

Cry 类和 Vip3Aa 类 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟的毒力和增效作用

胡小华^{1,2}, 王振营², 何康来², 解海翠^{1*}, 王月琴^{2*}

(1. 河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066600; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害综合治理全国重点实验室, 北京 100193)

摘要 筛选对靶标害虫高效的 Bt 杀虫蛋白、评价蛋白组合对靶标害虫的杀虫作用, 对于转基因抗虫新品种的研发具有重要的指导意义。本文采用人工饲料混合法评价了 Cry1Ab、Cry1Fa、Cry1Ca、Cry1Ba、Cry2Aa、Vip3Aa11、Vip3Aa20、Vip3Aa19 共 8 种 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟的毒力; 同时评估了 Cry1Ab/Vip3Aa19、Cry1Fa/Vip3Aa19 混合蛋白对亚洲玉米螟的杀虫作用, 筛选出毒力最佳的组合比例。结果表明: Cry1Ab、Cry1Fa、Cry2Aa 对亚洲玉米螟的 LC_{50} 在 0.24~0.72 $\mu\text{g/g}$ 之间, 其中 Cry1Ab 的毒力最强, 显著高于 Cry1Fa 和 Cry2Aa 蛋白, Cry1Fa 与 Cry2Aa 毒力无显著性差异。Cry1Ca、Cry1Ba、Vip3Aa11、Vip3Aa20、Vip3Aa19 对亚洲玉米螟的 LC_{50} 均大于 50 $\mu\text{g/g}$ 。当 Cry1Ab/Vip3Aa19、Cry1Fa/Vip3Aa19 混合比例为 1:1 时, 增效作用最强, 增效因子分别为 3.18 和 1.58。本研究结果为多价转基因玉米的研发提供了重要依据。

关键词 Bt; Cry; Vip3Aa; 亚洲玉米螟

中图分类号: S 433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021671

Insecticidal activity and synergism of combinations of *Bacillus thuringiensis* Cry and Vip3Aa against *Ostrinia furnacalis*

HU Xiaohua^{1,2}, WANG Zhenying², HE Kanglai², XIE Haicui^{1*}, WANG Yueqin^{2*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Selection of Bt toxin with high efficiency and evaluation of insecticidal effects between toxins against target pests is very important for development of new transgenic insect-resistant varieties. We evaluated the toxicities of Cry1Ab, Cry1Fa, Cry1Ca, Cry1Ba, Cry2Aa, Vip3Aa11, Vip3Aa19 and Vip3Aa20 against *Ostrinia furnacalis* by diet-incorporation bioassay, as well as the possible interaction between Cry1Ab and Vip3Aa19, Cry1Fa and Vip3Aa19 toxins, and select the proportion of the best combination of toxins. The LC_{50} values of Cry1Ab, Cry1Fa and Cry2Aa ranged from 0.24 to 0.72 $\mu\text{g/g}$. Among them, Cry1Ab had the highest toxicity, significantly different from Cry1Fa and Cry2Aa, and Cry1Fa and Cry2Aa had no significant difference. The LC_{50} values for Cry1Ca, Cry1Ba, Vip3Aa11, Vip3Aa20 and Vip3Aa19 were all higher than 50 $\mu\text{g/g}$. When bioassays were performed with toxin mixture at the ratio of 1:1, the Cry1Ab/Vip3Aa19 and Cry1Fa/Vip3Aa19 showed synergistic effect, with synergism factors of 3.18 and 1.58, respectively. The above results could be useful for developing of pyramided transgenic maize.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Cry; Vip3Aa; *Ostrinia furnacalis*

自 1996 年美国首次批准商业化种植转基因抗虫玉米防治欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 以来, 转

基因作物在全球范围内已经连续种植 25 年。截至 2019 年, 全球 26 个国家种植了 1.904 亿 hm^2 转基

收稿日期: 2021-11-30

修订日期: 2022-03-05

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2021ZX08013001); 河北省高等学校科学技术研究项目(BJ2020049)

* 通信作者 E-mail: 解海翠 hcxie2008@126.com; 王月琴 wangyueqin@caas.cn

因作物^[1]。转基因抗虫作物不仅有效防治了靶标害虫,减少了杀虫剂的使用量,而且保护了天敌和生物多样性,增加了农民的收入^[2-4]。然而,转基因作物的大面积推广使靶标害虫长期处于一定的筛选压力之下,导致田间抗性种群的产生,如亚澳白裙夜蛾 *Busseola fusca* 和地中海玉米蛀茎夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 对 Cry1Ab、西部玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 对 Cry3Bb1、小蔗螟 *Diatraea saccharalis* 对 Cry1F 和 Cry1A.105 等^[5-8]。

第一代转基因玉米主要表达 Cry1Ab 蛋白(‘MON810’‘Bt11’‘Bt176’)、Cry1Ac 蛋白(‘DBT-418’)、Cry1F 蛋白(‘TC1507’)、Cry9C 蛋白(‘CHB-351’);第二代转基因抗虫作物是将两个或者多个基因同时导入同一植株内,用来防治同一种害虫,达到延缓抗性产生、扩大杀虫谱的目的^[9]。如‘MON89034’(表达 Cry2Aba/Cry1A.105 蛋白)、‘MON88017’(表达 Cry1Fa/Cry1Ab 蛋白)、‘Bt11×MIR162’(表达 Cry1Ab/Vip3Aa20 蛋白)等^[10]。选择蛋白组合时,不仅要考虑蛋白的互补性、蛋白结合受体位点的能力,同时需要考虑蛋白间的协同增效作用或拮抗作用^[11]。增效作用能提高防治效力,达到 1+1>2 的效果;相反,拮抗作用削弱了聚合多种 Bt 杀虫蛋白的优势,降低防治效果。蛋白之间的相互作用可以通过评价单个蛋白的毒力和蛋白混合物的毒力效果来判断^[12]。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 是为害我国玉米的重要害虫,对玉米生产和农业安全造成严重的威胁^[13-14]。室内生测表明多种 Cry1 类蛋白对玉米螟具有较高的毒力,如 Cry1Aa、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1Ie^[15-17]等;田间抗性鉴定结果表明转基因抗虫玉米‘Bt799’‘Bt11’和‘MON810’对亚洲玉米螟有很高的杀虫效果和良好的田间抗螟性^[18-20]。草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是世界性重大迁飞害虫,自 2019 年 1 月入侵我国云南省后,进一步蔓延扩散至黄淮海夏玉米主产区,对我国玉米等作物生产安全构成严重威胁。室内生测结果表明:转 *cry1Ab* 基因玉米和转 *cry1Ab/vip3Aa* 玉米对草地贪夜蛾具有良好的控制效果^[21]。2020 年 1 月 21 日,国产转基因抗虫玉米‘DBN9936’(表达 Cry1Ab 蛋白)和‘瑞丰 125’(表达 Cry1Ab 和 Cry2Aj 蛋白)获得了在北方春玉米区的生产应用安全证书;2021

年 1 月 11 日,‘DBN9936’扩区审批至黄淮海夏玉米区、西南玉米区、南方玉米区。2021 年,农业农村部对转基因玉米开展了产业化试点。

Cry1Ab、Cry1Fa 和 Vip3A 是目前国际上商业化应用最广泛的防治鳞翅目害虫的转基因抗虫玉米表达的 Bt 杀虫蛋白,因此,本文评估了 8 种杀虫蛋白(Cry1Ab、Cry1Fa、Cry1Ba、Cry1Ca、Cry2Aa、Vip3Aa11、Vip3Aa19、Vip3Aa20)和 2 个组合(Cry1Ab/Vip3Aa19、Cry1Fa/Vip3Aa19)对亚洲玉米螟的毒力,筛选出 Cry1Ab 和 Cry1Fa 分别与 Vip3Aa19 组合的最佳毒力的比例,为多价转基因玉米的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟室内敏感种群:原始种群于 2015 年 6 月采集自吉林省松原市普通玉米种植田,在室内无琼脂人工饲料^[22]上连续饲养多代,饲养过程中未接触任何杀虫剂或 Bt 杀虫蛋白。

幼虫在温度(27±1)℃、相对湿度 70%~80%、光周期 L//D=16 h//8 h 的条件下饲养。

1.2 供试 Bt 杀虫蛋白

Cry1Ab、Cry1Fa、Cry1Ca、Cry1Ba、Cry2Aa 活化蛋白购自北京乐士宁科技有限公司(由美国 Case Western Reserve University 的 Marianne P. Carey 实验室生产,经胰蛋白酶活化的毒素),纯度为 98% 的白色粉末晶体,均用 50 mmol/L、pH=10 的 Na₂CO₃ 溶解。Vip3Aa19、Vip3Aa20 分别由北京大北农生物技术有限公司和先正达生物科技有限公司提供,均用 1 mmol/L、pH=10 的 PBS 溶解。Vip3Aa11 购自美延(北京)农业科技有限责任公司,用 1 mmol/L、pH=10 的 PBS 溶解。

1.3 毒力测定

采用人工饲料混合法测定 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟幼虫的毒力,人工饲料配方具体参考宋彦英等^[22]。主要步骤如下:

1)将 Bt 杀虫蛋白设置 6~9 个浓度梯度,保证幼虫死亡率在 10%~90%。Cry1Ab 和 Cry1Fa 的浓度设置为 0、0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5 μg/g;Cry2Aa 的浓度设置为 0、0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、12.5、25.0 μg/g;Cry1Ba、Cry1Ca、Vip3Aa11、Vip3Aa19、Vip3Aa20

的浓度设置为 0、0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/g}$ 。

2)混合蛋白与饲料。将对应剂量的蛋白加入蒸馏水中,混合均匀后与无琼脂半人工干粉饲料搅拌混匀,同时设置蒸馏水作为空白对照。

3)接入幼虫并封口。将混合均匀的人工饲料分装到 48 孔培养板中,每孔用毛笔挑入 1 头初孵幼虫(孵化时间<12 h),每个蛋白浓度 3 个重复,每个重复 48 头,共 144 头。然后用封口膜覆盖(Cat # 3M-9733, Minnesota Mining and Manufacturing Company, Minnesota, USA),防止试虫逃逸。并用解剖针扎孔,保证空气流通,避免湿度太大造成幼虫死亡。

4)饲养并调查结果。将所有培养板放置在温度(27±1)℃、相对湿度 70%~80%、光周期 L//D=16 h//8 h 的培养箱内,饲养期间无需更换或添加饲料,7 d 后调查试验结果,记录每板幼虫死亡数量。幼虫死亡评判标准:用毛笔轻触虫体尾部,虫体无反应或单头存活幼虫体重<0.1 mg。

1.4 数据统计与分析

用对数-几率值法模拟剂量-死亡率反应曲线,统计计算过程采用 PoloPlus Probit 软件。根据 95%置信区间判断差异性,如果置信区间有重叠,则无显著差异;如果置信区间无重叠,则有显著差异。

通过比较实际死亡率和预期死亡率,评价 Cry 类和 Vip3A 类蛋白间的相互作用。预期死亡率是在两

种蛋白间不存在相互作用且独立发挥作用的假设下得到的死亡率^[23]。根据 Tabashnik 的方法^[11]:

$$LC_{50(m)} = \frac{1}{\frac{r_a}{LC_{50(a)}} + \frac{r_b}{LC_{50(b)}}}$$

其中, $LC_{50(m)}$: 混合蛋白预期致死中浓度; $LC_{50(a)}$ 和 $LC_{50(b)}$ 分别是蛋白 a 和蛋白 b 对靶标害虫的致死中浓度; r_a 和 r_b 分别是 a 蛋白和 b 蛋白在混合蛋白中的比例。增效因子(synergism factor, SF)按如下公式计算:

$$SF = \frac{LC_{50(m)}}{LC_{50}}$$

其中, LC_{50} 为混合蛋白对靶标害虫的实际致死中浓度。当 $SF > 1$ 时,表现为增效作用;当 $SF = 1$ 时,表现为叠加作用;当 $SF < 1$ 时,表现为拮抗作用。

2 结果与分析

2.1 8 种 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟的毒力

8 种 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟幼虫的毒力测定结果如表 1 所示。 LC_{50} 从 0.24 $\mu\text{g/g}$ 到大于 50 $\mu\text{g/g}$,其中 Cry1Ab 对亚洲玉米螟的毒力最强, LC_{50} 仅为 0.24 $\mu\text{g/g}$ 。Cry1Fa 和 Cry2Aa 对亚洲玉米螟的毒力显著低于 Cry1Ab, LC_{50} 分别为 0.52 $\mu\text{g/g}$ 和 0.72 $\mu\text{g/g}$,但是两种蛋白的毒力不存在显著差异。Cry1Ba、Cry1Ca、Vip3Aa11、Vip3Aa19、Vip3Aa20 对亚洲玉米螟的致死效果差, LC_{50} 均大于 50 $\mu\text{g/g}$ (表 1)。

表 1 8 种 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟幼虫的毒力

Table 1 Toxicity of eight Bt toxins to *Ostrinia furnacalis* larvae

Bt 蛋白 Bt protein	试虫数/头 Insect number	LC_{50} (95%FL)/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	LC_{95} (95%FL)/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	斜率±标准误 Slope±SE	χ^2	df
Cry1Ab	672	0.24 (0.17~0.31)	2.22 (1.60~3.57)	1.71±0.19	6.3	12
Cry1Fa	864	0.52 (0.36~0.70)	8.96 (6.37~13.86)	1.33±0.11	6.4	16
Cry2Aa	768	0.72 (0.48~1.01)	8.24 (5.97~12.25)	1.21±0.11	8.1	14
Cry1Ba	864	>50	—	—	—	—
Cry1Ca	864	>50	—	—	—	—
Vip3Aa11	864	>50	—	—	—	—
Vip3Aa19	864	>50	—	—	—	—
Vip3Aa20	864	>50	—	—	—	—

2.2 Cry1Ab 和 Vip3Aa19 蛋白混合后对亚洲玉米螟的毒力

为了进一步明确 Cry1Ab 和 Vip3Aa19 之间的相互作用,评价了两种蛋白在不同混合比例下对亚洲玉米螟初孵幼虫的毒力,结果见表 2。当 Cry1Ab

和 Vip3Aa19 混合的比例分别为 1:1 和 1:2 时, SF 分别为 3.18 和 1.32,均大于 1,表明存在增效作用。其他比例组合的实际 LC_{50} 均高于预期 LC_{50} , SF 值范围为 0.49~0.96,说明存在一定的拮抗作用。

表 2 Cry1Ab 和 Vip3Aa19 蛋白混合对亚洲玉米螟幼虫的毒力

Table 2 Toxicity of combinations of Cry1Ab and Vip3Aa19 to *Ostrinia furnacalis* larvae

Bt 蛋白 Bt protein	比例 Ratio	试虫数/头 Insect number	LC ₅₀ (95%FL)/μg·g ⁻¹		斜率±标准误 Slope±SE	χ ²	df	SF
			实际值 Observed value	预期值 Expected value				
Cry1Ab/Vip3Aa19	1:0	768	0.24 (0.17~0.31)	—	1.71±0.19	6.3	12	—
Cry1Ab/Vip3Aa19	5:1	864	0.54 (0.42~0.67)	0.29	2.10±0.21	8.9	16	0.53
Cry1Ab/Vip3Aa19	2:1	864	0.74 (0.55~0.93)	0.36	1.75±0.17	6.5	16	0.49
Cry1Ab/Vip3Aa19	1:1	768	0.15 (0.01~0.21)	0.48	1.41±0.14	10.1	14	3.18
Cry1Ab/Vip3Aa19	1:2	768	0.54 (0.40~0.69)	0.71	1.67±0.18	8.1	14	1.32
Cry1Ab/Vip3Aa19	1:5	768	1.47 (1.18~1.76)	1.41	2.25±0.23	9.5	14	0.96
Cry1Ab/Vip3Aa19	0:1	864	>50	—	—	—	—	—

2.3 Cry1Fa 和 Vip3Aa19 蛋白混合对亚洲玉米螟的毒力

Cry1Fa/Vip3Aa19 在不同混合比例下对亚洲玉米螟初孵幼虫的毒力测定结果表明:当 Cry1Fa/Vip3Aa19 混合比例为 1:1 和 1:2 时,实际 LC₅₀ 均低

于预期 LC₅₀,SF 分别为 1.58 和 1.32,均大于 1,存在较弱的增效作用。当两种蛋白的混合比例为 5:1 时,SF 为 1,表现为简单的相加作用。当两种蛋白的混合比例为 2:1 和 1:5 时,SF 均小于 1,说明存在一定的拮抗作用(表 3)。

表 3 Cry1Fa 和 Vip3Aa19 蛋白混合对亚洲玉米螟幼虫的毒力

Table 3 Toxicity of combinations of Cry1Fa and Vip3Aa19 to *Ostrinia furnacalis* larvae

Bt 蛋白 Bt protein	比例 Ratio	试虫数/头 Insect number	LC ₅₀ (95%FL)/μg·g ⁻¹		斜率±标准误 Slope±SE	χ ²	df	SF
			实际值 Observed value	预期值 Expected value				
Cry1Fa/Vip3Aa19	1:0	864	0.52 (0.36~0.70)	—	1.33±0.11	6.4	16	—
Cry1Fa/Vip3Aa19	1:1	552	0.65 (0.39~0.91)	1.03	1.79±0.28	9.5	21	1.58
Cry1Fa/Vip3Aa19	5:1	600	0.62 (0.33~1.04)	0.62	0.83±0.08	4.4	23	1.00
Cry1Fa/Vip3Aa19	2:1	576	0.82 (0.33~1.41)	0.78	1.17±0.18	8.2	22	0.95
Cry1Fa/Vip3Aa19	1:2	624	1.16 (0.63~1.78)	1.53	1.40±0.18	9.0	24	1.32
Cry1Fa/Vip3Aa19	1:5	696	4.00 (2.41~5.59)	2.97	1.68±0.25	9.8	27	0.74
Cry1Fa/Vip3Aa19	0:1	864	>50	—	—	—	—	—

3 结论与讨论

不同 Bt 杀虫蛋白的杀虫谱不同,且对靶标害虫的毒力不同。因此,在研发转基因作物时,有必要评估不同 Bt 杀虫蛋白对靶标害虫的毒力。本文采用饲料混合法评价了 8 种 Bt 杀虫蛋白对亚洲玉米螟的毒力,其中 Cry1Ab 对玉米螟初孵幼虫的毒力效果最好,显著高于另外 7 种蛋白。Cry1Ab 除了对亚洲玉米螟具有较强的毒力外,对其他鳞翅目害虫也具有较强的毒力,包括欧洲玉米螟、小菜蛾 *Plutella xylostella*、草地贪夜蛾等^[24-26]。1996 年,以欧洲玉米螟和巨座玉米螟 *D. grandiosella* 为靶标害虫的转单价 Bt 玉米在美国商业化种植,包括转 *cry1Ab* 玉米(‘Bt11’‘MON810’)和转 *cry1Ac* 玉米(‘DBT-418’)^[9]。2002 年,为了扩大杀虫谱、延缓抗性产

生,美国和澳大利亚率先批准种植转双价基因棉花 ‘Bollgard II’(表达 Cry1Ac/Cry2Ab 蛋白)防治美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和棉铃虫 *H. armigera*。2011 年,阿根廷开始种植 ‘Bt11×MIR162’,主要防治草地贪夜蛾、小蔗螟等鳞翅目害虫^[8,27-28]。前期研究结果表明,Vip3Aa 对黏虫 *Mythimna separata*、草地贪夜蛾、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 等鳞翅目害虫均具有较好的毒力^[29-31],本研究结果显示 Cry1Ba、Cry1Ca、Vip3Aa 对亚洲玉米螟没有毒力,可能是因为这些蛋白在玉米螟幼虫中肠上不存在相应的特异性结合位点。但是 Vip3Ca 对亚洲玉米螟敏感品系和 Cry1Ab 抗性品系均具有很好的毒力^[32]。该试验结果为新基因的挖掘、转基因作物的研发提供了重要的参考信息。

随着转基因作物的不断推广,靶标害虫的抗性

问题引起越来越多的重视。但在选择多个基因叠加时,不仅要考虑单个基因的毒力,还要考虑蛋白之间的相互作用^[11, 33]。多个研究表明,当 Cry 类和 Vip 类蛋白混合时,存在增效、拮抗或者叠加作用。Bergamasco 等^[34]报道了 Cry1Ia10 和 Vip3Aa 相互作用的物种特异性。体外竞争结合试验表明,在草地贪夜蛾体内,Cry1Ia10 和 Vip3Aa 具有不同的结合位点,表现为增效作用。在灰翅夜蛾 *S. eridania* 体内,两种蛋白竞争结合同一个受体位点,表现为明显的拮抗作用^[34]。Cry9Aa 和 Vip3Aa 蛋白在水稻二化螟 *Chilo suppressalis* 体内存在特异性结合并具有不同的受体结合位点是协同增效作用的主要因素^[35]。本研究发现当 Cry1Ab 和 Vip3Aa19、Cry1Fa 和 Vip3Aa19 为 1:1 混合时,表现为增效作用,表明共表达两种蛋白将提高转基因作物对亚洲玉米螟的防治效果,延缓抗性的产生。Vip3Aa 和 Cry1Ab 对草地贪夜蛾具有显著的增效作用^[36]; Cry1Fa 和 Vip3Aa19 对黏虫亦有显著的增效作用^[30, 37]。除了受体位点的不同,蛋白间氨基酸序列的差异也可能是产生增效作用的原因^[38]。同种蛋白组合的相互作用可能因为受试靶标的不同而不同。比如 Cry1Ca 和 Vip3Aa 对草地贪夜蛾表现为拮抗作用,而对小蔗螟表现为增效作用。

不同蛋白组合的增效作用是提高蛋白毒力的方法之一。评价混合蛋白的相互作用,利用启动子调控 Bt 杀虫蛋白的表达量,可以最大程度地提高转基因作物的抗虫作用,实现转基因作物与 Bt 生物资源的可持续利用。本研究结果将为中国的转基因玉米研发提供基础数据,促进转基因玉米的可持续应用。

参考文献

- [1] ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019; biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier [R]. ISAAA Brief No. 55. ISAAA; Ithaca, NY.
- [2] CARRIERE Y, ELLERS-KIRK C, SISTERSON M, et al. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1519–1523.
- [3] WU Kongming, LU Yanhui, FENG Hongqiang et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton [J]. Science, 2008, 321(5896): 1676–1678.
- [4] CARPENTER J E. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(4): 319–321.
- [5] VAN RENSBURG J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize [J]. South African Journal of Plant and Soil, 2007, 24(3): 147–151.
- [6] CAMARGO A M, ANDOW D A, CASTAÑERA P, et al. First detection of a *Sesamia nonagrioides* resistance allele to Bt maize in Europe [J/OL]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 41954. DOI: 10.1038/s41598-41018-21943-41594.
- [7] ZUKOFF S N, OSTLIE K R, POTTER B, et al. Multiple assays indicate varying levels of cross resistance in Cry3Bb1-selected field populations of the western corn rootworm to mCry3A, eCry3. 1Ab, and Cry34/35Ab1 [J]. Journal of Economic Entomology, 2016, 109(3): 1387–1398.
- [8] GRIMI D A, PARODY B, RAMOS M L, et al. Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina [J]. Pest Management Science, 2018, 74(4): 905–913.
- [9] 何康来, 王振营. 草地贪夜蛾对 Bt 玉米的抗性与治理对策思考[J]. 植物保护, 2020, 46(3): 1–15.
- [10] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2014 [R]. ISAAA Briefs, 2014(49): vi+259.
- [11] TABASHNIK B E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3343–3346.
- [12] HATZIOS K. Interactions of herbicides with other agrichemicals in higher plants [J]. Reviews of Weed Science, 1985, 1: 1–63.
- [13] 周大荣. 我国玉米螟的发生、防治与研究进展[J]. 植保技术与推广, 1996(2): 38–40.
- [14] 王振营, 鲁新, 何康来, 等. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望[J]. 沈阳农业大学学报, 2000(5): 402–412.
- [15] TAN S Y. Comparative susceptibility and binding of Cry1 *Bacillus thuringiensis* toxins to the Asian (*Ostrinia furnacalis* Guenée) and European (*Ostrinia nubilalis* Hübner) corn borers (Lepidoptera: Crambidae) [D]. Lincoln: The University of Nebraska, 2010.
- [16] SHABBIR M Z. 亚洲玉米螟 Cry1Ah 抗性遗传规律与分子基础研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [17] 江帆. 复合 Bt cry1Ac 和 cry1Ie 抗虫玉米抗螟性及其在 IRM 中的作用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [18] 王月琴, 何康来, 江帆, 等. BT799 玉米对亚洲玉米螟抗性研究[J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(3): 636–642.
- [19] JIANG Fan, ZHANG Tiantao, BAI Shuxiong, et al. Evaluation of Bt corn with pyramided genes on efficacy and insect resistance man-

- agement for the Asian corn borer in China [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11 (12): e0168442. DOI: 0168410.0161371/journal.pone.0168442.
- [20] RASCO JR E T, MANGUBAT J R, BURGONIO A B, et al. Efficacy of insect protected maize (Bt11) against Asiatic corn borer (*Ostrinia furnacalis* Guenée) [J]. Philippine Journal of Crop Science, 2008, 33(3): 82–89.
- [21] 张丹丹, 吴孔明. 国产 Bt-Cry1Ab 和 Bt-(Cry1Ab+Vip3Aa) 玉米对草地贪夜蛾的抗性测定[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 54–60.
- [22] 宋彦英, 周大荣, 何康来. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用[J]. 植物保护学报, 1999, 26(4): 324–328.
- [23] FINNEY D J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1952.
- [24] SAYYED A H, GATSI R, IBIZA-PALACIOS M S, et al. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6863–6869.
- [25] CRESPO A L, SPENCER T A, TAN S Y, et al. Fitness costs of Cry1Ab resistance in a field-derived strain of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2010, 103(4): 1386–1393.
- [26] XIA Yaomin, LU Yanhui, SHEN Jun, et al. Resistance monitoring for eight insecticides in *Plutella xylostella* in central China [J]. Crop Protection, 2014, 63: 131–137.
- [27] SIGNORINI A M, ABRATTI G, GRIMI D, et al. Management of field-evolved resistance to Bt maize in Argentina: a multi-institutional approach [J/OL]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018, 6. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00067.
- [28] TRIGO E J, CAPE E J. Ten years of genetically modified crops in Argentine agriculture [R]. ArgenBio Report, 2006: 1–52.
- [29] PICKETT B R, GULZAR A, FERRÉ J, et al. *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin resistance in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J/OL]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(9): e03506–e03516. DOI: 03510.01128/AEM.03506-03516.
- [30] YANG Jing, QUAN Yudong, SIVAPRASATH P, et al. Insecticidal activity and synergistic combinations of ten different Bt toxins against *Mythimna separata* (Walker) [J/OL]. Toxins, 2018, 10(11): 454. DOI: 410.3390/toxins10110454.
- [31] 李国平, 姬婷婕, 孙小旭, 等. 入侵云南草地贪夜蛾种群对 5 种常用 Bt 蛋白的敏感性评价[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 15–20.
- [32] GOMIS-CEBOLLA J, WANG Yueqin, QUAN Yudong, et al. Analysis of cross-resistance to Vip3 proteins in eight insect colonies, from four insect species, selected for resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 155: 64–70.
- [33] CARRIÈRE Y, CRICKMORE N, TABASHNIK B E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 161–168.
- [34] BERGAMASCO V, MENDES D, FERNANDES O, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2013, 112(2): 152–158.
- [35] WANG Zeyu, FANG Longfa, ZHOU Zishan, et al. Specific binding between *Bacillus thuringiensis* Cry9Aa and Vip3Aa toxins synergizes their toxicity against Asiatic rice borer (*Chilo suppressalis*) [J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(29): 11447–11458.
- [36] FIGUEIREDO C S, LEMES A N, SEBASTIÃO I, et al. Synergism of the *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2, and Vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 188(3): 798–809.
- [37] LEMES A R N, DAVOLOS C C, LEGORI P C B C, et al. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda* [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e107196. DOI: 107110.101371/journal.pone.0107196.
- [38] WIRTH M C, DELÉCLUSE A, WALTON W E. Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3280–3284.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 309 页)

- [17] 蒋素容, 刘琦, 王巧, 等. 几种防治措施对橘小实蝇防效的研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(10): 2006–2009.
- [18] 李国平, 边全乐, 何衍彪, 等. 三华李橘小实蝇诱杀试验初报[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 170–172.
- [19] 汪末根, 古成彬, 刘灵敏, 等. 桃园橘小实蝇不同防治方法效果评价[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(3): 567–569.
- [20] 张艳, 林明光, 汪兴鉴, 等. 甲基丁香酚和蛋白饵剂添加不同杀虫剂诱杀桔小实蝇的效果[J]. 中国南方果树, 2013, 42(3): 72–74.
- [21] 郑思宁, 黄居昌, 叶光禄, 等. 应用寄生蜂和不育雄虫防控田间橘小实蝇[J]. 生态学报, 2013, 33(6): 1784–1790.
- [22] 于文惠. 桔小实蝇对几种寄主果实的选择和嗅觉学习行为[D]. 重庆: 西南大学, 2013.

(责任编辑: 田 喆)