

2015—2021年亚洲玉米螟对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性监测



王月琴^{1*} 静大鹏² 刘凯强¹ 王振营¹ 何康来¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; 2. 先正达集团中国, 北京 102206)

摘要: 为明确亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 田间种群对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性, 于2015—2021年连续7年从黄淮海夏玉米区和北方春玉米区7省14地采集亚洲玉米螟田间种群, 采用人工饲料混合法评价其对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性。结果表明, Cry1Ie杀虫蛋白对54个亚洲玉米螟田间种群的抑制中浓度LC₅₀介于0.65~6.28 μg/g之间, 其中对2016年齐齐哈尔种群的LC₅₀最低, 对2017年肇东种群的LC₅₀最高; LC₉₅介于4.99~70.29 μg/g之间, 其中对2015年合肥种群的LC₉₅最低, 对2017年松原种群的LC₉₅最高。在LC₅₀水平上, 相较于室内对照种群, 最敏感种群和最不敏感种群分别为2018年铁岭种群和2017年肇东种群, 抗性倍数分别为0.26和1.17。虽然各地理种群对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性存在差异, 但均处于敏感水平, 且是自然选择的结果, 表明Cry1Ie杀虫蛋白可用于亚洲玉米螟田间种群的防治。

关键词: 亚洲玉米螟; Cry1Ie杀虫蛋白; 地理种群; LC₅₀; 抗性监测; 敏感性

Susceptibility monitoring to Cry1Ie in Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* from 2015 to 2021

Wang Yueqin^{1*} Jing Dapeng² Liu Kaiqiang¹ Wang Zhenying¹ He Kanglai¹

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Syngenta Group China, Beijing 102206, China)

Abstract: To determine the susceptibility of Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* field populations to Cry1Ie, specimens were collected from 14 regions of seven provinces in the north spring corn region and Huang-Huai-Hai summer corn region from 2015 to 2021. Diet-incorporation bioassays were conducted to evaluate the susceptibility of these geographic field populations to Cry1Ie. The LC₅₀ values across 54 field populations ranged from 0.65 to 6.28 μg/g, with the lowest LC₅₀ recorded in Qiqihar population in 2016 and the highest in the Zhaodong population in 2017. Similarly, the LC₉₅ values ranged from 4.99 to 70.29 μg/g, with the lowest LC₉₅ observed in Hefei population in 2015 and the highest in the Songyuan population in 2017. Compared to the laboratory population, the Tieling population (2018) exhibited the most susceptibility, while the Zhaodong population (2017) displayed the highest tolerance, with resistance ratios of 0.26 and 1.17 at the LC₅₀ level, respectively. Although field populations showed different levels of susceptibility, they remained susceptible to Cry1Ie, reflecting natural variation. Therefore, Cry1Ie has the potential for the control of the *O. furnacalis*.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; Cry1Ie toxin; field population; lethal concentration 50; resistance monitoring; susceptibility

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-02)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wangyueqin@caas.cn

收稿日期: 2023-03-27

玉米的高产与稳产关系着世界粮食安全与经济发展,而虫害是制约玉米生产的最大因素。基于苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 杀虫蛋白研发的转基因抗虫玉米为玉米害虫的绿色防控做出了重要贡献,已在全世界范围内推广种植。然而,靶标害虫长期处于转 Bt 基因抗虫作物的选择压力下,敏感个体被逐渐淘汰,抗性个体不断富集、繁衍,最终导致田间抗性种群的产生。截至目前,已有 19 例报道证实靶标害虫对转基因抗虫玉米和转基因抗虫棉花产生了实质抗性,如玉米干夜蛾 *Busseola fusca* 对转 *cry1Ab* 玉米 (Strydom et al., 2019)、小蔗螟 *Diatraea saccharalis* 对转 *cry1A.105* 和转 *cry1F* 玉米 (Grimi et al., 2018)、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 对转 *cry1Ab* 和转 *cry1F* 玉米 (Omoto et al., 2016; Vassallo et al., 2019)、玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera* 对转 *cry3Bb* 玉米 (Shrestha & Gassmann, 2019) 等均产生了实质抗性。为了延缓靶标害虫抗性的发展,实现转基因抗虫作物长期、安全的种植,急需制订抗性治理策略。开展靶标害虫田间种群对 Bt 杀虫蛋白的抗性监测是抗性治理策略的重要组成部分,是掌握靶标害虫对 Bt 杀虫蛋白抗性发展动态的重要手段;当发现害虫对 Bt 杀虫蛋白的敏感性下降时应及时采取措施阻止抗性个体扩散,继而达到延缓抗性发展的目的 (Siegfried et al., 2005; Álvarez-Alfageme et al., 2022)。抗性监测也是未来预测抗性演化规律、评价抗性治理策略成效的重要依据。另外,抗性监测是确定诊断剂量的方法之一。诊断剂量法是联合国粮食及农业组织建议用于监测害虫田间抗性的方法,不仅能够区分害虫抗性个体和敏感个体,而且能够监测低频率的抗性等位基因 (Halliday & Burham, 1990; Marçon et al., 2000)。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 俗称玉米钻心虫,是重要的农业害虫,广泛分布在中国、日本、朝鲜半岛以及菲律宾、越南等东南亚国家 (Nafus & Schreiner, 1991)。该虫在我国玉米主产区常年发生较重,近 10 年来在全国年均发生面积达 0.2 亿 hm^2 ,年均实际损失量高达 196 万 t,分别占全国玉米病虫害年均发生总面积和实际总损失量的 29.8% 和 38.8%,是玉米上发生面积最大、产量损失最多的一类农作物害虫 (http://www.moa.gov.cn/xw/zxfb/202302/t2023_6420352.htm)。化学农药是防治亚洲玉米螟的主要手段,但其钻蛀为害的习性导致防治效果不佳。目前,以亚洲玉米螟为主要靶标的转基因抗虫玉米‘DBN9936’(转 *cry1Ab* 基因)、“瑞丰 125”

(转 *cry1Ab/cry2Aj* 基因)和‘浙大瑞丰 8’(转 *cry1Ab* 和 *cry2Ab* 基因)在我国相继获得生产应用安全证书。2023 年,在我国内蒙古、吉林和四川等省区已开始转基因抗虫玉米的试点种植 (http://www.moa.gov.cn/ztlz/zjyqwgz/kpxc/202311/t20231128_6441344.htm)。因此,监测亚洲玉米螟对 Bt 杀虫蛋白敏感性的变化对于该虫防控措施的制订具有重要意义。

cry1Ie 是我国具有自主知识产权的新型杀虫蛋白基因,其编码的 Cry1Ie 杀虫蛋白不仅能有效防治亚洲玉米螟、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和黏虫 *Mythimna separata*,而且与 Cry1Ab、Cry1F 及 Cry1Ac 等杀虫蛋白尚无交互抗性 (贺明霞等, 2013; Zhang et al., 2013; 姜韬, 2018)。我国已建立了亚洲玉米螟对 Cry1Ab 和 Cry1F 杀虫蛋白的敏感基线 (Liu et al., 2022; Wang et al., 2023),但有关亚洲玉米螟对 Cry1Ie 杀虫蛋白的抗性监测结果未见报道。因此,为明确亚洲玉米螟对 Cry1Ie 杀虫蛋白的敏感性现状,本研究于 2015—2021 年从我国北方春玉米区和黄淮海夏玉米区采集亚洲玉米螟田间种群,连续 7 年监测其对 Cry1Ie 杀虫蛋白的敏感性,以期对未来转基因抗虫玉米合理布局、抗性演化预测以及抗性治理措施有效性评价等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:亚洲玉米螟原始种群于 2010 年采集自陕西省杨凌区常规玉米种植田。采用标准饲养技术在室内以人工饲料 (宋彦英等, 1999) 连续饲养多年,过程中不接触任何 Bt 制剂或者 Bt 杀虫蛋白,取孵化 12 h 内的幼虫作为室内对照种群供试。于 2015—2021 年连续 7 年从北方春玉米区和黄淮海夏玉米区采集亚洲玉米螟田间种群,分别从黑龙江省齐齐哈尔市 (337 头成虫)、肇东市 (361 头成虫)、哈尔滨市 (283 头成虫)、吉林省松原市 (311 头成虫)、农安县 (228 头成虫)、公主岭市 (404 头成虫)、内蒙古通辽市 (255 头滞育幼虫)、吉林省铁岭市 (259 头幼虫、173 头成虫)、大连市 (68 头成虫)、山东省德州市 (487 头幼虫、152 头成虫)、河南省新乡市 (220 头幼虫)、郑州市 (402 头滞育幼虫)、洛阳市 (78 头成虫) 和安徽省合肥市 (138 头成虫) 这 7 省 14 地共采集 4 156 头。幼虫从花丝、茎秆或者穗轴内采集,主要为 4~5 龄幼虫,带回室内在温度 (27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光周期 16 L:8 D、相对湿度 70%~80% 的条件下用新鲜玉米组织或者人工饲料单管饲养,直至化蛹羽化,待成

虫交配产卵后,取孵化12 h内的幼虫供试。滞育幼虫于每年10月剖秆采集,带回室内后用特效防僵粉单头处理,防止病原体交叉感染,尤其是白僵菌 *Beauveria* spp.;将处理的幼虫单头放在5 mL离心管内,内置硫酸纸,为其化蛹提供附着点,处理后的滞育个体放在寒冷干燥的室外,第2年春天将滞育幼虫放在温度(27±1) °C、光周期16 L:8 D、相对湿度70%~80%的人工气候箱内解除滞育,直至化蛹羽化(He et al., 2005),待成虫交配产卵后,取孵化12 h内的幼虫供试。成虫于亚洲玉米螟发生高峰期在玉米田周边的杂草丛中网捕获得,放在铺有产卵纸的长80 cm×宽80 cm×高100 cm的交配笼中,每个种群至少50头雌成虫,每天收集卵块,并取孵化12 h内的幼虫供试。

供试玉米、土壤、蛋白和特效防僵粉:玉米品种为郑单958,种子购自当地市场,将玉米籽粒撒播于长60 cm×宽45 cm×高30 cm的塑料箱内,土壤为泥炭土,播种深度1.0~1.5 cm。在温度(27±1) °C、光周期16 L:8 D、相对湿度70%~80%的条件下培养,待生长至2~3叶期时取根部以上部位饲喂亚洲玉米螟幼虫。KLASMANN 422型泥炭土,德国Klasmann-Deilmann公司。Cry1Ie晶体蛋白,北京安百胜生物科技有限公司。特效防僵粉从电商平台购买。

仪器:RXZ-500B智能人工气候箱,宁波江南仪器厂;PCR-SEALER封膜机,北京鼎昊源科技有限公司;封口膜,美国Minnesota Mining and Manufacturing公司;48孔培养板,美国Corning公司。

1.2 方法

采用人工饲料混合法测定亚洲玉米螟田间种群对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性(He et al., 2005)。人工饲料参照宋彦英等(1999)配方配制。Cry1Ie杀虫蛋白用5 mmol/L、pH 9.5的Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液溶解,采用考马斯蓝染色法定量蛋白浓度,共配制9个浓度,即0、0.2、0.4、1、2、5、10、25、50 μg/g,用自来水溶解搅拌均匀后与配制好的人工饲料干粉混合,并以自来水配制的人工饲料作为空白对照。将10 g混合均匀的人工饲料分装到48孔培养板中,每孔接入1头待测试种群的孵化12 h以内幼虫,用封口膜覆盖,为保证空气流通,用解剖针在封口膜表面扎孔。将48孔培养板置于温度(27±1) °C、光周期16 L:8 D、相对湿度70%~80%的人工气候箱内培养。7 d后调查存活幼虫数,用毛笔轻触幼虫尾部,若无反应者视为死亡;若单头幼虫质量小于0.1 mg者也视为死亡。每个处理设2~3个重复。采用Polo Plus 1.0软

件分析生物测定结果,计算浓度-反应曲线的斜率值、LC₅₀及其95%置信区间、LC₉₅及其95%置信区间。因为不同批次Bt杀虫蛋白的纯度不同,蛋白纯度影响Bt杀虫蛋白对亚洲玉米螟的毒力,因此采用抗性倍数监测各地理种群对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性。抗性倍数=杀虫蛋白对田间种群的LC₅₀/杀虫蛋白对室内对照种群的LC₅₀。

1.3 数据分析

根据LC₅₀的95%置信区间判断差异显著性,如果置信区间有重叠,则无显著差异;如果置信区间无重叠,则存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟田间种群对Cry1Ie杀虫蛋白的敏感性

2015年,Cry1Ie杀虫蛋白对亚洲玉米螟各田间种群的LC₅₀介于0.69~2.20 μg/g之间,对农安种群的毒力最高,对新乡种群的毒力最低;LC₉₅介于4.99~30.02 μg/g之间,对合肥种群的毒力最高,对大连种群的毒力最低(表1)。2016年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于0.65~2.20 μg/g之间,对齐齐哈尔种群的毒力最高,对松原种群的毒力最低;LC₉₅介于7.58~33.07 μg/g之间,对合肥种群的毒力最高,对德州种群的毒力最低(表1)。2017年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于2.31~6.28 μg/g之间,对德州种群的毒力最高,对肇东种群的毒力最低;LC₉₅介于11.23~70.29 μg/g之间,对农安种群的毒力最高,对松原种群的毒力最低(表1)。2018年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于0.77~2.80 μg/g之间,LC₉₅介于12.72~39.26 μg/g之间,均对铁岭种群的毒力最高,均对洛阳种群的毒力最低(表1)。2019年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于1.83~3.57 μg/g之间,对德州种群的毒力最高,对齐齐哈尔种群的毒力最低;LC₉₅介于15.29~31.18 μg/g之间,对德州种群的毒力最高,对农安种群的毒力最低(表1)。2020年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于1.08~2.48 μg/g之间,LC₉₅介于19.15~50.97 μg/g之间,均对德州种群的毒力最高,均对公主岭种群的毒力最低(表1)。2021年,Cry1Ie杀虫蛋白对各田间种群的LC₅₀介于1.36~3.06 μg/g之间,对德州种群的毒力最高,对齐齐哈尔种群的毒力最低;LC₉₅介于20.51~40.77 μg/g之间,对哈尔滨种群的毒力最高,对齐齐哈尔种群的毒力最低(表1)。综合分析结果显示,2015—2021年,Cry1Ie杀虫蛋白对亚洲玉米螟各田间种群的LC₅₀介于0.65~6.28 μg/g

之间,对齐齐哈尔种群的毒力最高,对肇东种群的毒力最低;LC₉₅介于4.99~70.29 μg/g之间,对合肥种群的毒力最高,对松原种群的毒力最低(表1)。在LC₅₀水平上,相对室内对照种群,最敏感种群为2018年

铁岭种群,对CryIIe杀虫蛋白的抗性倍数为0.26;最不敏感种群为2017年肇东种群,对CryIIe杀虫蛋白的抗性倍数为1.17(表1和图1)。

表1 2015—2021年CryIIe杀虫蛋白对亚洲玉米螟田间种群和室内对照种群的毒力

Table 1 Toxicity of CryIIe against the field populations and laboratory population of *Ostrinia furnacalis* from 2015 to 2021

年份 Year	种群 Population	试虫数 No. of tested insects	LC ₅₀ (95% FL)/ (μg/g)	抗性倍数(95% FL) Resistance ratio (95% FL)	LC ₉₅ (95% FL)/ (μg/g)	斜率± 标准误 Slope±SE	χ ²	df
2015	室内对照 Laboratory population	624	2.02(1.70-2.39)	1.00(0.78-1.28)	21.37(15.54-31.99)	1.61±0.11	3.4	11
	新乡 Xinxiang	528	2.20(1.66-2.79)	1.09(0.80-1.49)	11.61(8.39-18.72)	2.28±0.28	6.8	9
	公主岭 Gongzhuling	576	2.10(1.59-2.64)	1.04(0.77-1.41)	12.09(8.86-19.01)	2.16±0.25	8.4	10
	大连 Dalian	576	1.68(1.07-2.36)	0.83(0.54-1.27)	30.02(19.27-57.29)	1.31±0.15	4.6	10
	德州 Dezhou	576	1.71(1.30-2.14)	0.85(0.63-1.14)	8.14(6.11-12.13)	2.42±0.27	9.0	10
	郑州 Zhengzhou	624	1.82(1.41-2.28)	0.90(0.67-1.22)	20.41(14.82-30.87)	1.57±0.13	7.8	11
	通辽 Tongliao	528	1.64(1.26-2.08)	0.82(0.60-1.11)	19.18(13.24-31.81)	1.54±0.14	4.9	9
	铁岭 Tieling	432	1.21(0.92-1.51)	0.60(0.45-0.81)	7.34(5.43-11.31)	2.10±0.24	3.0	7
	合肥 Hefei	576	0.90(0.63-1.15)	0.44(0.32-0.62)	4.99(3.60-8.44)	2.21±0.32	9.5	10
	松原 Songyuan	480	1.02(0.70-1.35)	0.51(0.35-0.72)	6.45(4.15-14.35)	2.05±0.35	7.1	8
农安 Nong'an	768	0.69(0.51-0.89)	0.34(0.25-0.48)	7.64(5.00-14.55)	1.58±0.19	5.5	14	
2016	室内对照 Laboratory population	672	2.40(1.76-3.08)	1.00(0.67-1.49)	26.41(18.72-42.61)	1.58±0.16	8.7	12
	松原 Songyuan	576	2.20(1.69-3.74)	0.92(0.64-1.33)	16.91(12.33-26.50)	1.86±0.20	4.0	10
	德州 Dezhou	624	1.71(1.29-2.20)	0.71(0.48-1.05)	33.07(21.93-57.09)	1.28±0.11	4.8	11
	铁岭 Tieling	576	1.46(1.16-1.80)	0.61(0.43-0.87)	18.09(12.48-29.74)	1.50±0.13	4.3	10
	公主岭 Gongzhuling	576	1.42(1.13-1.75)	0.59(0.42-0.85)	15.23(10.86-23.89)	1.60±0.14	2.9	10
	肇东 Zhaodong	576	1.16(0.86-1.49)	0.48(0.33-0.71)	13.34(9.33-21.67)	1.55±0.15	2.2	10
	合肥 Hefei	528	0.97(0.74-1.21)	0.40(0.28-0.58)	7.58(5.59-11.42)	1.84±0.17	7.4	9
	农安 Nong'an	576	0.95(0.74-1.19)	0.40(0.28-0.57)	9.99(7.13-15.63)	1.61±0.14	1.4	10
	齐齐哈尔 Qiqihar	624	0.65(0.49-0.85)	0.27(0.18-0.44)	12.91(8.73-21.74)	1.27±0.11	5.0	11
	2017	室内对照 Laboratory population	576	5.36(3.81-7.04)	1.00(0.65-1.54)	60.09(44.05-90.18)	1.57±0.14	9.9
肇东 Zhaodong		672	6.28(4.67-8.04)	1.17(0.78-1.76)	69.52(48.98-92.30)	1.57±0.15	8.7	12
公主岭 Gongzhuling		672	5.34(3.77-7.04)	1.00(0.65-1.54)	59.66(42.02-96.97)	1.57±0.16	8.6	12
农安 Nong'an		672	4.49(2.74-6.50)	0.84(0.50-1.41)	11.23(7.96-18.98)	1.18±0.13	9.5	12
齐齐哈尔 Qiqihar		672	3.85(2.41-5.44)	0.72(0.43-1.19)	62.47(42.83-85.91)	1.36±0.15	8.9	12
铁岭 Tieling		672	3.28(2.32-4.36)	0.61(0.39-0.95)	46.05(32.48-72.72)	1.43±0.13	6.4	12
松原 Songyuan		672	2.88(1.81-4.17)	0.54(0.32-0.90)	70.29(44.97-108.09)	1.18±0.12	9.9	12
哈尔滨 Harbin		672	2.97(2.21-3.75)	0.55(0.37-0.83)	20.78(15.61-30.64)	1.95±0.20	5.2	12
德州 Dezhou		672	2.31(1.45-3.25)	0.43(0.26-0.71)	41.20(28.06-70.62)	1.31±0.14	9.5	12
2018		室内对照 Laboratory population	672	2.91(2.34-3.57)	1.00(0.74-1.35)	37.44(26.48-58.52)	1.48±0.11	6.6
	洛阳 Luoyang	672	2.80(2.21-3.47)	0.96(0.70-1.31)	39.26(27.60-61.71)	1.43±0.11	8.0	12
	德州 Dezhou	672	2.65(2.01-3.32)	0.91(0.66-1.27)	22.80(16.94-34.00)	1.76±0.17	7.2	12
	农安 Nong'an	672	2.14(1.66-2.68)	0.73(0.53-1.01)	25.75(18.35-40.00)	1.52±0.12	9.4	12
	哈尔滨 Harbin	576	1.73(1.34-2.14)	0.59(0.43-0.81)	13.99(10.43-20.75)	1.81±0.17	8.5	10
	齐齐哈尔 Qiqihar	576	1.61(1.28-1.98)	0.55(0.41-0.75)	14.80(10.78-22.53)	1.71±0.15	7.8	10
	松原 Songyuan	624	1.59(1.25-1.97)	0.55(0.40-0.75)	14.44(10.71-21.26)	1.72±0.14	3.5	11
	公主岭 Gongzhuling	624	1.52(1.28-1.80)	0.52(0.40-0.69)	15.54(11.50-22.77)	1.63±0.11	8.0	11
	铁岭 Tieling	672	0.77(0.57-1.00)	0.26(0.19-0.38)	12.72(8.83-20.49)	1.35±0.11	6.8	12
	2019	室内对照 Laboratory population	672	3.34(2.80-3.96)	1.00(0.78-1.28)	31.51(23.50-45.44)	1.69±0.11	6.3

续表 1 Continued

年份 Year	种群 Population	试虫数 No. of tested insects	LC ₅₀ (95% FL)/ (μg/g)	抗性倍数(95% FL) Resistance ratio (95% FL)	LC ₉₅ (95% FL)/ (μg/g)	斜率± 标准误 Slope±SE	χ ²	df	
2020	肇东 Zhaodong	672	2.75(2.06–3.48)	0.82(0.60–1.13)	22.07(16.50–32.58)	1.82±0.17	6.5	12	
	齐齐哈尔 Qiqihar	672	3.57(2.69–4.43)	1.07(0.79–1.44)	22.80(17.23–34.02)	2.04±0.23	7.1	12	
	哈尔滨 Harbin	672	1.95(1.50–2.44)	0.58(0.43–0.79)	17.45(13.09–25.31)	1.73±0.15	5.4	12	
	松原 Songyuan	672	1.92(1.56–2.32)	0.57(0.44–0.75)	16.36(12.42–23.17)	1.77±0.13	9.3	12	
	农安 Nong'an	672	2.66(2.05–3.33)	0.80(0.59–1.07)	31.18(22.42–47.82)	1.54±0.13	9.3	12	
	公主岭 Gongzhuling	672	1.97(1.53–2.45)	0.59(0.44–0.79)	15.82(11.97–22.66)	1.82±0.15	8.6	12	
	铁岭 Tieling	672	1.97(1.52–2.48)	0.59(0.44–0.80)	31.04(21.72–49.24)	1.37±0.11	8.3	12	
	德州 Dezhou	672	1.83(1.48–2.22)	0.55(0.42–0.72)	15.29(11.61–21.66)	1.78±0.13	8.2	12	
	室内对照	864	2.43(1.72–3.23)	1.00(0.64–1.56)	42.99(30.69–65.71)	1.32±0.11	7.2	16	
	Laboratory population								
	肇东 Zhaodong	768	2.41(1.83–3.04)	0.99(0.66–1.49)	24.03(17.90–35.27)	1.65±0.14	3.4	14	
	公主岭 Gongzhuling	768	2.48(1.75–3.32)	1.02(0.65–1.60)	50.97(34.61–84.27)	1.25±0.11	4.2	14	
	齐齐哈尔 Qiqihar	768	1.48(1.14–1.87)	0.61(0.41–0.91)	21.84(15.81–32.71)	1.41±0.10	8.6	14	
	哈尔滨 Harbin	768	1.89(1.46–2.37)	0.78(0.52–1.16)	20.13(14.98–29.14)	1.60±0.12	7.0	14	
德州 Dezhou	768	1.08(0.81–1.39)	0.45(0.29–0.68)	19.15(13.61–29.42)	1.32±0.10	5.4	14		
合肥 Hefei	768	1.46(1.00–1.99)	0.60(0.38–0.96)	21.75(15.59–33.52)	1.40±0.13	6.8	14		
2021	室内对照	864	3.17(2.23–4.21)	1.00(0.64–1.57)	45.37(32.85–68.90)	1.42±0.13	7.2	16	
Laboratory population									
齐齐哈尔 Qiqihar	768	3.06(2.25–3.95)	0.97(0.63–1.48)	40.77(29.71–61.29)	1.46±0.12	4.2	14		
哈尔滨 Harbin	864	1.52(1.15–1.94)	0.48(0.32–0.72)	20.51(15.14–29.85)	1.46±0.11	7.0	16		
肇东 Zhaodong	864	2.53(1.77–3.37)	0.80(0.51–1.26)	33.68(24.66–50.50)	1.46±0.13	6.2	16		
公主岭 Gongzhuling	864	2.92(2.00–3.92)	0.92(0.58–1.46)	36.10(26.34–54.62)	1.51±0.14	5.9	16		
德州 Dezhou	864	1.36(0.97–1.81)	0.43(0.27–0.67)	25.57(18.24–38.85)	1.29±0.10	5.8	16		

FL: 置信区间。FL: Fiducial interval.

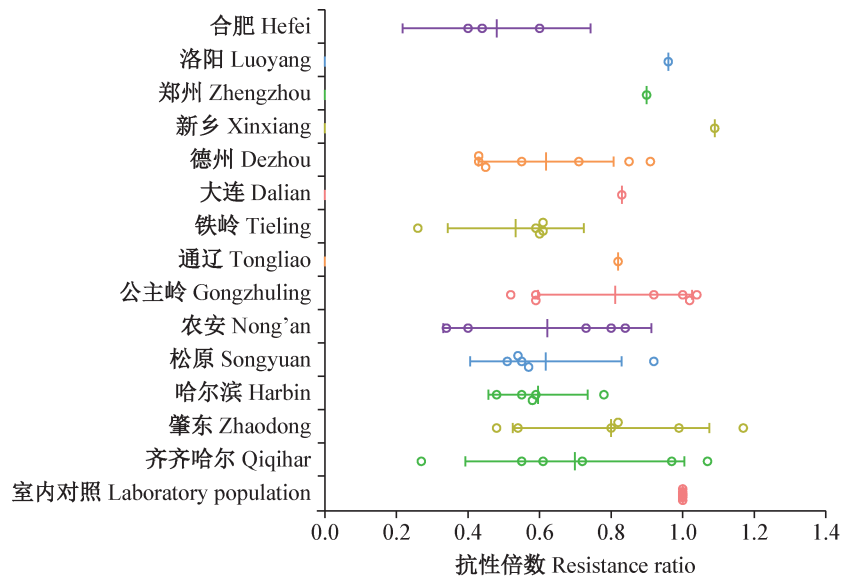


图 1 在 LC₅₀ 水平上亚洲玉米螟田间种群和室内对照种群对 CryIIe 杀虫蛋白的抗性倍数

Fig. 1 Resistance ratio values of CryIIe against the field populations and laboratory population of *Ostrinia furnacalis* at the LC₅₀ level

2.2 不同生态区田间种群对CryIIe杀虫蛋白的敏感性 在北方春玉米区,CryIIe杀虫蛋白对亚洲玉米

螟各田间种群的 LC₅₀ 和 LC₉₅ 范围分别是 1.13~4.16 μg/g 和 13.79~43.57 μg/g(图 2)。在黄淮海夏玉

米区, Cry1Ie 杀虫蛋白对亚洲玉米螟各田间种群的 LC_{50} 和 LC_{95} 范围分别是 1.25~4.65 $\mu\text{g/g}$ 和 11.29~

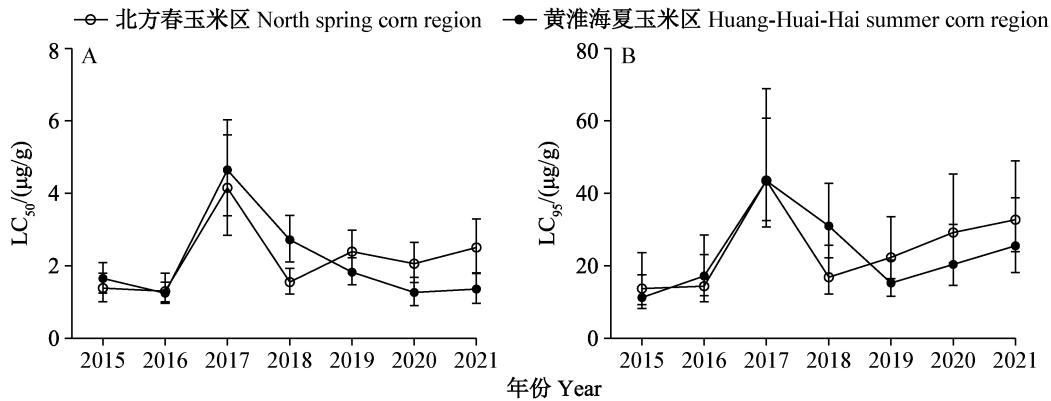


图2 Cry1Ie 杀虫蛋白对北方春玉米区和黄淮海夏玉米区亚洲玉米螟田间种群的 LC_{50} (A) 和 LC_{95} (B)

Fig. 2 LC_{50} (A) and LC_{95} (B) values of Cry1Ie against north spring corn region and Huang-Huai-Hai summer corn region populations of *Ostrinia furnacalis*

图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

3 讨论

作为抗性治理策略的重要组成部分,在转 Bt 基因抗虫作物商业化种植之前监测靶标害虫田间种群对 Bt 杀虫蛋白的敏感性至关重要。一方面可以全面了解靶标害虫对 Bt 杀虫蛋白的敏感性水平;另一方面,在转 Bt 基因抗虫作物商业化种植后,可为监测靶标害虫的田间抗性提供参考。在美国和西班牙等欧美国家,抗性监测也是转基因抗虫作物监管审批程序的重要组成部分(Álvarez-Alfageme et al., 2022)。本研究连续 7 年监测了我国玉米主产区多个亚洲玉米螟田间种群对 Cry1Ie 杀虫蛋白的敏感性,也是我国首次监测亚洲玉米螟田间种群对 Cry1Ie 杀虫蛋白的敏感性,结果表明 Cry1Ie 杀虫蛋白对亚洲玉米螟各田间种群的 LC_{50} 为 0.65~6.28 $\mu\text{g/g}$,虽然各田间种群之间存在敏感性差异,但这种差异是自然选择的结果。20 世纪 80 年代, Bt 制剂或 Bt 颗粒是防治亚洲玉米螟的主要生物学技术手段,由于防治成本高、缺乏合适剂型以及技术欠缺等原因,使用 Bt 制剂防治亚洲玉米螟的方法被逐渐淘汰,同样说明该差异是自然选择的结果(He et al., 2005)。亚洲玉米螟作为东南亚国家玉米上最重要的害虫之一,多个国家已建立了亚洲玉米螟对 Bt 杀虫蛋白的敏感基线,并评估了亚洲玉米螟对 Bt 杀虫蛋白的抗性等位基因频率。2005 年,我国首次建立了亚洲玉米螟对 Cry1Ab 杀虫蛋白的敏感基线,虽然各种群对 Cry1Ab 的敏感性存在差异,但 LC_{50} 范围相对较窄,最不敏感种群和最敏感种群的抗性倍数比值小于

10,说明各种群对 Cry1Ab 杀虫蛋白依然处于敏感水平(He et al., 2005)。2022 年,亚洲玉米螟对 Cry1Ab 杀虫蛋白的抗性等位基因频率仅为 0.004 8,说明该杀虫蛋白对亚洲玉米螟仍有较高的毒力(Liu et al., 2022)。2015 年,越南开始种植‘Bt11’(转 *cry1Ab* 玉米)来防治亚洲玉米螟,2019 年各监测点亚洲玉米螟种群对 Cry1Ab 杀虫蛋白仍处于敏感水平(Le et al., 2019)。在菲律宾,虽然亚洲玉米螟在 Cry1Ab 诊断剂量浓度下的存活率较高,但是存活个体不能在‘MON810’(转 *cry1Ab* 玉米)玉米组织上存活,说明没有产生抗性个体(Alcantara et al., 2011)。

本研究结果显示,同其他年份相比,2017 年 Cry1Ie 杀虫蛋白对亚洲玉米螟各田间种群的 LC_{50} 较高,但是 Cry1Ie 杀虫蛋白对各田间种群的 LC_{50} 或显著低于室内对照种群,或与室内对照种群差异不显著,这可能与蛋白纯度有关。蛋白的结构、纯度、制备过程、纯化方式以及定量方法等均可以影响其毒力(Siegfried et al., 2007; Gujar et al., 2008; Chakroun et al., 2012)。除此之外,影响靶标害虫对 Bt 杀虫蛋白敏感性的因素还包括采集靶标害虫的生态环境、地域差别、寄主植物类型、测试代数 and 种群活力等(Gore et al., 2003; Gujar et al., 2007)。如采集自黄淮海夏玉米区的亚洲玉米螟田间种群对 Cry1Ab 的敏感性低于采集自北方春玉米区的田间种群,可能是因为黄淮海夏玉米区田间种群被白僵菌和苏云金芽胞杆菌侵染的概率较高(He et al., 2005)。另外,黄河流域转基因棉花表达的 Cry1Ac 杀虫蛋白为亚洲玉米螟提供了一定的筛选压力,可能会影响该靶

标对Cry1Ab和Cry1F的敏感性(Wang et al., 2023)。

生物测定是监测Bt抗性或者杀虫剂抗性的主要方法(徐婷婷等, 2022; 胡明鑫等, 2023), 该方法能够监测高水平的抗性, 但是不能有效监测等位基因频率低于0.005的抗性(Burd et al., 2003)。诊断剂量法能够弥补该方法的不足, 不仅能有效监测低水平抗性, 而且工作量小, 可以在相同时间内完成对更多地理种群的抗性监测(Halliday & Burham, 1990)。当采用诊断剂量法监测害虫抗性时, 即使在诊断剂量浓度下个体能够存活, 也不能说明已经产生抗性个体; 若成活个体能够在转基因植株或者转基因作物组织上存活, 且能够产生可育后代, 则认为是抗性个体(Tabashnik et al., 2014)。采集自美国明尼苏达州的欧洲玉米螟 *O. nubilalis* 能在Cry1Ab诊断剂量下存活, 但是存活个体不能在营养期阶段转基因玉米组织上存活; 该种群虽然能在花丝上存活, 但是存活个体的生长发育受到严重抑制, 所以不能说明该地理种群对Cry1Ab杀虫蛋白产生了田间抗性(Siegfried et al., 2007)。另外, 为了增加抗性监测的敏感度和准确性, 有必要开展室内汰选工作, 建立靶标害虫的高水平抗性品系。在了解抗性遗传的基础上分析鉴定调控抗性的主效基因, 采用基因克隆等分子技术直接检测田间个体的抗性基因。因此, 未来应致力于开展诊断剂量法并筛选亚洲玉米螟CryIIe高抗性品系。

我国自主研发的转Bt基因抗虫玉米在技术上已经成熟, 利用转Bt基因抗虫玉米防治亚洲玉米螟已进入试点种植。虽然转 *cryIIe* 玉米‘IE09S034’没有获得安全证书, 但是已获得安全证书的转基因玉米品种会对亚洲玉米螟产生筛选压力, 这可能影响该靶标害虫对CryIIe杀虫蛋白的敏感性, 因此加强亚洲玉米螟对CryIIe杀虫蛋白的抗性监测同样重要。同时, 应根据我国的实际情况和基本国情制订抗性治理策略, 综合采用农业防治、物理防治和生物防治等技术进行害虫抗性治理。另外, 从1997年开始商业化种植转基因抗虫棉, 棉铃虫对转基因抗虫棉长期处于敏感水平。玉米作为天然庇护所, 在延缓棉铃虫对转基因抗虫棉产生抗性的过程中发挥了重要作用。若在我国推广转基因玉米种植, 棉铃虫的天然庇护所面积将降低, 这可能会加快棉铃虫对转基因抗虫棉的抗性发展(Wu, 2007)。为了可持续控制棉铃虫, 实现转基因抗虫棉长期安全的种植, 可以推广第二代转多价基因抗虫棉(Wei et al., 2017)。

参 考 文 献 (References)

- Alcantara E, Estrada A, Alpuerto V, Head G. 2011. Monitoring Cry1Ab susceptibility in Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt corn in the Philippines. *Crop Protection*, 30(5): 554–559
- Álvarez-Alfageme F, Devos Y, Camargo AM, Arpaia S, Messéan A. 2022. Managing resistance evolution to transgenic Bt maize in corn borers in Spain. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(2): 201–219
- Burd AD, Gould F, Bradley JR, Van Duyn JW, Moar WJ. 2003. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. *Journal of Economic Entomology*, 96(1): 137–142
- 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
- Gore J, Leonard BR, Jones RH. 2003. Influence of agronomic hosts on the susceptibility of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically engineered and non-engineered cottons. *Environmental Entomology*, 32(1): 103–110
- Grimi DA, Parody B, Ramos ML, Machado M, Ocampo F, Willse A, Martinelli S, Head G. 2018. Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. *Pest Management Science*, 74(4): 905–913
- Gujar GT, Kalia V, Kumari A, Singh BP, Mittal A, Nair R, Mohan M. 2007. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3): 214–219
- Gujar GT, Nair R, Singh BP, Kumari A, Kalia V. 2008. Toxicity to the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, of some Cry1Ac toxins expressed in cotton in India. *Crop Protection*, 27(3/4/5): 537–544
- Halliday RW, Burnhaw KP. 1990. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, 83(4): 1151–1159
- He K, Wang Z, Wen L, Bai S, Ma X, Yao Z. 2005. Determination of baseline susceptibility to Cry1Ab protein for Asian corn borer (Lep., Crambidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(8): 407–412
- He MX, He KL, Wang ZY, Wang XY, Li Q. 2013. Selection for CryIIe resistance and cross-resistance of the selected strain to other Cry toxins in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(10): 1135–1142 (in Chinese) [贺明霞, 何康来, 王振营, 王新颖, 李庆. 2013. CryIIe毒素胁迫下亚洲玉米螟的抗性发展及汰选种群对其他Bt毒素的交互抗性. *昆虫学报*, 56(10): 1135–1142]
- Hu MX, Yang ZZ, Li Y, Zhang N, Wang F, Bai YC, Jiao XG, Zhang LX, Liu BM. 2023. Cryptic *Bemisia tabaci* species harboring tomato yellow leaf curl virus and endosymbionts and insecticide resistance monitoring in Tianjin. *Journal of Plant Protection*, 50(1): 101–110 (in Chinese) [胡明鑫, 杨泽众, 李妍, 张楠, 王芳,

- 白义川, 焦晓国, 张李香, 刘佰明. 2023. 天津市烟粉虱隐种鉴定及其携带 TYLCV、内共生菌情况和抗药性监测. 植物保护学报, 50(1): 101-110]
- Jiang T. 2018. The effects of three transgenic maize events on population dynamics, growth and development of natural pests. Master thesis. Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese) [姜韬. 2018. 三种转基因玉米对害虫天敌种群动态及生长发育的影响. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学]
- Le DK, Le QK, Tran TTH, Nguyen DV, Dao TH, Nguyen TT, Trung XL, Nguyen QC, Pham HP, Phan TTT, et al. 2019. Baseline susceptibility of Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis* (Guenée)) populations in Vietnam to Cry1Ab insecticidal protein. Journal of Asia-Pacific Entomology, 22(2): 493-498
- Liu XB, Liu S, Long Y, Wang YQ, Zhao WL, Shwe SM, Wang ZY, He KL, Bai SX. 2022. Baseline susceptibility and resistance allele frequency in *Ostrinia furnacalis* in relation to Cry1Ab toxins in China. Toxins, 14(4): 255
- Marçon PCRG, Siegfried BD, Spencer T, Hutchison WD. 2000. Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Economic Entomology, 93(3): 925-930
- Nafus DM, Schreiner IH. 1991. Review of the biology and control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lep: Pyralidae). Tropical Pest Management, 37(1): 41-56
- Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivelari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. Pest Management Science, 72(9): 1727-1736
- Shrestha RB, Gassmann AJ. 2019. Field and laboratory studies of resistance to Bt corn by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology, 112(5): 2324-2334
- Siegfried BD, Spencer T, Crespo AL, Storer NP, Head GP, Owens ED, Guyer D. 2007. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. American Entomologist, 53(4): 208-214
- Siegfried BD, Vaughn TT, Spencer T. 2005. Baseline susceptibility of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin. Journal of Economic Entomology, 98(4): 1320-1324
- Song YY, Zhou DR, He KL. 1999. Studies on mass rearing of Asian corn borer: development of a satisfactory non agar semi-artificial diet and its use. Journal of Plant Protection, 26(4): 324-328 (in Chinese) [宋彦英, 周大荣, 何康来. 1999. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. 植物保护学报, 26(4): 324-328]
- Strydom E, Erasmus A, du Plessis H, Van den Berg J. 2019. Resistance status of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to single- and stacked-gene Bt maize in South Africa. Journal of Economic Entomology, 112(1): 305-315
- Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. Journal of Economic Entomology, 107(2): 496-507
- Vassallo CN, Bunge FF, Signorini AM, Valverde-Garcia P, Rule D, Babcock J. 2019. Monitoring the evolution of resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1F protein in Argentina. Journal of Economic Entomology, 112(4): 1838-1844
- Wang YQ, Zhao WL, Han S, Wang LX, Chang X, Liu KQ, Quan YD, Wang ZY, He KL. 2023. Seven years of monitoring susceptibility to Cry1Ab and Cry1F in Asian corn borer. Toxins, 15(2): 137
- 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
- Wu KM. 2007. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. Journal of Invertebrate Pathology, 95(3): 220-223
- Xu TT, Wang YQ, Hu F, Bi SJ, Hu BJ, Wang ZY, Xu LN. 2022. Susceptibility of different geographical populations of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Anhui Province to Bt proteins. Journal of Plant Protection, 49(5): 1521-1527 (in Chinese) [徐婷婷, 王月琴, 胡飞, 毕思佳, 胡本进, 王振营, 徐丽娜. 2022. 安徽省不同地理种群草地贪夜蛾对Bt蛋白的敏感性. 植物保护学报, 49(5): 1521-1527]
- Zhang YW, Liu YJ, Ren Y, Liu Y, Liang GM, Song FP, Bai SX, Wang JH, Wang GY. 2013. Overexpression of a novel *CryIIe* gene confers resistance to Cry1Ac-resistant cotton bollworm in transgenic lines of maize. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 115(2): 151-158

(责任编辑:李美娟)