

文章编号: 1005-0906(2003)02-0016-03

利用基因枪法将玉米矮花叶病毒外壳蛋白基因导入玉米优良自交系

刘小红^{1,2}, 张红伟¹, 谭振波¹, 荣廷昭², 李晚忱²

(1. 北京市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)

摘要: 利用基因枪法将玉米矮花叶病毒外壳蛋白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, 转化的愈伤组织在 Bialaphos 浓度为 8 mg/L、10 mg/L、5 mg/L 的筛选压下经过三次抗性筛选后, 分别再生出可育植株 12 株和 6 株。PCR 检测结果表明 18-599 红和 18-599 白分别有 10 株和 3 株为阳性, 说明 CP 基因已导入到玉米自交系中。

关键词: 玉米矮花叶病毒; 外壳蛋白; 自交系; 基因枪法

中图分类号: S513.035.3; Q78

文献标识码: A

Transfer of MDMV CP Gene into Maize Elite Inbred Lines by Microprojectile Bombardment

LIU Xiao-hong^{1,2}, ZHANG Hong-wei¹, TAN Zhen-bo¹, RONG Ting-zhao², LI Wan-chen²(1. *Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural & Forestry Science, Beijing 100089*; 2. *Maize Research Institute, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China*)

Abstract: We introduced MDMV CP gene into calli derived from immature embryos of elite inbredlines 18-599 Hong and 18-599 Bai by microprojectile bombardment. 12 fertile transformants of 18-599 Hong and 6 fertile transformants of 18-599 Bai were obtained from resistant calli which had been subcultured on selecting medium containing 8, 10 and 5 mg/L Bialaphos for 3 cycles with 3 weeks per cycle. The result of PCR amplification implied that the CP gene had been introduced into maize inbred lines 18-599 Hong and 18-599 Bai.

Key words: Maize dwarf mosaic virus; Coat Protein; Elite inbred lines; Microprojectile bombardment

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。该病毒于 1962 年在美国俄亥俄州最早发现, 1965 年定名为玉米矮花叶病毒 (maize dwarf mosaic virus, MDMV)。MDMV 是无包膜的单链 RNA 病毒, 属于马铃薯 Y 病毒科、马铃薯 Y 病毒属。该病毒可由汁液摩擦接种、种子带毒传播, 在自然条件下, 主要由蚜虫传染, 属非持久型。其寄主范围十分广泛, 能侵染 200 多种栽培作物和杂草。

玉米矮花叶病也是影响我国玉米生产的主要病害之一。目前主要通过农业措施 (如选择品种、调整

播期、清除杂草和拔除病株等) 和化学药剂来防治玉米矮花叶病的发生, 但是不能从根本上解决 MDMV 对玉米生产所带来的严重危害, 抗病品种的培育是防治 MDMV 病害发生的有效途径。在抗病毒病品种培育方面, 除了利用品种资源的抗性基因进行品种改良外^[1,2], 病毒基因组研究所取得的成果也使病毒基因工程技术成为培育抗病毒病农作物品种的有效方法^[3~7]。病毒外壳蛋白 (Coat Protein, CP) 基因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的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。本实验是将 MDMV CP 基因导入玉米优良自交系中。

收稿日期: 2002-11-08

作者简介: 刘小红 (1975-), 男, 博士生, 主要从事玉米基因工程研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270832) 和北京市高技术室基金项目 (953850100) 资助。

1 材料与方法

1.1 供试材料

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。质粒 pBPC47-bar 由北京农业生物技术中心张晓东博士提供。用该质粒构建了基因枪方法转化的表达质粒 p35ScpBar, 将我们分离的 MDMV CP 基因(GenBank accession number: AF540989)正向置于 35S 启动子下(图 1)。



图 1 p35ScpBar

1.2 试验方法

1.2.1 玉米幼胚的接种 取授粉后 8~13 d、幼胚大小为 1~2 mm 的玉米果穗,去苞叶后在 70%的酒精中浸泡 5 min,取出后用手术刀削去种皮,用镊子挑出幼胚,接种于诱导培养基上。

1.2.2 培养基 基本培养基: N₆ 大量、B₅ 微量、RTU 有机、Fe 盐、脯氨酸 690 mg/L、水解酪蛋白 200 mg/L、肌醇 100 mg/L、蔗糖 30 g/L、植物凝胶 2.6 g/L 或琼脂粉 6 mg/L;愈伤组织诱导及继代培养基:基本培养基附加 2,4-D 2 mg/L 或 Dicamba 3.3 mg/L 和 10 mg/L AgNO₃;选择培养基:愈伤组织诱导或继代培养基附加不同浓度 Bialaphos (表 2) 和 10 mg/L AgNO₃;胚状体诱导培养基:基本培养基附加不同浓度 KT(表 3);分化培养基:同基本培养基;生根壮苗培养基:基本培养基附加 1 mg/L 的 NAA。

1.2.3 基因枪转化及抗性愈伤组织的筛选 玉米幼胚转化前的高渗处理按文献^[8]进行,转化方法见文献^[9]。轰击后的愈伤组织转至附加 Bialaphos 的选择培养基上进行三次选择培养,每次 3 周。

1.2.4 植株的再生及移栽 抗性愈伤组织在附加不同浓度 KT 的胚状体诱导培养基上培养一周后,转移至分化培养基进行绿苗分化。分化的绿苗长出主茎后,将其移至生根壮苗培养基上生根壮苗。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。当幼苗在小花盆中长出 1~2 片新叶,带土移栽到大田。

1.2.5 转化再生植株的 PCR 检测 设计的 PCR 引物可特异扩增含有 MDMV CP 基因的插入片段 0.92Kb 的目的序列。引物序列如下:

上游引物:5' ATGTCGAAGAAGATGCGCCTG 3'
下游引物:5' TCACCACGAGACTCGCAGCAC 3'
PCR 反应条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 1

min,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 30 次;72℃延伸 10 min,4℃保存。

用 SDS 法提取转基因玉米叶片的总 DNA 作为模板进行 PCR 反应,扩增产物在 0.8%Agrose 凝胶上电泳后在紫外灯下检测。

2 结果与讨论

2.1 18-599 红、18-599 白幼胚愈伤组织的诱导

表 1 18-599 红和 18-599 白幼胚愈伤组织的诱导频率

自交系	接种幼胚数 (个)	I 型愈伤组织诱导率 (%)	II 型愈伤组织诱导率 (%)	III 型愈伤组织诱导率 (%)
18-599 红	300	55	45	0
18-599 白	300	58	40	2

在愈伤组织诱导过程中,观察到幼胚大小对愈伤诱导的效果影响很大。所接幼胚大于 2 mm 时,极易分化生根长芽,影响出愈;小于 1 mm 的幼胚,长势非常慢,但不易生根长芽;而 1~2 mm 的幼胚的出愈率较高。我们取 1~2 mm 的幼胚进行愈伤组织的诱导,统计了供试两个自交系 I 型、II 型和 III 型愈伤组织诱导率。有些幼胚上既有 I 型愈伤组织又有 II 型愈伤组织,统计时归为 II 型愈伤组织。结果表明供试的两个自交系具有较高的胚性愈伤组织诱导率(表 1)。

2.2 抗性愈伤组织的筛选

表 2 在附加不同浓度 Bialaphos 选择培养基上愈伤组织的成活率 %

自交系	愈伤组织的 转化与否	第一次筛选 8 mg/L PPT	第二次筛选 10 mg/L PPT	第三次筛选 5 mg/L PPT
18-599 红	转化	38	18	99
18-599 白	转化	41	10	98
18-599 红	未转化	52	0	-
18-599 白	未转化	47	0	-

未转化的 II 型愈伤组织在继代培养基上进行三次继代培养,在继代过程中正常生长,没出现褐化现象。未转化和转化的 II 型愈伤组织在含有 8 mg/L PPT 的 Bialaphos 选择培养基上进行第一次筛选培养过程中,部分愈伤组织出现褐化甚至变黑而停止生长,至第一次继代结束时,未转化和转化的愈伤组织的成活率介于 38%~52%之间。成活的愈伤组织在含有 10 mg/L PPT 的 Bialaphos 选择培养基上进行第二次筛选,至结束时未转化的愈伤组织不能成活而转化的愈伤组织的成活率为 10%~18%。成活的愈伤组织继续在含有 5 mg/L PPT 的 Bialaphos 选择培养基上进行第三次筛选,至结束时愈伤组织几

乎均能成活(表 2)。从这一结果来看,转化的愈伤组织在含有 8 ~ 10 mg/L PPT 的 Bialaphos 选择培养基上进行二次筛选继代培养后,成活的愈伤组织可进行植株再生。

2.3 植株再生与移栽

抗性愈伤组织在添加不同浓度 KT 的胚状体诱导培养基上进行胚状体诱导培养,一周以后进行愈伤分化。观察到在胚状体诱导培养基中不同浓度的 KT 对愈伤组织的分化率和丛生苗所占分化苗的比率产生明显的影响(表 3)。在培养基中未加 KT 时,分化率最低、而且持续时间较长,但丛生苗所占比率也最低;当添加 KT 的浓度提高到 1.5 mg/L 时,分化率大大提高,18-599 红和 18-599 白分别达到 98% 和 95%,但是丛生苗也大量出现;当达到 2.0 mg/L 时,两个材料分化率都为 100%,所分化植株也全部为丛生苗。当丛生苗数过多时,所生长的幼苗较弱小。这种苗虽然在壮苗生根培养过程中能存活下来,但因长势较差,在炼苗期及田间的存活率较低。我们将经过炼苗后存活的 79 株转化再生苗移栽于大田,有 18 株成活并结实,其中 18-599 红 12 株,18-599 白 6 株(表 4)。

表 3 附加不同浓度的 KT 对诱导胚状体后绿苗分化率(%)和丛生苗所占比率(%)的影响

材料名称	KT 浓度(mg/L)					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
18-599 红	35(29)	40(68)	77(65)	98(97)	100(100)	100(100)
18-599 白	28(29)	38(53)	68(60)	95(95)	100(100)	100(100)

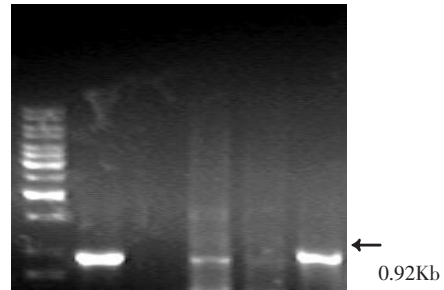
* 括号内数据为丛生苗所占比率(%)

表 4 抗性愈伤组织的分化及植株再生

自交系	轰击的 皿数	抗性愈 伤块数	分化的再 生苗数	练苗成活的 再生苗数	移栽成活 的植株数	结实的 植株数
18-599 红	15	320	206	45	12	12
18-599 白	10	295	180	34	6	6

2.4 转化再生植株的 PCR 检测

按照设计的 PCR 引物,以质粒 DNA、未转化植株的 DNA、转化植株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增(图 2),结果表明 18-599 红转化植株的 10 个株系为阳性,18-599 白转化植株的 3 个株系为阳性。我们正在对 PCR 阳性反应的转化再生植株进行 Southern 杂交和抗病性鉴定。



1. Marker: GencRuler™ 1kb DNA ladder
2. 质粒 p35ScpBar 3. 未转化植株
4 ~ 6. 转化再生植株

图 2 18-599 红部分转化再生植株的 PCR 检测

参考文献:

- [1] K D Simcox, M D McMullen, R louie. Co-segregation of the maize dwarf mosaic virus resistance gene, Mdm1, with the nucleus organizer region in maize[J]. Theor Appl Genet, 1995 90: 341-346 .
- [2] Gy Kovacs, R Gaborjanyi, R Vasdinyei et al. Resistance of maize inbred lines to maize dwarf mosaic and sugarcane mosaic potyviruses[J]. Cereal Research Communications, 1998 26(2): 195-201.
- [3] Lynn E Murry, Laurie G Elliott, Sherry A Capitani. Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus[J]. bio/technology, 1993 11: 1559-1564 .
- [4] Sai Jiqing, Kang liangyi, Huang Zhong et al. Nucleotide sequence of maize dwarf mosaic virus capsid protein gene and its expression in E. coli[J]. Science in China(Series B), 1995 38(3): 313-319 .
- [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[J]. Virology, 1987, 159: 299-305 .
- [6] Hemenway C, Fang RX, Kaniewski JJ, Chua NH, Tumer NE. Analysis of mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA[J]. EMBO J, 1988, 7: 1273-80.
- [7] Nelson RS, McCormick SM, Delannay X, Dube P, Layton J. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus[J]. bio/technology, 1988, 6: 403-9 .
- [8] Vain P, McMullen M D, Finer J J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 84-88 .
- [9] Wan Y C, Widholm J M, Lemaux P G. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (Zea mays L.) [J]. Planta, 1995, 196: 7-14 .

联系电话: 010-51503668, 51503980

E-mail: znbotan@public3.bta.net.cn