

转基因棉对棉铃虫幼虫生长及 中肠蛋白酶活性的影响

刘贤进 余向阳 王冬兰 张存政 王 跃

(江苏省农业科学院植物保护研究所,南京 210014)

摘要: 室内测定了转慈姑蛋白酶抑制素(API)基因棉对棉铃虫幼虫的抗虫活性及对中肠蛋白酶活性的影响。结果表明,以转基因棉饲养棉铃虫,对幼虫拒食率24h达76.49%,72h达80.57%,试虫体重在取食48h后显著下降,72h后较对照低54.04%。试虫取食转API基因棉后,中肠的强碱性胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性显著降低,取食24、48h后的强碱性胰蛋白酶活性分别只有对照组的68.11%和55.89%;类胰蛋白酶活性分别为对照组的85.87%和64.61%;对弱碱性类胰蛋白酶活性不明显。显示转API基因棉对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶的抑制作用与对棉铃虫生长发育的阻滞有良好的相关性。

关键词: 转慈姑蛋白酶抑制素基因棉; 棉铃虫; 中肠蛋白酶

利用转基因技术培育抗虫作物为防治农业害虫提供了新途径。特别是在当前,由于长期大量使用化学杀虫剂而造成农产品残留、生态破坏、环境污染和害虫产生抗药性,转基因抗虫作物的研究倍受青睐。在植物抗虫基因工程中使用最广泛的是苏云金杆菌毒素蛋白。培育转蛋白酶抑制素(protease inhibitor)基因植株是抗虫基因工程的另一个重要领域,与转Bt基因相比,这种转基因植物的优点在于其抗虫谱广,昆虫不易产生耐受性,但不足之处是杀虫活性较低,基因需要大量表达才能产生明显的抑虫或杀虫效果^[1]。另外,对生物的选择也不及Bt毒素。

从慈姑球块中分离的慈姑蛋白酶抑制素(arrowhead protease inhibitor,或API)能抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、激肽释放酶、强性蛋白酶、Lys-C肽酶^[2~5],是我国学者首先发现的重要抗虫育种资源。棉铃虫幼虫中肠中含有多种蛋白酶是慈姑蛋白酶抑制素的重要靶标。目前已通过转基因技术培育出对棉铃虫生长有高抑制活性的转基因株系。为了阐明转API基因棉的作用机制,笔者就转API基因棉对棉铃虫幼虫生长的影响及对中肠蛋白酶活性的抑制作用进行了研究。

基金项目:国家自然科学基金(30070507)

作者简介:刘贤进(1963-),男,研究员,主要从事农药毒理及农药环境副效应评价工作(E-mail:jaasliu@jaas.ac.cn)

收稿日期:2002-09-09

1 材料与方法

1.1 试验材料 试虫为室内人工饲养转基因的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner), 试验时采用生长整齐的4龄幼虫。供试转基因棉由本院经济作物研究所提供。试验中所用P-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)、 α -N-苯甲酰-D,L-精氨酸-P-硝基苯胺(BAPNA)、N-苯甲酰酪氨酸乙酯(BTEE)和Tris等试剂均为Sigma公司产品。

1.2 转基因棉对棉铃虫生长发育抑制作用测定 田间采回抗虫棉棉叶,剪成1cm×1cm的小叶片制成叶碟,参照赵善欢^[6]等1985的方法进行测定,24、48和72h后观察转基因棉对棉铃虫取食量的影响,计算拒食率,并记录每条虫的体重,以比较抗虫棉对棉铃虫生长发育的影响。同时分别定时抽取试虫,供中肠蛋白酶活性测定之用。

1.3 棉铃虫中肠酶液的提取 取供试幼虫在0~4℃的冰台上解剖,用预冷的0.15mol/L的NaCl溶液冲去体液,截取中肠去除内容物。测试前用0.15mol/L的NaCl溶液在冰浴中匀浆,匀浆液在4℃下,15000r/min离心15min,取上清液作为测试用的中肠酶液。

1.4 酶活性测定 蛋白酶活性均在30℃、最适pH下使用UV-721型分光光度计测定,所用方法参照Campbell^[3]等和王琛柱等^[7]方法。弱碱性类胰蛋白酶活性测定以P-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)为底物,在加入0.1mol/L HCl的0.1mol/L Tris缓冲液中测定,pH 8.0。TAME以2mmol/L溶于0.15mol/L NaCl溶液中。测定时,取TAME溶液0.5ml加入0.5ml含中肠酶液的缓冲液中,在247nm下测OD值。强碱性类胰蛋白酶活力以 α -N-苯甲酰-DL-精氨酸-P-硝基苯胺(BAPNA)为底物,在含4%的二甲基亚砷的甘氨酸(0.2mol/L)-NaOH(0.2mol/L)缓冲溶液中测定,pH 10.5。BAPNA以20mg/ml溶于二甲基亚砷,测定时,取BAPNA溶液40 μ l加入含1.5ml中肠酶液的缓冲液中,后加入0.5ml 30%(V/V)乙酸,终止反应,在405nm下测OD值。类胰凝乳蛋白酶活力测定以N-苯甲酰酪氨酸乙酯(BTEE)为底物,在Tris-HCl缓冲溶液中测定,pH 8.5。BTEE以1mmol/L溶于含10%(V/V)甲醇的0.15mol/L NaCl溶液中,测定时,取该溶液0.5ml加入0.5ml含中肠酶的缓冲液中,在256nm下测OD值。以固定时间(15min)反应混合物的OD值变化作为酶活力单位,以对照组测定的酶活力单位作为100,计算处理组的相对酶活力。

2 结果与分析

2.1 转API基因棉对棉铃虫的取食和生长发育的影响

转API基因棉对棉铃虫的取食有明显的抑制作用,饲喂24、48、72h拒食率分别为76.49%、77.97%和80.57%。取食转API基因棉对棉铃虫生长发育也有明显的抑制作用,而且时间越长,试虫体重与对照组差别越明显。取食72h后测定,对照组试虫单头体重较处理前增加74.07%,而处理组减轻了21.74%(表1)。从表1可以看出:转API基因棉可以迅速抑制棉铃虫幼虫取食,并导致生长发育受阻,但并未致死。

2.2 转API基因棉对棉铃虫中肠强碱性类胰蛋白酶活性的影响

取食转API基因棉后24、48、72h的棉铃虫中肠强碱性类胰蛋白酶活性的测定结果见表2。从表2可以看出,棉铃虫取食转API基因棉后,中肠强碱性类胰蛋白酶活性受到抑

表1 转API基因棉对棉铃虫取食和生长的影响

Table 1 Influence of API-transgenic cotton plant on feeding and growth of larvae of *H. armigera*

取食时间 Time of feeding (h)	处理 Treatment	取食 Feeding		体重 Body weight		
		平均取食量 (cm ² /individual) Average ingestion	拒食率 (%) Antifeeding rate	平均体重 (mg/individual) Average body weight	比CK(±%) Comparing to CK	比处理前 ± than before treatment
24	转基因棉 API-transgenic cotton	0.83	76.49	147	-5.7	+6.52
	CK	3.53	—	156	—	+15.56
48	转基因棉 API-transgenic cotton	2.32	77.97	147	-23.03	+6.52
	CK	10.53	—	191	—	+41.48
72	转基因棉 API-transgenic cotton	3.69	80.57	108	-54.04	-21.74
	CK	18.99	—	235	—	+74.07

注:表中数据为30头试虫测定的平均值,试验前测定处理组棉铃虫平均单头体重为138mg/头,对照组平均单头体重为135mg/头。Note: All the data in the table are the mean value of 30 individual tested; the mean body weight of per larva is 138 mg for API-transgenic treatment, and 135 mg per larva for CK.

表2 取食转API基因棉对棉铃虫中肠强碱性类胰蛋白酶活力的影响

Table 2 Influence on the activity of high alkaline trypsin-like enzyme in *H. armigera* after feeding API-transgenic cotton plants

处理 Treatment	取食时间(h) Time of feeding	活性单位(OD/15 min) Activity unit	酶相对活性 Relative activity
转API基因棉 API-transgenic cotton plant	24	0.2665 ± 0.0312	68.11
	48	0.2187 ± 0.0491	55.89
	72	0.0837 ± 0.0378	21.39
对照 CK	—	0.3913 ± 0.0249	100.00

注:表中对照组酶活力测定数据为取食24、48、72h测定的平均值,下同。Note: Enzyme activity of CK is the mean value from the results of 24, 48 and 72 h, the same are those in the following tables.

制。取食24、48和72h酶活力逐步下降,至取食后72h时,仅为正常虫的21.39%。

2.3 转基因棉对中肠胰凝乳蛋白酶的影响

测定取食转API基因棉的棉铃虫中肠胰凝乳蛋白酶活性结果见表3。从表3可以看出,取食24h后,中肠胰凝乳蛋白酶被轻微抑制,随时间延长,抑制作用逐步增强,至72h抑制作用已非常明显,活性下降至正常的41.14%。

2.4 转API基因棉对棉铃虫中肠弱碱性类胰蛋白酶的影响

取食转基因棉的棉铃虫中肠弱碱性类胰蛋白酶的活性变化见表4。结果表明,取食API棉的棉铃虫中肠弱碱性类胰蛋白酶降解能力与对照无明显差异。仅在取食后72h降解作用有所降低,为对照组的75.45%。

3 讨论

20世纪50年代Birk等发现含有大豆胰蛋白酶抑制素的大豆浸提物可抑制赤拟谷盗幼虫的生长,Hilder^[8]等1987年首次证实了转蛋白酶抑制素基因植物的抗虫作用。目前

表 3 取食转 API 基因棉对棉铃虫中肠胰凝乳蛋白酶活性的影响

Table 3 Influence on the activity of chymotrypsin-like enzyme in *H. armigera* after feeding API-transgenic cotton plants

处理 Treatment	取食时间(h) Time of feeding	活性单位(OD/15 min) Activity unit	酶相对活性 Relative activity
转 API 基因棉 API-transgenic cotton plants	24	0.2273 ± 0.0331	85.87
	48	0.1705 ± 0.0207	64.61
	72	0.1087 ± 0.0253	41.14
对照 CK	—	0.2647 ± 0.0175	100.00

表 4 取食转 API 棉对棉铃虫中肠弱碱性类胰蛋白酶活力的影响

Table 4 Influence on the activity of low alkaline trypsin-like enzyme of *H. armigera* after feeding on API-transgenic cotton plants

处理 Treatment	取食时间(h) Time of feeding	活性单位(OD/15 min) Activity unit	酶相对活性 Relative activity
转 API 基因棉 API-transgenic cotton plants	24	0.2547 ± 0.0283	97.25
	48	0.2681 ± 0.0381	100.00
	72	0.1976 ± 0.0367	75.45
对照 CK	—	0.2619 ± 0.0248	100.00

已转入植物中的蛋白酶抑制剂基因有 10 余种,主要来自大豆、豇豆和马铃薯,比较成功的受体植物包括烟草、棉花、毛白杨等^[1]。本试验用转慈姑蛋白酶抑制剂(API)基因棉喂饲棉铃虫幼虫的试验结果表明:转 API 基因棉对棉铃虫幼虫有明显的拒食作用,而且取食转基因棉使棉铃虫生长明显受到抑制,进一步证明了转 API 基因棉具有抗虫效果。

关于蛋白酶抑制剂对昆虫体内消化蛋白酶的影响国内外进行了大量的研究。Broadway^[9]等的研究表明,棉铃虫和甜菜夜蛾在长期取食大豆胰蛋白酶抑制剂后,中肠类胰蛋白酶的活性明显增高,并由此推论蛋白酶抑制剂对昆虫的作用是由于诱导类胰蛋白酶的过量产生从而造成一些重要营养物质缺乏所致。而王琛柱等^[7]1995 年研究结果认为:蛋白酶抑制剂对昆虫的作用方式在于影响多种蛋白酶的活性,如强碱性类胰蛋白酶的活性降低,而弱碱性类胰蛋白酶的活力反而提高,最终破坏昆虫消化过程中重要蛋白酶的协调性,导致昆虫生长受阻。本试验结果表明:取食转 API 基因棉对棉铃虫中肠强碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性具有抑制作用。由此可以初步推断转 API 基因棉的抗虫机制,即取食后生长受明显抑制的棉铃虫幼虫,蛋白酶活性下降,引起昆虫对食物中的蛋白质消化障碍,并影响昆虫进一步摄食,破坏昆虫营养吸收与平衡,干扰昆虫生长,最终导致昆虫死亡。试验中也可以看到部分试虫在用转基因棉叶饲喂过程中,生长始终未受到明显影响,部分在前期取食受到抑制的试虫,在恢复用非转基因棉叶饲喂后,可基本恢复正常生长。这种现象一方面可能与转基因棉的抗虫表达有关,另一方面也反应出试虫对转 API 基因棉的耐受性可能存在较大的差异。揭示这些差异,对深入认识蛋白酶抑制剂的作用机制和开展利用方面的研究均具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 王转花, 杨 斌, 张 政. 植物蛋白酶抑制剂抗虫基因工程研究进展. 植物保护学报, 2001, 28(1): 83 - 88
- 2 杨慧铃. 慈姑蛋白酶抑制特性及其中心的探讨. 中国科学, 1990, 12: 1271 - 1275
- 3 Campbell F C. *et al.* A preliminary characterization of alkaline digestive protease in the posterior midgut of the face fly *Musca autumnalis* De Geer. *Can. J. Zool.*, 1987, 65: 635 - 639
- 4 Xu W F, *et al.* Studies on multifunctional crystalline proteinase inhibitors from arrowhead (*Sagittaria sagittifolia* Linn), *Scientia Sinica*, 1979, 22: 1433 - 1438
- 5 Hinks C F and Hupka D. The effects of feeding leaf sap from oats and wheat, with and without soybean trypsin inhibitor, on feeding behavior and digestive physiology of adult males of *melanoplus*. *J. Insect Physiol.*, 1995, 41(11): 1007 - 1015
- 6 赵善欢, 曹 毅. 应用天然植物产品川楝素防治菜青虫试验. 植物保护学报, 1985, 12(3): 125 - 130
- 7 王琛柱, 项秀芬, 张书芳. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响. 昆虫学报, 1995, 38(3): 272 - 277
- 8 Hilder V A, Gatehouse A M, Sheeman S E. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, 330: 160 - 163
- 9 Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 1986, 32: 827 - 833

Influence of API-transgenic cotton plants on growth and midgut proteases activity to *Helicoverpa armigera* larvae

Liu Xianjin Yu Xiangyang Wang Donglan Zhang Cunzheng Wang Yue

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: Influence on the growth and activity of midgut protease of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, larvae after fed with API-transgenic cotton plants were determined in the lab. Results showed that the feeding and the growth rate were greatly repressed. The anti-feeding rate was 76.49% after 24 h feeding and 80.57% after 48 h, respectively. The mean body weight of cotton bollworm larvae was also greatly decreased after fed with transgenic cotton leaves. The mean body weight of the larvae 72 h after feeding was 54.04% lower than that of CK. After the insects fed with the API-transgenic cotton plants, the activity of high alkaline trypsin-like enzyme and chymotrypsin-like enzyme was also decreased. The activities of the two enzymes after 24 h feeding was about 68.11% and 85.89% that of control, respectively. And after 48 h feeding, the activities of the two enzymes were about 55.87% and 64.61% that of control, respectively. But no significant influence on the activity of low alkaline trypsin-like enzyme was observed during the whole period. The average body weight of cotton bollworm larvae was greatly decreased 48 h after feeding on the API-transgenic cotton plants. The decrease on the activities of the midgut digest proteases showed good correlation with the retardation on the growth of the larvae fed with API-transgenic cotton leaves.

Key words: API-transgenic cotton plant; *Helicoverpa armigera*; midgut proteases