

CP 基因转化的线辣椒抗卡那霉素 和抗 CMV 特性的遗传^{*}

商鸿生, 王 旭, 徐秉良

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 利用根癌土壤杆菌, 采用叶盘法转化线辣椒(*Capsicum annuum* var. *longum*) 优良品种陕 8212, 建成了能同时表达 CMV 和 TMV 外壳蛋白基因(CP 基因)的 T₁ 代纯合系。以其自交 T₂~T₄ 代, 以及 T₂ 代植株与未转化陕 8212 杂交的 F₁ 代和 F₂ 代群体为试材, 研究了抗卡那霉素和抗黄瓜花叶病毒(CMV)特性的遗传传递规律。结果发现, 抗卡那霉素标记基因和抗病性基因在自交和杂交各代都能稳定地高效表达; 两者在自交各代纯合; 在杂交 F₁ 代抗药性和抗病性都表现为显性; 在杂交 F₂ 代, 抗药植株对敏感植株, 以及抗病植株对感病植株的分离比都符合 3:1 的理论比例。表明抗药性和抗病性均为显性单基因遗传。

[关键词] 转基因线辣椒; CP 基因; CMV; 卡那霉素; 抗病性遗传

[中图分类号] Q 785; S641.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-103-04

线辣椒(*Capsicum annuum* var. *longum*) 是重要的经济作物, 易遭受以黄瓜花叶病毒(CMV) 为主的多重病毒侵染, 常造成严重减产。因缺乏抗源, 针对 CMV 的常规抗病育种工作进展缓慢。作者等从 1988 年开始, 利用病毒外壳蛋白基因(CP 基因) 转化策略, 将 CP 基因导入线辣椒, 现已成功地建立了转基因线辣椒纯合系, 在人工攻毒和田间自然发病条件下, 都获得了抗病性的高效表达。转基因植物可以直接使用, 也可能用作抗源, 用于抗病育种, 为此必须了解其抗病性遗传规律。本研究是在转基因线辣椒纯合系选育过程中, 对此进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 植物材料

转基因植株是利用根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法获得的。为此, 首先构建了具有 CaMV 35S 启动子和 rbcS 转录终止信号和抗卡那霉素标记基因, 能同时表达 CMV 和 TMV 外壳蛋白基因的中间载体 pBTC, 通过去毒根癌土壤杆菌, 采用叶盘法转化线辣椒品种陕 8212 的外植体, 获得了 49 株 T₀ 代抗卡那霉素的再生植株。经 PCR 测定, 表明 CMV-CP 和 TMV-CP 基因已被整合到其中 22 株的基因组中。由 10 株

PCR 测定阳性的 T₀ 代植株, 自花授粉获得了 T₁ 代植株, 在保留和测定的 113 株 T₁ 代植株中, 仅 20 株抗病。根据植株抗卡那霉素测定和 PCR 分析结果, 10 个 T₁ 代株系是纯合的。纯合系逐代自交获得了 T₂, T₃ 和 T₄ 代群体。进一步的分子生物学检测表明, T₃ 代植株稳定表达 CMV-CP 基因和 TMV-CP 基因。Southern blot 分析表明其基因组中具有 T-DNA 拷贝, RT-PCR 分析测到了 CMV-CP 基因和 TMV-CP 基因转录物, Western blot 分析证实 T₃ 代植株中病毒 CP 的合成^[1]。上述植物材料的建立和检测是中科院微生物研究所三室与本项目组合作完成的。几个 T₁ 代纯合系的 T₂, T₃ 和 T₄ 代自交群体, T₂ 代植株与未转化陕 8212 杂交的 F₁ 和 F₂ 代群体用于遗传分析。供试病毒为黄瓜花叶病毒山东株系(CMV-D), 毒源用常规方法保存备用。

1.2 抗卡那霉素标记基因表达测定

供试植物材料种子, 经质量分数为 0.1% 升汞液表面灭菌和无菌水冲洗后, 播种于含 300 μg/mL 卡那霉素的 MS 培养基上, 置于 20~25 °C, 日照 14 h 的光照培养室内, 30 d 后检查, 根据根系、子叶等形态特征, 确定抗性药苗和敏感苗。抗药性苗有子叶和 1~2 片真叶, 叶色鲜绿, 根系发达, 白色, 有根毛。敏感苗无子叶或仅有子叶, 叶色泛黄, 只有 1 条根,

* [收稿日期] 2000-10-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670488); 陕西省科技攻关项目(96K06-G1-03)

[作者简介] 商鸿生(1940-), 男, 辽宁大连人, 教授, 博士生导师。主要从事植物病理学教学和研究。

褐色,短而无根毛。

1.4 对 CMV 的抗病性鉴定

供试植物材料在防虫温室(22~25℃,光照16h/d)中盆栽,在6叶期用常规方法摩擦接种黄瓜花叶病毒山东株系(病毒质量浓度20μg/mL),然后仍置于防虫温室中培养。接种后25d记载病株数和严重度。严重度分5级,分级标准为:0级,无任何症状;1级,心叶明脉,少数叶片轻微花叶;2级,轻度系统花叶;3级,系统花叶明显或较严重,少数病叶畸形皱缩,或植株轻度矮化;4级,多数病叶畸形皱缩,

植株严重矮化。

2 结果与分析

2.1 转基因线辣椒自交后代测定

供试T₁代纯合体的T₂,T₃和T₄自交群体,播种于含300μg/mL卡那霉素的MS培养基上,测定抗卡那霉素基因的表达。结果516个植株中仅4株敏感,其余生长正常,抗卡那霉素。这表明自交各代抗卡那霉素基因纯合(表1)。

表1 转基因线辣椒各代自交群体对卡那霉素的抵抗性分离

Table 1 Segregation of kanamycin-resistance in selfing generations of transgenic chili pepper				
代数 Generation	株系 Strain	植株总数/株 Total plants	抗药植株数/株 Resistant plant	敏感植株数/株 Sensitive plant
T ₂	16-13	53	53	0
	4-2	83	81	2
	34-11	36	36	0
	34-12	33	33	0
T ₃	16-13-27	31	31	0
	4-2-5	37	36	1
	34-11-6	28	28	0
	34-12-9	42	41	1
T ₄	16-13-27-2	37	37	0
	4-2-5-10	54	54	0
	34-11-6-5	39	39	0
	34-12-9-11	43	43	0

对黄瓜花叶病毒的抗病性鉴定表明,转基因线辣椒自交各代植株都表现抗病,群体中没有出现感病植株,多数植株无表观症状,少数植株发病,但严

重度低于2级,表现抗病(表2)。这一结果表明自交各代抗病基因纯合。

表2 转基因线辣椒各代自交群体的抗病性

Table 2 Segregation of CMV-resistance in selfing generations of transgenic chili pepper					
代数 Generation	株系 Strain	植株总数/株 Total plant	抗病植株数/株 Resistant plant		感病植株数/株 Susceptible plant
			未显症 Symptom less	显症 Show ing symptom	
T ₂	16-13	26	22	4	0
	4-2	31	24	7	0
	34-11	29	24	5	0
	34-12	38	32	6	0
T ₃	16-13-31	31	28	3	0
	4-2-5	44	36	8	0
	34-11-15	49	34	15	0
	34-12-10	43	30	13	0
T ₄	16-13-31-6	41	33	8	0
	4-2-5-3	35	27	8	0
	34-11-15-9	23	17	6	0
	34-12-10-8	37	29	8	0

2.2 转基因线辣椒与感病品种杂交后代测定

供试转基因线辣椒纯合系16-13和4-2的T₂代植株,分别与未转化感病品种陕8212杂交,得到

了F₁和F₂群体。F₁代种子播于含卡那霉素的培养基上,结果正、反交共4个组合136株幼苗,全部抗卡那霉素,生长正常,这表明抗卡那霉素基因显性。

该 4 个组合的 F₂ 群体中抗药和敏感植株分离比亦符合 3∶1, 为显性单因子遗传(表 3)。

表 3 转基因线辣椒与陕 8212 杂交后代群体抗卡那霉素性状的分离

Table 3 Segregation of kanamycin-resistance in F₁ and F₂ populations of transgenic chili pepper×Shaan 8212

杂交组合 Cross	代数 Generation	植株总数/株 Total plant	抗药植株数/株 Resistant plant	敏感植株数/株 Sensitive plant	理论分离比 Expected segregation ratio	P
T ₂ (16-13)×陕 8212 T ₂ (16-13)×Shaan 8212	F ₁	33	33	0		
	F ₂	60	46	14	3∶1	0.8~0.7
陕 8212×T ₂ (16-13) Shaan 8212×T ₂ (16-13)	F ₁	35	35	0		
	F ₂	38	29	9	3∶1	0.9~0.8
T ₂ (4-2)×陕 8212 T ₂ (4-2)×Shaan 8212	F ₁	37	37	0		
	F ₂	48	37	11	3∶1	0.8~0.7
陕 8212×T ₂ (4-2) Shaan 8212×T ₂ (4-2)	F ₁	31	31	0		
	F ₂	31	23	8	3∶1	0.9~0.8

杂交后代群体的抗病性鉴定结果表明, 各个组合 F₁ 代植株绝大多数抗病, 个别植株感病, 抗病性为显性。各组合 F₂ 群体都符合 3∶1 的抗感分离比, 确证转基因线辣椒的抗病性为显性单基因遗传。另外, 不论以转基因株系作母本或作父本, 其遗传传递规律相同(表 4)。

表 4 转基因线辣椒与陕 8212 杂交后代群体抗病性的分离

Table 4 Segregation of CMV-resistance in F₁ and F₂ populations of transgenic chili pepper×Shaan 8212

杂交组合 Cross	代数 Generation	植株总数/株 Total plant	抗病株数/株 Resistant plant	感病株数/株 Susceptible plant	理论分离比 Expected segregation ratio	P
T ₂ (16-13)×陕 8212 T ₂ (16-13)×Shaan 8212	F ₁	43	42	1		
	F ₂	27	19	8	3∶1	0.8~0.7
陕 8212×T ₂ (16-13) Shaan 8212×T ₂ (16-13)	F ₁	50	48	2		
	F ₂	35	24	11	3∶1	0.7~0.5
T ₂ (4-2)×陕 8212 T ₂ (4-2)×Shaan 8212	F ₁	26	24	2		
	F ₂	31	19	12	3∶1	0.2~0.1
陕 8212×T ₂ (4-2) Shaan 8212×T ₂ (4-2)	F ₁	37	32	5		
	F ₂	36	23	13	3∶1	0.2~0.1

3 讨 论

研究外源基因在转基因植物中的遗传规律, 对于合理利用转基因植物至为重要。但这一领域, 虽然已从表型传递, 标记基因表达以及分子杂交分析诸方面, 作了较多工作^[1~4], 但与遗传工程的上游工作相比, 还相当薄弱。有的研究^[2,5~7]表明, 外源 DNA 可以作为一个单一因子以孟德尔遗传规律传递。但是, 外源 DNA 插入植物基因组可能是单位点插入, 也可能在同一染色体或不同染色体多位点随机插入, 每一位点插入的拷贝数目也不一定相同。转化方法对遗传特性也有明显影响。因此, 外源基因在转化植株中的遗传传递情况相当复杂, 对个案应进行具体分析^[5]。

有关辣椒遗传转化的研究较少。本例转基因线辣椒是利用根癌土壤杆菌介导, 采用叶盘法转化线辣椒优良品种陕 8212 的外植体而获得的, 具有外源目的基因 CMV-CP 和 TMV-CP, 以及抗卡那霉素标记基因。T₀ 代抗卡那霉素的再生植株中, 约有半数植株的基因组中整合有 CMV-CP 和 TMV-CP 基因。由已整合的植株自交得到的 T₁ 代株系, 抗病的纯合系不足 10%。本研究以这类纯合系的自交 T₂, T₃ 和 T₄ 代, 以及 T₂ 代植株与未转化陕 8212 杂交的 F₁ 和 F₂ 代, 探讨了抗卡那霉素特性和抗病性的遗传规律。结果表明, 不论在自交各代或杂交各代, 对卡那霉素和对黄瓜花叶病毒的抵抗性都能稳定地传递和表达。F₁ 和 F₂ 代的分离情况清楚地证明两者均为单基因显性遗传。显然, 外源 DNA 单位点插

入线辣椒基因组。这一特点在 CP 基因转化的其他植物中也有发现^[5~7]。

转基因植物由 CP 基因控制的对 CMV 的抗病性,具有延迟发病、减低病情和抑制病毒等多方面的作用^[2~4]。但是,在抗病性鉴定中,需选用直观、简单、代表性强而又易于快速调查的抗病性指标。由抗病到感病是一个连续的变化过程,不存在表现天然界限,需要人为地提出区分标准。笔者依据鉴定辣椒

抗病毒的长期经验,提出了简化的严重度分级指标,并把抗、感的界限定在 2 级与 3 级之间。遗传分析结果表明这些做法是可行的。

本例转基因线辣椒基因组中同时插入了 CMV-CP 和 TMV-CP,在抗病性表达和遗传中各自的作用尚不明,因缺乏单独转化 CMV-CP 或 TMV-CP 的线辣椒试材,需留待今后研究。

[参考文献]

- [1] 徐秉良. 双抗转基因线辣椒 CP 基因介导抗病性性质和机制研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学, 1998
- [2] Beachy R N, Loesch-Fries S, Tumer N E. Coat protein-mediated resistance against virus infection[J]. Annu Rev Phytopathol, 1990, 28: 451- 474
- [3] Quemada H D, Gonsalves D, Slightom J L. Expression of coat protein from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: Protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphids[J]. Phytopathology, 1991, 81: 794- 802
- [4] Nishibayashi S. CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-CP gene[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(5/6): 672- 678
- [5] 王关林, 方宏筠, 那 杰. 外源基因在转基因植物中的遗传特性[J]. 遗传, 1996, 18(6): 37- 41
- [6] 薛宝娣, 陈永萱, 汪智渊, 等. GU S 基因和 CMV-CP 基因在转基因番茄后代的遗传研究[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(4): 84- 88
- [7] 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: 85- 88

Inheritance of kanamycin-resistance and CMV-resistance in transgenic chili pepper expressing CMV-CP and TMV-CP genes

SHANG Hong-sheng, WANG Xu, XU Bing-liang

(College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Both CMV-CP and TMV-CP genes were transferred into cultivar “Shaan 8212” of chili pepper (*Capsicum annuum* var. *longum*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Selfing generation T₂, T₃ and T₄ from homozygous T₁ lines and F₁, F₂ of cross T₂/Shaan 8212 were tested and analysed to reveal inheritance of resistance to Kanamycin or to CMV. The results showed that resistance steadily and strongly expressed in tested populations T₂, T₃ and T₄ were in homozygous condition showing high resistance to Kanamycin and to CMV. The resistance was dominant over sensitivity to Kanamycin or susceptibility to CMV in F₁ progenies. F₂ segregated to fit 3:1 ratio. It was concluded that resistance to Kanamycin and resistance to CMV were conditioned by single dominant genes.

Key words: transgenic chili pepper; CP gene; CMV; Kanamycin; inheritance of virus resistance