

四种 Bt 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫毒力测定及中肠组织病理学变化

宋 萍¹ 杨云鹤¹ 南宫自艳¹ 郭丽伟² 王振营³ 王勤英^{1*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071000; 2. 河北省邢台市植物保护检疫站, 邢台 054001;

3. 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)

摘要: 为更好地了解苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 毒素蛋白对二点委夜蛾 *Athetis lepigone* 的毒力以及作用机理, 通过饲喂含有 Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab 和 Vip3Aa 四种不同 Bt 毒素蛋白饲料, 测定 Bt 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的毒力, 并观察取食 4 种毒素蛋白后幼虫中肠组织的病理学变化。结果显示, 二点委夜蛾幼虫取食毒素蛋白后 72 h, Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性较高, 校正死亡率为 84.7% 和 76.4%; Vip3Aa 和 Cry2Ab 毒素蛋白的毒力较弱。二点委夜蛾幼虫取食 4 种 Bt 毒素蛋白后, 中肠柱状细胞微绒毛脱落, 杂乱地分散在肠腔内, 杯状细胞变形和腔内微绒毛脱落, 线粒体和内质网等变形破裂, 细胞核的核膜消失、核质凝聚和形状发生变化, 经 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白处理后中肠细胞的病变症状和速度明显高于 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白处理。表明 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫杀虫活性较高, 显著高于 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白, 且对其中肠细胞的破坏作用也较强。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 二点委夜蛾; 毒素; 组织病理学

Toxicity of *Bacillus thuringiensis* toxin proteins against *Athetis lepigone* larvae and histopathology of the midgut of the larvae

Song Ping¹ Yang Yunhe¹ Nangong Ziyan¹ Guo Liwei² Wang Zhenying³ Wang Qinying^{1*}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. Plant Protection and Quarantine Station of Xingtai Municipality, Xingtai 054001, Hebei Province, China; 3. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to examine the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* toxin against *Athetis lepigone* larvae, *A. lepigone* larvae were fed on Cry1Ac, Cry1Ab, Cry2Ab and Vip3A toxins, and the toxicity of Bt toxin proteins to *A. lepigone* larvae was detected, and the cellular morphological change in the midgut of larvae was observed by transmission electron microscope (TEM). The results showed that Cry1Ab and Cry1Ac toxins had higher toxicity against the larvae of *A. lepigone* than Cry2Ab and Vip3Aa toxins, and the corrected mortality were 84.7% and 76.4%, respectively. Obvious histopathological changes were observed in the midgut cells after the larvae were fed on Bt toxins. Microvilli of column cells and goblet cells dropped off. Mitochondria and endoplasmic reticulum were dissolved and mixed disorderly. Wire draw of nucleus, condensation of nuclear, and disappearance of nuclear membrane were also observed. The pathological changes of column cells and goblet cells in the midgut of *A. lepigone* larvae induced by Vip3Aa and Cry2Ab were slower than that by Cry1Ab and Cry1Ac. The

基金项目: “十三五”国家重点研发计划课题(2017YFD0300906)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wqinying@hebau.edu.cn

收稿日期: 2017-04-06

results indicated that Cry1Ab and Cry1Ac toxins had higher toxicity against the larvae of *A. lepigone* than Vip3Aa and Cry2Ab toxins. Similar to the changes of histopathology, Cry1Ab and Cry1Ac toxins disrupted the midgut epithelium cells faster than Vip3Aa and Cry2Ab toxins. Lysis of gut epithelium cells resulting in larval death might be the mode of action of Cry toxin and Vip toxin.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Athetis lepigone*; toxin; histopathology

二点委夜蛾 *Athetis lepigone* Moschler 属鳞翅目夜蛾科,是玉米苗期为害较严重的一类害虫,2005年该虫在河北省首次发生(姜京宇等,2008;王振营等,2012),其幼虫主要集中在玉米苗根基部取食为害,由于该虫潜伏在玉米田的碎麦秸下隐蔽为害,因此在田间主要使用化学农药来防治(柴同海等,2012)。随着昆虫抗药性发展和环境保护等问题的出现,对二点委夜蛾生物防治的研究日益增多,如张海剑等(2012;2016)研究发现微孢子虫和球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 都对二点委夜蛾种群数量的控制起到一定作用,具有潜在的应用价值;雷利平等(2013)发现,筛选得到昆虫病原线虫异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* HB8 对二点委夜蛾幼虫致病力最高,也可以在田间推广应用防治二点委夜蛾。

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 在营养期或营养期末期会产生对多种昆虫具有毒性的杀虫物质,包括 Cry 蛋白、Cyt 蛋白、Vip 蛋白、双效菌素 ZWA、苏云金素等,在害虫生物防治中发挥着重要作用(Höfte & Whiteley, 1989; Bravo et al., 2011)。敏感昆虫取食 Cry 晶体蛋白后,晶体蛋白在昆虫中肠内溶解和酶解释放出具有活性的毒素,毒素蛋白再与昆虫中肠特异的受体结合,破坏中肠细胞的完整性而导致昆虫死亡(Bravo et al., 2007)。所以,敏感昆虫取食 Bt 毒素后,昆虫中肠细胞及其细胞器发生了明显的组织病理学变化,这些变化主要有微绒毛脱落、柱状细胞和杯状细胞形变、细胞器空泡破裂等。亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫取食转 Bt 基因玉米后出现微绒毛脱落、内质网肿胀断裂、杯状细胞杯腔增大空泡化等病变(徐艳聆等,2009);稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 幼虫取食转 cry1Ab 基因水稻后,中肠上皮细胞的线粒体出现凝聚、内嵴稀疏、空泡化等病理学变化,同时还伴随着内质网肿胀、核糖体脱落、细胞核拉长、核仁聚集等变化(李芳芳等,2007);棉叶波纹夜蛾 *Alabama argillacea* 幼虫取食 Cry1Ac 毒素蛋白后柱状细胞和杯状细胞都发生了形变、细胞器消失等组织病理变化(Sousa et al., 2010)。

本实验室前期研究已发现 Cry1Ac 毒素蛋白对

二点委夜蛾幼虫具有杀虫活性(杨云鹤等,2014),基于此,本研究选取 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa 四种不同毒素蛋白,利用透射电镜观察二点委夜蛾幼虫取食毒素蛋白后的组织病理学变化,以期为进一步了解 Cry 毒素的作用机制及更好地利用 Bt 制剂防治二点委夜蛾提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 Bt 毒素蛋白: Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa 毒素蛋白干粉制剂,由中国农业科学院植物保护研究所玉米螟组提供,用 pH 8 的 Na₂CO₃ 缓冲液溶解,配制成浓度为 0.5 mg/mL 的毒素蛋白溶液原液, -20℃ 保存备用。

供试昆虫:二点委夜蛾卵由河北农业大学植物保护学院害虫生物防治实验室提供,初孵幼虫用人工饲料饲养至 2 龄幼虫用于生物活性测定,饲喂至 4 龄幼虫用于组织病理学观察。

试剂及仪器:所用试剂均为国内分析纯。PRX-450D 智能人工气候箱,浙江宁波赛福实验仪器有限公司;EM UC6 型超薄切片机,奥地利徕卡仪器公司;JEM-1230 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司。

1.2 方法

1.2.1 Bt 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的毒力测定

采用人工饲料混合毒素蛋白方法测定毒素对二点委夜蛾的毒力。每克人工饲料中加入 1 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的毒素蛋白溶液,充分混匀后,分装于 24 孔板中,每孔接入 1 头 2 龄幼虫,置于 26±1℃、相对湿度 70%、光周期 12 L:12 D 的智能人工气候箱中培养,每个处理 24 头幼虫,重复 3 次,以无菌水混合人工饲料作对照,饲喂 72 h 后统计各处理幼虫的死虫数,计算校正死亡率,校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(100-对照组死亡率)×100%。以针头触碰虫体,无任何反应者视为死亡,反之则为存活幼虫。

1.2.2 昆虫中肠组织样品处理与电镜观察

将 4 龄二点委夜蛾幼虫预先饥饿处理 24 h,分

别饲喂含有 0.05 mg/g 的 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa Bt 毒素蛋白的人工饲料,以饲喂无菌水混合人工饲料的幼虫作对照,每个处理 24 头幼虫,重复 10 次,分别在取食 12、24、36、48、60、72 h 时,对各处理的试虫进行解剖分离中肠组织,浸泡于 2.5% 的戊二醛溶液中固定 2~3 d。

用 PBS 缓冲液洗涤戊二醛固定的二点委夜蛾幼虫中肠样品 3 次,30 min/次,放入 1% OsO₄ 中固定过夜,再用 PBS 缓冲液洗涤样品 3 次,30 min/次,固定好的样品用梯度酒精逐级脱水处理,再用丙酮将样品进行脱水处理约 30 min,再用 Spurr 树脂包埋样品,然后用徕卡 EM UC6 型超薄切片机对已包埋充分的外面裹有 Spurr 树脂的中肠样品进行切片,再用醋酸铀-柠檬酸铅双染色,最后用 JEM-1230 型透射电子显微镜观察并拍片。

1.3 数据分析

所有数据利用 Excel 2007、SSPS 10.0 软件进行统计分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 Bt 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性

Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 四种毒素蛋白对二点委夜蛾 2 龄幼虫的杀虫活性结果显示,4 种 Bt 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性差异较大,在浓度均为 0.5 mg/g 时,Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白对二点委夜蛾的杀虫活性显著高于 Vip3Aa 和 Cry2Ab 毒素蛋白,72 h 时校正死亡率分别为 84.7% 和 76.4%,而 Vip3Aa 和 Cry2Ab 毒素蛋白的校正死亡率分别仅为 47.2% 和 34.7%。

2.2 取食 Bt 毒素蛋白后幼虫中肠的细胞病理变化

取食正常饲料后二点委夜蛾幼虫的中肠柱状细胞顶端的微绒毛数量众多,排列紧密而整齐并且粗细均匀(图 1-a);杯状细胞杯腔形状呈现规则的椭圆或长椭圆形,腔内细胞质突起较发达并且排列有序(图 1-b);线粒体内脊可见,形状有圆、椭圆、球形并且形态良好;内质网发达、结构完整并且排列有序(图 1-c);细胞核核膜完整无破损、核质内的染色质均匀分布(图 1-d)。

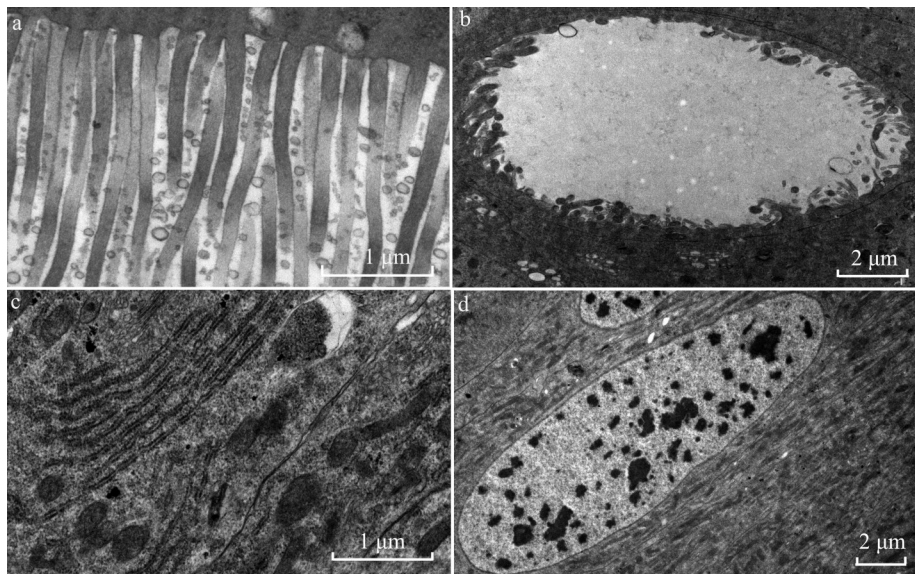


图 1 取食正常饲料 72 h 后二点委夜蛾中肠细胞各结构形态

Fig. 1 The midgut cells of *Athetis lepigone* fed on normal food without Bt toxin

a: 微绒毛; b: 杯状细胞杯腔; c: 内质网和线粒体; d: 细胞核。a: Microvilli; b: goblet cell; c: endoplasmic reticulum and mitochondria; d: nucleus.

二点委夜蛾幼虫取食 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白后,中肠柱状细胞微绒毛、杯状细胞、线粒体、内质网和细胞核等细胞质突起随着取食毒蛋白时间的延长均出现了一系列变化。取食 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白后,36 h 时二点委夜蛾幼虫中肠细胞微绒毛出现空泡增多、微绒毛肿胀断

裂;72 h 时取食 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白的二点委夜蛾中肠柱状细胞微绒毛已基本脱落,杂乱地分散在肠腔内(图 2-a~b)。取食 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白后,二点委夜蛾幼虫中肠柱状细胞微绒毛变化不明显,在 60 h 时微绒毛仍具有较为完整的结构,至 72 h 时微绒毛才出现空泡、肿胀断裂等变化(图 2-c~d)。

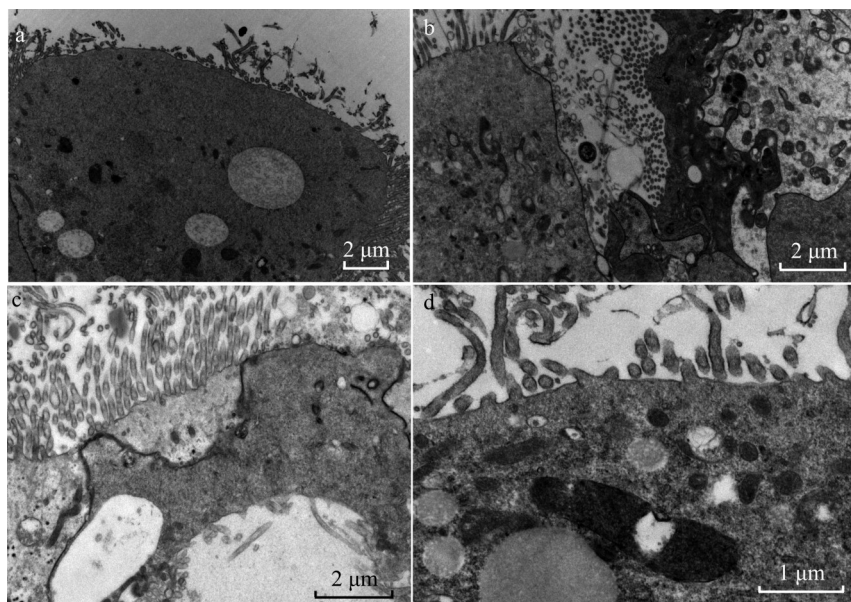


图2 取食4种Bt毒素蛋白72 h后二点委夜蛾幼虫中肠细胞微绒毛的变化过程

Fig. 2 The changes in the microvilli of midgut cells of *Athetis lepigone* larvae after treated with four kinds of Bt toxins

a: Cry1Ab 毒素蛋白; b: Cry1Ac 毒素蛋白; c: Cry2Ab 毒素蛋白; d: Vip3Aa 毒素蛋白。a: Cry1Ab toxin; b: Cry1Ac toxin; c: Cry2Ab toxin; d: Vip3Aa toxin.

二点委夜蛾幼虫取食4种Bt毒素蛋白后,中肠杯状细胞都出现了杯腔变形和腔内微绒毛伸长并向

腔中心延伸、微绒毛脱落等现象,处理72 h时杯状细胞杯腔内充满了断裂的微绒毛(图3)。

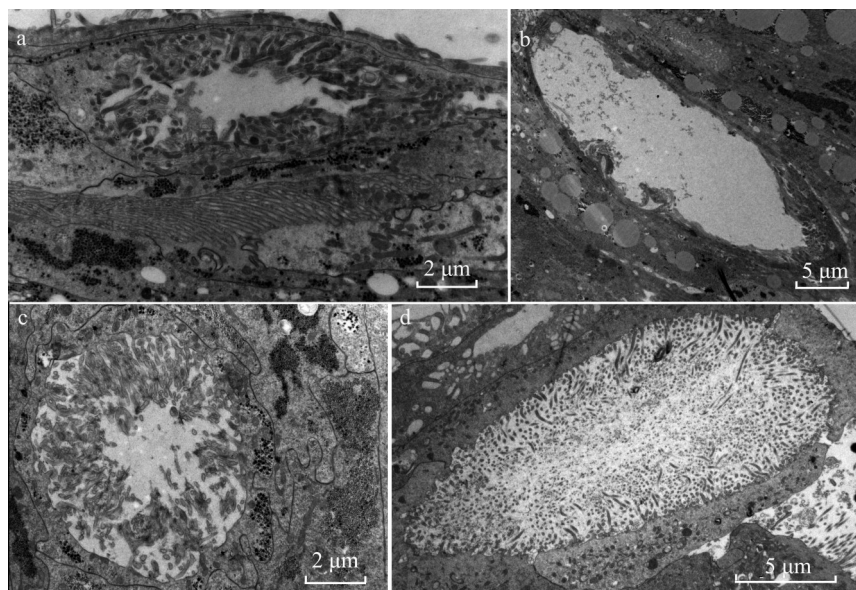


图3 取食4种Bt毒素蛋白后二点委夜蛾幼虫中肠杯状细胞的变化过程

Fig. 3 The changes in goblet cells of *Athetis lepigone* larvae after treated with four kinds of Bt toxins

a: Cry1Ab 毒素蛋白; b: Cry1Ac 毒素蛋白; c: Cry2Ab 毒素蛋白; d: Vip3Aa 毒素蛋白。a: Cry1Ab toxin; b: Cry1Ac toxin; c: Cry2Ab toxin; d: Vip3Aa toxin.

取食4种Bt毒素蛋白后二点委夜蛾幼虫中肠细胞器变化较为明显。Cry1Ab和Cry1Ac毒素蛋白作用下的中肠细胞细胞器变化较为迅速,12 h时已出现细胞核、线粒体和内质网变形等现象,72 h时在

细胞质中已基本看不出完整的细胞器(图4-a)。取食Cry2Ab毒素蛋白的幼虫中肠细胞内质网并未发生严重断裂情况,72 h时依然清晰可见,Vip3Aa毒素蛋白作用下的中肠细胞内细胞质空泡化最严重,

72 h时空泡已布满整个细胞并且细胞器降解严重(图 4-b)。细胞核的变化主要表现在核膜逐渐消失、核质凝聚和形状的变化,72 h时 Cry1Ab、Cry1Ac 毒素蛋白作用下的中肠细胞核已完全看不出核膜(图

5-a~b), Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白作用下的细胞核也出现了核质凝聚和形状的变化,但细胞核的核膜还是清晰可见(图 5-c~d)。

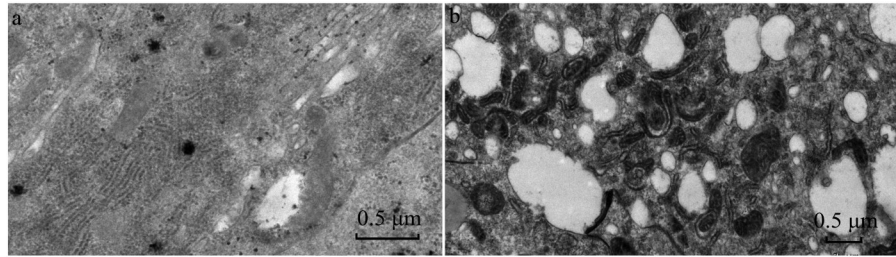


图 4 取食 Cry1Ac 和 Vip3Aa 毒素蛋白后二点委夜蛾幼虫中肠细胞细胞器的变化过程

Fig. 4 The changes in the organelles midgut cells of *Athetis lepigone* larvae after treated with Cry1Ac and Vip3Aa toxins

a: Cry1Ac 毒素蛋白; b: Vip3Aa 毒素蛋白。a: Cry1Ac toxin; b: Vip3Aa toxin.

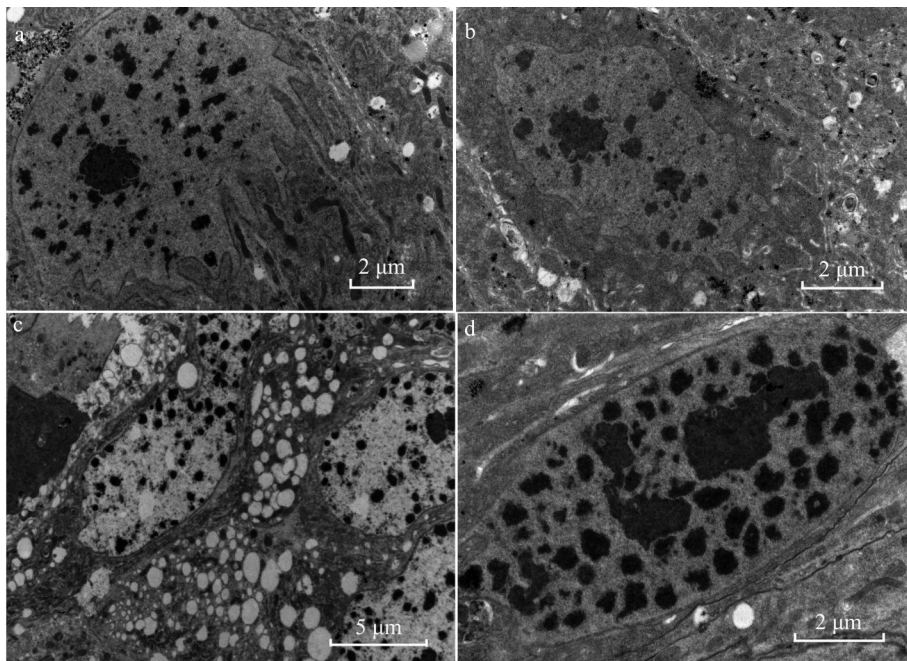


图 5 取食 4 种 Bt 毒素蛋白后二点委夜蛾幼虫中肠细胞细胞核的变化过程

Fig. 5 The changes in the nuclei of midgut cells of *Athetis lepigone* larvae after treated with four kinds of Bt toxins

a: Cry1Ab 毒素蛋白; b: Cry1Ac 毒素蛋白; c: Cry2Ab 毒素蛋白; d: Vip3Aa 毒素蛋白。a: Cry1Ab toxin; b: Cry1Ac toxin; c: Cry2Ab toxin; d: Vip3Aa toxin.

3 讨论

本试验结果表明,4 种 Bt 毒素蛋白中,Cry1Ab 对二点委夜蛾幼虫杀虫活性最高,Cry1Ac 次之,而 Cry2Ab 和 Vip3Aa 的杀虫活性较低,与本研究的中肠组织病理学结果一致,即 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫中肠组织的破坏速度较快,而 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白的破坏速度较慢。

本研究还发现,72 h 时 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素

对二点委夜蛾幼虫具有较高的杀虫活性,而 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫表现出较弱的毒力。对中肠组织病理学的观察结果与之吻合,即二点委夜蛾幼虫取食 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白后,12 h 时幼虫中肠细胞已出现病变,除了破坏速度较快之外,这 2 种毒素对细胞线粒体、内质网、细胞核的破坏程度均比 Cry2Ab 和 Vip3Aa 毒素蛋白大。Lemes et al. (2014) 研究发现草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 取食 Vip3Aa 毒素蛋白后,昆虫中肠第 5 天

才出现病理变化,第7天才表现出死亡症状,本试验研究发现二点委夜蛾取食 Vip3Aa 毒素后,从 60 h 时中肠组织才开始表现出病理变化,说明 Vip3Aa 毒素蛋白对昆虫中肠的破坏作用明显慢于 Cry 毒素蛋白,并且本试验只检测到了 72 h 时 Vip3Aa 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫具有较弱的毒力,而没有延长毒力测定的检测时间,说明在测定 Vip3Aa 毒素蛋白对试虫毒力时需要延长检测的时间。本试验还发现 Vip3Aa 毒素蛋白对二点委夜蛾中肠细胞的破坏作用和 Cry 毒素蛋白作用机理相似,这一结果和 Vip3Aa 毒素蛋白对其它夜蛾科昆虫的研究结果相同(Estruch et al., 1996; Jackson et al., 2007; Song et al., 2016)。Cry2Ab 毒素蛋白对鳞翅目和双翅目昆虫都具有杀虫活性,对鳞翅目昆虫有抑制生长作用(McNeil & Dean, 2011; Siebert et al., 2012; Pan et al., 2014),但该毒素蛋白需要在高 pH(pH 12)环境中才能发挥作用(Gill et al., 1992),在本研究中发现 Cry2Ab 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫具有较弱的毒力,可能与该虫中肠内环境有关,但是二点委夜蛾取食 Cry2Ab 毒素蛋白后,随着时间延长该虫中肠细胞也出现一定的病理变化,推断该虫中肠细胞对 Cry2Ab 毒素蛋白也有一定敏感性,高珍等(2013)也研究发现 Cry2Ab 毒素蛋白对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠组织的破坏作用要比 Cry1Ac 毒素蛋白的破坏作用慢一些,关于如何提高 Cry2Ab 毒素蛋白的毒力以及 Cry2Ab 毒素蛋白的作用机理还需要进一步研究。

cry1Ab 基因主要用于构建转基因抗虫玉米,在鳞翅目害虫的生物防治中发挥着重要作用(Széács et al., 2010; 李宁等, 2011),为了延缓昆虫的抗药性(Crespo et al., 2010; Burkness et al., 2015),又有 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ie/cry1Ac*、*cry1Ab/cry1Fa* 基因联合转入玉米中(Jakka et al., 2015; Zhang et al., 2016; 2017)获得双基因或多基因抗虫玉米来用于鳞翅目害虫的防治,二点委夜蛾是玉米苗期为害较严重的害虫,本研究中发现 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素蛋白对二点委夜蛾幼虫的毒力差异不显著,而本实验室已经研究发现 Cry1Ac 毒素蛋白在二点委夜蛾幼虫中肠的结合受体蛋白为 APN 蛋白,那么 Cry1Ab 毒素蛋白在二点委夜蛾中肠结合受体蛋白的种类、Cry1Ab 毒素蛋白和 Cry1Ac 毒素蛋白是否存在交互抗性还需要进一步研究。

参 考 文 献 (References)

Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus*

thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423–435

Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423–431

Burkness EC, Cira TM, Moser SE, Hutchison WD. 2015. Bt maize seed mixtures for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): larval movement, development, and survival on non-transgenic maize. *Journal of Economic Entomology*, 108(6): 2761–2769

Chai TH, Mei CB, Zhai H, Huo LQ, Guo LW, Liu KS, Liang JH, Ma JF. 2012. Chemical control methods of *Aethis lepigone*. *Plant Protection*, 38(2): 167–170 (in Chinese) [柴同海, 梅成彬, 翟晖, 霍立强, 郭丽伟, 刘奎胜, 梁建辉, 马继芳. 2012. 二点委夜蛾化学防治方法研究. *植物保护*, 38(2): 167–170]

Crespo AL, Spencer TA, Tan SY, Siegfried BD. 2010. Fitness costs of Cry1Ab resistance in a field-derived strain of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1386–1393

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11): 5389–5394

Gao Z, Liang GM, Wei JZ, Zhang LL. 2013. Pathological changes in larval midgut tissues of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), after feeding Cry2Ab. *Acta Entomologica Sinica*, 56(8): 934–944 (in Chinese) [高珍, 梁革梅, 魏纪珍, 张丽丽. 2013. 取食 Cry2Ab 蛋白后棉铃虫幼虫中肠组织的病理变化. *昆虫学报*, 56(8): 934–944]

Gill SS, Cowles EA, Pietrantoni PV. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37: 615–636

Höfte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*, 53(2): 242–255

Jackson RE, Marcus MA, Gould F, Bradley JR, van Duyn JW. 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. *Journal of Economic Entomology*, 100: 180–186

Jakka SR, Gong L, Hasler J, Banerjee R, Sheets JJ, Narva K, Blanco CA, Jurat-Fuentes JL. 2015. Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4): 1023–1034

Jiang JY, Li XQ, Xu YH, Li ZH, Zhang ZY, Xu H. 2008. Preliminary studies on *Aethis (Proxenus) lepigone*. *Plant Protection*, 34(3): 123–126 (in Chinese) [姜京宇, 李秀芹, 许佑辉, 李智慧, 张志英, 许昊. 2008. 二点委夜蛾研究初报. *植物保护*, 34(3): 123–126]

Lei LP, Nangong ZY, Li LT, Dong ZP, Wang QY. 2013. Efficacy of entomopathogenic nematodes against *Aethis lepigone*. *Journal of Environmental Entomology*, 35(2): 171–175 (in Chinese) [雷利平, 南官自艳, 李立涛, 董志平, 王勤英. 2013. 昆虫病原线虫对

- 二点委夜蛾致病力的研究. 环境昆虫学报, 35(2): 171–175]
- Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferré J, Lemos MVF, Desiderio JA. 2014. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. PLoS ONE, 9(10): e107196
- Li FF, Ye GY, Wu Q, Peng YF, Chen XX. 2007. Histopathological changes in the midgut of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae feeding on transgenic Bt rice. Acta Entomologica Sinica, 50(10): 1070–1076 (in Chinese) [李芳芳, 叶恭银, 吴琼, 彭予发, 陈学新. 2007. 取食转 Bt 基因水稻对稻纵卷叶螟幼虫中肠的组织病理学效应. 昆虫学报, 50(10): 1070–1076]
- Li N, He KL, Cui L, Wang ZY. 2011. Environmental safety of genetically modified insect resistant maize and future perspectives for implementation in China. Plant Protection, 37(6): 18–26 (in Chinese) [李宁, 何康来, 崔蕾, 王振营. 2011. 转基因抗虫玉米环境安全性及我国应用前景. 植物保护, 37(6): 18–26]
- McNeil BC, Dean DH. 2011. *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles mosquitoes*: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity. FEMS Microbiology Letters, 325(1): 16–21
- Pan Z, Xu L, Zhu Y, Shi H, Chen Z, Chen M, Chen Q, Liu B. 2014. Characterization of a new cry2Ab gene of *Bacillus thuringiensis* with high insecticidal activity against *Plutella xylostella* L. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(10): 2655–2662
- Siebert MW, Nolting SP, Hendrix W, Dhavala S, Craig C, Leonard BR, Stewart SD, All J, Musser FR, Buntin GD, et al. 2012. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F, Cry1A105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 against southern United States insect pests. Journal of Economic Entomology, 105(5): 1825–1834
- Song F, Lin Y, Chen C, Shao E, Guan X, Huang Z. 2016. Insecticidal activity and histopathological effects of Vip3Aa protein from *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera litura*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(10): 1774–1780
- Sousa MEC, Santos FAB, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, de Siqueira HÁ, Alves LC, Torres JB. 2010. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. Journal of Insect Physiology, 56(12): 1913–1919
- Székács A, Lauber E, Juracsek J, Darvas B. 2010. Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(1): 182–190
- Wang ZY, Shi J, Dong JG. 2012. Reason analysis on *Proxenus lepigone* outbreak of summer corn region in the Yellow River, Huai and Hai Rivers plain and the countermeasures suggested. Journal of Maize Science, 20(1): 132–134 (in Chinese) [王振营, 石洁, 董金皋. 2012. 2011 年黄淮海夏玉米区二点委夜蛾爆发危害的原因与防治对策. 玉米科学, 20(1): 132–134]
- Xu YL, Wang ZY, He KL, Bai SX. 2009. Histopathological changes in the midgut of larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), fed on Bt-transgenic corn expressing Cry1Ab protein. Acta Entomologica Sinica, 52(9): 1034–1038 (in Chinese) [徐艳聆, 王振营, 何康来, 白树雄. 2009. 取食转 Bt 基因抗虫玉米后亚洲玉米螟幼虫中肠的组织病理变化. 昆虫学报, 52(9): 1034–1038]
- Yang YH, Song P, Wang ZY, Dong ZP, Wang QY. 2014. Selection and genotype analysis of Bt isolates with high virulence against *Athetis lepigone* (Möschler). Chinese Journal of Applied Entomology, 51(3): 630–635 (in Chinese) [杨云鹤, 宋萍, 王振营, 董志平, 王勤英. 2014. 对二点委夜蛾高毒力苏云金芽胞杆菌的筛选及其基因型分析. 应用昆虫学报, 51(3): 630–635]
- Zhang B, Yang Y, Zhou X, Shen P, Peng Y, Li Y. 2017. A laboratory assessment of the potential effect of Cry1Ab/Cry2Aj-containing Bt maize pollen on *Folsomia candida* by toxicological and biochemical analyses. Environmental Pollution, 222: 94–100
- Zhang HJ, Shi J, Guo N, Wang ZY. 2012. Primary study on screening of high virulent strains and biological characteristics of *Beauveria bassiana* against *Athetis lepigone* (Möschler) (Lepidoptera: Noctuidae). Chinese Journal of Biological Control, 28(3): 439–443 (in Chinese) [张海剑, 石洁, 郭宁, 王振营. 2012. 二点委夜蛾幼虫高毒力球孢白僵菌菌株筛选与生物学特性初步研究. 中国生物防治学报, 28(3): 439–443]
- Zhang HJ, Song J, Du LX, Yang YH, Shi J. 2016. Control efficacy of one microsporidian against *Athetis lepigone* larvae. Chinese Journal of Biological Control, 32(4): 462–467 (in Chinese) [张海剑, 宋健, 杜立新, 杨云鹤, 石洁. 2016. 微孢子虫对二点委夜蛾致病力研究. 中国生物防治学报, 32(4): 462–467]
- Zhang Y, Zhang W, Liu Y, Wang JH, Wang GY, Liu YJ. 2016. Development of monoclonal antibody-based sensitive ELISA for the determination of Cry1Ie protein in transgenic plant. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408(28): 8231–8239

(责任编辑: 王 璇)