

Doi:10.12051/j.issn.1674-4942.2023.04.014



杀植物线虫的Bt菌Cry蛋白研究进展

张丽婧, 林明贤, 颜培玉, 李欣欣, 张译丹, 张雪, 符安芸, 宋靖雯, 张文飞*
(热带动植物生态学省部共建教育部重点实验室/海南师范大学 生命科学学院, 海南 海口 571158)

摘要:植物寄生线虫(Plant parasitic nematodes)对农林业生产造成了巨大的经济损失,为减少环境污染,发展绿色农业,生物防治愈发受到关注。Bt菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)作为一种重要的生防细菌,对鳞翅目、鞘翅目、双翅目和线虫具有特异性的杀虫活性,对人类和非靶标昆虫无害。文章对已报道的Bt菌及其杀植物线虫Cry蛋白种类、结构特征和杀虫机制等方面研究进展进行了简要综述。

关键词:Bt菌;Cry蛋白;植物线虫;杀线虫活性

中图分类号:Q93 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4942(2023)04-0447-06

Research Progress of Cry Protein of *Bacillus thuringiensis* Killing Plant Nematodes

ZHANG Lijing, LIN Mingxian, YAN Peiyu, LI Xinxin, ZHANG Yidan, ZHANG Xue, FU Anyun, SONG Jingwen, ZHANG Wenfei
(Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Animal and Plant Ecology/School of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract:Plant parasitic nematodes have caused huge economic losses to agricultural and forestry production. In order to reduce environmental pollution and construct green agriculture, biological control has attracted increasing attention. *Bacillus thuringiensis* (Bt), as a vital biocontrol bacterium, has been proved to have specific insecticidal activity against lepidoptera, coleoptera, diptera and nematodes, and is harmless to human and non-target insects. In this paper, we briefly reviewed the research progress of Cry protein of Bt bacteria and its Cry protein species, structural characteristics and insecticidal mechanism of plant nematodes.

Keywords:*Bacillus thuringiensis*; Cry protein; plant nematodes; nematicidal activity

线虫(Nematodes)隶属线虫动物门(Nemathelminthes)线虫纲(Nematoda),是一类两侧对称假体腔无脊椎动物,种类繁多,数量丰富,分布广泛。线虫除了游离生活,还可进行寄生生存^[1]。寄生于植物的线虫叫作植物寄生线虫(Plant parasitic nematode)^[2],藓类、蕨类、藻类、裸子植物和被子植物中都发现了寄生线虫。线虫在植物体各个部位都可寄生,吸取寄主养分用于自身生长繁殖,对寄主造成伤害,也会导致外界病原如病毒、真菌、细菌的入侵,加重寄主植物的病害^[3]。美国一项研究机构调查显示,全球农林作物损失中,由寄生线虫危害导致的损失高达800多亿美元,其中破坏程度最为严重的是根结线虫和囊肿线虫,严重影响全球粮食作物产量与品质^[4]。中国是传统农业大国,幅员辽阔,大多数地区属于温带气候,线虫的防控形势非常严峻。资料显示,在中国,寄生线虫达400多种,近百种作物受到侵害,防治线虫病害工作耗费了大量的人力和

收稿日期:2023-05-16

基金项目:海南省自然科学基金高层次人才项目(321RC545);国家自然科学基金项目(32260041,31960012)

第一作者:张丽婧(2002—),内蒙古赤峰市人,本科生,研究方向为微生物资源收集。E-mail:3043443026@qq.com

*通信作者:张文飞(1979—),湖南岳阳人,教授,研究方向为微生物资源与生物育种。E-mail:wenfei2007@163.com

物力。

总体来说,防治植物寄生线虫的方法主要为物理防治、化学防治和生物防治^[5]。物理防治的操作空间有限,效果不明显,易反复发作,防治不彻底。化学防治主要是使用卤代烃、有机磷等类型的农药,采用浸苗、毒土和灌根等方式毒杀线虫,其效果显著却存在诸多隐患,如长期使用会导致生态平衡被破坏,残留的农药很容易造成水和土壤的污染,并导致动物和人中毒。线虫的生物防治是利用某些微生物或者植物所产生的杀线虫代谢物及杀线虫的细菌、病毒、立克氏体、放线菌、捕食性线虫、涡虫和原生动物等线虫的自然天敌杀灭线虫,可有效控制线虫对作物的危害^[6-7]。

目前,中国倡导的线虫病害防治措施是以整体预防为主,综合多种方法进行防治。物理和化学方法防治线虫,都存在诸多缺点且不符合现代农业发展的需求。近年来,生物防治由于符合绿色农业可持续发展战略需求,受到越来越多的关注。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种对生态环境友好、应用十分广泛的生防细菌,其孢子形成过程中可产生Cry和Cyt毒素蛋白,营养期可产生Vip和Sip蛋白等多种毒素因子,其杀虫谱广泛,涉及鳞翅目、双翅目、鞘翅目和直翅目等多个目的昆虫。近年来,研究人员发现Bt菌对线形动物门中某些线虫种属具有活性^[8],其中Bt菌产生的抗线虫Cry毒素最为引人注目。利用分子生物技术将这些抗线虫Cry毒素基因导入作物的基因组,培育抗线虫作物,将成为未来一种最直接、高效、经济和环保的植物寄生线虫防治途径。

1 杀植物线虫Bt菌株的发现

Bt菌是芽孢杆菌属(*Bacillus*)的一员,芽孢杆菌科成员还包括为人熟知的炭疽芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌等。Bt菌是一种革兰氏阳性细菌,以苏云金亚种、以色列亚种、库斯塔克亚种及莫里斯亚种等为主,其芽孢期和生长期可分别产生伴孢晶体蛋白、营养期杀虫蛋白,对昆虫、线虫、原生动物甚至人类的某些癌细胞具有特殊毒性。1961年,Ciordia等学者^[9]首先报道Bt菌株具有毒杀线虫活性,据研究,Bt菌能杀死牛肠道寄生线虫(*Trichostrongylus colubriformis*)的卵及幼虫。1972年Prasad等^[10]发现Bt菌产生的苏云金素(β -外毒素)对植物寄生线虫有活性。而国内鲜见Bt菌在线虫体内功能的研究报道。

2 杀植物线虫的晶体蛋白

Bt菌产生的毒素蛋白包括营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs)和晶体蛋白(包括Cry和Cyt蛋白,前者居多)^[11]。Bt菌还产生许多具杀虫活性的酶类,如金属蛋白酶Bmp1(metalloproteinase)、胶原蛋白酶ColB(collagenase)和几丁质酶(chitinase)等。1987年Bone等^[12]和崔哲雨等^[13]报道Bt菌以色列亚种和库斯塔克亚种晶体蛋白能杀死蛇形毛圆线虫(*Trichostrongylus colubriformis*)的幼虫和卵,其半致死量(LC₅₀)为2.7 mg/L,这是Bt晶体蛋白在线虫体内显示毒杀活性的第一个报告。目前国内外学者已经从昆虫、蜘蛛及某些细菌体内分离出一些与晶体蛋白相似的蛋白质。1988年Osman等^[14]报道了Bt伴孢晶体蛋白毒杀植物寄生线虫的方法。1998年Vos等^[15]发现番茄中存在的Mi-1基因对根结线虫具有抗性,2003年Wei等^[16]证明大鼠肠道线虫对一些杀线虫晶体蛋白敏感,说明在自然界中存在着一些能抑制线虫生长、繁殖及诱导线虫产生抗药性的物质。美国Mycogen公司研究者发现,Bt伴孢晶体蛋白在10余个属的植物寄生线虫中表现出活性,同时确定了Cry蛋白的主要毒性组分的分子量是45~65 kD和65~155 kD,有广阔的应用前景^[15]。迄今已报道的杀线虫蛋白基因有cry1、cry5、cry6、cry12、cry13、cry14、cry21和cry55等^[17]。对这些基因编码蛋白进行分子聚类分析后发现,这些杀线虫Cry蛋白主要包括Cry5亚家族和Cry6亚家族^[18],这两个亚家族都是由原本属于一个保守结构域的蛋白质组成,其中,Cry5亚家族包括Cry5Aa和同源性大于45%的Cry5Ab、Cry5Ac、Cry5B,以及同源性小于45%的Cry12A、Cry13A、Cry14A、Cry21A,共6种蛋白^[19]。

2.1 典型的3D-Cry蛋白

大部分Bt菌的Cry蛋白活性区域由3个结构域(three-domains, 3D)组成,称为3D-Cry蛋白,同时包含有保守的短氨基酸序列(block)^[11]。3D-Cry蛋白主要参与毒性肽的合成。毒性肽的N-端是由7个疏水的 α -螺旋形成的Domain I,负责插入和空隙形成;Domain II是3个反向平行的 β -折叠结构,不同毒素氨基酸

序列差异显著;Domain III位于毒性肽的C-端,是紧裹在一起的 β -三明治结构,可以提高毒素分子的结构稳定性,防止毒素蛋白被水解,并可以促进靶膜通透性^[20]。通过X射线衍射方法已测出Cry1Aa、Cry3A等一些晶体蛋白的结构。由他们的结构特征可以推测Domain I关系到昆虫中肠细胞离子孔道的形成,Domain II关系到毒素蛋白与昆虫中肠细胞受体结合,Domain III可能与晶体形成和毒素稳定性有关。富含 β -折叠的Domain II和Domain III决定了Cry蛋白与昆虫细胞受体的结合^[21]。不同的晶体蛋白可针对靶标害虫引发特异的杀虫活性,其活性的高低依赖于蛋白晶体的结构。关于不同蛋白晶体结构相对应的三维结构,目前还没有一个明确的研究定论,还需进一步研究。

2.1.1 Cry5毒素

Cry5毒素表现出Cry蛋白的保守性,作为一种杀线虫3D-Cry蛋白被广泛研究。Cry5B和Cry1Ab具有24%同源性,晶体蛋白(约570个氨基酸)3个结构域中相似性为44%。Cry5伴胞晶体蛋白通常具有5个保守序列区,赵新民等^[22]发现Cry5Aa具有典型的3D结构域特征,Domain I的 α -螺旋一段插入序列结构有独特性,Cry5Aa Domain I的 α 2螺旋一段插入序列表面具有较高的正电势且包含特殊的四脯氨酸结构,该插入序列具有较大的柔韧性,其运动与其他氨基酸残基的相关性较小。此外,分别位于Domain I、Domain II和Domain III的残基123、残基397和残基567及其邻近部位也具有较大的柔韧性,这为了解Cry5Aa对线虫的毒杀作用机制提供了条件。

Cry5B是Kostichka等^[23]首次从Bt菌AB88培养液上清液中分离获得的,该蛋白是一种输出蛋白质,在Bt菌稳定期表达产生。与Cry1Ab相似,Cry5B杀虫晶体蛋白含有3个功能域,但Cry5B中比较特殊的区域是Domain II,其结构类似于香蕉凝集素(lectin),这个结构决定了Cry5B的杀虫特异性。雷梦英等^[24]改造了*cry5Ba3*基因并成功构建其表达质粒,通过农杆菌介导法将*cryBa3*基因整合到番茄灰霉病菌基因组中,利用生物测定法测定了*cry5Ba3*转化体对松材线虫的毒力。

2.1.2 Cry14毒素

Baghaee等^[25]发现Bt菌Cry14毒素对爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*)具有杀虫活性,鉴定出2株含有*cry14*基因的Bt菌T oIr65和T oIr67对爪哇曲线虫孵化的幼虫和卵具有杀线虫活性。菌株T oIr65和T oIr67具有双锥体和立方体伴胞晶体。在实验室和盆栽条件下,对细菌悬浮液(BS)、孢子和晶体混合物(SCM)2种形式的细菌分离物进行了测试,以评估其对爪哇曲线虫的作用效果,结果表明T oIr65和T oIr67的伴胞晶体蛋白具有70%的体外杀线虫活性。盆栽试验中,T oIr65和T oIr67均较对照显著降低了番茄植株的虫瘿数,并提高了植株的生长参数。据报道,Bt菌株KAU 50含有Cry6、Cry16、Cry20,Bt菌株KAU 424含有Cry1和Cry14。KAU 424的Cry 14蛋白具有杀线虫的特性,Cry 1蛋白对鳞翅目昆虫有毒性。因此,这种特殊的Bt菌株的杀线虫特性可能归因于Cry 14蛋白。然而,迄今为止尚未见KAU 50基因表达产物具有杀线虫特性的报道。值得注意的是,在自然界不同的Bt菌株中可能存在较新的杀线虫蛋白,必须进行进一步的蛋白质分析、分离和鉴定,以确定特定Bt菌株具有杀线虫特性的蛋白质^[26]。

2.1.3 Cry21毒素

Sato等^[27]从Bt菌克隆了一个编码新型晶体蛋白Cry21Ba1的基因,*cry21Ba1*的开放阅读框(ORF)大小为3 858 bp,基因起始密码子上游具有特定的启动子序列,终止密码子下游同时具有反向重复序列。Cry21Ba1蛋白由1 286个氨基酸编码而成,其氨基酸序列与已知的杀线虫蛋白Cry21Aa1的氨基酸序列同源性为67%。Cry21Ba1原蛋白由3个结构域和1个原蛋白特异性C末端延伸组成,原毒素的C端延伸可以被线虫肠中的蛋白酶准确消化。Cry21Ba1与Cry21Aa1在由结构域II和结构域III组成的区域中氨基酸序列存在显著不同,表明这些Cry蛋白在受体识别和结合特性上存在差异。

2004年,Iatsenko等^[28]发现Bt菌DB27产生的2种新的原毒素Cry21Fa1和Cry21Ha1对线虫具有协同作用,并发现Bt菌DB27通过肠道损伤杀死了一些自由生活和动物寄生线虫。Cry21Fa1和Cry21Ha1对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的50%致死浓度(LC₅₀)分别为13.6 μ g/mL和23.9 μ g/mL,与Cry5B的杀线虫活性相当。同时,Cry21Ha1与Cry21Ba1两种原毒素表现出协同作用,其协同因子数值为1.8~2.5,表明自然分离新菌株和新型毒素资源非常重要。

2.1.4 Cry1E 毒素

Bt 菌 BRC-XQ2 含有 4 种 *cryI* 类基因(*cryIAa*、*cryICb*、*cryIEa* 和 *cryIIa*),其伴胞晶体和芽孢混合物对松材线虫表现出明显杀虫活性,50% 致死浓度(LC₅₀)为 32.13 μg/mL。Huang 等^[29]在大肠杆菌中成功表达了来自 BRC-XQ2 的 *cryIEa11* 基因(ORF 为 3 516 bp),在 24 h 和 48 h 测定的纯化 Cry1Ea11 毒素表达蛋白的 LC₅₀ 分别为 32.53 μg/mL 和 23.23 μg/mL。与此同时,用 NHS 罗丹明标记的 GST-Cry1Ea11 饲喂松材线虫,能够检测到 GST-Cry1Ea11 通过管心针进入松材线虫体内,因此,Cry1Ea 毒素极有可能是抗线虫的关键活性成分,是首次证明鳞翅目活性的 Cry1 蛋白对植物寄生线虫有活性。Cry1Ea11 是一种高活性的杀线虫蛋白,可用于控制松材线虫引起的松材线虫病,显著拓宽了 Cry1 蛋白的杀虫谱。

2017 年 Chen 等^[30]发现长期种植表达 *cryIAb/IAc* 基因的 Bt 水稻可以减少稻田中植物寄生线虫的数量,但对其他线虫参数(线虫总数、游离线虫丰度和相对丰度、属丰富度、多样性指数、土壤食物网条件和群落组成)没有影响。但研究发现,这些变量具有明显的季节和年际变化,表明环境因素的影响大于 Bt 毒素的影响。综上所述,Bt 水稻在土壤健康和可持续性发展方面存在潜在生态风险,值得进一步研究,以探究各种混杂环境因素的影响^[31]。

2.2 非典型 3D-Cry 蛋白

2.2.1 Cry6 毒素

Cry6 不具有 Cry 蛋白典型的三维结构,属于 α-螺旋类穿孔毒素,与大肠杆菌中的溶血素 E 及蜡样芽孢杆菌中的溶血素 HblB 和非溶血素 NHEA 相似^[11]。Cry6 亚家族包括具有约 50% 同源性的 Cry6A 和 Cry6B,但他们与 Bt 菌中其他 Cry 蛋白的同源性较低,没有共同的 5 个保守序列区域^[16],Wei 等^[16]发现 Cry6A 蛋白含有一个由 31~1 146 个氨基酸残基构成的毒力活性中心区域。贾永强等^[32]对 Cry6A 进行了毒杀秀丽线虫的生物活性测定,结果发现带有空载体大肠杆菌 JM103 平板(对照)上的线虫在 3 d 后都没有死亡,而 Cry6A 的试验平板上的线虫有不同程度的死亡,其 50% 致死浓度为 37.33 ng/cm²,表明 Cry6A 具有较强杀线虫活性。但是迄今为止,尚未有任何介绍 Cry6B 具有杀线虫活性的研究报道。

2.2.2 Cry65 毒素

2011 年,吴寒^[33]从菌株 Sbt003 中克隆得到新杀虫蛋白基因 *cry65Aa1*,其编码的蛋白与 Cry41Aa1 有 28% 的相似性,而 Cry41Aa1 是一类 parasporin-like 蛋白,为非典型 3D-Cry 蛋白。Cry65Aa1 蛋白对秀丽隐杆线虫并没有表现出明显毒性。但吴寒所在实验室鉴定克隆的一个与 Cry65Aa1 相似性为 30% 左右的 Cry65-like 蛋白却表现出对线虫的明显活性。*cry65Aa1* 基因操纵子包含一个下游基因,编码一个辅助蛋白,研究发现 ORF1 是 Cry65Aa1 表达和结晶所必需的,其功能是 Cry65Aa1 的 C 端结晶结构域。ORF1 由 512 个氨基酸组成,被预测为分子量为 58 kDa 的蛋白质,与对线虫有毒性的 Cy21Ba1 的 C 端半段有 98% 的相似性。

3 Cry 蛋白的杀线虫机制

目前,对 Cry 蛋白杀线虫机制的研究还不是很深入,主要包括穿孔模型和细胞坏死途径。

3.1 穿孔模型

穿孔模型是一种被广泛接受的 3D-Cry 蛋白杀虫模型,其在昆虫体内的作用机理较为明确。3D-Cry 蛋白经昆虫吞食后进入肠道,在碱性条件下蛋白溶解为可溶性原毒素,然后昆虫肠道中的一些酶对原毒素 N 端与 C 端的非毒性区域进行切割,使毒素蛋白激活。活化的毒素蛋白先与位于昆虫中肠柱状上皮细胞(BBMV)上的膜受体 APN 或 ALP 以较低的亲和力结合,继而在细胞膜上富集毒素形成寡聚体诱导毒素蛋白空间构象发生改变。毒素蛋白空间结构的变化使其可在脂筏处插入细胞膜,孔洞由此形成。孔洞的出现破坏了细胞膜的完整性,引发细胞渗透失衡,从而使中肠细胞发生膨胀和裂解,最终导致肠道裂解,虫体因感染致死^[11]。

研究发现,秀丽隐杆线虫细胞膜上的糖脂为 Cry5B 的功能受体,是介导 Cry5B 杀虫活性的重要部位。石建伟^[11]对 Cry5B 的进一步研究表明,Cry5B 可引起靶向线虫的细胞内病理变化,线粒体对 Cry5B 敏感,是 Cry5B 的重要细胞内靶点。GPI 锚定蛋白 RBT-1 是 Cry6A 的功能性受体,位于秀丽隐杆线虫肠细胞膜脂筏

中,具有N端信号肽和糖基化位点,*rbt-1*的缺失会引起线虫对Cry6A的抗性。经典的穿孔模型仍然是被广泛接受的3D-Cry的作用模式,但是关于经典穿孔模型细胞机制研究的信息却很少。

3.2 细胞坏死途径

Zhang等^[34]研究了晶体蛋白Cry6Aa对秀丽隐杆线虫的活性作用,发现了坏死通路中的一个关键缺陷部位,该坏死通路的缺陷赋予了Cry6Aa毒素的耐受性。另外,Cry5Ba的氨基酸序列与Cry6Aa的氨基酸序列不同,在线虫内诱发细胞坏死的是Cry6Aa而不是Cry5Ba。并且,Cry6Aa诱导的坏死途径需要天冬氨酸蛋白酶(ASP-1)。此外,ASP-1对Cry6Aa的抗性也有一定的抑制作用,首次证实失去坏死通路可对Bt晶体蛋白产生耐受性,Cry6A激活了线虫的坏死通道,这是一种针对线虫新的坏死类型。

另外,Cry5Ba在非宿主环境中是沉默的,这种表型取决于sRNABtsR1对Cry5Ba的负调节。沉默的毒素基因可以掩饰Bt菌的毒性,从而骗过线虫对Bt菌的拒绝,使Bt菌更容易成为线虫的食物。当Bt菌被寄主吞噬后,沉默的性能就会消失,Cry5Ba的大量表达和快速杀灭进一步获得了Bt菌的生存优势。

4 展望

Bt菌被长期广泛应用于防治各类农业害虫,获得了很好的安全口碑。目前欧美等国及跨国生物公司投入大量的人力物力分离Bt菌的抗线虫毒素蛋白序列,然后将序列编入作物的基因组中,以培育抗线虫的转基因植物。国内外学者在Bt晶体蛋白对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等特殊毒杀作用的研究较为深入,但Bt菌对线虫活性的研究却相对较少,尤其是国内尚无成熟的实例。

目前非典型3D-Cry蛋白(如Cry6亚家族)对线虫活性的研究仍有较大空白,而实验室内已发现对典型3D-Cry蛋白(如Cry5B)产生抗性的线虫。因此,发掘具有杀线虫活性的Cry6类毒素可为解决线虫抗性问题的有效途径。开发杀线虫基因、构建杀线虫工程菌株、培育转基因抗线虫新品种,是当前农业可持续发展的最直接、最有效、最具前景的技术手段。

参考文献:

- [1] 洪香娜. 基于Bt转基因和RNAi防治大豆孢囊线虫的研究[D]. 开封: 河南大学, 2021.
- [2] ANTIL S, KUMAR R, PATHAK D V, et al. Recent advances in utilizing bacteria as biocontrol agents against plant parasitic nematodes emphasizing *Meloidogyne* spp[J]. *Biological Control*, 2023, 183: 105244.
- [3] MEJIAS J, TRUONG N M, ABAD P, et al. Plant proteins and processes targeted by parasitic nematode effectors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 970.
- [4] KAHN T W, DUCK N B, MCCARVILLE M T, et al. A *Bacillus thuringiensis* Cry protein controls soybean cyst nematode in transgenic soybean plants[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 3380.
- [5] 陈军. 松材线虫致病性最佳接种量的研究[J]. *辽宁林业科技*, 2019(3): 32-34.
- [6] FFRENCH-CONSTANTI R H, BOWEN D J. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2000, 57(5): 828-833.
- [7] 王奋山. 苏云金芽孢杆菌杀线虫晶体蛋白Cry55Aa和Cry5Ba的毒性区确定与毒力改造[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [8] GUO Y J, WENG M Q, SUN Y Z, et al. *Bacillus thuringiensis* toxins with nematocidal activity against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2022, 189: 107726.
- [9] CIORDIA H, BIZZELL W E, BAIRD D M, et al. The influence of pasture type and supplemental grain feeding on numbers of gastrointestinal nematodes in beef yearlings[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1962, 23: 1001-1006.
- [10] PRASAD S S V, SHETHNA Y I. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumour and insecticidal protein subunit from the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, 362(3): 558-566.
- [11] 石建伟. 苏云金芽孢杆菌Cry6A和Cry5B蛋白杀线虫机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [12] BONE L W, BOTTJER K P, GILL S S. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin[J]. *Experimental Parasitology*, 1985, 60(3): 314-322.
- [13] 崔哲雨, 黄念庭, 何鹏, 等. 苏云金芽孢杆菌在害虫防治领域的应用进展[J]. *现代面粉工业*, 2023, 37(1): 13-18.

- [14] OSMAN G Y, SALEM F M, GHATTAS A. Bio-efficacy of two bacterial insecticide strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a nematicide, nemacur, on certain parasitic Nematoda[J]. Anzeiger Für Schädlingkunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 1988, 61(2): 35-37.
- [15] VOS P, SIMONS G, JESSE T, et al. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(13): 1365-1369.
- [16] WEI J Z, HALE K, CARTA L, et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(5): 2760-2765.
- [17] Bradfish G A. Mycogen corporation (patent), San Diego CA92121, 1992.
- [18] 龚建如, 王俊慧, 蒙瑜, 等. 新型 Vip3-like 蛋白的从头预测建模及其结构域分析[J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2017, 30(3): 269-275, 296.
- [19] 赵新民, 黄璠, 付祖姣, 等. 杀线虫苏云金芽孢杆菌研究进展[J]. 农药, 2007, 46(5): 296-299, 304.
- [20] 郭雅洁. Cry3Aa 毒素对松墨天牛幼虫的作用机理及其多位点定向改造[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
- [21] HECKEL D G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2020, 104(2): e21673.
- [22] 赵新民, 彭晓赞, 刘淑云, 等. 杀线虫苏云金芽孢杆菌毒素 Cry5Aa 柔韧性分析[J]. 广东化工, 2014, 41(9): 35-36.
- [23] LI J X, WANG L, KOTAKA M, et al. Insights from the structure of an active form of *Bacillus thuringiensis* Cry5B[J]. Toxins, 2022, 14(12): 823.
- [24] 雷梦英. 苏云金芽孢杆菌 cry5Ba3 基因的表达及对松材线虫的毒杀效果研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2015.
- [25] BAGHAEE RAVARI S, MAHDIKHANI MOGHADDAM E. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry14 toxin against root knot nematode, *Meloidogyne javanica*[J]. Plant Protection Science, 2015, 51(1): 46-51.
- [26] BEENA V, RAMNATH V, GIRIJA D, et al. *Bacillus thuringiensis* strains from Western Ghats of India possess nematocidal property against *Haemonchus contortus* larvae of goats[J]. Heliyon, 2019, 5(10): e02724.
- [27] SATO K, ASANO S I. Cloning and sequencing of the gene for a putatively nematode-toxic crystal protein, Cry21Ba1, from *Bacillus thuringiensis* serovar roskildiensis[J]. Nematological Research (Japanese Journal of Nematology), 2004, 34(2): 79-88.
- [28] IATSENKO I, YIM J J, SCHROEDER F C, et al. *B. subtilis* GS67 protects *C. elegans* from Gram-positive pathogens via fengycin-mediated microbial antagonism[J]. Current Biology: CB, 2014, 24(22): 2720-2727.
- [29] HUANG T P, LIN Q X, QIAN X L, et al. Nematicidal activity of Cry1Ea11 from *Bacillus thuringiensis* BRC-XQ12 against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. Phytopathology, 2018, 108(1): 44-51.
- [30] CHEN Q Y, YANG B, LIU X H, et al. Long-term cultivation of *Bt* rice expressing the *Cry1Ab/IAc* gene reduced phytoparasitic nematode abundance but did not affect other nematode parameters in paddy fields[J]. Science of the Total Environment, 2017, 607/608: 463-474.
- [31] 杜洪文. 线虫防御杀线虫晶体蛋白 Cry6Aa 的信号通路研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [32] 贾永强, 刘学钊, 陈月华, 等. 杀线虫基因 cry6A 的克隆、表达及序列分析[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2008, 41(2): 19-23.
- [33] 吴寒. 苏云金芽孢杆菌中 Cry51Aa1 晶体形成特点及新杀虫基因 cry65Aa1 的克隆[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [34] ZHANG F J, PENG D H, CHENG C S, et al. *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry6Aa triggers *Caenorhabditis elegans* necrosis pathway mediated by aspartic protease (ASP-1)[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(1): e1005389.

(责任编辑: 杨国峰)