



评述

棉铃虫对转 Bt 基因抗虫棉花的抗性机制及治理

刘晨曦, 李云河, 高玉林, 宁长明, 吴孔明*

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: wkm@caasocse.net.cn

收稿日期: 2010-05-13; 接受日期: 2010-06-06

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB109204)和国家转基因重大专项(批准号: 2008ZX08012-004)资助项目

摘要 棉铃虫是危害棉花最严重的害虫之一. 作为生物技术产品, 转 Bt 杀虫基因棉花产生的 Cry 毒素对棉铃虫有高效毒杀作用. Bt 棉花已在世界范围内商业化种植, 通过有效控制棉铃虫种群数量, 而显著减少了化学农药的用量. 尽管没有发现棉铃虫田间种群对 Bt 棉花产生高水平抗性, 但室内持续筛选已培育出多个高水平抗性品系, 表明存在棉铃虫对 Bt 棉花产生抗性的风险. 鉴于棉铃虫对 Bt 棉花产生抗性可能对 Bt 棉花利用价值的影响, 国内外近 10 年来对此进行了系统深入地研究. 本文综述了棉铃虫对 Bt 棉花抗性的生物化学和分子机制、抗性治理与监测技术的最新研究进展, 并分析了中国、澳大利亚和印度等国家棉铃虫对 Bt 棉花的抗性治理策略.

关键词
棉铃虫
Bt 棉花
抗性机制
抗性监测
抗性治理

棉花是重要的经济作物之一. 2006 年, 全球有 75 个国家种植棉花, 产量达 270 亿公斤, 占世界纤维总需求的 40%^[1]. 许多害虫能够危害棉花, 导致其产量下降. 因此, 棉花害虫防治费用在棉花种植总费用中占很大份额. 在种植转基因抗虫棉花之前, 棉花农药使用量达到总农药使用量的 22.5%^[1]. 转基因抗虫棉花释放的 Cry 毒素能够很好地控制棉田鳞翅目害虫. 1996 年, 美国开始种植第一代 Bt(*Bacillus thuringiensis*)棉花. 到 2007 年, 世界上 Bt 棉花种植已达 1400 万公顷^[2]. 通过减少化学农药的使用, 从而减少了环境污染, 降低了农药残留对人类健康的威胁, 控制了一些害虫的种群数量, 提高了农民的收入. 1996~2005 年, 由于 Bt 棉花的种植, 农药使用量减少了 9450 万公斤, 农业收入提高了 75 亿美元^[1].

Bt 棉花的种植也存在着潜在的环境安全问题, 最突出的是害虫对 Bt 毒素的抗性风险^[3]. 尽管在转基因棉田尚没有发现高水平的抗性种群, 但棉铃虫

(*Helicoverpa armigera*)对传统化学农药抗性的发展历史, 表明存在对 Bt 毒素产生抗性引起严重后果的可能^[4]. 目前, 在几个实验室, 通过毒素的连续抗性筛选, 已经培育出多个高水平的棉铃虫抗性品系, 说明棉铃虫可以发展对 Bt 棉花的高水平抗性^[5~7].

为了延缓害虫对转 Bt 作物的抗性, 国内外对抗性机制和抗性监测与治理策略开展了深入的研究工作. 近年来, 在这一研究领域发表了很多相关的文章. 本文深入分析了 Bt 抗性的生物化学与分子生物学机制, 扼要介绍了中国、澳大利亚和印度 Bt 棉花的商业化进程(表 1), 详细阐述了抗性监测与治理策略的实施与应用.

1 抗性筛选与适合度

尽管 Bt 棉花能够有效地控制棉铃虫种群数量^[8~11], 但大面积种植 Bt 棉花增加了棉铃虫对 Bt 抗

表 1 中国、澳大利亚及印度商业化种植 Bt 棉花的基因类型

国家	杀虫基因	商业化年份	2009 年种植面积/ 万公顷
中国	<i>CryIAc</i>	1997	300
	<i>CryIAc+CpTI</i>	1999	
澳大利亚	<i>CryIAc</i>	1996	18
	<i>CryIAc+Cry2Ab^{a)}</i>	2002	
印度	<i>CryIAc</i>	2002	840
	<i>CryIAc+Cry2Ab^{b)}</i>	2005	

a) 2003/2004 年, Bollgard- II 完全替代 Bollgard- I ; b) 2005 年, Bollgard- II 获得商业化种植许可

性的风险^[12~14]. 近 10 年的抗性监测数据表明, 只有美洲棉铃虫的田间种群在美国产生了抗性^[3], 目前还没有发现棉铃虫对 Bt 棉花产生抗性. 但在中国、澳大利亚、印度, 经过多年的室内抗性筛选, 已获得了几个对 CryIA 毒素有高水平抗性的品系(表 2)^[5~7].

多项研究表明, 抗性的产生常伴随着适合度的成本, 包括发育速率、繁殖、存活率、交配竞争力的降低. Liang 等人^[15]发现, 室内筛选的高抗品系棉铃虫的幼虫发育相对缓慢, 蛹重降低, 受精率和繁殖力都有所下降. 在通过渐渗杂交的方式导入一个突变的抗性基因(*Cadherin r1*)的近等基因系也发现了幼虫发育缓慢的现象^[19]. 此外, 在抗性品系中也发现有较高的滞育速率^[22]. Zhao 等人^[23]发现, 抗性品系棉铃虫的求偶行为有所改变. 与敏感品系比较, 抗性品系中求偶个体数量减少; 求偶速率、时间、次数都明显下降; 求偶高峰延迟. 此外, 抗性品系的交配行为与敏感品系略有不同. 抗性品系降低了交配频率, 延迟

了交配时期^[24]. Bird 和 Akhurst^[25]发现, 不同的寄主作物对棉铃虫适合度也有很大的影响. 相对于其他作物, 在非 Bt 棉花上的棉铃虫适合度代价要高一些. 这些结果都说明, 棉铃虫必须以适合度为代价来进行抗性演化.

2 Bt 抗性机制

为了明确 Bt 的抗性机制, 对 Bt 毒素作用机理的研究也取得了较大进展. 目前, 关于 Bt 毒素作用机理假说很多, 被广泛认可的只有 2 个作用模型: 穿孔模型和信号转导模型. 穿孔模型包括几个步骤: (i) 摄入的毒素晶体在昆虫中肠特殊的碱性条件下水解, 前毒素释放出来; (ii) 前毒素在中肠蛋白酶的作用下水解为有活性的毒素单体分子; (iii) 经过中肠上皮细胞糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定的毒素受体分子的定位, 毒素单体分子结合中肠上皮细胞上的钙黏蛋白受体; (iv) 在中肠特定的蛋白酶的作用下, 毒素单体分子结构域 I 中的 α -1 螺旋被剪切掉, 毒素单体分子变成了寡聚体; (v) 寡聚化的毒素分子结合锚定在中肠上皮细胞的氨肽酶(aminopeptidase N, APN)和碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, ALP), 大量聚集在中肠上皮细胞的寡聚化的毒素分子穿孔, 导致细胞死亡^[26,27]. 信号转导模型是指毒素单体分子结合中肠上皮细胞的钙黏蛋白受体后, 激发了依赖 Mg^{2+} 的细胞信号转导通路, cAMP 迅速增多, 激活了蛋白激酶 A, 引起细胞凋亡^[28~30].

表 2 中国、澳大利亚、印度室内筛选的棉铃虫 Bt 抗性品系

抗性品系名称	国家	抗性特征				参考文献
		Bt 毒素	筛选代数	抗性倍数	遗传方式	
BtR	中国	Cry1Ac 前毒素	87	2893	常染色体不完全隐性遗传	[6,15]
		Cry1Ac 毒素		564	常染色体不完全隐性遗传	
GYBT		Cry1Aa 毒素	28	103	—	[16~18]
		Cry1Ab 毒素		>46	—	
		Cry1Ac 毒素		438	常染色体完全隐性遗传	
SCD-r1		Cry1Aa 毒素	—	>41	—	[19]
		Cry1Ab 毒素		31	—	
		Cry1Ac 毒素		160	常染色体完全显性遗传	
BKBT		Cry1Aa 毒素	30	43	—	[20]
		Cry1Ab 毒素		892	—	
BX	澳大利亚	Cry1Ac 前毒素	21	321	常染色体不完全隐性遗传	[7]
RES-AC	印度	Cry1Ac 前毒素	14	93	常染色体半显性遗传	[5,21]
RES-Bt		Cry1Ac 前毒素	15	205	常染色体半显性遗传	[5,21]

因此, Bt 毒素需经过连续的水解、结合等反应, 才能对昆虫具有毒性. 其中任何一个环节的改变都会导致昆虫对 Bt 毒素产生抗性. 产生抗性机制的主要因素也是 Bt 毒素作用机制中的关键环节^[31]. 目前所发现的昆虫对 Bt 毒素抗性机制也不尽相同^[31,32].

2.1 Bt 抗性的生化基础

经过 10 多年的研究, 利用生物化学手段来分析 Bt 抗性机制已取得了一定进展. 在室内筛选的棉铃虫抗性品系中发现了蛋白酶的缺失、受体结合降低、免疫反应的增强及酯酶的高表达等抗性机制(图 1).

(1) 蛋白酶调控的 Bt 抗性. 棉铃虫中肠蛋白酶在 Bt 前毒素的活化中起着重要作用. 由于蛋白酶的缺失使前毒素的活化程度降低而产生的抗性是抗性品系中最普遍的机制^[31]. Oppert 等人^[33]发现, 印度谷螟(*Plodia interpunctella*)中肠因缺少胰蛋白酶(Trypsin)的活化作用而对 Cry1A 毒素产生了抗性. 在玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)和烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)的抗性品系中也发现了同样情况^[34,35]. 在棉铃虫的抗性品系中, 一种丝氨酸蛋白酶 HaSP2(*H. armigera* serine protease 2)的缺失致使前毒素不能正常水解与活化^[36].

(2) 酯酶螯合及免疫反应增强. 酯酶螯合及免疫反应增强也是 Bt 抗性机制. 酯酶能够螯合 Cry1Ac 毒素, 使之不能与昆虫中肠上皮细胞的受体结合, 从而降低 Cry1Ac 毒性. Gunning 等人^[37]发现, 酯酶在棉

铃虫的抗性品系中的表达量上调而使 Cry1Ac 毒素与中肠上皮细胞受体蛋白的结合降低. 用亚致死浓度的 Cry1Ac 毒素饲喂地中海粉蛾(*Ephestia kuehniella*)而使其对毒素产生耐性. 耐性品系的免疫反应急剧升高^[38]. 免疫反应产生的一种凝聚物能识别 Cry1Ac 毒素, 并对其包被, 使其与中肠上皮细胞的受体蛋白结合降低^[39]. 在棉铃虫抗性品系中, 发现增强的免疫反应与血淋巴的黑化及血淋巴中存在一种可与 Cry1Ac 毒素结合的血清蛋白(hexamerin)有关^[40]. 增强的免疫反应可通过母本效应传递给下一代. 因此, 这种抗性机制对 Bt 作物是潜在的威胁.

(3) 结合位点的改变. Bt 毒素结合位点的改变可导致高水平抗性的产生^[31]. 通过 Cry1A 毒素与棉铃虫中肠刷状缘膜囊泡(brush border membrane vesicles, BBMV)竞争结合实验, 建立了 Cry1A 毒素的 3 个位点结合模型(图 2)^[41]. Cry1Aa 毒素仅识别位点 1, Cry1Ab 毒素识别位点 1 和 2, 而 Cry1Ac 毒素能够全部识别 3 个位点. 通过对 Cry1A 毒素与棉铃虫敏感和抗性品系 BBMV 的结合研究发现, 毒素与受体结合的降低是棉铃虫对 Cry1A 毒素产生抗性的主要原因之一^[41].

结合位点的改变是棉铃虫对 Cry1A 毒素产生抗性的主要机制. 有研究发现, 这种结合的改变不只是限制在 Cry1A 毒素, Cry2A 毒素与 BBMV 结合的降低也使棉铃虫对 Cry2A 毒素产生了抗性^[42](图 2).

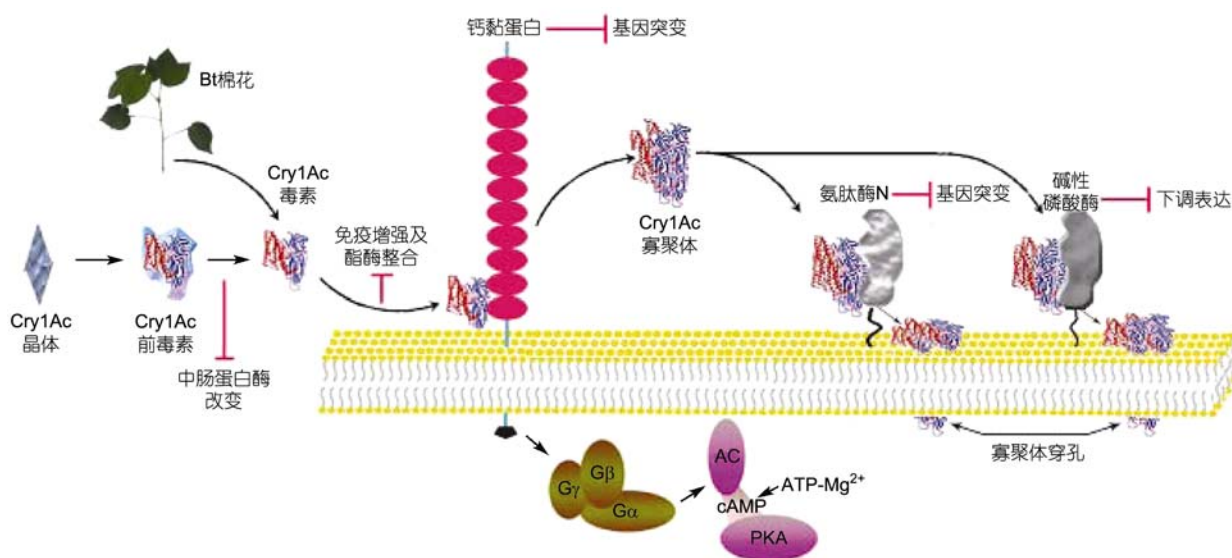


图 1 Cry1A 毒素的作用机制及棉铃虫抗性机制

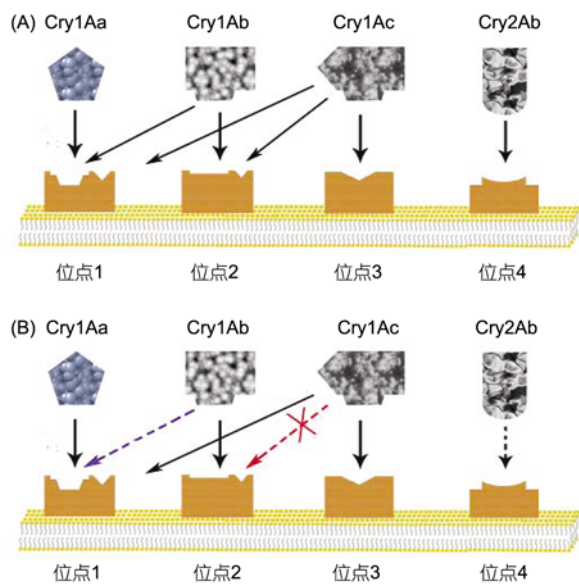


图2 Cry1A 和 Cry2Ab 毒素结合棉铃虫中肠不同位点的模型

(A) 敏感种群; (B) 抗性种群

结合研究表明, Cry2Ab 毒素与抗性棉铃虫种群的中肠 BBMV 的结合明显降低, 而 Cry1Ac 毒素的结合没有改变^[42]. 该研究表明, 棉铃虫可以进化成对 Cry2Ab 毒素产生抗性的种群.

2.2 Bt 抗性的分子基础

Bt 毒素特异性结合昆虫中肠受体蛋白是其产生毒性的关键环节. 缺失或减少受体蛋白的表达能够降低 Bt 毒素对昆虫的毒性^[43]. 钙黏蛋白、氨肽酶 N 及碱性磷酸酯酶基因的突变及表达下调都与昆虫对 Bt 产生抗性紧密相关. 研究 Bt 抗性的分子机制可为田间 Bt 抗性监测提供检测工具和理论依据, 为 Bt 抗性治理奠定科学基础.

(1) 钙黏蛋白调控的 Bt 抗性. 钙黏蛋白是比较大而复杂的糖蛋白家族, 是许多细胞活动, 如细胞识别、细胞信号转导、形态发生、维持细胞结构、神经传递的基本保证. 与 Cry 毒素结合的钙黏蛋白主要包括以下几个基本结构: (i) 细胞外结构域, 包含一个信号肽, 9~12 重复序列; (ii) 一个跨膜区; (iii) 一个较短的细胞质内域. Cry 毒素的结合区主要位于临近膜的重复序列, 这段区域在 Cry 毒素产生毒性的过程中起重要作用^[44,45]. 在室内筛选的烟芽夜蛾^[46]及田间棉铃虫(*Pectinophora gossypiella*)^[47]的抗性

品系中, 钙黏蛋白基因的 4 种突变体与 Cry1Ac 抗性紧密连锁.

在棉铃虫抗性种群中, 已检测出 8 种钙黏蛋白的基因突变(图 3(B)). 在室内筛选的棉铃虫抗性品系中, 钙黏蛋白突变基因 *r1* 的产生主要是由于 DNA 水平上缺失 10 kb 的碱基^[16]. 另外 7 种钙黏蛋白的突变基因 (*r2*~*r8*) 主要是在 2 个田间的棉铃虫种群中发现的, 这些突变主要由转座子插入或点突变而引起的转录而提前终止^[17,48]. 由于钙黏蛋白基因突变的多样性, 相对于 DNA 检测, F₁ 筛选是检测田间种群钙黏蛋白基因突变频率的理想且较实际的工具.

(2) 氨肽酶调控的 Bt 抗性. 通过 GPI 锚定在中肠上皮细胞的氨肽酶 N 已经被识别为 Cry1A 毒素的受体蛋白^[49-51]. 近来, 通过基因敲除^[52]或抗体封闭^[53]来沉默或封闭棉铃虫中肠的氨肽酶 N 的研究表明, 氨肽酶 N 的缺失与 Cry1A 的毒性相关.

通过抑制性消减杂交研究发现, 在对 Cry1Ca 毒素的甜菜夜蛾抗性品系中, 氨肽酶 N 的下调表达是抗性产生的主要原因^[54]. Zhang 等人^[55]利用 cDNA-AFLP 方法分析了室内筛选的棉铃虫抗性品系与敏感品系基因的差异, 发现在抗性品系中氨肽酶 N 缺失了可与 Cry1Ac 结合的片段(图 3(A)). 通过进一步验证, 缺失结合区的氨肽酶 N 不能与 Cry1Ac 毒素结合, 说明棉铃虫抗性品系中氨肽酶基因的突变与 Cry1Ac 毒素的抗性相关.

(3) 碱性磷酸酯酶调控的 Bt 抗性. 碱性磷酸酯酶也是一类通过 GPI 锚定在昆虫中肠上皮细胞的蛋白. 研究表明, 碱性磷酸酯酶也是 Cry1A 毒素的受体蛋白^[56]. 目前认为, 碱性磷酸酯酶在 Cry1A 毒素的作用机理中有两个作用: 一是通过 Cry1A 毒素的单体分子与碱性磷酸酯酶结合, 毒素单体分子定位在中肠上皮细胞的表面; 二是寡聚化的毒素分子与碱性磷酸酯酶结合后插入细胞膜内^[57]. 因此, 碱性磷酸酯酶在昆虫的抗性品系中的变化直接与 Bt 抗性相关.

研究表明, 在对 Cry1Ac 的烟芽夜蛾抗性品系中, 碱性磷酸酯酶的表达下调, 酶活力降低^[58]. 通过遗传连锁实验, 发现在回交后代中的碱性磷酸酯酶的表达量与 Cry1Ac 的毒性相关^[59].

近来, 利用 RT-PCR 及酶活力分析, 在本实验室内筛选对 Cry1Ac 的棉铃虫抗性品系中, 碱性磷酸酯酶的表达量及酶活力都呈下降趋势(未发表资料). 这些研究直接证明了碱性磷酸酯酶的表达量是昆虫产

生对 Cry1A 抗性的关键因素.

3 Bt 抗性治理

为了有效地延缓 Bt 抗性的进化, 几项相应的抗性治理策略已经在田间实施应用. 这些策略主要包括 Bt 毒素在转基因作物中高效表达、双价基因、Bt 毒素特异性时空表达及利用非转基因作物作为庇护所等^[32]. 庇护所是在田间应用较早的抗性治理策略^[12,14,60]. 研究数据表明, 庇护所能明显降低害虫对 Bt 抗性的进化^[61]. 在中国, 通过系统评估 Bt 棉花对棉铃虫种群区域性变化调控作用和非棉花寄主作物对棉铃虫的天然庇护所功能, 提出了利用小农模式下玉米、小麦、大豆和花生等棉铃虫寄主作物所提供的天然庇护所治理棉铃虫对 Bt-Cry1Ac 棉花抗性的策略^[62-65].

双价基因策略是指在同一转基因作物中表达两种不同杀虫机理的 Bt 毒素, 这种策略可有效延缓抗性的进化^[66]. 1996 年, 只表达一种 Cry1Ac 毒素的转基因棉花(Bollgard- I)在澳大利亚开始商业化种植. 2002 年, 为了预防棉铃虫种群对 Bt 产生抗性, 表达 Cry1Ac 毒素和 Cry2Ab 毒素的双价转基因棉(Bollgard- II)在澳大利亚获得商业化种植许可. 在 2003~2004 年, Bollgard- II 完全替代了 Bollgard- I. 截止到 2006 年, Bollgard- II 已占总棉田的 80%^[67]. 同时, 有数据表

明, Bollgard- II 较好地控制了棉田里的多种靶标害虫^[68].

在印度, 利用非 Bt 棉做庇护所及双价基因棉的策略来延迟 Bt 抗性的产生. 表达单一 Cry1Ac 基因的 Bt 棉花于 2002 年在印度开始商业化种植^[8]. 2005 年, Bollgard- II 已获得商业化种植许可. 此外, 在印度种植的 Bt 棉花周围要求设置至少 5 行或 20%非转基因棉花. 印度与中国有相似的种植模式, 即 Bt 棉花附近会种植番茄、向日葵、高粱、玉米、辣椒等棉铃虫寄主作物. Ravi 等人^[69]认为, 这些非 Bt 棉花的寄主作物被棉铃虫取食, 从而起到天然庇护所作用. 因此, 印度对是否需要强制性设计结构化的庇护所还存在一些争议.

4 Bt 抗性监测

一般认为, 抗性监测是抗性治理的主要工具之一. 从 1997~2006 年, 中国一直使用传统的生测方法来检测田间棉铃虫种群对 Cry1Ac 蛋白的敏感性^[70]. 田间监测数据表明, 棉铃虫种群对 Cry1Ac 毒素的敏感性没有改变^[70]. 在 10 年大规模的 Bt 棉花商业化种植后, 棉铃虫种群的抗性基因仍十分稀少, 而玉米、大豆、花生及一些蔬菜等天然庇护所是使田间棉铃虫种群保持对 Cry1Ac 毒素敏感性的主要因素之一. 此

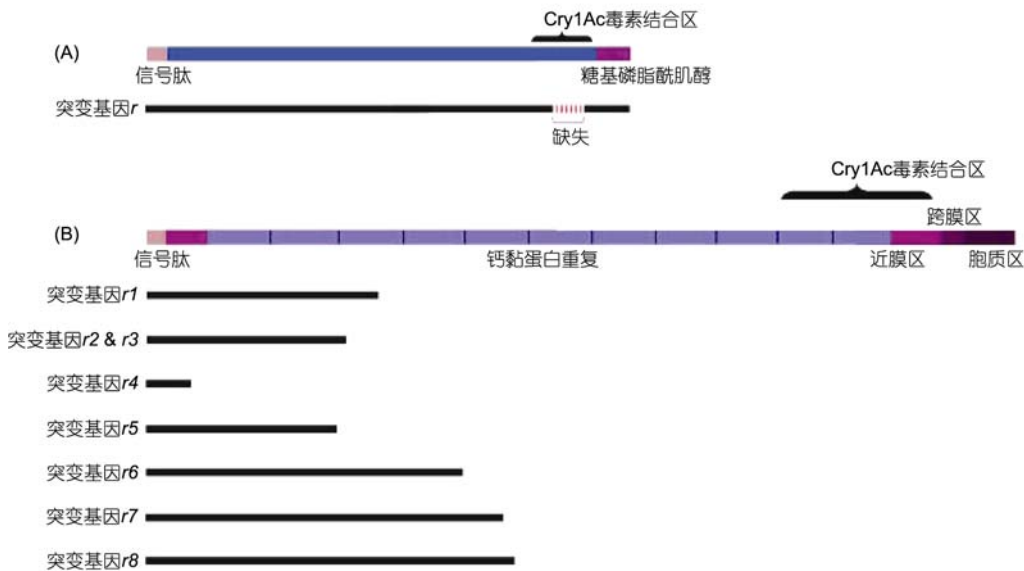


图3 Cry1Ac 抗性棉铃虫氨肽酶 N 基因及钙黏蛋白基因突变位点
(A) 氨肽酶 N; (B) 钙黏蛋白

外, 由棉铃虫种群迁飞而引起的基因交流也是延缓 Bt 抗性进化的因素之一^[71,72]. 尽管传统的生测分析能进行常规的抗性监测, 但当抗性频率低于 0.005 时, 这种方法就不够灵敏了^[73]. 从 2002~2008 年, F_1/F_2 筛选监测棉铃虫抗性频率已在山东夏津县和河北安次县实施. 监测数据表明, 田间棉铃虫种群没有进化成抗性种群, 天然庇护所对延缓抗性的进化、保持抗性基因频率处在较低水平以下起到非常重要的作用^[74,75].

1994 年, 澳大利亚在 Bt 棉花商业化种植之前就开始了 Bt 抗性监测研究. 从那时就已用 F_0 筛选监测 Cry1Ac 抗性基因频率. 2002 年, 澳大利亚开始使用 F_0 筛选监测 Cry2Ab 抗性基因频率. 2004~2005 年间, 为了能够广泛种植 Bollgard- II, 澳大利亚利用 F_2 筛选来监测 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的抗性基因频率. 2002~2003 年, 利用 F_2 筛选方法分析了 Cry1Ac 抗性的 1680 个等位基因和 Cry2Ab 抗性的 1684 个等位基因. 结果没有发现 Cry1Ac 的抗性基因, 却发现了 7

个 Cry2Ab 抗性的等位基因^[68,76]. 利用贝叶斯方法, Andow 和 Alstad^[77]分析了 F_2 筛选监测数据, 发现澳大利亚的抗性棉铃虫种群 Cry1Ac 和 Cry2Ab 抗性基因频率分别是 0.0001(0.0000~0.0005)和 0.0012 (0.0005~0.0021). 尽管初期的 Cry2Ab 抗性基因频率比预测的稍高, 但近来的数据表明, 在种植期内棉铃虫种群的抗性基因频率没有很大的变化^[68].

与澳大利亚的情况不同, 印度限制了 Bollgard- II 替代 Bollgard- I 的商业化种植^[8]. 因此, 棉铃虫种群主要存在于单价棉(Cry1Ac)和双价棉(Cry1Ac 和 Cry2Ab)中. 单价棉与双价棉组合使用提高了棉铃虫种群对双价棉的适应性^[78]. 为确保双价棉的长期使用, 预防性的抗性治理策略实施十分必要. 通过分析 2004~2005 年的生测数据(引进 Bollgard- II 前棉铃虫种群对 Cry2Ab 的敏感性)及 2007~2008 年的生测数据(引进 Bollgard- II 后 2 年内棉铃虫种群对 Cry2Ab 的敏感性)发现, 田间棉铃虫种群对 Cry2Ab 毒素敏感性没有明显变化^[79].

致谢 感谢澳大利亚联邦科学与工业研究组织 Sharon Downes 博士提供相关数据.

参考文献

- 1 Naranjo S E, Ruberson J R, Sharma H C, et al. The present and future role of insect-resistant genetically modified cotton in IPM. In: Romeis J, Shelton A M, Kennedy G G, eds. *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Dordrecht: Springer Science and Business Media B V, 2008. 159—194
- 2 James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. Brief NO. 39. ISAAA, Ithaca, NY
- 3 Gassmann A J, Carrière Y, Tabashnik B E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54: 147—163
- 4 Tabashnik B E, Carrière Y, Dennehy T J, et al. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J Econ Entomol*, 2003, 96: 1031—1038
- 5 Kranthi K R, Kranthi S, Ali S, et al. Resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in a laboratory selected strain of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Curr Sci*, 2000, 78: 1001—1004
- 6 Liang G M, Tan W J, Guo Y Y. Study on screening and inheritance mode of resistance to Bt transgenic cotton in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol Sin*, 2000, 43: 57—62
- 7 Akhurst R J, James W, Bird L J, et al. Resistance to the Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 2003, 96: 1290—1299
- 8 Gujar G, Kalia V, Kumari A, et al. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *J Invertebr Pathol*, 2007, 95: 214—219
- 9 Mahon R J, Olsen K M, Downes S, et al. Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian population of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 2007, 100: 1844—1853
- 10 Wu K M, Lu Y H, Feng H Q, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 2008, 321: 1676—1678
- 11 Gao Y L, Feng H Q, Wu K M. Regulation of the seasonal population patterns of *Helicoverpa armigera* moths by Bt cotton planting.

- Transgenic Res, 2010, 19: 557—562
- 12 Gould F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol*, 1998, 43: 701—726
- 13 Bates S L, Zhao J, Roush R T, et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 57—62
- 14 Tabashnik B E, Dennehy T J, Carriere Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 15389—15393
- 15 Liang G M, Wu K M, Yu H K, et al. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *J Invertebr Pathol*, 2008, 97: 142—149
- 16 Xu X J, Yu L Y, Wu Y D. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 948—954
- 17 Yang Y J, Chen H Y, Wu Y D, et al. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 6939—6944
- 18 Yang Y J, Chen H Y, Wu S W, et al. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2006, 36: 735—740
- 19 Yang Y H, Yang Y J, Gao W Y, et al. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Bull Entomol Res*, 2009, 99: 175—181
- 20 Wu Y D, Vassal J M, Royer M, et al. A single linkage group confers dominant resistance to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *J Appl Entomol*, 2009, 133: 375—380
- 21 Kranthi K R, Dhawad C S, Naidu S R, et al. Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Crop Prot*, 2006, 25: 119—124
- 22 Liang G M, Wu K M, Rector B, et al. Diapause, cold hardiness and flight ability of Cry1Ac-resistant and -susceptible strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur J Entomol*, 2007, 104: 699—704
- 23 Zhao X C, Wu K M, Liang G M, et al. Modified female calling behaviour in Cry1Ac-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 353—357
- 24 Zhao X C, Wu K M, Liang G M, et al. Altered mating behaviour in a Cry1Ac-resistant strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Appl Entomol*, 2008, 132: 360—365
- 25 Bird L J, Akhurst R J. Effects of host plant species on fitness costs of Bt resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol Control*, 2007, 40: 196—203
- 26 Bravo A, Gómez I, Conde J, et al. Oligomerization triggers binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1667: 38—46
- 27 Gómez I, Sánchez J, Miranda R, et al. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS letters*, 2002, 513: 242—246
- 28 Zhang X B, Candas M, Griko N B, et al. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1407—1416
- 29 Zhang X B, Candas M, Griko N B, et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9897—9902
- 30 Zhang X B, Griko N B, Corona S K, et al. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R₁ induced by Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp Biochem Physiol B*, 2008, 149: 581—588
- 31 Ferré J, van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 2002, 47: 501—533
- 32 Shelton A M, Zhao J Z, Wang P. Bt resistance management: have we been lucky or smart? In: Côté J C, Otvos I S, Schwartz J L, eds. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact. Victoria, BC, Canada, 2005. 69—71
- 33 Oppert B, Kramer K J, Beeman R W, et al. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*, 1997, 272: 23473—23476
- 34 Li H R, Oppert B, Higgins R A, et al. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34: 753—762
- 35 Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes J L, et al. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp Biochem Physiol B*, 2007, 146: 139—146
- 36 Rajagopal R, Arora N, Sivakumar S, et al. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochem J*, 2009, 419: 309—316
- 37 Gunning R V, Dang H T, Kemp F C, et al. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing

- Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2558—2563
- 38 Rahman M M, Roberts H L S, Sarjan M, et al. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2696—2699
 - 39 Rahman M M, Roberts H L S, Schmidt O. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. J Invertebr Pathol, 2007, 96: 125—132
 - 40 Ma G, Roberts H, Sarjan M, et al. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant, *Helicoverpa armigera* larvae? Insect Biochem Mol Biol, 2005, 35: 729—739
 - 41 Luo S D, Wang G R, Liang G M, et al. Binding of three Cry1A toxins in resistant and susceptible strains of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). Pestic Biochem Physiol, 2006, 85: 104—109
 - 42 Caccia S, Hernández-Rodríguez C S, Mahon R J, et al. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. PLoS ONE, 2010, 5: e9975
 - 43 Bravo A, Soberó M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends Biotechnol, 2008, 26: 573—579
 - 44 Jurat-Fuentes J L, Gahan L J, Gould F L, et al. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Biochemistry, 2004, 43: 14299—14305
 - 45 Liu C X, Wu K M, Wu Y D, et al. Reduction of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity against *Helicoverpa armigera* by a soluble toxin-binding cadherin fragment. J Insect Physiol, 2009, 55: 686—693
 - 46 Gahan L J, Gould F, Heckel D G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science, 2001, 293: 857—860
 - 47 Morin S, Biggs R W, Sisterson M S, et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 5004—5009
 - 48 Zhao J, Jin L, Yang Y H, et al. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. Insect Biochem Mol Biol, 2010, 40: 113—118
 - 49 Liao C Y, Trowell S, Akhuist R. Purification and characterization of Cry1Ac toxin binding proteins from the brush border membrane of *Helicoverpa armigera* midgut. Curr Microbiol, 2005, 51: 367—371
 - 50 Ingle S, Trivedi N, Prasad R, et al. Aminopeptidase-N from the *Helicoverpa armigera* (Hübner) brush border membrane vesicles as a receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. Curr Microbiol, 2001, 43: 255—259
 - 51 Wang G R, Liang G M, Wu K M, et al. Gene cloning and sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Eur J Entomol, 2005, 102: 13—19
 - 52 Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh G, et al. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. J Biol Chem, 2007, 282: 7312—7319
 - 53 Liu C X, Gao Y L, Ning C M, et al. Antisera-mediated *in vivo* reduction of Cry1Ac toxicity in *Helicoverpa armigera*. J Insect Physiol, 2010, 56: 718—724
 - 54 Herrero S, Gechev, T, Bakker P, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. BMC Genomics, 2005, 6: 96
 - 55 Zhang S P, Cheng H M, Gao Y L, 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: 421—429
 - 56 Ning C M, Wu K M, Liu C X, et al. Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. J Insect Physiol, 2010, 56: 666—672
 - 57 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: 12497—12503
 - 58 Jurat-Fuentes J L, Adang M J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur J Biochem, 2004, 271: 3127—3135
 - 59 Jurat-Fuentes J L, Adang M J. A proteomic approach to study resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in *Heliothis virescens* larvae. J Invertebr Pathol, 2007, 95: 187—191
 - 60 Shelton A M, Zhao J, Roush R T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. Annu Rev Entomol, 2002, 47: 845—881
 - 61 Tabashnik B E, Gassmann A J, Crowder D W, et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. Nat Biotechnol, 2008, 21: 199—202
 - 62 Wu K M, Guo Y Y, Gao S S. Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus*

- thuringiensis* transgenic cotton growing areas in northern China. J Econ Entomol, 2002, 95: 832—837
- 63 Wu K M, Feng H Q, Guo Y Y. Evaluation of maize as a refuge for management of resistance to Bt cotton by *Helicoverpa armigera* in the Yellow River cotton-farming region of China. Crop Prot, 2004, 23: 523—530
- 64 Wu K M. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. J Invertebr Pathol, 2007, 95: 220—223
- 65 Wu K M, Guo Y Y. The evolution of cotton pest management practices in China. Annu Rev Entomol, 2005, 50: 31—52
- 66 Zhao J Z, Cao J, Li Y X, et al. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. Nat Biotechnol, 2003, 21: 1493—1497
- 67 Farrell T. Cotton pest management guide 2006/7. NSW department of primary industries, Orange, NSW, Australia, 2006
- 68 Downes S, Mahon R, Olsen K. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for Bt-cotton: current status and future challenges. J Invertebr Pathol, 2007, 95: 208—213
- 69 Ravi K C, Mohan K S, Manjunath T M, et al. Relative abundance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host crops in India and the role of these crops as natural refuge for *Bacillus thuringiensis* cotton. Environ Entomol, 2005, 34: 59—69
- 70 Wu K M, Guo Y Y, Head G. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt insecticidal protein during 2001-2004 in China. J Econ Entomol, 2006, 99: 893—898
- 71 Feng H Q, Wu K M, Cheng D F, et al. Northward migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and other moths in early summer observed with radar in northern China. J Econ Entomol, 2004, 97: 1874—1883
- 72 Feng H Q, Wu K M, Ni Y X, et al. Return migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) during autumn in northern China. B Entomol Res, 2005, 95: 361—370
- 73 Burd A D, Gould F, Bradley J R, et al. Estimated frequency of non-recessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Bolddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. J Econ Entomol, 2003, 96: 137—142
- 74 Gao Y L, Wu K M, Gould F. Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006 -2008 in Northern China. Environ Entomol, 2009, 38: 1336—1342
- 75 Li G P, Wu K M, Gould F, et al. Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm was confirmed in Bt cotton farming area of China. Ecol Entomol, 2007, 32: 366—375
- 76 Mahon R J, Olsen K M, Downes S, et al. Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian population of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol, 2007, 100: 1844—1853
- 77 Andow D A, Alstad D N. F₂ screen for rare resistance alleles. J Econ Entomol, 1998, 91: 572—578
- 78 Zhao J Z, Cao J, Collins H L, et al. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two Bt genes speeds insect adaptation to pyramided plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 8426—8430
- 79 Kranthi S, Dhawad C S, Naidu S, et al. Susceptibility of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab before and after the introduction of Bollgard-II. Crop Prot, 2009, 28: 371—375