

# Bt 杀虫晶体蛋白的研究概述<sup>\*</sup>

李海涛<sup>1, 2</sup>, 王洪成<sup>3</sup>, 刘志洋<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100080; 3. 黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069)

**摘要:** 苏云金芽孢杆菌(Bt)杀虫晶体蛋白对许多农业害虫有很高的活性。许多试验表明 Bt 晶体蛋白之间具有协同增效作用, 蛋白的混配比单一的蛋白具有更高的活性。本文对 Bt 杀虫晶体蛋白分类方法、蛋白活性以及蛋白之间的协同作用进行综述。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; 杀虫晶体蛋白; 协同作用

中图分类号: S 433. 1 文献标识码: A 文章编号: 1002—2767(2004)05—0037—03

## Study on Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus Thuringiensis*

LI Hai-tao, WANG Hong-cheng, LIU Zhi-yang

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Plant Protection Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100080; 3. Horticulture Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* are extremely toxic to many pests. Many experiments prove that the interaction between these toxins is synergistic effect, in which the toxicity of mixed proteins is greater than independent proteins. Classification, toxicity and synergistic effect of Bt crystal proteins are reviewed.

**Key words:** bacillus thuringiensis; insecticidal crystal proteins; synergistic effect

害虫防治是农业生产中的一项重要任务。随着环保意识的日益增强, 人们对使用微生物杀虫剂的呼声越来越高。苏云金芽孢杆菌杀虫剂是目前世界上用途最广、产量最大的微生物杀虫剂。不同的苏云金芽孢杆菌制剂对不同的昆虫有不同的毒力, 其原因是菌株所含的杀虫晶体蛋白基因不同。如果我们知道了各种杀虫晶体蛋白对不同昆虫的毒力, 就可以有的放矢地从自然界中筛选菌株, 有根据地选择应用不同制剂防治目标害虫。

### 1 苏云金芽孢杆菌的研究历史

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)属革兰氏阳性细菌, 是目前世界上应用最广泛的微生物杀虫剂。苏云金杆菌的发现上百年的历史, 最初日本人石渡(Ishiwata)在 1901 年从病蚕尸体中分离出一株所谓猝倒细菌(sotto. bacteria)。1911 年

Ernst Berliner 在德国苏云金(Thuringia)的一个面粉厂的地中海粉斑螟(*Anagasta Ruchniela*)患病幼虫中又分离到这种产伴孢晶体的芽孢杆菌, 1915 年定名为苏云金芽孢杆菌, 一般称苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner)。他指明苏云金杆菌含有伴孢晶体(parasporal Crystal), 但未曾说明苏云金杆菌的伴孢晶体有杀虫作用。从 1920 年到 1950 年这一段时间内, 有许多人曾用苏云金杆菌进行防治害虫的田间试验。到了 50 年代才发现苏云金杆菌杀虫的活性。1956 年 Angus 证实杀虫活性物质位于伴孢晶体之中。他将伴孢晶体与孢子分开之后, 单独伴孢晶体仍然存在杀虫活性, 证明了苏云金芽孢杆菌中的伴孢晶体蛋白是杀虫活性的主要来源。苏云金芽孢杆菌大多数菌株都能产生多种类型的伴孢晶体蛋白(parasporal crystal protein), 即  $\delta$ -内毒素或杀

\* 收稿日期: 2004—04—03

第一作者简介: 李海涛(1978—), 男, 山东省人, 硕士, 现在中国农业科学院植物保护研究所从事 Bt 晶体蛋白的相关研究。  
1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Protein, ICP)对鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、膜翅目(Hymenoptera)、同翅目(Homoptera)、直翅目(Orthoptera)、食毛目(Mallophaga)等多种昆虫,以及线虫、螨类和原生动物等具有特异性的杀虫活性。

## 2 Bt 杀虫晶体蛋白的分类方法

1989 年 Hofte 和 Whiteley 根据晶体蛋白的氨基酸序列和杀虫谱的不同,将已经发表的 42 种晶体蛋白分为 5 群 14 亚类。其中具有溶血溶细胞作用的 27kDa 晶体蛋白基因被命名为 *cyt* 基因,其他只有杀虫活性的 13 亚类命名为狭义的晶体蛋白基因,即 *cry* 基因。*cry* 基因可划分四群,即 *cry* I 为鳞翅目特异性,*cry* II 为鳞翅目和双翅目特异性,*cry* III 为鞘翅目特异性,*cry* IV 双翅目特异性。由于当时发现的基因数目少,彼此之间有明显的差异,因此各个基因的分类地位比较明确,从而使得 Hofte 和 Whiteley 的分类系统被广泛的接受和采用,但随着新基因的发现,这种分类方法越来越不能满足这两个条件,使得分类难以确定。Crickmore 等在 1995 年国际无脊椎动物病理学会年会(SIP)上提出了以杀虫晶体蛋白氨基酸序列的同源性为唯一依据区别 Bt 基因的新分类系统,现已被各国广泛采纳。同源性在 45% 以下,为第一等级,用阿拉伯数字表示;同源性在 45%~78% 之间,为第二等级,用大写英文字母表示;同源性在 78%~95% 之间,为第三等级,用小写英文字母表示;同源性在 95% 以上,为第四等级,用阿拉伯数字表示。只要满足来自 Bt 的伴孢包涵体(晶体),与已知的 *cry* 或 *cyt* 具有高的同源性,就可以纳入这个系统<sup>[1]</sup>。截止到 2004 年 1 月已经发现 299 种杀虫晶体蛋白基因,分属于 44 群(其中 *cry* 基因 42 群,*cyt* 基因 2 群),136 模式基因<sup>[2]</sup>。

## 3 Bt 杀虫晶体蛋白对昆虫的杀虫活性

对鳞翅目幼虫有杀虫活性的晶体包括 *cry*1A 到 *cry*1K 的大部分蛋白以及 *cry*2A、*cry*3A、*cry*3B、*cry*4A、*cry*4B、*cry*9A、*cry*9C、*cry*15A,但其中个别蛋白不具有对鳞翅目一些昆虫的活性或者活性较低。如 *cry*1Aa 对海灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)、草地贪夜蛾(*Spodoptera fugiperda*)、黑迁移地老虎(*Actebia fennica*)没有活性,对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)毒性较低;*cry*1Ab 对黑迁移地老虎、海灰翅夜蛾没有活性,对甜菜夜

蛾、美国棉铃虫(*Helicoverpa zea*)、棉铃虫、家蚕(*Bombyx mori*)低毒;*cry*1Ac 对海灰翅夜蛾、草地贪夜蛾、家蚕、黑迁移地老虎无毒,对美国棉铃虫、白斑毒蛾(*Orgyia leucostigma*)低毒;*cry*1Ba 对甜菜夜蛾、海灰翅夜蛾、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、烟草天蛾、粉蚊夜蛾、甘蓝夜蛾、舞毒蛾、家蚕、黑迁移地老虎、白斑毒蛾无毒,对玉米螟低毒;*cry*1C 对草地贪夜蛾、棉铃虫没有活性,对烟芽夜蛾、舞毒蛾低毒。*cry*2Aa 对小菜蛾、烟芽夜蛾无活性,对甜菜夜蛾低毒;*cry*3A1 对甜菜夜蛾、粉蚊夜蛾无毒;*cry*9A 对棉铃虫无毒,*Vip*3A 对玉米螟没有活性。

对鞘翅目昆虫有活性的杀虫晶体蛋白包括 *cry*1Ba、*cry*11a、*cry*11b、*cry*3A、*cry*3B、*cry*3C、*cry*3D、*cry*7A、*cry*8A、*cry*8B、*cry*14Aa、*cry*18Aa。其中 *cry*3A、*cry*3B、*cry*3C 和 *cry*7Aa 对马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)有毒,*cry*7Aa 对黄守十一星叶甲(*Diabrotica undecimpunctata*)有杀虫活性。*cry*3C 对马铃薯甲虫的毒力分别是 *cry*3B 和 *cry*7Aa 的 5 倍和 18 倍。

对双翅目昆虫有活性的杀虫晶体蛋白包括 *cry*1Ba、*cry*2Aa、*cry*4A、*cry*4B、*cry*10Aa、*cry*11Aa、*cry*11Ba、*cry*16Aa、*cry*17Aa、*cry*19Aa、*cry*20Aa、*cyt*1Aa、*cyt*1Ab、*cyt*1Ba、*cyt*2Aa、*cyt*2Ba、*cyt*2Bb。其中 *cry*2Aa、*cry*4A 对伊蚊(*Aedes aegypti*)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)有毒性;*cry*4B 对伊蚊、斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)、尖音库蚊(*Culex pipiens*)有毒性;*cry*10A 对伊蚊有毒性;*cry*11A 对伊蚊和五带淡色库蚊(*Culex quinquefasciatus*)有毒性。*cry*11B 对五带淡色库蚊有毒性。

## 4 Bt 不同杀虫蛋白之间的协同作用

### 4.1 Bt 不同杀虫蛋白对鳞翅目昆虫的协同作用

1996 年 Lee M.K. 和 Curtiss A. 在以舞毒蛾为供试昆虫时发现 *cry*1Aa 与 *cry*1Ac(1:1)混合增效 3.8 倍,1:2 混合后增效达到最高,为 7.3 倍。*cry*1Aa 和 *cry*1Ab 表现拮抗作用,*cry*1Ab 与 *cry*1Ac 增效不明显<sup>[3]</sup>。1999 年 Cristina del Rincon—Castro 利用 *cry*1Acl 与 *cyt*1A1 对粉纹夜蛾的细胞系 BTI—Tn5B1—4 试验表现出明显的拮抗作用,当 *cry*1Acl 与 *cyt*1A 以 99:1 时,期望值与实际值之比为 0.549<sup>[4]</sup>。本实验室在 2000 年利用 *cry*1Ac 与 *cry*2Ab4 对棉铃虫进行试验表现了明显的增效作用。

### 4.2 苏云金芽孢杆菌不同杀虫蛋白对双翅目昆虫的协同作用

Wu 和 Chang (1985)最早报道了苏云金芽孢杆菌以色列亚种对蚊幼虫的高毒力是由于杀虫晶体蛋白之间的作用。他们发现, 提纯后的杀虫晶体蛋白以不同的比例混合进行生测, 以含 *cyt1A* 的组合毒力最高<sup>[5]</sup>。以后, Ibarra 和 Federici (1986)又报道了 *cry11Aa1* (*cry1VD*)和 *cyt1A* 蛋白之间的类似增效作用<sup>[6]</sup>。Margaret C. Wirth (2001)研究发现 *cry11B* 与 *cyt1A* 对 5 带淡色库蚊具有拮抗作用, 期望值是实际剂量 0.78 倍, 但是在对有抗性的 5 带淡色库蚊具有明显的抗性期望值是实际剂量的 4.8 倍, *cyt1Ab* 与 *B. sphaericus* 对 5 带淡色库蚊、伊蚊有明显的增效作用。 *cyt2Ba* 与 *B. sphaericus* 对五带淡色库蚊、伊蚊也有明显的增效作用<sup>[7]</sup>。

5 结语

有关昆虫对于苏云金芽孢杆菌的杀虫晶体蛋白产生抗性的研究已经有很多的报道, 如 Mc Gaughey (1985)首次发现了害虫印度谷螟仓虫可以在几代内对苏云金芽孢杆菌制剂产生抗性, 其中一个品系在饲养两代, 抗性几乎增加 30 倍, 在饲养 5 代抗性增加到 100 倍, 并且在选择中断以后其抗性可以稳定的遗传<sup>[8]</sup>。Tabashnik (1992)报道了在夏威夷田间小菜蛾对苏云金芽孢杆菌制剂产生了抗性, 小菜蛾在实验室筛选环境下, 迅速做出了响应, 说明小菜蛾对杀虫晶体蛋白制剂敏感性存在遗传差异, 加强选择作用可以得到更高的水平抗性的小菜蛾。许多学者认为, 大面积使用杀虫晶体蛋白制剂和种植转 Bt 基因植物, 昆虫的水平抗性的产生不可避免。因此测定不同杀虫晶体蛋白对一些重要的农林害虫的毒

力, 研究苏云金芽孢杆菌的杀虫晶体蛋白之间的协同作用规律, 找到那些对目标害虫毒力高、杀虫谱广的杀虫晶体蛋白基因以及其他杀虫晶体蛋白具有协同作用的基因就成了一项很重要的工作。

参考文献:

[ 1 ] 黄大 林敏. 农业微生物 基因工程[ M ]. 北京: 中国科技出版社, 2000. 417-485.

[ 2 ] Kumar P. A , Sharma R P , Malik VS . The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*[ J ] . *Advances in Applied Microbiology*, 1997, 42: 1-43.

[ 3 ] Lee MK , Curtiss A , Alcantara E , et al., Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins *CryIAa* and *CryIAc* on the gypsy moth[ J ] . *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 583-586.

[ 4 ] Cristina del Rincon—Castro, Jose Barajas—Huerta, Jorge E. Ibarra. Antagonism between *CryIAc1* and *Cyt1A1* toxins of *Bacillus thuringiensis*[ J ] . *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2049—2053.

[ 5 ] Wu D , Chang F. N.. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal[ J ] . *Febs Letters*, 1985, 190: 232-236.

[ 6 ] Ibarra, Federici. Isolation of arelatively notoxic 65—kDa protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp [ J ] . *israelensis* J. *Bacteriology*, 1986, 165: 527-533.

[ 7 ] Margaret C. Wirth, Amelle Delecluse, William E. Walton. *cyt1Ab1* and *cyt2Ba1* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and Resistant *Culex quinquefasciatus* [ J ] . *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3280-3284.

[ 8 ] Mc Gaughey. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*[ J ] . *Science*, 1985, 229: 193-195.

(上接第 20 页)

3 讨论

3.1 通过对我省 239 份小豆种质资源的研究和分析, 明确了我省保存小豆种质主要以子粒红色、中粒类型为主栽品种。

3.2 在熟期选择上要根据各地区的生态特点和栽培水平, 以中熟品种为主, 适当搭配早熟和晚熟类型品种。

3.3 在小豆种质创新和利用上, 要想获得高产种质, 必须选择结荚性强的品种, 才能收到良好的效果。

3.4 应加强小豆新品种选育推广及利用方面的研究工作。

参考文献:

[ 1 ] 金文林. 我国北方小豆地方品种资源在南京的表现及选择潜力 [ J ] . *作物品种资源*, 1989, (3): 10-12.

[ 2 ] 程须珍, 王素华. 中国绿豆品种资源研究[ J ] . *作物品种资源*, 1998, (4): 9-11.

[ 3 ] 胡家蓬. 中国小豆种质资源的收集与评价[ J ] . *作物品种资源*, 1999, (1): 17-19.

[ 4 ] 林汝法, 柴岩, 廖琴, 等. 中国小杂粮[ M ] . 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002. 210-228.