中图分类号：S532 文献标识码：A 文章编号：1672-3635(2006)02-0111-04

马铃薯抗晚疫病和病毒病转基因研究现状与展望

王 岫 芳

（黑龙江省农业科学院科技信息中心，黑龙江 哈尔滨 150086）

摘 要：从 Harpin 蛋白基因表达诱导抗性、Osmotin 蛋白诱导抗性、病原诱导葡萄糖氧化酶(GO)基因表达生成 H_2O_2 获得抗性途径对抗马铃薯晚疫病抗性转基因研究现状进行了综述；从病毒外壳蛋白(CP)基因介导抗病性、复制酶基因介导抗病性、用核酶切割介导抗病性、病毒基因调控序列介导抗性途径对马铃薯病毒病抗性转基因研究现状进行了综述。

关键词：转基因马铃薯；晚疫病；病毒病

在我国的粮食作物中，马铃薯是位于水稻、玉米、小麦之后的第四大粮食作物，我国马铃薯的种植面积约为 466.8 万 hm^2，鲜薯产量约为 7008 万 t 左右，目前处于世界第一位，但是我国马铃薯单产水平还很低，仅为 15.0 $t\cdot hm^2$，低于世界平均水平(16.5 $t\cdot hm^2$)[1]。由于马铃薯是同源四倍体作物，用常规育种方法改良品种，其过程复杂且需时较长[2]。尽管由于育种学家的长期努力已培育出许多食用和加工的优良品种，但是许多优良栽培品种仍受到真菌性病害、病毒性病害、细菌性病害的危害，其中马铃薯晚疫病和病毒病，给马铃薯生产上带来的危害最为严重。如果能在保持现有优良品种农艺性状的同时，利用基因工程技术使其获得抗某种重要病害的性状，对进一步发挥这些优良栽培种的潜力，发展我国马铃薯生产将具有重要现实意义。

1 马铃薯晚疫病抗性的研究

19 世纪中叶马铃薯晚疫病大发生曾造成数百万以马铃薯为主食的爱尔兰人饱尝饥饿的蹂躏。20 世纪 80 年代，马铃薯晚疫病又卷土重来，在全球各冷凉的马铃薯产区频频发生，再次引起了人们的广泛关注。

多年来人们从马铃薯抗晚疫病遗传学、马铃薯—Phytophthora infestans(马铃薯晚疫病病原)互作的生物化学、马铃薯抗晚疫病的遗传工程的角度进行了广泛深入的研究。尤其是近年来的分子生物学技术的发展，使马铃薯抗晚疫病遗传工程研究取得了突破性的进展，至目前为止，已经陆续获得了一批对 P. infestans 具有抗性的马铃薯品系或株系。抗马铃薯晚疫病转基因研究的主要技术途径，大体可分为：Harpin 蛋白基因表达诱导植物过敏性反应获得抗病性；改变 Osmotin 蛋白在转基因植株内的定位空间，使 Osmotin 蛋白表达后分泌到细胞外，使转基因植株在 P. infestans 侵染初期发挥抑菌作用从而获得抗病性；通过病原诱导葡萄糖氧化酶(GO)基因表达生成 H_2O_2 来抑制晚疫病菌或使植物产生获得免疫性以达到抗病目的。

1.1 Harpin 蛋白基因表达诱导植物过敏性反应获得抗病性

Harpin 蛋白是 Wei 等[3]首先从梨火疫病菌(Erwinia amylovora)中发现的一个激发过敏反应的蛋白，由 hrp(Hypersensitive response and pathogenicity)基因家族成员 hrpN 基因编码，纯化的 Harpin 蛋白在烟草、番茄等茄科植物的细胞间能诱导细胞的过敏性坏死。De Wit[4]提出构建植物抗病的非专化的抗病双元系统(Two-component system for nonspecific resistance)，把无毒基因(avr)和抗病基因(R)组装于同一细胞中，在适合的启动子调控下，将会引起寄主被侵染细胞的过敏性坏死，

收稿日期：2006-01-07

作者简介：王岫芳(1965-)，女，副研究员，主要从事国外农业科技动态的研究。

中国知网 https://www.cnki.net

从而限制病原菌的扩散，达到抗病的目的。这个系统关键是要选择一个适合的启动子，这个启动子应该是病原侵染诱导型而非组成型表达的，否则寄主的健康细胞可能会因转入基因的表达而受到伤害。Martinin 等[5] 研究发现马铃薯 prp-1 基因的启动子表达专一受 P. infestans 侵染诱导。李汝刚等[6] 从 Erwinia amylovora 基因组 DNA 中扩增获得了 Harpin 蛋白基因，以及以马铃薯品种 Desiree 基因组 DNA 为模板，克隆了对 P. infestans 侵染特异性表达的 prp1-1 基因启动子片段，构建了 Harpin 蛋白基因的病原诱导型植物表达载体；在侵染诱导 Harpin 基因表达的植株中，有 2 株对 P. infestans 侵染表现免疫。这个结果表明，Harpin 基因在转基因马铃薯中的病原侵染诱导性表达能提高马铃薯抗晚疫病的性能，为植物抗真菌病害遗传工程开辟了一条新途径。李先平等[7]通过根癌农杆菌介导，用 Harpin 基因转化马铃薯四倍体品种大西洋（Atlantic），获得 107 个马铃薯转化株系，其中 7 株的抗病性与对照相比差异极显著（$P<0.001$）。结果初步表明，Harpin 基因已整合到马铃薯的基因组中并得到表达，提高了植株的晚疫病抗性。

1.2　Osmotin 蛋白表达使马铃薯获得晚疫病抗性

Osmotin 是从受盐协迫的烟草细胞培养物中发现的一种蛋白，这种烟草蛋白能被烟草花叶病毒（TMV）侵染诱导表达，是一种病程相关蛋白，对马铃薯晚疫病菌 P. infestans 具有抑制活性。由于 P. infestans 的生长繁殖以细胞间为主要场所的寄生特点，李汝刚等[8]克隆了缺失 C 端信号肽序列（引导蛋白在细胞液泡内定位）、保留 N 端信号肽序列（引导蛋白分泌至胞外）的烟草 Osmotin 基因，在基因克隆过程中，由于 PCR 错配，获得了一个在第 96 位氨基酸处产生琥珀突变的 Osmotin 基因；李汝刚等[8]又研究了转这两个 Osmotin 基因的马铃薯对晚疫病的抗性，证明 Osmotin 蛋白胞外分泌能够赋予转基因植株叶片抗晚疫病的能力。

1.3　葡萄糖氧化酶（GO）基因抑制晚疫病菌

葡萄糖氧化酶基因（Glucose oxidase，简称 GO）是从黑曲霉提取物中发现的，它可以催化 β-D-葡萄糖氧化生成过氧化氢和葡萄糖酸，产生 H_2O_2 和其它活性氧物质是植物对病原体侵入的防御反应，目前仅在数种细菌和真菌中被发现[9]。实验证明，H_2O_2 水平升高不仅可诱发细胞过敏坏死反应，而且还能激活抗病基因表达，如植物抗毒素及诱导病原相关蛋白（PR）等基因的表达[10]。Wu 等[11] 将 GO 基因放在 35 S 组成型启动子下表达得到较好的抗病效果，但是 Doke[12] 的研究发现，在细胞内可以经过 F_e 催化生成自由基，它能引起细胞内酶活性的降低及细胞的衰老死亡，对植物有一定的伤害。甄伟等[13] 利用 PCR 技术从黑曲霉（Spergillus niger）中扩增并克隆了葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase，简称 GO）基因，并将马铃薯病原诱导型启动子（prp-1 基因启动子）与其融合构建了植物表达载体 pCAMGO，经农杆菌转化获得了转基因植株；结果表明，转基因马铃薯中病原诱导型启动子可受马铃薯晚疫病病原的诱导，获得的转基因植株对晚疫病的抗性多数表现为发病时间推迟和病症明显减弱，其中 4 株表现明显抗性，一株形成过敏型病斑表现高度抗性。张立平等[10]通过农杆菌介导将来自黑曲霉（Aspergillus niger）的葡萄糖氧化酶基因转入 2 个马铃薯重要栽培品种大西洋（Atlantic）和夏普蒂（Shepody）中获得 23 个转基因株系；结果表明，和未转基因对照相比转基因植株病斑出现时间晚，病斑扩展速度慢，发病程度轻，感病叶片少。

2　马铃薯病毒病抗性的研究

自 Powell 等[14]将 TMV 外壳蛋白基因转入烟草，获得了延迟发病的抗病毒转基因烟草以来，病毒外壳蛋白介导的抗性已迅速扩大到 15 个植物病毒属，抗病毒转基因马铃薯已进入田间试验，这些抗病毒转基因马铃薯在生产上大面积推广应用，在国内外即将成为现实。

2.1　病毒外壳蛋白基因介导抗病性

自 1986 年以来，病毒外壳蛋白（CP）基因介导的抗病性已成为植物抗病毒基因工程的一条成功的途径。用 CP 基因转化马铃薯都获得了抗病毒株系，CP 基因介导抗病性一般表现为只抗 CP 基因供体病毒或亲缘关系密切的病毒类型[15]。近年来，在抗 PVY、PVX 和 PLRV 病毒方面获得成果，已有一些转 CP 基因马铃薯新品系在实验室鉴定和网室攻毒试验基础上，进一步进行田间试验。转 PVX 和 PVY 的马铃薯在田间试验中表现高度抗病毒和显著增加产量，可望在生产上大面积推广。

外壳蛋白是形成病毒颗粒的结构蛋白，功能是将病毒基因组核酸包被起来，保护核酸；与宿主互

中国知网　https://www.cnki.net

相识别，决定宿主范围；参与病毒的长距离运输等。Hemenway 等[16]将马铃薯 X 病毒(PVX)的 CP 基因导入植物，CP 基因在转基因植株内正常表达并表现出对 PVX 的抗性。宋艳茹等[17]将马铃薯 Y 病毒(PVY)的 CP 基因通过致瘤农杆菌介导转入马铃薯栽培种 Favorita、虎头和克新 4 号，结果表明，转基因马铃薯植株中 PVY 增殖均较未转录基因的对照有所降低，同时转基因马铃薯生长发育正常，部分植株单株产量高于未转基因的马铃薯。张鹤龄等[18]将本室克隆的马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因，构建到植物表达载体—双元载体 $pROK_2$ 中，通过致瘤农杆菌介导，转入马铃薯栽培种 Desiree、Favorata、虎头、和台湾红皮等品种中，转入的 CP 基因在转录水平上获得表达，证明转基因马铃薯中外壳蛋白基因的表达干扰了接种病毒的增殖。宋艳茹等[19]用 PVX 和 PVY 双价 CP 基因转化了马铃薯品种虎头和克新 4 号，用 PVY 和 PLRV 双价 CP基因转化了马铃薯虎头和 Favorita。张鹤龄等[20]鉴定了表达 PVX、PVY 双价 CP 基因和 PVY、PLRV 双价 CP 基因转基因马铃薯的抗病性，结果表明，转基因马铃薯对 PVX 和 PVY 复合感染产生不同程度的抗性和保护作用。在转基因株系中出现感病植株,但也出现高抗 PVX 或 PVY 一种病毒的植株和同时高抗 PVX、PVY 两种病毒的植株。

尽管目前通过病毒外壳蛋白基因介导途径获得了一批抗病毒的株系，但抗病毒程度多数表现为中抗,而高抗和免疫类型相对较少。此外，某些转基因株系出现外源 CP 基因沉默和失活现象，致使 CP 基因的正常转录表达受到抑制[15]。针对上述问题,为了避免外源 CP 基因的沉默与失活，应深入研究基因沉默与失活的原因，从而采取相应的对策。

2.2 复制酶基因介导的抗病性

复制酶基因介导抗性是指将病毒复制酶一部分基因序列如 54kD 蛋白基因转入受体获得对病毒的抗性，同时缺陷型复制酶蛋白也可介导病毒抗性。复制酶即特异性依赖于病毒 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA-polymerase，即 RdRp)，是病毒基因组编码的自身复制不可缺少的部分，特异地合成病毒的正负链 RNA。Golemboski 等[21]报道他们将 TMVU1 株编码的复制酶的一部分基因序列，即 54kD 蛋白基因转入烟草中得到的工程植株用很高浓度的 TMVU1(500 $\mu g \cdot mL^{-1}$)及 TMV RNA(300 $\mu g \cdot mL^{-1}$)接种时，均表现出很高的抗性，比一般转外壳蛋白基因的植物抗病性高得多。鲁瑞芳等[22]在大肠杆菌中表达了马铃薯 Y 病毒中国分离物(PVY-C)复制酶 NIb 基因，构建了移码-1 位 NIb 基因(UN)的植物表达载体，通过土壤农杆菌(Agrobacterium tumefaciens LBA4404)介导转化烟草 NC89，获得 51 株再生植株，试验结果支持 PVY-C 复制酶 NIb 基因在转录水平上介导相对广谱抗病性的假说。

2.3 用核酶切割介导抗性

核酶(Ribozyme)是 20 世纪 80 年代初期发现的具有催化功能的 RNA 分子，它具有高度专一内切核酸酶的活性。迄今为止，人们已经发现和研究的核酶较多，而且其结构和作用方式也各不相同，其中锤头形核酶(Hammerhead ribozyme)是应用最广泛，研究最深入的一类。Lamb 等[23]设计合成了两种特异切割 PLRV RNA 的核酶并实现了体外切割。利用核酶内切控制马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)病，近年来取得了一定的进展。叶寅等[24]通过设计合成的针对 PSTVd 正链 RNA 第 246 位 GUC(位于中央保守区，C 区内)的锤头状核酶 cDNA 和针对 PSTVd 负链 RNA 的第 320 位 GUC(位于 T 区)设计合成特异切割 PSTVd 负链 RNA 的锤头状核酶 cDAN，在体外将 PSTVd 双体 RNA 切割成预期大小的片段。邓文生等[25]根据锤头型核酶的作用模式，设计、合成并克隆了特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTVd)负链 RNA 不同区域位点的双价和三价锤头型核酶基因。

3 前景展望

从上个世纪 90 年代我国开始马铃薯转基因抗病研究以来，我国在马铃薯抗晚疫病和抗马铃薯 Y 病毒病、马铃薯 X 病毒病、马铃薯卷叶病毒病(PLRV)、马铃薯纺锤块茎类病毒病(PSTV)等代表性病害进行了大量的研究，取得了丰硕的成果。通过外壳蛋白介导、复制酶基因介导、核酶切割、表达基因调控区等多种途径,获得一批抗 PVX、抗 PVY、抗 PVX 和 PVY、抗 PVY 和 PLRV、抗 PLRV、抗 PSTVP 的转基因马铃薯栽培种。

我国四大粮食作物前三位的水稻、小麦、玉米，其种植面积总体处于减少趋势，而平均单产均高于世界平均水平，各地区的单产水平相差较小，

中国知网 https://www.cnki.net

进一步增加单产的潜力较小。而马铃薯的平均单产水平低于世界平均水平，单产增加的潜力较大，对于我国粮食安全有特殊的战略意义。通过转基因技术获得对环境安全的、具有优良的农艺性状的马铃薯品种，即将成为现实。

[参 考 文 献]

[1] 屈冬玉，谢开云，金黎平，等.中国马铃薯产业发展与食物安全 [J]. 中国农业科学，2005, 38(2) : 358- 362.

[2] 张鹤龄.我国马铃薯抗病毒基因工程研究进展 [J]. 中国马铃薯，2000, 14(1) : 25- 30.

[3] Wei Z M, Lady R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of hypersensitive response produced by the plant pathogen Erwinia amylovora [J]. Science,1992, 257: 85- 88.

[4] De Wit. P J G M. Molecular characterization of gene- for- gene systems in plant- fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens [J]. Annu Rev Phytopathol, 1992, 30: 391- 418.

[5] Martinin N, Egen M, Runter I, et al. Promoter sequences of a potato pathogenesis- related gene mediate transcriptional activation seleselectively upon fungul infection [J]. Mol Gen Genet, 1993, 236: 179- 186.

[6] 李汝刚，范云六.表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长率 [J].中国科学 C 辑，1999, 29(1) : 56- 61.

[7] 李先平，何云昆，陈善娜，等. 表达 HarpinEa 基因的转基因马铃薯的晚疫病抗性分析 [J]. 云南农业大学学报，2002, 17 (3) : 253- 257.

[8] 李汝刚，伍宁丰，范云六，等. 表达 Osmotin 蛋白的转基因马铃薯对晚疫病的抗性分析 [J]. 生物工程学报，1994, 15(2) : 135- 140.

[9] Fredenick K R, Tung T, Emerick R S, et al. Ghucose oxidase from Aspergillus niger cloning, gene sequence, secreation from Saccharomyces cerevisiae and kinetic analysis of a yeast derived enzyme [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 3793- 3802.

[10] 张立平，杨静华，李天然，等. 表达葡萄糖氧化酶基因抗晚疫病马铃薯的培育 [J]. 河北农业大学学报：英文，2001, 24 (2) : 60- 64.

[11] Wu G, Shott B J, Lawrence E B, et al. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2 generating glucose oxidase in transgenic potato plants [J]. The Plant Cell,1995, 7: 1357- 1368.

[12] Doke N. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal cell wall components of Phytophthora infestans and specific inhibition of the reaction of hypersensitivity [J]. Physiol Plant Pathol,1983, 23: 359- 367.

[13] 甄伟，陈溪，梁浩博，等.转基因马铃薯中病原诱导 GO 基因的表达及其对晚疫病的抗性 [J]. 科学通报，2000, 45(10) : 1071- 1075.

[14] Powell- Abel P, Nelson R S, Hoffmann De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. Science,1986, 232: 738- 743.

[15] 赵福宽.马铃薯转 CP 基因育种研究进展 [J]. 北方园艺，1999, 12(4) : 40- 41.

[16] Hemenway C, Fang R , Kaniewski X, et al. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA [J]. EMBO J,1988, 7: 1273- 1280.

[17] 宋艳茹，马庆虎，侯林林，等. 转 PVY 外壳蛋白基因马铃薯及其田间实验 [J]. 植物学报，1996, 38(9) : 711- 718.

[18] 张鹤龄，李天然，哈斯阿古拉，等. 抗卷叶病毒 (PLRV) 转基因马铃薯栽培种及其抗病性研究 [J] .病毒学报，1995, 11(4) : 342- 350.

[19] 宋艳茹，李枞，侯林林，等.双价外壳蛋白基因植物表达协体的构建及马铃薯转基因植物的鉴定 [J]. 植物学报，1994, 36 (11) : 842- 848.

[20] 张鹤龄，宋艳茹，彭学贤，等.表达马铃薯 X 病毒、Y 病毒双价外壳蛋白基因马铃薯基因植株的抗病性 [J]. 病毒学报，1996, 12(4) : 360- 366.

[21] Golemboski D B, Lomonossoff G P, Zaitlin M. Plants transformed with tobacco mosaic nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990, 87: 6311- 6315.

[22] 鲁瑞芳，吕鹏飞，彭学贤.马铃薯 Y 病毒 NIb 复制酶基因在转录水平介导的相对广谱抗病性 [J]. 病毒学报，2000, 16(2) : 162- 166.

[23] Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase gene[J]. J Gen Virol, 1990, 71: 2257- 2264.

[24] 叶寅，刘怡之，赵丰，等.特异切割马铃薯纺锤块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性测定 [J]. 中国科学 B 辑，1992, 5: 491- 496.

[25] 邓文生，杨希才，康良仪，等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒负链的多价核酶的构建和体外活性测定 [J]. 病毒学报，2000, 16(4) : 370- 373.

书讯

《中国马铃薯》编辑部尚有部分由陈伊里教授等主编、哈尔滨工程大学出版社出版的马铃薯产业与开发方面的图书，供读者选购：

① 2000 年出版的《面向 21 世纪的中国马铃薯产业》，定价 50 元/本；② 2002 年出版的《高新技术与马铃薯产业》，定价 50 元/本；③ 2003 年出版的《中国马铃薯研究与产业开发》，定价 60 元/本；④ 2005 年出版的《马铃薯产业与东北振兴》，定价 60 元/本。另外，2001、2002、2003、2004 年《中国马铃薯》杂志精装本，定价 60 元/本。有欲求购的单位或个人请另寄 10%邮费，款到即寄。

联系电话：0451- 55190003　　联 系 人：张立菲

中国知网 https://www.cnki.net