

易晓莉,马 晓,刘先方,等. 昆虫对 *Bt* 毒素抗性研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):149-151.

# 昆虫对 *Bt* 毒素抗性研究进展

易晓莉<sup>1</sup>, 马 晓<sup>1</sup>, 刘先方<sup>3</sup>, 侯成香<sup>2,3</sup>, 李木旺<sup>2,3</sup>

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018;

3. 江苏科技大学蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

**摘要:**从 *Bt* 毒素杀虫机理、受体类型、昆虫对 *Bt* 毒素抗性机理及遗传特性等方面进行了综述,总结了近年来关于昆虫对 *Bt* 毒素抗性的研究进展情况,并对其研究前景进行了展望。

**关键词:**昆虫;*Bt* 毒素;受体;抗性;遗传特性;研究进展

**中图分类号:**S482.3<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)07-0149-02

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*) 是一种能产生伴孢晶体和芽孢的革兰氏阳性细菌,具有多个株系。由它产生的伴孢晶体对鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫的幼虫具有特异的杀灭活性,所以这种伴孢晶体通常被称为 *Bt* 毒素或 *Bt* 毒蛋白,编码该蛋白的基因则被称为 *Bt* 基因<sup>[1]</sup>。但 *Bt* 毒素并不是对所有的生物都具有毒性,它仅对昆虫、线虫及其他特定的物种表现出特异的毒性,尤其对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等昆虫表现出极高的特异性<sup>[2]</sup>;且不同株系的 *Bt* 菌系产生的毒蛋白也具有不同的特异性<sup>[3]</sup>。

## 1 *Bt* 毒素杀虫机理

根据孢子形成方式的不同,*Bt* 所产生的杀虫晶体内含物是由多种杀虫蛋白组成的,这些蛋白被称为 Cry 毒素或 Cyt 毒素。根据它们的氨基酸序列和基因序列将这些毒素分为 67 类,即 Cry1~Cry67,它们对特定范围内的昆虫表现出高度特异的杀灭活性,所以作为可喷射杀虫剂的 *Bt* 产物具有一定的局限性,将 Cry 毒素引用到转基因植物中可为农业上的害虫防治提供一种更加高效特异的方法<sup>[4]</sup>。*Bt* 所产生的蛋白主要包含 2 类杀虫活性成分,即杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, ICP)和营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal protein, VIP)<sup>[5]</sup>,后者不形成蛋白晶体,且两者在进化上无同源性。其中,ICP 由于具有对目标昆虫特异的杀灭活性且对人及其他动物无害等特点,因此目前已被广泛用于农业害虫的控制,约占总体杀虫剂市场的 2%。ICP 的毒性并非来自本身,但当它被特定的昆虫取食以后,在昆虫中肠的碱性环境中逐步降解为有杀虫作用的活性肽,该活性肽与目标昆虫中肠刷状缘细胞膜泡(brush border membrane vesicle, BBMV)上的特异性受体相结合,引起细胞膜上孔洞的形成,致使细胞渗透平衡被破坏而发生渗透裂解<sup>[6]</sup>。同时,离子浓度梯度的改变也严重影响了中肠细胞内环境的稳定,从而阻碍昆虫对养分的

的吸收,最终导致昆虫停止取食而死亡。

## 2 *Bt* 毒素受体种类及作用

某一种杀虫剂可用于防治的各类害虫及使用范围称为杀虫谱。作为杀虫剂的 *Bt* 毒素也有其特定杀虫谱。毒素的杀虫谱在很大程度上是由昆虫中肠 BBMV 上的特异性受体决定的,毒素必须与受体结合才具备杀虫活性,因此昆虫体内特异性受体的种类是决定毒素杀虫特性的关键因子之一<sup>[7]</sup>。有研究证明,在目标昆虫体内主要有氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN)、类钙黏蛋白(cadherin-like protein)、碱性磷酸酯酶(GPI-anchored alkaline phosphatase)以及某种糖脂类(glycolipids)物质等 4 种 *Bt* 毒素受体<sup>[8]</sup>。其中,APN 和类钙黏蛋白是昆虫体内与 *Bt* 密切相关的受体,所以对其研究也较为深入。APN 是一种常见的蛋白酶,在动植物中分布广泛。APN 上具有与 Cry 毒素特异结合的位点,目前已经确认某些鳞翅目昆虫中肠 BBMV 上的 APN 是 *Bt* 毒素的主要结合对象。Cry 毒素与 APN 受体的特异性结合是决定 Cry 毒素杀虫活性的关键因素之一<sup>[9]</sup>。在家蚕(*Bombyx mori*)体内,BmAPN1 上与 *Bt* 毒素结合的区域位于异亮氨酸(Ile)135 至脯氨酸(Pro)198 之间,该序列包含 63 个氨基酸残基<sup>[10]</sup>。虽然所有的鳞翅目昆虫的中肠 BBMV 上都有丰富的 APNs,但由 APN 所介导的 Cry1A 家族毒素的毒力大小在不同昆虫之前存在差异。

类钙黏蛋白是依赖钙离子的跨膜糖蛋白家族中的一员,在细胞增殖、分化以及细胞间的连接等生物过程中发挥重要作用。在昆虫中肠内,类钙黏蛋白与 Cry 毒素具有高度的亲和力,两者紧密结合会使中肠上皮细胞的结构和功能瓦解,最终导致昆虫死亡<sup>[11]</sup>。纯化得到烟草天蛾中肠 BBMV 上 Cry1Ab 毒素的受体 *Bt*-R1,已被证明为一种类钙黏蛋白,能与 Cry1Ab 毒素高度特异性结合<sup>[12]</sup>。且 *Bt*-R1 与 Cry1Aa 及 Cry1Ac 的结合特征与 Cry1Ab 相似,说明 *Bt*-R1 可能对 Cry1A 毒素家族具有高度亲和力。

## 3 昆虫对 *Bt* 毒素抗性形成机理

*Bt* 杀虫晶体蛋白制剂及 *Bt* 转基因作物已被广泛用于农业害虫的防治,一方面减少了化学杀虫剂的使用及其所产生的环境问题,另一方面也导致目标昆虫对其产生越来越强的抗性。据调查,已有多昆虫群体在自然环境下对 *Bt* 蛋白制

收稿日期:2013-10-18

基金项目:国家“863”计划(编号:2013AA102507);江苏省六大人才高峰项目(编号:NY-025)。

作者简介:易晓莉(1989—),女,河南信阳人,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yixiaoli19892008@163.com。

通信作者:李木旺,博士,研究员。E-mail: muwang\_li@hotmail.com。

剂及 *Bt* 转基因作物产生了抗性;也可在实验室和温室中通过人工选择获得多种昆虫的抗性虫系<sup>[13]</sup>。这些抗性虫系对 *Bt* 毒素的抗性具有水平高、遗传稳定性好等特点,有的能够在 *Bt* 作物上完成整个生活史,说明抗性风险广泛存在于自然环境与人工环境中。

根据 *Bt* 毒素的杀虫机制,可推测昆虫对 *Bt* 毒素产生抗性的机理主要有 *Bt* 原毒素的溶解性及其水解能力、毒素与昆虫中肠细胞膜上受体结合情况的变化、细胞膜上孔洞的形成与疏通及中肠上皮细胞的自我修复功能等<sup>[14]</sup>。其中,毒素与昆虫中肠细胞膜上受体结合情况的变化是目前普遍认可的昆虫对 *Bt* 毒素产生抗性的最主要机理。受体结合情况的变化主要包括结合能力的变化和特异性位点数目的改变。经研究发现,烟芽夜蛾抗性虫系 YHD 对 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 产生抗性主要是由于这 3 种毒素在细胞膜上共同的结合受体发生改变,且这种抗性表现为隐性遗传方式。有研究表明,Cry1Ac 对中肠上皮细胞的作用取决于细胞膜上是否具有 APN,在成功构建了烟芽夜蛾的 cDNA 文库基础上,从 YHD 烟芽夜蛾中克隆了含有 APN 与 *Bt* 毒素特异结合的蛋白,称为 *Bt* 结合蛋白<sup>[15]</sup>。

进一步研究发现,烟芽夜蛾 YHD2 品系对 Cry1Ac 产生高水平抗性的主要原因是类钙黏蛋白发生了突变,编码区发生了反向转座子插入,导致该蛋白完全失活,使 *Bt* 毒素不能结合到中肠膜上<sup>[16]</sup>。因此,类钙黏蛋白改变也是昆虫对 *Bt* 产生抗性的主要原因之一。类钙黏蛋白和 APN 都是棉铃虫的 Cry1Ac 受体,它们的突变分别产生抗性虫系 GYBT 和 *Bt*-R。在 *Bt* 毒素杀灭害虫过程中,类钙黏蛋白为毒素的第一受体,APN 为其第二受体,它们分别在不同的过程中发挥作用,这 2 类受体的改变必然导致昆虫对 *Bt* 毒素产生一定的抗性。

#### 4 抗性形成的分子机制和遗传特性研究

昆虫对 *Bt* 毒素的抗性与晶体毒素的致毒机理密切相关,*Bt* 毒素在杀虫过程中的任何一个步骤发生改变,都可能会导致昆虫产生抗性,因此体现出抗性机制的多样性。不同抗性机制所引起的抗性表现出各种遗传特性,如抗性水平的差异、不同的抗谱、显隐性和交叉抗性等。因此,有必要对抗性机制和遗传特性进行更加深入的研究。

*Bt* 抗性的遗传方式随虫种和杀虫晶体蛋白类型不同而不同,但多为隐性遗传,只受少数基因位点控制<sup>[17]</sup>。烟芽夜蛾 YHD2 虫系是在室内经过人工筛选得到的,对 Cry1Ac 具有 1 万倍以上的抗性,且表现为隐性遗传。经过回交连锁分析,将该虫系的抗性主效基因定位在第 9 连锁群上 2 个分子标记之间,命名为 *BTR-4*,是第 1 个被鉴定的 *Bt* 抗性基因。克隆发现的 *BTR-4* 是一个已发生突变的钙黏蛋白基因,在第 5 个钙黏蛋白的编码序列中插入了 1 个反转座子,导致该钙黏蛋白的编码提前终止,失去了与 Cry1Ac 结合的能力,从而使烟芽夜蛾对 Cry1Ac 毒素产生高度抗性<sup>[18]</sup>。随后,人们又从 *Bt* 转基因棉中筛选获得了 7 个 Cry1Ac 抗性虫系,有研究表明它们的抗性都是由钙黏蛋白基因的突变造成的<sup>[19]</sup>。

利用 cDNA-AFLP 方法分析了室内筛选的棉铃虫抗、感 2 种品系基因间的差异,发现抗性虫系体内的 APN 缺失了可与 Cry1Ac 结合的片段,导致毒素不能与受体结合而使昆虫对

其产生抗性,说明棉铃虫抗性品系中 APN 基因的缺失突变与 Cry1Ac 的抗性相关<sup>[20]</sup>。最近鉴定出 1 个烟芽夜蛾抗性品系的抗性等位基因,该基因由 1 个编码 ATP 结合盒(ABC, ATP-binding cassette)转运蛋白分子的基因突变而来。这一基因的突变影响了 Cry1A 毒素与烟芽夜蛾中肠 BBMV 的结合,说明 ABC 转运蛋白分子可能作为一个新的 Cry1A 毒素受体,与低聚物和细胞膜的结合有关<sup>[21]</sup>。

以家蚕为研究对象,通过图位克隆鉴定出 15 号染色体上一个候选基因 BGIBMGA007792-93,该基因以隐性方式控制家蚕对 Cry1Ab 的抗性。与上述烟芽夜蛾相似,该基因也编码一个 ABC 转运蛋白分子,且在家蚕中肠中表达<sup>[22]</sup>。

#### 5 昆虫对 *Bt* 毒素抗性研究前景

由于多种昆虫对毒素产生抗性的机理基本相似,在不同 *Bt* 毒素间容易产生交互抗性,且 *Bt* 品系和杀虫毒素间的交互抗性型也会随不同的抗性昆虫而有所不同<sup>[23]</sup>。虽然已对抗性的发生鉴定出多种潜在机理,但昆虫对 *Bt* 抗性的机理并无定论,分子生物学技术的发展有助于进一步研究不同昆虫对不同 *Bt* 毒素产生抗性的机制,从而进一步筛选、利用最高效的 *Bt* 毒素,发展多样化的 *Bt* 制剂及转 *Bt* 基因作物。

随着对 *Bt* 毒素受体等研究的深入,逐渐明确昆虫对 *Bt* 制剂或转 *Bt* 植物产生抗性的机制,以更好地持续利用 *Bt* 毒素这一珍贵的生物杀虫剂资源<sup>[24]</sup>。同时,陆续发现新的 *Bt* 毒素受体,这些新的受体基因的功能及其产生的突变与 *Bt* 抗性的关系成为未来昆虫对 *Bt* 毒素抗性机制研究的重点之一。这些研究为农林害虫的抗性监测和提出预防性的抗性治理策略提供了科学依据,这对我国 *Bt* 毒素制剂及转 *Bt* 植物的可持续应用具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Aibrahim M, Griko N, Junker M, et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective [J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(1): 31-50.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775-806.
- [3] Bravo A, Gill S S, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control [J]. *Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2007, 49(4): 423-435.
- [4] Crickmore N, Zeigler D R, Schnepf E, et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 807-813.
- [5] 赖云松,王亚,涂巨民. ICP 蛋白和 VIP 蛋白杀虫机理和毒性专一性的分子基础 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(5): 680-690.
- [6] 赵新民,夏立秋,王发祥,等. 昆虫对 *Bt* 毒素产生抗性的分子机制 [J]. *生命的化学*, 2007, 27(5): 421-424.
- [7] 王莉,李学锋,徐宝仁,等. *Bt* 杀虫晶体蛋白受体分子的结构与功能 [J]. *昆虫学报*, 2006, 49(6): 1009-1016.
- [8] 王骞春,高继国,宋福平,等. 昆虫 *Bt* 毒素受体类钙黏蛋白研究进展 [C]// 科技创新与绿色植保——中国植物保护学会 2006 学术年会论文集. 昆明: 中国植物保护学会, 2006: 103-108.

周东果,董美超,李进学,等. 嫁接不同柠檬接穗对植株生长的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):151-154.

# 嫁接不同柠檬接穗对植株生长的影响

周东果,董美超,李进学,杜玉霞,李 晶,朱春华,岳建强

(云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所,云南瑞丽 678600)

**摘要:**选择柠檬健康、缺锌、缺氮、感染碎叶病、感染黄龙病、综合征感病枝条的接穗,以枳作砧木进行嫁接,对不同接穗的柠檬植株生长与形态进行调查。结果表明,不同接穗对柠檬成活率、生长有显著的影响;健康接穗,植株综合表现效果最好,发芽率高,分枝数多,生长速度较快;感染碎叶病的接穗植株综合表现显著低于其他处理,效果最差。因此,在柠檬种苗繁育过程中选择健康植株接穗进行嫁接繁育,是提高柠檬种苗成活率、良种健康苗木繁育的前提保障。

**关键词:**柠檬;接穗;嫁接;生长

**中图分类号:** S666.504+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0151-04

柠檬(*Citrus limon*)属芸香科柑橘属枸橼类常绿树<sup>[1]</sup>,在世界四大类柑橘(甜橙、宽皮柑橘、柠檬、柚类)中,柠檬栽培面积居第3位,占柑橘栽培总面积的11%。柠檬全身都是宝,用途广泛,是鲜食、加工兼用的高档水果,具有降血脂、降血糖、止咳、清热、开胃等功效,同时,柠檬的深加工产品也广泛应用在食品、饮料、化工、美容、保健、医疗和环卫等行业

收稿日期:2013-10-04

基金项目:现代农业(柑橘)产业技术体系柠檬综合试验站建设专项(编号:CARS-27);公益性行业(农业)专项(编号:201403036);云南省德宏州柠檬产业化创新团队项目[编号:(德科创2012)001];云南省德宏州创新人才培养计划(编号:德创人才2012-1-3);云南省院士工作站建设项目(编号:20121B018)。

作者简介:周东果(1969—),女,云南梁河人,副研究员,主要从事热带果树育种与良种繁育研究。Tel:(0692)6661069。

通信作者:岳建强,研究员,主要从事热带果树栽培与育种研究。Tel:(0692)6660150;E-mail: yiq7009@163.com。

业<sup>[2-4]</sup>。柠檬主要分布在热带和亚热带地区,目前世界上已有60多个国家生产柠檬,其中主产国有印度、墨西哥、阿根廷、巴西、中国、美国等<sup>[5-6]</sup>。在中国,柠檬主要分布在四川、云南、重庆、广东、广西、福建、海南、台湾等地。近几年,云南省德宏州柠檬栽培发展规模较大,品种以尤力克和费米耐劳柠檬为主,产业的发展需要大量的健康种苗。健康无毒优质种苗已成为制约产业发展的重要因素,而优质苗木的繁育工作一直都是果树产业关注的焦点<sup>[7]</sup>。长期以来,产区生产柠檬种苗,在脱毒种苗不能完全保障时,部分产区繁育种苗的接穗选择直接源大田果园,导致不能确保选择到完全健康的接穗,而且若选择了感病、缺素的枝条进行嫁接,对种苗繁育将产生很大的影响。柠檬的嫁接技术有一定的突破<sup>[8-9]</sup>,但在嫁接接穗的选择方面未见相关研究报道。柠檬病害种类很多,有黄龙病、碎叶病、流胶病、裂皮病、疮痂病等<sup>[10]</sup>,此外还有一些非传染性病害如缺素等。本研究选择不同柠檬接穗嫁接进行比较,旨在为柠檬良种繁育提供指导。

[9]马文静,韩兰芝,尹新明,等. 鳞翅目昆虫氨肽酶N与Bt毒素的结合及其与Bt抗性的关系[J]. 环境昆虫学报,2011,33(3):378-387.

[10]李赛男. 昆虫中肠Bt毒素受体氨肽酶N的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2523-2525.

[11]张 应,梁革梅,雷朝亮,等. 昆虫Bt作物抗性与中肠类钙粘蛋白的关系[J]. 中国农业科技导报,2008,10(1):28-33.

[12]梁革梅,王桂荣,徐 广,等. 昆虫Bt毒素受体蛋白的研究进展[J]. 昆虫学报,2003,46(3):390-396.

[13]常彦婷,宋新英,于风欣,等. 昆虫对Bt的抗性反应及其机制研究进展[J]. 河北林果研究,2013,28(3):259-264.

[14]徐宝梁,刘小侠,宋 丽,等. 昆虫对Bt蛋白的抗性机理及抗性治理[C]//第五届生物多样性保护与利用高新技术国际研讨会暨昆虫保护、利用与产业化国际研讨会论文集. 北京:中国植物保护学会,2005:565-569.

[15]谭声江,陈晓峰,李典谟. 昆虫对Bt毒素的抗性机理研究进展[J]. 昆虫知识,2001,38(1):12-17.

[16]申本昌,乔传令. 昆虫产生Bt抗性的分子机制[C]//昆虫学创新与发展——中国昆虫学会2002年学术年会论文集. 南宁:中国昆虫学会,2002:309-311.

[17]吴红波,张永春. 昆虫对Bt毒素抗性监测和治理策略研究进展[J]. 贵州农业科学,2005,33(3):93-96.

[18]杨 宙,康美花,陈红萍,等. 目标昆虫对Bt杀虫晶体蛋白抗性的研究概况[J]. 江西农业学报,2012,24(2):80-82,85.

[19]韩岚岚,赵奎军,张 杰. 昆虫类钙粘蛋白与Bt CryIA蛋白之间的相互作用[J]. 昆虫知识,2009,46(2):203-209.

[20]常洪雷,梁革梅,于宏坤,等. 棉铃虫Bt毒素受体蛋白-氨肽酶N与抗性的关系[J]. 植物保护,2007,33(1):1-5.

[21]Bravo A, Likitvatanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431.

[22]Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(25): E1591-E1598.

[23]梁革梅,谭维嘉,郭予元. 棉铃虫对Bt的抗性筛选及交互抗性研究[J]. 中国农业科学,2000,33(4):46-53.

[24]刘凯于,姚汉超,杨 红,等. 昆虫中肠Bt杀虫晶体蛋白毒素受体氨肽酶N的研究进展[J]. 昆虫知识,2004,41(3):203-207.