

几丁质酶基因在植物抗真菌病基因工程中的应用^{*}

梁美霞^{1,2}, 李景富¹, 许向阳¹, 张 玉¹

(1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 2. 莱阳农学院园艺系, 莱阳 265200)

摘要: 真菌病害是影响农作物生长的主要病害。随着生物技术的发展, 利用转几丁质酶基因等方法防治真菌病害已被广泛使用。本文从几丁质酶功能、生化特性、防治真菌病害的基础、植物几丁质酶的研究历史和进展以及今后关于几丁质酶的研究动向进行了简要的综述。

关键词: 几丁质酶; 抗真菌病; 植物基因工程; 核糖体灭活蛋白

中图分类号: Q 556 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2004)05-0029-03

Chitinases and Its Application in Anti-Fungal Gene Engineering

LIANG Mei-xia^{1,2}, LI Jing-fu¹, XU Xiang-yang¹, ZHANG Yu¹

(1. Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Horticultural Department of Laiyang Agricultural College, Laiyang 265200)

Abstract: Fungal disease is the major element of affecting agricultural yield. With the development of the biotechnology, the method of transferring chitinase gene into plant is applied widely to control the fungal disease. In this article, we have a brief and general summary about chitinase gene in many aspects; its function, biochemical characteristics, the basis of resistance to fungal disease, its research history and its development trend in the future.

Key words: chitinase; resistance to fungi; gene-engineering of plant; RIP

自人类开始种植农作物以来, 真菌病害一直是限制农业生产的主要因素之一。全世界每年因病害造成作物减产达 15%^[1]。真菌病害一直是育种学家及科学工作者关注的焦点。随着分子生物学及基因组学的迅猛发展, 运用重组 DNA 技术即基因工程改良植物抗病性已成为抗病育种的新途径。近 10 年来, 植物抗病基因工程研究取得了重大进展, 抗病毒病的转基因植物已从实验室走向大田。抗真菌病的基因工程虽起步较晚, 却有后来居上之势, 尤以转几丁质酶基因防治真菌病的研究引人注目。

1 几丁质酶基因防治真菌病害的依据

几丁质(chitin)又称甲壳素或甲壳质, 是广泛分布在自然界的多聚物, 在天然聚合物中几丁质的贮量占第二位, 仅次于纤维素。几丁质是构成大多数真菌细胞壁的主要成分, 同时也大量存在于昆虫和

动物的甲壳中^[2,3]。另外, 几丁质还是昆虫肠围食膜的主要结构成分^[4]。真菌除卵菌外, 细胞壁都含有几丁质。一些杀菌剂如异稻瘟净的作用已查明是抑制几丁质合成。

几丁质酶(EC, 3, 2, 1, 14)是一种以几丁质为底物的水解酶。按水解切口位置的不同又分为: 内切几丁质酶(endochitinase, 水解位点为同聚物内部 $\beta-1, 4$ 连键)和外切几丁质酶(exochitinase, 水解位点为同聚物线性末端 $\beta-1, 4$ 连键); 目前研究最清楚应用最广泛的为前者(以下述及几丁质酶皆为前者)。离体试验表明, 几丁质酶活性底物并非仅此一种。有些几丁质酶具有溶菌酶的活性, 细菌肽聚糖 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖的 $\beta-1, 4$ 连键可以是其有效作用位点。几丁质、肽聚糖分别为真菌细胞壁、节肢动物外骨骼和细菌细胞壁的主要成

^{*} 收稿日期: 2004-04-03

第一作者简介: 梁美霞(1970-), 女, 山东莱阳市人, 在读硕士, 从事蔬菜生物技术育种研究。

分,因此这为应用几丁质酶防治植物病虫害的研究提供了强有力的理论依据。

几丁质酶分子量约 25~35kD,最适 pH 为 6,多数以单体形式存在,50℃仍很稳定。植物具有可诱导性几丁质酶,现已在水稻、小麦、棉花、大麦、油菜、甜橙等 70 多种栽培植物和野生植物中检测到几丁质酶活性。正常情况下,植物体内这种酶只是低水平表达,其活性一般低于可检测水平。而一旦植物受病原侵染或乙烯及其它外界因素的刺激后,植物体内几丁质酶含量迅速增高,多种生物因素和非生物因素如真菌、细菌、病毒、乙烯、水杨酸等可诱导植物几丁质酶,其中病原真菌 31 种(含变种和变化型)、菌根真菌 6 种^[5]。在某些物种中,乙烯成为几丁质酶基因表达的诱导信号之一,并且在不同器官、不同发育期,该酶的表达量不同。Roby^[6]、Samac^[7]、Fukuda^[8]等分别指出,来自菜豆、拟南芥、烟草的几丁质酶基因启动子能够应答真菌的入侵,从而增大酶表达量。搞清何种因素能促使植物几丁质酶大量表达,无疑对增强植物抗病性大有益处。

2 转植物几丁质酶基因的研究进展

高等植物本身不含作为真菌细胞壁组分之一的几丁质,但几丁质酶却广泛存在于高等植物中,包括单子叶植物和双子叶植物。几丁质酶分布于植物的茎、叶、种子及愈伤组织中。当植物受到真菌、细菌、病毒感染时,几丁质酶活性迅速提高。早在 1938 年,Zechmeister^[9]和 Balint 首次报道,杏胚乳可以产生几丁质酶和几丁质二糖酶。1950 年和 1951 年 Jeuniaux^[10]发现从蜗牛肠道分离的分解几丁质的细菌和土壤中的放线菌能产生胞外几丁质酶。此后,人们相继从多种微生物、多种植物及动物中分离到几丁质酶,并对几丁质酶的理化特性及生物学性状进行了大量的研究。澳大利亚 Poivnin 和 Irzykiewicz^[11]研究比较了十几种不同植物种子内的几丁质酶体系,发现菜豆、小麦和甘蓝种子内几丁质酶活性最高。以后发现,植物除种子外,茎、叶、根、块茎等部位也有几丁质酶,但一般含量较低。

80 年代以来,随着分子生物技术的迅猛发展,人们又把注意力转移到几丁质酶对真菌生长的抑制上,并希望通过基因工程手段培育出抗真菌的转基因植物。植物几丁质酶基因的研究最早见于菜豆。1986 年 Broglie^[12]以菜豆 mRNA 为模板,经反转录得到菜豆 cDNA,并进而构建菜豆 cDNA 基因文库,通过差异原位杂交的方法获得了菜豆几丁质酶基因,该基因含有 1132 个核苷酸碱基,在基因 5' 一端

和 3' 一端分别含有 34 和 125 个核苷酸碱基的非编码序列,菜豆几丁质酶基因含有 328 个 aa,在其 N 一端也含有一个 aa 残基的信号肽,在脱去信号肽后才能成为成熟的几丁质酶。

1991 年, Broglie^[13]等首次报道转几丁质酶基因的植物抗真菌病。他们将菜豆几丁质酶基因置于 CaMV35S 启动子控制下,转入烟草和油菜,转基因植物组成型表达菜豆几丁质酶基因,死苗率大大降低,病情发展缓慢。然而,同样的转基因烟草植株对病原真菌(*Cercospora nicotianae*)抗性并未提高。进一步的研究证明,几丁质酶同工酶类型及其在植物体内定位不同,影响转基因植物抗病性效果。

至 1995 年底止,已有水稻、大麦、烟草等植物的几丁质酶基因被转入水稻、烟草、番茄等植物,一些转基因植物对立枯丝核真菌、烟草蛙眼病菌引起的病害显示了较强的抗病性。相继报道了提纯的烟草、马铃薯、黄瓜、豌豆、鹰嘴豆、甜菜、水稻、小麦、大麦、玉米几丁质酶对立枯丝菌等 20 多种真菌表现出体外抑菌活性。

几丁质酶基因与其它基因组合有增效作用。目前报道最多的是几丁质酶与 β -1,3 葡聚糖酶及核糖体灭活蛋白的增效作用。Jongedijk^[14]等将烟草 I 型几丁质酶和 I 型 β -1,3 葡聚糖酶在转基因番茄中同时表达,用枯萎病病原菌—镰刀菌感染后,病害比对照减少 36%~58%,且受害植株可恢复正常生长。由于这两种酶可分解真菌的细胞壁而抑制真菌的生长,转入其中任一基因抗病性可显著降低。Zhu^[15]等(1994)利用组成型表达苜蓿 β -1,3 葡聚糖酶与水稻几丁质酶基因的转基因烟草做亲本,杂交筛选同时含有两种基因类型的植株,活体接菌实验结果表明,两者具有较高的协同效应,能有效抵抗尾孢菌的侵染,两种基因共同表达的转基因烟草对病原真菌的抗性亦明显高于转单基因植株。

核糖体灭活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP)来自植物,是一种作用于真核生物核糖体、抑制蛋白质合成的蛋白毒素。RIP 并不使自身核糖体失活,但能专化性的使真菌等的核糖体受损。以大麦中分离出来的 RIP 离体实验表明,可抑制真菌生长,且与 β -1,3 葡聚糖酶有协同增强作用。Jach^[16]等将几丁质酶基因、 β -1,3 葡聚糖酶基因和核糖体灭活基因连用,均得到抗性好于单一使用几丁质酶基因的转基因植株。Schell 等(1992)采用同样策略,转大麦 RIPcDNA 的烟草植株增强了对立枯丝核菌的抗性。另外培育几丁质酶和 RIP 共同

表达的转基因植物,可获得较好的对立枯丝核菌的持久抗病性,Zhu^[15]等将大麦核糖体蛋白基因和大麦 ClassII 几丁质酶基因同时转入烟草,转基因植株病害比对照减少 26%~55%;而只转大麦 ClassII 几丁质酶基因的转基因植株比对照减少 20%~35%。

3 今后研究动向

3.1 研究几丁质酶抑菌谱及选择性抑菌的机制

几丁质酶以几丁质为天然底物,从理论上讲,几丁质酶可作用于所有细胞壁含几丁质的真菌,也就是说转几丁质酶基因且表达该基因的植物可以抗所有真菌引起的病害,但事实并非如此。诸多实验表明,几丁质酶似乎只对一部分真菌具有抑菌作用,尤其是对绿木霉、立枯丝核菌和一些镰刀菌。而对另一些真菌无效或结果不一,也就是说几丁质酶抑菌作用具有选择性,这种选择性究竟由什么引起?可能有种种原因,例如真菌细胞壁的生化组成、结构各不相同,越易接触到几丁质酶则越易被降解;几丁质酶在细胞中的定位与真菌感染起始位点及菌丝繁殖路径相一致,则越易被降解;几丁质酶表达动力学活性最高期与真菌感染期相一致则越易降解。另外,在植物体内组成型超量表达(2~5 倍)几丁质酶,对于增强其防御抗性是足够的,但同时在不受侵染时仍需消耗植物大量能量,所以极有可能造成作物减产。真菌细胞壁结构、几丁质所占比例、几丁质暴露程度的差异、真菌体内 β -1,3 葡聚糖酶调节因子的作用或其它因子的作用都有可能影响几丁质酶抑菌作用的选择性,有必要对选择机制作深入研究,以便扩大几丁质酶抑菌谱。由于参试的真菌类较少,每种几丁质酶的抑菌谱并不真正为人所知。因此今后应使用更多的真菌进行实验。

3.2 转几丁质酶基因与其它基因组合,进一步研究植物几丁质酶基因与其它基因组合的增效作用及机理

单转几丁质酶基因能抑制某些真菌病害,但同时几丁质酶基因与 β -1,3 葡聚糖酶基因或大麦核糖体灭活基因组合转入植物,植物的抗病性显著增强。从目前研究情况来看,几丁质酶基因与 β -1,3 葡聚糖酶基因组合在一起时抑真菌作用显著提高,凡是转入这一基因组合的转基因植物一般抗性显著增强。是否转入更多基因就能起到累加或增效作用,Jongedijk^[14]等将烟草几丁质酶基因和 β -1,3 葡聚糖酶基因等四种基因组合转入番茄,结果只有

ClassII 的几丁质酶基因和葡聚糖酶基因得以表达。因而转入过多的基因不一定起到累加或增效作用。因此,在进行抗真菌病基因工程时应优先使用几丁质酶基因与 β -1,3 葡聚糖酶基因组合。在今后的研究中,有必要测试更多的组合,以便得到更好的增效组合,并且探明其增效机理。

3.3 加速现有转基因植物的商品化和实用化

由于基因转化的难度较大,得到的转基因植物群体不大,用于生物测定的植株数偏小,并且目前大多数研究处于实验室阶段。因此,实施转几丁质酶基因植物的大田化、产业化是今后的发展方向。同时,这些抗病植物的后代表现如何?抗病性和转基因表达能否稳定地传给后代?对其它病害抗性如何?是否可从后代中选出纯合转基因抗病且高产、优质的个体,并培育成为品系或推广品种,都需深入研究。

参考文献:

- [1] James WC., Teng P., Nutter Fw. CRC Press. 1990, (1): 15-50.
- [2] 吴东儒. 糖类的生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 349-352.
- [3] 黄秀梨. 几丁质, 脱乙酰几丁质—具有广泛应用前景的生物多聚物[J]. 应用微生物, 1989, (3): 13-15.
- [4] Brandt C.R.. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orygia Pseudotsugata*[J]. Invertebr. Pathol. 1978, (32): 12-14.
- [5] 高必达. 植物几丁质酶的分子生物学研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(6): 587-602.
- [6] Roby, D., K. Broglie, R. Cressman, et al. Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungus[J]. Plant Cell. 1990, (2): 999-1001.
- [7] Samac D. A.. Isolation and characterization of the genes encoding basic and Acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*[J]. Pl. Physiol., 1990, (93): 907-914.
- [8] Fukuda Y., Ohme M., Shinshi H.. Gene structure and expression of a tobacco endochitinase gene in suspension cultured tobacco cells[J]. Plant Mol Biol., 1990, (16): 1-10.
- [9] Zechmeister L., G. Toth. Uber die chromatographische trennung einiger enzyme des emulsinns[J]. Enzymologia. 1938, (5): 302.
- [10] Jeuniaux, C.. Production d'une exochitinase par des bacteries chitinolytiques du contenu intestinal del escargot Arch[J]. Int Physiol. 1950, (58): 352.
- [11] Powning RF., Van KA.. The chitinase produced by several different plants seeds[J]. Comp. Biochem. Physiol., 1965, (14): 127-133.
- [12] Broglie K. E. Gaynor J. J., Broglie, R. M.. Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from phaseolous vulgaris[J]. (下转第 50 页)

1.4.6 定植前炼苗 定植前 2~3 d 实行变光变温炼苗。门窗大开, 结合浇水, 使之适应环境条件。

1.4.7 整地施肥 定植前两周整好地, 选择有机质丰富、疏松肥沃、保肥保水的壤土或沙壤土, 起垄耙地前施腐熟农家肥 4 000~5 000 kg/667m², 磷酸二铵 20 kg 后起垄。缓苗后查田补苗, 过一周左右和莲座前中耕锄草各一次, 结合追肥浇水, 严防脱肥缺水。

2 注意事项

2.1 寒地花椰菜温室育苗移栽的苗期温湿度管理

是培育壮苗的关键, 栽培的适宜温度: 幼苗期 22~26℃, 夜间不可低于 10℃, 更不能连续低温, 防止过早通过春花阶段早期显球。要使苗期不受低温感应, 方能育出高脚花瓶式的壮苗。

2.2 选择最佳播期。培育适龄壮苗是高产栽培的重要环节, 定植后 60~70 d 左右成熟的中熟品种, 定植时幼苗达 6~8 片叶为宜, 苗龄过长与增产关系不大, 过短则达不到壮苗标准, 最佳播期约为 5 月 25 日前后, 苗龄在 40~50 d 为宜。

2.3 必须选用秋花椰菜中熟种, 切忌春、秋花椰菜种子混用。

(上接第 31 页)

Proc Natl Acad Sci. USA., 1986, (83): 6820-6824.

[13] Broglie Ke, Chet I., Holliday M., et al.. Transgenic plant with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia Solani[J]. Science, 1991, 254: 1194-1197.

[14] Jongedijk E., Tiglaar H., Roekel J. S. C., et al.. Synergistic activity of chitinases andβ-1, 3- glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants[J]. Euphytica., 1995, 85(1-3): 173-178.

[15] Zhu Q. Maher. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co- expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco[J]. Bio/ Technology, 1994, 12: 807-811.

[16] Jach G., Gomhardt B., Mundy J., et al.. Enhance quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco[J]. Plant - Journal, 1995, 8(1): 97.

欢迎订阅 2005 年度各种农业科技期刊

刊名	刊期	邮发代号	期定价(元)	订阅办法	地 址	邮编
黑龙江农业科学	双月	14- 61	5. 00	全国各地邮局	哈尔滨市南岗区学府路 368 号	150086
大豆科学	季刊	14- 95	7. 00	全国各地邮局	哈尔滨市南岗区学府路 368 号	150086
现代化农业	月刊	14- 84	4. 00	全国各地邮局	黑龙江省佳木斯市安庆街 382 号	154007
果树实用技术与信息	月刊	8- 220	1. 90	全国各地邮局	辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所	125100
现代农业科技	月刊	26- 41	3. 00	全国各地邮局	安徽省合肥市西郊四里河农科南路 40 号	230031
河南农业科学	月刊	36- 32	5. 00	全国各地邮局	郑州市农业路 1 号	450002
大豆通报	双月	14- 228	5. 00	全国各地邮局	哈尔滨市道外区南通大街 23 号	150050
玉米科学	季刊	12- 137	10. 00	全国各地邮局	吉林省公主岭市西兴华街 6 号	136100
中国农业市场	月报		1. 50	自办发行	北京·圆明园西路 2 号中国农业大学	100094
农村大市场	月刊		5. 00	自办发行	北京·圆明园西路 2 号中国农业大学	100094
西南农业学报	双月	62- 152	10. 00	全国各地邮局	成都市静居寺路 20 号省农科院内	610061
草食家畜	季刊	58- 71	4. 50	全国各地邮局	乌鲁木齐市克拉玛依东路 21 号	830000
土壤肥料	双月	2- 559	4. 00	全国各地邮局	北京市中关村南大街 12 号	100081
山西农业科学	季刊	22- 24	4. 00	全国各地邮局	太原市长风街 2 号	030006
湖南农业科学	双月	42- 20	5. 00	全国各地邮局	长沙市芙蓉区马坡岭湖南省农科院	410125
实用技术	月报		15. 00(年)	自办发行	安徽淮南洞山中安科技研究院	232001