

番茄抗病毒基因工程研究进展

赵 爽, 雷建军*, 陈国菊, 曹必好

(华南农业大学 园艺学院, 中国广东 广州 510642)

摘 要: 阐述了目前番茄抗病毒基因工程中应用的各种抗病毒方法, 包括病毒来源基因、植物的抗病基因、核糖体失活蛋白基因、RNA 干扰技术等, 并介绍了各种方法的抗病机理及在番茄上的应用情况。

关键词: 番茄; 植物病毒; 转基因

中图分类号: S641.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007) S1-0083-04

Progresses on Tomato Virus-resistant Genetic Engineering

ZHAO Shuang, LEI Jian-jun*, CHEN Guo-ju, CAO Bi-hao

(Horticulture College of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: Progresses in the virus-resistance methods to tomato were reviewed, including virus origin genes, plant resistance genes, ribosome-inactivating protein genes and RNA interfering technology. Meanwhile resistant mechanisms and the application of each method to tomato were briefly discussed.

Key words: tomato; plant virus; transgenic

(Life Science Research, 2007, 11(4) S1: 083-086)

番茄病毒病是一种世界性的病害, 分布极其广泛, 危害十分严重, 造成品质下降, 产量锐减。自 1909 年美国发现第一种番茄病毒 TMV(烟草花叶病毒)以来, 世界各地共相继报道了近 30 种可侵染番茄的病毒^[1]。在我国, 已发现在番茄上至少有 12 种病毒, 其中 TMV 和 CMV(黄瓜花叶病毒)是最主要的毒原种类, 面广量大, 危害严重, 其次是 PVX(马铃薯 X 病毒)和 PVY(马铃薯 Y 病毒)^[1]。一直以来, 抗病毒病育种是消除番茄病毒病威胁的主要策略, 但传统的育种艰苦费时, 从而限制了育种工作更快更深入地发展。

近 20 年来植物抗病毒基因工程的技术路线已日趋成熟, 与此同时, 番茄抗病毒基因工程也有了突飞猛进的发展。目前, 番茄抗病毒基因工程上应用的方法主要包括: 一是利用病毒来源基因; 二是利用来自植物的抗病基因; 三是利用核糖体

失活蛋白基因; 四是利用 RNA 干扰技术等。本文中就以以上的方法对番茄抗病毒基因工程作一概述。

1 病毒来源基因与病毒抗性

1.1 外壳蛋白基因介导的抗性

病毒外壳蛋白(coat protein, CP)介导的抗性(coat protein-mediated viral resistance, CPMR), 即转基因植物因表达病毒的 CP 基因从而获得抗此种病毒或相关病毒的能力。在番茄抗病毒基因工程中, 目前这种方法是应用最多也是比较成功的抗病毒手段。

自从 Powel-I Abel 等(1986)^[2]将 TMV-CP 基因导入烟草, 获得了第一例抗 TMV 的转基因植株开始, 已应用在番茄上的 CP 基因有: 苜蓿花叶病毒 CP 基因(AlMV-CP)^[3]、黄瓜花叶病毒 CP 基因

收稿日期: 2007-06-02; 修回日期: 2007-11-07

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(32293)

作者简介: 赵爽(1980-), 女, 山东省汶上县人, 华南农业大学蔬菜学专业博士研究生, Tel: 020-38604379; E-mail: zm_zs@126.com; 雷建军(1957-), 男, 湖南省祁东县人, 博士, 华南农业大学教授, 通讯作者, 主要从事蔬菜学遗传育种研究, Tel: 020-85288262; E-mail: jilei@scau.edu.cn

©2007-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(CMV-CP)^[3-9]、烟草花叶病毒 CP 基因(TMV-CP)^[3,9]、烟草卷叶病毒 CP 基因(TLCV-CP)^[3]、番茄花叶病毒 CP 基因(ToMV-CP)^[3]、番茄黄色卷叶病毒 CP 基因(TYLCV-CP)^[3]、番茄斑萎病毒 CP 基因(TSWV-CP)^[3]、马铃薯 Y 病毒 CP 基因(PVY-CP)^[3]、马铃薯 X 病毒 CP 基因(PVX-CP)^[3]、大豆花叶病毒 CP 基因(SMV-CP)^[3]、轮状病毒 CP 基因(VP7)^[7]等。

1.2 病毒移动蛋白基因与病毒复制酶基因

1.2.1 病毒移动蛋白基因

病毒移动蛋白(movement protein, MP)是一类由病毒编码,与病毒在植物体内运转有关的蛋白。基于病毒移动蛋白的特性,刘国胜等将 TMVL 移动蛋白基因转入番茄,移动蛋白基因与番茄的 Tm-2 基因互作表现出典型的 HR 抗性^[9]。Hou 等将菜豆矮化花叶病毒(BDMV)野生型或突变的 BV1 或 BC1MP 基因导入到番茄中,结果表明,转基因番茄表型不正常但能推迟 ToMV 的感染^[9]。Weber 等将 ToMV 30 kDa 移动蛋白导入到番茄中,来研究 ToMV 30 kDa 移动蛋白与番茄中 Tm-2 和 Tm-2² 抗性基因的互作关系^[10]。

MP 介导的抗性特点是,只有当转基因植株表达失去功能的 MP 时,才能显示出抗性,但是 MP 基因介导的抗性却是广谱性的^[11]。

1.2.2 病毒复制酶基因

病毒复制酶(replicase)基因是病毒非结构蛋白基因,它在病毒的复制中起着重要作用。Nunome 等将 CMV 中切去顶端的复制酶基因通过转基因技术导入到番茄中,获得了抗 CMV 的番茄材料^[12]。Praveen 等将 ToLCV 同源的复制酶基因结构导入到感染该病毒的番茄植株中,这种结构能够产生引起基因沉默的 dsRNA,从而使感染病毒的植株恢复抗性^[13]。

目前,已有多种病毒的复制酶基因导入到植物中,包括 TMV 复制酶的通读序列,全长的、截短的或突变的复制酶基因,但是,并非所有的复制酶序列构建体转化植物都能获得抗性。

1.3 RNA 介导的抗性

1.3.1 卫星 RNA

卫星 RNA(satellite RNA, satRNA)是指依靠辅助病毒进行复制的 RNA 分子,包装在由辅助病毒基因组编码的外壳蛋白中。卫星 RNA 对植物病毒病的影响主要有 3 种:一是加重症状;二是无调节作用;三是减轻症状^[14]。根据第 3 种影响,人们认为可以把卫星 RNA 转入植物中从而获得抗病

病的植株。目前主要是利用 CMV 的卫星 RNA 获得了抗病毒的转基因番茄^[3,15,16]。

但是,卫星 RNA 并不能彻底地抑制其辅助病毒的复制,具有减轻症状作用的卫星 RNA 一旦发生突变会有加重病害症状的可能。不过,鉴于其具有生物安全性的优势,卫星 RNA 会在番茄抗病病毒基因工程中发挥越来越大的作用。

1.3.2 反义 RNA 技术和缺陷干扰型 RNA 技术

病毒反义 RNA(antisense RNA)技术是指能与 mRNA 互补配对的单链 RNA。转基因植物中表达的反义 RNA 核酸顺序与病毒基因组 RNA 互补配对,从而抑制病毒重要序列的表达,阻断病毒的侵染。应用反义 RNA 技术,Praveen 等(2006)获得了抗 CMV 和 ToLCV 的番茄材料^[17]。这暗示着反义 RNA 技术对番茄病毒病可能是一个良策,既安全又可使番茄获得对病毒较高的抗性。

缺陷干扰型 RNA(defective interfering RNAs, DI-RNAs)是指那些直接来源于病毒的核酸序列,其所含的基因比正常病毒基因短少,但是核酸两端以及复制起点等都和正常病毒相同的 RNA 分子。Gal-On 等(1998)将 CMV 的缺陷 RNA 通过转基因技术导入到番茄中,获得了抗 CMV 的番茄材料^[18]。

2 植物抗性基因(R 基因)与病毒抗性

在番茄属里可供番茄育种工作者使用的抗 TMV 或 ToMV 的基因主要有 3 个即 Tm-1、Tm-2、Tm-2²(Tm-2^a),它们最初来自 3 种绿果番茄,即秘鲁番茄、多毛番茄和多腺番茄。

Ohmori 等利用 RAPD 标记番茄中抗 ToMV 的抗性基因 Tm-1^[19];Lanfermeijer 等通过转座子标签法从番茄中克隆出持久抗 ToMV 的抗性基因 Tm-2²,结果表明 Tm-2² 编码的蛋白属于 CC-NBS-LRR 抗性蛋白^[20];姜国勇等将 Tm-2² 基因导入到与烟草中,结果证实转基因植株对 ToMV 具有一定的抗性^[21];Masuelli 等从番茄中筛选出 Sw-5 基因,能够抗多种番茄斑萎病毒属病毒,结果表明 Sw-5 编码的蛋白也属于 CC-NBS-LRR 抗性蛋白^[22]。

将从番茄中分离克隆的 R 基因导入到优质的不含该基因的番茄品种中,从而有可能提高其抗病性。但是,植物 R 基因介导的抗病性通常具有病原物生理小种特性,不能介导对病原物的广谱抗性,当新的病原致毒生理小种产生后,植物的

抗病性将被克服^[23]。

3 核糖体失活蛋白基因与病毒抗性

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating proteins, RIPs) 是一类作用于真核细胞核糖体, 抑制蛋白质合成的毒性蛋白。目前植物 RIPs 应用在植物抗病毒基因工程中的主要是商陆抗病毒蛋白和天花粉蛋白。

3.1 商陆抗病毒蛋白基因

商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral protein, PAP) 是从商陆属 (*Phytolacca L.*) 植物的植株体内提取出来的一种碱性蛋白。纯化自美洲商陆叶片中的 PAP, 抗 7 种植物病毒: TMV、CMV、ALMV、PVX、PVY、CaMV 和非洲木薯花叶病毒等^[24], 因此, PAP 在防治植物病毒方面具有很好的应用前景。李建国将 PAP 和 PAP-c 基因导入到番茄中, 得到抗 TMV 和 CMV 的转基因番茄植株^[25]。

3.2 天花粉蛋白基因

天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 是中药天花粉的有效的药用成分, 而天花粉是从多年生的植物栝楼 (*Trichosanthes Kirilowii Maximowicz*) 块根中提等提取出来的。近年来发现 TCS 对艾滋病病毒 HIV、乙型肝炎、乙型肝炎、麻疹等病毒均有明显的抑制作用, 所以天花粉蛋白也被认为是一种具有广谱抗病毒作用的蛋白。姜国勇等利用天花粉蛋白基因和 GUS 基因偶联并导入番茄中, 获得的 TCS-GUS 基因双表达转基因植株对 TMV 和 CMV 均表现出较高的抗性^[26]。

由于 PAP 和 TCS 具有广谱抗病毒的作用, 因此应用 PAP 基因和 TCS 基因介导的优点就在于只分别导入这两种基因就有可能使番茄获得广谱的抗病毒特性, 因此在番茄抗病毒育种中具有非常大的利用价值。

4 RNA 干扰与病毒抗性

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是正常动植物体内的一种通过双链 RNA (dsRNA) 来沉默基因的自然现象, 这是一种转录后水平的基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 现象, 所以又称 RNA 沉默 (RNA silencing)。

目前利用 RNAi 机制防御植物病毒的方式主要有两种: 一是对已建立起成熟遗传转化体系的作物而言, 用转病毒基因反向重复结构 (转录产生 dsRNA) 来获取抗病毒转基因植物, 且在所得抗病

毒转基因植物中既不存在有功能的病毒基因或蛋白, 也不存在转基因 mRNA 的积累, 符合人们对生物安全性的高要求, Fuentes 等将一个基因内区发夹状的基因结构导入到番茄中, 用来诱导转录后的基因沉默以抑制 TYLCV 的复制, 结果表明得到的转基因番茄植株对 TYLCV 免疫^[27]; 二是 Tenllado 等建立的病原 dsRNA 细菌表达系统^[28], 即用细菌发酵来生产病原 dsRNA, 当做生物农药使用, 可以满足未建立遗传转化体系的作物、多寄主病毒或不能进行遗传转化的作物抗病毒, 赵明敏等利用这种方法得出了瞬时表达的 siRNA 能够特异性干扰 TMV 侵染的结果^[29]。

5 结语

近年来番茄抗病毒的研究进展迅速, 成绩喜人。在以上的各种方法中, 以病毒来源的基因介导抗性所取得的成就最大, 但现在越来越多的人担心这种策略可能引起的生物安全性问题; 植物 R 基因介导的抗性会随着病菌群体的变化, 抗病性会很快丧失, 因此只有发现和克隆新的具有广谱抗性和持久抗性的 R 基因, 这种方法才能在番茄抗病毒上发挥更有效的作用。

在自然情况下, 番茄很少只受一种病毒的侵染, 而不同病毒的混合侵染往往使病情加重, 而 PAP 基因和 TCS 基因都具有广谱抗病毒作用, 因此这种策略在番茄抗病毒基因工程中是非常有利用价值的; 通过 RNAi 技术所得的抗病毒转基因植物虽然符合人们对生物安全性的高要求, 但目前这种技术在番茄上的应用不多。这些方法几乎都是通过得到转基因植株从而达到抗病毒的目的。

采用以上的方法就有可能获得大量抗病毒甚至是具有广谱抗病毒作用的转基因番茄品种, 因此, 番茄抗病毒基因工程一定会成为选育抗病病毒番茄品种中最有效、最常用的手段之一。

参考文献 (References):

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995.229-240.
- [2] POWEL L A P, NELSON R S, DE B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein[J]. *Science*, 1986, 232: 738-843.
- [3] 闫新甫. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003.410-411.
- [4] PROVVIDENTI R, GONSALVES D. Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus in a transgenic tomato line expressing the coat protein gene of the white leaf strain[J]. *Journal of*

- Heredity, 1995, 86(2): 85-88.
- [5] 胡开林, 付群梅, 汪国平, 等. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化番茄的研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(4): 34-36.
- [6] RAJ S K, RACHANA S, PANDEY S K, et al. Agrobacterium-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection [J]. Current Science, 2005, 88(10): 1674-1679.
- [7] 沈文涛, 周鹏, 郭安平, 等. 轮状病毒外壳蛋白 VP7 在转基因番茄果实中的特异表达[J]. 云南植物研究, 2004, 26(2): 207-212.
- [8] 刘国胜, 刘玉乐, 宫倩红, 等. TMV-L 运动蛋白基因植物表达载体的构建及其与番茄 Tm-2² 基因的互作[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 11-15.
- [9] HOU Y M, SANDERS R, URSIN V M, et al. Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(3): 297-308.
- [10] WEBER H, OHNESORGE S, SILBER M V, et al. The tomato mosaic virus 30 kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes Tm-2 and Tm-2²[J]. Archives of Virology, 2004, 149(8): 1499-1514.
- [11] TACKER E, SALAMINI F, ROHDE W. Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 1597-1601.
- [12] NUNOME T, FUKUMOTO F, TERAMI F, et al. Development of breeding materials of transgenic tomato plants with a truncated replicase gene of cucumber mosaic virus for resistance to the virus[J]. Breeding-Science (Japan), 2002, 52(3): 219-223.
- [13] PRANVEEN S, MISHRA A K, DASGUPTA A. Antisense suppression of replicase gene expression recovers tomato plants from leaf curl virus infection[J]. Plant Science, 2005, 168(4): 1011-1014.
- [14] 蒋军喜, 蔡祝南. 卫星在调节植物病毒病害症状中的作用[J]. 江西农业学报, 1999, 11(3): 60-64.
- [15] CILLO F, FINETTI-SIALER M M, PAPANICE M A, et al. Analysis of mechanisms involved in the cucumber mosaic virus satellite RNA-mediated transgenic resistance in tomato plants [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2004, 17(1): 98-108.
- [16] IWASAKI M, ITO K, KAWABE K, et al. Evaluation of agronomic traits and environmental biosafety of a transgenic tomato plant expressing satellite RNA of cucumber mosaic virus[J]. Research Bulletin of the National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, 2005, 182: 51-63.
- [17] PRAVEEN S, MISHRA A, ANTONY G. Viral suppression in transgenic plants expressing chimeric transgene from tomato leaf curl virus and cucumber mosaic virus[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84(1): 49-55.
- [18] GAL-ON A, WOLF D, WANG Y Z, et al. Transgenic resistance to cucumber mosaic virus in tomato: blocking of long-distance movement of the virus in lines harboring a defective viral replicase gene[J]. Phytopathology, 1998, 88(10): 1101-1107.
- [19] OHMORI T, MURATA M, MOTOYOSHI F. RAPD markers linked to the tomato mosaic virus resistance gene Tm-1 in tomato[J]. Japanese Journal of Genetics, 1995, 70(2): 179-184.
- [20] LANFERMEIJER F C, DIJKHUIS J, STURRE M J G, et al. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2 superscript 2 from Lycopersicon esculentum[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(5): 1037-1049.
- [21] 姜国勇, 杨仁崔. 番茄 Tm-2² 基因在烟草中的表达及其对番茄花叶病毒 (ToMV) 的特异抗性[J]. 病毒学报, 2003, 19(4): 365-370.
- [22] MASJELLI R W, CUESTA G, PICCOLO R. A multiplex PCR reaction for the screening of the nematode resistance gene Mi, and the tomato spotted wilt virus resistant gene Sw-5 in tomato [J]. Journal of Genetics & Breeding, 2000, 54(3): 233-235.
- [23] 莽克强. 农业生物工程(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 150-151.
- [24] CHEN Z C, WHITE R F, ANTONI W J F, et al. Effect of poke-weed antiviral protein (PAP) on the infection of plant virus[J]. Plant Pathology, 1991, 40: 612-620.
- [25] 李建国. 美洲商陆抗病毒蛋白 cDNA 的克隆及其转化番茄[D]. 海南儋州: 华南热带农业大学, 2002.
- [26] 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.
- [27] FUENTES A, RAMOS P L, FIALLO E, et al. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants[J]. Transgenic Research, 2006, 15(3): 291-304.
- [28] TENLLADO F, MARTINEZ-GARCIA B, VARGAS M, et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections[J]. BMC Biotechnology, 2003, 3(1): 3-14.
- [29] 赵明敏, 安德荣, 黄广华, 等. 瞬时表达靶向 TMV 外壳蛋白基因的 siRNA 能干扰病毒侵染[J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 35-40.