

马铃薯抗虫基因工程研究进展

苏俊峰, 卢翠华*, 田兴亚, 李 晶

(东北农业大学马铃薯研究室, 哈尔滨 150030)

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 05-298-04

据不完全统计, 全世界农作物每年因病虫害造成的损失约占其总产量的 37%, 其中 13% 是由虫害引起的^[1]。而马铃薯是虫害危害较严重的作物之一, 马铃薯从播种到收获的整个过程中, 有许多害虫对它进行危害, 不仅影响了生长, 甚至会造成死亡。而且害虫在咬伤组织的同时, 还带来了病害, 或为病害的侵染带来方便, 因此虫害的防治在马铃薯生产中占有重要的地位。马铃薯的主要虫害包括: 蚜虫、马铃薯瓢虫、马铃薯块茎蛾、地老虎、蛴螬、蝼蛄和金针虫等。

1 马铃薯虫害的传统防治措施

马铃薯虫害的传统防治措施一般采用综合防治(包括培育抗虫品种、选择适宜的自然条件、隔离)、农业防治(秋翻地、除杂草、轮作等)、化学药剂防治等。虽然通过常规育种技术和试管培养技术已获得某些抗虫害的作物品种。如野生型马铃薯(*Solanum chacoense*)和栽培型马铃薯(*S. tuberosum*)的原生质体电融合获得的体细胞杂合品系对马铃薯甲虫具有抗性^[2]。然而, 由于马铃薯四倍体的特性和高度异质性, 常导致自交不孕和雄性不育, 使品种的遗传基础处于杂合状态。因此新品种的选育需要较长的时间, 并且某些虫害尚无基因资源作为杂交的亲本。所以, 用这种途径来获得抗虫作物是很困难的。化学杀虫剂是现在应用最广泛的防治虫害的方法, 且具有防治方法简单、周期短、见效快的优点。但同时也带来了许多严重问题: 一方面, 不仅提高了生产成本, 同时还造成了

严重的环境污染和食品中有害的化学残毒。另一方面, 化学杀虫剂的作用方式是非特异性的, 在杀害虫的同时, 也会毒害到有益的昆虫及害虫的天敌。从而危及到多种生物资源, 破坏生态平衡, 长此以往, 将会使人类遭受难以估计的损失。

2 马铃薯抗虫的基因工程研究

利用基因工程技术将外源基因导入植物细胞, 以期提高产量, 改良性状, 培育出适合人类需要的植物品种是现代植物遗传育种的重要途径。Fraley等(1983)首次将外源基因导入矮牵牛后, 植物基因工程技术得到了飞速的发展。至今, 全世界共有 45 个国家 25000 例转基因植物进入田间试验, 涉及 60 多个物种, 10 种性状。1994 年第一例转基因作物在美国批准上市以来, 全球转基因作物的种植面积从 1996 年的 170 万 hm^2 增加到 1999 年的 3990 万 hm^2 , 四年增加 23.5 倍^[3]。

马铃薯是世界上主要的农作物之一, 其种植面积仅次于小麦, 玉米, 水稻, 由于马铃薯组织培养技术已经较完善, 再生植株容易, 因此马铃薯遗传转化研究进展较快, 生物技术在马铃薯中得到了实际应用^[4]。自 1987 年世界上首次获得转 Bt-toxin 基因的烟草和番茄后, 植物抗虫基因工程的研究得到了迅猛的发展。而 Bt 基因是应用最多的基因, 全世界已获得 50 多种转 Bt 基因植物。美国 Monsanto 公司的 Fischhoff 小组还利用完全改造的 cry IIIA 基因获得了抗鞘翅目害虫的马铃薯^[5]。目前在美国转 Bt-toxin 基因的马铃薯已经实现商品化。1997 年 Mckersie 和 Brown 将植物来源的 CpTI 转化到马铃薯中, 并对鳞翅目和鞘翅目害虫均具有良好的抗虫效果^[6]。

收稿日期: 2003-05-30

作者简介: 苏俊峰 (1977) 男, 东北农业大学硕士研究生。

* 通讯作者

3 抗植物虫害基因及其应用

目前经常使用的抗虫基因主要有三种,一是从微生物苏云金杆菌分离出的苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因,简称 Bt 基因;二是从植物中分离出的昆虫的蛋白酶抑制剂基因,其中应用最广泛的是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (CpT I);三是植物凝集素基因 (Lectin gene)。

3.1 苏云金芽孢杆菌晶体蛋白基因及其应用

Bt 基因是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 晶体蛋白基因的简称。由于 Bt 在芽孢形成时产生的晶体蛋白具杀虫活性,故称其为“杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs)”或“ δ -内毒素 (δ -endotoxin)”^[7]。早在 50~60 年代经实验研究已证实苏云金芽孢杆菌对多数鳞翅目 (不同的蛾科和蝶科) 的幼虫有毒杀作用,对少数鞘翅目 (跳甲虫科) 或双翅目 (蝇科) 幼虫也有毒性。但 Bt 对人畜和益虫无害^[8]。现已知 Bt 毒蛋白分子量为 130~160 KD,在幼虫肠道中被昆虫蛋白酶在碱性条件下分解成较小的毒性多肽,分子量为 60~64 KD。这种毒性多肽引起昆虫肠道麻痹,昆虫很快停止取食,最后导致昆虫肠壁细胞破坏而死亡^[9]。1981 年 Schnept 等首次将 Bt 毒蛋白基因分离克隆,并分析了它们的序列,以后又有数类 Bt 毒蛋白基因被克隆。由于该基因的 mDNA 在植物中不稳定,表达量较低,因此研究人员对这些毒蛋白的基因作了改造,修饰了基因密码,使之为高等植物所偏爱,但又不改变原有氨基酸顺序,从而使这些毒蛋白的基因表达量提高了上百倍^[10,11]。鉴于 Bt 毒蛋白具有高度专一性、生物降解性、且对人畜无害的安全性,因此是植物抗虫基因工程中理想的杀虫目的基因。1987 年 7 月比利时 Belgina 生物技术公司植物研究小组首次报道了将 BtCryIA (b) 与抗卡那霉素标记基因 NPTII 融合并通过 Ti 质粒整合到烟草植株内,成功地获得了抗烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 转基因烟草植株^[12]。同年 8 月美国 Monsanto 公司研究人员报道了将 BtKurstakiHD-13' 缺失的 CryIA (d) 导入番茄 (*Lycopersicon esculentum* VF38)。转基因番茄显示出对烟草天蛾 (*M. sexta*)、烟草芽夜蛾和番茄果螟 (*H. zea*) 不同的抗性。稍后 Agracetus 公司的研究小组也发表了类似结果,把 Bt 毒蛋白基因转入烟草获得抗

虫植株^[13]。1987 年关于植物抗虫基因方面获得成功的研究报告仅有 4 篇,而 Bt 毒蛋白的应用占了 3 篇。在以后的几年里,其它实验也将 Bt 不同类型,经过改造的毒蛋白基因转化到受鳞翅目害虫危害的其它作物中,如棉花、马铃薯和玉米等。现在在美国 Monsanto 公司的抗虫马铃薯已被获准投入商业化大规模生产,抗虫棉花、玉米也正进入审批程序^[14]。我国植物抗虫基因工程的研究始于 1986 年。苏云金毒蛋白抗虫基因工程是国家“七五”攻关课题。1989 年,中国农科院生物技术研究中心杨虹等首次报道了带有一个 35s 启动子, δ -内毒素基因, GUS 报告基因和 NOS 终止子组成的嵌合基因构建的 pGY61 和 pGYCK63 重组质粒,通过 PEG 方法将其导入水稻 (台北 309) 原生质体内,获得了转基因植株。Southern blot 检测证明 δ -内毒素基因已整合进水稻基因组中^[15]。1991 年谢道昕等将 Btaizawai7-29 和 BtKurstakiHD-1 通过花粉管途径将杀虫基因导入水稻、棉花,并在转基因植株上得到表达^[16,17]。转 Bt 基因作物在所有转基因作物中所占比例最大,仅在美国就有几十种作物获准进行大田试验,其中转 Bt 棉花、玉米和马铃薯在 1997 年就已在美国、澳大利亚、日本、加拿大、南非、阿根廷以及一些欧共体国家商品化生产^[18,19]。

3.2 蛋白酶抑制剂基因及其应用

蛋白酶抑制剂基因是一类植物天然抗虫物质,它能抑制昆虫胰蛋白酶 (Trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 等的活性。它广泛存在于植物的贮藏组织如禾本科谷类、茄科、豆科等植物的种子和块茎中及受伤诱导的叶片组织中。它一般为 60~120 个氨基酸组成的多肽,分子量约为 8~25 KD。蛋白酶抑制剂基因的产物可抑制取食昆虫消化道的蛋白酶活力,使昆虫得不到所需养分,生长发育受到影响甚至导致死亡。与 Bt 毒蛋白相比蛋白酶抑制剂具有抗虫谱广、对人无毒副作用以及害虫不易产生耐受性等优点^[20]。

1987 年,英国 Durham 大学的 Hilder 等把编码 CpT I 的 cDNA 转移到烟草品种 Samsun NN 中,首先获得转 CpT I 基因的烟草工程植株。该转基因烟草抗烟草芽蛾 (*Heliothis virescens*)、玉米穗蛾、棉铃虫和粘虫等。在随后的几年中,美国、英国和我国等的研究人员相继把 CpT I 基因转移

到许多具有重要经济价值的植物中, 包括水稻、油菜、甘薯、苹果和杨树等。

John 等人把来自烟草天蛾的蛋白酶抑制抗弹性蛋白酶基因和 CaMV35 s 启动子插入 PAN70。通过农杆菌介导转化苜蓿的叶和叶柄, 外植体的转化率为 10%, 共获 1000 余株转基因植株。在转基因植株的叶、根、花中的 PI 的表达量占总蛋白的 0.125%。温室中生长的转基因苜蓿对蓟马显示出一定的抗性, 可减轻蓟马危害的发生^[21]。

国内中国科学院遗传所 1992 年克隆了 CPTI 的 cDNA。用 CaMV35 s 启动子构建植物表达载体 pRCL 27, 由农杆菌 LBA 4404 转化烟草。抗虫测试结果, 转基因烟草接种棉铃虫 (*H. armigera*) 2~3 龄幼虫, 4 d 死亡率达 50%, 而对照却无死亡^[22]。

3.3 植物凝集素基因及其应用

植物凝集素指能凝聚红细胞及其它细胞的结合碳水化合物的蛋白质。确切的作用机理现今并未研究清楚, 植物凝集素的毒性基于它们特异结合到昆虫肠的糖缀合物上, 目前认为以下三种作用类型是极可能的, 即: (a) 凝集素结合到围食膜的几丁质上; (b) 结合到消化道上皮细胞的糖缀合物上; (c) 凝集素结合到糖基化的消化酶上。这些结合影响了营养物质正常吸收, 同时还可能在消化道内诱发病灶, 促进消化道内细菌繁殖, 对害虫本身造成危害, 抑制害虫生长发育繁殖, 从而达到杀虫目的^[23]。

1990 年 Boulter 等所获得的稳定表达 p-*lec* (豌豆凝集素) 以及 CpTI (豇豆胰蛋白酶抑制剂) 的转基因烟草植株, 均表现出抗烟草夜蛾幼虫, 二者进行杂交, 筛选到既表达 CpTI 又表达 p-*lec* 的 C+L+ 双价转基因烟草, 烟草的抗虫性比转单一基因烟草抗虫性显著增强, 表明双基因作用具有累加性。1991 年 Edwards 等在 CaMV35S 启动子及 ssRubisco 小亚基启动子下正确表达 p-*lec*, 其表达量占可溶性总蛋白的 1% 以上, 其凝血活性及特异性均表现正常^[25]。1995 年 Hilder 等在 CaMV35S 启动子下构建 GNA 表达载体, 整株虫试每株接 8 头蚜虫, 封闭 27 d 后统计为 GNA 阳性株为 300 头, 对照株为 600 头桃蚜。叶片提取并纯化 GNA, 以 0.1% w/v 人工饲料饲喂桃蚜, 其校正死亡率为 33±1%, 且蚜虫平均大小显著小于对照, 桃蚜的

发育、繁殖也大大降低^[26]。1997 年 Gatehouse 等转 GNA 马铃薯试验表明, 显著降低桃蚜繁殖力, 每个雌蚜虫每天产卵数为 4.1~4.2 个, 而对照为 5.4 个, 每一个转基因植株上的幼虫生产数比对照显著降低 ($p<0.001$)^[27]。

4 问题与展望

植物抗虫基因工程在短短的是几年里取得了丰硕的成果, 而且已经走出了实验室, 并实现了产业化。为了更好的推动这项技术的应用和发展, 今后应注意以下几个问题: (1) 应继续发现新型、高效抗虫基因, 并深入的研究其抗虫机制, 这是基因工程发展的基础。(2) 利用抗虫基因的协同作用, 将多个抗虫基因导入植物中, 提高转基因植物的抗虫能力。(3) 研究外源基因的整合及表达机理, 提高外源基因的表达量和稳定性。(4) 应加强转基因抗虫植物与生物环境关系的研究, 以防止破坏自然界的生物资源多样性。

尽管存在一些有待进一步解决的问题, 但应该看到, 植物抗虫基因工程技术的发展为防治害虫提供了一条崭新的途径。可以相信, 随着基因工程研究的深入和技术的进一步发展, 植物抗虫基因工程必将为农业的发展起到巨大的推动作用。

参 考 文 献

- [1] Rgathehouse A M, V A Hilder, and D Boulter. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB international, 1992, 155—181.
- [2] Cheng J, J A Saunders, and S L Sinden. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1995, 31, 90—95.
- [3] 雷茂良, 程金根. 全球转基因植物发展现状 [J]. 生物技术通报, 1998, 6, 30—32.
- [4] 双宝, 吕文河. 马铃薯基因转化的研究进展 [J]. 马铃薯杂志, 1996, 1, 49—53.
- [5] Perlak F J, Stone T B, Muskopf V M, et al. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol Biol*, 1993, 22, 313—321.
- [6] Mckersie B D, and Brown D C W (eds). *Biotechnology and the improvement of forage legumes*. CAB international, 1997 (5), 111—115.
- [7] Crook N E, and Jarrett P V. Viral and bacterial pathogens of insects. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 70, 91—96.
- [8] 刘荣乐. 苏云金杆菌研究五十年 [M]. 北京科学出版社, 1962. 3, 15, 43—48.
- [9] 谢先芝. 抗虫转基因植物的研究进展及前景 [J]. 生物工程进展, 1999, 6, 42—52.

马铃薯组培脱毒试管苗繁育技术

赵佐敏, 艾 勇

(贵州省安顺市农科所 562109)

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2003) 05-301-04

1 前 言

马铃薯通过组织培养途径, 从而建立无病毒生产体系是一种非常有效的高新生物技术实用化措施。发达国家早在上世纪 50 年代就采用多种脱毒途径生产无病毒种薯, 取得巨大成功。70 年代初吉林农业大学进行了马铃薯茎尖组织培养, 以后黑龙江省农科院马铃薯研究所、中国科学院微生物研

究所、植物研究所、内蒙古乌盟农科所也相继开展了这方面的研究工作。目前已有 20 多个省、市、60 多家单位成功利用此项技术, 已获得近百个品种的脱毒种薯。我们从 2001 年开始马铃薯脱毒组培快繁研究, 至今已得到“米拉”、“威芋 3 号”的脱毒试管薯千余粒、微型薯万余粒, 这些脱毒种薯是全面大幅度提高马铃薯产量和质量的可靠保证。

2 马铃薯病毒与检测

主要危害马铃薯的病毒有 PLRV、PVA、PVY、PVM、PVX、PVS、PAMV 七种, 类病毒有 PSTV。一般情况下, 首先采用聚丙烯酰胺凝胶

收稿日期: 2003-10-20
作者简介: 赵佐敏 (1967—), 女, 农艺师, 主要从事园艺及生物技术研究。

[10] Peteroen M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. Trends in Biotechnology, 1997, 15: 173-177.

[11] 郭三堆. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因改造后的杀虫活性研究 [J]. 中国农业科学, 1993, 26 (5): 77-81.

[12] Vaecck M A. Transgenic plant protected from insect attack. Nature, 1987, 328: 33-37.

[13] Barton K A. *Bacillus thuringiensis* is delta-endotoxin expressed in transgenic nicotian provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiol, 1987, 85: 1103-1109.

[14] 张智奇, 周音, 王少鸥等. 抗虫基因及其在植物上的应用 [J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18 (1): 91-95.

[15] 杨虹. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入水稻和原生质体后获得转基因植株 [J]. 中国农业科学, 1989, 22 (6): 1-5.

[16] 谢道昕, 范云六. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. 中国科学 B 辑, 1991, 21 (8): 830-834.

[17] 谢道昕, 范云六, 黄俊麟等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株 [J]. 中国科学 B 辑, 1991, 21 (4): 367-373.

[18] Peteroen M. Progress and prospects for field use of B. t. genes in crops. Trends in Biotechnology, 1997, 15: 173-177.

[19] Mackenzie D. Genes sans frontiers. New Scientist, 1997, 153: 2071-2079.

[20] Gatehouse A M R. Introduction of genes conferring insect in Brighton. Crop Protection Conference, 1988, 3: 1245-1254.

[21] John C Thomasetal. Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfafa (*Medicago saliva*). Plant Cell Reports, 1994, 14: 31-36.

[22] 刘春明. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得 [J]. 科学通报, 1992, 37 (18): 1694-1697.

[23] 王志斌, 李学勇, 郭三堆. 植物凝集素与抗虫基因工程 [J]. 生物技术通报, 1998 (2): 5-10.

[24] Boulter D, Edwards G A, and Gatehouse A M R. Additive protective effects of different plant derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. Crop Prot, 1990, 9: 351-354.

[25] Edward G A, Hephher A, and Clerk S P. Pealectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. Plant Mol Biol, 1991, 17: 89-100.

[26] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, et al. Expression of snowdrop lectin in tranegenic tobacco plants results in added protection against aphids. Transgenic Research, 1995, 4: 18-25.

[27] Anghard M R Gatehouse, Rachel E Down, Kevins Powell, et al. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1996, 79: 295-307.