

应用生物技术提高烟草 对野火病抗病性的研究进展*

刘雅婷 张世光

(云南农业大学,云南省植物病理重点实验室,昆明 650201)

摘要: 自80年代中后期以来,在应用生物技术提高植物抗病性方面取得了重大进展。对应用生物技术提高烟草对野火病抗病性的研究进展进行了综述。

关键词: 基因工程;细胞工程;烟草;野火病菌;抗病性

中图分类号: S 435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2000)02-0168-04

烟草野火病是由烟草假单孢杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)引起的细菌性病害,近年来有日趋上升的趋势,在我国黑龙江、吉林、辽宁、云南烟区连年发生,且危害严重,特别在云南逐渐成为云南烟草的主要病害之一。目前对该病的防治主要是靠化学和抗菌素类药剂,但这些药剂不仅不能完全有效地控制病情,还给环境带来了许多潜在的威胁。近年来国内外许多专家利用各种生物技术手段对烟草野火病抗性进行研究,目前已取得重大进展。

1 基因工程

1.1 杀菌肽的应用

抗菌蛋白是动物防御机制的一种重要组成部分,在节肢动物、两栖动物和哺乳动物中都普遍存在。编码的抗菌蛋白基因已经克隆出来并在植物中得到表达^[1]。

1.1.1 蚕素(cecropin)

蚕素由30多个氨基酸残基组成,不同来源的多肽的氨基酸序列具有较强的保守性。它作用于细菌的细胞膜,破坏膜的完整性,造成离子通道,最终导致细胞内含物泄漏。它对很多植物病原细菌有较强的杀伤作用^[2]。目前一种稳定的蚕素类似

物(MB39)已经在烤烟上得到表达,转基因植株的后代,被*Ps. syringae* pv. *tabaci* 侵染后不会产生坏死症状^[3]。

1.1.2 溶菌酶(Lysozyme)

溶菌酶是在生物中普遍存在的酶类,它对细胞中的肽聚糖具有特殊的水解活性。许多生物的溶菌酶(Lysozyme)具有几丁质酶和溶菌酶活性的双重功能,既能降解真菌细胞壁中的几丁质和葡聚糖,又对植物病原细菌表现出很强的裂解活性,用基因工程方法将外源溶菌酶的基因导入植物可提高对细菌病害的抗性^[4]。目前有3种溶菌酶基因(蛋白,T4-噬菌体和人体溶菌酶)已经在植物体上得到表达。从转基因植株提取的细胞外提取物产生鸡卵溶菌酶抑制几种细菌的生长,但是转基因系对细菌性病害的敏感性还未报道^[5]。通过温室和离体培养实验表明,将人体溶菌酶基因导入烤烟后,转基因烤烟产生了人体溶菌酶,*Ps. syringae* pv. *tabaci* 仅出现烤烟植株的轻微病症^[6]。

1.2 抑制细菌致病性或致病力的因素

从理论上说,植物表现出的抑制细菌致病性(pathogenicity)或者致病力(virulence)因素会使植株产生抗性 or 降低感病性。然而,尽管人们很清楚许多细菌种类的致病因素(如致病毒素,果胶酶,外

* 收稿日期: 1999-10-22

作者简介: 刘雅婷(1971-),女,湖南人,现为云南农业大学硕士研究生,主要从事植物细菌性病害研究。

多糖,植物激素)但这些知识并没有被很好的应用到提高抗病性^[7]。*Ps. sy. pv. tabaci* 能产生一种细菌毒素系即烟毒素系(tabtoxin),它干扰烟草细胞正常代谢,并间接影响叶绿素的合成形成褪绿的病症。这种毒素是非专一性的,除烟草外,对多种植物、动物、细菌等均有毒性,而野火病菌却能抵抗高浓度的烟毒素,表明该菌体内存在自我保护机制^[8], Anzai 等(1989)成功地从烟草野火病菌(*Ps. sy. pv. tabaci*)中克隆了编码自身合成毒素分解酶基因 ttr(tabtoxin resistance),并成功地导入烟草,结果转基因烟草表现出对野火病的高度抗性^[9]。

1.3 植株保卫基因的表达

植物受到病原菌侵染后,常可产生一些具有抑菌活性的小分子化合物,多数情况下这类化合物的积累浓度与寄主对特定病原菌的抗性之间呈正相关,这类化合物被称为植物保卫素(Phytoalexin)。通过导入植物保卫素合成所需的有关酶的基因,提高植物体内植物保卫素的合成和积累水平,可以提高植物的抗病性^[4]。异种植物保卫基因表达导致产生植物保卫素、PR 蛋白或者植物防腐肽,在转基因植物上主要用于对真菌抗性,只有一组抗微生物肽(antimicrobial peptide),硫堇(Thionin)用于抗细菌性病害。它们的活动是细胞膜磷脂相互作用的结果,硫堇在离体培养中表现出抑制病原细菌的扩散,但是在转基因的烤烟植株上表达的大麦的硫堇基因已经对 *Ps. sy. pv. tabaci* 产生不同程度的抗性。在其中一次实验中,植物叶部接种该病原物 3 d 后出现褪绿很少^[10],而另一次实验中尽管转基因植株中已产生了硫堇却没有发现抗性^[11]。这一阴性的结果可能是由于硫堇分泌物未进入细菌大量存在的细胞外空间。

一般说来,将单个保卫细胞导入转基因植株上只能产生部分抗性,这可能是因为在同一植株上保卫细胞对抗病原起促进作用。

1.4 人工诱导植物系统性获得抗性(SAR)

植物受坏死型病原物侵染后,在未侵染部位产生对随后病原物侵染的抗性,称为系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)。诱发 SAR 的病原物包括诱导侵染组织产生过敏反应(hypersensitive response, HR)的非亲和性病原,及诱导产生坏死斑的亲亲和性病原。近年来发现有些化学制剂,如水杨酸(SA)2,6-二氯异烟酸(INA),苯并

噻唑类(BTH)也能诱发 SAR^[12]。

1.4.1 avr 基因

在分子水平上激发植株自我保护一直是研究热点,De Wit 等(1992)根据 Flor 基因对基因学说提出了获得具非专化抗性的转基因抗病植物的“双组分系统理论”,即在某一特定的寄主-病原菌互作系统中,把病原菌的无毒基因(avr)或无毒基因和寄主的抗病基因(R)与一个特殊的启动子融合在一起,组成双组分系统导入寄主植物中,筛选出抗病品种。当病原菌侵入该种植物时,其中的启动子能及时作出反应,并启动 avr 基因或 avr 基因和 R 基因的表达,两者的产物发生互作后诱发植物的保护反应(HR 反应)从而使植物抗病。由于启动子受各种非专化病原菌及其激发子所诱导,而植物体内产生的各种保卫反应不是专化性的,即对不同的病原菌,可能具有共同的保卫反应,因而可获得广普抗性的转基因植物^[4]。

我国刘国胜等 1996 年成功地将病原特异诱导表达的启动子 PAL、CHS 和 Pi II 控制的 avrD 基因转入烟草,转基因烟草生长正常,可育并高抗赤星病、野火病和青枯病等 3 种病害^[13]。

Thilmony(1995)利用丝-苏氨酸激酶将番茄中的 Pto 基因导入烟草植株,使转基因植株表达非致病基因 avrPto,提高了植株的抗性^[14]。

1.4.2 Bacterio-opsin 基因

该方法是用一种细菌的基因(bO)编码一种质子泵(bacterio-opsin 蛋白质),尽管其作用机制还不清楚,它似乎可以激发一种与病原感染类似的诱导物包括 HR。bO 基因在转基因烤烟上的表达增加了对几种病毒的抗性水平并产生对 *Ps. syringae* pv. *tabaci* 的完全抗性。这种转基因植物也积累了大量的水杨酸,这是病原诱导 SAR 的一个关键的化学信号^[15]。

1.5 病程相关蛋白

1.5.1 脂多糖蛋白(protein-lipopolysaccharide, pr-LPS)

在烟叶中,诱导其对烟草野火病产生抗性主要包括阻碍、减慢由致病菌所引起的组织坏死。这可以由寡聚糖和脂多糖、脂多糖蛋白预处理叶片来完成。Bizarri(1996)用 *Ps. sy. pv. aptaya* 中的由 pr-LPS 和热致死细胞组成的诱导剂诱导烟株对野火病产生抗性^[16]。

附表 通过基因工程的方法获得的烟草对野火病的抗性

Tab. Successful Improvement of Tobacco Resistanceto *Ps. sy. pv. tabaci* through Genetic Engineering

方法	蛋白质	来源	抗性水平
杀菌肽的应用	MB39	Giant silk moth	部分
	溶菌酶	人类	部分
抑制细菌致病性或致病力的因素	抗烟毒素蛋白	<i>Ps. sy. pv. tabaci</i>	完全
增强植物自身防病能力	Thionin	大麦	部分
人工诱导植物 SAR	Bacterio - opsin	<i>Halobacterium halobium</i>	完全
	AvrPto	番茄	部分
	AvrD	<i>Ps. sy. pv. tabaci</i>	完全
病程相关蛋白	pr - LPS	<i>Ps. sy. pv. aptata</i>	部分
	LTP ₂	大麦	部分

1.5.2 LTP₂ 蛋白(lipid transfer protein)

Molina(1997)将大麦中的 LTP₂ 蛋白转移到烟叶上可以消除由烟草野火病菌感染引起的症状^[17]。

1.6 其它潜在的方法

克隆植物自身的抗病害基因的表达,根据王绍坤(1987年)^[18]和张世光(1989)^[19]对烟草抗野火病的品种鉴定,若将这些高抗品种中的抗病基因克隆,建立抗病基因文库,通过基因工程技术将抗病基因导入感病品种来培育抗病品种,则能克服常规抗病育种周期长的缺点,从而在较短的时间内培育出抗病品种。定位和克隆抗病基因可以通过限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)和随机引物扩增的多态 DNA(RAPD)等分子标记构建遗传图谱,寻找与抗病基因紧密连锁的 RFLP 或 RAPD 标记,然后用染色体步移法来克隆抗病基因,以及用转座子示踪法、T-DNA 标记插入突变法定位和克隆抗病基因^[4]。

2 细胞工程

何云昆等 1994 年将烤烟品种红花大金元组织悬浮液培养细胞经过 4~5 代继代培养后,铺平板于含野火病粗毒的 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.1 mg/L(简称 MSI)培养基上进行筛选或置于含野火病粗毒 MSI 液体培养基中进行浅层筛选培养。存活的愈伤组织转移至相同的培养基进一步筛选,经两次筛选得到的愈伤组织在 MS+2,4-D 0.1 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 培养基上诱导分化形成植株,通过上述方法筛选得到的抗性愈伤

组织细胞比未经过筛选进行继代培养的愈伤组织细胞对野火病粗毒表现出较强的抵抗力;对筛选得到的愈伤组织再生植株及其后代进行人工接种,从中筛选出一些抗病株系,研究结果表明,利用体细胞无性系变异,采用细胞立体筛选技术,可以获得抗野火病的烟草新材料^[20]。

3 面临的问题

为了促进基因工程技术的研究和开发,同时预防基因工程及其产品对人类健康和农业生态与环境可能造成的危害,许多国家都十分重视基因工程安全性的评价和管理^[21]。本文所阐述的几种方法(见附表),要真正应用到生产上还需要对其效果、抗病持久性、毒性、对环境的压力作更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Fabienne Mourgues, Marie-Noelle Brisset, Elisabeth Chevreau E. Strategies to improve plant resistance to bacterial disease through genetic engineering [J]. Trends Biotechnol. 1998,16(5): 203-210
- 2 瞿礼嘉,顾红雅,胡莘等.现代生物技术导论[M].北京:高等教育出版社,1999
- 3 Huang Y, Nordeen R O, Di M et al.. Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Ps. sy. pv. tabaci* [J]. Phytopathology, 1997,87:494-499
- 4 崔新明,吴畏,杨竹平等.植物抗真菌和细菌病害基因工程育种策略[J].上海农业学报,1999,15(2):90-96
- 5 Trudeli J, Potvin C, Asselin A. Detection of aglycosylated form of hen egg white lysozyme[J]. Plant Sci., 1995, 106:

- 55-62
- 6 Nakajima H, Muranaka T, Ishige F et al. Expression of a human lysozyme in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Rep., 1997, 16: 674-679
 - 7 余叔立, 汤章城. 植物生理与分子生物学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 786
 - 8 赵为东, 刘进元. 烟草野火病的分子遗传[J]. 生物工程进展, 1997, 17(2): 17-20
 - 9 Anzai H, Yoneyamaguchi J. Transgenic tobacco resistant to bacterial disease by the detoxication of a pathogenic toxin[J]. MGG, 1998, 219: 492
 - 10 Carmona M J, Molina A, Lopez-Fando et al. Resistance to bacterial disease in transgenic tobacco plant expressing thionin from barley[J]. Plant J., 1993, (3): 457-462
 - 11 Florack D E A, Dirkse W G, Visser B, Heidekamp. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco [J]. Plant Mol. Biol. 1994, 24: 83-96
 - 12 蔡新忠, 郑重. 植物系统性获得抗病性的产生机理和途径[J]. 植物保护学报. 1999, 26(1): 83-90
 - 13 刘国胜. 病原细菌无毒基因 *avrD* 介导入的抗赤星病烟草[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 165
 - 14 Thilmony R L, Chen Z, Bressan R A. Expression of the tomato Pto gene in tobacco enhances resistance to *Ps. sy. pv. tabaci* [J]. The-Plant-Cell (USA), 1995, 7 (10): 1529-1536
 - 15 Mittler R, Shukaev V, Lam E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump [J]. Plant Cell, 1995, (7): 29-42
 - 16 Bizarri M, Fiore N, Ranalli P et al. Transmission of induced resistance to *Ps. sy. pv. tabaci* plants regenerated *in vitro* [J]. Phytopathol. Med. 1996, 35(3): 152-156
 - 17 Molina A, Garcia-olmedo F. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP₂ [J]. Plant-Journal (United Kingdom), 1997, 12(3): 669-675
 - 18 王绍坤, 钟树强, 李敏. 烟草品种对野火病的抗性鉴定 [J]. 中国烟草, 1988, (1): 21-22
 - 19 张世光, 陈敏惠. 11个烤烟品种对烟草病菌的抗性鉴定 [J]. 烟草科技, 1989, (1): 29-31
 - 20 何云昆, 吕华飞, 吴成军等. 烟草抗野火病细胞突变体筛选 [J]. 中国烟草学报, 1995, 2(4): 17-20
 - 21 黄大坊. 基因工程正在开辟植物病虫害防治的新途径 [J]. 植物保护, 1999, 25(1): 34-36

New Progress of Improving Tobacco Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* by Bio-technology

Liu Yating Zhang Shiguang

(Phytopathology Laboratory of Yunnan Province, Y A U, Kunming 650201)

Abstract There has been much great progress on raising plant resistance to disease by bio-technique. This paper reviews the research status of improving tobacco resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* through bio-technology in recent years.

Key words Bio-technology; Genetic engineering; Cellular engineering; Tobacco; *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; Resistance