

植物抗病及抗虫基因工程的研究进展

王 罡 季 静

(解放军农牧大学植物分子生物学研究室, 长春 130062)

提 要 建立在分子生物学技术基础上的植物基因工程操作, 为抗病虫害作物品种的培育提供了一条崭新而有效的途径。它主要通过将外源抗性相关基因导入受体植物以提高植物的抗性。目前, 在抗病虫害基因的分离、转化等方面均取得了令人瞩目的进展。本文将就抗病及抗虫基因工程两方面对目前的研究现状作一综述。

关键词 植物; 抗病基因工程; 抗虫基因工程

1 抗病基因工程

1.1 抗病毒基因工程

在植物抗病毒基因工程研究领域, 最主要的途径是病毒外壳蛋白途径, 通过烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因(cp 基因)导入烟草, 获得了抗该病毒的烟草植株。利用这一途径, 相继获得了抗黄瓜花叶病毒(CMS)、马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、烟草线条病毒(STV)、烟草脆病毒(TRV)、苜蓿花叶病毒(ALMV)和水稻条纹叶枯病毒(RSV)等抗病工程植株。对番茄 TMVcp 转基因植株的田间试验表明, 这类抗病毒转基因工程植株抗病性得到了明显的提高。在病毒感染时, 发病率很低(5%), 几乎不减产, 而对照发病率几乎高至 100%, 减产 26% ~ 35%。

除病毒壳蛋白途径外, 其它技术包括: a) 利用反义 RNA 技术; b) 利用病毒卫星 RNA; c) 利用病毒复制酶基因; d) 设计核酶, 剪切病毒 RNA; e) 利用植物本身编码的抗病毒基因, 如核糖体失活蛋白(RIP); f) 中和抗体法等。在上述抗病毒基因工程途径中, 以病毒外壳蛋白途径最为成熟。以此途径获得的外壳蛋白转基因植物已有近 40 例。另外, 利用反义 RNA 技术已成功地获得转基因烟草。以病毒卫星 RNA 技术获得了对 TMV 免疫的工程植株。利用病毒复制酶基因抗病毒技术, 已成功地将 TSV 中编码 54KD 蛋白基因导入烟草中, 并得到抗 TMV 病毒的植株。其它 3 种技术目前尚在探索中。

1.2 抗细菌基因工程

1.2.1 利用致病菌体本身的抗性基因

通过克隆抗菜豆毒素的 OCTase 基因并导入烟草, 成功地获得了抗菜豆假单胞菌的转基因烟草。毒素接种叶片实验表明, 对照烟草产生了黄化的晕圈, 同时, 叶绿素含量下降了 30%, 而在转基因烟草, 即使用 10 倍浓度的毒素, 也未见黄化症状发生, 叶绿素含量没有发生改变。进一步采用假单胞菌接种, 对照中部分植株发生系统感染, 黑暗中不能生长, 最终死亡, 而在转基因烟草中, 不发生系统感染, 并有过敏反应, 在黑暗中可以正常伸长。另

外,将抗烟草毒素的乙酰转移酶基因转入烟草,并获得了野火病的抗性。

1.2.2 抗菌肽

在昆虫体内分离的抗菌肽具有很强的杀菌能力,而且是广谱性的,对植物病原菌也有较强的作用。将编码抗菌肽的基因导入烟草,获得了转化植株,以青枯病细菌强毒株接种,与对照相比,明显推迟了发病,病害程度及死苗率均显著降低。以梨火疫病接种转入 attacin - E 裂解肽基因的转基因苹果中发现病害程度明显减轻。另外,在植物中也分离出了一些抗菌肽,如劳氏紫、Zeamatin,在真菌或细菌中也发现了抗菌肽。

1.3 抗真菌基因工程

1.3.1 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶基因

β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在单独存在或同时存在时,能显著抑制病原真菌的生长。这是由于这两种酶作用的底物——葡聚糖及几丁质在植物中不存在,但却是大多数真菌的胞壁的组成成分。Toyoda 等将外源几丁质酶注入到大麦中,发现白粉病菌的侵染结构被破坏并有效地阻止其侵入。通过反义 RNA 技术在拟南芥中人为降低几丁质酶活性,植物感病性明显增加。目前已从一些作物,如烟草、水稻、菜豆、油菜、拟南芥及甜菜中克隆出一些几丁质酶基因。Broglie K 等将菜豆几丁质酶基因 CH5B 与强启动子 CaMV35S 融合,形成嵌合基因并成功地转入烟草,转化植株栽至接种立枯丝核菌的土壤中,其死苗率比对照下降 30% 以上。另外,从微生物中也克隆出了一些几丁质酶基因。田间实验证实,这些转基因植物对立枯丝核菌表现出高度抗性。有关葡聚糖酶基因的研究也已取得了相应进展,目前已相继从烟草、大麦及豌豆中克隆出一些葡聚糖酶基因,并将大豆葡聚糖酶基因导入烟草,获得了比对照葡聚糖酶量高出一倍的转基因植株,转基因植株表现出了对赤星病及黑星病的抗性,而导入葡聚糖酶反义 RNA 的植株中,该酶活性显著低于对照。

1.3.2 核糖体失活蛋白(RIP)

这是一类病原菌侵染过程中植物防御反应中出现的一类蛋白。从大麦种子中分离纯化的分子量 30 KD 的 RIP 对病原真菌,如稻瘟病菌的生长有显著的抑制作用,并证实 RIP 在抗真菌方面与几丁质葡聚糖酶有协同作用。将 RIP 基因与马铃薯 wun1 基因的启动子融合形成的嵌合基因导入烟草,获得了表达该 RIP 蛋白的转基因植株,抗真菌病害能力明显提高。

在抗细菌、真菌方面的技术途径还有很多,并取得了相应进展。如病程相关蛋白、溶菌酶、植物保卫素合成所需酶基因、咖啡酰辅酶基因、多半乳糖醛酸酶抑制蛋白和过氧化物酶等。

2 抗虫基因工程

2.1 苏云金芽胞杆菌毒蛋白基因

利用苏云金芽胞杆菌(BT)中毒蛋白对害虫的毒害作用,将该基因导入植物中,这种转基因植物可以防止害虫的侵害,而对一些益虫、动物及人类没有毒害作用。苏云金芽胞杆菌在细胞形成芽胞时产生一种蛋白—— δ -内毒素,这种毒素在昆虫体内被蛋白酶分解为毒性多肽。从而引起昆虫减少或停止进食,最后昆虫肠壁细胞坏死并导致死亡。目前,通过分子克隆技术成功地分离出 Bt 毒蛋白基因[cryIA(b)],它编码 1155 个氨基酸,其毒性区域位于 N 末端 29~607 位置,而 C 端区为杀虫蛋白特异区域,与 Cry 晶体蛋白和昆虫肠细胞膜上的受体结合有关。目前,已对数十个苏云属芽胞杆菌毒蛋白基因进行了测序。由于野生型 Bt 毒蛋白基因在植物体内表达不尽理想,对原基因进行了进一步切割,保留 N 端的原基因长度

一半的序列并转化烟草,转化植株中 δ -内毒素的含量较野生型毒蛋白基因高出10倍。Perlak等对野生型Bt毒蛋白基因[cryIA(b)]AT富含区进行点突变,改变了其中63个碱基对,AT含量由63%下降至59%,而ATTTA重复序列也从13个减少至7个,含有这种经修饰的Bt毒蛋白基因的转基因植物体中产生的 δ -内毒素的含量比含有野生型的转基因植物体内的含量高10倍。采用相同方法,成功地转化了番茄,使其产生了抗烟草天蛾的能力。进一步在不改变编码的氨基酸序列的前提下,人工合成的Bt毒素蛋白基因(AT含量下降至51%,去除了所有ATTTA重复序列)转化植物后,其 δ -内毒素含量较转化野生型的植株提高了50~100倍,取得了良好的抗虫效果。在我国利用苏云金芽胞杆菌抗虫基因的研究也取得了良好的进展,相继获得了抑制烟草夜蛾生长发育的转基因烟草及转基因水稻、杨树和棉花。

2.2 蛋白酶抑制剂基因

其机理是蛋白酶抑制剂可以同昆虫消化道内的蛋白消化酶形成复合物,阻断或削弱蛋白酶的水解作用,同时造成昆虫的厌食反应甚至死亡,从而达到抗虫目的。目前,已分离出多种蛋白酶抑制剂基因或cDNA克隆,转基因植株抗虫效果良好。其中最引人瞩目的是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因、马铃薯蛋白酶抑制剂基因及水稻巯基蛋白酶抑制剂基因。目前,豇豆胰蛋白酶抑制剂基因已被分离并成功地导入烟草。DNA分子杂交、Western杂交及ELISA检测证实,整合基因能稳定遗传并能正确表达,其表达量占可溶性蛋白的0.9%,这些转基因植株具有较强的抗虫性。另外,在白薯及杨树上也成功地获得了转基因植株。马铃薯蛋白酶抑制剂-II基因产物分子量为12.3KD,有两个活性中心,可分别抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。目前已成功地将这一基因导入烟草并获得了明显的抗烟草天蛾的能力。水稻巯基蛋白酶抑制剂基因的抗虫谱同豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的抗虫谱具有互补性,其抗虫效果很显著,现已获得了这一基因的cDNA,并进行了测序,同时获得了转基因烟草。

2.3 淀粉酶抑制剂基因

淀粉酶抑制剂能普遍抑制哺乳动物及昆虫体内的 α -淀粉酶活性,但对植物本身及细菌的 α -淀粉酶不起作用。其杀虫机理在于抑制了昆虫消化道内 α -淀粉酶活性,使食入的淀粉不能消化水解,从而阻断了昆虫的主要能量来源。目前,在小麦及大麦中已克隆出多个淀粉酶抑制剂基因及cDNA,转化烟草的实验证实,该基因在体内可正确表达。体外实验表明,该基因产物可对黄粉虫中肠道 α -淀粉酶有显著抑制作用,但由于它具有抑制哺乳动物 α -淀粉酶活性,因此,其应用前景不甚乐观。

2.4 外源凝集素基因

外源凝集素在多种生物体中均有发现,以豆科植物种子含量最高。外源凝集素的生理作用是多方面的,保护植物免受害虫的侵害只是其功能之一。害虫一旦摄入,外源凝集素便同害虫肠道围食膜上的糖蛋白结合,从而影响营养的吸收,并促进消化道内细菌的繁殖,从而造成对害虫的毒害。目前已成功获得豌豆外源凝集素基因的转基因烟草及马铃薯,其抗虫效果显著。有关植物抗虫基因工程的研究除上述4种主要途径外,几丁质酶基因、核糖体失活蛋白基因、昆虫病毒、蜕皮激素抑制剂基因、蝎毒素控制基因以及豌豆脂肪氧化酶基因对植物的抗虫效果研究也在进行中。

综上所述,植物抗性基因工程的研究方兴未艾,随着对植物产生抗性分子机制认识的不断深入及基因克隆技术的不断改进完善,必将有更多新的抗病、抗虫基因不断被克隆,在育种中结合基因工程手段提高作物的抗性进行分子育种将为期不远。

参 考 文 献

- 1 田颖川等. 苏云金杆菌 δ -内毒素基因在大肠杆菌中的克隆及表达. 生物工程学报, 1989, 5(1): 11 ~ 18
- 2 刘进元等. 植物抗病基因工程的研究进展. 生物工程进展, 1994, 14(2): 31 ~ 34
- 3 宋凤鸣等. 植物抗真菌和细菌病害基因工程的策略及其进展. 植物生理学通讯, 1996, 32(1): 64 ~ 70
- 4 谢道昕等. 苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株. 中国科学 (B 辑), 1991, 4: 367 ~ 374
- 5 Abel P P, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science. 1986, 232: 738 ~ 743
- 6 Adang M J, et al. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene. 1985, 36: 289 ~ 300
- 7 Baulcombe D C, et al. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. Nature. 1986, 321: 446 ~ 449
- 8 Bent A F, et al. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science. 1994, 265: 1856
- 9 Broekaert W F, et al. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. Biochemistry. 1992, 31: 4308 ~ 4314
- 10 Broglie K, et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science. 1991, 254: 1194 ~ 1197
- 11 Cornelissen B J C, et al. A tobacco mosaic virus induced tobacco protein is homologous to the sweettasting protein thaumatin. Nature. 1986, 321: 531 ~ 532
- 12 Gibbons A. Moths take the field against biopesticide. Science. 1991, 254: 646
- 13 Hain R, et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature. 1993, 361: 153 ~ 156
- 14 Hammock B D, et al. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. Nature. 1990, 344: 458 ~ 461
- 15 Johal G S, Briggs S P. Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. Science. 1992, 258: 985 ~ 987
- 16 Jones D A, et al. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science. 1994, 266: 789 ~ 793
- 17 Jones J D G, et al. Visual detection of transposition of the maize element *activator* (*Ac*) in tobacco seedlings. Science. 1989, 244: 204
- 18 Martin G B et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science. 1993, 262: 1432 ~ 1436

Progress on Transgenic Disease and Insect Resistance Plants

WANG Gang JI Jing

(Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062)

Abstract Based on molecular biological techniques, plant genetic engineering and manipulation lead to a new and effective way for producing varieties resistant to diseases and insects. Resistance can be enhanced by transforming resistant genes into plants. Recently much progress has been made for isolation and transformation of disease and insect resistance genes. This article will review the progress of transgenic plants both in disease and in insect resistance.

Key words Plant, Transgenic disease resistance. Transgenic insect resistance