

高抗病毒多基因转化烟草新品系的快速繁育

Fast Breeding of High Resistance to Cucumber Mosaic Virus Conferred by Multiple Genes in Transgenic Commercial Tobacco Cultivar

王苏燕 叶 寅

(中科院微生物研究所 北京 100080)

一、多基因策略是提高抗病性的有效途径

利用植物基因工程培育抗病毒工程植物新品系已取得了突破性进展。将有用的抗病毒基因(如病毒的外壳蛋白基因、卫星基因、部分复制酶序列及核酶等)导入植物体内,使之插入到植物染色体上,抗性基因稳定表达并赋予植物以抗性。这些目前已有的抗性基因都可表现出程度不同的抗病性。然而,这些抗性水平还不足以达到推广应用的程度。因此,如何提高工程株系的抗性是这一领域面临的关键问题。

根据多年的工作,参照已有的资料,我们认为提高工程植物抗性的一个可行途径是采用复合抗性基因的策略,即将多个抗性基因同时转入植物体内以使这些基因协同作用,从多个途径封闭病毒基因组的功能表达,从而有效地阻断病毒的复制与传播途径。换一个角度来说,由单一基因控制的抗性是垂直抗性,很容易被病原体所克服,而由多种抗性基因控制的水平抗性是难以被病原体所克服的。在学部委员田波的指导下,我们实验室与河南省农科院烟草所合作,以黄瓜花叶病毒(CMV)外壳蛋白和卫星双基因转化烟草所进行的大田试验结果证实了这一设想。

二、植物育种技术和程序的改进

虽然植物常规育种至今仍然是培育新品种的主要途径,但它也存在着技术和程度上的局限性。首先常规育种通过有性杂交和回交等进行的有用基因的转移需要长久的时间及繁杂的程序,人力和物力的消耗也较高。常规育种面临的另一挑战是难于在性状分离的群体中选择理想的重组表型(Recombinant Phenotype)。

利用基因工程方法向优良品种中转移单一的或少数基因,并不影响原有优良性状的遗传和表达。所转移的基因虽也产生性状分离现象,但可通过次数不多的自交,获得同质结合的后代。例如我们向烟草和番茄中转入单一的抗病毒病基因,经过3~4代的选择,即可获得都具有抗病性的品系。

基因工程育种由于可直接把目的基因插入植物染色体,因此还可采用许多简化育种程序的技术。我们以烟草主要品种NC-89为转化受体,通过农杆菌将携带有两个抗性基因表达载体直接转化烟草花药培养的单倍体植株的叶片,经过卡那霉素抗性选择出的再生植株,再通过基因表达产物的分子杂交选择,最后在高浓度的CMV接种的压力下,选择出少数高度抗病的植株,用秋水仙素处理使染色体加倍,获得种子。种子当年到海南岛进行繁育和抗病性田间测定,其后代植株在抗病性和其它性状都有均一的表现。南繁收获的种子即可在第二年作较大规模的田间抗病性鉴定并参加区域性品种鉴定,大大缩短了基因工程育种的时间。

三、多基因转化烟草新品系的快速培育获得成功

我们将CMV外壳蛋白(CP)基因与其卫星RNA(Sat-RNA)基因[目前有证据表明,CMV卫星RNA具有抗TMV(烟草花叶病毒)、类病毒及真菌的作用]构建到同一个表达载体上并转化NC89单倍体植株的叶片,获得表达CMV-CP+Sat-RNA的单倍体苗。将单倍体苗经过秋水仙素处理后使染色体加倍,直接获得双基因呈纯合状态的转基因株系。

将经检测筛选出的85株表达双基因的转化植株在河南进行小区人工接种病毒试验(病毒浓度高达200 μ g/ml),即使在如此高的接种浓度下,仍有3株转基因植株在攻毒后90天完全不发病。

当年将这3株高抗植株种子在海南省进行繁育和抗病性田间测定。人工接种CMV时,NC89对

照的发病率及病情指数(反映病症程度的一个参数,百分数越高,表明病症越严重)均为 100% 双转 TMV-CP+CMV-CP 的 NC89 植株发病率为 76%,病情指数为 44.5%;双转 CMV-CP+CMV-Sat RNA 的 NC89 植株发病率平均为 26.2%,病情指数平均为 14.7%。在自然条件下,由于试验地周围种植有黄瓜且蚜虫较多,所以 NC89 植株对照的发病率及病情指数都较高,分别是 75%和 57.5%,双转 CMV-CP+TMV-CP 的 NC89 植株发病率为 20%,病情指数为 11.4%,而双转 CMV-CP+CMV-Sat RNA 的 NC89 植株发病率为 8.6%,病情指数为 4.08%。这一结果证明;双转 CP+Sat 的 NC89 植株的抗病效果无论在人工攻毒条件下,还是在自然环境中其抗病效果相当显著,有效保护作用也明显高于双转 TMV-CP+CMV-CP 的植株。

从海南省种植的第二代中筛选出抗性及其农艺性状均较好的 6 个单株(经检测全部带有 CP 及 Sat RNA 双基因)于第二年又在河南省进行了大面积种植,参加烟草品种的区域评比试验。一方面鉴定转基因植株的农艺性状是否有变异,第二方面鉴定这一外源基因是否纯合,第三是继续鉴定其抗病效果。实验结果如下:

1. 在自然发病条件下[试验地存在 CMV、TMV、PVY(马铃薯病毒 Y)],同时表达 CMV-CP 和 CMV-Sat RNA 的 A、B、C 三个品系的 NC89 发病率及病情指数又显著低于只表达 CMV-CP 和 TMV-CP 的 T 品系;未转基因对照的 NC89 病情指数为 14.06%。A、B、C 三个品系的平均病情指数为 3.24%,相对防效平均为 76.9%;T 品系病情指数为 8.45%,相对防效仅为 39.9%。这表明:同时将一种病毒的多个相关基因导入烟草时,可赋予其更高的抗病性,也即表现出植物的水平抗性。因而在田间应用时,可以更好地控制病毒病的发生。

2. 人工接种 CMV 条件下转基因材料与未转基因材料的抗病性有着极其显著的差异,其相对防效最高可达 92.95%,较低的可达 63.07%,已相当于

大田高抗水平。A、B、C 三个转基因品系的发病率在 15.5~20.5%之间,病情指数在 5.9~8.73%之间,而 T 品系的发病率达 47.97%,病情指数为 30.91%,二者有较明显的差异(见封三彩图 4),这一结果与在自然条件下的试验结果基本一致。

3. 比较接种 CMV 与未接种 CMV 时 NC89 对照组可见明显差异(见封三彩图 2),接种 CMV 的发病情况很严重,而同样情况下,转基因的 B 品系,不管接种 CMV 与否,生长状况良好,症状较轻或不表现症状,说明了 B 品系具有很强抗病性(见封三彩图 1)。

4. 在主要农艺性状方面,转基因材料与未转基因材料之间没有明显差异,大田外观长势较好,这就证明转基因材料的种性未变。

5. A 品系与易感病毒的烟草品系杂交 F₁ 代的抗病性仍然较高,证明了转基因烟草的抗病性可以稳定遗传(见封三彩图 3)。

综上所述,为进一步提高转基因烟草的抗病性,获得更理想的大田防治效果,同时将一种病毒的多个相关基因导入烟草是必要的也是可行的。我们的实验结果表明,双转 TMV-CP+CMV-CP 的烟草植株与未转基因对照相比有一定的抗病性,但与转 CMV-CP+CMV-Sat 双基因烟草相比,抗病性有显著差别,可能原因是前者的抗病思路局限在外壳蛋白这一单一策略,而后者是将外壳蛋白与卫星 RNA 策略结合在一起,协同抗病,从多个途径,多方位地封闭病毒的功能表达,从而有效地阻断病毒在植物体内的增殖与传播途径。按照这一思路,我们正在试验将现有的 TMV-CP 基因,TMV 复制酶基因部分序列(TMV-54KD 蛋白),马铃薯 Y 病毒(PVY)CP 基因,分别与双基因(CMV-CP+CMV-Sat RNA)组合,通过农杆菌共感染的方法,转化烟草,以图获得在田间环境下对 CMV, TMV, PVY 的高度抗性。现在第一代的结果已初步显示出这种多基因组合转化的植株,表现的抗性比单基因转化明显提高。

(责任编辑 肖庆山)

科技动态

厄尔尼诺现象为何持续三年?

1993 年全球气候反常现象十分明显。气象专家们认为,原因很复杂,但至少与两大现象有关:一是厄尔尼诺现象;另一个是 1991 年菲律宾皮纳图博火山爆发的后遗症——向大气中排放的灰烬至少使地面平均气温下降近 1℃。科学家解释说:“两种现象结合起来造成高空气流变化,在某些情况下使气候发生彻底变化。”

目前最引起人们关注的是厄尔尼诺现象。专家们指出:这次厄尔尼诺现象并不是本世纪最严重的,但却是持续时间最长的——本世纪还没有持续三年的纪录!科学家们担心,如果厄尔尼诺现象 1994 年继续存在,这就

意味着仍将全球性气候反常。

这次厄尔尼诺现象为何持续时间这么长?上海天文台的有关科研人员用地球自转速率变化的原理似可解释这一现象。

原来,厄尔尼诺现象与信风有关,而信风的强弱与地球自转速率有关,地球自转加速,信风就强劲,把赤道带太平洋洋面暖水吹到西太平洋;反之,信风就弱,西太平洋暖水就东流。近两年地球自转速率减慢,连续出现“闰秒”,信风较弱,因而持续出现厄尔尼诺现象。

(摘自 1994 年 1 月 2 日《科技日报》,余仁杰文)