

## **Insektenresistente transgene Nutzpflanzen in Westeuropa: Status und Perspektiven**

**Joachim Moeser**

Department f. Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Agrarentomologie, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen

### **Einleitung**

Bei Nutzpflanzen, die in Westeuropa angebaut werden, sind zurzeit vor allem Mais und potentiell Kartoffeln und Raps wohl die einzigen Pflanzen, bei denen Insekten-Resistenz über transgene Züchtungsmethoden am ehesten ökonomisch relevant ist. Von dieser Annahme ausgehend soll hier ein Überblick über den heutigen Wissensstand und ein Ausblick auf weitere Möglichkeiten der Biotechnologie gegeben werden. Der Schwerpunkt soll dabei hauptsächlich auf den Wirkungsweisen und Zielgruppen der möglichen Insektenresistenz liegen. Sicherheits-Bewertungen der verschiedenen Alternativen, die z.T. bereits vorhanden sind, sollen hier aus Platzgründen nicht diskutiert werden.

### **Bt-Mais: Hintergründe und Geschichte**

In Europa ist momentan nur ein geringer Zuwachs zu verzeichnen beim Anbau von insektenresistenten transgenen Nutzpflanzen. Die einzige Pflanze, die bisher in nennenswertem Umfang angebaut wurde, ist Bt-Mais. Bei diesem Bt-Mais handelt es sich um zwei Events (Bt 176 und MON 810), die in verschiedenen Sorten in verschiedenen Ländern auf dem Markt verfügbar sind. Der Event Bt 11 ist als Lebens- und Futtermittel für den Import und die Nutzung zugelassen. Diese drei Events exprimieren alle ein Lepidopteren spezifisches Cry-Toxin (Cry1Ab). Diese kristallinen (=Cry) Toxine werden von *Bacillus thuringiensis* (Bt) in der Übergangsphase vom vegetativen Stadium zum Sporen-Stadium gebildet (Sharma et al. 2000). Alle in diesem Fall verwendeten Bt-Toxine stammen von *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, da dieser Stamm eine deutliche höhere Toxizität als andere Isolate aufwies. Von der ersten Transformation und Klonierung des Bt-Toxin in *Escherichia coli* Anfang der 80er Jahre (Schnepf and Whitley 1981) hat es bis Mitte der 90er Jahre gedauert, bis erstmals ein marktfähiges transgenes Produkt in den USA angebaut werden konnte. Ein großflächiger Anbau mit stetig ansteigendem Flächenanteil konnte dann ab 1996 in den USA beobachtet werden

(McLaren, 1998).

Anfänglich wurden die Toxin-Gene in fünf Klassen eingeteilt basierend auf ihrer Insektenspezifität und Sequenzhomologien (Hoftey und Whiteley 1989): Typ I Cry-Gene sind lepidopterenspezifisch und kodieren ein 130kDa Protein, Typ II Cry-Gene sind lepidopteren- und dipteren-spezifisch und kodieren ein 70 kDa Protein, Typ III Cry-Gene sind spezifisch für Coleopteren und kodieren ebenfalls für ein 70 kDa Protein, Typ IV Cry-Gene sind spezifisch für Dipteren und Typ V Cry-Gene kodieren Proteine, die spezifisch für Lepidopteren und Coleopteren sind (Tailor et al. 1992).

Inzwischen ist klar, dass die Bt- $\delta$ -Endotoxine eine Familie von mindestens 140 bisher beschriebenen Genen sind, mit unterschiedlichen Spezifitäten für Lepidopteren, Dipteren und Coleopteren (Crickmore et al. 1998).

### **Wirkungsmechanismus**

Die inaktiven kristallinen Proteine (= Protoxine) lösen sich bei hohem pH Wert im Darm durch Darm-Proteasen, wobei die so genannten  $\delta$ -Endotoxine entstehen. Das Toxin stammt aus dem N-terminalen Teil des Protoxins, während der C-terminale Teil normalerweise hydrolysiert wird (Choma et al. 1990). Das aktivierte Toxin bindet an spezifische Rezeptoren der brush border membrane vesicles (BBMV) des Mitteldarm-Epithels. Dort führt das Einbinden des Toxins in die Membran zu Läsionen. Es gibt einen positiven Zusammenhang zwischen Toxinaktivität und Bindungsfähigkeit an BBMVs (Gill et al. 1992). Die Toxizität ist eher positiv mit der Anzahl der Rezeptoren als mit der Rezeptor-Affinität korreliert (Van Rie et al. 1989). Die Toxizität ist in der Organisation der  $\alpha$ - Helices der Domäne I begründet. Nach der Bindung an die Epithelzellen des Mitteldarms können die  $\alpha$ -Helices die apikale Membran durchdringen und Ionen Kanäle aufbauen. Diese sind entweder selektiv durchlässig für  $K^+$ , oder unselektiv durchlässig für andere Kationen bzw. Anionen, abhängig z.B. vom pH-Wert (Schwartz et al. 1993). Bei Anwesenheit von Cry1Ac im Darm kommt es deshalb zu einer Änderung der Permeabilität der Membran (Carroll und Ellar 1993). Es wurde auch beobachtet, dass es durch den Ausfall der  $K^+$ -Pumpe zu einem Anschwellen der Darmzellen kommt mit entsprechender osmotischer Lysis (Knowels und Dow 1993).

### **Neue Bt-Sorten in Deutschland**

In Deutschland sind bisher 5 Sorten zugelassen, die alle auf dem Event MON 810 beruhen. Diese sind mit dem Ziel entwickelt worden, gegenüber dem Maiszünsler *Ostrinia nubilalis* Hübner resistent zu sein. Durch die Einschleppung des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, Coleoptera, Chrysomelidae) nach Europa Anfang der 90er Jahre treten jedoch nun mit MON 863 und MON 88017 zwei weitere Maisevents in Europa in Erscheinung, die in Zukunft weit wichtiger sein könnten, als die gegen den Maiszünsler entwickelten Maissorten. Der Maisevent MON 863 ist bereits zur Einfuhr als Lebens- und Futtermittel zugelassen (produziert in den USA als Yieldgard rootworm® der Firma Monsanto) und eine Genehmigung für den Anbau ist geplant. In Deutschland wird deshalb z. Zt. ein Projekt des BMBF

(Bundesministeriums für Bildung und Forschung) zur Sicherheitsforschung durchgeführt. Dieses untersucht den Event MON 88017, der dasselbe Cry3Bb Toxin zur Abwehr des Maiswurzelbohrers produziert wie MON 863, aber keinen Antibiotika-Marker zur Selektion besitzt, sondern einen Glyphosatresistenz-Marker. Das transferierte Gen ist eine synthetische Variante des Wildtypgens Cry3Bb1 von *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis* mit 8-fach höherer insektizider Aktivität als das Wildtyp-Gen. Dieses wurde Codon-optimiert zur Expression in einer monokotylen Pflanze und soll unter Kontrolle des 4AS1-Promotors vor allem in der Wurzel exprimiert werden (Vaughn et al. 2005). Zurzeit ist in den USA ein weiterer Maiswurzelbohrer resistenter Mais in der Zulassung: Herculex rootworm® der Firma Dow Agrosience/ Pioneer. Dieser Mais exprimiert das binäre Toxin Cry 34/Cry35, die beide zusammen eine höhere Toxizität als ein einzelnes dieser Cry-Toxine erreichen. Eine Zulassung für Europa wird innerhalb der nächsten zwei Jahre erwartet.

Zurzeit werden auch Hybride entwickelt, die sowohl gegen den Maiszünsler, als auch gegen den Maiswurzelbohrer resistent sind (sog. stacking). In Zukunft werden auch Hybriden erwartet, die noch eine dritte transgene Eigenschaften aufweisen: neben der Resistenz gegen die o.g. Insekten soll noch eine Herbizidresistenz gewährleistet sein.

### **Resistenzenwicklung der Zielorganismen**

Bei allen Überlegungen zum Einsatz von transgenen Nutzpflanzen ist eine mögliche Resistenzentwicklung der Schadinsekten immer ein wesentlicher Bestandteil der Forschung gewesen. Als besonders problematisch wurde die Möglichkeit beurteilt, dass sich die Zielorganismen schnell an die exprimierten Toxine anpassen und so auch die Bt-Präparate nutzlos machen würden, die als formulierte Insektizide (z.B. im Biolandbau) ausgebracht werden.

Es existieren viele Hypothesen, wie diese Resistenzen entstehen könnten: durch Verlust der Darm Proteasen, die zur Aktivierung des Protoxins nötig sind (Ferre und Van Rie 2002), höhere proteolytische Aktivität, die zur Degradation des Toxins im Darm führt oder eine Reduktion der Bindungs-Affinität an der Membran der Darmepithelzellen (Avisar et al. 2004). Bis heute sind keine Feldpopulationen von resistenten Insekten in transgenen Nutzpflanzenbeständen gefunden worden. Dies mag auf die heute übliche Vorsichtsmaßnahme des Refugialflächen-Einsatzes zurückzuführen sein. Auf diesen Refugialflächen, die aus nicht-transgenen Pflanzen bestehen, sollen sich genug Schädlinge entwickeln, um eventuell auftretende Resistenz-Allele von Individuen aus dem transgenen Feld durch die anschließende sexuelle Rekombination auszudünnen und dadurch homozygot resistente F1 Individuen nicht entstehen zu lassen.

Es wurden bis heute drei verschiedene Arten mit insgesamt sieben verschiedenen Stämmen der Schädlinge *Plutella xylostella* L., *Pectinophora gossypiella* Saunders und *Helicoverpa armigera* Hübner im Labor erzeugt, die sich auf Bt-Pflanzen entwickeln können (Tabashnik et al. 2003). Viele andere Laborstämme konnten sich trotz 70- bis 10.000-facher Resistenz gegen Bt-Toxine in künstlichen Diäten nicht an Bt-Pflanzen

entwickeln. Dies macht die Komplexität des Themas Resistenzmanagement bei transgenen Pflanzen deutlich. Ein intensives Monitoring der Populationen im Feld hat keinen Anstieg der Häufigkeit der Resistenz-Allele gezeigt. Grundannahmen für eine Refugialstrategie und gleichzeitig Hauptgründe, warum bis heute keine resistenten Populationen im Feld gefunden worden sind, bestehen in einer von vornherein niedrigen Allel-Frequenz, in einem rezessiven Vererbungsgang und Fitness Kosten bei resistenten Individuen gegenüber nicht resistenten Individuen auf nicht-Bt-Pflanzen (Tabashnik et al 2003).

### **Weitere Möglichkeiten insektenresistenter transgener Pflanzen**

Neben der Transformation mit „traditionellen“ Bt-Genen sind im Laufe der letzten 15 Jahre viele andere Möglichkeiten untersucht worden, insektenresistente Pflanzen herzustellen. Im Folgenden soll auf einige näher eingegangen werden, um eine Zukunftsperspektive für transgene Pflanzen darzustellen:

#### **Domänen Tausch in Cry-Genen**

Die meisten aktivierten Cry-Toxine haben eine allen gemeinsame Struktur aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne I wird Bestandteil der Zellmembranen der Darm Epithelzellen und bewirkt die Porenbildung, Domäne II ist für die Rezeptor-Bindung und damit für die Spezifität verantwortlich und die C-terminale Domäne III ist ebenfalls an der spezifischen Bindung an Rezeptoren beteiligt. Hybrid Cry-Toxine können durch einen Austausch dieser Domänen eine weitaus höhere Toxizität erreichen, wie z.B. bei der Fusion von Domäne III von Cry 1Ac und den Domänen I und II anderer Cry1 Proteine (Karlova et al. 2005). Auch polyphage Insekten wie *Spodoptera litura*, die sonst Resistenzen gegen Cry1 Toxine aufweisen, konnten bei transgenem Tabak und transgener Baumwolle mit ausgetauschten Domänen erfolgreich bekämpft werden (Singh et al. 2004). Dadurch, dass diese Hybrid Toxine wahrscheinlich an anderen Rezeptoren als die Ausgangs-Toxine binden, bieten sich hier neue Möglichkeiten besonders für das Resistenzmanagement.

#### **Proteinase-Inhibitoren**

Den Proteinstoffwechsel der Insekten zu unterbinden ist das Grundprinzip von Proteinase-Inhibitoren (PI). Man hoffte, dass man durch die Expression in transgenen Pflanzen einen völlig neuen Wirkmechanismus als die Bt-Toxine einsetzen können (Gatehouse 1995). Bis heute liegt die Effektivität dieser transgenen Pflanzen allerdings weit unter dem für die Praxis notwendigen Niveau (Christou et al. 2006). Dies ist wohl vor allem auf die hohen genetischen Diversität der Proteasen bei gleichzeitiger hoher Spezifität der Proteinase Inhibitoren zurück zu führen. Selbst die Kombination zweier PIs, wie des Potato PI-II und des Carboxypeptidase (PCI)-Inhibitors ist nicht ausreichend, diese Anpassungsfähigkeit der Darmproteasen zu überwinden (Abdeen et al. 2005). Die Zukunft der Proteinase-Inhibitoren kann also nur in einer Kombination mit anderen Genen liegen, wie z.B. Equistatin aus der Seeanemone oder Pflanzen-Lectinen.

### **Alpha-Amylase-Inhibitoren**

Der Einsatz von  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren richtet sich auf eine Unterbrechung des Stärkestoffwechsels der Insekten, da  $\alpha$ -Amylasen für die Hydrolysierung der  $\alpha$ -(1,4) glykosidischen Bindung aller Stärken und verwandter Stoffe verantwortlich sind. So war es bereits möglich, solche Inhibitoren aus Bohnen und Weizen zu klonieren, zu charakterisieren und in *Arabidopsis* zu exprimieren (Titarenko und Chrispeels 2000). Da diese Inhibitoren vermehrt in den Wurzeln ausgebildet wurden, könnte ein transgener Mais mit  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren durchaus eine Möglichkeit sein, Wurzelherbivore wie z.B. den Maiswurzelbohrer zu bekämpfen. Beim Maiswurzelbohrer konnte eine Reduktion der  $\alpha$ -Amylase-Tätigkeit durch transgene  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren bereits nachgewiesen werden (Titarenko und Chrispeels 2000). Hier besteht in Zukunft noch großer Forschungsbedarf.

### **Pflanzen-Lectine**

Bei Pflanzen-Lectinen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Zucker-bindenden Proteinen, die eine Schutzfunktion gegen Herbivore haben. Sie haben negative Effekte auf die Entwicklung und die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Insekten aus verschiedenen Ordnungen (Shuckle und Murdock 1983, Czaplá und Lang 1990, Habibi et al. 1992, Powell et al. 1993, Powell et al. 1995). Ein transgener Mais mit wheat germ agglutinin (WGA) hatte zwar einen moderaten Effekt auf *O. nubilalis* und *Diabrotica* sp. (Maddock et al. 1991), jedoch ist bei WGA und beim Phaetohaemoglutinin (PHA) eine starke Säugetier-Toxizität festgestellt worden.

Besonders gegen Hemipteren sind Lectine aber erfolgreich in transgenen Pflanzen eingesetzt worden. So hatte eine Expression des Schneeglöckchen-Lectins (GNA) in Kartoffeln einen deutlich geringeren Befall mit *Myzus persicae* zur Folge (Gatehouse et al. 1996).

### **Fusionsproteine**

Eine weitere Eigenschaft des GNA ist seine Möglichkeit, als Carrier für andere Toxine zu fungieren. So war es möglich, zusammen mit diesen Carrier sowohl Allatostatin (GNA-allatostatin), als auch ein Spinnen Neurotoxin (GNA-SF11) als Fusionsproteine in *Pichia pastoris* zu exprimieren. Diese Fusionsproteine hatten eine insektizide Wirkung auf Lepidopteren-Larven von *Lacanobia oleracea*, während die Einzelkomponenten keine Wirkung zeigten (Fitches et al. 2002, 2004). Die Wirkung wird darauf zurückgeführt, dass GNA die aktiven Substanzen direkt in die Haemolymphe der Insekten transportieren kann. Auch ein Bt-Fusions Protein hatte eine deutlich höhere Toxizität und konnte ein größeres Schädlingsspektrum abdecken als nicht fusionierte Bt-Toxine (Mehlo et al. 2005). Durch die Fusion scheint es also zu einer Erhöhung der möglichen Rezeptor-Erkennungsstellen zu kommen, was sowohl die Spezifität reduziert, als auch die Toxizität erhöht.

### Unkonventionelle Quellen für insektizide Substanzen

*Photorhabdus* und *Xenorhabdus* spp. sind bakterielle Endosymbionten von entomopathogenen Nematoden und bilden Toxine, die einen sehr breiten Wirkkreis haben, also nicht spezifisch wie die Bt-Toxine wirken (Chattopadhyay et al. 2005). Diese Toxine sind nicht akut toxisch, sondern verursachen eine Sepsis im Darmlumen, was zum Tod des Insekts führt. Es konnten bereits mehrere Gene dieser beiden Bakteriengattungen identifiziert werden, die alle große Toxine mit wenigen Homologien zu anderen bekannten Toxinen kodieren (Williamson und Kaya 2003). Die Expression von Toxin A Gen von *Photorhabdus luminescens* in *Arabidopsis* hatte starke insektizide Wirkung auf einen Lepidopteren und moderate Wirkung auf einen Coleopteren (Liu et al. 2003).

Aus *B. thuringiensis* wurden neben den Cry-Toxinen aus der reproduktiven Phase auch Toxine der vegetativen Phase identifiziert (Vip= vegetative insecticidal proteins). Diese erwiesen sich als toxisch für *Agrotis* sp. und *Spodoptera* sp. (Estruch et al. 1996). Auch aus *Bacillus cereus* Kulturen konnten solche Vips mit insektizider Wirkung isoliert werden (Estruch et al. 1997). Diese Proteine haben ein weiteres Wirtsspektrum und nur wenig Sequenz-Homologien mit den Cry-Proteinen (Yu et al. 1997, de Maagd et al. 2003). Der Wirkungsmechanismus ist vergleichbar mit den Cry-Toxinen (Lysis der Darmepithelzellen). Eine Markteinführung von transgener Baumwolle mit einem solchen Vip-Gen wird für die USA 2006 erwartet.

Auch bei Insekten konnte man bereits Gene charakterisieren, die insektizide Proteine kodieren. In transgenem Tabak wurde z.B. ein Protein exprimiert, was ursprünglich aus den Teratocyten eines endoparasitoiden Hymenopteren stammt. Dieser Parasitoid (*Microplitis croceipes*) wird sonst zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Der transgene Tabak wies eine erhöhte Resistenz gegenüber Lepidopteren-Schadinsekten auf (Maiti et al. 2003).

### Endogene Abwehr der Pflanzen

Das Verständnis der Interaktionen zwischen Pflanzen und Herbivoren auf molekularer Ebene steht noch am Anfang. Es ist klar, dass bei Herbivoren-Befall die Wirtspflanzen auf mehreren Wegen versucht, eine Resistenz aufzubauen. Die genauen molekularen Mechanismen beginnt man gerade erst zu verstehen (Baldwin et al. 2001). Durch den Einsatz von Microarrays konnte z.B. gezeigt werden, dass *Arabidopsis* bei Herbivoren-Befall einen Unterschied von mehr als 700 mRNAs auf Transkriptom-Ebene aufwies im Vergleich zum Nicht-Befall. Hermsmeiser et al. (2001) schätzen ungefähr 500mRNAs als Antwort von Tabak auf Herbivoren-Befall. Hier konnte gezeigt werden, dass generell die Gene hochreguliert werden, die mit Abwehr-Maßnahmen in Verbindung gebracht werden können, während Gene, die für das Pflanzenwachstum verantwortlich sind, bei Herbivoren-Befall runterreguliert werden (Hui et al. 2003). Die genaue Funktion vieler dieser Gene ist aber weiterhin nicht klar. Es scheint jedoch zu einer simultanen

Aktivierung des Salicylsäure- (SA), Ethylen-, Cytokinin- und Jasmonsäure- (JA) Stoffwechsels zu kommen. Ähnliche Ko-Aktivierungen konnten auch für *Arabidopsis* gezeigt werden (Chen et al. 2002), was auf Netzwerke von Stoffwechsel- und Signalkaskaden hindeutet. Diese Signalkaskaden bieten neue Möglichkeiten insektenresistente transgene Pflanzen zu erzeugen, da einzelne Substanzen wie JA nicht nur ein Signal, sondern viele vernetzte Signale erzeugen (Rojo et al. 2003). Bei Mutanten von *Arabidopsis*, bei denen drei verschiedene Signalkaskaden nicht mehr ausgeführt wurden, konnten deutliche Auswirkungen auf den Glukosinolat-Gehalt (GS) gezeigt werden. Bei geblockten JA reduzierte sich der GS, während er bei geblockten SA erhöht war (Mewis et al. 2005). Erhöhte GS hatten deutlich negative Auswirkungen auf herbivore Insekten. Bislang ist aber ein Nachbauen dieser natürlichen Signalkaskaden an dem fehlenden Wissen über die koordinierte Regulation von multiplen Gen-Systemen gescheitert (Dixon 2005).

### Zusammenfassung

Von allen hier vorgestellten Möglichkeiten transgener insektenresistenter Nutzpflanzen haben bis heute nur Bt-Pflanzen die nötige Effektivität in der Schädlingsabwehr erbracht. Die Vielfalt der Alternativen und die rege Forschungstätigkeit zeigen, dass die Forschung viele neue Ansätze bietet, um in Zukunft außer Bt noch andere Alternativen zur konventionellen Züchtung anbieten zu können. Die Markteinführung von transgenen Vip-Pflanzen in den USA (s.o.) zeigt, dass das Potential insektenresistenter transgener Nutzpflanzen noch lange nicht ausgeschöpft ist.

### Literatur

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S., 2005: Multiple insect resistance in transgenic tomato plants overexpressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57, 189-202.
- Avisar, D., Keller, M., Gazit, E., Prudovsky, E., Sneh, B., Zilberstein, A., 2004: The role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E separate structural domains in the interaction with *Spodoptera littoralis* gut epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 15779-15786.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Kessler, A., Schittko, U., 2001: Merging molecular and ecological approaches in plant insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 351-358.
- Caroll, J., Ellar, D.J., 1993: Proteolytic processing of coleopteran specific  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *European Journal of Biochemistry* 214, 771-778.
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., Bhatnagar, R. 2005: Bacterial insecticidal toxins. *Critical Review in Microbiology* 30, 33-54.

- Chen, W.Q., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G.Z., Whitham, S.A., 2002: Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14, 559-574.
- Choma, C.T., Surewitz, W.K., Carey, P.R., Pozsgay, M. Raynor, T., 1990: Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*: structural implications. *European Journal of Biochemistry* 189, 523-527.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., 2006: Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11, 302-308.
- Crickmore, N., Ziegler, D.R., Fietelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Dean, D.H., 1998: Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62, 807-813.
- Czapla, T.H., Lang, B.A., 1990: Effects of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Economic Entomology* 83, 2480-2485.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E., 2003: Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review in Genetics* 37, 409-433.
- Dixon, R.A., 2005: Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 329-336.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996: Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Ntl Acad Sci USA* 93, 5389-5394.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., 1997: Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15, 137-141.
- Ferre, J., Van Rie, J., 2002: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47, 501-533.
- Fitches, E. Audsley, N., Gathouse, J.A., Edwards, J.P., 2002: Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectins delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1653-1661.
- Fitches, E., Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A.M.R., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2004: Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology* 50, 61-71.

- Gatehouse, A.M.R., Down, R.E., Powell, K.S., Sauvion, N., Bahbe, Y., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Gatehouse, J.A., 1996: Transgenic potato plants with resistance to the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79, 295-307.
- Gatehouse, L.N., 1995: Novel genes for insect resistance in transgenic plants. PhD Thesis Durham University, UK
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, F.V., 1992: The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37, 615-636.
- Habibi, J., Backus, E.A., Czaplá, T.H., 1992: Effect of plant lectins on survival of potato leaf hopper. *Proceedings XIX International Conference of Entomology*, Beijing, China, pp. 373.
- Hermesmeier, D., Schittko, U., Baldwin, I.T., 2001: Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* 125, 683-700.
- Hoftey, H., Whiteley, H.R., 1989: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review* 53, 242-255
- Hui, D.Q., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H.P., Baldwin, I.T., 2003: Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterisation of large scale changes in herbivore induced mRNAs. *Plant Physiology* 131, 1877-1893.
- Karlova, R., Weemen-Hendriks, M., Naimov, S., Ceron, J., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A., 2005: *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. *Journal of Invertebrate Pathology* 88, 169-172.
- Knowles, B.H., Dow, J.A.T., 1993: The crystal endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanisms of action on the insect gut. *Bioassays* 15, 469.
- Liu, D., Burton, S., Glancy, T., Li, Z.-S., Hampton, R., Meade, T., Merlo, D.J. 2003: Insect resistance conferred by a 283 kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* 21, 1222-1228.
- Maddock, S.E., Huffman, G., Isenhour, D.J., Roth, B.A., Raikhel, N.V., Howard, J.A., Czaplá, T.H., 1991: Expression in maize plants of wheat germ agglutinin, a novel source of insect resistance. 3rd International Congress of Plant Molecular Biology, Tucson, Arizona, USA
- Maiti, I.B., Dey, N., Pattanaik, S., Dahlman, D.L., Rana, R.L., Webb, B.A., 2003: Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSPI4) gene from a hymenopteran endoparasitoid (*Microplitis croceipes*). *Plant Biotechnology Journal* 1, 209-219.
- McLaren, J.S., 1998: The success of transgenic crops in the USA. *Pesticide Outlook* 9, 36-41.

- Mewis, I., Appel, H.M., Hom, A., Raina, R., Schultz, J.C., 2005: Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem feeding and chewing insects. *Plant Physiology* 138, 1149-1162.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. Gatehouse, J.A., 1993: Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66, 119-126.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. Gatehouse, J.A., 1995: Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 51-59.
- Rojo, E., Solano, R., Sanchez-Serrano, J.J., 2003: Interactions between signalling compounds involved in plant defense. *J Plant Growth Regulation* 22, 82-98.
- Schnepf, H.E., Whitley, H.R., 1981: Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Ntl Acad Sci USA* 78, 2893-2897.
- Schwartz, J.L., Garneau, L. Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., Rousseau, E., 1993: Lepidopteran specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation and anion-selective channels in planar lipid bilayer. *J Membrane Biology* 132, 53-62.
- Shukle, R.H., Murdock, L.L., 1983: Lipxygenase, trypsin inhibitor and lection from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology* 12, 787-791.
- Sharma, H.C., Sharma, K.K., Seetharama, N.n Ortiz, R., 2000: Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *J Biotechnology*, 3, 76-95.
- Singh, P.K., Kumar, M., Chaturvedi, C.P., Yadav, D., Tuli, R., 2004: Development of hybrid delta endotoxins and its expression in tobacco and cotton for control of polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Transgenic Research* 13, 397-410.
- Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L., Ely, S., 1992: Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis*-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Molecular Microbiology* 7, 1211-1217.
- Tabashnik, B.E., Carriere, Y., Dehenny, T.J., Morin, S., Sisterton, M.S., Roush, R.T., Shelton, A.M., Zhao, J.-Z., 2003: Insect resistance to transgenic Bt-crops: lessons learned from the laboratory and the field. *Journal of Economic Entomology* 96, 1031-1038.
- Titarenko, E., Chrispeels, M.J., 2000: cDNA cloning, biochemical characterisation and inhibition by plant inhibitors of the  $\alpha$ -amylases of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem Mol Biology* 30, 979-990.

- Van Rie, J., Jansens, S., Hoftey, H., Degheele, D., van Mellaert, H., 1989: Specificity of *Bacillus thuringiensis*- endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid gut of target insects. *European Journal of Biochemistry* 186, 239-247.
- Vaughn, T., Cavato, T., Brar, G., Combe, T., DeGooyer, T., Ford, S., Groth, M., Howe, A., Johnson, S., Kolacz, K., Pilcher, C., Purcell, J., Roman, C., English, L., Pershing, J., 2005: A method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. *Crop Science* 45, 931-938.
- Williamson, V.M., Kaya, H.K., 2003: Sequence of a symbiont. *Nature Biotechnology* 21, 1294-1295.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G., Estruch, J.J., 1997: The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl Environ Microbiology* 63, 532-536.