

我国棉铃虫对 Bt 蛋白 Cry1Ac 抗性现状及分子机制研究进展

吴益东* 管放 沈慧雯 杨亦桦

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种全球性的重要农业害虫, 主要为害棉花、玉米和大豆等作物。长期种植单株 Bt 棉花(表达 Cry1Ac 蛋白)会使棉铃虫田间种群承受单一、持续的选择压力, 必然会导致棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性发生演化。该文概述我国棉铃虫田间种群对 Cry1Ac 的抗性现状、自然庇护所对棉铃虫 Cry1Ac 抗性演化的延缓作用以及棉铃虫对 Cry1Ac 抗性的遗传多样性, 并对今后我国关于棉铃虫 Bt 抗性的治理对策进行了展望。

关键词: 棉铃虫; Bt 棉花; Cry1Ac; 抗性监测; 抗性机制

Research progress in the resistance status and molecular resistance mechanisms of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* to Bt protein Cry1Ac in China

Wu Yidong* Guan Fang Shen Huiwen Yang Yihua

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China)

Abstract: The cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, is one of the most serious pests around the world, which mainly infests cotton, maize, soybean and other crops. Long-term planting of the transgenic cotton expressing a single Bt protein Cry1Ac will impose continuous pressure on *H. armigera*, and result in the evolution of resistance to Bt cotton. This review summarizes the current status of its resistance to Cry1Ac, delaying effects of natural refuge on the evolution of Cry1Ac resistance, and diverse genetic mechanisms of the resistance to Cry1Ac in field populations of *H. armigera* under the small-scale production system of cotton mixed with multiple other host crops in China. Further, the prospects for Bt resistance management strategies for *H. armigera* in China in the future are discussed.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Bt cotton; Cry1Ac; resistance monitoring; resistance mechanism

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属于鳞翅目夜蛾科, 在亚洲、非洲、欧洲和大洋洲均有分布, 目前已扩散至南美洲, 成为一种世界性农业害虫 (Czepak et al., 2013; Tay et al., 2013)。棉铃虫寄主范围较广, 能够取食包括棉花、大豆、玉米等农作物在内的 20 多个科的 200 余种植物 (沈晋良和吴益东, 1995)。棉铃虫还具有产卵量大、远距离迁飞及兼性滞育等特性, 使其具有较强的环境适应能力。棉铃虫在我国黄河流域、长江流域和新疆维吾尔自治区 (简称新

疆) 等棉区间隙性暴发成灾, 造成巨大的经济损失 (郭予元, 1998)。

Bt 蛋白是源于苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 的一类杀虫蛋白, 主要分为在菌体孢子生长阶段以伴孢晶体形式产生的 Cry 杀虫蛋白和在营养生长阶段产生的 Vip 杀虫蛋白。自 1996 年开始, 表达 Bt 蛋白的转基因作物 (简称 Bt 作物) 开始在全球范围内大规模种植, 有效控制了多种重要鳞翅目和鞘翅目害虫。我国于 1997 年起开始推广种植表

达Cry1Ac蛋白的抗虫棉花(简称Bt棉花),有效控制了棉铃虫、棉红铃虫*Pectinophora gossypiella*等害虫的种群基数,不仅减少了化学杀虫剂用量而且保护了天敌昆虫(Wu et al., 2008; Lu et al., 2012)。

长期种植单价Bt棉花(表达Cry1Ac蛋白)会使棉铃虫田间种群承受单一、持续的选择压力,必然会导致棉铃虫对Cry1Ac的抗性发生演化。本文概述了我国棉铃虫田间种群对Cry1Ac的抗性现状、自然庇护所对棉铃虫Cry1Ac抗性演化的延缓作用以及棉铃虫对Cry1Ac的抗性遗传多样性,并对今后我国关于棉铃虫对Cry1Ac的抗性治理对策进行了展望,以期对棉铃虫的绿色防控提供参考依据。

1 棉铃虫田间种群对Cry1Ac的抗性现状

中国农业科学院植物保护研究所吴孔明团队采用人工饲料混毒法系统监测了我国种植Bt棉花以来棉铃虫田间种群对Cry1Ac的敏感性变化,监测结果显示在Bt棉花种植初期(1998—2004年),棉铃虫对Cry1Ac的敏感性未发生显著变化(Wu et al., 1999; 2006);自2010年以来,黄河流域和长江流域棉区棉铃虫种群对Cry1Ac的敏感性显著下降,平均抗性水平约3倍,而新疆棉区棉铃虫种群对Cry1Ac的敏感性未见显著下降(Zhang et al., 2019)。

南京农业大学植物保护学院吴益东团队采用人工饲料药膜法系统监测了2010年以来我国主要棉区棉铃虫对Cry1Ac的敏感性变化,监测结果显示2010年黄河流域和长江流域棉区棉铃虫种群对Cry1Ac的抗性倍数为2~16倍,抗性个体频率为0~2.6%,对Cry1Ac的敏感性显著低于新疆棉区种群,而不同区域的棉铃虫种群对Cry2Ab的敏感性无显著差异,表明种植Bt棉花时间较长的黄河流域和长江流域棉区棉铃虫种群因Cry1Ac选择压力导致敏感性显著下降(Zhang et al., 2011);黄河流域和长江流域棉区棉铃虫种群对Cry1Ac的抗性个体频率从2010年的0.93%上升至2013年的5.5%,而同期在新疆棉区均未检测到抗性个体(Jin et al., 2015)。

以上研究结果均表明,自2010年以来黄河流域棉区部分棉铃虫田间种群对Cry1Ac的敏感性虽有显著下降,但平均抗性水平仍小于10倍,对Bt棉花田间防治效果尚未产生不利影响。目前,我国棉铃虫种群对Cry1Ac的抗性处于早期预警阶段,今后需要加强Bt抗性系统监测工作,从而为抗性治理赢得

主动权。

2 自然庇护所对棉铃虫Cry1Ac抗性演化的延缓作用

为了延缓害虫对Bt作物产生抗性,美国、澳大利亚等发达国家通常采用庇护所策略,即在Bt作物附近种植20%非Bt作物为敏感害虫提供庇护所,这样可以提供足量敏感害虫来对抗性基因进行稀释(Tabashnik et al., 2008)。在我国现有的小规模、多样化种植中,与棉花同期种植的玉米、大豆、花生和芝麻等其他寄主作物为棉铃虫提供了自然庇护所。根据我国棉花生产的实际情况,并未要求棉农种植20%常规棉花作为庇护所,而是因地制宜采用自然庇护所作为主要抗性治理措施(Wu et al., 2004; Wu & Guo, 2005)。

Jin et al. (2015)于2010—2013年连续4年对我国6省17县棉铃虫Bt抗性进行监测和抗性基因型鉴定,结果发现我国黄河流域和长江流域棉区棉铃虫Bt抗性个体频率由2010年的0.93%上升到2013年的5.5%。根据各种寄主作物种植面积及棉铃虫成虫产出量,Jin et al. (2015)测算2010—2013年我国黄河流域和长江流域棉区非Bt寄主作物作为自然庇护所的效率相当于设置了56%的有效庇护所。在模拟黄河流域和长江流域棉区棉铃虫Bt抗性个体频率发展动态的模型中,假设没有自然庇护所,抗性个体频率在2013年将达到98.0%;如果有56%的有效庇护所,抗性个体频率在2013年将为4.9%,与实测值5.5%相符,结果证实了自然庇护所有效延缓了棉铃虫对Cry1Ac产生抗性;此外在检测到的棉铃虫抗性个体中,携带显性基因个体比例从2010年的37%上升到2013年的84%,表明自然庇护所对棉铃虫Cry1Ac显性抗性发生的延缓作用显著低于对隐性抗性发生的延缓作用。

3 棉铃虫对Cry1Ac抗性的遗传多样性

棉铃虫幼虫摄入Bt蛋白后,Bt蛋白在幼虫中肠上皮细胞微绒毛上识别受体,并与一系列受体蛋白交互后在中肠细胞膜上形成通透性孔道,使中肠细胞破损、脱落,幼虫停止取食并死亡(Wu, 2014)。而棉铃虫对抗Bt蛋白的一种重要机制就是受体功能丧失,使Bt蛋白穿孔效率下降或不能穿孔,导致Bt蛋白丧失杀虫活性(图1)。已有研究表明,棉铃虫

钙粘蛋白 HaCad 及 HaABCC2 和 HaABCC3 两种 ABC 转运蛋白均为 Cry1Ac 功能受体 (Xiao et al., 2014), 这 2 类受体发生功能丧失性突变可以导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生高水平隐性抗性 (Xu et al., 2005; Wang et al., 2016; Wang et al., 2020a)。通过大规模 F_1 代筛选和 F_2 代筛选, Zhang et al. (2012) 发现棉铃虫田间种群对 Cry1Ac 的抗性基因既有基于钙

粘蛋白基因缺失突变的隐性基因, 也有多种其他类型的非隐性抗性基因。最近 Jin et al. (2018) 研究结果发现, HaTSPAN1 四跨膜蛋白通过 L31S 点突变导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生显性抗性, 进一步表明棉铃虫可以通过多种遗传机制的改变对 Cry1Ac 产生抗性 (图 1)。

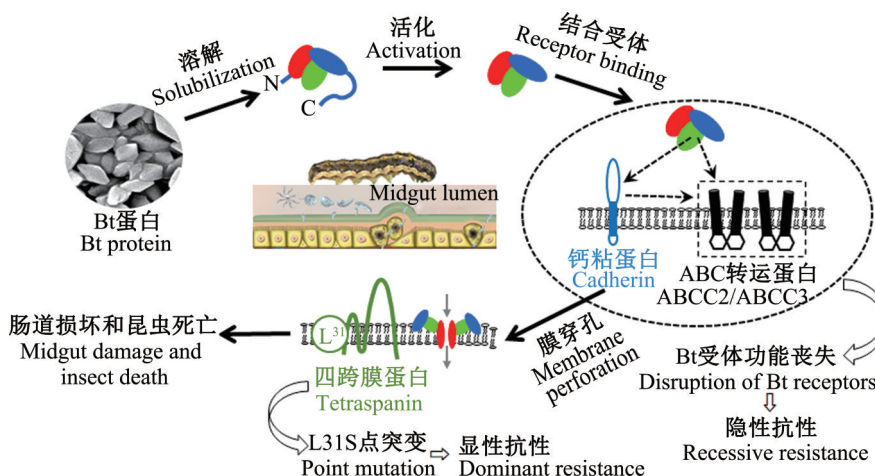


图 1 Bt 杀虫蛋白 Cry1Ac 对棉铃虫幼虫中肠的作用模式

Fig. 1 Modes of action of Bt insecticidal protein Cry1Ac against the larval midgut of *Helicoverpa armigera*

3.1 钙粘蛋白功能缺失突变

Gahan et al. (2001) 利用基因图位克隆发现烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 钙粘蛋白功能缺失突变与其对 Cry1Ac 的抗性遗传连锁。Morin et al. (2003) 发现棉红铃虫钙粘蛋白的 3 种突变等位基因与其对 Cry1Ac 的抗性遗传连锁。Xu et al. (2005) 发现棉铃虫 HaCad 基因突变与其对 Cry1Ac 的抗性遗传连锁。Wang et al. (2016) 通过 CRISPR/Cas9 技术敲除棉铃虫敏感品系 HaCad 基因, 获得的基因编辑品系对 Cry1Ac 的抗性约 500 倍且为隐性遗传, 从而首次在农业昆虫上通过反向遗传证据明确了钙粘蛋白基因突变与 Cry1Ac 抗性的因果关系。

3.2 ABC 转运蛋白功能缺失突变

ABC 转运蛋白具有 TMD1 和 TMD2 两个跨膜结构域及 NBD1 和 NBD2 两个核酸结合域, 能够以主动转运方式完成多种分子的跨膜转运 (Aller et al., 2009)。在烟芽夜蛾 (Gahan et al., 2010)、家蚕 *Bombyx mori* (Atsumi et al., 2012) 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Banerjee et al., 2017) 等多个鳞翅目物种中的研究表明, ABCC2 发生功能丧失突变与高水平 Cry1Ac 抗性有关。单独敲除棉铃虫体内 HaABCC2 或 HaABCC3 基因使其对 Cry1Ac 的抗性小于 4 倍, 而当 2 个基因同时被敲除时, 其功能共

同丧失, 此时棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性大于 15 000 倍 (Wang et al., 2020a)。随后, Liu et al. (2020) 和 Zhao et al. (2021) 研究结果也发现 ABCC2 和 ABCC3 基因共同突变才能使小菜蛾 *Plutella xylostella* 对 Cry1Ac 产生高水平抗性, 而在草地贪夜蛾 (Banerjee et al., 2017; Jin et al., 2021)、甜菜夜蛾 *S. exigua* (Huang et al., 2020) 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Wang et al., 2020b) 中, ABCC2 单独发生功能缺失即可使其对 Cry1F 和 Cry1A 产生高水平抗性。上述研究结果表明, 在一些鳞翅目昆虫中 ABCC2 和 ABCC3 功能相同, 为 1 对功能冗余的 Cry1Ac 受体, 而在另一些鳞翅目昆虫中两者功能出现分化, 即 ABCC2 保留了受体功能, 而 ABCC3 丧失了受体功能。ABCC2 和 ABCC3 作为 Bt 受体的功能冗余或分化的具体机制还有待深入研究。

3.3 四跨膜蛋白点突变

四跨膜蛋白是由 4 个跨膜结构域 TM1~TM4、小胞外环 EC1 和包含特征性 CCG 结构基序的大胞外环 EC2 构成的一类膜蛋白 (Maecker et al., 1997)。Jin et al. (2018) 利用全基因组关联分析和基因精细定位, 将棉铃虫 Bt 显性抗性基因定位于棉铃虫第 10 号染色体上长度为 250 kb 的特定区域, 通过对该区域 21 个功能基因进行碱基序列和表达水平的比对发

现,四跨膜蛋白编码基因*HaTSPAN1*发生了T92C点突变,导致第31位亮氨酸突变为丝氨酸;利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除抗性品系*HaTSPAN1*基因,导致其对Cry1Ac抗性完全消失,将T92C点突变敲入敏感品系则获得125倍抗性;上述正向和反向遗传学证据明确了棉铃虫*HaTSPAN1*基因T92C点突变与Cry1Ac显性抗性之间的因果关系。

害虫可以通过Bt受体基因如钙粘蛋白和ABC转运蛋白的功能丧失性突变对Cry1Ac产生抗性,这种抗性通常为隐性遗传,抗性位点基因必须纯合才能表现出抗性,而四跨膜蛋白的功能获得性突变对Cry1Ac产生的抗性为显性遗传,抗性位点基因在杂合状态下就会产生抗性,因此该抗性基因在田间的进化速度会快于隐性抗性基因(Guan et al., 2021)。我国黄河流域和长江流域棉区棉铃虫*HaTSPAN1*基因T92C突变频率从2006年的0.1%上升至2016年的10%,在近十年间提高了100倍(Jin et al., 2018)。Guan et al. (2021)通过对棉铃虫四跨膜蛋白编码基因的第1个外显子和第1个内含子序列进行扩增子检测和系统发育分析发现,T92C突变不仅是多点起源并且特定抗性位点基因能在大范围地理区域内扩散,使基于庇护所的抗性治理策略面临挑战。

3.4 不同隐性抗性基因间的异位不互补效应

棉铃虫SCD-r1抗性品系因具有钙粘蛋白突变等位基因*r1*,其对Cry1Ac的抗性约为500倍,其与SCD敏感品系杂交产生的F₁代对Cry1Ac没有抗性,表明抗性为隐性遗传(Yang et al., 2009)。Gao et al. (2018)用F₁代筛选法从田间分离到1个对Cry1Ac有224倍抗性、隐性遗传的棉铃虫LF256品系。为了证明棉铃虫LF256品系是否存在钙粘蛋白基因突变,将LF256与SCD-r1品系杂交并进行遗传互补试验,其杂交F₁代幼虫对Cry1Ac产生了高水平抗性,按照遗传互补原理,推测LF256品系对Cry1Ac的抗性也是由钙粘蛋白基因突变决定的。但是对LF256品系进行钙粘蛋白基因序列比对、mRNA表达水平及蛋白水平检测均未发现基因突变,遗传连锁检测结果也表明LF256对Cry1Ac的抗性与钙粘蛋白基因位点不连锁(Gao et al., 2018)。对LF256品系和SCD敏感品系的*HaABCC2*和*HaABCC3*基因的编码序列和转录水平进行比较和分析,均未发现与Cry1Ac抗性相关的基因变异(Qi et al., 2021)。因此,棉铃虫LF256品系对Cry1Ac的高水平抗性由一种新型抗性基因控制,LF256品系的抗性基因与SCD-r1品系的钙粘蛋白基因发生了异位不互补效

应(second-site noncomplementation, SSNC)。推测SSNC效应产生的成因可能是:(1)毒性效应,即2种突变基因表达的不完整蛋白(类似于毒物)与对方的野生型蛋白形成没有功能的复合体,从而不能产生互补作用;(2)剂量效应,即2种基因编码的蛋白作用于同一通路中,只有当2种蛋白的表达量同时下调时才产生剂量效应,使该通路丧失正常功能,从而不能遗传互补。

在害虫Bt抗性中发现不同抗性基因之间的SSNC效应,其意义如下:(1)为遗传互补试验结果增加了新的解释,也对遗传互补试验的设计提出了新要求。如果2个隐性遗传抗性品系的杂交F₁代表现为抗性,即不能互补,不能断定它们的抗性基因一定位于同一遗传位点,还需要遗传连锁和基因鉴定结果来进一步明确。(2)扩大了F₁代筛选法检测抗性基因的范围。习惯上认为F₁代筛选法只能检测到已知抗性基因的不同等位基因和未知的显性遗传抗性基因。SSNC效应的发现表明F₁代筛选法还可能检测到与已知抗性基因产生异位不互补效应的另一种隐性遗传抗性基因。(3)2种隐性抗性基因之间的SSNC效应可以加快抗性进化。显性抗性进化速度要快于隐性抗性,而隐性抗性基因可以通过与另一个隐性抗性基因的SSNC效应产生异位显性,加快抗性进化(Gao et al., 2018)。

4 展望

如果靶标害虫对Bt作物产生抗性,种植Bt作物带来的各种收益会显著下降甚至完全丧失,因此靶标害虫抗性严重威胁Bt作物长期、安全种植(Tabashnik & Carrière, 2017)。针对靶标害虫Bt抗性风险问题,目前采用2种抗性治理策略延缓Bt抗性演化速度,从而延长Bt作物有效使用期。第1种抗性治理策略为庇护所策略,第2种抗性治理策略为基因聚合策略。基因聚合策略的原理是将2个或多个针对同一种靶标害虫的不同作用机制的抗虫基因聚合在同一作物品种中,实现对靶标害虫的“饱和杀死”,由于单头害虫同时具有2种抗性基因的概率极低,害虫抗性产生速度可以得到减缓(Gould, 1998; Roush, 1998; Zhao et al., 2003)。采用基因聚合策略可以在减少庇护所的条件下实现延缓抗性的目的,庇护所面积可以减少至5%,对于取食多种作物的害虫甚至可利用其他作物提供的自然庇护所进行抗性治理。

基因聚合策略代表了抗性治理的未来发展方

向,正在美国和澳大利亚等国家大范围推广使用。如1996年美国孟山都公司开发了第1代Bt棉花(只表达Cry1Ac蛋白),2002年开发了第2代Bt棉花(表达Cry1Ac和Cry2Ab两种Bt蛋白),目前第3代Bt棉花(表达Cry1Ac、Cry2Ab和Vip3Aa三种Bt蛋白)也已在部分国家开始商业化种植。我国目前商业化种植的Bt棉花属于第1代单价Bt棉花,亟需研制和开发聚合多个Bt基因的第2代和第3代Bt棉花。

随着在黄河流域和长江流域棉花种植面积的大幅度减少,玉米和大豆等作物为棉铃虫敏感种群提供了更充足的自然庇护所,从而有利于延缓其对Bt抗性的发展,而Bt玉米即将在我国进行大规模商业化种植,自然庇护所面积将大幅度减少,进而影响对棉铃虫Bt抗性的治理效果。因此,相关企业和科研院所所在进行Bt玉米品种研发时,可考虑在转基因玉米中聚合多种类型的Bt基因,以压低靶标害虫产生抗性的风险。

靶标害虫对转基因抗虫作物产生抗性是一个必然过程,抗性治理的目标是尽量延缓抗性演化进程。对于目前广泛采用的Bt抗性治理策略,靶标害虫也能进化出相应的适应机制,如棉铃虫可以通过进化Cry1Ac显性抗性来应对庇护所策略(Wu, 2014; Jin et al., 2015);针对基因聚合策略,理论上棉铃虫也可以通过进化出交互抗性以适应此策略。因此,在实施抗性治理策略过程中,需要超前立项研究Bt抗性的机制及治理对策,在系统监测抗性的基础上实现早期预警,并根据抗性演化态势对抗性治理策略做出主动调整。

参 考 文 献 (References)

- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo RP, Harrell PM, Trinh YT, Zhang QH, Urbatsch IL, et al. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922): 1718–1722
- Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, et al. 2012. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25): E1591–E1598
- Banerjee R, Hasler J, Meagher R, Nagoshi R, Hietala L, Huang FN, Narva K, Jurat-Fuentes JL. 2017. Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientific Reports*, 7: 10877
- Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1): 110–113
- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293(5531): 857–860
- Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genetics*, 6(12): e1001248
- Gao MJ, Wang XM, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2018. Epistasis confers resistance to Bt toxin Cry1Ac in the cotton bollworm. *Evolutionary Applications*, 11(5): 809–819
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701–726
- Guan F, Hou BF, Dai XG, Liu ST, Liu JJ, Gu Y, Jin L, Yang YH, Fabrick JA, Wu YD. 2021. Multiple origins of a single point mutation in the cotton bollworm tetraspanin gene confers dominant resistance to Bt cotton. *Pest Management Science*, 77(3): 1169–1177
- Guo YY. 1998. Study on cotton bollworm. Beijing: China Agriculture Press, pp. 279–286 (in Chinese) [郭予元. 1998. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社: pp. 279–286]
- Huang JL, Xu YJ, Zuo YY, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2020. Evaluation of five candidate receptors for three Bt toxins in the beet armyworm using CRISPR-mediated gene knockouts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 121: 103361
- Jin L, Wang J, Guan F, Zhang JP, Yu S, Liu SY, Xue YY, Li LL, Wu SW, Wang XL, et al. 2018. Dominant point mutation in a tetraspanin gene associated with field-evolved resistance of cotton bollworm to transgenic Bt cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46): 11760–11765
- Jin L, Zhang HN, Lu YH, Yang YH, Wu KM, Tabashnik BE, Wu YD. 2015. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. *Nature Biotechnology*, 33(2): 169–174
- Jin MH, Yang YC, Shan YX, Chakrabarty S, Cheng Y, Soberón M, Bravo A, Liu KY, Wu KM, Xiao YT. 2021. Two ABC transporters are differentially involved in the toxicity of two *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the invasive crop-pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pest Management Science*, 77(3): 1492–1501
- Liu ZX, Fu S, Ma XL, Baxter SW, Vasseur L, Xiong L, Huang YP, Yang G, You SJ, You MS. 2020. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin requires mutations in two *Plutella xylostella* ATP-binding cassette transporter paralogs. *PLoS Pathogens*, 16(8): e1008697
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Guo YY, Desneux N. 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487(7407): 362–365
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal*, 11(6): 428–442
- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higgison

- D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carrière Y, et al. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9): 5004–5009
- Qi LX, Dai HY, Jin Z, Shen HW, Guan F, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2021. Evaluating cross-resistance to cry and vip toxins in four strains of *Helicoverpa armigera* with different genetic mechanisms of resistance to Bt toxin Cry1Ac. *Frontiers in Microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670402>
- Roush RT. 1998. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 353(1376): 1777–1786
- Shen JL, Wu YD. 1995. The resistance and management of cotton bollworm. Beijing: China Agriculture Press, pp. 58–88 (in Chinese) [沈晋良, 吴益东. 1995. 棉铃虫抗药性及其治理. 北京: 中国农业出版社, pp. 58–88]
- Tabashnik BE, Carrière Y. 2017. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology*, 35(10): 926–935
- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, 26(2): 199–202
- Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Behere GT, Anderson C, Downes S. 2013. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11): e80134
- Wang J, Ma HH, Zhao S, Huang JL, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2020a. Functional redundancy of two ABC transporter proteins in mediating toxicity of *Bacillus thuringiensis* to cotton bollworm. *PLoS Pathogens*, 16(3): e1008427
- Wang J, Zhang HN, Wang HD, Zhao S, Zuo YY, Yang YH, Wu YD. 2016. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 11–17
- Wang XL, Xu YJ, Huang JL, Jin WZ, Yang YH, Wu YD. 2020b. CRISPR-mediated knockout of the *ABCC₂* gene in *Ostrinia furnacalis* confers high-level resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa toxin. *Toxins*, 12(4): 246
- Wu KM, Feng HQ, Guo YY. 2004. Evaluation of maize as a refuge for management of resistance to Bt cotton by *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the Yellow River cotton-farming region of China. *Crop Protection*, 23(6): 523–530
- Wu KM, Guo YY. 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*, 50: 31–52
- Wu KM, Guo YY, Head G. 2006. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt insecticidal protein during 2001–2004 in China. *Journal of Economic Entomology*, 99(3): 893–898
- Wu KM, Guo YY, Lv N. 1999. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. *Journal of Economic Entomology*, 92(2): 273–278
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678
- Wu YD. 2014. Detection and mechanisms of resistance evolved in insects to cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Insect Physiology*, 47: 297–342
- Xiao YT, Zhang T, Liu CX, Heckel DG, Li XC, Tabashnik BE, Wu KM. 2014. Mis-splicing of the *ABCC₂* gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4: 6184
- Xu XJ, Yu LY, Wu YD. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac $\{\delta\}$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2): 948–954
- Yang YH, Yang YJ, Gao WY, Guo JJ, Wu YH, Wu YD. 2009. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Bulletin of Entomological Research*, 99(2): 175–181
- Zhang DD, Xiao YT, Chen WB, Lu YH, Wu KM. 2019. Field monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Cry1Ac insecticidal protein resistance in China (2005–2017). *Pest Management Science*, 75(3): 753–759
- Zhang HN, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu CH, Yang YH, Wu SW, Wu KM, Cui JJ, et al. 2012. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26): 10275–10280
- Zhang HN, Yin W, Zhao J, Jin L, Yang YH, Wu SW, Tabashnik BE, Wu YD. 2011. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *PLoS ONE*, 6(8): e22874
- Zhao JZ, Cao J, Li YX, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology*, 21(12): 1493–1497
- Zhao S, Jiang D, Wang FL, Yang YH, Tabashnik BE, Wu YD. 2021. Independent and synergistic effects of knocking out two ABC transporter genes on resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry1Fa in diamondback moth. *Toxins*, 13(1): 9

(责任编辑:张俊芳)