

果树抗虫基因工程研究进展

于亚军^{1,2}, 夏新莉¹, 尹伟伦¹

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院 北京 100083; 2. 大连大学 生物工程学院 辽宁 大连 116622)

摘要: 植物抗虫基因工程的发展为防治果树害虫提供了一条新途径。综述了近年来国内外对于果树抗虫基因工程的研究进展, 对常用的抗虫基因进行了概述, 针对果树植物分析了载体构建的特点, 概括了抗虫基因应用于果树转化的方法和技术, 提出研究工作中存在的问题、争议及可能的解决途径, 并对发展前景阐述了自己的看法。

关键词: 果树; 抗虫基因; 基因工程

中图分类号: S 66; S 603.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)07-0102-03

抗虫性已被列为全球作物基因工程的主要目标之一。果树虫害严重影响了树体生长和果品质量, 而农药的使用容易对生态环境和人体健康造成伤害。利用基因工程的手段培育果树新品种, 提高果树抗虫性是今后果树育种发展的方向之一。抗植物虫害的基因有很多, 迄今发现并应用于提高植物抗虫性的基因主要有两类: 一类是从细菌中分离出来的抗虫基因, 如苏云金杆菌毒蛋白基因(*Bacillus thuringiensis*, 简称为 Bt 基因)、异戊基转移酶基因(*Isopentenyl transferase*, 简称为 IPT 基因); 另一类是从植物和动物中分离出来的抗虫基因, 如外源凝集素基因(lectin 基因)、蛋白酶抑制剂基因(proteinase inhibitor, 简称为 PI 基因)、淀粉酶抑制剂基因(α -Amylase Inhibitor, 简称为 α AI 基因)等。选择合适的基因种类, 利用有效的基因转化方法, 提高外源基因在果树植物中的表达效率是果树抗虫基因工程研究的关键。

1 抗虫基因研究概述

1.1 Bt 基因

苏云金芽孢杆菌基因是一种自然界中广泛分布的革兰氏阳性孢子细菌, 在芽孢形成过程中能产生伴孢晶体, 而这些晶体主要是由一个或多个 27~140 kDa 的蛋白组成, 称为 δ 内毒素或杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, 简称为 ICP)^[1]。随着植物基因工程的发展, 越来越多的转 Bt 基因抗虫果树植物出现, 如苹果^[2]、核桃^[3]、葡萄^[4]、柿子^[5]等。1992 年底, 美国已经允许将转抗虫基因苹果进行田间试验。

第一代转 Bt 基因植物诞生于 1987 年, Vacek 等人

用来自 *B. thuringiensis* var. Berliner 1715 的全长的 cryI A (b) 基因与该基因 5' 端编码毒蛋白核心区域的缺失片段, 利用农杆菌介导法得到了烟草品种 Petit havana SR1 的转基因植株^[6]。第二代转 Bt 基因植物诞生于 1991 年, Perlak 等不改变原 Bt 毒蛋白氨基酸序列, 按照植物基因组常用的密码子优化了 Bt 基因序列, 着重对不稳定元件序列进行人工改造和合成, 经烟草和番茄转化表明, 基因表达量提高^[7]。之后, 研究人员在 Bt 毒蛋白基因的修饰和改造、表达载体的构建、植物转化、培育等方面进行了大量的研究^[8-14], 使用复合的具有非竞争性结合关系的 Bt 杀虫基因来转化植物, 以获得昆虫对之产生抗性的转基因植物, 称为第三代转 Bt 基因植物^[8, 11, 13]。

Bt 杀虫活性源于芽孢形成时产生的杀虫结晶蛋白(ICP)或苏云金杆菌毒蛋白(Bt toxic protein)^[11]。根据 ICP 的杀虫谱及它们的系列同源性可将其分类。据粗略统计, 目前所发现的杀虫基因已有 130 多种, 而且新的 Bt 毒蛋白基因还在不断分离、鉴定。

昆虫吃了苏云金芽孢杆菌的芽孢后, 蛋白毒素与肠道细胞表面上的受体结合, 干扰 K^+ -ATP 酶活性, 造成离子渗漏, 使细胞膜产生一些孔道破坏细胞的渗透平衡, 引起细胞肿胀和裂解, 造成昆虫肠道穿孔; 此外, 苏云金芽孢杆菌在生长和芽孢形成过程中, 还能分泌苏云金素或 β -外毒素, 对昆虫的生长也起到一定的抑制作用^[15]。

Bt 基因对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等 9 个目的昆虫和螨类等节肢动物, 以及动植物寄生线虫、原生动物、扁形动物等有特异性毒杀作用, 可防治棉花及其它农作物, 如: 蔬菜、果树、烟草、林木等危害严重的害虫, 例如棉铃虫、小菜蛾、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、菜青虫、马尾松毛虫、马铃薯甲虫、猿叶虫、柳兰叶甲等, 应用范围十分广泛^[16]。

1.2 其它抗虫基因

第一作者简介: 于亚军(1976-), 女, 内蒙古赤峰市人, 在读博士, 讲师, 研究方向为林木基因工程。E-mail: yuyajun_002@tom.com。

收稿日期: 2008-02-21

主要包括蛋白酶抑制剂基因(PI 基因)、植物凝集素基因(lectin 基因)、淀粉酶抑制剂基因(α AI 基因)、胆固醇氧化酶基因(Cho 基因)、营养杀虫蛋白基因(Vip 基因)和系统肽基因(Systemin 基因)等类型^[17-19]。目前在果树遗传转化中这几种抗虫基因的使用比较少见。

2 抗虫基因载体构建

2.1 启动子的选用和改造

启动子在基因表达方面起重要作用,选择合适的植物启动子并增强活性是外源基因表达的关键。目前,抗虫基因工程中应用最多的是 CaMV35S 启动子,它是组成型表达启动子,其基因表达产物在植物生长发育的全周期以及植物的各种组织中都将存在,因此会消耗植物自身的营养和能量,还可能对害虫形成稳定的选择压,提高害虫对转基因植物的抗性。为了克服组成型表达启动子的缺点,目前人们对特异表达启动子的研究和应用越来越重视^[5]。已发现的特异性启动子主要包括组织器官特异性的启动子和诱导特异性启动子,引入特异表达机制,利用毒素特异性、诱导性启动表达,包括组织特异性、发育特异性、损伤特异性或引诱剂诱导性表达,使抗虫基因只在特定部位、特定时间或只在植物受到损伤时进行表达,可以在短时间杀死害虫,减少害虫处在选择压下的时间,延迟或阻止害虫产生抗性,例如针对蚜虫取食部位是韧皮部可采用特异性表达启动子^[20]。

2.2 起始密码周边序列的优化与编码区的改造

为了增强外源基因的翻译效率,构建载体时一般要对基因进行修饰。将3'端截短了的 Bt-toxin 基因导入棉花和水稻,已获得转基因植株^[21-22]。在不改变毒蛋白氨基酸序列的前提下,对杀虫蛋白基因进行了改造,选用植物偏爱的密码子,增加 GC 含量,去除原序列中影响 mRNA 稳定的元件,在转基因植株中毒蛋白的表达量可以增加 30~100 倍^[7];利用人工改造的 Bt-toxin 基因得到了抗虫转基因大豆^[23]。

2.3 筛选基因的去除和无标记转化

近几年来,转基因植物中筛选标记基因的生物安全性引起了全球关注。众所周知,抗生素抗性基因和除草剂抗性基因虽然有利于转化体的筛选,但它们对植物的生长并非是必要的,还可能潜在的安全性问题。为了避免转基因植物带来的不安全因素,在筛选标记的使用方面已有了一些新的改进。获得无标记的转基因植物有两个方法:一个是在利用标记基因得到转基因植物以后再将其从植物中去除;另一个是在转化中不使用标记基因,即:无标记转化^[17]。这些技术在果树抗虫基因工程上值得一试。

3 抗虫基因转化方法与新技术

植物基因转化方法主要包括载体介导的转化和直接基因转移,转化系统主要包括以下几种:农杆菌转化

系统;以植物病毒作基因载体的外源基因转化系统;DNA 直接导入系统。目前应用较多的是农杆菌转化系统和 DNA 直接导入系统。

多基因转化通过基因联用使基因作用实现互补,可能会拓宽抗虫谱、增强抗虫性;叶绿体基因工程等新的技术领域也已经扩展到抗虫基因转化研究中来。

3.1 双价或多价基因转化方法的特点和优势

单基因表达强度不够或作用机制单一,往往不能获得理想的转基因植物。如果将两个以上抗虫基因组合在一起,优势互补,可能会提高抗虫能力、拓宽抗虫范围。例如,将 CpTI 基因和 Bt 毒蛋白基因联合使用,有助于拓宽转基因植株的抗虫谱,发挥堆塔效应(pyramiding),增强抗虫性,延缓害虫产生耐受性^[8]。构建双价或多价抗虫基因载体和进行多抗虫基因转化并共同表达已成为抗虫基因工程的研究趋势^[8, 11-12]。

3.2 用 Bt 基因转化叶绿体的特点和优势

叶绿体基因工程是植物基因工程新兴领域。应用叶绿体转化的方法,可以在一定程度上克服细胞核基因组中普遍存在的基因沉默现象;由于含有 Bt 基因的植物内毒素含量低,可能使害虫产生对该毒素的抗性,叶绿体基因组的转化可解决这一难题。1995 年,美国 Rutgers 大学 Maliga 实验室将 Bt 基因成功地转化到烟草叶绿体中,得到的毒蛋白占可溶性蛋白高达 3%~5%,杀虫活性在 90%以上,该表达量比改造后 Bt 毒蛋白基因转到植物核基因组中的最高表达量高 50 倍^[15]。与常规细胞核转化体系相比,叶绿体基因组较小、无组蛋白、结构相对简单、易于遗传操作;外源基因可以高效且表达相对稳定;转录、翻译所偏爱的密码子等与原核生物相似,使原核基因无需修饰改造;由于叶绿体转化为母系遗传,外源基因不会随花粉传播,不会产生外源基因的漂移,不存在环境安全性问题^[24]。

4 抗虫基因转化果树研究现状及今后发展方向

众所周知,果树的人工栽培以无性繁殖为主,许多丰产林基因结构单一,所以容易造成病虫害的流行。果树虫害一旦爆发,可能会导致果园减产甚至绝收,因此植保上通常采取“预防为主、综合治理”的原则,预防果树虫害有喷洒农药、生物防治等措施,但这些措施也都有各自的局限性甚至危害性。植物基因工程无疑为果树抗虫研究提供了新途径和新思路。但在我国,木本植物尤其是果树植物遗传转化技术相对落后,这一方面是由于我国国情造成的,另一方面也是由于果树再生体系的建立困难、遗传转化率普遍较低,因此遗传转化工作难度大。此外,同其它作物一样,果树遗传转化工作也面临着诸多的问题和挑战。

4.1 存在的问题和潜在的风险

1996 年 Monsanto 公司报道了刚刚推出不久的转

Bt-ICPs 基因的棉花已经完全失去抗棉铃虫的能力, 由于这些转 Bt 基因抗虫植物大多采用 CaMV35S 等组成型启动子, 在植物发育的全周期均表达 Bt 毒蛋白, 因此大大增强了 Bt 毒蛋白对昆虫的选择压。据报道, 转 Bt 基因抗虫棉已在澳大利亚的棉铃虫控制中惨遭失败。同时, 转基因作物高抗株系的子代有抗虫性分离和不稳定的现象出现^[2]。

抗虫基因表达水平低和表达稳定性差是值得关注的现象。基因沉默是目前人们在植物基因工程中需要经常面对, 并且亟待解决的问题, 它与目的基因在受体植物中的甲基化状况、拷贝数、插入受体染色体位点及是否与受体植物中有同源基因等因素有关。造成的基因沉默的原因包括: 密码子的偏爱性、上游和下游基因调控序列、存在基因同源序列、基因的甲基化等^[15]。

此外, 转抗虫基因植物也有可带来诸如基因漂流 (gene flow / dispersal)、破坏生物多样性、破坏生态平衡、食品安全性等问题。对此, 世界各国相继制定颁布了一系列生物遗传工程体及其产品安全性评价条例, 对转基因植物的安全性评价制定了严格的评价标准^[2]。民众和研究人员也应该持有科学和客观的态度。

4.2 今后发展方向

首先, 分离新的抗虫基因, 扩大抗虫范围将是今后科研工作的主要方向。

筛选出适宜的培养基和外植体种类, 建立高效、稳定的受体系统是果树遗传转化的关键。

尝试采用双价/多价基因共转化的方法来扩大抗虫范围和增强抗虫性。

在筛选标记的使用方面可做一些新的改进, 例如尝试采用叶绿体转化、筛选基因去除等新兴技术以消除安全隐患和果品安全隐患, 并提高基因表达的稳定性。

此外, 还要配合相应的栽培或育种措施, 阻止或者延缓害虫产生抗性, 具体的说, 在果树栽培工作中可营造转基因和非转基因的混交林, 使目标害虫暴露的时间、空间降到最低限度。为防止花粉传给野生种或相近种而带来基因污染, 可采取适当的物理、生物方法隔离转基因果树以防止花粉扩散。

总之, 在进行抗虫基因转化时, 根据育种目标构建和优化载体、选择良好表型的果树植物受体并采取适宜的转化方法以获得转基因果树植株个体, 对于创造具有优良性状的抗虫果树植物类型是至关重要的。

参考文献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 程家胜, 鄂超苏, 田颖川, 等. 转 Bt 抗虫基因苹果植株的再生[J]. 中国果树, 1994(4): 14-15.
- [3] Dandekar A M, Mcgranahan H Vail PV, et al. Low levels of expression of wild type *Bacillus thuringiensis* var *hustaki* cryIA(C) sequences in transgenic walnut somatic embryos[J]. Plant Sci, 1994, 96, 151-162.

- [4] 张克忠, 鲍雪珍, 占永延, 等. 苏云金杆菌内毒素蛋白基因转入葡萄胚性愈伤组织细胞及转基因植株再生的研究[J]. 实验生物学报, 1997, 30(30): 303-308.
- [5] Tan R. 采用苏云金芽孢杆菌的 cryI A(C) 基因使柿子具有遗传工程抗虫性[J]. 生物技术通报, 1998(3): 55.
- [6] Vacek et al. Nature, 1987, 328: 33-47.
- [7] Perlak F J, Stone T B, Muskopf Y M, Petersen L J, Parkers B, Mcpherson S A, Wyman J, Love S, Reed G, Biever, Fischhoff d A. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles[J]. Plant mol Biol, 1993, 22, 313-321.
- [8] 王志斌, 郭三堆. 表达 cryIA/GNA 双价抗虫基因烟草兼抗棉铃虫和蚜虫[J]. 科学通报, 1998, 44(19): 2068-2073.
- [9] 石春林, 朱祯, 徐鸿林, 等. 转基因烟草中 Bt 毒蛋白基因的表达行为[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 269-271.
- [10] 宋福平. 苏云金芽孢杆菌 cry 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 13-18.
- [11] 苏宁, 杨波, 孟昆, 等. 双价抗虫基因共转化烟草叶绿体的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 394-398.
- [12] 王爱菊, 姚方应, 温孚江, 等. 利用 Bt 基因和 X821 基因转化获得抗螟虫、白叶枯病的转基因水稻[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 857-860.
- [13] Cao J, Tang J d Strizhov N, Shelton A m, Earle E d. Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* cryIC protein control diamondback moth larvae resistant to cry IA or cry IC[J]. mol Breed, 1999, 5, 131-141.
- [14] Iannaccone R, grieco P d, Cellini F. Specific sequence modification of a cry3B endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance[J]. Plant mol Biol, 1997, 34, 485-496.
- [15] 侯丙凯, 陈正华. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(5): 385-393.
- [16] 朱新生, 朱玉贤. 抗虫植物基因工程研究进展[J]. 植物学报, 1997, 39(3): 282-288.
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002, 3-21; 89-106.
- [18] 王转花, 杨斌. 植物蛋白酶抑制剂抗虫基因工程研究进展[J]. 植物保护学报, 2001, 28(1): 83-88.
- [19] 王深往, 钦俊德. 植物蛋白酶抑制剂抗虫作用的研究进展[J]. 昆虫学报, 1997, 40(2): 212-218.
- [20] Shi Y, Wang m B, Powell K S, Van Damme E, Hilder V A, Gatehouse A m R, Boulterd Gatehouse J A. Use of the rice sucrose synthase I promoter to direct phloem-specific expression of beta-glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants[J]. J Exp Bot, 1994, 45: 623-631.
- [21] 谢道昕, 范云六, 倪丕冲. 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[J]. 中国科学, B 辑, 1991(8): 830-834.
- [22] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B 辑), 1991(4): 367-373.
- [23] Stewart C N, Adang M J, All J N, Boger h R, Cardineau, Tuckerd, Parrott WA. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene[J]. Plant Physiol, 1996, 112, 121-129.
- [24] 侯丙凯, 陈正华. 高等植物的质体基因转化[J]. 生物工程进展, 2000, 20(1): 70-73.
- [25] 欧阳立明, 郭予元. 害虫对转 Bt 基因植物抗性的治理策略[J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 183-188.
- [26] 邓欣, 赵廷昌, 高必达, 等. 转基因抗虫棉生物安全评价研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(12): 4244-4249.