277—283

6052(14)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

表达反义核酶RNA的转基因水稻对矮缩病毒复制和症状的抑制作用*

杨文定[1] 吴祖建[2] 王苏燕[1] 刘伟平[1] 叶寅[1] 谢联辉[2] 田波[1]

[1](中国科学院微生物研究所,北京 100080)
[2](福建农业大学植物病毒研究所,福州 350002)

S511.032
S432.41

A 提要 用基因枪法将含有RDV第五片段反义核酶序列基因的植物表达载体pROKII转化水稻幼胚,在G418存在的条件下,约2~3个月可筛选出抗性愈伤,转入分化培养基中培养可分化出幼苗。经Southern杂交法检测为阳性的水稻幼苗进行抗病性测定显示,转RDV反义核酶基因的水稻植株对RDV的复制和症状有显著抑制作用。转基因植株发病较轻,并能部分结实,而对照植株则明显矮化且大多不能抽穗。

关键词 水稻矮缩病毒,反义核酶基因,转基因水稻,抑制病毒复制 RNA,

水稻普通矮缩病是由黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)传播的病毒病害,此病普遍分布于我国南方地区,能造成水稻严重减产,其病原为水稻矮缩病毒(rice dwarf virus, RDV)。RDV属于植物呼肠孤病毒属(plant reovirus)的第一亚属。病毒可在传毒介体叶蝉体内复制,并随叶蝉卵传给后代[1]。RDV属双链RNA病毒,基因组包含12条dsRNA片段。我们针对RDV S5的核酶攻击位点,将一锤头型核酶引入S5III反义链上,构建成反义核酶基因S5IIIR。将S5IIIR插入植物表达载体pROKII,用基因枪法转化水稻幼胚,用G418进行选择培养。从抗性愈伤中分化出幼苗,转化植株对RDV的复制和症状发生有显著抑制作用。

材料和方法

1 材料和试剂

1.1 水稻 转化用水稻以安徽地方水稻品种(*Oryza sativa* L.)为材料,水稻幼穗采自中国农业科学院品资所水稻组网室。病毒繁殖用水稻品种为台中本地1号。

1.2 病毒 为水稻矮缩病毒松溪分离物。

1.3 试剂 分子生物学实验所用的cDNA合成试剂盒,4×dNTP及随机引物合成试剂购自Boehringer Mannheim公司。PCR扩增用的Taq酶、限制性内切酶、修饰酶均购自Promega公司和华美生物工程公司。反转录酶M-MLV-RTase购自BRL公司,PCR引物由本所技术室合成。

2 方法

2.1 未成熟胚培养 将开花后15 d的水稻幼穗,剥去颖壳,幼嫩种子用自来水漂洗干净,用70%乙醇浸泡2 min,后用0.1%升汞灭菌15~20 min,再用无菌水漂洗4遍,共约20~30 min。在无菌条件下将幼胚剥出,盾

本文于1995年12月11日收到,1996年3月4日修回
* 863高技术资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

片朝上放入固体培养基中(N6基本培养基,2,4-D 2 mg/L, 3% 蔗糖,0.7% 琼脂,pH5.7 高压灭菌),暗处培养2~3 d备用。

2.2 质粒构建 利用PCR引入法将具有锤头状核酶序列引入S5IIi反义链,将该重组克隆用XbaI和SacI酶切后以低熔点琼脂糖凝胶回收,与经同种内切酶处理的pROKII载体连接,转化MC1022感受态细胞,筛选得到重组克隆pROKII-S5IIIR(见王苏燕等)[2]。

2.3 基因枪转化 本研究所用基因枪为中国科学院生物物理研究所研制的高压放电基因枪。轰击前将幼胚放入6 cm的培养皿中。在50 μL的钨粉溶液中(60 mg/mL)依次加入5 μL质粒DNA(1 μg/μL),50 μL 2.5 mol/L $CaCl_2$和20 μL 0.1 mol/L亚精胺,混旋2~3 min,静置1 min,离心沉淀钨粉及DNA,弃去上清,沉淀分别用70%,100%乙醇洗涤,最后用48 μL 100%乙醇悬浮沉淀。每次取此悬浮液6 μL放在载体中央,干燥后即可进行轰击。样品室高度为6 cm,电压7-8 KV,真空度-0.095 Pa,每皿轰击1-2枪,以上操作均在无菌条件下进行。

2.4 转化体筛选及植株再生 将基因枪轰击的幼胚放在固体培养基暗中培养,25 ℃,约1~2周后,转入含有G418(20 μg/mL)的固体培养基中,继续培养,并逐渐增加G418的浓度(40 μg/mL)。将筛选出的抗性愈伤转入分化培养基(N6基本培养基,BAP 2~3 mg/L,NAA20 μg/L,3%蔗糖,0.7%琼脂,pH5.7,高压灭菌)中培养。约一个月后可分化得到绿芽,将小芽转至不含激素的N6基本培养基中促其生根。

2.5 分子生物学检测 待转化苗长至2~3片叶时,取适量叶片进行分子生物学检测,采用异硫氰酸胍法提取转基因水稻的总RNA[3],并以此RNA为模板加入反转录酶和引物,合成cDNA第一链,5′端引物为5′-TCG, GCT, GGC, TTA, TGC, TAA-3′,3′端引物为5′-GCG, TAT, TAG, AGT, GAA-3′。其反应条件为:50 mmol/L Tris-Cl (pH8.3), 75 mmol/L KCl, 10 mmol/L DTT, 3 mmol/L $MgCl_2$, 500 μmol/L dNTPs, 3′及5′引物各100 ng, 500 u M-MLV-RTase(BRL)。整个反应体积为20 μl,反应在37 ℃保温1.5 h。为扩增cDNA,取10 μL第一链cDNA产物加入上述3′及5′引物各100 pmol/L,进行PCR扩增,共30个循环,每一循环包括94 ℃变性30 s,52 ℃复性30 s,72 ℃延伸1 min。PCR结果用1%琼脂糖凝胶电泳检测。将部分分离PCR产物的琼脂糖胶进行Southern转印[3],以从pGEM-S5 Ⅲ R(含引入反义核酶的S5片段部分序列的重组克隆)上XbaI与SacI酶切下的S5IIIR片段为模板,使用随机引物标记法合成探针(反应条件见试剂盒操作指南),变性的探针与转印好的滤膜在65 ℃杂交24 h,按常规方法洗膜压片[3]。

2.6 抗病性测定 将分子检测阳性及根系生长健壮的转基因幼苗移栽至小盆于温室中培养,约2~3周后进行攻毒实验。供试毒源为温室保存的水稻矮缩病毒松嫘分离物(RDV-SX),繁殖用水稻品种为台中本地1号(TN-1)。供试介体昆虫为人工饲养的无毒黑尾叶蝉群体,饲养用水稻品种为TN-1。将无毒黑尾叶蝉的2~3龄幼虫吸转到RDV病株上饲毒,2 d后将其转移到TN-1健苗上饲养,待其通过循回期后备用。采用3虫单苗单管方法接种,即在每只试管内放入1棵转基因水稻苗,转入上述3只黑尾叶蝉,让其接种取食2 d,同种方法处理非转基因对照植株,并用苗龄为14 d的TN-1为对照。将接种过的稻苗在温室中隔离种植,观察症状出现时间和症状表现。

2.7 病毒含量的ELISA测定 分别取接种后24 d, 48 d, 72 d所有供试植物的少量根、茎和叶,进行ELISA检测。方法为A蛋白酶联免疫吸附法[4]。

结 果

1 水稻幼胚的基因枪转化及再生

水稻幼胚在固体培养基中培养2~3 d后,即可膨大并长出小的胚根。基因枪轰击后培养1周即出现浅黄色愈伤组织,将其转移到选择培养基中进行筛选。选择培养2周后约有50~60%的幼胚产生抗性愈伤。在提高G418含量的基础上,这些抗性愈伤继续增殖(图1)。在幼胚转化后约5~6周左右,将抗性愈伤转入分化培养基中进行光照培养,一个月后可分化出许

维普资讯 http://www.cqvip.com

多小绿点,从这些绿点中可长出小绿苗(图2)。

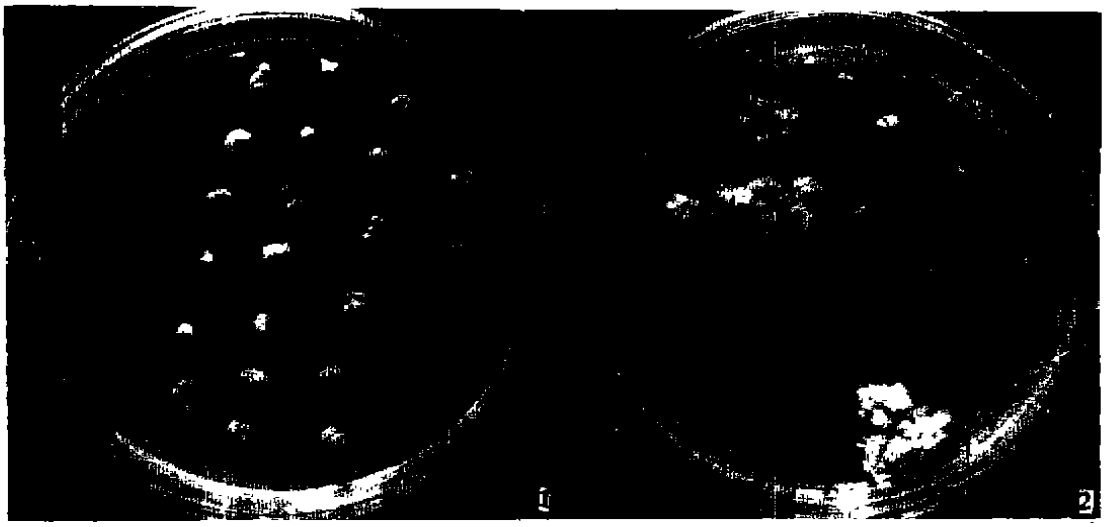

图1　选择培养4周后的水稻抗性愈伤

Fig 1　Resistant calli of rice after 4 weeks' selective culture

图2　分化培养1-2个月后从水稻抗性愈伤中分化出的小绿苗

Fig 2　Plantlet coming from resistant calli of rice after 1-2 months' differential culture

2　转基因植株的Southern检测

取转基因再生的水稻幼苗叶片0.2 g匀浆后提取总RNA,反转录为cDNA第一链,以此

表1　转基因水稻及对照发病及结实情况

Table 1　Symptoms and fertilities of transgenic rice plants and control

水稻植株 Rice plants	潜育期 Latent (天) (d)	株高(cm) Height (成熟期) (Mature stage)	症状 Symptoms	结实情况 Fertility
转化1 Transformed 1	21	40	轻,白色条点少 a few white stripes, spots	部分结实,饱满 partly fertile
转化2 Transformed 2	16	37	较轻,白色条点较少 a few white stripes, spots	部分结实,部分饱满 partly fertile
转化3 Transformed 3	18	35	较轻,白色条点较少 a few white stripes, spots	少量,部分饱满 a few panicle with partly full
对照1 control 1	15	20	重,白色条点多 severe with white stripes, spots	不抽穗 no panicle
对照2 control 2	15	28	较重,白色条点多 severe with white stripes, spots	少量,籽粒不饱满 a few panicle
对照3 control 3	14	25	重,白色条点多 severe with white stripes, spots	不抽穗 no panicle
对照4 control 4	14	15	重,白色条点多 severe with white stripes, spots	不抽穗 no panicle
对照5 control 5	13	25	重,白色条点多 severe with white stripes, spots	少量,籽粒不饱满 a few panicle
对照6 control 6	13	17	重,白色条点多 severe with white stripes, spots	不抽穗 no panicle

注:对照1-3为组培苗,对照4~6为TN-1。　note: control 1-3: cultured plant, control 4~6: TN-1

维普资讯 http://www.cqvip.com

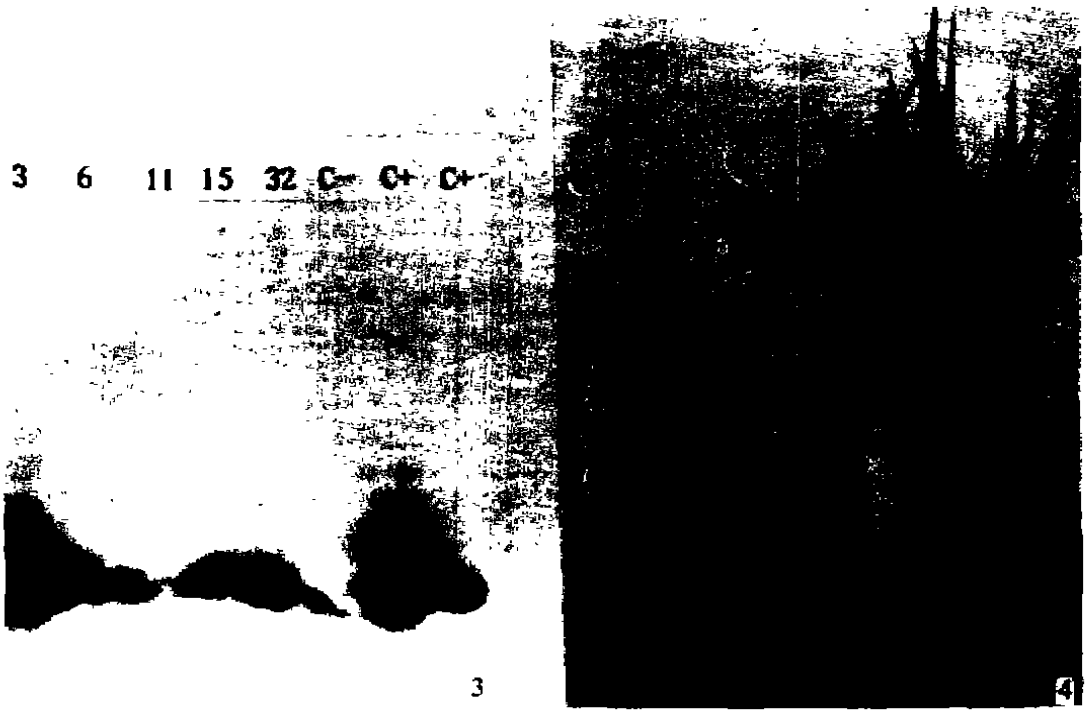

图3 转化水稻植株中S5IIIR基因转录产物检测:PCR扩增样品的Southern杂交图谱。3、6、11、15、32为实验材料编号,C^-为阴性对照,C^+为阳性对照。

Fig 3 Determination of transcription products of S5IIIR gene in transgenic rice plants. Southern blot analysis of RT-PCR products. 3、6、11、15、32: No. of experimental materials; C^-: negative control, C^+: positive control.

图4 转化水稻植株及对照的发病及结实情况差异。左:对照;右:转基因水稻植株。

Fig 4 Difference of symptom and fertility between transgenic rice plants and control. left: control; right: transgenic rice plants.

为模板进行PCR扩增,引物为人工合成的与S5Ⅲ片段5′和3′端互补序列。将部分PCR产物电泳分离后,进行Southern转印,取含反义核酶的酶切克隆片段以随机引物法合成探针,进行Southern杂交,杂交结果证明有5株水稻苗表现阳性结果(图3),说明构建的反义核酶基因已在转基因水稻植株中表达。

3 转基因植株对RDV的抗性

所筛选出的转基因植株抗病毒检测结果见表1,从表中可以看出,转化体在接种RDV后,其潜育期比对照长2~7 d,株高较对照高50%以上,症状显著减轻,白色条点较少,大部分可以结实。而对照植株明显矮化(图4),症状较重,白色条点多,不抽穗,或少量抽穗不饱满。

4 转基因植株内病毒含量的变化

攻毒后不同时间转基因植株及对照植株内病毒含量经ELISA检测发现,转化植株中病毒相对含量较对照低,茎和根中病毒含量相当对照的19~85%。接种后72 d,叶中的病毒含量明显降低至对照的17~44%(表2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　转 pROKII－SSHIR 水稻及对照植株内病毒含量比较(ELISA 值)

Table 2　Comparison of virus accumulation between transgenic plants and control (ELISA reading)

取样部位 Test part	水稻植株 Rice plants	接种后天数(days after inoculation) 24		48		72	
		OD_{405}*	转化/对照 TF/ck	OD_{405}*	转化/对照 TF/ck	OD_{405}*	转化/对照 TF/ck
叶 leaf	转化 1 TF1	0.476	0.67	0.446	0.82	0.186	0.30
	转化 2 TF2	0.716	1.01	0.659	1.21	0.109	0.17
	转化 3 TF3	0.456	0.64	0.513	0.94	0.274	0.44
	对照 ck	0.709		0.545		0.628	
茎 stem	转化 1 TF1	0.120	0.19	0.201	0.44	0.151	0.27
	转化 2 TF2	0.418	0.67	0.389	0.85	0.177	0.31
	转化 3 TF3	0.154	0.25	0.283	0.62	0.160	0.28
	对照 ck	0.627		0.459		0.568	
根 root	转化 1 TF1	0.288	0.36	0.343	0.50	0.269	0.49
	转化 2 TF2	0.365	0.45	0.490	0.72	0.170	0.31
	转化 3 TF3	0.346	0.43	0.423	0.62	0.298	0.54
	对照 ck	0.811		0.684		0.553	

注:对照为三株未转化组培苗测量平均值

note: ck: average reading of 3 untransformed plants; TF: transformed plants

*: OD_{405} = 病株 OD_{405} − 健株 OD_{405}; 健株 OD_{405} = 0.155; 空白 OD_{405} = 0.004

*: OD_{405} = inoculated plant OD_{405} − health plant OD_{405}; health plant OD_{405} = 0.155; blank OD_{405} = 0.004

讨　论

近几年来在禾本科植物中利用未成熟胚进行基因枪转化逐渐被众多的研究者所采用,并逐渐代替了原生质体和悬浮培养系统的发育进行的转化方法[5]。幼胚转化再生能力强,转化效率高,周期短,用悬浮细胞转化方法从诱导愈伤至再生出转化幼苗需要大约一年时间[6],而我们用水稻幼胚进行转化,从幼胚培养至分化出转化幼苗只需 2～3 个月的时间,大大缩短了周期,并有可能减少在组织培养中产生的体细胞变异的可能性。

自从 1986 年美国华盛顿大学 R. Beachy[7]等通过植物基因工程技术,首次将烟草花叶病毒(TMV)CP 基因转入烟草培育出能稳定遗传的抗病毒工程植物,抗病毒的植物基因工程成

维普资讯 http://www.cqvip.com

为近年来迅速发展的一个领域。目前在这一领域的研究不外乎通过病毒的外壳蛋白基、卫星RNA基因、反义RNA与病毒复制相关基因的部分序列等[8]。RDV作为一种植物呼肠孤病毒，为双链RNA病毒，组份多，基因组包含12条dsRNA片段，生活周期相当复杂。利用反义核酶RNA策略在水稻中是一种新的尝试。转化的水稻幼苗经分子生物学检测证实了针对RDV S5的反义核酶基因已在水稻中表达。抗病性检测发现，转基因植株在接种RDV后，潜育期比对照要长，植株较高，症状较轻，大部分可以结实。而对照则症状较重，不结实或少量结实并且籽粒不饱满。另外，在接种RDV后不同时间分别对转基因水稻及对照进行病毒含量的检测，也发现前者体内的病毒含量较低，后者则较高。

致谢 本工作承中国科学院生物物理所姚山麟、刘仲岚先生提供基因枪使用技术方面的大力帮助，特此致谢。

参 考 文 献

1 阮义理，金登迪，陈光育等.水稻矮缩病的研究.植物保护学报，1981，8(1)：27～33

2 王苏燕，盛刚，刘伟平等.抗水稻矮缩病毒的反义核酶及复制酶部分序列的合成、克隆及其表达载体的构建.中国病毒学，1996，11(2)：164－169

3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

4 马德芳，邱并生，田波.花椰菜花叶病毒的酶联免疫吸附分析.微生物学报 1981，21(1)：63～67

5 Christou P, Ford T L. Kafton M. Production of transgenic rice (*oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric dischange particel acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology, 1991, 9: 957～926

6 燕义唐，王晋芳，邱并生等.水稻条纹叶枯病毒外壳蛋白的基因在工程水稻植株中的表达.植物学报，1992.34(12)：899～906

7 Abel P P, Nelson R S, De B, *et al*. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, 1986, 232, 738～743

8 叶寅，田波.植物抗病毒基因工程研究进展和展望.见：荆玉祥等主编.植物分子生物学——成就与前景.北京：科学出版社，1995.242～253

维普资讯 http://www.cqvip.com

Inhibition of Replication of Rice Dwarf Virus in Transgenic Rice Plant Expressing Antisense Ribozyme gene

Yang Wending Wang Suyan Liu Weiping Yie Yin Tien Po

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080)

Wu Zujian Xie Lianhui

(*Institute of Plant Virology, Fujian Agricultural University, Fuzhou* 350002)

The plant expression vector pROKII containing antisense ribozyme gene of rice dwarf virus (RDV) S5 was transferred to rice immature embryo by microprojectile bombardment. The resistant calli were obtained in the presence of G418. Two or three months later these calli could differentiate to shoot after transferred to differential medium. The transformation of the regenerated rice plant was confirmed by Southern blot. Transgenic plants were inoculated with viruliferous leafhopper (*Nephotettix cincticeps*) to determine their RDV resistance. The results showed that the infection of RDV was not prevented, but the symptoms were milder than control. Most of the transgenic rice plants were fertile while the control was not. In order to assay the RDV replication, virus concentration was detected by ELISA. The results indicated that the replication of RDV in transgenic plants was obviously inhibited.

Key words RDV, Antisense ribozyme gene, Transgenic rice, Inhibition of replication of RDV