维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 3期
2002年8月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(3):243－247
August 2002

黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒在双抗转基因线辣椒内的增殖*

徐秉良[1],商鸿生[2],王 旭[2]
(1.甘肃农业大学植保系,甘肃兰州 730070;2.西北农业大学植保系,陕西杨凌 712100)

Cucumber Mosaic Virus and Tobacco Mosaic Virus Proliferation in Transgenic Chili Peppers and its Protoplast

XU Bing-liang[1], SHANG Hong-sheng[2], WANG Xu[2]
(1. *Plant protection department of Gausu Agricul tural University, Lanzhou* 730070, *China*;
2. *Plant Protection Department of Northwestern Agricultural University, Yanglin* 712100, *China*)

Abstract: Transgenic chili pepper plant expressing CMV and TMV coat protein gene were infected with CMV and TMV to comparing the characteristic of CP-MR in transgenic chili pepper and virus content in inoculated plants. The results showed that the transgenic chili pepper exhibited high level of coat protein-mediated resistance to both CMV and TMV. The development of systemic symptom was 7～15 days delayed, percentages of plants showing symptoms and severity of disease symptom in inoculated plants were strongly reduced, and virus accumulat and spread were obviously repressed in inoculated and newly-developed leaves in CP(+) plants challenged with CMV and TMV. The protoplasts from transgenic chili pepper expressing CMV-CP and TMV-CP were infected with CMV virion. The results showed that protoplasts from transgenic chili pepper can also inhibit the virus proliferation. The protoplasts were infected with 40μg/mL virus concentration, 48 hours later, the amount of virus in control plant protoplasts was 4.2 times than that in CP(+) plant protoplasts. This results demonstrated that the resistance characteristic of transgenic chili pepper was to reduce virus proliferation in plants.

Key words: Transgenic chili peper; Resistance characteristic; CMV; TMV; Protoplast; Virus Proliferation

摘要:本试验以转化CMV-CP和TMV-CP基因的转基因线辣椒纯合系植株作为研究试材,比较了单独或混合接种CMV和TMV后,转化线辣椒的抗病性表达特点,并测定了两种病毒在植株体内的病毒含量。结果表明:转化线辣椒不仅能抵抗CMV和TMV的单独侵染,而且还能抵抗CMV和TMV的复合侵染。转化线辣椒表现为系统症状延迟出现7-15d,显症株率和病害严重度级别大幅度降低,CMV和TMV在接种叶、新生叶中的病毒含量明显减低。转基因线辣椒原生质体作为研究试材接种CMV,测定病毒含量结果表明:CMV病毒的增殖在转基因线辣椒原生质体内受到明显抑制。在CMV接种浓度为40μg/mL,感染原生质体48h后,CP(－)植株原生质体内CMV是CP(＋)的4.2倍。这一结果揭示了转基因线辣椒具有抑制病毒增殖的抗病性。

关键词:转基因线辣椒;抗病性;CMV;TMV;原生质体;病毒增殖
中图分类号:S432.4 **文章标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2002)03-0243-05

病毒外壳蛋白基因(CP基因)策略是建立抗病毒转基因植物的有效途径之一,关于由外壳蛋白基因介导抗病性(CP-MR)性质方面的研究已有许多报道。一些研究结果表明,转化CP基因的植物能减少病毒在植株体内的积累。Nelson[1]等报道转TMV-CP基因的转基因烟草接种叶中TMV的含量

收稿日期:2001-12-13,修回日期:2002-02-25
* 基金项目:国家自然科学基金资助(39670488)
作者简介:徐秉良(1962-),女,浙江省桐乡籍,副教授,博士,从事果树蔬菜病害、植物免疫学等教学与研究工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

比CP(－)植株减少30%。新生叶中的病毒含量也很低；以后在表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因(CMV CP)，马铃薯X病毒外壳蛋白基因(PVX CP)和马铃薯Y病毒外壳蛋白基因(PVY CP)等的转基因植株上也得到证实[2~5]。然而，也有少数事例中显示转基因植株能减低病害严重度，表达外壳蛋白基因(CP＋)植株中的病毒含量并不比未转化植株(CP－)植株的少[6]。因此，不同的病毒与寄主植物的组合，其CP-MR的表达可能有所不同。本研究以利用CP基因策略获得的高抗CMV、TMV的转基因线辣椒纯合系作为研究材料，系统研究了由病毒CP基因介导的抗病性(CP-MR)的性质和机制。本论文报告接种CMV、TMV病毒后转基因线辣椒的植株个体的抗病性表达特点和其原生质体抗CMV病毒增殖的研究结果。

1 材料与方法

1.1 植物材料、病毒与抗血清

植物材料为抗CMV和TMV的转基因线辣椒(*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*)纯合系。它是由具有CaMV 35s启动子和rbcs转录终止信号，同时表达CMV和TMV外壳蛋白基因的中间载体，通过去毒Ti质粒的致瘤土壤农杆菌，采用叶盘法转化线辣椒优良品种陕8212的外植体而建立的。经PCR分析表明再生植株已整合有CMV-CP和TMV-CP基因，经Western blot分析证实了CMV-CP和TMV-CP基因的表达，并经室内攻毒试验和田间试验，选出的抗CMV和TMV，且遗传性状稳定的转基因线辣椒纯合系[7,12]，上述植物材料的建立和检测是中科院微生物所三室与本项目组合作完成的。本试验所用试材为转基因线辣椒纯合系16-13，4-2，34-11和34-12的T4代植株，用未转化的陕8212线辣椒作对照。CMV和TMV病毒毒源及抗血清均由中科院微生物所三室提供。

1.2 线辣椒无菌苗的培育及原生质体的分离与培养

取种子100～150粒左右，自来水冲洗，50℃恒温水浴中浸泡1～5h，0.1%升汞水浸泡2min无菌水冲洗，在MS无激素培养基上播种，黑暗与自然光交替培养，第一片真叶长出，子叶为1.5～25cm长时备用。

取转基因植株与未转基因无菌苗子叶，在70%乙醇溶液中浸泡至萎蔫后，撕去下表皮，浸入CPW13M液中，后加入含纤维素酶和果胶酶R10(均用CPW13M酶液调制，pH5.8)，抽滤灭菌，以下步骤参见何晓明[8]。将浮于上层的完好的原生质体移至另一试管中，用CPV9M悬浮，离心后沉淀用KM8p洗一次，然后悬浮，测活。以上操作均在无菌条件下进行。

1.3 CMV、TMV接种线辣椒及CMV感染原生质体

线辣椒植株个体接种采用机械摩擦接种法[9]，在供试苗4叶期，用浓度为40μg/mL的提纯CMV病毒接种，TMV接种浓度为0.5μg/mL，接种苗置于温度为20℃～25℃的环境下。接种后第3天起分别记载两种病毒接种的植株发病率的病害严重度。于接种后第15天采集各接种植株的接种叶和新生叶，测定病毒含量。

将新分离的线辣台肉原生质体(6×10^6个)，用低速离心得沉淀备用。CMV提纯病毒(80μg/mL)悬浮在10mL含甘露醇(0.7mol/L)的0.02mol/L柠檬酸缓冲液中(pH5.2，内含20μg/mL的聚鸟氨酸)，将此混合液在25℃下放置10min。把原生质体悬浮在甘露醇(0.7mol/L)10mL中。两液立即合并，置于25℃下10min，再低速离心3min收集原生质体，用0.7mol/L的甘露醇(含0.1mmol/L $CaCl_2$)洗3次，置于CPW9M培养液中26℃连续光照下培养48h。将接种病毒后的原生质体培养液离心蛋集，冻结融化后制成匀浆液，测定病毒含量。

1.4 病毒含量的检测

本试验采用异种动物抗体双夹心法(ELISA-DSM)和半叶枯斑测定线辣椒(按1:20稀释，W/V)植株内及原生质体内病毒含量。兔抗CMV、TMV与鼠抗CMV、TMV均由中科院微生物所三室提供。鼠抗CMV按1:250稀释，兔抗CMV按1:5000稀释；鼠抗TMV按1:100稀释，兔抗TMV按1:2500稀释。试验步骤为：包被第1特异抗体(鼠抗CMV或TMV)→加抗原→加第2特异抗体(兔抗CMV或TMV)→加酶标抗体→加底物溶液→测490nm波长处OD值。第1步以4℃冰箱过夜，第2、第3步各步均以37℃孵育2～3h，第4步孵育1.5～2h。每一步均洗板三次。加底物显色充分(约30min)后，H_2SO_4终止反应。酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(SAR-IgG-HRP华美生物工程公司产品)。检测病毒用DG302ZA型酶联免疫测定仪。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结果与分析

2.1 CMV和TMV单独与混合接种试验

转基因线辣椒对CMV、TMV单独与混合接种均表达了高度的抗病性。转基因线辣椒对TMV的抗病性表现为显症株率低、局部症状减轻、系统症状延迟出现和病毒含量降低的抗病特点。在TMV接种后3～5d,线辣椒接种叶上表现出枯斑症状。转基因线辣椒接种叶上枯斑数少且小,16～13品系的12张接种叶片平均枯斑数为3.08,枯斑直径为0.76;4-2品系接种叶平均枯斑数为4.66,枯斑直径为1.03;而对照品种陕8212平均枯斑数为25.08,枯斑直径为2.76;至试验结束,两个转基因品系系统症状出现率平均为25%,平均病级为0.25;对照品种发病率100%,平均病级高达3.42;接种CMV后,转化线辣椒品系比对照系统症状延迟出现7～12d,显症株率也明显低于对照组(表1)。

表1 接种CMV和TMV后转基因线辣椒的显症率(%)和平均病级

Table 1 The percentage of plants showing symptoms and the average disease grade in control and transgenic chili pepper plants pfter inculation with CMV and TMV (%)

株系 Plants	病毒 Inoculum	接种后天数 Days after inoculation					
		5	9	12	16	20	36
16-13 (24)[b]	CMV[a]	0(0)[c]	0(0)	8.3(0.08)	8.3(0.08)	16.7(0.17)	16.7(0.17)
4-2(24)		0(0)	0(0)	8.3(0.08)	25.0(0.25)	33.3(0.33)	33.3(0.58)
Shaan 8212(24)		28.6(0.29)	35.7(0.36)	35.7(0.64)	50.0(1.00)	100(2.36)	100(3.14)
16-13 (24)		0(0)	0(0)	0(0)	8.3(0.08)	16.7(0.17)	16.7(0.17)
4-2 (24)	TMV	0(0)	0(0)	0(0)	25.0(0.25)	33.3(0.33)	33.3(0.33)
Shaan 8212(24)		0(0)	16.7(0.17)	33.3(0.33)	41.7(0.67)	100(1.33)	100(3.42)
16-13 (24)		0(0)	0(0)	0(0)	25.0(0.33)	33.3(0.50)	33.3(0.50)
4-2 (24)	TMV	0(0)	0(0)	0(0)	33.3(0.33)	58.3(0.92)	58.3(0.92)
	TMV						
Shaan 8212(24)		41.6(0.42)	58.3(0.58)	66.7(1.00)	100(1.83)	100(2.50)	100(3.42)

a,CMV接种浓度为40μg/mL,TMV接种浓度为0.5μg/mL。Plants were inoculated with CMV at a 40μg/mL concentration and with TMV at a 0.5μg/mL concentration. b,括号内数值为接种总株数。The numbers in the parenthesis are the total numbers of inoculated plant;c,括号内数值勤为平均病级。The numbers in the parenthesis are the average disease grade;d,发病级数分5级:0级,无症状;1级心叶明脉,轻微花叶;2级,心叶及中上部叶片花叶;3级,少数病叶畸形皱缩,或轻度矮化;4级,重花叶,多数病叶畸形皱缩,植株严重矮化。Disease are divided into 5 grade:0, nosymptoms;1, vein clear and mild mosaic;2, middle and uper leaves are mosaic;3, minority leaves are mosaic and lighter stunt;4, majority leaves are severe mosaic and stunting.

转基因线辣椒对CMV、TMV的混合侵染也表达了与单独接种一致的抗病性。但抗病程度略有变化。CMV和TMV的混合接种后,对照品种陕8212症状表现严重,始症日比转基因品系提前7d,接种后16d发病率100%,严重矮化株率达50%,平均病级达3.42;而转化线辣椒品系16-13系统症状株率虽略有增高,由明脉症状发展至轻花叶(2级以下)的株数有所增加,但未出现更严重的症状,至试验结束有67.7%的植株不表现症状。另一转基因品系4-2系统显症株率比16-13高25%,有个别植株出现轻微矮化症状,但仍有41.7%的植株不表现症状,显症植株系统症状延迟出现且病害严重度减轻。

2.2 转基因线辣椒接种后病毒含量的测定

接种TMV、CMV病毒后第15d,采集转基因线辣椒显症与不显症植株的接种叶与新生叶及未转化线辣椒株的接种叶与新生叶,用ELISA测定病毒含量结果表明,转基因线辣椒对CMV和TMV病毒的增殖均有明显的抑制作用。单独或混合侵染情况下,TMV含量在转基因线辣椒接种叶中并不低,但在新生叶中的含量却明显低于对照;CMV含量在转基因线辣椒的接种叶和新生叶中均明显低于未转化植株(表2)。枯斑寄主(昆诺藜用于测定CMV,心叶烟用于测定TMV)测定结果(表3)与ELISA测定结果一致。由此说明,转基因线辣椒能抑制病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

在线辣椒体内的增殖，而且还能抑制病毒向新生叶运转。

2.4 CMV病毒在原生质体内的增殖

转基因线辣椒原生质体表现了与转基因植株个体一致的抗CMV增殖的能力。经ELISA测定感染病毒后原生质病毒含量结果表明，转基因线辣椒原生质体内病毒的积累减少。转基因线辣椒株系16－13，4－2，34－11，34－12的原生质接种病毒48h，平均OD值分别为0.11、0.14、0.11、0.13，而陕8212OD值为0.52，比转基因线辣椒株系高4.2倍。枯斑寄主测定结果与ELISA测定结果一致，由此说明，转基因线辣椒不仅植株个体具有抑制病毒增殖的能力，其原生质体同样表达了对病毒增殖的抑制作用(表4)。

表2 接种CMV、TMV后转基因线辣椒病毒含量(OC值)

Table 2 Virus proliferation in transgenic chili pepper inoculated with CMV and TMV

株系 Plants	病毒 Inocuhum virus	TMV 接种叶 Inoc. Leaf	TMV 新生叶 Fresh Leaf	病毒 Inocuhum virus	TMV 接种叶 Inoc. Leaf	TMV 新生叶 Fresh Leaf	病毒 Inocuhum virus	TMV 接种叶 Inoc. Leaf	TMV 新生叶 Fresh Leaf	TMV 接种叶 Inoc. Leaf	TMV 新生叶 Fresh Leaf
16－13		0.60	0.13		0.27	0.14		0.62	0.11	0.20	0.11
CK		0.13	0.12		0.11	0.10	CMV	0.13	0.10	0.12	0.11
4－2	TMV	0.67	0.19	CMV	0.25	0.16	TMV	0.61	0.21	0.21	0.12
CK		0.14	0.13		0.12	0.11		0.13	0.12	0.10	0.11
Shan8212		1.80	0.96		1.47	0.89		1.89	0.85	1.49	0.81
CK		0.06	0.05		0.04	0.05		0.04	0.05	0.03	0.04

注：CK为未接种植株。表中OD值为8次重复的平均值。

Note: CK was from uninoculated plants. The OD values in the table are average of 8repeats; The numbers of local lesions are the average of total 8 half leaves.

表3 接种CMV和TMV后线辣椒体内病毒含量(枯斑数/半叶)

Table 3 Virus accumulation in inoculated and fresh leaves of control and transgenic chili pepper (number of local lesions/half leaf)

植物材料 Plants	接种CMV(inoculating with CMV) 接种叶半叶枯斑数 Number of local lesions on inoculated leaf	接种CMV(inoculating with CMV) 新生叶半叶枯斑数 Number of local lesions on fresh leaf	接种TMV(inoculating with TMV) 接种叶半叶枯斑数 Number of local lesions on inoculated leaf	接种TMV(inoculating with TMV) 新生叶半叶枯斑数 Number of local lesions on fresh leaf
转基因品系(transgenicline)				
16－13	4.25	0.75	5.63	0.63
4－2	5.25	0.63	6.37	0.88
对照品种(untransgenic line)				
陕8212	17.88	5.25	29.38	11.37

注：枯斑数为8片半叶枯斑的总数平均数。Note: The numbers of local lesions are the average of total 8 half leaves.

表4 原生质体感染CMV病毒后病毒增殖量(OD值与枯斑数/半叶)

Table 4 Virus replication in protoplasts following inoculation with CMV

株系 Plants	检测植株号(No. of plant tested) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均OD值 Average of CMV titer	半叶枯斑数 Number of local lesions
16－13(CP＋)	0.11	0.10	0.12	0.13	0.15	0.10	0.10	0.10	0.11	0.12	0.11	0.57
CK											0.08	0.0
4－2(CP＋)	0.16	0.16	0.14	0.17	0.16	0.14	0.11	0.10	0.08	0.12	0.14	0.67
CK											0.09	0.0
34－11(CP＋)	0.17	0.07	0.12	0.15	0.11	0.10	0.08	0.08	0.12	0.11	0.11	0.86
CK											0.09	0.0
34－12(CP＋)	0.21	0.14	0.12	0.14	0.12	0.12	0.11	0.13	0.12	0.12	0.13	0.89
CK											0.08	0.0
Shaan 8212(CP－)	0.66	0.42	0.56	0.42	0.46	0.48	0.36	0.40	0.46	0.48	0.52	15.6
CK											0.03	0.0

注：CK为未接种植株。Note: CK was from uninoculated plants.

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

关于 CP 基因介导抗病性的表达性质与特点,前人总结为:减少病毒侵染位点数;延迟显症,降低病害严重度或少数植株不表现症状;减少病毒粒体的积累[1~5,10,11]。但是,研究涉及的范围多为烟草与 TMV 这一模式,对其它寄主植物与病毒组合下的 CP-MR 表达特点研究甚少。本论文在植株个体水平和细胞水平揭示了转化线辣椒 CP-MR 具有抑制病毒增殖的抗病表达特点。

以原生质体为试材,感染病毒后测定病毒的增殖可使发生在初期侵染细胞的事件与需要多个细胞参与的事件区分开来,使供试的两种试材处于同一细胞水平。本试验用两倍于常规接种浓度(20μg/mL)的 CMV 提纯病毒感染转基因线辣椒原生质体,48h 后对常规品种陕 8212 的平均 OD 值比转基因线辣椒高 4.2 倍,病毒含量明显高于转化植株,从而证实了植株个体水平抑制病毒增殖的现象正是转化线辣椒内在的 CP 基因介导抗病性表达的具体表现。

参考文献

[1] Nelson R S, Powell A P, Beachy R N, *et al*. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus[J]. Virology, 1987, 158:126 - 132.

[2] Cuozzo M, Connel K M, Kaniewski W, *et al*. Viral protection in trangsgenic tobacco plants expressing the CMV coat protein or its antisense RNA[J]. Bio/Technology 1988, 6:549 - 557.

[3] Hemenway C, Fang R X, Kaniewsiki W, *et al*. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA[J]. EMBO, J, 1988, 7:1273 - 1280.

[4] Lawson C, Kaniewski W, Haley L, *et al*. Engineering resistance to mxed virus infection in a commercial: resistance to PVX and PVY in transgenic Russet Burbank[J]. Bio/Technology, 1990, 8:127 - 134.

[5] 项　瑜,杨兰英,周雪荣,等.表达马铃薯 Y 病毒外壳蛋白的转基因烟草的抗病性研究[J].病毒学报,1995,11:158 - 162.

[6] Beachy R N. Virus resistance through expression of coat protein genes[A]. In biotechnology in plant disease control[C]. (edited by IlanChet), New York: Wiley-Liss, Inc, 1993.89.

[7] Cai W, Fang R, Shang H. Virus-Resistant chili pepper produced by agrobacterium species-mediated transformation[M]. Handbook of transgenic crops, Marcel Bekker Pubilisher Inc. of New York, 2001.38.

[8] 何晓明.辣椒(Capisicum annuum L.)组织培养及原生质体培养体系的建立[D].陕西扬陵:西北农业大学园艺系博士学位论文:1996, 11 - 13.

[9] 田　波.植物病毒研究方法.北京:科学出版社,1987.307 - 315.

[10] Powell A P, Nelson R S, De B, *et al*. Delay of disease development in transgenic plants that express tobacco mosaic virus coat gene[J]. Scnence, 1986, 232:738 - 743.

[11] Tumer N E, Kaniewski W, Haley L, *et al*. Expressing of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgeic tobacco and tomato[J]. EMBO J, 1987, 6:1181 - 1188.

[12] 商鸿生,王　旭,徐秉良.CP 基因转化的线辣抗卡那霉素和抗 CMV 特性的遗传[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29:103 - 106.