

受体介导的鳞翅目昆虫对 Bt 毒素抗性机制进展

刘磊磊¹, 徐培文^{1,3}, 刘凯于², 魏巍¹, 常忠燊¹, 程大辉¹

- 1 武汉生物工程学院 生命科学与技术学院 应用生物技术研究中心, 湖北 武汉 430415
- 2 华中师范大学 生命科学学院 昆虫研究所, 湖北 武汉 430079
- 3 华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070

刘磊磊, 徐培文, 刘凯于, 魏巍, 常忠燊, 程大辉. 受体介导的鳞翅目昆虫对 Bt 毒素抗性机制进展. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1809-1823.
LIU LL, XU PW, LIU KY, WEI W, CHANG ZS, CHENG DH. Advances in receptor-mediated resistance mechanisms of Lepidopteran insects to *Bacillus thuringiensis* toxin. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1809-1823.

摘 要: 苏云金芽孢杆菌作为一种对人畜安全、环境友好型绿色杀虫剂在全球被广泛使用。Bt 毒素与昆虫中肠上特定毒素受体结合并发挥作用, 形成毒素穿孔导致昆虫死亡是其重要的杀虫机制之一, 靶标害虫对 Bt 毒素产生抗性是制约转 Bt 作物长期有效种植和 Bt 毒素持续使用的重要因素。文中从鳞翅目昆虫中肠细胞 Bt 毒素重要受体的研究阐述昆虫对 Bt 的抗性机制, 为 Bt 抗性机制的深入研究和对害虫的防控与治理提供了一定的理论参考。

关键词: 苏云金杆菌; 毒素受体; 抗性; 鳞翅目昆虫

Advances in receptor-mediated resistance mechanisms of Lepidopteran insects to *Bacillus thuringiensis* toxin

LIU Leilei¹, XU Peiwen^{1,3}, LIU Kaiyu², WEI Wei¹, CHANG Zhongshen¹, CHENG Dahui¹

- 1 Center of Applied Biotechnology, School of Life Sciences and Technology, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, Hubei, China
- 2 Institute of Entomology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China
- 3 College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: *Bacillus thuringiensis* is widely used as an insecticide which is safe and environmentally

Received: November 11, 2021; **Accepted:** February 21, 2022; **Published online:** February 25, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Hubei Province, China (2020CFB145); National Natural Science Foundation of China (32102289); Science and Technology Research Project of Hubei Provincial Department of Education, China (B2021289)

Corresponding author: LIU Leilei. Tel: +86-27-89648287; E-mail: liulei@mails.cnu.edu.cn

基金项目: 湖北省自然科学基金 (2020CFB145); 国家自然科学基金 (32102289); 湖北省教育厅科学技术研究项目 (B2021289)

friendly to humans and animals. One of the important insecticidal mechanisms is the binding of Bt toxins to specific toxin receptors in insect midgut and forming a toxin perforation which eventually leads to insect death. The resistance of target pests to Bt toxins is an important factor hampering the long-term effective cultivation of Bt crops and the continuous use of Bt toxins. This review summarizes the mechanism of insect resistance to Bt toxins from the perspective of important Bt toxin receptors in midgut cells of Lepidopteran insects, which may facilitate the in-depth study of Bt resistance mechanism and pest control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; toxin receptors; resistance; Lepidopteran insects

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种具有昆虫病原特性的革兰氏阳性菌, 在其生长代谢过程中可以产生分泌到细胞外的营养期杀虫蛋白 (vegetative insecticidal protein, VIP), 分泌型杀虫蛋白 (secreted insecticidal protein, SIP) 以及母细胞释放芽胞时产生杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP)^[1-2]。VIP 主要有 4 个家族, Vip1 和 Vip2 蛋白作为二元毒素对鞘翅目和半翅目昆虫有较好的杀虫效果, Vip3 杀虫蛋白目前至少有 110 种被克隆以及命名, Vip3 家族蛋白对鳞翅目昆虫具有较好的杀虫活性^[3], Vip4 蛋白目前尚未见杀虫相关报道。SIP 蛋白关于杀虫活性相关研究较少。ICP 和 VIP 蛋白结构不同, 且两者蛋白质几乎也没有同源性, 在杀虫作用机理上也不同^[4], ICP 主要分为 Cyt 和 Cry 蛋白两大类。Cyt 蛋白是一类具有细胞溶解性甚至溶血活性的包涵体蛋白, 而 Cry 蛋白是一类对靶标害虫如鳞翅目昆虫具有高毒性的伴孢晶体, Cry 蛋白对靶标昆虫具有较高特异性而对人类、植物和无脊椎动物等安全友好, 并且可以完全降解无残留^[5]。Bt 菌株被认为是一种昆虫病原菌, 其致病性主要取决于伴孢晶体蛋白 Cry 毒素, 研究发现 Bt 菌株对鳞翅目、鞘翅目、同翅目和双翅目昆虫等有杀虫活性, 同时还发现一些 Bt 菌株对线虫、螨类和寄生虫有一定的杀虫活性^[5]。苏云金杆菌

产生的伴孢晶体毒素可以直接施用于农田防控害虫, 或者 Bt 毒素基因作为转基因植物的靶标基因转入作物中, 这样可以有效地减少化学合成杀虫剂在玉米、棉花、大豆等农作物中的使用, 促进现代农业的健康发展。由于 Bt 毒素具有对人畜安全友好、容易降解无残留且对环境友好等诸多优点, 使得 Bt 生物杀虫剂和转 Bt 作物在农业害虫防治中被广泛采用。害虫对 Bt 毒素产生较高的抗性严重制约了转 Bt 作物的广泛种植和 Bt 杀虫剂的长期有效使用^[6], 害虫对 Bt 毒素产生抗性过程和机理比较复杂, 虽然目前 Bt 毒素抗性机制以及 Bt 毒素受体相关研究取得一些进展, 但还有很多 Bt 抗性机制有待进一步研究。

1 苏云金杆菌毒素作用机理

研究表明毒素激活过程、毒素与受体结合以及昆虫免疫是引起 Bt 抗性的重要因素^[5-6]。Cry 毒素蛋白晶体对害虫具有高度特异性且对环境安全友好, Cry 毒素蛋白的杀虫机理研究较多。在 Cry 毒素蛋白作用于昆虫幼虫的过程中, 毒素经历一系列复杂的步骤使得昆虫中肠细胞裂解导致幼虫死亡, 目前 Cry 蛋白杀虫机理主要有两类理论假说, 即“穿孔形成”模型假说和“信号转导”模型假说 (图 1)^[5]。

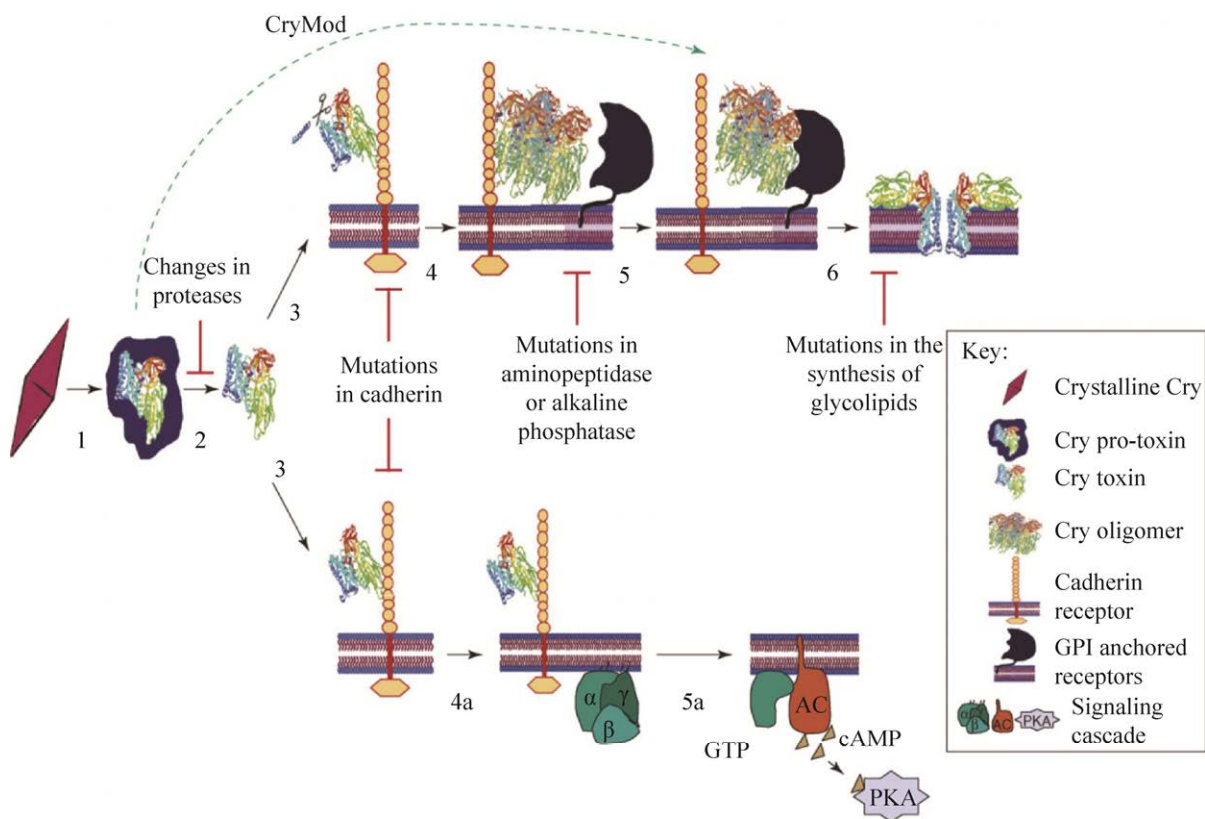


图 1 Cry 毒素的作用机制^[5]

Figure 1 Models of the mechanisms of Cry toxins^[5]. Two different mechanisms: the pore-formation model (top) and the signal transduction model (bottom).

“穿孔形成”模型理论认为昆虫肠道 pH 呈碱性的特征决定了 Cry 毒素具有潜在的杀虫活性。当靶标害虫摄取 Cry 晶体蛋白后, Cry 晶体蛋白在幼虫中肠首先被溶解为 Cry 原毒素, 随后被昆虫中肠释放的蛋白酶水解其 N 端 α -1 螺旋成大小约 60 kDa 的活化毒素^[7]。活化的 Cry 毒素首先与昆虫中肠刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上的钙黏蛋白 (cadherin, CAD) 受体结合, 使得活化的 Cry 毒素进一步水解^[8], 导致毒素单体寡聚化。寡聚化的毒素与通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidyl-inositol, GPI) 锚定蛋白

连接在细胞膜上的次级受体结合, 如烟草天蛾毒素受体氨肽酶-N (aminopeptidase N, APN)、烟芽夜蛾毒素受体碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)^[9-10], 毒素寡聚物与 APN、ALP 受体以 200 倍的高亲和力结合^[11], 寡聚毒素插入细胞膜形成毒素穿孔使得细胞裂解直至幼虫死亡^[12]。“穿孔形成”假说认为 Cry 毒素蛋白通过与受体结合插入细胞膜形成离子通道引起细胞穿孔, 毒素与受体蛋白发生一系列相互作用, 昆虫中肠细胞渗透压发生改变, 上皮细胞的裂解导致昆虫的消化系统麻痹, 靶标害虫迅速停止进食, 最终导致昆虫死亡 (图 2)^[13-14]。

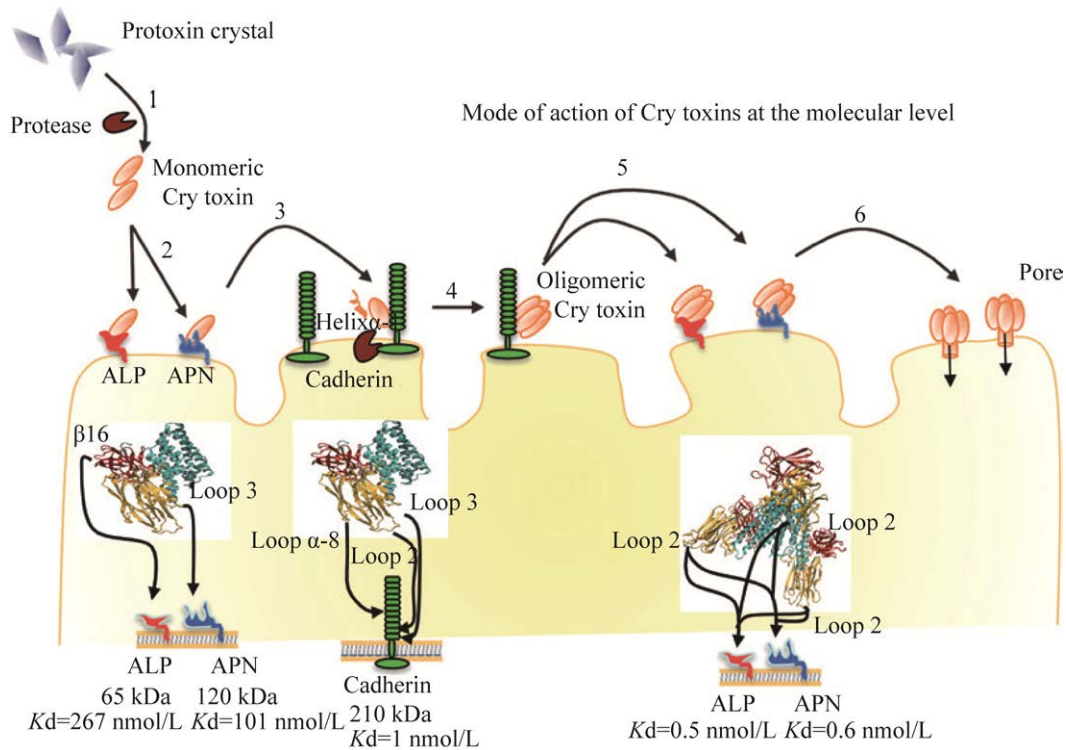


图 2 Cry 毒素在鳞翅目昆虫中的作用机理示意图^[13]

Figure 2 Schematic representation of the mechanism of Cry toxins in Lepidoptera at the molecular level^[13].

“信号转导”假说理论认为 Cry 毒素并不引起昆虫细胞穿孔，而是与昆虫中肠特异性受体相互作用进一步激活了信号转导过程。虽然“信号转导”模型与“穿孔形成”模型致死机理不同，但 Cry 毒素水解活化起始步骤类似，受体的表达量变化或突变引起昆虫 Bt 抗性过程保持一致。活化的 Cry 毒素与昆虫中肠 BBMVs 上钙黏蛋白受体结合，刺激 G 蛋白偶联系统，从而增加 cAMP 的含量，使得蛋白激酶 A 被活化，进一步触发级联信号通路反应，此过程激活细胞 PKA 系统信号通路导致细胞裂解死亡^[15]。关于“信号转导”模型理论的研究报道较少，靶标害虫仅可能在较低浓度 Cry 毒素的情况下才可能激活 PKA 系统信号通路^[14]。Cry 毒素蛋白和毒素受体结合是昆虫致病极为重要的过程，目前已发现能与 Bt 毒素结合的受体主要包括腺苷三

磷酸结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette transporters, ABC 转运蛋白)^[16]、CAD^[17]、ALP^[12]、APN^[18] 等几类重要的膜蛋白。除这些重要的膜蛋白以外细胞内还有些其他物质可以作为毒素受体蛋白也被鉴定出来，如肌动蛋白、糖脂等^[19]。

Vip3 家族蛋白是目前研究较多且对鳞翅目昆虫具有靶向性的营养期杀虫蛋白，Vip3A 毒素与 Cry 毒素氨基酸序列没有同源性，受体蛋白的结合位点也不同，杀虫作用机理也不同^[4]。Vip3A 杀虫机理主要是活化的毒素引起细胞膜穿孔和原毒素诱导细胞凋亡两方面导致靶标害虫死亡^[3]。Vip3A 原毒素在昆虫中肠蛋白酶水解活化产生约 19 kDa 和 65 kDa 的蛋白片段，Vip3A 毒素与 Cry 杀虫晶体蛋白毒素均能引起细胞穿孔，但两种毒素与靶标鳞翅目昆虫中肠

BBMV 上的结合受体差异较大^[4]；另一方面，Vip3A 不经过激活过程，在受体蛋白如成纤维生长因子受体、清道夫 C 型受体等介导的胞吞作用下进入细胞内部，诱导细胞凋亡，从而使细胞肿胀、丧失粘附力直至死亡^[20-21]，但 Vip3A 原毒素参与细胞凋亡的信号通路过程有待研究。

2 Bt 杀虫晶体蛋白主要受体研究

2.1 ABC 超家族转运蛋白

ABC 转运蛋白是一组跨膜蛋白，具有 ATP 结合区域的单向底物转运泵，因含有 1 个腺苷三磷酸的结合盒而得名。ABC 转运蛋白是细胞膜整合蛋白，可参与生物体各种生理功能，如维持细胞内外渗透压平衡、细菌免疫、抗原呈递、细胞分化、胆固醇和脂质的运输等^[22]。ABC 转运蛋白家族有 4 个核心区域，两个跨膜区域 (transmembrane domain, TMD) 形成具有特异性配基结合点，两个核苷酸结合区域 (nucleotide binding domain, NBD) 结合并水解 ATP 产生的能量用于逆浓度运输小分子底物^[23]。不同生物体的 ABC 转运蛋白的结构高度相似且具有高度保守的 NBD 区域，因此原核和真核生物中 ABC 转运蛋白作用机制保持一致。ABC 转运蛋白外向运输转运过程是从细胞内侧底物与 TMD 区结合开始的；而 ABC 转运蛋白内向运输的转运过程是先形成外周蛋白和底物分子复合物，随后与 ABC 转运蛋白互作把底物分子传递给 TMD 区域，药物结合 TMD 区域促使 ATP 与 NBD 结合，ABC 通过改变构象转运物质，ATP 可结合和水解药物^[24]。经典的昆虫对药物抗性解毒过程的研究主要集中在细胞色素单加氧酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶 3 大家族的研究^[25]。由于 ABC 转运蛋白的构象变化对药物的运输和 ATP 对药物的水解作用至关重要，因此，ABC 转运蛋白家族在生物体中参与

细胞解毒过程^[26]。

ABC 超家族蛋白是具有多功能完整膜蛋白包括从细胞内输出有毒分子，烟芽夜蛾 *ABCC2* 基因经过失活突变使得 Cry1A 毒素与中肠细胞膜微囊的结合力下降，导致其抗药性至少提高 1 000 倍，表明 *ABCC2* 作为重要毒素受体参与毒素穿孔形成膜整合过程^[27]。通过对家蚕 7 个抗性品系和 10 个敏感品系序列分析，发现家蚕 *ABCC2* 的耐药等位基因细胞跨膜结构外侧 loop 区域单个酪氨酸的插入，会引起家蚕对 Cry1Ac 毒素的敏感性降低^[28]。随着对 ABC 超家族蛋白的不断深入研究，利用 RNAi 技术对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾分离细胞系中 *ABCC3* 沉默后，发现分离的两种细胞系对 Cry1Ac 毒素敏感性降低^[29-30]。在果蝇幼虫唾液腺表达小菜蛾 *ABCC2* 蛋白，生物测定发现在果蝇中肠表达小菜蛾 *ABCC2* 的果蝇幼虫对 Cry1Ac 毒素高度敏感，表明小菜蛾 *ABCC2* 蛋白是 Cry1Ac 毒素的重要受体^[31]。对家蚕 *ABCC2* 蛋白几个氨基酸残基突变分析，结果发现 Cry1Aa 毒素对鳞翅目昆虫的特异性和毒性变化主要由于 *ABCC2* 蛋白胞外侧区域 loop 4 氨基酸残基 ⁷⁷⁰DYWL⁷⁷³ 保守性和不同程度变异引起的^[32]。同时敲除 *HaABCC2* 和 *HaABCC3* 基因会导致棉铃虫对 Cry1Ac 毒素的抗性大于 15 000 倍，而分别单独敲除这两个基因，单独敲除的棉铃虫品系均对 Bt 抗性几乎没有改变，通过生物测定和遗传分析，野生型 *HaABCC2* 或 *HaABCC3* 等位基因能维持棉铃虫对 Cry1Ac 毒素敏感性，表明 *HaABCC2* 和 *HaABCC3* 作为 Bt 毒素受体起重要作用^[33]，*ABCC2* 转运蛋白是一种重要的 Bt 毒素受体，与多种害虫 Bt 高水平抗性有关，推测 ABC 转运蛋白基因突变在鳞翅目昆虫草地贪夜蛾 Bt 抗性中起重要作用。我们团队研究发现，3 种鳞翅目昆虫 *ABCC2* 蛋白均可作为 Cry1Ac 毒素受

体, 而草地贪夜蛾 SfABCC2 上细胞外侧 loop1 区域 Q¹²⁵ 氨基酸和斜纹夜蛾 SIABCC2 上细胞外侧 loop1 上 E¹²⁵ 氨基酸是影响异源表达 ABCC2 的 Hi5 细胞对 Cry1Ac 敏感性差异的关键氨基酸, 表明单个氨基酸多态性是影响不同鳞翅目种群对 Cry1Ac 毒素敏感性差异的重要原因^[34]。最新研究发现, 小 RNA miR-998-3p 能识别棉铃虫、甜菜夜蛾和小菜蛾 ABCC2 靶基因 mRNA 保守或非保守位点, RNA miR-998-3 下调结合的靶基因, 引起毒素受体 ABCC2 蛋白表达减少, 导致这 3 种鳞翅目昆虫种群对 Cry1Ac 敏感性下降, 研究也发现小菜蛾抗性品系 RNA miR-998-3 的表达量显著高于敏感品系, ABCC2 受体蛋白的转录后调控也与 Bt 毒素抗性密切相关^[35], 表明 ABC 转运蛋白转录后调控在 Bt 毒素杀虫机制中具有重要作用^[36]。关于 ABC 超家族介导的 Bt 抗性的研究我们至今没有完全解释清楚, 对这类受体的转录后水平调控研究可为 Bt 抗性提供新思路。

2.2 鳞翅目昆虫类钙黏蛋白

钙黏蛋白是动物体内普遍存在的比较庞大而且多样的跨膜蛋白, 具有胞外区域有 5-34 个重复保守的钙结合位点序列, 通过跨膜区锚定在细胞膜上, 钙黏蛋白在不同细胞中时空表达具有高度特异性。钙黏蛋白重要的生物学特性主要是参与细胞识别、神经传递、信号转导以及维持细胞结构稳定等^[37]。昆虫类钙黏蛋白结构与钙粘蛋白相似故而得名, 昆虫类钙黏蛋白一般包括 4 个基本结构域, 从 N 端到 C 端依次为: 细胞外结构区域, 包含 9-12 个重复序列和 1 个信号肽序列; 细胞膜近端胞外结构域; 跨膜区, 由 21-26 个氨基酸残基组成; 以及细胞内的胞质结构域^[38]。

昆虫类钙黏蛋白是依赖钙离子的跨膜糖蛋白家族中的一员, 参与了细胞间的粘附, 它们

的变异与癌变有关。类钙黏蛋白无论是在“穿孔形成”模型还是“信号转导”模型中都有举足轻重的作用。在昆虫中肠内, 类钙黏蛋白作为重要毒素受体与 Cry 毒素具有高度亲和力, 两者紧密结合会使中肠上皮细胞的结构瓦解, 最终导致昆虫死亡^[13]。烟草天蛾中肠 BBMV 上类钙黏蛋白首次作为 Bt 毒素受体被发现, 其能与 Cry1Ab 特异性结合从而导致烟草天蛾幼虫死亡^[18]。用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统成功地获得了对 Cry1Ac 抗性的棉铃虫, 抗性品系较敏感品系对 Cry1Ac 抗性达 549 倍。这为 HaCAD 作为 Cry1Ac 的功能性受体提供强有力的反向遗传学证据, 也证明了 CRISPR/Cas9 技术可以作为一种强大而有效的基因组编辑工具研究全球农业害虫棉铃虫的基因功能^[39]。

有研究报道棉红铃虫钙粘蛋白一个新的与抗性相关等位基因 R16, 在 PgCAD1 外显子 20 插入带有终止密码子的转座子, 使得翻译提前终止。与表达野生型 PgCAD1 的昆虫细胞相比, 表达 R16 的细胞对 Cry1Ac 的敏感性较低, 并且 CAD 蛋白在细胞中的定位发生了改变, 介导昆虫细胞对 Cry1Ac 的较敏感的野生型 PgCAD1 主要定位在细胞膜上, 而 R16 蛋白定位在细胞质上, 表明 CAD 的突变影响昆虫对 Bt 毒素的敏感性^[40]。通过比较棉铃虫对 Cry1Ac 抗性品系和敏感品系钙粘蛋白序列, 发现有 35 个氨基酸突变。中肠组织切片免疫荧光定位显示, 敏感品系棉铃虫 CAD 基因定位在细胞膜上, 抗 Cry1Ac 品系棉铃虫中肠 CAD 基因定位在细胞内质网上。通过片段替换、点突变的方法鉴定出 172 位氨基酸的突变导致钙粘蛋白的定位发生了改变, 使得细胞对毒素产生抗性^[41]。实验室选择的 APHIS-R 棉红铃虫抗性品系较敏感品系对 Cry1Ac 抗性高达 530 倍, 抗性原因是 PgCAD1 基因表达量减少 79-190 倍而非氨基酸

突变导致。通过受体蛋白的定性和定量变化,证明棉红铃虫等主要害虫对 Bt 毒素的抗性进化能力,说明该种群对 Cry1Ac 毒素具有适应性,这给害虫监测和治理带来严峻考验^[12]。研究发现钙粘蛋白基因 3 370 bp 插入一个小型倒置重复转置元素,产生两个错误拼接的转录本,突变体 r15 A 和 r15 B。r15 纯合子介导的 Cry1Ac 毒素抗性较野生型增加了 290 倍,将突变体野生型 CAD 亚细胞定位,野生型或 r15 A 重组钙粘蛋白表达后定位于细胞膜,r15 B 重组钙粘蛋白表达后定位于细胞质,而定位在细胞质上的受体不参与毒素结合,导致种群 Bt 抗性^[42]。转染 HevABCC2 的 Sf9 细胞用 Cry1A 毒素处理,细胞致死率达 86%,用 Cry1A 毒素处理异源表达烟蚜夜蛾类钙黏蛋白的 Sf9 细胞,细胞毒性却没有变化,表明细胞与毒素接合具有特异性^[43]。类钙黏蛋白的胞外区域和寡聚毒素结合的过程机理已经非常清晰,但胞内区域作用尚不清楚。“信号通路”模型认为导致细胞死亡不是毒素穿孔所致,而是毒素与类钙黏蛋白受体结合激活 PKA 信号通路导致细胞裂解死亡^[44]。我们团队在前期研究中通过在活体水平敲除草地贪夜蛾 *SfCAD* 基因,同时在细胞水平表达该基因,经毒力测定和毒素结合等实验验证,证实草地贪夜蛾 *SfCAD* 蛋白并非 Bt 毒素 Cry1A 和 Cry1F 的受体^[45]。类钙黏蛋白的研究报道虽然较早也较多,诸多鳞翅目昆虫类钙黏蛋白可以作为 Cry1A 毒素受体,但我们仍然没有完全清楚昆虫类钙黏蛋白在与毒素结合中的具体作用机理。

2.3 氨肽酶 N

氨肽酶 N 是一类广泛存在于动植物组织细胞表面的水解蛋白酶,通过从 N 端催化切除多肽的中性氨基酸残基而发挥细胞代谢调节功能。氨肽酶 N 是一类消化食物蛋白的酶,在消化系统中具有重要作用,氨肽酶 N 在鳞翅目昆

虫中肠 BBMV 上分布最为丰富,约占中肠蛋白总量的 55%,但 APN 作为毒素受体时与其蛋白酶水解功能几乎无关^[46]。APN 被广泛研究以来发现它们有以下基本特征:其 cDNA 序列全长约为 3 kb,经过翻译后修饰的蛋白大小在 90–170 kDa。APN 属于锌结合的金属蛋白酶或肽酶家族^[47]。N 端依次有 N-糖基化位点 Asn-X-Ser/Thr、信号肽裂解位点、能够被 Cry 毒素识别的 N-乙酰半乳糖胺结构,中间部分是有高度保守的“GAMEN”结构域,而 C 端有跨膜特性和亲脂性的糖基化磷脂酰肌醇锚着位点,而 APN 就是通过 GPI 锚定蛋白连接在昆虫中肠 BBMV 上^[48]。

APN 是最早被发现在 Bt 毒素杀虫机制起重要作用的毒素受体蛋白。Gill 等运用显微注射的方法将烟草天蛾 *APN* 基因通过显微注射重组到黑尾果蝇卵中,通过筛选获得含该受体的转基因果蝇并发现该重组品系果蝇对 Cry1Ac 变得更加敏感,首次在虫体上验证 APN 可作为 Cry1Ac 毒素蛋白受体^[49]。通过敲降甜菜夜蛾 6 个不同的 *APN* 基因 (*SeAPN1–6*),抑制 *SeAPN1* 基因表达才会导致对 Cry1Ac 毒素的敏感性降低,幼虫数量减少,推测甜菜夜蛾中氨肽酶 APN1 是 Cry1Ac 功能受体^[50]。不同结构类别的 APN 受体与 Cry 毒素结合也有区别,Stephens 等发现 N-连接糖基化区域可能不参与 APN 与 Cry 毒素的结合,APN 与毒素作用的区域发生在含有大量 O-糖基化位点的富含苏氨酸的 C-端茎环结构区,而烟草天蛾 APN 与 Cry 毒素结合区是半乳糖胺,可见不同类别 APN 的结构区域特征决定了其与 Cry 毒素的结合能力^[51]。构建棉铃虫敏感和抗性品系的 cDNA-AFLP 体系,筛选出具有异性的 APN 片段,对差异片段进行基因克隆原核表达,并用 Cry1Ac 毒素与各片段结合试验,发现缺失 22 个氨基酸的抗性品系不能和 Cry1Ac 毒素结合,而敏感品系的 APN1 的 C

末端的 90 个氨基酸可以和 Cry1Ac 毒素结合, 结果表明 APN1 的 C 末端的 90 个氨基酸区域为毒素结合区^[52]。不仅 APN 上有毒素的特异性结合位点, Cry 毒素上也具有与 APN 的特异性结合位点, 目前发现 Cry1A 毒素结构中有 3 个可与 APN 特异性结合的位点, Cry1Ac 上的结合位点位于 Cry1Ac 毒素 domain III 的外部折叠片中, 通过一个含有半乳糖胺的多糖与 APN 结合, 毒素上的其他结合位点位于 Cry1Ac 和 Cry1Ab 毒素 domain II 的顶部, 该区域由表面裸露的环状结构组成^[53]。在美洲棉铃虫中肠细胞系、脂肪体细胞系、草地贪夜蛾卵巢细胞系中异源表达美洲棉铃虫 APN1, 显著增加了 3 种细胞系对 Cry1Ac 的敏感性。通过 RNA 干扰技术降低这 3 种细胞系 APN1 基因的表达, 对 Cry1Ac 产生抗性, 干扰的 3 种细胞系对 Cry2Ab 的敏感性没有变化。表明美洲棉铃虫氨基肽酶 APN1 是 Cry1Ac 的受体, 而不是 Cry2Ab 的受体^[54]。RNAi 技术沉默小菜蛾 *PxAPN5* 基因表达, 导致 Cry2Ab 与小菜蛾中肠蛋白结合力下降, 显著降低小菜蛾对 Cry2Ab 的敏感性^[55]。美国白蛾是我国主要的入侵害虫, APN3 被认为是 Cry1Ab 毒素的结合蛋白。注射双链 RNA 使得美国白蛾 *HcAPN3* 的转录水平下降 61%–66%, 并且 *HcAPN3* 表达下调会降低美国白蛾对 Cry1Ab 敏感性^[56]。APN 是 Bt 毒素重要受体之一, Bt 毒素与 APN 结合能力的改变是引起鳞翅目昆虫对 Bt 毒素抗性的重要原因。

2.4 碱性磷酸酶

苏云金芽孢杆菌产生的内毒素 Cry1Ac 作为一种生物农药, 主要用于害虫棉铃虫的控制。在杀死棉铃虫幼虫过程中, APN 和 ALP 起关键作用。早熟幼虫中 ALP 的表达高于氨基肽酶 N。毒素发挥作用是与特定受体结合而不是与 BBMV 蛋白的整体结合, ALP 可能在毒素发挥

毒力过程中比 APN 更重要^[57]。ALP 是一类广泛存在生物体内高度保守的磷酸水解酶, 能催化磷酸单酯的水解及磷酸基团的转移反应, 在生物体内对磷酸基团的转移和代谢有较为重要的作用。ALP 与 BBMV 相连, 通过 GPI 锚定在 BBMV 的表面, 在 Cry1Ac 发挥毒力过程中起到了重要作用。Bt 作物的长期种植使得棉铃虫对苏云金芽孢杆菌有了较强的抗性, 利用 RNA-seq 技术研究不同抗性水平的棉铃虫中肠基因的变化, 基因 *HaALP2* 在 6 个抗性品系中均显著下调, qRT-PCR 结果提示这些基因可作为监测抗性水平的标记物^[58]。

ALP 主要富集在昆虫中肠 BBMV 上, 通常作为双翅目和鳞翅目昆虫中肠微绒毛膜的标记。ALP 作为 Cry 毒素受体, 其 N 端的信号序列与蛋白分泌有关, C 端的 GPI 锚定信号序列使其锚定到细胞膜上^[59]。可溶性 mALP 通过 GPI 锚定在中肠 BBMV 上, mALP 活性降低导致昆虫对毒素的抗性增加, 但 mALP 的具体作用并不清楚。目前已有很多报道证明 ALP 作为毒素受体参与 Bt 毒素杀虫过程, 最初发现烟蚜夜蛾 ALP 可以与 Cry1Ac 结合^[60]。Bravo 等通过 Western blotting 和 Ligand blotting 试验发现, Cry1A 毒素结合大量特异性受体, 其中 APN 和 ALP 有很高的活性, 并且这两种蛋白作为受体参与 Cry1Ab 毒素形成细胞穿孔^[61]。研究发现在烟蚜夜蛾中发现 N 连接寡聚糖型 ALP 可以作为 Cry1Ac 毒素受体, 其分子量大小为 68 kDa 且末端包含 N-乙酰半乳糖胺残基^[62]。研究发现, 小菜蛾 *PxmALP* 作为 Cry1Ac 杀虫蛋白受体在种群产生 Bt 抗性中起重要作用, 小菜蛾 *PxmALP* 基因表达量下调会导致其对 Cry1Ac 毒素产生抗性^[63]。转录因子 GATAd 通过与 Cry1Ac 杀虫蛋白受体基因 *PxmALP* 的启动子不同靶位点结合, 调控抗性小菜蛾 *PxmALP* 基因表达,

从而参与小菜蛾 Cry1Ac 杀虫蛋白抗性的形成^[64]。ALP 的转录水平与害虫对 Cry1Ac 的抗性相关, ALP 与 Cry1Ac 结合的片段本身对棉铃虫没有毒性, 但增加了死亡率, 研究结果首次证明 Bt 毒素与 ALP 的毒素结合片段具有协同作用^[65]。碱性磷酸酶在部分鳞翅目低龄幼虫 Cry1A 介导的毒力中起重要作用。ALP 蛋白在所有幼虫阶段都有表达, 并且在 1 龄和 2 龄幼虫中高度表达。异源表达的 SeALP2 多肽与 Cry2Aa 结合, 并且亲和力高, 表明 ALP2 是 Cry2Aa 的功能性受体^[66]。

3 Bt 毒素受体的协同作用

Tanaka 等^[67]研究发现, ABCC2 和类钙黏蛋白在诱发细胞穿孔形成的过程中有协同作用, 将家蚕 ABCC2 和类钙黏蛋白 BtR175 在 Sf9 细胞异源表达, 发现两者均可以作为 Bt 毒素功能性受体, 但表达 ABCC2 的细胞较单独表达 BtR175 的细胞对 Bt 毒素敏感。同样的方法将 BtR17 和 ABCC2 在 Sf9 细胞共同表达, 发现该细胞系对 Cry1A 和 Cry1Fa 均更加敏感, 甚至对同源性很低的 Cry8Ca 毒素也更敏感^[17]。ABCC2 和 BtR175 的协同作用能增加毒素成孔数量从而渗透大量阳离子, 然而共同表达导致孔洞数量增加不足以解释两个受体是否产生协同效应, 研究发现共同表达 BtR175 和 ABCC2 介导的 Sf9 细胞对 Bt 毒素敏感性较在非洲爪蟾卵母细胞中共表达更强, 即在 Sf9 细胞中共表达协同效应更加明显, 这可能是类钙黏蛋白诱导胞内信号通路引起的^[67]。棉铃虫 CAD 的毒素结合区结构域招募毒素单体并使毒素寡聚化, 并定位于与 ABCC2 相互作用的良好位置, 从而使寡聚体毒素能更有效地传递给 ABCC2 并插入细胞膜, 增强 Cry1Ac 的毒力, 确证了棉铃虫 CAD 与 ABCC2 对 Bt 毒素的协同增效作用^[68]。

基于“穿孔形成”假说, 毒素单体结合类钙黏蛋白使得毒素 α -1 螺旋结构被切除, 这些被切割的毒素单体在细胞上形成预孔结构, 暴露出来的疏水区域让活化的毒素单体加速形成寡聚体, 当整个寡聚体毒素插入细胞膜上便形成细胞穿孔^[8]。红铃虫类钙黏蛋白突变的抗性品系生测实验表明钙黏蛋白在预孔结构形成中起重要作用^[69]。研究发现, 烟蚜夜蛾 ABCC2 和类钙黏蛋白也存在协同作用, 并推测类钙黏蛋白可以转移插入预孔结构区域的寡聚毒素, 而这些寡聚毒素正好与靶标蛋白 HevABCC2 结合形成穿孔, 因此 ABCC2 受体蛋白上寡聚毒素进入细胞后, 寡聚毒素又可以继续结合其他预孔结构, 使得更多的寡聚毒素进入细胞 (图 3)^[43], 从而引起昆虫对毒素敏感性增强。甜菜夜蛾 SeABCC2b 与 SeCAD1b 在 Sf9 细胞中共同表达, 可以增强 Cry1Ca 对细胞的毒力^[70]。在昆虫细胞系中表达不同的中肠蛋白, GPI 锚定蛋白 (如 ALP 或 APN), 跨膜蛋白 (如 CAD 或 ABCC2), 通过生物测定结果发现, GPI 锚定蛋白与毒素敏感性增强无关, 而表达 CAD 或 ABCC2 蛋白介导细胞对 Cry 毒素的敏感性。研究发现 CAD 与 ABCC2 转运体共同表达后具有协同效应^[71]。钙粘蛋白与毒素结合、促进寡聚体形成对于毒素发挥毒力很重要, 毒素结合是通过胞外区的作用来实现的。但是细胞内区域的功能尚不清楚。通过删除家蚕钙粘蛋白 (BtR175) 胞内区, 研究胞内区是否在 Cry1A 毒力中发挥作用。与野生型 BtR175 一样, 突变蛋白对 Cry1Aa 和 Cry1Ab 毒素也具有敏感性。细胞内区域在介导毒素毒力过程中并不重要, 并且协同作用也与胞内区域无关, CAD 缺失突变体同样具有与 ABCC2 的协同作用^[44], CAD 和 ABCC2 是分布于细胞膜上的蛋白受体, 可以与周围环境中的活化毒素结合, 进而促进毒素寡

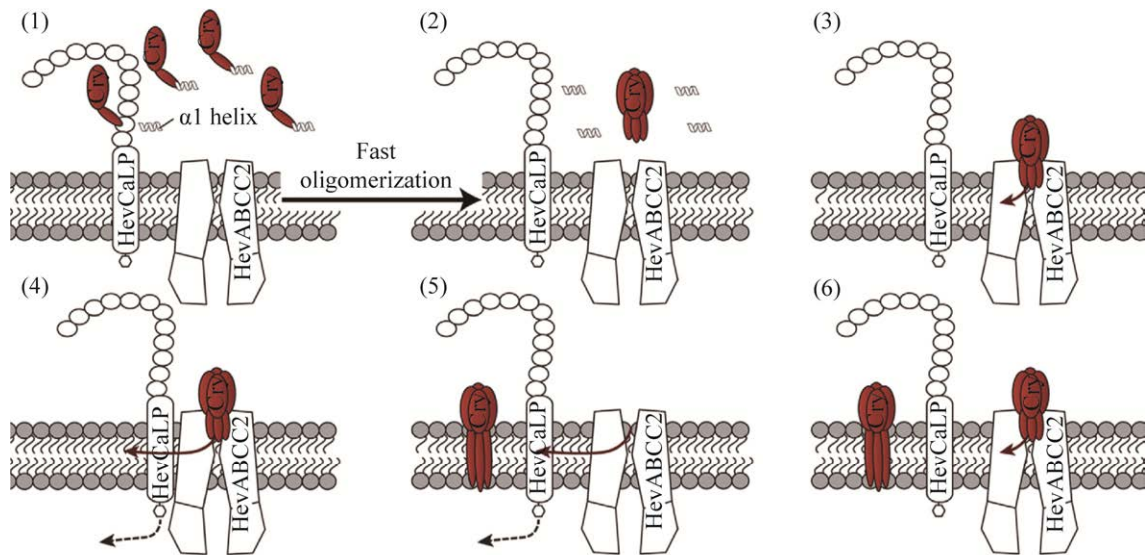


图3 HevABCC2 和 HevCaLP 协同作用模式图^[43]

Figure 3 Mode of synergistic effect of HevABCC2 and HevCaLP^[43].

聚化，寡聚体插入细胞膜形成孔洞，最终导致细胞死亡，CAD 与 ABCC2 存在协同增效作用，深入探索 CAD 参与 ABCC2 协同作用过程中的关键区域，揭示其中的调控机制，对于毒素的长期有效使用有着重要的意义。

4 Bt 毒素敏感性差异

苏云金芽孢杆菌能产生很强杀虫作用且有较广杀虫谱的晶体蛋白，不同的毒素能特异性地作用于靶标害虫，主要用于鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目害虫甚至线虫等防控，因此在农业领域具有重要应用。Bt 毒素对靶标害虫长期高压选择导致害虫的抗性进化，限制了 Bt 毒素的长期使用，目前这种现象在实验室和田间都有报道^[72-73]，因此研究昆虫的抗性机制对于 Bt 毒素的合理应用具有重要的意义。目前发现靶标害虫对 Bt 毒素的抗性作用主要有以下两种情况。

4.1 Bt 毒素的活化过程介导的敏感性差异

Bt 毒素被昆虫摄入到体内需要先溶解才能

够发挥作用，溶解的毒素需要在中肠蛋白酶的作用下水解成活化的毒素，活化的毒素与毒素受体相互作用导致中肠上皮细胞的裂解。如果毒素水解不充分或者水解过度都将会影响毒素的生物活性，进而导致昆虫对 Bt 毒素抗性。例如胰酶对原毒素的水解作用是毒素发挥活力极为关键的一步，在一些鳞翅目昆虫中已经报道 Bt 抗性品系和敏感品系中肠胰蛋白酶的比较研究。印度谷螟抗性品系活化 Bt 原毒素的能力慢于敏感品系，研究发现印度谷螟抗性品系缺少一个主要用于活化原毒素的蛋白酶^[74]。Liu 等报道由于棉铃虫胰酶基因的启动子区的突变，导致胰蛋白酶表达量的降低，影响了 Cry1Ac 原毒素的活化，导致棉铃虫对 Cry1Ac 毒素的抗性提高了 39 倍^[75]。Bt 原毒素可能会涉及到细胞凋亡过程^[20-21]，Bt 毒素在活化过程如果受到阻碍会导致毒素的生物活性大大降低，从而引起昆虫对 Bt 敏感性下降。

4.2 Bt 毒素与受体蛋白的结合能力介导的敏感性差异

Bt 毒素杀虫的过程中涉及多种受体蛋白的

参与,而这些蛋白的改变将影响毒素与受体蛋白的结合,如两者间结合能力的变化、特异性位点数目的变化等,这是鳞翅目昆虫对 Bt 毒素产生抗性主要原因。目前已有很多文献报道,由于 Bt 毒素受体蛋白的突变使得毒素与受体蛋白的结合量减少,从而昆虫产生抗性。毒素与昆虫中肠细胞膜上受体结合情况的变化是目前普遍认可的抗性机制,如 Fabrick 等报道钙黏蛋白受体蛋白基因的突变引起田间红铃虫对 Cry1Ac 毒素产生抗性^[76]。Tanaka 等报道由于家蚕 BmABCC2 受体蛋白中插入 1 个氨基酸,会导致家蚕对 Cry1Ab、Cry1Ac 毒素敏感性降低,这也是首次证明 ABCC2 蛋白可以作为 Cry 毒素功能受体^[16]。有报道发现小菜蛾对 Cry1Ac 毒素的抗性与 *ABCC2*、*ABCC3*、*ALP* 等基因的表达下调相关,首次提出这是由有丝分裂原活化蛋白 MAPK 信号通路介导的敏感性改变^[73]。棉红铃虫类钙黏蛋白与 Cry1Ac 结合位点 8 个氨基酸的缺失会导致毒素受体结合力下降,从而使种群对 Cry1Ac 毒素产生了抗性^[77]。活化的 Vip3 毒素能结合在亚热带黏虫中肠 BBMVs 上,这些结合位点在 Vip3 家族毒素中具有共性,但与 Cry 毒素不同,Vip3A 和 Vip3C 具有共同的结合位点,结合位点的突变会使靶标害虫对这两类毒素产生抗性^[78]。斜纹夜蛾核糖体蛋白 S2 能与 Vip3A 毒素互作,干扰核糖体蛋白 S2 能使幼虫产生抗性^[79]。与受体结合能力差异导致的毒素抗性相比,昆虫抗性与蛋白酶水解与活化的相关性一般很低,受体与毒素的结合能力的改变一般能在环境中保持下去,这种抗性也能导致昆虫对多种毒素产生交互抗性。

5 总结与展望

ABC 超家族转运蛋白和钙黏蛋白两类毒素受体是目前 Bt 抗性研究的主流受体蛋白,钙黏

蛋白作为 Cry 毒素受体已被广泛接受,Wang 等首次证明棉铃虫钙黏蛋白 BtR-harm 可以作为 Cry1Ac 毒素受体,BtR-harm 表达量下调是棉铃虫对 Cry 毒素产生抗性的主要原因^[80]。ABC 超家族转运蛋白基因的突变或表达下调对昆虫 Bt 抗性也起重要作用。Bt 毒素被昆虫摄入到体内水解不充分或者水解过度都将会影响毒素的生物活性,进而导致昆虫对 Bt 毒素抗性,昆虫对 Bt 毒素的抗性机制主要有两方面,一方面是杀虫晶体蛋白活化过程受阻或者蛋白酶对杀虫晶体蛋白的水解不足引起抗性。如棉铃虫胰酶基因的启动子区的突变引起蛋白酶表达量降低,影响 Bt 原毒素活化作用,导致棉铃虫对 Cry1Ac 毒素的抗性增加^[75];另一方面,Bt 毒素杀虫的过程中涉及到多种受体蛋白的参与,Bt 毒素与昆虫中肠 BBMVs 上的 Bt 毒素特异性受体结合能力、特异结合位点的数目改变等是引起抗性的重要因素,在毒素作用的“穿孔形成”假说中^[81-83],这种由受体基因发生突变而引起的昆虫对 Bt 抗性被普遍接受,而鳞翅目昆虫中特异性毒素受体的转录水平调控与昆虫 Bt 抗性关系知之较少^[84],这让我们今后对 Bt 毒素受体基因的转录调控规律研究有了新方向。当前研究昆虫 Bt 抗性主要集中在 Bt 毒素受体基因的碱基插入、缺失突变、错误拼接等方面,而毒素受体表达量减少也能引起鳞翅目昆虫的 Bt 抗性^[85-88]。启动子在基因的转录过程中发挥重要的作用,真核生物 RNA 聚合酶与诸多转录因子相互结合,生成具有活性、专一性的复合物,启动基因的转录和调控目的基因的转录频率。昆虫抗药性相关蛋白受转录因子的调控,构建烟粉虱细胞色素 P450 基因 *CYP6CM1* 启动子不同长度缺失片段重组质粒,利用双荧光素酶报告基因系统比较 11 个不同缺失片段活性强弱差异,以确定该基因启动子活性区域,该研究发现 MAPK 信号

通路通过转录因子 CREB 调控细胞色素 P450 介导烟粉虱对杀虫剂的抗药性^[84]。鳞翅目 Bt 毒素受体的转录与转录调控,可能是鳞翅目昆虫对 Bt 毒素抗性的潜在机制,筛选调控毒素受体基因转录因子,探究转录因子的作用规律,可以为深入研究草地贪夜蛾 Bt 抗性打开新的切入点。

REFERENCES

- [1] Palma L, Muñoz D, Berry C, et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 2014, 6(12): 3296-3325.
- [2] Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 2021, 66: 121-140.
- [3] Chakrabarty S, Jin MH, Wu C, et al. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(5): 1612-1617.
- [4] Ben Hamadou-Charfi D, Boukedi H, Abdelkefi-Mesrati L, et al. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. *J Invertebr Pathol*, 2013, 114(2): 139-143.
- [5] Bravo A, Soberón M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol*, 2008, 26(10): 573-579.
- [6] Xiao YT, Wu KM. Recent progress on the interaction between insects and *Bacillus thuringiensis* crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1767): 20180316.
- [7] Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 2007, 49(4): 423-435.
- [8] Gómez I, Sánchez J, Miranda R, et al. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett*, 2002, 513(2/3): 242-246.
- [9] Bravo A, Gómez I, Conde J, et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1667(1): 38-46.
- [10] Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr Pathol*, 2006, 92(3): 166-171.
- [11] Arenas I, Bravo A, Soberón M, et al. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 12497-12503.
- [12] Fabrick JA, Mathew LG, LeRoy DM, et al. Reduced cadherin expression associated with resistance to Bt toxin Cry1Ac in pink bollworm. *Pest Manag Sci*, 2020, 76(1): 67-74.
- [13] Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*, 2013, 37(1): 3-22.
- [14] Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011, 41(7): 423-431.
- [15] Zhang X, Candas M, Griko NB, et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS*, 2006, 103(26): 9897-9902.
- [16] Tanaka S, Miyamoto K, Noda H, et al. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *FEBS J*, 2013, 280(8): 1782-1794.
- [17] Zhang DD, Jin MH, Yang YC, et al. Synergistic resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt toxins linked to cadherin and ABC transporters mutations. *Insect Biochem Mol Biol*, 2021, 137: 103635.
- [18] Gómez I, Rodríguez-Chamorro DE, Flores-Ramírez G, et al. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) aminopeptidase N1 is a functional receptor of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(17): e01089-e01018.
- [19] Griffiths JS, Haslam SM, Yang TL, et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 2005, 307(5711): 922-925.
- [20] Jiang K, Hou XY, Han L, et al. Fibroblast growth factor receptor, a novel receptor for vegetative insecticidal protein Vip3Aa. *Toxins*, 2018, 10(12): 546.
- [21] Jiang K, Hou XY, Tan TT, et al. Scavenger receptor-C acts as a receptor for *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa and mediates the internalization of Vip3Aa via endocytosis. *PLoS Pathog*, 2018, 14(10): e1007347.
- [22] Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, 2007, 22: 122-130.
- [23] Linton KJ, Higgins CF. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 1998, 28(1): 5-13.

- [24] Orelle C, Ayvaz T, Everly RM, et al. Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. *PNAS*, 2008, 105(35): 12837-12842.
- [25] Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol*, 2007, 52: 231-253.
- [26] Buss DS, Callaghan A. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pestic Biochem Physiol*, 2008, 90(3): 141-153.
- [27] Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, et al. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001248.
- [28] Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *PNAS*, 2012, 109(25): E1591-E1598.
- [29] Park Y, González-Martínez RM, Navarro-Cerrillo G, et al. ABC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biol*, 2014, 12: 46.
- [30] Chen ZW, He F, Xiao YT, et al. Endogenous expression of a Bt toxin receptor in the Cry1Ac-susceptible insect cell line and its synergistic effect with cadherin on cytotoxicity of activated Cry1Ac. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015, 59: 1-17.
- [31] Stevens T, Song SS, Bruning JB, et al. Expressing a moth *abcc2* gene in transgenic *Drosophila* causes susceptibility to Bt Cry1Ac without requiring a cadherin-like protein receptor. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 80: 61-70.
- [32] Tanaka S, Endo H, Adegawa S, et al. *Bombyx mori* ABC transporter C2 structures responsible for the receptor function of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 91: 44-54.
- [33] Wang J, Ma HH, Zhao S, et al. Functional redundancy of two ABC transporter proteins in mediating toxicity of *Bacillus thuringiensis* to cotton bollworm. *PLoS Pathog*, 2020, 16(3): e1008427.
- [34] Liu LL, Chen ZW, Yang YC, et al. 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 Biochem Mol Biol*, 2018, 100: 59-65.
- [35] Zhu B, Sun X, Nie XM, et al. microRNA-998-3p contributes to Cry1Ac-resistance by targeting ABCC₂ in lepidopteran insects. *Insect Biochem Mol Biol*, 2020, 117: 103283.
- [36] Heckel DG. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2020, 104(2): e21673.
- [37] Hao J, Gao MJ, Hu XD, et al. Synergistic selection of a *Helicoverpa armigera* cadherin fragment with Cry1Ac in different cells and insects. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 3667-3675.
- [38] Xie RY, Zhuang MB, Ross LS, et al. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 8416-8425.
- [39] Wang J, Zhang HN, Wang HD, et al. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 76: 11-17.
- [40] Wang L, Ma YM, Guo XQ, et al. Pink bollworm resistance to Bt toxin Cry1Ac associated with an insertion in cadherin exon 20. *Toxins*, 2019, 11(4): 186.
- [41] Xiao YT, Dai Q, Hu RQ, et al. A single point mutation resulting in cadherin mislocalization underpins resistance against *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm. *J Biol Chem*, 2017, 292(7): 2933-2943.
- [42] Wang L, Wang JT, Ma YM, et al. Transposon insertion causes cadherin mis-splicing and confers resistance to Bt cotton in pink bollworm from China. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7479.
- [43] Bretschneider A, Heckel DG, Pauchet Y. Three toxins, two receptors, one mechanism: mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 76: 109-117.
- [44] Endo H, Adegawa S, Kikuta S, et al. The intracellular region of silkworm cadherin-like protein is not necessary to mediate the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab toxins. *Insect Biochem Mol Biol*, 2018, 94: 36-41.
- [45] Zhang JF, Jin MH, Yang YC, et al. The cadherin protein is not involved in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab or Cry1Fa toxins in *Spodoptera frugiperda*. *Toxins*, 2020, 12(6): 375.
- [46] Lorence A, Darszon A, Bravo A. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett*, 1997, 414(2): 303-307.
- [47] Laustsen PG, Vang S, Kristensen T. Mutational analysis of the active site of human insulin-regulated aminopeptidase.

- Eur J Biochem, 2001, 268(1): 98-104.
- [48] Pigott CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 255-281.
- [49] Gill M, Ellar D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac₁. *Insect Mol Biol*, 2002, 11(6): 619-625.
- [50] Qiu L, Cui SH, Liu L, et al. Aminopeptidase N1 is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Sci Rep*, 2017, 7: 45007.
- [51] Stephens E, Sugars J, Maslen SL, et al. The N-linked oligosaccharides of aminopeptidase N from *Manduca sexta*: site localization and identification of novel N-glycan structures. *Eur J Biochem*, 2004, 271(21): 4241-4258.
- [52] Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, et al. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, 39(7): 421-429.
- [53] Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr D Biol Cryst*, 2001, 57(12): 1938-1944.
- [54] Wei JZ, Zhang M, Liang GM, et al. APN₁ is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Sci Rep*, 2016, 6: 19179.
- [55] Pan ZZ, Xu L, Liu B, et al. PxAPN₅ serves as a functional receptor of Cry2Ab in *Plutella xylostella* (L.) and its binding domain analysis. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(Pt 1): 516-521.
- [56] Zhang YK, Zhao D, Yan XP, et al. Identification and characterization of *Hyphantria cunea* aminopeptidase N as a binding protein of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab35 toxin. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2575.
- [57] Upadhyay SK, Singh PK. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(10): 2027-2036.
- [58] Wei JZ, Yang S, Chen L, et al. Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera*. *Front Physiol*, 2018, 9: 1653.
- [59] Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 2020, 754: 144855.
- [60] English LH, Readdy TL. Delta endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. *Insect Biochem*, 1989, 19(2): 145-152.
- [61] Bravo A, Miranda R, Gómez I, et al. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1562(1/2): 63-69.
- [62] Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*, 2004, 271(15): 3127-3135.
- [63] Guo ZJ, Kang S, Chen DF, et al. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS Genet*, 2015, 11(4): e1005124.
- [64] GUO L, Cheng ZQ, Qin JY, et al. MAPK-mediated transcription factor GATAd contributes to Cry1Ac resistance in diamondback moth by reducing PxmALP expression. *PLoS Genet*, 2022, 18(2): e1010037.
- [65] Chen WB, Liu CX, Xiao YT, et al. A toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes Bt toxin Cry1Ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0126288.
- [66] Yuan XD, Zhao M, Wei JZ, et al. New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of Bt toxin Cry2Aa. *J Insect Physiol*, 2017, 98: 101-107.
- [67] Tanaka S, Endo H, Adegawa S, et al. Functional characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry toxin receptors explains resistance in insects. *FEBS J*, 2016, 283(24): 4474-4490.
- [68] Ma YM, Zhang JF, Xiao YT, et al. The cadherin Cry1Ac binding-region is necessary for the cooperative effect with ABCC₂ transporter enhancing insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Toxins*, 2019, 11(9): 538.
- [69] Ocelotl J, Sánchez J, Arroyo R, et al. Binding and oligomerization of modified and native Bt toxins in resistant and susceptible pink bollworm. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144086.
- [70] Ren XL, Jiang WL, Ma YJ, et al. The *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) ABCC₂ mediates Cry1Ac cytotoxicity and, in conjunction with cadherin, contributes to enhance Cry1Ca toxicity in Sf9 cells. *J Econ Entomol*, 2016, 109(6): 2281-2289.
- [71] Soberón M, Portugal L, Garcia-Gómez BI, et al. Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2018, 93: 66-78.
- [72] Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. Insect resistance to

- Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 510-521.
- [73] Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Prot*, 2014, 64: 150-158.
- [74] Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, et al. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*, 1997, 272(38): 23473-23476.
- [75] Liu CX, Xiao YT, Li XC, et al. Cis-mediated down-regulation of a trypsin gene associated with Bt resistance in cotton bollworm. *Sci Rep*, 2014, 4: 7219.
- [76] Fabrick JA, Ponnuraj J, Singh A, et al. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97900.
- [77] Melo AL, Soccol VT, Soccol CR. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(2): 317-326.
- [78] Li HR, Oppert B, Higgins RA, et al. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and-susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(8): 753-762.
- [79] Singh G, Sachdev B, Sharma N, et al. Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7202-7209.
- [80] Wang G, Wu K, Liang G, et al. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Sci China C Life Sci*, 2005, 48(4): 346-356.
- [81] Flores-Escobar B, Rodríguez-Magadan H, Bravo A, et al. Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(15): 4543-4550.
- [82] Portugal L, Gringorten JL, Caputo GF, et al. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides*, 2014, 53: 292-299.
- [83] Portugal L, Muñoz-Garay C, Martínez de Castro DL, et al. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF₁ cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 80: 21-31.
- [84] Yang X, Deng S, Wei XG, et al. MAPK-directed activation of the whitefly transcription factor CREB leads to P450-mediated imidacloprid resistance. *PNAS*, 2020, 117(19): 10246-10253.
- [85] Tiewsiiri K, Wang P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *PNAS*, 2011, 108(34): 14037-14042.
- [86] Jakka SRK, Gong L, Hasler J, et al. 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. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 82(4): 1023-1034.
- [87] Li JH, Ma YM, Yuan WL, et al. FOXA transcriptional factor modulates insect susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin by regulating the expression of toxin-receptor *ABCC₂* and *ABCC₃* genes. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 88: 1-11.
- [88] Wei W, Pan S, Ma YM, et al. GATAe transcription factor is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin receptor gene expression inducing toxin susceptibility. *Insect Biochem Mol Biol*, 2020, 118: 103306.

(本文责编 郝丽芳)