

# 番茄抗黄瓜花叶病毒基因工程育种的研究进展

徐思光, 王永飞, 马三梅

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

**摘要:** 对番茄抗黄瓜花叶病毒基因工程育种的研究进展进行了总结, 其主要包括利用病毒外壳蛋白、病毒复制酶、病毒星 RNA 和天花粉蛋白基因等, 讨论了番茄抗黄瓜花叶病毒基因工程育种的发展方向及前景。

**关键词:** 番茄; 黄瓜花叶病毒; 基因工程

**中图分类号:** S641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2005)05-0010-02

番茄是经济效益较高的蔬菜种类之一。而素有“植物界流感”、“植物界癌症”之称的黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)感染番茄后会造成番茄的大量减产, 对番茄生产构成严重威胁<sup>[1~2]</sup>。由于番茄栽培品种中缺乏抗 CMV 的基因, 而利用番茄野生种作为抗源时, 有远缘杂交的障碍, 所以利用基因工程将其他物种的基因导入番茄栽培品种中, 突破远缘杂交不亲和的困难, 创造出抗 CMV 的番茄, 成为番茄育种的研究热点。现对利用基因工程防治番茄的黄瓜花叶病毒病的研究进展进行总结。

## 1 利用 CMV 自身的基因

### 1.1 利用 CMV 外壳蛋白(coat protein, CP)基因

目前利用 CMV 外壳蛋白基因来创造抗 CMV 的番茄, 是研究最多的, 已经取得了很大成就。例如杨荣昌等<sup>[3]</sup>(1995)利用根癌农杆菌介导法获得了 42 株转 CMV-CP 基因的番茄植株, 在苗期人工接种 CMV, 转基因植株的发病率和非转基因植株相比明显降低。施曼玲等也得到同样的研究结果<sup>[4]</sup>。汪智渊等<sup>[5]</sup>(1997)利用土壤农杆菌将 CMV-CP 基因导入番茄中, 转基因番茄植株在田间的防病效果达 57%~79%, 转基因番茄的产量和自然发病的番茄相比增加 5 倍以上。这说明转基因番茄确实可以达到防病增产的效果。外壳蛋白基因介导的抗性强弱与蛋白表达水平没有直接对应关系, 但是在病毒浓度很高的状态下转基因植株的抗性会丧失, 而且外壳蛋白介导的抗病性只是延迟发病, 不能根治。所以 CMV 外壳蛋白介导的抗病性只抗 CMV 病毒。为了获得抗多种病虫害的番茄, 有人将 CMV-CP 和其他一些基因同时导入番茄中。例如梁小友等<sup>[6]</sup>(1994)构建了含 CMV-CP 基因和抗虫的 Bt-toxin 基因的表达载体, 导入番茄中, 得到了含 CMV-CP 基因和 Bt-toxin 基因的转基因番茄植株。单雷等<sup>[7]</sup>(1998)利用根癌农杆菌将烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)和 CMV 的 CP 基因导入番茄中, 得到了 3 株转基因番茄, 转基因番茄的发病率明显低于对照。此外, 王傲雪等<sup>[8]</sup>(2002)还通过花粉管通道法向番茄中导入 TMV-CP 和 CMV-CP 两个基因, 得到 6 株转基因番茄植株。

### 1.2 利用 CMV 复制酶基因

病毒复制酶基因是病毒非结构蛋白基因, 在病毒核酸加入植物体内后结合到寄主核糖体上发挥作用。利用病毒复制酶基因也可以创造出抗黄瓜花叶病毒的番茄。例如 Zeitlin

等<sup>[9]</sup>已经克隆了 CMV 的复制酶基因, 导入番茄后, 获得了具有高度抗病性的转基因番茄。从目前的研究来看, 病毒复制酶基因介导的抗病性优于 CP 基因介导的抗病性, 可克服在病毒浓度很高的状态下转基因植株抗性丧失的缺点。

### 1.3 利用 CMV 的卫星 RNA

CMV 病毒的卫星 RNA 是一种可复制的低分子量 RNA, 它存在于 CMV 病毒的基因组中。利用 CMV 病毒的卫星 RNA 可以创造出抗黄瓜花叶病毒的番茄。例如我国赵淑珍等<sup>[10]</sup>用 CMV 卫星 RNA 的 cDNA 转化番茄, 获得的转基因番茄植株对 CMV 表现出抗性。但卫星 RNA 有良性和恶性之分, 良性可减轻病症, 恶性可加重病症, 而且良性与恶性 Sat RNA 的 DNA 序列同源性较高, 良性易转化为恶性, 所以有潜在的危险性。

由于 CMV 外壳蛋白基因介导的番茄抗病性主要表现在早期抗病或延迟发病, 卫星 RNA 的转化番茄只是在番茄生长晚期抗病, 不抗初始侵染, 所以在番茄上可以将 CMV 的卫星 RNA 和外壳蛋白的基因同时导入, 获得转基因番茄, 增加番茄的抗病性。

## 2 利用非病毒来源的基因

利用其它植物的核糖体失活蛋白基因: 核糖体失活蛋白(Ribosome Inactivating Protein, RIP)是一类能抑制蛋白质生物合成的蛋白, 广泛存在于高等植物中。天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是药用植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)中含有的一种核糖体失活蛋白。它由 237 个氨基酸组成, 具有广谱抗植物病毒的活性, 而且 TCS 的抗病毒作用在异种植物中尤其明显。姜国勇等<sup>[11~12]</sup>(1998, 1999)通过根癌农杆菌将 TCS 和 GUS 同时导入番茄的两个品种, 获得了转 TCS 基因番茄植株, 转基因植株即对 TMV、CMV 和 TBRV 等病毒具有抗性, 还能抑制蚜虫和粉虱的生长。该实验为用基因工程的方法进行番茄广谱抗病毒材料的选育开辟了新途径, 对番茄抗病育种的研究具有重要意义。

利用基因工程的方法来达到抗病毒的方法还有很多<sup>[13~14]</sup>: 例如利用病毒的反义 RNA 基因、移动蛋白基因、核酶、缺陷干扰颗粒(Defective interfering, DI)以及动物产生的干扰素和抗体的基因等, 但在番茄中利用这些基因来抗 CMV 还未见报道。

由于转基因技术还没有定点插入, 获得转基因番茄并不是所有性状都符合育种目标, 并不能直接供农民种植, 还必须还要通过常规杂交, 选育出优良的抗 CMV 番茄品种, 然后才能推广种植。所以转基因技术还必须和常规育种技术相结合,

\* 基金项目: 暨南大学引进人才启动基金项目(692016和 692017)

收稿日期: 2005-05-10

才能真正选育出抗 CMV 的番茄品种。

### 3 展望

除 CMV 基因组上的外壳蛋白基因、复制酶基因、卫星 RNA 和天花粉蛋白基因外,其它基因如移动蛋白基因能否介导番茄同样强度的抗病性,这些问题还需要进一步探讨。随着植物分子生物学和分子病毒免疫学的发展,对 CMV 病毒复制、移动和感染寄主范畴等机制的深入认识,以及番茄转基因技术、反义技术的进一步完善,利用转基因技术创造抗 CMV 的转基因番茄必将有新的突破。

#### 参考文献:

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995, 236~240.
- [2] Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*, 2000, 71(1~2): 9~21.
- [3] 杨荣昌, 徐鹤林, 龙明生, 等. 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[J]. 江苏农业学报, 1995, 11(1): 40~44.
- [4] 施曼玲, 薛宝娣. 转 CMV-CP 基因番茄植株的抗病表现[J]. 杭州师范学院学报, 1996, 6: 276~279.
- [5] 汪智渊, 吴汉章, 薛宝娣, 等. 转 CMV-CP 基因番茄后代的田间

抗病性[J]. 南京农业大学学报, 1992, 20(1): 39~42.

- [6] 梁小友, 米景九, 朱玉贤, 等. 双抗(抗病毒及抗虫)植物表达载体的构建及番茄的转化鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(11): 849~854.
- [7] 单雷, 毕玉平, 王兴军, 等. 双抗 TMV 和 CMV 转基因番茄后代的遗传分析[J]. 山东省农业科学, 1998, (4): 11~13.
- [8] 王傲雪, 李景富, 徐香玲, 等. 番茄自花授粉后导入抗病毒基因的研究[J]. 北方园艺, 2002, 4: 54~55.
- [9] Zeitlin M. Specificity of replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus. *Virology*, 1994, 201: 200~205.
- [10] 赵淑珍. 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[J]. 中国科学(B辑), 1990, 7: 708~713.
- [11] 姜国勇, 翁曼丽, 金德敏, 等. 番茄转 TCS 基因植株的生物学性状研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 395~396.
- [12] 姜国勇, 金德敏, 翁曼丽, 等. 天花粉蛋白基因转化番茄的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(3): 334~336.
- [13] 王文静, 王富荣, 石秀清, 等. 现代分子生物学技术在植物抗病育种中的作用[J]. 山西农业科学, 2002, 30(3): 76~79.
- [14] 闫新甫主编. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003, 214~238.

苦瓜又名癞葡萄, 君子菜, 由于含有糖苷——腺嘌呤苦味素, 有一种特殊的苦味。苦瓜原产印度东部, 属葫芦科苦瓜果属一年生蔓性植物, 茎、叶、花、果实奇特, 可以作为观赏植物栽培。苦瓜营养丰富, 含多种无机盐, 每百克可食部含胡萝卜素 0.08 mg(毫克), 硫胺素 0.07 mg(毫克), 核黄素 0.04 mg(毫克), 尼克酸 0.03 mg(毫克), 抗坏血酸 84 mg(毫克), 根、茎、叶、花、果实和种子均可入药, 果实有明显解毒, 消热解暑, 降血糖的功效。

由于苦瓜营养丰富兼具保健功能, 在各地普遍引种, 成为夏季时令蔬菜, 为延长供应季节还采用大棚日光温室进行保护地栽培。在栽培技术上, 苦瓜需耐高温而不耐湿, 易出现早衰, 发生线虫病和枯萎病。为了提高苦瓜的抗病性, 我们尝试对苦瓜进行嫁接栽培, 苦瓜枯萎病寄主范围窄, 一般不侵害其他瓜类, 我们曾尝试以丝瓜作砧木进行嫁接栽培, 提高了苦瓜的抗病性和植株生长势, 取得了良好的效果, 并克服了保护地栽培轮作的困难, 使连茬成为可能, 现介绍如下。

## 1 嫁接方法

### 1.1 破壳变温催芽

苦瓜种皮坚硬, 发芽缓慢, 常规方法出芽缓慢, 发芽率低, 我们在播种前用 50℃~60℃温水浸种, 冷却后继续浸 1 d~2 d(天), 使种子吸水膨胀。晾干表面水分, 磕开种尖, 装入小沙袋中, 再置入大塑料袋中扎紧密封以保持湿度。然后置于 30℃~32℃温度下处理 10 h~12 h(小时), 28℃~30℃处理 12 h~14 h(小时)进行催芽, 在催芽过程中每天调温通气 4~5 次, 经过 3 d(天)以后发芽率可达 85%, 可见用这种方法可明显加速苦瓜种子发芽并提高发芽率。

### 1.2 播种

播种在阳光充足的温室中, 并切除顶芽, 及时清除病株。

### 1.3 砧木选择

农家丝瓜有短筒形和长筒形的, 我们选取抗病性较好的且茎粗壮的长方形丝瓜作为砧木种。在日光温室中培育丝瓜苗, 约 3 周时, 丝瓜苗有 1 片真叶, 这时可进行嫁接。

### 1.4 切取苦瓜接穗

从苦瓜母株上切取叶子没有开张的子蔓末梢一节。

### 1.5 嫁接

最好在傍晚或阴天嫁接, 在嫁接前 2 h~3 h(小时), 将砧木苗浇湿, 用消毒刀片切除丝瓜的生长点真叶, 保留两片子叶, 再纵切胚轴 1 cm~1.5 cm(厘米), 将苦瓜接穗削成长约 1 cm~1.5 cm(厘米)的双楔形, 插入砧木丝瓜的胚轴中, 用嫁接夹夹住砧穗相连部位。

### 1.6 培育嫁接苗

将嫁接好的苗放在遮光塑料棚中, 不需要浇水, 但湿度要高, 1 周后接穗成活, 再置于透光的温室中培育管理, 1 个月后即可定植。用这种方法嫁接可以使苦瓜增产抗病, 提高苦瓜的耐寒力, 延长苦瓜的生长期, 防止早衰, 并可使采收期提前, 经济效益十分显著。

## 2 嫁接栽培中的关键技术

提前播种培育嫁接苗是夺取苦瓜早熟丰产的关键。在山东济宁采用日光温室栽培, 12 月上旬播种, 培育苗龄 60 d(天)。

播种时土壤中不应含枯萎病病菌。切除顶芽时应在无菌条件下进行, 所有器械应消毒, 一旦发现病毒或病害应立即清除, 以保证母株健康。

适时定植, 合理密植, 单行种植, 定植时间为 2 月上旬苗具有 4~6 叶时栽植。

保持适宜的温度和充足的阳光, 一般白天 25℃~30℃, 夜间 20℃, 视晴天阴天可适时调整。

(山东济宁师专生物系, 济宁 272025)

# 以丝瓜作砧木嫁接栽培苦瓜的方法

尹春光