

钙粘蛋白氨基酸点突变介导红铃虫对 Cry1Ac 的抗性

武怀恒 王 玲 许 冬 丛胜波 王金涛 李文静 杨妮娜
尹海辰 万 鹏*

(湖北省农业科学院植保土肥研究所, 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/
农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室, 武汉 430064)

摘要: 为明确室内筛选的红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 抗性品系 AQ-R 对 Cry1Ac 的抗性机制, 采用室内生物测定法明确该品系对 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的敏感性, 通过遗传杂交和基因克隆分析抗性基因的显隐性及突变位点, 并进行细胞学试验分析突变蛋白的亚细胞定位。结果显示: 红铃虫 AQ-R 抗性品系对 Cry1Ac 的抗性倍数为 181.67 倍, 对 Cry2Ab 没有交互抗性; 该品系携带了一种新型的隐性钙粘蛋白抗性等位基因 *PgCad1*, 其编码蛋白的钙粘蛋白重复区、前蛋白区和近膜区共发生了 17 个氨基酸替换。表达野生型 *PgCad1-s* 基因的 Hi5 细胞对 Cry1Ac 敏感, 且钙粘蛋白定位于细胞膜; 而表达抗性 *PgCad1-r* 基因的 Hi5 细胞则对 Cry1Ac 不敏感, 且钙粘蛋白错误定位到内质网。表明钙粘蛋白氨基酸点突变能导致其定位错误, 从而促成红铃虫 AQ-R 品系对 Cry1Ac 产生抗性。

关键词: 红铃虫; 钙粘蛋白; Bt 蛋白; 抗性机制

Resistance of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* to Cry1Ac mediated by amino acid point mutation of cadherin

Wu Huaiheng Wang Ling Xu Dong Cong Shengbo Wang Jintao Li Wenjing
Yang Nina Yin Haichen Wan Peng*

(Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Key Laboratory of Crop Disease, Insect Pests and Weeds Control, Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei Province, China)

Abstract: To clarify the resistance mechanism of a laboratory-selected pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) strain AQ-R to Bt toxin Cry1Ac, the susceptibility of AQ-R to Cry1Ac and Cry2Ab was detected by bioassay; the dominance-recessiveness and mutation sites of resistant alleles were analyzed by genetic crossing and gene cloning, and subcellular localization of mutant proteins were analyzed using cytological test. The results showed that the Cry1Ac resistance of AQ-R strain was 181.67-fold, but there was no cross resistance to Cry2Ab. A novel recessive resistance allele on the cadherin locus was characterized, which encoded a mutant cadherin protein with seventeen amino acid substitutions in cadherin repeats region, proprotein region and membrane-proximal region. Hi5 cells expressing wild-type *PgCad1-s* gene were susceptible to Cry1Ac, and the produced cadherin protein was localized in the cell membrane; Hi5 cells expressing *PgCad1-r* gene were not susceptible to Cry1Ac, and the produced cadherin protein was localized in endoplasmic reticulum. These results indicated that the amino acid point mutation of cadherin might lead to mislocation, resulting in the resistance of AQ-R strain to Cry1Ac.

Key words: *Pectinophora gossypiella*; cadherin; Bt protein; resistance mechanism

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)能产生 Cry 和 Cyt 两大类杀虫晶体蛋白, Cry 蛋白因高效的杀虫活性、高度的专一性和对环境友好等特点,被广泛用于转基因作物育种(Pardo-López et al., 2013)。由此培育出的转 Bt 抗虫作物已在世界范围内被大量种植,带来了良好的经济、社会和生态效益(Wan et al., 2017; Zhang et al., 2018; Li et al., 2020),然而,靶标害虫对 Bt 作物演化出的抗性,使得这些效益受损。目前已经证实多种害虫在田间对 Bt 作物产生了抗性,严重威胁到 Bt 作物的持续应用(Tabashnik & Carrière, 2017)。例如,在波多黎各监测到草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 田间种群对转 Cry1F 玉米的抗性超过 1 000 倍,在巴西发现转 Cry1Ab、Cry1F 玉米对草地贪夜蛾已失去防效(吴超等, 2019);在美国美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 对转 Cry1Ab、Cry1A.105 玉米和转 Cry1Ac、Cry2Ab 棉花均产生了抗性(Tabashnik & Carrière, 2017);在印度红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 对转 Cry1Ac、Cry1Ac+2Ab 棉花也产生了抗性(Fabrick et al., 2015; Tabashnik & Carrière, 2019),这些都为 Bt 作物的持续应用带来了严峻挑战。

我国种植的转基因抗虫作物仅有转基因抗虫棉花,所含 Bt 基因仅为 Cry1Ac 基因,为一代抗虫棉,主要针对红铃虫和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (郭三堆等, 2015)。而美国、澳大利亚、印度等地种植的转基因棉花则为二代抗虫棉,所含基因为 Cry1Ac+ Cry2Ab,主要针对棉铃虫、红铃虫和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等靶标害虫(Tabashnik & Carrière, 2019)。Cry1Ac 和 Cry2Ab 具有不同的作用机制,对一些靶标害虫如棉铃虫和红铃虫等具有叠加效果,因此两者的交互抗性也备受关注(Wei et al., 2019)。近年来,这些转基因抗虫棉花在高效控制棉田鳞翅目害虫的同时,也面临了严重的抗性压力(Xiao & Wu, 2019)。

为探究红铃虫对 Cry1Ac 的抗性机制,本研究以室内筛选的红铃虫 AQ-R 抗性品系为研究对象,利用室内生物测定法、遗传杂交、基因克隆及细胞学试验,检测该品系对 Cry1Ac、Cry2Ab 的敏感性,分析抗性基因的显隐性和突变位点及突变蛋白的亚细胞定位,阐明 AQ-R 抗性品系对 Bt 的抗性机制,这将有助于进一步深化认识害虫对 Bt 作物抗性的分子机制,以期制定合理的抗性治理策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:红铃虫 QJ-S 敏感品系采自湖北省潜江市棉田,在室内用人工饲料饲养超过 10 年,期间未接触任何杀虫剂与 Bt 蛋白;AQ-R 抗性品系于 2013 年采自安徽省安庆市棉田,在室内经 Cry1Ac 杀虫蛋白长期筛选获得;AQ47 抗性品系于 2013 年从安徽省安庆市田间筛选获得,其钙粘蛋白基因发生隐性突变,从而导致它对 Cry1Ac 杀虫蛋白产生抗性,基因型为 *r13r13* (Wang et al., 2018)。红铃虫饲养条件为温度 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、光周期 14 L: 10 D、相对湿度幼虫为 $(50\pm 10)\%$,成虫为 $(70\pm 10)\%$ 。

药剂、试剂及仪器:由工程菌株表达并纯化的 Cry1Ac 和 Cry2Ab 杀虫蛋白粉剂,北京中保科农生物科技有限公司。TRIzol 试剂、Cellfection II 转染试剂,美国 Invitrogen 公司;Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、EcoR I 和 Sac II 内切酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;pie2-EGFP-N1 (pIE2-GFP)真核表达载体、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 卵巢细胞(Hi5 细胞),华中师范大学生命科学学院昆虫研究所提供;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,上海唯地生物技术有限公司;Grace's 细胞培养基,美国 Gibco 公司;FBS 胎牛血清,美国 Invigentech 公司。ETC811 基因扩增仪,苏州东胜兴业科学仪器有限公司;LRH-300-GSI 人工气候箱,韶光市泰宏医疗器械有限公司;ECLIPSE TE2000-S 倒置荧光显微镜,日本 Nikon 公司;ZEISS LSM510 共聚焦显微镜,德国 Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 AQ-R 品系抗性倍数的测定

采用饲料混合法对红铃虫敏感品系和抗性品系的初孵幼虫进行生物测定。先将 Cry1Ac 或 Cry2Ab 蛋白干粉配成浓度为 2 mg/mL 的母液,然后将母液配制相应工作浓度。首先配制常规人工饲料,待冷却至 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ 加入相应体积的 Cry1Ac 或 Cry2Ab 母液,充分混匀、冷却凝固后待用,用时将饲料切成边长 1 cm 的小方块,分装至 24 孔培养板中。AQ-R 抗性品系的生物测定浓度分别为 0 (对照)、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{g/mL}$ Cry1Ac,共 6 个处理;QJ-S 敏感品系的生物测定浓度分别为 0 (对照)、0.03、0.06、0.12、0.24 和 0.48 $\mu\text{g/mL}$ Cry1Ac,共 6 个处理。AQ-R 抗性品系和 QJ-S 敏感品系的 Cry2Ab 生物测定浓度均为

0(对照)、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8和1.6 $\mu\text{g/mL}$,共7个处理。将初孵幼虫接入装有不同浓度人工饲料的24孔培养板中,每孔1头,观察幼虫的死亡情况,计算死亡率。24头为1个重复,每个处理3个重复。采用SPSS 22.0软件的Probit回归法计算AQ-R抗性品系和敏感品系对Cry1Ac或Cry2Ab的 LC_{50} 值、95%置信区间以及浓度-死亡率曲线的斜率及其标准误差;并计算抗性倍数,抗性倍数为抗性品系的 LC_{50} 与敏感品系 LC_{50} 的比值。

1.2.2 AQ-R品系钙粘蛋白基因座的显隐性分析

将红铃虫AQ-R抗性品系分别与QJ-S敏感品系和AQ47抗性品系 $r13r13$ 杂交,测定AQ-R抗性品系幼虫、AQ-R $\times$ QJ-S、AQ-R $\times$ AQ47杂交 F_1 代幼虫以及QJ-S敏感品系幼虫在诊断剂量(10 $\mu\text{g/mL}$ Cry1Ac)下的存活率,并计算显隐性参数 h , $h=(F_1\text{代幼虫存活率}-\text{敏感品系幼虫存活率})/(\text{抗性品系幼虫存活率}-\text{敏感品系幼虫存活率})$ (Zhang et al., 2012)。 h 值的范围从0(完全隐性)到1(完全显性)。同时以AQ47抗性品系幼虫为参照,通过分析AQ-R与AQ47杂交 F_1 代的存活率,判断AQ-R抗性品系钙粘蛋白基因座的显隐性。

1.2.3 AQ-R品系钙粘蛋白基因的克隆与序列分析

分别选取红铃虫AQ-R抗性品系和QJ-S敏感品系4龄幼虫各10头,解剖中肠提取总RNA并合成cDNA第一链。根据已知的红铃虫敏感品系钙粘蛋白*PgCad1*基因序列(GenBank登录号:AY198374),设计特异性引物PgCad1-F(5'-CCGGAATTCATG-GCGGGTGACGCCTGCATACT-3')和PgCad1-R(5'-TCCCCGCGGGGTCGCATGCGCCTGTTAGTGA-3'),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,利用Phusion High-Fidelity DNA Polymerase扩增红铃虫*PgCad1*基因的开放阅读框序列,PCR产物回收后通过双酶切(*EcoR* I和*Sac* II)和同源重组将抗性品系、敏感品系红铃虫*PgCad1*基因插入到pie2-EGFP-N1(pIE2-GFP)表达载体,然后转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,各自挑选3个阳性克隆进行测序验证。50 μL PCR反应体系:5 $\times$ Phusion HF Buffer 10 μL 、Phusion DNA Polymerase 0.5 μL 、dNTP Mixture 5 μL 、上下游引物各1.5 μL 、cDNA 2 μL ,补充无菌水至50 μL 。PCR反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸4 min,共35个循环;在72 $^{\circ}\text{C}$ 下保温10 min。利用DNA-MAN 6.0软件将AQ-R抗性品系与QJ-S敏感品系*PgCad1*基因的开放阅读框序列及氨基酸序列进行

比对,分析AQ-R抗性品系该基因的变异位点。

1.2.4 质粒转染

将上述测序验证的红铃虫抗性品系(命名为PgCad1-r)与敏感品系(命名为PgCad1-s)*PgCad1*基因重组质粒分别转染到Hi5细胞。首先,选择对数生长期的Hi5细胞转入6孔培养板中,待细胞密度达到50%~70%时备用;在EP管中将2 μg 重组质粒/孔与100 μL /孔的无血清Grace培养基混匀,同时将6 μL /孔Cellfection II转染试剂与100 μL /孔的无血清Grace培养基混匀,室温静置15 min;将上述质粒溶液与Cellfection II试剂混匀后再静置15 min;去除备用6孔培养板中的培养基,经无血清Grace培养基清洗3次后加入无血清Grace培养基,800 μL /孔,然后加入所得质粒混合液,轻摇混匀;6孔板置于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养3~5 h,去除孔中残余液体,经无血清Grace清洗1次,最后加入含10% FBS的正常Grace培养基。

待质粒转染36 h后去除孔中培养基并使用PBS溶液清洗2次,加入固定液(4%多聚甲醛),每孔加入300 μL ,室温静置15 min;去除固定液并使用PBS溶液清洗3次;添加适量Hoechst染色液,室温避光染色15 min;去除染色液,使用PBS溶液漂洗3次,每次5 min;滴加1滴防淬灭剂于载玻片上,随后反扣盖玻片,制成Hi5细胞爬片;在共聚焦显微镜观察细胞的荧光情况,选择3~5个视野进行拍照。

1.2.5 Cry1Ac对昆虫细胞系的细胞毒力测定

将对数生长期的Hi5细胞接入24孔培养板中培养12 h之后,分别转染重组质粒PgCad1-s、PgCad1-r与pIE2-GFP空载体(对照);24 h后去除培养基,按照1.2.4方法逐步进行固定、染色、观察和拍照,并根据细胞的绿色荧光情况来计算细胞转染效率;去除各组细胞的培养基,使用PBS溶液清洗3次,添加2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度梯度的Cry1Ac活化蛋白;1 h后使用倒置荧光显微镜拍照,计算细胞病变率,细胞病变率=病变细胞数/细胞总数 $\times 100\%$;重复3次。采用SPSS 22.0软件的Probit回归法计算表达敏感与抗性*PgCad1*基因的Hi5细胞对Cry1Ac的 EC_{50} 值及其95%置信区间和斜率及其95%置信区间。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析,AQ-R与AQ47杂交 F_1 代的存活率与AQ47抗性纯合子的存活率之间采用Fisher's法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 AQ-R品系对Cry1Ac的抗性水平

用Cry1Ac和Cry2Ab杀虫蛋白分别对红铃虫抗性品系AQ-R和敏感品系QJ-S进行生物测定,结果表明,Cry1Ac杀虫蛋白对AQ-R抗性品系的致死中浓度为21.80 μg /mL,而对QJ-S敏感品系的致死中

浓度仅为0.12 μg/mL,AQ-R抗性品系对Cry1Ac杀虫蛋白的抗性倍数为181.67倍(表1)。Cry2Ab杀虫蛋白对AQ-R抗性品系和QJ-S敏感品系的致死中浓度分别为0.17 μg/mL和0.24 μg/mL,两者的95%置信区间有重叠(表1),说明抗Cry1Ac品系AQ-R对Cry2Ab杀虫蛋白没有交互抗性。

表1 Cry1Ac/Cry2Ab对AQ-R抗性品系与QJ-S敏感品系幼虫的生物测定结果

Table 1 Responses of the pink bollworm larvae from a resistant strain (AQ-R) and a susceptible strain (QJ-S) to Cry1Ac/Cry2Ab

Bt蛋白 Bt protein	品系 Strain	斜率±标准误 Slope±SE	LC ₅₀ (95% 置信区间) LC ₅₀ (95% CI)/(μg/mL)	抗性倍数 Resistance ratio
Cry1Ac	QJ-S	3.62±0.44	0.12(0.10–0.13)	181.67
	AQ-R	3.10±0.55	21.80(18.10–25.90)	
Cry2Ab	QJ-S	2.05±0.20	0.17(0.14–0.20)	–
	AQ-R	2.18±0.21	0.24(0.20–0.28)	

2.2 AQ-R品系钙粘蛋白基因座的显隐性分析

AQ-R抗性幼虫、AQ-R与QJ-S杂交F₁代、敏感幼虫在诊断剂量上的存活率分别为87.69%、0和0(表2),故其显隐性参数*h*值为0,表明AQ-R品系携带的抗性等位基因在诊断剂量下为完全隐性遗传。在诊断剂量下,AQ-R与AQ47杂交F₁代的存活率为

84.85%(表2),而AQ47抗性纯合子的存活率为90.91%,两者没有显著性差异(*P*=0.276);已知AQ47品系携带钙粘蛋白隐性抗性等位基因*r13*,这说明AQ-R品系的钙粘蛋白基因座上同样携带了一个隐性抗性等位基因。

表2 AQ-R和AQ47抗性品系及其与QJ-S敏感品系和AQ47抗性品系杂交F₁代在Cry1Ac诊断剂量下的存活率

Table 2 Survival rates of two resistant strains (AQ-R and AQ47) and F₁ progenies from crosses between each resistant strain and either the susceptible QJ-S strain or the resistant AQ47 strain at the diagnostic concentration of Cry1Ac

品系 Strain	杂交 Cross	样本量 Sample size	存活率 Survival rate/%	显隐性参数 Dominance parameter
AQ-R	R×R	72	87.69	0
	R×QJ-S	72	0.00	
	R×AQ47	72	84.85	
AQ47	R×R	72	90.91	0
	R×QJ-S	72	0.00	
	R×AQ47	72	92.65	
QJ-S	–	72	0.00	–

R代表相应的抗性品系。R represents the corresponding resistant strain.

2.3 AQ-R品系PgCad1突变位点的鉴定

红铃虫敏感品系钙粘蛋白基因PgCad1的开放阅读框全长5 205 bp,总共编码1 735个氨基酸,而AQ-R品系PgCad1的开放阅读框长度不变,相对于敏感品系虽然没有缺失或者插入位点,但具有37个核苷酸变异位点,其中包括20个无义突变位点和17个错义突变位点,最终导致AQ-R品系PgCad1编码的1 735个氨基酸中发生了17个氨基酸替换(图1)。这些氨基酸变异位点主要集中在钙粘蛋白重复区

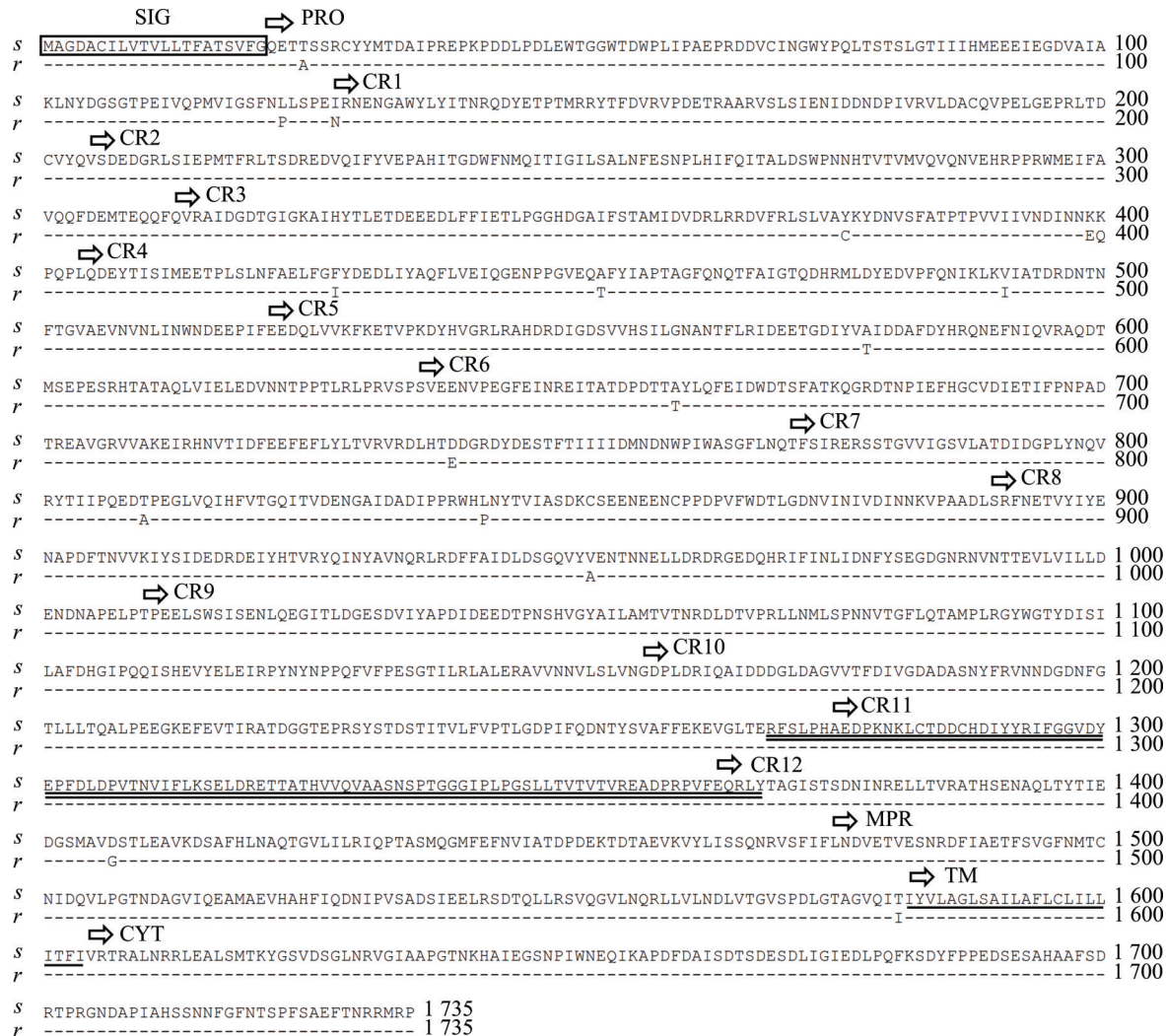
CR1~CR12,该区域包含15个点突变位点,分别为L123P、I128N、Y376C、K399E、K400Q、F428I、A453T、V491I、A578T、A660T、D739E、T810A、L842P、V952A、D1407G,而前蛋白区PRO(T25A)和近膜区MPR(T158I)各包含1个点突变位点,推断的结合区域并没有发生变异(图1)。

2.4 表达PgCad1昆虫细胞对Cry1Ac的敏感性

采用梯度浓度的Cry1Ac活化蛋白处理转染重组质粒的Hi5细胞和对照细胞,结果表明表达红铃

虫敏感品系钙粘蛋白基因 *PgCad1-s* 的细胞对 Cry1Ac 蛋白很敏感, 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cry1Ac 蛋白可导致多数转染细胞变得膨大、脱离底部而飘浮, 甚至部分细胞发生裂解而释放出内容物(图2~A-D); 表达红铃虫抗性品系钙粘蛋白基因 *PgCad1-r* 的细胞对 Cry1Ac 蛋白则不敏感, 经 40 $\mu\text{g/mL}$ 高浓度 Cry1Ac 蛋白处理 1 h, 没有发现细胞产生病变现象(图2~E-H)。在 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cry1Ac 蛋白处理下, 转

染空载体质粒的 Hi5 细胞形态维持正常, 既不膨大, 也不飘浮, 对 Cry1Ac 蛋白也不敏感(图2~I-L)。通过统计分析细胞转染效率和细胞病变率, 拟合回归方程, 明确了表达 *PgCad1-s* 的敏感细胞, 其 EC_{50} 为 6.79 $\mu\text{g/mL}$, 而表达 *PgCad1-r* 的抗性细胞在最高浓度 40 $\mu\text{g/mL}$ 处理下都未见细胞产生明显的病变。



s 和 *r* 分别代表敏感品系和 AQ-R 抗性品系的 *PgCad1* 基因。Single underlined amino acids indicate the transmembrane region. SIG, PRO, CR, MPR, TM 以及 CYT 分别代表信号肽序列、前蛋白区、钙粘蛋白重复、近膜区、跨膜区以及胞质区; 双下划线表示预测的结合位点; 单下划线表示跨膜区域。The *s* and *r* represent *PgCad1* gene of susceptible strain and AQ-R resistant strain, respectively. SIG, PRO, CR, MPR, TM and CYT represent signal sequence, proprotein region, cadherin repeat, membrane-proximal region, transmembrane region and cytoplasmic region, respectively. Double underlined amino acids indicate the putative binding region. Single underlined amino acids indicate the transmembrane region.

图1 AQ-R 品系与敏感品系钙粘蛋白氨基酸序列比较

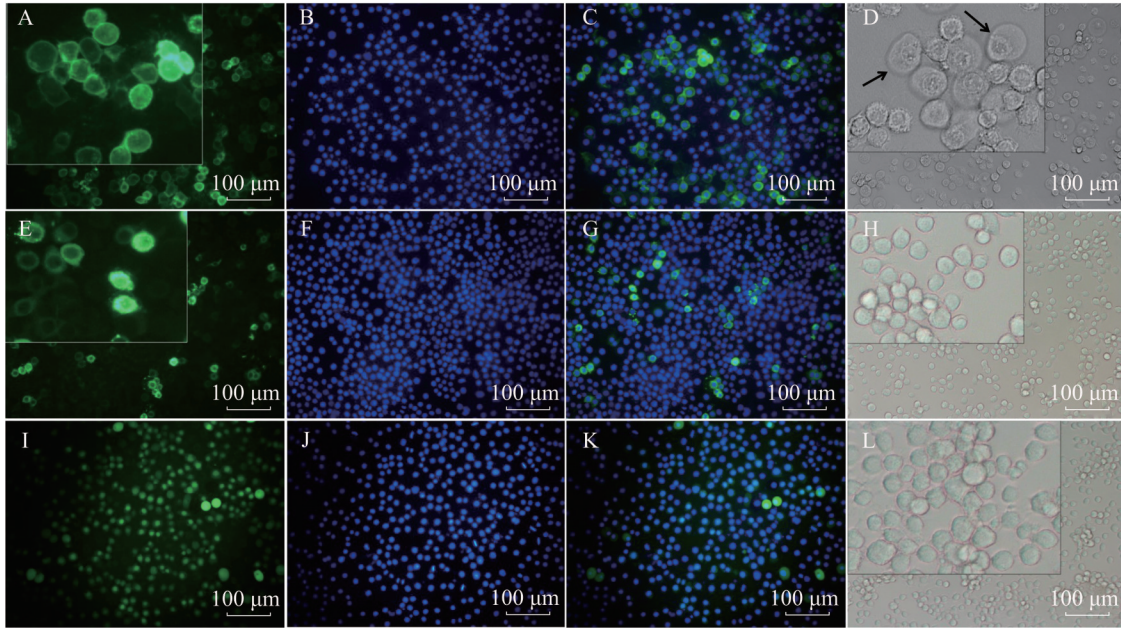
Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of *PgCad1* between susceptible and AQ-R strain

2.5 *PgCad1* 在昆虫细胞中的定位

共聚焦显微镜观察结果表明, 转染红铃虫敏感品系 *PgCad1-s* 的 Hi5 细胞, 产生的 *PgCad1-s*-GFP 融

合蛋白主要定位在细胞膜上; 而转染红铃虫抗性品系 *PgCad1-r* 的 Hi5 细胞, 产生的 *PgCad1-r*-GFP 融合蛋白与内质网标签蛋白完全共定位, 未能定位到细

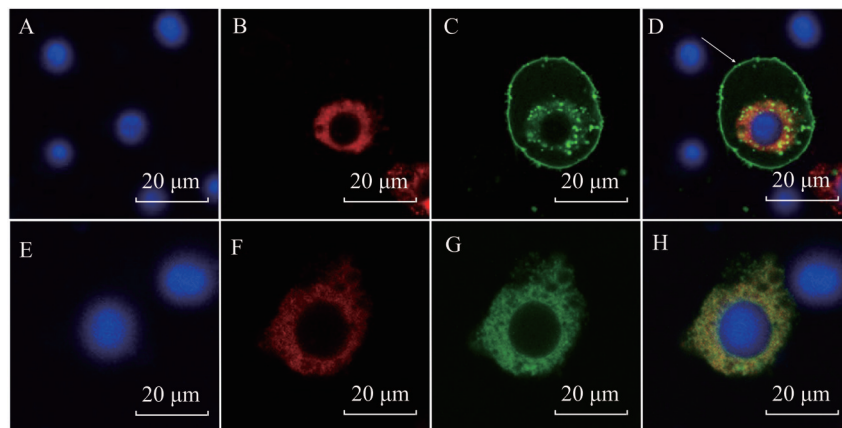
胞膜上(图3)。这表明红铃虫抗性品系的 PgCad1-r 蛋白定位发生了错误,不能准确定位到细胞膜。



A~D、E~H 和 I~L: 转染 PgCad1-s、PgCad1-r 和空载体 pIE2-GFP 的 Hi5 细胞经 Cry1Ac 处理 1 h 后的荧光情况 (表达 PgCad1-s 细胞的 Cry1Ac 处理浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 表达 PgCad1-r 和空载体 pIE2-GFP 细胞的 Cry1Ac 处理浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$)。Hoechst 染色的细胞核呈现蓝色, PgCad1-GFP 融合蛋白呈绿色; A、B 叠加图像显示为 C, E、F 叠加图像显示为 G, I、J 叠加图像显示为 K。D 图中箭头指向膨大的细胞。A~D, E~H, I~L: Hi5 cells transfected with PgCad1-s, PgCad1-r or the empty vector pIE2-GFP are treated with Cry1Ac for one hour (10 μg Cry1Ac per mL for cells producing PgCad1-s and 40 μg Cry1Ac per mL for PgCad1-r and GFP cells) and observed for swelling using fluorescence microscopy. Nuclei stained with Hoechst are shown in blue and PgCad1-GFP fusion proteins are shown in green. Superimposed images from A-B are shown in C, from E-F in G, and from I-J in K. Arrows in D indicate representative swollen cells.

图2 表达红铃虫 PgCad1 的昆虫细胞对 Cry1Ac 蛋白的敏感性

Fig. 2 Sensitivity of insect cells expressing PgCad1 of pink bollworm to Cry1Ac protein



A~D、E~H: 分别为表达 PgCad1-s 和 PgCad1-r 的 Hi5 细胞。Hoechst 染色的细胞核呈蓝色, dsRED 标记的内质网呈红色, PgCad1-GFP 融合蛋白呈绿色; A~C 叠加图像显示为 D, E~G 叠加图像显示为 H。C 图中箭头指向细胞膜。A~D, E~H: Hi5 cells transfected with PgCad1-s and PgCad1-r, respectively. Nuclei stained with Hoechst are shown in blue; dsRED-labeled endoplasmic reticulum is shown in red, and GFP-labeled PgCad1 fusion proteins are shown in green. Superimposed images from A-C are shown in D and from E-G in H. The arrow in C indicates the cell membrane.

图3 红铃虫敏感和抗性品系 PgCad1 蛋白在 Hi5 细胞中的定位

Fig. 3 Localization of PgCad1 protein from susceptible and resistant strains of the pink bollworm in insect Hi5 cells

3 讨论

害虫对Bt演化的抗性机制极其复杂,但主要由昆虫中肠Bt受体基因的突变或表达量变化导致,其中类钙粘蛋白、碱性磷酸酯酶、氨肽酶N以及ABC转运蛋白是最为重要的4类受体(Pardo-López et al., 2013; Fabrick & Wu, 2015; Wu et al., 2019)。就红铃虫而言,钙粘蛋白基因*PgCad1*的变异是其对Cry1Ac蛋白产生抗性的主要原因(Morin et al., 2003; Wang et al., 2018; 2019a)。目前,已经发现红铃虫*PgCad1*存在18种不同突变类型*r1~r18*(Fabrick & Tabashnik, 2012; 王金涛, 2019; Wang et al., 2020a)。与敏感基因*PgCad1*相比,这些抗性位基因的变异包括基因序列的缺失与插入、可变剪切或提前引入终止密码子,从而导致表达的钙粘蛋白并不完整,而本研究中AQ-R抗性品系*PgCad1*的变异与上述18种抗性位基因均不相同,仅仅是17个氨基酸的替换,这说明AQ-R抗性品系携带的是一种新型的*PgCad1*抗性位基因。在这17个替换的氨基酸中,位于前蛋白区(T25A)与钙粘蛋白重复区(K400Q、A578T、D739E)的4个替换位点是敏感种群中常见的替换位点(Fabrick et al., 2014; Wang et al., 2020b);因此钙粘蛋白重复区(L123P、I128N、Y376C、K399E、F428I、A453T、V491I、A660T、T810A、L842P、V952A、D1407G)与近膜区MPR(T158I)的这13个替换位点才是真正介导AQ-R抗性品系对Cry1Ac抗性的突变位点。

细胞学研究发现,AQ-R抗性品系的钙粘蛋白错误定位到内质网上,并未定位到细胞膜。在前期的研究中,红铃虫AQ47(*r13r13*)、JL46(*r15r15*)和AQ65(*r16r16*)品系也曾出现过钙粘蛋白错误定位到内质网而无法正确定位于细胞膜的现象(Wang et al., 2018; 2019a, b),但在这些品系中,其突变均为钙粘蛋白的跨膜区缺失。而本研究中AQ-R抗性品系的钙粘蛋白信号肽以及跨膜结构域等定位信息完整,仍然发生了定位错误,显示钙粘蛋白的定位应不仅仅由信号肽与跨膜结构域决定,其重复区和近膜区的13个氨基酸位点可能也参与了该蛋白的精确定位。在棉铃虫中也曾出现过类似现象。如棉铃虫抗性品系96CAD的钙粘蛋白mHaCad相较于敏感品系发生了35个氨基酸替换,其中关键氨基酸D172G的替换导致mHaCad错误定位到内质网上而不能准确到达细胞膜(Xiao et al., 2017)。这些结果表明,钙粘蛋白不同区域的突变均可能影响其准确

定位,从而导致害虫对Bt产生抗性。

此外,在诊断剂量下,AQ-R抗性品系与AQ47(*r13r13*)抗性品系的杂交 F_1 代存活率高达84.85%,这说明AQ-R抗性品系携带的抗性位基因存在2种可能性:一种是携带一种显性抗性位基因(钙粘蛋白基因或者非钙粘蛋白基因),另一种是钙粘蛋白基因座上同样携带一种*PgCad1*隐性抗性位基因。然而,AQ-R抗性品系与QJ-S敏感品系的杂交 F_1 代存活率为0,表明AQ-R抗性品系对Cry1Ac的抗性是典型的隐性遗传,排除了携带显性抗性位基因的可能,这与已知的抗性品系AZP-R(携带*r1*、*r2*、*r3*)(Morin et al., 2003)、AQ47(*r13r13*)(Wang et al., 2018)、AQ189(*r14r14*)(Wang et al., 2019a)、JL46(*r15r15*)(Wang et al., 2019b)和AQ65(*r16r16*)(Wang et al., 2020b)一致。携带2个*PgCad1-r*的纯合子个体对Cry1Ac表现为抗性,而仅携带1个*PgCad1-r*的杂合子个体则对Cry1Ac敏感,使用生物测定监测田间抗性基因频率时,携带这种隐性抗性位基因的杂合子个体并不能被检测到,故而DNA分子检测隐性抗性位基因的基因频率可能比生物测定更为精确(Wang et al., 2020a)。

参 考 文 献 (References)

- Fabrick JA, Ponnuraj J, Singh A, Tanwar RK, Unnithan GC, Yelich AJ, Li XC, Carriere Y, Tabashnik BE. 2014. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. *PLoS ONE*, 9 (5): e97900
- Fabrick JA, Tabashnik BE. 2012. Similar genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in boll-selected and diet-selected strains of pink bollworm. *PLoS ONE*, 7(4): e35658
- Fabrick JA, Unnithan GC, Yelich AJ, DeGain B, Masson L, Zhang J, Carriere Y, Tabashnik BE. 2015. Multi-toxin resistance enables pink bollworm survival on pyramided Bt cotton. *Scientific Reports*, 5: 16554
- Fabrick JA, Wu YD. 2015. Roles of insect midgut cadherin in Bt intoxication and resistance.//Soberon M, Gao YL, Bravo A. Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Oxfordshire: CABI Publisher, pp. 69–86
- Guo SD, Wang Y, Sun GQ, Jin SQ, Zhou T, Meng ZG, Zhang R. 2015. Twenty years of research and application of transgenic cotton in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(7): 3372–3387 (in Chinese) [郭三堆, 王远, 孙国清, 金石桥, 周焘, 孟志刚, 张锐. 2015. 中国转基因棉花研发应用二十年. *中国农业科学*, 48(7): 3372–3387]
- Li YH, Hallerman EM, Wu K, Peng YF. 2020. Insect-resistant genetically engineered crops in China: development, application, and prospects for use. *Annual Review of Entomology*, 65: 273–292

- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carrière Y, et al. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9): 5004–5009
- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1): 3–22
- Tabashnik BE, Carrière Y. 2017. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology*, 35(10): 926–935
- Tabashnik BE, Carrière Y. 2019. Global patterns of resistance to Bt crops highlighting pink bollworm in the United States, China, and India. *Journal of Economic Entomology*, 112(6): 2513–2523
- Wan P, Xu D, Cong SB, Jiang YY, Huang YX, Wang JT, Wu HH, Wang L, Wu KM, Carrière Y, et al. 2017. Hybridizing transgenic Bt cotton with non-Bt cotton counters resistance in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(21): 5413–5418
- Wang JT. 2019. Mechanism of pink bollworm resistance to transgenic Bt cotton mediated by cadherin alleles *r17* and *r18*. Ph. D thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [王金涛. 2019. 钙粘蛋白基因 *r17* 和 *r18* 突变介导的红铃虫对转Bt基因棉花的抗性机制. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- Wang JT, Xu D, Wang L, Cong SB, Wan P, Lei CL, Fabrick JA, Li XC, Tabashnik BE, Wu KM. 2020a. Bt resistance alleles in field populations of pink bollworm from China: similarities with the United States and decreased frequency from 2012 to 2015. *Pest Management Science*, 76(2): 527–533
- Wang L, Ma YM, Guo XQ, Wan P, Liu KY, Cong SB, Wang JT, Xu D, Xiao YT, Li XC, et al. 2019a. Pink bollworm resistance to Bt toxin Cry1Ac associated with an insertion in cadherin exon 20. *Toxins*, 11(4): 186
- Wang L, Ma YM, Wan P, Liu KY, Xiao YT, Wang JT, Cong SB, Xu D, Wu KM, Fabrick JA, et al. 2018. Resistance to *Bacillus thuringiensis* linked with a cadherin transmembrane mutation affecting cellular trafficking in pink bollworm from China. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 94: 28–35
- Wang L, Ma YM, Wei W, Wan P, Liu KY, Xu M, Cong SB, Wang JT, Xu D, Xiao YT, et al. 2020b. Cadherin repeat 5 mutation associated with Bt resistance in a field-derived strain of pink bollworm. *Scientific Reports*, 10(1): 16840
- Wang L, Wang JT, Ma YM, Wan P, Liu KY, Cong SB, Xiao YT, Xu D, Wu KM, Fabrick JA, et al. 2019b. Transposon insertion causes cadherin mis-splicing and confers resistance to Bt cotton in pink bollworm from China. *Scientific Reports*, 9(1): 7479
- Wei JZ, Zhang YL, An SH. 2019. The progress in insect cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 102(3): e21547
- Wu C, Chakrabarty S, Jin MH, Liu KY, Xiao YT. 2019. Insect ATP-binding cassette (ABC) transporters: roles in xenobiotic detoxification and Bt insecticidal activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11): 2829
- Wu C, Zhang L, Liao CY, Wu KM, Xiao YT. 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 503–513 (in Chinese) [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛. 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和Bt作物的抗性机制及其治理技术研究进展. 植物保护学报, 46(3): 503–513]
- Xiao YT, Dai Q, Hu RQ, Pacheco S, Yang YB, Liang GM, Soberón M, Bravo A, Liu KY, Wu KM. 2017. A single point mutation resulting in cadherin mis-localization underpins resistance against *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm. *Journal of Biological Chemistry*, 292(7): 2933–2943
- Xiao YT, Wu KM. 2019. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1767): 20180316
- Zhang HN, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu CH, Yang YH, Wu SW, Wu KM, Cui JJ, et al. 2012. 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 W, Lu YH, van der Werf W, Huang JK, Wu F, Zhou K, Deng XZ, Jiang YY, Wu KM, Rosegrant MW. 2018. Multidecadal, county-level analysis of the effects of land use, Bt cotton, and weather on cotton pests in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(33): 7700–7709

(责任编辑:王 璇)