

转 *Bt* 基因抗虫作物培育现状及 *Bt* 蛋白的改造和聚合策略的利用

李晨, 刘博林

中国种子集团有限公司生命科学技术中心, 湖北 武汉 430075

李晨, 刘博林. 转 *Bt* 基因抗虫作物培育现状及 *Bt* 蛋白的改造和聚合策略的利用. 生物工程学报, 2015, 31(1): 53–64.
Li C, Liu BL. *Bt* transgenic crops for insect-resistance and modification of *Bt* protein and utilization of stacking strategy. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 53–64.

摘要: *Bt* 基因是目前世界上应用最为广泛的抗虫基因, 已经被转入多种作物中。其中, 棉花、玉米、马铃薯等转 *Bt* 基因抗虫作物已经商品化生产, 创造了可观的经济效益。结合作者的资料收集和研究成果, 综述了 *Bt* 基因以及转 *Bt* 基因抗虫作物的培育现状, 同时对提高 *Bt* 蛋白杀虫活力的方法和 *Bt* 基因聚合策略的利用进行了深入的探讨。

关键词: *Bt*, 抗虫作物, *Bt* 蛋白改造, 基因聚合, 多基因转化

Bt transgenic crops for insect-resistance and modification of *Bt* protein and utilization of stacking strategy

Chen Li, and Bolin Liu

Life Science and Technology Center, China National Seed Group Company Limited, Wuhan 430075, Hubei, China

Abstract: Insecticidal protein genes from *Bacillus thuringiensis* are currently the most widely used insect-resistant genes. They have been transferred to many crops for breeding and production. Among them, cotton, maize, potato and other insect-resistant crops are commercialized, creating considerable economic benefit. In this review, we summarized advances in identifying functional genes and transgenic crops for insect resistance, compared different strategies for enhancing vigor of insecticidal protein and utilizing gene stacking as well as listing valuable groups of stacked genes. In addition, the methods for multiple gene transformation was discussed.

Received: March 1, 2014; **Accepted:** May 14, 2014

Corresponding author: Bolin Liu. Tel: +86-27-87570572; Fax: +86-27-87570511; E-mail: liubolin@sinochem.com

网络出版时间: 2014-06-19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140127.html>

Keywords: Bt, insect-resistant crops, Bt protein modification, gene stacking, multiple gene transformation

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*, 是目前产量最大、使用最广的生物杀虫剂。它的主要活性成分是一种或数种杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs), 又称 δ -内毒素。随着基因工程技术的发展, 越来越多的来自微生物的具有特殊功能的基因被转入到靶标作物中, 从而提高作物抗胁迫的能力。转 *Bt* 基因作物的出现实现了人们防治害虫少打农药的夙愿, 目前主要在防治鳞翅目有害昆虫棉铃虫和玉米螟等方面得到了成功应用。本文主要就转 *Bt* 基因作物研究及其应用领域的成就作一简要回顾与展望。

1 *Bt* 基因和转 *Bt* 基因作物

Bt 基因存在于一种土壤微生物苏云金芽胞杆菌中, 其具有杀虫功能的蛋白有多种类型 (Cry、Cyt 和 Vip)。早在 20 世纪初期苏云金芽胞杆菌就已经证明对鳞翅目昆虫有杀虫活性。随着对 *Bt* 菌株的不断发现和新 *Bt* 基因的不断克隆, *Bt* 家族的成员也越来越多, 其蛋白类型从 Cry 类扩展到 Cyt 和 Vip 类型, 杀虫谱从鳞翅目扩展到双翅目和鞘翅目^[1-3]。这些丰富的 *Bt* 基因资源为开发出应对各类害虫的 *Bt* 制剂和转基因作物提供了良好的基础。根据 1997 年的新分类方法, 将所发现的 176 个 *Bt* 蛋白分为 28 群 (其中 Cry 蛋白 26 群, Cyt 蛋白 2 群), 53 类, 89 亚类。其中第一群 (Cry1A-类) 为最大群, 共 11 类 33 亚类^[4]。目前 (2014 年 4 月), *Bt* 蛋白已增至 76 群共 778 个成员, 其中 Cry 蛋白 73 群, Cyt 蛋白 3 群 (详细信息可查阅网站 http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html)。

在植物中表达 *Bt* 基因进而开发转基因抗虫作物是 *Bt* 基因的一个重要应用领域而且发展势头异常迅猛。1987 年, 第一个转 *Bt* 基因植物——转 *Bt* 基因烟草诞生^[5], 随后 *Bt* 基因被导入各类作物中。1995 年, 转 *Bt* 基因玉米、棉花和马铃薯 3 个作物首次在美国和加拿大实现了商品化^[6]。2013 年, 全球转 *Bt* 作物种植面积维持在 7 000 万 hm^2 以上。其中, 包含 *Bt* 的两种或三种复合性状的转基因作物面积为 4 700 万 hm^2 , 占到了转基因作物总种植面积的 26%。在中国, *Bt* 抗虫棉是种植面积最大的转基因抗虫作物, 2013 年的种植面积达到了 420 万 hm^2 , 农民对 *Bt* 棉花的采用率达到 90%^[7]。对国际农业生物技术应用服务组织 (International service for the acquisition of agri-biotech applications, ISAAA) 网站上的数据进行统计后发现, 截至 2013 年 11 月, 含 *Bt* 基因的转化事件中, 通过了安全评估的累计共有 347 个, 其中玉米中有 255 个审批通过的转化事件, 以绝对优势位居第一 (表 1)。通过商业许可的转基因作物也已经扩展到 5 个 (分别是玉米、棉花、水稻、马铃薯和茄子), 这些商业化抗虫作物绝大多数的开发者是国际上的大公司, 这也表明在商业化作物开发上大公司具有更大的优势 (表 2)。

玉米螟和水稻二化螟是造成玉米、水稻减产的主要害虫 (图 1A-B)。近年来作者实验室一直从事抗虫基因表达与抗虫作物性状分析研究, 先后利用组成型和绿色组织特异型启动子, 表达了 Cry1C、Cry2A 以及 Cry1Ab 等多个 *Bt*

蛋白质, 获得了多种抗虫转基因玉米和水稻株系 (图 1E-F), 并希望最终获得杀虫效果良好的作物新种质。国际上抗虫作物研发的历程表明, 通过不同 *Bt* 基因的聚合, 不仅可以增强作物的杀虫效果, 而且能够扩大杀虫谱, 获得除抗螟

虫外兼抗其他鳞翅目害虫或鞘翅目害虫 (例如粘虫、地老虎、蛴螬等) 的作物新品种。抗虫新品种的推广可以大大减少杀虫农药的使用, 降低种植成本, 成为实现绿色农业^[8-10]、保证可持续发展的重要举措。

表 1 全球范围内 *Bt* 基因在各类作物中审批通过的转化事件数目汇总

Table 1 Approved GM events number with *Bt* in different crops around the world

Gene	Trait	Event number	Maize	Cotton	Potato	Rice	Soybean	Poplar	Eggplant	Tomato
<i>cryIA</i>	Lepidopteran insect resistance	1		1						
<i>cryIA.105</i>		17	17							
<i>cryIAb</i>		57	48	7		2				
<i>cryIAb</i> (truncated)		2	1			1				
<i>cryIAb-Ac</i>		2		2						
<i>cryIAc</i>		32	1	22		2	3	2	1	1
<i>cryIC</i>		1		1						
<i>cryIF</i>		7	2	4			1			
<i>mcryIF</i>		1	1							
<i>cryIFa2</i>		41	41							
<i>cry2Ab2</i>		23	17	6						
<i>cry2Ae</i>		3		3						
<i>cry9C</i>		1	1							
<i>vip3A(a)</i>		3		3						
<i>vip3Aa20</i>		15	15							
<i>cry34Ab1</i>	Coleopteran insect resistance	33	33							
<i>cry35Ab1</i>		33	33							
<i>cry3A</i>		30			30					
<i>cry3Bb1</i>		17	17							
<i>mcry3A</i>		28	28							
SUM		347	255	49	30	5	4	2	1	1

Data from website <http://www.isaaa.org>.

表 2 全球范围内获得商业许可的转基因抗虫作物相关信息

Table 2 List of commercial GM insect resistance crops around the world

Event name	Trade name	Developer	Crop	Gene
CBH-351	Starlink™ Maize	Bayer	Maize	cry9C/Bar (Herbicides tolerance)
TC1507	Herculex™ I, Herculex™ CB	Dow and DuPont	Maize	cry1Fa2
DAS59122	Herculex™ RW	Dow and DuPont	Maize	cry34Ab1/cry35Ab1
GM Shanyou 63	BT Shanyou 63	Huazhong Agricultural University	Rice	cry1Ac/cry1Ab
Huahui-1/TT51-1	Huahui-1	University	Rice	cry1Ac/cry1Ab
Event1	JK 1	JK Agri Genetics Ltd	Cotton	cry1Ac
Bt Brinjal Event EE1	BARI Bt Begun-1, -2, -3 and -4	Maharashtra Hybrid Seed Company	Eggplant	cry1Ac
31707	BXN™ Plus Bollgard™ Cotton	Monsanto	Cotton	cry1Ac/BXN (Herbicides tolerance)
ATBT04	Atlantic NewLeaf™ potato	Monsanto	Potato	cry3A
BT	New Leaf™ Russet Burbank potato	Monsanto	Potato	cry3A
DBT418	Bt Xtra™ Maize	Monsanto	Maize	cry1Ac
HLMT15	Hi-Lite NewLeaf™ Y potato	Monsanto	Potato	cry3A/pvy_cp (Disease resistance)
MON1076	Bollgard™ Cotton	Monsanto	Cotton	cry1Ac
MON15985	Bollgard II™ Cotton	Monsanto	Cotton	cry1Ac/cry2Ab2
MON531	Bollgard™ Cotton, Ingard™	Monsanto	Cotton	cry1Ac
MON810	YieldGard™, MaizeGard™	Monsanto	Maize	cry1Ab
MON863	YieldGard™ Rootworm RW, MaxGard™	Monsanto	Maize	cry3Bb1
MON88017	YieldGard™ VT™ Rootworm™ RR2	Monsanto	Maize	cry3Bb1/CP4 (Herbicides tolerance)
MON89034	YieldGard™ VT Pro™	Monsanto	Maize	cry2Ab2/cry1A.105
RBMT	New Leaf™ Plus Russet Burbank potato	Monsanto	Potato	cry3A/plrv_orf1/plrv_orf2 (Disease resistance)
SEMT15	Shepody NewLeaf™ Y potato	Monsanto	Potato	cry3A/ pvy_cp (Disease resistance)
SPBT02	Superior NewLeaf™ potato	Monsanto	Potato	cry3A
1210 amk	Lugovskoi plus	Russian Academy of Sciences	Potato	cry3A
2904/1 kgs	Elizaveta plus	Russian Academy of Sciences	Potato	cry3A
5307	Agrisure® Duracade™	Syngenta	Maize	ecry3.1Ab
Bt10	Bt10	Syngenta	Maize	cry1Ab
Bt176 (176)	NaturGard KnockOut™, Maximizer™	Syngenta	Maize	cry1Ab/Bar (Herbicides tolerance)
COT102 (IR102)	VIPCOT™ Cotton	Syngenta	Cotton	vip3A(a)
MIR162	Agrisure™ Viptera	Syngenta	Maize	vip3Aa20
MIR604	Agrisure™ RW	Syngenta	Maize	mcry3A

Data from website <http://www.isaaa.org>; cases of stacking through cross breeding were not included.

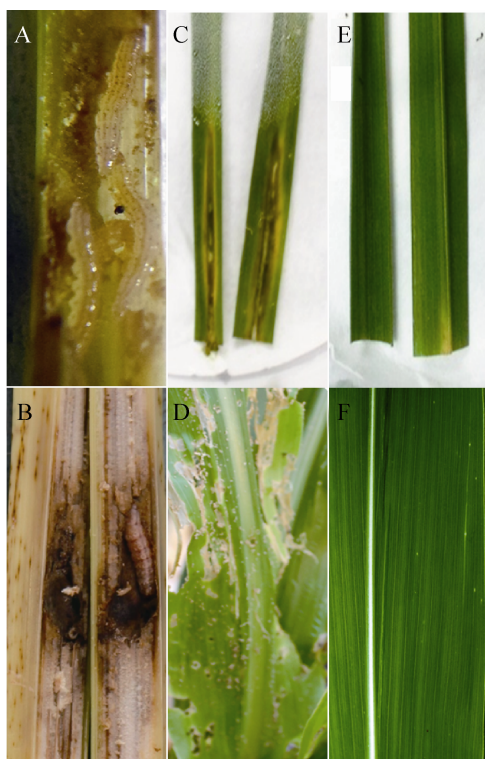


图 1 螟虫对水稻和玉米的危害以及转基因作物的抗虫效果

Fig. 1 Damage of stem borers and resistant effect of transgenic plant in rice and maize after infestation of stem borers larvae. (A) Rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*). (B) Asian Corn borer (*Ostrinia furnacalis*). (C) Wild type rice. (D) Wild type maize. (E) Transgenic rice. (F) Transgenic maize.

2 提高 *Bt* 蛋白杀虫活力的方法

为了增强转基因作物的抗虫性，使转 *Bt* 作物在农业生产上的应用成为可能，研究者对具有较好杀虫能力的 *Bt* 基因进行了很多有效的改造。这些改造包括密码子的优化、选用好的调控元件和转化策略以及对 *Bt* 蛋白的修饰。

通过增加 *cryIAb* 和 *cryIAc* 基因的 GC 含量以及改为植物偏爱的密码子，转基因番茄和烟草中的 *Bt* 含量达到了总可溶蛋白的 0.02%，比

原来提高了 100 倍^[11]。根据 *CryIAh* 基因所预示的氨基酸序列，将其 DNA 序列按照水稻密码子偏爱性设计了 5 种不同的密码子优化方案（分别为将密码子全部替换为每个氨基酸中的最高频密码子；只将稀有密码子转变为最高频密码子；按照密码子频率使用表中各密码子使用频率优化；将序列中的密码子换为中等频率的密码子以及使用每个氨基酸最高频的两种密码子），通过分子手段分析后表明全部采用最高频密码子的优化方案效果最好，*CryIAh* 蛋白平均表达量可以占到可溶性蛋白的 0.104%^[12]。除了改造 DNA 序列外，利用强启动子以及合适的终止子，*Cry* 蛋白含量可以增加至可溶蛋白的 0.2%–1%^[13]。而如果将密码子优化后的 *CryIAh* 蛋白转入到叶绿体中进行表达，其蛋白含量将比转入细胞核中还可以再增加 10 倍^[14]。同时，由于转入叶绿体中的 *Bt* 蛋白将不会存在于花粉和籽粒中，这将进一步降低人们对转基因作物危害环境和人畜安全方面的担心，从而能够更好地增强 *Bt* 作物的商业价值。除了转录水平的提升，某些特殊的起始序列（kozak, Ω ）和信号肽（PR1a, KDEL）具有增强基因翻译水平的作用，因而也可以起到增加表达效率，提高杀虫活力的作用^[15]。

除了对基因进行密码子优化和选择增强表达的调控原件外，最近越来越多的研究集中在如何提高 *Bt* 蛋白本身的杀虫活力。经过各种尝试，现在看来可行的方法主要包括以下几种：氨基酸代换、功能域置换、在特定区域内引入蛋白酶识别或结合位点以及删除 N 端的部分序列。

将 *Cyt2Aa* 蛋白在 Loop 环结构位置处加入蚜虫肠道受体结合肽 GBP3.1 后可以使得这种修饰的 *Cyt2Aa* 除了具有对双翅目昆虫的抗性还

获得了对同翅目昆虫蚜虫的毒性^[16]。而昆虫中肠受体钙粘蛋白上的 CR12-MPED 多肽可以成为 Cry1A 类蛋白杀虫活力的增强剂^[17]。蓖麻毒素作为一种毒蛋白与 Bt 蛋白类似,也是由毒性区 (A 链) 和受体结合区 (B 链) 组成。将蓖麻毒素 B 链中的半乳糖结合结构域与 Cry1Ac 融合后转化水稻和玉米,转基因植物都表现出了更强的抗虫性^[18]。

获得中国农业部转基因安全证书的水稻品种华恢一号其抗虫基因 *cry1Ab/c*,即为 *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 的融合基因。具体讲就是把 Cry1Ab 的第一和第二个结构域保留,而把第三个结构域替换为 Cry1Ac 的第三个结构域而得到的融合蛋白^[19]。因第一个结构域与蛋白毒性相关,第二和三个结构域与蛋白的结合能力有关,经过结构域之间的重新组合,可以使得新的蛋白同时具有高结合力和高毒性,从而增强了蛋白的杀虫活力。同样的,孟山都公司开发的转基因玉米 MON89034,转入的基因命名为 *cry1A.105*,实际上是将 Cry1Ab 的第一结构域,Cry1Ac 的第二结构域和 Cry1F 的第三结构域进行了重新组装 (http://cera-gmc.org/index.php?evidcode%5B%5D=MON89034&auDate1=&auDate2=&action=gm_crop_database&mode=Submit)。另外将 Cry1Ba 截短后与 Cry1Ia 的第二结构域融合后可以产生对鳞翅目和鞘翅目昆虫双抗的效果^[20]。

在 Cry3A 的第三个和第四个 α -helices 之间进行修饰,使之包含一个胰凝乳蛋白酶 G 识别位点,从而增强 Bt 毒性以及对玉米根虫中肠的特异识别^[21],而 Cry3A 与 Cry1Ab 融合后得到的蛋白 eCry3.1Ab 可以使得对玉米根虫的毒性变得更强^[22]。将 Cry3 的 N 端第 1-32 位氨基酸删除,以获得或增强对玉米根甲虫的杀虫能力,

或将 Cry3 的 N 端第 32-33 位氨基酸 Val-Val 替换为 Gly-Pro-Gly-Lys,有助其 N 端氨基酸多肽在目标昆虫中肠中被昆虫中肠蛋白酶切除。改良后的 Cry3A 对西方玉米根虫和北方玉米根虫的杀虫能力远高于天然 Cry3A,改良后的 Cry3B 对南方玉米根虫的杀虫能力远高于天然 Cry3B^[23]。

另外,利用体外分子进化技术诱导 *cry* 基因 DNA 序列的突变和蛋白结构域的重排,从而有目的地筛选新的高抗蛋白成为改造 Bt 蛋白的重要方法^[24-25]。通过易错 PCR (Error-prone PCR) 将 Cry1Ac 这个应用已久的杀虫蛋白进行诱变,发现位于第三结构域的 524 位点上的苏氨酸变成天冬酰胺后,Cry 蛋白对鳞翅目昆虫的杀虫活性显著增强^[26]。这一发现不仅创造了一个具有商业化前景的新抗虫蛋白,还有助于更加明晰 Cry 蛋白的杀虫机理和各结构域的具体功能。同样,利用 DNA shuffling 技术诱变 *cry8Ka* 序列后筛选到了对棉花象鼻虫 (Cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*) 这种鞘翅目昆虫有高活力的新杀虫蛋白^[27],拓宽了 Bt 蛋白的杀虫谱。随着分子生物学技术的不断发展,越来越多的新型 Bt 杀虫蛋白会被人工制造出来,为培育抗虫作物提供源源不断的候选基因资源。

3 基因聚合策略的利用

作物害虫对转基因植物产生抗性是一个不容忽视的问题,它可能使已经开发的转基因作物毁于一旦。所谓基因聚合即在同种作物品种中转入两个不同的抗虫基因。发展基因聚合策略对于中国的农业具有特殊的意义。

McGaughey 在 1985 年首次报道了实验室条件下印度谷螟对 Bt 制剂产生抗性^[28],而小菜蛾是发现的第一例在田间对 Bt 制剂产生抗性的昆

虫^[29]。随后在实验室或田间通过人工筛选已获得大量抗性昆虫株系^[30-32]。而真正在田间自然条件下对 Bt 作物产生抗性的昆虫是棉铃虫,抗性产生的时间发生在转基因作物开始商业化种植的 6 年后(2002 年)^[33]。截止到 2012 年,田间发现的对 Bt 作物产生抗性的昆虫共有 5 类,分别是棉铃虫 *Heliothis zea*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*、玉米茎蛀褐夜蛾 *Busseola fusca* 和玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera*, 涉及到的基因包括 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1F* 和 *cry3Bb*^[33]。

人工筛选抗 Bt 昆虫株系并揭示其抗性机理的相关研究也越来越多^[34-37]。这些研究不仅可以帮助我们预测昆虫产生 Bt 抗性的潜在风险,而且可以指导我们寻找有效的方法延缓昆虫抗性的产生^[38-40]。目前,治理昆虫抗性的产生主要有“高剂量/庇护所”和“基因聚合”两种策略。在美国、澳大利亚等国家主要采用高剂量/庇护所的方法来延缓昆虫产生抗性,但由于我国的主要目标害虫、种植制度、农户规模等生态和社会环境与这些国家有很大差异,这意味着在发达国家普遍采用的“高剂量/庇护所”策略在我国难以严格执行,因而“基因聚合”策略更符合我国的国情。

基因聚合策略要考虑两个基本原则:1) 每个基因单独都有极强的作用;2) 聚合后交叉抗性的几率低。这样,昆虫同时对两种不同蛋白产生抗性的几率就会大大降低。*cry1Ac* 和 *cry2Ab* 的组合是现在应用最广泛、效果也很好的聚合策略,因为它们的氨基酸同源性很低且结合在昆虫中肠的不同位点,从而使得昆虫对它们产生交叉抗性的概率很低^[36,41-42]。但是,最近研究者发现 *cry1Ac* 和 *cry2Ab* 组合的交叉抗性是非对

称的 (Asymmetrical cross-resistance), 即:用 *Cry2Ab* 筛选的抗性株对 *Cry2Ab* 和 *Cry1Ac* 都具有抗性,而用 *Cry1Ac* 筛选的抗性株只对 *Cry1Ac* 具有抗性而对 *Cry2Ab* 没有抗性。虽然这一现象的机制还有待研究,但是却给我们应用这一基因组合生产长效抗虫转基因作物敲响了警钟,好在使用 *Cry2Ab* 筛选出来的对 *Cry2Ab* 和 *Cry1Ac* 都具有抗性的抗性株其实在田间并不能存活于含有 *Cry2Ab*+*Cry1Ac* 的转基因棉桃上(可能是由于田间和实验室内剂量以及条件的差异)^[42]。不过,这也表明要想有效地延缓昆虫抗性的产生,除了选择合理的基因聚合策略外,保证蛋白的高剂量以及一定比例的庇护所也是需要的^[41]。

除了 *Cry2Ab*、*Cry1A* 类蛋白和 *Cry1C*、*Cry2A*、*Cry9C* 的结合位点也是不同的^[43],同时 *Cry1C* 的抗虫效果又比 *Cry2A* 的效果好^[44-46](表 3),因此 *Cry1C* 和 *Cry1Ab* (c) 也可以作为一种潜在的组合策略。

cry34Ab1/cry35Ab1 是对西方玉米根虫 *Diabrotica virgifera* 非常有效的双价聚合基因,原因有两个:1) 两个基因都有着特殊的蛋白结构,这就避免了交叉抗性的出现;2) 结合位点的差异性且 *Cry34Ab1* 可以增强 *Cry35Ab1* 与受体的

表 3 *Cry1C* 和 *Cry2A* 对水稻二化螟的抗性效果分析
Table 3 Comparison of resistance level against rice stem borers between *Cry1C* and *Cry2A*

Protein	Event number of transgenic rice	Adjust mortality rate (%) [*]
<i>Cry1C</i>	9	92.93±8.20 [#]
<i>Cry2A</i>	11	23.96±17.26 [#]

Results from laboratory assay using artificial infestation of first-instar larvae of stem borers. *: adjust mortality rate (%)=(MR_{transgenic plant}-MR_{wild type control})/(1-MR_{wild type control})×100; #: data in cell of the table are expressed as the $\bar{x} \pm s$ deviation.

结合能力。用其生产的转基因玉米(转基因事件 event DAS-59122-7) 具有很好的抗根虫性状, 现在已经被陶氏益农公司进行了商业化的生产^[47]。

此外, 对于防治亚洲玉米螟非常有效的 Bt 蛋白 Cry1Ab 来说, 其与 Cry1Ah 间是存在着高度的(131 倍) 交叉抗性, 其次是 Cry1Ac (36 倍的交叉抗性), 与 Cry1F 间的交叉抗性极低(只有 6 倍), 而与 Cry1-类的另外一个成员 Cry1Ie 间几乎完全没有交叉抗性^[48-49]。Cry1Ie 蛋白在 Bt 菌株中沉默表达而在大肠杆菌中可以大量产生, 其对鳞翅目昆虫尤其对亚洲玉米螟有很好的毒杀效果^[50]。因此 Cry1Ab 与 Cry1Ie 也是一对具有潜在价值的基因组合。

在抗虫基因聚合的方法上, 过去的聚合品种基本上都是以作物有性杂交的方式实现的(简称杂交聚合)。这一方法的优点是构建载体和作物转化相对容易, 而且可以根据需要灵活地选择组合策略。2010 年在美国和加拿大上市的转基因玉米 SmartstaxTM 即为孟山都公司和陶氏公司通过有性杂交的方法将 8 个抗虫抗除草剂基因(包括两个抗除草剂基因 *pat* 和 *epsps/cp4*, 4 个抗鳞翅目昆虫的基因 *cry1A.105*、*cry1Ab*、*cry2Ab*、*cry1Fa* 和两个抗根部害虫的基因 *cry34Ab* 和 *cry35Ab*) 聚合到一起, 从而实现了多种昆虫和除草剂的抗性^[51]。但是, 杂交聚合的策略也具有很多劣势, 比如: 田间杂交回交的工作量很大、多插入位点会带来位置效应等。另外, 我国的转基因作物安全评价流程采用的是基于品种的评价流程, 而非美国等国家所采用的基于转化事件的评价流程, 这就使得聚合后的转基因品种要重新进行安全评价过程, 无形中耗费了更多的时间和成本。因此一次性构建含有所有目标基因的转化载体然后直

接转入目标作物中从而产生基因聚合的品种将是更好的选择。

多基因聚合载体转化植物的技术目前在研究代谢途径、制作生物反应器以及改良微效多基因控制的性状(如作物产量)方面具有很好的应用前景^[52-56]。由于载体上元件的数量较多, 传统的酶切连接的方法不仅繁琐耗时且会受到酶切位点的限制, Gateway 技术利用位点特异重组系统使得表达元件在各载体间发生转移从而实现多基因元件的聚合。经过多年的发展和改善, 这项技术的应用范围和构建效率逐步提高, 也已经具有转化多种植物的应用实例^[57-59]。最近一项研究表明, Gateway 技术可以实现同时转入包含 8 个基因总计 74 kb 长度的 DNA 片段^[60]。植物人工染色体技术的发展也为多基因聚合带来了另外的途径^[61-62]。利用特异位点重组技术将多个基因整合到人工染色体上再导入到作物中, 不仅实现了基因的聚合, 而且因为外源序列没有插入到植物本身的基因组上, 从而避免了转基因沉默、插入失活等一系列问题^[63-65]。

此外, 最近发展起来的新型基因打靶和编辑技术, 包括锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(TALENs)、规律成簇间隔短回文重复(CRISPR)/Cas 系统^[66-68], 不仅可以在植物基因组改造和定点引入外源基因方面有很大应用前景, 也可以在多基因聚合转化方面发挥极大的作用^[69-70]。

4 结束语

随着对 Bt 基因研究的深入以及人们对转基因作物接受程度的提高, Bt 基因抗虫作物的种植规模会越来越大, 抗虫的种类也会越来越多。同时, 对 Bt 蛋白作用机理和昆虫抗性机理的逐

步探究以及新的分子生物学技术的发明也会帮助我们更好地开发出具有长效市场价值的 *Bt* 抗虫作物新品种。这些优良的抗虫作物的大规模种植势必会大幅度降低化学农药的田间施用量, 进而在降低农业成本、释放农村劳动力、减少环境污染和提高食品品质等方面发挥更加积极的作用。

REFERENCES

- [1] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 807–813.
- [2] Wirth MC, Georghiou GP, Federici BA. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10536–10540.
- [3] Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, et al. Vip3A, A novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11): 5389–5394.
- [4] Huang DF, Lin M. *Genetically Engineered Agricultural Microorganisms*. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
黄大昉, 林敏. *农业微生物基因工程*. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] Barton KA, Whiteley HR, Yang NS. *Bacillus thuringiensis* section sign-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol*, 1987, 85(4): 1103–1109.
- [6] Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *bt* transgenic plants. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 845–881.
- [7] James C. *Global status of commercialized biotech//GM Crops: 2013*. Ithaca: ISAAA, 2013, Brief No. 46.
- [8] Koochafkan P, Altieri MA, Gimenez EH. Green Agriculture: foundations for biodiverse, resilient and productive agricultural systems. *Inter J Agr Sust*, 2012, 10(1): 61–75.
- [9] Zhang QF. Strategies for developing Green Super Rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(42): 16402–16409.
- [10] Liu LF. The origin of the Green Agriculture. *Chin Rep*, 2007, 3: 94–96 (in Chinese).
刘连馥. 绿色农业的由来. *中国报道*, 2007, 3: 94–96.
- [11] Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(8): 3324–3328.
- [12] Zhou ZL, Lin ZM, Geng LL, et al. Comparison of codon optimizations of *cryIAh1* gene in rice. *Chin J Biotech*, 2012, 28(10): 1184–1194 (in Chinese).
周宗梁, 林智敏, 耿丽丽, 等. 水稻中 *cryIAh1* 基因密码子优化方案的比较. *生物工程学报*, 2012, 28(10): 1184–1194.
- [13] Koziel MG, Beland GL, Bowman C, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(2): 194–200.
- [14] Li XY, Li SY, Lang ZH, et al. Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated *cryIAh* gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(8): 1299–1308.
- [15] Weng LS, Deng LW, Lai FX, et al. Optimization of the *cry2Aa* gene and development of insect-resistant and herbicide-tolerant photoperiod-sensitive genic male sterile rice. *Czech J Genet Plant Breed*, 2014, 50(1): 19–25.
- [16] Chougule NP, Li HR, Liu SJ, et al. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(21): 8465–8470.
- [17] Chen J, Hua G, Jurat-Fuentes JL, et al. Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a

- toxin-binding cadherin. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(35): 13901–13906.
- [18] Mehlo L, Gahakwa D, Nghia PT, et al. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(22): 7812–7816.
- [19] Tu JM, Zhang GA, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Nat Biotechnol, 2000, 18(10): 1101–1104.
- [20] Naimov S, Dukiandjiev S, de Maagd RA. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotechnol J, 2003, 1(1): 51–57.
- [21] Walters FS, Stacy CM, Lee MK, et al. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against Western corn rootworm larvae. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(2): 367–374.
- [22] Walters FS, deFontes CM, Hart H, et al. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(10): 3082–3088.
- [23] Shen ZC, Fang J. The use of modified Cry3, plasmid and method: CN, 200810059372.6. 2008-01-24 (in Chinese).
沈志成, 方军. 改良 Cry3 的方法、改良 Cry3、质粒及其应用: 中国, 200810059372.6. 2008-01-24.
- [24] Craveiro KI, Gomes Junior JE, Silva MC, et al. Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. J Biotechnol, 2010, 145(3): 215–221.
- [25] Knight JS, Broadwell AH, Grant WN, et al. A strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains. J Econ Entomol, 2004, 97(6): 1805–1813.
- [26] Shan SP, Zhang YM, Ding XZ, et al. A Cry1Ac toxin variant generated by directed evolution has enhanced toxicity against Lepidopteran insects. Curr Microbiol, 2011, 62(2): 358–365.
- [27] Oliveira GR, Silva MC, Lucena WA, et al. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). BMC Biotechnol, 2011, 11: 85.
- [28] McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 1985, 229(4709): 193–195.
- [29] Tabashnik BE. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol, 1994, 39(1): 47–79.
- [30] Sayyed AH, Haward R, Herrero S, et al. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1509–1516.
- [31] Ferre J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol, 2002, 47(1): 501–533.
- [32] Kain WC, Zhao JZ, Janmaat AF, et al. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol, 2004, 97(6): 2073–2078.
- [33] Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat Biotechnol, 2013, 31(6): 510–521.
- [34] Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev, 2013, 37(1): 3–22.
- [35] George DM, Rind FC, Bendall MW, et al. Developmental studies of transgenic maize expressing Cry1Ab on the African stem borer, *Busseola fusca*; effects on midgut cellular structure. Pest Manag Sci, 2012, 68(3): 330–339.
- [36] Zhang HN, Yin W, Zhao J, et al. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. PLoS ONE, 2011, 6(8): e22874.
- [37] Tiewisiri K, Wang P. Differential alteration of two

- aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(34): 14037–14042.
- [38] Alstad DN, Andow DA. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 1995, 268(5219): 1894–1896.
- [39] Gonzalez-Cabrera J, Garcia M, Hernandez-Crespo P, et al. Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1Ab protein activation. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43(8): 635–643.
- [40] Tabashnik BE, Sisterson MS, Ellsworth PC, et al. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(12): 1304–1307.
- [41] Brevault T, Heuberger S, Zhang M, et al. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(15): 5806–5811.
- [42] Tabashnik BE, Unnithan GC, Masson L, et al. Asymmetrical cross-resistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(29): 11889–11894.
- [43] Alcantara EP, Aguda RM, Curtiss A, et al. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2004, 55(4): 169–177.
- [44] Chen H, Tang W, Xu CG, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(7): 1330–1337.
- [45] Ye RJ, Huang HQ, Yang Z, et al. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(9): 1015–1020.
- [46] Tang W, Chen H, Xu CG, et al. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene. *Mol Breed*, 2006, 18(1): 1–10.
- [47] Li HR, Olson M, Lin GF, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1/Cry35Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e53079.
- [48] Xu LN, Ferry N, Wang ZY, et al. A proteomic approach to study the mechanism of tolerance to Bt toxins in *Ostrinia furnacalis* larvae selected for resistance to Cry1Ab. *Transgenic Res*, 2013, 22(6): 1155–1166.
- [49] Xu LN, Wang ZY, Zhang J, et al. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins. *J Appl Entomol*, 2010, 134(5): 429–438.
- [50] Song FP, Zhang J, Gu AX, et al. Identification of *cryII*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cryII*-type gene. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5207–5211.
- [51] Storer NP, Thompson GD, Head GP. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. *GM Crops Food*, 2012, 3(3): 154–162.
- [52] Lu YH, Rijzaani H, Karcher D, et al. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E623–632.
- [53] Naqvi S, Zhu C, Farre G, et al. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(19): 7762–7767.
- [54] Fujisawa M, Takita E, Harada H, et al. Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. *J Exp Bot*, 2009, 60(4): 1319–1332.
- [55] Jiang LL, Yu XM, Qi X, et al. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transgenic Res*, 2013, 22(6): 1133–1142.
- [56] Farre G, Maiam Rivera S, Alves R, et al. Targeted transcriptomic and metabolic profiling reveals temporal bottlenecks in the maize carotenoid pathway that may be addressed by multigene

- engineering. *Plant J*, 2013, 75(3): 441–455.
- [57] Sun QX, Liu J, Li YX, et al. Creation and validation of a widely applicable multiple gene transfer vector system for stable transformation in plant. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(4/5): 391–404.
- [58] Buntru M, Gartner S, Staib L, et al. Delivery of multiple transgenes to plant cells by an improved version of MultiRound Gateway technology. *Transgenic Res*, 2013, 22(1): 153–167.
- [59] Mann DG, Lafayette PR, Abercrombie LL, et al. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(2): 226–236.
- [60] Untergasser A, Bijl GJ, Liu W, et al. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47885.
- [61] Yu WC, Han FP, Gao Z, et al. Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(21): 8924–8929.
- [62] Carlson SR, Rudgers GW, Zieler H, et al. Meiotic transmission of an in vitro-assembled autonomous maize minichromosome. *PLoS Genet*, 2007, 3(10): 1965–1974.
- [63] Murata M, Shibata F, Hironaka A, et al. Generation of an artificial ring chromosome in *Arabidopsis* by Cre/LoxP-mediated recombination. *Plant J*, 2013, 74(3): 363–371.
- [64] Birchler JA, Yu WC, Han FP. Plant engineered minichromosomes and artificial chromosome platforms. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 120(3/4): 228–232.
- [65] Dhar MK, Kaul S, Kour J. Towards the development of better crops by genetic transformation using engineered plant chromosomes. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(5): 799–806.
- [66] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646.
- [67] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
- [68] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688.
- [69] Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, et al. Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(9): 1126–1134.
- [70] D'Halluin K, Vanderstraeten C, Van Hulle J, et al. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(8): 933–941.

(本文责编 陈宏宇)