

马铃薯转 CP 基因育种研究进展

赵福宽 张鹤龄 哈斯阿古拉 刘纪麟 郑用琰

(北京农学院园艺系)

(内蒙古大学生物系·呼和浩特)

(华中农业大学·武汉)

近年来,马铃薯转基因育种研究进展迅速。以病毒外壳蛋白(CP)基因为目的的转基因工作在国内外均已获得成功,为选育抗病毒的马铃薯新品种开辟了新途径。现将该领域的有关进展分述如下。

1 马铃薯转 CP 基因育种现状

马铃薯病毒病害是影响马铃薯生产重要因素之一,每年都给世界马铃薯生产造成巨大损失。解决这一问题根本途径是培育高度抗病毒优良品种。近十年来,应用生物工程技术将病毒外壳蛋白(CP)基因导入马铃薯研究工作已取得重要进展。1988 年 Hemenway 等^[1]将马铃薯 X 病毒(PVX)的外壳蛋白(CP)基因导入植物,CP 基因在转基因植株内正常表达并介导出对 PVX 的抗性。Lawson 等(1990)^[2]将马铃薯 Y 病毒(PVY)的 CP 基因导入马铃薯并获得了抗 PVX 的马铃薯株系。Frank Vander Wilk 等(1991)^[3]将马铃薯卷叶病毒(PLRV)的 CP 基因导入马铃薯,转基因株系表现抗 PLRV 侵染。国内宋艳茹等(1994)^[4]获得了表达 PVX 和 PVY 的双价 CP 基因的转基因马铃薯。张鹤龄等(1995)^[5]将 PLRV 的 CP 基因导入马铃薯,经酶联免疫吸附试验和田间抗性鉴定表明转基因马铃薯株系延迟发病时间和降低发病指数。

目前已知马铃薯抗病毒途径有多种,而转 CP 基因途径被认为是最有应用潜力的途径之一。CP 基因介导植物产生抗病性是目前马铃薯抗病毒基因工程领域中研究热点。多数用 CP 基因转化马铃薯实验都获得了抗病毒株系,但不同来源的 CP 基因介导马铃薯抗病毒的程度并不一致。CP 基因介导抗病性一般表现为只抗 CP 基因供体病毒或亲缘关系密切的病毒类型。近年来,已有一些转 CP 基因马铃薯新品系在实验室鉴定和网室攻毒试验基础上,进一步进行田间试验。转 PVX 和 PVY 的马铃薯在田间试验中表现高度抗病毒和显著增加产量,可望在生产上大面积推广。

2 CP 基因介导马铃薯抗病毒机制

关于 CP 基因介导基因马铃薯抗病毒的机制目前

有不同的解释。有的研究者认为 CP 基因的转译产物外壳蛋白介导抗病毒;也有的研究者认为是 CP 基因的转录产物 CP RNA 介导抗病毒。外壳蛋白介导抗病毒的实验证据主要有两点:其一,转基因植物可积累外壳蛋白,且外壳蛋白的积累水平与植株对病毒的抗性呈正相关。其二,用病毒 RNA 接种时转基因植物的抗病性丧失,即转基因植物只抗病毒粒体而不抗病毒 RNA。然而,近年来对表达 PVX、PVY 及 PLRV CP 基因的转基因植物研究的结果似乎无法用外壳蛋白介导抗病这一理论来解释。也许有其他机制决定转 CP 基因植物的抗病性。

目前对转 PVX 外壳蛋白(CP)基因植物的抗病性研究得到的一致结果是在表现抗病转基因植株体内都能检测到 CP 基因的转译产物外壳蛋白。然而,关于抗病性与转译产物关系的研究,不同研究者得出了不同实验结果。有试验显示外壳蛋白积累与抗病性呈正相关,也有试验表明表现高度抗病转基因植株反而积累较少的 PVX 外壳蛋白^[6]。Karen—Beth G 等(1993)^[7]报道,表达 PVX CP 基因的转基因植物对 PVX 病毒粒体及 PVX RNA 都有抗性。基于上述实验事实,目前仍不能肯定表达 PVX CP 基因的转基因植物抗病性是由转译产物外壳蛋白介导,还是由转录产物 RNA 介导的。Lawson 等(1990)^[2]研究了转 PVY CP 基因植株中外壳蛋白和积累与抗性的关系,结果显示表现较高抗性的两个株系只积累很少的外壳蛋白。植株体内积累大量外壳蛋白的转基因株系反而表现感病。据此作者推测可能有外壳蛋白之外的其他因素与转基因植物的抗病性有关。Frank van der wilk 等(1991)^[3]对转 PLRV CP 基因马铃薯的抗病性进行了研究,结果显示转基因植株表达 PLRV 的 CP RNA,但测不出外壳蛋白。表达 CP RNA 的转基因植株表现抗病。Presting 等(1995)^[8]构建了经修饰的可增强蛋白表达的 PLPV CP 基因表达载体以转化马铃薯,所获得的转基因植株与用未经修饰的(野生型)CP 基因转化后的植株相比抗病性无明显差异。这说明转基因植株的抗病性与外壳蛋白可能无关,很可能是 CP 基因

情人草叶片再生植株

张弓 刘丽娟 金春斌

情人草 (*L. belt laard*) 是杂种补血草中的一个品种。因花枝坚韧、花色持久、不易褪色, 而成为切花中重要成员, 情人草组培繁殖比播种繁殖能得到更加健壮和整齐一致的小苗, 因而推广很快。

1 材料与方法

取田间生长的情人草中部叶片做接种材料, 取稀释的洗涤液清洗。再用自来水冲洗 10min, 放入消毒瓶, 在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 30s, 边泡边摇。倒出, 再用 0.1% 升汞灭菌 1min, 用无菌水冲洗 4 次, 备用。将消毒好的叶片切成数片, 接种在 MS+2mg/L6BA+0.2mg/LNAA 的培养基上进行分化培养。培养基 pH 值为 5.8, 培养温度控制在 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 光照强度为自然散射光, 辅助 1000LX 照明, 光照时间为 10~12h/d。在 1/2MS+0.5mg/LNAA 培养基上诱导生根, 用珍珠岩基质移栽。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的形成和分化丛生苗 接种在 MS+2mg/L6BA+0.2mg/LNAA 培养基上的情人草叶片, 接种 20d 左右, 外植体周围产生绿色愈伤组织, 愈伤组织逐步扩大。并在其表面出现绿色突起, 这些突起继续培养 15d 左右, 分化成芽, 继而发育成苗丛。随着培养时间的延长, 苗丛不断扩大。

2.2 苗的扩大繁殖 当小苗丛长到 4~5cm 高时, 将小苗丛取出分离, 高的可切成 2~3 段, 小苗不用再切。转接到新鲜的 MS+2mg/L6BA+0.2mg/LNAA 分化培养基上。小苗基部不断分化出小苗, 形成新的小苗丛, 当小苗丛长至 4~5cm 高时, 继续分离转接, 这样反复下去, 加速情人草的繁殖。

2.3 根的诱导和试管苗的移栽 当繁殖到一定数量后, 待苗长到 2cm 高时, 将小苗取出, 接种到生根培养基上, 培养 15d 左右, 即可长出 3~5 条根, 25d 后, 当根长到 2~3cm 时, 小苗也长到了 4~5cm 高, 可将培养瓶盖打开, 放入遮阴的大棚或温室内锻炼小苗, 5~7d 将生根苗从瓶中取出, 放入清水中洗净培养基, 栽入消毒好的珍珠岩中, 用清水浇透, 复好薄膜。加强温度、湿度和光照管理, 使小苗逐渐适应外界环境条件, 20~25d 后, 选阴雨天移入苗床定植。

3 培养过程的改进

可适当降低 6BA 的浓度, 增强苗的健壮程度。以绵白糖代替蔗糖, 自来水代替蒸馏水, 取得了用蔗糖与蒸馏水相同的培养效果, 降低了培养成本。在培养过程中, 始终进行自然散射光照射。既降低成本, 又锻炼了小苗, 提高了苗的成活率。

(吉林省通化市东昌区江沿路 48 号 通化市园艺所 134001)

的转录产物 RNA 介导植物产生抗病性。CP RNA 介导马铃薯抗病毒的可能机制是与病毒 RNA 复制的模板负链 RNA 结合, 从而干扰病毒基因组 RNA 的复制。或者是 CP RNA 与病毒基因组 RNA 竞争结合蛋白转译因子, 使病毒基因组 RNA 的转译过程不能正常进行。

3 对马铃薯转 CP 基因育种方法的思考

如前所述, 目前国内外均获得了转 CP 基因的马铃薯株系, 但迄今所获得的转 CP 基因马铃薯的抗病程度多数表现为中抗, 而高抗和免疫类型相对较少, 抗性水平有待进一步提高。此外, 某些转基因株系出现外源 CP 基因沉默和失活现象, 致使 CP 基因的正常转录表达受到抑制。针对转 CP 基因育种存在的上述问题, 必须对目前的方法加以改进。为了进一步提高转基因马铃薯对病毒的抗性, 在构建 CP 基因的植物表达载体时应加上能增强基因转录表达的调控序列。为了避免外源 CP 基因的沉默与失活, 应深入研究基因沉默与失活的原因, 从而采取相应的对策。目前的研究表明基因的沉默与失活与整合到植物基因组的外源 DNA 的多拷贝性有关, 因此, 对转基因株系的选育过程应尽可能筛选整合了单拷贝外源 CP 基因的转基因株系。随着研究的深入, 马铃薯转 CP 基因育种的方法将不断改进和完善, CP 基因介导的马铃薯抗病毒基因工程将会在生产上发挥重要作用。

参考文献

- 1 Hemenway, C. et al. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO. J. 1988, 7: 1273~1280
- 2 Lawson, C. et al Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar; resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. Bio/Technology 1990, 8: 127~134
- 3 Frank van der wilk et al. Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. Plant Molecular Biology 1991, 17: 431~439
- 4 宋艳茹 李枏 侯林林等. 双价外壳蛋白基因植物表达载体的构建及马铃薯转基因植株的鉴定. 植物学报 1994, 36 (11): 842~848
- 5 张鹤龄 李天然 哈斯阿古拉等. 抗卷叶病毒 (PLRV) 转基因马铃薯及其抗病性的研究. 病毒学报, 1995, VOL. 11NO. 4: 342~350
- 6 John, H. et al. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Annu. Rev. Microbiol. 1993, 47: 739~631
- 7 Karen—Beth G. et al. Control of plant virus diseases by pathogen—derived resistance in transgenic plants. Plant Physiol. 1993, 102: 7~12
- 8 Presting, G. G. et al. Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs Phytopathology, 1995, 85: 436~442.