

转化 CaMV 基因 V 芸薹属蔬菜植株抗病性鉴定及其遗传分析

巩振辉¹ 何玉科² 宋献军¹ 张广辉¹ 张桂华¹

(¹西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; ²中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要: 以转化 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 的大白菜、菜薹、紫菜薹和花椰菜植株为试材, 研究了 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 所提供的遗传工程交叉保护及其遗传规律。结果表明, 在转化 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 的大白菜、菜薹、紫菜薹和花椰菜植株中, 48.08% 对 CaMV 强株系 CABB-BJI 具有较强的抗性, 51.92% 表现为敏感。抗性基因 (CaMV *Bar-i* 1 基因 VI) 在自交代 (S_1) 中大多数 (76%) 表现为典型的孟德尔单基因显性遗传, 部分株系的抗性出现了 15:1, 1:1, 1:3 和 1:95 的非孟德尔遗传现象。

关键词: CaMV 基因 VI; 芸薹属; 转基因; 植株; 遗传工程交叉保护; 遗传规律

中图分类号: S 634 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 05-0466-03

1 目的、材料与方法

遗传转化研究揭示, 拟南芥转化 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 植株对 CaMV 强株系 CABB-BJI 具有较高的遗传工程交叉保护作用^[1]。本试验以转化 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 的大白菜、菜薹、芥菜和花椰菜的工程植株为试材, 鉴定分析其对 CaMV 强株系 CABB-BJI 的抗性及其遗传规律, 为利用 CaMV *Bar-i* 1 基因 VI 提高芸薹属作物对 CaMV 的抗性提供依据。

CaMV *Bar-i* 1 基因 VI 的克隆、植物表达载体的构建同文献 [2]。采用真空渗入植株原位遗传转化方法获得大白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)、菜薹 (*B. campestris* var. *parachinensis*)、紫菜薹 (*B. campestris* var. *purpurea*) 和芥菜 (*B. juncea*) 转化种子 (T_1 代)^[3], 采用农杆菌介导法获得花椰菜转化植株。转化种子 (植株) 经 25 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B (hygromycin B, hyg) 筛选后, 将抗潮霉素植株移入营养钵, 并置于人工气候室, 20 $^{\circ}\text{C}$, 光照 14 h/d, 光照强度 5 000 lx, 培养至 4~5 叶期, 按 DNA 微量提取法^[1] 提取叶片 DNA, 进行 PCR 鉴定。PCR 引物及反应条件同文献 [2]。将分子检测确定的转基因植株春化后移入温室。不同转基因植株用网室隔离, 人工辅助自花授粉, 获得转基因株系 (T_1 代), 供抗性遗传分析。CaMV CABB-BJI 毒源由英国格拉斯哥大学植物系 Milner 博士惠赠, 在芜菁 (*B. campestris* ssp. *rapifera*) 上繁殖保存。人工接种 CaMV, 抗性鉴定方法同文献 [1]。

2 结果与分析

2.1 转化植株 T_1 代抗性鉴定结果 对获得的转化潮霉素磷酸转移酶基因和 CaMV *Bar-i* 1 基因 VI 的大白菜、菜薹、芥菜和花椰菜植株经 hyg 抗性筛选和 PCR 分析后进行抗性鉴定, 其中 48.08% 对 CaMV 强株系 CABB-BJI 具有较强的抗性, 51.92% 表现敏感 (表 1)。说明在芸薹属作物上 CaMV 弱株系 *Bar-i* 1 基因 VI 对防治 CaMV 强株系 CABB-BJI 为害有明显的交叉保护作用。但转基因植株中同时出现了感病植株, 而 PCR 结果表明这些感病植株均能

收稿日期: 2001-02-05; 修回日期: 2001-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770522); 教育部资助优秀年轻教师基金项目

扩增出 CaMV *Bari-1* 基因 VI, 使 CaMV *Bari-1* 基因 VI 不表达或失活的原因尚待进一步研究。

表 1 芸薹属蔬菜转基因植株对 CaMV CABB-BJI 株系的抗性

Table 1 The resistance of transgenic Brassica plants to CaMV strain CABB-BJI								
种 类 Species	处 理 Treatment	植株数 No. of plants	抗病植株数 No. of resistance plants			感病植株数 No. of susceptible plants		
			0 级	1 级	小计	3 级	5 级	小计
			0 grade	1 grade	Total	3 grade	5 grade	Total
大白菜 <i>B. campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>	转基因 Transgenic	15	1	6	7	3	5	8
	对照 Control	30	0	0	0	0	30	30
菜薹 <i>B. campestris</i> var. <i>parachinensis</i>	转基因 Transgenic	10	0	4	4	1	5	6
	对照 Control	30	0	0	0	0	30	30
紫菜薹 <i>B. campestris</i> var. <i>purpurea</i>	转基因 Transgenic	12	3	3	6	2	4	6
	对照 Control	30	0	0	0	0	30	30
芥菜 <i>B. juncea</i>	转基因 Transgenic	7	1	6	7	0	0	0
	对照 Control	30	0	0	0	0	30	30
花椰菜 <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytic</i>	转基因 Transgenic	8	0	1	1	5	2	7
	对照 Control	28	0	0	0	3	25	28

表 2 芸薹属蔬菜转基因植株自交 1 代对 CaMV CABB-BJI 株系的抗性

Table 2 The resistance of transgenic Brassica plants of first selfed progeny to CaMV strain CABB-BJI					
种 类 Species	株 系 Lines	接种株数 No. of inoculating plants	抗病株数 No. of resistant plants	感病株数 No. of susceptible plants	抗感比例 Ratio of resistant to susceptible plants
欧洲芜菁 <i>B. campestris</i> ssp. <i>rapifera</i>	自交种 (对照)	30	0	30	0/30
	Inbred line (CK)				
大 白 菜 <i>B. campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>	B3	385	4	381	1/95
	B5	343	258	85	3/1
	B6	217	164	53	3/1
	B9	124	94	30	3/1
	B11	97	72	25	3/1
	B12	204	190	14	15/1
	B15	301	227	74	3/1
菜 薹 <i>B. campestris</i> var. <i>parachinensis</i>	C1	146	111	35	3/1
	C2	155	116	39	3/1
	C7	207	157	50	3/1
	C9	189	141	48	3/1
紫 菜 薹 <i>B. campestris</i> var. <i>purpurea</i>	ZH1	266	249	17	15/1
	ZH4	108	80	28	3/1
	ZH5	237	178	59	3/1
	ZH9	196	49	147	1/3
	ZH10	254	190	64	3/1
	ZH12	117	89	28	3/1
芥 菜 <i>B. juncea</i>	J1	252	190	62	3/1
	J2	123	90	33	3/1
	J3	176	130	46	3/1
	J4	243	181	62	3/1
	J5	211	160	51	3/1
	J6	196	95	101	1/1
	J7	260	243	17	15/1
花椰菜 <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytic</i>	H8	93	69	24	3/1

2.2 抗性基因 CaMV *Bari-1* 基因 VI 的遗传分析 将转基因植株自交代接种 CaMV 强株系 CABB BJI 毒源, 发现 CaMV 弱株系 *Bari-1* 基因 VI 在其自交后代整合和分离比较复杂 (表 2)。供试的 5 种芸薹属蔬菜 25 个转基因株系中 19 个株系抗性遗传表现为 3:1 的分离, 占 76%, 说明 CaMV *Bari-1* 基因 VI 在芸薹属作物自交一代中大多数呈 3:1 的单基因显性孟德尔分离。此外, 大白菜转基因株系 B12、紫菜薹 ZH1 和芥菜 J7 抗性遗传表现为 15:1 分离; 大白菜 B3 株系表现为 1:95 分离; 紫菜薹 ZH9 株系表现为 1:3 分离; 芥菜 J6 株系表现为 1:1 分离。这些转基因株系 S1 代植株的分子 (PCR) 检测结果与其抗病性鉴定结果高度一致。而造成抗性在自交后代出现不同的分离比例原因, 外源基因的遗传规律, 是今后研究和利用转基因植物的重要课题。

参考文献:

- 1 巩振辉, Miher JJ, 何玉科, 等. CaMV 基因 VI 在拟南芥上的遗传转化及交叉保护. 西北农业大学学报, 1997, 25 (4): 6~12
- 2 Cecchini E, Gong Zhenhui, Geri C, et al. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom like phenotypes and accumulate bodies. Molecular Plant Microbe Interactions, 1997, 9 (10): 1094~1101
- 3 张广辉, 巩振辉, 薛万新, 等. 大白菜和油菜真空渗入遗传转化方法初报. 西北农业大学学报, 1998, 26 (4): 1~4

Diagnosis and Genetic Analysis of Resistance to Cauliflower Mosaic Virus in Brassica Crops Which Was Transformed with CaMV Gene VI

Gong Zhenhui¹, He Yuke², Song Xianjun¹, Zhang Guanghui¹, and Zhang Guihua¹

(¹Horticulture College, Northwest Sci Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100; ²Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Science, Shanghai 200032)

Abstract: The genetically engineered cross protection which was supplied by weak strain *Bari-1* gene VI of cauliflower mosaic virus (CaMV), and its genetic regularity were studied with Brassica crops (*Brassica campestris* ssp. *rapifera*, *B. campestris* ssp. *pekinensis*, *B. campestris* var. *parachinensis*, *B. campestris* var. *purpurea*, *B. juncea*, *B. oleracea* var. *botrytic*) which were transformed with CaMV gene VI. The results showed that 48.08% of transformed Brassica plants was resistance to CaMV strain CABB BJI and 51.92% of them was susceptible to CaMV CABB BJI. The virus resistant gene (CaMV *Bari-1* gene VI) in 76% of first selfed progeny presented typically Mendelian single dominance gene inheritance. The ratio of virus resistant to virus susceptible plants in some of first selfed progeny presented non-Mendelian inheritance, such as, 15:1, 1:1, 1:3 and 1:95.

Key words: CaMV gene VI; *Brassica* L.; Transgenic; Plants; Genetically engineered cross protection; Genetic regularity

欢迎订阅《农业科技通讯》

《农业科技通讯》由农业部主管, 中国农科院主办。邮发代号: 2 602, 56 页, 16 开彩色四封, 每册定价 4 元, 全年 48 元。邮局订阅, 也可向本刊编辑部订阅。主要栏目: 人物采风、农村论坛、粮食作物、园艺作物、畜牧兽医、养殖技术、土肥耕作、植物保护、贮藏加工、名特新品种、市场信息、农业部推荐成果、国外农业、专利精选、农村书屋、广告信息等。读者对象: 蔬菜、林果基地、农业示范园区、农场、种子界人士, 农业科技推广人员, 基层领导, 种养业、加工业以及专业户, 农村青年, 院校师生以及与农业有关人员。单位: 中国农科院《农业科技通讯》编辑部, 地址: 北京中关村南大街 12 号, 邮编: 100081, 电话: (010) 68919914、68919665、68976831, 传真: (010) 68919664。