

实用生物信息技术  
期末总结交流报告会  
**Semester Summary Seminar for  
Applied Bioinformatics Course**  
2020年12月12日

汤金荣

中国农业科学院研究生院

2020级博士班

邮箱: [tangjinronga@163.com](mailto:tangjinronga@163.com)

微信号: 13783688673

# 小组成员

编号	姓名	研究所	导师	研究方向
G4A	毕蒙蒙	蔬菜花卉所	明军	观赏园艺-百合种质资源与遗传育种
G4B	常立春	蔬菜花卉所	王晓武	蔬菜学-芥菜叶片性状研究
G4C	孙鹏雷	植保所	李香菊	杂草学
G4D	汤金荣	植保所	梁革梅	昆虫毒理学



# 转基因抗虫作物：从苏云金芽孢杆菌Bt毒素谈起

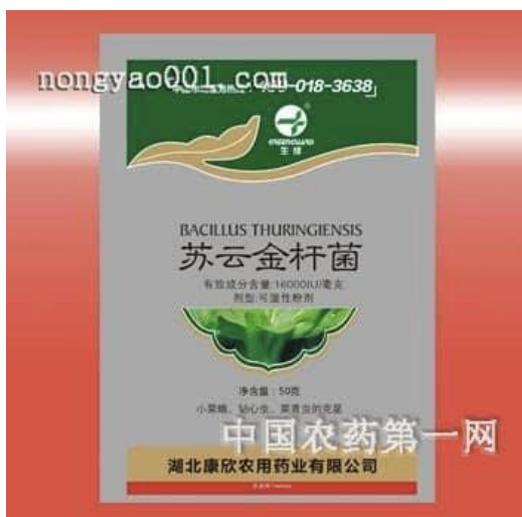
Genetically modified insect-resistant crops: the story of the anti-insect toxin from *Bacillus thuringiensis*



- 
- 世界上第一例转基因植物于1983年在美国培育成功，是一种含抗生素药类抗体的烟草。
  - 第一个商业化种植的转基因作物是一种可以延迟成熟的西红柿。1996年允许在美国超市出售。
  - 转基因作物最成功的案例之一并在我国也成功应用的是转基因抗虫棉。

# 苏云金芽孢杆菌

- 苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 被发现已有100多年历史，1938年首次在法国商业化应用，1950年大面积商业化应用，中国从上个世纪60年代也开始了规模化生产。



# 苏云金芽孢杆菌

---

- Bt是一种革兰氏阳性菌，其在孢子形成期能产生杀虫蛋白。**伴孢晶体**的存在是区别Bt和其他细菌的标识。
- Bt的靶标昆虫主要是鳞翅目昆虫，对鞘翅目、同翅目和动植物线虫也有特异性毒性。



处理前的活虫

处理后的死虫

# 苏云金芽孢杆菌

- 传统化学农药：有残留、污染环境、杀死害虫的同时也杀死了天敌。推荐了解《寂静的春天》。
- Bt：选择性强、无残留、保护自然天敌、对人畜无害、环境友好。



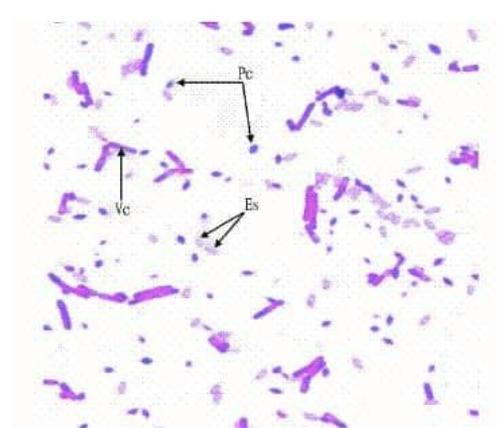
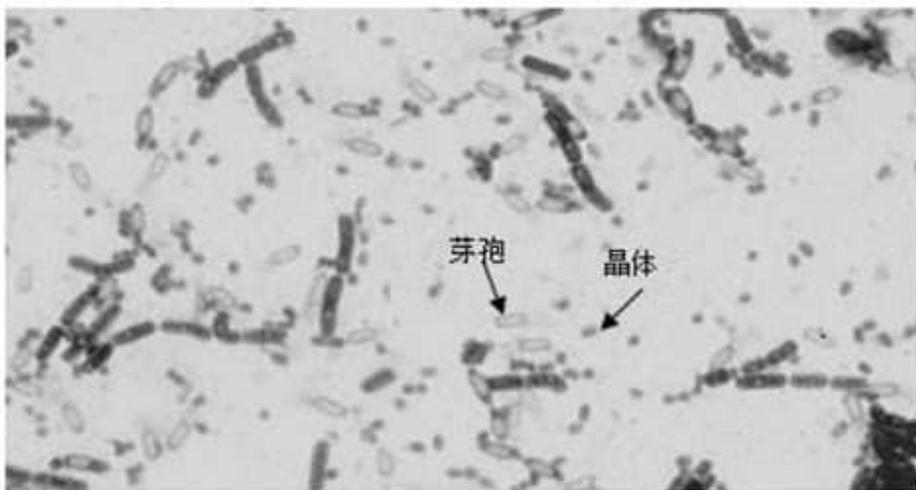
# 苏云金芽孢杆菌

- Bt致命的缺点：持效性太差，见效慢，导致Bt制剂在整个农药市场的份额很小。
- Bt最广泛的应用于防治害虫，是通过转基因植物产生杀虫蛋白，例如转Bt玉米和棉花。



# 作用机制

- **伴孢晶体**中的杀虫晶体蛋白是这种病菌的主要致毒因子，主要分为Cry和Cyt两大类。
- Cry毒素是目前最大的家族。Cyt具有体外溶细胞活性，对双翅目有特效。另外还有细胞生长分化阶段分泌的Vips类蛋白毒素。

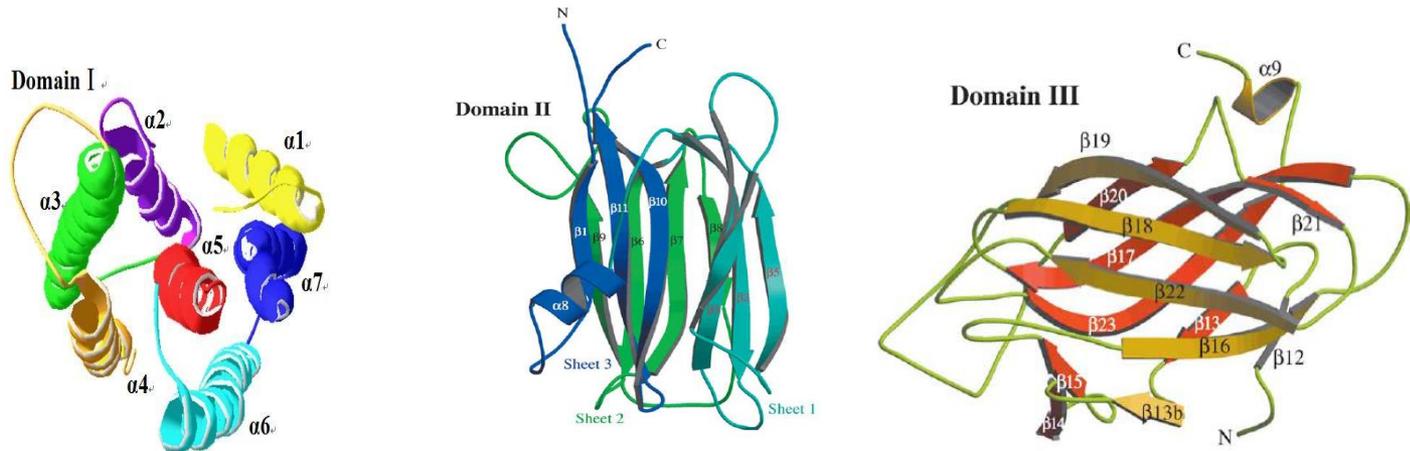


注：Pc. 伴孢晶体；Vc. 营养细胞；Es. 芽孢。

图1 光学显微镜下的伴孢晶体及芽孢(1000×)

# 作用机制

- 目前为止，500多个不同的Cry被分成了67类（Cry1-67）。通过对比已有结构的晶体蛋白，发现3个Domain非常相似。



(Li, et al., 1991)

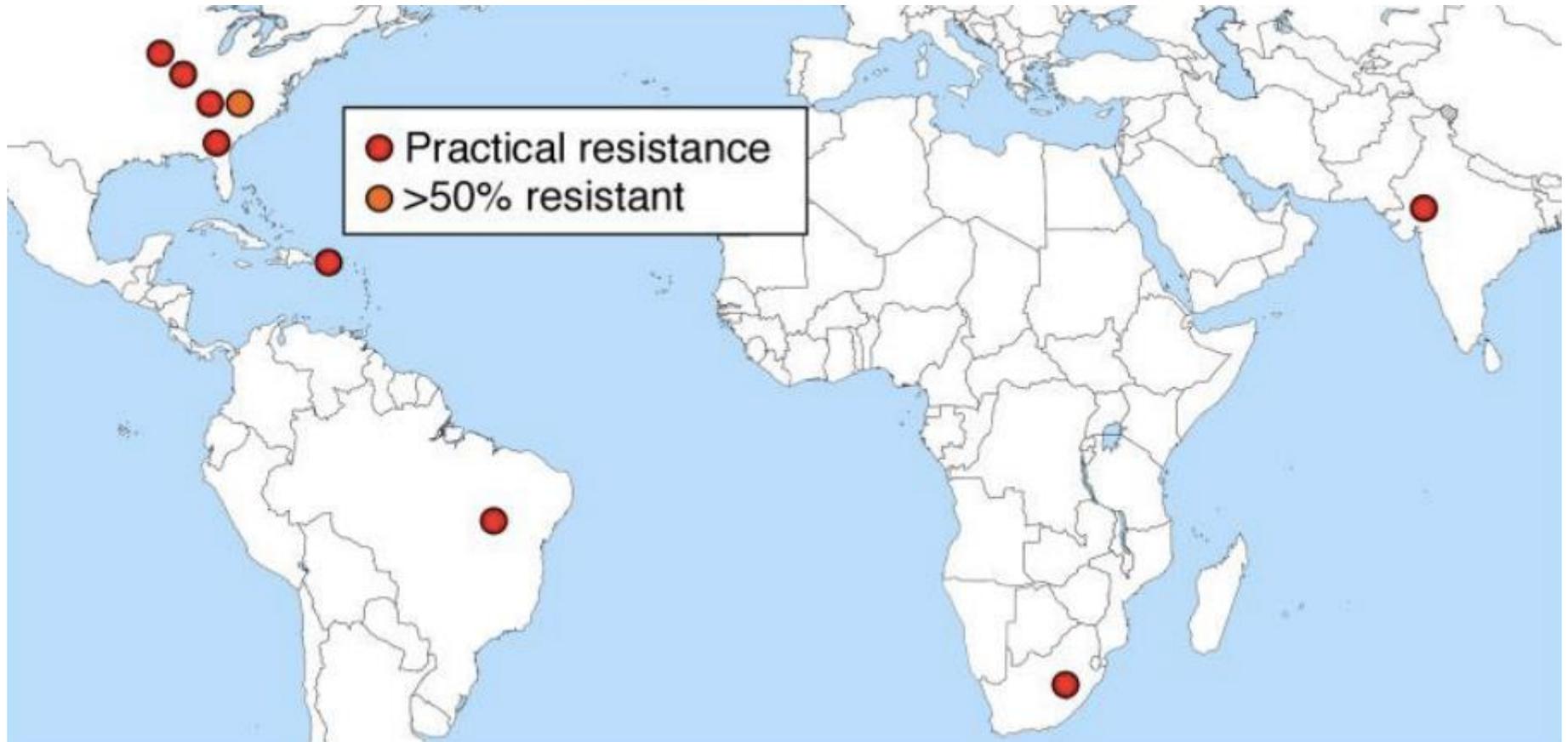
# 抗性的产生

---

- 第一代转Bt基因棉花主要是利用了Cry1Ac基因，对Cry1Ac蛋白的研究也比较多，作用机理已经相对比较完善。
- 但抗性监测发现田间害虫对转Cry1Ac基因棉花的抗性水平在逐年显著增加。如果没有解决方案，很可能危及到这项技术。

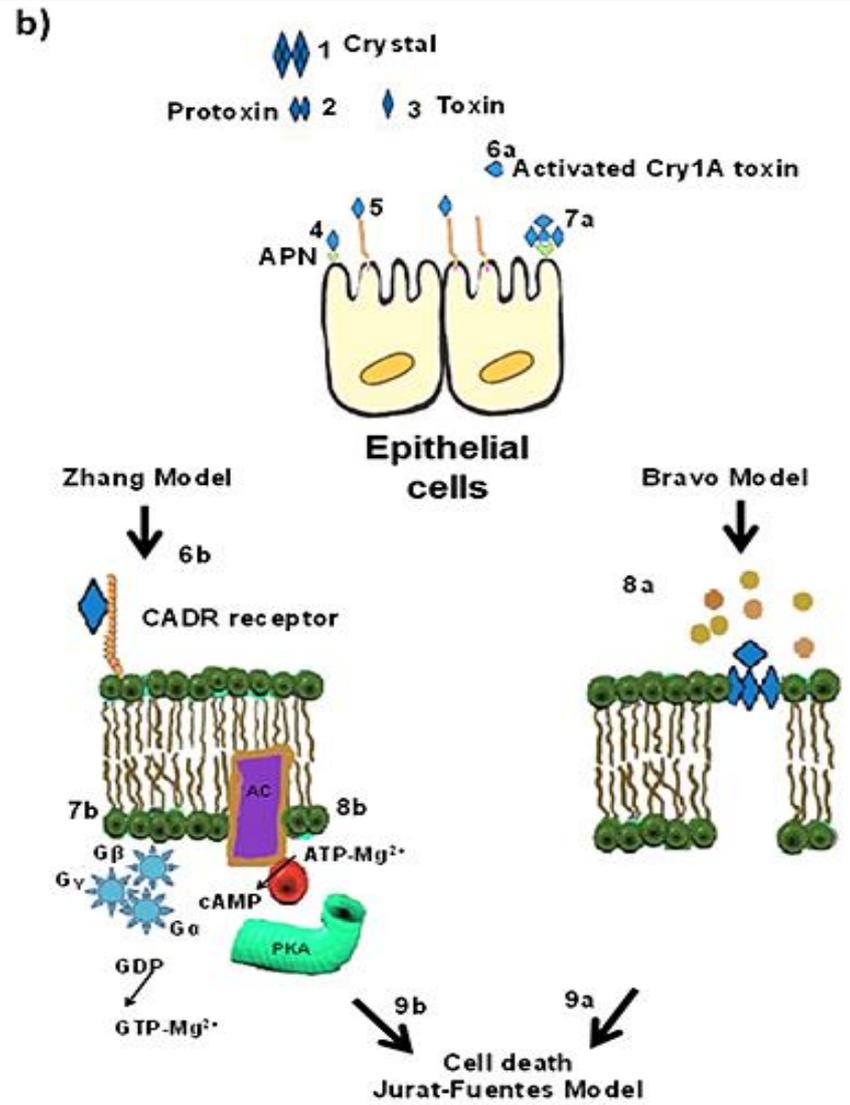
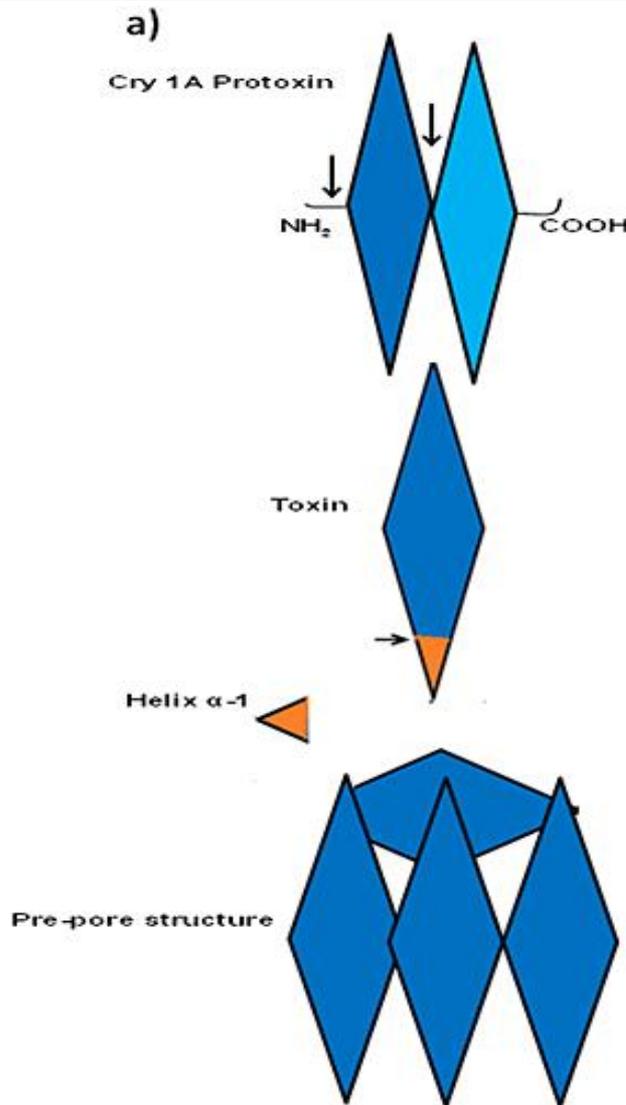
# 抗性的产生

---

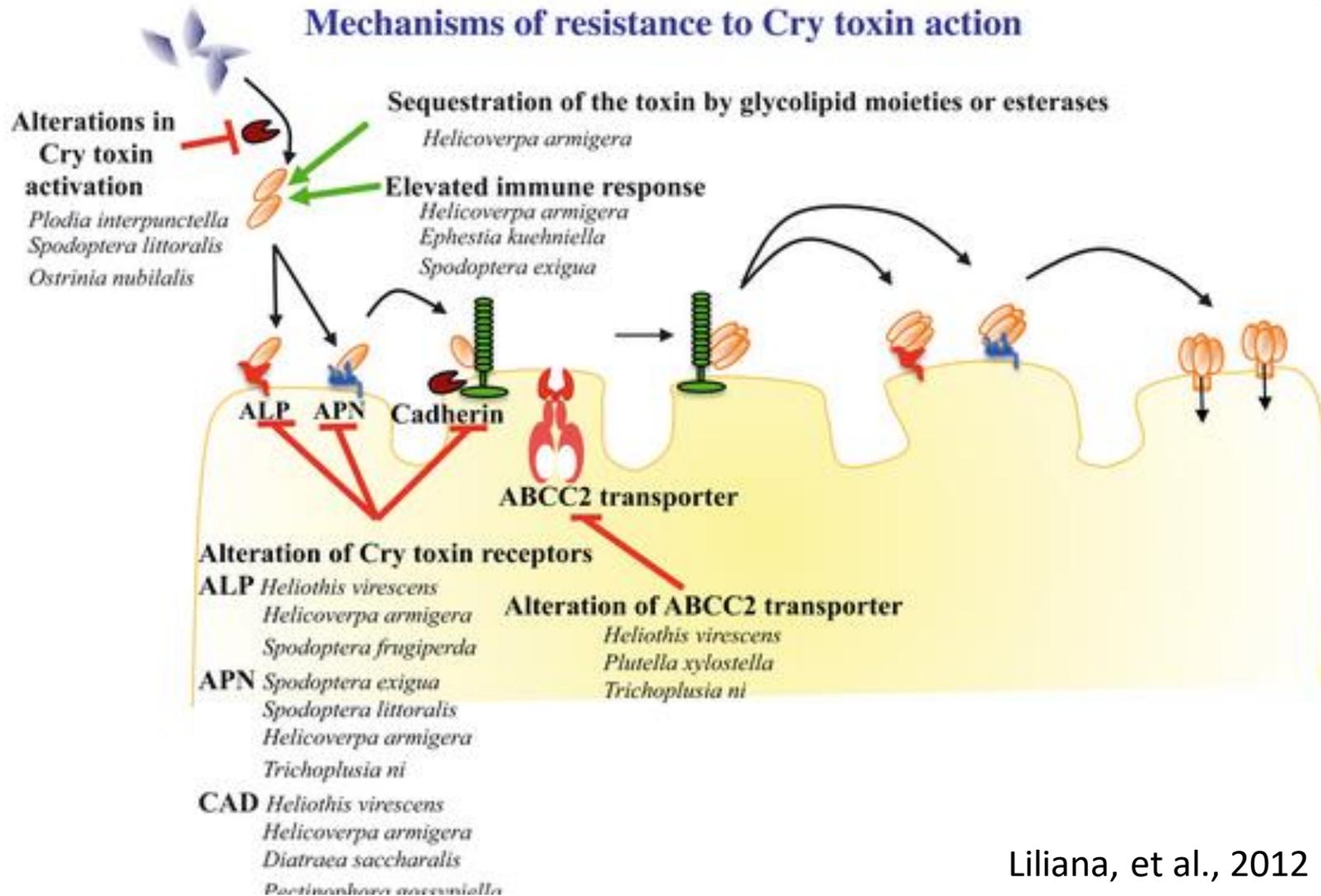


(Tabashnik, et al., 2015)

# 作用机制



# 抗性机制



Liliana, et al., 2012

# 抗性治理策略

---

- 高剂量/庇护所策略。例如：防治红铃虫（Tabashink *et al.*, 2008);
- 多基因策略。例如：转双价棉Cry1Ac+Cry2Ab;
- 发展新毒素。例如：Vip3A类和Cry2A类;
- 改造现有毒素。例如：Cry1AMod toxin（Bravo *et al.*, 2008）。

# 课题背景

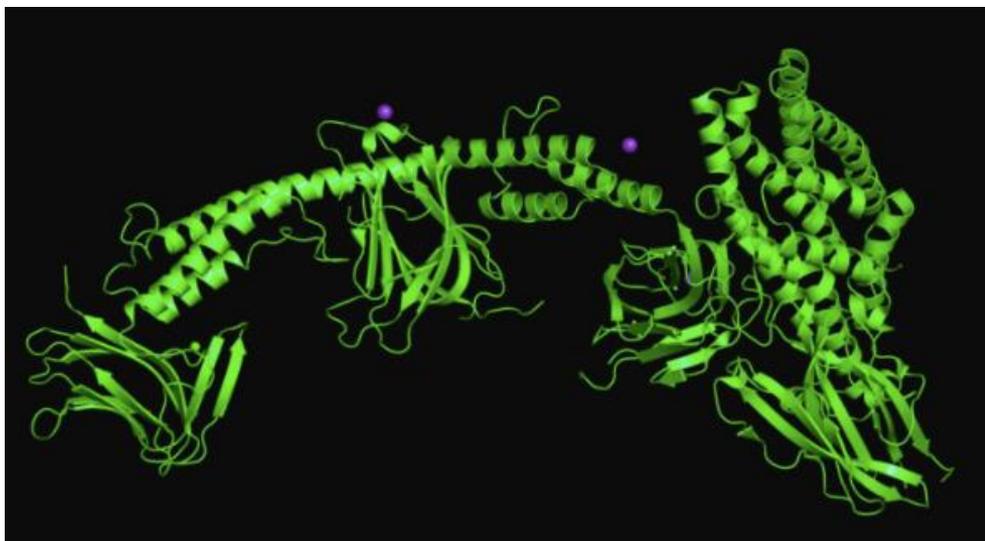
---

- Cry2Ab蛋白是广泛应用的商业化杀虫剂，也是二代转双价基因作物中重要杀虫蛋白之一。
- Cry2Ab与Cry1Ac的混用能有效防治抗Cry1Ac的棉铃虫，还能扩大杀虫谱，更好地防治了田间害虫。
- Cry2Ab作用机制还不清楚

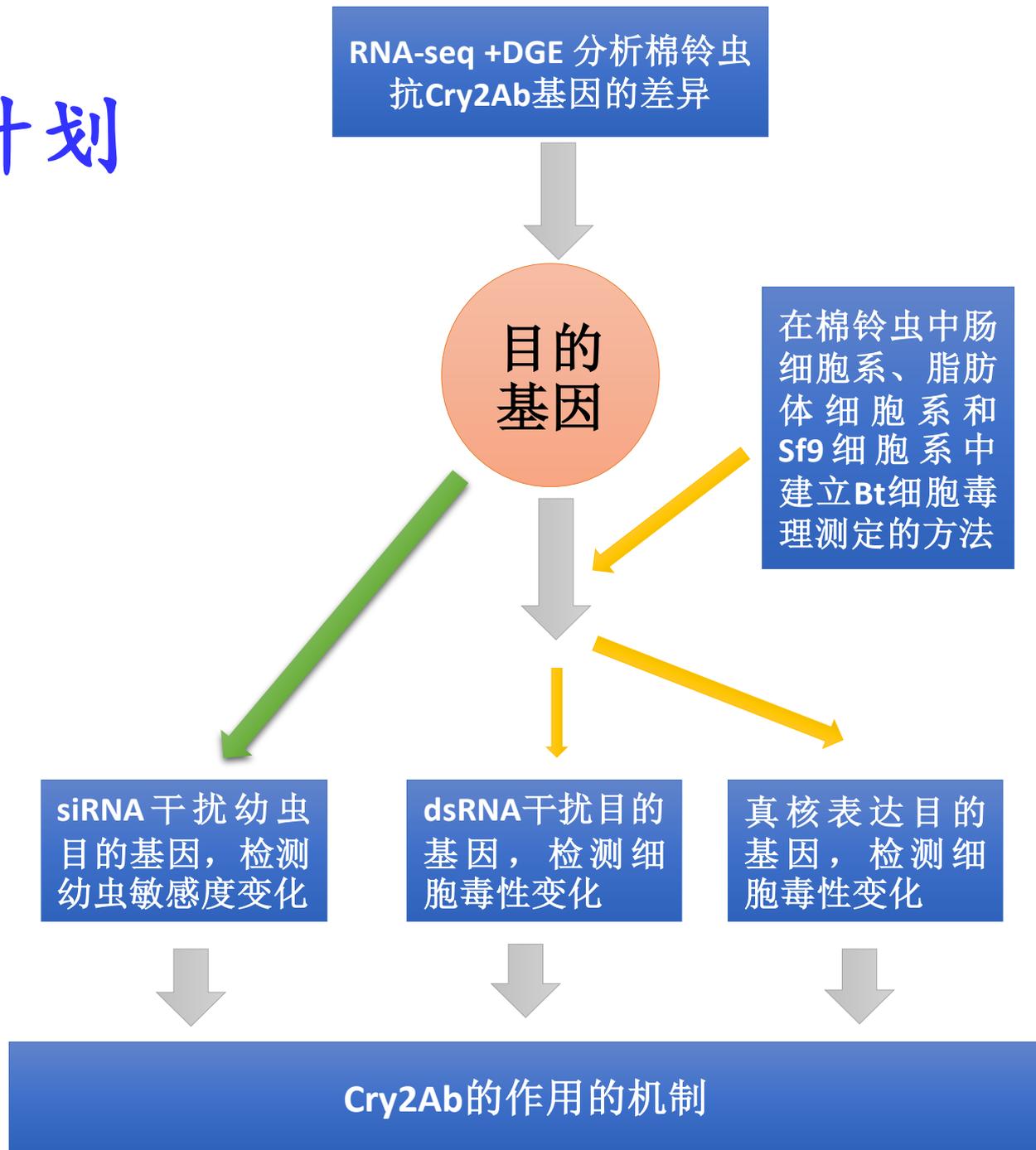
# 课题背景

---

- Cry2Ab分子量为71KDa，由633个氨基酸组成。
- Cry1Ac分子量为133KDa，由1178个氨基酸组成。
- 分子量蛋白结构差异较大，因此可能存在着不同的作用机制。



# 研究计划



# 转基因作物的发展

---

- 美国是最早进行转基因作物商业化种植的国家，也是目前世界上种植转基因作物的第一大国。
- 我国河北省政府于1995年开始试种孟山都公司研发的转基因棉花，1997年在华北地区开始大规模商业化种植。

# 我国推广抗虫棉

- 1992年华北地区棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 大爆发，差点把中国的整个棉花产业搞垮了。
- 不久后，中国也成功将人工合成的杀虫基因导入棉花主栽品种，成为继美国之后第二个拥有自主研发抗虫棉的国家。

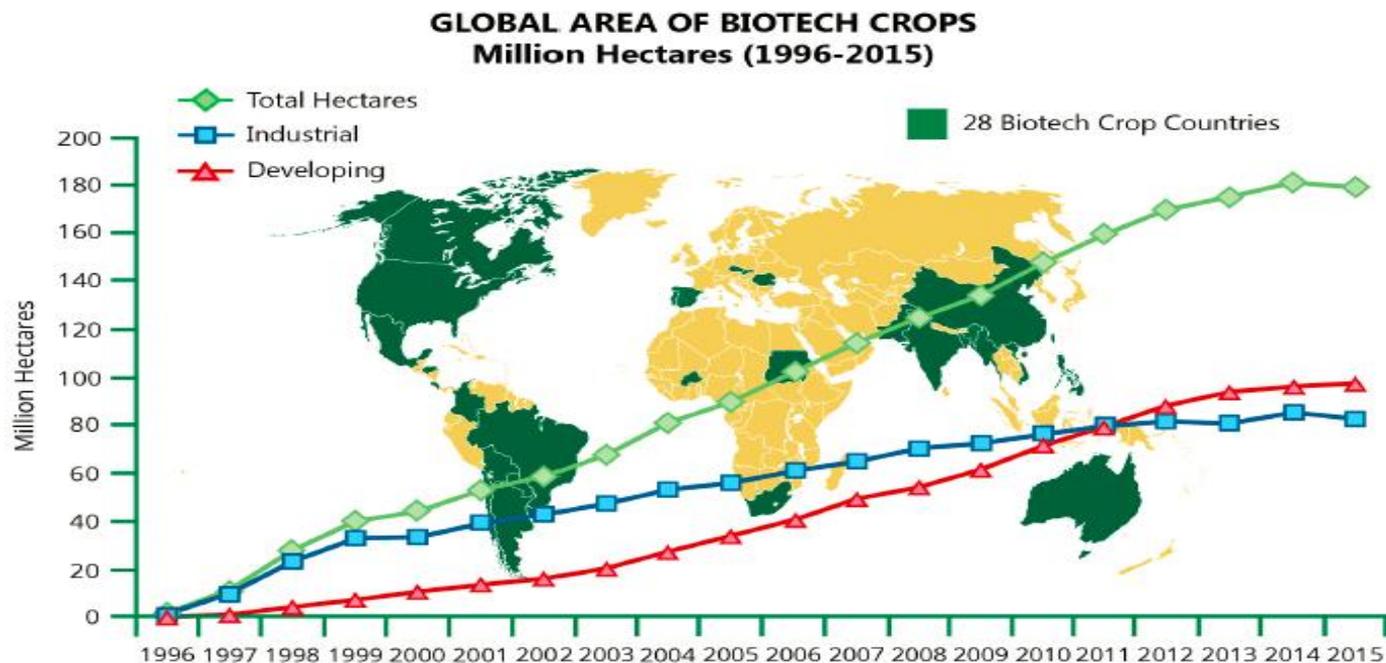
“棉铃虫可厉害了，1992年华北地区棉铃虫大爆发，差点把中国的整个棉花产业搞垮了。”李修立向本刊记者回忆，“那一年农药突然不管用了，棉铃虫泡在农药里都不死，只能用手抓。当时的朱镕基总理甚至都在电视里示范下田抓虫，但虫子太多了，根本抓不过来。那一年我们村的棉花几乎绝收，第二年很多人都不种棉花了。”

“面对如此严重的危机，中国政府采取了应急措施，将转基因棉花的研究纳入863重大研究专项，同时河北省政府于1995年开始试种孟山都公司研发的转基因棉花，并在两年后，也就是1997年正式开始在华北地区进行大规模商业化种植。”河南省农科院植保所棉花虫害课题组组长封洪强研究员对本刊记者说，“这个做法很快奏效，棉铃虫终于被控制住了。可以说，转基因棉花挽救了整个中国的棉花种植业，如果没有转基因棉花，你现在恐怕连10亩棉花地都找不到。”

温家宝：在10年前没有用转基因抗虫棉的时候，棉铃虫泡在农药里都死不掉。自从我们实施了棉花转基因工程后，棉花不仅抗虫害能力增强，而且产量也提高了。因此，我力主大力发展转基因工程，特别是最近发生的世界性粮食紧缺更增强了我的信念。

# 转基因作物的发展

- 2015年，全球28个国家种植转基因作物达26.96亿亩，是1996年种植面积的105倍



**Up to ~18 million farmers, in 28 countries planted 179.7 million hectares (444 million acres) in 2015, a marginal decrease of 1% or 1.8 million hectares (4.4 million acres) from 2014.**

Source: Clive James, 2015.

国情

决定

管理理念

澳大利亚、印度  
和巴西：

日 韩

肯尼亚

转基因作物生产国，  
管理理念接近美国

公众高度关注  
“不鼓励，不抵制，  
适当发展” 原则

管理理念  
接近欧盟

# 不同政治和经济背景，决定各国采取不同的转基因产业政策

- **美国**采取积极的转基因生物产业政策，提高其农产品生产能力，通过粮食等农产品贸易，控制全球市场，进而控制目标地区的粮食安全，以确定其在全球的霸主地位。
- **日本和欧盟**等转基因技术尚无法与美国抗衡，粮食又能自给，就以保护本国消费者和生态环境为由，采取审慎的产业政策，试图通过设置技术壁垒保护本国的生物产业，但是其转基因技术研发并未放松。
- **中国**是人口大国，农业资源短缺，粮食安全始终是威胁我国经济、社会安全的重大问题。大力发展以转基因为核心的生物技术产业，保障国家粮食安全

艾伯茨：我祝贺中国在这一领域达到世界领先水平。我曾经联合一些科学院和研究机构，试图将科学的思维方式引入农业领域。您知道，转基因作物在欧洲遭到强烈抵制，从而影响这一重要技术在非洲广泛应用。

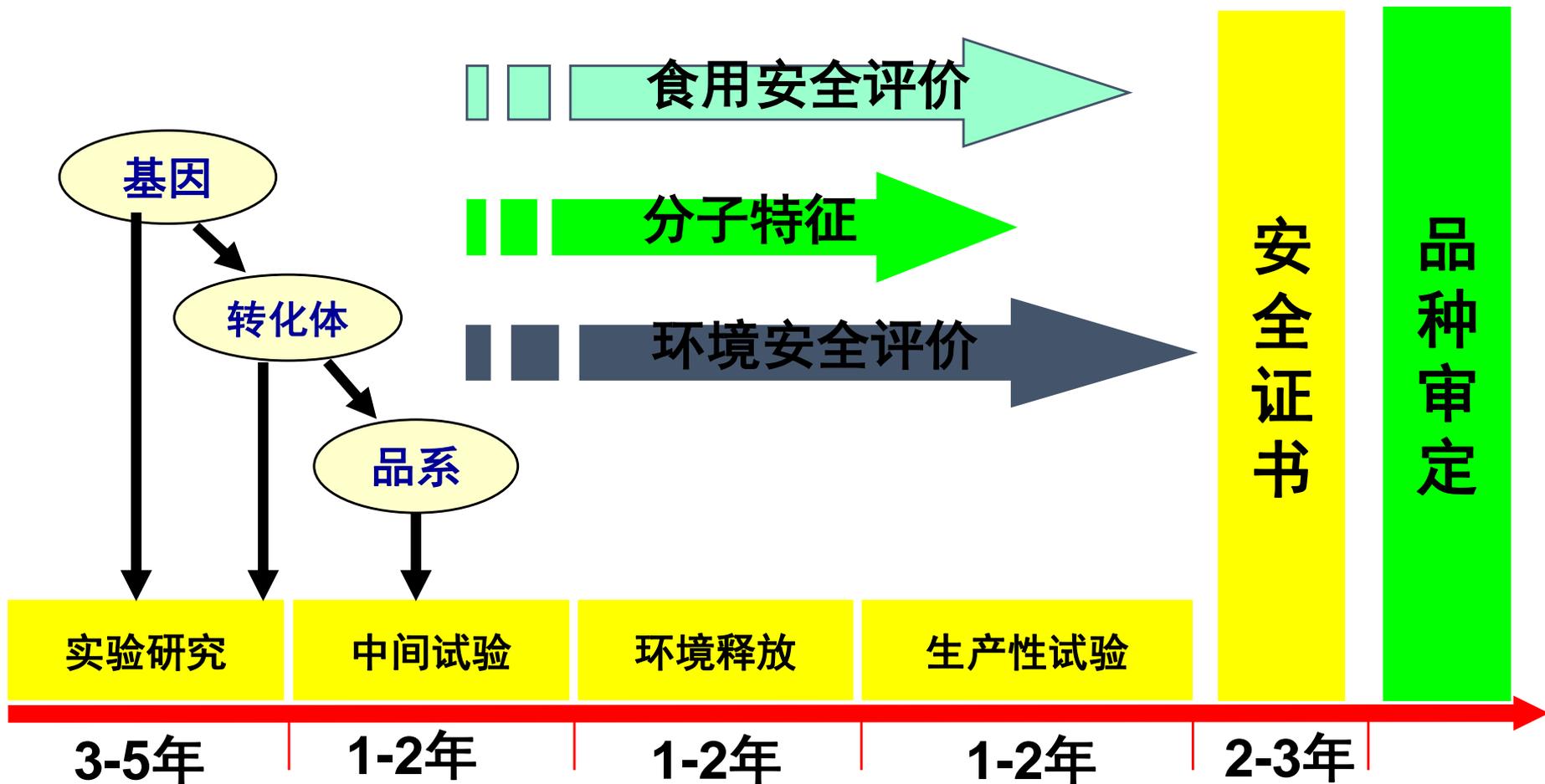
温家宝：不要把转基因这种科学同贸易壁垒联系在一起，那就会阻挡科学的发展。

# 转基因作物新品种培育进展

---

- 审定品种：**124 个**
- 发放安全证书：**6 个**
- 生产性试验：**43 份**
- 环境释放：**91 份**
- 中间试验：**686 份**
- 新品系：**4792 份**

# 转基因生物新品种研发流程



# 转基因水稻

## 1、转基因水稻新品种培育

高产优质转基因抗虫水稻：新型抗虫转基因水稻Y58S/成恢5198等10个新品系（组合）进入生产性试验，农艺性状突出，品质优良，比区试对照增产5%以上。



## 转人血清白蛋白水稻

- 高表达人血清白蛋白水稻新品系进入生产性试验
- 建立年产1吨、单批次8公斤人血清白蛋白工艺流程
- 完成8项生产技术操作规范，具备规模化生产条件



## 高抗性淀粉转基因水稻

培育的高抗性淀粉转基因水稻进入环境释放，可作为糖尿病人专用食品



## (1) 转基因抗虫水稻

- “华恢1号”和“Bt汕优63”通过安全性评价
- 开发出新型抗虫基因cry1C\*和cry2A\*，育成新型抗虫水稻T1C-19和T2A-1，及双价抗虫水稻



Bt汕优63

新型抗虫水稻

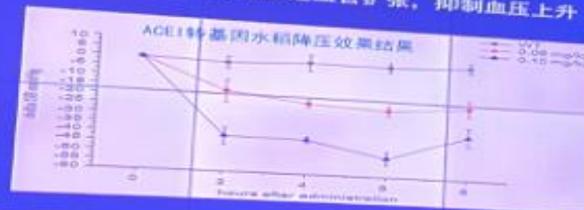
## 抗飞虱转基因水稻

转Cry30基因水稻高抗褐飞虱，抗性达到1级，有望解决水稻生产中同翅目害虫的危害



## 降血压转ACE1基因水稻

- 血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）使ACE失活，阻止血管紧张素II的生成，同时防止缓激肽降解
- 转ACEI基因水稻促进血管扩张，抑制血压上升



# 转基因小麦和玉米

## 2、转基因小麦新品种培育

**抗黄花叶病转基因小麦：**完成生产性试验，育成的优质、高抗转基因小麦新品系，比对照明显增产，具有重要的推广应用价值



转基因抗病毒小麦      对照

## 抗虫转基因玉米

**抗虫转基因玉米品系双抗12-5和IE034等**完成生产性试验，高抗玉米螟，具备产业化条件



对照      转基因抗虫玉米



## 抗除草剂转基因玉米

**新培育的抗除草剂玉米品系CC-2**进入生产性试验，高抗草甘膦，具有产业化应用前景



未喷除草剂      喷除草剂

## 3、转基因玉米新品种培育

**高产转植酸酶玉米：**培育出高植酸酶转基因杂交组合，适应性和产量明显提高，具备较好产业化应用前景



组合11TPY001：适合东北区，750-825公斤/亩，比对照增产5.8%  
组合11TPY050：适合黄淮海地区，657-721公斤/亩，比对照增产9.7%

## 科企合作创制抗虫转基因玉米 (中国农科院—奥瑞金)



2015年通州基地抗虫玉米田间展示  
左上：常规玉米虫害严重，抗虫玉米未受影响  
左下：玉米螟对常规玉米茎秆钻食危害  
右上：抗虫玉米叶部无虫眼，常规玉米叶部受害严重

## 抗逆转基因玉米

**转ABA合成关键基因LOSS抗旱玉米新自交系“T8920B6”，**在灌溉用水减少50%的干旱条件下，产量比对照显著提高



T8920B6      T8920B6

# 转基因大豆和棉花

## 4、转基因大豆新品种培育

### 抗草甘膦转基因大豆

转*G2-EPSPS/GAT*、*G10-EPSPS*转基因大豆新品系，高抗草甘膦，可降低生产成本，已完成环境释放，申请生产性试验



非转基因  
喷除草剂

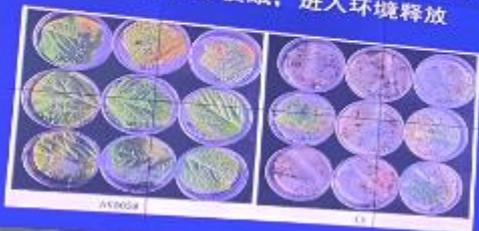
转基因  
喷除草剂

转基因不喷  
除草剂

转基因不喷  
除草剂

### 抗虫转基因大豆

转*CryIIem*基因抗虫大豆品系AK8059，高抗食叶性害虫-斜纹夜蛾，进入环境释放



AK8059

15

### 抗黄萎病棉花

三个转*GFP*基因新品系高抗黄萎病完成中间试验，进入环境释放阶段



转GFP品系	2011	2012	2013
19-84	27.20	25.15	25.15
19-115-1-1001	20.80	22.20	22.20
19-115-1-1002	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1003	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1004	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1005	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1006	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1007	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1008	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1009	18.20	21.20	21.20
19-115-1-1010	18.20	21.20	21.20

## 抗旱转基因大豆

转*GmNFYB*基因新品系，在干旱地区社蒙县干旱条件下产量增加5%以上，申请环境释放；转*TaDREB3*基因新品系进入环境释放



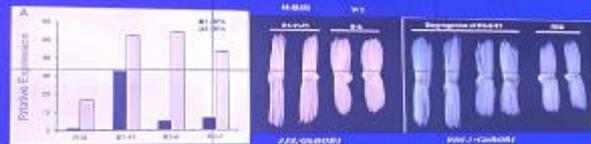
## 5、转基因棉花新品种培育

2008-2015年，培育转基因新品种147个，累计推广4.0亿亩，占国内市场份额95%，减少农药用量40万吨，经济效益450亿元



### 品质改良转基因棉花

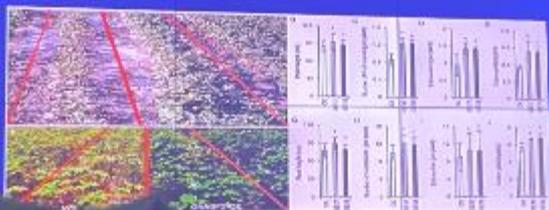
转*GhBOB1*基因棉花，纤维长度能稳定提高10-15%，完成中间试验，进入环境释放



# 转基因动物

## 耐旱耐盐碱转基因棉花

转*GhABF2*基因棉花耐旱性、耐盐碱性显著增加，进入环境释放



## 6、转基因猪新品种培育

- 肌抑素基因敲除猪已完成生产性试验，瘦肉率比对照提高5.7%-15.3%，达到国际领先水平
- 抗腹泻转基因猪进入生产性试验
- 转*sfat-1*优质转基因猪进入环境释放



肌抑素基因敲除猪

## 8、转基因羊新品种培育

- 抗腹泻奶山羊进入生产性试验
- 抗乳房炎奶山羊进入环境释放
- 转人乳铁蛋白奶山羊进入环境释放



## 多基因聚合棉花

转*HEWL*、*nhaD*和*CP4-EPSPS*基因棉花高抗黄萎病、耐盐、抗草甘膦，进入环境释放



0.3%草甘膦处理，7天

大田黄萎病(Y400)最高株高90天后表现情况

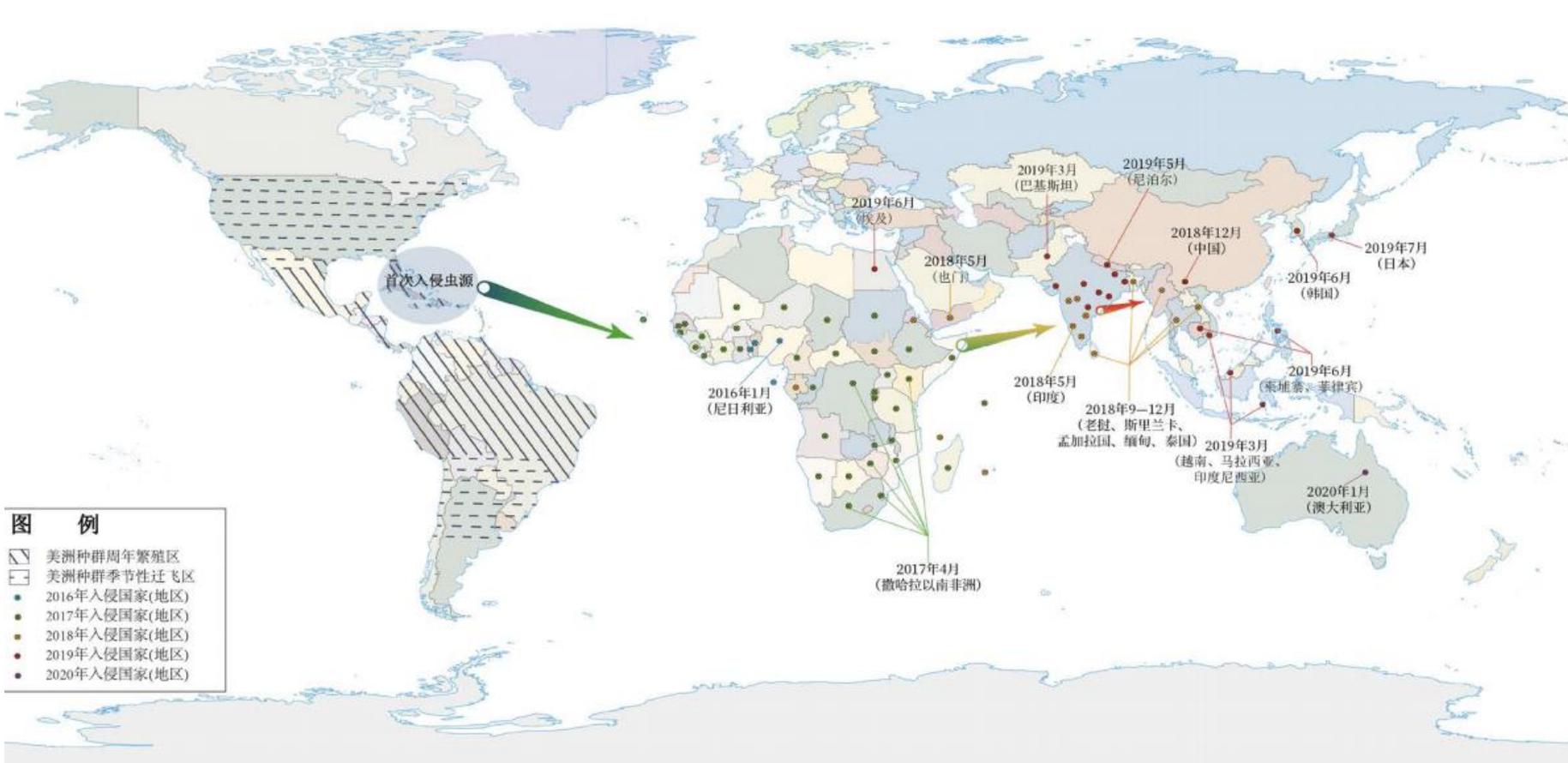
## 7、转基因牛新品种培育

- 人乳铁蛋白转基因奶牛进入生产性试验，重组蛋白表达量3.4克/升，达国际最高表达水平
- 人乳清白蛋白转基因奶牛进入生产性试验
- 人溶菌酶转基因克隆牛进入生产性试验



人乳铁蛋白功能：补铁、广谱抗菌、抗病毒、护胃

# 草地贪夜蛾入侵我国



# 草地贪夜蛾入侵我国

1997年河北省开始应用转基因抗虫棉花防治棉铃虫,到2000年其在黄河流域的种植比例超过棉花总面积的80%,并很快在长江流域等棉区推广应用。转基因抗虫棉花的种植切断了棉铃虫取食小麦、棉花和玉米的季节性食物链条,不仅高效控制了棉铃虫对棉花的危害,也大大降低了对玉米和小麦等其他作物的危害。农业生态系统天敌数量持续增加,生防服务功能得到恢复,棉铃虫区域性灾变问题得到了有效解决<sup>[25]</sup>。

靶标害虫的抗性治理是转基因作物生产应用的重要环境安全问题。在转基因抗虫棉花的生产实践中,中国采用了两种抗性治理措施,一是在黄河流域利用玉米、小麦、大豆、花生等普通作物提供天然庇护所延缓棉铃虫对Bt棉花的抗性发展<sup>[26]</sup>,二是在长江流域等地区采用Bt棉花与普通棉花杂交F<sub>2</sub>代分离25%普通棉花形成的种子混合庇护所治理抗性<sup>[27]</sup>。二十多年的生产实践证明,中国棉铃虫的抗性治理策略是十分成功的,已成为世界转基因抗虫作物可持续利用的经典案例。

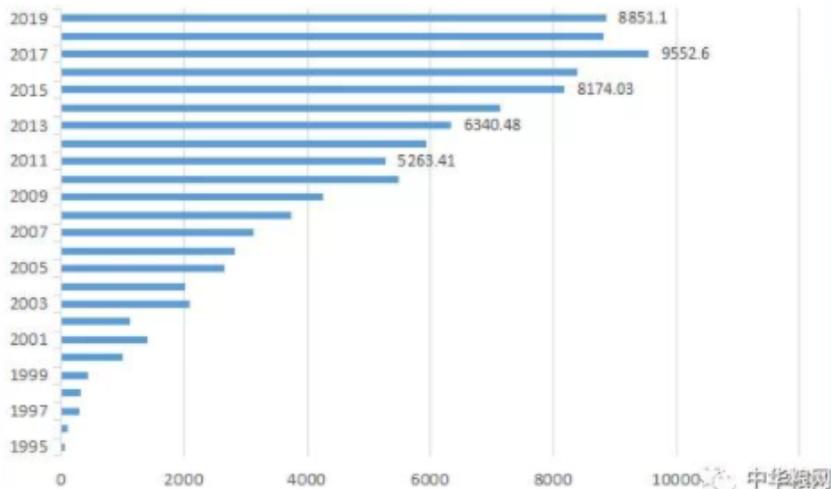
前事不忘,后事之师。草地贪夜蛾的防控无疑要吸取棉铃虫防控过程中的经验与教训。现阶段要通过实施以化学防治为主的综合防治策略解决应急防控问题,防止出现因严重为害玉米和小麦等作物而产生粮食安全问题。这样的技术路线防治投入成本高并存在一定的食品安全风险与较高的环境安全风险。由于入侵定殖的草地贪夜蛾已经对有机磷、拟除虫菊酯、氨基甲酸酯和烟碱类化学杀虫剂产生了很高的抗性<sup>[28,29]</sup>,大面积使用酰胺类等为数不多的高防效杀虫剂将很快引起抗药性的产生。一旦草地贪夜蛾对目前防效尚高的几类农药产生抗性,生产上将出现缺乏有效控制措施的被动局面,这将很可能重现20世纪90年代棉铃虫失控的严重后果。

历史上,草地贪夜蛾一直是美国玉米和棉花等作物的重要害虫。20世纪90年代以来,美国通过采用转基因抗虫玉米(Bt玉米)为主的防治技术实现了绿色可持续控制。入侵草地贪夜蛾来源于美国,抗性测定表明其对Bt玉米没有产生明显的抗性。中国Bt玉米对草地贪夜蛾的抗性评价工作已经完成,结果显示具有很高的抗性水平<sup>[30]</sup>。农业农村部2019年对2个转化事件颁发了安全证书<sup>[31]</sup>,表明Bt玉米的应用技术已经趋于成熟。因此,要充分利用应急防控阶段所能提供的3~5年窗口期,尽快制定实施以Bt玉米等高新技术为核心的草地贪夜蛾可持续治理策略。

# 我们或多或少都接触了转基因

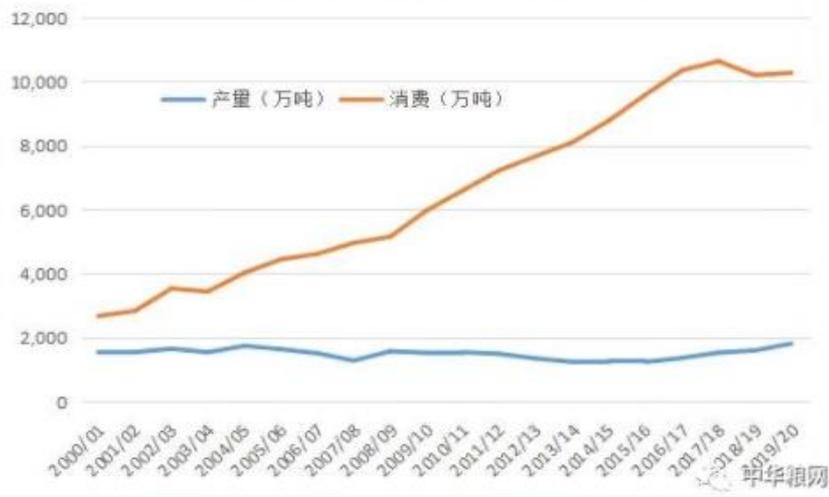
- 中国进口的多为转基因大豆，用于饲料和油类等生产。

中国大豆进口量 (万吨)



数据来源：中国海关，中华粮网作图

2000年以来中国大豆自产量和需求量



数据来源USDA，中华粮网作图

# 收获与体会

---

- 学到了生物信息相关的知识、许多使用的网站更重要的是，自己探索各种资源库和工具能力的提升等。
- 更被老一辈科学家的精神风骨感动。



# 部分参考文献

---

- 魏纪珍. 棉铃虫受体蛋白在Cry1Ac、Cry2Ab交互抗性中的作用[D]. 中国农业科学院, 2016.
- 吴孔明. 中国草地贪夜蛾的防控策略[J]. 植物保护, 2020, 46(02): 1-5.
- Rubio-Infante, Néstor, Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2016, 36(5): 630-648.
- Block, J, Libman, *et al.* Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. (cover story)[J]. *Nature*, 1991, 353(6347): 815-815.
- Tabashnik B E , Malik H S . ABCs of Insect Resistance to Bt[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(11): e1005646.
- Pardo-López Liliana, Soberón Mario, Alejandra B . *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection[J]. *Fems Microbiology Reviews*(1): 3-22.
- Tabashnik B E , Gassmann A J , Crowder D W , *et al.* Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(2): 199-202.
- Bravo A , Mario Soberón. How to cope with insect resistance to Bt toxins?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(10): 573-579.
- Grochulski P , Masson L , Borisova S , *et al.* *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation.[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 254(3): 447-64.
- Guo S , Ye S , Liu Y , *et al.* Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. [J]. *Journal of Structural Biology*, 2009, 168(2): 259-266.
- Boonserm P , Mo M , Angsuthanasombat C , *et al.* Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Ångstrom Resolution[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(9): 3391-3401.

# 致谢

---

- 感谢罗老师这学期以来的讨论指导，由于疫情，不得不线上教学，但授课效果却没有折扣，不得不归功于罗老师的耐心，和一次又一次的课下讨论。除了知识，罗老师身上的精神，也使我一生受用。
- 感谢本小组成员毕蒙蒙、常立春、孙鹏雷，这是个非常优秀的小组，在一次又一次的讨论中学到了很多东西。
- 感谢CAAS20博士班的每一个同学，这是一个很融洽的班级，祝你们科研顺利，以后不会的问题还要在群里积极交流！

**Thanks for your attention !**