

中国农业部科技发展中心负责翻译了题为：“Consensus Document on the Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Protein”，Copyright OECD, 2007的英语文件。经济合作和发展组织不会对于相对原文内容的中文翻译质量及其一致性予以负责。

Translated under the responsibility of the Development Center for Science and Technology, Ministry of Agriculture of People’s Republic of China, from the original English edition published under the title “Consensus Document on the Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Protein”, Copyright OECD, 2007. The OECD is not responsible for the quality of the Chinese translation and its coherence with the original text.

第七章

表达 Bt 抗虫蛋白转基因植物 安全信息的共识文件*

总 结 摘 要

本文总结了苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* δ -内毒素基因的来源、所编码毒素的结构和性质、独特的作用机制、在植物中的应用、毒性和暴露数据以及评价方法。与植物 δ -内毒素风险评估相关的一些苏云金芽孢杆菌的知识以及这些特性的细菌来源作为背景材料也在本文中进行了介绍，不过本文并没有打算介绍关于微生物的庞大信息。本文除了引用了科学文献中的数据之外（这些数据在近几年快速增长很快），还引用了美国申请植物农药产品登记（在美国法律中也称为植物性保护剂）的申请人员所提交的数据。这些研究都要求按照良好实验室操作规范进行（美国联邦法第 40 号第 160 条），并通过美国环境保护局科学家的同行评议，认可这些数据可以用于环境评估中。在美国，这些研究数据可向公众公布，并应其他行政单位的要求可从公司获得这些数据。提交的数据中有些涉及的是不再登记的产品，不过这些数据仍然可说明 δ -内毒素的性质。必要时，如果需要列举针对这些毒素基因而进行的特定评估，则应当对植物表达数据进行讨论。不过，本文的目的并不是想说明基因转移，也不是说明通过转化而表达了这些毒素的特定植物的其他问题。这些情况不在本文的讨论范围之列。如果已经评价了苏云金芽孢杆菌介导的抗虫植物的生物安全性，则本文应当与特定植物种的生物学共识文件同时应用。抗虫治理是为了预防或延迟接触了这些转基因作物的害虫发展对特定 δ -内毒素的抗性，因此本文将不介绍抗虫治理方面的问题。

第一节 总体介绍

近年来，随着基因工程的不断发展，人们通过整合和表达苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) δ -内毒素基因而开发出了很多抗虫植物。本文中，微生物农药指的是苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*，而整合到植物中的毒素指的是 δ -内毒素。苏云金芽孢杆菌的多个亚种已经登记为农药，并且由于它们具有种属特异性（主要是影响害虫），且在环境中不长期存在，因此被高度视为环境友好型农药。此外， δ -内毒素基因已经被插入到很多细菌中，如插入到荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*

* Originally published by OECD in English under the title: “Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis*-Derived Insect Control Protein” © 2007 OECD.

(Stone *et al.*, 1989) 和短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* (Selinger *et al.*, 1998) 中, 用于土壤害虫的防治; 插入到 *Clavibacter xyli* 中, 用于欧洲玉米螟的防治 (Dimock *et al.*, 1988); 插入到球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* 中, 用于蚊子的防治 (Poncet *et al.*, 1997)。不过试验用菌株只是他的活性形式。Mycogen 公司生产的在假单胞菌属 *Pseudomonas* 中表达苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素的一个产品不能存活, 因此不涉及环境方面的问题。表达不同 δ -内毒素的这些产品中有 4 个于 1995 年在美国进行了登记, 已经对很多种植物尤其是作物 (如棉花、玉米、烟草、西红柿和甘蔗) 进行了改良, 获得了来源于苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素蛋白 (Prieto-Samsonov *et al.*, 1997)。

与应用传统苏云金芽孢杆菌制剂相比, 应用含 δ -内毒素的转基因植物具有很多优点和缺点。通过转基因植物中表达的 δ -内毒素可以对害虫进行防治, 从而为整个生长季节的植物提供保护。由于传统的 Bt 制剂在环境中的降解速度更快, 因此与传统的 Bt 制剂相比, 不一定要求转基因植物的杀虫活性是短期的。转基因植物克服了传统微生物制剂无法到达土壤地下害虫、或钻蛀到植物茎秆或组织中并停留的害虫问题, 如欧洲玉米螟从里面破坏玉米秆。棉铃虫在大部分时间内取食含苞未放的棉蕾 (花) 和铃 (果), 因此与转基因棉花/ δ -内毒素产品防治棉铃虫的效果相比, 微生物制剂的防治效果差 (Beegle 和 Yamamoto, 1992)。与微生物叶面喷施剂 (Szekacs *et al.*, 2005) 相比, 延长接触时间、加大 δ -内毒素用量可选择出对 1 个或多个苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素具有抗性的害虫, 从而潜在降低这些苏云金芽孢杆菌杀虫剂的作用 (Tabashnik *et al.*, 1990; Bauer, 1995; Van Rie, 1990b)。用纯化 δ -内毒素进行的实验室研究已经筛选出了抗性害虫。如有必要, 可用各种策略来防止田间抗虫性的发展 (Williams *et al.*, 1992; Rajamohan *et al.*, 1998; Matten, 1998; Pittendrigh *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2005)。

表达 δ -内毒素基因的转基因抗虫植物以及微生物 Bt 制剂在环境方面的主要优势是: 与很多人工合成的化学农药相比, δ -内毒素对靶标生物具有更高的特异性, 对非靶标生物和其他生物的不利影响显著降低。尽管这种转基因植物具有很高的靶标特异性, 但仍有害虫和其他非靶标生物可能受 δ -内毒素的影响, 延长接触时间可能会影响这些生物的种群。转基因抗虫植物的另一个可能缺点是: δ -内毒素基因转移到性亲和的野生种群中, 增加杂草化潜力。不过, 应当强调, 多种因素决定野生植物种群的杂草化潜力, 其中最重要的是转基因是否渗入到野生植物种群中。例如, 一项评估发现, 由于本地棉花是二倍体, 因此基因从四倍体棉花渗入到澳大利亚 17 个本地棉花种的现象不明显 (AOGTR, 2002)。关于 δ -内毒素基因转移是否会增加野生近缘种的杂草发生潜力, 已在向日葵 (Snow *et al.*, 2003) 和油菜 (Halfhill *et al.*, 2002, Vacher *et al.*, 2004) 中进行了研究, 本文的第六节将对其进行讨论。

1. 苏云金芽孢杆菌及其应用

苏云金芽孢杆菌是一种常见细菌, 由于它产生的内生孢子对不良环境条件具有极强的抗性, 因此可在环境中存活很长时间。孢子一旦落入土壤, 除非有丰富的营养来源 (如土壤营养物质或摄入孢子的生物体内有可以利用的营养), 否则无法萌发而进入营养生长 (Petras 和 Casida, 1985)。例如, 已经证明, 苏云金芽孢杆菌 *kurstaki* DMU67R 亚种在土壤中可存活 7 年, 而数量不显著降低 (Hendriksen 和 Hansen, 2002), 详细情况见本

节第 2 部分第 1 段。芽孢杆菌属 *Bacillus* 的所有成员都为杆形、革兰氏阴性细胞，每个细胞产生的内生孢子不超过 1 个。细胞周围长有周鞭毛，需氧或兼性厌氧。孢子的形成不会因为接触空气而受到抑制 (Claus 和 Berkeley, 1986)。苏云金芽孢杆菌的特征是，在孢子形成的同时，产生一个或多个蛋白质伴孢晶体。伴孢晶体主要由具有杀虫活性的 δ -内毒素组成，同时含一些支架蛋白和 Cyt 毒素。晶体中的 δ -内毒素通常是失活的原毒素，通过幼虫肠道环境中酶的作用而转变成有活性的毒素 (Claus 和 Berkeley, 1986)。除一些苏云金芽孢杆菌分离物产生的其他毒素之外，这些毒素使这些微生物的商业产品对鳞翅目、双翅目和鞘翅目害虫具有杀虫活性。与单独的 δ -内毒素相比，这些微生物产品通过表达在昆虫中繁殖的其他因子，经常表现一些另外的活性。

天然存在的苏云金芽孢杆菌已在害虫防治中应用了几十年。关于苏云金芽孢杆菌的最早介绍始于 1901 年，日本微生物学家 S. Ishiwata 从感病的家蚕幼虫中分离了这一细菌 (shiwata, 1901)。Ishiwata 将该细菌命名为 Sottokin。10 年之后，德国微生物学家 E. Berliner 从德国图林根州地中海粉斑螟 *Ephestia kuehniella* 幼虫的感病种群中分离了一种类似的生物 (Berliner. 1911、1915；也被 Beegle 和 Yamamoto, 1992 引用)。Berliner 将这一细菌命名为 *Bacillus thuringiensis*。由于 Ishiwata 没有正式对他所发现的生物进行介绍，因此 Berliner 拥有了对这一生物命名的荣誉。最早的苏云金芽孢杆菌商业产品于 1938 年在法国生产 (Kumar *et al.*, 1996)。1961 年在美国首次登记作为杀虫剂使用。各种苏云金芽孢杆菌菌株制剂已应用于多种粮食、草料、水果、蔬菜、块茎和纤维作物以及西红柿中。此外，它们还可以用于防治森林害虫，特别是舞毒蛾和多种毒蛾，也用于防治蚊子和墨蚊。

苏云金芽孢杆菌毒素用作微生物农药时，由于接触紫外线后毒素会降解，因此其残留期较短，在植物上只有 1~4 天。不过，一项在森林中喷施 Bt 毒素的研究表明，Bt 毒素对鳞翅目害虫的毒性至少可持续 30 天 (Johnson *et al.*, 1995)。苏云金芽孢杆菌孢子在环境中可存活更长时间，并且从世界各地的土壤 (Martin 和 Travers, 1989；Bernhard *et al.*, 1997；Ejiofor 和 Johnson, 2002) 和植物表面 (Smith 和 Couche, 1991) 中已经分离出这种孢子。通常地，在自然条件下看不到大量的苏云金芽孢杆菌，但是预处理的土壤是个例外，并且这种情况并不罕见。在丹麦 (包括商业品种没有应用的区域)，已从多种不同类型的土壤中发现了大量的苏云金芽孢杆菌菌株 (Hendriksen 和 Hansen, 2004)。Delucca 等 (1981) 从测试的美国 12 个州 17% 的土壤中发现了这种细菌，并报道这种细菌存在于各种土壤中：栽培土、岩石土以及未采伐的森林 (未进行预处理)。苏云金芽孢杆菌可以在合适的寄主 (不因其存在而受危害) 中萌发并复制到很高的数量，从而在环境中持续存在。已经证明，很多动物的粪便中可排出苏云金芽孢杆菌。这些动物包括野鼠 (Swiecicka 和 De Vos, 2003)，日本鹿 (Ohba 和 Lee, 2003)、韩国的 14 种野生哺乳动物 (Lee *et al.*, 2003) 以及检测的 11% 的啮齿动物和 17% 的食虫性哺乳动物 (Swiecicka *et al.*, 2002)。由于苏云金芽孢杆菌是灌溉植物淤泥中常见的微生物群落之一，因此所说的哺乳动物可能也包括人类 (Mizuki *et al.*, 2001)。由于苏云金芽孢杆菌菌株可在 3 种蚯蚓以及 1 种大蚊科幼虫中萌发，而不使它们受伤害，因此在无脊椎动物生长的土壤中也存在同样的过程 (Hendriksen 和 Hansen, 2002)。苏云金芽孢杆菌孢子和毒素是整体环境

的一部分。

δ -内毒素含量不同的苏云金芽孢杆菌制品可能对不同属的不同害虫有毒，详情可见本节第 3 部分。Glare 和 O' Callaghan (2000) 附录 2.2 和 3.2 的表格中详细列出了对苏云金芽孢杆菌不同菌株具有抗性的害虫。但是很多害虫对苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素具有抗性。例如，欧洲金龟子是重要的害虫，其中已经开发出具有保护作用的中肠蛋白水解酶，保护欧洲金龟子不受 Cry8C 的毒害，但是 Cry8C 可杀死近缘的圣甲虫 (Wagner *et al.*, 2002)。Schmitz 等 (2003) 分析了害虫对 *Bt kurstaki* 喷雾剂敏感性的多项研究结果，认为尺蛾科 (Geometridae) 似乎最为敏感。相反，夜蛾科相对抗 Bt 的喷雾剂。总体说来，文献证明了 *Bt kurstaki* 商业毒素对鳞翅目害虫的毒性具有特异性 (Schmitz *et al.*, 2003)。

2. 苏云金芽孢杆菌毒素

大多数苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素包含于伴孢晶体包涵体中，在孢子形成过程中这种包涵体在内生孢子附近合成。伴孢晶体包涵体由多种杀虫晶体蛋白组成，每种蛋白由单一的基因编码。晶体蛋白的形状因杀虫蛋白组成的不同而异，可以有很多形状，如双锥形、立方形、偏菱形或同时具有两种类型。编码杀虫蛋白的基因通常位于质粒上，通过各种苏云金芽孢杆菌与近缘细菌如仙人掌杆菌 *Bacillus cereus* 和枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 结合，质粒自主复制染色体外的环状 DNA (Klier *et al.*, 1983; Battisti *et al.*, 1985; Ruhfel *et al.*, 1984)。苏云金芽孢杆菌质粒相对较大，可能含有细菌染色体 1/4 的基因编码能力 (Carlton 和 Gonzalez, 1985)。Schnepf 等 (1998) 指出，很多证据表明苏云金芽孢杆菌和仙人掌杆菌 *B. cereus* 可被认为是一个种。对苏云金芽孢杆菌、仙人掌杆菌 *B. cereus* 和炭疽杆菌 *Bacillus anthracis* 多个菌株进行的遗传分析发现，苏云金芽孢杆菌与环境分离的仙人掌杆菌 *B. cereus* 菌株之间具有广泛的遗传多样性，两者之间没有明显区别。炭疽杆菌 *B. anthracis* 菌株之间亲缘关系似乎更近 (Ticknor *et al.*, 2001)。炭疽杆菌 *B. anthracis* 菌株之间的多样性也小得多 (Keim *et al.*, 1997)。除了之前鉴定的可产生 δ -内毒素的 H34 菌株之外，苏云金芽孢杆菌菌株 (它们与近缘种不同) 的杀虫剂簇可将炭疽杆菌 *B. anthracis* 菌株进行分组，这些菌株都使小鼠致病 (Hernandez *et al.*, 2000)，并且出现在所有含有炭疽杆菌 *B. anthracis* 菌株的分支中 (Hill *et al.*, 2004)。

δ -内毒素还包括苏云金芽孢杆菌的另一类毒素，这种毒素在体外对大量的脊椎动物和无脊椎动物细胞具有溶解活性。已经表明，这些 Cyt 毒素通过与 Cry 毒素相似的作用机制而对双翅目害虫具有特异活性。由于某些情况下一定的 Cry/Cyt 毒素组合具有增效作用，而另外一些情况具有拮抗作用，如 Cry1Ac1 和 Cyt1A1 对 *Trichoplusia ni* 的体内毒性和体外毒性，因此 Cyt 毒素与 Cry 毒素之间的相互作用复杂 (Del Rincon - Castro *et al.*, 1999)。

近来从 Bt 中分离出双毒素，尽管它与传统的 Cry 毒素具有很低的同源性，但还是将其命名为 Cry 毒素。陶氏益农和先锋国际良种公司最近登记了一个双毒素 Cry34Ab1/Cry35Ab1，该双毒素来源于 Mycogen 公司的苏云金芽孢杆菌毒素库 (USEPA, 2005)。孟山都公司也拥有一个双毒素的专利权。

苏云金芽孢杆菌除了可产生 δ -内毒素之外，还可产生其他毒素。一个分离自芽孢杆菌属 *Bacillus* 的蛋白质类毒素为营养期杀虫蛋白 (Vip) 3A (Estruch *et al.*, 1996)，它对鳞翅目害虫具有广谱毒性 (C. Yu *et al.*, 1997)。表达 Vip3A 的转基因产品目前正在棉花和玉米植物中进行评价。尽管 Vip3A 毒素的性质与 δ -内毒素相似，但 Vip3A 并没有归类于 δ -内毒素，对于 Vip3A 的特性本文将不予说明。一些苏云金芽孢杆菌菌株产生一类亲缘关系很近的具有杀虫活性的腺嘌呤核苷类似物，称之为 δ -外毒素 (Hernandez *et al.*, 2001)。 β -外毒素的通用名为苏力菌素 (thuringiensin)。 β -外毒素对热不稳定并可能引起了苏云金芽孢杆菌对非靶标生物 (如大鼠、一些水生昆虫和鱼) 的毒性 (Beegle 和 Yamamoto, 1992)。 β -外毒素和其他芽孢杆菌属 *Bacillus* 毒素可能使这一细菌对鳞翅目、双翅目和鞘翅目害虫具有毒性 (Crickmore *et al.*, 2005)。已知 β -外毒素对人及其他所有生命形式具有毒性，并且 β -外毒素禁止出现在苏云金芽孢杆菌产品中。

3. 易感昆虫

据报道，各种分离的苏云金芽孢杆菌菌株主要对鳞翅目、双翅目和鞘翅目害虫具有毒性，也包括线虫、扁形虫、原生动物 (Feitelson *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 1992)，以及螨类 (Arachnida, Acarinae) (Feitelson *et al.*, 1992)。不过，这些细菌菌株的部分活性是 *Bacillus* 毒素而非 δ -内毒素所致。世界上存在多种不同的 δ -内毒素，它们对不同害虫具有截然不同的特异性。这种广泛的多样性可能是通过毒素分子内的序列分化及随后的结构域交换发展而来 (de Maagd *et al.*, 2001)。人们已经从菌株水平及毒素水平上测定了多种不同的 δ -内毒素对各种害虫的毒性。据报道，对 δ -毒素敏感的大多数害虫为鳞翅目害虫，但是很多 δ -内毒素 (如 Cry4, 10, 11, 19, 和 25) 对双翅目具有特异活性，一些 δ -内毒素 (如 Cry3 和 8) 对双翅目有活性。鳞翅目害虫对各种 δ -内毒素的敏感性变化很大。一项调查发现，42 种非靶标鳞翅目害虫中，有 13 种对商业产品 Foray 48B (含编码基因，但不一定表达，Cry1Aa1, Cry1Ab1, Cry1Ac1, Cry2Aa1 和 Cry2Ab1 蛋白) 的敏感性等级定为极敏感；11 种定为不敏感 (Peacock *et al.*, 1998)。一些 δ -内毒素似乎并不直接影响测试害虫。Lambert 等 (1992) 报道 Cry7Aa 不影响各种鳞翅目害虫的幼虫，且只对鞘翅目害虫具有很弱的活性，但是体外用胰蛋白酶预处理可增强其对鞘翅目害虫的活性。人们已经对一些代表性 δ -内毒素进行相关分析，认为寄主范围和毒性作用与蛋白质分子的不同结构域有关。分离的苏云金芽孢杆菌菌株通常产生 1 个以上的 δ -内毒素。很多体内和体外试验表明，两个或多个 δ -内毒素之间存在增效作用 (Schnepf *et al.*, 1998)；另一方面，舞毒蛾中的 Cry1Aa 和 Cry1Ab 之间可观察到拮抗作用 (Tabashnik, 1992)。

在利用微生物形式的苏云金芽孢杆菌测试植物中表达的单个 δ -内毒素敏感害虫的做法应当保持谨慎。如前所述，大多数苏云金芽孢杆菌菌株表达多种毒素，这些毒素经常相互作用。某些情况下，尽管孢子或毒素都对测试害虫无毒，但与孢子结合的 δ -内毒素却可表现出毒性 (Liu *et al.*, 1998)。 δ -内毒素经常可在植物中以截短的形式表达，有人推测，这种情况会增加 δ -内毒素对其他害虫的寄主范围。不过，应当指出，其他因素也可影响选择性 (见第四节)。很显然，害虫敏感性筛选方法需要保证测试害虫接触的 Cry 毒素与所讨论的抗虫植物中表达的 Cry 毒素相同或相等。例如，从封闭条件下生长的

大肠杆菌 *E. coli* 菌株中分离的 Cry 毒素，这种 Cry 毒素已经通过遗传改良而表达 δ -内毒素。

第二节 毒素和基因的命名或分类

与不了解产物的基因命名系统不同， δ -内毒素和产生 δ -内毒素的基因采用同样的命名法。不过，基因的标准命名法要求基因名称用小写的斜体字表示（如 *cry1A*）。而该基因产生的 δ -内毒素蛋白用规则的第一个字幕大写正体表示（如 Cry1A）。

Hofte 和 Whiteley (1989) 认为：分类系统应当将相似的毒素基因序列与对敏感害虫的活性联系起来。Hofte 和 Whiteley 将总共 52 个基因指定为 14 个不同的基因类型，并根据其对害虫的特异性将其分成 4 大类。这 4 大类基因包括 *cry I* ——对鳞翅目害虫具有特异性；*cry II* ——对鳞翅目和双翅目害虫具有特异性；*cry III* ——对鞘翅目害虫具有特异性；*cry IV* ——对双翅目害虫具有特异性。近来，在对 29 个不同的毒素蛋白进行的补充分析的基础上，又提出了 *cry V* 和 *cry VI* 两类 (Feitelson *et al.*, 1992)。不过，由于一些新发现的基因与已知基因的 DNA 具有很高的同源性，却具有不同的杀虫活性，因此这种分类方法已不能充分鉴定多种 δ -内毒素基因。因此，1993 年，成立了 δ -内毒素分类委员会，以修订 δ -内毒素的分类。

Crickmore 等 (1998) 依据基因产物的氨基酸序列相似性（而非生物学特性）提出了一种系统命名法。这种方法用公共的计算机程序构建系统进化树，在此基础上根据基因的可能进化关系绘制基因排列图。*cry* 基因的命名沿用 Hofte 和 Whiteley (1989) 的方法，只是大写和小写英文字母后的数字用阿拉伯数字代替罗马数字 (*cryII* 现为 *cry2*)。新的命名法确定：具有一定程度同源性的基因应当用相同的阿拉伯数字 ($\geq 45\%$)、同样的大写字母 ($\geq 75\%$) 以及同样的不加括号的小写字母 ($\geq 95\%$) 表示。对于氨基酸序列不同而基因序列同源性超过 95% 的某些基因产品也可用四级排序法。例如，Hofte 和 Whiteley (1989) 分类法命名为 *cryIA* (c) 的基因，Von Tersch 等 (1991) 将其命名为 *cry1Ac2*。需要指出的是，如果新的 Cry 毒素提交材料中用的是不同的四级排序法，名称相同而排序等级不同的毒素实际上可能是同一毒素。尽管有人提出争议，认为这一系统不能准确地满足蛋白质命名的标准，但对于大部分毒素而言，用之前的系统进行分类的基因，其名称不需要进行大的变动，且没有必要修改现有的大量文献。只有少数几个 *cry* 基因在新的命名系统下重新进行了命名（表 1）。苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因命名委员会现在是芽孢杆菌遗传保存中心 (Bacillus Genetic Stock Center) 的成员。目前列出的 δ -内毒素基因可从网页 (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/) 上查到 (Crickmore *et al.*, 2005)。

在新分类系统中，有 49 大类 *cry* 基因，即 *cry1*~*cry49*；2 大类 *cyt* 基因，即 *cyt1* 和 *cyt2*。2005 年末，总共有 314 个不同的 *cry* 基因（包括 26 个双 *cry* 基因）和 24 个 *cyt* 基因。近年来，通常每年有 20 个左右的新基因被归类加入进来。这一分类方法的应用大大推动了 δ -内毒素法律评价系统的国际协调。本文尽可能应用这一分类方法，某些情况下，在将旧分类系统作为参考文献引用时，也应用了旧的分类系统。

表 1 重新命名的一些 δ -内毒素基因 (旧分类系统与新分类系统对比)

旧分类系统	cryIG	cryIIIC	cryIIID	cryIVC	cryIVD	cytA	cytB
新分类系统	cry9A	cry7Aa	cry3C	cry10A	cry11A	cyt1A	cyt2A

数据来源: Crickmore et al., 1998。

第三节 δ -内毒素的特征

1. 原毒素

在孢子形成过程中, 在内生孢子相邻的苏云金芽孢杆菌细胞中形成的伴孢晶体包涵体为原毒素, 它由具有活性的 δ -内毒素前体及 DNA 组成 (Clarimont *et al.*, 1998)。就具有 3 个结构域的传统毒素 (如 Cry1, Cry2 和 Cry3) 而言, 在敏感害虫幼虫的中肠内, 这些无活性的原毒素的 C-末端被胰蛋白酶类的蛋白酶切割掉, 从而形成由 N 末端组成的具有活性的毒素 (Federici, 1993; Rukmini *et al.*, 1999)。

对鳞翅目害虫具有特异性的 Cry1 蛋白的大小为 130~140 kDa, 除了 Cry1I 之外, Cry1 蛋白以双锥形晶体包涵体的形式存在。目前已有大量不同的 *cry1* 基因序列 (Hofte 和 Whitely, 1989; Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2005)。Cry1A—Cry1G 原毒素含 1 100~1 200 个氨基酸, 原毒素分子的活性部分为 60~70kDa 的片段, 位于原毒素的 N 端。就很多 Cry 毒素而言, 从试验中无法知道其蛋白酶切位点, 但是可从同源性模拟方法中推导出来。双锥形的 Cry4A 和 Cry4B 原毒素, 大小约为 130kDa, 也由 1 100~1 200 个左右的氨基酸组成 (Knowles, 1994; Kumar *et al.*, 1996)。

Cry2, Cry3 和 Cry11A 原毒素分子更小, 只有 70kDa 左右, 与较大的原毒素的 N 末端部分相似。Cry2 蛋白形成的晶体为立方形, Cry3 形成的晶体偏菱形, Cry10A 和 Cry11A 形成的晶体为半球形 (Knowles, 1994)。这些较小的原毒素仍需要进行酶解, 包括从 N 末端切除部分氨基酸而形成活性毒素 (Bauer, 1995)。在某些害虫中, 也可以用与裂解其他 Cry 毒素不同的方法来裂解 Cry11A。Cry11A 被切割成两个片段, 大小分别为 30 和 35 kDa。Cyt 原毒素分子更小, 只有 29 kDa, 在 Cry 毒素不存在时为非晶体形状 (Knowles, 1994; Li, 1996)。该毒素溶解后以二聚体形式存在, 可在体外被蛋白酶 K 切割而露出活性位点 (Koni 和 Ellar, 1994; Li, 1996)。

δ -内毒素对不同种害虫的特异性不同, 在某些情况下, 部分原因可能是由于不同蛋白水解酶的存在。Cry1Ac 对甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 具有很强的活性, 但是几乎不影响大纹白粉蝶 *Pieris brassicae*。这两种害虫属于不同的科, 不具有亲缘关系。用来自不同害虫的蛋白酶进一步水解可产生不溶性产物, 但是其分子量因加工过程不同而异 (Lightwood *et al.*, 2000)。

2. 截短且具有生物活性的毒素

截短形式的活性毒素指的是, 大分子 Cry 毒素在昆虫中肠中通过酶切而获得的原毒素分子的 N 末端部分。然后这部分原毒素结构与受体结合, 最终由于膜损伤而死亡。分子量较小的 70 kDa 的 Cry2、Cry3 和 Cry11 有时被认为是大分子量 Cry 毒素的 N 末端部分

的截短形式，不过仍可对这些小分子进行某些加工 (Knowles, 1994)。29 kDa 的 Cyt 原毒素是二聚体，可酶切成活性单体 (Koni 和 Ellar, 1994; Li, 1996)。

3. 毒素的结构

已有文献公布了对鞘翅目害虫具有特异性的 Cry3A (Li *et al.*, 1991) 和对鳞翅目害虫具有活性的 Cyt2A δ -内毒素 (Li *et al.*, 1996) 的三维结构。并且已经确定了对鳞翅目害虫具有特异性的 Cry1Aa 的结构，它的结构与 Cry3A 相似 (Grochulskiet *al.*, 1995)。此外，近来又公布了 Cry2Aa (Morse *at al.*, 2001) 和 Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001) 的结构。根据序列相似性判断，其他的多个 Cry δ -内毒素具有相似的三维结构。最初的 285 个氨基酸为两束由 7 个两性分子组成的螺旋。其中 6 个螺旋绕成一周，中心是 Cry3A 分子。这些螺旋被称为结构域 I。结构域 II 由第 285~500 位的氨基酸氨基组成，形成 3 个反平行的 β -折叠。结构域 III 是以三明治形式排列的 β -折叠中其余的氨基酸 (由 Kumar *et al.*, 1996 综述)。

Cyt 原毒素只有 1 个结构域，其中两外层是 α -螺旋， α -螺旋被 5 条 β -折叠链围绕。这一原毒素实际上是两个分子结构域在 N-末端链处连接而形成的二聚体 (Li, 1996)。

4. δ -内毒素在微生物中的普遍性

苏云金芽孢杆菌通常可表达 1 个以上的 δ -内毒素，但是相同的 δ -内毒素可以出现在不同的分离菌株中。两项发表的研究特别检测了某种 δ -内毒素的普遍性。 δ -内毒素在 58 个新分离菌株中的分布情况表明：57% 的菌株含有 *cry1C* 基因，45% 的菌株含有 *cry1A (b)* 基因、34% 的菌株含有 *cry2A* 基因 (Kim *et al.*, 1998)。另一项对分离的 223 个菌株进行的研究着重检查了 3 类 δ -内毒素基因 (Ferrandis *et al.*, 1999)。他们发现在 66% 的菌株中含有 *cry1* 基因，62% 的菌株中有 *cry1A (c)* 基因，49% 的菌株中有 *cry1A (a)* 基因，43% 的菌株中有 *cry1D* 基因，35% 的菌株中有 *cry1C* 基因、34% 的菌株中有 *cry1A (b)* δ -内毒素基因 (Ferrandis *et al.*, 1999)。

根据苏云金芽孢杆菌鞭毛中抗原的差异，通常将苏云金芽孢杆菌菌株分成多个血清型，如 *Kurstaki* 血清型或 *Israelensis* 血清型。有时，可用生化和形态学标准来进一步区分不同的血清型。不过，由于 δ -内毒素基因主要在具有一定流动性的大质粒上运载，因此，亚种的划分 (subspecies designations) 并不一定可以预测 *cry* 基因的特定含量。一项对分离的 Bt 菌株的分析认为： δ -内毒素基因含量与微生物的血清型没有明显的关系 (Ferrandis, 1999)。已经证明，苏云金芽孢杆菌以外的其他细菌也可产生 δ -内毒素。1990 年， δ -内毒素类晶体蛋白首次在双酶梭菌 *Clostridium bif fermentans* 的 *malaysia* 血清型中报道 (de Barjac *et al.*, 1990)，然后在 12 个双酶梭菌 *C. bif fermentans* 亚种的 80% 菌株、13 个其他梭菌 *Clostridium* 的 8% 菌株、以及 13 个测试的苏云金芽孢杆菌中发现 (Barloy *et al.*, 1998)。在日本金龟子芽孢杆菌 *Bacillus popilliae* 中已经检测到 Cry2Aa δ -类内毒素，称为 Cry18Aa，其中日本金龟子芽孢杆菌 *B. popilliae* 是美国登记的一种农药产品，用于防治日本金龟子 (Zhang *et al.*, 1997)。

第四节 作用机制

人们对典型 δ -内毒素进行了大量的研究，使人们可理解毒素对敏感昆虫的作用方式。

伴孢晶体被昆虫摄入后通常会被昆虫蛋白酶溶解, 然后转变成具有活性的毒素。这种毒素与特异性受体结合, 并在昆虫肠道上产生孔道, 从而使细胞内环境失去平衡并导致败血病, 进而使昆虫死亡 (Broderick *et al.*, 2006)。此外, 这些毒素可能具有其他害虫防治功能, 如在致死性孔道形成之前规避毒素和导致取食麻痹, 很多情况下, 由于老龄幼虫的结合位点很少, 因此随着幼虫龄期的推进, 它们对 δ -内毒素越来越不敏感 (Gilliland *et al.*, 2002)。

1. 摄入和溶解

当无毒性的苏云金芽孢杆菌晶体包涵体被敏感性鳞翅目害虫摄入之后, 它们在幼虫中肠的高 pH (>9.5) 环境下溶解, 释放出 1 个或多个 δ -内毒素。不过, 很多中肠 pH 为中性的鳞翅目害虫的仍出现特异性毒素的溶解 (Koller *et al.*, 1992)。Cry3A 先被蛋白质水解, 使毒素在中性 pH 下可溶, 从而赋予毒素对鳞翅目害虫的活性, 因此出现溶解现象 (Carroll *et al.*, 1997)。与只有 1 个 Cry 蛋白的晶体相比, 多个 Cry 蛋白同时存在于包涵体中有利于溶解 (Aronson, 1995)。这些蛋白质为原毒素, 可在昆虫中肠中通过蛋白酶的作用转变成较小的活性毒素, 这种活性毒素可抵抗进一步的蛋白酶消化。这些活性毒素可与敏感害虫中肠上皮细胞上唯一的受体位点结合。各种 Cry1A 原毒素的蛋白质水解敏感性似乎对晶体中原毒素 N 末端连接的 DNA 敏感 (Clairmont *et al.*, 1998)。

很多研究表明, 与摄入了含有 δ -内毒素的苏云金芽孢杆菌晶体包涵体相比, 昆虫摄入了含有 δ -内毒素 (以原毒素或具有活性的截短形式毒素存在) 的植物材料后, 可控制相同的靶标寄主 (Mycogen 和 Novartis, 1995a、1995b; Plant Genetic Systems, 1998c; Mycogen 和 Pioneer, 2001a、2001b、2001c、2005a; Monsanto, 2002b、2002f)。有人认为, 溶解以及蛋白质水解阶段导致了 δ -内毒素对敏感害虫的选择性, 而且如果 δ -内毒素在植物中以截短的形式表达, 则更广泛的寄主可能会受到影响 (Stotzky, 2002; Hilbeck, 2002)。但是没有证据表明蛋白酶激活的或截短形式的毒素会改变非靶标生物寄主范围这一假说 (Mycogen 和 Novartis, 1995a、1995c; Plant Genetic Systems, 1998c; Mycogen 和 Pioneer, 2001a、2001b、2001c; 2005a; Monsanto, 2002b、2002d; Evans, 2002)。需要有另外的研究来更为清晰地阐述这些问题 (Evans, 2002)。

2. 与受体的结合

对于具有 3 个结构域的 Cry 毒素 (如 Cry1A 和 Cry2A) 而言, 尽管结合后的过程 (包括膜的插入和败血病) 也是致昆虫死亡所必需的 (Broderick *et al.*, 2006), 但 Cry 毒素活性分子与靶标害虫中肠粘膜 (microvillae) 上皮细胞刷状缘膜囊上的受体结合是获得毒性的必要过程 (Hoffman *et al.*, 1988)。Bt δ -内毒素的特异性主要决定于毒素与膜上特定受体位点的结合能力。不过, 有研究表明, 很多毒素可与多个受体结合 (Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1990a; Denolf *et al.*, 1993; Estada 和 Ferré, 1994; Escriche *et al.*, 1994), 1 个受体可结合多个毒素 (Escriche *et al.*, 1997), 而且不同的 Cry 毒素可竞争相同的结合位点 (Hua *et al.*, 2001; Estela *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004)。人们认为 δ -内毒素分子受体结合结构域的氨基酸序列可以预测寄主的反应 (Bauer, 1995 综述)。 δ -内毒素分子的结合结构域显然是具有活性的毒素分子的最可变区域 (Hofte 和 Whitely, 1989)。一些情况下, 活性毒素分子的结合与毒性直接相关 (Luo *et al.*, 1997;

Jurat - Fuentes *et al.*, 2000), 但是结合并不一定与体内毒性相关 (Van Rie *et al.*, 1990a; Gould *et al.*, 1992; Escriche *et al.*, 1994)。在一些研究中, 某些 Cry1 毒素的结合与毒性强度具有相关性, 从而进一步支持了毒素结合与毒性强度之间具有相关性 (Gilliland *et al.*, 2002)。Lee 等 (1999) 提出的假说认为: 受体结合与毒性不具有相关性是因非功能受体或者是由于与多个受体结合所致。

人们认为, 通过结构域 II 与 3 条反平行 β -折叠之间的相互作用, 活性毒素分子与昆虫中肠中特定受体发生高亲和性结合 (Knowles, 1994 综述)。根据 Cry 毒素定向突变研究结果, 提出了毒素作用机制的修订模型。Dean 等 (1996)、Aronson 和 Shai (2001) 认为: 对很多昆虫来说, 结构域 III 也参与了活性毒素分子与受体的结合。例如, de Maagd 等 (2000) 研究表明: 从 Cry1Ca 中转移活性结构域 III 到 Cry1 毒素中, 从而在一些 Cry1 毒素中产生了对甜菜夜蛾 *Spodoptera* 的活性, 因此结构域 III 是毒素对斜纹夜蛾 *Spodoptera exigua* 毒性所必需的。不过, 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 这一特例中, 结构域 III 对毒性和结合的影响很小 (Ballester *et al.*, 1999)。

在很多昆虫中已经鉴定出各种 δ -内毒素的推断受体。受体与毒素结合的结构图 (emerging picture) 很复杂。同一毒素可能与不同的受体结合, 不同的毒素可能与同一受体结合。例如, 据报道, Cry1C 既可与 40 kDa 蛋白结合 (Kwa *et al.*, 1998), 又可与 106 kDa 的氨肽酶-N 糖蛋白结合 (Luo *et al.*, 1996)。Wang 和 McCarthy (1997) 鉴定了 7 个 Cry1C 结合蛋白 (137, 120, 115, 68, 63 和 45 kDa)。在二化螟 *Chilo suppressalis* 和三化螟 *Scirpophagus incertulis* 中, Cry1Ab 和 Cry1Ac 竞争同一结合位点 (Alcantara *et al.*, 2004)。Cry1Ac 结构域 III 的突变体不再与氨肽酶-N 结合, 不过, 仍具有对烟草天蛾 *Manduca sexta* 的毒性, 这说明存在另外的受体 (Jenkins *et al.*, 1999)。

氨肽酶-N 蛋白属于锌依赖型金属肽酶, 已知这类蛋白的作用是作为很多 δ -内毒素蛋白的受体。Cry1Aa 与氨肽酶-N 家族蛋白的高度保守区结合 (Nakanishi *et al.*, 1999)。对黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中肠氨肽酶进行的详细分析表明, 哺乳动物氨肽酶-N 具有一些共同特征, 但是底物结合和催化残基却不同 (Cristofolletti 和 Terra, 2000)。Luo 等 (1997) 发现, 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的氨肽酶-N 可与 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 结合, 但是不与 Cry1C 或 Cry1E 结合。卷叶蛾刷状缘膜微囊中的 120 kDa 氨肽酶-N 可与 Cry1Ac 和 Cry1Ba 二者结合 (Simpson 和 Newcomb, 2000)。氨肽酶类蛋白上存在的 2 个氨基酸的差异, 完全可以使印度谷螟 *Plodia interpunctella* 抵抗 Cry1Aa 毒素 (Zhu *et al.*, 2000)。经鉴定, 鳞翅目害虫烟草天蛾 *Manduca sexta* Cry1A (c) 毒素的受体为 120 kDa 的氨肽酶-N (Knight *et al.*, 1994)。Cry1Ac 和 Cry1Fa 这两个 δ -毒素可与烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* 中一些氨肽酶-N (110、120 和 170 kDa) 结合 (Banks *et al.*, 2001)。一项关于 Cry1Ac 与舞毒蛾 *Lymantria dispar* 氨肽酶-N 结合的全面调查表明, 通过 Cry1Ac 结构域 III 上的某一区域, 氨肽酶开始被识别; 然后通过结构域 II 上的某一区域, Cry1Ac 与氨肽酶紧紧地结合在一起 (Jenkins *et al.*, 2000)。不过, 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 中 Cry1C、Cry1E 和 Cry1Ab 的研究表明, 结合特异性是由于结构域 II 的作用, 未检测到结构域 III 参与了这一过程 (Ballester *et al.*, 1999)。

关于锌依赖型中性金属氨肽酶已进行了详尽的研究。它们属于 M1 家族中, M1 家族

是 36 个家族中 1 个超家族的一部分。目前, 存在两种独特的识别类型, 即细菌氨肽酶-N 和哺乳动物氨肽酶-N。已有大量的研究着重于特定昆虫氨肽酶-N δ -内毒素受体编码基因的克隆和测序上 (Knight *et al.*, 1995; Denolf *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998; Garner *et al.*, 1999; Yaoi *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2001)。这些氨肽酶在昆虫中将单个氨基酸从 N 末端切下, 从而在蛋白质消化过程中起着重要作用 (Ortega *et al.*, 1996)。根据现有的测序信息可以推断: 昆虫的氨肽酶-N 是氨肽酶中独特的、截然不同的组 (不同于细菌氨肽酶和哺乳动物氨肽酶), 而且这些氨肽酶十分多样, 属于 3 组以上不同的中肠氨肽酶 (Gardner *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2001)。

碳水化合物可能参与了氨肽酶的结合, 使 δ -内毒素与昆虫中肠细胞进一步特异性结合。Cry1Ac 结构域 III 突变型 δ -内毒素已经被开发, 它与烟草天蛾 *Manduca Sexta* 的结合能力降低。这一突变的 Cry1Ac δ -内毒素不受碳水化合物 N-乙酰半糖胺的抑制, 但 N-乙酰半糖胺却抑制野生型 Cry1Ac 的结合, 这就说明烟草天蛾 *Manduca Sexta* 氨肽酶-N 中的碳水化合物参与了毒素的结合机制 (Burton *et al.*, 1999)。但情况并非常常如此, 与 Cry1Ac 和 Cry1Fa 结合的烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* 中 100 kDa 的氨肽酶-N 并不含 N-乙酰半糖胺碳水化合物 (Bankset *et al.*, 2001)。在一个对 Cry5B 和 Cry14A 敏感的植物一病原线虫系统中, 进一步表明了碳水化合物参与了结合过程 (Griffitts *et al.*, 2001)。含有突变失活的 β -1, 3 半乳糖转移酶基因的线虫对 δ -内毒素具有抗性。半乳糖转移酶催化半乳糖转移到糖蛋白和糖脂上。进一步研究认为, 敏感线虫中 Cry5B 的结合受体为碳水化合物 (Huffman *et al.*, 2004)。近来的研究表明, 具有 3 个结构域的杀线虫和杀虫 Bt 毒素利用无脊椎动物的糖脂作为寄主细胞受体 (Griffitts *et al.*, 2005)。

已知另一类 δ -内毒素受体与钙调素蛋白超家族有关。钙调素是钙依赖型蛋白, 通常具有细胞对细胞黏附特性。已有研究表明, 从家蚕 *Bombyx mori* 中分离的 175 kDa 钙调素类糖蛋白 (BtR175) 为 Cry1Aa 的受体 (Nagamatsu *et al.*, 1998)。在抗 Cry1Aa 的草地贪夜蛾 *Spodoptera fugiperda* Sf9 离体系统中加入 BtR175 基因, 可使该昆虫对 Cry1Aa 毒素敏感 (Nagamatsu *et al.*, 1999)。在烟草天蛾中发现另一种 210 kDa 的钙调素类糖蛋白, 它与 Cry1Ab δ -内毒素结合 (Vadlamudi *et al.*, 1995; Francis 和 Bulla, 1997)。此外, 研究表明烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* 含有钙调素类的 Cry1Ac 受体蛋白 (Gahan *et al.*, 2001)。

钙调素超家族由 6 个以上的亚家族组成。脊椎动物钙调素在超家族中占有独立的地位 (Nollet *et al.*, 2000)。这些昆虫结合蛋白的独特性进一步揭示了 Cry 毒素对哺乳动物不具有毒性。

人们对 Cyt δ -内毒素受体结合过程的了解不如 Cry 毒素详细。根据人造膜进行的离体试验, 人们最初认为, Cyt 毒素可溶解大量无脊椎动物和脊椎动物细胞 (包括哺乳动物红细胞), Cyt 毒素直接插入到昆虫中肠膜上, 而不是结合到特异性受体上。但是, 最近对蚊子的研究数据表明, Cyt 毒素 (尤其是 Cyt1A 毒素) 可在中肠与特定区域结合 (Ravoahangimalala *et al.*, 1993; Ravoahangimalala 和 Charles, 1995)。这一结合过程似乎与膜的损伤过程相关性更强, 而与 Cry 毒素的相关性小 (Li *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997; Du *et al.*, 1999)。

3. 孔道的形成和细菌性败血症

结合和孔道的形成是毒素对昆虫具有最佳活性的必需条件。研究表明,只有毒素的结合不足以产生毒性。黄粉虫幼虫中肠膜上的两个蛋白(分别为 137 和 107 kDa)可以与 Cry1Aa 结合,但黄粉虫却对 Cry1Aa 毒素具有抗性(Nagamatsu *et al.*, 1998)。Escriche 等(1998)研究表明, Cry1Ab 可与棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis* 结合,但是不产生孔道,体内分析表明, Cry1Ab 只对棉贪夜蛾 *S. littoralis* 有少量活性。活性 δ -内毒素分子与昆虫中肠刷状缘膜上的特异性受体结合之后,毒素插入到膜中。Cry 和 Cyt 毒素反向插入到膜中。

Cry δ -内毒素插入之后,受体—毒素复合物形成聚合体,聚合体可在膜上形成孔道(Walters *et al.*, 1993; Knowles, 1994; Soberon *et al.*, 2000)。原生质膜上形成的孔道能够破坏细胞内的渗透平衡,使孔道膨大和爆裂,导致害虫停止取食。Cry 蛋白的结构域 I 是孔道形成结构域(Walters *et al.*, 1993; VonTersch *et al.*, 1994)。结构域 I 左边的超螺旋由 α -螺旋组成,显然是膜插入的结构(Li, 1996)。白喉毒素和大肠杆菌李 A 也可以在膜上形成孔道,尽管 Cry δ -内毒素与白喉毒素和大肠杆菌素 A 的氨基酸序列不相似,但其结构域中的 α -螺旋与白喉毒素和大肠杆菌素 A 相似。Schwartz 等(1997)的研究表明,受体与结构域 III 的相互作用可能影响膜上孔道的形成。也有人正在进行更为细致的研究,如 Masson 等(1999)研究表明 Cry1Aa 结构域 I 的 α -螺旋 IV 一侧的带电荷氨基酸参与了离子跨孔道的运输。Cry1Ab α -螺旋 VII 的非保守性点突变使蛋白质不易降解,同时保守性突变影响离子通道的活性(Alcantara *et al.*, 2001)。Gerber 和 Shai(2000)研究表明, α -螺旋 IV 和 α -螺旋 V 的发夹环插入到膜中,使通道成直线,且 α -螺旋 V 参与了 Cry1Ac 的寡聚化。然而,对 Cry1Ab α -螺旋 V 中的残基进行突变表明,该螺旋参与了孔道的形成,并在毒素的稳定性中起作用,但他并没有参与寡聚体的形成过程(Nunez-Valdez *et al.*, 2001)。

Cyt δ -内毒素具有不同的膜插入机制。与 Cry 蛋白在中肠膜上形成小孔/通道不同,体外研究数据表明, Cyt1A 通过膜上洗涤剂类物质的干扰诱导渗透性提高(Butko *et al.*, 1997; Manceva *et al.*, 2005)。对 Cyt2A 进行结构分析表明,它的外面由两层 α -螺旋组成,四周被 β -折叠围绕。用毒性降低的突变体进行进一步研究发现, β -折叠的分子成分在膜的结合和孔道形成(膜的损伤)中起作用(Li *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997; Du *et al.*, 1999)。 β 链很长,完全可以横跨膜的疏水区(Li, 1996)。用结构相似的 Cyt1A 进行的研究表明, Cyt1A 通过两个 α -螺旋使膜内的几个单体组装,从而使膜紊乱(Gazit *et al.*, 1997)。Cyt δ -内毒素的结构分析表明,表面的螺旋发夹结构首先脱落,露出 β 链,然后使膜受到损伤(Li, *et al.*, 2001)。近来的研究表明, Cyt2Aa1 单体与膜结合,并插入到膜中。然后单体相互靠近,结合成寡聚体并形成大的孔道(Promdonkoy 和 Ellar, 2003)。

昆虫中肠膜上受体结合以及孔道形成的体外测试表明,受体结合以及孔道形成可以预测毒素对敏感害虫的体内毒性。不过,一些 δ -内毒素在体外条件下活性很强,却具有很小的体内活性,这就说明其他机制可能在毒性中起作用(Peyronnet *et al.*, 1997)。这也可能是由于毒素的溶解性或蛋白水解活性的差异,或由于试验的局限性造成的。不同昆虫

的中肠 pH 不同,用烟草天蛾中肠膜进行的体外试验表明, pH 可影响孔道的形成 (Tran *et al.*, 2001; Carroll *et al.*, 1997)。在高 pH 条件下, Cry1C 介导的渗透性比 Cry1Ac 低得多,体内测试表明烟草天蛾对 Cry1C 的敏感性比对 Cry1Ac 的敏感性低。昆虫对 δ -内毒素敏感性不同的另一机制可能是,昆虫具有某种机制,可修复细胞溶解而引起的破坏。而且,昆虫所修复的程度可能取决于很多因素,例如昆虫寄主的遗传学、寄主的龄期、摄入毒素的剂量和强度,以及各种环境因素 (Bauer, 1995)。如果不能修复,靶标昆虫通常在感染细菌性败血病后 2~3 天后死亡 (Broderick *et al.*, 2006)。昆虫的血淋巴为各种感染细菌提供了丰富的营养。微生物 Bt 农药能够综合苏云金芽孢杆菌孢子和 δ -内毒素蛋白的作用,从而加快细菌性败血病的发展,但是在有些情况下,孢子并不影响毒性水平 (Liu *et al.*, 1998)。

第五节 δ -内毒素基因在植物中的表达

在过去的 20 多年中,一些文献,如 Mendelsohn 等 (2003) 检测了苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因在各种植物中的引入和表达。1986 年美国环境保护局首次批准了植物农药产品转基因烟草的环境释放,该转基因烟草的 δ -内毒素分离当时为 berliner 亚属的自苏云金芽孢杆菌。由于真核生物和原核生物的转录和翻译系统不同,在真核植物细胞中实现原核 δ -内毒素基因的高水平表达存在很多限制因素。转录调节、mRNA 的稳定性、密码子偏好性以及翻译效率的差异都导致植物中插入的 Bt Cry 基因进行频繁的修饰 (见 De la Riva 和 Adang, 1996 综述)。近来的工作发现,基因插入到植物叶绿体可使表达水平显著提高。一项试验表明,叶绿体中 Bt cry2Aa2 操纵子使毒素在叶片中的表达量占到可溶性蛋白的 45.3%。他们在试验中发现了杀虫晶体的形成 (De Cosa *et al.*, 2001)。

1. 基因插入方法

很多重组 DNA 技术可用于抗虫植物的基因工程中。通过 Bt δ -内毒素基因的插入 (De la Riva 和 Adang, 1996)。最常用的方法是利用植物寄生细菌——土壤根癌农杆菌介导的转化 (Gasser 和 Fraley, 1989; Cheng *et al.*, 2004)。另一种常见的植物转化方法是通过微粒子轰击直接进行的基因转移。

2. 启动子

最初产生的 Bt 转基因植物,是利用组成型启动子控制的全长原毒素或截短 cry 基因进行的。尽管含 N 末端的截短 cry 基因比全长原毒素更为成功,但是毒素蛋白的表达量很低。目前,已有各种不同的启动子可在时间上和空间上驱动 Bt 基因的表达 (Potenza *et al.*, 2004)。最常用的启动子是花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV 35S)。尽管 CaMV 35S 已在转基因玉米中应用,但该组成型启动子在它在双子叶植物中的活性高于单子叶植物。单子叶植物中活性较强或组成型启动子包括水稻肌蛋白 1 启动子、玉米 Emu 启动子、玉米多聚泛素 1 启动子 (De la Riva 和 Adang, 1996)。

3. 植物表达水平

20 世纪晚期出现的一些出版物详细介绍了含有苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素的转基因植物 (Barton *et al.*, 1987; Fischhoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987)。早期人们用全长

原毒素进行植物的基因工程,得到的转基因植株中 δ -内毒素的表达量很低,不足以对害虫进行适当的防治。利用只含活性 N-末端区而非全长原毒素的截短 δ -内毒素进行基因工程,尽管发现对害虫的活性提高,但如果不进行进一步改良仍然无法实现高效率表达(Vaeck *et al.*, 1987; Koziel *et al.*, 1993)。据报道,利用截短的毒素,可从烟草和番茄中获得占总叶片可溶性蛋白含量 0.02%的 δ -内毒素(Kumar *et al.*, 1996)。与 De la Riva 和 Adang (1996) 报道的结果一样, Shivakumar 等 (1986) 用全长原毒素获得的表达量只占烟草叶片总蛋白含量的 0.0001%,但是用截短的重组 *cryIAb* (*cry1Ab*) 基因却获得了占烟草叶片总蛋白 0.07%的表达量。通常,大多数美国登记的植物农药产品中 Cry 蛋白的最大表达量只在干重的 0.001%以内(见表 2)。

δ -内毒素在植物中的表达水平变化很大,即使用截短的毒素也是如此,其表达量受很多因素影响。对 *cry* 基因序列进行修饰可使这些序列与植物转录系统或翻译系统更兼容,从而增加表达量(Perlak *et al.*, 1991)。在一篇综述文章中, De la Riva 和 Adang (1996) 建议,为了增加转基因植物中 δ -内毒素的表达,应当对 *cry* 基因序列进行如下修饰:①在密码子 2 和 3 的位置上删除 CG 和 TA 二核苷酸,并保留植物中典型的 AT 碱基,从而利用密码子的偏好性;②对引起 mRNA 不稳定或使 mRNA 降解的序列进行修饰,包括多聚腺苷酸信号、终止子序列或剪接位点;③降低可形成发夹结构的 mRNA 区域,或降低可影响核糖体运输速度的 mRNA 的其他次级结构;④将核苷酸侧翼的 ATG 拼接序列进行优化,以有利于蛋白质的翻译(和终止);⑤引入植物病毒非翻译 mRNA 前导序列以提高起始翻译。

原核基因和真核基因的结构差异是影响基因在植物中有效表达的限制性因素是。例如,真核基因的编码区被称为内含子的非编码区隔开,而内含子通常不存在于原核生物中。此外,与植物编码基因相比,苏云金芽孢杆菌的 *cry* 基因富含 AT。已经证明,植物中富含 AT 的区域通常在不具有编码功能的内含子内,并对多聚腺苷酸化起调节作用。*Cry* 基因中富含 AT 的区域作为多聚腺苷酸化信号或作为 RNA 聚合酶的终止序列,可能使植物 RNA 不稳定。此外, *cry* 基因中的多聚 ATTTA 序列可能充当了 mRNA 的降解信号。其他 AT 序列可使 mRNA 进行不正确的剪切(De la Riva 和 Adang, 1996)。

除了 δ -内毒素原核基因中 A、T 碱基的百分比含量高之外,原核生物和真核生物之间密码子使用的偏好性也使 δ -内毒素在植物中的表达效率低。尽管苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因通常以 A 或 T 作为第 3 个碱基,但植物通常以 G 或 C 作为第 3 个碱基。尽管 AU 识别的 tRNA 在植物中含量很低,但是如果 AT 含量高的细菌基因插入到植物中,则 δ -内毒素的翻译和合成速率降低(De la Riva 和 Adang, 1996)。

此外,可能存在基因时空表达的不同。例如,在印度检测的 8 个棉花杂交种中 Cry1Ac 的表达量不同,而且随着植物龄期的增长表达量一直降低,这引起了人们对表达效率的关注(Kranthi *et al.*, 2005)。其他试验也表明随着植物龄期的增长, Cry1Ac 在棉花中的表达量显著降低(Greenplate, 1999), Cry1Ab 在玉米中的表达量显著降低(Dutton *et al.*, 2004)。

4. 植物体各部分的差异表达

目前的基因工程技术可特异性控制 δ -内毒素在植物各部分中的表达。不过,迄今为

止, 大多数开发的转基因产品在植物各部分中的表达量显著不同 (表 2)。组成型强启动子如 CaMV 35S 通常可使其控制下的基因产物 (如 δ -内毒素) 在植物各组织中表达。不过, 玉米花粉中基因表达量低、棉花花粉中基因表达量相对较低, 这就说明 CaMV 35S 启动子似乎在花粉中的表达不佳 (Kozeil *et al.*, 1993)。一些组成型启动子如 MON 863 玉米 (Cry3b) 中使用的 CaMV 4AS1 在花粉中的表达效果很好。一些转基因植株利用组织特异性启动子而使 δ -内毒素限定在特定的植物组织中表达。例如, 用一个来源于磷酸烯醇式丙酮酸羧酸酶基因的启动子来启动 *cryIAb* (*cry1Ab*), 使基因在玉米绿色组织中表达 (Hudspeth 和 Grula, 1989)。通过在叶绿体中插入 δ -内毒素开发出了组织特异性转基因烟草, 该烟草可使插入基因高数表达 (McBride *et al.*, 1995)。此外, 用一个来源于玉米钙依赖型蛋白激酶基因的启动子可使 δ -内毒素只在花粉中表达 (Estruch *et al.*, 1994)。这些选择性表达技术有助于将接触针对靶标昆虫或限制非靶标昆虫的接触。

表 2 表达 5 种不同 δ -内毒素的转基因玉米中 δ -内毒素表达量的变化实例

Cry 蛋白的组织表达*

有效成分/ OECD 的唯一识别码 (ID)	叶片	根	花粉	种子	全植株
Cry1Ab SYN - BT11-1	3.3 ng/mg	2.2 ~ 37.0 ng/mg 蛋白	< 90 ng Cr-ylAb/g 干花粉	1.4ng/mg (玉米仁)	—
Cry1Ab MON - 00810-6	10.34 ng/mg	—	< 90ng Cr-ylAb/g 干花粉	0.19 ~ 0.39 ng/mg (玉米粒)	4.65 ng/mg
Cry1F DAS - 01507-1	56.6 ~ 148.9 ng/mg 总蛋白	—	113.4 ~ 168.2 ng/mg 总蛋白或 31 ~ 33 ng / mg 花粉	71.2 ~ 114.8ng/mg 总蛋白	803.2 ~ 1572.7 ng/mg 总蛋白
Cry3Bb1 MON - 00863-5	30 ~ 93ng/mg	3.2 ~ 66ng/mg	30 ~ 93ng/mg	—	13 ~ 54ng/mg
Cry34Ab1 DAS - 59122-7	5 ~ 302 ng/mg 干重	24 ~ 102 ng/mg 干重	63 ~ 88 ng/mg 干重	29 ~ 85 ng/mg 干重	9 ~ 88 ng/mg 干重
Cry35Ab1 DAS - 59122-7	2 ~ 113 ng/mg 干重	1 ~ 16 ng/mg 干重	0 ~ 0.2 ng/mg 干重	1 ~ 2 ng/mg 干重	1 ~ 16 ng/mg 干重

注: * 表中的信息直接由公司提供, 提交数据时由于没有对表格形式提出特定要求, 因此各行之间存在差异。提供的数据只是为了说明在植物各组织中存在差异。

第六节 δ -内毒素在植物中的风险评估

1. 概论

在评价产物对非靶标生物体的潜在毒性时, 与应用含有同一 δ -内毒素的微生物 Bt 制剂相比, 应用转基因植物中表达的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素存在相同的风险问题。1948 年

美国登记了第一个作为农药用的微生物（波林芽孢杆菌 *Bacillus popilliae*），1961 年登记了第一个苏云金芽孢杆菌微生物农药。此后，传统化学农药评估系统不断演化为完善的管理体系。Bt 植物的风险评估框架受微生物和化学农药风险评估经验的影响，并扩展到转基因作物（Mendelsohn *et al.*，2003；Romeis *et al.*，2006a；Romeis *et al.*，2006b）。与化学物的风险评估（见欧盟法第 1488/94 规定）一样，Bt 植物的评估应当考虑其危害的潜力，同时也应当考虑毒素的扩散和残留对敏感生物的影响。

由于苏云金芽孢杆菌菌株可产生其他毒素，因此以微生物形式存在的苏云金芽孢杆菌可能产生的潜在危害相对于植物所产生的 δ -内毒素危害并不一定相同。不过，已登记的苏云金芽孢杆菌微生物农药菌株实际上对哺乳动物无毒，对非靶标陆地生物和水生生物低毒（USEPA，1998）。目前已经证明微生物毒素对非靶标生物，如水蚤的毒性可能是由其产生的其他毒素引起，而不是 δ -内毒素（USEPA，1998）。而且来源于微生物孢子或晶体中的 δ -内毒素在环境中可以很快降解。由于这种毒素对非靶标生物的毒性可以忽略不计，且它在环境中的残留期短，因此可以推断，已登记的苏云金芽孢杆菌微生物农药的风险可以忽略不计（USEPA，1998）。近来对植物和微生物来源的 δ -内毒素的持久性研究表明，它们可与土壤中的某些物质结合，从而增加其在土壤中的持效期（Saxena 和 Stotzky，2000；Stotzky，2000；Crecchio 和 Stotzky，2001；Saxena *et al.*，2002a，2002b），但是没有发现由于接触量的增加而对生物产生不良影响。与天然存在的苏云金芽孢杆菌微生物相比，通过基因工程将 δ -内毒素导入植物中，由于去掉了可能产生外毒素的菌株，因此降低了风险。与此同时，与传统 Bt 制剂的应用相比，基因工程 Bt 作物的应用可能使人们更长久、更大量地接触到以截短活性形式存在的 δ -内毒素。从目前掌握的关于长期栽培转 Bt 植物对土壤残留毒素影响的研究表明，在土壤中检测不到残留毒素的存在，并且似乎经过长时间的积累，毒性也无法在土壤中建立（Sanvido *et al.*，2006）。

科学文献已有很多关于苏云金芽孢杆菌对非靶标生物（包括人类）影响的例子，但这些测试都是用微生物制剂进行的，其中含有多种毒素。近年来，已有很多出版物描述了分离的苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素对靶标生物和非靶标生物的影响（见苏云金芽孢杆菌毒素特异性数据库，van Frankenhuyze 和 Nystrom，1999）。这些毒素蛋白也已在植株中进行了广泛的研究（Bhatti *et al.*，2005a、2005b；Bitzer *et al.*，2006；Daly 和 Buntin，2005；Dively，2005；Head *et al.*，2005；Lopez *et al.*，2005；Naranjo，2005a、2005b；Naranjo *et al.*，2005；Pilcher *et al.*，2005；Prasifka *et al.*，2005；Torres 和 Ruberson，2005；Whitehouse *et al.*，2005）。

很多的私营公司或检测实验室提供了大量研究数据，支持针对基因工程产品的法规（Mendelsohn *et al.*，2003；Romeis *et al.*，2006b）。尽管这些信息比公共文献要难以获得，但对于讨论当前的研究有用。应当强调的是，公司提供的任何有助于支持法规的数据信息必须符合数据质量标准的评定。这些标准以良好实验室操作规范为依据，并在国家法律（美国联邦法第 40 号第 160 条；欧盟指令 87/18/EEC 和 88/320/EEC）中明文规定，国际组织如 OECD 也对其进行了规范（GLP，2006）。

附录 1 简要总结了 USEPA 收到的关于 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry3A、Cry9C、Cry1F、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1、和 Cry35Ab1 δ -内毒素在植物产品中的毒性检测报告。

附录表中各种数据可作为例子支持法规决议，但表中不包含决议文件的详细信息。其他 δ -内毒素的数据将会被审查人员定期接收，并通过各种国内外数据库向公众公布。表中的部分研究成果已提交给其他国家进行评估，并应用到这些产品的国际审批中。欧盟科学委员会的研究意见可在以下网页上查询：http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/catindex_en.html；植物科学委员的意见可以在http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/outcome_gmo_en.html，和http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/outcome_en.html#opinions。上查询。至少有一个国家（英国）设立了专门的网站<http://www.defra.gov.uk/environment/gm/regulation/index.htm>，列出了对部分研究或全部研究的科学意见。此外，美国生物技术法律局（United States Regulatory Agencies Unified Biotechnology）网站（<http://usbiotechreg.nbio.gov/>）列出了他们对转基因作物修正的法规，国际生物安全信息交换所网站（<http://bch.biodiv.org/decisions/default.shtml>）虽设有专业数据库，但可查阅其他国家的转基因植物法规。

δ -内毒素的接触量与含有 δ -内毒素的植物种类以及 δ -内毒素转移到其他植物中的潜力有关。已经在很多作物中对各种 δ -内毒素进行了田间检测，这些作物包括玉米、马铃薯、棉花、大豆、花生、紫花苜蓿、花椰菜、酸果蔓、茄子、油菜、水稻、西红柿、烟草、胡桃、云杉、苹果、白杨树（OECD 田间试验的 BioTrack 数据库网页：<http://webdominol.oecd.org/ehs/biotrack.nsf>；生物安全信息交换所网页：<http://bch.biodiv.org/decisions/default.shtml>）。已商品化的 δ -内毒素产品包括马铃薯、玉米和棉花（<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>）。

Bt 作物的风险评估是以其他转基因作物的风险评估过程为基础。对植物的潜在不利的影响应考虑到杂草发生增加的可能性及其对环境产生的不良影响。在评价转基因植物增加杂草潜在发生的同时，也应考虑转基因植物与野生近缘种之间杂交的风险。 δ -内毒素基因与野生近缘种的异型杂交可能会使非靶标的敏感昆虫间接中毒。在 Bt 作物栽培的同时还应考虑濒危物种。此外，连续接触苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素可能会对昆虫产生亚致死效应，或使原先对 δ -内毒素致死效应敏感的昆虫变得不再敏感。

2. 对人类健康影响的评估

(1) 急性毒性

通过苏云金芽孢杆菌微生物产品几十年的使用，其对哺乳动物的毒性人们已经做出了评价。苏云金芽孢杆菌的毒理学数据库表明， δ -内毒素对哺乳动物的健康没有产生影响。在对其进行各种传染性和致病性研究后得到了啮齿动物口服、肺部接种和静脉接种后，苏云金芽孢杆菌从啮齿动物的清除模式（McClintock et al., 1995a、1995b）。在这些研究中，无论是体重增加还是临床死亡率的观察，还是尸检时对测试动物内部器官的检查，均未报道测试微生物对人类健康产生明显的不良影响。为了获得 Bt 植物风险评估的支持数据，人们用 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry9C、Cry3A、Cry1F、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1 进行了急性毒性测试（DEKALB, 1997；Monsanto 和 Novartis, 1996a；Monsanto, 1995a、1995b、2001a、2001b、2001c；Mycogen 和 Novartis, 1995c、1995d；Plant Genetic Systems, 1998c；Mycogen 和 Pioneer, 2001d、2001e、2005b）。就这些研究而言，要求饲喂分析中设置产生毒性的最大剂量，由于从植物中提取不到足量的

纯毒素来满足标准的限定剂量，因此选用基因工程微生物培养产生毒素。这一方法要求对微生物产生的毒素进行分析，以表明该毒素与植物产生的毒素十分相似，分析方法采用了大量的技术包括十二烷基磺酸钠一聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、酶联免疫分析（ELISA）、Western 印迹、N-末端氨基酸序列、糖基化和生物活性（寄主范围）测定等。在所有情况下，小鼠经口服3 760~5 220 mg/kg 高剂量的 δ -内毒素后，均未发现不良反应。欧洲食品安全局（European Food Safety Authority, EFSA）评价了玉米植株中 δ -内毒素表达的食品安全性，如 Bt11 中的 Cry1Ab（EFSA, 2005a）、Tc 1507 中的 Cry1F（EFSA, 2005b）、MON 863 中的 Cry3Bb1（EFSA, 2004）、MON 810 与 MON 863 杂交种中的 Cry1Ab 和 Cry3Bb1（EFSA, 2005c）。家禽、猪、牛进行的短期饲喂/毒性试验，补充了 Cry1Ab 在胃肠道中的变化情况（Jennings *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2003; Einspanier *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2005）。Cry1Ab 在胃肠道中不完全降解，基因片段和免疫蛋白片段仍然存在于肠内容物和排泄物中，但是无论在动物组织或是周围血液中都看不到残留的 DNA 或蛋白，也没有发现与研究结果相关的任何风险。

δ -内毒素在敏感昆虫中的作用机制已被广泛了解，并在本文的第四节中进行了讨论。在昆虫的中肠内， δ -内毒素与细胞膜上的唯一受体结合，形成孔道，破坏渗透平衡，最终引起败血病（Gill 和 Ellar, 2002; Broderick *et al.*, 2006）。在可能受到影响的哺乳动物中，尚不清楚是否存在相同的受体位点（Noteborn *et al.*, 1995）。认为昆虫中存在特定作用模式的其它因素有：鳞翅目中肠依赖独特的 ATPases 来调节钾离子的流入，昆虫中肠对离子胁迫具有特有的敏感性（Knowles, 1994）。即使当 Cry 毒素位点结合蛋白在哺乳动物细胞中表达时，这些结合蛋白也不能以适当的形式使毒素与哺乳动物的细胞结合（Keeton 和 Bulla, 1997）。另外，哺乳动物肠道的酸性更强，这也会使 Cry 蛋白降解。

近来的一些研究发现，某些苏云金芽孢杆菌菌株对免疫功能不全的小鼠以及接种了流感病毒的小鼠产生了一些毒性。不过作者认为，这些影响是由芽孢杆菌 *Bacillus* 的毒素所致，而非 δ -内毒素（Hernandez *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2000）。人体组织感染与其具有近似图谱的炭疽杆菌 *Bacillus anthracis* 菌株的表现进一步支持了这一结论，即该杆菌不仅具有表达 δ -内毒素晶体的质粒，而且还表达一种与强活性炭疽杆菌毒素相似的哺乳动物毒素（Hill *et al.*, 2004）。另一种不含 δ -内毒素的苏云金芽孢杆菌菌株实验表明其对哺乳动物的毒性似乎是由没有溶血毒素所致（Salamitou *et al.*, 2000）。

（2）食品致敏性

由于没有合适的动物模型来预测食品致敏性，因此 1994 年 4 月在马里兰州安纳波利斯举行的“关于转基因食品潜在的致敏性科学问题”会议建议使用一种筛选模型。参会人员都是食品过敏方面的研究专家，他们建议，应当通过确定新蛋白与已知食品过敏原的特征相似性来对新蛋白进行评价。特别是需考虑如下问题：氨基酸序列是否相似？是否抗酶解或酸解？对热是否敏感？在植物的可食用部位是否有很高的含量？是否具有合适的分子量大小？在这些标准中，迄今为止所测定的 δ -内毒素与已知的蛋白质食品过敏原没有相似的氨基酸序列。Cry1Ac、Cry1Ab、Cry1F、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1/Cry35Ab1 具有热不稳定性（Monsanto, 1995b、2001a、2001b、2002c；Monsanto 和

Novartis, 1996b; Mycogen 和 Pioneer, 2001f、2001g、2005c、2005d、2005e、2005f)。用纯基因产品进行蛋白质消化试验,分析商业产化产品中的各 δ -内毒素是否抗酸解和酶解(DEKALB, 1997; Herman et al., 2003; Monsanto 和 Novartis, 1996b; Monsanto, 1995a、1995b、2001a、2001b、2002a、2002c、2002d、2002e; Mycogen 和 Novartis, 1995c; Mycogen 和 Pioneer, 2001h、2005b; Plant Genetic Systems, 1998c)。这些研究采用美国药品局(United States Pharmacopeia)推荐的模拟胃(酸和胃蛋白酶)、肠液(胰蛋白酶在中性 pH 值条件下)进行演示(USP, 1995)。通过 SDS-PAGE 上条带的消失或用敏感昆虫进行分析,可以追踪降解过程。当然, δ -内毒素的活性形式可以抵抗胰蛋白酶消化,但是迄今为止除 Cry9C 外,几乎所有的商品化的 δ -内毒素(Cry1Ac、Cry1Ab、Cry1F、Cry3A、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1 和 Cry35Ab1)都易在消化试验中失活。由于 Cry9C δ -内毒素与已知毒素或过敏原没有同源性,因此通过了部分致敏性筛选。不过,它对蛋白酶(胃蛋白酶, pH 2.0)的降解具有抗性,且对热(90°C, 10 min)亦有抗性(Plant Genetic Systems, 1998c)。因此, Cry9C 产品已退出市场。虽然一些 Cry9C 进入了食品供应链,但未发现其对人类有过敏的例子(见本节)。欧洲食品安全局评价了玉米植株中表达 δ -内毒素的潜在致敏风险,如 Bt11 中的 Cry1Ab (EFSA, 2005a)、Tc 1507 中的 Cry1F (EFSA, 2005b), MON 863 中的 Cry3Bb1 (EFSA, 2004)、MON810 与 MON863 杂交种中的 Cry1Ab 和 Cry3Bb1 (EFSA, 2005c)。利用不同的方法已经完成了 Cry 蛋白的致敏性风险评估,间接的证据表明这种蛋白的致敏性风险极低。这些证据包括不存在已知的致敏性来源、与已知过敏原不存在序列相似性、被胃蛋白酶快速彻底地降解。迄今为止,虽经广泛的科学调查仍然没有发现一种有效的方法可以评估某一物质潜在的致敏性,唯一方法就是通过筛选测试。

有时人们引用 Bernstein 等(1999)的结果,来证明 δ -内毒素是否成为潜在的食品致敏原。不过,这一研究测定的是农场工作人员在开发苏云金芽孢杆菌产品的反应和(或)抗体时通过吸入 δ -内毒素导致的潜在过敏性,而不是通过食用 δ -内毒素。而且,在对苏云金芽孢杆菌提取物产生免疫反应的工作人员中,作者并没有发现他们对 δ -内毒素制剂产生明显的反应(通过皮肤刺痛试验,未曾见到过敏症状或临床症状)。这一测试中所用的原毒素制剂来源于工人们接触的商业菌株 Javelin。作者推断:“... 消费者口服含有编码该蛋白的转基因食品(如西红柿、马铃薯)后,不可能发生过敏性。”Siegel (2001)也得出类似结论。

(3) 人体的接触

人体接触植物中 δ -内毒素的主要途径是经口食用作为食品的农作物。在加工 Bt 植物材料(如种子)过程中所接触到的气雾状物质是人体接触的另一途径,尽管接触量很小。很多国家要求进行农药残留研究,以确定化学农药在未加工农产品中的最大含量。由于很高剂量的 δ -内毒素对哺乳动物也没有毒性,因此不必要进行这些常规的农药残留试验。要求限定容许值(即最大残留水平)的国家中所登记的苏云金芽孢杆菌微生物农药已不要求设定农药残留限量(numerical tolerance, MRL)。不过,对植物各部分中 δ -内毒素的表达进行分析,有助于分析 δ -内毒素对非靶标生物的影响以及有关害虫抗性治理方面的问题。这些数据表明,目前商品化的转基因植物中 δ -内毒素在植物可食用部位的含量相对

较低。

(4) 对人类的风险评估

Cry1Ab、Cry1Ac、Cry9C、Cry3A、Cry1F、Cry2Ab2、Cry3Bb1、Cry34Ab1/Cry35Ab1 的急性口服毒性数据支持了 Cry 蛋白对人无毒的预测。当蛋白质有毒时，它们是通过急性中毒机制且在极低的剂量下起作用 (Sjoblad *et al.*, 1992)。由于在急性测试中未检测到不良影响，即使在相当高的剂量下也未检测到不良影响，因此认为这些 δ -内毒素蛋白对人无毒。从苏云金芽孢杆菌的长期安全使用历史以及急性口服毒性数据可以推断：这些 δ -内毒素以及其他 δ -内毒素对人产生的毒性风险可以忽略不计。评估这些毒素对人类健康的影响时，应考虑的另一方面是 Cry9C 蛋白是否会成为潜在的食品致敏原。通常情况下，Cry9C 在美国登记只用于动物饲料。不过在大田中通过授粉或收获后在粮食的操作设施中可能会发生无意混杂，并导致这一毒素在少数玉米加工产品中低水平存在。应公司的要求，Cry9C 登记已被撤回。但美国食品药品监督管理局和疾病预防控制中心的研究并没有发现接触 Cry9C 而引起人体过敏的例子。一个对 Cry9C 蛋白可能过敏的人自愿在医药中心通过口服和皮肤进行全面控制的双盲测试，结果表明他对 Cry9C 蛋白不过敏 (Sutton *et al.*, 2003)。通过 Bt 制剂喷施或特定 Bt 基因植物的研究，在实验室和田间已经确定了 Bt 的总体安全性概况 (Betz *et al.*, 2000; Siegel, 2001; Federici, 2002)。

3. 非靶标生物

(1) 对非靶标生物的影响

对非靶标生物影响的研究是为了测定毒素对一个测试物种的实际危害，试验通常采用很高的剂量来给出最大的危害结果，以保证获得安全性和确定性的范围 (Rose, 2006; Romeis *et al.*, 2006a)。接下来在本文关于非靶标物种的章节中，可以见到接触和评估试验 (包括将接触和效果结合进行的田间试验)。已经提交了大量的实验室测定结果，为这些产品商业化提供了有力证据。进行的测定包括：植物中 δ -内毒素对非靶标生物 (特别是在实验室条件下能很好存活的生物) 的急性食用毒性、亚急性食用毒性、繁殖毒性。所用测试物是非靶标生物能够接触到且在特定植物组织中表达的 δ -内毒素；如果未能加入到测试生物的饲料中，则测试物为纯 δ -内毒素。在美国，非靶标生物通常选用鸟类 (北美鹌鹑)、啮齿动物 (大鼠或小鼠) 以及大量不相关的非靶标昆虫 (蜜蜂和捕食性有益生物如寄生蜂、瓢虫和绿草蛉) 作为代表性物种，这些物种起着某种功能作用或替代作用，并证明其可在实验室条件下存活。必要时，也会对其他非靶标昆虫进行实验室测试。已对肉鸡多次进行了为期 6 周的饲喂试验。利用人类健康分析进行的膳食研究，部分评价了毒素对非靶标哺乳动物的影响。如果水生生物 (鱼，如虹鳟鱼；水生无脊椎动物，如水蚤) 有可能，但不是经常接触转基因植物 (转基因水稻除外) 中产生的毒素，那么对水生生物的测试可能会很有用。对降解碎石的土壤微生物，如蚯蚓以及弹尾目昆虫也进行了研究。不过测试的土壤微生物数量有限。

① 对非靶标哺乳动物的影响

微生物形式的苏云金芽孢杆菌对啮齿动物影响的实验数据表明，苏云金芽孢杆菌制剂对测试动物没有产生不良影响 (如 USEPA, 1998)。用牛或猪这种代表不同消化系统的哺乳动物来进行测试，很少造成或没有重点考虑其长期影响。不过， δ -内毒素具有前面所

指的特定的作用方式，因此认为 δ -内毒素不可能对哺乳动物产生毒性。在支持转基因植物的商业应用的研究中，用纯化的 δ -内毒素对啮齿动物进行测试（附录 1），结果未见不良反应，从而支持了 δ -内毒素不可能对哺乳动物产生毒性这一结论。而且，如前所述，在哺乳动物中没有和已知 δ -内毒素结合的受体位点（Noteborn *et al.*, 1995；Gill 和 Ellara, 2002；Broderick *et al.* 2006）。 δ -内毒素的作用机制似乎具有昆虫特异性，其原因在于鳞翅目昆虫中肠特有的依赖 ATPase 来调节钾离子流入的机制，且其对离子胁迫具有特定的敏感性（Knowles, 1994）。即使 Cry 毒素结合受体蛋白在哺乳动物细胞中表达，这些表达的蛋白仍无法使哺乳动物细胞与毒素结合（Keeton 和 Bulla, 1997；Gill 和 Ellar, 2002；Broderick *et al.*, 2006）。

②对鸟类的影响

对北美鹌鹑和野鸭进行的急性和亚慢性测试表明，苏云金芽孢杆菌的微生物产品无毒或不致病（如 USEPA, 1998）。已经提交 δ -内毒素对鸟类急性口服毒性试验结果，用来支持产品的商业应用。鹌鹑取食了含 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry3A、Cry9C、Cry1F、Cry2Ab2 和 Cry3Bb1 的作物后，未见不良反应（DEKALB, 1997；Monsanto 和 Novartis, 1996c；Monsanto, 1995a、1995b、2001c、2002a；Mycogen 和 Novartis, 1995c；Plant Genetic Systems, 1998c；Mycogen 和 Pioneer, 2001e）。此外，家禽在取食了含表达 Cry34Ab1/Cry35Ab1 双毒素的玉米后，也未见不良反应（Mycogen 和 Pioneer, 2005c）。

③对淡水鱼的影响

苏云金芽孢杆菌的微生物产品对大鳍鳞鳃太阳鱼或虹鳟鱼这两种淡水鱼没有毒性或不使其致病。水生生物的 LC_{50} 为 $8.7 \times 10^9 \sim 4.6 \times 10^{10}$ cfu/L（USEPA, 1998）。用含量为 100% 的玉米粕饲料喂食鲶鱼来分析 Cry1Ab 的毒性，结果在最大剂量（ >200 ppm）下未观察到不良影响（Monsanto 和 Novartis, 1996d）。分别用 20%（w/w）的棉子粕和 35%（w/w）玉米粕，检测了 Cry2Ab2 和 Cry3Bb1 对鲶鱼的毒性，未观察到不良反应（Monsanto, 2001c、2001d、2002a）。用含 100 mg/kg 的两种 Bt 蛋白混合物作为标准的鱼饲料，连续 8 天测试了 Cry34Ab1/Cry35Ab1 对虹鳟鱼的毒性，未见不良反应（Mycogen and Pioneer, 2005g）。

④对淡水中无脊椎动物的影响

对已登记的苏云金芽孢杆菌 *kurstaki* 亚种和 *israelensis* 亚种的微生物产品进行的毒性测试表明，其对淡水中的无脊椎动物大型蚤 *Daphnia magna*，是中等毒性，据报道 LC_{50} 范围为 5~50 ppm。对水蚤是高毒性的， EC_{50} 范围为 0.8~3 ppm（USEPA, 1998）。不过，经验证所产生的毒性与对热稳定的 δ -内毒素无关，而是由悬浮液中一种对热不稳定的可溶物质所致。特由明确的 δ -内毒素蛋白在植物中的表达，减少了人们对传统 Bt 产品发酵过程中由苏云金芽孢杆菌产生的外毒素或其他代谢物所致毒性的顾虑。用花粉中表达的 Cry1Ab（Mycogen 和 Novartis, 1995c），Cry9C（Plant Genetic systems, 1998c），Cry1F（Mycogen 和 Pioneer, 2001e），和 Cry3Bb1（Monsanto, 2002a）进行的测试表明，这些毒素对水蚤没有不良影响。尽管玉米花粉由于体积太大而无法被水蚤摄入，但测试表明水蚤接触玉米花粉后其肠道颜色变黄（Monsanto, 2002a）。尽管不确定水蚤是否

摄入毒素，但是由于水生生物接触植物所表达 δ -内毒素的主要途径是通过花粉沉淀，因此这些研究仍然十分有用，而且这些研究可以排除毒素对水蚤产生影响这一结论。此外，水蚤以 100mg 蛋白/L 水的靶浓度接触 Cry34Ab1/Cry35Ab1 蛋白时，未见不良反应 (Mycogen 和 Pioneer, 2005g)。

⑤对河口和海生动物的影响

对微生物形式苏云金芽孢杆菌的几个亚种进行的毒性研究表明，*kurstaki*、*israelensis* 和 *aizawai* 亚种对青虾、绵羊头鲈鱼或浮游动物没有毒性或不使其致病 (如 USEPA, 1998)。迄今为止，由于从表达 δ -内毒素的植物中接触不到明显的毒素，因此行政部门没有要求用植物中表达的 δ -内毒素进行类似的测试。

⑥对蚯蚓的影响

用 Cry1Ab (Monsanto 和 Novartis, 1996d; Mycogen 和 Novartis, 1995a), Cry1Ac (DEKALB, 1997), Cry3A (Monsanto, 1995b), Cry9C (Plant Genetic Systems, 1998c), Cry1F (Mycogen 和 Pioneer, 2001e、2001c), Cry2Ab2 (Monsanto, 2001c), Cry3Bb1 (Monsanto, 2002a、2002f), 或 Cry34Ab1/Cry35Ab1 (Mycogen 和 Pioneer, 2005h) 处理蚯蚓的研究中，发现商品化植物产品中的 δ -内毒素未对蚯蚓产生不良反应。在一个实验研究中，用 Bt 玉米 (Cry1Ab、Bt11) 枯叶饲养陆正蚯蚓 *Lumbricus terrestris* 成虫，同时用非 Bt 玉米枯叶，结果发现在 160 天内未见显著差异。不过，在 200 天后，用 Bt 饲养的蚯蚓体重下降了 18%，而对照体重增加了 4%。Bt 与非 Bt 处理之间，蚯蚓的死亡率没有差异 (Zwahlen *et al.*, 2003a)。作者认为：“有必要进行进一步试验来验证相对体重差异是由 Bt 毒素所致，还是由本研究中讨论的其它因素所致”。Vercesi 等 (2006) 发现 Bt 玉米对农田土壤中丰度很高的白颈腔环蚯蚓 *Aporrectodea caliginosa* 的生活史没有产生负面影响。综合考虑体重方面的所有试验数据，认为 Bt 玉米对蚯蚓没有产生有害影响。同时，考虑危害性 (影响) 和接触毒性的田间试验已经进行，关于其风险请参考相关的章节 (见本节)。

⑦对非靶标昆虫的影响

由于 δ -内毒素被用作杀虫剂，所以对那些可能受毒素影响的昆虫进行了广泛测试。要使昆虫对毒素敏感，非靶标昆虫必须具有可以结合 δ -内毒素的特定受体位点，以及合适的中肠 pH 值和酶反应条件，并能在中肠膜上形成孔道。由于昆虫是 Bt 毒素的主要靶标，因此有必要对主要的非靶标生物就作用机理明确的 Cry δ -内毒素及其近缘蛋白进行风险评估。本章节第 1 部分关于测试效果的研究只考虑到其危害性，而没有反映田间的实际接触情况。全面的风险研究 (主要是田间测试) 在第 3 节风险评估中。

在苏云金芽孢杆菌亚种 *kurstaki*, *israelensis*, *tenebrionis* 的微生物产品中含有不同的 Cry 和 Cyt 毒素，可影响各种鳞翅目和双翅目害虫，从它们的选择作用方式可知，它们对昆虫非靶标指示种 (如脉翅目、同翅目和鞘翅目) 没有毒性。苏云金芽孢杆菌的这些亚种对蜜蜂的毒性也很低。不过，在美国登记的苏云金芽孢杆菌亚种 *aizawai* 的微生物产品对蜜蜂却具有很高的毒性 (LE_{50} = 15 ppm) (如 USEPA, 1998)。这种毒性被认为是热不稳定的外毒素所致，并非 δ -内毒素所致。附录 4 的一个表中，Glare 和 O' Callaghan (2000) 列出了 92 篇关于不同苏云金芽孢杆菌菌株对 9 个目中 24 科有益昆虫 (捕食性昆

虫和寄生性昆虫)影响的研究。其中只有 8 篇研究认为其对捕食性昆虫产生了有害影响,而且其活性可能来自于 δ -内毒素之外的其他毒素。大部分研究报道认为没有不良影响。

如本文前面所述, δ -内毒素通常具有相当高的特异性。由于这一原因,可认为 Bt 毒素比传统化学农药对非靶标生物的影响更小,据推测化学杀虫剂会杀死大部分非靶标昆虫。Dutton 等(2003)关于捕食性节肢动物的风险评估综述表明,比较传统化学农药与微生物农药对非靶标生物的影响,可以决定是否需要对非靶标植食性昆虫进行测试,但是由于 δ -内毒素在植物中表达的时间长,因此对一些非靶标植食性动物的影响情况进行了了解也十分有用。大多数关于 δ -内毒素寄主范围的测试针对潜在的害虫而进行,以弄清这些毒素是否可防治这些潜在的害虫。例如,Cry2A 毒素似乎具有高度的种属特异性,只对鳞翅目害虫和一些双翅目害虫具有杀虫活性(Van Frankenhuyzen 和 Nystrom, 1999 数据库,2002 年 1 月 24 日版)。目前已用 Cry2Aa 毒素对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、直翅目、膜翅目、同翅目、脉翅目、半翅目、等翅目、弹尾目昆虫以及等足目甲壳动物进行了大量的测试(Crickmore *et al.*, 1998)。

另一方面,与靶标害虫亲缘关系近的物种可能会受 Bt 毒素的影响。一般说来,基因工程作物所产生的影响因具体情况而异。在森林中使用喷雾剂可使一些靶标害虫近缘的鳞翅目昆虫受到影响(Miller, 1990; Johnson *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1996),因此当鳞翅目昆虫濒临灭绝或一些鳞翅目昆虫在 Bt 玉米田或邻近地点受到影响时,美国林业服务署(US Forest Service)就不允许使用苏云金芽孢杆菌喷雾剂(Zangerl *et al.*, 2001)。如果寄主植物种植于玉米相邻的地方,玉米花粉会落到寄主植物上,黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*, 北美黑凤蝶 *Papilio polyxenes* 和酢酱灰蝶 *Pseudozizeeria maha* 取食 Bt 玉米 176 (Cry1Ab) 的花粉后,其幼虫会受到负面影响(Losey *et al.*, 1999; Hansen Jesse 和 Obrycki, 2000; Hellmich *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2000; Zangerl *et al.*, 2001; Shirai 和 Takahashi, 2005)。而且, Felke 及其同事在实验室研究中表明,欧洲一些非靶标鳞翅目昆虫的幼虫在取食 Bt176 玉米 (Cry1Ab) 花粉后会产生不良影响。尽管其中一些昆虫被认为是害虫,如小菜蛾 *Plutella xylostella*, 但另一些昆虫如孔雀蛱蝶 *Nymphalis io* 却在欧洲某些地区受到保护(Felke 和 Langenbruch, 2001、2003; Felke *et al.*, 2002)。通常这些昆虫取食 Bt176 花粉后,幼虫的存活、取食速度、体重和发育历期都会受到不良影响。Bt176 玉米花粉对孔雀蛱蝶 *Nymphalis io* 的 LD₅₀ 值为 61—80 个花粉粒,对菜粉蝶 *Pieris rapae* 为 19 个花粉粒、对大菜白蝶 *Pieris brassicae* 为 139 个花粉粒。由于幼虫没有取食全部所施用的花粉,因此实际的 LD₅₀ 值要低(Felke 和 Langenbruch, 2001、2003; Felke *et al.*, 2002)。

以上测试多以低龄幼虫(经常为初孵幼虫)进行,龄期相对较高的幼虫对 Bt 玉米花粉的取食敏感性要差(Felke 和 Langenbruch, 2001、2003; Hellmich *et al.*, 2001; Felke *et al.*, 2002)。Bt 玉米花粉的毒性取决于特定品系。Bt176 在花粉中表达的 Cry1Ab 浓度比 MON 8 和 Bt11 玉米高(Sears *et al.*, 2001)。在实验室分析中,MON810 和 Bt11 对帝王蝶 *Danaus plexippus*, 香芹黑凤蝶 *Papilio polyxenes* 或柞蚕 *Antheraea pernyi* 幼虫不产生急性毒性(Hansen Jesse and Obrycki, 2000、2002, Wraight *et al.*, 2000, Hellmich *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2005),因此可认为这些品系产生的影响不存在或可以

忽略不计。不过，在最近的出版物中，Dively 等（2005）研究表明，在自然界中延长与 MON810 和 Bt11 玉米花粉的接触时间，会对帝王蝶 *D. plexippus* 产生不良影响。在实验室和温室试验（以及田间试验，见本节）中，接触 Bt 玉米花粉的幼虫发育历期显著延长，存活率显著降低。而且，幼虫和成虫的体重降低（Dively *et al.*，2004）。

除了取食花粉之外，取食玉米花药也会对帝王蝶幼虫产生不良影响，使它的存活率降低，取食速度减慢、体重减轻、发育历期延长（Hellmich *et al.*，2001；Anderson *et al.*，2004），但是龄期较高的幼虫受到的影响小（Anderson *et al.*，2004）。Anderson 及其同事认为，花药产生的影响是通过幼虫的忌避行为（avoidance behaviour）引起（Anderson *et al.*，2004，2005），并推断由于在田间接触的概率很低，因此，只接触花药不会对帝王蝶产生风险（见本节关于接触的章节）。不过，同时接触 Bt 花药和花粉可产生相加效应，使帝王蝶幼虫的存活率降低，取食速度下降（Anderson *et al.*，2005）。关于 Cry1AbBt 玉米内毒素之外的其他对蝴蝶幼虫的影响，已有很多研究。Hellmich 等（2001）测试 Cry1Ac 和 Cry1F 对帝王蝶初孵幼虫的影响发现，Bt 毒素的毒性比 Cry1Ab 低。Mattila 等（2005）测试了取食玉米杂交种（Cry1Ab×Cry2Ab2）和 Cry3Bb1 的花粉后帝王蝶 1 龄幼虫受到的影响。Cry3Bb1 不产生不良影响，而 Cry1Ab×Cry2Ab2 的花粉却能产生致死效应和亚致死效应（Mattila *et al.*，2005）。同时用另外的胁迫因子处理可使 Bt 毒素的效应增强，或使其效应为两者相加，从而增强 δ -内毒素的毒性。例如，用苏云金芽孢杆菌制剂和 Cry1Ab 处理欧洲玉米螟（鳞翅目：草螟科）幼虫，与对照相比原生动植物微孢子虫 *Nosema* 更容易侵染，死亡率增高，产生更强的亚致死效应（如 Pierce *et al.*，2001；Reardon *et al.*，2004）。用 Cry34Ab1/Cry35Ab1 的双毒素蛋白测试了来自于 3 个目（鳞翅目、同翅目和鞘翅目）和 4 个科的（螟蛾科，金花虫科，常蚜科和夜蛾科）昆虫杀虫活性谱，结果表明只有 *Diabrotica* 属的幼虫受到 Cry34Ab1/Cry35Ab1 蛋白的影响（Mycogen 和 Pioneer，2005b）。

为了确定 δ -毒素的寄主范围，对非靶标昆虫也进行了毒性测试，并进行了综述（Mendelsohn *et al.*，2003；Rose，2006；Romeis *et al.*，2006a，2006b）。首次分离出 Cry2Ab 基因的 Dankocsik 等（1990）报道了高剂量 Cry2Ab 毒素对鳞翅目害虫（舞毒蛾 *Lymantria dispar*，烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*，粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*，美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*，玉米螟 *Ostrinia nubilalis*）的毒性，与 Cry2Aa 不同，其对双翅目害虫（埃及伊蚊 *Aedes aegypti*）没有毒性。对亲缘关系极近的 Cry2Ab1 毒素进行的研究表明，该毒素对双翅目害虫（埃及伊蚊）没有活性，其对鳞翅目害虫（烟草天蛾 *Manduca sexta*）具有活性（Widner 和 Whiteley，1989，1990）。实验室研究表明，表达 Cry3Aa 的 Bt 马铃薯不影响桃蚜 *Myzus persicae* 幼虫的发育、寿命以及繁殖（Kalushkov 和 Nedved，2005）。Lumbierres 等（2004）在实验室内研究了取食 Bt 玉米（Cry1Ab）的禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的表现。发现在 Bt 或非 Bt 玉米上生活了几代的无翅蚜后代，其死亡率、发育历期和产蚜前期，繁殖能力、内禀增长率之间没有差异。不过，取食 Bt 玉米的第 1 代无翅雌蚜后代，其死亡率低，发育历期短、产蚜前期短、繁殖率高、内禀增长率高。与此相比，取食 Bt 玉米的第 1 代有翅蚜后代在 Bt 玉米上的表现较好，其发育历期短、产蚜前期短、内禀增长率高（Lumbierres *et al.*，2004）。作者推断，这些研究结