草地贪夜蛾对国产Bt玉米的抗性风险评估

王文荟[1] 黄运新[1*] 万 鹏[2] 封洪强[3] 吴孔明[4]

（1. 湖北大学资源环境学院，武汉 430062；2. 湖北省农业科学院植物保护土肥研究所，武汉 430064；3. 河南省农业科学院植物保护研究所，郑州 450002；4. 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）

摘要：为评估草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*对国产Bt玉米的抗性风险，基于抗性风险分析模型对草地贪夜蛾在3种Bt玉米和2种庇护所条件下的抗性时间进行预测分析。结果显示，无论是采用种子混合庇护所还是结构化庇护所，草地贪夜蛾对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间均远长于对Vip3Aa-玉米和Cry1Ab-玉米的抗性时间。在Bt与非Bt植株之间存在异花授粉和幼虫转移的条件下，采用种子混合庇护所的抗性时间较采用结构化庇护所的抗性时间大大缩短。以采用Cry1Ab+Vip3Aa-玉米和比例为0.20的庇护所为例，当异花授粉Bt显性度为0.5、幼虫转移概率为0.95时，采用结构化庇护所的抗性时间超过200代，而采用种子混合庇护所的抗性时间只有59代。结果表明，草地贪夜蛾对Cry1Ab-玉米的抗性风险远大于对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性风险，而种子混合庇护所条件下的抗性风险远大于结构化庇护所条件下的抗性风险。

关键词：草地贪夜蛾；Bt玉米；种子混合庇护所；幼虫转移；抗性风险分析

A risk assessment of the resistance of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to Bt maize in China

Wang Wenhui[1] Huang Yunxin[1*] Wan Peng[2] Feng Hongqiang[3] Wu Kongming[4]

（1. School of Resource and Environmental Science, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China; 2. Institute of Plant Protection and Soil Fertility, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei Province, China; 3. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 4. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China）

Abstract: In order to understand the resistance risk of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to Bt maize in China, the time for developing resistance was predicted by using the resistance risk analysis model for three Bt maize varieties and two types of refuges. The results showed that, for both seed mix refuge or structured refuge, the time for developing resistance was much longer for Cry1Ab+Vip3Aa-transgenic maize than for Cry1Ab-transgenic maize or Vip3Aa-transgenic maize. In the case of cross-pollination and larval movement between Bt and non-Bt maize plants, the time for developing resistance was generally shorter for seed mix refuge than for structured refuge. When the Bt dominance of cross-pollination was 0.5, the probability of larval movement was 0.95, if the proportion of refuge was 0.20, the time for developing resistance for Cry1Ab+Vip3Aa-transgenic maize was longer than 200 generations for structured refuge, but only 59 generations for seed mix refuge. These results suggested that the resistance risk of *S. frugiperd*a to Cry1Ab-maize was much higher than to Cry1Ab+Vip3Aa-maize, and the resistance risk in the case of seed mix refuge was much higher than in the case of structured refuge.

Key words: fall armyworm; Bt maize; seed mix refuge; larval movement; resistance risk analysis

基金项目：国家自然科学基金(31670543)，国家转基因生物新品种培育重大专项(2019ZX08012-004)

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：y.huang@hubu.edu.cn

收稿日期：2021-06-25

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*，又称秋黏虫，是一种原产于美洲热带和亚热带地区的广食性农作物害虫（Montezano et al.，2018）。草地贪夜蛾包括玉米品系和水稻品系2种生态型，分别以玉米和水稻为主要寄主作物（Dumas et al.，2015）。草地贪夜蛾迁飞能力极强，2018年12月在我国云南省发现后迅速蔓延至我国主要玉米产区（姜玉英，2019；陈辉等，2020；Li et al.，2020），入侵我国的草地贪夜蛾经鉴定为玉米型（张磊等，2019）。

草地贪夜蛾在美国、巴西等国主要依靠Bt抗虫玉米进行防治（Buntin，2008）。这些国家早期采用的Bt玉米品种主要是表达Cry1F、Cry1Ab的单基因品种，后来逐步更新换代采用表达Cry1A.105+Cry2Ab2、Cry1A.105+Cry2Ab+Cry1F、Vip3A+Cry1Ab+mCry3A的复合基因品种（Huang et al.，2014；Niu et al.，2014）。相较于单基因品种，复合基因品种具有更好的杀虫效力和抗性预防作用（Storer et al.，2010；Farias et al.，2014；Jakka et al.，2014）。我国目前尚未开始商业化种植Bt抗虫玉米，草地贪夜蛾主要依靠化学农药进行防治，但是未来存在利用Bt抗虫玉米进行综合防治的前景（吴孔明，2020）。目前国内已经研发了表达Cry1Ab的单基因Bt玉米和表达Cry1Ab+Vip3Aa的复合基因Bt玉米（张丹丹和吴孔明，2019）。试验研究结果显示，Cry1Ab+Vip3Aa-玉米对草地贪夜蛾具有很高的杀虫效力；Cry1Ab-玉米对草地贪夜蛾也有一定的杀虫作用，但效果不如Cry1Ab+Vip3Aa-玉米（张丹丹和吴孔明，2019）。Bt抗虫玉米商业化应用前必须进行杀虫效力和抗性风险评估。从目前已有的结果来看，国产Bt玉米尤其是复合基因品种对草地贪夜蛾的杀虫效力是很高的，但是草地贪夜蛾对国产Bt玉米的抗性风险尚不可知（吴超等，2019）。

Bt作物靶标害虫的抗性风险一般通过模型来评估（Ives et al.，2011；Onstad et al.，2011）。模型评估可以方便地将众多复杂的影响因素如Bt作物的杀虫效力、庇护所的类型及比例、靶标害虫的种群动态等整合在一起（Carrière et al.，2010；2016；Huang et al.，2017）。美国从1996年开始到现在所执行的一系列强制性抗性管理政策在很大程度上都是基于模型评估结果制定的（U.S.EPA，2011）。目前，我国已有红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对Bt棉花的抗性风险评估的相关研究，Wan et al.（2017）研究发现，Bt棉与非Bt棉杂交二代形成的种子混合庇护所能有效延缓长江流域红铃虫对Bt棉花的抗性演化；Jin et al.（2015）研究表明天然庇护所能有效延缓华北棉铃虫对Bt棉花的抗性演化。结构化庇护所也是一种国外广泛采用的庇护所类型（Carrière et al.，2016），但在我国尚未开始实践。我国国产Bt玉米无论是Bt蛋白类型、表达水平还是对草地贪夜蛾的杀虫效力等均与国外有所不同，另外庇护所的使用条件也有所不同。如果在我国采用国产Bt玉米对草地贪夜蛾进行防治，这些因素都可能影响草地贪夜蛾对Bt玉米的实际抗性风险，因此需要有针对性的对其进行分析评估。

本研究针对国产Bt玉米，考虑种子混合庇护所与结构化庇护所2种庇护所方案，通过模型对我国草地贪夜蛾的Bt抗性风险进行预测评估，以期为Bt玉米商业化和草地贪夜蛾的抗性管理提供决策依据。

1 材料与方法

1.1 材料

计算机模型以及数据来源：本研究针对我国本土的草地贪夜蛾和3种不同的国产Bt玉米品种Cry1Ab-玉米、Vip3Aa-玉米和Cry1Ab+Vip3Aa-玉米进行模型分析。本研究所选用的计算机模型为基于C++语言的编程模型（黄运新等，2019），模型参数数据主要来源于已发表的文献（表1）。本研究不涉及草地贪夜蛾和Bt玉米品种的实体材料。

1.2 方法

1.2.1 模型构建

本研究基于群体遗传学原理构建抗性风险分析模型。模型包括单基因和双基因模型，其中单基因模型针对Cry1Ab-玉米和Vip3Aa-玉米，双基因模型针对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米。在单基因模型中，抗性由1个位点决定，在双基因模型中，抗性由2个位点决定。为区别起见，将与Cry1Ab和Vip3Aa对应的抗性基因分别记为R_1和R_2，即对Cry1Ab和Vip3Aa的抗性分别由位点1和位点2决定。模型以世代为时间单位、以基因频率为状态变量。由于单基因模型可以作为双基因模型的特例看待，因此只对双基因模型进行描述。

模型的核心参数是害虫在不同寄主作物上的适合度。为了确定这些适合度参数，需要对寄主作物进行分类。草地贪夜蛾的寄主作物可分为种子混合庇护所和结构化庇护所2大类，这2类的占比分别记为$1-P_{ref}$和P_{ref}。其中种子混合庇护所是指将Bt和相应品种的非Bt玉米种子按一定比例混合在一起种植的玉米田（Bt和非Bt玉米种子的比例分别记为$1-Q$和Q），而结构化庇护所是与Bt玉米分开种植的非Bt玉米田。

表1 主要模型参数的记号、含义及默认值

Table 1 The notation, meaning and default value of model parameters

参数记号 Notation of parameter	含义 Meaning	默认值 Default value	参考来源 Reference
s_{11}	敏感纯合子S_1S_1在Cry1Ab-玉米上的适合度（发育阶段1） Fitness of S_1S_1 on Cry1Ab-maize at developmental stage 1	0.46	张丹丹和吴孔明，2019 Zhang & Wu, 2019
s_{12}	敏感纯合子S_1S_1在Cry1Ab-玉米上的适合度（发育阶段2） Fitness of S_1S_1 on Cry1Ab-maize at developmental stage 2	0.76	张丹丹和吴孔明，2019 Zhang & Wu, 2019
s_{21}	敏感纯合子S_2S_2在Vip3Aa-玉米上的适合度（发育阶段1） Fitness of S_2S_2 on Vip3Aa-maize at developmental stage 1	0.00	张丹丹和吴孔明，2019 Zhang & Wu, 2019
s_{22}	敏感纯合子S_2S_2在Vip3Aa-玉米上的适合度（发育阶段2） Fitness of S_2S_2 on Vip3Aa-maize at developmental stage 2	0.24	张丹丹和吴孔明，2019 Zhang & Wu, 2019
c_{ij}	抗性纯合子R_iR_i的抗性代价 Fitness cost of R_iR_i with i representing locus, j standing for larval stage (i, j=1, 2)	0.00	Vélez et al., 2014
d_{ij}	抗性代价显性度 Dominance of fitness cost for R_i with i representing locus, j standing for larval stage (i, j=1, 2)	0.00	黄运新等，2019 Huang et al., 2019
e_{ij}	抗性纯合子R_iR_i的不完全性 Incomplete resistance of R_iR_i with i representing locus, j standing for larval stage (i, j=1, 2)	0.00	Horikoshi et al.,2016
h_{11}	抗性基因R_1的显性度（发育阶段1） Dominance of resistance in R_1 at developmental stage 1	0.15	Farias et al., 2016
h_{12}	抗性基因R_1的显性度（发育阶段2） Dominance of resistance in R_1 at developmental stage 2	0.15	Farias et al., 2016
h_{21}	抗性基因R_2的显性度（发育阶段1） Dominance of resistance in R_2 at developmental stage 1	0.00	Horikoshi et al., 2016
h_{22}	抗性基因R_2的显性度（发育阶段2） Dominance of resistance in R_2 at developmental stage 2	0.05	黄运新等，2019 Huang et al., 2019

若采用种子混合庇护所，则邻近的Bt和非Bt玉米植株之间极易发生异花授粉，导致出现杂合型植株（Chilcutt & Tabashnik, 2004; Yang et al., 2014）。为了反映这种现象，本研究将种子混合庇护所中的植株划分为TT、TN、NN三种类型，分别代表Bt纯合植株、杂合型植株、非Bt纯合植株，其比例分别记为x、y、z。如果异花授粉随机发生，这3种类型所占的比例分别为$x=(1-Q)^2$，$y=2\times Q\times(1-Q)$，$z=Q^2$。需要指出的是，如果每年重新制种，且种子纯度极高，杂合型植株在授粉期后才会出现并且只有玉米穗和籽粒会受到Bt污染。但是如果农民自己留种，杂合型植株的所有组织均会受到Bt污染。本研究考虑后一种情形。

由于Bt玉米对草地贪夜蛾不同龄期的幼虫致死率不同（张丹丹和吴孔明，2019），所以对幼虫进行龄期划分能更准确地模拟害虫抗性演化。本研究将草地贪夜蛾的幼虫期划分为发育阶段1（1~2龄）和发育阶段2（3龄或以上）共2个发育阶段，分别代表低龄期和高龄期。草地贪夜蛾的幼虫转移能力很强，极易发生转株为害（Sokame et al., 2020）。为了量化幼虫的植株转移，假定幼虫平均每代发生随机植株转移的概率为M（$0\leqslant M\leqslant 1$），且幼虫在发育到发育阶段2后才发生植株转移。目前没有证据显示草地贪夜蛾能够分辨Bt植株和非Bt植株，因此幼虫在植株间的转移应该是随机的。在这种情况下，幼虫在不同类型植株之间的转移概率只与转移概率M和各植株类型占比有关（Mallet & Porter, 1992），计算公式为：$P_{TT\text{-}TT}=x\times(M\times x+1-M)$，$P_{TT\text{-}TN}=x\times M\times y$，$P_{TT\text{-}NN}=x\times M\times Z$，$P_{TN\text{-}TN}=y\times(M\times y+1-M)$，$P_{TN\text{-}TT}=y\times M\times x$，$P_{TN\text{-}NN}=y\times M\times z$，$P_{NN\text{-}NN}=z\times(M\times z+1-M)$，$P_{NN\text{-}TT}=z\times M\times x$，$P_{NN\text{-}TN}=z\times M\times y$。其中$P_{TT\text{-}NN}$是幼虫从TT型植株转移到NN型植株的概率，即幼虫在发育阶段1位于TT型植株，发育阶段2位于NN型植株的概率，其他以此类推。

根据上述转移概率，任一基因型G在种子混合体上的适合度为$W_M(G)=P_{TT\text{-}TT}\times W_{TT\text{-}TT}(G)+P_{TT\text{-}TN}\times W_{TT\text{-}TN}(G)+P_{TT\text{-}NN}\times W_{TT\text{-}NN}(G)+P_{TN\text{-}TT}\times W_{TN\text{-}TT}(G)+P_{TN\text{-}TN}\times W_{TN\text{-}TN}(G)+P_{TN\text{-}NN}\times W_{TN\text{-}NN}(G)+P_{NN\text{-}TT}\times W_{NN\text{-}TT}(G)+P_{NN\text{-}TN}\times W_{NN\text{-}TN}(G)+P_{NN\text{-}NN}\times W_{NN\text{-}NN}(G)$。其中$W_{TT\text{-}NN}(G)$是基因型G发育阶段1在TT型植株，发育

阶段2在NN型植株上的累积适合度，其他记号的含义可以根据记号中的下标类推。

由于草地贪夜蛾飞行能力强，因此假设结构化庇护所内的成虫可与种子混合庇护所内的成虫随机交配，这样基因型G在所有寄主植物上的适合度就可以表示为 $W(G)=(1-P_{ref})\times W_M(G)+P_{ref}\times W_N(G)$。根据上述适合度表达式，对任意基因型G，其下代频率 $f'(G)$ 由迭代方程 $f'(G)=[f(G)\times W(G)]/[\sum_X f(X)\times W(X)]$ 计算，其中 $f(X)$ 和 $W(X)$ 分别是基因型X的频率和适合度。根据上述迭代方程，当初始频率给定后，各基因型的频率可逐代导出。根据基因型的频率，按照Hardy-Weinberg定律可计算得到配子频率和抗性基因频率，最终得到抗性基因频率的逐代变化的模拟结果（黄运新等，2019）。

1.2.2 模型参数的设置

模型的核心参数是适合度参数。为了简化参数设定，首先将双基因型的适合度分解成单基因型的适合度之积。以双基因型 $S_1S_1R_2R_2$ 的适合度 $W(S_1S_1R_2R_2)$ 的计算为例，如果2个单基因型的适合度分别为 $W(S_1S_1)$ 和 $W(R_2R_2)$，按照乘积原则得到 $W(S_1S_1R_2R_2)=W(S_1S_1)\times W(R_2R_2)$，其他双基因型的适合度计算依此类推。这样就只须指定单基因型的适合度即可，也就是分别指定单基因型 S_1S_1、S_1R_1、R_1R_1 和 S_2S_2、S_2R_2、R_2R_2 在3种植株类型上的适合度即可。然后将草地贪夜蛾幼虫期2个发育阶段的累积适合度进行分解计算（Mallet & Porter，1992）。以基因型 S_1R_1 在发育阶段1处于TT型植株、发育阶段2处于NN型植株的适合度 $W_{TT\text{-}NN}(S_1R_1)$ 的计算为例，如果2个发育阶段适合度分别为 $W_{TT,1}(S_1R_1)$ 和 $W_{NN,2}(S_1R_1)$，则 $W_{TT\text{-}NN}(S_1R_1)=W_{TT,1}(S_1R_1)\times W_{NN,2}(S_1R_1)$，其他基因型的适合度计算依此类推。这样只须分别指定单基因型在2个发育阶段的适合度即可。最后根据Bt纯合植株（TT型植株）和非Bt纯合植株（NN型植株）上的适合度计算杂合型植株（TN型植株）上的适合度。以基因型 S_1S_1 在发育阶段1处于TN型植株上的适合度 $W_{TN,1}(S_1S_1)$ 的计算为例，如果该基因型在TT型植株和NN型植株上的适合度分别为 $W_{TT,1}(S_1S_1)$ 和 $W_{NN,1}(S_1S_1)$，则 $W_{TN,1}(S_1S_1)=W_{NN,1}(S_1S_1)+H\times(W_{NN,1}(S_1S_1)-W_{TT,1}(S_1S_1))$。当 H=0时，杂合型植株上的适合度与非Bt纯合植株上的适合度一致；当 H=1时，杂合型植株上的适合度与Bt纯合植株上的适合度一致，所以参数 H 可反映杂合植株中的Bt显性度，本研究称之为异花授粉Bt显性度。目前暂无具体试验数据能精准地估计这个参数，但有试验数据表明，在95%的Bt玉米和5%的非Bt玉米种子庇护所条件下，非Bt玉米穗中Bt蛋白的表达量可达到临近Bt玉米穗的45%（Chilcutt & Tabashnik，2004）。基于此数据，本研究将 H 的默认值设为0.5。同时，本研究也考虑了 H=0和 H=1两种极端情形。

综上，双基因模型的适合度参数最终可分解为2个位点（i=1，2）、2个发育阶段（j=1，2）、2种植株类型（TT和NN）上的适合度参数。以上适合度参数可根据表1中的原始参数计算，计算公式如表2所示。

表2 本研究模型适合度参数的计算公式

Table 2 The formulae for computing the fitness parameters of the model in this study

参数记号 Notation of parameter	含义 Meaning	计算公式 Formula
$W_{NN,j}(S_iS_i)$	S_iS_i 在非Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of S_iS_i on non-Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	1
$W_{NN,j}(S_iR_i)$	S_iR_i 在非Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of S_iR_i on non-Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	$1-d_{ij}\times c_{ij}$
$W_{NN,j}(R_iR_i)$	R_iR_i 在非Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of R_iR_i on non-Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	$1-c_{ij}$
$W_{TT,j}(S_iS_i)$	S_iS_i 在Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of S_iS_i on Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	s_{ij}
$W_{TT,j}(S_iR_i)$	S_iR_i 在Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of S_iR_i on Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	$s_{ij}-h_{ij}\times(1-e_{ij}\times s_{ij})$
$W_{TT,j}(R_iR_i)$	R_iR_i 在Bt植株上发育阶段 j 的适合度（i,j=1,2） Fitness of R_iR_i on Bt plants at developmental stage j（i,j=1,2）	$1-e_{ij}$

本研究将幼虫转移概率 M 的默认值设为0.95，即幼虫平均有95%的可能性发生转株。该参数设置的主要依据是草地贪夜蛾从3龄开始有互相残杀行为，所以幼虫具有很强的转移倾向，同时也具有很强的转移能力，可通过吐丝和爬行进行转移（Sokame et al.，2020）。本研究也考虑了 M=0和 M=0.5两种较低的转移概率情形。

抗性基因 R_1 和 R_2 的初始频率目前国内暂时没

有试验参数，为此本研究参照Ives et al.（2011）方法将抗性基因R_1和R_2的初始频率设为0.001。

庇护所比例为可变参数，庇护所比例选择0、0.05、0.10、0.15、0.20五种比例。本研究考虑了种子混合和结构化庇护所2种情形，在种子混合庇护所情形中，庇护所比例是非Bt玉米种子所占的比例；在结构化庇护所情形中，庇护所比例是非Bt玉米田所占的比例。

1.2.3 草地贪夜蛾抗性时间的预测

抗性时间是一种常用的抗性风险评价指标（Ives et al.，2011），按照上述参数设置采用C++语言的编程模型计算草地贪夜蛾的抗性时间，需区分单基因和双基因情形分别进行计算。在单基因情形下，以抗性基因的频率达到50%的时间为标准计算草地贪夜蛾的抗性时间。在双基因情形下，以2个抗性基因的频率均达到50%的时间为标准计算草地贪夜蛾的抗性时间。抗性时间越短，抗性风险越高，反之越低。

2 结果与分析

2.1 种子混合与结构化庇护所对草地贪夜蛾抗性的影响

针对Cry1Ab-玉米的模型预测结果显示，在种子混合庇护所和结构化庇护所2种情况下，抗性时间均随着庇护所比例的增加而增加（图1-A）。根据默认参数预测的结果显示，当采用比例为0、0.05、0.10、0.15、0.20的种子混合庇护所时，草地贪夜蛾的抗性时间分别为28、30、33、36、39代，而当采用相同比例的结构化庇护所时，抗性时间分别为28、31、35、39、44代。与结构化庇护所相比，采用种子混合庇护所导致抗性时间略有缩短，即抗性演化速度略有加快。值得指出的是，对Cry1Ab-玉米而言，当庇护所比例为0时，抗性时间也有28代。

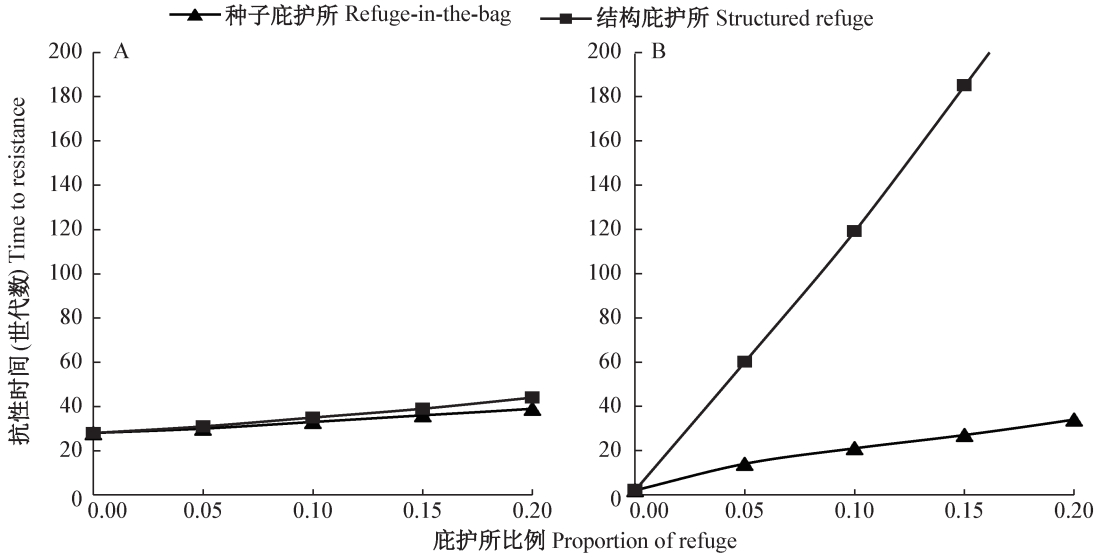


图1 不同种子混合和结构化庇护所比例条件下草地贪夜蛾对Cry1Ab-玉米（A）和Vip3Aa-玉米（B）的抗性时间

Fig. 1 Time for developing resistance to Cry1Ab-maize (A) and Vip3Aa-maize (B) in *Spodoptera frugiperda* under different proportions of refuge in the bag or structured refuge

针对Vip3Aa-玉米的模型预测结果显示，无论是采用种子混合庇护所还是结构化庇护所，抗性时间均随着庇护所比例的增加而增加（图1-B）。当采用比例为0、0.05、0.10、0.15、0.20的种子混合庇护所时，草地贪夜蛾的抗性时间分别为2、14、21、27、34代。当采用同样比例的结构化庇护所时，抗性时间分别为2、60、119、185、>200代。也就是说，与结构化庇护所相比，采用种子混合庇护所会大大加快抗性演化速度。注意当庇护所比例为0时，抗性时间只有2代，这是因为Vip3Aa-玉米对草地贪夜蛾1~2龄幼虫的致死率达到了100%，致死率越高，抗性选择压力越高，在没有庇护所的情况下抗性演化越快。

针对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的模型预测结果显示，无论是采用种子混合庇护所还是结构化庇护所，抗性时间均随着庇护所比例的增加而增加（图2）。当采用比例为0、0.05、0.10、0.15、0.20的种子混合庇护所时，草地贪夜蛾的抗性时间分别为28、37、44、51、59代。而当采用同样比例的结构化庇护所时，抗性时间分别为28、181、>200、>200、>200代。与Cry1Ab-玉米和Vip3Aa-玉米的抗性时间相比，若采用种子混合庇护所，则对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间均有一定程度的延长；若采用结构化庇护所，则对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间大大延长。

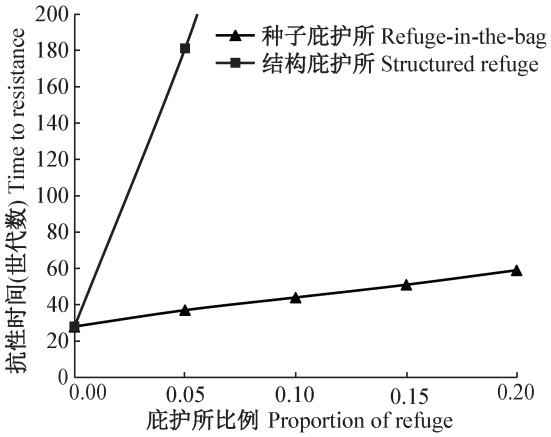
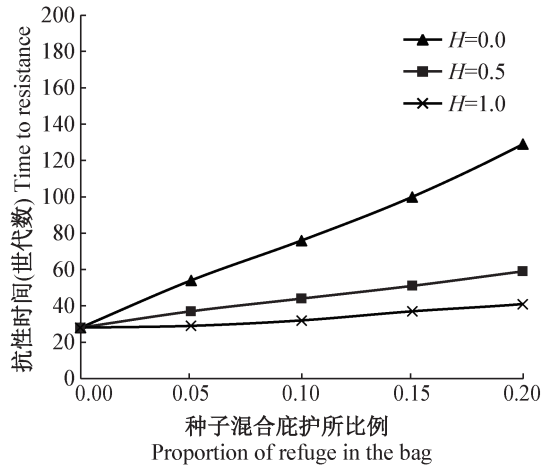


图2 不同种子混合和结构化庇护所比例条件下草地贪夜蛾对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间

Fig. 2 Time for developing resistance to Cry1Ab+Vip3Aa-maize in *Spodoptera frugiperda* under different proportions of refuge in the bag or structured refuge

2.2 异花授粉对草地贪夜蛾抗性演化的影响

在种子混合庇护所和Cry1Ab+Vip3Aa-玉米条件下，草地贪夜蛾的抗性时间随着异花授粉Bt显性度的增加而缩短（图3）。当庇护所比例为0.05，异花授粉Bt显性度从0增加至0.5和1时，抗性时间从54代分别缩短至37代和29代；当庇护所比例为0.20，异花授粉Bt显性度从0增加至0.5和1时，抗性时间从129代分别缩短至59代和41代。表明庇护所比例越高，异花授粉Bt显性度对抗性时间的影响越大。另外，异花授粉Bt显性度非0与否对抗性时间影响很大。



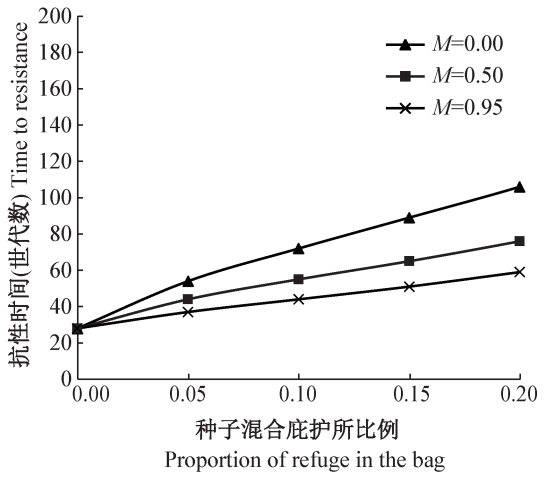
*H*代表异花授粉Bt显性度。*H* represents the dominance degree of cross-pollination.

图3 不同种子庇护所比例和异花授粉Bt显性度条件下草地贪夜蛾对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间

Fig.3 Time for developing resistance in *Spodoptera frugiperda* to Cry1Ab+Vip3Aa-maize under different proportions of refuge in the bag and different degrees of Bt dominance of cross-pollination

2.3 幼虫转移对草地贪夜蛾抗性演化的影响

在种子混合庇护所和Cry1Ab+Vip3Aa-玉米条件下，草地贪夜蛾的抗性时间随着幼虫转移概率的增加而缩短（图4）。当庇护所比例为0.05，幼虫转移概率从0增加至0.5和0.95时，抗性时间从约54代分别缩短至44代和37代；当庇护所比例为0.20，幼虫转移概率从0增加至0.5和0.95时，抗性时间从106代分别缩短至76代和59代。表明庇护所比例越高，幼虫转移概率对抗性时间的影响越大。



*M*代表幼虫转移概率。*M* represents the probability of larval movement.

图4 不同种子庇护所比例和幼虫转移概率条件下草地贪夜蛾对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间

Fig. 4 Time for developing resistance in *Spodoptera frugiperda* to Cry1Ab+Vip3Aa-maize under different proportions of refuge in the bag and different probabilities of larval movement

3 讨论

本研究通过模型分析发现，在庇护所条件相同的情况下，草地贪夜蛾对Cry1Ab-玉米的抗性时间相较于对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间大大缩短，即草地贪夜蛾对Cry1Ab-玉米的抗性风险远远高于对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性风险。如果仅从定性的差别来看，这个结果并不意外，因为表达2种或2种以上不同杀虫蛋白的Bt植物对害虫具有叠加毒杀作用，害虫只有对2种毒蛋白同时产生抗性才能存活（Edwards et al., 2013; Huang et al., 2017）。不过，这个结果的重要性在于两者之间的定量差别。以国际上常用的20%的结构化庇护所为例（U.S. EPA, 2011），草地贪夜蛾对Cry1Ab-玉米的抗性时间是44代，而对Cry1Ab+Vip3Aa-玉米的抗性时间大于200代。

关于种子混合庇护所与结构化庇护所对害虫抗

性管理的影响之前已有文献报道。研究表明，与结构化庇护所相比，种子混合庇护所可能加快害虫抗性演化（Mallet & Porter，1992；Carrière et al.，2016）。其主要原因包括2个方面：一是种子混合可能导致幼虫在Bt和非Bt植株间转移，从而增加庇护所内敏感害虫的死亡率，降低庇护所的有效性；二是种子混合可增加杂合子相对于敏感纯合子的存活率，进而导致抗性显性度的增加。本研究结果印证了两者之间的定性差别，即与结构化庇护所相比，种子混合庇护所确实可能会加快抗性演化。而更为重要的是本研究发现2种庇护所对应的抗性风险可能存在巨大的定量差别。以采用Cry1Ab+Vip3Aa-玉米和比例为0.20的庇护所为例，采用结构化庇护所的抗性时间大于200代，而采用种子混合庇护所的抗性时间仅为59代。

本研究结果表明异花授粉是导致种子混合条件下抗性风险增加的重要原因。有研究报道认为，Bt与非Bt植株之间的异花授粉可能对害虫抗性产生2个方面的影响：一是导致庇护所受到Bt污染，影响庇护所的有效性，二是增加杂合基因型在Bt玉米上的存活率，增加抗性显性度（Heuberger et al.，2011；Onstad et al.，2011）。本研究结果与Heuberger et al.（2011）和Onstad et al.（2011）的结论一致。但是，异花授粉对抗性演化的实际影响取决于异花授粉发生的概率以及异花授粉的Bt表达量，而这些又与Bt玉米品种、庇护所比例和种植密度等有关。Yang et al.（2014）研究发现，在采用双基因Bt玉米和比例为0.05的种子混合庇护所的条件下，90%以上的庇护所玉米籽粒至少表达一种Bt基因，说明异花授粉发生的概率是非常高的。Chilcutt & Tabashnik（2004）研究显示，由于异花授粉的原因，庇护所玉米籽粒中Bt基因的表达水平最高可达到临近Bt玉米籽粒的45%，说明异花授粉的Bt表达水平也较高。我国目前还没有针对国产Bt玉米的相关试验研究，未来需开展这方面研究，以便精准地评估我国草地贪夜蛾对Bt玉米的抗性风险。

本研究表明幼虫转移也是影响种子混合庇护所条件下害虫抗性风险增加的重要原因。Sokame et al.（2020）研究表明草地贪夜蛾幼虫可通过吐丝和爬行进行植株转移，相较其他害虫具有转移范围大、频率高等特点。本研究前期试验的观察也证实了这些特点，但是由于幼虫转移概率与玉米种植密度、植株大小和气候条件等因素有关，这个参数还有待进一步量化，以便对种子混合庇护所条件下的害虫抗性风险进行精准预测。

除了上述提到的庇护所类型、异花授粉和幼虫转移等因素外，迁飞也是影响草地贪夜蛾抗性风险的一个潜在因素。本课题组前期研究表明，迁飞对害虫抗性演化的影响是有条件的，只有当庇护所的空间分布不均匀时迁飞才可能对害虫的区域抗性演化产生影响（Huang et al.，2017）。如果采用种子混合庇护所方案，则庇护所的比例在空间上是一致的，在这种情况下，害虫在各空间单元的抗性演化速度也是一致的，因此迁飞对害虫区域抗性演化的影响较小。基于这个原因，本研究的模型未考虑空间结构和害虫迁飞。今后如果需要进一步评估庇护所比例的空间差异对草地贪夜蛾区域抗性演化的影响，则迁飞是一个必须考虑的因素（Jin et al.，2015）。

参 考 文 献（References）

Buntin GD. 2008. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. Florida Entomologist, 91 (4): 523−530

Carrière Y, Crowder DW, Tabashnik BE. 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt-crops. Evolutionary Applications, 3(5/6): 561−573

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE. 2016. Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? Trends in Biotechnology, 34 (4):291−302

Chen H, Wu MF, Liu J, Chen AD, Jiang YY, Hu G. 2020. Migratory routes and occurrence divisions of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in China. Journal of Plant Protection, 47(4): 747−757 (in Chinese) [陈辉, 武明飞, 刘杰, 谌爱东, 姜玉英, 胡高. 2020. 我国草地贪夜蛾迁飞路径及其发生区划. 植物保护学报, 47(4): 747−757]

Chilcutt CF, Tabashnik BE. 2004. Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(20): 7526−7529

Dumas P, Legeai F, Lemaitre C, Scaon E, Orsucci M, Labadie K, Gimenez S, Clamens AL, Henri H, Vavre F, et al. 2015. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? Genetica, 143(3): 305−316

Edwards KT, Caprio MA, Allen KC, Musser FR. 2013. Risk assessment for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance on dual-gene versus single-gene corn. Journal of Economic Entomology, 106(1): 382−392

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, dos Santos AC, Omoto C. 2016. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. Pest Management Science, 72(5): 974−979

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: 150−158

Heuberger S, Crowder DW, Brévault T, Tabashnik BE, Carrière Y. 2011. Modeling the effects of plant-to-plant gene flow, larval behavior, and refuge size on pest resistance to Bt cotton. Environmental Entomology, 40(2): 484−495

Horikoshi RJ, Bernardi D, Bernardi O, Malaquias JB, Okuma DM, Miraldo LL, de Amaral FS, Omoto C. 2016. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. Scientific Reports, 6: 34864

Huang F, Qureshi JA, Meagher RL, Reisig DD, Head GP, Andow DA, Ni XZ, Kerns D, Buntin GD, Niu Y, et al. 2014. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. PLoS ONE, 9(11): e112958

Huang Y, Qin Y, Feng HQ, Wan P, Li Z. 2017. Modeling the evolution of insect resistance to one- and two-toxin Bt crops in spatially heterogeneous environments. Ecological Modeling, 347: 72−84

Huang YX, Feng HQ, Wu KM. 2019. Risk analysis of the resistance of Asian corn borer to Bt corn in the spring corn-growing region of northern China. Journal of Plant Protection, 46(6): 1262−1269 (in Chinese) [黄运新, 封洪强, 吴孔明. 2019. 北方春玉米区亚洲玉米螟对Bt玉米的抗性风险分析. 植物保护学报, 46(6): 1262−1269]

Ives AR, Glaum PR, Ziebarth NL, Andow DA. 2011. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. Ecological Applications, 21(2): 503−515

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL. 2014. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. Journal of Invertebrate Pathology, 122: 52−54

Jiang YY, Liu J, Zhu XM. 2019. Analysis on the occurrence and future trends of the invasion of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in China. China Plant Protection, 39(2): 33−35 (in Chinese) [姜玉英, 刘杰, 朱晓明. 2019. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析. 中国植保导刊, 39(2): 33−35]

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 XJ, Wu MF, Ma J, Gao BY, Wu QL, Chen AD, Liu J, Jiang YY, Zhai BP, Early R, et al. 2020. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. Pest Management Science, 76(2): 454−463

Mallet J, Porter P. 1992. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 250: 165−169

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JA, Hunt TE. 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. African Entomology, 26(2): 286−300

Niu Y, Yang F, Dangal V, Huang F. 2014. Larval survival and plant injury of Cry1F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. Crop Protection, 59: 22−28

Onstad DW, Mitchell PD, Hurley TM, Lundgren JG, Porter RP, Krupke CH, Spencer JL, DiFonzo CD, Baute TS, Hellmich RL, et al. 2011. Seeds of change: corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. Journal of Economic Entomology, 104(2): 343−352

Sokame BM, Subramanian S, Kilalo DC, Juma G, Calatayud PA. 2020. Larval dispersal of the invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, the exotic stemborer *Chilo partellus*, and indigenous maize stemborers in Africa. Entomologia Experimentalis et Applicata, 168(4): 322−331

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: 1031−1038

U. S. EPA. 2011. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants. Washington: U. S. EPA.

Vélez AM, Spencer TA, Alves AP, Crespo ALB, Siegfried BD. 2014. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Journal of Applied Entomology, 138(5): 315−325

Wan P, Xu D, Cong S, Jiang Y, Huang Y, Wang J, Wu H, Wang L, Wu K, Carrièree Y, et al. 2017. Hybridizing transgenic Bt cotton with non-Bt cotton counters resistance in pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(21): 5413−5418

Wu C, Zhang L, Liao CY, Wu KM, Xiao YT. 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. Journal of Plant Protection, 46(3): 503−513 (in Chinese) [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛. 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和Bt作物的抗性机制及其治理技术研究进展. 植物保护学报, 46(3): 503−513]

Wu KM. 2020. Management strategies of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in China. Plant Protection, 46(2): 1−5 (in Chinese) [吴孔明. 2020. 中国草地贪夜蛾的防控策略. 植物保护, 46(2): 1−5]

Yang F, Kerns DL, Head GP, Leonard BR, Levy R, Niu Y, Huang F. 2014. A challenge for the seed mixture refuge strategy in Bt maize: impact of cross-pollination on an ear-feeding pest, corn earworm. PLoS ONE, 9(11): e112962

Zhang DD, Wu KM. 2019. The bioassay of Chinese domestic Bt-Cry1Ab and Bt-(Cry1Ab+Vip3Aa) maize against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Plant Protection, 45(4): 54−60 (in Chinese) [张丹丹, 吴孔明. 2019. 国产Bt-Cry1Ab和Bt-(Cry1Ab+Vip3Aa)玉米对草地贪夜蛾的抗性测定. 植物保护, 45 (4): 54−60]

Zhang L, Jin MH, Zhang DD, Jiang YY, Liu J, Wu KM, Xiao YT. 2019. Molecular identification of invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in Yunnan Province. Plant Protection, 45(2): 19−24, 56 (in Chinese) [张磊, 靳明辉, 张丹丹, 姜玉英, 刘杰, 吴孔明, 萧玉涛. 2019. 入侵云南草地贪夜蛾的分子鉴定. 植物保护, 45(2): 19−24, 56]

（责任编辑：王 璇）