维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中国病毒学 Vol 13 No.3
1998年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1998

烤烟栽培品种G28和K326抗黄瓜花叶病毒的遗传转化

陈元生* 肖火根 张曙光 范怀忠

(华南农业大学资环学院植物病毒室,广州 510642)

提 要 采用根癌农杆菌介导的叶盘转化法,将CMV-BS(香蕉株系)的CP基因转入广东烤烟栽培品种G28和K326,获得了再生转基因烟株。在卡那霉素(Km)100 μg/mL浓度下转化体叶片分化形成愈伤组织;用PCR和DAS-ELISA分析,结果证明CP基因已整合到转化烟株的染色体中,并得到不同程度的表达。利用广东地区香蕉、烟草和番茄上的CMV-BS、-27和-37株系,采用机械接种和蚜虫传毒法分别进行攻毒试验,结果证明转基因烟株对这三个株系的攻击都表现出明显的抗病能力,其抗性程度与烟株中的CP表达量呈正相关。采用五种攻毒浓度处理,发现随着攻毒浓度的增加,转基因烟株的抗病能力逐渐减弱。

关键词 黄瓜花叶病毒,香蕉株系,外壳蛋白基因,转基因烟草,株系,抗病性

黄瓜花叶病毒(CMV)是一种非持久性蚜传病毒,能引起烟草、黄瓜、番茄、香蕉等许多重要作物发生花叶病,难于防治。因此,利用CMV CP基因的抗CMV基因工程早已引起人们的重视。迄今CMV-C[1]、-WL[2]、-0[3,4]、-Y[5]、D[6]、-BS[7]等多个CMV株系的CP基因已分别转入烟草、番茄、甜瓜、黄瓜、南瓜和西葫芦等作物。

表达CMV CP基因的转基因烟株的抗病性强弱主要与株系间的亲缘关系有关[4],也与攻毒条件(如攻毒浓度、攻毒方式)有关[3]。在CMV的众多株系中,许多株系都能侵染烟草,是导致广东烤烟花叶病的重要病原之一。本研究室李华平(1995)已构建含有CMV-BS CP基因的植物表达载体,并将该基因转入了土耳其烟和本生烟[7],但两品种都不是广东的栽培品种,且还没有鉴定转基因烟草对广东地区烟草CMV和其它作物CMV优势株系的抗病性。本研究在其基础上,将CMV-BS CP基因转入广东烤烟栽培品种G28和K326,并应用当地CMV不同株系,对转化烟草的抗病性作进一步研究。

材料与方法

1 材料

1.1 植物与病毒株系

广东栽培品种G28和K326作为转化受体植物;接种的病毒株系为广东香蕉CMV-BS、番茄CMV-37和烟草CMV-27(均为当地优势株系)。

1.2 菌种

含CMV-BS CP基因表达载体的农杆菌LBA4404(PAL4404)由本实验室提供,此载体包含有CaMV-35S

收稿日期:1997-11-07,修回日期:1998-01-16

* 现在广东省农业科学院作物研究所烟草研究室,广州 510640

维普资讯 http://www.cqvip.com

双启动子和 NPTⅡ基因。

1.3 培养基

培养基包括：①1/2 MS 培养基[7]；② MS_{104}培养基：1/2 MS + 0.1 mg/L NAA + 1 mg/L BA；③ 导根培养基：1/2 MS + 0.2 mg/L NAA。

2 方法

2.1 基因转化及植株再生

参照李华平等[7]的方法，将过夜培养的农杆菌菌液，用 1/2 MS 液稀释成浓度为 1×10^9个/mL。无菌组培苗叶方块(0.5～1 cm 大小)在菌液里浸约 10 min，再用 1/2 MS 液洗二次，置于不含激素和抗生素的 1/2 MS 培养基上，于 25 ℃暗培养 2d。转移叶方块至 MS_{104}培养基[含 60 μg/mL Km + 500 μg/mL Carb(羧苄青霉素)]上，15 h 光照，9 h 黑暗，27 ℃下培养，待伤口处形成的小芽长至 1 cm 左右时，将芽切下并转移至导根培养基(含 100 μg/mL Km + 500 μg/mL Carb)上诱导生根，待根系长出后，将生根良好的完整植株移栽至温室内。

2.2 转基因烟株的筛选与鉴定

2.2.1 转化体对 Km 的抗性鉴定 参考吕华飞等的方法[6]。

2.2.2 CP 基因的整合分析 参照 Murray 等[9]的方法分别提取转化烟株的总 DNA。PCR 扩增按文献方法[7]。PCR 反应程序为：94 ℃，1 min－55 ℃，1 min－72 ℃，0 3 min，共 35 个循环。按常规方法，用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物。

2.2.3 CP 基因的表达(翻译)分析 参照 Okuno 等[5]的方法提取烟株的可溶性蛋白作为抗源 DAS-ELISA 测定方法按文献方法[7]。

2.3 转基因烟株的抗病性鉴定

选取移栽后已有 4～5 片完全叶的转基因烟株进行攻毒试验。

常规机械接种法：采用分别感染上述三个株系 10～16 d 的新鲜西葫芦病叶为毒源材料，分别加不同体积(8、20、50、100 或 200 倍)的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)，(pH7.4，含 0.02% DIECA)研磨，温室条件下接种。接种后 3～5 d 重复接种一次。

蚜虫传毒法：按文献方法[1]，每株接 10 只蚜虫。传毒 4 d 后重复一次。

对照烟株发病后(一般为接种后 10 d 左右)定期观察症状情况，记录。

结 果

1 基因转化及植株再生

以农杆菌共培养叶盘法转化 CP 基因，进行了五批次共 238 个叶方块的转化试验，分别得到 146 株 G28 和 167 株 K326 可能的转基因烟株。结果显示：转化了叶方块在转化后 2～3 周开始形成愈伤组织，3～4 周后分化出芽。1 cm 大小的芽在含 100 μg/mL Km 的导根培养基上 1～2 周生根，假阳性的芽却不能生根，最终叶片变黄、死亡。

G28 和 K326 的转化率(形成愈伤组织的叶方块数/转化的总叶方块数)分别为 67.8% 和 70.1%，差异不大；其植株再生率也差异不明显(分别为 70.3% 和 73.6%)。这表明转化了的叶方块能够在含有适宜 Km 浓度的培养基上形成愈伤组织、并长出幼芽和根。

2 转基因烟株的筛选与鉴定

2.1 转化体对 Km 的抗性鉴定

共进行了 3 批次 72 个转化体叶方块的 Km 抗性试验。结果 70 个转化体叶方块在含 100 μg/mL Km 的 MS_{104}培养基上培养 1～2 周都能形成愈伤组织。这表明 97% 以上的转化体烟

维普资讯 http://www.cqvip.com

株具有对Km的抗性，即证明NPTⅡ基因已转入烟株，说明此二步法筛选是有效的。

2.2　CP基因的整合分析

随机选取具有Km抗性的转基因烟株26株（G28和K326各13株），抽提植物总DNA，PCR扩增，电泳检测分析。结果有20株（G28和K326分别为9株和11株）含有CMV-BS CP基因（见图1）。

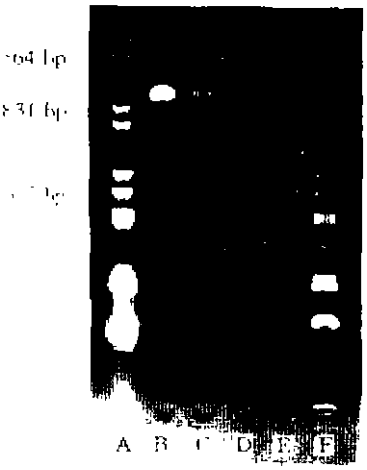

图1　转化烟株的PCR检测结果

A、F：分子量标准（λ DNA/EcoR Ⅰ + Hind Ⅲ）；B：阳性对照；C：转化体G28（单株）；D：转化体K326（单株）；E：未转基因烟株。

Fig 1　PCR analysis of transformed tobacco plants

A、F: Standard molecular weight (λ DNA/EcoR Ⅰ + Hind Ⅲ), B: *Positive control*; C: *Transformed G28 (one plant)*; D: *Transformed* K326 (one plant); E: Non-transformed tobacco plants

2.3　CP基因的表达（翻译）分析

从PCR检测的转基因烟苗中每烟种随机选取10株，在攻毒接种前，进行DAS-ELISA检测。结果各有9株呈阳性反应，1株呈阴性反应，呈阳性反应的颜色深浅也不一，说明各烟株的CP基因的翻译水平（即表达量）不一致。OD_{405nm}值也差异较大，从0.019～0.827不等（总平均为0.4303）（阳性对照为0.689～0.719，平均为0.704，阴性对照平均为0.021，见表1）。进一步证明CMV-BS CP基因已转入上述90%的烟株中，并得到了不同程度的表达。

3　转基因烟株的抗病性分析

3.1　CP表达量与转基因烟株的抗病性关系

选PCR和DAS-ELISA检测的转基因烟株20株，采用感染CMV-BS的西葫芦病叶1∶200的稀释浓度进行攻毒试验。结果如表1所示，转基因烟株一般都比对照（未转基因）烟株延迟5 d以上发病，但也有少数烟株（如G28的D7和K326的C1）虽含有CP基因，由于CP表达量（即OD_{405nm}值）很低，也不表现抗病性；转基因烟株G28和K326的OD_{405nm}平均值与病状始发期的相关系数分别为0.8927和0.9078，说明两者相关极显著；CP表达量愈高的烟株，发病愈迟。这些结果表明含有较高CP表达量的烟株，一般都表现出较强的抗病力，呈正相关关系。

3.2　攻毒方式、浓度和株系与转基因烟株的抗病性关系

3.2.1　人工摩擦进行攻毒接种

为了选择合适的攻毒浓度，进行了以CMV三个株系五种不同浓度的攻毒试验。结果浓度为1∶8和1∶20时，转基因烟株的发病率都较高，攻毒后30 d，累计发病率达到80%以上；浓度为1∶50和1∶100时，转基因烟株的发病率明显下降，50 d后，才上升到80%以上；而浓度为1∶200时，攻毒后60 d，发病率仍只为63.63%，转基因烟株表现出较强的抗病性；1∶250时，转

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因烟株的发病率极低，可对照烟株的也很低，差异不明显。这说明转基因烟株的抗病性与攻毒浓度有关，攻毒浓度太高(如1:8)，会使转基因烟株几乎丧失抗病能力，而太低(如1:250)，又难于鉴定出真正的抗病植株，所以适宜的攻毒浓度应为1:200。

表1 CP表达量与转基因烟株的抗病性关系

Table 1 Relation of CP expression and protection of transformed tobacco plants

品种[1] Variety	PCR检测[2] PCR Analysis	攻毒接种前DAS-ELISA检测OD_{405nm}值[3] OD_{405nm} of DAS-ELISA assay before inoculation		症状始发期(d) No. of days to symptom expression after inoculation
		范围 Range	平均 Average	
G28				
B5	−	0.113~0.121	0.117	20
D7	+	0.151~0.163	0.156	10
A4	+	0.151~0.168	0.158	20
A2	+	0.210~0.213	0.211	25
D8	+	0.319~0.347	0.333	30
D4	+	0.423~0.431	0.428	15
C2	+	0.545~0.558	0.553	40
A5	+	0.608~0.655	0.630	50
D9	+	0.651~0.782	0.719	45
D2	+	0.825~0.831	0.827	>60
K326				
B3	−	0.014~0.023	0.019	10
C1	+	0.019~0.031	0.026	10
A3	+	0.131~0.149	0.141	15
D3	+	0.203~0.212	0.208	20
C3	+	0.296~0.310	0.303	30
D1	+	0.484~0.514	0.499	>60
A1	+	0.569~0.590	0.579	35
B7	+	0.584~0.599	0.591	40
B6	+	0.750~0.757	0.753	50
B8	+	0.759~0.784	0.771	60
CK−	−	0.019~0.023	0.021	10

1)：A~D：表示实验的批次；1~9：表示每次试验植株的序号；2)："+"：含有CP基因，"−"：不含CP基因；3)：品种G28和K326的平均OD值与始发期的相关系数分别为$r=0.8927$和$r=0.9078$。

1)：A~D：No. of experiments；1~9：No. of experimented plants；2)："+"：CP，"−"：No CP；3)：The correlated index of average OD_{405nm} of G28 or K326 and days to symptom expression was $r=0.8927$ or $r=0.9078$.

结果也显示：表达CMV-BS CP基因的烟株G28和K326都能抗CMV-BS的侵染，也能抗CMV-27和CMV-37的侵染，且都表现了较强的抗病性，抗性程度基本一致。

3.2.2 用蚜虫进行攻毒接种

随机取90株转基因烟苗分3批次进行蚜虫攻毒试验。接种后30 d，分别检查各批次的发病情况，结果用CMV-BS、-27或-37株系攻毒，品种G28转基因烟苗(各15株)的发病率分别为6.7%、13.3%和26.7%，品种K326(各15株)分别为6.7%、6.7%和20.0%，而对照(未转基因烟株，各10株)则为70.0%、60.0%和80.0%。这些结果表明，品种G28和K326的转基因烟苗对攻毒的CMV三个株系都有较强的抗性，差异不显著，且都比机械接种的转基因烟苗

维普资讯 http://www.cqvip.com

表现的抗性更强。

讨　论

对转基因烟株的攻毒试验,一般是采用机械摩擦接种法。在机械接种中,转基因烟株受到攻击毒株的病毒量很高,而在自然状况下却只受到带毒蚜虫所带微量病毒的攻击,因而应用蚜虫传毒法更为接近自然、更适合对转基因烟株的抗性鉴定,这一看法与Quemada等[1]的观点一致。

本研究试验结果显示,转基因烟株G28和K326对CMV的抗性不仅与CP基因的存在有关,更重要的是与CP基因的表达量有关,其抗性程度与CP基因表达量呈正相关,这一结果与一些文献[1,10]的报道不相同,却支持了Van Dun和Powell等[11,12]的观点。转基因烟株的抗病能力主要表现为早期抗性,因而发病延迟,这与Okuno等[5]的报道相同。随着攻毒浓度的提高,其抗病能力会逐渐减弱、甚至丧失,因此,在人工机械接种攻毒时,选择适宜的接近于蚜虫所带毒量的攻毒浓度来鉴定转基因烟株的抗病性是很必要的。

由于CMV具有众多的株系,转化一个株系的CP基因能否抗其它株系的侵染,是至关重要的。Namba等[10]用CMV一个株系的CP基因转化植物,然后用CMV不同株系对转基因植物进行攻毒接种,结果表明转基因植物的抗病性强弱,主要取决于攻击株系与转化(克隆)株系的亲缘关系的远近。本研究结果显示,转基因烟株对CMV三个株系(-BS-27和-37)的抗性程度基本一致。这表明表达CMV-BS CP基因的烟株具有较为广谱的抗病性。这也似乎表明,CMV-BS、CMV-27和CMV-37株系具有较强的亲缘关系,至于这三个株系的真正亲缘关系如何有待进一步研究。

本研究实测的各转化烟株的OD_{405nm}值差异较大(见表1),甚至有个别烟株的OD_{405nm}平均值小于阴性对照的平均值(这些数值都是经过三次重复检测的结果)。造成此种结果,除了由于转化烟株本身所含CP表达量的差异外,可能还有DAS-ELISA法检测CP表达量不够精确等原因,有待进一步研究。

本研究仅只在试验室内进行,而且仅试验了R_0代,这R_0代烟株在大田中的实际抗病能力如何,其后代是否具有遗传稳定性,无疑是必要和重要的研究。

参 考 文 献

1 Quemada H D, Gonsalves D, Slightam J L. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco protection against infections by CMV strains transmitted mechanisally or by aphids. Phytopathology, 1991, 81: 194－802

2 Fuch M, Xue B, Gonsalves C V et al. Greenhouse and field resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato, squashand melons expressing the coat protein gene of CMV-white leaf. Abst Int Congr Plant Pathol, 1993, 6: 196

3 Yie Y, Zhao F, Zhao S Z. High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar G-140 Molecular Plant-Microbe Interactions, 1992, 5: 460－465

4 Nakajima M, Hayakawa T, Nakamura I et al. Protection against cucumber mosaic virus strain-0 and -Y and chrysanthemum mild mottle virus in transgenic tobacco plants expressing CMV-0 coat protein. J Gen Virol, 1993, 74: 319－322

5 Okuno T, Nakayama M, Yoshida S et al. Comparative susceptibility of transgenic tobacco plants and protoplasts expressing the

维普资讯 http://www.cqvip.com

coat protein gene of cucumber mosaic virus to infection with virions and RNA. Phytpathology, 1993, 83:542 – 547

6 Cuozzo M, O'Connell K, Kaniewski W et al. Vrial protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. Bio/Technology, 1988, 6:549 – 557

7 李华平.侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系特征及衣壳蛋白基因的遗传转化.[博士论文],广州:华南农业大学,1995.

8 吕华飞,何云昆,赵淑珍等.烤烟栽培品种G28,K326抗病毒遗传转化的研究.西南农业学报,1994,7(1):66 – 69

9 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 1980, 8:4321 – 4324

10 Namba S, Ling K H, Gonsalves C *et al*. Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infections by several different CMV strains. Gens, 1991, 107:181 – 188

11 Van Dun C M P, Bol J F. Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browing virus. Virology, 1988, 167:649 – 652

12 Powell-Abel P, Sanders P R, Tumer N *et al*. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. Virology, 1990, 175:124 – 130

Genetic Transformation of Flue-Cured Tobacco Cultivars G28 and K326 Protecting to Cucumber Mosaic Virus

Chen Yuansheng Xao Huogen Zhang Shuguang Faan Hweichung

(*South China Agricultural University, Guangzhou* 510642)

Abstract Two flue-cured tobacco cultivars, G28 and K326, from Guangdong, were transformed by CMV-BS CP gene from diseased banana via *Agrobacterium tumefaciens*, and 313 transgenic tobacco plants were obtained. Calli were observed on the small square sections of leaves of the transgenic plants in culture medium containing 100 μg/mL Km, indicating the Km resistant marker genes (NPT Ⅱ) has been successfully introduced into the plants. It was confirmed with PCR analysis and DAS-ELISA assay that the CMV-BS CP genes were stably integrated into the genomes of the transgenic tobacco plants, and were subsequently found to be expressed in these plants. The transgenic tobacco plants were inoculated mechanically or by aphids with the challenging CMV strains BS, 27 and 37 from diseased banana, tobacco and cucumber in Guangdong, respectively. The transgenic tobacco plants expressing coat protein of BS were demonstrated protecting effect to the infection of these CMV strains significantly, delaying the disease expression and reducing the severity of systemic symptoms, and the degrees of protection were positive correlated with the extents of the coat protein expressed. It was further shown that when the transgenic plants were challenged with five concentrations (8, 20, 50, 100 or 200 times of dilution of diseased leaf-sap extract with buffer solutions) of CMV-BS, CMV-27 and CMV-37 respectively, the protection was decreased with the increasing of concentration of the virus inoculum.

Key words CMV-banana strain, Coat protein gene, Transgenic tobacco plant, Strain, Protection