

文章编号: 1005-0906(2008)01-0137-04

玉米矮花叶病及抗病毒基因工程研究进展

马 丽

(枣庄学院生物系, 山东 枣庄 277160)

摘 要: 玉米矮花叶病毒是在世界范围内广泛分布的重要病毒, 我国已经确定可以侵染玉米的病原有 SCMV、SrMV 和 PenMV。转录后基因沉默现象是植物抵御病毒入侵、保持自身基因组完整性的一种防御机制。基因沉默的发现使人们对植物和病毒的相互关系有了一个新的认识。利用 PTGS 抗病机制为控制玉米矮花叶病提供了新的途径。简要介绍了玉米矮花叶病毒病害特点及其主要病原; 阐述了玉米矮花叶病毒抗病毒基因工程策略研究进展, 展望了 PTGS 在开展抗玉米矮花叶病毒基因工程中的应用前景。

关键词: 玉米矮花叶病毒; 病原; RNA 介导抗性; 转录后基因沉默

中图分类号: S435.41

文献标识码: A

Study on Strategies of Maize Dwarf Mosaic Virus-resistance Gene Engineering

MA Li

(Department of Biology, Zaozhuang College, Zaozhuang 277160, China)

Abstract: Maize dwarf mosaic virus(MDMV) is widely distributed in the whole world. Researches have shown that SCMV, SrMV and PenMV are the pathogens of MDMV. RNA-mediated resistance has been widely studied in recent years. Posttranscriptional gene silencing(PTGS) is considered to be one of dominant mechanisms of RNA-mediated resistance. PTGS is an antiviral defense system of plants which has led to a new understanding of the relationship between viruses and plants. A new strategy is obtained to control MDMV by the mechanism of PTGS. In this paper, we simply review the features and pathogen of MDMV. The strategies of maize dwarf mosaic virus resistance is described in detail. Moreover, the application of PTGS is prospected in controlling maize dwarf mosaic virus.

Key words: MDMV; Pathogen; RNA mediated virus resistance; PTGS

玉米在生长期容易受多种病虫害的严重危害而使其产量和品质下降, 特别是受各种病毒侵染造成病毒性退化。全世界有 40 多种病毒侵染玉米, 其中以玉米矮花叶病毒(Maize Dwarf Mosaic virus)分布最广, 危害最严重。本文对玉米矮花叶病毒病的研究概况及近年来开展的玉米抗病毒基因工程策略进行论述。

1 玉米矮花叶病毒

玉米矮花叶病是世界性玉米病害, 我国于 1968

年首次在河南新乡地区发现 MDMV。后来逐步遍及黑龙江、辽宁、内蒙古、北京、天津、河北、山东等 19 个省(区)。玉米矮花叶病明显的表现为爆发性、迁移性和间歇性三大特征, 可给生产造成 20% ~ 80% 的损失。

1.1 玉米矮花叶病病原

近 20 年有关病原生物学及血清学的研究结果表明, 我国至少存在着 3 种相关的病原可导致玉米矮花叶病: 玉米矮花叶病 B 株系(MDMV-B)、MDMV-G (或白草花叶病毒)以及甘蔗花叶病毒(SCMV)。它们均属于马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)中侵染禾本科植物的甘蔗花叶病毒亚组。

Mackenzie 等(1967)利用约翰逊草(*Sorghum halepense*)作为鉴别寄主, 将 MDMV 分为 A 和 B 两个株系, A 株系可以侵染约翰逊草, 而 B 株系不能侵染。Louie 等(1975)进一步将侵染约翰逊草的分离物区分

收稿日期: 2007-01-04; 修回日期: 2007-08-10

作者简介: 马 丽(1980-), 女, 山东郓城人, 在读博士。从事玉米矮花叶病毒基因遗传转化研究。

E-mail: y000018@sdau.edu.cn

为 C、D、E 和 F 株系。范在丰等通过对中国玉米矮花叶病毒 6K1 基因的克隆和序列分析发现,从北京地区获得的玉米矮花叶病分离物是不同于国外 MDMV 的新株系^[1]。

白草为多年生禾草,在我国的东北、华北、西南地区广泛分布于农田、地边、水渠和道路两旁。白草花叶病毒分离物是从白草病株上分离得到一个可以侵染高粱和玉米、造成矮花叶症状危害严重的新病毒。石银鹿等从白草花叶病株上分离得到一个引起玉米矮花叶病的一个新毒株,定名为 MDMV-G^[2]。范在丰等对白草花叶病毒分离物进行了生物和分子生物学鉴定,确定白草花叶分离物是 Potyvirus 的一个新成员,暂命名为白草花叶病毒 *Pennisetum mosaic virus*(PenMV)^[3]。石秀清等证实山西玉米矮花叶病毒病原包括 SCMV 和 PenMV 两种病毒^[4]。

迄今为止,我国已经确定的可以侵染玉米、甘蔗和高粱的 Potyvirus 有 SCMV、SrMV 和 PenMV,其中 SCMV 是危害我国玉米、高粱和甘蔗等作物病毒病的重要病原,分布最广,危害最严重。

1.2 抗源筛选

玉米矮花叶病毒源量大、传播途径多、品种抗病力低,进行抗玉米矮花叶病毒的基因工程研究是控制玉米矮花叶病的有效途径。国内外学者针对玉米病毒的危害情况,在玉米抗病毒育种方面相继开展研究。美国从 60 年代开展了种质资源的抗病性研究,鉴定筛选出 Pa405、Pa11、oh7Bd 等对 MDMV A 株系和 B 株系高抗的自交系;Kuntze 等人工接种评价了 122 份早熟玉米自交系对 MDMV 的抗性,筛选出具有完全抗性的 D21、D32、FAP1360A 等 3 个自交系。我国于 1973 年开始对玉米种质资源进行抗性评价,筛选了一批抗源,主要来自于塘四平头系统的衍生自交系,抗源的遗传基础比较狭窄。MDMV-B 株系是我国玉米产区造成危害的主要病毒株系。

1.3 抗性遗传

对玉米矮花叶病的抗性遗传研究始于 20 世纪 60 年代。用于抗性分析的多是美国种质 Pa405,但研究结果不一致。Rosenkrantz 等认为抗性由 1~5 个基因控制,并将一个主效基因 Mdml 定位在第 6 染色体着丝点处^[5]。Louie 等(1991)通过对美国抗感玉米矮花叶病玉米种质的杂交后代分离分析,确定其抗性有 1~5 个基因控制^[6]。Xia 等利用 D32 × D145 的 F₂ 群体,检测了 5 个 QTL,分别位于染色体 1、3、6、10 上^[7]。曹如槐等认为我国矮花叶病的抗性遗传以基因加性效应为主,显性效应也有相当大的作用^[8]。

王振华等研究利用两个抗病自交系(黄早四、Pa405)和两个感病自交系(掖 107、Mo17)配制 4 套杂交组合,研究了玉米抗矮花叶病的遗传规律。结果表明:苗期和成株期玉米杂交组合 F₁ 的抗感程度与遗传背景有关,抗性遗传不符合加性-显性模型。黄早四和 Pa405 对矮花叶病的抗性遗传力较高(变幅为 63.11%~98.28%),两者分别含有至少两对和一对抗病基因。玉米抗矮花叶病基因的加性、显性以及互作效应普遍存在,且在不同杂交组合中作用方式不同,抗病性受多基因控制,存在效应强弱差异^[9]。吴建宇等利用微卫星标记技术针对玉米第 6 染色体定位了来自塘四平头血缘的自交系黄早四中一个抗 MDMV-B 的新基因位点,位于第 6 染色体短臂上,认为黄早四在不同遗传背景下遗传方式复杂,可能含有多基因、两对基因或一对基因再加微效基因^[10]。玉米矮花叶病的抗性遗传研究结果由于受玉米材料的基因型、病毒株系、环境、抗病性鉴定指标及遗传分析等方面的影响而不尽一致。

2 玉米矮花叶病抗病基因工程研究

2.1 植物抗病毒基因工程研究

1986 年,Power-Abel 等将烟草花叶病毒的外壳蛋白导入烟草,获得第一列抗 TMV 的转基因植株。此后,发展了多种植物抗病毒基因工程策略。转基因植株主要在蛋白质水平和 RNA 水平获得抗性。蛋白质获得抗性的特点是抗性水平和转基因蛋白质的表达量呈正相关,与接种的病毒浓度有关。高浓度的病毒接种量能克服蛋白质介导的抗性,抗性只对病毒粒子起作用,一般不抗裸露的病毒 RNA 攻击,如 CP 基因、复制酶基因、核酶基因等。研究表明,转基因的蛋白质表达水平与抗性水平之间常常缺乏相关性,其中有些在抗性植株内难以检测到转基因蛋白质表达产物,这种抗病性即是 RNA 介导的病毒抗性^[11~13]。

2.2 RNA 介导抗性的主要机制(PTGS)

在 RNA 介导的抗性植株内,细胞核内转基因的转录水平很高,而细胞质中稳定 mRNA 的积累水平很低,病毒 RNA 复制被抑制在检测不到的水平,这说明转基因在转录后细胞内 RNA 的降解机制被活化,转基因的 mRNA 和病毒 RNA 在细胞质中都被降解,导致了转录后的基因沉默(Posttranscriptional gene silencing, PTGS)和植物的抗病性。研究发现 PTGS 是 RNA 介导抗性的主要机制之一。转录后基因沉默与植物抗病性的关系目前已有报道^[14~16]。

植物基因沉默是植物长期进化形成的用来防止外来遗传物质干扰自身基因组功能和稳定性的一种重要机制。当表达来源病毒某一基因或核酸序列的转基因植物发生 PTGS 时,能对入侵的同一病毒或同属中相近病毒 RNA 进行降解,使入侵的病毒不能在植物中积累,从而赋予植物病毒抗性。PTGS 是生物体中一种不完全的原始的生物免疫系统,当病毒入侵植物时,对植物而言病毒核酸是外来遗传物质,病毒在植物体内不断复制其核酸数量达到一定程度而强烈干扰了植物基因组正常的生理生化功能时,植物的基因沉默修饰控制系统会以某种方式被激活,通过甲基化修饰作用来减少或阻止整合到植物基因组的病毒核酸的转录复制或通过被激活的特异性 RNA 降解系统来专一降解病毒核酸 RNA,从而抑制了病毒的复制。

利用 PTGS 介导的抗性机制,将植物易感病毒基因片段整合到宿主染色体上,当该病毒或其同源病毒侵染植物后,植物就通过 PTGS 防卫机制降解病毒 RNA,防止植物发病。植物和病毒在进化过程中利用各种防护来抵御病毒的入侵,现在认为 PTGS 是植物对病毒入侵采取的一种巧妙的抵抗措施。它具有序列特异性,适合于各种不同的病毒,因为其序列特异性是针对病毒基因组本身的。此外引发沉默的信号不是限制在单个细胞内,而是在侵染位点产生,然后可以扩散到其它较远部位发挥作用。

病毒的复制、双链 RNA 分子以及高效表达的外源基因产生的正常或异常 mRNA 都可以引发 PTGS,使植物对这种病毒或近缘病毒产生免疫反应^[17,18]。利用 PTGS 使植物获得抗性逐渐成为病毒研究者研究植物对病毒抗性的一种全新策略。在转基因抗病毒方面,牛颜冰等利用病毒基因组上基因的 cDNA 的反向重复片段转化植物,通过启动 RNA 沉默机制得到了相关病毒免疫的转基因植株。

2.3 玉米矮花叶病抗病基因工程研究

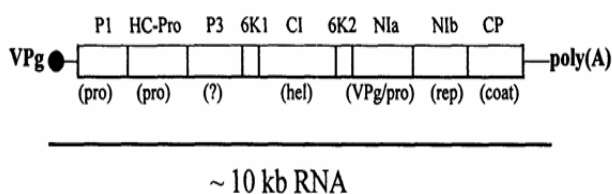


图 1 马铃薯 Y 病毒属分子结构图

Fig.1 Genome structure of Potyvirus

MDMV 属于马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。马铃薯 Y 病毒为线状单分体正义 RNA 病毒,全长约 10 Kb,

整个基因组只有一个阅读框架,编码一个大的多聚蛋白(polyprotein),经过翻译后加工成具有不同功能的蛋白质,加工后成熟蛋白从 N 到 C 端依次是:PI、HC-Pro(蚜传辅助因子)、P3、6K1、CI、6K2、NIa-VPg、NIa-Pro(蛋白酶)、NIb(复制酶)和 CP(外壳蛋白)。该病毒主要由蚜虫以非持久性方式传播,进行蚜虫传播病毒需要两种病毒编码的蛋白,一种是 CP,另外一种辅助成分蛋白酶 Hc-pro。此外该病毒也能由种子传播,机械传播效率也较高。

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。利用基因工程技术是培育抗病品种的有效途径,但玉米矮花叶病抗性的遗传基础较为复杂,玉米自身的这些抗性基因目前尚难于分离和利用,这给利用玉米矮花叶病的抗性基因来培育抗病品种带来了一定的困难。植物病毒主要依赖于寄主的复制转录体系完成自身的繁殖和侵染。如干扰病毒的复制和转录,能达到延迟和减轻病毒病害的目的。目前利用 PTGS 的发生原理采用表达病毒来源的 dsRNA 是生产抗病毒转基因植株的有效方法,成为解决植物抗病毒病害的发展趋势。

抗矮花叶病毒转基因玉米的研究进展,从有关文献和 GenBank 中,1993 年报道玉米矮花叶病毒基因组 CP 的 DNA 序列,1999 年报道了其 DNA 全序列。玉米抗矮花叶病基因工程主要利用的是外壳蛋白基因 (CP),Murry 等 1993 年首次将玉米矮花叶病毒的外壳蛋白基因导入玉米,所有转化体细胞内均表达了 CP 基因,其中一个转化体鲜组织内 CP 表达量约 100 ~ 200 $\mu\text{g/g}$,获得了抗 MDMV 的转基因玉米植株^[19]。刘小红用基因枪轰击愈伤组织将 MDMV 的完整 CP 基因导入玉米自交系,获得了抗病的转基因植株^[20]。周小梅等用基因枪轰击将 SCMV 外壳蛋白基因导入到玉米自交系综 3、综 31,获得对 MDMV 具有一定抗性的转基因玉米^[21]。2006 年白云凤等根据 RNAi 原理构建了 SCMV NIb 基因反向重复序列表达载体并通过农杆菌介导法将 NIb 基因反向重复序列导入到玉米自交系,获得高抗的转基因植株,证实 RNAi 技术可成功用于玉米抗矮花叶病基因工程研究^[22]。

3 结论与展望

对病毒抗性研究是一个永恒的课题。试验证明各种抗病毒技术策略都能得到一些抗病毒的植株。对于各种抗病毒策略,蛋白质介导抗性无论是理论

上还是实际上都是研究较多的、最成功的,但在其生物安全方面存在很多的争议。RNA 介导抗性的研究是近几年生命科学界的一大热点。RNA 沉默机制的进一步阐明将为抗病毒基因工程提供强大的理论支持。玉米矮花叶病毒的分子生物学性状及其完整基因序列都已得到深入研究,为开展玉米矮花叶病毒抗病毒基因工程奠定了基础。国内外学者针对玉米矮花叶病毒所进行的抗病毒策略研究,多数利用蛋白质介导抗性机制把 MDMV 完整外壳蛋白基因导入玉米从而获得抗性植株。目前利用 RAN 介导抗性机制采用表达病毒来源的 dsRNA 是生产抗病毒转基因植株的有效方法,此策略已在其它植物病毒种类中得到应用。试验证明它具有抗病性强、抗性持久、生物安全性高等特点。因此可以根据 RNA 介导抗性的发生原理,构建 MDMV 基因表达载体使 MDMV 多个反向重复基因排列转入到玉米基因组中,通过启动 RNA 沉默机制来获得高抗 MDMV 的转基因植株。利用农杆菌介导方法把 PenMV 病毒基因组中的 HC-pro 基因与 SCMV 病毒基因组中的 CI 基因反向重复序列转移到玉米中,获得了高抗 MDMV 的转基因植株。开展 MDMV 的抗病基因工程研究,为培育抗病毒玉米育种材料,创新玉米品种资源,利用玉米矮花叶病毒抗源的多样化进一步改良抗 MDMV 玉米品种打下基础。

参考文献:

- [1] 范在丰,李怀方,李向东,等. 中国玉米矮花叶病毒 6K1 基因克隆及序列分析[J]. 植物病理学报,2000,30(1):95-101.
- [2] 石银鹿,张琦,王富荣,等. 玉米矮花叶病毒的株系鉴定[J]. 植物病理学报,1986,16(2):99-104.
- [3] Fan Z, Chen H, Cai S, et al. Molecular characterization of a distinct potyvirus from whitegrass in China[M]. Arch. Virol, 2003.
- [4] 石秀清,王富荣,石银鹿,等. 玉米种质资源抗矮花叶病鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(4):338-340.
- [5] Rosenkranz E, Scott G E. Determination of the number of genes for resistance to maize dwarf mosaic virus strain A in fiber corn inbred lines[J]. Phytopathology, 1984, 74: 71-76.
- [6] Louie R, Knoke J K, Frindley W R. Genetic basis of resistance in maize to five dwarf mosaic virus strains[J]. Crop Science, 1991, 31(1): 4-18.
- [7] Xia X C, Melchinger A E, Kuntze L. Quantitative trait loci mapping of resistance to sugarcane mosaic virus in maize[J]. Phytopathology, 1999, 89(8): 660-667.
- [8] 曹如槐,王晓玲,任建华. 玉米矮花叶病毒抗病遗传的初步研究[J]. 植物病理学报,1987,17(2):119-120.
- [9] 王振华,李新海,袁力行,等. 玉米抗甘蔗花叶病毒资源的遗传多样性研究[J]. 作物学报,2003,29(3):391-396.
- [10] 吴建宇,汤继华,夏宗良,等. 一个新的抗玉米矮花叶病基因的微卫星标记[J]. 植物学报,2002,44(2):69-74.
- [11] Swaney S, Powes H, Goodwin J, et al. RNA-mediated resistance with nonstructural gene from the tobacco etch virus genome[J]. MPMI, 1995, 8(6): 1004-1011.
- [12] Boogaart T, wen F J, Davies J W, et al. Replicate derived resistance against pea early browning virus in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon post transcriptional gene silencing[J]. MPMI, 2001, 14(2): 196-203.
- [13] 郭启兴,李茵,张杰道,等. 表达马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因的转基因烟草抗病机制研究[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(4):372-376.
- [14] Feng De -jiang, Liu Xiang, Song Gui-sheng, et al. Virus-induced PVX coat protein gene silencing and Methylation in transgenic tobacco[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(1): 116-123.
- [15] Neves-Borges, Coollares W M, Pontes J A, et al. Coat protein RNAs-mediated protection against Andean potato mottle virus in transgenic tobacco[J]. Plant Science, 2001, 160: 699-712.
- [16] Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses[J]. Trends Genet, 2001, 17(8): 449-459.
- [17] 牛颜冰,于翠,张凯,等. 瞬时表达黄瓜花叶病毒部分复制酶基因和番茄花叶病毒移动蛋白基因的 dsRNA 能阻止相关病毒的侵染[J]. 农业生物技术学报,2004,12(4):484-485.
- [18] Han Y, Grierson D. Relationship between small antisense aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato[J]. Plant. J., 2002, 29(4): 509-519.
- [19] Murry L E, Elliott L G. 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]. Biotechnology (NY), 1993, Dec; 11(13): 1559-1564.
- [20] 刘小红,张红伟,刘昕,等. MDMV-CP 基因的克隆及其转基因玉米的研究[J]. 生物工程学报,2005,1:184-188.
- [21] 周小梅,贾炜珑,赵云云. 转基因玉米植株的再生[J]. 植物研究, 2006, 26(4):461-464.
- [22] 白云凤. 利用不同策略获得抗 SCMV 转基因玉米的研究[D]. 博士论文,2004.

(责任编辑:朱玉芹)