

大豆抗虫基因工程研究进展^{*}

朱成松 顾和平 陈 新

(江苏省农业科学院经济作物研究所 南京 210014)

ADVANCES IN ENGINEERING OF INSECT- RESISTANT SOYBEANS

Zhu Chengsong Gu Heping Chen Xin

(*Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of
Agricultural Sciences, Nanjing, 210014*)

提 要

本文概述了大豆抗虫基因及其修饰、载体的构建、遗传转化的方法、转基因植株后代抗性表现等方面的研究进展。

关键词 大豆;杀虫基因;遗传转化;抗虫基因工程

大豆生育期间受害虫侵害严重,常给大豆生产造成巨大损失。大量喷施化学杀虫剂,不仅会增强害虫的抗药性,使益虫及其它动物区系遭受破坏,而且严重污染环境,提高生产成本,破坏生态平衡。常规育种及栽培技术由于育种年限长,遗传资源有限,抗虫机制不甚明了,以及害虫新生物型的发展导致抗性不稳定等原因已有一定的局限性,收效不大。八十年代迅速崛起的植物基因工程技术为大豆抗虫育种开辟了新的途径,已引起了许多育种工作者的关注。本文拟就大豆抗虫基因工程方面研究的进展作一综述。

1 抗虫基因及其修饰

1.1 Bt 晶体蛋白毒素基因

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt) 是一种能产生杀虫晶体蛋白的土壤杆菌,在形成芽孢时可生产一种不溶性的伴孢晶体蛋白— δ 内毒素 (δ -endotoxin),其量约占孢重 30% 左右。它通常由 600~1200 个氨基酸组成的一种多肽前毒素。Bt 晶体蛋白的杀虫机理是该蛋白与昆虫中肠道上皮纹缘细胞 (brushborder membrane) 上的受体位点结合,引起并破坏纹缘膜细胞渗透压平衡,使细胞裂解,杀死昆虫 (Aronson 等, 1986)。Bt 毒蛋白的杀虫性非常专一,其中两个变种 (Bt aizawai 7-29 和 Bt kurstaki HD-1) 为杀鳞翅目昆虫的优良菌种。

* 收稿日期 1997-07-14

Received on July 14, 1997

(Rowe, 1987)。1981年,Whitely克隆了Bt毒蛋白基因cryIA(b)至今,人们已从Bt中克隆出50多个毒素基因(Barton and Miller, 1993)通过克隆技术已确定Bt毒蛋白基因位于30–150MD大小不同的质粒上,其中毒性区间位于该序列N末端29–607个编码区(Vacek等, 1987)。Adang等(1985)首次报道了转Bt毒蛋白基因的烟草植株,2种转基因植株都能有效地抵抗一龄烟草天蛾,随后研究人员先后把Bt基因转到棉花、番茄、大豆等植物中。但野生型Bt毒蛋白基因在高等植物体内表达量低,抗虫效果不理想(Benedict等, 1992)。Murry等(1991)认为,与高等植物结构基因正常的DNA序列相比,Bt基因含有较多的AT碱基和ATTTA重复序列。AT富含区在高等植物中被认为是不能表达的内含子(Goodal等, 1989),ATTTA重复序列在高等植物的转录翻译系统中会影响mRNA的稳定性(Shaw等, 1986),二者都不能在高等植物中进行编码(Kunkle, 1985)。为此,Monsanto公司的科技人员从两方面入手来解决Bt晶体蛋白表达量低的难题:一方面改进Ti质粒转化载体的启动子,在原先基础上加入重复的强化表达区(duplicated enhanced region)。通过启动子的改造,野生型基因的表达水平可提高5–10倍(Perlak等, 1990)。另一方面,他们采用人工合成的方法合成了一条全新的DNA序列。与野生型Bt毒蛋白相比,它改变了390个碱基对,涉及60%的密码子,使GC含量增加到49%,且不含ATTTA重复序列,这种完全修饰的Bt毒蛋白基因导入植物后,使植物体内的 δ -内毒素含量比野生型提高了100倍,并表现较强的杀虫效果(Perlak等, 1991)。

1.2 豇豆胰蛋白酶抑制剂

植物蛋白酶抑制剂是一类天然的抗虫物质(Ryan, 1989)。与苏云金杆菌毒蛋白相比,具有抗虫谱广,对人无副作用以及害虫不易产生耐受性等优点(Gatehouse, 1988)。目前已从豇豆、大豆、番茄、马铃薯、大麦等植物中分离纯化出多种丝氨酸蛋白酶抑制剂基因或cDNA。经过多年的深入研究,比较了不同来源的各种蛋白酶抑制剂,发现豇豆胰蛋白酶抑制剂(Cowpea trypsin inhibitor,简称CpTi)抗虫效果最为理想。这是因为CpTi的作用部位是酶活中心,除非其消化系统主要生理生化过程都发生变化,否则害虫几乎不可能通过突变的方式诱发抗性,所以CpTi所介导的抗性是比较稳定的。豇豆胰蛋白酶抑制剂是由设在尼日利亚的国际热带作物研究所(IITA)从几千份豇豆资源材料中筛选得到的一份抗豆象材料-TV_{u2027}中得到的。它是由约80个氨基酸组成的多肽,其产物可抑制昆虫消化道中的消化酶,使昆虫取食后不能消化吸收营养物质而饿死。Hilder等(1987)首先将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入烟草,获得能毒杀烟芽夜蛾的转基因烟草。Parrott等(1994)已将CpTi转入大豆,但无详细报导。

2 抗虫基因载体的构建

分离得到的抗虫基因一般不能直接使用,必须对其进行分子重组和修饰,把目的基因、启动子、报告基因、终止子及加强子等整合到合适的载体上(一般采用农杆菌Ti质粒),其中关键是启动子。目前大豆上所采用的启动子多为花椰菜花叶病毒GaMV35S启动子、NOS启动子、光诱导启动子和 β -云扁豆蛋白启动子等。常用的报告基因有氯霉素乙酰转移酶(CAT)、新霉素磷酸转移酶(NPT-II)和 β -葡萄糖苷酶(GUS)基因。

3 抗虫基因导入方法

3.1 农杆菌质粒介导法

土壤农杆菌 (*Agrobacterium*) 有两个种: 根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*A. rhizogenes*), 均能向植物细胞转移其质粒上的一段 DNA (T-DNA) 片段, 所导入的片段 (T-DNA) 可整合到植物细胞核基因组中, 并能稳定遗传下去。目前, 大豆等作物的转基因工程大多采用农杆菌质粒介导法进行基因转移, 其中以根癌农杆菌 Ti 质粒更为普遍 (贾士荣等, 1992)。其方法是将植物外植体浸泡在农杆菌溶液中, 使农杆菌侵染植物组织, 然后把外植体取出冲净置于含抗菌素的选择培养基上培养, 诱导外植体再生植株, 由于目的基因同时连接有报告基因 (如 NPT-II 等), 凡能在选择培养基上出愈者, 就表明目的基因被整合到植物细胞核基因组中。农杆菌介导法的优点在于可靠性强、效率高, 但只有外植体能再生的双子叶植物才能采用。

3.2 微弹射击法

微弹射击法, 又称基因枪法, 是由康奈尔大学 Kleim 等 (1987) 发明的外源基因直接导入植物细胞的方法。该方法是将带有目的基因的载体裹在金属 (钨) 微粒上, 再用金属微弹加速轰击受体组织, 金属微弹到离受体细胞一定距离的金属网屏受阻, 而把微粒连同基因载体打入受体组织细胞内, 再通过组织培养产生再生植株。该方法的受体不受植物种类、器官等限制, 特别用于农杆菌不能感染的单子叶植物, 但可靠性较差, 转化频率较低。

3.3 花粉管通道法

周光宇 (1978, 1988) 在广泛调查内外远缘杂交工作的基础上, 提出 DNA 片段杂交假设, 并设计了外源 DNA 直接导入受体的花粉管途径导入方法。即利用作物受粉后形成的花粉管通道使外源 DNA 导入植物卵细胞、合子或早期胚细胞的技术。雷勃钧等 (1991, 1994) 先后用该技术将种内、种间、属间外源总 DNA 成功导入受体大豆植株, 并获得一些有价值的遗传变异。该方法简便易行, 可以避免农杆菌转化频率低和转化脱菌困难等问题, 特别适于植物外植株再生困难或再生频率低的植物。

其他的如电击法和 PEG 电击法介导的遗传转化虽在大豆上得到广泛应用, 但目前仅得到转化的愈伤组织和再生芽, 还尚未见得到再生植株的报导 (Christou, 1990, Dhir, 1991)。

4 大豆抗虫基因工程研究现状

Facciotti 等 (1985) 最早开始克隆基因用于农杆菌感染转化大豆。Hinchee 等 (1988) 首次通过农杆菌介导的转化获得转基因大豆植株。从 100 份栽培大豆品种中筛选出 3 个最敏感品种, 用含有 pTi-T37-SE 和 pMON9749 (含 NPTII 和 GUS 基因) 或 pTiT37-SE 和 pMON894 (含 DNAILI 和 Glyphosate 耐性基因) 农杆菌与子叶共培养, 得到 NPTII 和 GUS 以及 NPTII 和 Glyphosate 耐性基因共转化的转基因植株, 两种类型的转基因植株后代的分离比都为 3:9 (共转化: 非转化), 表明外源基因以单位点插入, 呈孟德尔式遗传。

据美国国家农业图书馆 (National Agricultural Library) 提供资料, 抗叶食性害虫转基因大豆研究已获重要进展 (Kalinshi, 1993)。Parrott 等 1992 年起用携有 Bt 结晶蛋白毒性基因和 (或) CpTi 基因的微弹轰击各种基因型的大豆品种的胚状悬浮系, 获得 Bt 结晶蛋白毒性基因的三个转基因大豆细胞系已成功地再生植株。用两个再生植株后代分别饲养黎豆夜蛾幼虫, 其中有一个再生植株的后代对黎豆夜蛾幼虫有明显的抑制生长的作用。

叶片损耗显著少于非转基因大豆植株。携有 CpTi 抗虫基因的愈伤组织也已经获得,正进行进一步鉴定。试验表明棉铃虫和大造桥虫在不同大豆上的取食和生长发育情况,转基因系和对照之间无显著差异 (Parrott 等, 1994)。可见 Bt 毒蛋白基因在大豆株体内的表达不理想,所产生的 δ -内毒素不足以抑制昆虫取食或杀死昆虫的水平。为此, Stewart 等 (1996) 将人工合成的 Bt 晶体蛋白基因 (Bt cryIAC) 通过微弹射击法导入感虫品种 Jack 中, 得到 3 个转基因系, cryIAC 蛋白在植株中的表达量高达 46ng/mg, 再生植株的后代对棉铃虫、大造桥虫、烟芽夜蛾、黎豆夜蛾等均有较强的抑制作用。由于棉铃虫危害产生落叶转基因植株仅为 3%, 对照抗鳞翅目昆虫的品系 GatIR81-296 为 20%, 而感虫品种 Cobb 高达 40%。

我国的大豆外源抗虫基因研究起步较晚, 发展较慢。徐香玲等 (1997) 以 Ti 质粒为介导, 将 pK T₃₄B₇C₅ 质粒上的 Bt k- δ 内毒素蛋白基因导入东北大豆“黑农 37”、“黑农 39”等品种。采用多种外植体和感染方法, 从胚轴和子叶节诱导出丛生芽和再生植株。经卡那霉素筛选和冠瘿碱检测, 初步证明外源基因导入大豆中, 共获 81 株再生植株, 得到 7 粒种子, 有关研究正在进行之中。

总之, 大豆抗虫基因工程研究已取得一些可喜进展, 但总的来说, 尚处于开始阶段, 还有待于发现和分离有效的抗虫基因, 开辟更快更直接的杀虫途径, 造福生产。可以预料, 随着分子生物学、生物工程技术 and 现代植物育种的进一步发展, 具有较强抗虫能力的大豆转基因品种 (系) 可望不久将育成, 并投入大面积生产试验, 大豆害虫的生物控制必将成为现实。

参 考 文 献

- [1] 贾士荣等, 1992, 植物学报, 9(2): 3- 15
- [2] 刘春明等, 1992, 科学通报, 37(18): 1694- 1697
- [3] 雷勃钧等, 1991, 大豆科学, 10(1): 58- 63
- [4] 雷勃钧等, 1994, 中国科学, 24(6): 596- 601
- [5] 徐香玲等, 1997, 大豆科学, 16(1): 6- 11
- [6] 周光宇, 1978, 中国农业科学, (2): 16- 20
- [7] 周光宇, 1988, 中国农业科学, (3): 1- 16
- [8] Adang, L. E. et al., 1985, Gene, (36): 289- 300
- [9] Aronson, A. I. et al., 1986, Microbiol. (50): 6- 11
- [10] Barton, K. A. et al., 1987, Plant Physiol., (85): 1103- 1109
- [11] Benedict, J. H. et al., 1992, J. Econ. Ent., 85(2): 589- 593
- [12] Christou P. et al., 1990, TAG, 79: 337- 341
- [13] Dhir, S. K. et al., 1991, Plant Cell Reports, (10): 97- 101
- [14] Facciotti, D. et al., 1985, Bio/Technology, (3): 241- 246
- [15] Goodal, G. L. et al., 1991, Australian J. Plant Physiol., 18(5): 481- 494
- [16] Gatehouse, A. M. R., 1988, Brighton Crop Protection Conf., (3): 1245- 1254
- [17] Hilder, V. A., 1987, Nature, (300): 160- 163
- [18] Hinchey, M. A. W. et al., 1998, Bio/Technology, (6): 915- 922
- [19] Klein, T. M. et al., 1987, Nature, (327): 70- 73

- [20] Kumkle, T. A 1983, Proc. Natl Acad. Sci. USA. (82): 488– 492
- [21] Murray, L. et al. , 1989, Nucleic Acid Research, 17(2): 477– 491
- [22] Parrott, W. A. et al. , 1994, In Vitro Cell Dev. Biol, (3): 144– 149
- [23] Perlak, F. J et al. , 1990, Bio /Technology, (8): 739– 743
- [24] Perlak, F. J et al. , 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88(8): 3324– 3328
- [25] Rowe, G. E. et al. , 1987, Crit Rev. (6): 87– 127
- [26] Ryon, C. 1989, Bio– Essays, 10(1): 20– 24
- [27] Shaw, G et al. , 1986, Cell, (46): 659– 667
- [28] Stewart, C. et al. , 1996, Plant Physiol (112): 121– 129
- [29] Vaeck, M et al. , 1987, Nature, (328): 33– 37