

苏云金芽胞杆菌在马铃薯甲虫防治上的研究进展

任 羽^{1*} 郭文超^{2,3}

(1. 喀什大学生命与地理科学学院, 叶尔羌绿洲生态与生物资源研究实验室, 新疆 喀什 844000; 2. 新疆农业科学植物保护研究所, 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室, 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆特殊环境微生物实验室, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 马铃薯甲虫是重要的入侵害虫, 严重威胁着我国粮食作物马铃薯的生产。苏云金芽胞杆菌是重要的农业害虫生防细菌, 对马铃薯甲虫有良好的防治效果。本文围绕苏云金芽胞杆菌在马铃薯甲虫防治上的研究进展与应用进行综述。主要从马铃薯甲虫的入侵与防治手段、苏云金芽胞杆菌的晶体蛋白结构与杀虫机制、对马铃薯甲虫有活性的Bt毒蛋白研究进展、Bt毒蛋白对马铃薯甲虫的作用机制以及马铃薯甲虫对Bt毒蛋白的抗性机制等方面进行了综述。最后, 从Bt新基因的挖掘和杀虫机理方面对苏云金芽胞杆菌在马铃薯甲虫防治上的研究进行了展望。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 杀虫晶体蛋白; 马铃薯甲虫; 生物防治

Research progresses in the control of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) using the *Bacillus thuringiensis*

Ren Yu^{1*} Guo Wenchao^{2,3}

(1. Laboratory on Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis, College of Biological and Geographical Sciences, Kashi University, Kashi 844000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. Key Laboratory of Integrated Management of Crop Pests in Northwest Desert Oasis, Ministry of Agriculture; Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 3. Xinjiang Special Environmental Microbiology Laboratory, Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) is an important invasive pest and poses a threat to the production of potato in China. *Bacillus thuringiensis* is a kind of biocontrol bacteria for the agricultural pests and effective in the control of the Colorado potato beetle. This article reviewed the progresses and applications of *B. thuringiensis* in the control of Colorado potato beetle, including the invasion of Colorado potato beetle, the structure and insecticidal mechanism of the crystal toxins of *B. thuringiensis*, the Bt toxins active to Colorado potato beetle, the toxic mechanism of Bt crystal proteins on the Colorado potato beetle and the resistance mechanism of Colorado potato beetle to Bt toxins. It was prospected that the Colorado potato beetle could be controlled through conducting Bt researches in terms of new gene mining and insecticidal mechanisms.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein; *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Colorado potato beetle); biological control

马铃薯是仅次于玉米、小麦和水稻的第四大粮食作物, 全世界种植面积达0.25亿hm²。据国家农业

基金项目: 喀什大学高层次人才引进计划(GCC14ZK-001), 新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2013S25), 新疆维吾尔自治区科技创新团队(201475002)

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: renyu1020@aliyun.com

收稿日期: 2016-07-17

部编撰的《中国农业统计资料》显示,2013年我国马铃薯种植面积为561.46万 hm^2 ,总产量为1 918.8万t,马铃薯种植面积和总产量跃居世界第一。到2020年我国马铃薯播种面积将达到796.7万 hm^2 ,总产量达到12 030.7万t(张千友和罗雪妹,2016)。马铃薯是贫困地区农民生活和增收的重要基础,马铃薯产业在我国具有良好的发展前景(谢从华,2012)。

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say) 又称蔬菜花斑虫、科罗拉多甲虫 (Colorado potato beetle), 属鞘翅目叶甲科, 是世界有名的毁灭性检疫害虫, 主要为害茄子、马铃薯和西红柿等茄科蔬菜, 可造成30%~50%的产量损失, 严重者减产可达90%, 甚至绝收, 在世界范围内每年因马铃薯甲虫造成的马铃薯产量损失达50亿美元(郭文超等, 2014)。

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 是一种分布非常广泛的革兰氏阳性菌, 属于芽胞杆菌科的芽胞杆菌属。在芽孢形成过程中可产生伴胞晶体蛋白, 又称为 δ -内毒素、杀虫晶体蛋白或毒蛋白, 而将编码这种蛋白的基因统称为Bt基因。苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白对鳞翅目、鞘翅目、双翅目和膜翅目等主要农业害虫都有良好的胃毒效果, 对脊椎动物无毒, 对生态环境安全(Faust et al., 1983)。

本文从马铃薯甲虫的入侵与防治、Bt杀虫晶体蛋白的种类与作用机制、Bt在马铃薯甲虫防治上的研究进展和马铃薯甲虫的抗性机制等几个方面进行综述, 并从Bt新基因的挖掘和杀虫机理方面对苏云金芽胞杆菌在马铃薯甲虫防治上的研究进行展望, 旨在推动马铃薯甲虫与Bt杀虫晶体蛋白的相关研究, 为利用Bt持续治理马铃薯甲虫提供参考。

1 马铃薯甲虫的入侵与防治

1.1 马铃薯甲虫的生物入侵

马铃薯甲虫原产于美国落基山脉东坡, 1993年由欧洲自西向东侵入我国新疆维吾尔自治区天山以北大部分区域, 2013年由俄罗斯侵入我国吉林省部分地区。由于马铃薯甲虫具有极强的生理生态适应能力, 受温度、水分、地形、寄主植物和水流气流的影响, 马铃薯甲虫在我国由东北各省及内蒙古自治区向华北和西南马铃薯产区扩散蔓延和定殖的风险很大, 如果不加强监测和防控, 将对华北和西南等马铃薯产区的安全生产造成巨大威胁(李超, 2013; 郭文超等, 2014)。

1.2 马铃薯甲虫的防治

马铃薯甲虫的防治方法有物理、化学和生物防

治方法。物理防治方法主要指传统的农艺措施, 缺点是人力成本高, 且不能完全根除, 一旦外界条件合适马铃薯甲虫仍会大暴发。化学防治方法最大的优点是高效, 但容易使马铃薯甲虫产生抗性(王志田等, 2010)。2008年以来, 我国的科技工作者对马铃薯甲虫实施了监测和综合防控措施, 有效控制了马铃薯甲虫的传播扩散(郭文超等, 2013)。其中, 生物防治是害虫综合防控的重要手段, 体现在“以虫治虫”或“以菌治虫”, 具有安全、无污染、防效持久和成本低廉等特点。生物防治方法主要包括: 马铃薯甲虫天敌的选育、生物杀虫剂的开发、转基因抗虫马铃薯的培育和RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术的应用, 其中生物工程菌制剂和转基因抗虫基因主要来源之一是苏云金芽胞杆菌。

2 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白

2.1 晶体蛋白分类

杀虫晶体蛋白可分为胞内晶体蛋白基因家族(crysal protein gene, Cry)和胞外溶解性晶体蛋白基因家族(cytolytic protein gene, Cyt); 而按其同源性已被分为Cry1~Cry74、Cyt1、Cyt2、Cyt3共77类, 每一类以下的家族则以大写字母A、B等表示, 例如Cry1具有Cry1A~Cry1N共14个家族, 每个家族的成员则以小写字母表示, 如Cry1Aa、Cry1Ab和Cry1Ac等(Crickmore et al., 2016)。研究发现, Cry3类杀虫晶体蛋白对鞘翅目有一定的毒杀效果(Palma et al., 2014)。

2.2 晶体蛋白结构

晶体蛋白结构的电镜观察和SDS-PAGE分析表明, 不同Bt菌株中含有的杀虫晶体蛋白在数量、种类和结构上具有很大差异, 从而表现出Bt晶体蛋白的多样性(Cancino-Rodezno et al., 2010; Dammak et al., 2012)。Bt晶体蛋白有菱形、方形、圆形和不规则形, 其分子质量大致有3个范围: 129~138 kD、65~78 kD和25~28 kD。对Cry3Aa、Cry1Aa和Cyt2A三种杀虫蛋白的X射线衍射晶体图谱分析表明, Cry3Aa和Cry1Aa的氨基酸同源性为36%, 二者均包含3个不同的结构域: 结构域I由第1~290个氨基酸组成, 含有7个 α 螺旋, 其中6个两性的 α 螺旋包裹着1个疏水的 α -5螺旋; 结构域II由第291~500个氨基酸组成, 是3个 β -折叠片层构成的 β -棱柱结构, 每个 β -折叠片层是由4个反向平行的 β -折叠构成的“Greek Key”结构; 结构域III由第504~644个氨基酸残基构成, 是2个弯曲的反向平行的 β -折叠构成的

“ β -三明治”结构(Bravo et al., 2013)。研究Bt菌株杀虫晶体蛋白的多样性、蛋白结构特点和体外进化过程,对阐明Bt的杀虫机理和发掘新型毒蛋白具有重要意义(Bravo et al., 2013)。

2.3 晶体蛋白作用机理

经典的Cry蛋白作用模型主要分为2类。当杀虫晶体蛋白被昆虫取食后,进入昆虫中肠道,晶体溶解,杀虫蛋白分子从晶体点阵结构中释放出来,被蛋白酶水解成65~70 kD的活性毒素分子。活性毒素分子与中肠肠道上皮刷状缘膜囊泡(brush border membrane vesicle, BBMV)上的一系列受体位点结合,形成离子通道,使细胞的离子平衡和渗透压平衡遭到破坏,引发昆虫败血症,导致昆虫停止取食并最终死亡,即“孔洞”模型。另一种是“信号传导”模型,Cry蛋白与特异的受体结合,先后激活G蛋白、腺苷酸环化酶和蛋白激酶A等,导致细胞骨架稳定性下降,形成离子通道,细胞死亡(Zhang et al., 2006)。虽然2个模型描述Cry蛋白致死的原因不同,但起始步骤类似,即Cry毒素经昆虫肠道消化后,先与中肠BBMV上的受体结合再发挥相应的功能(彭琦等, 2015)。因为脊椎动物体内尚未发现Bt蛋白受体,所以,杀虫晶体蛋白对脊椎动物无毒性(Hernández-Rodríguez et al., 2009)。

3 对马铃薯甲虫有活性的Bt晶体蛋白

Hough-Goldstein et al. (1991)首先发现了圣地亚哥亚种*Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*和拟步甲变种*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrions*均可产生对马铃薯甲虫具有致死作用的毒素。*tenebrions*亚种产生的 β -外毒素(苏云金素)使幼虫畸变,*san diego*亚种产生的 δ -内毒素,即Bt Cry蛋白,造成靶标害虫肠道瘫痪和停止取食,在马铃薯甲虫防治中具有选择性的优势(Hare, 1990)。

Herrnstadt et al. (1987)从*san diego*亚种中克隆得到*cry3A*基因,并证明其表达产物对马铃薯甲虫和其它几种鞘翅目害虫具有毒杀作用。随后科研人员先后克隆得到*cry3Ba*(Arpaia et al., 2000; Rausell et al., 2004)、*cry3Ca*(Haffani et al., 2001)、*cry1Ba*和*cry1Ia*(Naimov et al., 2001)等对马铃薯甲虫有活性的Bt基因。

Adang et al. (1993)和Perlak et al. (1993)把*cry3A*基因中的A、T序列富集区去除,缩短为1.8 kb,遗传转化得到转基因马铃薯植株,试验结果表明获得的绝大多数转基因植株对马铃薯甲虫具有高毒杀

效果。同年,美国Monsanto公司的Fischhoff小组还利用完全改造的*cry3A*基因获得了抗鞘翅目害虫的马铃薯(Perlak et al., 1993),目前在美国转Bt基因的马铃薯已经实现商品化(杨欣等, 2010)。

Arpaia et al. (2000)研究发现,雌性马铃薯甲虫取食转*cry3B*基因的马铃薯后,生殖能力严重受损,不能产生后代。Nault (2001)试验证明,马铃薯甲虫取食转*cry3A*基因马铃薯后,存活率大幅下降,仅有不足0.5%的成虫存活下来越冬,而对照成虫的存活率达到57%。可见,转Bt *cry3A*和*cry3B*基因的马铃薯植株对马铃薯甲虫表现出较好的控制作用(Rausell et al., 2004)。

Haffani et al. (2001)成功在大肠杆菌*Escherichia coli*中获得Bt *cry3Ca1*和*cry3Aa3*的表达产物,生测结果发现,Cry3Ca1(LD₅₀=320.1 ng/mg)的杀虫毒力是Cry3Aa3(LD₅₀=672.9 ng/mg)的2倍多。Naimov et al. (2001)研究发现,Cry1Ba(LC₅₀=142 μ g/mL)和Cry1Ia(LC₅₀=33.7 μ g/mL)对马铃薯甲虫的毒力较之Cry3Aa(LC₅₀=1.84 μ g/mL)低,用Cry1Ia的结构域II替换Cry1Ba的结构域II,嵌合蛋白的LC₅₀为7.94 μ g/mL,用Cry1Ba的结构域III替换Cry1Ia的结构域III,嵌合蛋白的LC₅₀为22.4 μ g/mL,用Cry1Ia的结构域III替换Cry1Ba的结构域III,嵌合蛋白完全丧失活性。这说明结构域II和III可以改变毒蛋白与受体的结合能力,从而改变毒蛋白的杀虫特异性。Wu et al. (2000)对*cry3A*进行定点突变,突变体A1(R³⁴⁵A-Y³⁵⁰F-Y³⁵¹F)和A2(R³⁴⁵A-DeltaY³⁵⁰-DeltaY³⁵¹)对马铃薯甲虫的毒力升高,究其原因突变蛋白A1和A2与BBMV的结合能力提高了2.5倍。

蒋红玲(2001)构建了*cry1Ba*植物表达载体,转入马铃薯品种Desiree中,抗虫试验发现,马铃薯甲虫幼虫食用转基因马铃薯叶片4 d后死亡率达到100%。中国农业科学院植物保护研究所构建了*cry1Ba3*和*cry3Aa7*双价基因植物表达载体,并获得转基因马铃薯株系,在伊犁哈萨克自治州进行抗虫试验,结果显示转基因马铃薯抗虫性显著增强(张杰等, 2002; 郭文超等, 2011)。郭文超等(2007)构建了携带*cry1Ba3*和*cry3A+vhb*(透明颤菌血红蛋白)的单价和双价植物表达载体,并通过农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*转化获得了转基因抗虫马铃薯株系,室内生物测定结果显示,转基因马铃薯具有很好的杀虫活性,且田间释放均表现出良好的抗虫性(周壮志等, 2004; 郭文超等, 2007)。罗晓丽等(2010)用4个转*cry3A*基因马铃薯株系叶片喂养马铃薯甲虫

6 d后,致死率分别为30.0%、46.7%、50.0%和100.0%,幸存的马铃薯甲虫发育滞后1.4~4.2 d。

在Bt杀虫剂开发利用方面,我国科研工作者利用分子生物学技术对Bt *cry* 基因进行修饰,研制出对马铃薯甲虫高效的工程菌制剂(张杰等,2002),田间喷施量为80 g/hm²时,施用10 d后防治效果达99.30%(张杰,2000;郭文超等,2011)。Wang et al. (2008)构建了*cry3A*和*cry1B*的双效Bt工程菌,田间试验发现对马铃薯甲虫的LC₅₀达到0.19 mg/mL,且不会对非靶标生物造成不良影响。Yan et al. (2009)构建了*cry3A*和*cry8C*的双效工程菌,对马铃薯甲虫的LC₅₀达到1.74 mg/mL。由此可见,构建多效Bt工程菌,扩大Bt农药的杀虫谱和延缓马铃薯甲虫的田间抗性,是Bt杀虫剂研究的主要内容,在生产实践中具有重大意义。

4 Bt对马铃薯甲虫的作用机制

4.1 昆虫体内Bt毒蛋白水解/蛋白酶类

大量研究表明,昆虫体内的水解/蛋白酶类包括:细胞色素P450氧化物酶、谷胱甘肽-S-转移酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、酯酶、抗坏血酸盐过氧化物酶、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、解聚素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease, ADAM)和胰凝乳蛋白酶。其中,蛋白酶对Cry毒蛋白的激活起着关键作用,过程包括促进毒蛋白的溶解与活化、催化毒蛋白与昆虫中肠受体结合和调整毒蛋白的特异性与敏感性(Ochoa-Campuzano et al., 2007)。

4.1.1 碱性磷酸酶

ALP是昆虫体内的重要水解酶。Yi & Adams (2001)发现,马铃薯甲虫中肠膜结合碱性磷酸酶(m-ALP)和可溶性碱性磷酸酶(s-ALP)的催化活性与其取食活动及滞育有关。ALP表达量的降低能够减少其对Bt的阻滞,从而增强Bt制剂对目标害虫的杀伤作用。除此之外,马铃薯甲虫体内ALP与Cry3A的作用方式仍然需要深入研究。

4.1.2 解聚素金属蛋白酶

马铃薯甲虫BBMV内的ADAM参与Bt毒蛋白Cry3Aa的裂解过程,是Cry3Aa在马铃薯甲虫体内的特异性靶标(Ochoa-Campuzano et al., 2007; Rausell et al., 2007)。Cry3Aa毒蛋白的第344、346、351和353位氨基酸位点能够与马铃薯甲虫的ADAM结合并被后者所活化,将这些位点突变后发现,Cry3Aa对马铃薯甲虫的活性降低,也就是说,毒蛋

白的关键氨基酸位点突变后,ADAM不能充分结合并活化Bt毒蛋白,致使Bt毒蛋白失活(García-Robles et al., 2012)。

4.2 Bt毒蛋白与马铃薯甲虫中肠受体的互作

虽然Cry3A毒素对马铃薯甲虫具有较好的毒杀作用,但是目前对Cry3A毒蛋白在马铃薯甲虫中的靶标受体和二者的互作方式还知之甚少,与其杀虫机理有关的靶标受体可能有以下几种。

4.2.1 钙粘蛋白

钙粘蛋白(cadherins, CADHs)是Bt Cry毒蛋白的初级受体,Bt Cry毒蛋白与钙粘蛋白结合并形成寡聚体后,介导毒杀害虫的过程。因此,钙粘蛋白与Bt Cry毒蛋白的协同作用是昆虫毒理学研究的热点。黄粉虫 *Tenebrio molitor* Linnaeus 的钙粘蛋白TmCad1片段TmCad1p可特异性地与Bt Cry3Aa结合并促使Cry3Aa形成寡聚体,将dsRNA注射到黄粉虫幼虫而使对应基因 *TmCad1* 沉默表达以后,钙粘蛋白TmCad1含量显著下降,处理的幼虫对Bt Cry3Aa的抗性明显增强(Fabrick et al., 2009)。有研究表明,棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)对Cry1Ac产生抗性与钙粘蛋白的点突变有关(Zhang et al., 2012a)。由此推断,如若马铃薯甲虫对Cry3A产生抗性,那与钙粘蛋白受体的突变可能具有直接关系(Zhang et al., 2012b)。玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera* LeConte 中肠钙粘蛋白与Cry3A或Cry3B混合,提高了后者对马铃薯甲虫的毒力,分别为混合前的3.7倍和6.4倍,混合后Cry3A和Cry3B毒杀玉米根萤叶甲的增效倍数分别是混合前的2.9倍和8.4倍(Park et al., 2009)。刘京国等(2011)研究发现,黄粉虫类钙粘蛋白对Cry3A毒蛋白的杀虫活性也有类似的增效作用,黄粉虫从食物中摄取的一类钙粘蛋白首先与Bt Cry毒蛋白结合,促进后者寡聚化,然后寡聚体再与中肠BBMV的次级受体结合,具有毒杀害虫的功能。对马铃薯甲虫转录组的分析发现,马铃薯甲虫的钙粘蛋白与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)的钙粘蛋白TcCad1相似性较高(Kumar et al., 2014),在今后的研究工作中需要进一步确认钙粘蛋白与Cry3A在马铃薯甲虫中肠内的相互作用关系。

4.2.2 钙调蛋白、抑制素和氨肽酶N

钙调蛋白(calmodulins, CaMs)能够与Cry3Aa结构域I的N256~V271结合,因此与Bt毒蛋白的杀虫有关(Ochoa-Campuzano et al., 2012)。另外,马铃薯甲虫中肠细胞膜上存在的抑制素Prohibitin也能

够影响到Bt毒蛋白发挥功能(Ochoa-Campuzano et al., 2013)。氨肽酶N(aminopeptidase N, APN)也是Bt毒蛋白的受体蛋白, APN上毒素结合位点数目的改变导致昆虫对Bt产生抗性。马铃薯甲虫中肠上是否存在Cry3A特异性的APN受体, 尚需试验证实。

目前, Bt Cry3杀虫晶体蛋白对赤拟谷盗和黄粉虫的致死机理研究较多(Oppert et al., 2011), 基于马铃薯甲虫的食性和解毒代谢途径比前二者复杂的缘故, 若想对Cry3A与马铃薯甲虫的相互关系做出系统完整的研究尚需时日。在马铃薯甲虫转录组等大数据的支持下(Kumar et al., 2014), 希望通过生物信息学和RNAi等技术可以在马铃薯甲虫体内发现新型Bt毒蛋白靶标受体和水解/蛋白酶代谢途径, 早日揭示Bt晶体蛋白对马铃薯甲虫的毒杀机制。

5 马铃薯甲虫的抗性机制研究

Whalon et al. (1993)首次发现马铃薯甲虫对Bt Cry3A毒素产生抗性的现象, 并通过室内选育12代, 获得了对Bt产生59倍抗性的马铃薯甲虫抗性品系, 此品系与敏感品系相比, 产卵率下降。另有研究发现, 马铃薯甲虫对Bt田间抗性的产生比较缓慢。如德国的2个马铃薯甲虫种群, 一个种群自从1993年就开始使用Bt防治, 而另一个种群从未利用Bt防治, 但这2个种群对Bt的敏感性水平却没有明显差异(Gegenwart & Langenbruch, 2001)。转Bt基因植物的应用具有很高的经济价值, 在其商业释放的同时, 抗性的产生不可避免(Krattiger, 1997)。因此今后工作重点是研究害虫对Bt的抗性机制, 提出针对性的对策, 以延缓害虫对Bt的抗性进化。马铃薯甲虫对Bt产生抗性是行为、生理和代谢等多种因素综合作用的结果, 而上述因素受遗传因素控制(Heckel, 1994)。

5.1 生理生化和代谢研究

Bt毒蛋白作用靶标的突变是抗性产生的主要形式, 是抗性遗传机制最直接的证据(Heckel, 1994)。其中蛋白酶活性发生变化, 导致Bt Cry毒素对蛋白酶的靶标特异性、敏感性和溶解性受到影响(Ochoa-Campuzano et al., 2007)。Loseva et al. (2002)利用室内选育的对Cry3Aa产生300倍抗性的马铃薯甲虫品系进行酶谱分析, 发现抗、感品系中肠消化液中的蛋白酶活性谱明显不同, 抗性品系中不仅蛋白酶的活性明显升高, 而且具有敏感品系没有的酶条带, 结合试验结果显示, 抗性品系的BBMV对Cry3Aa的结合量比敏感品系减少60%。这表明马

铃薯甲虫对Cry3Aa的抗性与中肠蛋白酶活性的改变及毒素结合力的下降有关。

另外, 抗性的产生与昆虫对杀虫剂代谢功能的提高有关, 即昆虫体内的解毒酶能将杀虫剂代谢分解。代谢抗性机制中的解毒酶包括: 多功能氧化酶(如细胞色素P450等)、酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶等(Heckel, 1994)。本课题组用苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白Cry8E饲喂马铃薯甲虫, 中肠酶系活性测定结果发现, 在不同的亚致死剂量和不同龄期幼虫处理条件下, 以过氧化氢酶为代表的保护酶和以羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽-S-转移酶为代表的解毒酶活性呈现规律性变化(任羽等, 2016)。

5.2 抗性行为研究

马铃薯甲虫在取食Bt Cry3A毒素后, 飞行能力增强, 表现出逃离这种毒素环境的行为。抗Bt的马铃薯甲虫的相对适合度明显下降, 例如雌虫交配次数、产卵量及后代幼虫数量都比敏感品系明显减少, 而越冬滞育数却是敏感品系的2倍(Alyokhin & Ferro, 1999)。

Gould (1988)提出一个问题, 棉铃虫的寄主是棉花和大豆, 如果突然面对大面积的能够导致80%死亡率的抗性棉花(比如Bt棉), 棉铃虫是在生理上产生适应而使抗性棉(Bt棉)失去价值, 还是在行为上适应转而去以大豆为食? 这个问题很难回答。实际上生理生化抗性机制和行为抗性机制可能同时存在, 害虫产生哪种机制是依照具体情况而定的。如在转Bt玉米中, CryIA(a)的表达需要光激活磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化酶启动子, 一方面, 害虫能够通过生理代谢忍受低量表达的Bt毒蛋白, 另一方面, 由于心叶见光少, 所以害虫一般都在心叶中生活(Bergvinson et al., 1997)。

从不同抗性品系间的比较、经典遗传学研究及遗传标记连锁的研究来看, 抗性产生的遗传基础非常复杂, 导致昆虫对Bt的抗性种类多样。研究马铃薯甲虫对Bt产生抗性的生化和遗传基础将有助于制定合理的抗性治理措施, 为Bt生物农药及转Bt马铃薯的持续利用提供保障(魏伟等, 1999; 常菊花等, 2007)。

6 展望

马铃薯甲虫在我国西北边疆已经得到控制, 但从东北和内蒙古自治区传入内地的风险依然很大(张正坤, 2012)。利用Bt对马铃薯甲虫进行防治的前景广阔。一方面, 我国拥有丰富的Bt资源, 利用

高通量基因测序技术,发掘新的对马铃薯甲虫高效的Bt基因仍然是今后研究的主要方向。另一方面,随着Cry蛋白与受体互作方式的逐渐明确,科研工作者能够对已有基因进行改造,提高Cry蛋白的毒力和拓宽其杀虫谱,为开发工程菌制剂和构建转基因植株奠定基础(Mi et al., 2015);马铃薯甲虫对Cry蛋白产生抗性是由于受体基因突变或表达量下调所引起的,因此,Cry蛋白与受体的互作是杀虫机理研究的热点(Wu & Tian, 2013)。最后,阐明马铃薯甲虫对Bt的抗性机制,能够为Bt杀虫蛋白的推广应用奠定理论基础,同时也为Bt蛋白的定向改造提供方向。总之,利用Bt防治马铃薯甲虫是一项系统工程,需要全面深入地开展研究工作,为马铃薯甲虫的有效控制提供理论基础和技术手段。

参 考 文 献 (References)

- Adang MJ, Brody MS, Cardineau G, Eagan N, Roush RT, Shewmaker CK, Jones A, Oakes JV, McBride KE. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*, 21(6): 1131–1145
- Alyokhin AV, Ferro DN. 1999. Relative fitness of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) resistant and susceptible to the *Bacillus thuringiensis* Cry3A toxin. *Journal of Economic Entomology*, 92(3): 510–515
- Arpaia S, de Marzo L, di Leo GM, Santoro ME, Mennella G, van Loon JJA. 2000. Feeding behaviour and reproductive biology of Colorado potato beetle adults fed transgenic potatoes expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry3B endotoxin. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95(1): 31–37
- Bergvinson D, Willcox M, Hoisington D. 1997. Efficacy and deployment of transgenic plants for stemborer management. *International Journal of Tropical Insect Science*, 17(1): 157–167
- Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6(1): 17–26
- Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villaseñor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, Soberón M, Gill SS, Bravo A. 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1): 58–63
- Chang JH, Liu FY, Xu ZP, Shen JL. 2007. Advances in inheritance mode of pest resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Modern Agrochemicals*, 6(5): 5–13 (in Chinese) [常菊花, 刘凤沂, 须志平, 沈晋良. 2007. 害虫对Bt抗性遗传方式的研究进展. *现代农药*, 6(5): 5–13]
- Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. 2016. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.btnomenclature.info/>
- Dammak M, Ali MB, Jaoua S, Tounsi S. 2012. Amino acids Y229 and F603 are involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin stability and toxicity. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1): 54–60
- Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, Morris K, Oppert B, Jurat-Fuentes JL. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(27): 18401–18410
- Faust GM, Abe K, Held GA, Lizuka T, Bulla LA, Meyers CL. 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, 9(1): 98–103
- García-Robles I, Ochoa-Campuzano C, Sánchez J, Contreras E, Real MD, Rausell C. 2012. Functional significance of membrane associated proteolysis in the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin against Colorado potato beetle. *Toxicon*, 60(6): 1063–1071
- Gegenwart G, Langenbruch GA. 2001. Monitoring the susceptibility of two *Leptinotarsa decemlineata* (Say) populations to *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 36(1/2): 75–80
- Gould F. 1988. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *BioScience*, 38(1): 26–33
- Guo WC, Deng CS, Li GQ, Deng JY, Jiang WH, Wu JH, Wang PL, Tan WZ, Zhang QW. 2011. Progress in biological control techniques of Colorado potato beetle in China. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 48(12): 2217–2222 (in Chinese) [郭文超, 邓春生, 李国清, 邓建宇, 姜卫华, 吴家和, 王佩玲, 谭万忠, 张青文. 2011. 我国马铃薯甲虫生物防治技术研究进展. *新疆农业科学*, 48(12): 2217–2222]
- Guo WC, Tan WZ, Zhang QW. 2013. The biology, ecology and comprehensive control of the invasive insects — potato beetle. Beijing: Science Press, pp. 2–460 (in Chinese) [郭文超, 谭万忠, 张青文. 2013. 重大外来入侵害虫马铃薯甲虫生物学、生态学与综合防控. 北京: 科学出版社, pp. 2–460]
- Guo WC, Tursun · Ahmat, Cheng DF, Tan WZ, Zhang ZK, Li GQ, Jiang WH, Deng JY, Wu JH, Deng CS, et al. 2014. Main progress on biology and ecology of Colorado potato beetle and countermeasures of its monitoring and controlling in China. *Plant Protection*, 40(1): 1–11 (in Chinese) [郭文超, 吐尔逊·阿合买提, 程登发, 谭万忠, 张正坤, 李国清, 姜卫华, 邓建宇, 吴家和, 邓春生, 等. 2014. 我国马铃薯甲虫主要生物学、生态学技术研究进展及监测与防控对策. *植物保护*, 40(1): 1–11]
- Guo WC, Tursun · Ahmat, Zhou J, He J, Tian YC. 2007. Preliminary report on the genetic expression of Colorado potato beetle resistant to the potato transferred by *cry3A* and *vhb* genes. //Cheng ZM. Proceeding of Academic Annual Conference of Botanical China Society of Plant Protection in 2007: Plant Protection and Modern Agriculture. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 489–494 (in Chinese) [郭文超, 吐尔逊·阿合买提, 周俊, 何江, 田颖川. 2007. 转 *cry3A* 和 *vhb* 基因马铃薯对蔬菜花斑虫抗性表达研究初报. //成卓敏. 植物保护与现代农业——中国植物保护学会2007年学术年会论文集. 北

- 京: 中国农业科技出版社, pp. 489–494]
- Haffani YZ, Cloutier C, Belzile FJ. 2001. *Bacillus thuringiensis* Cry3Ca1 protein is toxic to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biotechnology Progress*, 17(2): 211–216
- Hare JD. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annual Review of Entomology*, 35: 81–100
- Heckel DG. 1994. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol Science & Technology*, 4(4): 405–417
- Hernández-Rodríguez CS, Boets A, van Rie J, Ferré J. 2009. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1): 219–225
- Hernstadt C, Gilroy TE, Sobieski DA, Bennett BD, Gaertner FH. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene*, 57(1): 37–46
- Hough-Goldstein J, Tisler AM, Zehnder GW, Uyeda KA. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. *Journal of Economic Entomology*, 84(1): 87–93
- Jiang HL. 2001. Construction of plant expression vectors harboring Bt insecticidal *cry1Ba* & *cry3A* genes and obtaining of pest-resistant potato transformants. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [蒋红玲. 2001. Bt 杀虫基因双价植物表达载体的构建及抗虫马铃薯植株的获得. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Krattiger AF. 1997. Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries (ISAAA Briefs No. 2). New York: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
- Kumar A, Congiu L, Lindström L, Piironen S, Vidotto M, Grapputo A. 2014. Sequencing, *de novo* assembly and annotation of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome. *PLoS ONE*, 9(1): e86012
- Li C. 2013. Research on diffusion law of *Leptinotarsa decemlineata* based on GIS in Xinjiang, China. Ph. D Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [李超. 2013. 基于 GIS 的新疆马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say) 扩散规律研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Liu JG, Shen XH, Li TC, Zhang Y, Yang AZ, Shi GL. 2011. The effect of cadherin on the insecticidal activity of Cry3A toxin. *Journal of Plant Protection*, 38(5): 466–470 (in Chinese) [刘京国, 申晓鸿, 李彤春, 张玉, 杨爱珍, 师光禄. 2011. 类钙粘蛋白对 Cry3A 毒素杀虫活性的影响. *植物保护学报*, 38(5): 466–470]
- Luo XL, Yang X, Guo WC, Tian YC, Fu WJ, Wu JH. 2010. The analysis of expression of *cry3A* gene and resistance to Colorado potato beetle in transgenic potato lines. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 38(11): 3–5, 12 (in Chinese) [罗晓丽, 杨欣, 郭文超, 田颖川, 付文君, 吴家和. 2010. 转 *cry3A* 基因马铃薯外源蛋白表达和对马铃薯甲虫抗性分析. *山西农业科学*, 38(11): 3–5, 12]
- Loseva O, Ibrahim M, Candas M, Koller CN, Bauer LS, Bulla LA Jr. 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(5): 567–577
- Mi XX, Ji XZ, Yang JW, Liang LN, Si HJ, Wu JH, Zhang N, Wang D. 2015. Transgenic potato plants expressing *cry3A* gene confer resistance to Colorado potato beetle. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7): 443–450
- Naimov S, Weemen-hendriks M, Dukiandjiev S, de Maagd RA. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11): 5328–5330
- Nault BA. 2001. Survival and fecundity of Bt-susceptible Colorado potato beetle adults after consumption of transgenic potato containing *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry3A toxin. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3): 265–272
- Ochoa-Campuzano C, Martínez-Ramírez AC, Contreras E, Rausell C, Real MD. 2013. Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(3): 299–308
- Ochoa-Campuzano C, Real MD, Martínez-Ramírez AC, Bravo A, Rausell C. 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(2): 437–442
- Ochoa-Campuzano C, Sánchez J, García-Robles I, Real MD, Rausell C, Sánchez J. 2012. Identification of a calmodulin-binding site within the domain I of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 81(1): 53–62
- Oppert B, Morgan TD, Kramer KJ. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. *Pest Management Science*, 67(5): 568–573
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12): 3296–3325
- Park Y, Abdullah MAF, Taylor MD, Rahman K, Adang MJ. 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10): 3086–3092
- Peng Q, Zhou ZS, Zhang J. 2015. Research prospects in insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(5): 712–722 (in Chinese) [彭琦, 周子珊, 张杰. 2015. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白研究进展. *中国生物防治学报*, 31(5): 712–722]
- Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, et al. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, 22(2): 313–321
- Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-

- Ramírez AC, Real MD, Bravo A. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1/2): 99–105
- Rausell C, Ochoa-Campuzano C, Martínez-Ramírez AC, Bravo A, Real MD. 2007. A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(9): 2293–2299
- Ren Y, Guo WC, Yue MC, Tursun · Abdulrehman. 2016. Influence of Cry8E sublethal doses on activities of detoxifying enzymes and protective enzyme of the Colorado potato beetle larvae. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(6): 794–799 (in Chinese) [任羽, 郭文超, 岳明翠, 阿布都热合曼·吐尔逊. 2016. Cry8E亚致死浓度对马铃薯甲虫解毒酶和保护酶的影响. *中国生物防治学报*, 32(6): 794–799]
- Wang G, Zhang J, Song F, Gu A, Uwais A, Shao T, Huang D. 2008. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting nontarget species in the field. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5): 1536–1543
- Wang ZT, Jiang WH, Li GQ. 2010. Insecticide resistance in adult of the Colorado potato beetle among North Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Agrochemicals*, 49(3): 206–208 (in Chinese) [王志田, 姜卫华, 李国清. 2010. 新疆北疆马铃薯甲虫成虫抗药性水平监测. *农药*, 49(3): 206–208]
- Wei W, Qian YQ, Ma KP. 1999. Pests resistance to transgenic Bt crops and their management strategies. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 5(2): 215–228 (in Chinese) [魏伟, 钱迎倩, 马克平. 1999. 害虫对转基因Bt作物的抗性及其管理对策. *应用与环境生物学报*, 5(2): 215–228]
- Whalon ME, Miller DL, Hollingworth RM, Grafius EJ, Miller JR. 1993. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 86(2): 226–233
- Wu JH, Tian YC. 2013. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A* accumulating in chloroplasts. // Walker JM. *Transgenic cotton: methods and protocols*. Methods in Molecular Biology Series, Volume 958. Clifton: Humana Press, pp. 247–258
- Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH. 2000. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Letters*, 473(2): 227–232
- Xie CH. 2012. Potato industry: status and development. *Journal of Huazhong Agricultural University (Social Sciences Edition)*, (1): 1–4 (in Chinese) [谢从华. 2012. 马铃薯产业的现状与发展. *华中农业大学学报(社会科学版)*, (1): 1–4]
- Yan GX, Song FP, Shu CL, Liu JJ, Liu CQ, Huang DF, Feng SL, Zhang J. 2009. An engineered *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against Scarabaeidae (*Anomala corpulenta*) and Chrysomelidae (*Leptinotarsa decemlineata* and *Colaphellus bowringi*). *Biotechnology Letters*, 31(5): 697–703
- Yang X, Liang AH, Wu JH. 2010. Progress of transgenic insect-resistant potato. *Journal of Biology*, 27(3): 66–68 (in Chinese) [杨欣, 梁爱华, 吴家和. 2010. 抗虫转基因马铃薯研究进展. *生物学杂志*, 27(3): 66–68]
- Yi SX, Adams TS. 2001. Age- and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 46(3): 152–163
- Zhang HN, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu CH, Yang YH, Wu SW, Wu KM, Cui JJ, et al. 2012a. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26): 10275–10280
- Zhang HN, Wu SW, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2012b. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. *PLoS ONE*, 7(12): e53418
- Zhang J. 2000. Cloning of insecticidal cry genes to Coleopteran pests and construction genetically engineered bacteria. Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [张杰. 2000. 对鞘翅目害虫高毒力的Bt cry基因分离克隆和工程菌的构建. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhang J, Song FP, Li CY, Chen ZY, Tan JX, Huang DF. 2002. Cloning and expression of cry3Aa7 gene from *Bacillus thuringiensis* strain toxic to coleopteran pests. *Scientia Agricultura Sinica*, 35(6): 650–653 (in Chinese) [张杰, 宋福平, 李长友, 陈中义, 檀建新, 黄大昉. 2002. 对鞘翅目害虫高毒力Bt基因cry3Aa7的分离克隆及表达研究. *中国农业科学*, 35(6): 650–653]
- Zhang QY, Luo XM. 2016. Long-term trends, influencing factors and target prediction of potato production. *Rural Economy*, (7): 60–64 (in Chinese) [张千友, 罗雪妹. 2016. 马铃薯生产的长期趋势、影响因素与目标预测研究. *农村经济*, (7): 60–64]
- Zhang XB, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26): 9897–9902
- Zhang ZK, Lu X, Li JP, Zhang YC, Ding YH, Xu WJ, Du Q, Li QY, Guo WC. 2012. Monitoring of *Leptinotarsa decemlineata* in northeast China and analysis of its invasion risk. *Journal of Jilin Agricultural Science*, 37(2): 42–44 (in Chinese) [张正坤, 鲁新, 李建平, 张有才, 丁毅弘, 徐文静, 杜茜, 李启云, 郭文超. 2012. 东北地区马铃薯甲虫监测与入侵风险分析. *吉林农业科学*, 37(2): 42–44]
- Zhou ZZ, Zhou YG, He CZ, Mang KQ, Tian YC. 2004. Expression of cry3A and vhb genes in transgenic potato plants. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 31(8): 741–745 (in Chinese) [周壮志, 周永刚, 何朝族, 莽克强, 田颖川. 2004. cry3A和vhb基因在转基因马铃薯中的表达. *生物化学与生物物理进展*, 31(8): 741–745]

(责任编辑:李美娟)