

植物抗根结线虫转基因育种研究进展

魏振林¹, 董玲², 芮玉奎³

(1. 德州学院生物系, 山东 253023; 2. 德州学院机电系, 山东 253023; 3. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘要:对当前植物抗根结线虫转基因育种中所采用基因的特点和育种策略进行了详细的综述。根结线虫是全世界范围内危害经济作物最为严重的病原性线虫, 约 1 700 种作物受到根结线虫的危害, 而南方根结线虫是 4 种主要根结线虫中危害最严重的一种。利用转基因技术进行抗根结线虫育种是一种有希望的途径, 因为它具有过程简单、费用小和不造成环境污染等优点。

关键词:根结线虫; 转基因育种; 基因

中图分类号:S 603.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0070-03

全世界每年因根结线虫侵染而造成的粮食和纤维植物损失约 12%, 果树和蔬菜造成的损失超过 20%, 且有逐年加重的趋势。在 4 种主要的病原根结线虫中(南方根结线虫, 北方根结线虫, 花生根结线虫和爪哇根结线虫), 南方根结线虫危害最为严重。

根结线虫的二龄幼虫侵入植物根部后, 进入维管束向上移动, 通过诱导植物细胞分裂, 形成巨大的、具有多细胞核的细胞: 巨型细胞(GC, Giant cell), 并在此建立永久的取食据点(NFS, nematode feeding site)。根结线虫通过从巨型细胞汲取营养和水分, 生长发育为成虫。这个过程不但与植株竞争养分, 而且根结阻碍植物水分及营养的运输, 严重危害植物生长。同时, 根结线虫的侵染为其它微生物的侵入创造了条件。

由于传统的根结线虫防治方法效果不佳^[1], 利用转基因技术进行抗根结线虫育种已经是亟待开发的策略, 它具有育种周期短、费用低和不改变植株重要农艺性状等优点(Atkinson, 2001), 可作为进一步育种的资源或直接在生产中应用。南方根结线虫生长和发育的营养直接来自 GC, 因此, 通过分子生物学方法, 阻止根结线虫诱导 GC 的形成、破坏其结构或在 GC 中表达线虫毒性基因均可以达到抗线虫目的。

1 阻止或抑制 GC 形成的抗线虫策略

1.1 通过过敏反应阻止 GC 形成的抗根结线虫策略

研究发现, 在番茄中, Mi 显性基因控制着番茄对南方根结线虫的抗性^[2]。利用分子标记和定位克隆的方法, 已经分离了 *Mi1.1* 和 *Mi1.2* 基因, 随之证明只有 *Mi1.2* 基因具有根结线虫抗性。*Mi1.2* 基因编码一个含

1 257 个氨基酸的蛋白质, 含有 NBS 和 LRR 结构域。其 NBS 结构域类似于调控细胞凋亡或程序性死亡过程关键蛋白的 ATPase 结构域。在 NBS 结构域之前, 有一个 LZ 结构域, 此种模式通常参与蛋白质之间的相互作用。其 N 末端有一个 PCI 结构域, 这种结构域往往参与形成巨大的蛋白复合物。这些结构特征表明 *Mi1.2* 蛋白具有与其它蛋白相互作用的复杂模式。含有 *Mi1.2* 基因的抗性番茄中, 根结线虫可以正常侵染, 但是不能形成巨型细胞, 在侵染部位附近形成过敏性坏死, 表明 *Mi1.2* 基因参与控制针对线虫侵染的过敏反应^[18], 这个过程涉及某些线虫基因的表达产物(或植物被线虫诱导表达、修饰的蛋白)与 *Mi1.2* 基因的 N 端(或 LRR 区域)相互作用^[10]。*Rmel* 基因在 *Mi1.2* 基因的上游发挥至关重要的作用, 该基因的缺失导致 *Mi1.2* 基因丧失抗线虫能力, 但是关于这方面的细节尚不清楚。

转基因研究发现 *Mi1.2* 基因对于 3 种互不相关的害虫(根结线虫、蚜虫和粉虱)均有明显的抑制效果, 表明了 *Mi1.2* 基因具有广阔的应用前景, 但是目前还不清楚它对三种害虫抗性机制的确切机制^[10]。

虽然利用 *Mi1.2* 基因培育抗线虫番茄品种是较为成熟和有效的方法^[1,4,7,9,18], 但是这一策略仍然存在一些不足之处: 如温度敏感性、抗性的阶段性和对北方根结线虫无效等^[5,11,18]。*Mi1.2* 基因的这些不足表明, 仅使用 *Mi1.2* 基因培育抗根结线虫植物并不完全符合生产要求, 因此有必要配合其它抗线虫策略, 进一步提高转基因作物的抗性和抗性谱。

1.2 干扰巨型细胞形成有关基因表达的抗线虫策略

根结线虫建立侵染据点并形成 GC 是一个极为复杂的过程, 涉及到线虫分泌蛋白和植物细胞天然蛋白之间相互作用的复杂调控机制。线虫可能通过模拟植物天然多肽或自己分泌信号多肽来改变植物细胞分裂过程, 从而诱导形成巨型细胞^[6]。Ramsay 等通过激光捕

第一作者简介: 魏振林(1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物逆境基因工程。

通讯作者: 芮玉奎(1973-), 男, 博士, 讲师。

收稿日期: 2006-12-10

获显微切割(LCM)技术分析了根结线虫侵染 4d 后番茄 GC 细胞的基因表达模式,发现两种 D 型 cyclin 基因, *LeCycD3.2* 和 *LeCycD3.3* 的显著上调表达,表明这两种基因对于番茄 GC 形成中的细胞分裂有重要作用^[16],因此通过转基因技术在植物细胞中表达特异抗体,封闭根结线虫分泌蛋白、多肽、植物多肽或蛋白以阻碍 GC 细胞的建立,是一个有希望的抗线虫策略^[6]。

最近,在封闭特异多胎的表达方面取得了振奋人心的进展,Hussey 等使用 RNAi 技术在转基因拟南芥中成功的干扰了根结线虫分泌的 16D10 多肽的表达,获得了满意的抗线虫效果,这为进行广谱性的植物抗根结线虫育种开辟了崭新的道路。

2 破坏巨型细胞结构与功能的抗线虫策略

2.1 破坏巨型细胞结构的抗根结线虫策略

巨型细胞的维持需要众多寄主基因的表达和代谢产物的支持,通过表达对巨型细胞有破坏效应的基因或干扰巨型细胞的代谢途径,破坏线虫的取食来源,也是有希望的抗线虫策略。

HS1^{pro1} 是第一个在植物中发现的天然抗线虫基因,它来源于野生甜菜,含有 LRR 结构域和跨膜区域^[7],表现出对胞囊线虫的较强抗性。世界上有多个实验室正在开展利用 *HS1^{pro1}* 基因获得抗线虫的农作物研究,中东技术大学植物生物技术实验室的研究发现,转 *HS1^{pro1}* 基因的烟草明显提高了对几种根结线虫的抗性,显示出这个基因在茄科植物中抗根结线虫育种的潜力。*HS1^{pro1}* 基因体现了一种与 *Mi1.2* 基因完全不同的抗性机制^[18]。

另外一个被根结线虫诱导而在 GC 中特异表达的基因是 *TobRB7*,它的编码产物是一种定位于液泡膜的特异性水孔蛋白。Opperman 对 *TobRB7* 启动子的分析表明,不同的缺失型具有不同的表达模式。其中一种 5' 缺失突变体,即 $\Delta 0.3$ 启动子,仅仅驱动报告基因在 GC 细胞中作特异性表达^[15],并且这种启动子可以被几乎所有根结线虫(包括 *M. hapla*)诱导表达。它驱动的反义 *TobRB7* 基因破坏了 GC 的水分平衡,使细胞死亡而达到了抗线虫的目的^[15]。美国和澳大利亚等国研究人员正在采用类似的策略进行番茄、黄瓜和马铃薯抗线虫研究。

除反义 *TobRB7* 基因外,Taylor 将 $\Delta 0.3$ 启动子驱动的 barnase 基因转入烟草,获得的转基因植株表现出非常强的抗线虫活性,表明 $\Delta 0.3$ 启动子具有高度根结线虫侵染特异性。

2.2 抑制巨型细胞代谢的抗线虫策略

植物细胞受线虫诱导后会改变代谢模式,以利于巨型细胞的形成和营养的不断供应。Favery 等通过启动子捕捉技术分离到一个在侵染据点形成早期阶段有重要作用的 RPE 基因,RealTimeRT-PCR 结果表明,RPE 基因在南方根结线虫诱导的马铃薯和拟南芥 GC

细胞初始阶段显著表达,同时在胞囊线虫侵染形成 NFS 的晚期阶段也被诱导表达,这可能与磷酸戊糖途径参与维持 NADPH 的数量和核酸及其它物质的合成有关^[8]。RPE 基因在 GC 和 NFS 结构中表达模式的差异,可能是因为 NFS 形成的早期阶段对 DNA 合成的依赖性较小,而 GC 形成的早期阶段需要大量 DNA 合成,因为 GC 发育是以细胞核的重复有丝分裂为基础,而 NFS 形成则以细胞融合为基础。

缺失该基因的拟南芥纯和突变体中,南方根结线虫的 GC 形成率只有 5%,杂合型突变体 GC 的形成率有 10%~20%,并且这些 GC 的发育速率均显著降低,进而终止。

由于 RPE 基因在遗传背景较远的线虫种类诱导的不同植物 NFS 中表达,有理由推测,该基因对于根结线虫的其它种类(如北方根结线虫)诱导和维持 GC 也有重要作用。通过合适的技术抑制番茄 RPE 同源基因的表达,将极有可能开辟新颖、高效的抗线虫途径。

2.3 在巨型细胞中表达线虫毒性基因的抗线虫策略

一旦 GC 形成后,通过使用对根结线虫有毒害的基因同样可以取得抗线虫的效果。这些基因包括:蛋白酶抑制剂基因(Pis)、*Lectin*s 和 *Cry* 基因^[13],其中 Pis 基因的应用较为成功。在 2 种类型的 Pis 基因中,由于巯基蛋白酶抑制剂基因对哺乳动物无害^[3,4],因而更为常用。Pis 对多种线虫的抑制效应已经被实验确认,如在番茄和马铃薯中表达 $\alpha-1$ 基因,对胞囊线虫和根结线虫生长发育均造成有害影响^[16];在拟南芥中,通过共表达两种不同的蛋白酶抑制剂基因,*CpTI* 和 $\alpha-1D86$,达到了更明显的抑制效果^[16]。已经有许多不同来源的植物蛋白酶抑制剂基因得到克隆,如水稻 $\alpha-1$ 基因和向日葵 *cystatin* 基因。关于 *cystatin* 基因对生物安全等方面的评估正在进行之中,最近 Lilley 等研究表明,通过使用根特异的启动子 TUB-1,可以将 $\alpha-1D86$ 的表达限制在 GC 细胞附近,因而在很大程度上消除安全性方面的忧虑^[12]。

参考文献:

- [1] 韩生成,刘清利,孟颂东,等.植物寄生线虫分子生物学和抗线虫基因工程策略的研究进展[J].农业生物技术学报,1999,4:395-400.
- [2] 刘维志.植物病原线虫学[M].北京,中国农业出版社,2000:1-2.
- [3] 赵鸿,彭德良,朱建兰.根结线虫的研究现状[J].植物保护,2003,29(6):6-9.
- [4] Atkinson HJ,Green J, Cowgill S, et al. The case for genetically modified crops with a poverty focus[J]. Trends in Biotechnology, 2001,19(3): 91-96.
- [5] Atkinson, HJ, Urwin PE, McPherson MJ. Engineering plants nematode resistance[J]. Annu. Rev. Phytopathol, 2003, 41: 615-639.
- [6] Bird DM. Signaling between nematodes and plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7: 372-376.
- [7] Cai D, Kleine M, Kille S, et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet[J]. Science, 1997,275: 832-834.
- [8] Davis EL, Hussey RS, Baum TJ. Getting to the roots of parasitism by nematodes[J]. TRENDS in Parasitology,2004,20(3): 134-141.

土壤农药残留微生物降解研究进展

李玉梅¹, 王根林², 于洪久¹, 孙 彬¹, 边道林¹

(1. 黑龙江省农科院农村能源研究所, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农科院土肥所, 哈尔滨 150086)

摘 要: 农药在人类防治农作物病虫害、草害等方面发挥了举足轻重的作用, 但随之而来的农药残留问题对环境和人类健康也带来了严重的危害。为解决这一问题, 人们进行了大量的科学研究, 其中利用微生物降解农药残留已引起人们的广泛关注。现综述了土壤农药残留及微生物降解技术的发展与新技术应用。

关键词: 农药残留; 微生物降解

中图分类号: S 154.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)04-0072-03

自 1939 年瑞士科学家米勒 (Paul. Miller) 发明了 DDT 杀虫剂以来, 农药的应用取得了很大的进展。至今世界农药的年产量超过 200 万 t 以上, 每年农药的生产与销售量都处于上升趋势, 化学农药的品种也越来越多^[1]。已研制的农药品种达 1 200 多种, 其中 500 多个品种已投入使用, 农药已成为现代农业不可缺少的生产资料。首先, 农药的使用保证了农业的增产增收。据估计, 如果不使用化学农药, 世界粮食产量的一半会被各种病虫害和杂草所吞噬; 其次, 农药有效地防治了林业、牧业病虫害, 保证自然林和人工林的健康发展, 尤其是保证了经济林的增产增收; 另外, 农药对农业产品 (蔬菜、瓜果等) 和种子的保存也起了重要作用。然而大量

使用农药也给环境和生态系统带来了负面影响, 主要表现在: 农药在杀死害虫的同时, 对害虫的“天敌”及传粉的益虫益鸟也有伤害作用, 因而破坏了自然界的生态平衡; 由于长期使用同一类型农药, 使害虫产生了抗药性, 导致农药量越来越大, 成本越来越高; 农药在土壤、水体中残留、扩散, 使土壤资源、水资源环境遭受污染; 由于农药在农副产品中残留, 最终进入食物链而影响人类的生存与发展。

以有机磷类农药为例。有机磷类农药是目前应用最广泛的一类农药, 一直在国内外大量生产并大面积使用^[2]。和其它种类的农药一样, 有机磷农药真正用于毒杀病虫害的量通常仅占施用总量的 10%~20% 左右, 其余大部分农药都直接进入环境, 污染土壤、水体和空气。低剂量的有机磷农药对人和动物可产生慢性中毒, 会诱发多发性神经病、中风等; 急性中毒可引起肌肉痉挛、瞳孔收缩、呼吸困难, 甚至引发死亡。农业生产中过量使用有机磷农药会导致蔬菜、瓜果及动物性食品上农药残留增加, 人若长期使用此类食品, 对身体极为有害。在一项针对持久性有机污染物在农田生态系统中的环境

第一作者简介: 李玉梅 (1971-), 女, 助理研究员, 东北农业大学在读博士, 现从事植物营养学研究。

通讯作者: 王根林 (1971-), 男, 高级农艺师, 从事土壤肥料的研究与开发。

基金项目: 黑龙江省农科院青年基金项目 (200604002)。

收稿日期: 2006-12-20

[9] Favery B, Lecomte P, Gil N, et al. RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells[J]. *The EmboJournal*, 1998, 17, 6799-6811.

[10] Goggin F, Shah G, Williamson VM, et al. Instability of Mi-mediated nematode resistance in transgenic tomato plants[J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13, 357-364.

[11] Hwang CF, Bhakta AV, Truesdell GM, et al. Evidence for a Role of the N Terminus and Leucine-Rich Repeat Region of the Mi Gene Product in Regulation of Localized Cell Death[J]. *Plant Cell*, 2000, 12, 1319-1330.

[12] Jung C, Cai DG, Kleine M. Engineering nematode resistance in crop species[J]. *Trends in plant Science*, 1998, 3(7), 266-271.

[13] Lilley CJ, Urwin PE, Johnston KA, et al. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*[J]. *Plant Biotechnology*, 2004, 2, 3-12.

[14] Opperman CH, Taylor CG, Conkling MA. Root-knot nematode-directed

expression of a plant root-specific gene[J]. *Science*, 1994, 263, 221-223.

[15] Opperman, CH, Acedo, GN, Saravitz, DM, et al. Bioengineering resistance to sedentary endoparasitic nematodes. In *Advances in Molecular Plant Nematology*, F. Lamberti, C. de Giorgi, and D. M. Bird, eds (New York, Plenum Press), 1994, 221-232.

[16] Ramsay K, Wang ZH, Jones MGK. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5(6), 587-592.

[17] Urwin PE, Atkinson HJ, Waller DA, et al. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*[J]. *Plant J.*, 1995, 8, 121-131.

[18] Williamson VM, Richard S, Hussey RS. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants[J]. *Plant Cell*, 1996, 8, 1735-1745.

[19] Williamson, VM. Plant nematode resistance genes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 12, 327-331.