

# 植物抗细菌病害基因工程研究进展<sup>\*</sup>

李祥羽<sup>1</sup>, 常敬礼<sup>2</sup>, 孙培昕<sup>2</sup>, 韩 凌<sup>3</sup>, 张艳菊<sup>2</sup>,

(1. 黑龙江省农科院科技信息中心, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 3 黑龙江省农科院大豆所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 植物细菌性病害常常给农业生产造成严重损失, 利用基因工程手段提高植物的抗病性是抗病育种新的研究热点。本文论述了就目前植物抗细菌病害基因工程研究现状, 着重论述了植物抗细菌基因工程研究的基本策略、植物抗细菌基因工程取得的主要成绩及植物抗病相关基因工程研究进展, 并在此基础上指出了植物抗病基因工程存在的问题和今后研究的重点。

**关键词:** 细菌病害; 基因工程; 抗病基因

中图分类号: Q 1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2006)01-0074-04

## Research Progress of Bacterial Disease Resistance in Plant Thorough Genetic Engineering

LI Xiang-yu<sup>1</sup>, CHANG Jing-li<sup>2</sup>, SUN Pei-xi<sup>3</sup>, HAN Ling<sup>3</sup>, ZHANG Yan-ju<sup>2</sup>

(1. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 3. Soybean Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Plant bacterial diseases cost great loss every year. To enhance plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering is an effective way. This paper summarized the basic strategies and main achievements in plant bacteria-resistance gene engineering including the disease-resistance related gene engineering and discussed the problems existed in plant gene engineering of disease-resistance and the importance we should research in future.

**Key words:** plant bacteria disease; gene engineering; resistance gene

全世界细菌性作物病害约有 500 多种, 我国主要的细菌作物病害有 60~70 种。细菌性病害常造成严重损失, 据估计, 全世界马铃薯每年因细菌性病害减产 25%。对于这些细菌性病害的防治通常是比较困难的, 可用于化学防治的高效低毒杀细菌农药较少, 防效往往不能令人满意, 而且还会造成环境和农产品的污染<sup>[1]</sup>。为了提高农作物产量和品质, 植物病害的控制显得尤为重要。

传统的抗病遗传育种由于其周期长, 工作量大, 很难满足目前需要。随着分子生物学理论与技术的不断发展以及人们对植物抗病分子机制了解的逐步深入, 人们有目的的操纵基因获得广谱抗病品种成

为可能。近年来, 植物抗病基因工程取得了许多突破, 显示出诱人的前景。

### 1 植物抗细菌病害基因工程的基本策略

近年来, 植物抗病反应机制及植物病原菌致病机理的深入研究, 为植物抗病基因工程策略的制定提供了基础和依据。植物和病原菌的相互作用经历识别、信号传递和防卫反应 3 个环节后, 最终的互作表现为感病或抗病则取决于植物和病原菌双方的特性。所以植物抗病基因工程可以通过下面不同的技术路线来实现。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2005-07-11

第一作者简介: 李祥羽(1978-), 男, 黑龙江省铁力市人, 植保专业学士, 在读农学硕士, 实研, 从事农业科技信息工作。E-mail: xian-gyu527443@sohu.com.

通讯作者: 张艳菊

## 1.1 植物抗病基因及病原物无毒基因的利用

根据基因对基因理论, 只有当植物中抗病基因产物与病原菌中相对应的无毒基因产物相互识别后才能诱导抗病反应。在植物抗病基因的利用上可以从以下几方面考虑。首先, 根据已有的 R 基因结构特征设计新的 R 基因。对已有的 R 基因研究资料发现, R 基因都是高度保守的, 它们具有共同的功能区域, 在无毒基因的利用上, 研究较多的是植物病原菌无毒基因的转基因。另外, 也可以把病原菌的无毒基因和与之相对应植物的抗病基因一起导入植物中, 在特定的条件下可刺激两者同时表达, 相互作用后激发植物的抗病反应。与植物抗病信号传递有关基因的利用是获得植物广谱抗病的一种有效策略。不同植物的抗病过程可能涉及到许多不同的信号传递通道, 而在不同信号的传递过程中, 可能存在着共同的枢纽基因, 这些基因对下游的多种防卫反应起重要的调控作用。

目前在拟南芥中已鉴定了多个系统获得抗性 (SAR) 发生改变的突变体<sup>[2,3]</sup>, 并克隆了多个对植物防卫反应具有调控作用的基因, 如 NPRI 等。

## 1.2 导入植物防卫反应病程相关蛋白基因, 增强植物抗病性

在植物抗性中, 抗病基因只是一个效应因子, 它是通过激活防卫反应起抗病作用的。因此可以直接导入植物防卫反应基因, 使其在植物中表达, 从而提高植物抗病能力。植物的防卫机制极其复杂, 主要包括蛋白、水解酶类和植保素的产生等, 相关基因都可以通过分子操作导入植物中。

## 1.3 导入降解病原菌致病因子的基因

植物病原菌产生的毒素是一类重要的致病因子, 但产毒素菌却具有自身保护机制, 使其免受毒素的毒害。人们设想从病原菌中克隆降解毒素基因, 并把这种基因导入植物, 使转基因植物能抵抗毒素菌产生的侵染, 提高植物的抗性。

## 1.4 导入其他抗菌蛋白(肽)基因以增强植物抗病性

1.4.1 抗菌肽 抗菌肽对细菌病害的作用效果较好, 它的作用机制为: 通过抗菌肽分子多聚体插入细胞膜形成离子通道, 导致细胞膜内外的离子浓度失控而杀死细胞, 一些真核细胞对抗菌肽不敏感。抗菌肽的广谱杀菌能力使其成为植物抗细菌病害基因工程的一种有用策略, 转抗菌肽基因工程主要集中于双子叶的烟草和马铃薯以及单子叶的水稻。

1.4.2 疏素 离体条件下, 疏素对一些植物病原菌

有毒性, 被认为与植物对病原细菌的抗性有关。

## 2 目前抗细菌基因工程取得的成就

### 2.1 解毒基因工程

2.1.1 抗菜豆毒素的转基因工程 菜豆毒素 (phaseolotoxin) 是由菜豆晕斑病菌 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) 产生的非寄主专化性毒素。病原菌的侵入与褪绿症状的出现有关, 系统侵染是菜豆毒素在寄主植物上直接作用的结果。菜豆毒素抑制精氨酸生物合成有关酶, 即鸟氨酸氨甲酰基转移酶 (OCTase) 的活性, 从而也抑制了鸟氨酸氨甲酰基磷酸盐向精氨酸的转化, 在感病的植物体中, 毒素被肽酶水解形成一个不可逆抑制剂, 在受侵组织中这种抑制剂为毒素存在的主要形式<sup>[4]</sup>。

产菜豆毒素的 *P. s. pv. phaseolicola* 对毒素不敏感。病原菌对毒素的这种抗性是通过合成另一个不被菜豆毒素抑制的 OCTase (OCTase R) 来实现的。编码这种对菜豆毒素不敏感 OCTase 的基因是 *argK*, 该基因已从 *P. s. pv. phaseolicola* 中得到克隆并测序。将 *argK* 基因导入植物基因组中可以使转基因植株获得对菜豆毒素的抗性。

在植物细胞中 OCTase 位于叶绿体上, 为获得在此细胞器上表达抗性的 OCTase 转基因植株, Dela Fuente 等<sup>[5]</sup> 构建了一个嵌合基因, 将 *argK* 的编码序列融合到核酮糖二磷酸羧化酶 (一个在叶绿体中有活性的核编码蛋白) 的小亚基的转运肽上, 受 CaMV 的 35S 启动子控制, 将构建成的基因转入烟草和菜豆, 获得的转基因烟草和菜豆植株表现出较对照高 1~10 倍的 OCTase 活性。

2.1.2 抗烟草毒素的转基因工程 引起烟草野火病的 *P. s. pv. tabaci* 产生一个二肽的毒素, 即烟毒素 (tabtoxin)。该毒素含有一个不常见的  $\beta$ -内酰胺氨基酸和丝氨酸或苏氨酸。H. Anzai 等分离到了抗烟毒素的基因, 它是通过筛选在含烟毒素的基本培养基上能够生长的 *P. s. pv. tabaci* 基因文库克隆获得的, 该基因即为 *ttr* 基因 (tabtoxin resistance gene), 它编码一个酶, 通过乙酰化反应使烟毒素或 R-内酰胺失活。将 *ttr* 基因与 CaMV 35S 启动子融合成嵌合基因, 通过根癌土壤杆菌介导的转化法导入烟草中, 所获得的转基因烟草植株中 *ttr* 基因表达水平很高, 对 tabtoxin 处理及病原菌的侵染均表现出了良好的抗性<sup>[6]</sup>。

### 2.2 抗菌蛋白(肽)基因工程

2.2.1 转抗菌肽基因工程 用花粉管导入法, 李乃坚等(1998)<sup>[7]</sup> 以质粒 pRS505 为载体, 以 *Nopaline*

和 *Bar* 基因为选择标记, 在肌动蛋白基因启动子 *rbcS* 和 *CaMV35S* 启动子调控下, 将长度为 159bp 的抗菌肽 B 基因构建成 pCB5 质粒。用 SSC 溶液将 pCB5 质粒 DNA 稀释成 100 g/mL 的溶液, 在烟草开花期, 选择开花后 24 ~ 30 h 的健康小花, 将花柱剪去 2/3。用微量注射器从剪口处慢慢插入, 使深度达 10 mm, 轻轻地注入 10<sup>4</sup>L DNA 稀释液, 再轻轻拔出注射器, 经注射的子房用小纸筒套好, 10d 后取下纸筒, 收获种子。将转基因种子播于苗床, 在小苗生长至 6 片真叶时浸根接种青枯病细菌, 测定其抗病性。结果转基因植株表现出较好的抗病和推迟发病的特点<sup>[8]</sup>。

从昆虫惜古比天蚕蛾的血淋巴中分离到了一些裂解肽, 这些低分子量的 (约 400) 肽具有杀死植物病原细菌的活性。J. M. Jaynes 等 (1993)<sup>[9]</sup> 根据获得的肽设计合成了能表达这种裂解肽的人工基因 *Shiva-1*, 并构建了含有该基因的载体 (以马铃薯蛋白酶抑制剂的创伤诱导启动子调控), 将该基因转入烟草。用 *R. solanacearum* 强毒株接种时, 转基因烟草的 R<sub>i</sub> 子代幼苗较对照明显推迟了青枯病症状的出现, 降低了病害严重度和死苗率。而将同样的转基因植株用浸根的方法接种病原菌时, 则表现出与对照未转基因植株相同的感病性。这种抗性差别是由嵌合基因所用启动子的特性所决定的。

用编码天然裂解蛋白 *attacinE* 的基因转化对梨火疫病 (*E. amylovora*) 感病的苹果砧木, 获得的转基因苹果植株在接种 *E. amylovora* 时表达 *attacinE* 裂解肽, 并推迟发病, 使病害明显减轻 (Norelli, 1993)。

*Cecropin* 是研究较多的来自蚕的一种抗菌肽, 对青枯病菌、水稻白叶枯病菌和水稻条斑病菌都有一定的杀菌效果。转基因植物研究也取得了较大成功。贾士荣等 (1994) 和 M. Hassan 等 (1993)<sup>[10]</sup> 向马铃薯中导入 *cecropin* 基因后提高了马铃薯对青枯病的抗性。J. M. Jaynes 等 (1993) 将 *cecropinB* 的基因转入烟草后获得的转基因植株提高了对由 *R. solanacearum* 引起的病害的抗性。中国水稻所黄大年等 (1997) 分别以水稻 *Act1* 启动子和 *CaMV35S* 启动子启动的 *cecropinB* 和 *cecropinD* 的基因通过基因枪法导入水稻幼胚, 获得的转基因水稻植株可明显提高对水稻白叶枯病菌的抗性, 他们同时也获得了高抗水稻细菌性条斑病和水稻白叶枯病的高抗株系。

2.2.2 转硫素基因的基因工程 M. J. Garmona 等

(1993) 将来源于大麦基因组克隆的  $\alpha$ -硫素基因和来源于小麦 cDNA 克隆的  $\alpha$ -硫素基因在 35S *CaMV* 启动子的调控下构成嵌合基因转化烟草, 获得了较对照有不同表型的转基因烟草植株。转基因植株接种 *P. s. pv. tabaci* 后发现, 对照株和低表达转基因株在接种点形成了 55% ~ 75% 的坏死斑, 而较高表达水平的转基因烟草在接种点只形成了 5% ~ 30% 的病斑, 且发现病菌的生长也被强烈抑制, 但并未完全被抑制。

## 2.3 植物抗病相关基因工程

2.3.1 水稻抗白叶枯病的转基因工程 水稻抗白叶枯病基因克隆进展较迅速, 从水稻中克隆了抗白叶枯病的 2 个基因, 即 *Xa21* 和 *Xa1*<sup>[11~13]</sup>。G. L. Wang<sup>[14]</sup> 等 (1996) 通过微弹轰击法将水稻抗白叶枯病菌基因 *Xa21* 导入感病品系 *O. sativa* sp. Japonica Var Taipei309, 测定了来自印度、印度尼西亚、哥伦比亚、中国、菲律宾、尼泊尔、朝鲜和泰国 8 个国家的 32 个水稻白叶枯病菌菌株在 T1 转基因系、受体品种 TP309 以及原初抗病品种 IRBB21 上的致病表型变化。结果发现, 其中 29 个菌株在 T1 植株和 IRBB21 上均不能引起感病反应, 而且转基因植株至少对 16 个菌株的抗性较原初抗病品种 IRBB21 有所提高, 这可能是由于转基因植株中 *Xa21* 基因的拷贝数较高所致。

2.3.2 番茄抗斑点病的转基因工程 番茄抗斑点病的基因存在于一个多基因的基因家族中。研究较清楚的抗病及相关基因有 *Pto*、*prf*、*Fen* 和 *Pti*<sup>[15~17]</sup> 等。

2.3.3 *NPRI* 的转基因工程 *NPRI* 基因 (non-expresser of PR 基因), 也被称为 *NIMI* (nonimmunity) 基因或 *SAII* (salicylic acid insensitivity) 基因, 是从拟南芥植物中克隆得到的。它是导致包括 SAR 及局部获得抗性在内的一般获得抗性反应发生的 SA 信号传递过程中的一个重要调节因子。*NPRI* 基因的突变将使植物即使在 SAR 诱导因子预处理后也失去对毒性病原真菌和细菌的抗性。

Cao<sup>[18]</sup> 等用作图克隆法获得了拟南芥的 *NPRI* 基因, 它编码的蛋白含有一个 ankyrin 重复结构, ankyrin 重复结构已被发现存在于动物免疫反应调控蛋白中。Cao 等通过表达 *NPRI* 蛋白的策略获得了广谱抗病的拟南芥植株。*NPRI* 基因是植物防卫反应调控基因, 它的转基因研究给植物抗病性研究带来了新的视点, 在实践中具有重要意义。令人振奋的是 *NPRI* 蛋白类似物在多种经济上重要的植物

中得到鉴定, 其中包括 can01a、大白菜、花茎甘蓝 (broccoli)、烟草、番茄、马铃薯、玉米和小麦, 并已从烟草和番茄中分离到了与 *NPRI* 基因同源的 cDNA 克隆, 它们编码的蛋白与拟南芥 *NPRI* 蛋白具有 70% 氨基酸同源性, 这些现象的发现为拟南芥 *NPRI* 基因在其他植物基因工程上的应用提供了依据。

### 3 植物抗病基因工程的应用及存在的问题

随着分子植物病理学的研究深入及生物技术的发展, 越来越多的病原菌致病基因及植物抗病相关基因得到克隆, 其中不少基因已被用于植物转基因研究以期提高植物的抗病性, 并取得了不少令人惊喜的成就, 尤其是植物抗病基因的转基因因为植物的抗病育种提供了一条捷径。目前, 转基因工程研究仍然存在着一些问题, 抗病基因工程要获得深入发展, 加强以下方面的研究是十分必要的。

3.1 加强植物个体发育的研究, 阐明形态变化, 组织分化世代交替的调控机制和发生过程。

3.2 加强植物体内基因表达调控的研究, 阐明各类基因的功能, 结构, 表达机制。

3.3 加强植物体内修饰限制系统的研究, 探讨植物和外界生物之间胁迫和适应的原理。

3.4 加强植物和病原物相互作用的分子机理的研究<sup>[19, 20]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Zhou J. M., Loh Y. T., Bressan R. A.. The tomato gene *ptil* encodes a serine/ threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response[ J ]. *Cell*, 1995, 83: 925-935
- [2] Clarke J. D, Liu Y, Klessig DE, et al. Uncoupling PR gene expression from NPRI and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* *cp16-1* mutant[ J ]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 557-570
- [3] Jack G, Gornhard B, Mundy J, et al.. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley *anhr* Unga proteins in transgenic tobacco[ J ]. *Plant*, 1995, 8: 97
- [4] Mosqueda G., Van den Broeck G, Saucedo O. Isolation and characterization of the gene from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* encoding the phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase[ J ]. *Mol. Gene. Genet.*, 1990, 222: 461-466
- [5] Dela Fuente JM, Mosqueda G, Herrera- Ertrella L, et al..

Expression of a bacterial ornithyl- carbamoyl- transferase in transgenic plants confers resistance to phaseolotoxin In Vitro [ J ]. *Biol. Psychiatry*, 1993, 40: 412-418.

- [6] Anzai H, Yoneyama K, Yamaguchi J, et al.. Transgenic tobacco resistance to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin[ J ]. *Mol. Genet.*, 1989, 219: 492
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[ M ]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] Hightower R, Baden C, Penzes E, et al.. The expression of ceropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tobaci*[ J ]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13: 295-299
- [9] Jaynes JM, Nagpala P, Beltran L, et al.. Expression of a ceropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[ J ]. *Plant Science Limerick*, 1993, 89: 43-53
- [10] Hassan M, Sinden SL, Kabayashi RS, et al.. Transformation of potato with a gene for an antibacterial protein, ceropin, *Acta Horticulturæ* [ J ]. 1993, 336: 127-131
- [11] Ronald P. The molecular basis of disease resistance in rice, *Plant Molecular* [ J ]. *Biology*, 1997, 35: 179-186
- [12] Ronald P. C., Albano B., Abenes L., et al.. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus[ J ]. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, 236: 113-120
- [13] Yoshimura S., Yamanouchi U., Katayose Y.. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice is induced by bacterial inoculation, *Proc* [ J ]. *Natl. Acad. Sci.* 1998, 95(4): 1663-1668
- [14] Wang GL, Song WY, Ruan DL, et al.. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple xanthomomorphs *oryzae* pv. *Oryzae* isolates in transgenic plants[ J ]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1996, 9(9): 850-855
- [15] Rommens CM, Salmeron JM, Oldroyd GE, et al.. Intergenic transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*[ J ]. *The Plant Cell*, 1998, 7: 1537-1544
- [16] Salmeron J. M., Oldroyd G. E. D., Rommens C. M. T.. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster[ J ]. *Cell*, 1996, 86: 123-133
- [17] Tang X. Y., Frederick R. D., Zhou J. M., Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase[ J ]. *Science*, 1996, 274: 2060-2065
- [18] Cao, H., Bowling, S. A., Gordon S.. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[ J ]. *Plant Cell*, 1998, 6: 1583-1592
- [19] 宋从凤, 王金生. 植物抗病基因工程策略及其前景[ J ]. *世界农业*, 2001, (10): 39-41.
- [20] 王金生. 分子植物病理学[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 1999.