

MDMV CP 基因的克隆及其转基因玉米的研究

Isolation of the Capsid Protein Gene of Maize Dwarf Mosaic Virus and its Transformation in Maize

刘小红^{1,2}, 张红伟¹, 刘 昕^{1,①}, 刘欣洁¹, 谭振波^{1*}, 荣廷昭²

LIU Xiao-Hong^{1,2}, ZHANG Hong-Wei¹, LIU Xin^{1,①}, LIU Xin-Jie¹, TAN Zhen-Bo^{1*} and RONG Ting-Zhao²

1. 北京农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100089

2. 四川农业大学玉米研究所, 雅安 625014

1. Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China

2. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

摘 要 用 RT-PCR 方法分离了玉米矮花叶病毒外壳蛋白基因(MDMV CP), 并且利用基因枪法将该基因导入玉米优良自交系 18-599 红、18-599 白幼胚诱导的愈伤组织中。转化的愈伤组织在 Bialaphos 浓度(PPT)为 8mg/L、10mg/L、5mg/L 的筛选压下经过 3 次抗性筛选后, 分别再生出可育植株 12 株和 6 株。PCR 和 Southern 检测结果说明 CP 基因已整合到玉米自交系基因组中。对 T1 代转基因植株进行病毒人工接种试验, 结果表明对照植株全部表现为感染玉米矮花叶病的典型症状, 而转基因植株后代呈现不同程度的抗性。

关键词 玉米矮花叶病毒, 外壳蛋白, 遗传转化, 人工接种

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0144-05

Abstract The MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus, MDMV) CP (Coat Protein, CP) gene was cloned by RT-PCR method and introduced into the embryonic calli derived from immature embryos of elite inbred 18-599hong and 18-599bai via particle bombardment. Bombarded calli were selected on selection medium containing 5 ~ 10 mg/L (PPT) Bialaphos. From resistant calli, 79 plantlets were regenerated. 18 of 79 were grown and harvested. The results of Southern blotting and PCR analysis demonstrated that MDMV CP have been integrated into the genome of the transgenic plants. PCR-positive progeny plants were artificially inoculated with MDMV strain B, and the average chlorosis of the functional leaves of each plant was investigated. The typical symptoms were observed from the leaves of the control inbreds, while, the presence of the MDMV CP gene provided resistance to inoculation with MDMV strain B.

Key words MDMV, coat protein, genetic transformation, artificial inoculation

玉米矮花叶病是世界上玉米产区普遍发生的玉米病毒性病害。A、B 和 KS1 株系是影响美国、欧洲玉米生产的主要病毒株系, 而在我国玉米产区造成危害的主要是 B 株系。在

玉米矮花叶病的防治中, 抗病品种的培育是防治 MDMV 病害发生的有效途径。在玉米对矮花叶病毒的抗性遗传研究方面, 许多结果表明玉米对矮花叶病毒的抗性是由多基因控

Received: June 7, 2004; Accepted: August 16, 2004.

This work was supported by Beijing Hi-tech Foundation (No. 953850100).

① Present address: Institute of Genetics and Developmental Biology.

* Corresponding author. Tel: 86-10-51503668; E-mail: znbotan@public3.bta.net.cn

北京市高技术室基金项目(No. 953850100)资助。

制的,这已为基因或 QTL 定位的研究结果所证实^[1,2]。玉米对矮花叶病抗性的遗传基础较为复杂,这给利用玉米对矮花叶病的抗性基因来培育抗病品种带来了一定的难度。另一方面,病毒基因组研究所取得的成果使病毒基因工程技术成为培育抗病毒农作物品种的有效方法^[3-7]。病毒外壳蛋白基因(Coat Protein, CP)在植物抗病毒基因工程中研究较早,1986年 Powell-Albel 等首次报道了抗马铃薯 Y 病毒科的 TMV(Tobacco Mosaic Virus)的转外壳蛋白基因的烟草。此后,在水稻、玉米、苜蓿、番茄和马铃薯等许多作物上进行了研究,结果表明外壳蛋白基因介导抗性对许多病毒都是有效的。我国关于玉米矮花叶病毒外壳蛋白基因的克隆及其在 *E. coli* 表达的研究始于 1995 年,最近全基因组测序的工作也已完成。本文报道我们在建立优良骨干自交系玉米幼胚再生体系的基础上进行转 MDMV CP 基因玉米研究的初步结果。

1 材料与方法

1.1 玉米材料和培养基

玉米优良自交系 18-599 红、18-599 白由四川农业大学玉米研究所提供。玉米愈伤组织的诱导、筛选及分化等所用到的培养基配方见文献^[11,12]。

1.2 MDMV CP 基因的克隆、测序及其序列分析

用 TE3D 法提取感染玉米矮花叶病的玉米叶片总 RNA,根据 GenBank 有关序列设计引物:

上游引物:5' AA[g/A]gC[C/T/A]ATgTC[g/T/A]AAgAA[A/g]ATgCg 3';

下游引物:5' TCTCT[T/C]ACCA[C/A]gA[g/A]ACTCgC 3'。

用试剂盒 SuperSCRIPT one-step RT-PCR System (GIBCO-BRL)进行 RT-PCR 扩增,RT-PCR 扩增产物在 1% agarose 凝胶中电泳后回收并克隆到 pGEM-T(Promega)载体上,DNA 测序由上海生工(Sangon)完成,使用 GenBank 中的 BLAST 对序列同源性进行搜索。

1.3 MDMV CP 基因表达载体的构建

构建 MDMV CP 基因的原始质粒是由我实验室保存的 35SIH3X(含 Bar 基因)和 PBPC47P(含胚乳特异表达启动子)(图 1 和图 2)。将分离的 MDMV CP 基因置于 35S 启动子下构建用于基因枪法转化的表达载体,以 Bar 为标记基因。

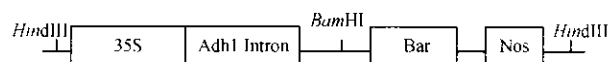


图 1 质粒 35SIH3X 的物理图谱

Fig. 1 Physical map of plasmid 35SIH3X

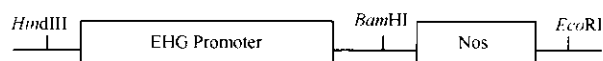


图 2 质粒 PBPC47P 的物理图谱

Fig. 2 Physical map of plasmid PBPC47P

1.4 玉米幼胚培养、转基因植株的获得与分子鉴定

取授粉后 10~12d 的玉米果穗,去苞叶后在 70% 酒精中

浸泡 5min,取出后用刀片削去种皮,取出幼胚后接种于诱导培养基上进行愈伤组织的诱导。在转化之前,按 Vain 等(1993)报道的方法对玉米愈伤组织进行高渗处理^[8]。并按照 Wan 等(1995)报道的基因枪法进行转化工作^[9],所用基因枪为 PDS-1000/He (Bio-Rad),金粉颗粒直径为 1μm,选用耐受爆裂压力为 1100psi(7.58 MPa)的可裂圆片作为表达载体支持膜,基因枪真空度调为 28 inches of Hg(9.83kPa),射程选择 70mm。轰击后的愈伤组织在恢复培养 7d 后转至附加 8、10、5mg/L (PPT) Bialaphos 的选择培养基上继代筛选 3 轮,每轮 3 周。在每次继代时,选择色泽正常、生长良好的愈伤组织进行筛选培养。将抗性愈伤组织转移至分化培养基,分化苗长出主茎后将其移至生根壮苗培养基上;待幼苗长出 2 片新叶、3~4 条主根后,移至装有营养土(2/3 蛭石 + 1/3 腐殖质)的小花盆中;当幼苗在小花盆中又长出 1~2 片新叶时,带土移栽到大田中。对大田移栽成活的转基因 T0 代再生植株进行 PCR 检测,呈阳性的植株后代进一步进行 Southern 杂交分析。

用 CTAB 法提取对照自交系和转基因玉米叶片的总 DNA,用于 PCR 扩增和 Southern 杂交分析。设计的 PCR 引物,可特异扩增出 920bp 的目标序列。上游引物为:5' AT-GTCGAAGAAGATGCGCTG 3';下游引物为:5' TCACCAC-GAGACTCGCAGCAC 3'。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4min;94℃ 1min,55℃ 30s,72℃ 1min,循环 30 次;72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。PCR 扩增的产物在 1.0% Agarose 凝胶上电泳,在紫外光下进行检测。

以 CP 基因片段作为探针进行分子杂交,从玉米叶片提取的总 DNA 经 HindIII 酶切后,按 McCouch(1988)的方法进行 Southern 印迹及分子杂交^[10],以检测 T-DNA 插入的拷贝数。

1.5 T1 代转基因玉米对矮花叶病毒的抗性鉴定

病毒提取方法:将感染 MDMV-B 的病叶去掉中脉,用 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0)研磨提取,提取体积比 1:10(汁液:缓冲液),用双层纱布过滤后装入三角瓶中。

病毒接种:采用汁液摩擦接种法,用脱脂棉签蘸取配制好的病毒液并涂上 600 目的金刚砂,在玉米 10 叶期,轻轻摩擦心叶 2~3 遍,待一周后对所有植株再接一次,15 d 后调查发病情况,方法如下:

病情调查:对 18-599 红 20 株植株以及 T1 代转基因植株进行接种,调查棒五叶的感病情况,按叶绿素的褪绿程度进行分级,其标准如下:

0 级:叶片无症状发生;

1 级:叶片略微褪绿,有褪绿点线;

2 级:褪绿,出现稳定的黄绿相间条纹;

3 级:严重褪绿,叶片褪绿面积较大,条纹连片;

4 级:叶片变黄或紫红色。

叶片危害度计算:

穗五叶叶片危害度 $I = \Sigma(\text{叶片叶绿素破坏程度的级别} \times \text{该级叶片数}) / 5(\text{总叶片数})$

2 结果与分析

2.1 MDMV CP 基因的克隆

用 TE3D 法提取田间自然发生的矮花叶病典型症状的玉米植株叶片的总 RNA。根据设计的引物,通过 RT-PCR 扩增,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3 所示。扩增片段的特异性强,没有出现非特异带,大小在 1kb 左右,与 GenBank 中收录的目的序列大小相符。

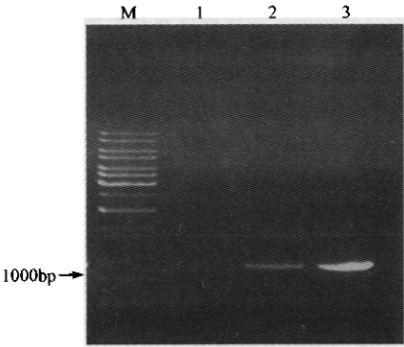


图 3 RT-PCR 扩增产物的电泳

Fig. 3 Isolation of MDMV CP gene by RT-PCR

M: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder marker; 1: no amplification product from healthy young leaves of maize plants; 2,3: amplification products from young leaves of maize plants infected naturally in fields.

回收所扩增的特异片段,并克隆到 T-Vector。DNA 测序结果表明该片段的大小为 920bp,已收录在 GenBank 中(GenBank accession number: AF540989)。该序列包含 CP 基因的部分序列(666 bp)和 3'末端的非编码区序列。我们所克隆的 MDMV CP 与 MDMV-KS1 株系(A34978)、MDMV-A 株系(A34974)、MDMV-B 株系(A34976)及我国的 MDMV-B 株系(S77088)的同源性进行比较,DNA 序列的同源性分别为 56.0%、73.0%、89.0%、98.0%;编码外壳蛋白的氨基酸序列的同源性分别为 57.0%、88.0%、85.0%、100.0%;3'非编码区序列的同源性分别为 37.0%、53.0%、86.0%、98.0%。由此推测克隆的 cDNA 片段是来源于玉米矮花叶病毒 B 株系。

2.2 MDMV CP 基因表达载体的构建

在质粒 PBPC47P 中,利用 HindⅢ 和 BamHⅠ 两个限制性内切酶切下胚乳特异表达启动子,换上用同样两个限制性内切酶从 35SIH3X 上切下的 35S 启动子。在设计扩增 CP 基因的引物时,引物两端加上 BamHⅠ 酶切位点。利用 PBPC47P 上的 BamHⅠ 位点连上 CP 基因,使其置于 35S 启动子下,最后用 HindⅢ 从 35SIH3X 上切下 Bar 基因表达盒,连到 PBPC47P 的 HindⅢ 位点,构建成用于基因枪转化的表达载体 pMCB01-3(见图 4)。

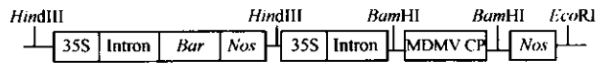


图 4 质粒 pMCB01-3

Fig. 4 Physical map of plasmid pMCB01-3

2.3 基因枪转化及转基因植株的获得

在建立玉米优良自交系 18-599 红、18-599 白高效再生体系的基础上^[11],利用基因枪法将 MDMV CP 基因导入玉米幼胚诱导的愈伤组织中,经选择培养和植株再生,将经过炼苗后存活的 79 株转化再生苗移栽于大田,有 18 株成活并收获自交结实的种子,其中 18-599 红 12 株,18-599 白 6 株(表 1)

表 1 抗性愈伤组织及植株再生

Table 1 Resistant callus and its plant regeneration

Inbred	No. of plates bombarded	No. of resistant callus	No. of plants regenerated	No. of plants before transplant	No. of plants harvested
18-599 hong	15	320	206	45	12
18-599 bai	10	295	180	34	6

2.4 转基因植株的分子鉴定

对田间存活的 18 株再生苗,提取基因组总 DNA 作 PCR 检测,检测结果表明 18-599 红和 18-599 白分别有 10 株和 3 株呈阳性^[12]。在 PCR 检测呈阳性的植株中,选了 7 株进一步作 Southern 分析。玉米叶片总 DNA 经 HindⅢ 酶切后转膜,以 CP 基因作为探针进行 Southern 分析。由于 CP 基因中没有 HindⅢ 酶切位点,随着转化植株中 CP 基因插入的位置不同或者多拷贝串联整合,其 HindⅢ 酶切长度也相应发生变化,自显影结果也就反映出这种差异。从 Southern 杂交的结果来看,这些转基因植株中分别携带有 1~4 个拷贝(图 5)。

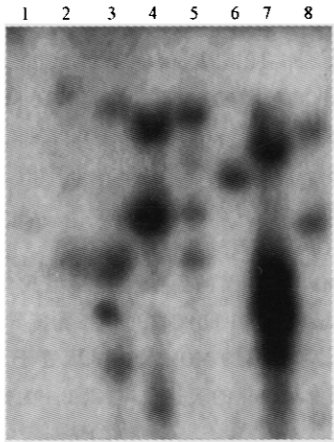


图 5 T0 代转基因株系的 Southern 分析

Fig. 5 Southern hybridization for T0 transgenic plants

1: 18-599hong; 2~8: T0 transgenic plants.

2.5 转 MDMV CP 基因玉米对矮花叶病毒的抗性鉴定

收获 13 个 PCR 检测呈阳性植株的种子,T1 代种成 13 个穗行,连同对照 18-599 红一起进行病毒接种抗病性鉴定。在 13 个 T0 代转基因株系中,T0 代转基因植株 CP7 收获了 20 多粒种子,对这些后代植株的抗病结果列于表 2。鉴定结果显示 T1 代转基因植株间叶片危害程度表现明显的差异,其

中有 4 个植株没有出现明显的症状。而对照植株叶片危害度为 1~3,并且表现出典型的玉米矮花叶病症状,即接种后叶片开始形成黄绿相间的条纹花叶状,十五天后慢慢扩展至上下其它叶,部分叶片会从叶尖或叶缘开始褐化,并慢慢枯

萎。尽管进行抗病性鉴定的群体较小,但这一鉴定结果表明玉米矮花叶病的危害程度在 MDMV CP 转基因后代植株间存在明显的差异,这可能是由 T0 代转基因植株在种植 T1 代时 CP 基因的分离造成的。

表 2 MDMV B 株系对自交系 18-599 红及 T1 转基因植株的危害程度
Table 2 Leaf damage ratings of 18-599hong and T1 transgenic plants after artificial inoculation of MDMV strain B

Materials	The second leaf under the ear	The first leaf under the ear	The leaf on the ear	The first leaf above the ear	The second leaf above the ear	Average damage ratings
18-599hong	1	1	3	2	3	2.0
CP7-1	1	1	1	1	1	1.0
CP7-2	0	0	0	0	1	0.2
CP7-3	0	0	0	0	0	0.0
CP7-4	0	0	0	0	0	0.0
CP7-5	1	1	2	2	3	1.8
CP7-6	1	1	1	1	1	1.0
CP7-8	0	0	1	1	2	0.8
CP7-9	0	0	0	0	0	0.0
CP-10	1	1	1	1	1	1.0
CP7-11	0	0	1	1	1	0.6
CP7-12	0	0	1	1	1	0.6
CP7-13	1	1	2	2	2	1.6
CP7-14	0	0	0	0	1	0.2
CP7-15	1	1	1	2	2	1.4
CP7-16	0	1	1	1	1	0.8
CP7-17	1	1	1	2	2	1.4
CP7-18	0	0	0	1	1	0.4
CP7-19	0	0	1	1	1	0.6
CP7-20	0	0	0	1	1	0.4
CP7-21	0	0	0	0	0	0.0
CP7-22	0	0	1	1	1	0.6
CP7-23	0	0	1	1	1	0.6

3 讨论

玉米矮花叶病毒(MDMV)属于马铃薯Y病毒科马铃薯Y病毒属。其种类及株系的划分在国内外已有较多的研究,主要分为 A、B、C、D、E、F、O、G 和 KS1 株系^[13-17]。目前对马铃薯Y病毒种的划分标准是如果全基因组序列的同源性在 85% 以上,或 CP 基因的氨基酸序列的同源性在 80% 以上且 3'非编码区的序列的同源性在 75% 以上则可定义为同一种病毒^[18]。Frenkel 等通过 MDMV-B 和 SCMV-SC 的血清学关系分析,以及对 MDMV-B 和 SCMV-SC 的 CP 序列及 3'非编码区的序列比较认为 MDMV-B 应从 MDMV 中分离出来成为甘蔗花叶病毒的 1 个株系(命名为 SCMV-MDB)^[19]。我们所克隆的 MDMV CP 基因由测序结果和同源性分析确定属于玉米矮花叶病毒 B 株系。

Beachy 等人(1990)认为 CP 介导的抗性是由于 CP 蛋白的积累封闭了病毒侵染的一个早期步骤,即封闭了病毒粒子的脱衣壳^[20]。此外,Reimann-Philipp 等(1993)报道一些病毒的截短的、反义的或不可转译的 CP 基因也能介导转基因植

物对相关病毒的高度抗性,甚至可达到免疫程度^[21],这一结果表明 CP 基因介导的抗性中存在着不依赖于 CP 蛋白本身的抗性机制,很可能是转入的 CP 基因转录体与接种病毒之间直接发生 RNA:RNA 间的干扰,从而产生对外源病毒的抗性。Haldeman-Cahill 等(1998)研究发现 3'非编码区序列在维持烟草蚀纹病毒(TEV)基因组的二级结构和 RNA 的复制都是必需的^[22]。通过把病毒 CP 基因导入植物中产生抗病毒的转基因材料已有很多成功的报道,如蚜虫传播的马铃薯病毒组的病毒(PVY)和黄症病毒组的病毒(PLRV),对这些病毒的 CP 基因进行分子操作改造后转入植物体内,结果表明转基因植物对病毒侵染表现一定程度的抗性。Murry 等人(1993)把 MDMV CP 基因导入到甜玉米自交系 R90 和 R91 中,获得的转基因玉米对 MDMV 表现出明显的抗性^[23]。这一结果在我们的实验中得到了进一步证实。此外,在这项实验中,由于所构建的载体除了包含 CP 基因序列,还包含 3'非编码区序列。该序列是否有助于进一步提高转基因玉米的抗性及其稳定性,还有待于对这些高抗矮花叶病的转基因材料进一步进行抗病鉴定和遗传分析。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Simcox KD, McMullen MD, Louie R. Co-segregation of the maize dwarf mosaic virus resistance gene, *Mdm1*, with the nucleolus organizer region in maize. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 341 - 346
- [2] Kovacs G, Gaborjanyi R, Vasdinyei R *et al*. Resistance of maize inbred lines to maize dwarf mosaic and sugarcane mosaic potyviruses. *Cereal Research Communications*, 1998, **26**(2): 195 - 201
- [3] Kong P, Steibiss HH. Complete nucleotide sequence and analysis of the putative polyprotein of maize dwarf mosaic virus genomic RNA. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1791 - 1799
- [4] Asad S, Haris WA, Bashir A *et al*. Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Arch Virol*, 2003, **148**(12): 2341 - 2352
- [5] van Dun CMP, Bol JF, van Vloten-Doting L. Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology*, 1987, **159**: 299 - 305
- [6] Hemenway C, Fang RX, Kaniewski JJ *et al*. Analysis of mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J*, 1988, **7**: 1273 - 1280
- [7] Nelson RS, McCormick SM, Delannay X *et al*. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/technology*, 1988, **6**: 403 - 409
- [8] Vain P, McMullen MD, Finer JJ. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, 1993, **12**: 84 - 88
- [9] Wan YC, Widholm JM, Lemaux PG. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 1995, **196**: 7 - 14
- [10] McCouch SR, Kochert G, Yu Z *et al*. Molecular mapping of the rice nuclear genome. *Theor Appl Genet*, 1988, **76**: 815 - 829
- [11] Zhang HM(张红梅), Liu XH(刘小红), Zhang HW(张红伟) *et al*. Characterization of callus induction and plant regeneration in immature embryo culture among several heterotic groups of elite maize inbreds. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 2004, **24**(1): 50 - 55
- [12] Liu XH(刘小红), Zhang HW(张红伟), Tan ZB(谭振波) *et al*. Transfer of MDMV CP gene into maize elite inbreds by micro-projectile bombardment. *Journal of Maize Sciences*(玉米科学), 2003, **11**(2): 16 - 18
- [13] Machenzie DR, Ford RE. Differences in maize dwarf mosaic virus isolates of the Northeastern United States. *Plant Dis Rep*, 1966, **50**: 814 - 818
- [14] Louie R, Knoke JK. Strains of maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis Rep*, 1975, **59**: 518 - 522
- [15] Louie R, Findley WR, Knoke JK *et al*. Genetic basis of resistance in maize to five maize dwarf mosaic virus strains. *Crop Science*, 1991, **31**(1): 14 - 18
- [16] McDaniel LL, Gordon DT. Characterization of the oat infecting strain of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 1989, **79**(1): 113 - 120
- [17] Mcken NM, Whittaker LA, Strike PW *et al*. Coat protein properties indicate that maize dwarf mosaic virus-KSI is a strain of johnsongrass mosaic virus. *Phytopathology*, 1990, **80**: 907 - 912
- [18] Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL *et al*. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, 2000
- [19] Frenke MJ, Jilka JM, McKern NM *et al*. Unexpected sequence diversity in the amino-terminal ends of the coat proteins of strains of sugarcane mosaic virus. *J Gen Virol*, 1991, **72**(2): 237 - 242
- [20] Beachy RN. in Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes(Eds. Verma DPS, Goldberg RB), Springer-Verlag, New York, 1990. pp. 313 - 327
- [21] Reimann-Philipp U, Beach RU. Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. *Mol Plant Microbe Interact*, 1993, **6**(3): 323 - 330
- [22] Haldeman-Cahill R, Daros JA, Carrington JC. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J Virol*, 1998, **72**(5): 4072 - 4079
- [23] Murry LE, Elliott IG, Capitán SA *et al*. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. *Bio/technology*, 1993, **11**(13): 1559 - 1564