

浙江大学

硕士学位论文

稻纵卷叶螟对Bt水稻抗性风险及其对策初步研究

姓名：张广林

申请学位级别：硕士

专业：农业昆虫与害虫防治

指导教师：姚洪渭;叶恭银

20070601

中文摘要

本论文就稻纵卷叶螟对Bt水稻抗性风险及其对策进行了初步的研究与探讨, 结果如下:

1 稻纵卷叶螟对Cry1Ab杀虫蛋白及其转基因水稻的敏感性

采用浸叶喂毒法测定了稻纵卷叶螟*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 不同地区种群对Cry1Ab的敏感性。Cry1Ab蛋白对稻纵卷叶螟不同地区种群的 LC_{50} 范围从20.00 ng/cm² (浙江杭州) 到69.60 ng/cm² (浙江宁波)。应用多剂量LD-p线获得了稻纵卷叶螟田间种群对Cry1Ab的诊断剂量, 为620 ng/cm²。采用单雌系分析法测定稻纵卷叶螟种群对Cry1Ab蛋白和Bt水稻的敏感性频率分布。

2 水稻螟虫对4种Bt杀虫蛋白的敏感性测定

采用人工饲料喂毒法和浸叶喂毒法测定了二化螟*Chilo suppressalis* (Walker)、大螟*Sesamia inferens* (Walker) 和稻纵卷叶螟初孵幼虫对4种Bt杀虫蛋白的敏感性。二化螟对Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C和Cry2A的 LC_{50} 值分别为1.739 ng/mg、2.645 ng/mg、2.794 ng/mg和15.965 ng/mg; 大螟依次为2.455 ng/mg、10.046 ng/mg、11.803 ng/mg和35.359 ng/mg; 稻纵卷叶螟依次为4.000 µg/ml、1.611 µg/ml、69.031 µg/ml和12.708 µg/ml。

3 基于cry基因的新型融合基因构建

通过分子生物学技术, 构建含Cry蛋白结构域II序列和抗菌活性肽(AMPs)序列融合基因的质粒载体, 其表达产物的杀虫活性还有待于进一步验证。这为筛选新型杀虫候选基因用于转基因抗虫作物培育提供了新思路。

关键词: 稻纵卷叶螟; 二化螟; 大螟; 苏云金杆菌; Cry蛋白; 结构域II; 转基因水稻; 抗药性; 生物测定; 敏感基线; 诊断剂量; 抗性频率; 抗性治理; 抗菌活性肽; 融合基因

Abstract

The risk of rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) resistance to Bt rice and its management were studied and discussed in this paper.

1 Susceptibility of *Cnaphalocrocis medinalis* to Cry1Ab and its transgenic rice

The susceptibility of different *C. medinalis* populations to Cry1Ab was bioassayed using the leaf-immersion method. The LC₅₀ values of Cry1Ab to *C. medinalis* populations ranged from 20.00 ng/cm² (Hangzhou population) to 69.60 ng/cm² (Ningbo population). The diagnostic dose of Cry1Ab to the field population of *C. medinalis* was estimated as 620 ng/cm² using the multi-dose LP-p line. Finally, the frequency distribution of susceptibility in the field population of *C. medinalis* to Cry1Ab and transgenic *cry1Ab* rice were measured using iso-female analysis method.

2 Susceptibility of rice lepidopterans to four insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*

The susceptibility of the neonates of rice lepidopterans, striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker), and leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) to four Cry proteins, i.e. Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, and Cry2A, from *Bacillus thuringiensis* were bioassayed using diet-feeding method and leaf-immersion method. The LC₅₀ values of Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, and Cry2A to *C. suppressalis* were 1.739 ng/mg, 2.645 ng/mg, 2.794 ng/mg, and 15.965 ng/mg, respectively; and those for *S. inferens* were 2.455 ng/mg, 10.046 ng/mg, 11.803 ng/mg, and 35.359 ng/mg, respectively; and for *C. medinalis*, 4.000 µg/ml, 1.611 µg/ml, 69.031 µg/ml, and 12.708 µg/ml, respectively.

3 Construction of new fusion genes based on *cry* gene

The pBDIIA vector was constructed by combining the domain II sequence of *cry1Ab* and anti-microbial peptides (AMPs) using the modern biotechnology. Despite the insecticidal activity of the expression products of recombinants still to be further bioassayed, it provides a new strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops.

Key words: *Cnaphalocrocis medinalis*; *Chilo suppressalis*; *Sesamia inferens*; *Bacillus thuringiensis*; Cry protein; Domain II; Transgenic rice; Insecticide resistance; Bioassay; Baseline susceptibility; Diagnostic dose; Resistance frequency; Resistance management; Anti-microbial peptide; Fusion gene

前 言

随着现代生物工程技术的迅猛发展，使得多种生物获得了来自其它生物或人工合成基因所编码的能促进优质高产、抵抗病虫害等生物灾害和非生物逆境等的优良性状。1983 年世界首例转基因植物培育成功，标志着人类用转基因技术改良农作物的开始。1986 年转基因农作物获得批准进入田间试验，1994 年第一例转基因作物在美国获得批准商业化种植。此后，全球转基因作物应用取得了突飞猛进的发展。2002 年全球转基因作物种植面积达到5870万公顷，较1996 年约170 万公顷猛增了35 倍，其中大豆、棉花、玉米和油菜等4 种主要转基因作物的种植面积已占这4 种作物世界总面积的22%。我国2002 年转基因作物种植面积达到210 万公顷，其中转苏云金杆菌*Bacillus thuringiensis* (Bt) 毒素蛋白基因棉花的种植面积在2001~2002 年间增加了40%，成为继美国、阿根廷和加拿大之后种植转基因作物面积最大的国家 (James, 2002)，2004年种植面积的年增长率为32%，种植面积由2003年的0.28亿公顷增长到2004年的0.37亿公顷，相当于我们棉花总种植面积的66%。转基因作物带来的社会、经济和生态效益十分明显。据估计，1999 年全球通过应用转基因作物而获得的经济利益达到甚至超过10 亿美元 (James, 2001)，2002 年美国因此获得的净收益高达15 亿美元 (James, 2002)，至2003年已达到440亿美元以上，仅美国转基因作物2003年的净利润就达19亿美元之多。2006 年生物技术作物完成了几个里程碑：生物技术作物年种植面积超过一亿公顷（两亿五千万英亩）；第一次种植生物技术作物的农民数量（一千零三十万）超过了一千万人；从1996年至2006年的累计种植面积超过了五亿公顷达五亿七千七百万公顷（十四亿英亩）1996至2006年空前地翻了60倍，使转基因成为近代历史为人们采纳最快的作物技术。2006年种植生物技术作物的国家的数量从21个增加到22个，欧盟国家斯洛伐克第一次种植转基因玉米，并且使欧洲25个国家中参与种植转基因作物的国家的总数达到6个。西班牙2006年种植面积是六万公顷，继续保持其在欧洲的种植转基因作物的领先地位。颇具影响的是，欧洲其他五个国家（法国、捷克共和、葡萄牙、德国和斯洛伐克）转基因玉米的总面积从2005年约计一千五百公顷到今年的八千五百公顷，增长五倍多，虽然面积不大，但是2007年这五国的种植面积还将继续上升。2006年，全球生物技术作物的市场价值，根据Cropnosis 估算，达六十一亿五千万美元，占2006年全球植保市场总额三百八十亿五千万美元的16%，及2006 年全球商品种子市场总额计三百亿美元的21% (James, 2006)。

在中国，据估计2010年转基因作物的净利润将达到50亿美元，其中转基因棉花只占10亿美元，而短期内有望获得批准进行商业化推广的转基因水稻的利润将达40亿美元之多 (James, 2004)。

水稻是地球上近30 亿人口的主要食物来源。据估计，到2025 年水稻产量需再增产70%才能满

足日益增长人口的需求 (Khush, 1995)。然而水稻病虫害, 特别是螟虫 (二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等) 为害严重威胁水稻生产, 限制了增产的潜能。据 Herdt (1991) 估算, 每年因水稻螟虫为害而造成的产量损失可达 100 亿公斤。为有效控制水稻螟虫为害, 并减少化学杀虫剂使用量, 自 20 世纪 90 年代以来, 国内外已有多个研究组开展了转基因抗虫水稻的研究工作, 并在转 Bt 基因水稻培育方面取得了较大进展 (Bennett *et al.*, 1997; 叶恭银等, 1998), 获得了不少抗虫效果好的籼稻、粳稻和杂交稻株/品系 (Datta *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 1998; 叶恭银等, 1998), 而且有些已进入了田间中试 (Tu *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001a;b; 2003)。转 Bt 基因水稻的培育成功为水稻增产带来了可能, 其商业化前景十分广阔。

Bt 水稻的靶标害虫主要是鳞翅目幼虫, 如二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟等。转 Bt 水稻在其体内或特定组织表达的外源杀虫蛋白被靶标害虫取食后, 作用于昆虫中肠上的靶标受体而发挥杀虫效果。Bt 水稻在防治害虫的同时, 也与其他许多防治药剂一样, 存在着害虫产生抗性的风险。

大面积的推广 Bt 作物可能对给靶标害虫施加较大的选择压力以致害虫产生抗性 (Tabashnik, 1994; Ostlie *et al.*, 1997; Gould, 1998)。在田间防治害虫方面, Bt 已经成功应用了 30 多年。目前虽仅报道一种靶标害虫——小菜蛾 *Plutella xylostella* 在田间产生了抗性 (Ferre & van Rie, 2002)。但是在室内人工选择条件下, 已有多钟害虫对 Bt 产生抗性 (Janmaat & Myers, 2003), 其中有烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens*, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, 和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 等 (Van, 2000)。

因此, 实施有效的害虫抗性治理 (IRM) 已成为保证 Bt 作物长期使用的有效措施 (US EPA and USDA, 1999)。美国环保署 (EPA) 要求在美国注册登记 Bt 作物时必须提供完备的 IRM 计划 (FIFRA Scientific Advisory Panel, 2001)。

害虫抗性监测技术是害虫抗性治理的必要组成部分, 其目的是明确害虫田间种群敏感/抗性水平、抗性种群地理分布及其抗性变化动态等, 为提出抗性治理策略与措施并展开抗性治理提供依据。本文就水稻重要害虫——稻纵卷叶螟对 Bt 水稻的抗性风险及其对策进行了初步的研究, 旨在为今后转基因抗虫水稻全面推广后监测、延缓并治理水稻螟虫的抗性提供必要的理论依据, 并为开展转新型杀虫基因及转多价基因抗虫水稻培育提供物质依据。

致 谢

上帝做的最公平的一件事情，就是给了每个人一天都只有24小时，1440分钟。但是每天对于每个人的意义是不一样的。对我，上帝给了格外的眷顾，让我在2005~2007两年内的每一分钟都有了别样意义的深刻感受。

两年的研究生生涯即将匆匆走过。逝去的是时间，但留下的却是对我人生成长有着重大影响的人和事的珍贵记忆和经历。在此论文完成之际，我要对曾经指导、帮助和陪伴过我的人表示诚挚的感激之情。

首先，我要向尊敬的两位导师姚洪渭副教授和叶恭银教授表示衷心的感谢与崇高的敬意！从论文选题、设计到工作开展方面两位导师都予以全面关怀和悉心指导，在学习、科研和生活各方面也都给予了极大的关心与帮助。

姚老师对本领域发展动态的准确把握以及对科研的热爱、执着和追求，使我终身难忘和受益匪浅；他平易近人的为人风格也让我们师生之间的感情得到了加深。

叶老师渊博精深的学识、实事求是的学风、尖锐敏捷的思路、诲人不倦的风范、兢兢业业的精神、勤奋忘我的品质，为我们在攀登科学高峰的荆棘道路上树立了一面鲜明的旗帜，引导着我们奋发拼搏，勇往直前。

我要感谢本所刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、徐志宏教授、施祖华教授、姜永根教授、莫建初教授、祝增荣研究员和唐启义研究员等的授业解惑和关心指导！这无疑为我顺利完成学业奠定了坚实的基础。蒋明星副教授、余虹副教授、马云高级实验师、芮开宁老师在论文期间也给予了热心指点与帮助，为论文完成提供了便利。

在校期间，还得到了农学院和植保系各级领导、老师的热情关怀和支持，在此一并谢过！

浙江理工大学蒋彩英博士、美国Cornell大学博士后陈茂先生、东华大学李凯博士、温州市农科院李芳芳博士、广西省农科院黄诚华博士、山东医学院张忠博士、云南大学吴国星博士、浙江大学袁志东硕士、山西农业大学郭建洋硕士，课题组博士生董胜张、石宇、吴玛莉、张倩倩、慎小晶、方琦、朱家颖、田俊策、王欢，硕士生韩成香、董卉、高秀云、吴珏靖，以及本所博士生杨琼、巩中军、康桂娟、张文俊，硕士生左文、郭近、赵改、张长波，寝室的室友郑昀晔博士、华水金博士等在为本论文的完成提供了不少便利和帮助的同时，也给我的研究生生活增色不少。

感谢我勤劳朴实、默默无闻、任劳任怨、无私奉献的父母、对我关爱有加的姐姐、姐夫和所有亲朋好友始终如一的支持和帮助！再次深深地感谢大家！

张广林

2007年5月于杭州华家池畔

第一章 文献综述

1 抗虫作物的抗虫基因资源

由于昆虫与植物之间存在相互进化的关系，许多重要害虫日益猖獗，仅靠常规抗虫品种已很难达到良好的控制效果，因此需不断寻找新的抗虫基因和新的方法以培育出对害虫具有高抗性的转基因作物。利用基因工程技术将外源抗虫基因导入植株体内使植物自身产生抗虫物质，培育成转基因抗虫植物，为害虫的有效防治提供了一条新的思路。

克隆得到的抗虫基因按照其来源可分为三大类：第一类是植物源抗虫基因，主要包括植物凝集素（Lectins）、蛋白酶抑制剂（proteinase inhibitor）、淀粉酶抑制剂（ α -Amylase inhibitors）和酶类。第二类是微生物来源的抗虫基因，主要指苏云金杆菌杀虫蛋白基因；第三类是动物源抗虫蛋白，应用较多的是来自烟草天蛾的蛋白酶抑制剂与蝎和蜘蛛所产生的毒素。

1.1 蛋白酶抑制剂（Protease Inhibitors, PI）与GMO

蛋白酶能催化蛋白中的肽键断裂，按照其催化作用的机理和活性中心的氨基酸种类蛋白酶可以分成四类：（1）丝氨酸蛋白酶，含有丝氨酸和组氨酸；（2）半胱氨酸蛋白酶，含一个半胱氨酸；（3）天冬氨酸蛋白酶，含天门冬氨酸盐组；（4）金属蛋白酶，含有一个金属离子（ Zn^{+} ， Ca^{2+} 或 Mn^{2+} ）（Neurath, 1984）。

蛋白酶抑制剂是对蛋白酶有抑制活性的一种小分子蛋白质，普遍存在于植物、动物和微生物中。1936年Kunitz等（Kunitz *et al.*, 1936）首先从牛胰脏中分离出碱性胰蛋白酶抑制因子（BPTI或Kunitz型抑制因子）。1946年Kunitz（Kunitz, 1946）又从小豆中分离出胰蛋白酶抑制因子，并结晶，证实了其为蛋白质，从此揭开了蛋白酶抑制因子的研究序幕。

蛋白酶抑制剂根据其作用于酶的活性基团不同及其氨基酸序列的同源性，可分为丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂（Richardson, 1991），其中，丝氨酸类蛋白酶抑制剂与抗虫关系最为密切，因为大多数昆虫（包括大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以及某些鞘翅目）肠道内的蛋白酶主要是丝氨酸蛋白酶。巯基蛋白酶抑制剂则对以半胱氨酸类蛋白酶为主要消化酶的鞘翅目昆虫的防治有价值（Ryan, 1989）。Broadway 研究认为，当昆虫摄食蛋白酶抑制剂后，蛋白酶抑制剂主要通过抑制昆虫消化道内蛋白水解酶的活性，过度刺激胰腺合成和分泌大量对抑制剂敏感的蛋白酶，从而引起某些必需氨基酸的缺乏，扰乱昆虫的正常代谢，最终导致昆虫发育不正常甚至死亡（Broadway, 1986）。Hendriks（1991）等认为：蛋白酶抑

制剂的生物合成具有阶段性，即在某一阶段合成后，随后又被降解，其合成机理还有待于进一步研究。Cordero (1994) 等研究得出，植物的愈伤组织可以诱导蛋白酶抑制剂的合成。当植物组织受到创伤时，其体内蛋白酶抑制剂量急剧上升，从而抑制昆虫对植物组织的取食。另外，Kim (1991) 等研究发现，马铃薯蛋白酶抑制剂II (protease inhibitor II, PTII) 基因具有损伤诱导型启动子，如果使用这类启动子调控其它外源抗虫基因在植物中的表达，将具有特殊的意义。

人们早就观察到植物蛋白酶抑制剂的抗虫作用。1947年Mickel和Standish发现有些昆虫无法在大豆制品上正常生长。20世纪50年代初Lipke 等开始了大豆抑制剂对杂拟谷盗 (*Tribolium confusum*) 生长发育的研究，发现大豆浸提物能使杂拟谷盗生长缓慢，发育不良，同时，还检测到大豆浸提物对杂拟谷盗幼虫肠道蛋白酶有抑制作用。后来，Brik 等发现大豆浸提物能抑制重要害虫赤拟谷盗 (*T.castenmum*) 幼虫的生长。分离纯化结果表明，该抑制物是一种胰蛋白酶抑制剂。这些结果提示人们，蛋白酶抑制剂可能是一种新的抗虫物质，从此以后，人们开始了对蛋白酶抑制剂抗虫作用的研究 (Ryan CA, 1990)。

从英国Durham大学Hider (1987) 等人利用农杆菌叶盘转化法，首次将豇豆蛋白酶抑制剂 (cowpea trypsin inhibitor, CpTI) 的cDNA转化到烟草植株中并获得抗虫转基因植物以来，到目前为止，至少有15种不同来源的蛋白酶抑制剂的cDNA或基因被克隆，并转入不同植物，其中大部分均获得对昆虫具有明显抗性的转基因植株。

在害虫与植物本身含有的或是被诱导产生的蛋白酶抑制协同进化的过程中，害虫会发展出一系列抵抗其抑制效果的策略。这些策略包括非靶酶对其降解，由上游其他不被抑制的蛋白酶调控发展成复杂的酶解系统，以克服抑制作用。害虫对过量表达蛋白酶抑制剂植物的适应反应已被证实 (Bolter and Jongsma, 1995; Jongsma *et al.*, 1995; Broadway, 1996; Girard *et al.*, 1998; Bonade'-Bottino *et al.*, 1999; Paulillo *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2001)，但是，存在于害虫肠内的蛋白酶抑制剂是怎样诱导不敏感消化蛋白酶产生还不清楚 (Jongsma and Bolter, 1997; Broadway, 1997)。

1.2 Bt杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Proteins, ICPs) 与GMO

苏云金芽孢杆菌是一种能够产生伴孢晶体的革兰氏阳性细菌。Bt伴孢晶体其实是一种具杀虫活性的蛋白质，即杀虫晶体蛋白 (ICPs) 或 δ -内毒素 (Knowles, 1994)。伴孢晶体一般含有一种或多种杀虫晶体蛋白，而且，Bt的杀虫活性和杀虫特异性均取决于ICPs 的性质。到目前为止，Bt对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目、直翅目和食毛目的昆虫以及对线虫、螨类和原生动物等都具有一定的毒杀作用，且对哺乳动物和非靶标生物 (如捕食性天敌和昆虫病原寄生虫) 无毒，在生物防治中备受青睐，其生物制剂广泛应用于农林防治和蚊虫控制中。随着害虫对化学杀虫剂的抗性的增强，Bt也被越来越广泛地使用。与此同时，Bt基因也被转进不同作物中以控制日趋严重的昆虫

抗药性问题。

1.2.1 Bt概况

Bt首先于1901年由日本人Ishiwata Shigetane在患猝倒病的家蚕中分离得到，当时只认为是由一种杆状细菌所引起的疾病，因此该病源未能保存下来。1909年，E. Berliner 从德国苏云金省的地中海粉蛾（*Ephestia kühniella* Zell）中重新分离得到，并于1911年将感染家蚕幼虫的这种致病菌正式定名为苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）。1938年，Bt的第一个商品制剂Sporéine 在法国问世，并用于防治地中海粉蛾。Angus 在1954年证实Bt在孢子形成过程中产生的晶体蛋白内含体具有杀虫活性，即Bt杀虫特性由其杀虫晶体蛋白决定。Schnepf 等（1981）首次成功克隆得到第一个编码杀虫晶体蛋白基因，此后不断有新基因被发现并克隆。1983年首例转基因烟草问世，这为Bt基因广泛而深入的应用提供了新的发展方向。随后，转Bt基因抗虫烟草最先培育成功（Veack *et al.*, 1987）。

在苏云金杆菌（*B.thuringiensis*）和蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）中已经发现150多种Cry蛋白（Schnepf *et al.*, 1998）。不同Cry毒素之间在基因序列上有很大的差异，但都存在一组五个功能区域的保守区。通过比较Cry1、Cry2、Cry3的三维结构可以看出他们之间有高度的结构相似性（de Maagd *et al.*, 2001）。由于在保守的区域和结构的相似性，可能在功能上也存在高度的相似性。序列的差异必然与其靶标昆虫的种类和结合位点的特异性存在相应的联系。Cry蛋白的作用机制主要基于Cry1得出的，因为较多的研究主要集中在这种蛋白上（Aronson & Shai, 2001; Gringorten, 2001）。

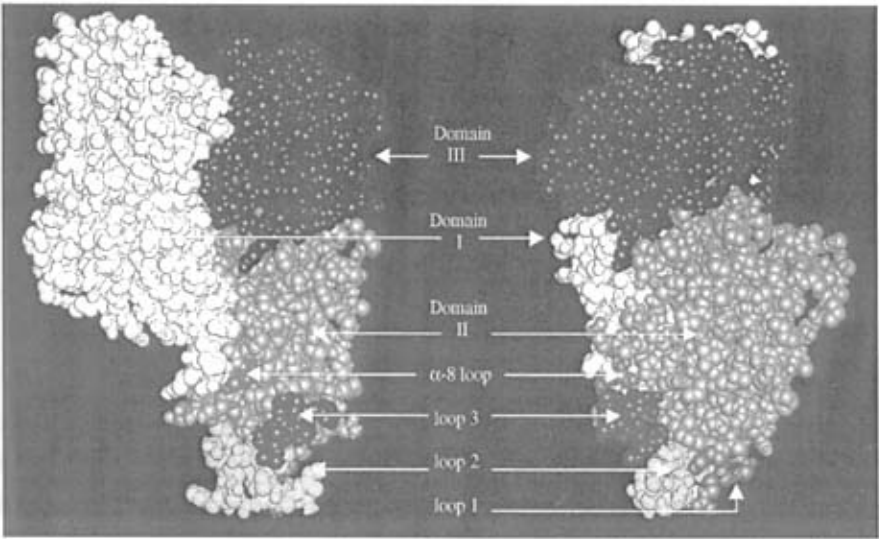


图1.1 Cry1Ab杀虫蛋白推测的三维结构（Schnepf *et al.*, 1998）
Fig.1.1 Three-dimension structure of insecticidal protein of Cry1Ab

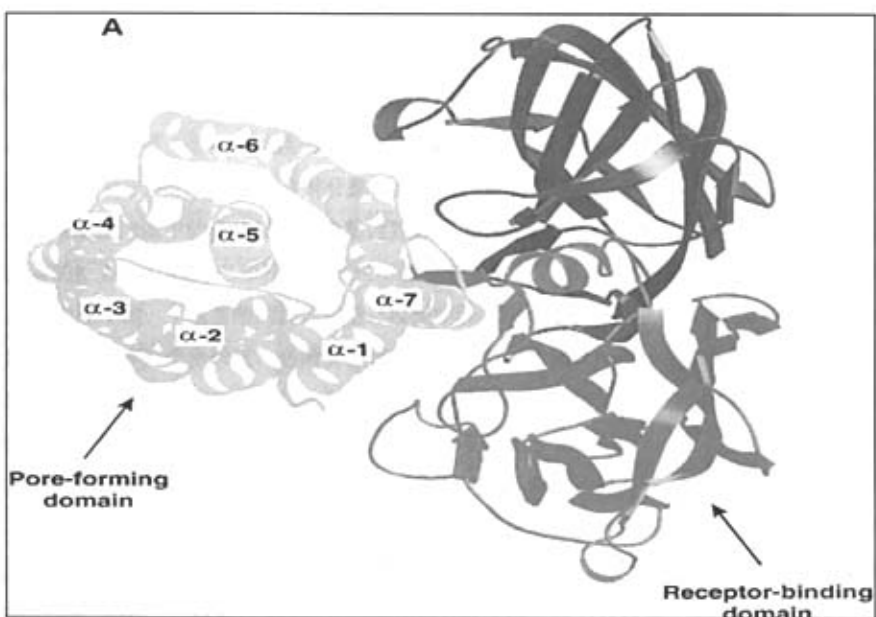


图1.2 Cry3A蛋白N-端带状示意图 (Li *et al.*, 1991)

Fig.1.2 Strip structure of insecticidal protein of Cry3A

Cry 蛋白由三个独特的结构域组成。N-端的结构域（结构域I）含有7个 α -螺旋，其中三对螺旋围绕一中心螺旋；结构域II有三个对称折叠的 β -片，在受体识别和结合发挥作用；C-端（结构域III）有两个 β -折叠片，在结合、识别、孔洞形成及通道特异性方面有关。三个结构域形成了倒“L”形，结构域III叠在结构域II上，结构域I 悬吊在侧面 (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001)。

1.2.2 Bt杀虫蛋白的作用机制

首先，进入肠内的植物组织先经过前肠，在前肠摄取的组织被进一步分解成小碎片。延伸到前肠内腔的小刺充当筛网，阻止大颗粒进入中肠。

通常鳞翅目昆虫的中肠的围食膜上排列着中肠上皮细胞。围食膜一般有黏多糖和蛋白质组成的蛋白多糖胶与缠绕的几丁纤维相交排列而成。这层膜将中肠内腔分成两部分：包含摄取的食物颗粒位于肠中央的外围食膜区和位于围食膜和中肠肠壁细胞之间的内围食膜区。围食膜起着物理屏障的作用，防止中肠上皮细胞层受到机械损伤和选择性得让营养成分通过。这层膜有个小孔，不能让细菌和植物毒性大分子通过到达内围食膜区，例如单宁 (Chapman, 1998)。

食物的最初酶解消化发生在外围食膜区，消化后更小的分子进入到内围食膜区再被进一步消化和被中肠上皮细胞表面的微绒毛吸收。有些消化酶是分区存在的，而另外的消化酶则存在于围食膜

上。比如，胰蛋白酶和淀粉酶等消化酶是食物的最初消化必需的，所以在内围食膜区可以发现。而在外围食膜区包含氨基肽酶和海藻糖酶，消化后的氨基酸和多糖通过围食膜转运到内围食膜区。

植食性昆虫需要一个极端碱性的中肠环境，鳞翅目幼虫的中肠的pH值一般在10-11的范围内。高的pH值能防止单宁和消化酶配位并钝化酶的活性。将单宁与叶片蛋白分离之后，昆虫的消化能力增强了。中肠上皮细胞中的杯状细胞向中肠内腔分泌碳酸钾来保持pH的稳定。这些细胞同样可以利用依靠能源的 K^+ 泵，从血淋巴和柱状细胞将 K^+ 泵回中肠内腔，从而维持着高的 K^+ 浓度。高的pH值和 K^+ 浓度在内腔中被，于氨基酸的协同扩散，以便中肠上皮的柱状细胞吸收营养（Gringorten, 2001）。

Bt要成功发挥其杀虫效果，必须克服昆虫的各种防御措施。Bt晶体蛋白被昆虫摄入后，其毒力发挥依赖于一个多步骤的复杂过程，包括晶体蛋白的溶解、原毒素到活性形式的蛋白水解过程、与中肠受体，亲和力的结合过程以及毒素插入膜的不可逆过程（Jenkins *et al.*, 2000）。为了能通过昆虫的前肠，Bt必须以非常小的孢子形式而不是营养体。从Bt孢子的晶体内容物中释放出的Cry 蛋白是以非活性的原毒素形式存在的。在毒力发生以前，原毒素必须经过蛋白水解过程，这过程则需要昆虫中肠的高pH 值环境和各种消化酶的参与。活化过程包括晶体蛋白羧基端和氨基末端的去除（Gringorten, 2001）。毒素一旦被活化，就由内腔经壁膜扩散进入内膜空间，这样就到达了柱状上皮细胞的表面（Hill and Pinnock, 1998）。

在细胞表面，Cry 蛋白与受体结合（Ferre and Van Rie, 2002），在此过程中，氨肽酶和类似于钙粘着蛋白的细胞支持分子被认为是Cry 蛋白的结合受体（Luo *et al.*, 1997; Vadlamudi *et al.*, 1995）。Dorsch 等（2002）认为Cry 蛋白的结合过程通常发生在与膜结合蛋白结构最接近的膜区域。此外，Jurat-Fuentes 等（2002）通过对受体结合的研究发现Cry 蛋白在细胞表面可以和多个位点结合，且认为糖基化对蛋白和受体间的相互作用起着积极重要的作用。所以，害虫对一种Cry蛋白产生抗性时，不会出现对所有Cry蛋白都产生抗性。尽管个体中的多重抗性等位基因被证明可以导致害虫对多个Cry蛋白产生交互抗性。（Sayyed *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2001; Jurat-Fuentes *et al.*, 2002）

当受体与晶体蛋白结合后，结构域I 首先发生重排，形成象“伞”一样的结构，其三对 α -螺旋打开并插入膜中，把结构域III 带至于膜的表面。Li 等（2001）研究发现Cry 蛋白的插入是个不可逆的过程。随着插入过程Cry 蛋白发生了聚合，孔结构也随之形成。孔结构在很大程度上是一个四聚物，也形成 K^+ 选择通道（Gringorten, 2001）。此通道的形成，立即给昆虫带来了两个致命的生理变化。首先，上皮细胞中的 K^+ 梯度被破坏，导致血淋巴中 K^+ 浓度的增加。其次，pH 值梯度的破坏，导致中肠内腔pH 值的下降和血淋巴中pH 值的提高。最终，导致受影响的细胞被破坏和渗透裂解。随着中肠上皮细胞的裂解，孢子也得以在中性环境中生长，从中汲取营养。大多数昆虫并不是被杀虫蛋白直接杀死，而是由于中肠被麻痹、取食受抑制，最终死于饥饿或败血症。

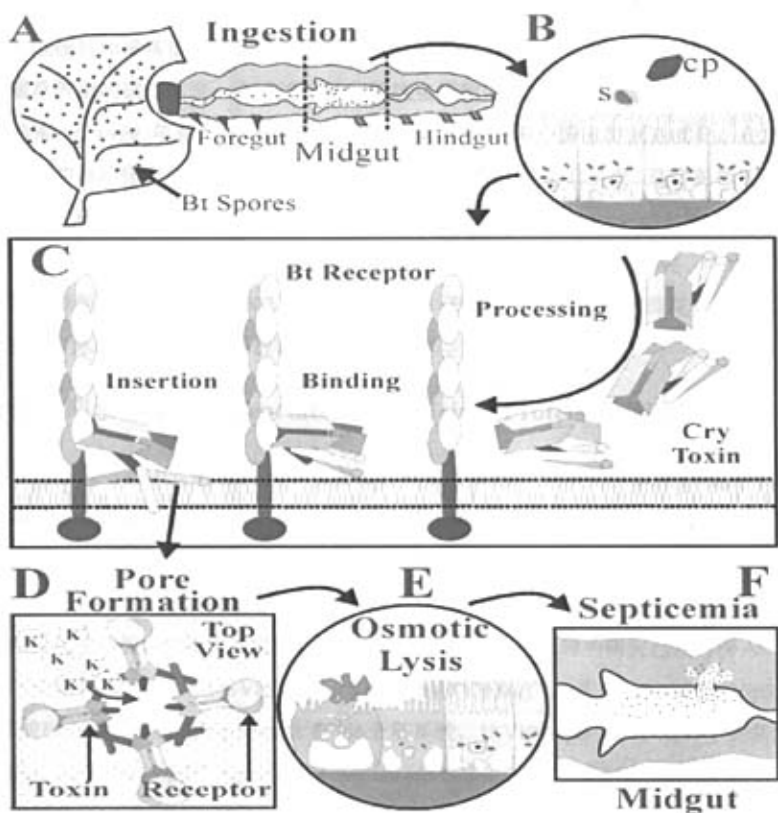


图1.3 杀虫蛋白的毒性作用机制 (Whalon *et al.*, 2003)

Fig.1.3 Mechanism of toxicities of insecticidal proteins

1.2.3 在转基因作物上的应用

Bt内毒素蛋白基因目前研究最多，至今已克隆得基因已达300余种。然而自然的野生型Bt内毒素蛋白基因在转基因植物中的表达水平较低。因此为了获得高效抗虫的转基因植物，就须对野生型基因进行修饰，消除对高效表达不利的因素。如Perlak等(1991)对*cry1Ab*和*cry1Ac*进行修饰，改变了21%的核苷酸，经修饰的基因在棉花中获得了高效表达，表达量由原来的占可溶性蛋白总量的0.001%提高到0.05-0.1%，增加了50~100倍。1993年Fujimoto等对*cry1Ab*进行广泛地修饰，66%密码子第三位的A或T碱基被G或C所取代，*cry1Ab*经修饰后不仅消除了其mRNA不稳定的因素，而且使其密码子更适合于水稻的翻译系统，不存在调控密码子，大大提高了翻译效率。该修饰的*cry1Ab*在水稻中能进行高效表达，其蛋白表达量近占可溶性蛋白总量的0.05%。此外，经修饰的*cry3A*和*cry1Ab*分别在马铃薯和玉米中得到了高效的表达，从而达到了高效抗虫之效果。近年来，许多国家

已开展了大规模转Bt毒素蛋白基因植物的环境释放试验。自1986年PGS公司首次在美国和法国进行转基因烟草的田间试验以来,全球进行转基因抗虫植物田间试验800余次,占有转基因植物田间试验的18%。至1999年初,70多种转基因作物已经在10多个国家得到商品化,在80种已经批准或即将批准的商品化转基因作物中,21种为转Bt基因作物,其中以玉米、马铃薯和棉花为主。2002年全球仅Bt玉米和Bt棉花这两种转基因作物的商业化种植面积就高达1.45亿公顷(James, 2002)。在我国,已获得转Bt基因植物有棉花、玉米、水稻、番茄、欧洲黑杨、花椰菜、马铃薯和烟草等,其中Bt棉花已得到商品化生产,2002年种植面积210万公顷,已超过全国棉花种植总面积的51%;转Bt抗虫玉米、水稻已进行环境释放试验。

1.3 Bt营养期杀虫蛋白(Vegetative Insecticidal Proteins, VIPs)与GMO

1996年Estruch等在Bt发酵上清液中发现营养期分泌的一类新型杀虫蛋白即营养期杀虫蛋白(Vegetative Insecticidal Proteins, VIPs),对鳞翅目和鞘翅目害虫具有较广谱的杀虫活性(Estruch *et al.*, 1996)。与ICPs不同,VIPs蛋白是从对数生长期中期开始分泌的,在稳定前期达到最高峰。

直至目前,VIPs主要分为Vip1、Vip2和Vip3三种,对Vip1和Vip2作用于昆虫的情况未进行细胞病理学和免疫化学试验,对其作用机理也不了解。关于Vip3作用机理的研究已较为深入。其中Vip3A是一类新型的蛋白质,主要包括Vip3A(a)、Vip3A(b)和Vip3A(c)。其中Vip3A(b)与Vip3A(a)具有98%的氨基酸序列同源性,而Vip3A(c)含有746个氨基酸,比Vip3A(a)少了C-端43个氨基酸。现已克隆了vip3A(a)、vip3A(b)、vip3V、vip3A-S184、vip-S、vip83等vip3A类基因(Estruch, 1996; Doss, 2002)。15-23%的Bt都含有Vip3A基因(Schnepf *et al.*, 1998; Rice, 1999)。

Vip3A引起的症状与ICPs的相似,但是时间上推迟了,后者则只需16-24h。而两者的作用机制则完全不同:ICPs在昆虫碱性中肠中溶解,前毒素经中肠胰蛋白酶作用后,将C-端切除,加工成对昆虫有活性的毒蛋白,毒蛋白再与中肠上皮细胞刷状缘膜(brush border membrane vesicles, BBMV)的受体结合,引起昆虫细胞膨胀解体,导致昆虫死亡(Schnepf *et al.*, 1998);而Vip3A毒蛋白在pH 5~10之间都可溶解(Lee *et al.*, 2003),其C-端也不被切除,与敏感昆虫上皮结合,诱发昆虫细胞凋亡,细胞核溶解,最终导致昆虫死亡(Selvapandiyan *et al.*, 2001)。细胞凋亡是细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)的三种现象之一。PCD在绝大部分多细胞生物中都存在,对昆虫而言,PCD是在其生长发育或对微生物感染的一种反应(Yu *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 2001)。虽然多数PCD现象相当类似,但对许多昆虫而言,细胞质膨胀、空泡化而不是浓缩似乎是细胞凋亡的一种相关现象。由于昆虫的中肠作为重要的营养摄取和吸收场所,使中肠细胞崩溃似乎是多数杀虫蛋白的作用方式。

尽管苏云金杆菌内毒素是有效的杀虫晶体蛋白,但有几种农业上重要的害虫对其仍不敏感。鳞

翅目小地老虎（Black cutworm, BCW）（*Agrotis ipsilon*）就是其中一种。小地老虎是为害包括谷类作物在内50多种作物的世界性害虫。这种害虫之所以很难控制，因为当发现作物被为害时，已经错过了害虫的敏感期（如幼虫期），其造成的损失可能非常严重而且不能逆转。

Vip3A对鳞翅目昆虫具有较广谱杀虫活性，甚至是一些对Bt杀虫晶体蛋白有很强抗性的昆虫，如Vip3A(a)对小地老虎的毒性要比CryIAc高260倍，但对鞘翅目昆虫无效。

转基因植物可以提高植物的抗虫性，减少损失。VIPs已经以多种方法导入不同作物。Estruch等于1998年成功地将vip3A(a)基因与不同的启动子（如PEPC、Ubi和MTL等）构成表达载体通过粒子轰击法导入I型玉米愈伤组织，得到的转基因玉米对小地老虎和草地贪夜蛾的杀虫效果都很好。vip3A(a)基因可以全序列或毒性片断导入植物，而ICP基因只能以毒性片断导入植物，因为两种毒蛋白在昆虫中肠作用机制不同。同时，他又将vip3A(a)基因和其它ICP基因共表达构建出多价转基因植物，如将转vip3A基因玉米和转cryIIb基因玉米杂交，得到杂交后代中有27.9%对欧洲玉米螟和草地贪夜蛾均有效。同样，转vip3A基因和转cryIIa与cryIIc基因的玉米杂交也有类似的效果（Warren, 1998; Estruch *et al.*, 2000）。

1.4 外源凝集素（Lectin）与GMO

植物外源凝集素（lectin）是非免疫来源的糖蛋白或结合糖的蛋白质，能聚集细胞和（或）沉淀糖蛋白，它广泛存在于植物的各种器官中，尤以豆科植物的种子中含量最丰富。凝集素具有对多种单糖和寡聚糖的专一性结合能力，不同植物的凝集素对同翅目、鞘翅目、鳞翅目和双翅目表现有毒性（Gatehouse & Gatehouse, 1998）。

凝集素抗虫的作用机制可能是其特异地结合到昆虫消化道围食膜的几丁质或上皮细胞的糖缀合物或糖基化的消化酶上，影响营养物质的正常吸收；同时还可能在消化道内诱发病灶，促进消化道内细胞的繁殖，破坏其消化系统，使昆虫得生长停滞甚至死亡；另外凝集素也能微弱地与脂肪体、卵巢、血淋巴结合，破坏循环系统（程家安和唐振华, 2001）。

目前研究较多的凝集素基因有：雪花莲凝集素（GNA）基因、豌豆凝集素（P-Lec）基因、麦胚凝集素（WGA）基因和半夏凝集素（PTA）基因。其中WGA和PTA不仅对昆虫有毒性，对哺乳动物也有强毒性。GNA和P-Lec对哺乳动物毒害较小，因而较多地集中在GNA和P-Lec基因的转化研究上，近年来利用这两类凝集素基因所进行的基因转化工作日渐增多，已在包括马铃薯、小麦、陆地棉等多种植物中得到表达，大大增强了作物的抗虫性（Birch *et al.*, 1999; Stoger *et al.*, 1999; 王伟等, 1999）。

1999年用GNA转化小麦，证明GNA能降低麦长管蚜（*Sitobion avenae*）的繁殖力。徐琼芳用基因枪法也获得了转GNA基因的小麦植株（徐琼芳, 2001）。而Hilder等（1995）在CaMV35S启动子下构建GNA表达载体获得转基因烟草，试验证明受试蚜虫个体平均大小显著小于对照组，繁殖力

也大大降低。1997年也有试验表明,转GNA马铃薯能显著降低桃蚜繁殖力(Gatehouse *et al.*, 1997)。

豌豆凝集素(Pea-lectin)对人体无毒,可用于根系的特异性表达,将可能用于防治难以控制的地下害虫。豌豆凝集素基因是研究较为深入的一种抗虫基因,其基因是单拷贝的,它的初始产物是一个25kDa的前体蛋白,转运到内质网后裂解为成熟的外源凝集素 α 和 β 亚基。Edward 等(1991)在CaMV35S启动子及ssRubisco小亚基启动子下正确表达P-lectin,其表达量占可溶性总蛋白的1%以上,凝血活性及特异性均表现正常。另外,麦胚凝集素对稻飞虱和桃蚜也有一定的毒性(Powell *et al.*, 1995)。水稻和蓖麻凝集素也具有和麦胚凝集素相同的杀虫效果,把水稻外源凝集素基因转入豇豆中,可对豇豆象产生抗性(Gatehouse *et al.*, 1997)。

1.5 淀粉酶抑制剂(α -Amylase Inhibitors, α AI)与GMO

淀粉酶抑制剂在植物界广泛存在,可以抑制动物、微生物的淀粉酶活性而对植物本身的淀粉酶不起作用。 α -淀粉酶抑制剂对鳞翅目和同翅目等昆虫有毒性。抑制特异性是淀粉酶抑制剂的重要性质,它保证选择性转入植物的抑制剂基因表达产物只对有害昆虫和病原微生物起作用,不影响植物自身的淀粉酶和农作物的营养价值,这是淀粉酶抑制剂是否能用于抗虫转基因工程的最重要因素(Titarenko & Chrispeels, 2000)。

目前了解较多的是来自菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的 α -淀粉酶抑制剂(α AI-Pv),它是一种热稳定的糖蛋白,能够与昆虫或哺乳动物的 α -淀粉酶1:1形成复合物。实验表明,转 α -AI-Pv 基因的烟草和豌豆均能阻止鞘翅目幼虫的生长发育(Altabella and Chrispeels, 1990; Schroeder *et al.*, 1995)。

1.6 动物来源的抗虫基因与GMO

在这一类基因中,研究较多的是来自哺乳动物和烟草天蛾(*Manduca sexta*)的蛋白酶抑制剂基因。经体外抑制实验发现来自牛的三种蛋白酶抑制剂(BPTI、 α 1AT和SI)均能显著抑制昆虫中肠提取物的蛋白质降解,然而,当把这些基因转入马铃薯,并未出现预期的抗虫效果,以转基因马铃薯饲喂的幼虫其体重反而超过了对照(Schuler *et al.*, 1998)。与牛的蛋白酶抑制剂不同,来自烟草天蛾的蛋白酶抑制剂基因被导入棉花和烟草均表现出了一定的抗虫性(Thomas *et al.*, 1995)。

另一类研究较多的是由蝎和蜘蛛所产生的毒素。这些毒素一般都能专一性作用于昆虫而对哺乳动物无害或毒性很小。Barton(1990)曾将5种蝎毒基因导入烟草,发现转基因烟草对棉铃虫和烟青虫具有很高的致死性。

第三类来自动物的抗虫基因是几丁质酶基因。从目前的研究来看,这类基因的抗虫效果并不明显。例如:来自烟草天蛾的几丁质酶基因被转入烟草,转基因烟草对鳞翅目害虫几乎没有表现出抗性(Estruch *et al.*, 1997)。

2 转基因抗虫作物培育

转基因作物育种又称“基因转移”、“基因导入”或“基因嫁接”，它是在体外或试管中借助酶促反应将目的基因或异源DNA片段，与适当的载体（Ti 质粒或病毒）进行重组，得到杂种DNA分子，然后将杂种DNA分子导入并整合到受体细胞染色体上，在受体细胞中复制、转录、翻译和表达出导入DNA所携带的优良遗传性状，从而按育种目标定向培育出新品种或新物种。

将外源抗虫基因导入植物离不开遗传转化技术。近年来，基因转化技术飞速发展，对于一些诸如禾本科单子叶植物和木本植物等曾被认为比较难以转化的植物也先后取得成功。目前，国内外常用的转基因技术体系有：（1）DNA 直接转化系统，主要包括通过聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）、脂质体、电激、超声波、显微注射、激光微束和基因枪等介导的基因转化；（2）以质粒DNA为载体的转化系统，如根癌农杆菌Ti 质粒介导的基因转化；（3）以种质系统介导的转化系统，包括花粉管通道法、生殖细胞浸泡法以及胚囊与子房注射法等（王关林等, 1998）。

不同的转化技术体系对于外源基因整合到受体细胞染色体上的作用机制不尽相同，最终可影响到外源基因在转基因植物中遗传与表达的稳定性。外源基因通常是随机地整合到受体细胞染色体上，这可以是插入到植物基因组的任何一条染色体的任何位点，而且还可以是单基因位点或多基因位点整合。DNA直接转化系统和以种质系统介导的转化系统往往导致外源基因在受体细胞中的整合呈现复杂化，并在转化当代及子代中出现DNA环化、甲基化、外源基因片段分离或丢失、基因重排、串联及多拷贝插入等现象（Finnegan *et al.*, 1994; Casas *et al.*, 1995）；以质粒DNA为载体的转化系统通常可形成1-2个拷贝或低拷贝整合，而且外源基因结构较为完整，整合位点较为稳定（Zambryski, 1988），其遗传稳定性相对较高（吴刚, 2000）。许多研究发现外源基因在转基因植物中出现转基因沉默（transgene silencing）和表达活性降低现象，这在很大程度上与不同的转化技术体系所引起的外源基因在受体植物中不同的遗传与表达模式有关。转基因沉默与失活现象已严重影响转基因抗虫作物在农业生产上的应用，例如1996年7月美国Texas州东部出现Bt棉对美洲棉铃虫*Helicoverpa zea*失控问题（Kaiser, 1996）。此外，转基因沉默与失活也是许多转基因抗虫作物未能进入商品化生产的主要原因之一。因此，如何稳定和提高外源抗虫基因在植物体内的表达，是当前植物抗虫基因工程的一个重要研究方向。

1983 年世界首例转基因烟草的培育成功，标志着人类利用转基因技术改良农作物的开始。1986 年首批转基因作物批准进入田间试验，1992 年商业化种植，1994 年美国第一例转基因作物产品（延熟保鲜转基因番茄）批准上市，转基因作物发展非常迅猛。

就转基因抗虫作物而言，至今已获得百余种转Bt内毒素蛋白基因、蛋白酶抑制剂基因、凝集素基因以及 α -淀粉酶基因等不同抗虫基因的转基因植物（Hilder *et al.*, 1999; 叶恭银等, 2001）。目前，

在美国至少有18种转基因抗虫作物通过田间试验，其中转基因玉米、棉花和烟草等已被广泛种植（Obrycki *et al.*, 2001）。

在现有的转基因抗虫作物中，以转Bt内毒素蛋白基因作物的研究与利用最为广泛、深入。根据转基因植株获得的先后以及外源Bt基因表达水平的高低，转Bt基因作物的发展可分为2个阶段。第一阶段为20世纪80年代中后期，以Vacek等（1987）获得的首例转基因烟草为代表，其特点是Bt基因表达水平相当低，植株抗虫性较差。这是由于当时所使用的Bt杀虫晶体蛋白基因直接来源于细菌，富含AT碱基，密码子偏好与高等植物差异较大，使得外源杀虫基因的转录不稳定，翻译效率差。第二阶段为20世纪90年代，以Perlak等（1991）培育的转基因棉花为代表。在不改变编码氨基酸序列的情况下，对*cry*基因进行修饰（去除富含AT区，提高GC含量）以适宜于植物中表达，使得外源基因的表达水平提高近100倍，并获得良好的抗虫效果。此外，也有通过利用组织特异性启动子或强启动子等方法提高Bt内毒素表达水平（Kozziel *et al.*, 1993）。

至今全球已获得了60多种转Bt基因抗虫植物，其中以双子叶植物居多，而单子叶植物因其遗传转化较困难，所以获得的转Bt基因植物相对较少。近年来，许多国家已开展了大规模转Bt毒素蛋白基因植物的环境释放试验。自1986年PGS公司首次在美国和法国进行转基因烟草的田间试验以来，全球进行转基因抗虫植物田间试验800余次，占有转基因植物田间试验的18%。至1999年初，70多种转基因作物已经在10多个国家得到商品化，在80种已经批准或即将批准的商品化转基因作物中，21种为转Bt基因作物，其中以玉米、马铃薯和棉花为主。2002年全球仅Bt玉米和Bt棉花这两种转基因作物的商业化种植面积就高达1.45亿公顷（James, 2002）。在我国，已获得转Bt基因植物有棉花、玉米、水稻、番茄、欧洲黑杨、花椰菜、马铃薯和烟草等，其中Bt棉花已得到商品化生产，2002年种植面积210万公顷，已超过全国棉花种植总面积的51%；转Bt抗虫玉米、水稻已进行环境释放试验。就其它转基因抗虫植物而言，国内外已至少获得20余种转蛋白酶抑制剂基因植物和14种转外源凝集素基因植物，而且已将 α -淀粉酶抑制剂基因、几丁质酶基因和Bt营养期杀虫蛋白基因等导入不同的植物中，其中多数表现显著抗虫性，少数已进行环境释放，但均尚未进入推广应用阶段（叶恭银等，2001）。

3 抗性产生的研究进展

理论上，昆虫和转基因植物之间存在着协同进化的关系，所以在转Bt作物发挥良好的抗虫效果的同时，害虫也会产生相应的变化，即抗性的产生。

在田间防治害虫方面，Bt已经成功地应用了30多年。尽管只有一种靶标害虫——小菜蛾*Plutella xylostella*产生了抗性（Ferre & Van Rie, 2002）。但是在室内条件下，已经有害虫对Bt产生抗性

(Janmaat&Myers, 2003) 这些害虫有, 烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens*, 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 等 (Van, 2000) 。

3.1 抗性产生的机理

目前, 在抗性机制方面的研究主要集中在原毒素的活化以及毒性蛋白与肠膜受体间的相互作用上 (Ferre *et al.*, 2002), 抗性的类别主要有两大类:

3.1.1 蛋白酶调控的抗性:

肠道蛋白酶活性的下降导致伴孢晶体的溶解和原毒素的活化速度减慢或者因为蛋白酶活性的增强导致原毒素和活化毒素的降解。

在毒蛋白的作用机理中已提到昆虫肠道内蛋白酶在伴孢晶体的溶解和毒素的活化过程有重要的作用。鳞翅目昆虫的消化酶大部分是丝氨酸类蛋白酶 (Applebaum, 1985; Terra and Ferreira, 1994)。丝氨酸类蛋白酶包括胰蛋白酶 (trypsin)、糜蛋白酶 (chymotrypsin) 和弹性蛋白酶 (elastase)。Huang 等 (1999) 和 Li 等 (2004) 报道抗Dipel (一种Bt制剂, 包含Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2A、Cry2B五种蛋白) 欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 品系的可溶性胰蛋白酶类似物的溶解活性明显下降, 活化原毒素的下降和蛋白酶活性的下降有关。

在最近的研究中, Li 等通过比较了欧洲玉米螟抗性品系对Cry1Ab原毒素和胰岛素人工活化并纯化的Cry1Ab两者的抗性水平, 以及利用northern blot 和适时定量PCR分析胰岛素蛋白酶类似物基因在抗性和敏感幼虫中基因的表达水平, 确认了上述关于抗Dipel 欧洲玉米螟品系的抗性和蛋白酶活性下降之间关系的假设 (Li *et al.*, 2005) 。

3.1.2 肠膜受体分子调控的抗性:

肠膜受体基因的突变导致和Bt蛋白结合能力下降。Van Rie等 (1990) 首先比较了人工活化的Cry1Ab毒素分子与印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) Bt抗感品系的BBMV相互作用的亲和性或Kd值。发现抗性品系的BBMV与Cry1Ab的亲和性下降了50倍, 与Cry1Ca的亲和性没有变化, 但其结合位点显著增加。与Cry1Ab的亲和性显著下降是对Cry1Ab抗性的重要原因, 与Cry1Ca的结合位点恰好说明该抗性品系增强了对Cry1Ca的敏感性。

肠膜受体Cadherin调控的Bt抗性首先在一烟芽夜蛾 (*H. virescens*) Bt抗性品系 (YHD2) 中发现。YHD2对Cry1Ac具高度抗性 (>1000倍), 该抗性与其Cadherin基因遭转座子的插入有关 。

3.1.3 其他一些机制

细胞膜上孔洞的形成细胞膜上离子孔洞的形成受阻以及孔洞的阻塞都有可能是抗性产生的原

因。而且这将是抗性产生的非常有效的环节，因为如果所有Bt毒素都通过这种方式作用，一旦孔洞不能形成或阻塞，将能阻止其它的毒素在细胞膜上形成孔洞或通过孔洞，很容易产生交互抗性（Tabashnik, 1997）。

行为机理：许多昆虫在取食毒素后几乎都有一个快速的停食反应，害虫在行为上对Bt毒素的逃避行为将减少毒素的摄入量，这也是抗性产生的一种方式。例如实夜蛾属（*Heliothis*）昆虫的幼虫能区分出含有毒素的饲料（Gould *et al.*, 1991）

3.2 抗性的监测

转基因作物的生态风险如害虫的抗性问题的不容忽视。如同各种化学农药的使用一样，随着Bt作物的推广应用，害虫在持续选择压力下，也将对Bt毒素产生抗性。据报道，经室内汰选已有10余种昆虫对Bt蛋白或Bt作物产生抗性（Tabashnik, 1994），尤其是小菜蛾（*Plutella xylostella* L.）在田间自然条件下对Bt制剂产生了抗性。昆虫对Bt毒素产生抗性已经在3个目的昆虫上得到证实。1985年，McGaughey首次发现了印度谷螟（*P. interpunctel* Hubner）对Bt生物药剂的抗性；1992年，Gill发现双翅目昆虫对其产生抗性；1993年，Whalon等发现鞘翅目昆虫对Bt制剂产生抗性（Navon, 2000）。

害虫抗性监测技术是害虫抗性治理的必要组成部分，其目的是明确害虫的抗性水平、地理分布及抗性变化动态，为抗性治理提供依据。

3.2.1 通过种植户对田间仿效的反馈

Bt作物上出现大量的害虫危害和生存迹象，在证明田间Bt作物仿效失败非常有用。在抗性大面积出现之前，一般在部分区域首先发生。种植户在其Bt作物上发现潜在的抗性，这实际上也就无形中充当了哨兵的角色。但种植户失效的报道最大的弊病是此时通常不能较早地采取治理措施，应对发现的问题只能是利用其他化学方法简单地代替现有的Bt作物（US EPA, 2001）。

3.2.2 剂量-反应型生物测定

剂量-反应技术因其成本相对较低和容易操作的优点，而成为害虫抗性监测最常用的方法（Everich *et al.*, 1992; Bolin *et al.*, 1998; Mascarenhas *et al.*, 1998; Marçon *et al.*, 1999, 2000; Hardee *et al.*, 2001）。操作方法主要包括：1）田间收集害虫；2）室内饲养一代或多代以提供生测的足够的后代；3）将特定的时期的昆虫暴露于一系列Bt浓度之下；4）通过概率分析确定致死剂量（比如，LD₅₀, LC₅₀, LD₉₅, LC₉₅）；5）通过历史和已有的资料，比较致死浓度的差异。致死-反应生测在建立敏感性底线，明确害虫抗性种群的存在，确认田间仿效失效是否由于抗性的发展导致都发挥重要的作用。US EPA（2001）提议田间抗性种群的LC₅₀应该超过同期敏感种群的LC₅₀的95%置信上线。

此外，从致死-剂量生物测定衍生出来的在确定诊断/识别致死剂量已被用于抗性监测。US EPA

和USDA强制要求对Bt作物的靶标害虫的抗性敏感基线（US EPA, 2001）。在致死-剂量生物测定中，有限的昆虫样本通常又被划分到几个浓度中，其中有些浓度只能造成很低或零的死亡率。而这些信息通常在抗性频率是否在害虫种群中发生变化的判断中没有什么帮助。所以，当通过致死-剂量生物测定得出致死剂量值发生了显著变化时，田间的害虫早已进化产生了抗性（Roush & Miller, 1986）。从致死-剂量生物测定得到的信息和田间的仿效失败的报告一样，都不能及时有效地治理产生抗性的种群。相应地致死-剂量生物测定方法在Bt作物的抗性监测中通常不单独使用（Andow & Alstad, 1998）。

3.2.3 诊断/剔除剂量生物测定

诊断（或剔除）剂量方法因为所有的昆虫都是通过单一诊断剂量的表现型来判断，因而比剂量-反应生物测定方法更有效（Roush & Miller, 1986）。这项技术的关键部分是确定一个能区分含有抗性基因的基因型的可行的诊断剂量。通常，诊断剂量是有剂量-反应生物测定来确定（Marçon *et al.*, 2000）。99%死亡率的致死剂量通常在抗性监测中被定为诊断剂量。理想地，一个诊断剂量通常要通过遗传和抗性水平都已清楚的种群来检验。诊断剂量方法在监测显性或部分显性抗性中特别有效。但是，这种方法不能监测隐性抗性中的杂合个体。所以此方法本身在Bt抗性频率很低的许多种昆虫种群监测中不是可行的技术。

3.2.4 F₁代单雌系筛选

Burd (2003) 改进了致死剂量用来筛选Bt非隐性抗性F₁单雌系。这方法包括：1) 建立能将表现型呈抗性和敏感的个体区分开的剔除剂量；2) 收集田间的雌性成虫；3) 建立单雌系；4) 在Bt作物或饲料上筛选F₁代；5) 筛选后存活的个体认为是抗性个体。F₁代单雌系通常比剂量-反应生物测定或诊断剂量方法能筛选更多的田间野生个体。所以，在估计抗性等位基因频率时，F₁单雌系筛选比只对田间收集的种群后代进行生测的传统诊断剂量更准确。然而，此方法除非F₁代的个体足够多，否则仅能监测非隐性抗性（Burd *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004）。因此，单独使用F₁代筛选田间Bt隐性抗性同样不可行。

3.2.5 F₂代筛选

Andow和Alstad (1998, 1999) 提出了F₂代筛选技术。这项技术包括：1) 收集田间交配的雌性成虫；2) 通过饲养每一雌性个体后代，并将F₁代个体之间自交建立单雌系；3) 在Bt作物或含有Bt蛋白的饲料上筛选F₂代；4) 筛选后确认抗性个体。通过F₁后代的自交，F₂代中1/16的个体被认为带有纯合的抗性等位基因。因为每一交配的雌虫都至少带有四个单倍型（两个来自自己，两个来自其配偶），每个单雌系都带有四个等位基因（Andow & Alstad, 1998）。所以，这种技术可以监测隐性抗

性中的杂合个体，因为它可以推断出田间收集个体的基因型。 F_2 代筛选被认为在抗性是隐性的情况下，比单独的诊断剂量方法更有效。然而，这种方法需要从田间收集大量的昆虫建立众多的单雌系，并用诊断剂量对每一个单雌系的 F_2 后代进行筛选。费用将是 F_2 代筛选的问题，所以，有效的昆虫取样、饲养和抗性筛选在筛选过程中显得相当关键（Andow & Alstad, 1998）。针对降低 F_2 代筛选花费的几个修正方案也相继提出（Bentur *et al.*, 2000; Génissel *et al.*, 2003; Stodola & Andow, 2004）。最近，Huang 等2006年提出利用充分生长的Bt玉米V6JV8时期离体的叶片组织代替整株Bt玉米植株和包含Bt蛋白的饲料，对玉米螟Bt抗性进行 F_2 代筛选。相对于整株Bt作物，Bt玉米叶片组织用于 F_2 代筛选的一个缺点在于离体的叶片组织内的Cry蛋白浓度或杀虫活性可能发生了改变（Huang *et al.*, 2006a）。总之，强大的 F_2 代筛选方法使得对低频率的抗性的监测成为可能，并且应该在Bt作物上害虫抗性监测的核心方法。

3.2.6 与室内已知抗性昆虫杂交进行筛选

Gould等（1997）提出利用一系列田间的昆虫和室内得到的抗性个体杂交来估计田间种群的抗性等位基因频率。这种方法包括：1）建立室内高度Bt抗性昆虫种群；2）收集田间雄虫；3）将收集的雄虫与Bt抗性昆虫杂交；4）在Bt作物或Bt诊断剂量处理的饲料上筛选 F_1 后代。通过杂交， F_1 代幼虫如果是纯合的抗性等位基因，那么田间的雄性抗性个体就会被监测出来。这方法有几个主要的假设：1）抗性是隐性的；2）抗性是常染色体遗传；3）田间种群的抗性等位基因和室内的抗性雌性是相同的。此方法在监测稀少的隐性抗性等位基因是非常有效的。对已知抗性的监测效果和 F_2 代筛选的效果是相等的，而费用却大大降低了。但其较大的局限在于高抗性室内种群的获得和遗传学背景的明晰。此外，这种方法通常仅能识别和已知Bt抗性种群相同的抗性等位基因。

3.2.7 田间调查和实验室生物测定结合

某些情况下，当警戒区不能实现的话，那么从田间Bt作物上收集的活虫可以用做抗性等位基因频率的估计。此方法包括：1）收集田间Bt作物上的昆虫；2）饲养田间采集的昆虫一代或多代为生测提供足够的虫量；3）在Bt作物或含Bt蛋白的饲料上对田间害虫后代进行筛选。Tabashnik等（2000）使用了这种方法估计了美国亚利桑那州的棉红铃虫（*Pectinophora gossypiella*）的Bt抗性等位基因频率。这种方法最大的局限在于从田间Bt作物上采集活的害虫需要花费大量的人力物力。此外，这种方法估计因为从高剂量表达的田间Bt作物上只能收集到数量有限的活虫，会有较大的误差。然而，这种方法的估计精确性可以通过结合 F_2 代筛选或通和过已知室内抗性种群的杂交来提高。

3.2.8 DNA标记

在了解了昆虫种群中Bt抗性的分子机制之后，抗性突变的基因序列可以被克隆和测序，所以，

每一个突变的等位基因特异性PCR引物被用于监测田间个体的DNA是否存在相同的突变。DNA为基础的监测方法可以区分杂合和纯合敏感个体。无论是隐性还是显性遗传，分子监测可以直接监测遗传差异而非依赖可观察的表现型来区别，因此可以消除环境因子对生测和生化结果的影响。DNA标记的方法也可以利用各个生育阶段的死虫，所以这方法比传统的监测稀有纯合抗性个体拥有较高的效率和灵活性（Morin *et al.*, 2004）。DNA方法的缺点是大多数的抗性基因目前还不知道。此外，其效果依赖抗性个体的多样性，而且，分子标记监测比传统的生测在供应、设备、较高的技术培训等方面花费较大。

3.3 抗性的治理措施

与化学农药相比，害虫对Bt生物农药及转毒素产品产生抗性的速度比较缓慢，这主要与Bt杀虫剂残效期短，以及它是由芽孢杀虫晶体蛋白（ICP）及一系列外毒素等组成的混合物有关（Tang *et al.*, 1992）。尽管如此，室内抗性选育试验表明多种害虫具有对Bt发展抗性的潜在危险，已经报道很多种昆虫能对Bt产生抗性（Halcomb *et al.*, 2000）。如大田小菜蛾由于对常用化学农药产生抗性，从而大量广泛地应用Bt生物农药进行防治，近年来，已经导致了美国夏威夷，美国本土和亚洲小菜蛾对Bt产生抗性。因此，我们必须在深入研究害虫对Bt抗性的生化及遗传机制的基础上，按照害虫综合治理的原则，结合田间生态环境，建立合理、有效的抗性管理策略，从而延长Bt制剂及转Bt基因作物的应用（梁革梅，谭维嘉，郭予元，1999；崔金杰，夏敬源，2000）。

3.3.1 同种作物中转入多个杀虫基因

转基因育种实践表明，目的基因的整合最好是单基因，否则会引起目的基因的沉默，不同转基因抗虫植物品系间杂种的Bt基因间无同源重复引用的抑制现象（Van Emden, 1999）。在Hobbs等人研究中，GUS 基因表达量高的拟南芥转基因品系间互交，GUS 基因的表有累加效应。如果转基因抗虫棉品系间杂种后代也有累加效应，这将为多个不同的Bt基因转入同一遗传背景。通过Bt基因的累加效应而提高转基因抗虫棉的抗性效果。据报道，将Bt基因导入烟草叶绿体基因组，可以显著提高烟草对烟草夜蛾的抗性（张天真和唐灿明，2000）。其转入的基因可以是具有不同结合位点的Bt基因，也可将蛋白酶抑制剂基因（如丝氨酸蛋白酶抑制剂基因、马铃薯蛋白酶抑制剂基因等）与Bt基因同时转入同一种作物中，以提高杀虫效果，延缓抗性的产生。由于害虫对不同的Bt杀虫晶体蛋白具有交互抗性（Caprio & Suckling, 2000），因此应用该策略时必须防止害虫对不同杀虫蛋白的交互抗性。试验证明，将多个抗性基因转到作物品种或杂交品种中，比连续种植单基因抗虫作物更具有持久的抗性（Ghidiu & Zehnder, 1993），但这要依不同的害虫而定，比如对小麦上的蚜虫而言，该策略没有多大效果，因为蚜虫生物型产生很快。1961~1995年，已经报道蚜虫有11个生物型，

每5年1个新的生物型，然而仅报道了6个抗性基因。但是对高粱上的蚜虫，在新的生物型产生之前已经发展和利用该抗性基因2~5年，该策略很有效（Porter *et al.*, 2000）。另外，在棉花抗虫育种中，除了转移Bt杀虫晶体蛋白、蛋白酶抑制剂基因和其他多肽毒素基因外，也可考虑把无蜜腺、鸡脚叶等形态抗性和一些生理抗性结合起来，培育复合的转基因抗虫棉品种，以增加抗虫的有效性。

3.3.2 提高转基因植物Bt杀虫晶体蛋白的表达量

高表达策略要求表达的毒素能杀死所有抗性杂合子害虫，由于杂合子相互交配会产生抗性纯合子后代，从而使抗性迅速提高，所以杀死杂合子害虫是延缓抗性的重要途径。但高表达策略的风险（Daly, 1994）表现在：（1）毒素表达量逐渐减少。Fitt等（1994）发现抗虫植物在生长初期杀虫效果很好，而后期较差据推测，可能随植物发育成熟，ICPs的表达量减少，或其他次生物质（如单宁）的合成增多，对ICPs产生拮抗。ICPS的表达量也可能因植株受到高温或低温、干旱等环境胁迫而减少。一旦表达量不足以杀死杂合子害虫，该策略就可能失效；（2）对大量初孵幼虫的高强度选择压，将加速害虫抗性种群的发展。（3）由于抗虫植物区害虫数量大大减少，天敌数量也将大为减少，从而使避难区天敌数量增多，减少了避难区的敏感虫数，这违反了IPM理论，也将加速抗性上升。考虑到高表达策略可能的风险，该策略与避难区策略结合实施乃是最佳方案（Denholm & Rowland, 1992）。

3.3.3 “高剂量—庇护所”策略

用“高剂量—庇护所”策略来防止害虫产生抗性的理论基础有3个因素：（1）植物组织必须高毒性，以便昆虫抗性是隐性并且杂合体也被杀死（Roush & McKenzie, 1987）。被报道的主要Bt抗性等位基因是部分、或完全隐性（Tabashnik *et al.*, 1997）；（2）抗性突变因子是稀有的($P < 10^{-3}$)，以便有少量的同型纯合子存在 ($P^2 < 10^{-6}$)；（3）Bt作物与非Bt作物保护带的合理配置以便抗性纯合子（RR）将能与敏感纯合子（SS）随机杂交或优先选择杂交产生不能继续生存的杂合后代（Gould, 1998）。无论是计算机模拟还是室内实验都已证实。用“高剂量—庇护所”策略可防止棉铃虫产生抗性（张天真等, 2000; 谭声江等, 2002）。最近发现欧洲玉米螟（*O. nubilalis*）对Bt生物农药Dipel的抗性表现为不完全显性，因此，玉米用“高剂量—庇护所”策略来防止欧洲玉米螟产生抗性的效果就会下降口（Huang, 1999）。用混有Bt生物农药的饲料喂养烟蚜夜蛾等多种害虫的试验表明，对Bt生物农药产生抗性的昆虫是由于发生了隐性基因突变。即这种抗性是由一对隐性基因（rr）控制的，因而在大面积种植转基因抗性品种后。害虫产生基因突变，由RR 变成Rr。在转基因抗虫植物杀虫晶体蛋白高剂量表达下，杂合体Rr也将被杀死。即使产生基因型为（rr）的抗性害虫，由于可以与“庇护所”中的野生型昆虫（RR）交配，产生基因型为Rr的后代，它们对转基因抗虫作物敏感，仍然可以被杀死。

3.3.4 加强早期抗性监测

在使用转基因技术的过程中，进行抗性监测非常重要。多种抗性检测综合应用，特别需要充分利用现代科学技术进行抗性监测，提供一个更完整的监测项目。监测的结果可用于抗性治理策略的成功实施并为新策略的实施提供可靠的依据，同时也可以根据田间害虫发生情况和抗性监测的调查结果适时调整监测计划。

3.3.5 特定时间和组织的表达

治理害虫抗性的最有效办法是避免害虫不必要的接触杀虫蛋白（Roush, 1997）。构建组织特异性或特定时间表达杀虫基因作物，使Bt毒素在作物的某一部分或作物发育的特定时期表达（Williams *et al.*, 1992）。一般来说，如能种植具有组织、时间专一性表达Bt毒素的植株，调节Bt毒素在转基因植物上的时空表达特性，尽可能在害虫为害的高峰期表达将能较好地延缓抗性的发展（Gould, 1998）。

诱导表达启动子能够通过使用不同的良性的化合物让Bt蛋白在需要的位置和时间表达（例如，当害虫的密度超过了经济阈值或易受威胁的植物生殖结构形成时）。已有研究表明利用含有化学诱导启动子的转*cry1Ab*的甘蓝可以诱导迅速表达Bt蛋白（Cao *et al.*, 2001）。然而，这种植物启动子系统作为抗性治理方法的有效性还有待于进一步验证。

3.3.6 发现新的杀虫蛋白

利用具有不同靶标位点新的Cry蛋白和选择性强并有不同的作用机理，不产生交互抗性的非Cry杀虫蛋白，在IRM中有巨大的潜在价值，实施起来会更快和更有效。苏云金杆菌在芽胞期产生杀虫晶体蛋白，而在营养生长阶段产生同样产生集中杀虫蛋白（Schnepf *et al.*, 1998）。这些杀虫蛋白（Vips）结构和功能都不同于晶体蛋白，并对很多种鳞翅目和鞘翅目害虫表现出杀虫活性（Warren, 1997; Lee *et al.*, 2003）。转*vip*基因棉花正在Syngenta（Greensboro, NC, USA）进行田间评价。

另外一种具有IRM应用潜力的非Cry蛋白是从嗜线虫致病杆菌（*Photobabidus luminescens*）分离的杀虫蛋白“毒素A”。嗜线虫致病杆菌是和某些病原线虫共生的细菌。当线虫感染害虫时，毒素A会导致害虫的死亡。转毒素A基因的拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）可以高水平表达蛋白。并且转化的植物至少对一种鳞翅目害虫表现良好的杀虫效果和对一种鞘翅目害虫表现中等的杀虫效果（Liu *et al.*, 2003）。除了毒素A外，嗜线虫致病杆菌的基因组被认为包含了几种编码有杀虫活性蛋白的基因（Williamson & Kaya, 2003）。

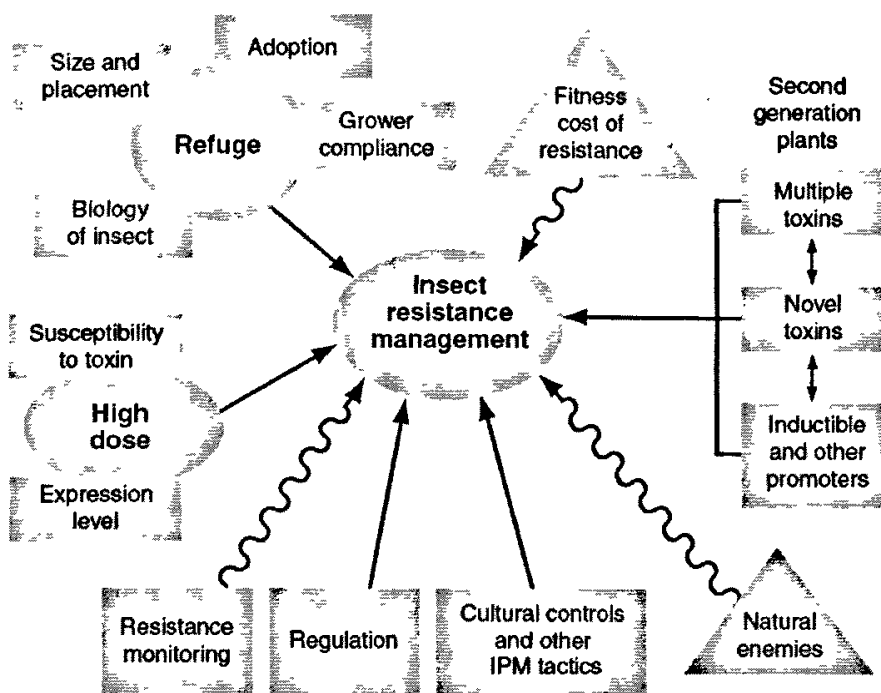


图1.4 影响转基因抗虫作物IRM治理策略的因子 (Saraha *et al.*, 2005)

Fig1..4 Factors influencing the IRM strategies of transgenic insect resistant crops

3.3.7 其他害虫综合治理措施

分子育种不应该是发展了的转基因作物IRM策略的唯一关注点。在澳大利亚，农业防治在棉红铃虫 (*H. armigera*) 的控制和其抗性治理中仍发挥重要作用。通过翻耕土壤压制越冬蛹数量，缩短植物生长期以减少筛选的代数 and 限制Bt的种植面积等在降低抗性的选择压方面都发挥了重要的作用 (Roush, 1997; Zhao *et al.*, 1998)。

天敌的利用很值得一提。模型已显示，如果天敌造成的取食转基因作物的敏感昆虫死亡率大于保护区敏感昆虫死亡率，那么捕食者和寄生生物可能会延缓抗性发展的速度 (Gould, 1994)。但是如果在保护区植物上的害虫密度较高将导致天敌对其的致死率发生不均衡的偏高，那反而会加速抗性的发展。

从IPM 宗旨出发，对害虫治理应该同时使用多种措施，以防治害虫对其中一种产生高抗性。还有许多措施可以考虑，如农业和生物防治、利用性引诱剂干扰性成虫交配等。

第二章 稻纵卷叶螟对Cry1Ab蛋白及其转基因水稻的敏感性

诊断剂量 (diagnostic dose) 或区分剂量 (discrimination dose) 技术是联合国粮农组织 (FAO) 推荐用于害虫抗性田间监测的主要方法之一。它可以区分田间种群中对药剂敏感的个体进而估测抗性分布频率及其变化。诊断剂量技术无论是用于早期诊断还是抗性治理的效果评估都比致死中浓度 (LC_{50}) 或致死中量 (LD_{50}) 更灵敏、准确。诊断剂量的确定方法很多, 通常, 需要先获得目标害虫的SS个体 (敏感纯合子品系) 对某药剂的敏感度基线, 然后用该品系的 LC_{99} 或 $LD_{99.9}$ 的剂量处理, 存活个体即为杂合子 (RS) 和抗性纯合子 (RR) 个体。一般都要以敏感基线的 LD_{99} 或 $LD_{99.9}$ 作为诊断剂量。这就要求用害虫的敏感品系来测定, 但绝大多数害虫的敏感品系都很难获得。目前, 在室内通常是通过遗传杂交方法来纯化、获得与害虫田间种群具有相同遗传背景的敏感品系, 筛选工作较繁琐、费时, 因此多数害虫的抗性研究多以在尚未用药地区采集相对敏感种群作为研究的敏感品系。

从种群遗传学角度来看, 害虫田间种群按不同基因型和表现型可分为敏感纯合子 (SS)、杂合子 (RS) 和抗性纯合子 (RR), 抗性表现型分为敏感个体和抗性个体。因而田间种群对杀虫剂的毒力反应也有一定差异。以某药剂的20-30个系列浓度梯度绘出的LD-p曲线具有若干个平坡和拐点, 平坡和拐点的数量与种群抗性基因的个数和显隐性有关。因此可根据LD-p曲线的平坡和拐点来确定该害虫中去对某药剂的诊断剂量, 进而监测害虫田间种群的药剂敏感性及其变化 (李显春和王荫长, 1997)。

至今, 有关稻纵卷叶螟对Bt杀虫蛋白的敏感性问题尚未有系统研究。本文采用诊断剂量法及常规毒力曲线法测定了稻纵卷叶螟田间种群对Cry1Ab蛋白和转*cry1Ab*基因水稻的敏感性水平, 为稻纵卷叶螟对Bt及Bt水稻的抗性研究和田间抗性监测抗性监测提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2006年分别自浙江 (杭州、富阳、宁波和温州等)、江苏、安徽、江西、广东、广西和云南等地采集稻纵卷叶螟1代蛹, 于室内羽化、交配和产卵, 待孵化后以初孵幼虫供生物测定。同时, 于浙江杭州田间采集3代稻纵卷叶螟成虫配成单雌系用于对Cry1Ab蛋白及转*cry1Ab*水稻的敏感性测定。饲养温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度80%, 光周期16 L : 8 D。

1.2 供试水稻

转Bt基因水稻——克螟稻1号（KMD1）为第R8代转Bt基因粳稻纯合品系，采用农杆菌介导法获得，含有*cry1Ab*基因和Ubiquitin启动子，室内和田间条件下对水稻螟虫均表现高抗（舒庆尧等，1998；Shu *et al.*, 2000；Ye *et al.*, 2001a）。非转基因亲本为粳稻品种秀水11。

1.3 浸叶生物测定法

配制系列浓度Cry蛋白溶液（含0.1% Triton X-100），取新鲜非转基因水稻叶切成6.0cm长，经灭菌双蒸水漂洗后于系列蛋白溶液中分别浸没30s，取出晾干后置于铺有润湿滤纸的培养皿（Φ12.0cm）中，两端压以含保鲜液的棉花球保湿。每浓度设3~5次重复，每重复处理10头初孵幼虫。接虫后，用Parafilm膜封口，在温度28℃±1℃、相对湿度80%、光周期16L：8D条件下饲养，96h后考查幼虫死亡率（Ye *et al.*, 2001；Han *et al.*, 2007）。

1.4 稻纵卷叶螟对Bt杀虫蛋白敏感性测定

参照1.3方法，根据死亡率测定结果绘制多剂量LD-P曲线，利用平坡法确定抗性个体的诊断剂量。应用该诊断剂量，采用浸叶法（同1.3方法）测定稻纵卷叶螟田间种群单雌系（1200对）幼虫对Bt蛋白的死亡率。

1.5 稻纵卷叶螟对Bt水稻敏感性测定

采用植株生物测定法测定稻纵卷叶螟田间种群单雌系（400对）幼虫对Bt水稻的敏感性。取单对成虫移至栽有70天苗龄的Bt水稻的笼罩里产卵，记录初始产卵量，5日后记录残留卵量、存活幼虫数及虫龄等指标。饲养温度28℃±1℃，相对湿度80%，光周期16L：8D。

1.6 数据分析

生物测定数据采用POLO-PC软件计算获得LC₅₀值及其95%置信限，以两者LC₅₀值的95%置信限互不重叠示为显著性差异（Litchfield & Wilcoxon, 1949）。

2 结果与分析

2.1 稻纵卷叶螟对Cry1Ab敏感性的诊断剂量

以多剂量LD-p曲线法测定杀虫蛋白Cry1Ab对稻纵卷叶螟的诊断剂量（图2.1），结果如图所示。

Cry1Ab的多剂量LD-p曲线共呈现2个平坡，第1个平坡的Cry1Ab对数剂量为0.70-1.60，对应的稻纵卷叶螟幼虫死亡率的机率值为5.16左右（死亡率约为57%）；第2个平坡的Cry1Ab对数剂量为1.90-2.79时，对应的死亡率的机率值为6.71左右（死亡率约为96%）。由此，可选择620ng/cm²作为抗性监测的诊断剂量。

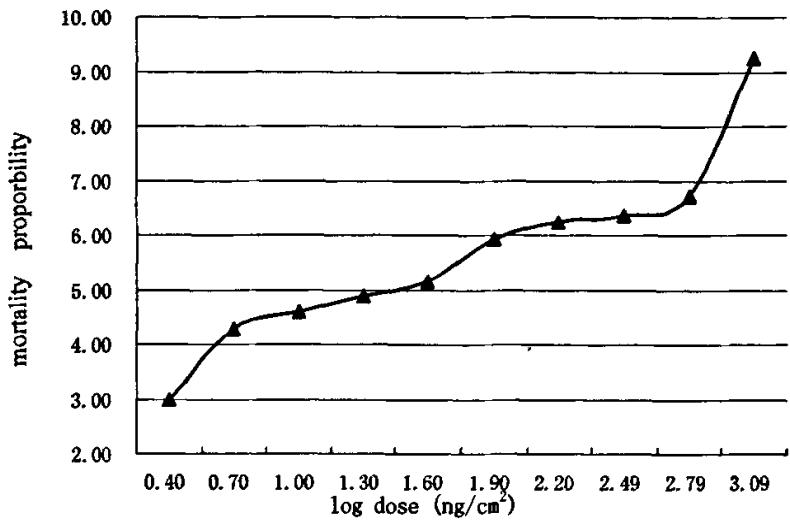


图2.1 稻纵卷叶螟初孵幼虫对杀虫蛋白Cry1Ab多剂量LD-p线

Fig.2.1 The multi-dose LD-p curve of *C.medinalis* response to Cry1Ab

2.2 稻纵卷叶螟对Cry1Ab蛋白敏感性的种群结构分析

采集的约1200对单雌系，仅有300对单雌系符合生物测定要求。经诊断剂量处理后，各单雌系的发育进度情况整理如下（表2.1）。

300对单雌系共孵化12,623头幼虫，经诊断剂量处理后，绝大部分稻纵卷叶螟群体对Cry1Ab是敏感的，高敏感种群达到92.82%，中度敏感性种群为6.72%，而不表现敏感性的群体只为0.17%。

300对单雌系对Cry1Ab的敏感性按幼虫发育阶段可分为4组，其中有178组（约59.33%）单雌系对Cry1Ab高度敏感，仅发育至1龄初；有93组（约31%）的单雌系表现中度敏感，有19组（约6.33%）单雌系对Cry1Ab表现低敏感性；只有10组（约3.33%）的单雌系为不敏感，可发育至3龄。84%的对照幼虫发育至3龄。

表 2.1 稻纵卷叶螟对Cry1Ab的种内敏感性变异

Table 2.1 Intra-population variation in susceptibility of *C.medinalis* to Cry1Ab

Susceptibility group	Developmemt stage	No.of isofemale	Proportio n(%)	No.of larvae	Proportion (%)
High	Early1st instar	178	59.33	11717	92.82
Moderate	Late 1st instar to early 2nd instar	93	31.00	848	6.72
Low	Late 2nd instar	19	6.33	37	0.29
No	3rd instar	10	3.33	21	0.17

2.3 稻纵卷叶螟对Bt水稻敏感性的种群结构分析

采集约400对单雌系用于测定对Bt水稻的敏感性，其中有150对符合生物测定要求（表2.2）。150对单雌系共孵化12,874头幼虫，其中5头发育至2龄末期，占总体的0.04%，只有1头发育至3龄，占总虫数的0.008%。稻纵卷叶螟种群对Bt水稻敏感性分布与对Cry1Ab的反应趋势相似，均以高敏感性单雌系所占比例较高，不敏感性单雌系比例较低。

表2.2 稻纵卷叶螟对转cry1Ab水稻的种内敏感性变异

Table 2.2 Intrapopulation variation in susceptibility of *C.medinalis* to transgenic Btrice

Susceptibility group	Developmemt stage	No.of isofemale	Proportion (%)	No.of larvae	Proportion (%)
High	Early1st instar	138	92.00	12827	99.63
Moderate	Late 1st instar to early 2nd instar	9	6.00	41	0.32
Low	Late 2nd instar	2	1.33	5	0.04
No	3rd instar	1	0.67	1	0.008

2.4 稻纵卷叶螟不同地区种群对Cry1Ab蛋白的敏感性

Cry1Ab蛋白对稻纵卷叶螟不同地区种群的 LC_{50} 范围从20.00 ng/cm²（浙江杭州）到69.60 ng/cm²（浙江宁波），其中后者 LC_{50} 是前者的3.48倍，有显著差异（表2.1）。其他地区种群之间对Cry1Ab敏感性并无显著差异。稻纵卷叶螟不同地区种群LD-p线的斜率以浙江宁波种群的相对较低，表明该

种群对Cry1Ab敏感性的异质性较高。结果表明，稻纵卷叶螟不同地区种群对Cry1Ab仍较为敏感。利用累计剂量对数反应方法（Kranthi *et al.*, 2001; Kranthi *et al.*, 2004），将各地的数据通过概率分析得到了累计对数剂量反应关系，从其中可以推导出LC₅₀为38.23 ng/cm²，即敏感基线值。

表 2.3 稻纵卷叶螟不同地区种群对Cry1Ab的敏感性

Table 2.3 The susceptibility of different <i>C. medinalis</i> populations to Cry1Ab					
Location	No. of Test larvae	LC ₅₀ (95%FL) (ng/cm ²)	Slope±SE	□χ ² (df)	Ratio
Zhejiang					
-Hangzhou	250	20.00(11.42-30.91)	1.31±0.18	1.95(3)	1.00
-Fuyang	250	47.00(3.95-131.26)	1.15±0.19	4.56(3)	2.35
-Ningbo	250	69.60(38.63-120.45)	0.76±0.11	0.98(3)	3.48
-Wenzhou	250	42.01(5.77-139.37)	1.06±0.15	5.63(3)	2.10
Jiangsu	150	33.01(12.82-61.28)	1.32±0.26	0.89(3)	1.65
Anhui	150	28.14(10.17-55.10)	1.10±0.21	1.88(3)	1.41
Jiangxi	150	43.58(22.87-74.06)	1.17±0.19	2.92(3)	2.18
Guangdong	150	32.39(13.58-60.88)	1.04±0.19	2.87(3)	1.62
Guangxi	150	29.58(15.46-49.2)	1.29±0.21	1.14(3)	1.48
Yunnan	150	38.55(22.69-62.13)	1.15±0.17	2.29(3)	1.93

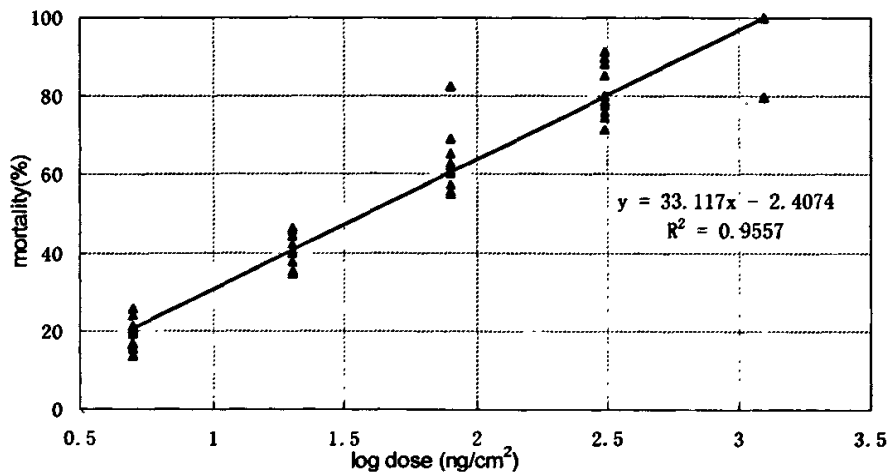


图2.2 稻纵卷叶螟对Cry1Ab的累计剂量反应

Fig. 2.2 Cumulative log dose response of *C. medinalis* to Cry1Ab

3 讨论

通常情况下,当田间防治失效时,害虫已产生较高水平的抗性。对此,只能换用无交互抗性的杀虫剂来防治。抗性治理只有抗性基因频率较低时才有效,所以必须对田间种群进行抗性监测(唐振华等,2003)。目前,常用的抗性早期诊断技术有基于敏感性测定的毒力测定法和区分剂量技术、基于抗性生理/生化机制的酶活测定技术、基于*Kdr*的电生理测定法、基于PCR技术的特异性等位基因PCR扩增(PCR amplification of specific alleles, PASA)、单链构象多态性分析(Single stranded conformational polymorphism, SSCP)和PCR限制性内切酶核苷酸分析法(PCR restriction endonuclease nucleotide, PCR/REN)等,其中以区分剂量法最为简便、实用(Forrester *et al.*, 1993; Sims *et al.*, 1996; Kranthi *et al.*, 1997)。

有关稻纵卷叶螟对Bt杀虫蛋白的抗性研究尚少有报道。本文测定了不同地区稻纵卷叶螟对BtCry1Ab蛋白的敏感性,发现不同地区种群之间的敏感性虽有一定差异,但多未达显著水平。这表明当前不同地区稻纵卷叶螟种群对Bt蛋白仍相对较为敏感,这可能与在Bt制剂在水稻生产上的应用相对较少有关。鉴于缺乏与田间种群具有相同遗传背景敏感品系,本文利用多剂量LD-p曲线法估测稻纵卷叶螟对Bt蛋白的诊断剂量,并可望用于田间抗性监测。从本文结果来看,稻纵卷叶螟种群对Cry1Ab和转*cry1Ab*水稻的敏感性呈现相似趋势,其中以对转*cry1Ab*水稻的敏感性水平相对更高。虽然稻纵卷叶螟测试种群中绝大多数个体仍相对较敏感,但该种群已有Bt蛋白抗性基因分布。如对Cry1Ab蛋白表现不敏感的比例,单雌系占3.33%,幼虫占0.17%;而对转*cry1Ab*水稻表现不敏感的比例,单雌系占0.67%,幼虫个体占0.008%。

第三章 水稻螟虫对4种Bt杀虫蛋白的敏感性测定

水稻螟虫, 如二化螟*Chilo suppressalis* (Walker)、大螟*Sesamia inferens* (Walker) 和稻纵卷叶螟*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) 等是严重威胁水稻生产的鳞翅目害虫。全球每年因其为害而造成的产量损失高达100亿公斤 (Herd, 1991), 其中我国水稻螟虫年发生面积约0.15亿公顷, 年防治代价约45.7亿~60.0亿元, 残虫造成的作物损失近65.0亿元, 总经济损失达115.0亿元 (盛承发等, 2003)。至今, 生产上一直使用化学杀虫剂防治水稻螟虫, 但长期大量不合理用药已导致水稻螟虫产生抗药性, 引起防效降低, 防治成本增加 (王荫长, 1991; 黄诚华, 2006)。微生物杀虫剂如苏云金杆菌*Bacillus thuringiensis* (Bt) 制剂等对水稻螟虫具较好防效 (王忠柳, 1990; 范仰东, 2001), 但由于见效慢、易受环境条件影响等而在实际应用颇受限制。

为有效控制水稻螟虫为害、减少化学杀虫剂使用量, 自上世纪90年代以来, 转基因抗虫水稻, 特别是转Bt基因水稻不断培育成功, 不少抗虫效果好的水稻品系已进入或通过了田间试验 (叶恭银等, 1998; Bajaj, 2005; Huang *et al.*, 2005)。2005年, 伊朗率先开展了转Bt基因水稻的商业化种植 (James, 2005)。我国亦正积极推进转基因水稻的商业化进程 (Huang *et al.*, 2005)。但是, 水稻螟虫作为靶标生物, 在转Bt基因水稻大面积商业化推广后能否产生抗性的风险问题一直颇受关注 (High *et al.*, 2004)。鉴于目前有关水稻螟虫对Bt杀虫蛋白 (Cry蛋白) 的敏感性尚少有研究, 本文就不同水稻螟虫田间种群对常用于转基因抗虫作物/水稻培育的目的基因所编码的4种Cry蛋白 (Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C和Cry2A等) 的敏感性进行了测定, 为水稻螟虫的Bt抗性研究以及转多价基因抗虫水稻的培育提供必要的依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2006年自杭州稻田分别采集二化螟、大螟和稻纵卷叶螟第2代成虫, 置养虫室内于稻苗上产卵。饲养温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度80%, 光周期16L: 8D。待卵孵化后, 取初孵幼虫测定对Bt杀虫蛋白的敏感性。

1.2 生物测定

采用人工饲料喂毒法测定二化螟和大螟对Bt杀虫蛋白的敏感性。分别参照FAO (FAO, 1980) 和Chatterji等 (Chatterji, 1969) 配方配制二化螟和大螟幼虫的人工饲料。分别取4种Cry蛋白 (Cry1Ab、

Cry1Ac、Cry1C和Cry2A等，由本实验室保存）按一定浓度梯度与人工饲料充分混合均匀，装入玻璃指形管（ $\Phi 2.0\text{cm} \times 10.0\text{cm}$ ）中。每处理浓度设3个重复，每重复接虫10头，共处理180头。以不含Cry蛋白的人工饲料为对照。接虫后，用棉花球封口，在无光照、温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度80%条件下饲养，96 h后考幼虫死亡率。

稻纵卷叶螟对Cry蛋白的敏感性测定采用浸叶法。分别配制不同Cry蛋白系列浓度溶液（含0.1% Triton X-100），取新鲜稻叶切成6.0 cm长，经灭菌双蒸水漂洗后于蛋白溶液中浸没30 s，取出晾干后置于铺有润湿滤纸的培养皿（ $\Phi 12.0\text{cm}$ ）中，两端压以含保鲜液的棉花球保湿。每处理浓度设3个重复，每重复接虫30头，共处理300头。以未经蛋白溶液处理的为对照。接虫后，用Parafilm膜封口，在温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度80%、光周期16L：8D条件下饲养，96 h后考幼虫死亡率。

数据采用POLO-PC软件（LeOra, 1987）计算获得 LC_{50} 值及其95%置信限，以两者 LC_{50} 值的95%置信限互不重叠示为显著性差异。

2 结果

不同水稻螟虫对4种Cry蛋白的敏感性不尽相同（表3.1）。二化螟以Cry2A的 LC_{50} 值显著较高，分别是Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1C的9.2、6.0和5.7倍；其中后3种Cry蛋白对二化螟的 LC_{50} 值无显著性差异。大螟对不同Cry蛋白的敏感性变化与二化螟的相似，亦以Cry2A的敏感性显著较低，分别是Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1C的14.4、3.5和3.0倍；其中Cry1Ac和Cry1C对大螟的 LC_{50} 值无显著差异，但均显著高于Cry1Ab的。4种Cry蛋白对大螟的 LC_{50} 值均明显较二化螟的为高，即大螟对该4种Cry蛋白的敏感性相对较低，其中对Cry1C和Cry2A的敏感性差异均达显著。稻纵卷叶螟以对Cry1C的敏感性显著较低，其次为Cry2A，其 LC_{50} 值为前者的18.4%；Cry1Ab和Cry1Ac的 LC_{50} 值显著较低，其中Cry1Ac的 LC_{50} 值是Cry1Ab的2.5倍，但两者间差异不显著。

4种Cry蛋白对二化螟、大螟和稻纵卷叶螟的LD-p线的斜率均以Cry2A和Cry1Ab的相对较高，即3种水稻螟虫田间种群对Cry2A和Cry1Ab敏感性的异质性相对较低（表3.2）。不同水稻螟虫之间，以4种Cry蛋白对稻纵卷叶螟LD-p线的斜率相对较低，即种群异质性相对较高。

表3.1. 4种Cry蛋白对水稻螟虫的LC₅₀值比较

Table 3.11. Comparison on LC₅₀ values of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* to rice lepidopterans

Cry蛋白	二化螟	大螟	稻纵卷叶螟
	<i>Chilo suppressalis</i>	<i>Sesamia inferens</i>	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>
Cry1Ab	1.739(1.136-2.276) ^a	2.455(1.745-3.138) ^a	4.000(2.284-6.182) ^b
Cry1Ac	2.645(1.169-4.669)	10.046(4.171-18.473)	1.611(0.796-2.883)
Cry1C	2.794(1.533-4.447)	11.803(8.611-15.196)	69.031(21.049-305.522)
Cry2A	15.965(11.550-20.067)	35.359(24.415-46.347)	12.708(8.071-17.463)

注: a. LC₅₀值单位为ng/mg人工饲料, 括号数值示LC₅₀的95%置信限; b. LC₅₀值单位为μg/ml, 括号数值示LC₅₀值的95%置信限。

表3.2. 4种Cry蛋白对水稻螟虫的LD-P线斜率比较

Table 3.2. Comparison on the slopes of LD-p lines of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* to rice lepidopterans

Cry蛋白	二化螟	大螟	稻纵卷叶螟
	<i>Chilo suppressalis</i>	<i>Sesamia inferens</i>	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>
Cry1Ab	2.754±0.561	3.143±0.603	1.310±0.177
Cry1Ac	1.205±0.228	1.275±0.236	0.866±0.136
Cry1C	1.615±0.294	2.502±0.397	0.524±0.135
Cry2A	3.494±0.682	2.709±0.492	1.896±0.287

3 讨论

二化螟对4种Cry蛋白的敏感性依次为: Cry1Ab>Cry1Ac>Cry1C>Cry2A, 这与Alcantara等 (Alcantara *et al.*, 2004) 报道的结果一致, 而与Lee等 (Lee *et al.*, 1997) 报道的Cry2A>Cry1C>Cry1Ac不尽相同。二化螟对不同Cry蛋白的敏感性差异主要与其幼虫中肠表皮刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上特异性受体对Cry蛋白的结合能力及数量不同有关。二化螟中肠BBMV受体对Cry1Ab和Cry1Ac具有相同的结合位点, 且结合亲和力较强; 对Cry1C和Cry2A的结合位点与Cry1Ab及Cry1Ac的明显不同, 亲和力虽相对较弱, 但位点数量则明显较多 (Alcantara *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1997)。本文测得不同Cry蛋白对二化螟的LC₅₀值比Lee等和Alcantara等报道的均明显较低, 这

可能与杭州地区稻田较少使用Bt制剂防治水稻螟虫而导致当地二化螟种群对Bt相对较为敏感有关。Cry1Ab对杭州地区二化螟种群的LD-P线斜率相对较高，也表明该种群对Cry1Ab敏感性的异质性较低。

大螟对4种Cry蛋白的敏感性及其种群异质性变化与二化螟的相似，但不同Cry蛋白对大螟的 LC_{50} 值均明显高于二化螟的，即大螟对Cry蛋白的敏感性相对较低。这与现已有报道的夜蛾科害虫对转Bt基因作物的敏感性比螟蛾科的普遍较低相一致(Fitt *et al.*, 1994)。稻纵卷叶螟对不同Cry蛋白的敏感性变化与二化螟和大螟的不尽相同，但仍以对Cry1Ab和Cry1Ac相对较为敏感。有关不同害虫种类对Cry蛋白的敏感性差异及其内在机制尚有待进一步研究。

不同水稻螟虫对Cry1Ab的敏感性均较高，这与转Cry1Ab基因水稻（克螟稻及其杂交后代）表现的优异杀螟效果相一致(Ye *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003)。目前，4种Cry蛋白的基因均被广泛用于转基因抗虫作物的培育，其中Cry1C和Cry2A因与Cry1Ab、Cry1Ac在鳞翅目害虫中肠BBMV上具有不同的结合位点，该2种基因被用来与后2种基因组合共同转入作物体内，培育成转双价基因抗虫作物(Zhao *et al.*, 2003; Bashir *et al.*, 2004)，不仅获得较理想的杀虫效果，而且可延缓靶标害虫产生抗性。

第四章 基于*cry*基因的新型融基因构建

Bt生物农药和转Bt基因作物的推广使用能有效控制虫害发生，并减少化学农药的用量，保护生态环境。但是，如同各种化学农药的使用一样，随着Bt制剂及转Bt作物的广泛应用，害虫在持续的选择压作用下，可能对Bt蛋白产生的抗性；甚至在田间推广种植转Bt作物之前，某些害虫已在田间或实验室条件下对Bt产生了显著抗性（McGallghey, 1985; Tabashnik, 1994; Tabashnik, 1997; Heckel, 1997）。因此，寻找新型杀虫基因进而培育高效转基因抗虫作物不仅可有效减缓害虫抗性产生与发展，而且还可用于抗性治理。

目前，用于转基因抗虫作物培育的主要是利用由单基因调控的编码具杀虫活性蛋白或酶类的基因。这些蛋白类杀虫活性物质根据其来源可分为：微生物来源（如Cry蛋白等）、植物来源（如蛋白酶抑制剂等）和动物来源（如蝎子毒素等）（叶恭银等, 2001）。近年来，随着现代分子生物学技术的快速发展，通过基因突变或改造来构建新型功能基因已成为可能。Mehlo等（2005）通过将*cry1Ac*基因片段与蓖麻毒蛋白B链（ricin B-chain）上的半乳糖结合结构域（galactose-binding domain）序列连接构建成新的融合基因，其表达蛋白具有较高杀虫活性，且转入水稻和玉米体内亦具有较强杀虫活性。本文拟通过将Cry1Ab蛋白结构域II基因序列与抗菌活性肽（anti-microbial peptides, AMPs）基因连接构建新的融合基因，为新型杀虫候选基因筛选提供思路与材料。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和载体

菌株*E.coli* DH5 α 和克隆载体pETcoco-2（图4.1和4.2）等由昆虫生理生化实验室保存；限制性内切酶*Aat*II, *Sph*I和*Pac*I购于New England Biolabs; *Taq*Plus DNA聚合酶、T₄DNA连接酶购自Sangon公司；DNA Marker DL2000、15000、购自Takara公司；Tryptone Powder、Yeast Extract、Mineral Oil和Agrose等购自Bio Basic Inc.。

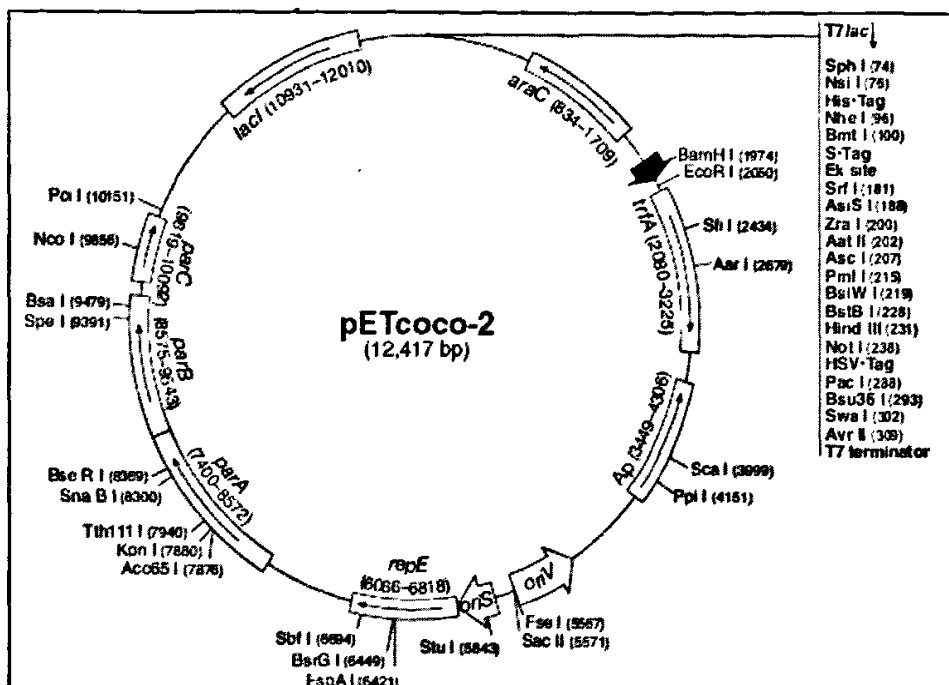


图4.1 pETcoco-2 表达载体图谱

Fig. 4.1 pETcoco-2 vector map

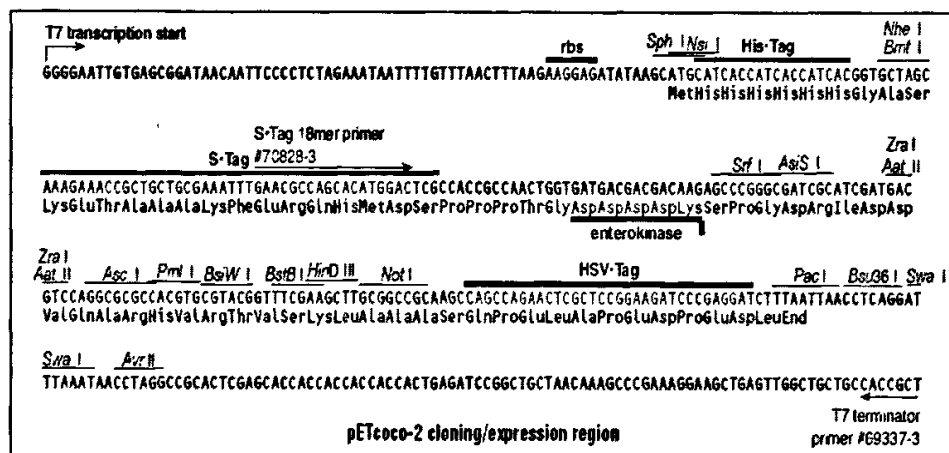


图4.2 pETcoco-2 载体的多克隆位点和表达区序列

Fig.4.2 pETcoco-2 Multi-cloning site and expression region

1.1.2 常用试剂的配制

1) LB培养基的配制

蛋白胨 (Polypepton)

10 g

酵母抽提物 (Yeast Extraction) 5 g

NaCl 10 g

用玻棒搅动至溶质完全溶解, 用5 mol/L NaOH调节pH值至7.0, 加入去离子水至总体积1 L, 在120 °C、151 bffin² (1.034×10^5 Pa) 高压下蒸汽灭菌20 min。

固体培养基的配制: 在LB培养基中加入15 g琼脂糖, 灭菌后轻轻旋动以使熔解的琼脂糖均匀分布于LB培养基溶液中, 待冷却至60 °C左右铺制平板。

2) 氨苄青霉素 (100 mg/ml)

0.5 g氨苄青霉素, 加入5 ml无菌水溶解, 分装后于 -20 °C贮存。

3) TE缓冲液 (pH 8.0)

10 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0)

1 mmol/L EDTA (pH 8.0)

50 mmol/L CaCl₂

800 ml Mili-Q水加入5.55 g无水CaCl₂ (国产分析纯) 溶解后定容至1 L, 分装, 高压灭菌, 4 °C保存。

4) 3 mmol/L NaAc (pH 5.2)

NaAc·3H₂O 408.1g加Mili-Q水溶解, 用冰醋酸调pH值至5.2, 定容至1 L, 分装, 高压灭菌, 室温存放。

5) 50×TAE缓冲液

成分及终浓度	配制1L溶液各成分的用量
--------	--------------

2mol/L Tris碱	242g
--------------	------

1mol/L 乙酸	57.1 ml的冰乙酸 (17.4 mol/L)
-----------	--------------------------

100 mmol/L EDTA	200ml的0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)
-----------------	-------------------------------

加水补足1 L, 室温保存。

6) 10 mg/ml EB

在100 ml水中加入1 g EB, 磁力搅拌数小时以确保其完全溶解, 然后转移至棕色瓶中, 室温避光保存。

7) 10 mg/ml RNase A

0.1 g RNase A溶于10 mmol/L Tris·Cl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl中, 配成10 mg/ml的浓度, 于100 °C加热15min, 缓慢冷却至室温, 分装成小份保存于 -20 °C。

8) 核酸电泳上样缓冲液 (6×)

0.25 %溴酚蓝

40 % (W/V) 蔗糖水溶液

用Milli-Q水配制, 于4 °C贮存。

9) 20 %葡萄糖和2% L-阿拉伯糖

称量20g葡萄糖和2g L-阿拉伯糖，100 ml蒸馏水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌，室温储藏，需要时加入LB中。

1.2 方法

1.2.1 *cryIAb* 基因结构域II (DomainII, DII) 序列的PCR扩增

1) PCR 引物及*Sph*I 和 *Aat*II的酶切位点:

DII-a: 5' primer: 5'- GAAG CAT GC'CC AGA G AAA TCT ATA CTA ACC

*Sph*I

DII-b: 3' Primer: 5'- CATG ACG TC'T GTT GAA CTC AGC ACT AC

*Aat*II

2) PCR反应体系 (50μl):

10×PCR buffer (with MgCl ₂)	5 μl
10 mM dNTP	0.5 μl
DII-a	1 μl
DII-b	1 μl
<i>cryIAb</i>	2 μl
<i>Taq</i> 酶	1 μl

加ddH₂O至终体积50μl。混匀后离心。

反应参数设置:

94 ℃预变性4min后开始以下循环反应,

变性	94 ℃	60 s
退火	55 ℃	60 s
延伸	72 ℃	60 s

35个循环后, 72 ℃ 继续延伸 10 min。

反应完毕后, 从反应液中取5μl, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。

3) PCR产物纯化

使用PCR纯化试剂盒处理PCR产物, 使用紫外分光光度计测得DII浓度。

1.2.2 pETcoco-2质粒载体的大量制备

从LB平板上(含100ng/μl氨苄青霉素, Amp)挑单克隆, 在10 ml含有0.2%葡萄糖的LB液体培养基(100 ng/μl Amp), 37℃摇过夜。

按1: 50比例将培养基加入预热的不含葡萄糖的新鲜LB液体培养基（100 ng/μl Amp）。培养基在37℃，250rpm 摇至OD₆₀₀=0.2~0.4，加2 % L-阿拉伯糖至0.01%终浓度。再在37℃，培养4-5小时，后用Plasmid Mini Kit EZNA 质粒试剂盒提取质粒。

1.2.3 DII和pETcoco-2的Aat II和Sph I酶切

DII 终浓度为50 ng/μl，pETcoco-2浓度为250 ng/μl。

SphI酶切体系（50μl）：

2.5μg 模板（DII或pETcoco-2）

5μl 10×Buffer

2.5μl SphI

ddH₂O 补足至50μl

37 ℃酶切2h，后60℃，10min

纯化试剂盒纯化酶切溶液，40μl ddH₂O洗脱，得到终浓度约50 ng/μl 。再进行AatII酶切。

AatII酶切体系（40μl）

34μl 模板（DII或pETcoco-2）

4μl 10×T-Buffer（with BSA）

2μl AatII

37 ℃酶切2h，后60 ℃，10min灭活。割胶回收试剂盒，30μl ddH₂O洗脱，浓度约为50 ng/μl，电泳检测结果。

1.2.4 SphI和AatII酶切后的DII 和pETcoco-2连接，构建成pBDII载体

连接反应体系（20μl）

10×Buffer 2 μl

T4连接酶 1 μl

pETcoco-2 4 μl

DII 4 μl

dd H₂O 9 μl

自连反应体系（10μl）

10×Buffer 1 μl

T₄连接酶 1 μl

pETcoco-2 4 μl

ddH₂O 4 μl

以上反应7℃ 过夜。转化DH5α ，涂LB板（100 ng/μl Amp），37℃培养过夜，次日检查结果，挑单克隆摇菌，测序。

1.2.5 AMPs和pBDII的PacI和AatII双酶切

1) AMPs序列（见表4.1）

表4.1 AMPs序列
Table 4.1 AMPs sequences

AMP1	1a	C AGA CGT CTC CTC CCG ATC ATT GCA GGC ATT GCC GCG AAA GTG TTC CCA AAG ATC TTT TGC GCT ATA AGC AAG AAG TGT TAA TTA AT
	1b	AT TAA TTA ACA CTT CTT GCT TAT AGC GCA AAA GAT CTT TGG GAA CAC TTT CGC GGC AAT GCC TGC AAT GAT CGG GAG GAG ACG TCT G
AMP7	7a	C AGA CGT CCC AGG TCC AGC CGT GCC GGC CTC CAG TTC CCG GTC GGG CGC GTG CAC CGG CTG CTT AGA AAG T TTA ATT AAT
	7b	ATT AAT TAA ACT TTC TAA GCA GCC GGT GCA CGC GCC CGA CCG GGA ACT GGA GGC CGG CAC GGC TGG ACC TGG GAC GTC TG
AMP8	8a	C AGA CGT CTC CTC GGG GGC CTG ATT AAG ATA GTC CCG GCG ATG ATC TGC GCC GTG ACC AAG AAA TGT T TT A AT TAA T
	8b	A TTA ATT AAA ACA TTT CTT GGT CAC GGC GCA GAT CAT CGC CGG GACT ATC TTA ATC AGG CCC CCG AGG AGA CGT CTG
AMP11	11a	C AGA CGT CGG AGC AAA AAG CCG GTG CCA ATC ATT TAC TGC AAC AGG CGG ACC GGC AAG TGT CAG CGC ATG T TTA ATT AAT
	11b	ATT AAT TAA ACA TGC GCT GACA CTT GCC GGT CCG CCT GTT GCA GTA AAT GAT TGG CAC CGG CTT TTT GCT CCG ACG TCT G
AMP15	15a	C AGA CGT CTC CTC CCA TGG AAG TGG CCC TGG TGG CCG TGG AGG CGC TTT AAT TAA T
	15b	ATT AAT TAA AGC GCC TCC ACG GCC ACC AGG GCC ACT TCC ATG GGA GGA GAC GTC TG

- a) 化学合成五对寡聚核苷酸链，AMP1，AMP7，AMP8，AMP11，AMP15。
- b) 溶解六对AMP达到2μg/μl终浓度，-20℃保存备用。
- c) 分别取2μg互补链加入离心管中，加水至20μl，100℃水浴3min，室温冷却，此过程将形成双链AMP。
- d) 2%琼脂糖凝胶电泳检测形成的AMP大小是否正确。

2) AMP的AatII和PacI双酶切

反应体系（50μl）

10×NEB	5 μl
AMP	17 μl
100×BSA	0.5 μl
PacI	1 μl

*Aat*II 1 μ l

dd H₂O加至50 μ l; 37℃, 4h; 后65℃, 10min; 乙醇沉淀 (2倍体积无水乙醇+1/10体积的3MKAc), -20℃过夜。

3) pBDII的*Aat*II和*Pac*I双酶切

反应体系 (50 μ l)

10×NEB 5 μ l

pBDII 7 μ l

100×BSA 0.5 μ l

*Pac*I 1 μ l

*Aat*II 1 μ l

dd H₂O加至50 μ l; 37℃, 5h; 后65℃, 10min;

4) 酶切后用割胶回收试剂盒回收目的片段, 30 μ l H₂O洗脱。

5) pBDII和DII的连接, 构建pBDIIA载体

反应体系 (50 μ l)

10×Buffer 2 μ l

T4连接酶 1 μ l

pBDII 9 μ l

AMP 2 μ l

dd H₂O 7 μ l

反应7℃ 过夜。转化DH5 α , 涂LB板 (100 ng/ μ l Amp), 37℃培养过夜, 次日检查结果, 挑单克隆测序。

2 结果

经PCR扩增获得*BtcryIAb*基因结构域II (DII) DNA片段 (图4.3), 长为600bp。测序结果如下:

经GenBank数据库比对, 确证为*cryIAb*基因的结构域II序列。

DII序列经*Sph*I和*Aat*II酶双切后和经同样双酶切的pETcoco-2载体连接, 构建成pBDII载体 (图4.4)。AMPs序列和pBDII经*Pac*I和*Aat*II双酶切后连接, 构建pBDIIA载体 (图4.5)。通过对pBDIIA载体测序与比对, 确证*cryIAb*基因的结构域II序列pBDII已与AMPs序列融合成功。

Sph I

AAGCATGCCAGAGAAATCTATACTAACCCAGTTCTTGAGAACTTCGACGGTAGCTT
CCGTGGTTCTGCCCAAGGTATCGAAGGCTCCATCAGGAGCCCACACTTGATGGACAT
CTTGAACAGCATAACTATCTACACCGATGCTCACAGAGGAGAGTATTACTGGTCTGG
ACACCAGATCATGGCCTCTCCAGTTGGATTGAGCGGGCCCGAGTTTACCTTTCCTCT
CTATGGAACATATGGGAAACGCCGCTCCACAACAACGTATCGTTGCTCAACTAGGTCA
GGGTGTCTACAGAACCTTGTCTTCCACCTTGTACAGAAGACCCTTCAATATCGGTAT
CAACAACCAGCAACTTTCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTCGCCTATGGAACCTCTTC
TAACTTGCCATCCGCTGTTTACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCCTTGGACGAAAT
CCCACCACAGAACAACAATGTGCCACCCAGGCAAGGATTCTCCCACAGGTTGAGCCA
CGTGTCCATGTTCCGTTCCGGATTCAGCAACAGTTCCGTGAGCATCATCAGAGCTCC
TATGTTCTCATGGATTCATCGTAGTGCTGAGTTCAACAGACGTC

Aat II

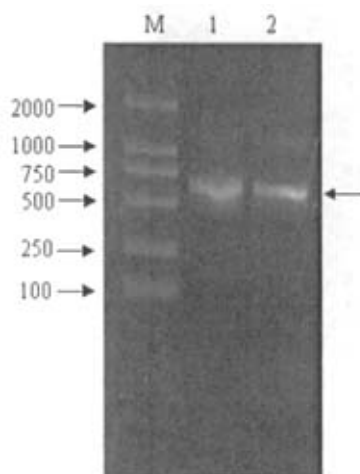


图4.3 *cryIAb*的DomainII的PCR扩增产物电泳图

M: Marker2000; 泳道1: PCR19个循环; 泳道2: PCR35个循环

Fig.4.3 Agrose electrophoresis of the PCR products of DomainII of *cryIAb*

Lane 1 products of 19 cycles of PCR; Lane 2 products of 35 cycles of PCR

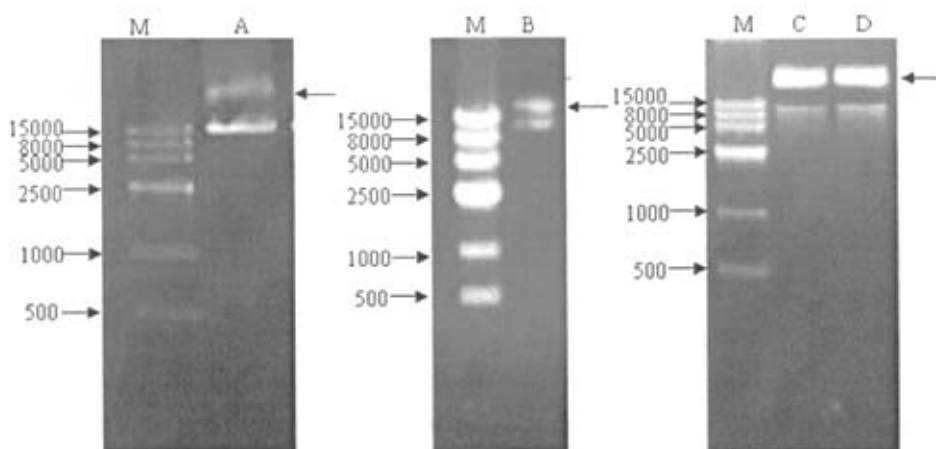


图4.4 pETcoco-2的*Sph*I和*Aat*II酶切结果及pBDII载体的构建

M: 2000bp和15000bp 的DNA Marker; A: pETcoco-2的*Sph*I酶切结果; B为*Sph*I酶切后再被*Aat*II酶切的结果; C: pETcoco-2载体; D: pBDII载体.

Fig.4.4 The DNA digested orderly by *Sph*I and *Aat*II of pETcoco-2 and the recombinant vector of pBDII
A: The digestion of *Sph*I of pETcoco-2; B: The digestion of *Aat*II of pETcoco-2 after the digestion of *Sph*I;
C: Vector of pETcoco-2; D: Vector of pBDII

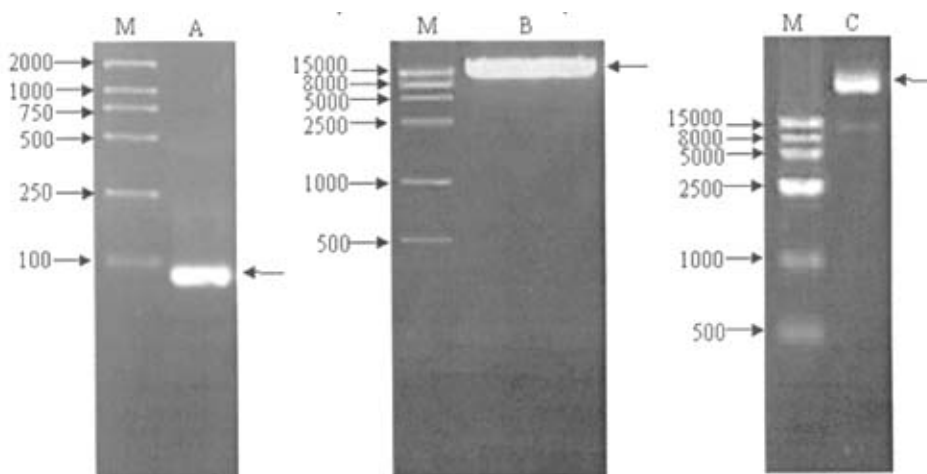


图4.5 AMP和pBDII的*Pac*I、*Aat*II双酶切结果及pBDIIA载体

其中M: 2000bp和15000bp 的DNA Marker; A: AMP的*Pac*I、*Aat*II双酶切结果; B为pBDII的*Pac*I、*Aat*II双酶切的结果; C: pBDIIA载体.

Fig.4.5 The DNA digested simultaneously by *Pac*I and *Aat*II of AMP and pBDII, recombinant vector of pBDIIA
A: The double digestions of *Pac*I and *Aat*II of AMP ; B: The double digestions of *Pac*I and *Aat*II of pBDII;
C: Vector of pBDIIA

3 讨论

通常情况下，Bt的毒性肽一般由三个结构域（活性区域）组成。结构域I位于毒性肽N端，由两亲性 α -螺旋组成，主要参与在昆虫中肠细胞膜形成穿孔；结构域II由 β -折叠构成，参与毒素与膜受体蛋白的专一识别和特异性结合；结构域III位于C端，亦由 β -折叠组成，主要调节毒素活性，在不同毒素中的功能不同（Li *et al*, 1991; Grochulski *et al*, 1995）。

本文成功地将杀虫蛋白基因*cryIAb*的结构域II与AMPs融合重组至质粒pETcoco-2 中，构建了pBDIIA载体。由于试验时间关系，重组基因表达的融合蛋白是否能有效的结合昆虫中肠上的受体，并具有良好的杀虫活性还有待于今后通过生物测定来进行验证。但无论如何，这为构建新的杀虫基因提供了新的思路。

第五章 总讨论

本论文就稻纵卷叶螟对Bt水稻抗性风险及其对策进行了初步的研究,得到了一定的结果,为今后的害虫抗性评价和治理提供了一定的实践参考价值。

1 稻纵卷叶螟对Cry1Ab蛋白及其转基因水稻的敏感性

目前关于Bt杀虫蛋白对稻纵卷叶螟的抗性监测还未见报道,本文在杀虫蛋白Cry1Ab对稻纵卷叶螟的抗性监测方面做了初步的尝试性研究。因为没有室内敏感品系,所以利用平坡法确定了抗性监测的诊断剂量。并据此测定了稻纵卷叶螟对Cry1Ab敏感性水平。虽然其得出的结果和利用转基因水稻直接检测的结果有相同的趋势,但是利用蛋白检测得到的抗性个体比例较转基因水稻检测得到的比例高得多。其中原因可能是用转*cry1Ab*水稻监测抗性个体时,刚孵化的幼虫最初取食的就是转基因水稻,从而较先接触杀虫蛋白。而杀虫蛋白检测抗性个体时,利用稻纵卷叶螟成虫先产卵于非转基因水稻上,幼虫刚孵化取食的是不含Cry1Ab的水稻组织,所以较迟得接触杀虫蛋白,以致更能抵抗Cry1Ab的毒杀。

从稻纵卷叶螟对杀虫蛋白Cry1Ab和转*cry1Ab*水稻敏感性结果可以初步看出,稻纵卷叶螟种内已经表现出一定的变异性。对Cry1Ab蛋白表现不敏感的比例,单雌系占到3.33%,幼虫个体占到0.17%,对转*cry1Ab*水稻表现不敏感的比例,单雌系占到0.67%,幼虫个体占到0.008%。

目前高剂量/庇护区策略受到广泛重视(Tabashnik, 1997; Gould, 1998),已被美国、澳大利亚等国家采用。高剂量/庇护区策略是根据昆虫种群遗传学和昆虫生态学理论,采用计算机模拟研究提出的(Mcgaughey, 1998),其中就假设:大田害虫种群的起始抗性等位基因频率应该很低, $<10^{-3}$ (Roush, 1994)。那么,按照Bt抗性遗传理论,当抗性隐性等位基因频率 $<10^{-3}$,要监测抗性个体的话,就必须检查至少 10^6 的个体(Roush & McKenzie, 1987)。在本实验中,用转*cry1Ab*水稻共检测了12827头个体,虽然远远未达到假设要求 10^6 的数量。但是已发现有1头幼虫发育至三龄,达到了本实验划分的不敏感的抗性水平。其中的原因可能是转基因水稻的Cry1Ab蛋白的表达存在时间和空间的动态变化,导致杀虫蛋白没有按高剂量表达(Alinia, 2000)。可以进一步通过DNA检测手段来验证。在未完全确认是否为抗性个体之前我们应该对此保持应有的重视。

在各地稻纵卷叶螟种群对Cry1Ab的敏感性差异中,除了杭州外,其他各种群之间对Cry1Ab的敏感性没有显著差异。可能与稻纵卷叶螟的迁飞性有关。害虫的高度迁飞特性使得对Bt的敏感性种群间难以形成。*Heliothine* 种类的昆虫因为具有高度的飞行本性,所以很难得到其种群之间对Bt敏感性差异的估计(Fitt, 1989)。

2 水稻螟虫对4种Bt杀虫蛋白的敏感性测定

二化螟对4种Cry蛋白的敏感性依次为：Cry1Ab>Cry1Ac>Cry1C>Cry2A，这与Alcantara等（Alcantara *et al.*, 2004）报道的结果一致，而与Lee等（Lee *et al.*, 1997）报道的Cry2A>Cry1C>Cry1Ac不尽相同。二化螟对不同Cry蛋白的敏感性差异主要与其幼虫中肠表皮刷状缘膜囊泡（brush border membrane vesicles, BBMV）上特异性受体对Cry蛋白的结合能力及数量不同有关。二化螟中肠BBMV受体对Cry1Ab和Cry1Ac具有相同的结合位点，且结合亲和力较强；对Cry1C和Cry2A的结合位点与Cry1Ab及Cry1Ac的明显不同，亲和力虽相对较弱，但位点数量则明显较多（Alcantara *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1997）。本文测得不同Cry蛋白对二化螟的LC₅₀值比Lee等和Alcantara等报道的均明显较低，这可能与杭州地区稻田较少使用Bt制剂防治水稻螟虫而导致当地二化螟种群对Bt相对较为敏感有关。Cry1Ab对杭州地区二化螟种群的LD-P线斜率相对较高，也表明该种群对Cry1Ab敏感性的异质性较低。

大螟对4种Cry蛋白的敏感性及种群异质性变化与二化螟的相似，但不同Cry蛋白对大螟的LC₅₀值均明显高于二化螟的，即大螟对Cry蛋白的敏感性相对较低。这与现已有报道的夜蛾科害虫对转Bt基因作物的敏感性比螟蛾科的普遍较低相一致（Fitt *et al.*, 1994）。稻纵卷叶螟对不同Cry蛋白的敏感性变化与二化螟和大螟的不尽相同，但仍以对Cry1Ab和Cry1Ac相对较为敏感。有关不同害虫种类对Cry蛋白的敏感性差异及其内在机制尚有待进一步研究。

不同水稻螟虫对Cry1Ab的敏感性均较高，这与转Cry1Ab基因水稻（克螟稻及其杂交后代）表现的优异杀螟效果相一致（Ye *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003）。目前，4种Cry蛋白的基因均被广泛用于转基因抗虫作物的培育，其中Cry1C和Cry2A因与Cry1Ab、Cry1Ac在鳞翅目害虫中肠BBMV上具有不同的结合位点，该2种基因被用来与后2种基因组合共同转入作物体内，培育成转双价基因抗虫作物（Zhao *et al.*, 2003; Bashir *et al.*, 2004），不仅获得较理想的杀虫效果，而且可延缓靶标害虫产生抗性。

3 基于cry基因的新型融合基因构建

本文成功将杀虫蛋白基因cry1Ab的domainII（简称DII）与化学合成的AMPs重组至质粒pETcoco-2中，构建了pBDIIA载体。究竟重组基因表达的产物是否能有效的结合昆虫受体蛋白，发挥良好的杀虫效果，还有待于进一步通过生物测定和相关的指标来判定。但是，不管结果如何，都会得到相应的结论。一方面是具有杀虫效果，从实践的角度证明我们设计的重组是合理的，为害虫抗性的治理提供了相应的参考价值。另一方面，不具有杀虫效果，那么也证明了杀虫蛋白的作用过程中关于结

合机理的正确性，从某种程度上，该实验也具有一定的理论意义。

4 本研究的特色与创新点

有关转基因抗虫水稻的环境释放已被提上日程。我国更是在考虑是否要加快批准转基因水稻的商业化种植进程（Jia, 2004）。本论文就稻纵卷叶螟对Bt水稻抗性风险及其对策进行了初步的研究，在国内，甚至国外尚属首次。本文结果对于今后Bt水稻在中国推广后面临的抗性监测问题提供参考价值，并对抗性的治理奠定一定的物质基础。

5 今后研究的方向

由于时间等种种原因，本文只对稻纵卷叶螟对Bt水稻抗性风险及其对策进行了初步的研究，今后有待于进一步研究的工作有：

- 1) 采用DNA标记技术等其他技术相结合，进一步完善抗性监测体系，使其更有效和准确。
- 2) 进行多年份、多地区的抗性监测，进而使抗性监测系统更全面。
- 3) 尝试利用其他杀虫基因或者和Bt基因的组合，来筛选既能有效抗虫又对脊椎动物安全且作物产量和品质不受影响的抗虫基因。

参考文献

- 程家安, 唐振华. 2001. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社.
- 崔金杰, 夏敬源. 2000. 转Bt基因棉田昆虫群落多样性及其影响因素. 生态学报, 20(5): 824-829.
- 范仰东, 莫小平. 2001. Bt与锐劲特混用防治水稻二化螟的效果评价. 昆虫知识, (4): 33-35.
- 黄诚华. 2006二化螟和大螟对氟虫腈和三唑磷敏感性及其机理研究. 浙江: 浙江大学农业与生物技术学院博士学位论文.
- 李显春, 王荫长. 1997. 农业病虫抗药性问答. 北京: 中国农业出版社.
- 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 1999. 利用Bt预处理缓解不同龄期棉铃虫的抗药性. 植物保护学报, 26(4): 353-357.
- 盛承发, 王红托, 盛世余, 等. 2003. 我国稻螟灾害的现状与损失估计. 昆虫知识, 40(4): 289-294.
- 谭声江, 陈晓峰, 李典谟. 2002. 棉铃虫双转Bt基因棉的抗性及其治理策略研究进展. 昆虫学报, 45(1): 138-144.
- 王关林, 方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社.
- 王伟, 朱祯, 高越峰, 等. 1999. 双价抗虫基因陆地棉转化植株的获得. 植物学报, 41: 384-388.
- 王荫长, 韩召军. 1991. 我国农业害虫抗药性发生概况. 昆虫知识, (2): 58-59.
- 王忠柳. 1990. Bt乳剂防治水稻螟虫效果显著. 植物保护, (S1): 11.
- 徐琼芳, 李连城, 陈孝, 等. 2001. 基因枪法获得转基因小麦植株的研究. 中国农业科学, 34(1): 5-8.
- 叶恭银, 张传溪, 鲁兴萌. 2001. 转基因抗虫作物与转基因昆虫. 见: 程家安, 唐振华主编. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社. 327-365.
- 叶恭银, 胡萃, 舒庆尧. 1998. 转基因抗虫水稻的转育及其合理持续利用. 见: 程家安, 周伟军主编. 跨世纪农业发展与研究. 北京: 中国环境科学出版社. 406-414.
- 张天真, 唐灿明. 2000. 转基因抗虫棉品种的推广利用与棉铃虫抗性的治理. 科学通报, 45(2): 119-127.
- Alcantara EP, Aguda RM, Curtiss A, *et al.* 2004. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. Arch. Insect Biochem. Physiol., 55: 169-177.
- Alinia FB, Ghareyazie LG, Rubia J, *et al.* 2000. Effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistance of a *cry1Ab*-transformed aromatic rice to lepidopteran stem borers and foliage feeders. J. Econ. Entomol., 93: 484-493.
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, *et al.* 1999. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor *CpTI*. Mol. Breed., 5: 53-63.
- Aronson AI, Shai Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. Fems. Microbiol. Lett. 195: 1-8.
- Bajaj S, Mohanty A. 2005. Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice. Plant Biotechnol. J., 3: 275-307.
- Barton KA, 1990. Insecticidal toxins in plant express an insect specific toxin from a scorpion. C12N015/82, European patent, patent No. EP0431829A1.
- Bashir K, Husnain T, Fatima T, *et al.* 2004. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica

- basmati rice. *Mol. Breed.*, 13: 301-312.
- Birch ANE, Geoghegan IE, Majerus MEN, *et al.* 1999. Tritrophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Mol. Breed.*, 5: 75-83.
- Bolter CJ, Jongsma MA. 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarso decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect. Physiol.*, 41: 1071-1078.
- Bonade-Bottino M, Lerin J, Zacommer B, *et al.* 1999. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin. *J. Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 131-138.
- Brito LO, Lopes AR, Parra JRP, *et al.* 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B: 365-375.
- Broadway RM, Duffey SS. 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32: 827-833.
- Broadway RM. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 39-53.
- Broadway RM. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43: 855-874.
- Cao J, Shelton AM, Earle ED. 2001. Gene expression and insect resistance in transgenic broccoli containing a *Bacillus thuringiensis cryIAb* gene with the chemically inducible PR-1a promoter. *Mol. Breed.* 8: 207-216.
- Caprio MA and Suckling DM. 2000. Simulating the impact of cross resistance between Bt toxin in transformed clover and apples in New Zealand. *J. Econ. Entomol.*, 93(2): 173-179.
- Casas AM, Kononowicz AK, Bressan RA, *et al.* 1995. Cereal transformation through particle bombardment. *Plant Breed. Rev.*, 13: 235-264
- Chapman RF. 1998. The insects. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chatterji SM, Sharma GC, Sideliqui KH, *et al.* 1969. Laboratory rearing of the pink stem borer, *Sesamia inferens* Walker on artificial diet. *Indian J. Entomol.*, 31: 75-77.
- Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 254(5036): 1388-1390.
- Cordero MJ, Raventós D & Segundo BS. 1994. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *The Plant J.*, 6(2): 141-150.
- Daly, JC. 1994. Ecology and resistance management for *Bacillus thuringiensis* transgene plant. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 563-571.
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.*, 17: 193-199.
- Dorsch JA, Candas M, Griko NB, *et al.* 2002. CryIA toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the 137 membrane-proximal extracellular domain of BT-R-1 in *Manduca sexta*:

- Involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol., 32: 1025-1036.
- Denholm I, Rowland MW. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. Ann. Rev. Entomol., 37: 91-112.
- Doss VA, Kumar KA, Jayakumar R, *et al.* 2002. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. Protein Express. Purif., 26(1): 82-88.
- Edward GA, Hepher A, Clerk SP, *et al.* 1991. Pea lectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. Plant Mol. Biol., 17: 89-100.
- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, *et al.* 1997. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. Nat. Biotechnol., 15: 137-141.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, *et al.* 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93: 5389-5394.
- Estruch JJ, Yu CG, Warren GW, *et al.* 2000. Class of proteins for the control of plant pests: World Intellectual Property Organization Patent. WO 6/ 107.279.
- FAO. 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO plant production and protection paper. ROME: 21.
- Ferre J and van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. A. Rev. Entomol. 47: 501-533.
- FIFRA Scientific Advisory Panel. 2001 Bt plant-pesticides risk and benefit assessments. EPA SAP Report, No. 2000J07, March 12.
- Finnegan J, McElroy D. 1994. Transgene inactivation: Plants fight back. Nat. Biotechnol., 12: 883-888
- Fitt GP, Mares CL, Deacon J, *et al.* 1994. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. Biocontrol. Sci. technol., 4: 535-548.
- Fitt GP. 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Ann. Rev. Entomol., 34: 17-52.
- Forrester NW, Cahill M, Bird L, *et al.* 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Bulletin of Entomological Research-supplement No.1, 1-132.
- Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, *et al.* 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*; growth room trials. Mol. Breed., 3: 49-64.
- Gatehouse AMR, Gatehouse JA. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. Pestic. Sci., 52: 165-175.
- Georghiou GP and Taylor CE. 1976. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. In Proceedings of the 15th International Congress of Entomology, Washington DC, pp.759-785.
- Ghidui GM, Zehnder GW. 1993. Timing of the initial spray application of *Bacillus thuringiensis* for control of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in potatoes. Biological Control, 3: 348-352.
- Girard C, Picard-Nizou AL, Grallien E, *et al.* 1998. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. Transgenic Res., 7: 239-246.

- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 701-726.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. of Entomol.*, 43: 701-726.
- Gould F. 1994. Potential and problems with high-dose strategies for pesticide engineered crops. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 451-461.
- Gringorten JL. 2001. Ion balance in the Lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. Biochemical sites of insecticide action and resistance. I. Ishaaya. Heidelberg: Springer: 167-207.
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, *et al.* 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.*, 254(3): 447-464.
- Halcomb JL. 2000. Feeding behaviour of bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in mixed stands of nontransgenic and transgenic cotton expressing an insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* 93(4):1300-1307.
- Han L, Wu K, Peng Y, *et al.* 2007. Efficacy of transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI against the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). *J. Invertebr. Pathol.*, doi:10.1016/j.jip.2007.02.015
- Herd RW. 1991. Research priorities for rice biotechnology. In: Khush GS, Toenniessen GH. eds. *Rice Biotechnology*. Wallingford: CAB International, 19-54.
- Herrero S, Oppert B, Ferre J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indian meal moth. *Appl. Environl. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- High SM, Cohen MB, Shu QY, *et al.* 2004. Achieving successful deployment of Bt rice. *Trends Plant Sci.*, 9: 286-292.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, *et al.* 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 300: 160.
- Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR, *et al.* 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plant in added protection against aphids. *Transgenic Res.*, 4: 18-25.
- Hilder VA, Boulter D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance -A critical review. *Crop Prot.*, 18: 177-191.
- Hill CA, Pinnock DE. 1998. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse, *Bovicola ovis*. *J Invertebr. Pathol.*, 72: 9-20.
- Huang F, Buschman LL, Higgins RA. *et al.* 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*. 284: 965-967.
- Huang JK, Hu RF, Rozelle S, *et al.* 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Sciences*, 308(5722): 688-690.
- James C. 2001. Global status of commercialized transgenic crops: 2001. ISAAA Briefs No. 24: Preview. ISAAA: Ithaca, NY
- James C. 2002. Preview: Global status of commercialized transgenic crop: 2002. ISAAA Briefs No. 27. ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2003. Preview: Global status of commercialized transgenic crop: 2003. ISAAA Briefs No. 30.

- ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2004. Preview: Global status of commercialized transgenic crop: 2004. ISAAA Briefs No. 32. ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005. ISAAA Briefs No.34. ISAAA: Ithaca, NY.
- James C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. ISAAA Briefs No.35. ISAAA: Ithaca, NY.
- Janmaat AF, and Myers J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. R. Soc. Lond. B, 270: 2263-2270.
- Jenkins JL, Lee MK, Valaitis AP, *et al.* 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. J. Biol. Chem. 275: 14423-14431.
- Jia H. 2004. China ramps up efforts to commercialize GM rice. Nat. Biotechnol., 22(6): 642.
- Jongsma MA, Bakker PI, Peters J, *et al.* 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase-inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92: 8041-8045.
- Jongsma MA, Bolter C, 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. J. Insect Physiol., 43: 885-895.
- Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ. 2002. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. Appl. Environ. Microbiol., 68: 5711-5717.
- Kaiser J. 1996. Pests overwhelm Bt cotton crop. Science, 273(5274): 423.
- Kim SR, Costa MA & An GH . 1991. Sugar response element enhances wound response of potato proteinase inhibitor II promoter in transgenic tobacco. Plant Mol. Biol., 17 (5) : 973- 983.
- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, *et al.* 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Nat. Biotechnol., 11: 194-200.
- Kranthi KR, Kranthi S and Wanjari RR. 2001. Baseline toxicity of Cry1Ac toxins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in India. International journal of pest managemen. 47(2): 141-145.
- Kranthi S, Kranthi KR, Siddhabhatti PM, *et al.* 2004. Baseline toxicity of Cry1Ac toxin against spotted bollworm, *Earias vittella* (Fab) using a diet-based bioassay. Curr. Sci. India, 87(11): 1593-1597.
- Kranthi KR, Arives NJ, Rao NGV, *et al.* 1997. Seasonal dynamics of metabolic mechanisms mediating pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* in central India. Pesti. Sci., 50: 91-98.
- Kunitz M, Northrop JH. 1936. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor and a inhibitor trypsin compound. J. Gen. Physiol., 19: 991-1007.
- Kunitz M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor I. J. Gen. Physiol., 29: 149-151.
- Lee MI, Aguda RM, Cohen MB, *et al.* 1997. Determination of binding of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin receptors to rice stem borer midguts. Appl. Environ. Microbiol., 63(4): 1453-1459.
- Lee MK, Walters FS, Hart H, *et al.* 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4648-4657.

- LeOra. 1987. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Li J, Carroll J, and Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal N-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 353: 815-821.
- Litchfield JT, and Wilcoxon F. 1949. A simple method of evaluating dose-effect experiments . *Journal of Pharmacology and Experimental therapy*, 96: 99-103.
- Liu D. 2003. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 1222-1228.
- Luo K, Sangadala S, Masson A, *et al.* 1997. The *Heliothis virescens* 170kDa aminopeptidase functions as receptor A by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 735-743.
- Mcgaughey WH, Gould F, Gelernter W. 1998. Bt resistance management. *Nat. Biotechnol.*, 16: 144-146.
- Mehlo L, Gahakwa D, Trung P, *et al.* 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 7812-7816.
- Neurath H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224: 350-357.
- Obyrcki JJ, Losey JE, Taylor OR, *et al.* 2001. Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *Bioscience*, 51: 353-361.
- Ostlie KR, Hutchison WD, Hellmich RL. 1997. Bt-corn & European corn borer, long term success through resistance management. North Central Region Extension Publication 602. University of Minnesota, St. Paul, MN, USA.
- Paulillo LC, Lopes MS, Cristofolletti AR, *et al.* 2000. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *J. Econ. Entomol.* 93: 892-896.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, *et al.* 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3324-3328.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3324-3328.
- Porter DR, Burd JD, Shulfran KA, *et al.* 2000. Efficacy of pyramiding greenbug (Homoptera: Aphididae) resistance genes in wheat. *J. Econ. Entomol.*, 93(4): 1315-1318.
- Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, *et al.* 1995. Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens* .*Entomol. Experi. Appl.*, 75: 61-65.
- Rice WC. 1999. Specific primers for the detection of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28(5): 378-382.
- Richardson M. 1991. Seed storage proteins : The enzyme inhibitor. In: Rogers LJ (Ed) . *Methods in plant biochemistry: v. 5 Amino acid proteins and nucleic acids* . London: Academic Press, 259-305.
- Roush RT. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4: 501-516.
- Roush RT & McKenzie JA. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann. Rev Entomol.*, 32: 361-380.
- Roush RT. 1997. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance

- management ?. Pestic. Sci., 51:328-334
- Ryan CA. 1989. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. Bioessays. 10(1): 20-4.
- Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plant: genes or improving defense against insect and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol., 28: 425-449.
- Sayyed AH, Haward R, Herrero S, *et al.* 2000. 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., 66: 1509-1516.
- Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 775-806.
- Schnepf HE, Whiteley HR. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2893-2897.
- Schroeder HE, Gollasch S, Moore A, *et al.* 1995. Bean α -Amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas. Plant physiol., 107: 1233-1239.
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm L, 1998. Insect resistant transgenic plants. Trends Biotechnol., 16: 168-175.
- Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, *et al.* 2001. Toxicity Analysis of N- and C-Terminus-Deleted Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 67(12): 5855-5858.
- Sims SR, Berberich SA, Nida DL, *et al.* 1996. Analysis of expressed proteins in fiber fraction from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. Crop Science, 36: 1212-1216.
- Stoger E, Williams S, Christou P, *et al.*, 1999. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop in transgenic wheat plant. Mol. Breed., 5: 65-73.
- Tabashnik BE. 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. Proc. Natl. Sci. USA, 94: 3488-3490.
- Tabashnik BE 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., 39: 47-79.
- Tang JD, Collins HL, Roush RT, *et al.* 1999. Survival, weight gain and oviposition of Resistant and Susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on Broccoli Expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol., 92(1): 47-55.
- Theo H, Dick V & Willem JS. 1991. Patatin and four serine proteinase inhibitor genes are differentially expressed during potato tuber development. Plant Mol. Biol., 17(3): 385-394.
- Thomas JC, Adams DG, Keppenne VD, *et al.*, 1995b. Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. Plant Cell Rep., 14: 758-762.
- Titarenko E, Chrispeels MJ. 2000. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*. Insect Biochem. Mol. Biol., 30: 979-990.
- US EPA and USDA .1999. EPA and USDA position paper on insect resistance management in Bt crops. http://www.epa.gov/opbtpd1/biopesticides/otherdocs/Bt_position_paper_618.html.
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, *et al.* 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of

- Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem., 270: 5490-5494.
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, *et al.* 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 327: 33-37.
- Van Emden HF. 1999. Transgenic host plant resistance to insects some reservations. Annals of the Entomological Society of America. 92: 788-797.
- Van Rie J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. Int. J. Med. Microbiol., 290(4-5): 463-9.
- Warren GW, Koziel MG, Mullins MA, *et al.* 1998. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins . World Intellectual Property Organization Patent WO 5, 849, 870.
- Warren GW. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. in advance in insect Control(eds.Carozzi,N.&Koziel,M.): 109-121(Taylor and Francis, London, UK).
- Whalon ME and Wingerd BA 2003. Bt: Mode of Action and Use . Arch. Insect Biochem., 54: 200-211.
- Williamson VM& kaya HK. 2003. Sequence of a symbiont. Nat. Biotechnol. 21: 1294-1295.
- Ye GY, Shu QY, Yao HW, *et al.* 2001. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. J. Econ. Entomol., 94: 271-276.
- Ye GY, Yao YW, Shu QY, *et al.* 2003. High levels of stable resistance in transgenic rice with a *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions. Crop Prot., 22: 171-178.
- Ye GY, Hu C, Shu Q Y, *et al.*, 2000. The application of detached-leaf bioassay for evaluating the resistance of Bt transgenic rice to stem borers. Acta Phytophyl. Sin. 27: 1- 6.
- Yu CG, MuUinsMA, WarrenGW, *et al.* 1997. The *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Lyses Midgut Epithelium Cells of Susceptible Insects Appl. Environ. Microb., 63(2): 532-536.
- Zambryski P. 1988. Basic process underlying agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet., 22: 1-30.
- Zhao JZ, Cao J, Li Y, *et al.* 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. Nat. Biotechnol., 21: 1493-1497.