

转基因抗虫棉研究进展、问题及对策

谢德意

(河南省农科院经济作物研究所, 郑州 450002)

为解决棉铃虫给棉花生产造成巨大为害这一世界性难题,从 20 世纪 80 年代开始,国内外相继开展了转基因抗虫棉的研究,到目前为止,美国、澳大利亚、中国等转基因抗虫棉已在生产中应用,转基因抗虫棉的研究取得了重大进展。

1 转基因抗虫棉研究进展

转基因抗虫棉研究中常用的外源抗虫基因有苏云金芽孢杆菌〔WT 5 B X〕(*Bacillus thuringiensis*) 毒素蛋白基因简称 Bt 基因、蛋白酶抑制基因、淀粉酶抑制基因、外源凝集素基因、几丁质酶基因、蝎毒素基因等,目前人们已成功地将 Bt 基因和豇豆胰蛋白酶抑制基因(Cowpea Trypsin Inhibitor Gene 简称 CPTI 基因)分别或同时导入到棉花植株内,获得了抗虫性强且能稳定遗传的转基因植株。苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,在芽孢形成过程中产生的伴胞晶体被称为 2 内毒素或杀虫晶体蛋白(ICP, Insecticidal Crystal protein)。它可毒杀鳞翅目、双翅目和鞘翅目等的昆虫,是目前世界上应用最为广泛的生物杀虫剂。据统计已有 60 多种 Bt 基因被报道,根据它们的杀虫范围和基因序列的同源性的不同又可大致分为六大类,即 CryI、Cry₂、Cry₃、Cry₄、Cry₉ 和 Cyt,每一类中又包含有不同的亚类,前五类称为晶体蛋白基因家族(Crystal Protein Codon Gene),而第六类称为细胞外溶解性晶体蛋白基因(Cytolytic Protein Codon Gene)。典型的 ICP 为 130kb 左右,由两部分构成即 N 端的活性片段和 C 端的结构片段。带有结构片段的 ICP 被称为原毒素,它经过蛋白酶的消化作用后,产生有活性的毒性肽。

1981 年, Schnepf 和 Whiteley 等首次从苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*) 中分离并克隆了 Bt 基因。美国 Agrocetus 公司克隆了与 2-内毒素有关的片段,利用农杆菌介导法首次将其导入棉花中,使棉株能形成自身的杀虫蛋白。1988 年,美国 Monsanto 公司获得经改造后 Bt 基因的转基因棉花,1989 年温室鉴定杀虫效果良好,1990~1992 年大田试验结果表明,Bt 转基因棉花在治虫和不治虫两种情况下,皮棉产量均高于对照。1995 年正式申请并通过美国环保局的批准登记,首批发放的 2 个品种为 NuCOTN33B 和 NuCOTN35B,1996 年正式开始大面积商品化种植。1998 年将 BXN 基因与 Bt 基因同时转入一个品种中,得到了既抗虫又抗除草剂的棉花品种,1999 年得到了双价转基因抗虫棉,预计到 2002 年前后,转基因抗棉铃虫、象鼻虫的棉花可望发放种植。到目前美国国内抗虫棉种植面积大约有 100 万公顷,而且岱字棉公司已在世界上十多个主产棉国推广种植其转基因棉花,包括中国、澳大利亚、南非、津巴布韦、墨西哥和印度等。

我国抗虫基因工程棉花品种的培育起步较晚,但发展很快。1990 年,范云六等从苏云金芽孢杆菌亚种 aizawai7—29 和 *kurstaki*HD—1 中分离克隆出了 Bt 基因。1991 年,谢道昕等首次报道将 Bt 毒素基因通过花粉管途径导入我国棉花品种,其后代在实验室内虽具有一定的抗虫性,但抗虫性差,不足以致死害虫。范云六、郭三堆等对 Bt 基因进行了改造,获得了具有自主知识产权的抗虫性强的 Bt 基因。随后,中国农科院生物工程中心、中国农科院棉花研究所、山西省棉花研究所、江苏农科院经作所等单位将这些改造后的 Bt 基因导入到我国自育品种中棉所 12 号、中棉所 16、晋棉 7 号、泗棉 2 号、泗棉 3 号等中,获得了我国第一批转基因棉花。到目前为止,我国共选育抗虫棉品种(系)52 个,其中 21 个通过了安全性评价,12 个通过审定。在这 52 个品种(系)中,又有 7 个抗虫杂交棉,3 个双价转基因抗虫棉。此外,河北省、安徽省还分别与美国岱字棉公司成立了合资公司,引进其转基因抗虫棉 7 个。据统计,1999 年我国抗虫棉种植总面积约 60 万公顷。

2 转基因抗虫棉存在的问题

推广种植转基因抗虫棉能够减少田间治虫的用药次数和用药量，减轻对环境和水资源的污染，同时能提高植棉的比较效益，但目前的转基因抗虫棉本身还存在不少问题，主要表现在以下几方面：

2.1 转基因抗虫棉抗性持久性问题

目前已获得的尤其是生产上推广应用的转基因抗虫棉大多为转 Bt 基因，且均为单一基因。自从人们广泛应用化学杀虫剂以来，昆虫对含氯、含烃、含有机磷的化学杀虫剂、氨基甲酸酯以及菊酯类的杀虫剂都产生了抗性。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，但早在 1985 年 McGanghey 就证明了印度谷螟 (*Plocia interpune tella*) 在选择压的条件下繁殖 15 代后，对 Bt 杀虫剂的抗性增加 90~100 倍，对纯 Bt 杀虫剂 HD—1 产生了 6 倍抗性。目前世界上有不少地区都已经发现了对 Bt 抗虫植物产生抗性的害虫，棉花是世界上广为种植的重要经济作物，一旦棉铃虫对 Bt 产生抗性，人们历经长时间花费成百上千万元培育出的转基因抗虫棉瞬间就会失去价值。不仅如此，还会因为 Bt 抗虫棉的失效，而造成 Bt 生物农药的失效，其经济损失和社会损失都是不可估量的。

2.2 转基因抗虫棉抗虫的时空性问题

转基因抗虫棉的抗虫时空性包括两个方面，一是指棉株不同的发育时期转基因抗虫棉对棉铃虫的抗性不同，二是指棉株的不同部位、不同器官的抗虫能力也不同。大量的研究表明，Bt 棉的抗虫性随着棉株生育期进展而降低，即表现出抗虫棉苗期抗虫性强，花铃期抗虫性弱。华北地区，棉铃虫主要以第二、三、四代为害棉花，其盛发期分别是 6、7、8 月下旬，而这三时期分别是棉花现蕾、盛花、花铃期，生产中棉铃虫为害严重的时期也正处于后期，即棉田第三、四代棉铃虫发生期。而抗虫棉又恰在这时抗虫性下降，因此，抗虫棉在生长后期仍需要进行药物防治。对棉株不同组织抗虫性的研究表明，棉株营养组织的抗虫性较繁殖组织要强，即叶>蕾>铃>花。其中以花蕊的抗性最弱，棉田中的幼虫多在花蕊中找到。

2.3 抗虫范围狭窄，抗虫强度差

世界上各产棉国培育开发的抗虫棉绝大多数为转 Bt 基因棉，转 Bt 基因抗虫棉仅对棉铃虫、红铃虫等少数鳞翅目昆虫产生抗性。而为害棉田的害虫极多，转 Bt 抗虫棉对其它大多数害虫如棉蚜、红蜘蛛等都没有抗性。此外，转基因抗虫棉仅对低龄幼虫抗性较强，而对高龄棉铃虫效果不明显。同时，随着生育期进展，转基因抗虫棉后期的抗虫能力不断下降，还需要化学防治。因而，目前推广和应用的转基因抗虫棉还不能从根本上解决棉花害虫为害问题。

2.4 转基因抗虫棉的安全性问题

世界上许多国家对基因工程技术的研究开发利用都是非常慎重的，管理也是非常严格的，并制定了相关的法律法规。例如不少西欧国家对其转基因水果、蔬菜及其它转基因食品在其销售时强制实行与同类非转基因食品分开放置，并要有转基因食品的有关标识和说明等。我国也出台了《基因工程安全管理办法》以加强规范基因工程方面研究的管理。转基因抗虫棉的开发利用一方面向我们展示了良好的前景，同时也应该看到推广利用转基因抗虫棉也存在重大安全隐患。首先是当前生产上推广的转基因抗虫棉一般都是单价转 Bt 基因的，现在已发现有不少对 Bt 产生抗性的害虫。其次是现有的抗虫棉仅对棉铃虫、红铃虫等鳞翅目害虫产生抗性，对其它棉田害虫不产生抗性，不仅如此，现有研究表明，抗虫棉棉田其它害虫的种群丰度还有增大的趋势，如果因使用抗虫棉而造成别的害虫的大暴发则又会引发新的问题。第三是抗虫棉的棉子及棉子加工后的棉油、棉子蛋白、棉饼是重要的蛋白质来源和精饲料，人食和饲喂动物后，对人和动物是否产生影响，产生怎样的影响，这方面的研究还基本上是空白，加强这方面的研究将有利于对转基因抗虫棉的安全性作出科学全面的评价。

3 提高转基因抗虫棉的抗虫性和抗性持久性的对策

3.1 培育转多基因抗虫棉

在高强度的 Bt 选择压力下，一般经过 17 代后，棉铃虫就会对 Bt 产生抗性。有研究表明，单价基因抗虫棉产生抗性个体的机率为 10^{-6} ，而双价基因抗虫棉则为 10^{-12} 。目前已发现的抗虫基因除常用的 Bt 基因、CPTI 基因外，还有淀粉酶抑制剂基因、外源凝集素基因、几丁质酶基因、蝎毒素基因、脂肪氧化酶基因等，随着技术的发展，还会发现新的抗虫基因。如果将两类或多类不同的抗虫基因同时导入同一棉株中，那么无疑会进一步提高转基因棉花的抗虫范围和抗虫能力，延缓害虫对其产生抗性。

3.2 寻找和筛选广谱抗虫基因

棉田害虫极多，除棉铃虫外，还有棉叶螨、象鼻虫、棉蚜、红铃虫、红蜘蛛等，现有的转基因抗虫棉一般只对棉铃虫有毒害作用，不能防治其它害虫，为了不致减产，棉田还需要用药。要想彻底保护生态环境，就需要积极寻找筛选广谱性的抗虫基因，使转入一种基因能抗多种害虫，从而达到少用药和不用药的目的。目前人们普遍认为比较适合的这类基因是豇豆蛋白酶抑制剂基因(即 CPTI 基因)，但由于其表达量不够而使其获得的转化株抗虫性较差，要使其真正应用于育种实践，还需要进一步的研究。

3.3 采用特异启动子和诱导表达启动子

转基因抗虫棉抗虫性存在明显的时空性，即不同的生育期抗性不同，表现为前期抗虫强，后期减弱；不同的组织器官抗虫性也不同，一般是叶>铃>蕾>花。而且抗虫基因在棉株体内的表达是不可调控的。目前用于棉花等作物转化的启动子均为 CaMV25S，该启动子在棉株的不同生长时期和不同的部位均能表达，这样就降低了棉株体内杀虫物质的浓度，影响了杀虫效果。如果改用具有特异表达功能的启动子，控制抗虫基因只在特定部位如蕾、花、铃中和特定时期主要在棉花生长的中后期高效表达，就能大大提高抗虫效果。诱导表达启动子的特点是带有该启动子的植株只有在遭到害虫危害时才会高效表达，这样当害虫侵害棉花后，在损伤部位瞬时合成大量杀虫物质以杀死害虫，从而达到防治的目的。

3.4 加强抗虫棉种植管理，改善棉田生态环境

为预防和延缓棉铃虫对 Bt 基因产生抗性，一般采用在转基因抗虫棉种植区设置非转 Bt 基因棉“庇护所”(Refuge)，同时严格禁止在转 Bt 基因抗虫棉种植区内种植别的转 Bt 基因作物，如转 Bt 基因玉米等。此外，由于对一种毒素产生抗性的害虫不一定对另一种毒素蛋白产生抗性，因而，可以将转不同 Bt 亚种的 Bt 基因棉以及转其它抗虫基因的棉花品种相邻种植，并定期进行品种轮换，这样也可延缓和避免害虫对转基因抗虫棉产生稳定的抗性变异或新的生物类型。

3.5 严格进行转基因抗虫棉的安全性评价

在明确界定转基因抗虫棉知识产权情况下，在批准商品化应用之前，严格对转基因抗虫棉抗虫效果的时空动态、害虫防治配套措施、抗性治理方案等进行必要的审查，同时加强抗虫棉深加工产品人食和饲养动物的安全性评价研究，以便对转基因抗虫棉作出科学全面的安全性评价。(《中国棉花》2001.02)