

高效抗虫转基因水稻的研究与开发*

朱 祯

(遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

摘要 植物转基因技术为培育高效抗虫水稻新品种开辟了新的途径。豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因是一种广谱抗虫基因,该成果采用最新研究策略,对该基因进行体外修饰,使其转译产物最终定位于细胞的内质网中,以增加外源抗虫物质的稳定性。实验证明,转修饰cpti 基因的植物无论是抗虫蛋白含量还是抗虫能力均比转野生型cpti 基因植物有显著的提高。已获大量转基因水稻株系,包括著名水稻恢复系明恢 81 和明恢 86,并用其配制了杂交组合。转基因抗虫杂交水稻已获国家有关部门批准进行中间试验和环境释放,大田试验结果表明,转基因杂交水稻具有优良的抗虫特性和广阔的应用前景。

关键词 抗虫水稻,植物基因工程,豇豆胰蛋白酶抑制剂基因,基因修饰,细胞内定位

水稻是世界主要粮食作物,全球约有 25 亿人以稻米为主食,仅我国就有 8 亿人。联合国粮农组织统计表明,1999 年我国水稻播种面积占世界的 20.6%,名列世界第二,稻谷总产量为 19 848 万吨,占粮食产量的 39%^[1]。水稻也是受虫害侵袭最为严重的粮食作物,据不完全统计,我国每年因虫害造成的损失占水稻总产量的 5% 以上。通过化学杀虫剂控制水稻害虫,不仅生产成本低,且造成生态环境的恶化,同时对人畜也产生严重危害。因此,发展新型高效、低毒的农药和培育具有抗虫能力的水稻新品种是控制水稻害虫的重要途径。

1 抗虫转基因水稻研究进展及存在的问题

转基因农作物的应用正迅猛发展,2000 年全球转基因作物的种植面积达到了 4 420 万公顷^[2],我国也有 6 种转基因作物被批准进行商品化生产^[3]。但是到目前为止,尚未见到有关转基因水稻进入商品化生产的报道。其主要原因是水稻转基因技术有一定难度且水稻是第三世界国家的粮食作物,发

达国家并未把其作为研究重点。目前对抗虫水稻进行研究的主要国家是中国、印度、美国、日本、菲律宾和泰国。

来源于苏云金芽孢杆菌的 Bt 毒蛋白基因是目前应用最为广泛的抗虫基因,转 Bt 毒蛋白基因棉花、玉米已获成功运用。现已发现有 60 多种类型的 Bt 毒蛋白基因,每一种毒蛋白只能针对少数害虫。水稻的害虫种类繁多,仅我国就有 600 种以上。这些水稻害虫地域分布广,种间差异大,只有培育广谱抗虫转基因水稻才能有效地应用于水稻生产。

来源于豇豆的豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因(cpti)是另一个有应用潜力的抗虫基因。CpTI 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,有很广的抗虫谱,对大部分鳞翅目和部分鞘翅目害虫(见表 1)都有作用。CpTI 安全性较高,被人或牲畜食用后可被胃蛋白酶降解。研究表明,CpTI 对饲喂大鼠无不良影响,另外,CpTI 来源于可食用蔬菜豇豆,与来源细菌的抗虫基因相比,更容易被消费者接受。

* 收稿日期:2001 年 5 月 13 日

表 CpTI 的抗虫谱

昆虫名称(拉丁文)	中文名	危害作物
Lepidoptera	鳞翅目	
Heliothis virescens	美洲烟草夜蛾	烟草、棉花
H. zea	玉米穗蛾	玉米、棉花、菜豆、烟草
H. armigera	棉铃虫	棉花、玉米、菜豆、高粱
Spodoptera littoralis	粘虫	玉米、水稻、棉花、烟草
Chilo partellus	玉米禾螟	玉米、高粱、甘蔗、水稻
Manduca sexta	烟草天蛾	烟草等
Coleoptera	鞘翅目	
Anthonomus grandis	棉铃象甲	棉花
Diabrotica undecimpunctata	玉米根甲	玉米
Callosobruchus maculatus	豇豆象	豇豆、大豆
tribolium confusum	杂拟谷盗	面粉等
Costelytra zelandica	草蓂螬	三叶草、杂草

转 *cpti* 基因植株最早在 1987 年获得^[4], 它表现出一定的抗虫能力。本实验室也曾将 *cpti* 基因导入烟草^[5]、水稻^[6]、棉花^[7] 等作物, 虽表现出良好的抗虫能力, 但可能是由于转基因植株中外源 CpTI 蛋白的积累量没有达到强烈抑制害虫的浓度, 因此, 缺乏整个生长期的全程抗性, 不能广泛应用于生物技术育种实践^[8]。

2 提高抗虫转基因农作物抗虫性的新策略

2.1 提高外源抗虫蛋白含量的有效方法

外源基因导入植物细胞并整合到寄主基因组内后, 其表达过程将要涉及到基因的转录、转录后加工、转译、转译后加工等步骤, 细胞通过对这些阶段进行调控以控制基因的表达方式和表达水平。

基因转录的调控方式主要取决于基因 5' 端的调控序列, 使用强启动子和增强子可有效地提高外源基因的转录水平, 是转基因研究中使用最为普遍的一种方式。通过增加转译增强序列, 如来源于 TMV 病毒的 Ω 因子, 可有效地提高外源基因的转译水平^[9]。根据植物细胞对遗传密码的偏爱性, 在不改变氨基酸序列的情况下, 改变外源基因的密码子, 亦可使外源基因表达显著提高^[10]。*cpti* 基因来

源于植物, 不存在密码子偏爱性问题, 我们对上述其它策略均进行了大量试验, 然而均未取得预期的结果。显然, 要获得优异的抗虫转基因植株, 需采用新的研究策略。

2.2 提高 CpTI 在转基因植株中含量的新策略

转基因植物抗虫性直接与抗虫物质的含量成正相关性, 而抗虫物质的含量又与转录、转译速率成正比, 与降解速度成反比。因此, 除有效增加转基因的表达量外, 增加外源抗虫物质在植物细胞内的稳定性是提高其积累水平的一条有效途径。

CpTI 蛋白作为一种胞浆蛋白, 定位于豇豆种子储藏细胞的胞浆中^[11], 当 *cpti* 基因作为外源基因在植物营养生长组织的细胞中表达时, 其表达产物受细胞中大量蛋白酶的作用而降解, 造成外源蛋白积累量的减少^[12]。要提高 *cpti* 基因表达产物在转基因植株中的稳定性, 关键是如何避免 CpTI 免遭降解, 从而延长 CpTI 蛋白的半寿期, 最终达到提高其积累量的目的。改变外源 CpTI 蛋白的细胞内定位位置, 将其从细胞代谢活跃部位转移至代谢惰性部位, 可实现上述目标。

Gunter Blobel 提出的“信号肽假说”为改变蛋白在细胞内的定位方式提供了理论依据。该假说认

为新生多肽的定位方式取决于蕴含其中的一段特殊的氨基酸序列。大量后续研究证明该理论的正确性,为此 Gunter Blobel 获 1999 年度诺贝尔生理及医学奖。

同时,滞留在内质网内的蛋白的 C 端多含有由 KDEL 或 HDEL 序列组成的内质网滞留信号,该信号是新生蛋白滞留于内质网的必要和充分条件^{[13],[14]}。如 CpTI 蛋白分子被引入细胞内相对惰性的细胞器内质网,并在内质网滞留信号的作用下滞留于内质网或内质网衍生的蛋白体中,有可能提高 CpTI 蛋白在宿主细胞中的稳定性和积累水平。

3 sck 融合基因的获得及模式植物的转化

在这种策略的指导下,本研究对野生 *cpti* 基因进行了修饰,通过本实验室独创的三引物 PCR(TP-PCR)方法在基因的 5' 末端和 3' 末端分别融合了来源于大豆胰蛋白酶抑制剂(SKTI)的信号肽和内质网定位信号 KDEL 的编码序列,得到融合基因 *Signal-cpti-KDEL*(*sck* 基因),其编码的蛋白应具有定位于内质网表达并滞留于内质网的特性。

为了验证 SCK 蛋白在转基因植物中的表达和积累效果,首先将 *sck* 基因转化植物烟草模式。实验表明 *sck* 基因转基因烟草与未修饰的 *cpti* 转基因烟草相比,外源蛋白的含量有明显的提高。抗虫实验的结果也表明转 *sck* 基因烟草在抗虫性方面比转 *cpti* 基因烟草有明显的改善(见封三)。

4 sck 基因的水稻转化及鉴定

4.1 水稻转化

根据转基因烟草所取得的结果,构建了一个适合水稻转化的载体。用基因枪法将携带 *sck* 基因和筛选标记基因的植物表达载体转入水稻的胚性愈伤中,在抗性条件下初步筛选出阳性植株,并通过 PCR、Southern、ELISA 等分子生物学方法检测外源基因的整合和表达情况,进一步筛选得到转 *sck* 基因水稻植株。对获得的转基因水稻植株分别在实验室试验、中间试验和环境释放三个阶段进行了检测和试验(第四阶段商品化生产正在申请之中),主要检测其 CpTI 蛋白含量、抗虫效果、农艺性状及生产安全性等。

4.2 实验室内鉴定

通过测定转基因水稻胰蛋白酶抑制剂活性表明,在转 *sck* 基因水稻植株中的胰蛋白酶的活性比转 *cpti* 基因水稻植株中胰蛋白酶的活性平均高 2 倍,个别单株高出 4 倍之多。用大螟作为攻击害虫对部分转 *sck* 基因水稻进行抗虫性测定,结果表明,转 *sck* 基因水稻对受试害虫有明显的作用,致死率在 60%—72.2% 之间。

4.3 大田鉴定

1998 年,转 *sck* 基因水稻获国家农业部的批准进入环境释放阶段,田间试验同样表现出良好的抗虫特性(见封三)。对转 *sck* 基因水稻植株的田间测试已连续进行了 3 年。在 1998 年试验中统计转基因植株、对照植株的敏感分蘖及白穗数目发现,转 *sck* 基因水稻植株敏感分蘖数仅占 5.74%,白穗率仅为 1.21%,而对照分别高达 67.41% 和 25.45%(见封三)。在 2000 年田间释放中,螟虫大发生,虫口密度高,在不喷洒化学杀虫剂,转 *sck* 基因水稻植株表现出对大螟,二化螟等害虫良好的抗性,而对照非转化植株在这些虫害的攻击下,多数都变成了枯草(见封三)。

4.4 农艺性状鉴定及杂交组合配制

在中间试验和环境释放中,结合抗虫性对转 *sck* 基因水稻进行农艺性状选择,1999 年获得一批综合性状表现优良的纯合转 *sck* 基因水稻恢复系。其中以明恢 81 和明恢 86 为转化材料的转 *sck* 基因水稻在抗虫性和农艺性状方面表现尤为突出。明恢 81 和明恢 86 是近年培育的优良恢复系,具有取代明恢 63 的趋势。田间对比试验显示转 *sck* 基因的明恢 81 和明恢 86 在株叶态、生育期和经济性状等方面与未转化受体亲本基本一致。

利用获得的优良转基因恢复系进行了杂交组合的配制,获得科丰 1 号和科丰 2 号杂交组合,并于 2000 春季在海南完成了小区制种。上述杂交组合已参加福建省 2000 年度的中、晚稻区试,并在国家“863”计划支持下进入的中试。

4.5 动物安全性鉴定

在环境释放过程中,我们还对转 *sck* 水稻进行

了安全性检测实验。通过检测转基因水稻稻米中 CpTI 活性发现, 尽管转修饰的 *cpTi* 基因在水稻植株中进行了高效的表达, 但在稻米中, 转基因 *cpTi* 水稻与非转化对照植株蛋白酶抑制剂活性并无差异。

初步的动物安全性实验数据表明, 转基因水稻稻米饲喂的小鼠生长状况良好, 与食用非转基因稻米小鼠在体重增长状况、微核频率以及精子畸形率等方面均无明显的差异。说明用转 *sck* 基因水稻稻米饲喂小鼠没有引起亚急性及亚慢性毒性反应, 也没有引起小鼠微核异常或精子畸形的致畸作用。初步证明转 *sck* 水稻对人畜是安全的。这与 Gatehouse^[15]、Newmark^[16] 及 Pusztai^[17] 的结果吻合。

5 其它进展

sck 基因已申请国家专利, 已应用于棉花、玉米以及叶菜类蔬菜等粮食和经济作物的抗虫研究中。其中转 *sck* 基因叶菜类蔬菜的研究获对外经济贸易合作部科学技术进步奖二等奖。

为进一步提高转基因水稻的安全性, 我们已经开始研制无选择标记基因的转化体系。通过构建带外源基因与选择标记基因位于不同 T-DNA 区的超级载体转化水稻以获得只带有抗虫基因的转基因水稻株系。同时为避免外源基因失活, 展开了基因失活机理的基础研究, 并利用核基质结合区序列构建植物表达载体提高外源基因表达的稳定性^[18]。新型抗虫基因的分离也在进行之中。

基于抗虫转基因水稻技术, 2000 年本课题组与中国最大的上市种业公司“合肥丰乐种业股份有限公司”联合成立了“中科丰乐生物技术有限责任公司”, 进一步对抗虫水稻及其它转基因抗虫作物进行研究和开发。

在上述工作的基础上, 与袁隆平、谢华安、周开达等国内著名水稻育种学家合作, 在福建、四川、湖南和广西等地对现有抗虫转基因水稻进行评价和新组合的研制, 同时充分利用其育种方面的优势培育高产优质的抗虫转基因水稻新品种。

1998 年以来, 国际上对转基因作物的安全性发生了激烈争论, 反对者主要是一些欧洲农产品进口国和环保组织。虽然大部分从事生物工程和农业科学的科学家在大量理论和实践数据的基础上指

出转基因作物具有可靠的安全性, 但要使大部分消费者接受转基因作物和食品还需要更多的实验证据。考虑到上述原因, 我们今后对转 *sck* 基因水稻的研究工作将重点放在安全性的评价上。在转基因水稻对环境生态、非目标生物的以及对人畜的影响上进行大量的安全性评估实验。

致谢 本研究得到国家“863”计划、国家“863”中试项目、国家转基因专项、国家自然科学基金以及美国洛氏基金资助; 大田试验照片由福建农业科学院福建省农业遗传工程重点实验室提供, 在此致谢。

参考文献

- 1 国家统计局.《中国统计摘要——2000》.北京:中国统计出版社,2000,98.
- 2 James C. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs NO. 21. New York: Ithaca, 2000.
- 3 范云六, 张春义. 迎接 21 世纪农作物生物技术的挑战. 生物技术通报, 1999, 15: 1—6.
- 4 Hilder V A et al. A novel mechanism of resistance engineered into tobacco. Nature, 1987, 300: 160—164.
- 5 刘春明, 朱祯, 周兆澜等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得. 科学通报, 1992, 18: 1 694—1 697.
- 6 安韩冰, 朱祯, 李慧芬等. 基因枪法转化水稻(*Oryza sativa* L.) 获得可育的转抗虫基因水稻再生植株. 高技术通讯, 2001(接收).
- 7 李燕娥, 朱祯, 陈志贤等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂转基因棉花的获得. 棉花学报, 1998, 10(5): 237—243.
- 8 Santos M O, Adang M J, All J N et al. Testing transgenes for insect resistance using *Arabidopsis*. Molecular Breeding, 1997, 3: 183—194.
- 9 Gallie D R, Sleat D E, Watts J W et al. The 5'—leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. Nucleic Acids Research, 1987, 15: 3 257—3 273.
- 10 Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A et al. Insect Resis-

- tant Cotton Plants. *Bio/Technology*, 1990, 8: 939—943.
- 11 Hilder V A, Barker R F, Samour R A et al. Protein and cDNA sequences of Browmar Birk protease inhibitors from the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Plant Molecular Biology*, 1989, 13: 701—710.
- 12 Higgins T J V, Spencer D. The expression of a chimeric cauliflower mosaic virus (CaMV35S)-pea vicilin gene in tobacco. *Plant Sci.*, 1991, 74: 89—98.
- 13 Munro S, Pelham H R B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 1987, 48: 988—997.
- 14 Pelham H R, Hardwick K G, Lewis M J. Sorting of soluble ER proteins in yeast *The EMBO Journal*, 1988, 7: 1 757—1 762.
- 15 Gatehouse A M R, Hilder V A. Introduction of genes conferring insect resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*. Lavenham: Lavenham Press, 1988, 1 245.
- 16 Newmark P. Trypsin inhibitor confers pest resistance. *Bio/Technology*, 1987, 5: 426.
- 17 Pusztai A, Grant G, Brown D J et al. Nutritional evaluation of the trypsin (EC 3. 4. 21. 4) inhibitor from cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Br. J. Nutr.*, 1992, 68(3): 783—791.
- 18 李旭刚, 朱祯, 徐军望等. 核基质结合区在转基因烟草中提高报导基因的表达水平. *高技术通*, 2000, 10(9): 9—13.

Research and Development of Highly Insect-resistant Transgenic Rice

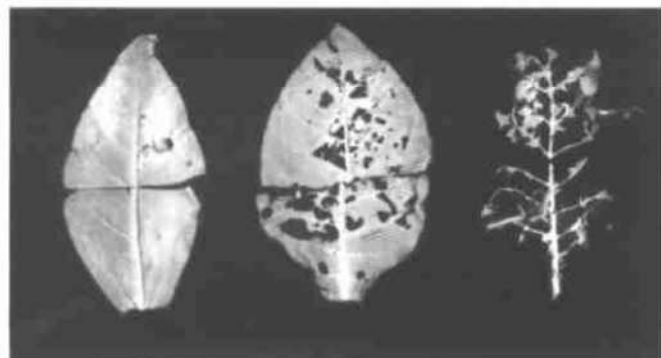
Zhu Zhen

(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Beijing 100101)

Plant biotechnology provide a new way to breed insect resistant rice. Cowpea trypsin inhibitor (cpti) gene is an insecticidal gene with wide range spectrum of insect-resistance. A novel strategy was employed in this research by modifying cpti gene in vitro. The translation product of modified cpti gene (sck gene) could be sorted in endoplasmic reticulum (ER) and protein body derived from ER and therefore increase foreign insecticidal protein stability in transgenic plant cell. Experiments result shows that both the accumulation of CpTI protein and insect resistant ability of sck transgenic plants increased greatly. Up to now, several types of transgenic rice line, include the excellent restorers Minghui81 and Minghui86, were attained and the hybridized combination have been made. Performance trial had shown that the transgenic rice had excellent insecticidal attribute and retain their eminent agronomic trait.

朱 祯 男, 中国科学院生命科学与生物技术局副局长, 研究员, 博士生导师。1983 年获北京大学理学硕士学位。1985 年—1988 年在美国学习, 1988 年获原中国科学院遗传研究所博士学位。1988 年—1991 年在美国从事博士后研究。曾任原遗传研究所副所长。主要从事植物分子生物学及植物基因工程领域的研究, 主持国家“973”项目、“863”项目、国家转基因植物研究与产业化专项、总理基金项目、国家自然科学基金项目、中国科学院重大项目、美国洛克菲勒基金会、中国-希腊国际合作项目等有关项目的研究工作。发表学术论文 100 余篇, 合作完成学术专著 6 部。

遗传与发育生物学研究所 在基因研究等方面取得新进展



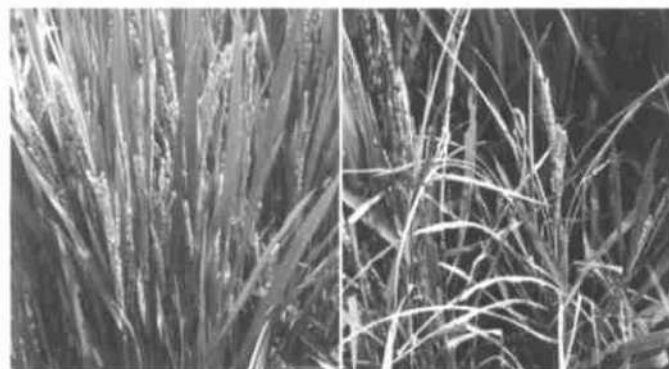
▲转修饰后 CpTI 基因烟草对棉铃虫的抑制情况

转 sck 基因烟草 (左); 转未修饰 cpII 基因烟草 (中); 非转化植株对照 (右)



▲转 sck 基因水稻植株

高抗性转基因植株 (左)、中等抗性转基因植株 (中) 及对照植株 (右) 在大田不施用杀虫剂条件下受二化螟攻击的状况



▲转 sck 水稻 T₁ 代田间实验



▲转 sck 基因水稻大田环境释放

在完全不施用杀虫剂条件下, 转基因水稻生长正常 (绿色部分), 对照完全死亡 (外围枯黄部分)



▲培养罐生产马铃薯脱毒苗



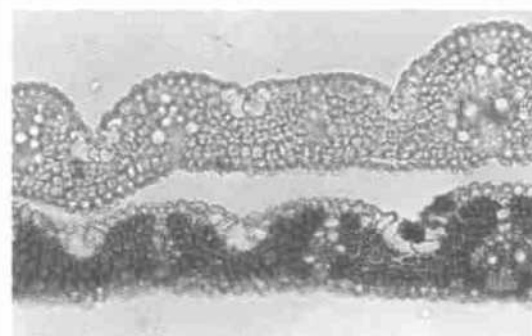
▲培养罐中生产微型薯



▲具有不同细胞特异性表达启动子在转基因水稻中的表达情况
微管组织特异性表达启动子 (左)



叶肉细胞特异性表达启动子 (右)



▲alk 基因开关系统在转基因水稻中的表达情况