



马铃薯病毒抗性的分子生物学

王 春 林

(中国农科院蔬菜花卉研究所)

马铃薯传入欧洲后不久, 病毒病就成为马铃薯栽培的主要威胁。用带病的种薯在下一季度播种, 则产量损失更为严重。这种现象称为退化, 其典型表现为叶子卷曲, 严重减产。最初, 人们认为退化是由于连续的无性繁殖或不利的氣候和土壤环境条件造成的。直到 1778 年, 人们才认识到退化是由带病的种薯传播的。到本世纪初, 才认识到病毒是造成退化的真正原因。Folsom (1926) 根据症状表现, 将马铃薯病毒病分为 5 类, 即卷叶、花叶、皱缩花叶、条斑和纺锤形块茎。随后又发表了已知的几种病毒。

一些北部的发达国家种植的马铃薯品种, 产量很高, 但很少带有抗病虫性, 这些国家都有严格的种薯检疫制度, 确保将病毒病控制在可以接收的水平之下。这些作法比较奏效, 但是十分繁琐, 还要有昂贵的设备和熟练的人员。而一些发展中国家, 由于气候、土壤以及社会经济条件的制约, 不适合采用类似的种薯检疫制度。所以, 培育抗病毒的品种, 或许是控制病毒病的最经济、最有效而持久的措施。抗病毒的种质资源十分丰富, 问题在于没有有效的方法将这些抗性导入品种, 而不丧失其它的主要特性。随着重组 DNA 技术和离体再生方法的发展, 将特定的基因转

移到马铃薯中并非难事。

1 马铃薯病毒抗性的类型

自然界中, 茄属植物普遍地有如下几种类型的病毒抗性。

1.1 抗蚜虫媒介

阻止病毒传播, 从而减轻发病。这类抗性不包括植物和病毒之间的直接相互作用, 故不在此作重点讨论。

1.2 田间抗性

亦称感染抗性, 包括很多因素, 被认为是多基因的。大部分马铃薯品种都有一定程度的田间抗性, 这种多基因控制的数量性状的抗性, 已知存在于两种重要的蚜传病毒、卷叶 (PLRV) 和 Y 病毒 (PVY)。抗卷叶的植株表现为限制病毒感染, 叶片病毒浓度低并限制病毒从叶片向块茎传播。对 PLRV 和 PVY 田间抗性比较强的品种很少, 也说明用传统育种方法转移多基因抗性比较困难。

1.3 单基因抗性

包括极端抗性和过敏反应。Ross 将过敏反应又分为两类, 即局部免疫 (表现为坏死, 侵染仅限于入侵处及周围细胞) 和系统过敏 (植株感病后死亡)。和田间 (多基因) 抗性相比, 这两种单基因抗性对植株的保护程度很高。一般用接种或酶联免疫吸附法 (ELISA) 都检测不到病

毒。

植物抗性基因可以将病毒复制降低到极低的水平而不影响正常的植株发育过程, 这对于植物病害的控制极有价值。Fraser (1987) 对 63 个抗性植株的寄主——病毒相互作用的 63 个系统进行的调查发现, 有 90% 以上的病毒抗性是受单基因控制的, 而且这种基因是非株系特异性的。植物病毒的单基因抗性与对真菌的单基因抗性不同, 不会在群体水平上丢失。这些特点都为马铃薯抗病毒育种提供了依据。

2 极端抗性和过敏反应概念的发展

很多有关马铃薯抗性的文献都认为极端抗性是一种过敏反应。但是细胞水平的研究表明, 两者是截然不同的现象。Barker 等 (1984) 用 PVY 的普通株系 (PVY⁰) 接种带有极端抗性 (R) 或过敏反应 (N) 的马铃薯无性系的原生质体, 发现极少量的具有 Ry 的品种的原生质体可以检测到病毒。而有 N 基因的品种的原生质体, 经 PVY 感染的原生质体的量与易感 PVY 的马铃薯品种的原生质体的量相似。品种 Maris piper (带有 PVX 抗性基因 Nx) 的原生质体所含的 PVX 的数量, 以 ELISA 测定, 与经过和 PVX RNA40 小时共培养的易感原生质体的病毒含量相当。相比之下, 品种 Cara (带有基因 Rx) 的原生质体的病毒含量, 只占易感原生质体 (Rx⁻) 中 PVX 含量的 10%~15%。这说明, 由 Rx 或 Ry 产生的极端抗性, 只在单个细胞的水平上表达。相比之下, 过敏反应的表达, 则需要细胞之间的交流。并且有两点是肯定的: ①N 基因通过激活植物过敏反应间接地产生抗性; ②R 基因可能直接通过 1

个或多个步骤来干扰病毒的复制。

3 PVX-Rx 模式

马铃薯 X 病毒是一弯曲的棒状结构, 是一单链的正意 RNA。PVX RNA 为 6.4kb, 具有 5' 端的帽子结构和 3' 端的多腺苷化结构。PVX 是马铃薯上最常见的 1 种病毒, 造成的产量损失可达 15% 左右。

根据 PVX 与过敏反应的基因 Nb 和 Nx 及极端抗性基因 Rx 的相互作用, 已知的分类见表 1。

表 1 PVX 株系分类

基因型	株				系
	1	2	3	4	HB
nxnb	S	S	S	S	S
Nxnb	R	S	R	S	S
nxNb	R	R	S	S	S
NxNb	R	R	R	S	S
Rx(acl)rx	R	R	R	R	S
Rx(adj)rx	R	R	R	R	S

R: 抗; S: 感; acl: Sacaule; cdj: anaigena

1933 年, 由 Schultz 和 Raleigh 首次报道了对 DVX 的极端抗性。后来发现这种抗性是由一个显性基因控制的, 来自于 *Solanum andigena* 并被转移到 *Solanum tuberosum* 无性系 USDA41956 中。这个基因被命名为 Rx (adj), 已被转移到很多北美品种如 Atlantic 中。另一个极端抗性是在 *Solanum acaule* 中由 Ross (1954) 发现的。该基因被称为 Rx (acl), 已被转移到几个欧洲品种中。Rx (adj) 和 Rx (acl) 之间有什么关系还不清楚。

PVX 的另一株系, 称为 PVX-HB, 可以克服 Nb, Nx, Rx (acl) 和 Rx (adj) 的极端抗性, 但是发现 *Solanum sucrense* 的一个系, 带有一个显性基因称为 Rx (scr), 对 PVX-HB 有免疫作用。*Solanum sucrense* 是 *Solanum oplocense* 和 *Solanum andigena* 的天然四倍体杂种, 故推测这两个

亲本中也应该有 Rx (scr)。

自从将 Rx(adj)(Schultz)和 Raleigh, 1933) 和 Rx(acl)(Ross1954)转移到马铃薯育种资源中以上, PVX 的破坏抗性株系并没有在带有这两个抗性基因的北美欧洲品种上构成威胁, 这说明 Rx (adj) 和 Rx (acl) 是 2 个十分重要和在发挥抗性作用

的基因。
当用提纯的 PVX 病毒接种 *Solanum acaule* 的两品系, PVX-抗 (Rx⁺) (P1203555) 和 PVX-感 (Rx⁻) (P1205520) 的原生质体时, Rx⁻ 品系的原生质体中合成了大量的 PVX RNA, 而 Rx⁺ 品系的原生质体中只有极少量的新合成的 PVX RNA, 通过放射性标记才能检测到。用 PVX 接种 48 小时之后, Rx⁻ 的原生质体的生活力没有明显下降, 但接种 72 小时之后, 存活的 Rx⁻ 的原生质体数则很少。而接种 PVX 的 Rx⁺ 原生质体的生活力则与假接种的原生质体的生活力相同。用 *Solanum tuberosum* 的 Rx⁺ 和 Rx⁻ 品系进行上述实验, 也得到类似结果。

PVX 的感染性, 可能与某种促进病毒复制的因素有关。比如某种寄主编码的 RNA 聚合酶亚基, 可能与 PVX 编码的 RNA 聚合酶结合, 形成一个高效的 PVX RNA 特异的聚合酶。相反的, 由 Rx 编码的 RNA 聚合酶亚基可能与 PVX RNA 聚合酶亚基有高度亲合性, 形成一个活性极低的空酶 (pol Rx)。这种假说与 Rx 等位基因相对于产生感染性的 Rx 等位基因成为一对显性基因的事实相吻合。PVX 的抗性破坏株系可能为病毒 RNA 的聚合酶编码一种亚基, 来提高 pol Rx 的活性。Tavantzis 等 (1990) 正在进行这方面的深入研究。

4 克隆植物病毒抗性基因方法

由于尚不明了 Rx 基因的生化功能和产

物, 只能用以下途径克隆 Rx 基因: 一种是通过转座子突变来捕捉基因, 一种是利用限制性片段长度多态性 (RFLP) 来进行基因定位。用转座子诱导的突变来从基因组 DNA 克隆中鉴定生化功能未知的植物结构基因, 越来越得到广泛注视。Frey 等 (1989) 将玉米的转座子 En (Spm) 克隆到植物的表达载体 PLGV1103neo 上, 再转移到带有 PGV3850 Ti 质粒的根癌农杆菌 C58C1 中, 再用此质粒转化二倍体无性系 USW2225 (含有 Rx 杂合基因) 的叶圆片和节间。分析转基因植株上 En 1 因子的存在和表达。结果证明 En 1 转移到了马铃薯上。目前, 这些带有 En 转座子的马铃薯植株正被用来产生定位 Rx 基因的材料。转座子突变只实用于如下情况, 即带有显性基因 (Rx) 的植株与带有隐性的突变基因 (rx) 在表型上能够相区别。USW2225 的叶片接种 PVX 后表现出花叶症状, 因此可用于转座子突变分析。

最近, Cornell 大学和 Max Planck 研究所分别得到了 *Solanum tuberosum* 的 RFLP 连锁图谱。种用 RFLP 的方法, 可以将 Rx 定位到某一条通过染色体上距最近的标记大约 300~500kb 的地方, 通过染色体走读 (Chromosome walking) 进一步趋近 Rx 位点。当距离假设的位置 50~100kb 的时候, 就将 10~15kb 的基因组 DNA 片段克隆到根癌农杆菌中并转化对 PVX 感染的马铃薯品系 (Rx⁻) 看有无产生抗性的克隆。然后再用更小片段的亚克隆 (2~4kb) 进行转化, 看是否还保持抗性表型。

5 用病毒基因的点突变研究植物——病毒之间的相互关系

植物病毒基因的克隆和序列分析有利于对这些病毒基因进行突变分析并确定结构与功能之间的相互关系。在这方面有两例典型的报道。已知 TMV 的 L 株系 (TMV-L)

在带有抗性基因 N' 的烟草植株上产生过敏反应 (HR) (区域性坏死斑)。Saizo 等人 (1989) 对 TMV-L 的外壳蛋白进行某些修饰, 致使 TMV-L 在 N' 植株上的过敏反应能力有所变化。Soratford 和 Covey (1989) 发现, 花椰菜花叶病毒不同株系表现症状的遗传决定因素分属于病毒基因组的不同部分, 而不限于一种基因产品。

6 CP 基因与 R 基因的比较

自从 Powell-Abel 等 (1986) 报道了用重组 DNA 技术使植物获得抗性以来, 人们对植物病毒外壳蛋白 (CP) 的基因工程予以特别的青睐, 而忽视了对自然界存在的病毒抗性基因的研究和利用。其实, 带有 PVX CP 基因的转基因植株的抗性, 其有效性依赖于病毒接种物的浓度, 在很多情况下, 只使病毒侵染和症状发展推迟 2~3 周。机械接种以后的 7~21 天, PVX CP 植株 (品种 Bintje) 叶组织中的 PVX 数量增加了 1000 倍。这个数量虽比对照 Bintje 植株中的 PVX 数量低 20~30 倍。但也十分可观。相比之下, 机械接种 PVX 后, 带有 Rx 基因的马铃薯植株的叶片中未能检测到 PVX 病毒。由于马铃薯通过块茎繁殖, 病毒可以通过块茎传播并逐代累加。根据两周多的 PVX 增长曲线计算, 带有 PVX CP 基因的转基因 Bintje 植株, 在种薯繁殖的 4 年之中 PVX 可以达到相当高的浓度。而且, 这种植株中的 PVX 可以被昆虫传播。

总之, 对病毒侵染的抗性在 90% 的情况下, 是由单个显性基因控制的。马铃薯病毒抗性也不例外。马铃薯的单基因抗性分为极端抗性 (ER), 在单细胞水平表达; 和过

敏反应 (HR), 需要细胞之间的作用才能表达。单基因抗性没有株系特异性, 而且在群体水平有很高耐性。

利用重组 DNA 技术转移病毒抗性基因是个十分可靠而有前途的方法。由于对这些基因的生化功能和产物知之甚少, 对这些基因的分离和操纵也就十分困难。随着马铃薯抗病毒基因的克隆和序列分析的发展, 可以对寄主基因进行定点突变。然后拿我们手中所掌握的抗性基因, 根据不同的品种和环境, 配制不同的组合。

虽然最近兴起了用外壳蛋白的基因工程保护马铃薯和其它作物的方法, 但是必须清楚地认识到, 自然界存在的 ER 和 HR 基因远比 CP 所产生的抗性优越。

Solanum sp-PVX 相互作用的方式为研究抗性分子机制提供了十分理想的模式。已经建立了单显性基因 Nb, Nx, Rx (acl), Rx (adj), Rx (scr) 与 PVX 不同株系之间的相互关系。PVX 基因组 RNA 的核苷酸全序列和各个病毒基因的开放阅读框架也已确定。PVX 基因组 RNA 可能翻译成一个或数个大片段多肽而且不经过翻译后的加工, 病素基因的表面也通过亚基因组 mRNA 来实现。

用原生质体接种病毒的方法研究了 Rx (adj) 抗性的生化机制。用病毒颗粒或核酸 RNA 接种 Rx⁻植株的原生质体时, 发现有大量的 PVX 积累, 而 Rx⁺植株原生质体中 PVX 的含量只有用放射性标记才能检测出来。PVX 侵染引起 Rx⁻植株原生质体活力降低, 但对 Rx⁺植株原生质体活力无影响。原生质体活力的丧失与症状的严重程度成比例。有证据表明, PVX 的抗性可能与 *Solanum tuberosum* 的染色体或染色体片段的丢失有关。