

基因工程在甜菜育种中的研究现状

李玉萍 (甘肃省农科院啤酒原料研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 基因工程作为一种最有效的现代作物育种方式, 已在多种作物中得到广泛应用。甜菜转基因研究起步较晚, 但取得的成绩显著。从抗病、抗虫、抗除草剂及品质改良等领域综述了基因工程在甜菜育种方面的研究成果及进展。

关键词: 甜菜; 基因工程; 育种

中图分类号: S566.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1631 (2009) 02-0055-03

Research Status of Genetic Engineering on Beet Breeding

LI Yu-ping (Beer Material Institute, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730070, China)

Abstract: As a most effective modern crop breeding method, genetic engineering had been applied in many crops. Studies on beet gene transferred started relatively late, yet the achievements were outstanding. The research results and progress of the application of genetic engineering on beet breeding, including disease resistance, insect-resistant, herbicide resistance and quality improvement and so on.

Key words: Beet; Gene engineering; Breeding

甜菜是世界 2 大糖料作物之一, 是重要的经济作物, 主要在北温带种植。我国是世界甜菜种植大国之一, 1998 年以前, 年种植面积 60 万 ~ 75 万 hm^2 , 甜菜产量 1200 万 ~ 1600 万 t, 产糖 120 万 ~ 150 万 t。2000 年以后, 甜菜生产虽大幅度下滑, 但年种植面积仍达 30.8 万 hm^2 , 产糖约 66.16 万 t/a。

基因工程是现代生物工程技术中最活跃、发展最快, 在植物育种中应用最广、前景最好的研究方式。甜菜为 2 a 生作物, 传统方法选育新品种不仅耗时长, 而且其基因来源只存在于同种或个别同属植物体中, 杂交后基因的转移是个体中整体基因的转移、整合, 育种效率较低。基因工程操作的只是单个或极个别基因, 其基因来源可以是各种植物、细菌、真菌、病毒, 甚至是动物以及人工合成的基因, 范围极大地扩展, 目的性更明确, 准确性和效率更高。继 1988 年首批转基因植物 (烟草和马铃薯) 问世以来, 截至 2001 年, 国外批准商业化应用的各种转基因植物产品已达 90 余种^[1]。在 1996 ~ 2000 年的 5 a 内, 全球转基因作物的商品化种植面积增长了 25 倍, 2000 年底全球转基因作物种植面积达到 4421 万 hm^2 。

我国大约在 20 世纪 90 年代中后期开始进行甜菜转基因的研究^[2], 虽然起步较晚, 但取得的成绩是显著的, 主要集中在抗病毒、抗虫、抗除草剂及提高碳水化合物品质等方面。

1 甜菜抗病基因工程

甜菜抗病基因工程主要集中在抗丛根病和根腐病的研究上。甜菜丛根病是由甜菜多粘菌 (*Polymyxa beate*) 传播甜菜坏死黄脉病毒 (beet necrotic yellow vein virus, BNYYV) 所致的一种毁灭性土传病害^[3]。抗病育种是对付该病唯一有效的途径, 但也只能引起基因重组而不能创新。植物基因工程的应用在很大程度上弥补了常规育种引入基因的缺陷, 并可创造出新基因。最初的抗性基因是在美国霍利糖业公司的育种品系中发现的, 叫做 Holly 基因, 现改称 *Rz1* 基因, 已被广泛应用于世界各地的甜菜育种中^[4]。*Rz1* 的分子标记物与基因结合很密切, 检测标记物即知植株中是否存在抗性基因, 在试验室中几个小时即可完成检测。后来又发现其他的抗丛根病基因约十余种, 但目前还只有 *Rz1* 开发出分子标记物。Kallerhoff 等^[5]将甜菜细胞和根癌农杆菌共培养, 导入 *npt*、*gus* 和 *cp*, 从未转化和转化表达外壳蛋白悬浮细胞中分离出原生质体, 接种 BNYYV, 结果表明在转导的原生质体中, 病毒受到限制。Ehlers 等用 PCR 技术扩增了 *cp* 基因, 以发根农杆菌转化甜菜组织, 得到了根毛中表达 *cp* 基因的转基因甜菜植株。Marie 等^[6]通过根癌农杆菌法导入 *npt*、*bar* 和 *cp*, 转基因株温室测定病毒含量降低, 大田试验进一步证实上述结果; BNYYV *cp* 导入后转基因植株中的甜菜土著病毒 BSBV 水平与 BNYYV *cp* 无相关关系^[6]。姚华建等^[7,8]克隆了 BNYYV 外壳蛋白基因, 并通过农杆菌介导转入甜菜下胚轴, 得到了转基因再生植株。李大伟等首次将 BNYYV 基因组中控制介体传毒和病毒离子装配的 54 kD 片段基因单独克隆出来, 并将 75 kD 蛋白基因及其 54 kD 片段分别克

收稿日期: 2008-12-26

作者简介: 李玉萍 (1974 -), 女, 甘肃静宁人, 助理研究员, 硕士, 主要从事特种经济作物的育种及栽培工作。

隆到 pJW2 上, 构建了 2 个原核表达载体。将 75 kD 蛋白基因及其 54 kD 片段分别导入双元中间载体 pB II21, 构建出植物表达载体。此外, 还构建了 1 个在 CaMV35S 启动子分别控制下的双基因植物表达载体 pBC54。将以上各植物表达载体分别导入农杆菌 LBA4404 中, 并以下胚轴和叶柄为外植体对甜菜进行遗传转化, 获得了 54 kD 基因片段的转基因抗性甜菜芽。李大伟^[9]还将 BNYVV 75 kD 通读蛋白基因及其缺失突变体 - Ac 和 54 kD 片段分别克隆到双元载体 pB II21 上, 构建了 3 个植物表达载体 pBDW5、pBDW - Ac 和 pBGW9, 并将它们导入土壤农杆菌 LBA4404 中, 以含 pBDW5 和 pBGW9 的农杆菌转化甜菜, 获得了抗卡那霉素的再生甜菜植株。目的基因在再生植株中的表达检测正在进行之中。李大伟等^[10]还研究了 BNYVV 5 个 RNA 组分与病毒致病性的关系, 发现 RNA1 和 RNA2 是 BNYVV 侵染所必需的, RNA3 是甜菜丛根病症状形成的决定因子, RNA4 控制 *P. betae* 传播 BNYVV 的效率, RNA3 和 RNA5 在介体传毒和致病过程中与 RNA4 具有协同效应。刘巧红等^[11]采用含有 BNYVV *cp* 基因的农杆菌, 分别以不同甜菜品系的叶柄、下胚轴及子叶为外植体材料进行基因转化研究。结果表明, 含有 BNYVV *cp* 基因和卡那霉素抗性筛选基因 *Kan* 的农杆菌与甜菜组织不同外植体共同培养后, 经过诱导分化培养, 在含有卡那霉素的培养基上, 从叶柄和下胚轴直接诱导出抗卡那霉素再生芽, 而从子叶上只诱导出紧密型绿色愈伤组织。将通过农杆菌介导转入甜菜不同品系的叶柄、下胚轴及子叶中, 得到抗卡那霉素的再生植株及自交种子, 并进行了抗病性的室内鉴定。郝秀英等^[12]根据植物发育的分子遗传学理论筛选到一种不依赖基因型、高频率再生、易重复、简单快速及周期短的组织培养体系, 并利用农杆菌介导法将甜菜坏死黄脉病毒基因导入新疆甜菜品种 (系), 获得转基因植株, 建立了新疆主栽甜菜品种 (系) 基因转化和再生体系。刘升学等^[13]利用 RT-PCR 技术对 12 个采自新疆不同地区的甜菜 BNYVV 分离物进行比较研究, 结果表明不同地区的 BNYVV 分离物含有不同的 RNA 组分。徐伟丽等^[14]对徐德昌等^[15]用农杆菌介导法所获的转基因甜菜植株的第 3 代植株进行检测, 发现经过 3 代的培养, 基本可以确定所检测的甜菜为可稳定遗传的转基因甜菜。

甜菜抗根腐病基因工程方面, 吴旭红^[16]对甜菜高抗品种及其后代采用 BSA 和 RAPD 法进行分析, 获得了与甜菜抗根腐病基因连锁的 RAPD 标记, 并进一步将其转化为更快捷、容易检测的 ISSR 标记, 可以用于甜菜杂种幼苗根腐病基因的 DNA 分子标记鉴定。

2 甜菜抗虫基因工程

在诸多甜菜害虫中抗甜菜夜蛾转基因研究已经取得进展。20 世纪 80 年代, Schnepf 等^[17]首次成功地克隆

了 1 个编码 Bt 杀虫晶体蛋白基因, 并且经修饰的毒素基因最早在烟草和番茄中表达, 率先获得了基因工程抗虫植株, 揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕。随后 Bt 基因相继被导入许多种作物, 包括棉花、水稻、马铃薯、玉米和油菜等, 并得到表达, 有多例表达修饰 Bt 基因的作物进入田间试验, 有些作物已进行商品化。Bt 基因对于甜菜夜蛾同样具有较好的防治效果, 其主要表现为 Bt 中所表达的杀虫蛋白可直接对甜菜夜蛾起作用。甜菜抗虫转基因研究即是利用转基因技术将 Bt 基因导入甜菜中获得转基因植株^[18]。日本甜菜协会一直进行 Bt 基因导入甜菜、开发抗甘蓝夜蛾的材料研究, 已将 2 个基因整合到甜菜野生种中, 使该基因的功能得以在甜菜中充分发挥, 育成了日本第 1 例甜菜基因重组植株。另外, 已成功地从 Bt 菌中分离出对甘蓝夜蛾具有高效杀伤力的基因, 并进行了甜菜导入试验。日本北海道大学的岛本义也等通过农杆菌介导法, 以卡那霉素耐性基因 (*npt*) 为选择标记, 以 Bt 的 *cryA (b)* 基因为目的基因构建的质粒 P_{IA}B_{TI} 导入甜菜自交系 NK150 和 TK80 中, 将在含卡那霉素选择培养基上获得的 35 个个体与 I_{Ab}s5 和 I_{Ab}s3 为引物的 PCR 产物进行 Southern 杂交, 结果有 14 个个体获得了与正调节同样大小的信号。用确认导入 *cryA (b)* 基因的 5 个个体叶片和阴性对照个体叶片饲喂 3 龄甘蓝夜蛾幼虫, 结果 2 个个体的幼虫体重降低, 幼虫死亡率 0% ~ 40%, 如采用 1 ~ 2 龄或刚孵化的幼虫饲喂, 则死亡率会提高。确认在导入 *cryA (b)* 基因的甜菜中, 其杀虫活性得到高效表达。之后岛本义也等为获得杀虫效果更高的甜菜材料, 采用上述方法和材料, 将杀虫效果更高的 *cryIC* 基因导入甜菜中, 对经过含卡那霉素培养基筛选的 24 株甜菜用 PCR-Southern 杂交法对目的基因进行检测, 结果有 10 株得到了与正调控同样大小的信号, 用这 10 株甜菜个体叶片及阴性对照个体叶片饲喂甘蓝夜蛾幼虫, 观察其生长情况, 结果发现在 5 株上甘蓝夜蛾幼虫生长迟缓, 1 株体重降低。最近, 日本学者又对导入 Bt 基因甜菜杀虫效果的差异进行研究。用已经检测导入 *cryA (b)* 基因及 *cryIC* 基因的甜菜叶片饲喂甘蓝夜蛾幼虫, 以未导入 Bt 基因的甜菜叶片为阴性对照, 7 d 后统计各群的体重变化及死亡数。结果表明, *cryIC* 基因比 *cryA (b)* 基因杀虫效果更高。陈中义等从约 2 000 质粒 DNA 文库转化子和 400 个染色体文库转化子中筛选获得了 *cry1Aa*、*cry2Ab*、*cry1Ca* 和未知基因 *cryX* 的阳性克隆, 将这些质粒分别导入 Bt 无晶体突变株 C_{ry}B, 经 SDS-PAGE 分析表明, 只有 *cry1Ca* 表达了约 130 kD 杀虫晶体, *cry1Ca* 对甜菜夜蛾具有高毒力, 7 d 校正死亡率为 100%。

3 甜菜抗除草剂基因工程

20 世纪 90 年代初开始抗除草剂作物研究受到广泛



的关注, 迄今已培育出多种抗除草剂作物, 甜菜抗除草剂研究也已取得进展。Halluin以松脆型愈伤组织为材料导入 *pat* (提供除草剂 Basta的活性成分膦化麦黄酮) 和 *als* (提供绿黄隆抗性), 转基因甜菜在温室或田间表现出对草铵膦和氨基磺酰脲类的抗性。Maric等^[19]将 *epsps* (提供草甘膦抗性)、*gas*、*npt* 导入甜菜, 结果证实不同转化株间对农达存在差异。目前, 利用基因工程手段已经获得对几种主要除草剂 (如草甘膦) 抗性的转基因甜菜。

4 甜菜品质改良基因工程

基因工程技术已被成功地应用于食物中多种碳水化合物组分的修饰改造^[20]。例如, 果聚糖是一类有益于人类健康的可溶性碳水化合物, 是由果糖形成的聚合物链, 普通食物中果聚糖的含量一般较低, 只在菊芋等少数几种植物中的含量很高。现在, 生产商主要利用生化技术合成果聚糖, 或者从菊苣和洋姜之类的植物中分离果聚糖。由于生产成本较高, 从植物中提取的量又少, 所以果聚糖的庞大市场一直未能打开。

甜菜可大量生产蔗糖。为此, 科学家们就将洋姜内可生产果聚糖的基因移植到甜菜上, 希望能利用甜菜高效的生产机能制造出果聚糖。荷兰的科学工作者已将果聚糖合成中的关键酶 (1-SST) 及相关的基因分离出来, 并且已利用基因工程技术将 1-SST基因转移到甜菜中。该基因可将甜菜中的蔗糖分子转变为果聚糖分子, 从而培育出可生产低热糖的转基因甜菜。经过这样转基因处理的甜菜, 可将 90%的蔗糖转化为长度只有 2~4个果糖单位的短果聚糖分子, 而这正是生产低热量甜味剂的理想长度。

5 展望

甜菜基因工程方兴未艾。一方面可以借助各种分子生物学手段来克隆甜菜本身所具有的与高产、优质、抗病等有关的基因; 另一方面可以借助组织培养等细胞生物学方法和介导遗传转化等分子生物学手段, 将同源或异源基因、抗病虫基因、抗除草剂基因、抗菌肽等转入甜菜体内来获得可遗传的转化植株。然而, 与其他植物转基因研究相比, 甜菜研究有诸多困难, 如甜菜基因高度杂合, 组织培养以及影响介导转化的因素等问题。

因此, 如何降低基因型重复性及内源激素平衡等复杂因素对组织培养的影响, 建立甜菜的高频再生体系, 筛选甜菜本身所具有的优良基因, 构建高效表达载体等将成为该领域的主要内容。

参考文献:

[1] 黄传杰. 植物基因工程技术在病虫害防治中的应用与展望 [J]. 安徽农业科学, 2001, 29 (3): 320 - 324.

- [2] 崔杰. 甜菜生物技术发展现状与未来思考 [J]. 中国甜菜糖业, 2003, (2): 26 - 29.
- [3] 吴永英, 史淑芝, 王立群, 等. 甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 研究进展 [J]. 中国甜菜糖业, 2005, (4): 32 - 34.
- [4] 张喜林. 抗真菌病害基因工程在甜菜抗病育种中的应用 [J]. 中国甜菜糖业, 2002, (2): 12 - 15.
- [5] Kallerhoff J. Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts [J]. Plant cell Rep, 1990, (9): 224 - 228.
- [6] Marie M. Reduced titer of BNYVV on transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein [J]. Euphytica, 1996, (90): 293 - 299.
- [7] 姚建华, 李大伟, 于嘉林, 等. 甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因的克隆 [J]. 生物工程学报, 1993, 9 (2): 147 - 151.
- [8] 姚建华, 李大伟, 于嘉林, 等. 甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白在甜菜转基因植株中的表达 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(4): 440 - 442.
- [9] 李大伟. 甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 75 kDa通读蛋白基因及其 54 kDa片段的克隆与表达 [J]. 植物病理学报, 1997, (27): 92 - 93.
- [10] 李大伟, 于嘉林, 韩成贵, 等. 中国甜菜坏死脉病毒 RNA5的检测及其核苷酸序列分析 [J]. 生物工程学报, 1999, 15 (4): 461 - 465.
- [11] 刘巧红, 孔凡江, 于歆, 等. 基因工程方法抗甜菜丛根病病毒育种的研究 [J]. 中国甜菜糖业, 2000, (2): 1 - 4.
- [12] 郝秀英, 于嘉林, 王燕飞, 等. 新疆甜菜品种 (系) 基因转化和再生体系的建立 [J]. 中国糖料, 2002, (4): 5 - 7.
- [13] 刘升学, 黄家风, 向本春, 等. 新疆甜菜坏死黄脉病毒分离物的症状反应及核酸组分分析 [J]. 中国糖料, 2002, (3): 12 - 16.
- [14] 徐伟丽, 徐德昌, 刘巧红. 第三代转基因甜菜植株的检测 [J]. 中国甜菜糖业, 2006, (1): 22 - 23.
- [15] 徐德昌, 刘巧红, 江莉萍, 等. 甜菜转基因植株抗性表现及种子获得 [J]. 中国甜菜糖业, 2002, (4): 3 - 11.
- [16] 吴旭红. 甜菜抗根腐病基因 ISSR分子标记的初步研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报, 2005, (2): 30 - 32.
- [17] Schnepf H E, Whiteley H R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichiacoli* [J]. Proc Natl Acad Sci, 1981, (78): 2893 - 2897.
- [18] 崔杰, 李滨胜. 抗虫基因及甜菜抗虫转基因研究现状 [J]. 中国甜菜糖业, 2004, (1): 38 - 42.
- [19] Maric B K. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate [J]. Euphytica, 1997, (94): 83 - 91.
- [20] 邓小莉. 转基因植物品质育种的内容和策略 [J]. 平原大学学报, 2001, (3): 16 - 18.