

# 抗黄瓜花叶病转基因烟草新品系的对比及示范试验

吴中心<sup>1</sup> 沈金昌<sup>2</sup> 王廷晓<sup>3</sup> 王振坤<sup>2</sup> 杨永斌<sup>2</sup> 周瑞宽<sup>3</sup>

1. 河南省农业科学院烟草研究所, 许昌 461000; 2. 河南省禹州市烟草公司; 3. 河南省襄城县烟草公司

**摘 要** 对同时表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV CP)和卫星 RNA 的转基因烟草 NC89 新品系(NC89-B)及单一表达 CMV CP 的转基因 NC89 新品系(NC89-T), 在大田生产条件下进行了品比及示范试验。结果表明, 在抗病性方面, 转基因 NC89 明显高于未转基因 NC89, 其中 B 品系对 CMV 的相对防效达 80% 左右, T 品系对 CMV 的相对防效达 20% 左右; 在农艺性状方面, 转基因 NC89 较对照有较显著改善, 产值、产量、上等烟比例均有提高, 但种性未变; 在原烟品质方面, 转基因 NC89 与对照基本一致。

**关键词** 烟草 转基因 NC89 抗病性 农艺性状

利用植物基因工程技术将与病毒有关的核酸序列, 如病毒外壳蛋白基因, 卫星 RNA 基因, 复制酸亚基基因等, 导入作物以获得转基因作物对该病毒甚至相关病毒的抗性, 已在 21 个国家、25 余种作物上取得成功<sup>[2]</sup>, 从而开创了基因工程抗病育种新领域。目前抗几种主要烟草病毒的转基因烟草均已获得<sup>[3]</sup>, 有些已进入大田试验及示范<sup>[1,4]</sup>。

如何进一步提高转基因烟草的抗病水平, 是基因工程抗病育种的关键。在以前的研究中, 均采用单基因抗病毒策略, 即针对某一种病毒, 转基因植株中只存在一种抗病基因, 或是病毒外壳蛋白基因, 或是卫星 RNA 基因, 因此抗病水平较低<sup>[2]</sup>。为使转基因烟草对病毒具有多基因抗性, 我们将黄瓜花叶病毒的外壳蛋白基因和卫星 RNA 基因同时导入烟草, 并选育出了纯合品系<sup>[5]</sup>。本研究拟通过大田品比及示范试验, 比较具有多基因抗性的转基因烟草品系与具有单基因抗性的转基因烟草品系的抗性水平。同时, 为验证转基因 NC89 的原品种特性是否发生变异, 还对其主要植物学及农艺性状、原烟品质等进行了测试。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及来源

NC89-B: 同时表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV CP)及卫星 RNA 的转基因 NC89 品系。

NC89-T:单一表达 CMV CP 的转基因 NC89 品系。NC89-ck:未转基因 NC89(对照)。

以上材料均由河南省农科院烟草所提供。

## 1.2 试验设计

品比试验分别在河南省农科院烟草研究所及禹州市郭连乡闫楼村进行。试验地前茬作物为大豆,砂质壤土,肥力中等。大田按规范化栽培措施管理,测土施肥,施肥后土壤总含 N 量为 6kg, N:P:K=1:2:3。试验设 5 次重复,每重复 3 个材料顺序排列,在第 1、3、5 重复的各材料边界区设人工接毒试验,于移栽后第 30 天摩擦接种纯 CMV 液(100 $\mu$ g/ml),每一重复内每材料接种 100 株。试验地总面积为 2hm<sup>2</sup>,种植密度为 17700/hm<sup>2</sup>。

示范试验分别在禹州市、襄城县、许昌县及临颍县进行,示范总面积约 40hm<sup>2</sup>,示范田统一施肥,规范管理。

## 1.3 试验项目

1.3.1 抗病性鉴定 在示范试验区及品比试验的自然发病区,于烟草移栽大田后,每隔 15 天调查记载一次花叶病发病情况。在品比试验的人工接种区,于第一次接种后每隔 7 天调查一次花叶病发病情况。通过比较各试验材料的 CMV 发病率、病情指数及大田相对防效,对其抗病水平进行评价。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级} \times \text{株级})}{\text{总株数} \times \text{最高病级}} \times 100$$

$$\text{相对防效}(\%) = \frac{\text{对照材料病指} - \text{试验材料病指}}{\text{对照材料病指}} \times 100$$

病级分类按方中达等方法,依次为 0~4 级。

1.3.2 农艺性状测试 分别于生育期及采收后,调查各材料株高、株形、叶数、叶形、茎围、节距、腰叶长宽、田间整齐度、产量、上等烟比例、均价、产值等。

1.3.3 原烟品质分析 为验证转基因烟草的工业特性,对烤后中三原烟进行外观质量评价及内在化学成分分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗病性鉴定

2.1.1 自然鉴定结果 在移栽后 20 天内,各试验材料均未感病,生长正常,顺利进入团棵期,之后花叶病在各试验点开始轻度发生,病级以 1 级为主,其中转基因材料发病率明显低于对照 NC89。进入旺长期后,NC89 对照及 NC89-T 品系的病情迅速扩展,病株数增多,病级加重,以 2 级较多;而 NC89-B 品系在该阶段发病率及病级仍维持在较低水平;至移栽后第 60 天,各材料之间的抗病性差异更为显著。结果见表 1。

表 1 各试验材料的自然发病情况比较

材 料	不同重复的发病率(%)						较对照 降低(%)	不同重复的病情指数(%)						相对 防效(%)
	I	II	III	IV	V	平均		I	II	III	IV	V	平均	
NC89-B	14.3	13.8	14.8	18.3	15.6	15.6	73.2	7.5	7.2	7.1	9.6	8.1	7.9	80.5
NC89-T	56.3	46.5	44.9	61.0	52.5	52.2	10.5	39.8	31.0	27.1	43.8	34.4	35.2	13.3
NC89-ck	61.9	54.1	57.1	61.1	57.5	58.3	—	45.4	37.9	39.0	43.1	37.5	40.6	—

表1结果表明,在自然发病条件下,转基因材料表现出了明显的抗花叶病能力。而在转基因材料之间,具有两个抗病基因(CMV CP和卫星RNA)的B品系的抗病水平又明显高于只具有一个抗病基因的T品系;这表明同时将抗一种病毒的多个基因导入同一烟草,使之具有多种抗病机制,是提高转基因烟草抗病性的有效途径。

2.1.2 人工接毒鉴定结果 在人工接种条件下,各材料均在接毒7天左右开始发病,至20天时对照NC89全部发病,病情发展迅速,病级多为3、4级,病指达70左右;而转基因NC89—B品系仍然有35%左右的植株没有发病,且发病株病级以2、3级为主,病指在32.5~38.4之间,极显著低于对照及转基因T品系。转基因T品系的抗性表现,与自然条件下所得结果一致,即显著高于未转基因NC89,显著低于转基因B品系。人工接毒后第20天时的调查结果见表2。该结果进一步表明,含多个抗病基因的转基因品系较含单个抗病基因的转基因品系具有更高的抗病能力。

表2 人工接种条件下各试验材料的发病情况

材 料	3次重复的发病率(%)						3次重复的病情指数					
	I	II	III	平均	显著性检验		I	II	III	平均	显著性检验	
					0.05	0.01					0.05	0.01
NC89—B	62.5	67.5	65.0	65.0	a	A	38.4	32.5	36.3	35.1	a	A
NC89—T	87.2	97.5	87.0	90.6	b	A	57.0	62.5	63.8	61.1	b	B
NC89—ck	100	100	100	100	b	A	80.0	72.4	65.0	72.5	c	B

注:发病率  $t_{0.05}S_D=24.02$ ,  $t_{0.01}S_D=40.84$ ;病情指数  $t_{0.05}S_D=10.26$ ,  $t_{0.01}S_D=22$ 。

2.1.3 各示范点病情对比结果 转基因材料在各个示范点的抗病性表现,与在品比试验中的结果完全一致,即显著高于对照材料,同样,在转基因材料之间,B品系的抗病性又显著高于T品系。各示范点在移栽后第65天的调查结果见表3。

表3 示范区各试验材料的自然发病调查结果

材 料	各示范点的发病率(%)						各示范点的病情指数					
	许昌	襄城	禹州	平均	显著性检验		许昌	襄城	禹州	平均	显著性检验	
					0.05	0.01					0.05	0.01
NC89—B	7.0	10.0	2.1	6.37	a	A	2.0	2.5	0.97	1.82	a	A
NC89—T	21.1	16.2	14.1	17.13	b	AB	7.3	6.1	5.64	6.30	b	B
NC—ck	24.5	28.8	16.0	23.10	b	B	10.1	8.9	8.12	9.00	c	C

注:1. 与转基因材料相邻地块的未转基因NC89为示范对照材料。

2. 发病率  $t_{0.05}S_D=6.97$ ,  $t_{0.01}S_D=11.56$ ;病指  $t_{0.05}S_D=1.14$ ,  $t_{0.01}S_D=1.89$ 。

## 2.2 主要植物学及农艺性状比较

转基因材料在品比区及各示范区的植物学及农艺性状表现基本一致,即在基本保持原NC89品种特性的基础上,在株高、总叶数、最大叶面积等方面又有显著改善,大田外观长势也更好。以禹州点为例,B品系的株高、总叶数、最大叶面积分别较对照增加2.3cm,2.8片和148cm<sup>2</sup>,这说明B品系不仅具有很高的抗病能力,且具有较强的生长势。

## 2.3 产值结果对比

将各品比区及示范区试验材料单收单烤后,分别记产、记值,结果见表4。

表4表明,转基因NC89—B品系较T品系及对照NC89分别增产163.5kg/hm<sup>2</sup>及183kg/hm<sup>2</sup>,增收762元/hm<sup>2</sup>及1149元/hm<sup>2</sup>,上等烟比例提高2.3及3.8个百分点。经显著性检验,NC89—B品系的上述各项指标与T品系及对照NC89的差异均达显著水平。

表4 各试验材料产值对比结果

材 料	产量(kg/hm <sup>2</sup> )				产值(元/hm <sup>2</sup> )				上等烟比例(%)			
	烟草所	禹州	许昌	平均	烟草所	禹州	许昌	平均	烟草所	禹州	许昌	平均
NC89—B	2335.5	2080.5	2313.0	2242.5	6931.5	8166.0	8748.0	7948.5	15.7	24.3	17.2	19.1
NC89—T	2118.0	1957.5	2161.5	2079.0	5763.0	7572.0	8234.5	7186.5	13.1	21.1	16.3	16.8
NC89—ck	2082.0	1944.0	2154.0	2059.5	5254.5	7174.5	7968.0	6799.5	12.7	19.0	14.1	15.3

### 2.4 原烟品质特性对比

三个试验材料的中三原烟均表现为叶片油分充足,弹性好,叶色橘黄,色度饱满,叶色杂色轻,经测定100片干烟重NC89—B为914.6g,NC89—T为903.1g,NC89对照为896.8g,均达到了优质主料烟质量要求。其它各级烟叶经综合评价,NC89—B叶片较大,叶片含青少,外观质量较NC89对照稍有改善。通过对各材料的中三原烟进行化学成分分析(见表5),表明B品系糖碱比更趋合理,烟碱含量则互有高低,无明显差异。

表5 各试验材料中三原烟的化学成分对比

材 料		总糖(%)	还原糖(%)	总氮(%)	蛋白质(%)	烟碱(%)	烟碱氮(%)
NC89—B	烟草所	17.24	16.57	1.64	8.13	2.74	0.42
	禹州	18.61	16.60	1.59	8.27	2.65	0.45
NC89—ck	烟草所	16.10	14.04	1.61	8.76	2.95	0.47
	禹州	17.41	15.89	1.72	8.64	2.52	0.41

## 3 讨论

利用植物基因工程技术已获得大量抗病毒转基因植株<sup>[2]</sup>,其中已进入大田试验的有抗CMV的黄瓜<sup>[6]</sup>,兼抗PVX和PVY的马铃薯<sup>[7]</sup>,兼抗TMV和PVY的烟草<sup>[3]</sup>等。但以前的研究均是将一种类型的抗病基因即病毒外壳蛋白基因或病毒卫星RNA基因导入作物,属单基因抗性,抗性机制较单一,在大田病毒严重侵染或重复侵染的情况下,抗性易被克服。且有遗传不稳定的倾向,即抗病性在不同地区或年份间存在较大差异。这也是常规育种实践中经常发生的现象。我们通过将两种不同类型的抗病基因,即主要抗CMV侵染的CMV外壳蛋白基因及主要抗CMV复制的卫星RNA同时导入烟草,获得了具有多种抗病机制的转基因烟草。本研究结果表明,其抗病性水平显著高于只表达单一抗病基因的转基因品系。这说明,在植物基因工程抗病育种研究中,将多个抗病基因导入同一作物,使之具有多基因抗性,是提高其抗病水平及稳定性的有效途径。

### 参 考 文 献

- 1 吴中心,张同庆,姚根怀等.快速选育抗CMV转基因烟草纯合品系.中国烟草,1994,(3):1~7
- 2 Wilson TMA. Strategies to protect crop plants against viruses. Proc Natl Acad Sci USA,1993,90:3134
- 3 Wersman EA. Fruits of a biotechnology harvest: A decade of tobacco research. Coresta Congress Information Bulletin, Harare, Zimbabwe, 1994
- 4 Charles JB and Thomas. HU. Environmental release permits. Bio/technology, 1993, 11: 1524~1528
- 5 Yie Y, Wu ZX, Wang SY et al. Fast homozygosity and field test of transgenic tobacco NC89 to CMV. Transgenic Research, 1995

- 6 Gonsalves D et al. Comparison of coat protein mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to CMV. *Bio/Technology*, 1992, 10: 1562~1570
- 7 Lamson C et al. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar. *Bio/technology*, 1990, 7: 1079~1087

## Virus Resistance and Cultivar Properties in Transgenic Tobacco Lines under Field Conditions

Wu Zhongxin<sup>1</sup>    Shen Jinchang<sup>2</sup>    Wang Tingxiao<sup>3</sup>    Wang Zhenkun<sup>2</sup>  
Yang Yongbin<sup>2</sup>    Zhou Ruikuan<sup>3</sup>

1 Institute of Tobacco, Henan Academy of Agricultural Sciences, Xuchang

2 Tobacco Corporation of Yuzhou City, Henan Province

3 Tobacco Corporation of Xiangcheng County, Henan Province

**Abstract**    The resistance to cucumber mosaic virus and the preservation of cultivar properties in transgenic tobacco cv NC89-B line expressing "CMV CP + Satellite RNA" and NC89-T line possessing CMV CP gene were tested under field conditions. The results indicated that the transgenic lines showed much higher resistance than the non-transformed plants. The disease index of the transgenic line B, the best line, averaged about 7.9 and 35.1 in contrast to about 40.6 and 72.5 of the non-transformed NC89 under natural condition and with inoculation of viruses, respectively. The agronomic properties of the transgenic lines improved but showed no genetic variation compared with the non-transformed plants.

**Key words:** Tobacco; Transgenic NC89; Resistance; Agronomic characters