

林木抗病虫基因工程的现状和问题

张立钦^{*} 董林根 方志刚
(浙江林学院 浙江临安 311300)

摘要 本文综述了林木抗虫、抗病毒、抗细菌和抗真菌的基因工程的途径、研究现状及发展前景。

并提出了林木抗病虫基因工程方面存在的问题。

关键词 林木 基因工程 抗病 抗虫

由害虫、真菌、病毒、细菌等有害生物因子引起的病虫害是森林树木死亡和产品减少的重要因素。一个世纪以来,科学们应用常规育种的方法为林木抗性品种的选育做出许多努力,取得了不少可喜的成绩。但林木生长周期长,这是林木抗性育种工作一个最大障碍。基因工程的延生给林木抗性育种带来了新的、突破性的方法。

林木抗病虫基因工程就是利用重组 DNA 技术,将抗性外源基因导入林木染色体,从而产生具有外源基因表达的转基因林木。80 年代以来,随着基因分离、表达载体构建、植物遗传转化和外源基因在高等植物细胞中的表达等方面的深入研究,特别是利用真核基因启动子构建融合基因的工作解决了外源基因在植物转化细胞中的表达问题,加速了林木基因工程的进展。在近 10 余年里,已有 20 余种树木如杨树、火炬松、花旗松、白云杉、桉木、核桃、刺槐、麻栎、桉树、苹果、欧洲赤松、兰伯氏松、挪威云杉和思格曼云杉等先后进行了基因工程的研究,已获得转基因植株的有杨树、核桃、柳、松树、苹果、李和葡萄等。到目前为止,有些项目开始或已经进入商业化操作阶段。研究领域有抗虫、抗病、抗除草剂、耐盐、耐高温、耐干旱、耐冻等基因工程。本文对国内外林木抗病虫基因工程的现状以及在其研究发展中存在的问题作一概述。

1 抗虫基因工程

害虫是林业生产上的大敌之一。化学药剂杀虫不仅成本高,且造成严重的环境污染和食品中的残毒。人们很早就知道可以利用生物防治的方法来控制虫害。现在利用基因工程可以有效地达到这个目

的。目前,人们已从细菌、植物本身及昆虫体内发现并分离到许多抗虫基因,有的已导入植物获得了抗虫转基因植株。目前,研究的抗虫基因有以下几方面。

1.1 苏云金杆菌毒蛋白基因

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt)制剂长期以来用于多种害虫的生物防治,因其产生大量的伴胞晶体蛋白对昆虫幼虫有很强的毒杀作用。伴胞晶体由具有高度特异性杀虫活性的结晶蛋白组成。根据毒蛋白基因的序列同源性和它们编码蛋白的杀虫谱,可划分为四大类及若干小类。类型 I (Cry I) 对鳞翅目;类型 II (Cry II) 对鳞翅目和双翅目;类型 III (Cry III) 对鞘翅目;类型 IV (Cry IV) 对双翅目有特异毒性。最近几年中,还发现类型 V (Cry V) 既对鳞翅目又对双翅目有特异性。

首次报道获抗虫基因植株是在 1987 年,比利时 Mentagn 实验室的 Veack 等人,用 Cry I A[b] 基因与 NPT II 基因融合,转化烟草,结果得到转基因烟草植株。同年,美国 Monsanto Agracetus 和 Agrigenetic 公司分别获得抗虫转基因蕃茄和烟草植株。这些植株在实验室条件下用烟草天蛾幼虫检测抗虫性,结果证明虽有一定的抗虫性,但都难以或几乎检测不到晶体蛋白的表达。经分析,主要原因是在杀虫晶体蛋白的基因的编码区内有一些特殊序列存在,使杀虫晶体蛋白基因在植物体内转录后加工的效率不高,mRNA 转运过快造成 mRNA 不稳定,或因含量过低而检测不到全长的 mRNA。在国内,中国农业科学院生物技术研究中心、中国科学院微生物研究所、中国科学院上海植物生理研究所等单位,在 80 年代中后期,也将 Bt 杀虫晶体蛋白基因 Cry

^{*} 南京林业大学在职博士生

I A、Cry I C 等基因进行了克隆和序列分析, 并将 3' 端缺失基因导入水稻、棉花、烟草和甘蓝等, 得到转基因植株。经生物杀虫检测, 杀虫性与国外报道的基本相同。

1989 年, Murray 等人发现了 Cry 基因中存在着许多不稳定元件。因此, 人们又把注意力集中在人工改造和人工合成 Bt 杀虫晶体蛋白基因上, Parlak 等部分改造了野生型的 Cry I A[b] 基因序列, 得到 PmCry I A[b], 转化烟草和蕃茄得到抗虫基因植株, 其表达量提高了 10 倍。人工合成基因是将 Bt 杀虫体蛋白结构中的所有不稳定元件, 几乎全部换掉。合成基因称为 FmCry I A[b], 在转基因植株内表达量提高 30–100 倍或更高。1991 年开始, 郭三堆等在国内首先合成了 Cry I A 杀虫晶体蛋白结构基因, 此后田颖川、白永延等也先后合成和部分改造了 Cry I A 基因, 并导入烟草、甘蓝和棉花获得抗虫转基因植株。现在国内外利用修饰、改造、部分及全合成的 Cry 基因转化植物, 得到抗虫转基因植物已达 25 种以上, 取得了突破性进展。

在此基础上, 林木抗性基因工程工作也同时开展起来。1990 年中国农业科学院范云六等成功地将对鳞翅目昆虫有毒性的 Bt 毒蛋白基因用根癌农杆菌导入欧洲黑杨获得转基因植株。1991 年 Mcowen B. H 等人利用电激法将抗虫 Bt 基因导入银白杨×大齿杨和欧洲黑杨×毛果杨杂种中, 前者获得抗虫转基因植株。美国威斯康星大学等单位, 已成功地将在抗虫 Bt 基因与蛋白酶抑制剂基因导入云杉中, 有效地防止了卷叶蛾的危害。1994 年 Kleiner K. W 等人获得枯枯叶蛾毛虫和吉卜赛蛾的转基因杂种杨(NC5339)无性系。同年 Shin D. I 等将 Bt 基因转入欧洲落叶松, 通过 Southern, Northern 和 Western blot 分析以及生物测定证明该基因已得到表达。中科院上海植物所和南京林业大学合作, 将 Bt 基因导入毛白杨和美洲黑杨×小叶杨无性系 NL-80106。中科院微生物所对 Bt 基因的 5' 端和 3' 端进行改造, 构建了带有双转录的增强子, 并植入翻译增强子 TMV 的 Ω 片段的中间载体, 分别将有四种不同缺失长度的 Bt 基因载体, 即含全长基因 3.6kb、2.8kb、2.1kb 和 1.8kb 转入农杆菌 LBA4404, 并与中国林科院合作转化欧洲黑杨共获得 54 棵转基因植株, Southern Blot 证明该基因稳定地插入到杨树基因组中, 虫试测定表明, 其毒杀鳞翅目害虫舞毒蛾和杨尺蠖的能力高达 76–100%。后来中国林科院又把上述 Bt 基因导入欧美杨和美洲

黑杨, 成功地获得转 Bt 基因抗叶部害虫植株。Wang Gejiao 等也成功地获得转 Bt 基因的黑杨植株, 经 2~3 年的抗虫测定和优良性状选择, 有 3 个无性系即 12、153 和 192 在中国 6 个省种植进行评估。1998 年 Soir Suk Gyu 等在杂种杨转基因研究时, 发现 PEHA101 载体比 LBA4404/PB121 效率高达 6 倍。到目前为止, 有表达 Bt 基因的树种有杨树、苹果、核桃、落叶松、花旗松、火炬松和云杉等。

1.2 蛋白酶抑制剂基因

蛋白酶抑制剂(PI)是自然界含量最为丰富的蛋白种类之一, 存在于所有生命体中。植物中存在三类, 它们是丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂。前者与抗虫关系密切, 巯基蛋白酶抑制剂对鞘翅目昆虫具有独特抗性。它们的杀虫机理就在于, 它能与昆虫消化道内的蛋白消化酶相互作用, 形成酶—抑制剂复合物(EI), 阻断或减弱消化酶的蛋白水解作用, 所以影响外来蛋白的正常消化, 同时它刺激消化酶的过量分泌, 通过神经系统反馈, 使昆虫产生厌食反应, 最终造成昆虫的非正常发育或死亡。

目前, 已有多种蛋白酶抑制剂基因或 cDNA 被克隆, 并得到一批转基因植株, 转基因植株表现出良好的抗虫效果, 尤其是丝氨酸类蛋白酶抑制剂中的豇豆胰蛋白酶抑制剂(CPT I)和马铃薯蛋白酶抑制剂—II(PI—II)。豇豆胰蛋白酶抑制剂具有广谱抗虫性, 纯化的 CPT I 对鳞翅目、鞘翅目及直翅目的害虫有毒性。1987 年英国的 Hilder 首先获得转 CPT I 基因烟草植株。刘春明等对鉴定出的转基因植株, 用 2—3 龄的棉铃虫进行抗虫测试, 4 天后死亡率达 50%, 存活的虫生长发育也明显受到了抑制。中科院遗传所对 CPT I 基因转化杨树, 也获得成功。在随后几年中, 美国、英国和中国研究人员相继把 CPT I 基因转入一些重要的经济植物中, 包括苹果和杨树。PI—II 是一类损伤诱导型表达的基因产物, 主要成分是丝氨酸蛋白酶抑制剂。1988 年美国依阿华大学林学系在林木方面首先利用 PI—II 基因, 以根癌农杆菌 Ti 质粒为载体对杨树杂种无性系 NL5339 进行转化, 获得卡那霉素植株。

蛋白酶抑制剂基因在抗性基因工程中突出的优点是抗虫谱广, 对几个目的昆虫均有毒性作用, 而 Bt 基因抗虫谱却十分有限; 其次, 它来自植物本身, 比来源于细菌的转基因产品更易于被公众接受。问题在于, 基因表达量还远远达不到要求, 这给基因工程带来一定的难度。

1.3 其它

淀粉酶抑制剂(aAl)、外源凝集素(Lectin)、几丁质酶(Chitinase)、核糖体失活蛋白(RIP)等基因也是丰富的抗虫基因,在基因工程中发挥作用。Altarbella等把菜豆aAl编码和种子特异性表达的蚕豆植物血凝素基因及其调控区融合在一起,插入到Ti质粒表达载体中转化烟草,发现aAl基因能稳定地表达。在Lectin基因转化方面,Maddock(1990)用基因枪转化玉米胚性悬浮细胞系获得成功,转化的植株对欧洲玉米螟具良好的抗性。此外还成功地将豌豆外源凝集素基因导入烟草和马铃薯,抗蚜虫效果明显。目前,在林木方向未见报道。应当指出,这些工作刚刚开始不久,获得的转基因植株是否对人、畜无害还有待进一步证实。

2 抗病基因工程

林木病原真菌、细菌、病毒常年危害树木,给林业生产带来巨大损失。森林树木高大,山坡陡峭,用化学防治既不便又成本太高,因此最有效的措施还是抗病育种。基因工程给林木抗病育种开辟了新的途径。

2.1 抗病毒基因工程

该项工作在农作物方面有不少报道,但林木抗病毒基因工程还刚刚起步。利用基因工程解决病毒防治,目前有希望的途径有以下几条。

2.1.1 病毒的外壳蛋白基因

1986年Beachy研究小组首次将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因(CP基因)导入烟草,培育出抗TMV的烟草植株,开创了抗病毒育种的新纪元。至今采用这一途径,针对黄瓜花叶病毒(CMV)、苜蓿花叶病毒(ALMV)、马铃薯X病毒(PVX)、马铃薯Y病毒(PVY)、烟草线条病毒(TSV)、烟草脆裂病毒(TRV)、水稻条纹叶枯病毒(RSV)等主要病毒成功地构建出各种抗病毒工程植株。这些植株抗性良好,与室内水平相当,农艺性状与对照无明显差异。显示出外壳蛋白途径在农业生产中的巨大潜力。引起林木病害的许多病毒基因尚未被克隆出来,因而严重地限制了抗病毒基因导入工作。在林木方面,目前英国牛津大学病毒所的研究小组正在克隆杨树花叶病毒(PMV)外壳蛋白基因,来转化杨树,以育成抗性无性系。奥地利的农林大学科研人员把欧洲和整个地中海地区的核果类树的最重要的病毒PPV(洋李痘病毒)的CP基因导入杏。但利用转CP基因仍有一些问题,一是抗性局限于一定程

度只对特异性的病毒产生抗性;二是转基因植株大多只是推迟发病,而不能彻底根治。

2.1.2 病毒复制酶基因

病毒复制酶基因是病毒非结构蛋白基因。它赋予植物相当高的对病毒的抗性,但其作用机理还不十分清楚。把烟草花叶病TMV的病毒复制酶基因导入烟草,结果转基因烟草对TMV表现出绝对高的抗性。国内,中科院微生物所完成了马铃薯Y病毒组中的PRV的复制酶基因的克隆、序列分析及其植物表达载体的构建工作。沈阳农大和中科院微生物所合作,获得转PVY复制酶基因的烟草植株,温室接种表明转基因植物具有抗性。从目前实验来看,病毒复制酶基因所介导的抗性远远强于CP基因介导的抗性。其最大的优点在于即使对转基因植株使用很高浓度的病毒或RNA,抗性仍然明显。但林木病毒病害尚未有该方面的报道。

此外提出和已经应用的途径还有:利用病毒的卫星RNA;利用人工构建的缺损干扰颗粒;利用植物本身编码的抗病毒基因和利用动物中的干扰素基因;利用反义RNA技术;利用中和抗体法技术;设计核酶剪切病毒RNA等。在以上技术途径中,导入CP基因是目前较为成功的一种,而利用病毒的复制酶基因是一种很有前途的方法。

2.2 抗细菌、真菌病害基因工程

抗菌基因工程起步比较晚,也不如抗虫基因工程和抗病毒基因工程进展快。主要是植物与病原菌相互作用的分子基础和抗性基因跟踪分析和分离等一系列工作还不够深入,尤其是树木病害。近些年,可见到一些较成功的报道。日本人率先从烟草野火病菌中分离出解该菌产生毒素的解毒基因,并导入烟草,获得重组植物能降解该菌分泌的毒素,不形成病斑。几丁质酶基因和角质酶基因是目前克隆的抗树木真菌病的两种基因。几丁质酶具有降解几丁质的作用。由于许多病原真菌的细胞壁主要成分之一是几丁质,而植物中还未发现几丁质酶的底物,所以几丁质酶在防御病原真菌侵害中具有重要的作用。1991年Brogie将菜豆几丁质酶基因导入烟草,转基因烟草表达出较高水平的几丁质酶,对立枯丝菌(*Rhizoctonia solani*)和白绢菌(*Sclerotinia rolfsii*)有一定抗性。此后转入玉米和棉花等多种作物获得抗性。美国Hawey研究小组(1989)对创伤反应基因在毛果杨×美洲黑杨无性系中表达进行了研究,发现杨树受到机械损伤后在杨树的上部产生了许多mRNA。这些mRNA的cDNA已被克隆并进行了

序列分析, 其中两个转录了 win6 和 win8 编码几丁质酶, 可降解细菌和真菌的细胞壁。他们将 win6 基因和 Gus 报告基因融合, 构建了在杨树细胞中表达的几丁质酶基因表达系统, 用于抗病基因的遗传转化研究。植保素和木质素在细胞内的积累或在细胞壁上的沉积直接表现为抗病效应, 而它们的生物合成和沉积过程是受多基因控制的, 弄清其生物合成途径, 找出协调多个相互独立的防卫基因的调控基因, 是调控多基因防卫系统, 提高抗病效果的关键。这将是树木抗菌基因工程的重要途径。PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) 是合成木质素单位以及某些植保素的关键酶, 对其基因分析和转移是非常有意义的。德国的 Hain 等从葡萄中分离出植保素 3', 4', 5' - 三羟芪合成酶基因, 并通过农杆菌介导, 首次将外源植保素基因转移到烟草中, 并获得抗性转基因植株。1998 年 Dowd D. F 成功地获得转氧化酶基因的枫香植株, 并得以表达。一般来说, 树木病害大多是多基因抗性, 这给基因工程带来一定难度。其次是大多数树木病害的分子遗传学的机理不十分清楚, 这使该项工作难度加大。无论如何, 只要加强这方面的工作, 特别是寻找抗菌基因, 不仅从植物和病原菌中找, 还可从其他生物中找, 如昆虫体内的杀菌肽基因、牛的溶菌酶基因等多种细菌有抗性, 相信在不久的将来一定能培育出树木抗病原菌的重组植物新品种。

3 问题与展望

林木抗病虫基因工程已经取得令人鼓舞的成绩, 但应该看到还存在许多尚待解决的问题。

3.1 基础研究缺乏: 林木病虫害的研究总体上不如农作物病虫害研究深入, 尤其是分子水平的基础研究。提示植物与有害生物相互作用的分子基础, 是基因工程的必要条件。近几年国外做了一些研究, 取得了可喜的成绩。我国在此基础上克隆了一些已有的抗性基因或改造了抗性基因, 这对我国今后工作起良好的推动作用。今后在做基因工程的同时, 还要重视基础研究, 这样才会有生命力。

3.2 树木的多基因抗性的障碍: 树木的抗病虫遗传机理多数属于多基因控制, 这给树木基因工程带来难度, 其转基因的抗性表达往往不理想。因此, 如何寻找多基因中关键的基因非常重要, 同时也可从寄主以外的材料中寻找抗性基因。寻找林木的抗病虫基因将是长期而艰难的工作。

3.3 林木 Bt 抗虫基因工程中, 昆虫对 Bt 杀虫晶体

蛋白产生抗性问题: 与化学杀虫剂相比虽然昆虫对 Bt 杀虫剂产生的抗性发展缓慢, 但有资料已经证明, 在 Bt 抗虫转基因植株选择压力的条件下, 昆虫将会产生抗性。这是林木抗虫基因工程研究中存在的较为严重的潜在问题。要解决该问题, 需要采取组合 2 个或 2 个以上的非竞争性 Bt 杀虫晶体蛋白基因, 同时或分别导入转基因植物体内。也可将不同杀虫机理的基因组合, 转入植物体内。

3.4 基因转化率低: 转基因的效率受许多因素的影响, 当外源基因转入时, 可能会引起宿主染色体的插入突变。此外, 与操作技术及条件有关, 如组织培养基, 愈伤组织的生长速度, 组织类型及接种方法等等。用于遗传转化的组织培养再生系统, 其外植体的再生频率越高越好。

3.5 转基因的表达: 在有些转基因林木中, 转基因不表达, 或在不同林木中表达强度不一。如转 Bt 毒蛋白基因有的不足杀死害虫, 这一方面可能是表达量低的原因, 另一方面可能是 Bt 杀虫机理的多样性。除 Bt 晶体蛋白外, Bt 芽孢及胞外分泌物也有杀虫作用。

3.6 转基因的扩散问题和带来一些潜在问题: 已有资料证明抗除草剂基因从转基因作物上自然扩散到杂草上, 外源基因的插入是一种随机过程, 定点问题尚未解决, 位置数量可能会影响转基因植物的其他性状。此外, 转基因植物是否会有副作用, 还不知, 如果某种病毒的外壳蛋白能够装配虫传的它种病毒 RNA 的话, 可能会发生危险。

总之, 基因工程为林木抗病虫开辟了一条诱人的新的育种途径。林木生长周期长, 用常规育种方法不仅时间长, 见效慢, 而且可操作性差。应用基因工程进行林木抗病虫育种有其显著的优越性, 它可以大大地缩短育种周期; 又可在基因水平上改造林木抗性遗传物质, 更具科学性和精确性, 提高了育种的目性和可操作性。此外, 还大大地扩大了育种的范围, 打破物种之间的生殖障碍, 实现基因的共同性。所以, 只要我们面对存在的问题, 加大研究投入, 并有效地与常规的林业技术措施相配合, 必将会培育出更多有价值的抗病虫基因工程树木。

参考文献

- [1] 王学聘等 林业科学 1997, 33(1): 69- 74.
- [2] 李强等 世界林业研究 1996, 9(4): 10- 16.
- [3] 陈颖等 林业科学 1995, 31(2): 97- 102.
- [4] 陈颖等 林业科学 1996, 32(3): 274- 276.
- [5] 许农等 南京林业大学学报 1993, 17(1): 78- 82.

- [6] 张绮致等 世界林业研究 1998, 11(1) : 8– 13. 7, 712– 720
- [7] 田颖川等 生物工程学报 1993, 9(4) : 291– 297. [13] Wang GeJiao et al. Transgenic Research. 1996, 5: 5, 289– 301.
- [8] 刘进元等 生物工程进展 1994, 14(2) : 31– 34. [14] Kleiner K. W et al. Environmental Entomology. 1995, 24: 5, 1358– 1364.
- [9] 郑金宝等 河北农业大学学报 1995, 18: 3 20– 25. [15] Shin D. I et al. Canadian Journal of Forest Research. 1994, 24: 10, 2059– 2067.
- [10] Seguin A. et al. Forest Products Biotechnology, 1998, 287– 303.
- [11] Klopfenstein N. B. et al. Can. J. For. Res. , 1991, 21: 1321– 1328. [16] Tian Y. C et al. Agricultura Ricerca. 1993, 15: 146, 22.
- [12] Dowd P. F. et al. Cellular and Molecular Life Sciences. 1998, 54: 87: 2, 164– 172.

Situation and Problems in Genetic Engineering of Tree for Resistance to Pests and Diseases

Zhang Liqin Dong lingen Fang Zhigang
(Zhejiang Forestry College, Linan 311300)

Abstract This paper summarized the current situation and the ways in genetic engineering of tree for resistance to pests, virus, bacteria and fungi. Meanwhile, it found out the problems in this Field.

Key words Tree, Genetic engineering, Resistance, Pest, Disease

(接第 74 页)

- [5] Somia NV, Zoppe M et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92 (16) : 7570. [9] Vile RG, Miller N. Gene Therapy, 1994; 1(5) : 307.
- [6] 赵亚刚等, 国外医学肿瘤学分册, 1999; 26(1) : 24. [10] 曹雪涛, 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997; Dec 4(4) : 251.
- [7] Wagner E, Zatloukal K. et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89 (13) : 6099. [11] 高啸波等, 中外医学遗传学分册, 1999; 22(1) : 9.
- [8] Kanai F. Shiratori Y. et al. Hepatology, 1996; 23(6) : 1359. [12] Kochanek S et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 5731
- [13] Meizhen F et al. Nature Biotechnology, 1997; 15: 866.
- [14] Johnston KM et al. Hum Gene Ther, 1997; 8: 359.
- [15] Fisher KJ et al. Hum Gene Ther, 1996; 7: 2079.

Major Problems and Their Solutions in Current Tumor Gene Therapy

Abstract There are three major problems in the research of current tumor gene therapy. First, only one aim gene is adopted in most gene therapy schemes. Second, being short of transition target, tumor gene therapy is deficient. Third, gene transfer vectors have some defects, such as efficiency, safety, capacity limit etc. The solutions to these problems are combination gene therapy, in vivo gene therapy or targeted gene therapy, and gene transfer vectors reforming.

Key words Tumor gene therapy Combination gene therapy Targeted gene therapy Gene transfer vectors reforming