

马铃薯羧肽酶抑制剂与 Cry1Ac 毒素混用对棉铃虫中肠蛋白酶活性及杀虫活性的影响



陈文波 臧中旭 孙龙龙 郜晓妍 谢桂英 赵新成*

(河南农业大学植物保护学院昆虫系, 郑州 450002)

摘要: 为研发转多价抗虫棉, 利用蛋白酶专性底物测定马铃薯羧肽酶抑制剂 (potato carboxypeptidases inhibitor, PCI) 和 Cry1Ac 毒素单用及混用后棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫中肠内总蛋白酶、类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和羧肽酶的活性、羧肽酶 A (carboxypeptidase A, CPA) 和羧肽酶 B (carboxypeptidase B, CPB) 基因的相对表达量及对棉铃虫的杀虫活性。结果表明, 饲喂 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 含药饲料后, 棉铃虫 3 龄幼虫中肠内 CPA 活性分别为 0.20 U/mg 和 0.16 U/mg, 显著低于对照; 总蛋白酶活性均为 0.15 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 与对照差异不显著; 类胰蛋白酶活性均为 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 均显著低于其他处理, CPB 基因表达量较对照显著下调。饲喂 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 含药饲料后, CPB 活性分别为 0.26、0.26、0.24、0.26、0.27 和 0.26 U/mg, 与对照差异不显著; 棉铃虫 3 龄幼虫中肠内类胰凝乳蛋白酶活性分别为 0.48、0.39、0.42、0.41、0.40 和 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 6 者之间差异不显著, 但均显著低于对照; 棉铃虫 3 龄幼虫中肠内 CPA 基因表达量均较对照显著上调。饲喂 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 含药饲料后, 棉铃虫初孵幼虫实际校正死亡率分别为 66.54%、68.28%、77.74% 和 85.76%, 均高于其预期校正死亡率, 表明 PCI 和 Cry1Ac 两者对杀虫活性表现为独立作用和增效作用, 两者可共同用于棉铃虫幼虫的防治。

关键词: 棉铃虫; 羧肽酶抑制剂; Cry1Ac 毒素; 蛋白酶活性; 杀虫活性

Effects of potato carboxypeptidases inhibitor combined with Cry1Ac toxin on protease activities and insecticidal activity against cotton bollworm *Helicoverpa armigera*

Chen Wenbo Zang Zhongxu Sun Longlong Gao Xiaoyan Xie Guiying Zhao Xincheng*

(Department of Entomology, College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: In order to develop insect-resistance pyramided cotton varieties, the activities of total proteases, trypsin-like proteases, chymotrypsin-like proteases and carboxypeptidases were determined using the specific substrates, and the expression levels of carboxypeptidase A (CPA) and B (CPB) genes in the third instar larvae of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* fed on different concentrations of potato carboxypeptidases inhibitor (PCI), Cry1Ac or PCI+Cry1Ac were also investigated, and the effects of PCI toward insecticidal activity of Cry1Ac against the newly hatched larvae of *H. armigera* were fur-

基金项目: 国家自然科学基金(32001912), 河南省青年人才托举工程项目(2020HYTP043), 河南省科技攻关项目(202102110226), 河南省大学生创新创业项目(202010466063)

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

收稿日期: 2020-12-10

ther tested in bioassay. The results showed that when the third instar larvae of *H. armigera* were fed on an artificial diets containing 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac and 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, respectively, the activities of CPA were 0.20 U/mg and 0.16 U/mg, which were significantly lower than those in the control; the activities of total protease were 0.15 $\text{OD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, which had no significant difference from those in the control; the trypsin-like enzyme activities were 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, which were significantly lower than those in other groups; the expression levels of *CPB* significantly lowered than those in the control. When the third instar larvae of *H. armigera* were fed on an artificial diets containing 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI, 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac and 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, the activities of CPB were 0.26, 0.26, 0.24, 0.26, 0.27 and 0.26 U/mg, which had no significant difference from those in the control; chymotrypsin-like protease activities were 0.48, 0.39, 0.42, 0.41, 0.40 and 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectively, among which were no significant difference, but they were all significantly lower than the control; the expression levels of *CPA* significantly increased compared with those in the control. When the newly hatched larvae of *H. armigera* were fed on an artificial diets containing 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac and 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac, the observed corrected mortalities were 66.54%, 68.28%, 77.74% and 85.76%, which were higher than its expected corrected mortality, the results suggested that there were independent and synergistic interactions between PCI and Cry1Ac toxin, their combination can be used to in resistance pyramid to the pest *H. armigera* larvae.

Key words: *Helicoverpa armigera*; carboxypeptidases inhibitor; Cry1Ac toxin; protease activity; insecticidal activity

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是一种多食性害虫, 20 世纪 90 年代曾在我国连年大暴发。1997 年后, 转 Bt 抗虫棉在我国的广泛商业化种植使得棉铃虫种群数量逐年降低。然而随着近期我国种植业结构调整, 2010 年以来一些地区棉铃虫种群数量明显回升, 其对玉米和花生等非棉花作物的为害不断加重(关秀敏等, 2016), 并严重波及内蒙古自治区和宁夏回族自治区等棉铃虫偶发区域(陆宴辉等, 2018)。而且近些年来监测数据表明我国黄河流域棉区棉铃虫种群内的 Bt 抗性基因频率呈现增加趋势(Jin et al., 2015; Zhang et al., 2019)。国外多项独立田间监测数据表明害虫易对单价 Bt 作物产生抗性(Tabashnik et al., 2013a), 而转多基因策略的提出正是基于害虫对 2 种或多种不同作用机制杀虫蛋白产生抗性的概率要低于对单一杀虫蛋白产生抗性概率的设想。目前研发的转基因抗虫作物多是转双价作物, 转入的基因既可以是具有不同杀虫作用机制的 Bt 基因, 又可以是靶标害虫消化酶抑制剂基因, 如 α -淀粉酶抑制基因、大豆凝集素 *lectin* 基因、雪花凝集素 *gna* 基因、豇豆胰蛋白酶抑制剂 *cpiti* 基因和马铃薯蛋白酶抑制剂 *Pin II-2x* 基因等, 以达到延缓害虫产生抗性的目的(侯文胜等, 2002; Yu et al.,

2012)。如我国自主研发的转 *Cry1Ac+CpTI* 双价抗虫棉、美国孟山都生物技术公司研发销售的转 *Cry2Ab+Cry1Ac* 双价抗虫棉 Bollgard II、先正达生物技术公司研发的转 *mCry1Ab+Vip3Aa19* 双价抗虫棉和转 *Cry1Ab+Vip3Aa20* 双价抗虫玉米等(侯文胜等, 2002; Carrière et al., 2016)。

植食性昆虫取食植物后对蛋白质的消化吸收是其最基本的生理活动, 而植物同样进化出了防御机制以抵御昆虫为害。其中植物源蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)能够对植食性昆虫和病原体的侵染起到化学防御作用, 引起植食性昆虫忌避、拒食、中毒亦或是干扰其消化和对营养物质的吸收, 最终导致昆虫由于缺乏必需的营养而发育异常并最终死亡(Ryan, 1989)。与 Bt 毒素相比, PI 具有抗虫谱广, 昆虫不易产生耐受性等优点(王转花等, 2001)。某些 PI 对 Bt 毒素具有增效作用, 如将大豆胰蛋白酶抑制剂添加到 Bt 制剂中, 其可对棉铃虫幼虫生长有抑制增强作用(Zhang et al., 2000); 将慈菇蛋白酶抑制剂 *B* 基因与 *Cry1Ac* 基因双价转入到棉花中, 棉花的抗虫性显著增强(Guo et al., 2003); 将 Bt 和蛋白酶抑制剂基因转入到杨树中, 其抗虫能力明显高于仅含单一 Bt 基因的植株(李明亮等, 2000)。

马铃薯羧肽酶抑制剂(potato carboxypeptidases inhibitor, PCI)是最初从马铃薯中分离纯化出来的一种由39个氨基酸残基组成的球状多肽,其能够抑制昆虫肠道内羧肽酶的活性(Díez-Díaz et al., 2004)。而羧肽酶是从蛋白质和多肽的C端开始逐个水解释放出游离氨基酸的一类肽链外切酶,在蛋白质的消化吸收中起重要作用,其以酶原形式存在于生物体内,酶原激活需要丝氨酸族蛋白酶的参与(Bayés et al., 2005; 2006)。在昆虫体内羧肽酶主要有羧肽酶A(carboxypeptidase A, CPA)和羧肽酶B(carboxypeptidase B, CPB)两大类,而PCI可特异性抑制昆虫肠道内CPA活性(Bayés et al., 2005; 2006)。如Abdeen et al.(2005)将PCI和马铃薯PI-II基因转入到番茄中,结果发现高表达蛋白酶抑制剂的纯合番茄株系可有效防控棉铃虫和三叶斑潜蝇*Liriomyza trifolii*幼虫;Quilis et al.(2014)将玉米蛋白酶抑制剂和PCI基因融合后转入到水稻中,结果发现转基因水稻既可以抵抗二化螟*Chilo suppressalis*为害又可抑制稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*侵染;Oppert et al.(2011)将PCI与Cry3Aa杀虫蛋白混用,结果发现PCI+Cry3Aa可有效延缓谷蠹*Rhyzopertha dominica*生长发育历期,增加其死亡率,降低其繁育数量。截至目前,关于PCI与Bt毒素混用对昆虫中肠蛋白酶活性影响以及PCI对Cry1Ac毒素杀虫活性影响的研究鲜有报道。

为明确PCI能否作为一个候选基因与Cry1Ac共同作用,本研究拟测定PCI与Cry1Ac毒素混用后棉铃虫中肠内羧肽酶、总蛋白酶活性、类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性、CPA和CPB基因的相对表达量及对棉铃虫初孵幼虫的杀虫活性,以期对转多价抗虫棉的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:棉铃虫成虫于1996年自河南省新乡市七里营镇棉田内采集,于温度(27±2)℃、相对湿度(75±10)%、光周期14 L:10 D养虫室内用人工饲养繁殖多代,取3龄幼虫供试。人工饲料配方参照梁革梅和谭维嘉(1999)。

试剂及仪器:Cry1Ac毒素,中国农业科学院植物保护研究所生物技术组馈赠;氨苯磺胺偶氮酪蛋白、N α -苯甲酰-DL-精氨酸-4-基苯酰胺盐酸盐(N α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride, BApNA)、N-琥珀酰-丙酰氨-丙酰氨-脯酰氨-

苯丙氨酸对硝基酰苯胺(N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, SAAPFpNA)、羧肽酶抑制剂PCI、N-((2E)-3-(2-呋喃基)-2-丙烯酰)-L-苯丙氨酸-L-苯丙氨酸(N-(3-(2-furyl)acryloyl)-Phe-Phe, FAPP)、呋喃基丙烯酰-丙酰氨-赖氨酸(N-(3-(2-furyl)acryloyl)-Ala-Lys, FAAK),美国Sigma试剂公司;FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix,天根生化科技(北京)有限公司;Trizol试剂,美国Invitrogen生命技术有限公司;Premix Ex Taq™,宝日医生物技术(大连)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。24孔养虫板,上海希言科学仪器有限公司;DYY-6C电泳仪,北京六一仪器厂;Synergy4多功能酶标仪,美国BioTek仪器有限公司;Immuno 96孔酶标板,美国Thermo Fisher科技公司;NanoDrop2000超微量分光光度计,美国Thermo Fisher科技公司。

1.2 方法

1.2.1 PCI与Cry1Ac单用及混用的饲喂试验

PCI单用含量分别为20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。根据前期本实验室测定的Cry1Ac对棉铃虫初孵幼虫的LC₅₀结果(Zhang et al., 2019)及da Silva et al.(2018)的研究结果,Cry1Ac毒素单用含量分别为1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。PCI与Cry1Ac混用含量分别为20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac和40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac。将新制作的人工饲料通过50 mL注射器注入到24孔养虫板内,每孔1.5 mL,待人工饲料冷却凝固后将对照0.1 mol/L PBS缓冲液(pH 7.4)、2个浓度的Cry1Ac、2个浓度的PCI和2个Cry1Ac+PCI混合液各100 μL 均匀涂于饲料表面,待其风干后,取个体大小一致的棉铃虫3龄幼虫,饥饿处理12 h后分别接入不同处理的人工饲料中,每孔1头试虫。每处理各饲喂96头幼虫,取食12 h后,每个处理取10头和15头幼虫分别用于中肠酶液和总RNA的提取,每个处理重复3次。

1.2.2 饲喂后棉铃虫幼虫中肠内蛋白酶活性的测定

棉铃虫中肠酶液的制备:将每个处理取样后的棉铃虫3龄幼虫放在冰上,用解剖剪将其迅速解剖,取其中肠及其内含物置于预冷玻璃均浆器内,加入0.15 mol/L NaCl溶液1 mL,研磨匀浆,4℃、12 000×g下离心15 min,取上清液作为中肠酶液备用。根据Bradford(1976)方法以牛血清蛋白为标准蛋白计算各样品的蛋白质量,每个处理重复3次。

羧肽酶活性的测定:分别以FAPP和FAAK为底物测定CPA和CPB的活性(Bown et al., 1998)。底物FAPP和FAAK各取0.02 mmol分别溶于含0.1 mol/L

NaCl, pH 8.0、浓度为 20 mmol/L Tris-HCl 的 10 mL 缓冲液内,使底物终浓度均为 2 mmol/L。取 10 μ L 中肠酶液加入到浓度为 0.1 mol/L、pH 8.0、170 μ L 硼酸-氢氧化钠缓冲液中,30℃ 孵育 10 min 后分别加入 20 μ L FAPP 和 FAAK 底物,使用酶标仪在 330 nm 波长处连续 10 min 测量吸光度 $OD_{330\text{ nm}}$ 。以时间为横坐标、以吸光度 $OD_{330\text{ nm}}$ 为纵坐标作图,取最初线性部分,计算 $\Delta OD_{330\text{ nm}}$ 的变化值。每分钟水解 1 μ mol 底物所需酶量为 1 个酶活力单位,1 mL 酶液中酶活力单位= $(\Delta OD_{330\text{ nm}} \times \text{酶液稀释倍数}) / (\text{底物摩尔消光系数} \times \text{酶液加入量} \times 10^{-3})$,FAPP 和 FAAK 的摩尔消光系数分别为 2 300 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 和 1 820 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;酶比活力=1 mL 酶液中酶活力单位/总蛋白质量(Wang et al., 2004)。

总蛋白酶活性的测定:参照王琛柱和钦俊德(1996)方法并进行适当修改。将 200 mg 氨苯磺胺偶氮酪蛋白溶于浓度为 0.15 mol/L 的 10 mL NaCl 中,终浓度为 20 μ g/ μ L,以此为底物。依次取底物 40 μ L、0.2 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.5) 20 μ L 和中肠酶液 5 μ L 加入到 1.5 mL 离心管内,30℃ 反应 1.5 h 后,加入体积比为 10% 的三氯乙酸 65 μ L,终止反应。反应混合物在 4℃,12 000 $\times$ g 下离心 15 min,取上清液于 415 nm 波长处测定吸光度,通过计算单位时间内吸光度的变化值,并除以中肠酶液中总蛋白质量即可得到总蛋白酶活性(Cao et al., 2013)。

类胰蛋白酶活性的测定:将 200 mg BApNA 溶于 10 mL 二甲基亚砷中,使其终浓度为 20 μ g/ μ L,以此为底物。向 96 孔酶标板中加入底物 100 μ L、0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.5) 45 μ L 和中肠酶液 5 μ L,立即置于酶标仪中,于 405 nm 波长处测定吸光度 $OD_{405\text{ nm}}$,每次读数间隔 20 s,持续读数 10 min。以时间为横坐标、以 $OD_{405\text{ nm}}$ 为纵坐标作图,取最初线性部分,计算 $\Delta OD_{405\text{ nm}}$ 的变化值。1 mL 酶液中类胰蛋白酶活力单位= $(\Delta OD_{405\text{ nm}} \times \text{酶液稀释倍数}) / (\text{底物摩尔消光系数} \times \text{酶液加入量} \times 10^{-3})$,BApNA 的摩尔消光系数为 8 800 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;类胰蛋白酶比活力=1 mL 酶液中类胰蛋白酶活力/总蛋白质量(解娜等,2012)。

类胰凝乳蛋白酶活性的测定:参照王琛柱和钦俊德(1996)方法,将 100 mg SAAPFpNA 溶于浓度为 0.15 mol/L 的 5 mL NaCl 中作为底物,终浓度为 20 μ g/ μ L。向 96 孔酶标板中加入底物 45 μ L、0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.5) 90 μ L

和中肠酶液 5 μ L,立即置于酶标仪中,于 405 nm 波长处读取吸光度 $OD_{405\text{ nm}}$,每次读数间隔 20 s,持续读数 10 min,以时间为横坐标,以 $OD_{405\text{ nm}}$ 为纵坐标,取最初线性部分,计算 $\Delta OD_{405\text{ nm}}$ 的变化值。1 mL 酶液中类胰凝乳蛋白酶活力单位= $(\Delta OD_{405\text{ nm}} \times \text{酶液稀释倍数}) / (\text{产物摩尔消光系数} \times \text{酶液加入量} \times 10^{-3})$,SAAPFpNA 水解产物对硝基苯胺的摩尔消光系数为 10 070 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;类胰凝乳蛋白酶比活力=1 mL 酶液中类胰凝乳蛋白酶活力/总蛋白质量(Pekkarinen et al., 2000)。

1.2.3 饲喂后棉铃虫中肠中羧肽酶基因的表达分析

将每个处理取样后的棉铃虫 3 龄幼虫放在冰盒内,10 min 后用解剖剪截取中肠放入研钵内,加入少量液氮,将其快速研磨至粉末状,加入 1 mL Trizol 试剂继续研磨至匀浆均匀,按照 Trizol 法提取总 RNA。提取的 RNA 经分光光度计检测 RNA 纯度和浓度,并检测 RNA 完整性。参照 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 说明书合成 cDNA。20 μ L 反转录体系:5 $\times$ FastKing-RT SuperMix 4 μ L、总 RNA 1 μ L、DEPC 水 15 μ L。反转录条件:42℃ 15 min,95℃ 灭活 3 min。合成的 cDNA 于 -20℃ 冰箱中保存备用。

根据 NCBI 上登记的棉铃虫 *CPA* (GenBank 登录号为 AJ005176、AJ005177 和 AJ005178)、*CPB* (GenBank 登录号为 EF600060)、棉铃虫 *β -actin* (GenBank 登录号为 X97615) 和 *gapdh* (GenBank 登录号为 JF417983.1) 基因序列,使用 Beacon Designer 8 软件设计引物和探针(表 1),引物及探针均由宝日医生物技术(大连)有限公司合成。

以 *β -actin* 和 *gapdh* 管家基因为双内参基因,采用 TaqMan 探针法进行实时荧光定量 PCR 检测 *CPA* 和 *CPB* mRNA 相对表达量,25 μ L 反应体系:2 $\times$ Pre-mix Ex TaqTM 12.5 μ L、10 μ mol/L PCR 正反向引物各 0.75 μ L、探针 0.5 μ L、50 $\times$ Rox 参考染料 0.25 μ L、cDNA 模板 1 μ L、无 RNA 酶水 9.25 μ L。反应条件:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 15s,60℃ 退火延伸 30 s,40 个循环。试验重复 3 次,生物学重复 3 次。所得数据利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 定量方法进行相对表达量分析。

1.2.4 PCI 和 Cry1Ac 单用及混用对棉铃虫的杀虫活性

采用表面涂抹法测量 PCI 和 Cry1Ac 单用及混用对棉铃虫的防治效果。根据本实验室前期测定的 Cry1Ac 对棉铃虫初孵幼虫的 LC_{50} (Zhang et al., 2019),Cry1Ac 单用选择亚致死浓度 0.02 μ g/cm² 和 0.06 μ g/cm²;PCI 单用选择 20 μ g/cm² 和 40 μ g/cm²,PCI 和 Cry1Ac 混用为单用浓度的两两组合。含药

饲料的制备方法同1.2.1,待其风干后每孔接入1头棉铃虫初孵幼虫,放入养虫室中饲养,每个处理接虫72头,7 d后调查幼虫的死亡及生长发育情况,幼虫死亡及龄期末达3龄者视为死亡(Chakroun et al., 2012),计算实际校正死亡率,实际校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100%。每个处理重复3次。PCI和Cry1Ac混用的预期校正死亡率=(1-PCI单用的实际校正存活率×Cry1Ac单用的实际校正存活率)×100%。采用费希

尔精确检验法(Tabashnik et al., 2013b)对棉铃虫幼虫实际校正死亡率与预期校正死亡率进行差异显著性检验,当实际校正死亡率显著大于预期校正死亡率,表示PCI与Cry1Ac混用对棉铃虫杀虫活性具有协同增效作用;当实际校正死亡率与预期校正死亡率差异不显著,表示PCI与Cry1Ac混用对棉铃虫杀虫活性具有独立作用;而当实际校正死亡率显著小于预期校正死亡率,表示PCI与Cry1Ac混用对棉铃虫杀虫活性具有拮抗作用。

表1 本研究中实时荧光定量PCR所用引物及探针序列
Table1 Sequences of primers and probes used in quantitative real-time PCR in this study

引物和探针名称 Name of primer and probe	引物和探针序列 Sequence of primer and probe
CPA-F	5'-TCCTCCACTGTCGTGAATGG-3'
CPA-R	5'-TGACATCAATGACAAGTTTGTGGAT-3'
CPA 探针 CPA probe	5'- (FAM)TGACCCCTCCCTGCGACTCTCTACGC(TAMRA)-3'
CPB-F	5'-CAACTATGATTTCGCCTGGAATACC-3'
CPB-R	5'-GCAATACGAGCCAGATGTTCTTG-3'
CPB 探针 CPB probe	5'- (FAM) TCCTTGCTCCGACATCTACGCTGG (TAMRA)-3'
gapdh-F	5'-CATTGAAGGTCTGATGACCACTGT-3'
gapdh-R	5'-CAGAGGGTCCATCCACTGTCTT-3'
gapdh 探针 gapdh probe	5'- (FAM)CAGCCACCATTGCCACCCA(TAMRA)-3'
β-actin-F	5'-CACAGATCATGTTTCGAGACGTTCAA-3'
β-actin-R	5'-GCCAAGTCCAGACGCAGGAT-3'
β-actin 探针 β-actin probe	5'- (FAM)CCGCCATGTACGTCGCCATCCAGG (TAMRA)-3'

括号里 FAM 和 TAMRA 分别为 5'端带有的荧光物质和 3'端带有的淬灭物质。FAM and TAMRA in brackets are the FAM (6-carboxy-fluorescein) at the 5' end as a reporter dye and TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine) as a quencher dye at the 3' end.

1.3 数据分析

运用 DPS 7.05 数据处理系统软件对试验数据进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PCI和Cry1Ac单用及混用对蛋白酶活性的影响

饲喂 1 μg/cm² Cry1Ac 和 5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,棉铃虫 3 龄幼虫中肠内 CPA 活性分别为 0.78 U/mg 和 0.76 U/mg,均与对照差异不显著,而饲喂 20 μg/cm² PCI、40 μg/cm² PCI、20 μg/cm² PCI+1 μg/cm² Cry1Ac、40 μg/cm² PCI+5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,CPA 活性分别为 0.25、0.19、0.20 和 0.16 U/mg,显著低于对照(P<0.05,图 1-A)。

饲喂 20 μg/cm² PCI、40 μg/cm² PCI、1 μg/cm² Cry1Ac、5 μg/cm² Cry1Ac、20 μg/cm² PCI+1 μg/cm² Cry1Ac、40 μg/cm² PCI+5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,棉铃虫 3 龄幼虫中肠内 CPB 的活性分别为 0.26、

0.26、0.24、0.26、0.27 和 0.26 U/mg,与对照差异不显著(图 1-A)。

饲喂 20 μg/cm² PCI、40 μg/cm² PCI、1 μg/cm² Cry1Ac、5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,棉铃虫 3 龄幼虫中肠内总蛋白酶的活性分别为 0.17、0.16、0.19 和 0.19 OD·min⁻¹·mg⁻¹,与对照差异不显著,而饲喂 20 μg/cm² PCI+1 μg/cm² Cry1Ac、40 μg/cm² PCI+5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,总蛋白酶活性均为 0.15 OD·min⁻¹·mg⁻¹,均显著低于 1 μg/cm² Cry1Ac 和 5 μg/cm² Cry1Ac 处理(P<0.05,图 1-B)。

饲喂 20 μg/cm² PCI、40 μg/cm² PCI、1 μg/cm² Cry1Ac、5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,棉铃虫 3 龄幼虫中肠内类胰蛋白酶活性分别为 0.59、0.59、0.66 和 0.58 μmol·min⁻¹·mg⁻¹,与对照差异不显著,而饲喂 20 μg/cm² PCI+1 μg/cm² Cry1Ac、40 μg/cm² PCI+5 μg/cm² Cry1Ac 含药饲料后,类胰蛋白酶活性均为 0.45 μmol·min⁻¹·mg⁻¹,均显著低于其他处理(P<0.05,图 1-C)。

饲喂 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 含药饲料后,棉铃虫3龄幼虫中肠内类胰凝乳蛋白酶活性分

别为0.48、0.39、0.42、0.41、0.40和0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 6者之间差异不显著,但均显著低于对照($P<0.05$,图1-D)。

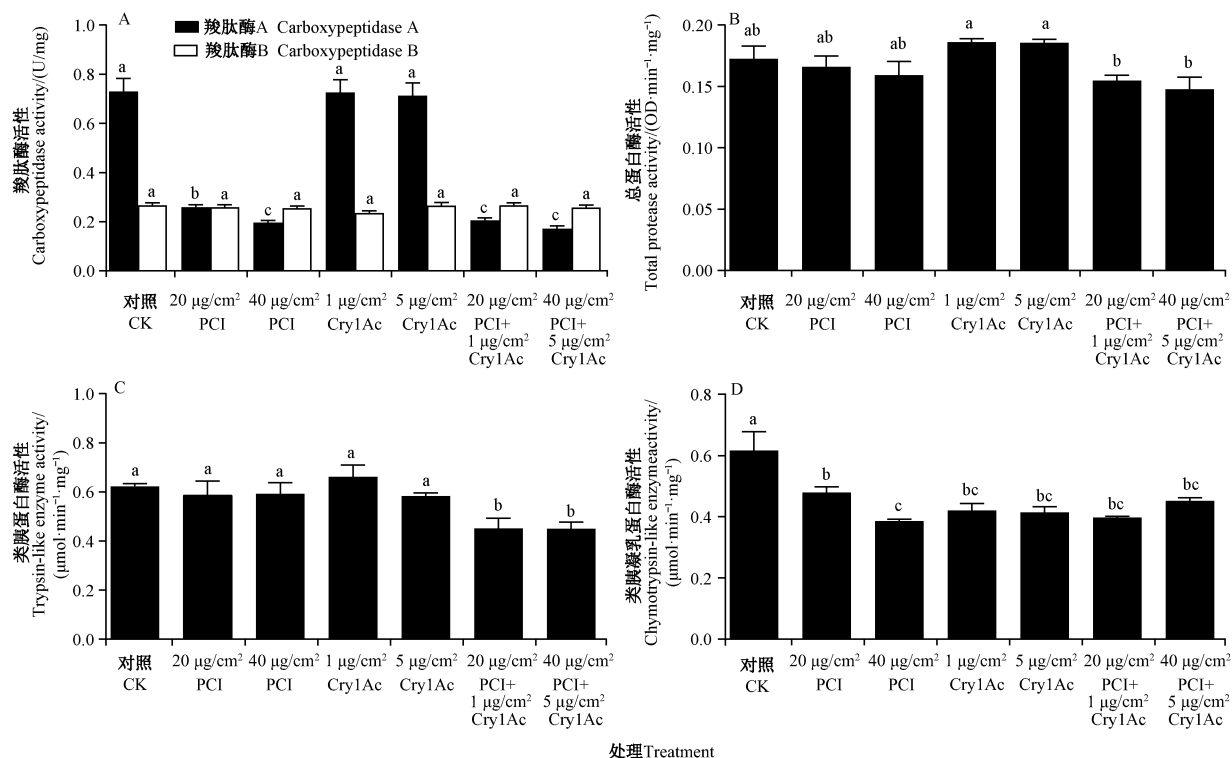


图1 PCI和Cry1Ac单用及混用后棉铃虫3龄幼虫中肠内的蛋白酶活性

Fig. 1 Protease activities in midgut of third instar larvae of *Helicoverpa armigera* that fed on diet containing PCI, Cry1Ac or PCI+Cry1Ac

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同色柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean $\pm$ SE. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 PCI和Cry1Ac单用及混用对CPA和CPB的影响

饲喂1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac含药饲料后,棉铃虫3龄幼虫中肠内CPA基因相对表达量均较对照显著上调($P<0.05$);饲喂1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac含药饲料后,棉铃虫3龄幼虫中肠内CPB基因相对表达量较其他处理显著下调($P<0.05$);而饲喂20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI和40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI含药饲料后CPB基因相对表达量较对照无显著变化(图2)。

2.3 PCI与Cry1Ac单用及混用对棉铃虫的杀虫活性

20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac、40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac及20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Cry1Ac处理后,棉铃虫初孵幼虫的实际校正死亡率分别为66.54%、68.28%和77.74%,预期校正死亡率分别为59.67%、60.10%和69.46%,与实际校正死亡率差异不显著,这些组合对杀虫活性表现为独立作用;而40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac混用后,棉铃虫初孵幼虫的实际校正死亡率和预期校正死亡率分别为85.76%和71.37%,前者显著高于后者,这个组合对杀虫活性表现为增效作用(表2)。

3 讨论

在植物与植食性昆虫漫长的协同进化过程中,植物形成了多种多样的防御机制来抵抗昆虫为害。而植物源蛋白酶抑制剂是其中一类重要的防御蛋白,并且随着转基因技术的发展,多个植物源蛋白酶抑制剂基因被用于抗虫作物的研发中(李明亮等,

2000; Guo et al., 2003; Yu et al., 2012), 如马铃薯羧肽酶抑制剂。本研究结果表明, PCI 和 Cry1Ac 混用可加剧扰乱棉铃虫幼虫中肠内主要消化酶的活性。棉铃虫和印度谷螟 *Plodia interpunctella* 等鳞翅目幼虫中肠内的胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶可激活 Bt 原毒素, 而且该类蛋白酶活性的降低常与昆虫 Bt 抗性的产生相关 (Oppert et al., 1997; Liu et al., 2014)。解娜等 (2012) 发现取食 Cry1Ac 后黏虫 *Mythimna separata* 体内胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性都下降, 与本研究结果一致。魏纪珍等 (2012) 研究结果发现, 取食低浓度 Cry1Ac 后, 棉铃虫体内总蛋白酶活性下降, 而类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性都升高, 与本研究结果存在分歧, 究其原因可能是 Bt

原毒素进入昆虫中肠内后, 胰蛋白酶或类胰凝乳蛋白酶在错误位点剪切原毒素, 使得 Bt 蛋白没有产生杀虫活性的活化蛋白, 而是将 Bt 原毒素降解了, 昆虫就通过提高消化酶活性尽快将 Bt 毒素降解消化; 而进入中肠的 Bt 原毒素一旦被正确剪切就会产生具有杀虫活性的活化蛋白, 昆虫就会产生中毒反应, 这时昆虫可能会通过提高体内解毒酶和保护酶的活性和降低类胰蛋白酶类的活性来防止产生更多活化杀虫蛋白, 避免进一步中毒死亡。在此期间, 消化酶组分也会发生改变, 消化酶活性变化可能由最初 Bt 原毒素是否被正确剪切决定, 该猜测是否正确还有待进一步研究验证。

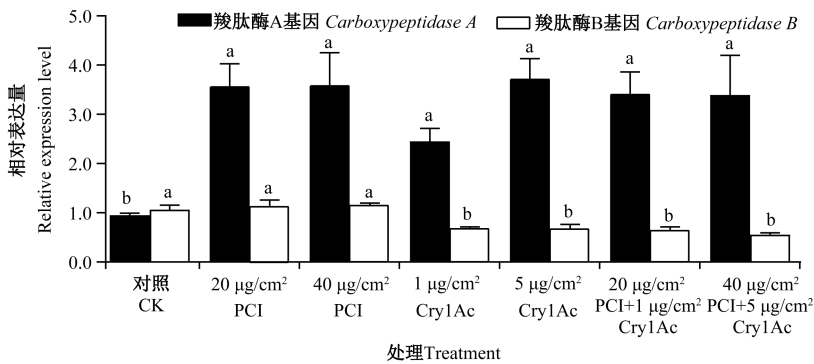


图2 PCI和Cry1Ac单用及混用后棉铃虫3龄幼虫中肠内羧肽酶基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of carboxypeptidase genes in midgut of *Helicoverpa armigera* third instar larvae that fed on diet containing PCI, Cry1Ac or PCI+Cry1Ac

图中数据为平均数±标准误。同色柱上不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

表2 PCI和Cry1Ac单用及混用对棉铃虫初孵幼虫杀虫活性

Table 2 Insecticidal activities of single and mixed use of PCI and Cry1Ac on newly hatched larvae of *Helicoverpa armigera*

处理 Treatment	实际校正死亡率 Observed corrected mortality/%	预期校正死亡率 Expected corrected mortality/%
20 µg/cm² PCI	23.62±4.11	—
40 µg/cm² PCI	28.39±4.00	—
0.02 µg/cm² Cry1Ac	44.28±5.05	—
0.06 µg/cm² Cry1Ac	60.02±7.84	—
20 µg/cm² PCI+0.02 µg/cm² Cry1Ac	66.54±3.22	59.67±2.50
40 µg/cm² PCI+0.02 µg/cm² Cry1Ac	68.28±0.96	60.10±4.44
20 µg/cm² PCI+0.06 µg/cm² Cry1Ac	77.74±1.73	69.46±6.70
40 µg/cm² PCI+0.06 µg/cm² Cry1Ac	85.76±2.53	71.37±6.30*

—: 无数据。表中数据为平均数±标准误。*表示实际校正死亡率与预期校正死亡率之间经费希尔精确检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。—: No data. Data in the table are mean±SE. * indicates significant difference between observed and expected corrected mortalities at $P<0.05$ level by Fisher's exact test.

本研究结果表明尽管在基因表达水平上, 与对照组相比, PCI 和 Cry1Ac 单用及混用都诱导了 CPA 基因的上调, 但只在 PCI 单用及与 Cry1Ac 混用后中肠中具有实际功能的 CPA 酶活性显著低于对照组

和Cry1Ac单用,表明PCI与CPA蛋白酶结合并抑制了其活性;尽管Cry1Ac单用及与PCI混用显著诱导了CPB基因的下调,但CPB酶活性在各处理之间并无显著差异,表明Cry1Ac和PCI不是CPB蛋白酶的抑制剂。Bayés et al. (2006)前期证实PCI并不是CPB酶的抑制剂,与本研究结果一致。棉铃虫羧肽酶基因表达水平的变化与中肠羧肽酶活性的实际变化不一致,究其原因可能是羧肽酶是以酶原形式存在于中肠内,胰蛋白酶可将中肠内已有的酶原酶切为活性态酶(Bayés et al., 2005),导致酶活性在短时间内无显著变化。

本研究结果表明,PCI与Cry1Ac混用对棉铃虫初孵幼虫的杀虫活性无拮抗作用,仅在 $40\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PCI+ $0.06\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac浓度组合时有协同增效作用,然而本研究中PCI与Cry1Ac组合较少,未来仍需对两者的高浓度进行组合,进一步确定具有协同增效作用的适宜组合比例。本研究中用到的PCI剂量明显高于Cry1Ac剂量,未来可通过优化PCI基因的密码子提高其在植物体内的表达水平,亦或通过微生物发酵工程技术进行大量合成以进行施用。蛋白酶抑制剂对Bt毒素有增效作用,如Zhang et al. (2000)研究发现大豆胰蛋白酶抑制剂可增强Bt毒素对棉铃虫幼虫的生长抑制作用;Zhu et al. (2007)研究发现苯甲脒、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和甲苯磺酰赖氨酸甲酮(N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK)蛋白酶抑制剂也可增强Bt毒素对美洲棉铃虫*H. zea*的杀虫活性;Oppert et al. (2010)报道赤拟谷盗*Tribolium castaneum*幼虫取食半胱氨酸蛋白酶抑制剂后,会降低类半胱氨酸蛋白酶活性,转而提高类胰凝乳蛋白酶活性以对抗抑制剂对其生长发育的影响;Oppert et al. (2011)结果发现PCI或抑肽酶可显著增强Cry3Aa对谷蠹的杀虫效果,但对黄粉虫*Tenebrio molitor*和赤拟谷盗无增效作用,究其原因PCI对Bt毒素的增效作用可能与昆虫种类和Bt毒素类别有关。

参 考 文 献 (References)

- Abdeen A, Virgós A, Olivella E, Villanueva J, Avilés X, Gabarra R, Prat S. 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 57(2): 189–202
- Bayés A, Comellas-Bigler M, de la Vega MR, Maskos K, Bode W, Aviles FX, Jongsma MA, Beekwilder J, Vendrell J. 2005. Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46): 16602–16607
- Bayés A, de la Vega MR, Vendrell J, Aviles FX, Jongsma MA, Beekwilder J. 2006. Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 654–664
- Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA. 1998. Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: enzyme characterisation, cDNA cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(10): 739–749
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2): 248–254
- Cao GC, Zhang LL, Liang GM, Li XC, Wu KM. 2013. Involvement of nonbinding site proteinases in the development of resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac. *Journal of Economic Entomology*, 106(6): 2514–2521
- Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE. 2016. Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? *Trends in Biotechnology*, 34(4): 291–302
- Chakroun M, Bel Y, Caccia S, Abdelkefi-Mesrati L, Escriche B, Ferré J. 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3): 334–339
- da Silva IHS, Gómez I, Sánchez J, de Castro DLM, Valicente FH, Soberón M, Polanczyk RA, Bravo A. 2018. Identification of midgut membrane proteins from different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. *PLoS ONE*, 13(12): e0207789
- Díez-Díaz M, Conejero V, Rodrigo I, Pearce G, Ryan CA. 2004. Isolation and characterization of wound-inducible carboxypeptidase inhibitor from tomato leaves. *Phytochemistry*, 65(13): 1919–1924
- Guan XM, Dong BX, Cao XR, Liu XS, Li ZB, Huang W, Zheng CM, Xu ZC. 2016. Impact of Bt cotton plantations on cotton bollworm populations in peanut fields. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(4): 851–855 (in Chinese) [关秀敏, 董保信, 曹欣然, 刘旬胜, 李振博, 黄渭, 郑成民, 徐兆春. 2016. 转基因抗虫棉种植面积变化对花生田棉铃虫种群影响. *应用昆虫学报*, 53(4): 851–855]
- Guo HN, Wu JH, Chen XY, Luo XL, Lu R, Shi YJ, Qin HM, Xiao JL, Tian YC. 2003. Cotton plants transformed with the activated chimeric Cry1Ac and API-B genes. *Acta Botanica Sinica*, 45(1): 108–113
- Hou WS, Guo SD, Lu M. 2002. Gene transformation for plant improvement. *Biotechnology Information*, (1): 10–15 (in Chinese) [侯文胜, 郭三堆, 路明. 2002. 利用转基因技术进行植物遗传改良. *生物技术通报*, (1): 10–15]
- 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
- Li ML, Zhang H, Hu JJ, Han YF, Tian YC. 2000. Study on insect resistant transgenic poplar plants containing both Bt and Pi gene. *Scientia Silvae Sinicae*, 36(2): 93–97 (in Chinese) [李明亮, 张辉, 胡建军, 韩一凡, 田颖川. 2000. 转 Bt 基因和蛋白酶抑制剂基因杨树抗虫性的研究. *林业科学*, 36(2): 93–97]
- Liang GM, Tan WJ. 1999. An improvement in artificial rearing technique of *Helicoverpa armigera*. *Plant Protection*, 25(2): 15 (in Chinese) [梁革梅, 谭维嘉. 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. *植物保护*, 25(2): 15]
- Liu CX, Xiao YT, Li XC, Oppert B, Tabashnik BE, Wu KM. 2014. Cis-mediated down-regulation of a trypsin gene associated with Bt resistance in cotton bollworm. *Scientific Reports*, 4: 7219
- Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM. 2018. Adjustment of cropping structure increases the risk of cotton bollworm outbreaks in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(1): 19–24 (in Chinese) [陆宴辉, 姜玉英, 刘杰, 曾娟, 杨现明, 吴孔明. 2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. *应用昆虫学报*, 55(1): 19–24]
- Oppert B, Elpidina EN, Toutges M, Mazumdar-Leighton S. 2010. Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 5(4): 280–287
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38): 23473–23476
- Oppert B, Morgan TD, Kramer KJ. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. *Pest Management Science*, 67(5): 568–573
- Pekkarinen A, Mannonen L, Jones BL, Niku-Paavola ML. 2000. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. *Journal of Cereal Science*, 31(3): 253–261
- Quilis J, López-García B, Meynard D, Guiderdoni E, San Segundo B. 2014. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3): 367–377
- Ryan CA. 1989. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 10(1): 20–24
- Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. 2013a. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6): 510–521
- Tabashnik BE, Fabrick JA, Unnithan GC, Yelich AJ, Masson L, Zhang J, Bravo A, Soberón M. 2013b. Efficacy of genetically modified Bt toxins alone and in combinations against pink bollworm resistant to Cry1Ac and Cry2Ab. *PLoS ONE*, 8(11): e80496
- Wang CZ, Qin JD. 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7–13 (in Chinese) [王琛柱, 钦俊德. 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. *昆虫学报*, 39(1): 7–14]
- Wang P, Li GX, Kain W. 2004. Characterization and cDNA cloning of midgut carboxypeptidases from *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8): 831–843
- Wang ZH, Yang B, Zhang Z. 2001. Recent progress in the genetic engineering of plant proteinase inhibitor anti-insect pests. *Journal of Plant Protection*, 28(1): 83–88 (in Chinese) [王转花, 杨斌, 张政. 2001. 植物蛋白酶抑制剂抗虫基因工程研究进展. *植物保护学报*, 28(1): 83–88]
- Wei JZ, Liang GM, Gao XW, Gao Z, Zhang WN, Guo YY. 2012. The effects of Cry2Ab and Cry1Ac insecticidal proteins on protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 839–846 (in Chinese) [魏纪珍, 梁革梅, 高希武, 高珍, 张万娜, 郭予元. 2012. Cry2Ab 及 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响. *应用昆虫学报*, 49(4): 839–846]
- Xie N, Jiang XF, Luo LZ, Zhang L. 2012. Effects of Cry1Ac toxin on activities of some enzymes in the larval midgut of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 168–175 (in Chinese) [解娜, 江幸福, 罗礼智, 张蕾. 2012. Cry1Ac 杀虫蛋白对粘虫中肠几种酶活性的影响. *昆虫学报*, 55(2): 168–175]
- Yu XM, Liu T, Sun ZG, Guan P, Zhu J, Wang SQ, Li SC, Deng QM, Wang LX, Zheng AP, et al. 2012. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 64(4): 326–331
- 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 JH, Wang CZ, Qin JD. 2000. The interactions between soybean trypsin inhibitor and delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* larva. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(4): 259–266
- Zhu YC, Abel CA, Chen MS. 2007. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(1): 39–46

(责任编辑:张俊芳)