Lichun	500	12	4
强力米寿 Qianglimishou	500	5	2



0 号为空白对照; 1 号为未转基因植株样品; 2~9 号为转化 CMV-cp 基因植株样品。

No. 0 is the sample of empty control; No. 1 is the sample of nontransgenic tomato; Nos. 2~9 are the samples of transgenic tomato.

图 3 转基因番茄蛋白 Dot blot 检测结果

Fig. 3. Dot blot analysis of total protein extracts in transgenic tomato plants.

对照, 感病品种早粉 2 号作为第二对照, 苏 8805 R<sub>1</sub> 发病率、病情指数明显低于对照品种, 由于 CMV-cp 基因产生抗性的机理是交叉保护, 因此, 发病达 3 级(即心叶及中上部叶花叶)的亦应归到抗病范围, 根据  $\chi^2$  测验, 抗病与感病株的比例符合 3:1。

从图 4 可见, 接种 10 天后, 8805 R<sub>1</sub> 发病率为 4.3%, 早粉 2 号为 18.4%, 接种 20 天后, 8805 R<sub>1</sub> 为 15.6%, 8805 为 53.5%, 早粉

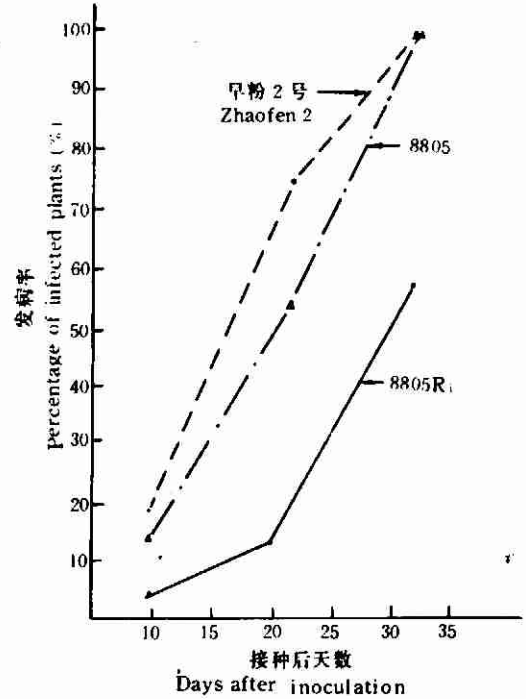


图 4 苏 8805 R<sub>1</sub> 接种 CMV 不同时期发病情况比较

Fig. 4. Infection of Su 8805 R<sub>1</sub> progeny inoculated with CMV virus at different periods.

2 号为 73.8%, 接种一个月后结果见表 2。上述结果表明, 转基因番茄 8805 R<sub>1</sub> 不仅发病率低于对照, 而且发病速率也低于对照, 说明 CMV 外壳蛋白基因能够推迟 CMV 病症表

表 2 苏 8805R<sub>1</sub> 代接种 CMV 病毒结果

Table 2. Results of Su 8805R<sub>1</sub> progeny inoculated with CMV virus.

品 种 Cultivar	株 数 Plant no.						总株数 Total plants	发病率(%) Percentage of infected plants	病 指 Index of disease
	病 级		Grade of disease						
	0	1	3	5	7	9			
苏 8805R <sub>1</sub> Su8805R <sub>1</sub>	50	0	42	16	10	0	118	57.9	25.9
苏 8805(ck1) Su8805(ck1)	0	12	18	20	35	7	92	100	57.2
早粉 2 号(ck2) Zhaofen 2(ck2)	0	0	12	25	48	40	125	100	76.2

$$\chi^2 = 0.141 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$$

现。

2.4.2 转基因番茄 8805 R<sub>2</sub> 代接种筛选  
从 R<sub>1</sub> 代选择 10 株抗病性最好的单株留种,  
R<sub>2</sub> 代分单系进行苗期人工接种鉴定,方法同

2.4.1,结果见表 3。

从表 3 可见,R<sub>2</sub> 代的 10 个株系接种  
CMV 后,其发病率、病情指数绝大部分低于  
R<sub>1</sub> 代,其中 4 号单系表现抗性最好,发病率

为 7.69%,病情指数为 4.0,将其单独留种得  
R<sub>3</sub> 单系。在 R<sub>2</sub> 单系接毒试验中,仍有少数单  
系发病率、病情指数偏高,这是由于所选择的  
R<sub>2</sub> 单株在抗性方面仍为杂合状态。

目前,我们正加紧纯化抗 CMV 的转基  
因番茄材料,并着手用它作为 CMV 抗源,配  
制组合,以便早日在生产上推广应用。

### 3 参考文献

表 3 苏 8805 R<sub>2</sub> 代接种 CMV 病毒的结果

Table 3. Infection in Su 8805 R<sub>2</sub> progeny inoculated with  
CMV virus.

R <sub>2</sub> 单系 R <sub>2</sub> lines	调查总株数 Total plants	发病率 Percentage of infected plants (%)	病情指数 Index of disease
1	23	43.5	14.5
2	28	50.0	27.7
3	12	16.6	18.5
4	14	7.7	4.0
5	18	38.9	21.6
6	30	63.3	27.0
7	8	37.5	11.0
8	16	43.8	24.3
9	20	25.0	14.0
10	11	18.2	6.0
ck1	58	100.0	56.0
ck2	58	100.0	60.5

1 山谷纯. 细胞工学. 1988,7(3):230

2 赵淑珍等. 由卫星互补 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. 1990,7:  
708~713

3 胡天华等. 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

4 Baulcombe D *et al.* Molecular Biology of Plant Pathogen  
Interactions. Now. York; Alan R. Liss. 1989. pp 257~  
267

5 Horsch RB *et al.* A Simple and General Method for  
Transferring Genes into plants. Science. 1985,227:1229  
~1231

6 Sambrook J *et al.* Molecular Cloning. 1989 Cold Spring  
Harbor Laboratory Press. 1989,pp 127~150

7 Xie Y, Min Y-J *et al.* Chemical synthesis and cloning of  
a Ceroin B gene. Chinese J. Biotechnology. 1990,6(4):  
311~315