

马铃薯 Y 病毒 6 kD 和 NIa 基因转化的烟草介导抗病性*

杨兰英¹ 项瑜² 魏宁生^{1#} 彭学贤²

(1 西北农业大学植物病理研究所, 陕西杨陵 712100)

(2 中国科学院微生物所植物生物技术开放实验室, 北京 100080)

摘要 将马铃薯 Y 病毒中国分离株(PVY-C)的 6 kD 和 NIa 基因拼接和改造, 分别构建了其正向表达和反向转录的植物表达载体。借助土壤农杆菌 LBA4404 将在此二元载体上的 6 kD 和 NIa 基因及新霉素磷酸转移酶基因(NPT II)转入到烟草品种 NC89 的染色体上, 从而获得了抗卡那霉素的转化再生烟草植株。用 PVY-C 对这些转化烟草进行抗性接种试验, 结果表明部分转基因植株能够抵制 PVY-C 的侵染, 对抗病植株的子一代(R₁)进行进一步的抗性分析发现, 其 R₁ 代通过遗传也获得了这种抗病性。

关键词 马铃薯 Y 病毒, 6 kD 基因, NIa 基因, 转基因烟草

中图分类号 S432.41, S432.21

1986 年, Powell-Abel 等人^[1]将 TMV 外壳蛋白基因转入烟草, 首次获得抗 TMV 的转基因工程植株, 自此以后, 除病毒外壳蛋白及其基因介导的抗病性外, 关于病毒非结构蛋白, 特别是利用病毒 RNA 复制酶(亚基)基因序列介导的抗病性的报道正在增多^[2]。最近, 有两例报道了另一类非结构蛋白——Potyvirus 的核内含体 a(NIa)介导的抗病性, 即将烟草脉斑驳病毒(TMV)和马铃薯 Y 病毒(PVY)的 NIa 基因或 NIa 基因及其前后若干基因共同转化烟草, 并获得了较好的抗病性^[3,4]。在获得马铃薯 Y 病毒中国分离株(PVY-C)的复制酶(NIb)基因和外壳蛋白基因的转基因烟草, 并证明了其抗病性^[5,6]的基础上, 本研究克隆了 PVY-C 的蛋白酶基因(NIa)及 NIa 基因 5' 端紧邻的 6 kD 基因^[7], 分别构建了其正向表达和反向转录的植物表达载体, 并转化在当前我国主栽的烟草品种 NC89 上, 旨在通过基因工程, 尝试利用病毒非结构基因组成分进行抗病育种的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

PVY-C 毒原、烟草品种 NC89、农杆菌 LBA4404 及表达载体 PBin438, 均由中国科学院微生物所植物生物技术开放实验室提供; 寡聚核苷酸引物由中国科学院微生物所技术室合成; Taq DNA 聚合酶、Klenow 酶、限制性内切酶等购自 Promega 公司。

1.2 方法

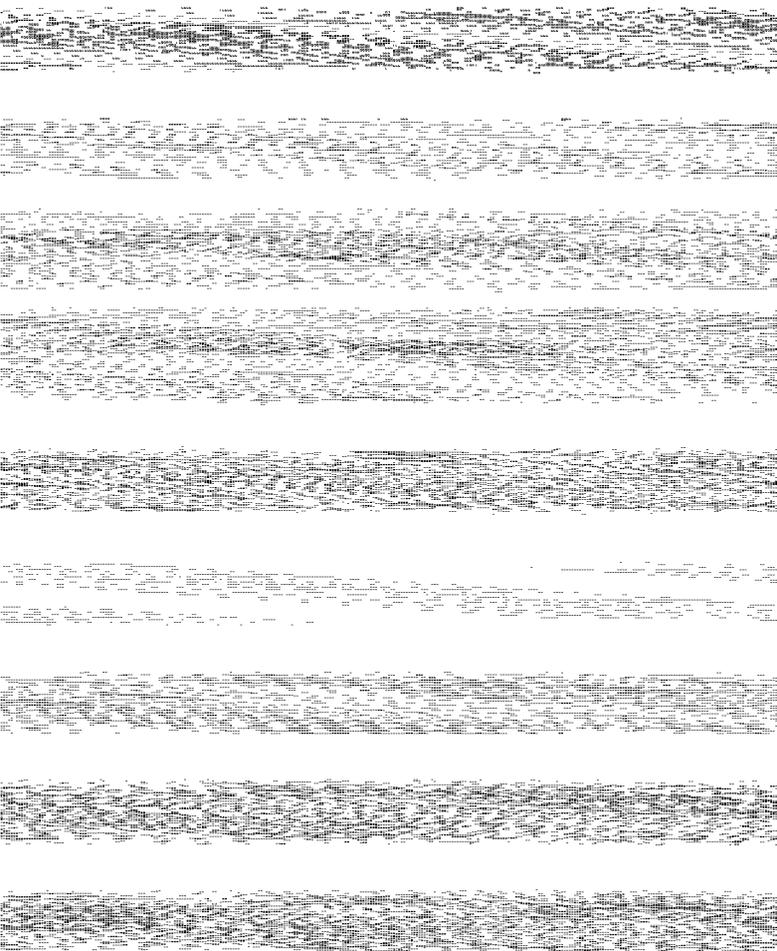
1.2.1 6 kD 和 NIa 基因的植物表达载体的构建 参考项瑜等^[7]的方法进行。

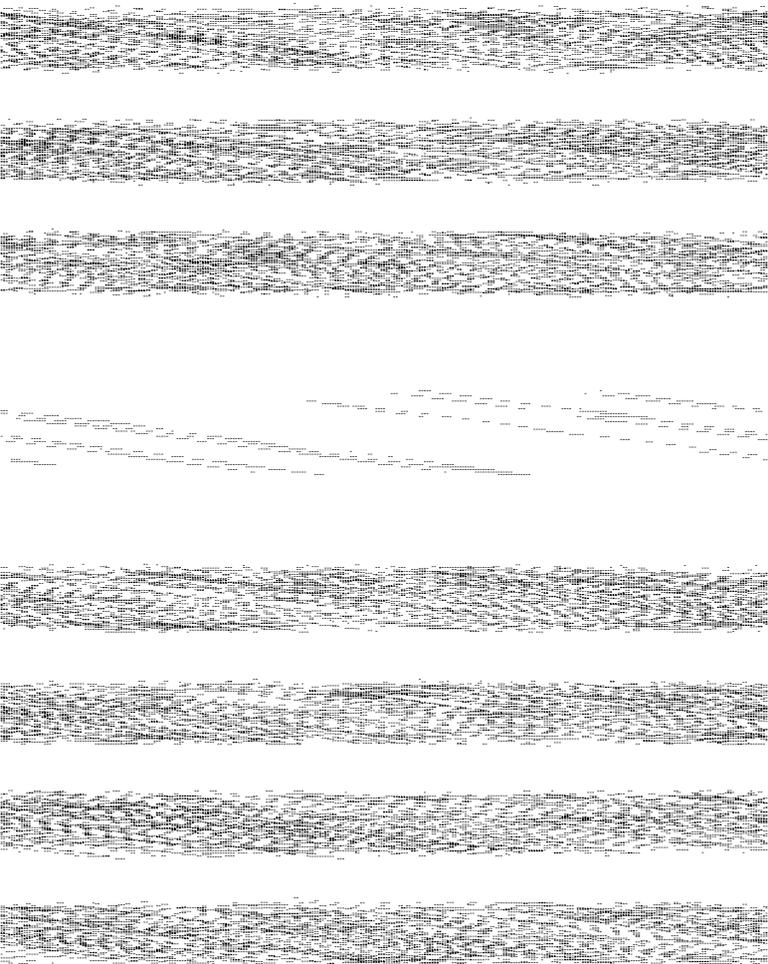
1.2.2 农杆菌感受态细胞的制备和质粒 DNA 向农杆菌的转化 参考文献[8]。

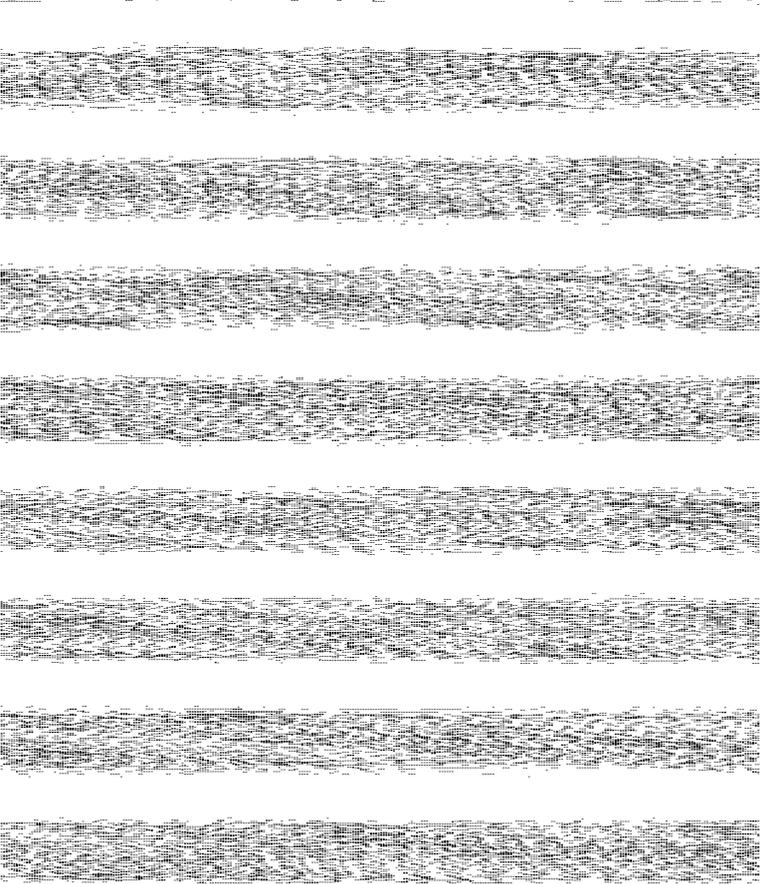
收稿日期: 1995-11-16

* 国家自然科学基金资助项目, 并得到国际科学和文化中心世界实验室(WL, ICSC, 日内瓦, 洛桑)的部分资助。

通讯作者







参 考 文 献

- 1 Powell-Abel P, Nelson R S, De B, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, 232: 738~743
- 2 Wilson T M A. Strategies to protect crop plants against viruses; Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 3134~3141
- 3 Maiti I B, Murphy J F, Shaw J G, *et al.* Plants that express a Potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 6110~6114
- 4 Vaidi E, Seia I, Edelbaum O, *et al.* Plants transformed with a cistron of a potato virus Y protease (NIa) are resistant to virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7513~7517
- 5 项瑜, 彭学贤, 杨兰英等. 马铃薯Y病毒复制酶基因的抗病性研究. *山东大学学报*, 1994, 29(增刊): 101
- 6 项瑜, 杨兰英, 周雪荣等. 表达马铃薯Y病毒外壳蛋白的转基因烟草的抗病性研究. *病毒学报*, 1995, 11(2): 158~162
- 7 项瑜, 杨兰英, 彭学贤等. 马铃薯Y病毒6 kD和NIa基因的克隆与序列分析及其植物表达载体的构建. *病毒学报*, 1995, 11(3): 279~282
- 8 An G. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press Inc, 1987. 153, 292
- 9 Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 10 Riechmann J L, Lain S, Garcia J A. Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. *J Gen Virol*, 1992, 73: 1~16
- 11 Restrepo-Hartwig M A, Carrington J C. Regulation of nuclear transport of a plant Potyvirus protein by autoproteolysis. *J Virol*, 1992, 66: 5662~5666
- 12 Bejarano E R, Lichtenstein C P. Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA. *TIBTECH*, 1992, 10: 283~388

Mediate Resistance of Tobacco Transformed with 6 kD and NIa Genes of PVY-C to Virus Infection

Yang Lanying¹ Xiang Yu² Wei Ningsheng^{2*} Peng Xuexian²

(1 Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing, 100080)

Abstract The entire 6 kD and nuclear inclusion a (NIa) genes of potato virus Y chinese isolate (PVY-C) were inserted correctly into the plant expression binary vector PBin438 in sense and antisense directions respectively. By the mediation of *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, these genes (with NPT I) were transformed to the chromosomes of cv. NC89 tobacco and anti-Kn transformed tobacco plants were obtained. Resistant inoculation tests with PVY-C revealed that several transgenic plants could suppress virus infection. By inheritance, R₁ progeny of these resistant tobaccos indicated inhibition also.

Key words potato virus Y, 6 kD gene, NIa gene, transgenic tobacco