

表达黄瓜花叶病毒卫星 RNA 的转基因烟草耐烟草花叶病毒

刘玉乐 王振东* 朱 锋 康良仪 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

表达黄瓜花叶病毒(CMV)的卫星 RNA 的转基因烟草可以抗 CMV 的侵染。为了决定这些植物对其它病毒,如烟草花叶病毒(CMV)的安全性,我们对这些植物接种 CMV。结果发现 卫星 RNA 可减弱 TMV 引起的症状,并降低病情指数,然而却对 TMV 在植物中的积累没有明显影响。这一发现有助于对卫星 RNA 抗病机制的理解,有助于含卫星 RNA 的生防制剂及表达病毒卫星 RNA 的转基因植物的应用。本文在国际上首次报道卫星 RNA 可减弱非相关病毒引起的症状。

1 材料和方法

1.1 病毒及植物

烟草花叶病毒(TMV),烟草 G140 种子及枯斑三生烟种子均为中国科学院微生物研究所病毒室保存;含黄瓜花叶病毒卫星 RNA-R1 基因的烟草 G140(烟 Sat-G140)^[1]为中国科学院微生物研究所病毒室培育,所用材料为第三代种子。

1.2 植物种植、生长、病毒接种及观察

烟 Sat-G140 及烟 G140 在防虫温室育苗,三周后移苗入小花盆中,待烟长至 3—4 片叶时,用 0.5 μ g/ml TMV 进行摩擦接种,定期观察。

1.3 病毒含量测定

待 TMV 接种 20 天时,从烟 Sat-G140 及烟 G-140 各 10 株中每株各取一片顶部叶子,烟 Sat-G140 及烟 G-140 的叶子分别叠加在一起,用打孔法取样,称重,以每克叶片加 2ml 磷酸缓冲液(pH7.2)进行研磨,离心,上清即为原汁液,经 1000 倍、2000 倍、4000 倍稀释后,以半叶法接种枯斑三生烟,每个稀释度接种 4 片叶子,三天后计算枯斑数,重复三次。

2 结果

2.1 表达 CMV 卫星 RNA 的转基因烟的病情

烟 G140 与烟 Sat-G140 在接种 0.5 μ g/ml TMV 4 天后均大部分发病(明脉),但发病的烟 Sat-G140 发展缓慢,在 22 天后大多植株仍表现较轻的花叶症状,而烟 G140 病情发展很快,在 12 天时大部分表现很重的症状,在 17 天时几乎所有植株均呈泡状花叶或高度皱缩。这些结果表明卫星 RNA 可减弱 TMV 引起的症状,虽然卫星 RNA 并不降低发病率,但却明显地降低病情指数。其发病情况及病情指数见表 1 及表 2, TMV 接种后 18 天的症状表现见图版 1。

* 沈阳农业大学博士生。

本文于 1993 年 8 月 3 日收到。

表1 0.5 μ g/ml TMV 接种烟 Sat-G140及烟 G140后的发病率

植物	发病率 (%)	接种后天数				
		4	6	12	17	22
烟 Sat-G140	94.1	94.1	100	100	100	100
烟 G140	65.1	92.3	100	100	100	100

表2 0.5 μ g/ml TMV 接种烟 Sat-G140及烟 G140后的病情指数比较

植物	病情指数 (%)	接种后天数				
		4	6	12	17	22
烟 Sat-G140	23.5	23.5	60.0	64.4	67.8	
烟 G140	15.4	23.1	89.6	95.5	100	

注：(1) 发病级数分五级：0级：无症状；1级：脉明；2级：轻花叶；3级：重花叶；4级：泡状花叶，皱缩。

$$(2) \text{病情指数} = \frac{\sum (\text{每一发病级数的植株数}) \times \text{发病级数}}{(\text{植株总数}) \times (\text{发病最高级数})} \times 100$$

(3) 接种 TMV 的植株数：烟 Sat-G140为17株，烟 G140为13株。

2.2 TMV 在烟 Sat-G140的增殖

TMV 接种后20天时，从 Sat-G140烟10株中各取一片叶子，叠加在一起，打孔取样，称重为1.38g，从烟 G-140 10株中也各取一片叶子，叠加在一起，打孔取样，称重也为1.38g，各加2.74ml 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2)，研磨，离心，上清液即为原汁液，各以1000倍、2000倍及4000倍稀释后接种枯萎三生烟，三天后计算枯斑数，发现烟 Sat-G140含 TMV 的量与烟 G140含 TMV 的量没有明显差别，即卫星 RNA 对 TMV 在植物中的积累没有明显影响，结果见表3。

表3 烟 Sat-G140与烟 G140中 TMV 含量差异

植物	枯斑数*	稀释倍数		
		1000	2000	4000
烟 Sat-G140	268	243	153	
烟 G140	272	231	168	

*以上数字为三次重复实验枯斑数的总和。

3 讨论

卫星 RNA 基因策略是抗病毒植物基因工程最有效的策略之一^[2]，目前已经获得 CMV 的卫星 RNA 及烟草环斑病毒 (SToRV) 的卫星 RNA 的转基因植物，前人的工作显示：表达 CMV 卫星 RNA 的植物对 CMV 及同病毒组的蕃茄不孕病毒 (TAV) 有抗性，表达 SToRV 卫星 RNA 的植物对 SToRV 及同病毒组的樱桃卷叶病毒 (CLRV) 有抗性^(1,3-6)。即：表达卫星 RNA 的转基因植物只对其辅助病毒及同一病毒组的个别其他病毒有抗性。我们的研究证实，表达 CMV 卫星 RNA 的植物对 TMV，一个非相关病毒也有显著的抗性，CMV 卫星 RNA 可减弱 TMV 引起的症状，降低病情指数，这与生防制剂 CMV S₅₂ 可干扰 TMV 引起的症状一致 (覃秉益等，未发表)。这是在国际上首次报道病毒卫星 RNA 可减弱非相关病毒引起的症状。

卫星 RNA 的抗病机制仍不清楚，一般认为其作用机制是卫星 RNA 与病毒基因组 RNA 争夺病毒 RNA 复制酶，从而干扰了病毒基因组 RNA 的复制^(5,6)。最近我们实验室发现 CMV 卫星 RNA 可干扰

CMV 外壳蛋白进入植物叶绿体, 进而推测卫星 RNA 干扰病毒外壳蛋白进入叶绿体也是卫星 RNA 抗病毒机制之一 (梁德林等, 待发表), 然而 TMV 和 CMV 分属不同的病毒组, 用这两个假说均难以简单地解释 CMV 卫星 RNA 减弱 TMV 引起的症状。最近我们还发现 CMV 的卫星 RNA 也可介导对类病毒 PSTV 的抗性, 并可降低 PSTV 在番茄中的积累 (杨希才等, 待发表)。我们推测 CMV 卫星 RNA 介导对不同病原物的抗性的机制是不同的, CMV 卫星 RNA 可减弱 TMV 引起的症状的机制在于卫星 RNA 与病症发生有关的植物组分相互作用的结果。

由于 TMV 和 CMV 分属不同的病毒组, 我们推测 CMV 卫星 RNA 除抗 TMV 外, 还可抗其它病毒, 进一步的调查尚在进行中。CMV 卫星 RNA 除抗 CMV 外, 还耐 TMV 这一发现有助于含病毒卫星 RNA 的生防制剂和表达病毒卫星 RNA 的转基因植物的应用。

参 考 文 献

- [1] 吴世宣, 赵淑珍, 田波, 等. 中国科学 (B 辑), 1989, 9: 948—956.
- [2] 刘玉乐, 田波. 中国病毒学, 1993, 8 (1): 7—15.
- [3] Baulcombe D C, Saunders G R, Bevan M W *et al.* *Nature*, 1986, 321: 446—449.
- [4] Gerlach W L, Llewellyn D, Haseloff J *et al.* *Nature*, 1987, 328: 802—805.
- [5] Harrison B D, Mayo M A, *et al.* *Nature*, 1987, 328: 799—802.
- [6] Ponz F, Bruening G *et al.* *Virology*, 1987, 160: 183—387.

TOLERANCE OF THE TRANSGENIC TOBACCO EXPRESSING SATELLITE RNA OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS TO TOBACCO MOSAIC VIRUS

Liu Yule Wang Zhendong Zhu Feng Kang Liangyi Tien Po

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract Transgenic tobacco plants that express satellite RNA of cucumber mosaic virus (CMV) are resistant to infection by CMV. To determine whether these plants also protect against other viruses, such as tobacco mosaic virus (TMV), they were inoculated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ TMV. These plants showed much milder symptom by TMV and lower disease index than untransformed plants. The accumulation of TMV in these plants is similar to that in untransformed tobacco plants. These results demonstrate that transgenic tobacco plants expressing satellite RNA of CMV has a significant degree of protection against TMV, and benefit the understanding of the mechanism of virus satellite RNA-mediated resistance to virus and application of biological control agent containing virus satellite RNA and transgenic plants expressing virus satellite RNA. This is the first report that virus satellite RNA can reduce the symptom of unrelated virus.

Key words Satellite RNA of CMV, TMV, Symptom reduction, Transgenic plant