

亚洲玉米螟 Bt 抗性种群的遗传多样性分析

刘雪微¹, 张天涛¹, 白树雄¹, 王振营¹, 徐丽娜^{2*}, 何康来^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;

2. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031)

摘要 近 20 年来,在北美、西欧、南美、菲律宾等 20 多个国家大面积商业化应用 Bt 玉米防治欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner) 等鳞翅目害虫的实践证明,其不可避免地胁迫靶标害虫产生遗传分化,出现新的抗性种群。研究精准有效的抗性检测方法,将为抗性监测和抗性治理策略的有效性提供科学依据。本研究基于高通量测序获得的亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 转录组数据,应用 MISA (MicroSATellite) 软件搜索 SSR 位点,从 61 622 条 EST (Expressed Sequence Tag) 序列中获得了 3 467 个 SSR 位点。通过设计、筛选,共获得 3 316 对特异性引物,从中挑选了 150 对引物进行 PCR 扩增,共有 51 对扩增出目的条带,对亚洲玉米螟敏感种群 (ACB-BtS) 及 5 个 Bt 毒素抗性种群 (ACB-AbR, ACB-AcR, ACB-AhR, ACB-FR, ACB-IeR) 进行多态性检测,最终得到 20 条高多态性引物。利用这 20 对微卫星引物共检测到 126 个等位基因,平均每个位点 6.3 个。不同 Bt 抗性种群间产生了一定程度的遗传分化,种群间的平均遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.195 9,即说明种群间的遗传变异为 19.6%。根据遗传距离建立了 UPGMA 系统发育树,显示 6 个种群的相似性,即 ACB-AbR 与 ACB-AcR 相似度高。种群变异相似性规律与已报道的亚洲玉米螟对各 Bt 毒素的交互抗性规律相一致。本研究发现的 SSR 位点可作为亚洲玉米螟不同 Bt 毒素抗性种群的分子检测方法。

关键词 亚洲玉米螟; 敏感种群; 抗性种群; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S 433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018150

Genetic diversity in Bt-resistant strains of the Asian corn borer

LIU Xuewei¹, ZHANG Tiantao¹, BAI Shuxiong¹, WANG Zhenying¹, XU Lina², HE Kanglai¹

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

2. Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract In the past two decades, the commercialization of Bt corn for protecting corn against lepidopteran pests such as the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), has been widely used in more than 20 countries in North America, Western Europe, South America, and the Philippines. Accordingly, evolution of resistance has been reported in target pests driven by widespread Bt corn. Accurate and effective resistance testing methods will provide scientific basis for the effectiveness of resistance monitoring and resistance management strategies. Using MISA (MicroSATellite) software to analyze 61 622 ETS sequences of the transcriptome database of the Asian corn borer, *O. furnacalis* (Guenée) and 3 467 SSR loci were identified. By designing and screening, we designed 3 316 pairs of specific primers, of which 150 pairs of primers were selected for PCR amplification, and there were 51 pairs producing amplification bands of expected sizes. Through polymorphism detection, 20 highly polymorphic primers were obtained among susceptible Asian corn borer populations and 5 Bt-resistant populations (ACB-AbR, ACB-AcR, ACB-AhR, ACB-FR and ACB-IeR). By targeting these 20 highly polymorphic loci to analyze the genetic diversities of different Bt-resistant populations of the Asian corn borer, 126 alleles were detected by using those 20 pairs of microsatellite primers, with an average of 6.3 alleles per locus. The average genetic differentiation coefficient (F_{st}) among populations was 0.195 9 in the Asian corn borer, indicating that 19.6% genetic differentiation existed among the populations. UPGMA phylogenetic tree was established based on genetic distances, showing similarity among the six populations, i. e., high similarity between ACB-AbR and ACB-AcR, and high similarity between ACB-FR and ACB-IeR. The pattern of genetic similarity among the strains was similar to the previously reported pattern of cross-resistance to Bt toxins. Those 20 pairs of microsatellite primers could be used

收稿日期: 2018-04-04 修订日期: 2018-05-28

基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08011-003)

* 通信作者 E-mail: xulina26@hotmail.com; klhe@ippcaas.cn

to establish the molecular detection method for monitoring resistance to Bt toxins in Asian corn borer.

Key words *Ostrinia furnacalis*; susceptible strain; resistant strain; SSR; genetic diversity

转 Bt 基因抗虫玉米为亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 的防治提供了新途径, 虽然在我国转基因抗虫玉米目前还处于应用前的环境安全评价阶段, 然而一旦大面积商业化种植将会使亚洲玉米螟长期处于特定的毒素选择压力下, 使其产生抗性。印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hübner) 是世界上第一个被报道的对 Bt 制剂产生抗性的鳞翅目害虫^[1]。此后, 诸多研究证实鳞翅目、鞘翅目和双翅目的多种昆虫对 Bt 蛋白产生抗性^[2-8]。分子标记能够检测到群体间及个体的基因组中某一特异性的 DNA 片段, 是建立在核酸分子水平上检测物种种群遗传变异的一种标记技术。研究者利用 RAPD(随机扩增多态性 DNA) 技术检测到棉铃虫对 Bt 产生抗性后在基因水平发生变异^[9]。雷仲仁等^[10]使用 RAPD 技术对不同抗性水平和敏感的棉铃虫种群进行了区分。潘志萍等使用微卫星标记对橘小实蝇的敏感品系及 3 个农药抗性品系进行 DNA 遗传变异分析^[11]。

本实验室以采自陕西田间的亚洲玉米螟敏感种群进行 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ie、Cry1F、Cry1Ah 蛋白抗性汰选, 获得了 5 个抗性种群。抗性倍数达数十倍, 乃至百倍以上^[12-14], Cry1F 蛋白抗性种群的抗性倍数更达近 2 000 倍^[15]。本研究基于前期对亚洲玉米螟 Bt 敏感种群的转录组高通量测序结果, 进行 EST-SSR 分子标记搜索和分析, 建立了 EST-SSR 标记, 筛选出高多态性的位点, 并用这些位点对亚洲玉米螟不同 Bt 抗性种群进行了遗传多样性分析, 以期建立新的田间抗性检测技术提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟敏感品系 (ACB-BtS): 采自陕西西安玉米田, 在 (28±1)℃、光周期 L//D=16 h//8 h、RH 70%~80% 的条件下用无琼脂半人工饲料饲养, 未接触过任何 Bt 产品。

亚洲玉米螟 5 个抗性种群: Cry1Ab 蛋白抗性种群 (ACB-AbR)、Cry1Ac 蛋白抗性种群 (ACB-AcR)、Cry1F 蛋白抗性种群 (ACB-FR)、Cry1Ieb 蛋白抗性种群 (ACB-IeR)、Cry1Ah 蛋白抗性种群 (ACB-AhR) 均以 ACB-BtS 种群为基础, 采用饲料混合法^[16]进行室内人工汰选。

1.2 微卫星位点的开发及引物设计

基于亚洲玉米螟 Bt 敏感种群转录组测序结果获得的 61 622 条 Unigenes 序列, 使用 MicroSAtellite(MISA) 软件进行 SSR 位点搜索。搜索的标准为单核苷酸至少重复 12 次, 二核苷酸至少重复 6 次, 三、四核苷酸至少重复 5 次, 五、六核苷酸至少重复 4 次。对所有 SSR 重复单元在 Unigene 上前后序列长度进行筛选, 一并在 3 035 条 Unigenes 中找到 3 467 个符合条件的 SSR。只保留前后序列均不小于 150 bp 的 SSR, 用其设计引物。

主要的引物设置参数为: 退火温度 55~65℃, 上、下游引物的 T_m 相差不大于 2℃, 扩增产物大小 80~300 bp, 引物长度 18~28 bp, GC 含量 40%~65%。将设计出的引物通过以下标准筛选: 1、引物不能存在 SSR; 2、将获得的引物比对到 Unigene 序列, 引物的 5'端允许有 3 个碱基的错配, 3'端允许有 1 个碱基的错配; 3、去掉比对到不同 Unigene 上的引物, 筛选唯一匹配的引物; 4、使用 ssr_finder 校验 SSR, 使用产物序列来寻找 SSR, 检验结果是否与 MISA 结果相同, 并筛选出相同的 SSR 产物。每条 SSR 产生 5 条候选引物, 用于后续进行 SSR 的多态性检测。最终过滤获得 3 316 对引物。

1.3 微卫星引物筛选

在 2~6 碱基重复类型中选择重复次数较高的 SSR 位点, 最终从 3 316 对引物中获得了 150 对 SSR 引物(编号 1~150, 上海 Sangon 生物技术公司合成), 这 150 对引物覆盖 73 个 SSR 位点。

利用 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒[康宁生命科学(吴江)有限公司]提取亚洲玉米螟 DNA, -20℃保存备用, 提取方法参照试剂盒的说明书。以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(25 μL)包括: 2×Go Taq Green Master Mix 12.5 μL; 正反引物各 1 μL; DNA 模板 1.5 μL; 无核酸酶水 9 μL。PCR 循环条件为 95℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 合适的退火温度 35 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。各对引物的最适退火温度通过梯度(50.8、52.1、53.8、55.2、57.2、59.2℃)PCR 试验确定。

将可以扩增出目的条带的引物的 5'端进行双色荧光标记(FAM、HEX), 根据以上优化好的 PCR 扩增条件, 用荧光标记的上游引物与原引物的下游引

物对 24 个亚洲玉米螟 DNA 样品 (ACB-BtS、ACB-AbR、ACB-AcR、ACB-FR、ACB-IeR、ACB-AhR 6 个种群,每个种群 4 个个体)进行扩增。PCR 扩增产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将检验合格的产物送往上海 Sangon 生物技术公司,利用 ABI 3730 仪器进行毛细管电泳基因分型扫描,扫描结果经 GeneMapper 软件进行分析。在 Excel 表中输入分型结果,分别用“A、B”表示每个基因座的两个等位基因,并用两个字母表示条带:纯合子条带表示为 AA、BB、CC 等;杂合子为 AB、AC、BC 等。使用 Popgene32 (Version 1.32)软件计算每一个多态性 SSR 位点的总等位基因数(number of alleles, N_a)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、预计杂合度(expected heterozygosity, H_e)等。分析(PIC_CALC, Version 0.6)各个位点的等位基因频率,得到多态性信息含量参数(polymorphism information content, PIC)。

1.4 亚洲玉米螟不同 Bt 抗性种群的遗传多样性

选取筛选得到的具有多态性的微卫星位点,分别在 6 个种群中进行 PCR 扩增,每个种群扩增 30 个个体。PCR 反应条件、反应程序、PCR 产物检测及荧光标记基因分型数据分析同上。计算 Nei’s 遗传距离 D 和群体遗传分化的 F 统计量(F -statistics, F_s)等参数。 $D = -\ln \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$,其中 x 和 y 代表两个种群, J_x 、 J_y 和 J_{xy} 分别代表种群特有或共有等位基因频率平均数; $F_s = \frac{\text{var}(p)}{p(1-p)}$,其中 p 为种群间变异, $p(1-p)$ 为期望的杂合等位基因频率,计算过程由 Popgene 32 软件实现^[17]。MEGA7.0 软件根据遗传距离和等位基因频率进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟转录组中 SSR 的分布及频率

在亚洲玉米螟 Bt 敏感种群转录组的 61 622 条 unigenes 中的 3 035 条中找到符合条件的 3 467 个 SSR 位点,其中 337 条 unigenes 含 2 个及 2 个以上 SSR 位点。整体上,SSR 发生频率(含 SSR unigenes 的数目与总 unigenes 数目之比)为 4.93%,出现频率(检出 SSR 数目与总 unigenes 数目之比)为 5.63%。从分布情况看,亚洲玉米螟转录组中平均每 15 162 bp 含有 1 个 SSR 位点。

2.2 微卫星位点的多态性

经 PCR 条件优化,确定最适退火温度。选取的 150 对 SSR 引物序列中共有 51 对成功扩增出清晰

条带(49 对产生与预期大小相同的条带,另 2 对产生条带较长)。对这 51 对引物进行双色荧光标记,利用荧光标记引物 PCR 扩增所有 24 个亚洲玉米螟 DNA 样品,然后对扩增产物进行基因分型。根据基因分型结果,其中 20 对引物(表 1)扩增的 DNA 条带在 6 个种群中都具有多态性。引物有效扩增率为 34%,其中多态性占 39.22%。

表 1 20 个微卫星标记在亚洲玉米螟 6 个种群中的多态性参数

Table 1 Polymorphism parameters of 20 microsatellite markers in 6 populations of <i>Ostrinia furnacalis</i>					
位点 Locus	等位基因数 No. of alleles	个体数 No. of samples	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态性 PIC
19	4	180	0.338 9	0.565 0	0.501 6
21	4	180	0.411 1	0.562 6	0.501 1
26	10	180	0.488 9	0.607 3	0.575 7
44	3	180	0.950 0	0.591 3	0.510 5
63	3	180	0.366 7	0.603 6	0.528 2
56	6	180	0.283 3	0.581 0	0.520 3
73	5	180	0.655 6	0.648 0	0.585 0
79	7	180	0.444 4	0.752 5	0.713 1
81	10	180	0.461 1	0.708 4	0.661 3
92	7	180	0.372 2	0.713 1	0.663 5
96	6	180	0.283 3	0.693 5	0.631 5
107	6	180	0.633 3	0.657 1	0.601 2
109	8	180	0.338 9	0.634 3	0.577 9
128	5	180	0.427 8	0.603 4	0.544 4
134	7	180	0.438 9	0.729 9	0.679 9
139	5	180	1.000 0	0.789 5	0.752 8
141	8	180	0.400 0	0.759 6	0.721 4
145	10	180	0.566 7	0.833 5	0.810 0
147	6	180	0.583 3	0.757 6	0.715 5
150	6	180	0.611 1	0.616 7	0.570 1
平均 Mean	6.3	180	0.502 8	0.670 4	0.618 3

2.3 遗传多样性

20 对微卫星引物在 6 个亚洲玉米螟种群中共检测到 126 个等位基因,平均值是 6.3 个(表 1)。最大值出现在位点 26、81、145 中,为 10 个;最小值出现在位点 44 和 63 中,为 3 个。观察杂合度变化范围在 0.283 3 到 1.000 0 之间,平均观察杂合度 0.489 2;期望杂合度变化范围从 0.562 6 到 0.833 5 之间,平均期望杂合度是 0.670 4。多态性参数在 0.501 1~0.810 0 之间,平均值为 0.618 3,都处于高度多态性。

6 个种群的表观杂合度(H_o) 在 0.463 3~0.550 0 之间;预期杂合度(H_e) 在 0.480 8~0.633 4 之间,平均值为 0.546 7;种群的多态位点百分率 P 均为 100%,同时表明这 20 个微卫星位点具有高度的多态性;种群的基因多样性指数 Nei’s 在 0.472 8~0.622 9 之间;香农信息指数(I) 在 0.856 3~1.193 4 之间(表 2)。

表 2 20 个微卫星位点在亚洲玉米螟 6 个种群的遗传变异参数¹⁾

Table 2 Summary of genetic variability of 20 microsatellite loci in 6 populations of *Ostrinia furnacalis*

种群 Population code	观测等位基因数 <i>N_a</i>	有效等位基因数 <i>N_e</i>	香农信息指数 <i>I</i>	基因多样性 <i>Nei's</i>	表观杂合度 <i>H_o</i>	预期杂合度 <i>H_e</i>	多态位点百分率/% <i>P</i>
ACB-AbR	4.150 0	2.143 3	0.880 0	0.472 8	0.463 3	0.480 8	100.00
ACB-AcR	3.750 0	2.106 6	0.856 3	0.478 7	0.480 0	0.486 8	100.00
ACB-BtS	4.500 0	2.571 9	1.036 4	0.558 5	0.545 0	0.567 9	100.00
ACB-AhR	4.550 0	2.369 0	1.005 1	0.531 0	0.486 7	0.540 0	100.00
ACB-FR	4.400 0	2.568 0	1.037 9	0.561 7	0.491 7	0.571 2	100.00
ACB-IeR	5.250 0	2.897 2	1.193 4	0.622 9	0.550 0	0.633 4	100.00
平均 Mean	4.433 3	2.442 7	1.001 5	0.537 6	0.502 8	0.546 7	100.00

1) *N_a*: Observed number of alleles; *N_e*: Effective number of alleles; *I*: Shannon's information index; *Nei's*: *Nei's* gene diversity; *H_o*: Observed heterozygosity; *H_e*: Expected heterozygosity; *P*: Percentage of polymorphic loci.

2.4 遗传分化分析

对于亚洲玉米螟种群整体而言,种群间分化系数 F_{st} 从 0.015 6~0.423 8,平均遗传分化系数为 0.195 9,其中位点 92 贡献显著。从种群间分化系数可知,亚洲玉米螟不同 Bt 抗性种群间的遗传变异约为 19.6%。

2.5 6 个种群的遗传相似度

使用 NTSYS-pc2.1 对 6 个种群的 *Nei's* 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,这些种群的遗传距离在 0.098 2~0.703 6。显示 6 个群体聚类分为两大分支,ACB-AbR 与 ACB-AcR 首先汇聚再与 ACB-BtS 聚为一支,ACB-FR 与 ACB-IeR 汇聚再与 ACB-AhR 聚为另一支(图 1)。

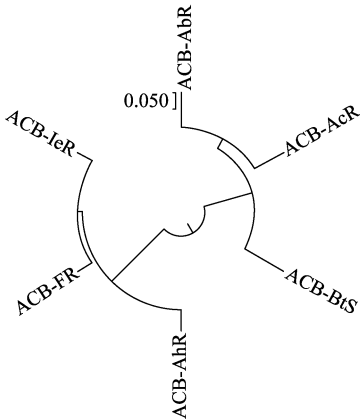


图 1 亚洲玉米螟 6 个种群间 *Nei's* 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram for 6 populations of *Ostrinia furnacalis* based on *Nei's* genetic distance

表 3 亚洲玉米螟 6 个种群中 *Nei's* 遗传相似度和遗传距离¹⁾

Table 3 *Nei's* genetic identity and genetic distance in 6 populations of *Ostrinia furnacalis*

种群 Population code	ACB-AbR	ACB-AcR	ACB-BtS	ACB-AhR	ACB-FR	ACB-IeR
ACB-AbR	****	0.807 8	0.714 0	0.587 5	0.494 8	0.523 4
ACB-AcR	0.213 4	****	0.796 0	0.593 5	0.528 5	0.598 9
ACB-BtS	0.336 9	0.228 2	****	0.562 9	0.518 5	0.574 1
ACB-AhR	0.531 9	0.521 8	0.574 6	****	0.879 4	0.876 2
ACB-FR	0.703 6	0.637 7	0.656 8	0.128 5	****	0.906 5
ACB-IeR	0.647 4	0.512 6	0.554 9	0.132 1	0.098 2	****

1) 表中对角线以上为遗传相似度,对角线以下为遗传距离。
Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

3 讨论

多态位点百分率 $P>50\%$ 时为高多态位点; $25\%<P\leq50\%$,则为中度多态位点;当 $P\leq25\%$ 时为低多态位点, P 是衡量遗传多样性的重要指标^[18]。本试验 20 个位点的 P 值均具有高多态性,可作为有效的遗传标记用于亚洲玉米螟不同 Bt 抗性种群的遗传多样性研究,同时说明亚洲玉米螟种群具有丰富的遗传多样性。

种群间杂合度的高低可以衡量种群的遗传分化

程度,其与种群遗传同一性成反比关系^[19]。本试验结果中,6 个种群的表观杂合度在 0.463 3~0.550 0 范围,预期杂合度在 0.480 8~0.633 4 范围,ACB-BtS 和 ACB-IeR 种群相对其他 Bt 抗性种群杂合度更高一些,表明这两个种群的遗传多样性相对更丰富。

种群的遗传分化系数 F_{st} 大小代表了种群间的遗传分化强弱程度,当 $0<F_{st}<0.05$ 时,种群遗传分化水平较小;当 $0.05<F_{st}<0.15$ 时,遗传分化水平中等;当 $F_{st}>0.15$ 时,遗传分化水平较大^[20]。本试验得到的 6 个种群的 F_{st} 在 0.015 6~0.423 8 之

间,平均为0.195 9,说明 6 个种群均有一定程度的遗传分化。种群遗传分化包括多方面的原因,如细胞突变、自然选择、环境因素等。本试验的 5 个亚洲玉米螟 Bt 抗性种群分别以亚洲玉米螟 Bt 敏感种群 ACB-BtS 为起始种群,以饲料中分别添加不同的 Bt 杀虫蛋白为胁迫因子,经多代汰选演化而来。饲养过程中添加的不同 Bt 蛋白是各种群演化的最大环境差异(胁迫)因素,故不同 Bt 蛋白这一环境因素是导致亚洲玉米螟产生不同 Bt 抗性遗传分化种群的主要原因。

Cry1Ab 和 Cry1Ac 的氨基酸序列相似性大于 85%,且在 N-末端有 49%~52%的氨基酸序列一致^[21-22],有研究表明这两种蛋白拥有一个共同的结合位点,存在较高的交互抗性^[23-24]。亚洲玉米螟不同 Bt 毒素抗性种群的遗传特征与交互抗性研究表明,Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素汰选的品系对这两种蛋白存在显著的高交互抗性^[25-26],说明二者对于亚洲玉米螟的胁迫汰选力相近似。Cry1F 汰选的抗性品系 ACB-FR 对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素的交互抗性水平显著低^[14]。Cry1Ie 汰选的抗性品系 ACB-IeR 对 Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry1Ah 毒素不存在交互抗性^[13]。Cry1Ah 汰选的抗性品系 ACB-AhR 对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 交互抗性较低,而对 Cry1F 的交互抗性较高^[15]。此外,Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素汰选下,亚洲玉米螟的抗性演化速率缓慢,汰选 14 代后的抗性提高仅 20~30 倍,而 Cry1Ie 和 Cry1F 汰选 7 代后的抗性倍数达到 400 倍以上(本实验室未发表数据)。从这些交互抗性模式和抗性演化规律的结果可以看出各 Bt 蛋白对于亚洲玉米螟胁迫之间的相似性。本研究结果揭示的各种群间的遗传相似性与交互抗性模式和抗性演化规律具有一致性,即 ACB-AhR 与 ACB-AcR 种群遗传关系相近,ACB-AhR 与 ACB-FR、ACB-IeR 种群遗传相似性较远。本研究发现的 SSR 位点可作为亚洲玉米螟不同 Bt 毒素抗性种群准确的分子检测方法,亦为今后 Bt 玉米商业化种植后,建立田间抗性监测项目所需的标准、简易的抗性检测技术提供了科学支撑。

参考文献

- [1] MCGAUGHEY W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. *Science*, 1985, 229(4709): 193-195.
- [2] MCGAUGHEY W H, BEEMAN R W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1988, 81(1): 28-33.
- [3] MÜLLERCOHN J, CHAUFAX J, BUISSON C, et al. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIC and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1996, 89(4): 791-797.
- [4] ESTADA U, FERRE J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(10): 3840-3846.
- [5] MOAR W J, PUSZTAICAREY M, FAASSEN H V, et al. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1995, 61(6): 2086-2092.
- [6] GOULD F, MARTINEZ-RAMIREZ A, ANDERSON A, et al. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(17): 7986-7990.
- [7] LEE M K, RAJAMOCHAN F, GOULD F, et al. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1995, 61(11): 3836-3842.
- [8] STONE T B, SIMS S R, MARRONE P G. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens*, containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 53(2): 228-234.
- [9] 梁草梅, 谭维嘉. 棉铃虫 Bt 抗性种群的 RAPD-PCR 初步分析 [J]. *植物保护*, 2000, 26(3): 4-6.
- [10] 雷仲仁, 郭予元, 李莉, 等. 棉铃虫抗药性种群的 RAPD 分析 [C]//植物保护 21 世纪展望暨全国青年植物保护科技工作者学术研讨会, 1998: 548-550.
- [11] 潘志萍, 曾玲, 温福洋. 桔小实蝇抗性品系的微卫星 DNA 分析 [J]. *昆虫学报*, 2006, 49(5): 874-877.
- [12] ZHANG Tiantao, HE Mingxia, GATEHOUSE A M R, et al. Inheritance patterns, dominance and cross-resistance of Cry1Ab and Cry1Ac-selected (Guenée) [J]. *Bautechnik*, 2014, 74(6): 395-400.
- [13] WANG Yueqin, YANG Jing, QUAN Yudong, et al. Characterization of Asian corn borer resistance to Bt toxin Cry1Ie [J]. *Toxins*, 2017, 9(6): 186.
- [14] WANG Yueqin, WANG Yidong, WANG Zhenying, et al. Genetic basis of Cry1F-resistance in a laboratory selected Asian corn borer strain and its cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* toxins [J/OL]. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0161189.
- [15] SHABBIR M Z, QUAN Yudong, WANG Zhenying, et al. Characterization of the Cry1Ah resistance in Asian corn borer and its cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 234.

- [17] 金鑫,蔡林运,李刚华,等. 小麦秸秆全量还田对水稻生长及稻田氧化还原物质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2013(5): 80-84.
- [18] ZHANG Fan, SUI Ning, YU Chaorun, et al. Effects of wheat straw returning and potassium fertilizer application on yield and nutrients uptake of cotton [J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(12): 2169.
- [19] 侯颖,徐建强,宋宇州,等. 三种杀菌剂对牡丹黑斑病菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响[J]. 植物保护学报, 2014, 41(6): 367-372.
- [20] CLASSEN A T, BOYLE S I, HASKINS K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 319-328.
- [21] 靳百慧,杨羚钰,徐玉龙,等. 三七收获后不同年限土壤微生物代谢多样性分析[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(3): 284-292.
- [22] GRIZZLE H W, ZAK J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity on nitrogen substrates [J]. Mycologia, 2017, 98(2): 353-363.
- [23] ROGERS B F, TATE R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(10): 1389-1401.
- [24] 王光飞,马艳,郭德杰,等. 不同用量秸秆生物炭对辣椒疫病防控效果及土壤性状的影响[J]. 土壤学报, 2017, 54(1): 204-214.
- [25] 李志裴,王广军,谢俊,等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1985-1994.
- [26] 杜滢鑫,鞋宝明,蔡洪生,等. 大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构及功能多样性[J]. 生态学报, 2016, 36(3): 740-747.
- [27] 邹春娇,齐明芳,马建,等. Biolog ECO 解析黄瓜连作营养基质中微生物群落结构多样性特征[J]. 中国农业科学, 2016, 49(5): 942-951.
- [28] GROVE J A, KAUTOLA H, JAVADPOUR S, et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18(2): 111-114.
- [29] 张锋,李新华,张凤云,等. 玉米秸秆还田与氮肥互作对不同类型小麦产量和品质的影响[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 103-106.
- [30] 陈尚洪,朱钟麟,吴捷,等. 紫色土丘陵区秸秆还田的腐解特征及对土壤肥力的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(6): 141-144.
- [31] 李贵,冒宇翔,沈俊明,等. 小麦秸秆还田方式对水稻田杂草化学防治效果及水稻产量的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(5): 1102-1109.
- [32] DEGENSA B P, SCHIPPER L A, SPARLING G P, et al. Decreases in organic c reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(2): 189-196.
- [33] ZHENG Liping, LONG Tao, LIN Yusuo, et al. Biolog-ECO analysis of microbial community functional diversity in organochlorine contaminated soil [J]. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 2013, 19(5): 759-765.
- [34] WEBER K P, GROVE J A, GEHDER M, et al. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(3): 461-469.
- [35] 董立国,袁汉民,李生宝,等. 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2): 444-446.
- [36] 罗希茜,郝晓晖,陈涛,等. 长期不同施肥对稻田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(2): 740-748.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 107 页)

- [16] 贺明霞,何康来,王振营,等. Cry1Ie 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[J]. 昆虫学报, 2013, 56(10): 1135-1142.
- [17] NEI M. Genetic distance between populations [J]. American Naturalist, 1972, 106(949): 283-292.
- [18] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [19] 李伟丰,杨朗,唐侃,等. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1255-1262.
- [20] BALLOUX F, LUGON-MOULIN N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155-165.
- [21] CHAMBERS J A, JELEN A, GILBERT M P, et al. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(13): 3966-3976.
- [22] HÖFTE H, WHITELEY H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiological Reviews, 1989, 53(2): 242-255.
- [23] DENOLF P, JANSSENS S, PEFEROEN M, et al. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1828-1837.
- [24] WOLFERSBERGER M G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins [J]. Experientia, 1990, 46(5): 475-477.
- [25] XU Lina, WANG Zhenying, ZHANG Jie, et al. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other cry toxins [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 134(5): 429-438.
- [26] JIANG Fan, ZHANG Tiantao, BAI Shuxiong, et al. Evaluation of Bt corn with pyramided genes on efficacy and insect resistance management for the Asian corn borer in China [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(12): e0168442.

(责任编辑: 田 喆)