

转基因技术在抗植物真菌病害方面的研究策略^{*}

吕晓波

(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 重点概述酶基因、抑制蛋白基因、致病相关蛋白基因、降解毒素基因和无致病力基因在抗真菌植物病害中的研究及应用。

关键词: 转基因; 真菌病害; 抗病育种; 植物

中图分类号: S 432.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2001)03-0028-03

Strategies of Transgenic plants for Resistance to Fungus Diseases in Plant

Lǐ Xiao-bo

(Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In the paper, the strategies of transgenic plants for resistance to fungus diseases in plant are reviewed. The subject is discussed under the following headings: Enzyme genes from plants, inhibitor genes, the tobacco PR-la gene, the detoxifying genes and avirulent genes.

Key words: transgene; fungus diseases; plant breeding for disease resistance; plants

植物病害是世界粮食减产的主要原因之一。据估计,其每年在农作物生产中造成 10%~15% 的产量损失^[1]。真菌引起的病害又为三类病害(真菌病害、细菌病害和病毒病)之首,且许多土传病害多为真菌侵染,化学药剂难以防治。应用抗病品种即可减少环境污染,并可降低应用化学药剂和劳动力的成本。但常规抗病育种受抗原材料的限制,应用传统方法难以快速有效地选育大量的抗性品种。在生物技术飞速发展的今天,抗病育种正在迈入分子水平,大量综述文献描述了植物抗病的分子机制^[2]。在此基础上,分子标记和转基因技术正在成为抗病育种的重要手段。由于上述所提三种病害各病原物致病机理有差异,因此采取的策略也不同,这里主要介绍转基因技术在抗真菌病害方面的研究策略。

1 酶基因

研究发现,在病原真菌侵染植物时,植物体内的某些酶活性增强,从而抵御病菌的侵染。早期的努力集中在某些水解酶基因上, Brogile 等(1991)^[3] 将豇豆中的一种水解酶转入烟草和油菜,观察到转基

因植株提高了抗土壤真菌茄丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的能力,并减缓病症的发展。进一步的研究表明是几丁质酶使烟丝细胞壁中的几丁质被降解,最后导致菌丝细胞破裂^[4]。一种细菌(*Serratia marcescens*)的几丁质酶基因被分离转入烟草,同样表现了对茄丝核菌的抑制作用。在玉米中,一个显性基因(Hm)编码合成长蠕孢碳(*Helminthosporium carbonum*, HC)毒素还原酶,这种酶使 HC 毒素的主要碳基基因失活。这是一种植物建立的直接阻止病菌侵染的抗病机制^[5]。利用毒素降解酶将成为利用转基因技术提高植物抗病性的又一新策略。

2 抑制蛋白基因

植物有某些特殊蛋白抑制真菌进攻,从大麦中分化到一种钝化核糖体的蛋白(Ribosome-inactivating protein, RIP),并报道这种物质在离体条件下明显抑制植物病原真菌^[3,6]。将该基因转到烟草中,提高了烟草对丝核菌的抗性^[7]。对 RIPs 的生物化学和分子作用的更深入研究已有报道,这将进一步推动该基因在抗病育种中的应用^[2,8]。另一个发现是被

* 收稿日期: 2001-02-20

作者简介: 吕晓波(1964-),女,黑龙江省富裕县人,双硕士,副研,从事生物技术研究。

调查的双子叶植物中含有特殊的多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (Polygalacturonase — inhibiting protein, PGIPs)。这种酶主要负责溶解植物细胞壁,以保证真菌有效侵染植物。有趣的是这种抑制物对植物自身无害^[1]。Toubart 等(1992)^[9]克隆了豇豆的 PGIP 基因,使转该基因植物过量表达该抑制蛋白,转基因植株表现出了抑制真菌发展的潜力。

植保菌素 (Phytoalexins) 是植物在长期自然进化过程中形成的一种防止病原菌侵染的自我保护物质。实际上,不同植物都能产生不同的植保菌素,但许多病原菌拥有特殊的植保菌素降解机制,从而使其寄主植物患病。如果附加外源植保菌素,扩大预防物质的组成成分,病原菌不能降解新类型植保菌素,而使植物抗病^[1]。Hain 等(1993)^[10]首先证明通过表达外来的植保菌素可增加植物对真菌的抗性。他们从葡萄中分离到含有两个完全的 1, 2—二苯乙烯 (Stilbene) 植保菌素的合成酶基因,并将这组基因转到烟草中,已证明烟草自身不含这类植保菌素,转基因烟草的抗病性提高。类似的单个 1, 2—二苯乙烯合成酶基因转入水稻后有效地防制稻瘟病^[11]。在大麦上做的试验也得到可喜的结果^[12]。

防预因子 (Defensin)、脂类转移蛋白 (Lipid transfer protein, LTP) 和硫素 (thiorin) 是三类小的抗真菌肽,所有类型的代表物已在大麦、玉米、小麦及许多双子叶物种中检测到。这些物质经常存在于种子盾片,也在植物的其它一些组织被发现。这三类物质都具有病菌侵染诱导合成的特性^[13]。在转基因试验中,小萝卜的防预因子基因在烟草中减小了叶片被链孢菌 (*Alternaria Longipes*) 的损害程度^[14]。这是一种非常有实用价值的策略。奇异果甜蛋白 (Thaumatococcus danielli) 分离到的甜味蛋白具有同源性。在烟草中的一种 TLP 是渗透蛋白,当盐胁迫时,这种蛋白积累。有些 TLPs 蛋白通常表达在种子里,另一些对病菌反应积累在叶中。这些在大麦、燕麦、水稻和小麦中均得到证明^[15]。转有烟草一种渗透蛋白基因的马铃薯在被晚疫病病菌接种后延缓发病^[2]。

3 烟草的 PR-1a 基因

PR (Pathogenesis — related) 蛋白是致病相关蛋白的英文缩写,是植物在被病原菌侵染后植物作出反应而合成的蛋白^[1]。PR1 蛋白是这类蛋白中的一种。在大麦、玉米、烟草和蕃茄中都分离到这类蛋白。PR-1a 是烟草中 PR 蛋白最有代表的一类。被

病菌侵染后诱导合成的量可达诱导前的 10 000 倍,这种蛋白占叶肉细胞总蛋白的 1% ~ 2%。对烟草 PR-1a 基因的生物化学作用还不清楚,但导入烟草中证明对黑胫病及霜霉病具有高水平抗性。用加强的 35sRNA 启动子增强烟草中该基因的表达,转基因的烟草减少了蓝霉和黑梗的数量^[16]。但在大麦中,虽然被 *Blumeria graminis* 病菌侵染后,PR1 积累增加,可患病品种中增加的量比抗病品种中的高。所以,这类型基因能否成为抗真菌病害的一个技术手段有待进一步明确。

4 降解毒素作用 (Detoxifying) 基因

有些病菌产生毒素使其能侵染和破坏植物组织。已明确:一种真菌毒素脱氧瓜萎镰菌醇 (Dexynivalenol, DON) 是镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 致病毒素,能造成大麦和小麦的赤霉病^[1, 2]。从病菌中分离到一个基因 (TR1r), 该基因可降解 DON 毒素,该基因已被克隆并被转入酵母菌,转化的酵母菌降低了对 DON 毒素的敏感性,该基因转化大麦和小麦的试验已经进行^[20]。另一种抑制多聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase) 活性的蛋白基因已被克隆,这种酶是玉米穗腐病菌 (*Stenocarpella maydis*) 的一种致病因子^[1, 2]。

5 无致病力 (Avirulence) 的基因

植物被病菌侵染时有种抗性表现为抑制病菌在寄主体内增殖,即不亲和作用 (incompatible interactions) 这种反应经常导致侵染部位的细胞局部坏死,表现为一种过敏反应^[17, 18]。这种现象发生时总是与抗病植株体内发生一系列的生物化学或其它反应密切相关。这一过程是受病菌和寄主植物的基因共同控制的,认为宿主植物的抗病基因与病原的无毒基因 (Avr) 产物相互识别诱导植物抗病信号传导,进而产生一系列保护机制。尽管这些基因的产物目前还不完全清楚。但由此而提出了一个获得非专业广谱抗性的抗病基因工程策略,克隆这些基因正在为抗病基因工程开辟新路。从枝孢菌属 (*Cladosporium fulvum*) 克隆一个无致病力基因 (Avr9) 已被转入带有相关抗性基因 (Cf9) 的蕃茄品系中。为避免无病菌侵染情况下的过敏现象发生,Avr9 所用的启动子为侵染部位才有作用的特殊类型启动子。获得的几个转基因品系已表现出侵染诱导过敏反应,减轻了植株的病症^[2, 19]。

总之,此研究策略已展示了转基因技术在抗真菌病害育种中的巨大潜力,随着抗病分子机理研究的深入及转基因技术实用性的提高,抗真菌病害的

转基因技术必为世界农业生产提供更广泛的服务。

参考文献:

- [1] Hain R. and P. H. Schreier: Genetic engineering in crop protection — opportunities, risks, and controversies [J]. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer (special issue); 1996, 49(67): 25-120.
- [2] Bushnell W. R., D. A. Somers, R. W. Giroux, L. Szabo, and R. J. Zeyen: Genetic engineering of disease resistance in cereals [J]. Canadian Journal of Plant Pathology 1988, 20(2): 137-220.
- [3] Brogile K., K. Chet, et al., Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Science 1991, 254: 1194-1197.
- [4] Jolle's P. and J. Jolle's: Wath's new in lysozyme research? Mol [J]. Cell. Biochem. 1984, 63: 165-189.
- [5] Keeley R. B., G. S. Briggs et al., A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize [J]. Plant Cell 1992, 4: 71-77.
- [6] Wegener D., Steinecke P., Hergel, and et al., Expression of a reporter gene is reduced by a robozyme in transgenic plants [J]. Molec. Gen. Genet. 1994, 245: 465-470.
- [7] Logemann J., G. Jach et al., Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants [J]. Bio/Technology 1992, 10: 305-308.
- [8] Panopoulos N. J., E. Hatziloukas, A. S. Afendra, Transgenic crop resistance to bacteria [J]. Field Crops Research 1996, 45: 85-97.
- [9] Toubart P., A. Desiderio et al. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseslus vulgaris* [J]. Plant J. 1992, 2: 367-373.
- [10] Hain R., H. J. Reif et al., Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant [J]. Nature 1993, 361: 153-156.
- [11] Stark-Lorenzen P., B. Nelke et al., Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Report 1997, 16: 668-673.
- [12] Leckband G., and H. Lo"rz: Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance [J]. Theor. Appl. Genet. 1998, 96: 1004-1012.
- [13] Broekaert W. F., B. P. A. Cammue et al., Antimicrobial peptides from plants [J]. Critical Rev. Plant Sci. 1997, 16: 297-323.
- [14] Terras F. R. G., K. Eggenmont et al., Small cysteine-rich antifungal protein from radish: their role in host defense [J]. Plant Cell 1995, 7: 573-587.
- [15] Lin K-C., W. R. Bushnell et al., Isolation and expression of a host response gene family encoding thaumatin-like proteins in incompatible oat-stem rust fungus interactions [J]. Mol. Plant-Microbe Interact. 1996, 9: 511-522.
- [16] Alexander D., R. M. Goodman, et al., Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expression pathogenesis-related protein 1a [J]. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1993, 90: 7327-7331.
- [17] Sanford J. C., and Johnston, S. A., The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite's own genome [J]. J. Theor. Biol., 1985, 113: 395-405.
- [18] Witt D., P. J. G. M., Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the applications of avirulence genes in control of plant pathogens [J]. Annu. Rev. Phytopathol. 1992, 30: 313-418.
- [19] Desjardins A. E., R. H. Proctor et al., Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Giberella zeae* in wheat field tests [J]. Mol. Plant-Microbe Interact. 1996, 9: 775-781.

(上接第 53 页)

直接喂饲,这样有利于保全饲料苦苣菜的有效营养成分。另外,可以把饲料苦苣菜制成干粉按 3%~5%的比例添加到饲料中。也可以进行青贮,青贮时宜压紧,饲料苦苣菜青贮呈黄色,具芳香气味,有微酸味,猪及马、牛、羊喜食。

4 种植饲料苦苣菜需特别注意的几个问题

4.1 种子较小,播种时一定要精细整地,覆土不宜过深,在 1.5cm 以内,同时确保墒情良好。

4.2 生长期特别是苗期一定要加强田间管理,防草、防虫、防病。苗期特别要注意除草和防虫,可用 50% 辛硫磷乳油 1 500 倍进行灌根防治地下害虫蛴螬、蝼蛄等。在 6~7 月份如遇高温干旱天气易发蚜虫,可用 2.5% 功夫菊脂乳油 1 000 倍液或用 40% 乐果 1000 倍液防治。

7 月以后如患白粉病可用 25% 粉锈宁可湿性粉剂 300 倍或 75% 百菌清可湿性粉剂 600 倍进行喷雾,如发生根腐病可用 50% 多菌灵可湿性粉剂 500 倍或 70% 甲基托布津可湿性粉剂 800 倍灌根。一般高度不超过 100cm 很少发生病害。施药后 15 d 内不能喂饲。

4.3 饲料苦苣菜生长必须保证土壤含水量适中不宜渍水,更不宜干旱,否则引起死亡或减产。

4.4 低洼易渍水地块可采用畦作,畦宽 1.5~2 m,畦块之间设 30cm 深排水沟,一般畦作因其密度大,利用空间和光照的效率高,所以产量比垄作稍高。

4.5 收割时要根据喂饲量有计划地收割确保生产和喂饲的连续性。一般 30~40 d 为一个收割周期。