



抗虫活性物质的研究与应用前景

刘 勇*, 倪汉祥, 孙京瑞

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 本文试从抗虫活性物质的种类、作用机理、及基因调控3个方面作一概述, 为作物抗虫育种提供理论依据。

关键词: 抗虫活性物质; 作用机理; 调控基因

中图分类号: S 433.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-1542(2000)05-0029-03

抗虫活性物质的研究是从事植物抗虫机理和抗虫植物特别是转基因抗虫植物研究的基础。自然界中, 植物、动物和微生物中存在着相当丰富的抗虫活性物质资源。目前研究的抗虫活性物质主要有3大类: 植物源抗虫活性物质(糖类、类萜、生物碱、类黄酮、酚类、氨基酸、凝集素、类凝集素、蛋白酶抑制剂、 α -淀粉酶抑制剂、几丁质酶、脂肪氧化酶、色氨酸脱羧酶、阴离子过氧化物酶), 动物源抗虫活性物质(昆虫几丁质酶、蛋白酶抑制剂、毒素、昆虫激素及有关代谢酶)和微生物源抗虫活性物质(Bt内毒素蛋白、蜡状芽孢杆菌营养期杀虫蛋白、细菌次生代谢物、真菌有关活性酶、昆虫病毒)。植物源抗虫活性物质种类较多, 研究较早; 微生物源抗虫活性物质研究较深入; 动物源抗虫活性物质的研究有待进一步强化。

1 抗虫活性物质的杀虫机理

抗虫活性物质的杀虫特性, 一般可分为3类。一是直接杀死害虫, 如Bt等; 二是使植物本身营养状况下降, 使害虫生育期延长, 遭受天敌攻击机会增多, 生殖力下降; 三是可以产生抑制昆虫营养成分吸收的化学物质。下面就目前研究较多的几类杀虫活性物质Bt内毒素蛋白、蛋白酶抑制剂、淀粉酶抑制剂和植物外源凝集素概述如下:

1.1 Bt内毒素蛋白

Bt内毒素蛋白在伴孢晶体内是以原毒素形式存在, 昆虫摄食后, 在其肠道内经蛋白酶水解, 转变为较小的毒性多肽分子, 再与敏感昆虫中肠上皮细胞表面的特异受体相互作用, 诱导细胞膜产生一些非特异性小孔, 扰乱细胞的渗透平衡, 并引起细胞肿胀甚至裂解, 昆虫停止取食, 最终死亡。

1.2 蛋白酶抑制剂

大多数植物贮藏器官(种子和块茎)中所含各种蛋白酶抑制剂可达总蛋白的1%~10%, 甚至高达30%。其杀虫机理可能在于它与昆虫消化道内的蛋白酶相互作用, 形成酶抑制复合物(EI)。EI能阻断或减弱消化酶的蛋白水解作用, 从而影响昆虫对食物蛋白的正常消化; 但更重要的是EI能刺激消化酶的过量分泌, 耗尽必需的氨基酸, 最终导致昆虫非正常发育或死亡; 除此之外, 它还可能影响昆虫体内水份平衡、昆虫蜕皮和酶活力调节等^[1]。迄今为止, 在植物中发现的蛋白酶抑制剂有丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂、天门冬氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂4类, 其中丝氨酸蛋白酶抑制剂与抗虫关系最为密切, 因为大多数昆虫(如大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目及某些鞘翅目昆虫)都是利用丝氨酸蛋白酶, 尤其是类胰蛋白酶, 消化利用食物蛋白的。目前最引人注目的是豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)、马铃薯蛋白酶抑制剂II(PI-II), 巯基蛋白酶抑制剂其次, 它仅与大部分鞘翅目昆虫尤其是仓储害虫有关。以水稻巯基蛋白酶抑制剂(OC)的研究为最多, 而金属蛋白酶抑制剂目前研究甚少, 且多对昆虫生长发育无明显不良影响。

豇豆胰蛋白酶抑制剂在豇豆和其它豆类种子成熟时大量积累。成熟的豇豆胰蛋白酶抑制剂是由80个氨基酸组成的小分子多肽, 富含二硫键, 具2个抑制活性中心, 可同时竞争抑制2个胰蛋白酶分子。豇豆胰蛋白酶抑制剂杀虫谱广, 对鳞翅目、鞘翅目、直翅目昆虫均表现强毒性, 其中直接来自豇豆的毒性较强。如转CpTI基因的水稻的螟虫危害白穗率平均为22%, 而对照则高达97%^[1]。其转基因烟

草不但能阻止烟芽夜蛾取食,对美洲棉铃虫也具有一定的抗性。马铃薯蛋白酶抑制剂Ⅱ是马铃薯受害虫攻击或机械损伤时在叶片组织中诱导形成的。当转基因烟草叶片中PI-Ⅱ可溶性总蛋白的含量等于或高于50 $\mu\text{g/g}$ 时,烟草天蛾取食后生长严重受阻,当含量达100 $\mu\text{g/g}$ 时,烟草天蛾部分死亡。另外,含转PI-Ⅱ基因水稻螟虫危害白穗率平均为16%~40%,而对照高达85%^[1]。巯基蛋白酶抑制剂广泛存在于水稻、马铃薯、豇豆、玉米等多种植物中,但其中研究最多的系水稻巯基蛋白酶抑制剂,其对禾谷类鞘翅目仓库害虫抗虫效果非常显著。转OC-1基因杨树,能大大提高其对欧洲黑杨叶甲 *Chrysomela tremulae* 的抗性。

1.3 淀粉酶抑制剂

α -淀粉酶抑制剂(α -AI)在植物界中普遍存在,尤其在禾谷类和豆科作物中含量更为丰富。它能抑制哺乳动物和昆虫体内的 α -淀粉酶活性,而对植物本身的 α -淀粉酶不起作用。其杀虫机理在于它能抑制昆虫消化道内的 α -淀粉酶活性,使淀粉无法正常消化,阻断了昆虫的主要能量来源。同时淀粉酶抑制剂和 α -淀粉酶结合形成EI复合物,也会刺激昆虫消化酶过量分泌,通过神经系统反馈,使昆虫厌食,最后导致昆虫非正常发育或死亡。转菜豆 α -AI基因的豌豆能免受豌豆象、绿豆象和四纹豆象的危害。转 α -AI的绿豆,则能免受绿豆象、四纹豆象和鹰嘴豆象的危害。鉴于淀粉酶抑制剂对哺乳动物的淀粉酶有抑制作用,故它们的应用尚须慎重。

1.4 植物外源凝集素

植物外源凝集素(Lectin)是非免疫来源的糖蛋白或结合糖的蛋白质,能使细胞聚集或沉淀糖蛋白。它们在植物各种组织器官中均有发生,尤以豆科植物的种子中含量最为丰富,占可溶性蛋白的10%。目前已查明来自不同植物的多种凝集素对同翅目、鞘翅目、鳞翅目和双翅目昆虫有毒性^[2]。其杀虫机理在于它特异性地结合到昆虫消化道围食膜的几丁质或上皮细胞的糖缀合物或糖基化的消化酶上,影响营养物质的正常吸收,同时还可能促进消化道内的细菌繁殖,抑制昆虫生长发育,但真正的杀虫机理尚不明。目前研究较多的有麦胚凝集素(WGA)、雪花莲凝集素(GNA)、半夏外源凝集素(PTA)和豌豆外源凝集素(P-lec)。如来自大麦的WGA可使玉米切根甲的生长速率下降40%;以0.1%(W/V)WGA处理鳞翅目幼虫,可使其体重至少下降50%;以同样浓度处理褐飞虱,可使其死亡率接近80%;

以2 mmol/L浓度处理双翅目幼虫,幼虫生长量下降50%,以25 mmol/L处理,幼虫死亡率达100%;GNA饲喂褐飞虱实验表明,GNA毒力比WGA强,褐飞虱吸食0.1%(W/V)GNA后,其蜜露排泄量比对照下降95%,GNA浓度为0.01%~0.1%(W/V)时,对褐飞虱发育有显著的抑制作用,而且成虫不能羽化^[3]。桃蚜取食转GNA基因的马铃薯后,每雌日产仔数4.1~4.2头,而对照为5.4头;PTA粗提液饲喂实验表明,饲喂84 h后,对棉蚜成蚜的致死率为70%,产仔率也明显下降^[4];P-lec 0.2%~1.5%(W/V)浓度范围内可使马铃薯叶甲存活率降低,生长发育受阻。饲喂实验还表明,P-lec也能抑制豇豆象的生长。

2 抗虫活性物质的基因及转化利用

目前植物抗虫基因工程仅能利用受单基因调控的蛋白或酶类抗虫活性物质的基因。但这些基因是否可选择用于转基因抗虫植物的培育,一般需满足下列条件:(1)杀虫蛋白对靶标害虫毒力较高,要求其基因在转基因植物表达产生的杀虫蛋白的活性浓度低于0.01 g/L即可致死靶标害虫,否则毒力欠佳。同时还要求杀虫蛋白对人畜和植物本身安全无害。(2)杀虫蛋白基因结构要求适于在植物体内转录和翻译表达,否则须作一定修饰改造。如Bt内毒素蛋白基因中A+T碱基含量较高,在植物体内表达效果不佳,此时须人工修饰加工,以提高G+C碱基比例。(3)对于通过改变植物中昆虫营养物质比例而起作用的杀虫物质,必须明确植物本身是否含有杀虫活性物质。

2.1 Bt内毒素蛋白基因及利用

目前对抗虫活性物质基因的研究最深入的是Bt内毒素蛋白基因。Schnepf和Whiteley(1981)^[5]首次克隆得到HD-1内毒素基因,并于1985年完成了核苷酸序列分析后。Hofte和Whiteley于1989年又对42个Bt内毒素蛋白基因的核苷酸序列进行了比较分析,并将已克隆的基因分为4大类 *cryI*、*cryII*、*cryIII* 和 *cryIV* 和14个亚类^[6]。其中 *cryI* 类基因表达的内毒素蛋白特异地对鳞翅目昆虫表现毒性, *cryII* 鳞翅目和双翅目昆虫表现毒性, *cryIII* 和 *cryIV* 分别特异地对鞘翅目和双翅目昆虫表现毒性。目前Bt内毒素蛋白家族已有140多个基因被描述,最近又被分为24个主要组^[7]。现已获得的转基因Bt内毒素蛋白基因的抗虫植物已近60种,除深为大家熟知的Bt棉、Bt玉米外,Bt水稻、Bt马铃薯等的研究也渐趋成熟。如ghareyaxie等(1997)获

得的转 *Cry I Ab* 基因的水稻,抗性鉴定表明,转基因水稻植株经人工接虫处理后,无任何枯心或白穗产生^[8]。

2.2 蛋白酶抑制剂基因及利用

至于其它研究较多的抗虫活性物质,如马铃薯蛋白酶抑制剂 II,其基因序列内有一个 117bp 的内含子,开放阅读框编码 153 个氨基酸的前体肽,成熟肽为 123 个氨基酸,成熟肽单体分子量 12.3 KDa,有两个活性中心。水稻巯基蛋白酶抑制剂,目前已克隆出了该抑制剂的 cDNA,其基因序列中含有 2 个内含子,编码 102 个氨基酸的小肽,分子量约为 11.5 KDa。小麦和大麦中已有多种 α -淀粉酶抑制剂基因或 cDNA 被克隆,菜豆中也研究得十分详细^[9-12]。转蛋白酶抑制剂基因的植物目前至少已达 20 种,主要有烟草、马铃薯、水稻、棉花、番茄、苜蓿、杨树等,其靶标害虫主要是鳞翅目、鞘翅目和同翅目昆虫,所转基因主要是 CpTI 及 PI-II 基因,转 OC 基因研究较少。

2.3 植物外源凝集素基因及利用

豌豆外源凝集素基因不含有内含子,单拷贝。雪花凝集素蛋白是每个亚基为 12.5 KDa 的四聚体,其基因是被认为在培育抗刺吸式口器害虫转基因作物中最有利用前景的一类^[3]。对半夏外源凝集素目前国内已构建出了 cDNA 文库,并正克隆出我国特有的半夏外源凝集素基因^[13]。目前已获得的转凝集素基因的抗虫植物至少有 14 种,主要有玉米、马铃薯、烟草、油菜、水稻、番茄等,靶标害虫主要是鳞翅目和同翅目昆虫。

对于植物次生物质,由于其与多基因控制有关,目前尚无利用研究。如生氰葡萄糖苷的合成至少需受 4 个基因调控;硫代葡萄糖苷约需 6 个基因等^[14]。尽管如此,在充分了解这些次生物质生物合成途径的相关催化酶以及合成、转运与贮藏位点的基础上,可运用基因工程手段将其用于转基因抗虫作物的培育中还是大有潜力的。目前关于植物萜类代谢生物工程方法及其存在问题已有研究文章^[15]。据预测,到 2010 年后,即可运用基因工程手段把植物次生物质用于抗虫育种中。

参考文献:

- [1] Schuler T H, Poppy G M, Kerry B R, *et al.* Insect resistant transgenic plants[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16: 168-175.
- [2] Gatehouse A M R, Gatehouse J A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops[J]. Pestic Sci, 1998, 52:165-175.
- [3] Powell K S, Gatehouse A M R, Hilder V A, *et al.* Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphae stages of *Nilaparvata lugens* [J]. Entomol Exp Appl, 1995, 75: 51-59.
- [4] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, *et al.* Expression of anowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids[J]. Transgenic Res, 1995, 4: 18-25.
- [5] Schnepf H E, Whiteley H R. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci, 1981, 78: 2893-2897.
- [6] Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiol Rev, 1989, 53: 242-255.
- [7] Crickmore N, Ziegler D R, Feitelson J, *et al.* Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998b, 62: 807-813.
- [8] Ghareyazie B, Alinia F, Menguito C A, *et al.* Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *Cry I A(b)* gene[J]. Mol Breed, 1997, 3:401-414.
- [9] Carbonero P, Royo J, Diaz I, *et al.* Cereal inhibitors of insect hydrolases: genetic control, transgenic expression and insect tests[J]. Cent Reunions Int Sobre Biol, 1993, 10:71.
- [10] Shade R E, Schrapowder H E, Pueyo J J, *et al.* Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles[J]. Bio/technology, 1994, 12:793-796.
- [11] Schroeder H E, Gollasch S, Moore A, *et al.* Bean α -amylase inhibitor confers resistance to pea weevil in transgenic peas[J]. Plant Physiol, 1995, 107:1233-1239.
- [12] Ishimoto M, Sato T, Chrispeels M J, *et al.* Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α amylase inhibitors of common bean[J]. Entomol Exp Appl, 1996, 79:309-315.
- [13] 王志斌,李学勇,郭三堆. 植物凝集素与抗虫基因工程. 生物技术通报, 1998, (2):5-10.
- [14] Chilton S. Genetic engineering of plants secondary metabolism for insect protection. In: Carozzi N, Koziel M eds. Advances in insect control: the role of transgenic plants[M]. London: Taylor & Francis Press, 1997. 237-263.
- [15] McCaskill D, Croteau R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16:349-355.