

植物抗真菌基因工程研究进展

Progress in Research of Genetic Engineering of Fungal
Disease—Resistant Plants

罗闰良

(湖南省农业科学院, 副研究员 长沙 410125)

吴京华

(湖南省农业科学院, 助理研究员 长沙 410125)

真菌病害是作物损失的主要原因之一,作物病害的80%由病原真菌所引起。迄今,对作物真菌病害的控制,一是选育并采用抗性品种,二是使用化学杀菌剂,三是采取预防措施,如轮作、避免受侵染土壤和带病原植物材料的传播等。然而,抗病育种需时长,病原小种的分化速度往往超过品种更新换代的速度,难以对新病原小种作出及时反应;化学杀菌剂成本较高,且最终导致病原菌的抗药性,其残毒还引起环境污染等问题。

重组DNA技术的创立和发展,已可将动物、植物、微生物的基因相互转移,突破了物种之间难以杂交的天然屏障,开辟了植物育种的新途径。近年来,一些科学家致力于利用基因工程方法,如基因转移技术,培育抗真菌病害的作物品种。该领域的研究,有的已取得显著的成果,或出现很好的苗头,具有诱人的应用前景。本文将概述抗真菌基因工程的策略和进展。

利用作物的抗病基因

常规育种中已确定一些小种—品种特异抗性基因种质。这种抗性只能抗御一种病原菌的一个或少数几个小种。植株通常在侵染部位发生超敏反应,形成枯斑,包围病原菌,阻止其蔓延。这是植物中显性抗性基因的产物与病原体小种特异的引物相互作用的结果。最近,杰哈尔(Johal)和布里格斯(Briggs)采取转座子标记法分离出第一个特异抗病原真菌的基因——抗长蠕孢((*Helminthosporium carbonum*)小种1的玉米Hm1基因。该基因在抗性玉米品种中存在,能够分解长蠕孢小种1产生的对玉米具特异致病性的HC毒素。分离的抗性基因能被转入其他品种或物种,产生对病原真菌特定小种的抗性。

小种—品种特异抗性基因在抗病育种中的利用受到两方面的局限:性状特异性和较易被新的病原小种克服。若某一特异抗性基因与相应的非致病基因一起由病原菌诱导而在植物中同时表达,则可产生非特异的广谱抗菌性。例如,黄枝孢(*Cladosporium fulvum*)携带非致病基因avr9的小种可诱发含有抗性基因Cf9的番茄品系的超敏反应,其引物是这种真菌avr9基因的成熟产物——一种28个氨基酸的小肽。将提纯的这种肽注入叶后

引起同样的超敏反应。1992年,德威特(de Wit)提出,将avr9基因转入Cf9番茄,随后在启动子的指导下表达;并且可将avr9—Cf9联合体导入缺乏Cf9的植物。由此,在avr9—Cf9系统不起作用的植物中可导入另一种含有病原菌非致病基因与相应抗性基因的联合体。这样获取的抗性,特异性低,可普遍利用。这一方法尚在探索,它的成功有赖于得到指导抗性基因与相应非致病基因表达的合适启动子。

利用植物抗毒素基因

已于多种植物中发现,植物抗毒素的产生及浓度与对特定病原菌的抗性之间有相关性。它表明,植物抗毒素的产生可导致对某种病原菌的抗性。例如,葡萄中植物抗毒素白藜芦醇(3,4,5—三羟基芪)的存在与对灰质葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抗性有关。海恩(Hain)等将花生编码芪合酶(白藜芦醇合成的关键酶)的基因转入了烟草,转基因烟草可合成白藜芦醇,抗灰质葡萄孢侵染的能力增强。另外,对植物中原有的抗毒素进行改造修饰,也可能提高植物的抗病力。

利用真菌酶抑制物基因

病原真菌在侵染植物时产生分解植物细胞壁的内源多聚半乳糖醛酸酶,形成降解产物低聚半乳糖醛苷。降解产物一般很小,不能充当植物防卫反应的引物。由抑制物引起的多聚半乳糖醛酸水解作用的离体抑制导致低聚半乳糖醛苷延伸,直至足以充当引物,从而引起植物的防卫反应。图巴特(Toubart)等据此认为,这样的抑制物在转基因植物中的大量产生可使植物具有抗菌性。他们已经分离和克隆菜豆编码多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的基因,且正用于抗真菌的转基因植物育种之中。

利用抗真菌蛋白质基因

植物界大量存在具有离体抑制真菌生长增殖能力的蛋白质,相应基因在转基因植物中的表达可使这些植

物产生抗真菌性。

1. 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶

这两类酶分别催化许多真菌的细胞壁主要成分几丁质和 β -1,3-葡聚糖的水解作用,从而抑制真菌的生长增殖。业已发现,烟草中存在这两类水解酶中的各三种酶。其中,位于液泡中的几丁质酶 I 和 β -1,3-葡聚糖酶 I 是多种真菌的有效离体抑制物,两者协同作用,联合形成很强的抗菌活性。但由于内源几丁质酶含量低,烟草植株仍感猝倒病(立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*)。布罗格利(Brogli)等将由花椰菜花叶病毒 35S 启动子启动的菜豆内源几丁质酶 I 基因导入烟草基因组,使转基因烟草的几丁质酶含量升高,对猝倒病的抗性增强。

多数真菌侵染始于细胞间隙,而上述抗真菌蛋白质只在细胞内产生。诺豪斯(Neuhaus)和梅尔彻斯(Melchers)先后以液泡内抗真菌蛋白质为目标,修饰几丁质酶 I 基因和 β -1,3-葡聚糖酶 I 基因;在表达这两种修饰基因的任何一种的转基因烟草中,这两种酶在细胞间隙中出现,且都保持其抑菌活性。

2. 钝化核糖体的蛋白质(RIP)

植物 PIPs 可抑制靶细胞的蛋白质合成,真菌核糖体即可作为 RIPs 的靶标。大麦 RIP 的抗真菌活性比大麦几丁质酶或 β -1,3-葡聚糖酶低,而当大麦 RIP 与这两种水解酶的任何一种混合时,则有很强的协同作用。最近,洛格曼(Logemann)等将在创伤诱导启动子控制下的一种大麦 RIP 基因转入了烟草,其再生一代转基因植株高抗立枯丝核菌。

3. 渗透蛋白(Osmotin)

沃洛舒克(Woloshuk)等(1991)鉴别了烟草的一种盐胁迫诱导的液泡蛋白质,即渗透蛋白,它对致病疫霉(*Phytophthora infestans*)有离体抑制作用;通过干扰霉菌的膜而扰乱细胞的功能,从而抑制其生长增殖。渗透蛋白基因的利用,亦是经基因修饰而使转基因植物产生细胞外抑菌蛋白质。

4. 其他抗真菌的蛋白质

除了上述植物抗真菌蛋白以外,还有一批具离体抑菌活性的富含半胱氨酸的碱性小蛋白,包括:最近识别的萝卜、千穗谷和紫茉莉的种子蛋白,大麻的一种外源凝集素——橡胶蛋白(Hevein),存在于被子植物种子和叶中的抗菌肽类硫堇(thionins)等。

微生物中也有抗真菌的肽,如 Nakaya 等(1990)报道,真菌巨曲霉(*Aspergillus giganteus*)产生一种 51 个氨基酸的胞外肽,对其他真菌具有抑制作用。微生物的抗性基因为植物抗真菌基因工程提供了新的抗源。

结 束 语

植物抗真菌基因工程尚处于探索阶段。在我国,该领域的研究还刚起步。中国科学院微生物研究所完成了水稻几丁质酶基因的结构分析,北京大学和昆明植物研究所分离到了几种抗菌蛋白质。目前,国际上正在加紧研究植物防病机制和病原菌致病机制,同时已开始利用单个基因于抗真菌基因工程育种。随着认识的深入和技术的发展,不久定将育出抗真菌的基因工程作物品种,达到控制真菌病害、作物高产稳定之目的。

(责任编辑 冷远猷)

科技动态

联合国教科文组织首次发表《世界科学报告》

据新华社消息,联合国教科文组织 2 月 14 日发表《世界科学报告》,指出当今世界上发达国家和发展中国家的差距是“知识的差距”,强调“没有科学知识的传播就不会有经济的持续发展”。

这份长达 200 多页的报告是由一批专家、学者共同提出的。报告指出,目前全世界 80% 的“研究发展”活动集中在工业化国家,它们每年用于科研的经费占国民生产总值的 2.9%。其中日本用于研究发展项目的经费最多,人均每年 700 美元;其次是美国,人均 600 美元;欧洲联盟各国人均 300 美元。与此相反,许多发展中国家每年用于科研的经费在国民生产总值中所占的比例还不到发达国家的 1/10。拉美国家每年人均均为 10 美元,而非洲的尼日利亚仅为 0.22 美元。

报告指出,科技人员在一个国家人口中所占的比例与国家的经济实力成正比。日本平均每千人中有科学家 4.7 人,居世界榜首,美国是 3.8 人。而第三世界国家平均每 5000 人中才有 1 名科学家。

报告提到一些发展中国家由于重视科研而使经济有较大发展。例如韩国,每年投入研究发展项目的经费人均达 600 美元,已相当于美国的水平。新加坡、马来西亚等国也都对科研项目给予高度重视。

报告认为,发展中国家与发达国家在科研方面存在着较大差距,这既有战争和社会动乱等政治原因,也有经济文化落后等原因。报告特别指出,发展中国家人才外流的现象令人忧虑。

教科文组织总干事马约尔指出,发表《世界科学报告》,目的是引起世界各国领导人、科学家、企业家和广大公众注意当今世界科研发展的现状,并促使决策者提出解决现存问题的办法。他强调发达国家应该向发展中国家传播先进的科学技术,并为发展中国家的研究发展项目提供资助,而发展中国家在接受外援的同时,应该把立足点放在自力更生的基础之上。

今年是联合国教科文组织第一次发表《世界科学报告》,以后将每两年发表一次。