

抗菌肽在果树抗病育种上的应用

李春荣 张霞 (山东师范大学生命科学院, 山东济南 250014)

摘要 抗菌肽作为一种新型的抗菌物质在各个领域都有广泛的应用前景, 在果树抗病育种工作中也是一个热门课题。综述了抗菌肽在我国果树抗病育种中的意义、应用现状和问题。

关键词 抗菌肽; 果树; 抗病育种; 基因工程; 应用

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02647-02

抗菌肽(anti microbial peptide) 是指具有抗菌作用的一些小分子肽的总称, 又称为肽抗生素(peptide antibiotics)。它是一种新型的抗菌物质, 抗菌谱广, 活性强, 水溶性好。同时, 天然的和人工合成的抗菌肽基因在植物中可以被表达并具有杀菌活性。因此, 将抗菌肽基因分离, 通过基因工程的手段, 利用遗传转化导入植物体, 从而获得抗病育种的新材料, 为育种工作开辟了新的途径。

1 抗菌肽发现的意义

1972年, 瑞典科学家Boman等首先研究了果蝇的抗菌机制, 观察到其体内具有抗菌活性的可溶性物质^[1], 其后又有人以惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)为实验材料, 注射蜡状芽孢杆菌诱导分离得到一种具有杀菌活性的物质, 并将其命名为抗菌肽(cecropins)。该肽在昆虫天然免疫中发挥着重要的作用, 被认为是第一个真正意义上的抗菌肽, 之后又陆续从家蚕、柞蚕、蓖麻蚕及多种昆虫中均分离到抗菌肽(Faye等, 1975)^[2-3]。此后, 更多的抗菌肽类物质相继被分离、纯化, 而且许多抗菌肽的氨基酸一级结构和基因序列得到确定。20世纪80年代后, 有关抗菌肽的研究主要集中在蚕等大型经济昆虫, 90年代以来, 扩展到一些小型昆虫和其他无脊椎和脊椎动物以及海洋生物, 抗菌肽已成为免疫学和分子生物学研究的热点。近年研究发现, 从低等的细菌到植物、从昆虫到高等的哺乳动物, 普遍存在利用抗菌肽作为机体抵抗病原入侵的防御武器^[4-5]。到目前, 已发现了几百种抗菌肽, 其中在昆虫中就发现了170多种。

根据抗菌肽的结构, 可将其分为5类: 单链无半胱氨酸(Cys)的抗菌肽, 或由无规则卷曲连接的两段-螺旋组成的肽。该类包括天蚕素Cecropins、Mgairins等^[6]。富含某些氨基酸残基但不含Cys的抗菌肽, 如富含脯氨酸(Pro)或甘氨酸(Gly)残基的抗菌肽; 鞘翅肽Coleoptericin和半翅肽Hemiptericin的全序中富含Gly^[7-8]。含1个二硫键的抗菌肽, 该二硫键的位置通常在肽链C端。如从爪蟾皮肤细胞中获得的Brevirins^[9]。有2个或2个以上二硫键, 具有-折叠结构的抗菌肽。如绿蝇防御素(Phormindefensin)^[10]。由其他已知功能较大的多肽衍生而来的具有抗菌活力的肽, 如人和牛的乳铁蛋白经过酶等水解处理获得具有比原来更高抗菌活性的小肽被命名为人乳铁多肽素H(Lactoferricin Human, IfcinH)和牛乳素(Lactoferricin Bovine, IfcinB)^[11]。此外, 还有植物抗菌肽^[12]。其他一些结构上与昆虫、哺乳动物防

御素结构相似的植物抗菌肽, 称为植物防御素。这些抗菌肽具有广谱抗菌活性, 大多数对革兰氏阳性菌有较强的杀灭作用, 有些则对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均起作用, 尤其对耐药性细菌有杀灭作用, 既抗真菌, 又抑杀病毒, 对肿瘤细胞和癌细胞有明显的杀伤作用。更重要的是, 抗菌肽对正常的真核细胞几乎没有作用。因此, 抗菌肽作为一种新型的抗菌物质在各个领域都有广泛的研究应用前景, 特别是动物方面的研究较多, 而在植物方面的研究报道较少。目前, 大部分植物抗菌肽是从植物种子中分离获得的, 但是植物抗菌肽对大部分细菌无抑制活性。因此, 依靠基因工程的方法用其他真核生物的抗菌肽基因来转化农作物, 培育抗病新品种是当前国内外研究的一个热点。

2 抗菌肽在果树抗病育种中的意义

果树周年都受病虫害的侵害, 每年因病虫害而烂掉的水果占年产量的1/3左右^[13]。虽然微生物农药具有广谱、高效、安全等优点, 但药效相对缓慢, 需要适宜的光照、温度和湿度等, 对抗生素类容易产生抗药性, 且生物农药的工业化生产成本较高, 广泛应用有一些困难。最根本的解决途径就是培育抗病品种, 但果树常规育种有很大局限性, 周期长, 更新慢。随着植物基因工程和分子生物学的快速发展, 对植物与微生物相互作用的分子生物学的研究表明, 作为小分子的抗菌肽基因转入植物将大大提高农作物的抗病性^[14-16]。导入抗菌肽基因, 对于果树抗病育种来说, 有可能使果树对细菌病害(如苹果和梨的火疫病)产生抗性。利用基因工程原理把天然的或者人工合成的抗菌肽基因通过遗传转化的手段导入果树外植体获得再生抗病植株将大大缩短育种年限。果树一般都是多染色体的杂合体, 有性繁殖很容易产生染色体的重组和变异, 通过组织培养、扦插、嫁接等无性繁殖方式进行快速繁殖, 能保持该性状的稳定, 减少染色体重组的可能, 保持母本的优良性状, 既减少了培育成本, 又增加了推广的可能性, 在果树抗病育种上具有广阔的应用前景。

3 抗菌肽的结构和作用原理

绝大多数抗菌肽由20~60个氨基酸组成, 有A、B、C、D、E等多种结构, 属于小分子肽。其分子构型有-螺旋或-折叠或-螺旋和-折叠共存, 无论是哪一种构型都有一个共同的特性, 就是都具有疏水和亲水的两亲性。虽然不同抗菌肽之间的氨基酸组成具有不同程度的差异, 但是分子肽链中50%以上的氨基酸是疏水的, 这有利于抗菌肽与细菌细胞膜相互作用。由于抗菌肽属于蛋白质类, 因此对蛋白酶很敏感, 并在广泛的pH范围和温度范围内具有活性。无论哪一种结构, 抗菌肽N末端区域都富含亲水性碱性氨基酸残基如

赖氨酸(Lys),这些带正电荷的氨基酸有利于和细菌细胞膜上的酸性磷脂头负电荷作用而吸附到细菌膜上;而C末端含有较多的疏水性氨基酸残基如甘氨酸(Gly),疏水性的尾部有利于抗菌肽插入细菌膜的双层脂质膜中形成一个两亲性-螺旋,这种-螺旋具有破坏性,当抗菌肽结合到细菌细胞膜上时,-螺旋相互聚集使细胞膜形成孔洞和离子通道,裂解细菌的主要结构,使细菌的细胞质外溢,细胞内离子大量丢失,使细菌失去代谢平衡,不能维持生命活动所需的胞内渗透压而死亡^[17],这就是抗菌肽作用的机理。

4 抗菌肽在果树抗病基因工程育种中的应用现状和问题

植物基因工程是以植物为受体材料,把不同生物有机体的DNA(或基因)分离提取出来,在体外进行酶切和连接,构成重组DNA(Recombinant DNA)分子,然后转化到受体细胞(大肠杆菌),使外源基因在受体细胞中复制增殖,然后借助生物或理化的方法将外源基因导入植物细胞,进行转译或表达。果树基因工程起步较晚,1988年果树的基因转化研究首先在核桃(*Juglans nigra*)上取得突破,McGranahan等获得了转gus基因核桃再生植株^[18]。此后,果树转基因工程研究日益发展,有许多果树品种获得了转基因植株^[19]。

在果树的遗传转化中最常用的方法有3种:农杆菌介导(Agrobacterium mediated)、生物导入(Biostic)和DNA直接摄取(Direct DNA uptake)。而农杆菌介导是以农杆菌中的Ti质粒或R质粒为基因载体(vector),将外源基因整合到植物细胞的染色体DNA上,从而实现转化。绝大多数果树对农杆菌比较敏感,因此,农杆菌介导是果树转化的主要方法。通过农杆菌介导把外源抗菌肽基因导入有关果树品种进行抗病育种,在这方面已经取得了阶段性的进展。1995年张清杰等^[20]将人工合成的抗菌肽D基因导入根癌农杆菌感染锦橙的中盘及上胚轴,初步获得了转基因植株;方宏筠等^[21]已经将CecropinB和ShivaA基因成功转入樱桃外植体并获得转化植株,现在,樱桃的抗菌肽植株已由农业部批准进入田间实验。人工合成的抗菌肽D基因已经成功导入了沙田柚并获得转基因植株^[22];何永睿等^[23]把抗菌肽基因CecropinB和ShivaA转入新会橙、锦橙、北碚447锦橙和纽荷尔脐橙4个柑橘优良主栽品种。这些成果表明,随着果树基因工程的发展,找到相关的抗细菌和抗真菌的抗菌肽基因通过遗传转化导入不同的果树品种,从而获得再生植株成为可能。

抗菌肽的基因工程研究中仍存在一些问题,因为抗菌肽分子小,易被蛋白酶降解,其表达产物对宿主有害等,影响了基因的高水平表达;而且小分子物质分离纯化比较困难,抗菌肽在转基因植物中存在基因沉默和位置效应等现象使外源抗菌肽基因表达活性降低^[24-25]。相信随着分子生物学的发展,对分子作用机制的深入研究,问题会迎刃而解。

参考文献

- [1] BOMAN H G, NILSSON I, RASMLSON B. Inducible antibacterial defence system in drosophila [J]. Nature, 1972, 237(5352): 232 - 235.
- [2] FAYA I, PYE A, RASMLSON T, et al. Insect immunity II. simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *hyalophora cecropia* and *sarcia cyrthia* [J]. Infect Immun, 1975, 12(6): 1426 - 1438.
- [3] STEINER H, HULTMARK D, ENGSTROMA, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. Nature, 1981, 292: 246 - 251.
- [4] LEHRER R I, GANZ T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence [J]. Cur Opin Immunol, 1999, 11: 23 - 30.
- [5] KIMBRELL D A. Insect antibacterial proteins: not just for insect and against bacteria [J]. BioEssays, 1991, 13: 657 - 663.
- [6] ZASLOFF M. Magainins: a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5449 - 5455.
- [7] 郑青, 鲍时翔, 姚汝华, 等. 新型抗菌肽基因设计、合成及在酵母中表达 I——杂合抗菌肽基因的设计与合成 [J]. 华南理工大学学报, 1998, 26(3): 60 - 63.
- [8] COCIANICHIS, DUPONT A, HEGY G, et al. Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *pyrrhocoris apterus* [J]. Biochem J, 1994, 300(2): 567 - 575.
- [9] 陈留存, 王金星. 昆虫抗菌肽研究现状 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 55 - 60.
- [10] 饶贤才, 胡福泉. 肽抗生素, 控制感染的新希望 [J]. 生命的化学, 2001, 21(5): 13 - 15.
- [11] 冯兴军, 王建华, 单安山. 抗菌肽 *Latiferin* 生物学功能及其应用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 11(1): 120 - 123.
- [12] NAI-YUAN LEE, KAZUHIRO K, ICHIRO N. Susceptibilities against bovine *latiferin* with microorganisms isolated from mastitic milk [J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(10): 1267 - 1269.
- [13] 张守友, 贺丽敏. 落叶果树病虫害防治技术的演替及生物防治的研究与应用 [J]. 北方果树, 1996(1): 5 - 6.
- [14] HERCE J C, MALOY W L, SALVADOR L, et al. Recombinant expression of the antimicrobial peptide *pylphenusin* and its activity against the protozoan oyster pathogen *perkinsus marinus* [J]. Mol Mar Biol Technol, 1997(6): 248 - 259.
- [15] CAVALLARIN L, ANDREU D, SANSEGUNDO B. Cecropin - derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens [J]. Mol Plant Microb Interact, 1998, 11(3): 218 - 227.
- [16] MOFFAT A S. Improving plant disease resistance [J]. Science, 1992, 257: 482 - 483.
- [17] 马卫明, 余锐萍. 抗菌肽的免疫机理及应用前景 [J]. 世界农业, 2003, 29(10): 41 - 43.
- [18] McGRANAHAN G H, LESLIE C A, URAISU S L. Agrobacterium mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants [J]. Biotechnology, 1988, 6: 800 - 804.
- [19] 张志宏, 景士西, 王关林. 果树基因工程研究进展 [J]. 果树科学, 1995(3): 188 - 193.
- [20] 张清杰, 张景宁, 黄自然, 等. 柞蚕抗菌肽对柑桔黄龙病及溃疡病病原菌的杀菌作用 [J]. 蚕业科学, 1995, 21(2): 76 - 81.
- [21] 方宏筠, 王关林, 王火旭, 等. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株 [J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1192 - 1198.
- [22] 陈大成, 郑启发, 胡桂兵. 沙田柚遗传转化的探讨 [J]. 中国南方果树, 1999, 28(4): 3 - 7.
- [23] 何永睿, 邹修平, 彭爱红, 等. 根癌农杆菌介导的柑桔遗传转化技术 [J]. 热带作物学报, 2004, 25(1): 11 - 16.
- [24] 赵淑清, 武维华. DNA 分子标记和基因定位 [J]. 生物技术通报, 2000(6): 1 - 4.
- [25] 李艳, 李毅, 陈章良. 转基因植物内源基因与外源基因共抑制问题研究进展 [J]. 生物工程学报, 1999(1): 1 - 4.