

8
3
pub

ISSN 1000-9841
CN 23-1227/S

农学、农作物类核心期刊表

序号	刊名	序号	刊名	序号	刊名
1	中国农业科学	9	植物生理学报	17	华北农学报
2	作物学报	10	种子	18	作物品种资源
3	大豆科学	11	遗传学报	19	北京农业大学学报
4	华中农业大学学报	12	福建农业大学学报	20	南京农业大学学报
5	中国油料	13	江苏农学院学报	21	中国麻作
6	杂交水稻	14	遗传	22	棉花学报
7	植物生理学通讯	15	中国水稻科学		
8	植物学报	16	花生科技		

*《中文核心期刊要目总览》第二版 P89

《大豆科学》 季刊 第18卷 第2期 1999年5月出版

编辑出版:《大豆科学》编辑部	SOYBEAN SCIENCE
地址:哈尔滨市学府路386号 (邮政编码:150086)	Business and Editorial Offices at the Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
电话:0451-6668735	(Xuefu Road 368, Harbin, China)
主编:王金陵	Editor-in-Chief: Wang Jingling
主办单位:黑龙江省农业科学院	Oversea Distributed by China International Book Trading Corporation
印刷:哈尔滨新路印刷厂	(GUOJI SHUDIAN)
国内总发行:哈尔滨市邮电局	P. O. Box 399
订购处:全国各地邮电局	Beijing, China
国外发行:中国国际图书贸易总公司 (中国国际书店)北京399信箱	

邮发代号:14-95 国内定价:5.00元 国外代号:Q4162 刊号:ISSN1000-9841 CN23-1227/S

大豆科学

SOYBEAN SCIENCE

第18卷 第3期

Vol.18 No. 3

The Library - UC Berkeley
Received on: 11-03-99
Ta tou ko hsueh = Soybean science

NOT TO BE CIRCULATED UNTIL

NOV 15 1999

1999

ISSN 1000-9841



100-984003

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(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,杀虫效果不理想(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(Goodall 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)杀虫效果最为理想。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—TVU₂₀₂₇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,使昆虫取食后不能演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-Ⅰ)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

* 收稿日期 1997-07-14
Received on July 14, 1997

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片段杂交假说,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,特别适于植物外植体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DNAⅡ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pKT₄B₃C₅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] Hinchee, 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. USA 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

欢迎订阅 2000 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。国内外公开发行,季刊,16开本,每期12万字左右。国内每期订价:5.00元,全年20.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年40美元,国外总发行由中国国际图书贸易总公司,北京399信箱。国外代号Q1462。

《大豆科学》是我国核心期刊,主要刊登有关大豆的遗传育种,品种资源,生理生态,耕作栽培、病、虫、杂草防治,营养施肥及生物技术等方面的科研报告,学术论文,国内、外研究进展评述,研究简报,学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,农业院校师生、国营农场及各级农业技术推广部门的技术人员、干部。

订阅办法:全国各地邮局,如在邮局漏订,可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路368号《大豆科学》编辑部。邮政编码:150086。联系电话:(0451) 6668735。

大豆种粒中总多酚含量的分析方法*

滕冰 吴宗璞

(东北农业大学 哈尔滨 150030)

摘 要

本文报导了一个新的大豆种粒中“总多酚”的分析方法,采用固兰B试剂与以类黄酮化合物为代表的多酚类发生重氮化反应而显红色,在508nm进行色测定。该方法具有简单、快速、灵敏的特点,可用于抗病生理研究。

关键词 大豆;总多酚;类黄酮;固兰B盐

前 言

多酚类物质包括简单的酚类衍生物和类黄酮化合物。这些化合物对于植物的生理学和病理学,次级代谢物质的研究都有重要意义。我们在大豆种粒斑驳发生机理研究中针对大豆感染SMV后类黄酮化合物异常积累的现象通过对大豆种粒中以类黄酮化合物为代表的总多酚进行分析,取得了良好的效果。

由于大豆种粒样品(种皮和子叶)的特殊性,即样品量少,蛋白质含量高,而多酚类物质含量相对较低。因而要求分析方法有较高灵敏度,并且对种粒中所含有的类黄酮化合物及简单酚类都要有正反应,样品量过少给样品制备和纯化过程带来不便并给分析结果带来影响。多酚类化合物的稳定性差,类黄酮化合物的溶解性质都需要分析方法有良好的适用性。从灵敏度的角度考虑我们采用了重氮化比色法,常用的对氨基苯甲酸重氮化比色法和对氨基苯磺酸重氮化比色法存在两个主要的问题:一是使用强碱性试剂使样品不稳定而且对甲醇、乙醇、丙酮等提取用溶剂有正反应;二是样品提取后不能直接进行测定,原因是脂溶性蛋白的沉淀使溶液浑浊影响比色;预先的净化和提供大量样品都有困难。为此,我们通过反复的试验成功地创造了“固兰B盐总多酚比色测定法”。该法结合“类黄酮分析法”在大豆种粒斑驳发生机理的研究中取得了良好的应用效果。固兰B盐比色法还可以用于分析植物抗逆生理中的多酚类物质的变化。故将该方法介绍如下。

1 方法和原理

固兰B盐是一个具有“双端重氮化基团”的试剂,可以和芳香族多酚和黄酮类化合物

* 本课题得到国家自然科学基金资助。

收稿日期 1998-05-14

Received on May 14, 1998