

徐启江  
王傲雪  
迟玉明

## 获得 CMV 番茄抗源材料研究进展



第一作者简介: 徐启江, 1970 年 10 月 2 日出生, 1994 年毕业于东北农业大学园艺系蔬菜专业获农学学士学位, 毕业后分配到黑龙江农垦师专生物系, 从事《农业基础》课程的教学工作。

番茄病毒的毒源种类至少有 30 余种, 在我国至少也有 10 余种侵染番茄的病毒存在, 而在生产上最常见的病毒主要是 TMV 和 CMV 两种。在番茄抗病育种工作中, 育种工作者早已找到或引进了 TMV 抗源材料, 并且育成了抗 TMV 的新品种, 目前在我国栽培的大部分番茄都抗 TMV, 其中抗性基因大部分源于由美国引入的含

Tm-2<sup>nr</sup> 的 Manapal 抗源材料, 设想通过直接方法育成抗 CMV 品种由于抗源的缺少而成为缺憾。因此, 育种工作者正试图从间接方法创造 CMV 抗源, 以达到成功育成抗 TMV 的番茄品种。

## 1 获得抗 CMV 抗源材料的主要方法

### 1.1 利用茸毛番茄避蚜特点防 CMV

据郑贵彬等人报道, CMV 的主要传播媒介为蚜虫, 通过育成抗蚜虫的品种就可达到防治 CMV 的目的。据张环等人报道, 由美国引入的 Smoky Mountain 品种, 被覆银灰色茸毛, 可起到防蚜效果。其抗蚜机理主要有两点: 一是该品种被覆茸毛, 影响蚜虫的取食定位; 二是品种被覆茸毛, 呈银灰色泽, 其反射率和反射量分别比普通番茄高 5% ~ 10% 和 25%, 植株表面的反射光起到驱蚜作用。蚜虫飞近白色表面而反射的短波光时, 常沿边缘飞过, 转变方向或离开, 尽管茸毛番茄本身不含任何抗 CMV 的基因, 但它能避开 CMV 的传播媒介——蚜虫。因此, 它有间接抗 CMV 的能力。但据张环 (1986) 报道, 多茸毛性状为单基因显性性状, 而且是纯合致死基因, 纯合显性时致死。因此, 当后代经自交后会有分离现象, 生产时在苗期需拨出非茸毛番茄, 留下茸毛番茄供实际生产应用。

### 1.2 利用基因工程方法创造 CMV 抗源材料

近年来, 随着分子生物学的发展, 植物基因工程正逐步走向成熟, 这为获得番茄 CMV 抗源带来了曙光。迄今为止, 人们获得抗病毒的基因主要来源于病毒, 如 CP 基因, Sat RNA 基因, 病毒的反义 RNA 等。而从植物中分离抗病毒基因尚未见报道, 这与人们对植物防御机制的研究和植物基因结构, 分离的水平有直接关系, 但更主要的是至今为止仍未找到 CMV 的抗源材料。

1.2.1 利用病毒外壳基因 (Cp- G) 这个方法在获得番茄 CMV 抗源中应用最多, 也最有效、最普及。在短短的五、六年内已经取得了很大成就。50 年代, 人们发现了植物病毒的交叉保护现象; 70 年代, 人们发现外壳蛋白注入寄主体内同样有抑制病毒侵染作用。这给人们启示, 病毒外壳蛋白可能在病毒侵染中起重要作用。首先获得成功的例子是 TMV 抗源材料的创造 (R. Beachy, 1986), 它的主要方法是首先将 CMV-CP 基因克隆出来, 然后通过载体法对植物进行转化, 将 CP 基因导入植物细胞染色体, 被转化细胞进一步形成愈伤组织, 最后分化为完整植株。也可采取花粉管直接导入的方法, 种植

后代并进行检测, 筛选出抗 CMV 植株, 也可用基因枪直接轰击愈伤组织, 从而获得抗性植株。1995 年, 杨荣昌等人已将 CMV-CP- G 导入番茄, 并发现 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。其主要机理是病毒的交叉保护反应, 具体说, 外壳蛋白的作用可能有 2 种情况: 一是抑制侵入病毒的脱壳; 二是病毒 CP 基因的 RNA 参与干扰病毒的复制。至于其安全性, 虽然有许多提出怀疑, 但至今仍未发现其危险性。

1.2.2 利用病毒卫星 RNA (Sat- RNA) 卫星 RNA (Sat- RNA) 是一类依赖于病毒才能复制并包裹在外壳蛋白的小分子 RNA, 它的

DNA碱基序列与病毒无同源性,但却能干扰病毒的复制。1983年田波等从卫星RNA能干扰病毒的复制这一特点,研制了SatRNA生物制剂S52,获得了成功,这使人们思考利用卫星RNA进行抗病毒基因工程。1986年英国科学家Baulconbe D.C等将CMV-SatRNA导入烟草,并证实能抗病毒。我国在1989~1990年间,田波研究室将其转化番茄获得成功,并证实有抗性。赵淑珍等也利用CMV-Sat-CDNA基因转化番茄,获得抗性植株。该方法有以下2个优点:一是低水平表达SatRNA即可起到抗病毒作用,低水平的SatRNA不致于对植物产生危险;二是最近还有人发现,带有SatRNA的CMV-S株系侵染的番茄可缓解或减轻PSTV侵染的症状。但也有缺点:一是SatRNA有良性和恶性之分,恶性可加重病症,而且良性与恶性SatRNA DNA序列同源性较高,良性易于转化为恶性;二是SatRNA转化的植株只是作物生长晚期抗病。这也给我们一个启示。将CP-G与SatRNA结合起来使用,便可达到防治效果。

SatRNA的抗病机理至今不清。大多数认为它与病毒RNA争夺RNA复制酶,而SatRNA复制周期短,复制快。因此,易占据RNA复制酶。

1.2.3 利用病毒的反义RNA与RNA互补的RNA即反义RNA。反义RNA与mRNA互补配对,即可抑制其基因表达。因此,反义RNA可关闭某一基因,而不影响其它基因的作用,这在动物细胞和原核生物基因表达已被证明。转与CMV-cp基因互补的反义RNA,即可达到抗CMV效果,但其效果比cp基因介导的要差。它的原因是反义RNA在调节基因表达中存在一个剂量问题,目前并不常用,尚待研究出新方法获得全新的机会。关于反义RNA的抗病机理,目前主要有以下3种假说:一是在细胞质内与mRNA形成RNA和RNA二聚体,使后者不能与核蛋白结合阻断翻译过程。二是在细胞核内与新生mRNA结合使mRNA不能向胞质运输。三是反义RNA与相应结合后处于不稳定状态,易在细胞核中被酶降解。

1.2.4 利用两种不同基因。CP-G介导的抗性表现在早期抗病或延迟发病,而SatRNA则表现为晚期抗病,不抗初始侵染。若将这两种不同基因串连到一个表达型载体上,应能得到抗性较高的植株。中科院微生物所田波研究室已获得了能稳定表达CMV-CP和CMV-SatRNA的工程烟草植株,经过体外攻毒测定,含双基因的工程烟草抗病性明显好于含单基因CMV-CP或CMV-SatRNA的烟草。虽然在番茄上至今还未见报道,但在理论上确认可以在番茄上获得成功。虽然抗病毒基因工程有许多方法,但许多方面并不成熟,至少是在CMV上还未见报道,有些还仅仅停留在理论上的可行。但毕竟给抗病育种一个新的机会,并将逐步走向成熟,从而获得较好的CMV番茄抗源材料。

## 2 CMV番茄材料的鉴定方法

CMV番茄抗源材料是否被成功获得,需要对获得植株进行鉴定。除了常规的接种鉴定方法外,对于转基因番茄,往往还可通过分子生物学方法进行辅助鉴定。随着基因工程技术的完善,这些鉴定方法也不断成熟。分子生物学检测转基因番茄方法有以下几种:

2.1 纸电泳法。目前常用的载体法导入基因主要用Ti和Ri质粒,这两个质粒是土壤农杆菌中的两种质粒,利用改造的Ti和Ri质粒做为载体进行导入基因,这两种农杆菌诱导植物生产冠瘿瘤和毛状根,能合成非感染组织。把组织提取液进行高压纸电泳后,再进行碱性银染就能检测出这种物质。有这种物质的存在,证明基因被导入植物中。

2.2 Southern blot。分子杂交是基因工程的重要技术之一。鉴别DNA的杂交称为Southern blot即Southern杂交。杂交的受体是DNA片段,可用DNA也可用RNA。受体从琼脂糖凝胶转移到硝酸纤维薄膜(NC)上,与探针片段进行杂交。转基因中使用的基因已知其序列,使可合成探针,用同位素进行标记后,与标准品对比,标准样品可设计正样品和负样品,正样品用CMV-CP片段,负样品用非转化植株。观察其结果,出现非转化植株没有的带纹并大致与正样品在同一位置,即表示基因导入。

2.3 Western blot。Western blot是鉴别蛋白的杂交。杂交的受体是蛋白质。在转CMV-CP基因时,如能转入,应有病毒外壳蛋白的生产。许多实验证明工程植株对病毒的抗性需病毒外壳蛋白的参与,而且抗性强弱与蛋白质表达量直接相关。将转化植株的蛋白提取液与CMV抗血清反应,如果是起特异性免疫反应的蛋白,则出现此种蛋白的杂交带,否则不会出现此种蛋白的杂交带。

2.4 斑点杂交(Dot blot)。斑点杂交是由Southern blot衍生而来的鉴别DNA的杂交法。它是直接将DNA样品点在硝酸纤维薄膜上使之成为斑点,然后再加同位素标记的探针,经自显影后如出现杂交斑点,表示有导入基因存在。

2.5 PCR扩增。PCR(polymerase Chain Reaction)指多聚酶链反应技术,通过该项技术可扩增基因。设计好引物,然后进行PCR扩增,最后进行电泳,从电泳带上即可显示该植株是否含有这个基因。

获得番茄抗源材料是当前番茄育种上解决的一个主要问题,就目前来说,育种工作者还仍未找到CMV抗源,而通过遗传工程得到的纯化的CMV番茄抗源材料并得以实际应用也尚未报道,这需要进一步的理论研究和技术研究,以便早日得到较好的抗CMV番茄品种。

(第一、三作者黑龙江省农垦师专生物系 阿城市 150301 第二作者东北农业大学 150030)