

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)01-035-04

马铃薯抗虫基因工程研究进展

邬震坤, 卢翠华*, 丛培琳

(东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 马铃薯在整个生育期内易受到各种虫害侵扰, 严重影响产量与品质。近些年来逐渐发展起来的马铃薯抗虫基因工程为解决这一问题提供了有效途径。目前, 已有多种抗虫基因被导入马铃薯中, 并通过生物鉴定, 证明具有明显的抗虫效果。但马铃薯抗虫基因工程仍需进一步完善, 使马铃薯抗虫性达到高效、持久和安全的水平。

关键词: 马铃薯; 抗虫基因; 生物鉴定

马铃薯是世界四大作物之一, 可粮菜兼用, 近些年以其在粮食安全中的重要作用受到了更广泛的重视。然而, 在马铃薯的整个生育期中, 容易遭受

各种害虫的侵袭, 如蚜虫、马铃薯块茎夜蛾、蛴螬等, 直接危害地上与地下部分, 造成产量和品质下降, 甚至导致死亡。据统计, 每年全球粮食总产量因害虫造成的损失达 14%, 如不喷施杀虫剂对马铃薯可能造成的产量损失达到 74%^[1]。但化学药剂防治害虫不仅耗费资金, 而且严重污染环境、食物链和水资源等。近些年发展起来的植物基因工程技

收稿日期: 2005-12-20

作者简介: 邬震坤 (1979-), 女, 硕士研究生, 从事马铃薯生物技术研究。

* 通讯作者: cuihualu2000@yahoo.com.cn

采收在不影响单株产量的同时可以大大提高单株结薯数。

5 问题与展望

近些年马铃薯脱毒快繁及无土栽培生产微型薯已取得长足进展。高效低成本基质的研究与利用、改变传统的采收方法都在一定程度上降低了微型薯的成本, 但微型薯的价格还没有达到农民能够接受和大量推广的程度。在今后的研究中, 如何进一步降低成本, 提高单位面积微型薯产出率仍是研究的重要课题, 同时, 进一步健全微型薯繁育体系和脱毒种薯繁育体系也迫在眉睫, 只有体系的成熟和完善, 才能为微型薯的推广应用打下坚实的基础。

[参 考 文 献]

- [1] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 中国马铃薯栽培学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 131.
- [2] 云南省科学技术委员会. 马铃薯脱毒良种繁育及栽培技术 [M].

1999: 37.

- [3] 吕典秋, 李学湛, 何云霞, 等. 马铃薯脱毒原种栽培基质筛选和栽培技术研究 [J]. 杂粮作物, 2002, 22(1): 46-47.
- [4] 庞万福, 王清玉, 张恭, 等. 脱毒小薯无土栽培生产培养基质研究 [J]. 马铃薯杂志, 1997(3): 144-147.
- [5] 屈冬玉, 庞万福, 谢发成, 等. 松针土作基质生产脱毒微型薯试验研究 [J]. 马铃薯杂志, 1999(1): 16-17.
- [6] 杨春, 杜珍, 齐海英, 等. NAA、IAA、GA₃ 对马铃薯扦插苗成活率的影响 [J]. 山西农业科学, 1999, 27(3): 40-43.
- [7] 刘世林. 利用 ABT 生根粉溶液浸泡对马铃薯脱毒试管苗扦插成活率的影响 [J]. 种子, 1994(6): 61.
- [8] 杨春, 齐海英, 崔根芳, 等. 提高马铃薯脱毒苗扦插成活率的关键技术 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(3): 173.
- [9] 梁东超, 李文刚, 胡志全, 等. 扦插时期、光照与密度等条件在马铃薯微型薯生产中的影响 [J]. 中国马铃薯, 1998, 12(2): 77-79.
- [10] 方志明. 品种、密度、基质对马铃薯微型薯产量的影响 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14(3): 156-157.
- [11] 张武, 任瑞玉. 锌对马铃薯微型薯原种生产的影响 [J]. 甘肃农业科技, 1994(3): 30.
- [12] 于品华, 王蒂. KH₂PO₄ 追肥对无土栽培剪头后马铃薯植株微型薯产量的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 38(4): 432-435.

术, 将各种来源的抗性基因导入马铃薯中, 并获得了一定的抗虫效果。

1 马铃薯抗虫基因工程研究

各国研究人员已经利用基因工程技术分离得到了不同来源的抗虫基因, 这些抗虫基因主要分为三类: 第一类是从细菌中分离出来的抗虫基因, 主要是苏云金杆菌杀虫结晶蛋白 (Bt) 基因; 第二类是从植物组织中分离出的抗虫基因, 主要为蛋白酶抑制剂基因、淀粉酶抑制剂基因、外源凝集素基因等; 第三类是从动物体内分离的抗虫基因, 主要有蝎毒素基因和蜘蛛毒素基因。近年来正在研究或已应用于抗虫基因工程的基因还有氢过氧化物裂解酶基因、胆固醇氧化酶基因、营养杀虫蛋白基因、核糖体失活蛋白基因、几丁质酶基因、异戊烯转移酶基因、非蛋白质类杀虫剂调控基因和 Mi 基因等。下面将简述几种应用于马铃薯的抗虫基因。

1.1 Bt 基因及其应用

Hannay 首次研究发现苏云金杆菌的杀虫活性与伴孢晶体有关, 并证明晶体是可在碱性条件下溶解的杀虫晶体蛋白。当伴孢晶体被敏感昆虫取食后, 在中肠高 pH 值条件下溶解成原毒素, 并被蛋白酶水解成活化毒素, 活化毒素与敏感昆虫中肠上皮细胞膜上的受体结合, 引起细胞膜穿孔, 干扰渗透平衡, 细胞肿胀及裂解, 幼虫停止取食最终死亡。目前 Bt 基因应用最为广泛, 已有十几种编码不同 Bt 毒蛋白的基因 (cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ba, cry1Ca, cry1H, cry2Aa, cry3A, cry3B, cry3Ca1, cry6A, cry9Aa2, cry9C 等) 转入植物, 分别具有不同的抗虫谱, 因此需要对靶标害虫采用相应杀虫晶体蛋白基因。

通过研究人们发现, 对天然 Bt 基因进行修饰改造 (主要是改造密码子和去除富含 A、T 碱基序列) 以及使用新的启动子, 可以使其在植物体内有较高的表达水平, 从而产生较高抗性。Adang 等^[2]用去除富含 A、T 序列的 1.8kb cry3A 基因转化并得到转基因马铃薯植株, 通过试验证明, 得到的绝大多数转基因植株对科罗拉多甲虫具有高水平的抗性。Arpaia 等^[3]的研究结果表明, 雌性科罗拉多甲虫取食了含有 cry3B 的转基因马铃薯后, 生殖能力受到了严重损害, 不能产生后代。Nault^[4]通过实验证明, 科罗拉多甲虫取食了转 cry3A 基因马铃薯植株后, 存活率大幅下降, 仅有不足 0.5% 的成虫存

活下来越冬, 而对照成虫的存活率达到 57%。蒋红玲^[5]构建了 cry1Ba 植物表达载体, 导入马铃薯品种 Desiree 中, 并用转基因马铃薯叶片进行室内抗虫实验, 饲喂 3 d 后的死亡率为 64%, 4 d 后达到 100%。另外, 中国农业科学院生物技术研究所构建了 cry1Ba3 和 cry3Aa7 双价植物表达载体并获得了转基因马铃薯株系, 在马铃薯甲虫重发地新疆伊犁进行抗虫性鉴定, 结果表明转基因马铃薯抗虫性明显增强, 达到极显著水平。

1.2 蛋白酶抑制剂基因及其应用

蛋白酶抑制剂与昆虫消化道的消化酶相结合, 形成酶抑制剂复合物, 从而阻断或减弱蛋白酶对于外源蛋白质的水解作用, 导致蛋白质不能被正常消化; 同时酶抑制剂复合物刺激昆虫分泌过量的消化酶, 导致昆虫产生厌食反应。另外, 蛋白酶抑制剂可能通过消化道进入昆虫的淋巴系统, 从而严重干扰昆虫的蜕皮过程和免疫功能, 最终造成昆虫非正常发育或死亡。

根据蛋白酶抑制剂作用于酶的活性基团的不同及其氨基酸序列的同源性, 可分为丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂。虽然已在马铃薯中克隆出天冬氨酸蛋白酶抑制剂基因^[6], 但应用很少。目前应用最为广泛的是丝氨酸蛋白酶抑制剂和巯基蛋白酶抑制剂。

1.2.1 丝氨酸蛋白酶抑制剂

丝氨酸蛋白酶抑制剂与抗虫关系最为密切, 因为大多数昆虫 (包括大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以及某些鞘翅目) 肠道内的蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶。丝氨酸蛋白酶抑制剂被分为 Bowman-Birk 家族、Kunitz 家族、PI 家族等不同的类型。其中 Bowman-Birk 家族中的豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 和马铃薯蛋白酶抑制剂 (PI) 的应用较多。

CpTI 是由 80 个氨基酸组成的小分子多肽, 它的一个分子具有两个抑制活性中心。通过氢键和范德华力与胰蛋白酶紧密结合, 使酶活性中心失活。Gatehouse 等^[7]所获得的转 CpTI 基因的马铃薯植株使得甘蓝夜蛾的幼虫存活率下降 20%, 具有一定的抗虫能力。

PI 家族是一类创伤诱导型表达的蛋白酶抑制剂, 当植株受到虫害或机械损伤时, 其含量可在几小时之内明显增加, 其启动子属于损伤诱导型。PI 家族中的 PI- 只有一个活性中心, 而 PI- 有两

个活性中心，分别抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性，所以抗虫谱较广。迄今为止，已有一些学者从四倍体马铃薯栽培种^[8]中克隆了马铃薯 Pin 基因，最近在二倍体马铃薯野生种^[9]中也克隆到了 Pin 基因。Marchetti 等^[10]从大豆中分离得到了几种蛋白酶抑制剂基因 (KTI3, C-II and PI-IV)，并将其导入马铃薯中，经检测，在表达足够数量抑制剂的情况下，幼虫重量的增加降低 50%。

1.2.2 巯基蛋白酶抑制剂

巯基蛋白酶抑制剂对于利用巯基蛋白酶消化植物蛋白的昆虫具有特殊的抗性，因此对鞘翅目昆虫尤为有效。

Wolfson 等^[11]研究发现，用 E-64 一种特异的巯基蛋白酶抑制剂处理的马铃薯叶片 ($0.8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 饲喂科罗拉多甲虫的幼虫后，对其生长和发育产生了有害的影响。之后，Bolter 等^[12]也认为科罗拉多甲虫长期摄取巯基蛋白酶抑制剂 E-64 以后，其幼虫的生长发育、成活率以及成虫产卵率都会受到影响，并且较低浓度的抑制剂有明显的作用。一些学者^[13]发现，用茉莉酸处理马铃薯植株后，其茎部液泡中积累了马铃薯巯基蛋白酶抑制剂，并认为这是马铃薯抵御病虫害的机制之一，因此从马铃薯中克隆了几种巯基蛋白酶抑制剂基因。Cowgill 等^[14]的研究表明，表达巯基蛋白酶抑制剂的转基因马铃薯植株对马铃薯包囊线虫有较强的抗性，而且蛋白酶抑制剂对非目标的草食性昆虫几乎没有影响。目前人们十分关注水稻巯基蛋白酶抑制剂 (oryzacystatin) 的抗虫能力。Asmaa 等^[15]利用农杆菌介导法将与 CaMV35S 启动子相连接的水稻巯基蛋白酶抑制剂 (OC) 转入马铃薯，之后在转基因马铃薯叶片中检测到 OC 的活性，并证明 OC 的转入不会影响马铃薯叶片主要的内源蛋白酶活性，因而可以应用于抗科罗拉多甲虫马铃薯的生产。

1.3 植物凝集素基因及其应用

植物凝集素是植物体普遍存在的一类保守性很强的非免疫性蛋白，能特异性识别并可逆地结合糖类复合物的糖基部分。植物凝集素基因的抗虫机制可能有以下 3 种：与含有几丁质的昆虫的围食膜结合；与暴露在昆虫消化道上皮细胞外的糖进行结合；与糖基化作用的消化酶结合。当昆虫取食外凝集素后，通过上述结合作用影响营养的吸收，并可能在昆虫消化道内诱发病灶，使昆虫感病，达

到抗虫目的。

目前分离得到的植物凝集素有雪花莲凝集素 (GNA)、麦胚凝集素 (WGA)、豌豆凝集素 (p-Lec) 等。雪花莲凝集素是由 105 个氨基酸残基组成的成熟蛋白，包括三个重复性的同源片段，每个约 25 个氨基酸残基，对蚜虫、叶蝉、稻飞虱等同翅目吸食性害虫有极强的毒性；麦胚凝集素是禾本科典型的植物凝集素，从小麦胚芽可以分离到三种相近的凝集素，分子中甘氨酸和半胱氨酸含量很高且不含糖，对欧洲玉米螟有良好的抗性；豌豆凝集素是由 275 个氨基酸组成的蛋白质，由 α 和 β 两个亚基组成，能抑制豇豆象的生长。

Gatehouse 等^[7]获得了转 GNA 基因的马铃薯 (Desiree) 植株，结果表明，表达 GNA 的马铃薯植株表现出较强的抗性水平，叶片损伤比对照植株小 50%。Down 等^[16]检测转 GNA 基因的马铃薯植株时，发现不同部位 GNA 蛋白积累水平的差异小于植株之间的蛋白积累差异。通过对转基因植株的大量调查发现，转基因产物随着植物的生长不断增加，成熟植株体内含量达到最高，并且植株抗甘蓝夜蛾的能力与植株表达的 GNA 水平直接相关，植株生长的条件也影响 GNA 的表达水平，进而影响抗性水平。

2 存在的问题及对策

2.1 昆虫对抗虫基因产生抗性的问题

尽管抗虫基因对害虫有明显的作用，但已有一些种类的昆虫在实验室条件下对 Bt 基因产生抗性，并且昆虫也可以适应蛋白酶抑制剂的作用。针对这一问题，有以下几种策略：

2.1.1 双价或多价基因协作

使用两种或两种以上甚至杀虫机理不同的抗虫基因转化马铃薯，不但可以拓宽抗虫谱，而且使转基因植株的抗性水平得到提高，这是目前的抗虫基因工程所使用的重要方法。

2.1.2 提高抗虫基因的表达活性

由于害虫对马铃薯地上部与地下部有不同的危害，可针对主要害虫的情况采用高效表达的强启动子、诱导表达启动子，甚至是块茎特异表达启动子来提高基因的表达活性，使得抗虫基因的表达在时间上和空间上受到调控。另外，对已有基因的特定位点或区段进行改造可以提高该基因在植株内的表达量，也可以在一定程度上提高抗虫效果。

2.1.3 利用野生资源寻找广谱抗虫基因

马铃薯具有丰富的野生资源, 其中不乏具有优良抗虫特性的种类, 因而, 应充分利用该资源克隆新的植物来源的广谱抗虫基因, 弥补现有抗虫基因的不足。

2.1.4 通过降低选择压力稀释抗性

如果将转基因植株和非转基因植株混种于同一大田中, 转基因植株表达的高剂量毒素足以杀死大部分敏感害虫, 同时部分害虫仍可以在非转基因植株上繁殖, 通过敏感害虫和抗性害虫的交配稀释了昆虫的抗性基因, 这样昆虫出现抗性基因的频率就会大大降低, 而抗虫基因就不会在短期内失效。

2.2 抗虫基因工程的安全性

转基因作物的安全性问题一直受到广泛的关注, 因而针对人们所担心的问题提出相应的解决办法是势在必行的。

2.2.1 使用植物来源的基因

目前应用于抗虫基因工程的许多基因和调控元件来自于动物和微生物, 因而采用植物来源的基因和调控元件可以消除人们的顾虑, 提高抗虫基因工程的安全性。

2.2.2 使用安全标记基因

有人提出, 目前所使用的抗性标记基因存在向动物及人类体内转移的可能, 因而应在以后的研究中使用更加环保、安全的标记基因或者在转基因后去除抗性标记基因。

2.2.3 加强管理和监控

尽管采用一些方法来解决抗虫基因工程存在的问题, 但是仍应该加强对转基因植物的管理, 严格其审查制度, 公正科学的进行宣传, 以认真负责的态度对生态系统进行风险评估。

我们希望马铃薯抗虫基因工程能够不断得到发展, 更好的服务于生产, 并在平衡世界粮食生产与需求中发挥重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Oerke E C, Dehne H W, Schonbeck F, et al. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops [M]. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- [2] Adang M J, Brody M S, Cardineau G, et al. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cry A gene in proto-plasts and potato plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 21(6): 1131- 1145.
- [3] Arpaia S, Marzo L D, Di Leo G M, et al. Feeding behaviour and re-productive biology of Colorado potato beetle adults fed transgenic potatoes expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry3B endotoxin [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000, 95(1): 31- 37.
- [4] Nault B A. Survival and fecundity of Bt- susceptible Colorado potato beetle adults after consumption of transgenic potato containing *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry3A toxin [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2001, 101(3): 265- 272.
- [5] 蒋红玲. Bt 杀虫基因双价植物表达载体的构建及抗虫马铃薯植株的获得 [M]. 北京: 中国农业科学院生物技术研究所, 2001: 28- 53.
- [6] 王永胜, 刘中大, 扈廷茂. 马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆和结构分析 [J]. *内蒙古大学学报 (自然科学版)*, 1996, 27(5): 670- 674.
- [7] Gatehouse A M R, Davison G M, Newell C A, et al. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Leucania delecta* growth room trials [J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3(1): 49- 63.
- [8] Sanchez- Serrano J, Schmidt R, Schell J, et al. Nucleotide sequence of proteinase inhibitor encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1986, 203 (1): 15- 20.
- [9] 卜庆云, 武亮, 杨世湖, 等. 二倍体马铃薯蛋白酶抑制剂基因的克隆、序列分析及表达载体的构建 [J]. *遗传*, 2005, 27 (3): 417- 422.
- [10] Marchetti S, Delledonne M, Fogher C, et al. Soybean Kunitz, C- II and PI - IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(4): 519- 526.
- [11] Wolfson J L, Murdock L L. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1987, 44(3): 235- 240.
- [12] Bolter C L, Marysia L G. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E- 64, on Colorado potato beetle gut proteinases [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1997, 83(3): 295- 303.
- [13] Kristina G, Borut S, Maja R, et al. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterization and immunocytochemical localization studies [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34 (2): 317- 323.
- [14] Cowgill S E, Atkinson H J. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12(4): 439- 449.
- [15] Asmaa B, Dominique M, Binh N Q, et al. Synthesis of active oryzacystatin in transgenic potato plants [J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(9): 585- 588.
- [16] Down R E, Ford L, Bedford S J, et al. Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance [J]. *Transgenic Research*, 2001, 10(3): 223- 236.