

基于抗体的小麦赤霉病抗性研究进展

廖玉才^{1,2}, 李和平^{1,3}

1. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070

2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

3. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 由镰刀菌引起的小麦赤霉病, 不仅降低产量和品质, 所形成的真菌毒素还会影响食品安全。植物缺乏高抗小麦赤霉病的资源, 因此从动物中筛选、分离抗病抗体及其基因, 可为培育植物抗病品种提供新种质, 也拓展了开发研究新抗源的渠道。抗病抗体能特异靶向真菌蛋白、抑制抗原的功能; 抗体与抗菌肽和顺式表达调控元件结合, 使病菌能诱导抗体融合蛋白在镰刀菌侵染小麦的颖壳高效表达, 从而有效抑制病菌侵入、扩展及毒素积累。本文综述抗病抗体的抗原类型、抗病抗体及其融合蛋白在体外和植物中的表达以功能、抗原基因结构与功能、抗体抗病机理的研究进展。

关键词 抗体介导的抗病性; 小麦赤霉病; 镰刀菌; 膜蛋白; 乙二醛氧化酶; 真菌毒素

小麦赤霉病是世界上广泛流行的重要真菌病害。赤霉病菌主要在小麦开花期侵染颖壳、小麦灌浆期致病, 引起麦穗枯萎、籽粒发育受阻, 发病的麦穗及其麦粒常呈现红色霉变(赤霉)症状^[1]。所以小麦赤霉病不仅直接降低小麦产量和品质, 病原菌在侵染小麦过程中产生的真菌毒素, 如脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV), 直接积累存留在小麦籽粒中, 进入食物链, 危害人、畜健康^[2-5]。因此, 小麦赤霉病抗性既影响小麦高产、稳产, 也与食品安全和人类健康密切相关。

在中国, 小麦赤霉病过去主要在长江中下游冬麦区、东北春麦区和华南冬麦区发生流行, 平均约6年大流行一次^[1]。但是, 随着全球气候变化、玉米-小麦轮作、秸秆还田等耕作制度的变化, 2000年以来就已大流行7次(2003、2008、2009、2010、2012、2015、2016年), 很多田块甚至绝收; 而收获的麦粒赤霉菌毒素污染也相当严重^[5]; 同时, 小麦赤霉病发生流行的另一个趋势是, 正在向过去很少发病的北方小麦主产区如黄淮麦区和关中麦区扩展。如2012年中国小麦赤霉病特大流行, 河南、山东发病面积大、程度重^[6]。北美、欧洲自20世纪90年代中期以来, 小麦赤霉病重新大流行, 造成重大经济损失^[7-9]。

小麦赤霉病之所以如此发生流行而未能得到有效控制,

关键问题是植物中缺乏高抗或免疫的赤霉病抗源, 生产上种植的一些小麦品种的抗病水平不高, 抗病机理不清, 使小麦抗赤霉病、高产品种培育成为世界性难题^[9-11]。同时, 由于喷雾化学杀菌剂一直是中国小麦赤霉病防治主要措施, 不仅污染环境, 还产生许多抗药赤霉菌菌株^[12-13]。因此, 开拓小麦赤霉病新抗源, 利用动物免疫防卫系统中的抗体, 改良小麦的赤霉病抗性, 将为小麦赤霉病抗性改良开辟新途径。本文综述抗赤霉病抗体应用及抗体抗病机理的研究进展。

1 植物抗体的类型

植物细胞表达的抗体为植物抗体(plantibody)^[14]。抗体是脊椎动物免疫系统产生的可鉴别、中和或抑制病原菌等外来物质的一类蛋白质, 具有与其对应抗原结合的特异性与亲和力。植物本身不能像动物一样产生抗体, 但是同为真核生物的植物细胞, 具有表达、加工和修饰动物抗体的条件和能力, 表达的抗体与来自动物细胞的抗体的特异性及亲和力相似、功能相同^[15]。如果植物表达的抗体与植物某一性状有关, 这类植物抗体就可改变植物的这一特定性状。Hiat等^[16]最早在植物中表达来自杂交瘤的单克隆抗体, 利用完整的重链和轻链编码序列, 重、轻链在植物细胞中装配形成四聚体抗体(分子量约150 kD)(图1)。植物表达的单克隆抗体能够显著

收稿日期: 2016-08-29; 修回日期: 2016-10-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB127801); 国家自然科学基金项目(30530510, 30571160, 30771337, 3071120181, 31271718, 31272004); 国家转基因专项(2011ZX08002-001, 2016ZX08002001-003)

作者简介: 廖玉才, 教授, 研究方向为作物遗传育种, 电子邮箱: yucailiao@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 廖玉才, 李和平. 基于抗体的小麦赤霉病抗性研究进展[J]. 科技导报, 2016, 34(22): 68-74; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.22.009

提高植物的抗病毒病能力^[15,17]。

植物可以表达不同类型的抗体。随着分子生物学与免疫学的结合及发展,以噬菌体展示技术筛选的单链抗体(single chain-variable fragment, scFv)^[18],仅含抗体重链和轻链的变异区序列,中间以一个可塑性强、易折叠的短肽连接,整个抗体分子量约 26 kD(图 1)。分离单链抗体时,同时分离编码抗体的基因。小分子量单链抗体不仅因其在哺乳动物血管

中移动速度快而备受医学界重视,也十分有利于各种遗传操作,构建双功能抗体融合蛋白^[19-21]。单链抗体已广泛用于植物抗病基因工程^[22-24]、改良植物代谢发育过程^[25]、药物开发^[26]等领域。迄今已在植物中功能表达来自鼠、鸡、骆驼、羊、人等多种不同类型的抗体(图 1),如单克隆抗体、单链抗体、双单链抗体、双抗体以及抗体融合蛋白等^[15,17,27-30]。

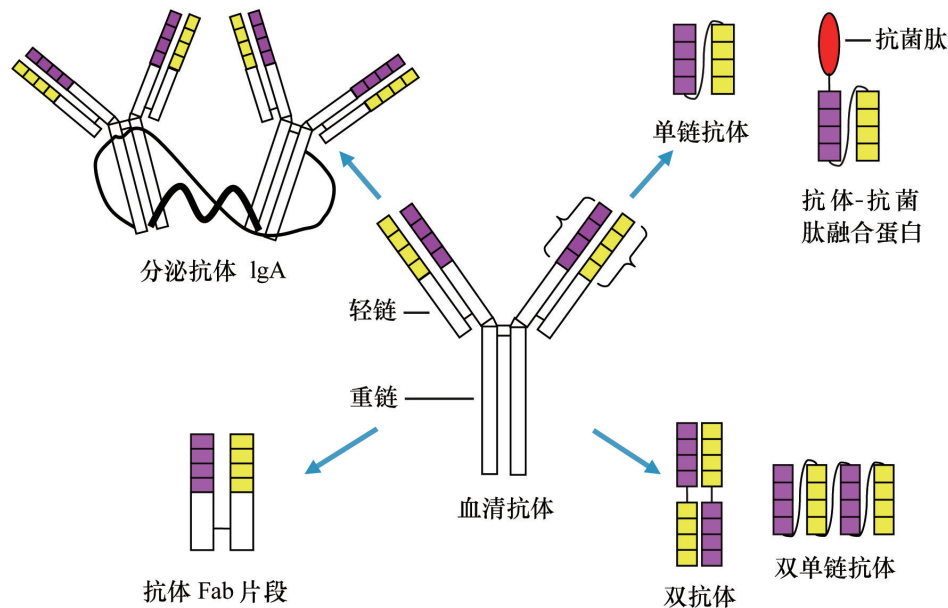


图 1 植物表达的不同抗体

Fig. 1 Different antibody formats expressed in transgenic plants

2 抗赤霉病抗体的分离及人工分子进化

抗赤霉病抗体 CWP2 是分离的第一个抗真菌病害的抗体^[19],它可赋予植物抵抗镰刀菌侵染和扩展的能力。分离抗病抗体,选择合适的抗原免疫动物是关键的一步。赤霉菌抗原具有以下特征:1) 制备抗原的小麦赤霉菌菌株,应是中国乃至世界上小麦赤霉病流行区域的主要代表性致病菌;2) 抗原应位于菌丝细胞表面,有利于抗体的识别与结合;3) 抗原应是赤霉菌致病的关键组成部分,抗体与抗原结合可干扰抗原的功能,即可影响赤霉菌的致病力;4) 制备抗原的菌株产生的毒素,是中国小麦籽粒中污染率最高、污染量最大的 DON 毒素。为了选择符合这些条件的菌株制备抗原,瞿波等于 20 世纪 90 年代末收集了全国 13 省、市小麦赤霉病流行频繁地区的赤霉病样品^[31],分离、纯化菌株,分析了它们的群体遗传结构、种群类型、致病力和产毒性,并与欧、美菌株比较^[32-36]。结果表明,来自小麦赤霉病重灾区湖北武昌的菌株 5035,为禾谷镰刀菌亚洲种,这个种是中国小麦赤霉菌群体

中数量最多的种群类型;这个菌株产生 DON 毒素致病力强,具有小麦赤霉病菌的典型特征^[31,37];制备其菌丝细胞壁结合蛋白(cell wall-bound proteins, CWPs),作为抗原免疫鸡,从鸡的脾脏细胞提取 RNA,反转录后构建单链抗体基因文库,经噬菌体展示分离、获得赤霉菌特异抗体 CWP2 及其编码基因^[19]。

免疫荧光定位分析证实,CWP2 抗体特异识别赤霉菌菌丝表面抗原。抗原特异性和交叉反应测定表明,CWP2 抗体能识别不同镰刀菌细胞壁结合蛋白,但与非镰刀菌属真菌没有任何交叉反应,表明 CWP2 是一个镰刀菌属特异抗体。植物抗病功能鉴定表明,在植物中组成型表达 CWP2 基因,可显著提高植物对禾谷镰刀菌、尖孢镰刀菌的抗性^[19]。近年来,基于上述类似的策略和技术,先后分离了油菜菌核病菌、大豆猝死综合症病菌特异抗体,均可显著提高转抗体基因植物对这些真菌病害的抗性^[38-39]。上述结果表明,动物免疫体系的防卫分子,也可用于控制植物真菌病害。

人工分子进化抗病抗体 CWP2, 进一步提高了这个抗体与抗原结合的亲和力及抗病能力。通过 DNA Shuffling 体外诱变优化 CWP2 抗体序列, 构建抗体基因库, 经噬菌体展示筛选获得了亲和力比原始抗体提高的抗体 CWP_a^[40]。表面等离子体分析表明, 体外诱变筛选的抗体 CWP_a 比原始抗体 CWP2 的亲和力提高了 15 倍, 抗病性提高 26%^[41]。抗体三维结构模拟分析也表明, 序列优化的 CWP_a 抗体, 所有 6 个 CDR 区域全部聚集展现在抗体分子表面, 使抗体 CDR 能与抗原充分结合, 从而提高了抗体的亲和力。这些研究结果说明, 抗体作为病菌特异抗病基因, 在植物抗病改良中具有十分广阔的发展应用前景, 特别是在天然植物抗病资源匮乏的植物抗病育种中, 必将发挥更为重要的作用。如果病原菌抗原发生了变异, 可通过体外人工分子进化, 筛选适应变异抗原的抗病抗体。

3 抗体融合蛋白的双重功能与抗体的导向作用

抗体融合蛋白是指将抗体与另一个蛋白质编码序列置于同一个开放阅读框内, 在这 2 个蛋白序列之间以一个可折叠的短肽连接, 使 2 个功能不同的蛋白表达形成一个双功能融合蛋白^[19-21]。体外抑菌研究表明, CWP2 抗体与不同抗菌肽形成的融合蛋白在细菌中表达纯化后, 可在体外高效抑制赤霉菌生长; 而单独的抗体、抗菌肽或抗体和抗菌肽的混合物, 在同样条件下则没有抑菌活性^[19]。由此说明, 抗体和抗菌肽融为一体形成的融合蛋白, 是抑菌活性的关键; 在这个融合蛋白中, 抗体具有识别并结合赤霉菌抗原的特异性与亲和力, 在识别与结合过程中, 将抗体融合蛋白导向赤霉菌抗原靶点, 富集于病菌感染结构表面, 其中的抗菌肽直接作用于赤霉菌, 破坏病菌细胞结构; 同时抗体与赤霉菌抗原特异结合, 干扰了抗原的生物学功能, 从而影响病菌生长发育。这些研究结果表明, 抗体融合蛋白不仅兼具抗体及抗菌肽的双重功能, 还有特异靶向抗原的作用。

植物抗体 CWP2 的作用与体外鉴定结果一致。在拟南芥中, CWP2 抗体可显著提高植物对镰刀菌的抗性, 而表达抗体-抗菌肽融合蛋白的植株的抗病力更强, 显著高于只表达单独抗体的植株^[19]。但是, 无论是表达抗体还是表达抗体融合蛋白的转基因植株, 均对非镰刀菌属真菌没有抗性。这些结果再次证明, 镰刀菌属特异抗体 CWP2, 通过识别与结合寄生在植物细胞中的镰刀菌表面抗原, 干扰抗原的功能, 影响病菌的生长扩展, 从而降低植株的病害症状; 在表达抗体融合蛋白的植物中, 抗体部分将融合蛋白导向靶点, 并与抗原结合, 同时其中的抗菌肽直接破坏真菌细胞, 因此病菌所受影响更大, 植物表现的抗病性更强。单独的 CWP2 抗体在体外抑菌活性不高, 但在植物中具有抗病作用, 可能与下列因素有关: 1) 赤霉菌菌丝在马铃薯-葡萄糖培养基中生长速度快, 而抑菌活性分析中仅加了一次抗体, 不断生长增加的菌丝量大大高于抗体, 因而抑菌效果不显著, 而在植物细胞中, 菌丝

生长速度相对较慢, 而组成型表达的抗体可以不断积累, 富集于菌丝表面; 2) 真菌菌丝细胞壁在体外与植物细胞中不同, 真菌侵染会诱发植物细胞激活防卫蛋白如几丁质酶表达, 破坏真菌细胞壁从而增加菌丝细胞的透性, 有利于抗体与病菌抗原的结合。所以, CWP2 抗体能赋予植物抗病性。

进一步将抗病作用突出的抗体融合蛋白转入小麦品种中, 组成型表达后, 在中国小麦赤霉病流行地区接近自然感病的条件下, 接种赤霉病菌, 分析鉴定其抗病作用。研究表明, 抗体融合蛋白可在小麦中稳定表达, 极显著提高小麦抗赤霉菌侵入 (type I) 和扩展 (type II) 的能力, 不同世代的转基因小麦抗性表现高度一致^[42], 说明这种抗性可以稳定遗传。因此, 抗体融合蛋白可作为一种抗病新资源, 用于改良小麦品种的赤霉病抗性。

4 赤霉菌诱导表达抗体融合蛋白与植物主动免疫

将病原菌诱导表达与抗体导向功能结合, 实现抗体融合蛋白表达的时空调控, 在植物抗病基因工程中具有重要意义。为了实现这一目标, 最近 Cheng 等^[43]利用富含病菌诱导顺式元件的颖壳特异启动子 Lem2, 调控抗体融合蛋白在中国主推小麦品种郑麦 9023 中表达, 筛选获得的小麦材料既抗赤霉菌侵入 (type I) 和扩展 (type II), 也抗赤霉菌毒素积累 (type III)。Lem2 是来自大麦的颖壳特异表达启动子^[44-45], 基因表达分析证实, Lem2 调控的抗体融合蛋白基因, 主要在小麦颖壳和内稃中表达, 在小麦叶片、胚或胚乳中表达量极低。实时定量 PCR 分析表明, 赤霉菌侵染小麦颖壳 24~96 h 后, 赤霉菌侵染可诱导小麦颖壳中抗体融合蛋白表达量增加 5 倍。组织化学分析进一步证实, 赤霉菌侵染表达抗体融合基因小麦的颖壳, 确实可通过激活转基因表达, 降低颖壳中赤霉菌的定殖量, 从而增强植物的抗病能力。

赤霉菌侵染植株诱导表达对赤霉菌具有特异性和亲和力的抗体融合蛋白, 是一种植物主动免疫的表现, 这一特征与注射疫苗的脊椎动物的主动免疫相似。脊椎动物一旦接受某一病原菌的疫苗, 在机体应答疫苗产生的抗体中, 一小部分转化为记忆细胞储存在体内; 当该菌再次感染机体时, 这些记忆细胞就会迅速激活而诱发机体产生大量相同的抗体, 以抵抗病原菌, 动物的这种主动免疫可以持续数年乃至一生。所以, 尽管植物细胞没有动物的免疫系统, 但是可以分离病菌特异抗体, 与病菌侵染诱导启动子组合在一起, 一并导入植物细胞, 就可人工创建植物主动免疫, 赋予植物在整个生长阶段的抗病能力。

将抗体-抗原互作特异性、病菌诱导特异性和组织表达特异性“三位一体”, 用于控制主要作物重要病原真菌及其毒素, 为在植物生物技术育种中广泛开拓、挖掘和综合应用不同生物资源提供了信息和依据。转基因组织特异表达可节省植物能量, 这是转基因生物研究关注的热点^[46]。在植物不需要转基因产物发挥作用时, 较低的表达量可为植物节省能

量。颖壳是赤霉菌花期侵染小麦最主要的部位^[12,10],也是赤霉菌毒素合成及转移至小麦籽粒的主要场所^[47]。在小麦赤霉病发生的这个关键部位,聚合3种不同的抗病机制,是有效抵抗赤霉菌侵入和扩展、降低毒素积累的最佳选择。禾谷镰刀菌为非专化寄生菌,可侵染小麦、大麦、玉米等多种作物和其他植物^[2,10,48-49],基于抗体的赤霉病控制技术,也可用于其他植物的镰刀菌抗性改良。

5 抗体抗赤霉病机理

抗体CWP2究竟与赤霉菌表面哪一种抗原结合?这种抗原具有哪些生物学功能?抗体又如何介导赤霉病抗性?这些问题均是揭示抗体抗病机理的关键。要回答这些问题,首先需要鉴定、克隆赤霉菌表面抗原编码基因。

Song等^[50]利用免疫蛋白组技术,经双向电泳和免疫杂交,从赤霉菌5035菌株细胞壁蛋白中,发现CWP2特异结合的抗原为单拷贝乙二醛氧化酶(glyoxal oxidase, GLX)基因编码的蛋白质,含有多个跨膜结构域;GLX-GFP融合蛋白细胞定位及免疫荧光标记分析一致表明,GLX蛋白位于细胞膜上。敲除GLX基因的GLX缺失突变5035菌株的细胞壁蛋白,缺少CWP2抗体结合的蛋白质。酶活测定分析表明,GLX蛋白催化产生过氧化氢;GLX基因缺失突变体酶活降低61%~68%,而GLX过表达菌株的酶活提高13%~18%。抗体CWP2可特异抑制氧化酶活性,显著降低过氧化氢产物。GLX缺失突变体的致病力降低68%~73%,毒素合成降低7~17倍。这些结果充分证明,GLX基因编码的蛋白,就是CWP2抗体识别的抗原。

前期研究表明,CWP2是镰刀菌属特异抗体,可以识别不同镰刀菌表面抗原^[19]。串珠镰刀菌和尖孢镰刀菌,分别是侵染玉米和番茄的主要致病菌^[49]。序列分析表明,串珠镰刀菌、尖孢镰刀菌的GLX基因,与禾谷镰刀菌GLX基因的拷贝数和结构相同、同源性高达97%^[50]。串珠镰刀菌和尖孢镰刀菌GLX基因缺失突变体,在玉米和番茄上的致病力分别降低84%和68%,串珠镰刀菌合成伏马菌素毒素能力下降7倍^[50]。因此,乙二醛氧化酶在镰刀菌属高度保守,是镰刀菌属真菌的致病因子,参与真菌毒素合成。

GLX基因的功能解析^[50],为阐明CWP2抗病机理提供了依据(图2:基于Song等^[50]修改)。研究表明,GLX是镰刀菌侵染植物的关键基因,也是控制镰刀菌的理想靶点。GLX催化产生的过氧化氢,与过氧化物酶结合^[51];在镰刀菌侵染植物过程中,过氧化氢参与降解植物细胞壁,促进病菌侵染扩展^[52-57];同时过氧化氢又在毒素合成中具有关键作用,赤霉菌毒素也是致病因子^[58-59];GLX为跨膜蛋白,具有类似动物T细胞受体的作用,可作为特异抗体的锚定位点,富集抗体。在抗病转基因植物中,植物表达的抗体CWP2靶向赤霉菌细胞膜上的GLX蛋白,抑制GLX酶活性,降低过氧化氢产物量,从而既可减少植物细胞壁的伤害,又可降低病原菌的致病力和产毒量,因而阻碍了病菌生长,增强了植物的抗性;抗体融合蛋白除了具有抗体的作用外,其中的抗菌肽可直接破坏真菌细胞壁;只要存在病原菌的GLX抗原,植物细胞不断表达的抗体就可找到靶点并与其结合,这种双功能分子的协同作用,赋予植物的持久抗病性。CWP2抗体基因同GLX抗原基因的互作,类似专性寄生菌与其宿主的“基因对基因”互作模

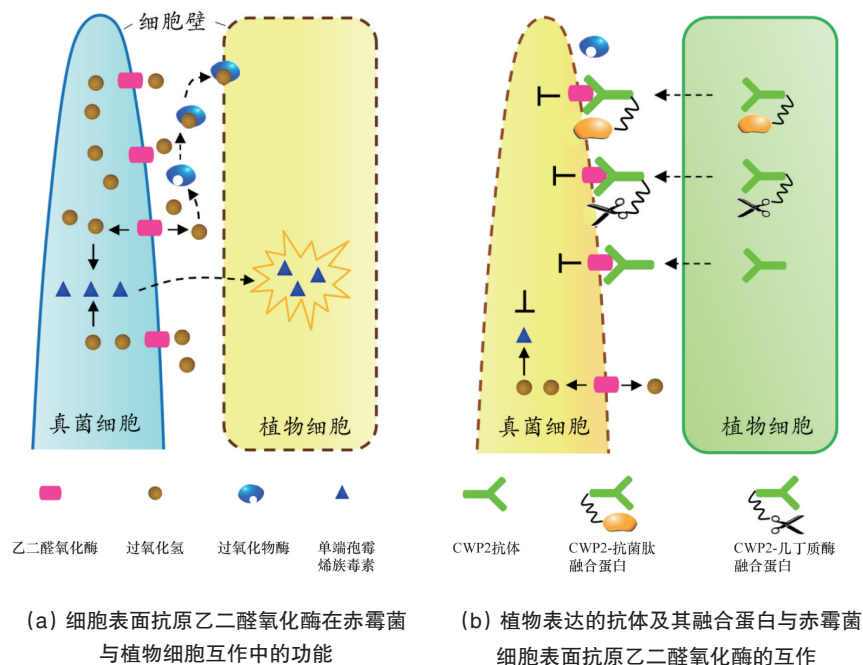


图2 抗赤霉病抗体抗病机理

Fig. 2 Mechanism of a disease resistance antibody against Fusarium head blight

式,当抗体和抗原基因同时存在时,植物表现抗病,缺少其中的一个,就可能出现感病。由此说明,在非专化寄生菌与植物互作的体系中,可通过人工创建“基因对基因”互作,提高植物的抗病性。

6 结论

抗赤霉病抗体 CWP2 的应用及其抗病机理解析,为开发和应用抗病抗体控制小麦赤霉病和其他镰刀菌引起的植物病害,以及人类疾病展示了广阔的前景。但是,抗体介导的小麦赤霉病抗性也存在一些问题。

1) 抗赤霉病抗体数量有限。尽管应用类似思路分离获得多个镰刀菌特异抗体,但是通过植物抗体验证其抗病功能的较少,这与小麦转化效率较低、成本高有关;

2) 赤霉菌抗原靶点不多。只有抗病抗体靶向的抗原是赤霉菌致病发育关键位点,才能充分发挥抗体的作用。目前候选的病菌抗原靶点数目较少;

3) 抗体筛选技术限制。目前筛选重组抗体主要采用噬菌体展示技术,这需要构建多样性高、来自免疫动物的抗体基因文库,技术要求高、投入大;利用未经免疫的抗体库筛选,往往难于获得高亲和力抗体;一些来自杂交瘤细胞的单链抗体往往表达量低、亲和力下降。

这些问题可采用以下途径加以解决:

1) 结合植物瞬间表达和小麦模式品种表达分析验证抗体功能,这些技术近年在小麦基因功能鉴定中发展较快;

2) 根据赤霉菌功能基因组研究进展筛选抗原靶点,近年通过酵母双杂交等技术鉴定一批赤霉菌致病发育关键蛋白,其中有些可作为候选基因,用作抗体的抗原。

3) 借助核糖体展示等技术,筛选抗病抗体。

参考文献(References)

[1] 陆维忠,程顺和,王裕中. 小麦赤霉病研究[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Lu Weizhong, Cheng Shunhe, Wang Yuzhong. Research on wheat scab [M]. Beijing: Science Publisher, 2001.

[2] Bai G H, Shaner G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight[J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42 (1): 135-161.

[3] Placinta C M, D'Mello J P F, Macdonald A M C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins[J]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 78(1/2): 21-37.

[4] Pestka J J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance[J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(9): 663-679.

[5] Zhang J B, Wang J H, Gong A D, et al. Natural occurrence of *Fusarium* head blight, mycotoxins, and mycotoxin-producing strains of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei[J]. Plant Pathology, 2013, 62 (1): 92-102.

[6] 程顺和,张勇,别同德,等. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 938-942.
Cheng Shunhe, Zhang Yong, Bie Tongde, et al. Damage of wheat *Fusari-*

um head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2012, 28(5): 938-942.

[7] McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact[J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1340-1348.

[8] Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops[J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(6): 515-525.

[9] Windels C E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the northern great plains[J]. Phytopathology, 2000, 90(1): 17-21.

[10] Xu X M, Nicholson P. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight[J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47(1): 83-103.

[11] 刘大钧. 小麦抗赤霉病育种——一个世界性难题[C]/21世纪小麦遗传育种展望——小麦遗传育种国际学术讨论会文集. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 4-12.
Liu Dajun. Breeding wheat for scab resistance: A worldwide hard nut to crack[C]/Proceedings of International Conference on Wheat Genetics and Breeding—Perspectives of the 21st Century for Wheat Genetics and Breeding. Beijing: Agriculture Publisher, 2001: 4-12.

[12] Liu X, Yin Y, Wu J, et al. Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zeae*[J]. Plant Disease, 2010, 94(9): 1137-1142.

[13] Yuan S K, Zhou M G. A major gene for resistance to carbendazim, in field isolates of *Gibberella zeae*[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2005, 27(1): 58-63.

[14] Liao Y C, Li H P, Yao M J, et al. Plantibodies: A novel strategy to create pathogen-resistant plants[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2006, 23: 253-271.

[15] Voss A, Niersbach M, Hirsch H J, et al. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody[J]. Molecular Breeding, 1995, 1(1): 39-51.

[16] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Antibodies produced in plants[J]. Nature, 1990, 344: 469-70.

[17] Safarnejad M R, Jouzani G S, Tabatabaie M, et al. Antibody-mediated resistance against plant pathogens[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 961-971.

[18] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. Nature, 1990, 348: 552-554.

[19] Peschen D, Li H P, Fischer R, et al. Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to anti-fungal peptides protect plants against fungal pathogens[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(6): 732-738.

[20] Hu Z Q, Li H P, Zhang J B, et al. A phage-displayed chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Fusarium* pathogens and their presence in cereal grains[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 764: 84-92.

[21] Xue S, Li H P, Zhang J B, et al. Chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Aspergillus* pathogens and their presence in natural samples by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(22): 10992-10999.

[22] Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, et al. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected

- from virus attack[J]. *Nature*, 1993, 366: 469–472.
- [23] Galeffi P, Lombardi A, Donato M D, et al. Expression of single-chain antibodies in transgenic plants[J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 823–827.
- [24] Zimmermann S, Schillberg S, Liao Y C, et al. Intracellular expression of TMV-specific single chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 369–379.
- [25] Jobling S A, Jarman C, Holmberg, N, et al. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(1): 77–80.
- [26] Ma J K C, Drake P M W, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants[J]. *Nature Review Genetics*, 2003, 4: 794–805.
- [27] Boonrod K, Galetzka D, Nagy P D, et al. Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(7): 856–862.
- [28] Hu Z Q, Li H P, Zhang J B, et al. Antibody-mediated prevention of *Fusarium* mycotoxins in the field[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9: 1915–1926.
- [29] Nölke G, Cobanov P, Uhde-Holzem K, et al. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(1): 41–49.
- [30] Liao Y C, Li H P, Zhang J B, et al. Antibody-mediated protection of plants against *Fusarium* pathogens[C]. McIntosh R, ed. *Proceedings Borlaug Global Rust Initiative 2012 Technical Workshop*. Beijing: Borlaug Global Rust Initiative, 2012: 88–101.
- [31] 瞿波. 中国禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的遗传多样性及其与尼泊尔、欧美菌系的比较[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
Qu Bo. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in China and its comparison with the isolates from Nepal, Europe and USA[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2003.
- [32] Li H P, Wu A B, Zhao C S, et al. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(2): 505–511.
- [33] Wu A B, Li H P, Zhao C S, et al. Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* from China revealed by wheat coleoptile and floret inoculations[J]. *Mycopathologia*, 2005, 160(1): 75–83.
- [34] Zhang J B, Li H P, Dang F J, et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China[J]. *Mycological Research*, 2007, 111: 967–975.
- [35] Qu B, Li H P, Zhang J B, et al. Geographical distribution and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57: 15–24.
- [36] Qu B, Li H P, Zhang J B, et al. Comparison of genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* head blight pathogens from China and Europe revealed by SSCP and seedling assays on wheat[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57(4): 642–651.
- [37] Wang J H, Ndoye M, Zhang J B, et al. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex[J]. *Toxins*, 2011, 3: 1020–1037.
- [38] Yajima W, Verma S S, Shah S, et al. Expression of anti-sclerotinia scFv in transgenic *Brassica napus* enhances tolerance against stem rot [J]. *New Biotechnology*, 2010, 27: 816–821.
- [39] Brar H K, Bhattacharyya M K. Expression of a single-chain variable-fragment antibody against a *Fusarium virguliforme* toxin peptide enhances tolerance to sudden death syndrome in transgenic soybean plants[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2012, 25: 817–824.
- [40] Liu J L, Hu Z Q, Xing S, et al. Attainment of 15-fold higher affinity of a *Fusarium*-specific single-chain antibody by directed molecular evolution coupled to phage display[J]. *Molecular Biotechnology*, 2012, 52(2): 111–122.
- [41] 刘锦龙. 高亲和力和镰刀菌特异性单链抗体的获得和应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Liu Jinlong. Attainment and application of a high affinity *Fusarium*-specific single-chain antibody[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [42] Li H P, Zhang J B, Shi R P, et al. Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2008, 21(9): 1242–1248.
- [43] Cheng W, Li H P, Zhang J B, et al. Tissue-specific and pathogen-inducible expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and a fungal chitinase protects wheat against *Fusarium* pathogens and mycotoxins[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(5): 664–674.
- [44] Abebe T, Skadsen R W, Kaeppler H F. A proximal upstream sequence controls tissue-specific expression of Lem2, a salicylate-inducible barley lectin-like gene[J]. *Planta*, 2005, 221(2): 170–183.
- [45] Abebe T, Skadsen R, Patel M, et al. The Lem2 gene promoter of barley directs cell- and development-specific expression of gfp in transgenic plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2006, 4(1): 35–44.
- [46] Hensel G, Himmelbach A, Chen W, et al. Transgene expression systems in the Triticeae cereals[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(1): 30–44.
- [47] Snijders C H A, Krechting C F. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1992, 70(8): 1570–1576.
- [48] Ndoye M, Zhang J B, Wang J H, et al. Nivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade species are prevalent on maize throughout China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(10): 519–524.
- [49] Agrios G N. *Plant Pathology*[M]. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- [50] Song X S, Xing S, Li H P, et al. An antibody that confers plant disease resistance targets a membrane-bound glyoxal oxidase in *Fusarium* [J]. *New Phytologist*, 2016, 210(3): 997–1010.
- [51] Christensen J H, Baucher M, O'Connell A P, et al. Control of lignin biosynthesis[M]. Jain S M, Minocha S C, ed. *Molecular Biology of Woody Plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer, 2000: 227–267.
- [52] Obruca S, Marova I, Matouskova P, et al. Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552[J]. *Folia Microbiologica*, 2012, 57(3): 221–227.
- [53] Eudes A, Liang Y, Mitra P, et al. Lignin bioengineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 189–198.
- [54] Cohen B A, Amsellem Z, Lev-Yadun S. Infection of tubercles of the parasitic weed *Orobancha aegyptiaca* by mycoherbicidal *Fusarium* species[J]. *Annals of Botany*, 2002, 90: 567–578.
- [55] Walter S, Nicholson P, Doohan F M. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease[J]. *New Phytologist*, 2010, 185(1): 54–66.

- [56] Kang Z, Buchenauer H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57: 255–268.
- [57] Kang Z, Buchenauer H, Huang L, et al. Cytological and immunocytochemical studies on responses of wheat spikes of the resistant Chinese cv. Sumai3 and the susceptible cv. Xiaoyan 22 to infection by *Fusarium graminearum*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2008, 120(4): 383–396.
- [58] Desjardins A E, Proctor R H, Bai G H, et al. Reduced virulence of trichothecene–nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests[J]. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 1996, 9(9): 775–781.
- [59] Li X, Zhang J B, Song B, et al. Resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat is associated with activation of a cytochrome P450 gene[J]. *Phytopathology*, 2010, 100: 183–191.

Recent progress on antibody–based resistance against *Fusarium* head blight pathogens in wheat

LIAO Yucai^{1,2}, LI Heping^{1,3}

1. Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
3. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Wheat *Fusarium* head blight (FHB) causes the reduction of yields and the quality degradation, as well as the contamination of mycotoxins that are produced by FHB pathogens and enter into the food chains, thus posing a serious threat to humans and farm animals. Plant germplasm resources with natural resistance against wheat FHB are inadequate. Thus, the isolation of antibodies and their genes from animals provides new resistance resources for the improvement of FHB resistance in wheat, as a new approach for other plants that lack natural resistance germplasms against pests. A disease–resistance antibody can specifically target the highly conserved transmembrane glyoxal oxidase in *Fusarium* and inhibit its oxidative reaction. A combination of the disease–resistance antibody, the antifungal peptide (AFP) and the regulatory cis–elements for plant expression will generate the antibody–AFP fusions that can be induced by FHB pathogens on the infection organs of wheat; this pathogen–inducible expression can restrict the fungal spreading and the mycotoxin accumulation in wheat, which is similar to the active immunity in mammals that have been vaccinated. This paper reviews recent research progresses on FHB pathogens for preparation of antigens, expression and functional characterization *in vitro* and *in planta* of disease–resistance antibodies and their antibody fusions, the structure and the function of an antigen–encoding gene, and the resistance mechanisms of disease–resistance antibodies.

Keywords antibody–mediated disease resistance; wheat *Fusarium* head blight; *Fusarium* pathogen; membrane protein; glyoxal oxidase; mycotoxin

(责任编辑 王媛媛)