

## 研究报告

## Research Reports

# 葡萄病毒 B CP 基因植物表达载体构建及烟草遗传转化

任芳, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 李正男, 董雅凤\*

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 兴城 125100)

**摘要** 葡萄病毒 B *Grapevine virus B* (GVB) 是葡萄皱木复合病中栓皮病的病原, 为开展抗 GVB 转基因研究, 本研究利用 RT-PCR 技术克隆 GVB 外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因, 与植物表达载体 pRI 101-AN 连接构建植物表达载体 pRI-GVB CP。采用电击转化法将植物表达载体 pRI-GVB CP 导入农杆菌 LBA4404, 并利用农杆菌介导的叶盘转化法将外源基因导入西方烟 '37B'。共获得 16 个烟草再生株系, PCR 检测其中 3 个株系为阳性, 阳性株系播种获得的 64 株 T<sub>1</sub> 代植株中有 30 株扩增到目的条带, 阳性率为 46.9%, 表明目的基因 GVB cp 成功导入烟草并可成功遗传到子代。28 株 T<sub>1</sub> 代转基因植株接种病毒进行抗病性鉴定, 其中有 6 株对接种病毒 GVB 具有抗性。

**关键词** 葡萄病毒 B; 外壳蛋白基因; 植物表达载体; 烟草; 遗传转化

**中图分类号:** S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017236

## Construction of a plant expression vector of the *Grapevine virus B* coat protein gene and transformation into *Nicotiana tabacum*

REN Fang, ZHANG Zunping, FAN Xudong, HU Guojun, LI Zhengnan, DONG Yafeng

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Trees, Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, China)

**Abstract** *Grapevine virus B* (GVB) is the pathogen of grapevine corky bark disease in the rugose wood complex. In order to develop transgenic plants resistant to GVB, the coat protein (CP) gene of GVB was cloned and inserted into the plant expression vector pRI 101-AN and the recombinant plant expression vector pRI-GVB CP was constructed. The vector pRI-GVB CP was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electric shock process, and then introduced into *Nicotiana occidentalis* '37B' by *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. Totally 16 regenerated tobacco strains were obtained in this study. PCR detection indicated that three stains were positive, and 46.9 percent of 64 T<sub>1</sub> plants were positive by PCR detection, indicating that the target gene GVB cp was successfully introduced into the tobacco and successfully inherited to the progeny. The resistance of transgenic tobacco was identified by inoculating GVB into T<sub>1</sub> transgenic plants. The results indicated that 6 out of 28 T<sub>1</sub> transgenic plants showed resistance to GVB.

**Key words** *Grapevine virus B*; coat protein gene; plant expression vector; tobacco; genetic transformation

葡萄 *Vitis vinifera* L. 是我国的重要水果之一, 截至 2015 年其产量排名为我国水果产量的第四位<sup>[1]</sup>。但同时葡萄也是感染病毒种类最多的果树, 目前国内外已报道 65 种病毒可侵染葡萄<sup>[2]</sup>, 病毒病也逐渐成为制约我国葡萄产业化发展的重要因素之一。葡萄栓皮病 (corky bark, CB) 是皱木复合病

(rugose wood complex, RW) 中的一种病害类型<sup>[3]</sup>, 其病原为葡萄病毒 B *Grapevine virus B* (GVB), 为线性病毒科 *Flexiviridae* 葡萄病毒属 *Vitivirus* 的重要成员<sup>[4-6]</sup>。目前 GVB 在美国、意大利<sup>[4-5]</sup>、法国、南非<sup>[6]</sup>、以色列<sup>[7]</sup>、印度<sup>[8]</sup> 及中国<sup>[9]</sup> 等全世界多个国家普遍发生, 2014 年对中国不同地区的 188 个葡萄

样品检测发现其中 17 个样品携带 GVB,带毒率为 9%左右<sup>[9]</sup>。GVB 感染葡萄后植株将终生带毒,难以通过化学药剂进行有效防治,因此培育抗病品种是防控葡萄病毒病的重要途径,利用基因工程导入外源基因是抗病育种的一种有效辅助手段。目前葡萄抗病毒基因工程主要利用病毒外壳蛋白(coat protein, CP)和移动蛋白(movement protein, MP)等病毒来源的基因作为抗性基因,并获得了抗病毒植株<sup>[10-11]</sup>。这一类基因诱导植株产生针对来源病毒的特异抗性。田莉莉等<sup>[12-13]</sup>为创制针对葡萄病毒的广谱抗病毒植物新材料,分别将 2 种和 4 种葡萄病毒部分 *cp* 基因片段串联构建 RNAi 干扰植物表达载体,分别转入烟草和葡萄体细胞胚,抗性效果有待进一步评价。除病毒源基因外,一些非病毒来源的基因也被应用于抗病毒基因工程,如郭佩佩等<sup>[14]</sup>利用大豆凝集素基因 *lec-s* 转化烟草增强了植株对烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 的抗性;本实验室曾将一种广谱性抗病毒基因酵母 *pac1* 基因导入烟草,所获得的部分转基因植株对 GVB 表现出一定的耐病性,但并不能完全抵抗病毒的侵袭<sup>[15]</sup>,因此还需探索和研究诱导抗性更强的外源基因。利用病毒 *cp* 基因培育抗病毒植株已有一些成功案例<sup>[10-11]</sup>,但由于转基因葡萄植株培育、抗性评价等周期长、难度大,因此选择烟草等模式植物开展转基因研究,可快速获得转基因烟草植株并进行抗性评价,如 Radian-Sade 等<sup>[16]</sup>、Ling 等<sup>[17]</sup>、Jardak-Jamoussi 等<sup>[18]</sup>将 GVA、GFLV、或 GLRaV-2 等葡萄病毒 *cp* 或 *mp* 基因导入烟草获得转基因植株,通过摩擦接种转基因烟草观察症状表现快速进行抗性评价,初步筛选出抗病或耐病株系。有关 GVB *cp* 基因的遗传转化研究目前国内尚罕见报道,本实验室研究证明西方烟 *Nicotiana occidentalis* ‘37B’ 接种 GVB 后,会出现明显褪绿、黄化、皱缩畸形等症状<sup>[15]</sup>,有助于快速进行抗病性评价,因此本研究将 GVB *cp* 基因作为目的基因导入该烟草,为评价其抗病毒效果、培育抗性更强的转基因植株奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用于 GVB *cp* 基因克隆的毒源为 GVB 带毒葡萄植株摩擦接种的西方烟 *N. occidentalis* ‘37B’ 组培苗,由本实验室保存;用于遗传转化的健康西方烟 ‘37B’ 组培苗由本实验室保存。

### 1.2 载体、菌株及主要试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态、农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 电击转化感受态、克隆载体 pMD 19-T、植物表达载体 pRI 101-AN、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、PCR 相关试剂等均购自 TaKaRa 公司(大连);质粒提取试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司;6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)、萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)、吲哚丁酸(indolebutyric acid, IBA)、链霉素(streptomycin, Sm)卡那霉素(kanamycin, Km)、头孢霉素(cefotaxime sodium, Cef)等激素和抗生素购自美国 Sigma 公司。

### 1.3 GVB *cp* 基因的克隆

根据 GenBank 登录的 GVB 序列利用软件 Primer premier 5.0 及 Oligo 6.0 设计扩增 GVB *cp* 基因全长的引物:B8A-Bam(5'-CAGGATCCTACG-AGACAATAAGCAAGC-3'), B8B-Sac(5'-CCGA-GCTCCACCCAAATACTTAGACATAC-3'),上下游引物 5'端分别添加 Bam H I 和 Sac I 酶切位点。参照任芳等<sup>[19]</sup>的方法,从实验室保存的 GVB 毒源烟草组培苗中 RT-PCR 扩增 *cp* 基因,连接到 pMD 19-T 载体,转化 DH5 $\alpha$  感受态,PCR 筛选阳性克隆(pMD-GVB CP)并进行测序和酶切验证。采用 DNASTar 7.0 和 MEGA 7.0.14 软件进行序列分析和比对。多序列比较采用 DNASTar Clustal V 方法。

### 1.4 植物表达载体的构建及转化农杆菌

植物表达载体构建流程见图 1,利用限制性内切酶 BamH I 和 Sac I 分别对 pMD-GVB CP 质粒和 pRI 101-AN 载体双酶切,胶回收目的基因片段和线性化载体大片段,T4 DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,PCR 筛选阳性克隆(pRI-GVB CP)并进行测序和酶切验证。提取 pRI-GVB CP 质粒 DNA,利用美国 BIO-RAD 公司 Gene Pulser Xcell™ 电穿孔系统电击转化农杆菌 LBA4404 感受态。转化步骤:取 20  $\mu$ L 感受态细胞置于冰上融化,加入 2  $\mu$ L 质粒 DNA;将混合液加入冰中预冷的 BIO-RAD 电极间距 0.1 cm 的电击杯内,2 400 V 电击 2 次;迅速置于冰上冷却,然后加入 1 mL SOC 培养基,30℃ 120 r/min 振荡培养 1 h;取适量菌液涂布于含卡那霉素(Km)100 mg/L 和链霉素(Sm)100 mg/L 的 LB 培养基,30℃ 培养 48 h,挑斑培养,菌液 PCR 鉴定筛选阳性克隆。

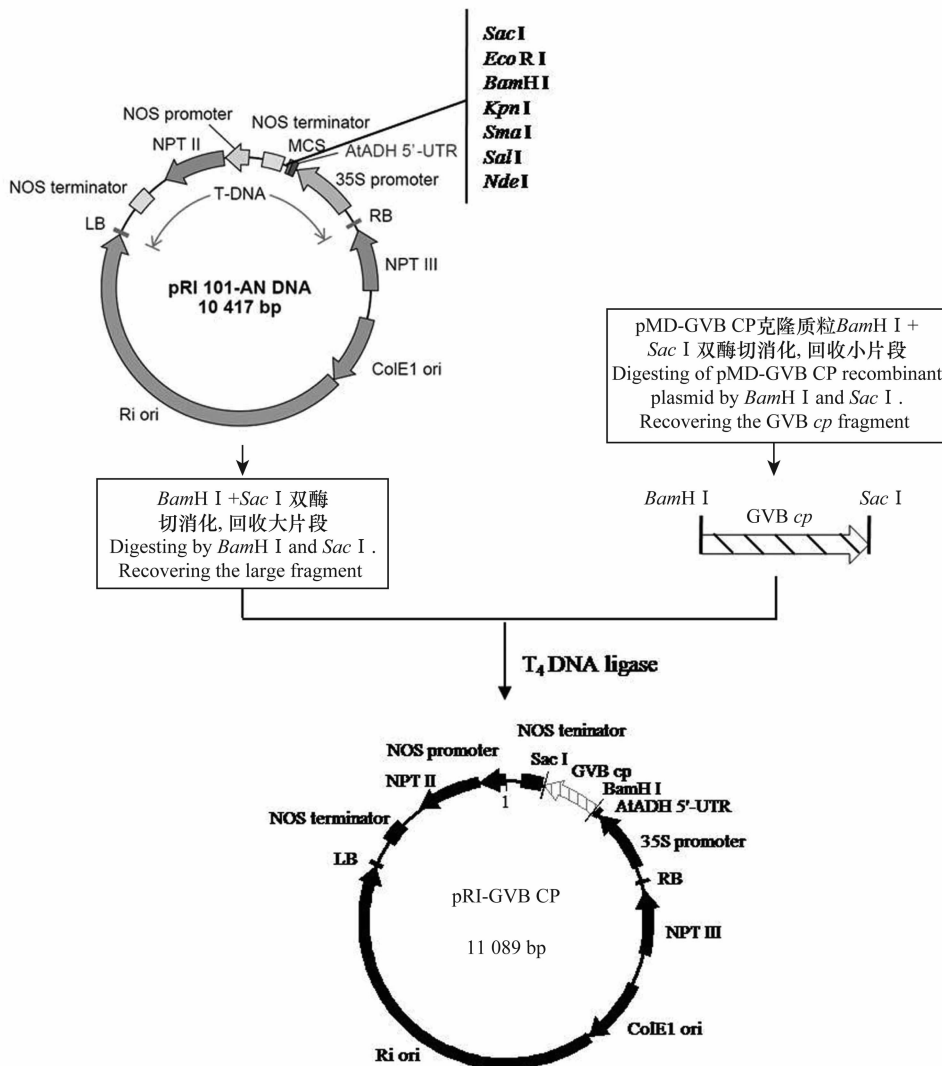


图 1 植物表达载体 pRI-GVB CP 构建流程

Fig. 1 Construction of plant expression vector pRI-GVB CP

### 1.5 烟草遗传转化及再生植株培育

参照任芳等<sup>[15]</sup>的叶盘法进行烟草遗传转化, 将含重组质粒 pRI-GVB CP 的农杆菌菌液振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时低速离心收集沉淀, 沉淀用 MS 液体培养基重悬作为侵染源。将烟草无菌组培苗叶片剪成 0.5~1.0 cm<sup>2</sup> 的小块, 在上述菌悬液中浸泡 10 min, 无菌滤纸吸干多余菌液, 接种于分化培养基 (MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 100 μmol/L 乙酰丁香酮) 上 27℃ 暗培养 3 d, 然后转至含 Km 和 Cef 的选择培养基 (MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 50 mg/L Km + 250 mg/L Cef) 于 (25 ± 2)℃、L//D=16 h//8 h 条件下培养, 每月继代培养 1 次, 诱导产生抗性芽, 待不定芽长至 1~2 cm 时将其切下转到生根培养基 (1/2MS + 0.5 mg/L IBA +

25 mg/L Km + 150 mg/L Cef) 诱导生根直至获得完整再生植株。

### 1.6 转基因植株 PCR 检测

取再生植株叶片采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 提取步骤参照北京艾德莱生物科技有限公司 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书, 采用引物 B8A-Bam/B8B-Sac 对 DNA 模板进行 PCR 检测, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。收集阳性 T<sub>0</sub> 代植株种子播种, 培育 T<sub>1</sub> 代植株, 同样采用引物 B8A-Bam/B8B-Sac 进行 PCR 检测鉴定阳性植株。

### 1.7 转基因植株抗病性初步鉴定

在转基因 T<sub>1</sub> 代阳性植株 6 叶期左右, 取感染 GVB 的试管苗毒源摩擦接种转基因烟草, 同时接种

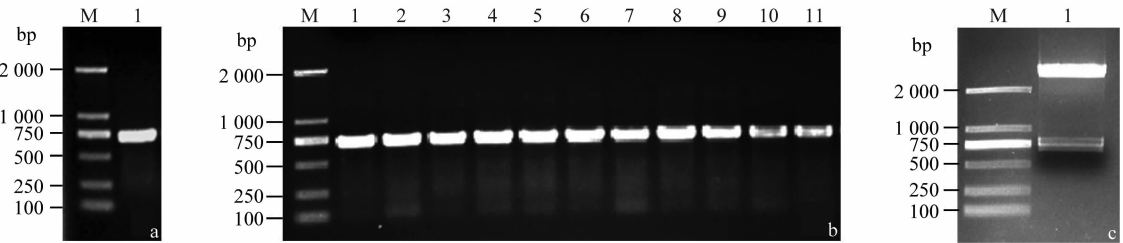
非转基因烟草为对照,观察转基因植株及对照植株症状表现,在接种后 15 d 和 30 d 分别采集植株叶片提取总 RNA,采用引物 GVBh/GVBc (GVBh: 5'-ATCAGCAAACACGCTTGAACCG-3', GVBc: 5'-GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC-3') 进行 RT-PCR 检测确定植株中带毒情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 GVB cp 基因的克隆

引物 B8A-Bam/ B8B-Sac 从实验室保存的毒源烟草中均扩增到约 704 bp 的目的片段(图 2a)。克隆产物菌液 PCR 鉴定(图 2b)和 Bam H I 和 Sac I

双酶切鉴定(图 2c)表明成功获得阳性克隆 pMD-GVB CP。阳性克隆经测序共获得 11 个 GVB cp 序列,包含完整 GVB cp 基因(594 bp)及两端引物和酶切位点序列。这些 cp 基因克隆序列相似性达 98.8%~100%,与 GenBank 登录的 GVB cp 序列核苷酸相似性为 77.9%~98.8%,其中与登录号 X75448 分离物相似性最高,达 97.5%~98.5%,在进化树上也聚在一个分支。本研究所获得的 11 个克隆序列中仅有 2 个克隆序列共 3 个氨基酸差异,其余 9 个克隆均没有氨基酸突变,并且其中有 6 个克隆氨基酸和核苷酸序列均完全一致,表明这些序列为优势序列,选取其中的克隆 99-1 作为载体构建的目的片段。



M: D2000; a: GVB cp 基因 PCR 扩增产物; b: 1~11 分别为重组质粒 pMD-GVB CP 1-11 号克隆 PCR 产物; c: 重组质粒 pMD-GVB CP 酶切产物  
M: D2000; a: PCR product of GVB cp gene; b: 1-11 are PCR products of pMD-GVB CP recombinant plasmid, respectively; c: Restriction enzyme digestion of pMD-GVB CP recombinant plasmid

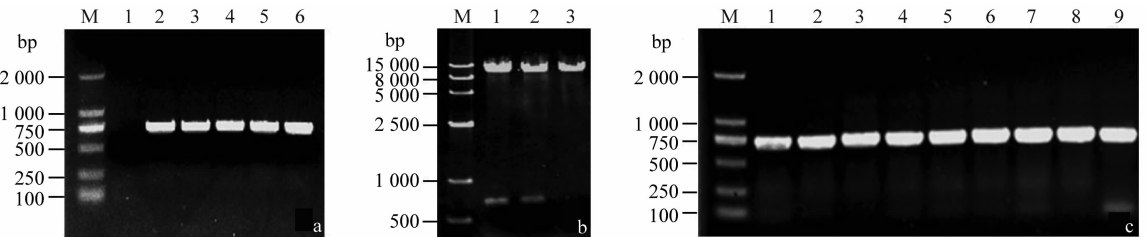
图 2 GVB cp 基因克隆

Fig. 2 Cloning of GVB cp gene

### 2.2 植物表达载体 pRI-GVB CP 构建及转化农杆菌

用 BamH I 和 Sac I 分别对克隆质粒 pMD-GVB CP 和载体 pRI 101-AN 进行双酶切、回收和转化 DH5 $\alpha$ , 克隆产物 PCR 扩增除 1 个克隆未扩增到目的条带外其余克隆均获得目的条带(图 3a)。阳性克隆质粒 DNA 双酶切鉴定获得两条条带,其中

小片段为 cp 基因,大片段为切下的载体片段(图 3b)。阳性克隆测序结果显示未发生碱基突变,表明植物表达载体 pRI-GVB CP 构建成功。将植物表达载体 pRI-GVB CP 质粒 DNA 电击转化农杆菌 LBA4404, 克隆产物 PCR 扩增获得约 704 bp 的目的条带,表明载体成功转入农杆菌(图 3c)。



a: pRI-GVB CP 质粒转化 DH5 $\alpha$  克隆产物 PCR 鉴定。M: D2000; 1~6: 1~6 号克隆; b: pRI-GVB CP 质粒酶切产物。M: DNA Marker; 1~2: pRI-GVB CP 质粒酶切产物; 3: pRI 101-AN 载体酶切产物; c: pRI-GVB CP 质粒转化 LBA4404 克隆产物 PCR 鉴定。M: D2000; 1~9: 1~9 号克隆  
a: PCR detection of pRI-GVB CP recombinant plasmid in DH5 $\alpha$ . M: D2000; 1-6: PCR products of 6 clones; b: Restriction enzyme digestion of pRI-GVB CP recombinant plasmid. M: Wide-range DNA Marker; 1-2: Digested products of pRI-GVB CP recombinant plasmid; 3: Digested product of pRI 101-AN vector; c: PCR detection of pRI-GVB CP recombinant plasmid in LBA4404. M: D2000; 1-9: PCR products of 9 clones

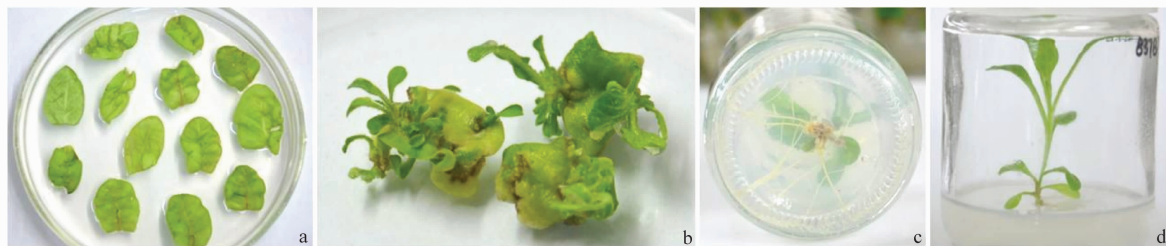
图 3 植物表达载体 pRI-GVB CP 构建及检测鉴定

Fig. 3 Construction and detection of plant expression vector pRI-GVB CP

### 2.3 烟草遗传转化及再生植株培育

含植物表达载体 pRI-GVB CP 的农杆菌共浸润烟草叶盘(图 4a),暗培养 3 d 后转入含 Km 和 Cef 的选择培养基上诱导培养,约 4 周后开始产生抗性

不定芽(图 4b)。待不定芽长至 1~2 cm 时切下不定芽转到生根培养基上诱导生根(图 4c),成功获得完整再生植株(图 4d)。在 Km 和 Cef 筛选下共获得再生烟草 16 株。



a: 农杆菌介导的叶盘转化; b: 抗性不定芽; c: 诱导生根; d: 再生植株  
a: Leaf discs of tobacco transformed by *Agrobacterium*; b: Resistant adventitious bud; c: Root induction; d: Regenerated plant

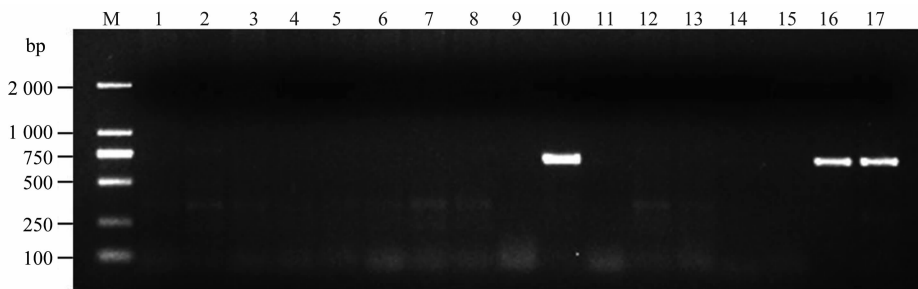
图 4 pRI-GVB CP 遗传转化烟草

Fig. 4 Genetic transformation of pRI-GVB CP into tobacco

## 2.4 转基因烟草的 PCR 鉴定

采用引物 B8A-Bam/ B8B-Sac 对 16 株再生烟草植株的 PCR 鉴定结果表明,其中有 3 株扩增到约 704 bp 的目的条带,阴性对照和其余植株未扩增到目

的条带(图 5)。收集阳性  $T_0$  代植株种子播种,对 3 个阳性株系共 64 株  $T_1$  代植株进行 PCR 检测,其中 30 株扩增到目的条带,阳性率 46.9%,表明目的基因 GVB *cp* 基因成功导入烟草并可成功遗传到子代植株。



M: DL2000; 1: 非转基因对照; 2~17: 转基因植株  
M: DL2000; 1: Non-transgenic plant; 2~17: Transgenic regenerated plant

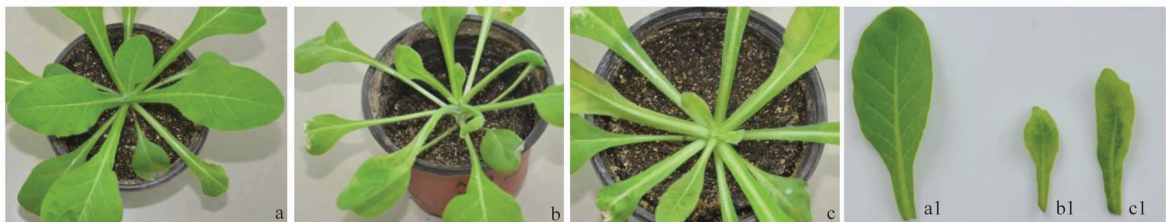
图 5 转基因烟草 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of transgenic tobacco plants

## 2.5 转基因烟草抗病性初步鉴定

在转基因  $T_1$  代阳性植株 6 叶期左右接种 GVB 毒源,共接种 28 株,同时接种 10 株非转基因烟草为对照。接种后 15 d,所有非转基因植株新叶均出现褪绿、黄化、皱缩畸形及叶片变小等症状,接种的转基因  $T_1$  代阳性植株中有 22 株出现与非转基因对照相似的症状,另外有 6 株未观察到明显症状(图 6)。分别提取转基因  $T_1$  代接种后无症状植株(6 株)、转基因  $T_1$  代接种发病植株(4 株)、非转基因接种发病植株(4 株)

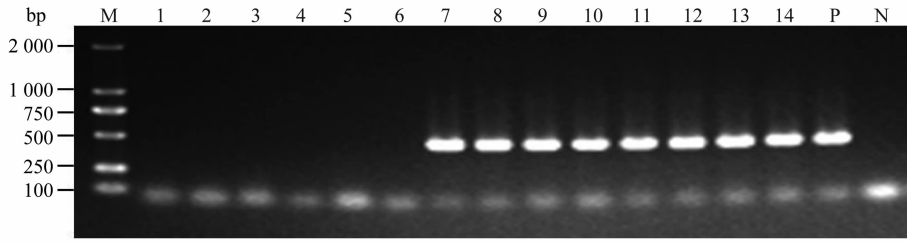
及非转基因未接种健康植株(2 株)总 RNA,采用引物 GVBh/GVBc 进行 RT-PCR 检测。结果表明,转基因  $T_1$  代接种发病植株和非转基因接种发病植株中均扩增到 GVB 目的条带,转基因  $T_1$  代接种后无症状植株及非转基因未接种健康植株中均未扩增到 GVB 目的条带(图 7)。接种后 30 d 再次采集相同植株叶片,RT-PCR 检测 GVB 带毒情况与接种 15 d 结果一致。因此,接种及检测表明无症状的 6 株转基因  $T_1$  代植株中未被 GVB 侵染,初步表明其对 GVB 具有一定的抗性。



a, a1:  $T_1$  代转基因烟草接种后无症状植株及叶片; b, b1:  $T_1$  代转基因烟草接种后发病植株及叶片; c, c1: 非转基因烟草接种后发病植株及叶片  
a, a1: Plant and leaves of the  $T_1$  transgenic tobacco without symptom; b, b1: Plant and leaves of the  $T_1$  transgenic tobacco with symptom; c, c1: Plant and leaves of the non-transgenic tobacco with symptom

图 6 转基因烟草对 GVB 的抗病性鉴定

Fig. 6 Resistance of transgenic tobacco plants to GVB



M: DL2000; 1-6: T<sub>1</sub>代转基因烟草接种后无症状植株; 7-10: T<sub>1</sub>代转基因烟草接种后发病植株; 11-14: 非转基因烟草接种后发病植株; P: GVB接种毒源阳性对照; N: 健康植株阴性对照  
M: DL2000; 1-6: T<sub>1</sub> transgenic plant without symptom; 7-10: T<sub>1</sub> transgenic plant with symptom; 11-14: Non-transgenic plant with symptom; P: Positive control; N: Negative control

图7 GVB接种植株的PCR鉴定

Fig. 7 PCR identification of plants inoculated with GVB

### 3 讨论

葡萄为多年生木本植物,生长周期长且再生困难,近年来与大田作物相比葡萄抗病毒基因工程进展相对缓慢。由于在葡萄上进行转基因植株培育、抗性评价等周期长、难度大,因此多项研究选择烟草等模式植物进行转基因植株培育和抗性评价<sup>[16-18,20]</sup>。已有研究获得导入 GVA *cp*、GFLV *mp*、GLRaV-2 *cp* 等葡萄病毒基因的转基因烟草,通过病毒接种及症状表现发现它们对同源病毒普遍具有抗性,抗性表现分为抗病(植株在整个试验期间均无症状)或耐病(植株发病延迟或症状减弱)等类型<sup>[16-18]</sup>。本实验室此前获得的酵母 *pac1* 转基因烟草部分株系经病毒摩擦接种后也表现出症状延迟和减弱等耐病性,但仍可在植株体内检测到病毒存在,表明不能完全抵抗病毒感染<sup>[15]</sup>。本研究成功构建了 GVB *cp* 基因植物表达载体,通过农杆菌介导的遗传转化成功导入烟草获得转基因植株。但目前转化效率较低,阳性率仅为 18%,可能与载体及菌株类型、受体材料状态及培养条件等原因有关。阳性株系播种获得的 T<sub>1</sub> 代植株中,阳性率达 46.9%,表明目的基因可成功遗传子代,且通过 T<sub>1</sub> 代植株接种病毒进行抗病性鉴定表明,其中有 6 株对接种病毒 GVB 具有抗性,表明该转基因策略可成功获得抗性植株。在今后试验中将通过增加抗生素浓度及继代培养次数等途径提高转化率,并进行转基因植株扩繁培育以及葡萄遗传转化研究,为培育抗病毒植株、开展葡萄抗病毒分子辅助育种提供一定基础。

### 参考文献

[1] 周艳. 我国水果生产状况分析[J]. 南方农业, 2015, 9(30):

146 - 148.  
[2] MARTELLI G P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents [J]. Journal of Plant Pathology, 2014, 96 (S1): 1 - 136.  
[3] MARTELLI G P. Rugose wood complex [M]// MARTELLI G P. Graft-transmissible diseases of grapevines; Handbook for detection and diagnosis. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993: 45 - 54.  
[4] BOSCIA D, SAVINO V, MINAFRA A, et al. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark [J]. Archives of Virology, 1993, 130: 109 - 120.  
[5] BOSCIA D, MINAFRA A, MARTELLI G P. Filamentous viruses of the grapevine; putative trichoviruses and capilloviruses [C]// MONETTE P L. Filamentous viruses of woody plants. Trivandrum, India, Research Signpost, 1997: 19 - 28.  
[6] GOSZCZYNSKI D E. Divergent molecular variants of *Grapevine virus B* (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines [J]. Virus Genes, 2010, 41: 273 - 281.  
[7] MOSKOVITZ Y, GOSZCZYNSKI D E, BIR L, et al. Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of *Grapevine virus B* and its infectivity on herbaceous plants [J]. Archives of Virology, 2008, 153: 323 - 328.  
[8] KUMAR S, SINGH L, FERRETTI L, et al. Evidence of *Grapevine leafroll associated virus-1-3*, *Grapevine fleck virus* and *Grapevine virus B* occurring in Himachal Pradesh, India [J]. Indian Journal of Virology, 2013, 24(1): 66 - 69.  
[9] HU G J, DONG Y F, ZHANG Z P, et al. Detection and sequence analysis of *Grapevine virus B* isolates from China [J]. Acta Virologica, 2014, 58: 180 - 184.  
[10] VALAT L, FUCHS M, BURRUS M. Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of *Grapevine fanleaf virus*: characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation [J]. Plant Science, 2006, 170(4): 739 - 747.



2.35%、1.83%、1.82%、1.66%、0.57%和0.41%。由此可见,油菜菌核病以绝对优势占据榜首,成为影响油菜安全生产的最大威胁;油菜蚜虫成为仅次于油菜菌核病的第二大威胁;油菜根肿病面积不大,植保统计尚未涉及,但该病害类似于油菜田的顽疾,一旦发病,数十年将无法耕种,且近年来在长江中下游地区有扩展蔓延趋势。

### 3.3 新形势下,加强监测预警在油菜安全生产中的作用

根据农业部农药零增长行动规划和以绿色发展理念引领种植业转型升级的总要求,新形势下保障油菜产量和品质,抵御病虫害的威胁,一个重要的方面是要加强监测预警。以油菜生产中造成危害损失最严重的菌核病为例,油菜菌核病后期的发病程度与花瓣核盘菌侵染率密切相关<sup>[16]</sup>,通过监测掌握田间油菜花瓣侵染情况,才能确定适宜的防治时期,有研究表明,关键期喷药一次,茎部病害株率防效可达82.69%<sup>[17]</sup>。因此应加强监测预警技术研究,完善测报体系队伍建设,做好长、中、短期的油菜病虫害发生趋势预测,提前制定科学合理的防控预警方案,遇到重大病虫害暴发危害,有能力控制其暴发流行趋势,减轻危害损失,保障油菜丰收和油菜产业安全。

### 参考文献

[1] 殷艳,陈兆波,余健康,等.我国油菜生产潜力分析[J].中国农业科技导报,2010,12(3):16-21.  
 [2] 农业部发展计划司.新一轮优势农产品区域布局规划汇编[M].北京:中国农业出版社,2009:86-89.

[3] 李春广,汤金仪.植物保护统计技术与方法[M].北京:中国农业科学技术出版社,2013:102-114.  
 [4] 杨正茜.油菜根肿病发生动态与危害及其防治技术研究[D].武汉:华中农业大学,2014.  
 [5] REN Li, JIA Jianguang, LI Ming, et al. Distribution of rapeseed clubroot disease in Hubei Province and evaluation of yield loss [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(4):775-777.  
 [6] 殷艳,廖星,余波,等.我国油菜生产区域布局演变和成因分析[J].中国油料作物学报,2010,32(1):147-151.  
 [7] 王璐.中国油菜产业安全研究[D].武汉:华中农业大学,2014.  
 [8] 王汉中.我国油菜产需形势分析及产业发展对策[J].中国油料作物学报,2007,29(1):101-105.  
 [9] 康育光,韩巨才,刘慧平,等.核盘菌对几种杀菌剂的敏感性研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2006,26(1):19-21.  
 [10] 李慧,文李,刘凯,等.油菜抗菌核病机制研究进展[J].作物研究,2015,29(1):84-89.  
 [11] 刘爱芝,韩松,张书芬,等.吡虫啉及其复配剂不同施药方法对油菜蚜虫控制效果[J].植物保护,2010,36(3):162-165.  
 [12] 李德友,何永福,陆德清,等.油菜蚜虫发生危害规律及防控技术[J].西南农业学报,2010,23(5):1757-1759.  
 [13] 符明联,侯树敏,朱炫,等.油菜蚜虫防控技术研究[J].安徽农业科学,2011,39(9):5287-5289.  
 [14] 李荣峰,徐秉良,梁巧兰,等.甘肃省白菜型冬油菜霜霉病发生规律[J].中国油料作物学报,2012,34(4):413-418.  
 [15] 王伟,方小平.油菜霜霉病原菌生物学特性及发病条件的研究[C]//陈万权.病虫害绿色防控与农产品质量安全—中国植物保护学会2015年学术年会论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2015.  
 [16] 侯树敏, MALGORZATA J, 李强生,等.利用油菜花瓣实验检测油菜菌核病[J].中国农学通报,2009,25(17):203-205.  
 [17] 孙俊铭,韦刚,张启高,等.油菜菌核病防治药剂筛选试验报告[J].安徽农学通报,2007,13(7):80-81.

(责任编辑:田喆)

(上接16页)

[11] GAMBINO G, PERRONE I, CARRA A, et al. Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation [J]. Transgenic Research, 2010, 19(1): 17-27.  
 [12] 田莉莉,牛良.葡萄抗病毒双价 RNAi 植物表达载体构建及其对烟草的遗传转化[J].果树学报,2012,29(6):997-1003.  
 [13] 田莉莉,牛良.葡萄广谱抗病毒 RNAi 载体构建及对合子胚起源的体细胞胚的遗传转化[J].分子植物育种,2016,14(1):72-79.  
 [14] 郭佩佩,伍辉军,高学文.大豆凝集素基因 *lec-s* 转化烟草增强对烟草花叶病毒的抗性[J].植物病理学报,2013,43(2):157-165.  
 [15] 任芳,董雅凤,张尊平,等.酵母 *pac1* 基因介导对葡萄 B 病毒的抗性[J].植物保护学报,2015,42(4):538-543.  
 [16] RADIAN-SADE S, PERL A, EDELBAUM O, et al. Transgenic *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants transformed

with *Grapevine virus A* (GVA) sequences [J]. Phytoparasitica, 2000, 28(1): 79-96.  
 [17] LING Kaishu, ZHU Haiying, GONSALVES D. Resistance to *Grapevine leafroll associated virus-2* is conferred by post-transcriptional gene silencing in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. Transgenic Research, 2008, 17(4): 733-740.  
 [18] JARDAK-JAMOUSI R, WINTERHAGEN P, BOUAMAMA B, et al. Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2009, 97(2):187-196.  
 [19] 任芳,范旭东,董雅凤,等.葡萄 A 病毒外壳蛋白基因克隆及分子变异分析[J].分子植物育种,2012,10(5):568-574.  
 [20] 任芳,董雅凤,张尊平,等.葡萄抗病毒转基因研究进展[J].园艺学报,2013,40(9):1633-1644.

(责任编辑:田喆)