

暗黑鳃金龟幼虫取食 Bt 菌株 HD8E 和 HD8G 后的中肠细胞病理变化*

魏红爽^{1**} 谭树乾^{1,2**} 曹雅忠¹ 忤均祥²
李克斌¹ 束长龙¹ 尹 姣^{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. 西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室, 杨凌 712100)

摘 要 【目的】暗黑鳃金龟 *Holotrichia palallela* Motschulsky 的幼虫 (蛴螬), 是小麦、花生、大豆、玉米、高粱、马铃薯等作物的重要地下害虫。本研究为暗黑鳃金龟幼虫的生物防治奠定了基础, 并为抗虫转基因作物的研究提供优良的候选基因。【方法】将 HD8E 和 HD8G 两个 Bt 株系的晶孢悬液饲喂蛴螬后, 利用透射电子显微镜对蛴螬中肠进行病理性观察, 利用解剖镜观察蛴螬肠道内容物。【结果】观察结果显示蛴螬的中肠组织出现微绒毛脱落、环肌和纵肌肌纤维降解、中肠细胞间隙扩大、细胞内质网肿胀断裂、线粒体变形等现象。【结论】HD8E 和 HD8G 两个 Bt 株系可以导致蛴螬中肠组织结构发生明显的病变, 且可明显地抑制暗黑鳃金龟幼虫的取食行为。

关键词 蛴螬, HD8E, HD8G, 中肠组织, 病理变化, 抑制取食

Pathological changes in the midgut of *Holotrichia palallela* larvae after feeding on HD8E and HD8G

WEI Hong-Shuang^{1**} TAN Shu-Qian^{1,2**} CAO Ya-Zhong¹ WU Jun-Xiang²
LI Ke-Bin¹ SHU Chang-Long¹ YIN Jiao^{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. Key Laboratory of Applied Entomology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract 【Objectives】*Holotrichia palallela* Motschulsky (Coleoptera: Melolonthidae) is an important underground insect pest that seriously damages wheat, peanut, soybean, corn, chinese sorghum, and potato, crops. This paper lays the foundation for the biological control of *H. palallela* larvae with the Bt strains HD8E and HD8G, and may provide some excellent candidate genes for the development of insect-resistant, genetically modified, crops. 【Methods】Pathogenic changes in the midgut of grubs after ingestion of HD8E and HD8G were observed using transmission electron microscopy and an anatomical lens, respectively. 【Results】Pathogenic changes in the midgut of *H. palallela* larvae included the shedding of microvilli, degradation of longitudinal and circular muscles fibers, expansion of the intercellular space, swelling and breakage of the endoplasmic reticulum and mitochondrial cyclization. 【Conclusion】The two Bt strains HD8E and HD8G caused obvious pathogenic changes in the midguts of *H. palallela* larvae and visibly inhibited their feeding behavior.

Key words grubs, HD8E, HD8G, midgut tissue, pathologic changes, feeding inhibition

暗 黑 鳃 金 龟 *Holotrichia palallela* (Melolonthidae), 幼虫为蛴螬, 俗称蛴虫、白 Motschulsky 属鞘翅目 (Coleoptera) 鳃金龟科 土蚕等。蛴螬是地下害虫中种类最多、分布最广、

*资助项目 Supported projects: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003025)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: weihongshuang710@163.com; zhiweijianniyixiao@163.com

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

收稿日期 Received: 2016-12-15, 接受日期 Accepted: 2017-09-03

危害最重的一个类群。暗黑鳃金龟是大多地区的优势种之一,发生程度日趋严重;其幼虫主要取食作物地下部分,其发生与危害给农业和林业生产造成巨大的经济损失(徐建国等,2002;李俊秀等,2007;王爱东,2008)。为了控制蛴螬的猖獗危害,长期以来农民采用化学农药防治蛴螬,但是带来了生态环境破坏与污染问题(曹雅忠等,2005;罗宗秀等,2009),因此探寻一种绿色防控手段成为当务之急。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性昆虫病原细菌,在形成芽孢时伴随着多种形态的伴孢晶体。研究报道 Bt 伴孢晶体主要由 Cry 和 Cyt 基因编码的杀虫晶体蛋白组成,每一种杀虫晶体蛋白可以对某种或几种害虫有毒杀活性(李雪薇等,2003;Bravo *et al.*, 2007;Frankenhuyzen, 2009)。说明其对靶标害虫具有高度特异的杀虫活性,但是这些杀虫活性蛋白对人畜等非靶标生物安全无害(冯书亮等,2000;王容燕等,2003;Roh *et al.*, 2007)。研究发现昆虫中肠上皮组织中有能够与 Cry 毒素结合的受体,这些受体是 Cry 毒素杀虫特异性的决定因素(Wolfersberger, 1984;Gahan *et al.*, 2001;Rajagopal *et al.*, 2003;Jurat-Fuentes and Adang, 2004, 2006;Fernandez, 2006)。目前研究显示,大量 Bt 活性杀虫蛋白对鳞翅目昆虫具有很强的毒杀作用,且中肠病变的研究比较深入。但是,对鞘翅目昆虫有活性的株系明显少于鳞翅目(Manju *et al.*, 2009;Zhang *et al.*, 2013),且中肠病变研究极少(张强等,2011)。本文中采用的 HD8E 和 HD8G 两株系菌可以表达 Cry8Ea1 和 Cry8Ga1 两种毒蛋白,均对暗黑鳃金龟幼虫具有毒杀活性(Shu *et al.*, 2009a, 2009b)。本文利用透射电镜技术对取食 Bt 后暗黑鳃金龟幼虫的中肠组织进行观察,旨在明确 Bt 目标菌株对鞘翅目暗黑鳃金龟幼虫中肠的致病效果,为探索 Bt 特定毒蛋白用于防治暗黑鳃金龟幼虫的应用技术以及对鞘翅目昆虫的病理机制的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试昆虫 暗黑鳃金龟 *H. parallela* 幼虫由河北省沧州市农林科学院提供。从田间捕捉暗黑鳃金龟成虫,在室内用榆树叶饲养至产卵,将卵放入塑料盒内孵化。饲养土壤环境:水含量 18%~20%,温度 27℃。用土豆条或小麦饲养孵化后幼虫。选取 5~7 日龄幼虫进行试验。

1.1.2 Bt 菌株孢晶悬液的制备 可表达 Cry8Ga1 和 Cry8Ea1 蛋白的 Bt 菌株 HD8G 和 HD8E 由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供。用液体 LB 培养基(卡纳终浓度为 50 μg/mL) 30℃、230 r/min 摇床上培养 Bt 菌株,油镜检验,观察芽孢释放量为 50%时停止培养。将培养液 12 000 r/min 离心 15 min,得到的沉淀用无菌水悬浮,制成孢晶悬液,测定其蛋白含量和孢子数。液氮冷冻后保存 -80℃中。待用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 用 Bt 的孢晶悬液浸泡晒干的马铃薯丝 20 min,再将马铃薯丝与孢晶悬液一并倒入灭过菌的土壤中,将其混匀作为饲料。土与孢晶悬液或水的质量比为 5:1,土与马铃薯丝的质量比为 23:1。以 HD8E 和 HD8G 两菌株对暗黑鳃金龟幼虫的致死终浓度(0.0875×10^8 CFU/g 土和 2.838×10^8 CFU/g 土)作为试验处理浓度(Shu *et al.*, 2009a, 2009b)。将暗黑鳃金龟幼虫置于混合好的毒土中持续饲养(处理),期间不再添加新的毒蛋白或毒土。处理 1、2、4 d 后,取其肠道,利用体视显微镜(上海蔡司光学仪器,Stemi 2000-C)观察其肠道内容物;取其中肠做进一步的电镜试验。以正常饲养的虫体为对照。

1.2.2 透射电镜制样 试验方法参照张彦等(2012)方法。解剖 1、2、4 d 亚致死虫体和对照,将中肠取出,浸入 3%的戊二醛(pH 7.4)固定液中,室温固定 2~4 h;戊二醛固定后,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 的磷酸缓冲液冲洗 2 h,尽量多次冲洗;将冲洗干净的样品加入 1%的锇酸中,

轻轻振动样品,使样品充分固定。固定 2 h;用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇分级脱水,每级脱水 7 min;用无水丙酮置换乙醇,室温进行,置换 3 次;用浸透液浸透样品,在 35℃ 温箱,浸透 2 h;先将包埋剂挑进包埋板孔中,再将样品小心的挑到孔的两头,最后用包埋剂将孔灌满;在 37、45、60℃ 的温箱中分别聚合 12、24、48 h;切片,并将切片置于铜网上;将带有切片的铜网放在醋酸铀液滴上染色 15 min。用蒸馏水冲洗数次,并吸干铜网上的水分;将切片放在 0.02 mol·L⁻¹ NaOH 的液滴上,插入后立刻取出,放入含有柠檬酸铅的液滴上,染色 20 min;用重蒸水洗去多余染色液,将切片置于干燥器中待观察。

2 结果与分析

2.1 中肠微绒毛的病变

健康蛱蝶(对照)的中肠微绒毛数量多,修

长,整齐,分布均匀,致密,膜结构正常(图 1:A, B)。其中图 1(A)为中肠微绒毛纵切;图 1(B)为中肠微绒毛横切。两种 Bt 毒蛋白处理 1 d 后,蛱蝶微绒毛便产生了不同程度的病变,出现肿胀,脱落,稀疏(图 1:C, F)。HD8E 处理的暗黑鳃金龟幼虫中肠微绒毛变形,结构疏松,内部出现泡状(图 1:C),随着处理时间的延长,微绒毛逐渐脱落(图 1:D),到第 4 天时,几乎完全脱落(图 1:E)。HD8G 处理后 1 d(图 1:F)暗黑鳃金龟幼虫中肠微绒毛的状态类似于 HD8E 处理的第 2 天状态(图 1:D),HD8G 处理的第 2 天和第 4 天病变程度没有增加(图 1:G, H)。研究结果表明,蛱蝶取食 Bt 1 d 后,HD8G 处理的其中肠微绒毛的病变速度比 HD8E 处理的要快,但之后病变速度落后于 HD8E 处理。

2.2 中肠环肌和纵肌的病变

健康暗黑鳃金龟幼虫(对照)中肠环肌的肌

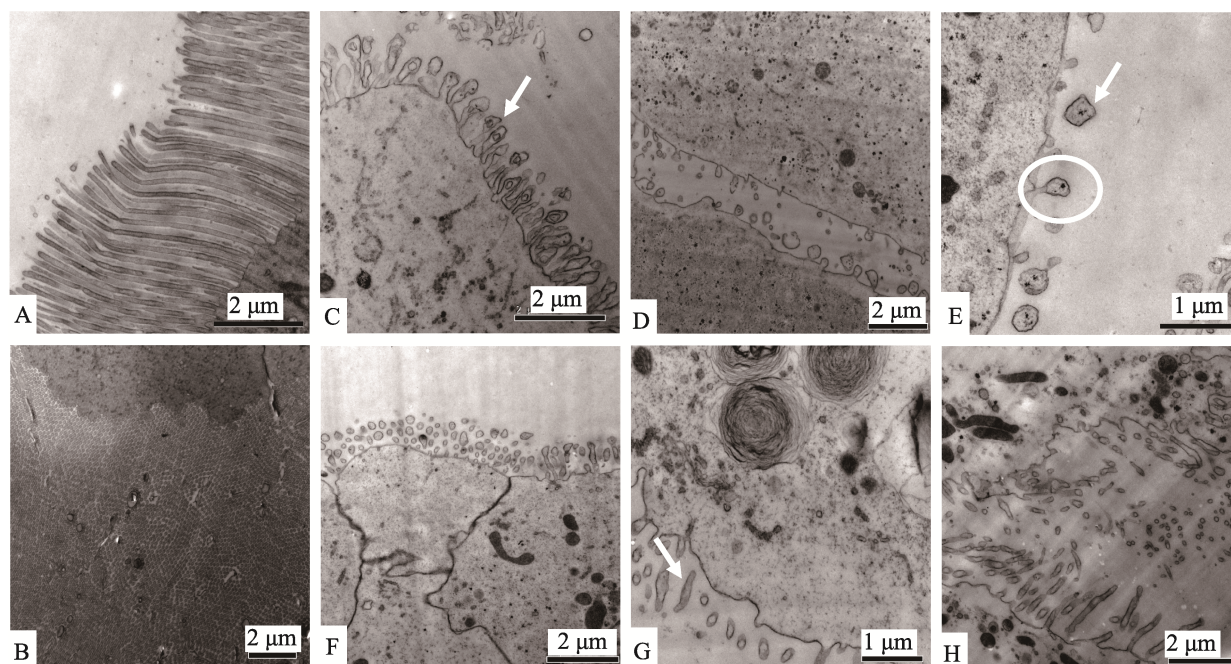


图 1 Bt 菌株对暗黑鳃金龟幼虫中肠微绒毛的病理影响

Fig. 1 The pathological effect of Bt on the microvilli of the midgut in *Holotrichia palallela* grubs

A. 对照(纵切); B. 对照(横切); C. HD8E 处理 1 d; D. HD8E 处理 2 d; E. HD8E 处理 4 d; F. HD8G 处理 1 d; G. HD8G 处理 2 d; H. HD8G 处理 4 d。图中白色箭头所指示为中肠微绒毛病变位置。白色圆形所示为中肠微绒毛脱落。

A. Control (longitudinal section); B. Control (cross section); C. Treated by HD8E for 1 day; D. Treated by HD8E for 2 days; E. Treated by HD8E for 4 days; F. Treated by HD8G for 1 day; G. Treated by HD8G for 2 days; H. Treated by HD8G for 4 days. The white arrows point to the microvilli lesions and the circle is pointing the location where the microvilli fell off.

纤维致密(图 2:A), 纵肌肌纤维致密且大部分肌肉束横截面呈椭圆形(图 2:D)。Bt 处理 4 d 后, 中肠环肌出现大量小孔, 肌纤维变得稀疏, 有的甚至断裂(图 2:C, E); 纵肌肌肉束横截面形状变得不规则, 肌肉束中出现不同程度的孔状结构(图 2:D, F)。说明 Bt 处理可以

引起中肠肌肉的病变, 甚至降解。

2.3 中肠细胞间隙的变化

健康(对照)蛱蝶的中肠两细胞之间空隙很小, 有零星泡状结构分布(图 3:A)。幼虫取食 Bt 4 d 后, 亚致死蛱蝶的中肠细胞间隙出现不同

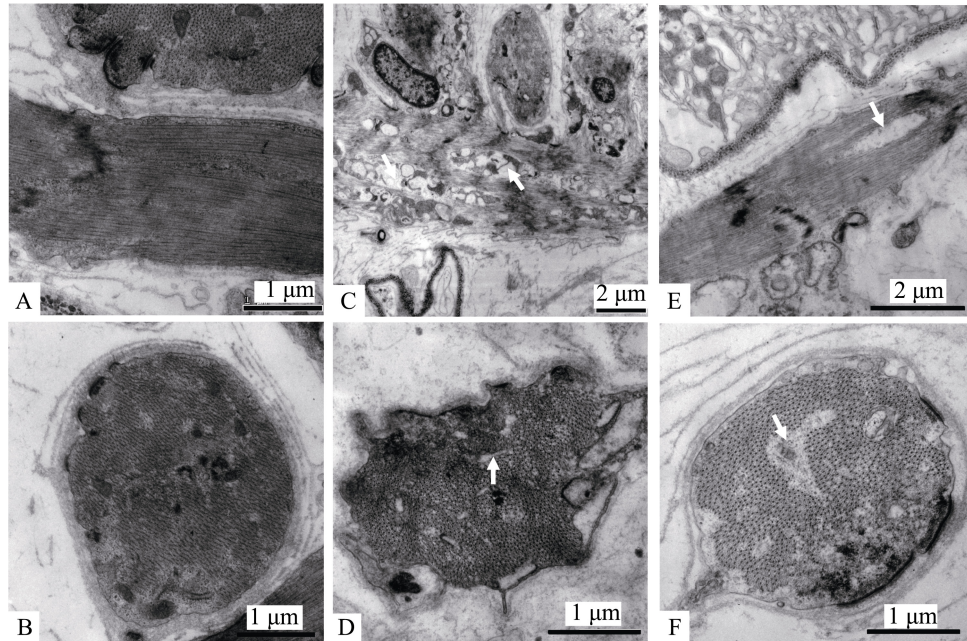


图 2 Bt 菌株对暗黑鳃金龟幼虫中肠肌肉组织的病理影响

Fig. 2 The pathological effect of Bt on the muscle of the midgut in *Holotrichia palallela* grubs

A. 肠环肌对照; B. 肠纵肌对照; C. HD8G 处理 4 d 后的肠环肌; D. HD8G 处理 4 d 后的肠纵肌; E. HD8E 处理 4 d 后的肠环肌; F. HD8E 处理 4 d 后的肠纵肌。图中白色箭头所指示为中肠肌纤维降解造成的孔洞位置。

A. Control of circular muscle; B. Control of longitudinal muscle; C. Circular muscle treated by HD8G for 4 days; D. Longitudinal muscle treated by HD8G for 4 days; E. Circular muscle treated by HD8E for 4 days; F. Longitudinal muscle treated by HD8E for 4 days. The holes resulting from the degradation of the intestinal muscle fibers are showed in white arrows.

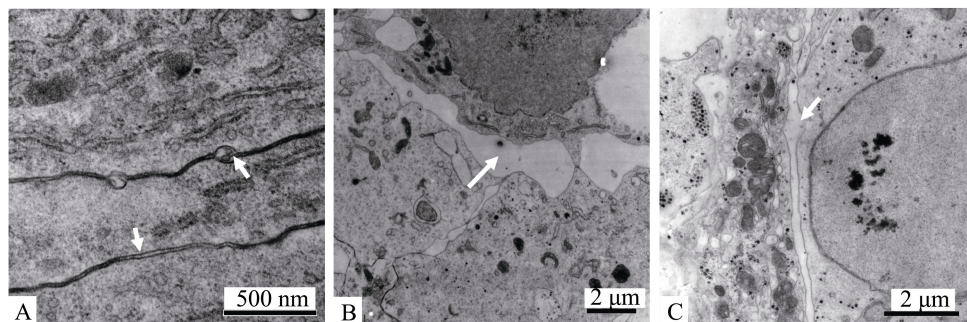


图 3 Bt 处理后暗黑鳃金龟幼虫中肠细胞间隙变化

Fig. 3 The variation of intercellular space in the midgut of *Holotrichia palallela* grubs fed with Bt strains

A. 健康中肠细胞间隙; B. HD8G 处理 4 d 后中肠细胞间隙; C. HD8E 处理 4 d 后中肠细胞间隙。

图中白色箭头所指示为中肠细胞间隙位置。

A. Intercellular space (healthy); B. Intercellular space of midgut cells treated by HD8G for 4 days; C. Intercellular space of midgut cells treated by HD8E for 4 days. The intercellular spaces are labeled with the white arrows.

程度变化。病变轻微的部位其泡状结构增多, 泡状增大 (图 3:B); 病变严重的部位两细胞膜之间出现大段的分离现象 (图 3:C)。

2.4 中肠细胞内质网的病变

正常 (对照) 的细胞内质网狭长, 多, 且排列有序 (图 4:A)。取食 Bt 4 d 之后, 发现细胞内质网数量变少, 有的细胞内质网甚至完全消失。HD8G 处理后蛱蝶中肠细胞内质网变得肿胀, 断裂成一些泡状膜结构, 排列变得杂乱无章 (图 4:B)。而 HD8E 处理的暗黑鳃金龟幼虫中肠细胞内质网出现环化现象 (图 4:C~F)。

2.5 中肠细胞线粒体的病变

在电镜下, 正常线粒体近乎椭圆形, 内脊数量多而排列整齐, 双层膜结构清晰 (图 5:A)。经 Bt 处理后, 两种蛱蝶中肠细胞线粒体病变明显。在两个株系处理中, 以 HD8G 处理暗黑鳃金龟幼虫后病变出现最快, 第一天就出现线粒体双层膜模糊不清和中空现象 (图 5:E)。随后的时间里两种处理的中肠细胞线粒体病变特征基本一致。表现为线粒体的双层膜结构以及内脊模糊不清; 内脊的数量减少, 导致线粒体中空; 线粒体变形, 甚至破裂等病变特征 (图 5:C, D, F, G)。

2.6 抑制取食观察

将正常饲养的和用 Bt 晶孢悬液处理的 1 龄幼虫中肠解剖, 照相, 如图 6。通过比较发现, 健康虫体中肠 (图 6:A) 内部充满食物, 表明虫体取食正常。处理 1 d 后, HD8E 处理的暗黑鳃金龟 (图 6:B) 肠内食物变少, 呈半透明状。HD8G 处理的暗黑鳃金龟中肠内部干净, 几乎透明 (图 6:E)。处理 2 d 和 4 d 后, HD8G 蛋白处理的暗黑鳃金龟中肠内透明无食物 (图 6:F, G)。随处理时间延长, 取食 HD8E 的暗黑鳃金龟幼虫中肠内容物越来越少 (图 6:C, D)。结果表明, Cry 蛋白有抑制蛱蝶取食的作用。

3 结论与讨论

研究认为大部分 Bt 蛋白的靶标部位是昆虫中肠上皮细胞, 昆虫中肠上皮细胞结构被破坏, 以达到毒杀昆虫的目的。张彦等 (2012) 利用电镜观察棉铃虫取食 Vip3Aa 蛋白后中肠组织病理变化; 宋健等 (2008) 利用相差显微镜分别观察了感染 Bt HBF-1 菌株的铜绿丽金龟幼虫中肠和感染 Bt 戈尔斯德亚种的病变棉铃虫幼虫中肠的石蜡切片 (项秀芬等, 1996; 宋健等, 2008)。除直接饲喂昆虫 Bt 蛋白外, 许多学者还研究了

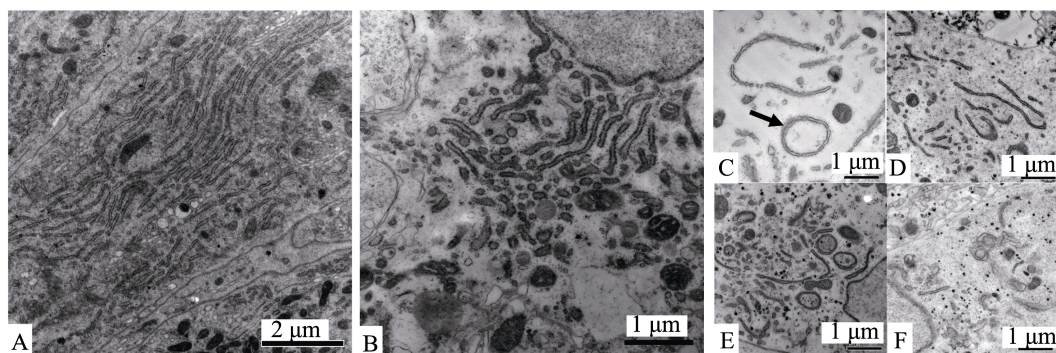


图 4 Bt 处理后暗黑鳃金龟幼虫中肠细胞内质网变化

Fig. 4 The variation of endoplasmic reticulum in the midgut cells of *Holotrichia palallela* grubs fed with Bt strains

A. 健康内质网; B. HD8G 处理 4 d 后内质网; C、D、E、F. HD8E 处理 4 d 后的内质网。

图中黑色箭头所指示为中肠细胞内质网环化。

A. Healthy endoplasmic reticulum; B. Endoplasmic reticulum treated by HD8G for 4 days; C, D, E, F. Endoplasmic reticulum treated by HD8E for 4 days. The black arrow points to cyclization of endoplasmic reticulum in the midgut cells of *H. palallela* grubs.

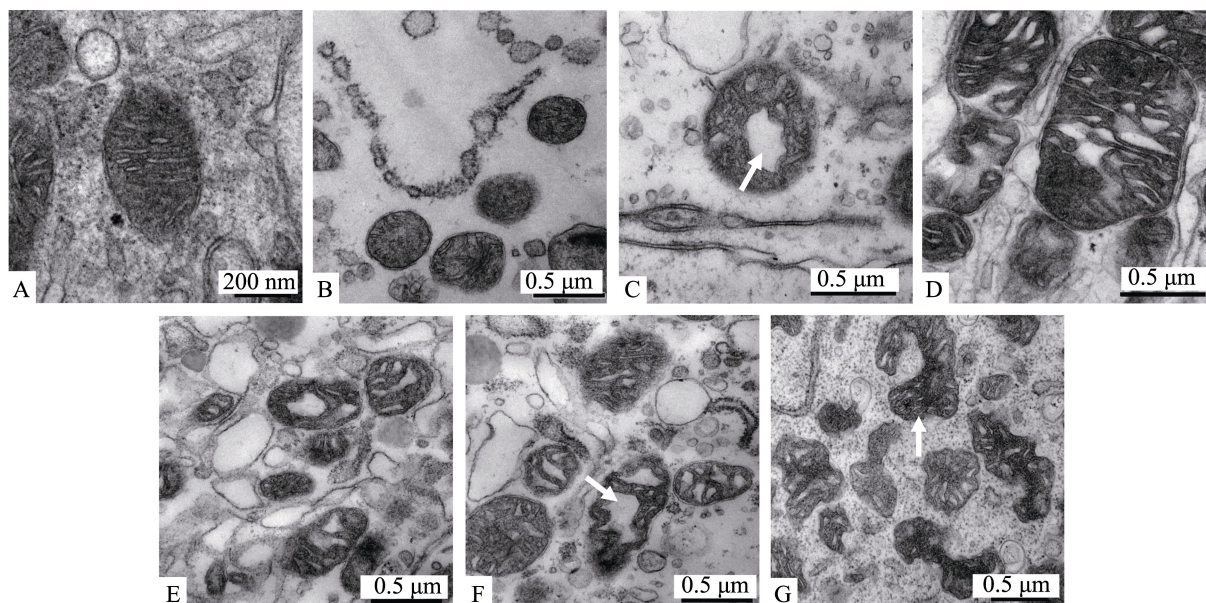


图5 Bt处理后暗黑鳃金龟幼虫中肠细胞线粒体变化

Fig. 5 The variation of mitochondria in the midgut cells of *Holotrichia palallela* grubs fed with Bt strains

A. 对照；B. HD8E 处理 1 d；C. HD8E 处理 2 d；D. HD8E 处理 4 d；E. HD8G 处理 1 d；F. HD8G 处理 2 d；G. HD8G 处理 4 d。图中白色箭头所指示为中肠细胞线粒体变形和内脊变形。

A. Control; B. Treated by HD8E for 1 day; C. Treated by HD8E for 2 days; D. Treated by HD8E for 4 days; E. Treated by HD8G for 1 day; F. Treated by HD8G for 2 days; G. Treated by HD8G for 4 days. The mitochondria and mitochondria ridge in the midgut cells of *H. palallela* grubs are both deformed labeled with white arrows.

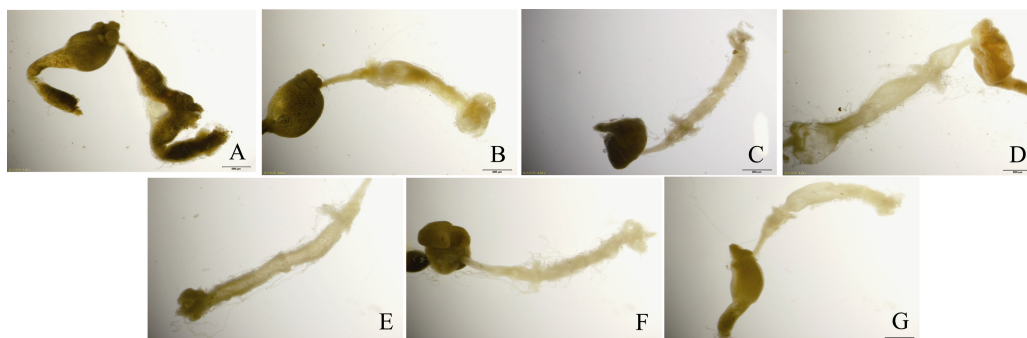


图6 取食 Bt 的蛴螬中肠观察

Fig. 6 Midguts of grubs treated by Bt toxin

A. 健康暗黑鳃金龟幼虫肠道；B、C、D. HD8E 处理暗黑鳃金龟 1、2、4 d 的肠道；E、F、G. HD8G 处理暗黑鳃金龟 1、2、4 d 的肠道。

A. Healthy guts of *H. palallela*; C, D, E. guts of *H. palallela* treated by HD8E for 1 day, 2 day and 4 day, respectively; F, G, H. guts of *H. palallela* treated by HD8G for 1 day, 2 days and 4 days, respectively.

转 Bt 作物对昆虫中肠组织病理的变化（束春娥等，1996；梁革梅等，2001；李芳芳等，2007）。综合众多研究，我们发现，取食 Bt 后昆虫中肠细胞都有以下病变：微绒毛脱落、内质网肿胀断裂、线粒体变形、核膜不清晰、甚至中肠细胞脱

落等（束春娥等，1996；项秀芬等，1996；梁革梅等，2001；Cavados *et al.*, 2004；李芳芳等，2007；宋健等，2008；徐艳聆等，2009；张彦等，2012）。在本研究中，采用 HD8E 和 HD8G 晶孢悬液处理暗黑鳃金龟幼虫后，中肠细胞病变严

重, 表现为: 中肠微绒毛出现肿胀, 内部出现泡状结构, 稀疏, 局部完全消失; 中肠环肌肌纤维由原先的致密变得稀疏, 纵肌横截面变形, 肌纤维内部出现空洞; 中肠细胞间隙增大, 细胞质收缩; 内质网膨胀, 断裂, 数量减少, 其中 HD8E 处理的暗黑鳃金龟幼虫中肠细胞内质网出现环化现象; 线粒体双层膜模糊不清, 内脊模糊, 减少, 整个线粒体变形, 出现空洞。

许多毒素都可以导致昆虫停止取食反应, 昆虫行为上对 Bt 的逃避, 可减少毒素的摄入量, 是一种抗性表现。早先, Gould 和 Anderson (1991) 研究发现, 美洲烟夜蛾 *Heliothis virescens* 能区分出含有 Bt 的食物。一些中国学者也系统地研究了部分鳞翅目昆虫对 Bt 的拒食活性, 研究内容包括选择拒食作用、完全拒食作用等 (杨峰山等, 2004; 负桂玲等, 2004)。本试验中通过解剖取食 Bt HD8E 和 HD8G 毒蛋白后的蛱蝶中肠显示, 蛱蝶取食第一天后, 肠内食物减少或消失, 直至第 4 天后蛱蝶都没有进食。作者认为, Cry8Ea1 和 Cry8Ga1 毒蛋白可以使蛱蝶出现停食反应, 抑制其取食行为。并且, 研究者发现相较于对照, 试虫的活动性明显变弱。另外, 本试验只是一个定性观察, 尚缺少生物统计学数据的分析, 还需进一步开展定量研究。以期探索利用 Bt 特定毒蛋白防治暗黑鳃金龟幼虫的应用技术提供试验依据。

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.
- Cao YZ, Li KB, Yin J, 2005. Brief analysis in progress of occurrence and management underground pests in China. The Ninth Congress of the Chinese Society for the Protection of Plants. Beijing. 389–393. [曹雅忠, 李克斌, 尹姣, 2005. 浅析我国地下害虫的发生与防治现状. 中国植物保护学会第九届会员代表大会. 北京. 389–393.]
- Cavados CF, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo Coutinho CJ, Rabinovitch L, 2004. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera: Simuliidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5): 493–498.
- Feng SL, Wang RY, Fan XH, Hu MJ, 2000. A new isolate HBF-1 of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity for scarabaeid beetles. *Chinese Journal of Biological Control*, 16(2): 74–77. [冯书亮, 王容燕, 范秀华, 胡明峻, 2000. 一株对金龟子类幼虫具有杀虫活性的苏云金杆菌新分离株. 中国生物防治学报, 16(2): 74–77.]
- Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of CryIIAa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*, 394(1): 77–84.
- Frankenhuyzen KV, 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*, crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1): 1–16.
- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293(5531): 857–860.
- Gould F, Anderson A, 1991. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 20(1): 30–38.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2004. Characterization of a CryIAC-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271(15): 3127–3135.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3): 166–171.
- 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. [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 JX, Sun CM, Kang YJ, Ma J, 2007. Control effect of entomopathogenic nematodes to peanuts grubs. *Agrochemicals*, 46(1): 62–63. [李俊秀, 孙春梅, 康宇静, 马骥, 2007. 昆虫病原线虫对花生田蛴螬的防治效果. 农药, 46(1): 62–63.]
- Li XY, Li ZH, Xu WA, 2003. Research advances on the cry genes of *Bacillus thuringiensis*. *Entomological Knowledge*, 40(1): 9–13. [李雪雁, 李照会, 许维岸, 2003. 苏云金芽孢杆菌 cry 基因研究进展. 昆虫知识, 40(1): 9–13.]
- Liang GM, Tan WJ, Gu YY, 2001. Pathological changes in the midgut tissues of cotton bollworm larvae after intaking transgenic Bt cotton. *Acta Gossypii Sinica*, 13(3): 138–141. [梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 2001. 棉铃虫取食转 Bt 基因棉花后中肠组织的病理变化. 棉花学报, 13(3): 138–141.]

- Luo ZX, Li KB, Cao YZ, Yin J, Zhang J, Zhang JT, Shang GQ, 2009. Investigations on soil-inhabiting pests in peanut fields in Henan. *Plant Protection*, 35(2): 104–108. [罗宗秀, 李克斌, 曹雅忠, 尹姣, 张杰, 张静涛, 尚光强, 2009. 河南部分地区花生田地下害虫发生情况调查. 植物保护, 35(2): 104–108.]
- Manju K, George S, Kumar ARV, Manjulakumari D, 2009. Distribution of *Bacillus thuringiensis* berliner strains in the soils of different habitats and their activity against white grubs. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(3): 628–630.
- Rajangopal R, Agrawai N, Seivapandiyan A, Sivakumar S, Ahmad S, Bhatnagar RK, 2003. Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. *Biochemical Journal*, 370(3): 971–978.
- Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH, 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17(4): 547–559.
- Shu CE, Liu XJ, Bai LX, Sun YW, Sun HW, Huang JQ, Ni WC, Zhang ZL, 1996. Toxicological activities of Bt transgenic cotton plants on the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Gossypii Sinica*, 8(4): 219–222. [束春娥, 刘贤金, 柏立新, 孙以文, 孙洪武, 黄骏麒, 倪万潮, 张震林, 1996. Bt 转基因棉花抗棉铃虫毒性机理研究. 棉花学报, 8(4): 219–222.]
- Shu CL, Yan GX, Wang RY, Zhang J, Feng SY, Huang DF, Song FP, 2009a. Characterization of a novel *cry8* gene specific to melolonthidae pests: *Holotrichia obliqua* and *Holotrichia parallela*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4): 701–707.
- Shu CL, Yu H, Wang RY, Fen SL, Su XD, Huang DF, Zhang J, Song FP, 2009b. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. *Current Microbiology*, 58(4): 389–392.
- Song J, Wang RY, Du LX, Cao WP, Zhang HJ, Wang YZ, Feng SL, Zhang J, Song FP, 2008. Symptoms of *Anomala corpulenta* and *A. exoleta* (Coleoptera: Rutelidae) larvae infected by Bt HBF-1 strain and histopathological changes in their midguts. *Acta Entomologica Sinica*, 51(10): 1083–1088. [宋健, 王容燕, 杜立新, 曹伟平, 张海剑, 王金耀, 冯书亮, 张杰, 宋福平, 2008. 铜绿丽金龟和黄褐丽金龟幼虫感染 Bt HBF-1 菌株后的病症及中肠组织病理变化. 昆虫学报, 51(10): 1083–1088.]
- Wang AD, 2008. Grubs occurrence and integrated control technique. *Modern Agricultural Science and Technology*, 6: 101–104. [王爱东, 2008. 农田蛴螬发生及综合防治技术. 现代农业科技, 6: 101–104.]
- Wang RY, Feng SL, Fan XH, Cao WP, 2003. Comparison of the toxicity of *Bacillus thuringiensis* against Scarabaeidae larvae. *Acta Phytophylacica Sinica*, 30(2): 223–224. [王容燕, 冯书亮, 范秀华, 曹伟平, 纪姝晶, 2003. 苏云金杆菌新菌株对金龟子幼虫的毒力比较. 植物保护学报, 30(2): 223–224.]
- Wolfersberger MG, 1984. Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. *American Zoologist*, 24(1): 187–197.
- Xiang XF, Wang SZ, Zhang SF, 1996. Pathological changes in the midgut of larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) infected by Bt HD-1. *Entomological Knowledge*, 33(5): 266–268. [项秀芬, 王深柱, 张书芳, 1996. 棉铃虫幼虫感染苏云金杆菌戈尔斯德亚种(HD-1)后中肠细胞的病理变化. 昆虫知识, 33(5): 266–268.]
- Xu JG, Fan H, Zhang MK, Yang EH, Guo L, 2002. Habits observation and control technology research of *Holotrichia parallela*. *Plant Protection Technology and Extension*, 22(11): 9–10. [徐建国, 范惠, 张明考, 杨恩华, 郭琳, 2002. 暗黑鳃金龟生活习性观察及防治技术研究. 植保技术与推广, 22(11): 9–10.]
- 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 *CryIAb* protein. *Acta Entomologica Sinica*, 52(9): 1034–1038. [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 FS, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Qiu DW, 2004. Anti-feeding activity of *Bacillus thuringiensis* resistant and susceptible population of *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 6(3): 77–80. [杨峰山, 张友军, 张文吉, 吴青君, 徐宝云, 邱德文, 2004. 苏云金杆菌对抗性及敏感小菜蛾的拒食活性. 农药学报, 6(3): 77–80.]
- Yun GL, Deng SD, Zhang QW, Xu HL, Cai QN, 2004. The resistance of Bt corn (MG95) to *Pseudaletia separata*. *Entomological Knowledge*, 41(5): 422–426. [袁桂玲, 邓曙东, 张青文, 徐环李, 蔡青年, 2004. Bt 玉米(MG95)对粘虫的抗性和拒食作用. 昆虫知识, 41(5): 422–426.]
- Zhang Q, Wang Y, Li KB, Yin J, Cao YA, Liu CQ, 2011. Preliminary analysis of the cellular morphological change in the midgut of *Holotrichia parallela* larvae fed with BT. *Plant Protection*, 37(6): 126–129. [张强, 王岩, 李克斌, 尹姣, 曹雅忠, 刘春琴, 2011. 暗黑鳃金龟幼虫取食 Bt 后中肠细胞形态变化的初步研究. 植物保护, 37(6): 126–129.]
- Zhang Y, Liang GM, Zhang LL, Wei JZ, 2012. Pathological changes in midgut tissues of larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) after feeding Vip3Aa protein. *Acta Entomologica Sinica*, 55(7): 869–876. [张彦, 梁革梅, 张丽丽, 魏纪珍, 2012. 棉铃虫幼虫取食 Vip3Aa 蛋白后的中肠组织病理变化. 昆虫学报, 55(7): 869–876.]
- Zhang Y, Zheng GL, Tan JX, Li CY, Cheng LY, 2013. Cloning and characterization of a novel *cry8ab1* gene from *Bacillus thuringiensis* strain b-jjx with specific toxicity to scarabaeid (coleoptera: scarabaeidae) larvae. *Microbiological Research*, 168(8): 512–517.