

# 应用基因工程创造抗病毒转基因小麦新种质

成卓敏 何小源 陈彩层 吴茂森 张杰 肖红 周广和

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

由大麦黄矮病毒(BYDV)引起的小麦黄矮病是小麦最重要的病毒病害,对世界上所有麦产区国家造成重大经济损失,流行年份减产 20—30%。由于已明确小麦中不含有抗性基因,无法从抗病性筛选中获得抗病品种。所以,利用基因工程人工构建小麦对病毒的抗性就显得更有意义。

按照已测定的小麦黄矮病毒外壳蛋白基因核苷酸序列,合成二条引物,用 MMLV 反转录酶把病毒 RNA 反转录成 cDNA,用聚合酶链式反应(PCR)方法得到了全长 CP 基因 cDNA,然后把 CP 基因 cDNA 插入到携带有 35S、Actin 和 Emu 不同启动子和 NPTII、GUS 和 HPT 等不同报告基因的表达质粒中,再用  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP 标记的 CP 探针及用  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 标记的 GPV RNA 探针进行检测和对 CP 片段进行序列分析,证明重组质粒中的 CP 是真正的大麦黄矮病毒 GPV 株系外壳蛋白基因 cDNA。

应用花粉管通道法等转化途径,成功地把 GPV 株系 CP 基因导入普通栽培小麦中。对转基因小麦后代(TO 代、T1 代、T2 代和 T3 代)的分子水平检测(dot blot, PCR Southern)证明,外源基因已存在于转基因小麦中,并得到稳定遗传。应用 PCR 对 T1 代 CP 基因检测结果,在二次试验中,CP 基因阳性率分别为 75%和 77.7%,符合孟德尔 3:1 分离规律。经 Western 测定,证明 CP 基因在转基因小麦中已经得到表达。

抗病性鉴定分室内和田间二部分,室内鉴定是把在 GPV 毒源上饲毒二天的麦二叉蚜逐株接种到转基因小麦的 T1 代和 T2 代上,使植株充分发病。一般可对比照推迟发病 1—2 周,有的可推迟发病达 4 周,部分转基因小麦在整个生长期抗病,且 ELISA 读数较低。田间抗病性鉴定,在本所试验田进行单粒播种 100 份材料。在充分接种发病的基础上目测检查全田发病情况和续株检查轻病区 12 个小区发病情况。其中三个小区旗叶和旗叶下一叶无病状和病状轻微的共 70 株,占总株数 127 株的 55%,从 12 个小区单株收获病轻株共计 154 株。

研究的意义在于首先对 BYDV—GPV 株系进行了基因序列分析,合成了 CP 基因的全长 cDNA;建立了以花粉管通道法等简单、有效、可信任的小麦遗传转化方法;在世界上首次获得抗病毒转基因小麦植株。本研究应用基因工程途径,首次把人工构建的抗性基因导入高产、优质,不抗病的小麦品种,使在不改变品种原来优良性状的情况下,增加抗病性,无疑对小麦的抗病育种具有重要的经济和社会意义。