

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.02.002

鳞翅目昆虫中肠 Bt 杀虫蛋白受体研究进展

张 龙, 古丽·库尔班, 张绍会, 马小丽*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

摘要: 杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs; 含有 Cry 和 Cyt 2 大家族)和营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, Vips)等 Bt 杀虫蛋白可有效防治鳞翅目害虫, 其中 Cry 应用最广泛。然而, 一些地区的鳞翅目害虫已对 Bt 杀虫蛋白产生了抗性。目前, 普遍认为鳞翅目昆虫中肠受体与 Bt 杀虫蛋白结合能力的改变是导致其对 Bt 杀虫蛋白产生抗性的最主要因素。在鳞翅目昆虫中, Cry 受体是研究得最为透彻的 Bt 受体, 已经被证实的有氨肽酶 N、钙黏蛋白、碱性磷酸酶和 ABC 转运蛋白等。Vips 杀虫蛋白类与鳞翅目昆虫中肠受体的结合方式与 Cry 杀虫蛋白相似, 但结合位点与 Cry 杀虫蛋白不同。本文从结构特点、作用机制及不同鳞翅目昆虫间的表达差异等角度对以上 4 种鳞翅目昆虫中肠 Bt 受体进行了综述, 并提出如下展望: (1) 以棉铃虫或小菜蛾等鳞翅目昆虫为农业害虫模式生物进行深入研究, 阐明其对 Bt 杀虫蛋白产生抗性的机制, 为研究其他鳞翅目农业害虫对 Bt 杀虫蛋白产生抗性的机制提供理论借鉴; (2) 鉴于在不同鳞翅目昆虫间, 中肠 Bt 受体与 Bt 杀虫蛋白结合存在差异, 且同一 Bt 杀虫蛋白与鳞翅目昆虫 Bt 受体并不专一性结合, Bt 杀虫蛋白多基因组合策略是较为有效的田间鳞翅目昆虫防治策略, 是今后一段时间内 Bt 杀虫蛋白应用的发展方向。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 杀虫蛋白; 氨肽酶 N; 钙黏蛋白; 碱性磷酸酶; ABC 转运蛋白



开放科学标识码
(OSID 码)

Research progress on *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein receptors in lepidopteran midgut

ZHANG Long, KUERBAN · Guli, ZHANG Shaohui, MA Xiaoli*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China

Abstract: Insecticidal crystal proteins of two major families, Cry and Cyt, vegetative insecticidal proteins and other *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins are effective for controlling lepidopteran pests, with Cry as the most widely used Bt insecticidal protein. However, lepidopteran pests in some areas have developed resistance to Bt insecticidal proteins. A change in the ability of lepidopteran midgut receptors to bind to Bt insecticidal proteins is thought to be the most important factor leading to their resistance to Bt insecticidal proteins. Among lepidopteran insects, Cry receptors are the most widely studied, including aminopeptidase N, cadherin, alkaline phosphatase, and the ATP-binding cassette transporter. The binding modes of vegetative insecticidal proteins are similar to those of Cry insecticidal proteins, but the binding sites differ from those. This review mainly describes the Bt insecticidal protein receptors in the midguts of lepidopteran insects based on the structural characteristics, mechanisms of action, and differences in expression, and proposes the following: (1) *Helicoverpa armigera* and *Plutella xylostella* can be used as models of agricultural insect pests to clarify the mechanisms of their resistance to Bt insecticidal proteins, providing theoretical references for the resistance mechanisms; (2) As the midgut receptors of Bt insecticidal proteins may differ and a Bt insecticidal protein may bind to more than one receptor, the multi-gene combination strategy of Bt insecticidal proteins is a more effective method and development direction for Bt insecticidal protein application.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal protein; aminopeptidase N; cadherin; alkaline phosphatase; ABC transporter

收稿日期(Received): 2021-08-21 接受日期(Accepted): 2021-09-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区青年博士科技人才培养项目(2018Q064); 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年项目(2020D01C060); 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室开放课题(SKL2018003)

作者简介: 张龙, 男, 硕士研究生。研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 15123411124@163.com

* 通信作者(Author for correspondence): 马小丽, E-mail: xlm87@xju.edu.cn

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在芽孢形成过程中产生杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 和在对数生长期分泌营养期杀虫蛋白 (vegetative insecticidal proteins, Vips) (Estruch *et al.*, 1996)。ICPs 分为 Cry 杀虫蛋白和 Cyt 杀虫蛋白 2 类, 其中, Cry 杀虫蛋白是目前应用最广泛的 Bt 杀虫蛋白, 其亚组达 79 个 (Clairmont *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/old_name_new_name/)。Bt 杀虫蛋白只对靶标害虫 (主要是鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫) 起作用, 对人畜及生态环境无害 (Sanahuja *et al.*, 2011; Schnepf *et al.*, 1998)。将 Bt 杀虫蛋白基因转到棉花 *Gossypium herbaceum* Linn.、玉米 *Zea mays* L.、水稻 *Oryza sativa* L.、甘蔗 *Saccharum officinarum* L.、茄子 *Solanum melongena* L. 和大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 等农作物中, 可有效减少靶标害虫对农作物的危害。然而, 自 1989 年小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 被报道对 Bt 杀虫蛋白产生抗性以来 (Tabashnik *et al.*, 1990), 害虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性呈逐年增长的趋势。

目前, Bt 杀虫蛋白杀虫机制和鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白抗性机制尚未研究清楚。Bt 杀虫蛋白杀虫机制主要有 Bravo 模型 (Knowles & Ellar, 1987)、Zhang 模型 (Zhang *et al.*, 2005) 及 Jurat-Fuentes 模型 (Jurat-Fuentes & Adang, 2006) 等; 昆虫对 Bt 杀虫蛋白抗性机制主要有促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路模型 (康师, 2018; Guo *et al.*, 2015) 和 CAD 错误定位 (cadherin mislocalization) 模型 (Xiao *et al.*, 2017) 等。

目前, 普遍接受的 Bt 杀虫蛋白杀虫机制主要经历 3 个阶段:

(1) 活化。Bt 原毒素 (分子质量 130~140 ku) 被昆虫取食后以晶体形式进入中肠, 随即被碱性消化液和相应蛋白水解酶识别并水解为 55~65 ku 的活化杀虫蛋白核心。N 端测序表明, Bt 杀虫蛋白的酶切位点在结构域 I 的螺旋 α -1 前端的 Arg28 处 (Liu, 2020);

(2) 结合。活化的杀虫蛋白穿过围食膜 (peritrophic membrane, PM), 并与昆虫中肠刷状缘膜囊泡 (brush-border membrane vesicles, BBMV) 受体结合。一种模型表明, Cry 杀虫蛋白单体与钙黏蛋白 (cadherin, CAD) 结合后, 会进一步加工形成杀虫

蛋白低聚物 (oligomer), 该低聚物与氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 或碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 结合 (Arenas *et al.*, 2010), 然后通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定结合到细胞膜上的蛋白质。另一种模型认为, Cry 杀虫蛋白低聚物与 CAD 结合后通过激活腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC) 信号传导途径诱导程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) (Zhang *et al.*, 2006)。另外, ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC) 也作为 Bt 受体而参与到鳞翅目昆虫中毒过程中, 小菜蛾 *Px-ABCC2* 促进小菜蛾中 Cry1Ac 杀虫蛋白的低聚 (oligomerization) 和低聚物插入细胞膜中 (Ocelotl *et al.*, 2017), 且 PxABC 与 PxCAD 协同促进小菜蛾 Cry 抗性水平 (Ma *et al.*, 2019)。

(3) 成孔。杀虫蛋白寡聚物与受体结合后被插入中肠细胞膜形成膜孔, 从而改变细胞渗透性使细胞裂解死亡, 进而导致昆虫死亡。

根据目前普遍接受的 Bt 杀虫蛋白杀虫机制, 鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性机制主要分为 3 类: ①鳞翅目昆虫中肠蛋白酶活化 Bt 杀虫蛋白的能力改变, 主要是胰蛋白酶 (trypsin) 和胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) (Guo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019); ②Bt 活化杀虫蛋白核心 (Bt activated toxin core) 与鳞翅目昆虫中肠 Bt 受体的结合能力及结合位点数量的改变 (Bravo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018a); ③鳞翅目昆虫信号调控通路改变。目前, 普遍认为第二类是鳞翅目昆虫产生 Bt 抗性的最主要原因。在鳞翅目昆虫中, 研究最为透彻的 Bt 受体是 Cry 受体, 位于鳞翅目昆虫中肠 BBMV 细胞膜上, 已经被证实的鳞翅目昆虫中肠 Cry 受体有 APN、CAD、ALP、ABC 等。

1 鳞翅目昆虫 Bt 杀虫蛋白受体

1.1 氨肽酶 N

氨肽酶 N 是最早发现的鳞翅目昆虫中肠 Bt 受体 (Knight *et al.*, 1994)。据研究, 鳞翅目昆虫中肠 APN 在系统发育上分为 8 个族, 依次命名为 APN1~8 (Wei *et al.*, 2016), 这些 APNs 都具有以下常见特征: (1) 是一类可切割肽链 N 末端中性氨基酸的酶, 常与内肽酶和羧肽酶协同发挥作用 (Wang *et al.*, 2005); (2) C 端通过 GPI 识别并结合在鳞翅目昆虫中肠 BBMV 细胞膜表面 (Lu & Adang, 1996;

Takesue *et al.*, 1992); (3) 多含有谷氨酸锌化氨肽酶 (gluzincinaminopeptidase) 的保守元件 GAMEN 基序和锌结合基序, 成熟 APN 分子质量在 90~170 ku (Pigott & Ellar, 2007); (4) 与 Cry 杀虫蛋白的结合方式不尽相同, 某些 APN 可与多种 Cry 杀虫蛋白结合, 而某些 Cry 杀虫蛋白可与多个 APNs 结合。

APN 各族之间存在结构差异。APN5 具有 GAMEN 基序的变化形式, 其中甲硫氨酸被替换为苏氨酸 (Pigott & Ellar, 2007)。APN1 和 APN3 在 GPI 序列的下游为苏氨酸富含区, 该区域具有广泛的 O-连接糖基化, 被认为可能是 Cry1Ac 杀虫蛋白的结合位点 (Knight *et al.*, 2003), 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的 HaAPN1 和 HaAPN2 虽然都含有一个 O-连接糖基化位点富集区 (高美静, 2017), 但分别敲除棉铃虫易感品系 SCD 中这 2 个 APNs 基因后, 对 Cry1A 或 Cry2A 杀虫蛋白的敏感性均无显著变化 (Wang *et al.*, 2020b)。鳞翅目昆虫 APN 主要通过与 Cry 杀虫蛋白结合使易感昆虫中肠细胞膜成孔而改变细胞膜的渗透性, 进而导致细胞裂解。APN 作为 Cry 杀虫蛋白的受体, 含有与 Cry 杀虫蛋白结合的结构域或结合位点, 如美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 中肠 APN3 的谷氨酸锌化氨肽酶结构域可与 Cry1Ac 杀虫蛋白特异性结合 (王翠苹等, 2016)。

APN 作为 Cry 受体, 在不同种类鳞翅目昆虫中也不相同, 有的鳞翅目昆虫 APN 作为专一的 Cry 受体, 有的鳞翅目昆虫 APN 却不与某种 Cry 杀虫蛋白唯一结合。家蚕 *Bombyx mori* L. BmAPN6 (林平等, 2018) 和二点委夜蛾 *Athetis lepigone* Mschler AlAPN5 (Wang *et al.*, 2017) 都仅作为 Cry1Ac 杀虫蛋白的功能性受体, 而水稻害虫二化螟 *Chilo suppressalis* Walker CsAPN6 和 CsAPN8 都参与了 Cry1Ac/Cry1Ab 和 Cry1Ca 杀虫蛋白的毒性作用 (Sun *et al.*, 2020)。

不同种类鳞翅目昆虫在不同发育阶段及不同部位、不同 APNs 的表达量也不尽相同。水稻二化螟 CsAPN6 在 4 龄期前肠中高表达, 而 CsAPN8 在成虫和蛹中高表达 (Sun *et al.*, 2020); 甘蔗二点螟 *Chilo infuscatellus* Snellen CiAPN1、CiAPN2、CiAPN3、CiAPN4、CiAPN7 和 CiAPN8 在 6 龄期表达水平最高, 而在 5 龄期的表达水平较低 (Wang *et al.*, 2019a); 在棉铃虫中, 除 HaAPN7 等少数 APN

外, 其他 HaAPNs 在中肠组织中均高表达 (高美静, 2017)。

1.2 钙黏蛋白

钙黏蛋白是定位于昆虫中肠 BBMV 上重要的 Cry 受体, CAD 首次在烟草天蛾 *Manduca sexta* (L.) 中被鉴定为 Bt 受体 (Vadlamudi *et al.*, 1995)。CAD 为单链糖蛋白, 其糖基化对于 Bt 杀虫蛋白与之结合至关重要。鳞翅目昆虫 CAD 结构相似, 常以单跨膜结构域锚定在细胞膜上, 其结构一般包括一个 N 末端信号肽 (signal peptide, SIG)、8~12 个钙黏蛋白重复序列 (cadherin repeats, CR)、一个膜近端细胞外结构域 (membrane-proximal extracellular domain, MPED)、一个跨膜结构域 (transmembrane domain, TM) 和一个细胞质结构域 (cytoplasmic domain, CYTO), 有的鳞翅目昆虫 CAD 还有前蛋白区 (proprotein region, PRO), 大多数鳞翅目昆虫 Cry 杀虫蛋白结合域 (toxin binding domain, TBD) 位于膜近端 CR7-MPED 附近。CAD 至少有 6 个亚家族 (Nollet *et al.*, 2000), 最初被认为是细胞黏附分子, 现已知 CAD 参与细胞识别、细胞信号传导、细胞通讯和形态发生等多个生物学过程 (Angst *et al.*, 2001)。

CAD 与 Cry 杀虫蛋白结合后通过促进 Cry 杀虫蛋白 N 末端区域的去除而诱导 Cry 杀虫蛋白低聚, 从而有利于 Cry 杀虫蛋白低聚物与 APN 或 ALP 结合。Cad 基因突变多为隐性等位基因遗传, 并导致 CR 区域内发生变化, 这种突变通常仅由几个或几十个氨基酸的取代、插入或缺失导致。棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) 的 Cry1Ac 抗性 with PgCAD 3 个氨基酸取代 (I1100V、I1107T 和 K1682R) (Fabrick *et al.*, 2019), 或 PgCad 基因中插入 3370 bp (r15) 碱基 (Wang *et al.*, 2019c) 密切相关。烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (F.) 和烟草天蛾的 CAD 氨基酸序列中的 Leu (1425) 和 Phe (1429) 对 CAD 与 Cry1Ac 杀虫蛋白相互作用至关重要 (Xie *et al.*, 2005)。棉铃虫 HaCad 等位基因 r15 突变导致 CYTO 中 55 个氨基酸残基缺失, 体外表达的突变型 HaCAD 没有 Cry1Ac 杀虫蛋白的 TBR, 证明 HaCAD 赋予棉铃虫 Cry1Ac 抗性 (Zhang, 2017a)。

鳞翅目昆虫可能通过 CAD 错误定位赋予其 Bt 抗性。棉铃虫抗性品系 96CAD 的 HaCAD 包含 35 个氨基酸取代, 其中 D172G 取代将造成 HaCAD 定

位错误,即易感品系 96S 的 HaCAD 位于细胞膜上,而 96CAD 的 HaCAD 保留在内质网中,说明 HaCAD 定位错误可能与 Cry1Ac 抗性有关 (Xiao *et al.*, 2017)。棉红铃虫 *PgCad1* (r16) 外显子 20 中插入 1545 个碱基对的简并转座子后产生一个剪接错误的转录本 (包含一个提前终止密码子), r16 等位基因通过干扰 CAD 的定位导致棉红铃虫产生 Cry1Ac 抗性 (Wang *et al.*, 2019b)。鳞翅目昆虫还可能通过调控 Cad 的长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 的表达赋予其对 Bt 杀虫蛋白产生抗性。棉红铃虫可能通过破坏 *PgCAD* 等位基因内含子 20 中的一个 lncRNA (Li *et al.*, 2019) 的下调表达降低 *PgCAD* 基因 (*PgCad1*) 的转录,使得 *PgCAD* 的丰度明显降低 (Fabrick *et al.*, 2019),从而增强棉红铃虫对 Cry1Ac 杀虫蛋白的抗性。

另外,鳞翅目昆虫 CAD 还可通过其他方式赋予昆虫 Bt 抗性。棉红铃虫 *PgCad* 突变等位基因 (具有 207 个碱基对缺失导致缺乏编码其跨膜结构域) 通过破坏 CAD 的细胞运输而赋予其 Cry1Ac 抗性 (Wang *et al.*, 2018b); 棉铃虫 HaCAD 的胞外域和胞质域均参与 Cry1Ac 杀虫蛋白中毒 (Zhang, 2017); 澳大利亚棉铃虫 *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) *HpCad* 基因剪接位点的单核苷酸多态性导致内含子的部分转录和过早产生终止密码子,但 Cry1Ac 结合到澳大利亚棉铃虫 BBMV 不受 *HpCad* 基因破坏的影响 (Walsh *et al.*, 2018)。

不同鳞翅目昆虫 CAD 与 Bt 杀虫蛋白结合能力不同,如小菜蛾 PxCAD 和棉铃虫 HaCAD 都被证实为 Cry1Ac 受体,但小菜蛾 PxCAD 与 Cry1Ac 的结合水平较棉铃虫 HaCAD 低 (Gao *et al.*, 2019)。有的鳞翅目昆虫 CAD 与 Cry 杀虫蛋白专一性结合;有的鳞翅目昆虫 CAD 虽可与多种 Cry 杀虫蛋白结合,但 CAD 所起的作用可能不同。体外表达的二化螟 CsCAD 肽 (CsCad-CR11-MPED) 以高亲和力特异性结合 Cry1Ab 杀虫蛋白,但不与 Cry1C 杀虫蛋白结合,敲除 CsCAD 降低了其幼虫对 Cry1Ab 杀虫蛋白的敏感性,但没有降低其幼虫对 Cry1C 杀虫蛋白的敏感性,这表明 CsCAD 在二化螟幼虫的 Cry1Ab 和 Cry1C 中毒过程中起着不同的作用 (Du *et al.*, 2019)。

有的鳞翅目昆虫只表达一种 CAD,有的鳞翅目昆虫可表达多种 CAD,且不同发育阶段和作用方式

不尽相同。小菜蛾 PxCAD1 可使幼虫的死亡率上升,而 PxCAD2 则不能增强 Cry1Ac 杀虫蛋白的杀虫活性 (龚莉君等, 2016)。二化螟 CsCAD1 在 5 龄期和 6 龄期幼虫中肠中高表达,而 CsCAD2 的表达水平在每个发育阶段均相等 (Zhang, 2017)。

1.3 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶是一组通过水解磷酸单酯,将底物分子中的磷酸基团去除的同工金属酶,水解底物包括核酸、氨基酸、蛋白、生物碱甚至生物杀虫蛋白等,ALP 在碱性环境中具有最佳活性 (Vimalraj, 2020)。完整的 ALP 分子呈现典型的 α/β 拓扑结构,与很多分泌蛋白一样,ALP 在细胞质内合成 N 末端带有信号肽的前体,信号肽引导前体跨内膜运输后被切除,形成同源二聚体 (Ren *et al.*, 2017)。同一昆虫中以不同形式存在的 ALP 具有不同的作用,如家蚕中肠中存在膜结合 ALP (membrane bound ALP, m-ALP, 通过 GPI 锚定在细胞膜上,参与营养物质的消化吸收) 和可溶性 ALP (soluble forms ALP, s-ALP, 位于杯状细胞内腔,参与离子平衡调控) 2 种 ALP 同工酶 (何华伟等, 2017; Yamamoto *et al.*, 1991)。ALP 已被证实存在于鳞翅目、同翅目、双翅目、膜翅目和直翅目等昆虫中,但目前鳞翅目昆虫中 ALP 的研究较有限。

鳞翅目昆虫 m-ALP 作为 Bt 受体,通过 GPI 锚定在昆虫中肠 BBMV 细胞膜表面, m-ALP 与被 CAD 诱导的 Bt 杀虫蛋白低聚物结合有助于后者插入细胞膜导致细胞成孔死亡, m-ALP 突变导致鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白产生抗性 (Ren *et al.*, 2017)。鳞翅目昆虫体内的 m-ALP 曾被认为是 Cry1Ac 杀虫蛋白的专一性受体,如美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Boddie) HzALP2 是 Cry1Ac 杀虫蛋白的受体 (Wei *et al.*, 2019a), 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenee OfALP 的一个 37 ku 片段 (D173 ~ D473 残基) 能够与 Cry1Ac 杀虫蛋白结合 (Jin *et al.*, 2015)。但有研究表明,鳞翅目昆虫体内 m-ALP 也可与其他 Bt 杀虫蛋白结合,异源表达的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Sfm-ALP 可与 Cry1Fa 杀虫蛋白特异性结合,且 Sfm-ALP 下调表达与 Cry1Fa 抗性有关 (Jakka *et al.*, 2016), 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner SeALP1、SeALP2 和 SeALP4 参与了 Cry1Ca 杀虫蛋白中毒过程 (Ren *et al.*, 2017)。

棉铃虫 HaALP 的 Cry1Ac 杀虫蛋白结合片段

(HaALP1f)能增加易感品系和抗性品系在 Cry1Ac 杀虫蛋白处理下的死亡率,首次证明 ALP 的杀虫蛋白结合片段与 Bt 杀虫蛋白间存在协同作用(Chen *et al.*, 2015)。Cry1Ac 杀虫蛋白可与棉铃虫 HaALP 上的 N-乙酰半乳糖胺(N-acetyl- β -D-galactosamine, GalNAc)特异性结合,并且可以通过糖基化的改变或 GalNAc 的存在来防止 Cry1Ac 杀虫蛋白结合(Ning *et al.*, 2010),这为棉铃虫的防治提供了一种方案。

不同种类的 ALPs 在鳞翅目昆虫不同发育阶段差异表达,如甘蔗二点螟 CiALP2 和 CiALP3 在幼虫 2 龄期和 4 龄期的表达量最高(Wang *et al.*, 2019a)。甜菜夜蛾 SeALP2 可与活化的 Cry1Ac 杀虫蛋白结合,且在整个幼虫期均表达,但不同龄期的表达量差异显著,在幼虫 4 龄期表达量最高(袁向东等, 2017)。

1.4 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白,全称 ATP 结合盒转运蛋白,是一类广泛存在于原核生物和真核生物体内的 ATP 能量驱动泵超家族,对离子、氨基酸、葡萄糖、多肽及杀虫蛋白等小分子进行主动跨膜转运。目前已经发现的 ABC 转运蛋白种类很多,采用系统发育分析方法将 ABC 分为 ABCA~H 8 个不同的亚家族,ABCB 家族的成员最初被称为 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)(Heckel, 2012; Jeong *et al.*, 2015)。

ABC 是膜整合蛋白,其完整结构包括高度保守的 2 个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和 2 个胞质侧核苷酸结合域(nucleotide-binding domain, NBD)2 部分。TMD 形成水性通道,含有底物结合位点,通常包含几个跨膜螺旋,如小菜蛾 Px-ABCC2 和 PxABCC3 的 2 个跨膜结构域(TMD1 和 TMD2)都具有 6 个跨膜螺旋(Baxter *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020b),相邻跨膜螺旋在胞外侧形成胞外环(extracellular loops, ECLs)。NBD 将 ATP 的结合水解与物质运输相偶联,具有几个保守基序:walker A 基序、Q 环、signature 基序和 walker B 基序(Heckel, 2012; Liu *et al.*, 2020b)。每种 ABC 都有底物特异性,ABC 各成员之间既存在共性,又存在差异。另外,有的 ABC 仅由一个 TMD 和一个 NBD 组成,但依然能行使完整 ABC 功能。

自 2011 年小菜蛾 PxABCC2 首次被报道作为 Cry1Ac 杀虫蛋白的受体以来(Baxter *et al.*, 2011),

鳞翅目昆虫 ABC 家族被认为是 Bt 杀虫蛋白的受体而受到越来越多的关注。棉红铃虫 PgABCA2 与 Cry2Ab 抗性有关(Mathew *et al.*, 2018);草地贪夜蛾 SfABCC2 是 Cry1Fa 杀虫蛋白和 Cry1A.105 杀虫蛋白的受体(Flagel *et al.*, 2018);亚洲玉米螟 Cry1Ab 和 Cry1Ac 抗性品系中 *OfAbcg* 基因的转录显著下调(Zhang, 2017b);棉铃虫 HaABCC1 跨膜区 TMD1 和 TMD2 片段蛋白均能与活化的 Cry1Ac 杀虫蛋白在体外结合,且抗性品系 HaABCC1 的表达量显著降低(陈琳等, 2019)。

已知 ABC 主要存在于鳞翅目昆虫中肠 BBMV 中,其作用机制尚有许多不明之处。在小菜蛾中, PxABCC2 促进 Cry1Ac 杀虫蛋白的低聚并促进低聚物插入细胞膜中(Ocelotl *et al.*, 2017)。在鳞翅目昆虫中研究较为深入的是 ABCC2 和 ABCC3,可能主要作为各种 Cry1 杀虫蛋白的受体(Endo *et al.*, 2017),ABCC2 和 ABCC3 的 ECLs 起到关键作用。一些鳞翅目昆虫 ABCC2 的 ECL1 的单个氨基酸残基的不同[草地贪夜蛾 SfABCC2 的氨基酸 Q (125)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fab.) SIABCC2 的氨基酸 E (125)及棉铃虫 HaABCC2 氨基酸 Q (122)]导致其对 Cry1Ac 杀虫蛋白的敏感性不同(Liu *et al.*, 2018),SfABCC2 也作为 Cry1F 的功能性受体(Jin *et al.*, 2021)。家蚕 BmABCC2 的 ECL2 上的 234 位的酪氨酸插入赋予家蚕 Cry1Ab 杀虫蛋白和 Cry1Ac 抗性(Tanaka *et al.*, 2013);BmABCC2 突变体的 ECL4 的(DYWL773)-D-770 包含与 Cry1Aa 的假定结合位点(Tanaka *et al.*, 2017)。构建的 BmABCC3 突变体(其中包含家蚕 Cry1Ab 易感品系 ABCC2 的胞外环 ECL1 或 ECL3 3 个氨基酸残基的插入)对 Cry1Aa 杀虫蛋白和 Cry1Ab 杀虫蛋白的活性增加,而在家蚕 Cry1Ab 抗性品系 ABCC2 的 ECL2 插入一个 Tyr 残基后,与 Cry1Ab 杀虫蛋白的亲和力降低,但对 Cry1Aa 的结合力却显著升高,这表明 BmABCC 的 ECL 结构决定了其对 Cry 杀虫蛋白的特异性(Endo *et al.*, 2018)。

ABCC2 和 ABCC3 在鳞翅目昆虫 Bt 杀虫蛋白抗性机制中可能存在某种替代关系。棉铃虫 HaAbcc2 或 HaAbcc3 的单突变几乎没有影响其对 Cry1Ac 杀虫蛋白的敏感性,而 HaAbcc2 和 HaAbcc3 的双突变导致棉铃虫 Cry1Ac 抗性增强超过 15000 倍,说明 HaABCC2 或 HaABCC3 单独存在就足以使

棉铃虫对 Cry1Ac 杀虫蛋白敏感 (Wang, 2020c)。在小菜蛾中也有相似的结果,小菜蛾敏感品系 (G88) 中同时发生 *PxABcc2* 和 *PxABcc3* 组合突变使得小菜蛾产生比 *PxABcc2* 突变 (*PxABcc2* 内含子 6 的 3' 剪接点的点突变导致 *PxABcc2* 错接) 或 *PxABcc3* 突变 (*PxABcc3* 的 cDNA 在 2131 处的点突变导致 *PxABcc3* 过早终止) 更高水平的 Cry1Ac 抗性 (Liu *et al.*, 2020b)。

鳞翅目昆虫中肠 ABC 的表达受到多种因素的调控。小菜蛾的 Cry1A 抗性与 MAPK 信号通路上游的四级信号级联放大 (MAP4K4) 基因转录激活后反式调控多个中肠 Cry1Ac 抗性基因差异表达相关,这些抗性基因包括 *PxABcc1-3*、*PxABcg1* 和 *Pxm-Alp* 等 (康师, 2018)。叉头框蛋白 A (forkhead box protein A, FoxA) 可上调棉铃虫 *HaAbcc2* 基因和斜纹夜蛾 *SlAbcc3* 基因的表达,而较低的 FoxA 表达与鳞翅目昆虫幼虫 Cry 抗性相关 (Li *et al.*, 2017)。从棉铃虫、小菜蛾和斜纹夜蛾 3 种鳞翅目昆虫的 *Abcc2* 的编码序列 (coding sequence, CDS) 中鉴定出 microRNA-998-3p (或 miR-998-3p) 的保守靶位点,注射 microRNA-998-3p 拮抗剂可以显著降低 3 种鳞翅目昆虫 ABCC2 的丰度,同时增加 3 种幼虫的 Cry1Ac 抗性 (Zhu *et al.*, 2010)。

1.5 其他鳞翅目昆虫 Bt 受体

类钙黏蛋白 (cadherin-like protein, CaLP) 存在于多种鳞翅目昆虫中,包括家蚕、小菜蛾、二化螟、棉铃虫、美洲棉铃虫、烟草天蛾等, CaLP 参与 Bt 抗性的重要性可能因不同鳞翅目昆虫而异 (Stevens *et al.*, 2017), 小菜蛾 PxCaLP 的 CR7-CR11 片段在变性和非变性条件下均显示有与 Cry1Ac 杀虫蛋白结合的能力 (Hu *et al.*, 2017)。棉铃虫四跨膜蛋白 (tetraspanin) 基因中的一个点突变赋予棉铃虫 Cry1Ac 显性抗性 (Jin *et al.*, 2018)。聚钙蛋白 (polycalin, pentadecacalin) 首先在家蚕中被证实为一种载脂蛋白 (Mauchamp *et al.*, 2006), 在许多鳞翅目昆虫中,聚钙蛋白已被证实是 Cry 杀虫蛋白的结合蛋白,棉铃虫聚钙蛋白可以与 Cry1Ac 特异性地相互作用 (Wang *et al.*, 2020a)。ABCG4、胰蛋白酶 (trypsin)、热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)、肌动蛋白 (actin)、糖基磷脂酰肌醇锚定附着蛋白 1 (glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1 protein, GAA1) 和溶质载体家族 30 成员 1

(solute carrier family 30 member 1, SLC30A1) 等可能与小菜蛾对 Cry1Ac 杀虫蛋白的抗性有关 (Xia *et al.*, 2016)。此外,同一 Bt 杀虫蛋白可能与鳞翅目昆虫中肠不同 BBMV 受体结合,如 Cry1Ab1 杀虫蛋白与小菜蛾中肠液中胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (trypsin-like serine proteases) 和 Dorsal 蛋白结合,而在甜菜夜蛾中肠液中与过氧化物酶 C (peroxidase-C, POX-C) 结合 (Lu *et al.*, 2017)。

鳞翅目昆虫中与 Vip 杀虫蛋白和 Cyt 杀虫蛋白结合的受体研究较有限,总体而言, Vip 杀虫蛋白与鳞翅目昆虫中肠受体的结合方式与 Cry 杀虫蛋白相似,但结合位点与 Cry 杀虫蛋白不同 (张谦, 2010; Chen *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2006)。Vip3Aa 杀虫蛋白可使海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* (Boisduval) 幼虫的中肠组织细胞质空泡化、BBMV 破坏和细胞解体等 (Abdelkefi-Mesrati *et al.*, 2011)。研究表明, Vip3Aa 杀虫蛋白的 C 末端结构域 (从 510 氨基酸到 C 端) 是赋予 Vip3 蛋白质特异性的区域 (Gomis-Cebolla *et al.*, 2020)。Vip3Aa18 杀虫蛋白的 C 端 536~667 区段氨基酸残基可能与昆虫中肠受体结合,而 N 端 272~292 区段氨基酸残基可能与 Vip3Aa18 杀虫蛋白形成穿孔有关 (蔡峻等, 2007)。Vip3Aa11 杀虫蛋白的 C 端 543~784 区段部分氨基酸对其杀虫特异性以及杀虫毒力均具有重要作用,且不同的害虫受体所结合的 Vip3Aa11 杀虫蛋白氨基酸位点也不尽相同 (雒国兴, 2017)。

2 鳞翅目昆虫 Bt 受体间的相互作用

在 Bt 杀虫蛋白杀虫机制的模型中,位于昆虫中肠 BBMV 上的 Bt 受体发挥了重要作用。在鳞翅目昆虫幼虫中, Bt 杀虫蛋白与不同的肠道蛋白 (包括 GPI 锚定蛋白 APN/ALP 和跨膜蛋白 CAD 和 ABC) 顺序结合形成孔前结构 (pre-pore structures), CAD 通过促进 Bt 杀虫蛋白 N 末端区域的去除而诱导杀虫蛋白的低聚,而 APN/ALP 结合则有助于低聚物插入细胞膜中,各受体之间有序排列,协同完成 Bt 杀虫蛋白中毒过程。某些 Bt 杀虫蛋白可与鳞翅目昆虫体内多种 Bt 受体结合, Cry1Ac 杀虫蛋白可以结合昆虫中肠 APNs、ALP、CaLP、ABCC2、肌动蛋白、ATPase、聚钙蛋白和一些其他以前未鉴定为 Cry 杀虫蛋白结合分子的蛋白,如二肽基肽酶 (dipeptidyl peptidase) 或羧基/胆碱酯酶 (carboxyl/choline esterase) 和一些丝氨酸蛋白酶 (serine protease)。

ases)等(Zhou *et al.*, 2016)。草地贪夜蛾 Cry1F 抗性与中肠 SfALP、SfAPN、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性降低有关(Zhu *et al.*, 2015)。

鳞翅目昆虫中肠 ABC 与其他 Bt 受体间存在协同作用,共同赋予昆虫 Bt 抗性,小菜蛾的 Cry1Ac 抗性 with PxALP、PxABCC2 和 PxABCC3 的下调表达紧密相关(Guo *et al.*, 2015)。在 Hi5 细胞中,棉铃虫 HaCAD 与 HaABCC2 共表达时可显著增强 Cry1Ac 杀虫蛋白对细胞的毒性,然而,斜纹夜蛾 SlCAD 与 HaABCC2 在 Hi5 细胞中共表达时,必须有 HaCAD 的 TBD (特别是 CR11) 的参与才能使 HaABCC2 增强 Cry1Ac 杀虫蛋白的细胞毒性,由此可以推断 CAD 的 TBD 使 Cry1Ac 杀虫蛋白定位在与 ABCC2 相互作用的关键位置,从而有助于 ABCC2 与 Cry1Ac 杀虫蛋白结合(Ma *et al.*, 2019)。在 Sf9 细胞中,甜菜夜蛾 SeABCC2b 与 SeCAD1b 共表达时可增强 Cry1Ca 杀虫蛋白的细胞毒性(Ren *et al.*, 2016),烟芽夜蛾 HvCaLP12 和 HvABCC2 共表达时产生高 Cry1A 杀虫蛋白(Cry1Aa、Cry1Ab 或 Cry1Ac)的细胞毒性(Bretschneider *et al.*, 2016)。这些结果都表明不同受体间的协同作用可使 Bt 杀虫蛋白的毒性增强,这为农业鳞翅目害虫防治提供了一种策略。

同一 Bt 杀虫蛋白与鳞翅目昆虫体内的 Bt 受体并非专一性结合,且这种非专一性结合在不同鳞翅目昆虫中也存在物种多样性。Cry1Ac 杀虫蛋白与家蚕 BmCaLP 和 BmCAD 的结合位点都相同(都位于 CR7、CR11 和 CR12)(Lin *et al.*, 2018),Cry1Aa 杀虫蛋白与家蚕 BmABCC2 和 BmCaLP 受体(BtR175)的结合位点相同,但是家蚕 BmABCC2 突变对 Cry1Aa 杀虫蛋白的抗性比 BmCaLP 突变高 1000 倍(Adegawa *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2013)。

3 展望

研究鳞翅目昆虫 Bt 杀虫蛋白受体对抗性机理研究具有重要意义,有助于为鳞翅目害虫防治提供科学有效的措施,为农业害虫绿色防控提供参考。在 Bt 杀虫蛋白杀虫机制的模型中,位于鳞翅目昆虫中肠 BBMV 上的 Bt 受体之间有序排列,协同完成 Bt 杀虫蛋白中毒过程,整个过程受到昆虫机体的精密调控(Gómez *et al.*, 2014),如棉铃虫 GATA 转录因子(HaGATAe)可以增强棉铃虫 Cry1Ac 受体基因的转录活性(Wei *et al.*, 2019),但是,目前关于

这方面的研究较为有限。需要强调的是,鳞翅目昆虫体内还存在其他物质参与 Bt 杀虫蛋白中毒过程,如棉铃虫钙调磷酸酶(calcineurin, CAN)可能通过磷酸酶活性调节免疫基因表达而增强 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫的杀虫活性(Wei *et al.*, 2021)。建议在今后的研究中,以家蚕或小菜蛾等鳞翅目昆虫为模式生物进行深入研究,阐明其对 Bt 杀虫蛋白产生抗性的机制,为研究其他鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白产生抗性的机制提供参考。

鳞翅目昆虫中肠受体的下调表达或错误表达可以降低其对 Bt 杀虫蛋白的敏感性,从而阻止或减轻鳞翅目昆虫对转 Bt 基因作物的危害。在棉铃虫中,HaAPN1 和 HaCAD 表达量的下降与其 Bt 抗性相关,且在不同幼虫龄期表达量不同(张涛等, 2011)。但鳞翅目昆虫 Bt 抗性机制尚未完全阐释清楚,每种模型都有待验证或完善之处,随着研究的深入,或许还有其他 Bt 抗性机制或 Bt 受体有待发现,且鳞翅目昆虫 Bt 显性抗性机制与 Bt 隐形抗性机制有区别(金琳, 2017)。由于 Bt 杀虫蛋白杀虫机制和相应的鳞翅目昆虫 Bt 抗性机制复杂,即使采用先进的分子生物学方法完全阻断鳞翅目昆虫中肠已知受体的表达,也不确定能取得效果,且在生产中是相当复杂的工作。尽管如此,这一领域仍具有较大的研究价值和现实意义,阐明鳞翅目昆虫的 Bt 抗性机理,可以为相关害虫的防治提供理论基础,为解决鳞翅目害虫对转 Bt 基因作物的危害提出建设性方案。

鳞翅目昆虫 Bt 受体相关研究可为鳞翅目害虫防治提供相应策略,如同时使用多种 Bt 杀虫蛋白的混合策略(或多基因组合策略),该防治策略可明显增强鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白的敏感性。共表达 Vip3AcAa 杀虫蛋白和 Cry1Ac 杀虫蛋白的转基因棉花可有效防治抗 Cry1Ac 杀虫蛋白的棉铃虫(Chen *et al.*, 2017)。同时,鳞翅目昆虫中也存在不同 Bt 受体间的协同作用以增强鳞翅目昆虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性,如 CAD 和 ABC(张丹丹, 2019; Ma *et al.*, 2019),但这些受体间是如何进行协同作用,彼此间的作用机制存在怎样的差别,还有待明确。尽管不同鳞翅目昆虫间中肠 Bt 受体与 Bt 杀虫蛋白结合存在差异,但无论如何,多基因组合策略依旧是今后一段时间 Bt 杀虫蛋白应用于田间鳞翅目昆虫防治的发展方向。

参考文献

- 蔡峻, 滑东辉, 肖亮, 严冰, 陈月华, 2007. 新 vip3Aa 基因的克隆、表达及其序列分析. 微生物学通报, 34(4): 672-675.
- 陈琳, 魏纪珍, 刘臣, 牛琳琳, 张彩虹, 梁革梅, 2019. 棉铃虫中肠特异性结合蛋白 ABCC1 对 Cry1Ac 毒力的影响. 中国农业科学, 52(19): 3337-3345.
- 高美静, 2017. 棉铃虫 LF256 品系对 Cry1Ac 抗性机理的研究及 APN 家族基因的特征分析. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 龚莉君, 彭鹏, 袁哲明, 柳傲, 杨中侠, 2016. 小菜蛾钙黏蛋白片段对 Cry1Ac 蛋白的增效作用. 植物保护, 42(3): 45-51.
- 何华伟, 王叶菁, 侯丽, 李瑜, 位曙光, 赵朋, 蒋文超, 赵萍, 2017. 家蚕碱性磷酸酶原核表达纯化、结构与活性分析. 中国农业科学, 50(14): 2837-2850.
- 金琳, 2017. 自然庇护所对棉铃虫 Cry1Ac 抗性演化的影响及显性 Bt 抗性基因的鉴定. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 康师, 2018. MAPK 信号途径调控小菜蛾 Bt Cry1Ac 抗性的分子机制研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 林平, 程廷才, 冯铁山, 龚娇, 刘春, 夏庆友, 2018. 家蚕氨肽酶和类钙黏蛋白与苏云金芽孢杆菌 Cry1Ac 毒素相互作用. 生物工程学报, 34(11): 1809-1822.
- 雒国兴, 2017. Bt Vip3Aa11 蛋白羧基端点突变对其杀虫活性和敏感性的影响. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 王翠苹, 赵丹, 李少雅, 郭家萍, 郭巍, 陆秀君, 2016. 美国白蛾 *hcapsn3* 基因的克隆及 HcAPN3 蛋白与 Cry1Ac 结合特性分析. 植物保护, 42(2): 62-67.
- 袁向东, 张万娜, 赵曼, 梁革梅, 2017. 甜菜夜蛾中肠碱性磷酸酶 *alp2* 基因的克隆、表达及功能分析. 植物保护学报, 44(1): 8-15.
- 张丹丹, 2019. 棉铃虫 *ABCC2* 和 *Cadherin* 基因变异品系的构建及其对 Bt 抗性的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 张谦, 2010. 不同 Bt 抗性品系棉铃虫对 Vip3Aa 的交互抗性研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 张涛, 魏纪珍, 张丽丽, 陆琼, 梁革梅, 杨朗, 2011. Bt 抗性和敏感棉铃虫钙黏蛋白及氨肽酶 N1 表达量的比较. 植物保护, 37(6): 69-74.
- ABDELKEFI-MESRATI L, BOUKEDI H, DAMMAK-KAR- RAY M, SELLAMI-BOUDAWARA T, JAOUA S, TOUNSI S, 2011. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2): 250-254.
- ADEGAWA S, NAKAMA Y, ENDO H, SHINKAWA N, KIKUTA S, SATO R, 2017. The domain II loops of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa form an overlapping interaction site for two *Bombyx mori* larvae functional receptors, ABC transporter C2 and cadherin-like receptor. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1865(2): 220-231.
- ANGST B D, MARCOZZI C, MAGEE A I, 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(4): 629-641.
- ARENAS I, BRAVO A, SOBERÓN M, GÓMEZ I, 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17): 12497-12503.
- BAXTER S W, BADENES-PÉREZ F R, MORRISON A, VOGEL H, CRICKMORE N, KAIN W, WANG P, HECKEL D G, JIGGINS C D, 2011. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189(2): 675-679.
- BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, SOBERÓN M, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423-431.
- BRETSCHNEIDER A, HECKEL D G, PAUCHET Y, 2016. Three toxins, two receptors, one mechanism: mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 109-117.
- CHEN W B, LIU C X, XIAO Y T, ZHANG D D, ZHANG Y D, LI X C, TABASHNIK B E, WU K M, 2015. A toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes Bt toxin Cry1Ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 10(4): e0126288.
- CHEN W B, LU G Q, CHENG H M, LIU C X, XIAO Y T, XU C, SHEN Z C, SOBERÓN M, BRAVO A, WU K M, 2017. Transgenic cotton co-expressing chimeric Vip3AcAa and Cry1Ac confers effective protection against Cry1Ac-resistant cotton bollworm. *Transgenic Research*, 26(6): 763-774.
- CLAIRMONT F R, MILNE R E, PHAM V T, CARRIÈRE M B, KAPLAN H, 1998. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15): 9292-9296.
- DU L X, CHEN G, HAN L Z, PENG Y F, 2019. Cadherin CsCad plays differential functional roles in Cry1Ab and Cry1C intoxication in *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*, 9(1): 8507-8517.
- ENDO H, TANAKA S, ADEGAWA S, ICHINO F, TABUNO-KI H, KIKUTA S, SATO R, 2018. Extracellular loop struc-

- tures in silkworm ABCC transporters determine their specificities for *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22): 8569–8577.
- ENDO H, TANAKA S, IMAMURA K, ADEGAWA S, KIKUTA S, SATO R, 2017. Cry toxin specificities of insect ABCC transporters closely related to lepidopteran ABCC2 transporters. *Peptides*, 98: 86–92.
- FABRICK J A, MATHEW L G, LEROY D M, HULL J J, UNNITHAN G C, YELICH A J, CARRIÈRE Y, LI X C, TABASHNIK B E, 2019. Reduced cadherin expression associated with resistance to Bt toxin Cry1Ac in pink bollworm. *Pest Management Science*, 76(1): 67–74.
- FLAGEL L, LEE Y W, WANJUGI H, SWARUP S, BROWN A, WANG J L, KRAFT E, GREENPLATE J, SIMMONS J, ADAMS N, WANG Y, MARTINELLI S, HAAS J A, GOWDA A, HEAD G, 2018. Mutational disruption of the ABCC2 gene in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, confers resistance to the Cry1Fa and Cry1A.105 insecticidal proteins. *Scientific Reports*, 8(1): 82–87.
- GAO M J, DONG S, HU X D, ZHANG X, LIU Y, ZHONG J F, LU L N, WANG Y, CHEN L M, LIU X J, 2019. Roles of midgut cadherin from two moths in different *Bacillus thuringiensis* action mechanisms: correlation among toxin binding, cellular toxicity, and synergism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 13237–13246.
- GÓMEZ I, FLORES B, BRAVO A, SOBERÓN M, 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*. *Peptides*, 68: 130–133.
- GOMIS-CEBOLLA J, FERREIRA D S R, WANG Y Q, CABALLERO J, CABALLERO P, HE K L, JURAT-FUENTES J L, FERRÉ J, 2020. Domain shuffling between Vip3Aa and Vip3Ca: chimera stability and insecticidal activity against European, American, African, and Asian pests. *Toxins*, 12(2): 99–115.
- GUO Z J, GONG L J, KANG S, ZHOU J L, SUN D, QIN J Y, GUO L, ZHU L H, BAI Y, BRAVO A, SOBERÓN M, ZHANG Y J, 2019. Comprehensive analysis of Cry1Ac protoxin activation mediated by midgut proteases in susceptible and resistant *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163: 23–30.
- GUO Z J, KANG S, CHEN D F, WU Q G, WANG S L, XIE W, ZHU X, BAXTER S W, ZHOU X, JURAT-FUENTES J L, ZHANG Y J, 2015. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS Genetics*, 11(4): e1005124.
- HECKEL D G, 2012. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2): 103–110.
- HU X D, ZHANG X, ZHONG J F, LIU Y, ZHANG C Z, XIE Y J, LIN M M, XU C X, LU L N, ZHU Q, LIU X J, 2017. Expression of Cry1Ac toxin-binding region in *Plutella xylostella* cadherin-like receptor and studying their interaction mode by molecular docking and site-directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 822–831.
- JAKKA S R K, GONG L, HASLER J, BANERJEE R, SHEETS J J, NARVA K, BLANCO C A, JURAT-FUENTES J L, 2016. Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4): 1023–1034.
- JEONG C B, KIM B M, KANG H M, CHOI I Y, RHEE J S, LEE J S, 2015. Marine medaka ATP-binding cassette (ABC) superfamily and new insight into teleost Abch nomenclature. *Scientific Reports*, 5(1): 626–628.
- JIN L, WANG J, GUAN F, ZHANG J P, YU S, LIU S Y, XUE Y Y, LI L L, WU S W, WANG X L, YANG Y H, ABDELGAFFAR H, JURAT-FUENTES J L, TABASHNIK B E, WU Y D, 2018. Dominant point mutation in a tetraspanin gene associated with field-evolved resistance of cotton bollworm to transgenic Bt cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115: 11760–11765.
- JIN M H, TAO J H, LI Q, CHENG Y, SUN X X, WU K M, XIAO Y T, 2021. Genome editing of the *SfABCC2* gene confers resistance to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(3): 815–820.
- JIN T T, DUAN X L, BRAVO A, SOBERÓN M, WANG Z Y, HE K L, 2015. Identification of an alkaline phosphatase as a putative Cry1Ac binding protein in *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 131: 80–86.
- JURAT-FUENTES J L, ADANG M J, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3): 166–171.
- KNIGHT P J K, CARROLL J, ELLAR D J, 2003. Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of

- Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1): 101–112.
- KNIGHT P J K, CRICKMORE N, ELLAR D J, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11(3): 429–436.
- KNOWLES B H, ELLAR D J, 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *BBA-General Subjects*, 924(3): 509–518.
- LEE M K, MILES P, CHEN J S, 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(4): 1043–1047.
- LI J H, MA Y M, YUAN W L, XIAO Y T, LIU C X, WANG J, PENG J X, PENG R, SOBERÓN M, BRAVO A, YANG Y B, LIU K Y, 2017. FOXA transcriptional factor modulates insect susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin by regulating the expression of toxin-receptor *ABCC2* and *ABCC3* genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 88: 1–11.
- LIU L L, CHEN Z W, YANG Y C, XIAO Y T, LIU C X, MA Y M, SOBERÓN M, BRAVO A, YANG Y B, LIU K Y, 2018. A single amino acid polymorphism in *ABCC2* loop 1 is responsible for differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in different *Spodoptera* (Noctuidae) species. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 100: 59–65.
- LIU S Y, WANG S, WU S W, WU Y D, YANG Y H, 2020a. Proteolysis activation of Cry1Ac and Cry2Ab protoxins by larval midgut juice proteases from *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 15(1): e0228159.
- LIU Z X, FU S, MA X L, BAXTER S W, VASSEUR L, XIONG L, HUANG Y P, YANG G, YOU S J, YOU M S, 2020b. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin requires mutations in two *Plutella xylostella* ATP-binding cassette transporter paralogs. *PLoS Pathogens*, 16(8): e1008697.
- LU K Y, GU Y Q, LIU X P, LIN Y, YU X Q, 2017. Possible insecticidal mechanisms mediated by immune-response-related Cry-binding proteins in the midgut juice of *Plutella xylostella* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(10): 2048–2055.
- LU Y J, ADANG M J, 1996. Conversion of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(1): 33–40.
- MA Y M, ZHANG J F, XIAO Y T, YANG Y C, LIU C X, PENG R, YANG Y B, BRAVO A, SOBERÓN M, LIU K Y, 2019. The cadherin Cry1Ac binding-region is necessary for the cooperative effect with *ABCC2* transporter enhancing insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Toxins (Basel)*, 11(9): 538–555.
- MATHEW L G, PONNURAJ J, MALLAPPA B, CHOWDARY L R, ZHANG J W, TAY W T, WALSH T K, GORDON K H J, HECKEL D G, DOWNES S, CARRIÈRE Y, LI X C, TABASHNIK B E, FABRICK J A, 2018. ABC transporter mis-splicing associated with resistance to Bt toxin Cry2Ab in laboratory- and field-selected pink bollworm. *Scientific Reports*, 8(1): 13531–13545.
- MAUCHAMP B, ROYER C, GAREL A, JALABERT A, DA R M, GRENIER A M, LABAS V, VINH J, MITA K, KADONO K, CHAVANCY G, 2006. Polycalin (chlorophyllid A binding protein): a novel, very large fluorescent lipocalin from the midgut of the domestic silkworm *Bombyx mori* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 623–633.
- NING C M, WU K M, LIU C X, GAO Y L, JURAT-FUENTES J-L, GAO X W, 2010. Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. *Journal of Insect Physiology*, 56(6): 666–672.
- NOLLET F, KOOLS P, VAN R F, 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology*, 299(3): 551–572.
- OCELOTL J, SNCHEZ J, GMEZ I, TABASHNIK B E, BRAVO A, SOBERÓN M, 2017. *ABCC2* is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. *Scientific Reports*, 7(1): 423–431.
- PIGOTT C R, ELLAR D J, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2): 255–281.
- REN X L, HU H Y, JIANG W L, MA X Y, MA Y J, LI G Q, MA Y, 2017. Three GPI-anchored alkaline phosphatases are involved in the intoxication of Cry1Ca toxin to *Spodoptera exigua* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151: 32–40.
- REN X L, JIANG W L, MA Y J, HU H Y, MA X Y, MA Y, LI G Q, 2016. The *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) *ABCC2* mediates Cry1Ac cytotoxicity and, in conjunction with cadherin, contributes to enhance Cry1Ca toxicity in Sf9 cells. *Journal of Economic Entomology*, 109(6): 2281–2289.

- SANAHUJA G, BANAKAR R, TWYMAN R M, CAPELL T, CHRISTOU P, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3): 283–300.
- SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, LERECLUS D, BAUM J, FEITELSON J, ZEIGLER D R, DEAN D H, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775–806.
- STEVENS T, SONG S S, BRUNING J B, CHOO A, BAXTER S W, 2017. Expressing a moth *abcc2* gene in transgenic drosophila causes susceptibility to Bt Cry1Ac without requiring a cadherin-like protein receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80: 61–70.
- SUN Y J, YANG P, JIN H H, LIU H, ZHOU H, QIU L, LIN Y J, MA W H, 2020. Knockdown of the aminopeptidase *N* genes decreases susceptibility of *Chilo suppressalis* larvae to Cry1Ab/Cry1Ac and Cry1Ca. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162: 36–42.
- TABASHNIK B E, CUSHING N L, FINSON N, JOHNSON M W, 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(5): 1671–1676.
- TAKESUE S, YOKOTA K, MIYAJIMA S, TAGUCHI R, IKEZAWA H, TAKESUE Y, 1992. Partial release of aminopeptidase *N* from larval midgut cell membranes of the silkworm, *Bombyx mori*, by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 102(1): 7–11.
- TANAKA S, ENDO H, ADEGAWA S, IIZUKA A, IMAMURA K, KIKUTA S, SATO R, 2017. *Bombyx mori* ABC transporter C2 structures responsible for the receptor function of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 91: 44–54.
- TANAKA S, MIYAMOTO K, NODA H, JURAT-FUENTES J L, YOSHIKAWA Y, ENDO H, SATO R, 2013. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS Journal*, 280(8): 1782–1794.
- VADLAMUDI R K, WEBER E, JI I, JI T H, BULLA L A, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10): 5490–5494.
- VIMALRAJ S, 2020. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 754: 144855–144862.
- WALSH T, JAMES B, CHAKROUN M, FERRÉ J, DOWNES S, 2018. Isolating, characterising and identifying a Cry1Ac resistance mutation in field populations of *Helicoverpa punctigera*. *Scientific Reports*, 8(1): 2626–2634.
- WANG B J, WEI J Z, WANG Y N, CHEN L, LIANG G M, 2020a. Polycalin is involved in the toxicity and resistance to Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(1): e21661.
- WANG G R, WU K M, LIANG G M, GUO Y Y, 2005. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Science in China Series C-life Sciences*, 48(4): 346–356.
- WANG J, ZUO Y Y, LI L L, WANG H, LIU S Y, YANG Y H, WU Y D, 2020b. Knockout of three aminopeptidase *N* genes does not affect susceptibility of *Helicoverpa armigera* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A and Cry2A toxins. *Insect Science*, 27(3): 440–448.
- WANG J, MA H H, ZHAO S, HUANG J L, YANG Y H, TABASHNIK B E, WU Y D, 2020c. Functional redundancy of two ABC transporter proteins in mediating toxicity of *Bacillus thuringiensis* to cotton bollworm. *PLoS Pathogens*, 16(3): e1008427.
- WANG J D, ZHANG J S, GUO Y F, CHEN L F, WANG F L, HUANG M T, GAO S J, WANG R, 2019c. Molecular cloning, characterization, and expression profiling analysis of Cry toxin receptor genes from sugarcane shoot borer *Chilo infuscatellus* (Snellen). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157: 186–195.
- WANG L, MA Y M, GUO X Q, WAN P, LIU K Y, CONG S B, WANG J T, XU D, XIAO Y T, LI X C, TABASHNIK B E, WU K M, 2019b. Pink bollworm resistance to Bt toxin Cry1Ac associated with an insertion in cadherin exon 20. *Toxins*, 11(4): 186–198.
- WANG L, MA Y M, WAN P, LIU K Y, XIAO Y T, WANG J T, CONG S B, XU D, WU K M, FABRICK J A, LI X C, TABASHNIK B E, 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, WANG J T, MA Y M, WAN P, LIU K Y, CONG S B, XIAO Y T, XU D, WU K M, FABRICK J A, LI X C, TABASHNIK B E, 2019a. Transposon insertion causes cadherin mis-splicing and confers resistance to Bt cotton in pink bollworm from China. *Scientific Reports*, 9(1): 362–365.
- WANG L Y, GU S H, NANGONG Z Y, SONG P, WANG Q Y, 2017. Aminopeptidase N5 (APN5) as a putative functional receptor of Cry1Ac toxin in the larvae of *Athetis lepi-*

- gone. *Current Microbiology*, 74(4): 455–459.
- WANG S H, KAIN W, WANG P, 2018. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exert toxicity by multiple pathways in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 102:59–66.
- WEI J Z, YAO X, YANG S, LIU S K, ZHOU S, CEN J J, LIU X G, DU M F, TANG Q B, AN S H, 2021. Suppression of calcineurin enhances the toxicity of Cry1Ac to *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Microbiology*, 12: 634619.
- WEI J Z, ZHANG M, LIANG G M, LI X C, 2019. Alkaline phosphatase 2 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Insect Molecular Biology*, 28(3): 372–379.
- WEI J Z, ZHANG M, LIANG G M, WU K M, GUO Y Y, NI X Z, LI X C, 2016. APN1 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Science Reports*, 6(1): 19179–19186.
- XIA J X, GUO Z J, YANG Z Z, ZHU X, KANG S, YANG X, YANG F S, WU Q J, WANG S L, XIE W, XU W J, ZHANG Y J, 2016. Proteomics-based identification of midgut proteins correlated with Cry1Ac resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 132: 108–117.
- XIAO Y T, DAI Q, HU R Q, PACHECO S, YANG Y B, LIANG G M, SOBERÓN M, BRAVO A, LIU K Y, WU K M, 2017. A single point mutation resulting in cadherin mislocalization underpins resistance against *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm. *Journal of Biological Chemistry*, 292(7): 2933–2943.
- XIE R Y, ZHUANG M B, ROSS L S, GOMEZ I, OLTEAN D I, BRAVO A, SOBERON M, GILL S S, 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9): 8416–8425.
- YAMAMOTO H, AZUMA M, EGUCHI M, 1991. Further characterization of alkaline phosphatase isozymes in the silkworm midgut: effects of amino acids and metal ions and comparison of sugar chains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 99(2): 437–443.
- ZHANG H N, YU S, SHI Y, YANG Y H, FABRICK J A, WU Y D, 2017a. Intra- and extracellular domains of the *Helicoverpa armigera* cadherin mediate Cry1Ac cytotoxicity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86: 41–49.
- ZHANG M, WEI J Z, NI X Z, ZHANG J, JURAT-FUENTES J L, FABRICK J A, CARRIÈRE Y, TABASHNIK B E, LI X C, 2019. Decreased Cry1Ac activation by midgut proteases associated with Cry1Ac resistance in *Helicoverpa zea*. *Pest Management Science*, 75(4): 1099–1106.
- ZHANG T T, COATES B S, WANG Y Q, WANG Y D, BAI S X, WANG Z Y, HE K L, 2017b. Down-regulation of aminopeptidase N and ABC transporter subfamily G transcripts in Cry1Ab and Cry1Ac resistant Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *International Journal of Biological Sciences*, 13(7): 835–851.
- ZHANG X, CANDAS M, GRIKO N B, ROSE-YOUNG L, BULLA L A, 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 12(11): 1407–1416.
- ZHANG X B, CANDAS M, GRIKO N B, TAUSSIG RONALD, BULLA L A, 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9897–9902.
- ZHOU Z S, WANG Z Y, LIU Y X, LIANG G M, SHU C L, SONG F P, ZHOU X P, BRAVO A, SOBERÓN M, ZHANG J, 2016. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. *Microbiology Open*, 5(4): 659–669.
- ZHU B, SUN X, NIE X M, LIANG P, GAO X W, 2010. MicroRNA-998-3p contributes to Cry1Ac-resistance by targeting ABCC2 in lepidopteran insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 117: 103283–103300.
- ZHU Y C, BLANCO C A, PORTILLA M, ADAMCZYK J, LUTTRELL R, HUANG F, 2015. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122: 15–21.

(责任编辑:郭莹)