

植物抗病毒基因工程研究进展和展望

Research on Plant Antiviral Gene Engineering

叶寅田波

(中国科学院微生物所)

利用植物的转化系统将外源基因导入植物体内并插入到染色体上,经过组织培养及植株再生,可获得插入有外源基因并具生物活性功能且稳定遗传的工程植株。对不同植物,外源基因的导入系统不同。首先发展起来且目前广泛应用的是双子叶植物的转化系统——利用侵染双子叶植物的土壤细菌农杆菌将插入有外源基因的载体(经过修饰改造的农杆菌Ti质粒)转入植物体内。目前,借助于农杆菌介导的转化系统已将许多种类的基因——抗虫基因、抗病毒基因、改良作物品质的基因等转化植物体内,获得具有重要经济价值的工程植株。然而,对单子叶植物——主要是一些重要的粮食作物,如水稻、小麦和玉米等,则可用PEG融合法、电穿孔法及脂质体法等,将外源基因导入植物中并再生植株。

病毒病害一直是农业生产上的一个大问题。植物基因工程的出现与发展给病毒病的防治带来新的希望。1986年,美国华盛顿大学比奇(R. Beachy)通过植物基因工程技术首次将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因转入烟草,培育出能稳定遗传的抗病毒工程植株,由此确定了抗病毒的植物基因工程这一新的领域。自此以后,人们不断分离来源于病毒的抗性基因,利用不同的策略来获得抗病毒工程植株。

一、对已有策略的评价

1. 外壳蛋白基因策略

比奇等将TMV外壳蛋白(CP)基因转入烟草。转化植物中外壳蛋白基因的表达产物达到烟草叶片蛋白总量的0.1%。转基因烟草接种TMV后,能够抑制TMV的复制,并在一定程度上降低或阻止了TMV在植株体内的系统侵染,且能延迟发病12~30天。这一抗性按孟德尔定律遗传给后代。用同一CP基因转化番茄,其CP表达量为叶片总蛋白的

0.02~0.05%。大田试验也得到令人满意的保护效果。当对照番茄减产26~35%时,转基因番茄未受到影响,其产量与不接种的相比无显著差别。近几年来,利用病毒外壳蛋白基因达到植物基因工程保护作用的,除TMV外,在20多个植物病毒组中已用近10个组的代表性成员进行了遗传工程的研究。

最近,一些实验结果提供了这样的可能性,即将一种病毒的外壳蛋白基因转入植物,则可使转化植物获得对一些其它亲缘关系较近的病毒的抗性。目前一般认为,CP介导的抗性是由于CP的积累封闭了病毒侵染的一个早期步骤,即封闭了病毒粒子的脱衣壳。

然而,利用病毒外壳蛋白策略的工程植株如要推广应用,尚有一段距离。这主要表现在工程植株的抗病性还不足以有效地控制病毒的侵染。已有的资料表明,外壳蛋白基因转化植株只能延迟发病,表现出对病毒侵染的早期抗性,但若在大田条件下,则其抗病能力大大减退或完全丧失。当然,病毒外壳蛋白基因是目前比较有效的策略而被普遍采用,问题在于如何更进一步提高其抗性。目前有人提出,利用病毒外壳蛋白基因策略存在的一些潜在危险性,应引起足够的重视。

2. 病毒卫星RNA基因策略

卫星RNA是依赖于辅助病毒才能复制的一类低分子量RNA。它能干扰辅助病毒的复制,并改变症状的表现,常常使症状减轻。1983年田波等基于卫星RNA是病毒的分子寄生物的观点,用卫星RNA作为生防制剂防治黄瓜花叶病毒(CMV)引起的病害获得成功。在这项工作启发下,人们设想用卫星RNA基因的策略来获得具有抗病毒的基因工程植株。库姆(B. Combe)等成功地将CMV 1-17N的卫星RNA的cDNA双体基因借助Ti质粒转化到烟草染色体上。转化的植株生长正常,能开花结果,无任何病毒症状,经杂交证明在RNA中有

卫星RNA的全长序列。转化植株上接种CMV, 则卫星RNA大量产生, 而病毒基因组RNA减少95%, 且只在第1至第3片叶上形成斑驳, 此后形成的叶片不表现花叶症状, 接近正常的植株。用对照空载体转化的植株, 症状严重, 植株矮化。

我们用CMV卫星RNA-1的cDNA单体基因转化烟草、番茄和甜椒都获得成功。同质结合的后代在田间表现出对CMV侵染的高度抗病性。格洛克(Gerlach)等用烟草环斑病毒(TobRV)的卫星RNA的基因转化烟草获得对该种病毒的抗性。

我们认为, 这种策略的作用机制是, 转化的卫星RNA基因在体内产生少量转录产物, 而当病毒侵染时, 体内转录出来的少量卫星RNA利用病毒复制酶而大量复制, 从而发挥对病毒复制的干扰作用。当然, 卫星RNA基因只是表现出对病毒侵染的晚期抗性。

3. 病毒反意RNA策略

反意RNA——基因编码链的互补链RNA, 对原核和动物细胞基因表达有抑制作用。曾寄希望于病毒反意RNA在抵抗植物病毒中发挥作用。但表达反意RNA的转基因植物对病毒不表现抗性, 或只有微弱的抗性。从目前的研究看, 这一策略用于抗病毒基因工程植株的培育, 前景并不理想。

4. 与病毒复制相关基因的部分序列

戈莱博斯基(Golemboski)等将TMV UI株系54KD蛋白基因(病毒复制增殖相关的酶基因的一部分序列)转入烟草。抗性实验表明, 这些工程植株不但在用病毒作接种物时, 而且在使用TMV/RNA作接种物时都表现出高的抗性。但用其它株系病毒作攻毒实验时, 其工程植株的抗性降低或丧失, 说明其抗性表现出对病毒株系的特异性。已有的实验结果证明其抗病性高于外壳蛋白基因而显示出诱人的前景。然而, 也应看到, 这一策略中转入基因的交叉保护效果不甚令人满意, 而且其抗病毒的作用机理尚待进一步探讨。

5. 核酶

核酶是一类具有特殊二级结构, 能够特异性催化切割其它RNA分子的小分子RNA。原则上说, 任何生物, 包括病源RNA, 都可作为核酶的底物。已发现的绝大多数植物病毒, 它们的基因都是由RNA组成的。根据这些病毒基因组的序列要求, 设计恰当的核酶, 转入植物体内, 使其在体内表达并有效切割病毒核酸, 达到防治病毒病害的目的。

我们设计合成并克隆了特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒正链和负链RNA的核酶基因。体外活性实验表明, 当核酶与底物PSTV RNA保温时, 具有相当高的特异切割活性。目前, 已将核酶基因导入马铃薯, 正检测其体内切割活性。这将给防治类病毒病害提供一个有效的途径。格洛克等设计

了针对TMV RNA的核酶序列转化烟草, 抗性分析表明, 工程植株对TMV侵染有相当抗性。

二、复合抗性基因策略是目前提高工程植株抗性的有效途径

目前应用较普遍且成熟的策略——病毒外壳蛋白基因、卫星RNA基因, 以及复制酶特异序列等, 都表现出程度不同的抗病性。但总的看来, 目前尚处于进一步研究与提高工程植株抗性的阶段。如何才能更有效地增强工程植株的抗病性? 我们认为, 目前一个可行途径是采用复合抗性基因的策略, 即利用多个抗性基因共同作用与相互作用, 从多个途径封闭病毒的功能表达, 从而有效地阻断病毒在植物体内的增殖与传播途径。目前的一些工作证实了我们的设想。

1. 多种抗性基因控制一种病毒

转黄瓜花病毒外壳蛋白基因与转卫星RNA基因的工程植株表现对CMV侵染的较强抗性。但温室接种及初步田间感染实验表明, 外壳蛋白的基因表达早期抗性, 而卫星RNA基因表达晚期抗性。以其中的任一基因单独转化植物, 都难以获得抗病效果良好的工程植株。如何克服它们的抗病局限性呢? 我们设想, 把外壳蛋白基因和卫星RNA基因共同转化植物, 可望获得在病毒整个感染期间都能抗病的高抗工程植物。

为此, 我们进行了实验。经分析证明, 转双基因的烟草能稳定表达外壳蛋白及卫星RNA, 攻毒后测工程植株的CMV增殖水平, 只相当于未转基因对照的0~5%, 而单独转卫星RNA基因的植株则相当于对照的10~20%, 分析转双基因植株对CMV感染后症状表达的抗性结果表明, 其病情指数只有未转基因对照的21%, 比单转卫星RNA基因的抗性提高一倍以上, 而即使用浓度很高的病毒接种, 90天后仍有50%左右的植株不表现出任何症状。由此可见比单转CP基因的工程植株的抗性提高三倍。

2. 多种抗性基因控制病毒的混合侵染

许多植物受到多种病毒的混合侵染, 病毒的混合侵染引起的病症程度比一种病毒感染要严重得多。马铃薯病毒X(PVX)和Y(PVY)是危害马铃薯生产的病毒病害, 尤其是PVY危害最大, 该病毒引起的产量损失高达80%。劳森(Lawson)等人将PVX和PVY的外壳蛋白基因通过DNA重组的方法构建到同一质粒上构成双基因植物表达载体, 并转化马铃薯。研究证明, 这两种基因在工程植株中稳定转录并能稳定表达外壳蛋白。当用PVX和PVY同时接种工程植株, 表现出对这两种病毒的抗性。攻毒后36天, 未转抗性基因的对照有80%

表现症状, 而其中的一个转化系植株几乎不表现症状, 且表现出对PVY通过机械接种和虫传感染的抗性。

我们在已获得表达黄瓜花叶病毒卫星RNA与外壳蛋白的高抗黄瓜花叶病毒的工程植株的基础上, 目前正将烟草花叶病毒(TMV)的54KD蛋白基因转入到上述工程植株中, 以图获得对CMV与TMV的高度抗性。

三、新的抗病毒策略的探讨

目前, 分离的抗病毒基因, 一般是病毒来源的。这些抗性基因被认为是由于针对病毒的功能表达而发挥抗病作用的。例如, 一般认为, 外壳蛋白基因介导的抗性是由于外壳蛋白的积累封闭了病毒的脱衣壳, 因而阻止了病毒核酸的释放和基因功能表达, 从而阻断了病毒的复制增殖。由此给我们的启发是, 一旦弄清了参与病毒功能表达的一些反应步骤, 就可能阻断这些步骤中的病毒功能表达。人们已设想出许多新的策略, 来获取新的抗性基因。同时, 由于已有的研究证明植物在病毒等病原体侵入后激发自身的防御反应, 这启发人们试图从植物体内分离这些具有防御作用的抗性基因。

1. 阻断病毒基因功能表达的策略

(1) 针对参与病毒基因表达的因子 病毒基因组的表达是通过寄主的核糖体翻译的。正链RNA基因组一般通过两个途径来翻译其基因组mRNA, 一种是形成亚基因组构成单顺反子; 一种是整个基因组作为一个单顺反子翻译成一个多聚蛋白, 然后再被切割成功能性蛋白。豇豆花叶病毒组和马铃薯病毒Y组病毒就是利用后一途径, 并已有证据表明, 参与多聚蛋白的加工的蛋白酶由病毒基因组编码。那么我们设想, 如果这些蛋白酶被封闭, 那么病毒的功能表达则被阻断。而烟草花叶病毒则利用第一种途径来翻译其mRNA, 如果我们了解了控制亚基因组形成的因子, 那么我们就能够设计出相应的策略来封闭这些因子的功能。当然, 利用这一策略获得的抗性将是病毒特异而非广谱性的。

(2) 针对参与病毒复制的酶类 负责RNA病毒复制增殖的酶大部分由病毒编码, 也不排除寄主的一些成分参与了酶的功能活性, 但关于RNA病毒复制酶知之甚少。然而, 我们一旦对此有了深入的了解, 则不难设计出既不影响寄主正常生理功能又可封闭病毒复制酶的策略。

(3) 针对参与病毒传播因子 研究表明, 大多数病毒在细胞间的传递是通过胞间连丝途径。这一传播是由病毒的基因产物移动蛋白参与的。

当然, 相应的策略是, 设计新的分子转入植物体内, 封闭或干扰移动蛋白的功能, 则可限制病毒的扩散侵染。

病毒在植株间传播则要复杂得多, 一般通过虫传。在病毒外壳蛋白和昆虫介体上存在着特殊的位点, 在这些位点, 病毒与昆虫介体发生着非常特异性的相互作用, 而使得病毒能借助昆虫传播。一旦病毒与昆虫寄主之间的相互作用的分子生物学方面了解清楚之后, 则可能设计相应的策略去干扰这些相互作用以阻断病毒的虫传途径。

2. 植物编码的抗性基因

植物对病毒感染产生各种类型的抗病性, 包括高度抗病的免疫性, 抗侵染、抗扩散和抗增殖的抗病性, 过敏性抗病性, 耐病性以及病毒介体的抗体。由病毒等病原体的感染, 植物产生的超敏反应所诱发的防御反应主要是由植物编码称作病原相关蛋白(PR)的一类蛋白作为物质基础。至少包括以下三个方面: 直接对侵入的病原体进行攻击(例如诱导产生的水解酶类); 将病原体局限于侵染的位点(例如包括木质化酶在内的酶); 宿主的代谢调整以适应过激条件(例如超氧化物歧化酶)。具有防御作用的蛋白(PR蛋白)基因极具吸引力。如果我们能够将这些基因分离出来用于抗病毒的植物基因工程, 则有可能提高工程植株的本身内在抗性。然而, 已有的实验结果并不令人鼓舞。研究表明, 以水杨酸处理烟草诱导产生至少以上两种PR蛋白, PR-1a和GRP(富含甘氨酸的蛋白质), 则烟草植物表现出对TMV及苜蓿花叶病毒(AIMV)感染的抗性。将这两个基因分别转化烟草, 工程植株稳定表达PR-1a或GRP, 但并不影响内源性PR基因的表达, 工程植株也不表现出对TMV和AIMV的抗性。看来病毒侵染诱导的抗性并非是这些PR蛋白单独作用的结果, 而是它们共同作用的结果。由此可见植物对病原体侵染产生的防御反应相当复杂。然而, 随着研究的深入, 有关植物防御机制的被揭示, 那么加强植物的防御作用, 提高植物的抗病性并非难事。

3. 正在研究的新策略

(1) 抗体基因 1985年, 伍德(Wood)等首次将来源于鼠分泌抗半抗原4-羟基-3-硝基苯乙酰的单克隆抗体基因转入酿酒酵母, 结果表明, 酵母细胞可表达动物淋巴细胞产生的抗体基因。目前已在植物体内表达了来源于动物淋巴细胞的抗体基因。

抗体基因在植物中的高效表达对植物科学本身及其外界环境(包括生物)的理论与应用产生重大影响, 尤其是用于抗病毒的植物基因工程。田波曾提出将抗植物病毒的中和抗体基因转入植物体内, 使其在体内表达中和抗体以封闭病毒颗粒。当

然,这一设想也适用于抗支原体、细菌和真细菌等引起的病害。

(2) 核酸酶作为控制病毒核酸功能表达的策略 利用核酸酶来控制病毒核酸的研究尚处于萌芽之中。这一策略的核心是以病毒的外壳蛋白与核酸酶连接在一起构成一融合蛋白。这种融合蛋白能如同外壳蛋白那样包被病毒核酸,又具有核酸酶活性。这种拟外壳蛋白的融合蛋白包壳核酸后,在一定条件下降解核酸,从而达到抑制病毒扩散侵染的效果。我们正以TMV作为实验材料研究这一策略在植物抗病毒基因工程中的可行性。

结 束 语

自从1986年比奇等首次将TMV CP基因转入烟草获得第一例抗TMV的工程植株以来,抗病毒的植物基因工程的进展非常迅速。已采用了多种策略来获得抗病毒工程植株。目前使用比较多的策略主要是病毒来源的抗性基因,如病毒的外壳蛋白基因,卫星RNA基因等。这些策略可获得程度不同的抗性。然而,也应该看到,所有这些策略都有局限性与潜在的危险性。就目前的研究进展看,各种抗性基因的作用效果还不足以达到推广应用的水平。也就是说,若要进行大面积推广应用,必须进一步提高工程植株的抗性。往往温室的抗性分析结果非常令人满意,但一旦进入大田实验,则这种抗性水平大为降低。一个不容忽视的因素是,大田条件绝不同于温室条件。例如,大田条件下,病毒的感染往往是多次的,而且经常是两种以上病毒的混合感染。因此,笔者呼请在进行推广作用时,一定要慎重。基于目前国内外研究的现状和多年的工作经验,我们认为,在今后的研究工作中,应该注意以下几个方面。

1. 在现有的抗病毒策略的基础上,进一步提高工程植株的抗性

抗病毒植物基因工程发展到现在,还未有一个成功应用的范例,原因就正如前面谈到的,以目前的策略所获得的抗性还远远不足以达到推广应用的水平。如何进一步提高工程植株的抗性,是目前应该探讨与研究的重点。

2. 开展基础研究,探讨更有效,更安全的新策略

封闭病毒的功能表达则可达到控制病毒复制与传播。如何更有效地封闭病毒的功能表达呢?笔者认为,一个关键的因素是,加强对病毒基因结构与功能之间的关系,以及病毒与寄主之间的相互作用关系的研究。以此作为突破口,方可探索到控制病毒功能表达的更有效的策略。就目前的现状看,有关这方面的基础研究还相当薄弱。

3. 揭示植物自身的防御机制以提高植物的内在抗性

关于这方面的研究相当热门,也积累了丰实的资料,但似乎还未抓到关键性的环节。笔者认为,植物虽然没有动物那样完善的防御系统——免疫系统,但也有相当复杂与完善的防御体系。可以想象,一旦植物的防御机制被揭示,就可以如同动物那样提高植物的内在“免疫力”。

4. 抗病毒植物基因工程应与常规育种系统结合起来

植物的品质是各种性状的综合。因此,抗病毒的工程植株的培育应以推广品种与性状良好的品种为材料加以综合考虑,并纳入常规育种和良种繁育体,才能真正在生产上应用。

(责任编辑 肖庆山)

(上接第47页)

的生产能力,其中约有10%的能力将会因为品种、质量问题闲置,有效生产能力只有8 400万吨左右。因此,在条件成熟时,应尽快考虑新建大的钢铁基地。目前有三种考虑:一是利用国内铁矿资源建设新基地,即攀钢二基地;二是利用进口矿沿海布点建设,可供比选的厂址有石臼所、连云港、北仑港、湄州湾、惠州、湛江六个点;三是利用国内外两种资源,建设冀东钢铁厂。新建大厂布局,既要考虑易于取得矿石和接近消费市场,又要有利于全国钢铁工业布局的调整。因此,2000年前在沿海地区选址布点为宜,2000年以后再考虑利用国内铁矿资源建设攀钢二基地。因为:

1. 新建大型钢铁基地要重视规模经济,侧重解决钢材品种、质量问题,生产规模至少要达到600万吨钢,并留有发展到1 000万吨钢的余地。

2. 从资源条件来看,目前国内可供新上300万吨钢铁企业的铁矿基地只有冀东、鞍本、攀西三处,可供建设600万吨以上钢铁企业的铁矿基地一处也没有。而且,从今后长远发展来看,鞍本基地铁矿仅可供本地区钢铁企业(主要是鞍钢、本钢)改扩建需要;攀西钒钛磁铁矿由于交通和目前利用技术的限制,开发条件尚不成熟;冀东铁矿在保证首钢、唐钢、宣钢和天钢适当发展所需铁矿外,可供建新厂资源也有限。因此,新建大厂必须考虑利用进口铁矿,在沿海港口布点建设。

3. 从钢材消费的供需平衡看,目前钢材缺口最大的地区是华南和西北;而西北由于地处内陆,其自身发展钢铁工业的条件又比较差,从长远看应就近由华北地区钢铁工业的发展来解决。因此,新大厂选址,应在东南沿海和北方沿海地区比选。

(责任编辑 宋义荣)