

棉铃虫对不同 Bt 蛋白的抗性及其交互抗性研究*

刘 臣^{1**} 张丹丹¹ 王泽宇¹ 陈 琳¹ 李国平² 梁革梅^{1***}

(1. 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; 2. 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室, 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002)

摘 要 【目的】棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 对 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 的抗性问题是阻碍 Bt 抗虫棉持续发展的关键, 探究棉铃虫对不同 Bt 蛋白的抗性演化趋势及交互抗性, 可为选择合适的抗虫棉花备选基因提供参考。【方法】在室内通过连续多代筛选, 获得了 5 个对 Bt 具有不同抗性的品系, 利用饲料混合法测定了这些品系棉铃虫的交互抗性。【结果】经筛选后棉铃虫对 Cry1Ac 产生了超高水平的抗性、对 Cry2Ab、Vip3Aa 产生了超低抗性(耐性); Cry1Ac 抗性棉铃虫停止筛选而换成 Cry2Ab 或 Vip3Aa 继续筛选后, 棉铃虫对 Cry1Ac 抗性水平明显降低, 对 Cry2Ab 或 Vip3Aa 产生低抗或超低抗性(耐性)。Cry1Ac 抗性棉铃虫对 Cry1Ab 敏感性显著降低, 而对 Cry2Ab、Cry2Ah 及 Vip3Aa 敏感性变化不显著; Cry2Ab 抗性品系棉铃虫对 Cry1Ac 敏感性显著降低; Vip3Aa 抗性品系棉铃虫对 Cry1Ac 敏感性变化不显著。说明 Cry1Ac 与 Cry1Ab 间存在明显交互抗性, 与 Cry2Ah、Vip3Aa 没有交互抗性; 而 Cry2Ab 与 Cry1Ac 间存在不对称的交互抗性。【结论】在筛选新杀虫基因或叠加基因时, 应充分考虑抗性发展及交互抗性, Cry2Ah、Vip3Aa 是治理 Cry1Ac 抗性棉铃虫或与 Cry1Ac 叠加最优的选择。

关键词 棉铃虫, Bt 蛋白, 抗性, 交互抗性

Resistance, and cross-resistance, of *Helicoverpa armigera* to different Bt proteins

LIU Chen^{1**} ZHANG Dan-Dan¹ WANG Ze-Yu¹ CHEN Lin¹
LI Guo-Ping² LIANG Ge-Mei^{1***}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, MOA'S Regional Key Laboratory of Crop IPM in Southern Part of Northern China, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract [Objectives] The development of resistance to Bt (*Bacillus thuringiensis*) toxins by *Helicoverpa armigera* (Hübner) is the main constraint on the continuous planting of Bt transgenic cotton. In order to choose appropriate, alternative Bt genes to incorporate into transgenic cotton, we studied the resistance, and cross-resistance, of *H. armigera* to different Bt proteins. [Methods] After successive selection in the laboratory, we obtained 5 Bt-resistant strains with different resistance levels and determined the cross-resistance of these strains to different Bt proteins. [Results] Selection produced a strain of *H. armigera* with ultra-high resistance to Cry1Ac but low resistance (tolerance) to Cry2Ab and Vip3Aa. When Cry1Ac-resistant *H. armigera* were selected for resistance to Cry2Ab or Vip3Aa their resistance to Cry1Ac decreased significantly. Selection could only produce low, or ultra-low, resistance (tolerance) to Cry2Ab or Vip3Aa. The susceptibility of *H. armigera* to Cry1Ab dropped dramatically in the Cry1Ac-resistant strain, however, its susceptibility to Cry2Ab, Cry2Ah and Vip3Aa did not change

*资助项目 Supported projects: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题 (2016ZX08011-002); 河南省科技开放合作基金 (172106000054)

**第一作者 First author, E-mail: ippcaasliuchen@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: gmliang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-11-16, 接受日期 Accepted: 2017-12-29

significantly. The susceptibility of Cry2Ab-resistant *H. armigera* to Cry1Ac decreased significantly while the susceptibility of Vip3Aa low-resistant larvae to Cry1Ac did not change. Overall, the present study indicates obvious cross-resistance between Cry1Ac and Cry1Ab, but no cross-resistance between Cry1Ac and Cry2Ah or Vip3Aa. However, asymmetrical cross-resistance was found between Cry1Ac and Cry2Ab. **[Conclusion]** The evolution of resistance and cross-resistance in *H. armigera* should be fully considered when selecting novel, insecticidal genes for transgenic cotton. We suggest that Cry2Ah and Vip3Aa are the best choices for incorporation into new transgenic cotton varieties.

Key words *Helicoverpa armigera*, Bt proteins, resistance, cross-resistance

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 属鳞翅目夜蛾科, 具有杂食性, 严重危害棉花、小麦、玉米等多种农作物, 常造成重大经济损失, 是我国一种重要的农业害虫 (郭予元, 1998)。Bt (*Bacillus thuringiensis*) 蛋白具有靶标特异性强、对天敌和人畜无害等优点。Bt 蛋白在抗虫植物中的持续表达, 不仅可以有效的防治害虫, 降低农作物的产量损失, 而且可以减少化学农药的使用, 保护环境。自 1997 年以来, Bt 抗虫棉在中国大面积推广种植, 不仅有效的控制了棉田棉铃虫的为害, 而且还显著降低了其他寄主作物田棉铃虫的种群数量 (Wu *et al.*, 2008)。

Bt 杀虫剂和 Bt 作物的长期应用不可避免的会引起害虫的抗性产生 (Downes and Mahon, 2012), 目前已经有报道靶标害虫在田间、温室或室内对 Bt 蛋白产生了抗性 (Gould, 1998; Huang *et al.*, 2011; Tabashnik *et al.*, 2013), 如小菜蛾 *Plutella xylostella*、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*、草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、棉铃虫等多种鳞翅目害虫已对 Bt 产生抗性 (Rensburg, 2007; Storer *et al.*, 2010; Dhurua and Gujar, 2011; Gassmann *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014)。在我国华北棉区, 表达 Bt-Cry1Ac 的抗虫棉已种植 20 年, 棉铃虫的早期抗性可能将逐步制约 Bt 抗虫棉的可持续应用 (Wu, 2007; Zhang *et al.*, 2011)。有效的抗性治理策略主要有高剂量/庇护所策略、新毒素策略和转多价基因策略等 (谭声江等, 2002; 郭芳等, 2009), 为了延缓抗性的产生, 目前美国、澳大利亚和印度等国家推广种植的是同时表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的抗虫棉, 而我国还一直在种植仅表达 Cry1Ac 的

单价抗虫棉。因此, 筛选与 Cry1Ac 蛋白无交叉抗性的高效新蛋白, 对于我国新一代抗虫棉的研发至关重要。

Cry1Ab 是目前商业化的转基因玉米中最主要的一种基因, 可以有效地防治玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和二化螟 *Chilo suppressalis* (王世贵等, 2003; Zhang *et al.*, 2013); Cry2Ab、Vip3Aa 等新型毒素蛋白已陆续在转基因棉花、玉米等作物中与其他蛋白叠加表达。拥有自主知识产权的 Cry2Ah 除了对棉铃虫具有较好杀虫活性, 对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等也有较好的控制效果 (Kim *et al.*, 2017), 也是未来开发应用的备选基因。因此, 我们比较了棉铃虫对 Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa 产生抗性的趋势, 并测定了这些抗性或耐性品系棉铃虫对不同 Bt 蛋白的交互抗性, 结果可为筛选转基因棉花备选基因及制定合理的抗性治理策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫敏感品系 (96S): 1996 年采集于河南新乡棉田, 室内用人工饲料饲养至今, 未接触任何杀虫剂。

Cry1Ac 抗性品系棉铃虫 (1Ac-R): 由 96S 品系棉铃虫在含 Cry1Ac 蛋白的人工饲料上连续筛选 210 代。

Cry2Ab 抗性品系棉铃虫 (2Ab-R) \ Vip3Aa 抗性品系棉铃虫 (Vip-R): 由 96S 品系棉铃虫在含 Cry2Ab 或 Vip3Aa 蛋白的人工饲料上筛选 80 代。

1Ac-2Ab-R、1Ac-Vip-R 品系为已经对 Cry1Ac 产生超高抗棉铃虫,第 125 代后改用含 Cry2Ab 或 Vip3Aa 蛋白的人工饲料筛选 80 代。

1.2 人工饲料

棉铃虫人工饲料具体配方和饲养方法参照梁革梅等 (1999)。

1.3 供试 Bt 蛋白

Cry2Ah 大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 由中国农业科学院植物保护研究所抗虫生物技术组馈赠,提取和亲和层析纯化参照 Zhou (2015) 等。Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab、Vip3Aa 毒素蛋白购于北京缙诺思特生物科技有限公司。

1.4 生物测定

采用混合饲料法,将一定剂量的 Bt 蛋白与人工饲料充分混匀,分装到 24 孔板内。每种蛋白设 6 个浓度梯度,根据预试验,不同蛋白设置不同的浓度梯度(浓度范围在 0-200 μg/g)。Bt 蛋白用 50 mmol/L、pH 为 10.5 的 Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液进行溶解稀释,以缓冲液加入饲料作为对照。每孔接入 1 头棉铃虫初孵幼虫,放入 (27±2)℃,相对湿度 70%±10%,光周期

14 L:10D 的培养箱中培养,7 d 后调查幼虫死亡情况,以轻触虫体不动为死亡,小于 1 龄的幼虫也记为死亡。每处理重复 3 次。

1.5 数据统计与分析

生物测定数据采用 SPSS 软件进行分析,计算 LC₅₀ 和 95%置信区间(贾春生,2006)。以抗、感品系 LC₅₀ 之比计算相对抗性倍数(Relative resistance, RR)。抗性分级条件如下:无抗性:RR=1,超低抗性:RR=2-10,低抗:RR=11-20,中抗:RR=21-50,高抗:RR=50-100;超高抗:RR>100 (Shah *et al.*, 2017)。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫抗性种群的筛选

经长期连续筛选后,棉铃虫对 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 产生了不同程度的抗性(表 1)。与 96S 敏感品系棉铃虫相比,棉铃虫对 Cry1Ac 产生了超高水平抗性(1Ac-R),相对抗性倍数为 606.01 倍;对 Cry2Ab (2Ab-R)和 Vip3Aa (Vip-R)产生了超低抗的抗性(或耐性),相对抗性倍数分别为 6.69 倍和 7.14 倍。经 125 代筛选已经对 Cry1Ac 产生高抗的棉铃虫改用含 Cry2Ab (1Ac-2Ab-R)或 Vip3Aa (1Ac-Vip-R)

表 1 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 筛选后棉铃虫的相对抗性								
Table 1 Resistance rations of selected <i>Helicoverpa armigera</i> strains to Cry1Ac, Cry2Ab and Vip3Aa								
品系	Strains	Bt 蛋白	Bt proteins	筛选代数	Generations of selection	LC ₅₀ (95% CI)(μg/g)	相对抗性倍数	RR*
96S	Cry1Ac				/	0.14 (0.07-0.30)		1
	Cry2Ab				/	0.12 (0.09-0.17)		1
	Vip3Aa				/	1.80 (1.21-2.77)		1
1Ac-R	Cry1Ac				210	82.42 (52.10-125.86)		606.01
2Ab-R	Cry2Ab				80	0.89 (0.63-1.36)		6.69
Vip-R	Vip3Aa				80	12.86 (6.89-51.28)		7.14
1Ac-2Ab-R	Cry1Ac	Cry2Ab			125	7.42 (4.74-12.20)		54.54
					80	1.50 (0.86-4.95)		12.20
1Ac-Vip-R	Cry1Ac	Vip3Aa			125	9.05 (5.67-16.30)		66.54
					80	9.34 (6.61-13.60)		5.19

*表示相对抗性倍数是用相同蛋白测定的抗性品系 LC₅₀ 与 96S 敏感品系 LC₅₀ 的比值。
* indicates the relative resistance ratio, the LC₅₀ of Bt-resistant strain divided by the LC₅₀ of 96S strain for the same toxin.

蛋白的人工饲料筛选 80 代后,棉铃虫对 Cry1Ac 的抗性明显降低,相对抗性倍数为 54.54 倍和 66.54 倍,对 Cry2Ab 和 Vip3Aa 敏感性明显降低,抗性倍数分别为 12.20 倍和 5.19 倍,产生了低抗和超低抗水平的抗性。

2.2 交互抗性

测定了 1Ac-R、2Ab-R 和 Vip-R 3 个抗性品系棉铃虫对 Bt 的交互抗性(表 2),结果发现:超高抗品系棉铃虫对 Cry1Ab 的敏感性显著降低,LC₅₀ 值大于 100 μg/g(最高 Bt 蛋白浓度处理的实验组也未达到半数死亡),说明 Cry1Ac 与 Cry1Ab 间具有较高水平的交互抗性。但 1Ac-R 超高抗棉铃虫对 Vip3Aa 和 Cry2Ah 敏感性变化不大,相对抗性倍数分别是 1.26 倍和 1.11 倍,同时 Vip-R 品系对 Cry1Ac 抗性倍数也仅为 1.61 倍,说明 Cry1Ac 与 Cry2Ah 和 Vip3Aa 之间没有明显的交互抗性。但 1Ac-R 棉铃虫对 Cry2Ab 敏感性有一定程度降低,抗性倍数为 6.69(超低抗性),而 2Ab-R 品系对 Cry1Ac 的敏感性明显降低,抗性倍数为 22.24(中抗),说明

Cry1Ac 与 Cry2Ab 具有明显的交互抗性,且这种交互抗性为不对称交互抗性。

3 讨论

Bt 蛋白对多种鳞翅目、双翅目、膜翅目、直翅目、鞘翅目害虫都具有杀虫作用,是迄今推广应用最成功的生物杀虫剂,而且通过在转基因抗虫植物中的表达,成功用于害虫防治。为了延缓害虫对 Bt 的抗性,延长 Bt 和抗虫作物的使用时间,新基因和蛋白的筛选在抗性治理中尤为重要。目前 Cry1Ab、Cry2Ab、Vip3Aa 和 Cry1F 等蛋白已陆续在转基因棉花、玉米等作物中表达,不仅扩大了杀虫谱,而且有利于延缓抗性发展,因此这些基因通常与其他 Bt 基因共表达,如 Yang 等(2016)研究表明转双价或转三价 Bt 棉能够有效防治对 Cry1F 产生高抗(>270 倍)的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*,孟山都公司已经开发并应用 Bollgard II 抗虫棉(表达 Cry1Ac+Cry2Ab)和转入 Vip3A+Cry1Ac+Cry2Ab 基因的抗虫棉等(Walsh *et al.*, 2014)。

表 2 抗性种群棉铃虫对 Bt 蛋白的交互抗性
Table 2 The cross-resistance of resistant *Helicoverpa armigera* to Bt proteins

品系 Strains	Bt 蛋白 Bt proteins	LC ₅₀ (95% CI) (μg/g)	相对抗性倍数 RR
1Ac-R	Cry1Ab	>100	>100
	Cry2Ab	0.82 (0.62-1.65)	6.69
	Cry2Ah	1.93 (0.54-4.34)	1.11
	Vip3Aa	2.28 (1.37-4.13)	1.26
2Ab-R	Cry1Ac	3.02 (2.07-4.35)	22.24
Vip-R	Cry1Ac	0.22 (0.16-0.31)	1.61

本研究结果显示,经室内筛选后,棉铃虫对 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Vip3Aa 产生了不同程度的抗性,尤其对 Cry1Ac 产生了超高水平的抗性。说明在室内高选择压下,棉铃虫对具有不同杀虫机制的 Bt 蛋白都可以产生抗性。虽然经过 80 代左右筛选,棉铃虫对 Cry2Ab 和 Vip3Aa 的抗性水平仍属于超低抗性,与 Cry1Ac 的抗性演化趋势明显不同。梁革梅等(2000)报道,棉铃虫对 Cry1Ac 经 12 代筛选后有一个抗性突增期,之后抗性水平明显上升,到 16 代以后就增加到 100

多倍。但在我们筛选 Cry2Ab 和 Vip3Aa 的过程,却没有这样的突增期,反而出现敏感性反复起伏的现象,抗性倍数一直低于 20 倍,造成这种现象的主要原因可能是 Cry2Ab 和 Vip3Aa 具有与 Cry1Ac 不同的特异杀虫机制(Whalon and Wingerd, 2003);也可能是我们的初始敏感种群饲养时间较长,或其他因素共同影响,具体原因有待进一步研究。

Cry1Ac 超高抗棉铃虫对与 Cry1Ab 敏感性显著降低,说明 Cry1Ac 与 Cry1Ab 间存在明显

交互抗性。Cry1Ac 超高抗棉铃虫对 Cry2Ah 及 Vip3Aa 敏感性变化不显著, Vip3Aa 超低抗品系棉铃虫对 Cry1Ac 敏感性变化也不显著, 因此 Cry1Ac 与 Cry2Ah、Vip3Aa 没有交互抗性。但 Cry1Ac 超高抗棉铃虫对 Cry2Ab 有 6.69 倍抗性, Cry2Ab 超低抗品系棉铃虫对 Cry1Ac 敏感性降低 22.24 倍, 说明 Cry2Ab 与 Cry1Ac 间存在不对称的交互抗性(Yang *et al.*, 2017)。Wei 等(2015, 2017) 的研究结果也显示 Cry1Ac 与 Cry2Ab 之间存在着弱交互抗性, 与本研究结果一致。利用 DNAMAN 比较上述几种蛋白的氨基酸序列一致性, 发现 Cry1Ac 与 Cry1Ab 的相似性为 86.17%; 而 Cry1Ac 与 Cry2Ab 相似性较低, 为 9.29%, Cry2Ah 与 Cry1Ac 相似性也较低, 为 8.85%; Vip3Aa 不属于 Cry 类蛋白而是营养期杀虫蛋白, 与 Cry1Ac 相似性最低, 仅为 7.38%。不同蛋白的基因序列和三维结构上的差异决定了 Bt 特异性杀虫作用, 差异越大, 与昆虫中肠是结合位点就可能不同, 产生交互抗性的可能性就越小。

靶标害虫长期在单种 Bt 的筛选下能够产生抗性, 多基因叠加表达不仅能够有效延缓靶标害虫的抗性, 同时还可以扩大转基因作物的杀虫谱。但在选择叠加基因时, 一定要明确不同蛋白间是否存在交互抗性。根据本文试验结果, 不建议种植仅表达 Cry1Ab 的棉铃虫其他寄主作物, 或将 Cry1Ac 与 Cry1Ab 进行叠加表达。虽然 Cry2Ah 与 Cry2Ab 同源性高达 92.58%, 但本次试验显示 Cry1Ac 与 Cry2Ab 存在交互抗性, 但与 Cry2Ah 没有交互抗性, 因此, 治理 Cry1Ac 抗性棉铃虫 Cry2Ah 可能更优于 Cry2Ab。Cry1Ac 与 Vip3Aa 也没有交互抗性, 而且由于营养期蛋白杀虫机制的特异性, 使得 Vip3Aa 也可作为与 Cry1Ac 叠加的主要基因。

参考文献 (References)

- Dhurua S, Gujar GT, 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Management Science*, 67(8): 898–903.
- Downes S, Mahon R, 2012. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3): 281–286.
- Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, dos Santos AC, Omoto C, 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64(3): 150–158.
- Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, Dunbar MW, 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *PLoS ONE*, 6(7): e22629.
- Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701–726.
- Guo F, Liang GM, Cao GC, Chen H, Wu KM, Gao XW, Guo YY, 2009. The fitness cost of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* and their correlation with resistance management strategy. *Journal of Environmental Entomology*, 31(2): 162–167. [郭芳, 梁革梅, 曹广春, 陈豪, 吴孔明, 高希武, 郭予元, 2009. 昆虫对 Bt 抗性的适合度代价及其与抗性治理策略的关系. 环境昆虫学报, 31(2): 162–167.]
- Guo YY, 1998. Study on Cotton Bollworm. Beijing: China Agricultural Press. 1–14. [郭予元, 1998. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社. 1–14.]
- Huang F, Qureshi JA, Meagher RL, Reisig DD, Head GP, Andow DA, Ni XZ, Kerns D, Buntin GD, Niu Y, Fei Y, Vikash D, 2014. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PLoS ONE*, 9(11): e112958.
- Huang FN, Andow DA, Buschman LL, 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140(1): 1–16.
- Jia CS, 2006. Calculating the LC₅₀ of insecticides with software SPSS. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(3): 414–417. [贾春生, 2006. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC₅₀. 昆虫知识, 43(3): 414–417.]
- Kim HS, Noh S, Park Y, 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca toxicity against *Spodoptera exigua* (Hübner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(1): 199–205.
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 1999. An improvement in the technique of artificial rearing cotton bollworm. *Plant Protection*, 25(2): 16–18. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2): 16–18.]
- Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2000. The study of resistance-selection and cross-resistance of Bt against cotton bollworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 33(4): 46–53. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元,

2000. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学, 33(4): 46–53]
- Rensburg JBJ van, 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant & Soil*, 24(3): 147–151.
- Shah RM, Shad SA, Abbas N, 2017. Methoxyfenozide resistance of the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): cross-resistance patterns, stability and associated fitness costs. *Pest Management Science*, 73(1): 254–261.
- Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM, 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1031–1038.
- Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y, 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6): 510–521.
- Tang SJ, Chen XF, Li DM, 2002. Progress in the studies on *Helicoverpa* spp. resistance to transgenic Bt cotton and its management strategy. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 138–144. [谭声江, 陈晓峰, 李典谟, 2002. 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性及其治理策略研究进展, 45(1): 138–144.]
- Walsh TK, Downes SJ, Gascoyne J, James W, Parker T, Armstrong J, Mahon RJ, 2014. Dual Cry2Ab and Vip3A resistant strains of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae); testing linkage between loci and monitoring of allele frequencies. *Journal of Economic Entomology*, 107(4): 1610–1617.
- Wang SG, Ye GY, Hu C, Shu QY, 2003. The lethal and sub-lethal effects of a Cry1Ab-transformed rice line KMD-1 on *Chilo suppressalis* (Walker) larvae. *Journal of Zhejiang University*, 29(6): 52–56. [王世贵, 叶恭银, 胡萃, 舒庆尧, 2003. 转 cry1Ab 基因水稻对二化螟幼虫的致死和亚致死效应. 浙江大学学报, 29(6): 52–56.]
- Wei JZ, Guo YY, Liang GM, Wu KM, Zhang J, Tabashnik BE, Li XC, 2015. Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. *Scientific Reports*, 5: 7714.
- Wei YY, Wu SW, Yang YH, Wu YD, 2017. Baseline susceptibility of field populations of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin and lack of cross-resistance between Vip3Aa and cry toxins. *Toxins*, 9(4): 127.
- Whalon ME, Wingerd BA, 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4): 200–211.
- Wu K, 2007. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3): 220–223.
- 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.
- Yang F, Kerns DL, Brown S, Kurtz R, Dennehy T, Braxton B, Head G, Huang FN, 2016. Performance and cross-crop resistance of Cry1F-maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. *Scientific Reports*, 6: 28059.
- Yang F, Kerns DL, Head GP, Price P, Huang FN, 2017. Cross-resistance to purified Bt proteins, Bt corn and Bt cotton in a Cry2Ab2-corn resistant strain of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 73(12): 2495–2503.
- 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.
- Zhang LP, Huang FN, Leonard BR, Chen M, Clark T, Zhu YC, Wangila DS, Yang F, Niu Y, 2013. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of *Sugarcane borer* (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(3): 267–272.
- Zhou ZS, Yang SJ, Shu CL, Song FP, Zhou XP, Zhang J, 2015. Comparison and optimization of the method for Cry1Ac protoxin preparation in HD73 strain. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(8): 1598–1603.