

Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾低龄幼虫的抗性

路献勇, 张 帅, 吕丽敏, 雒珺瑜, 王春义, 崔金杰*

中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000

摘要:【背景】在我国, 由于 Bt 棉的种植, 棉铃虫和红铃虫等靶标害虫得到了控制, 但棉田其他鳞翅目害虫如甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的危害仍较严重。美国商业化种植的双价棉 Bollgard II 所表达的 Cry2Ab 蛋白不仅对棉铃虫有较好的控制效果, 而且对甜菜夜蛾和草地贪夜蛾有较好的控制作用。因此, 该双价棉在我国被环境释放前, 有必要研究其对棉田其他鳞翅目害虫的影响。【方法】在人工饲料中分别添加质量浓度为 1.25、2.5、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 Cry2Ab 蛋白, 采用生物测定的方法, 在室内研究了其对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾低龄幼虫存活率和体质量抑制率的影响。【结果】随着 Cry2Ab 蛋白浓度的增大, 甜菜夜蛾初孵幼虫和 1 龄幼虫的存活率逐渐降低, 2 龄幼虫和 3 龄幼虫以及斜纹夜蛾各龄期幼虫的存活率在不同浓度处理下与对照差异均不显著。但与对照相比, 高浓度处理对这 2 种害虫各龄期幼虫的体质量均有显著影响。【结论与意义】高浓度 Cry2Ab 蛋白 (10.0 和 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 对甜菜夜蛾低龄幼虫有较好的控制作用, 但对斜纹夜蛾低龄幼虫的控制效果不太理想。这为该双价基因棉花在我国的推广提供了依据。

关键词: Cry2Ab 蛋白; 鳞翅目害虫; 抗性; 生物测定

The effectiveness of Cry2Ab protein against early-instar larvae of *Spodoptera exigua* and *S. litura*

Xian-yong LU, Shuai ZHANG, Li-min LÜ, Jun-yu LUO, Chun-yi WANG, Jin-jie CUI*

State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan 455000, China

Abstract:【Background】After the widespread planting of Bt cotton in China, the target pests cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and the pink bollworm *H. zea* were no longer major pests. However, two other herbivores, *Spodoptera exigua* and *S. litura* remained important. The Cry2Ab protein, expressed in Bollgard II cotton seems to have higher effects against these two pests. In this paper, the effect of Cry2Ab protein on these lepidopteran pests was investigated.【Method】The effects of different Cry2Ab protein concentrations (1.25, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) mixed into artificial diet on the survival rate and growth rate inhibition in *S. exigua* and *S. litura* were described under laboratory conditions.【Result】With the increase of Cry2Ab protein concentration, first-instar and neonate larvae of *S. exigua* displayed a lower survival rate, but second and third-instar larvae of either species showed no significant differences compared with the control. However, body mass of these two insects was obviously negatively affected by feeding on Cry2Ab protein containing diets.【Conclusion and significance】High concentrations of Cry2Ab protein (10.0 and 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) had stronger effects against neonates and first-instar *S. exigua* larvae but had little effect against *S. litura*.

Key words: Cry2Ab protein; lepidopterous pest; insect resistance; bioassay

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hubner) 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 均属于鳞翅目夜蛾科, 是我国典型的迁飞能力较强的一类间歇暴发性农业重要害虫。20 世纪 80 年代, 这 2 种害虫在我国局部地区零星发生, 并仅以危害蔬菜为主。自 90 年代以来, 转 Bt 基因棉花在我国长江流域和黄河流域大规模商业化种植, 有效地控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hubner) 和红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) 2 种靶标害虫的发生与危害; 但由于其主要以表达 Cry1Ac 蛋白为主, 甜菜夜蛾和斜纹夜蛾对该蛋白不敏感 (Pujiastuti *et al.*, 1999; Sivasupramaniam *et al.*, 2008), 导致这 2 种害虫的种群数量逐渐上升, 在 Bt 棉花中从次要害虫逐渐演化为主要害虫, 严重威胁了 Bt 棉花的种植 (刘悦秋和

coverpa armigera (Hubner) 和红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) 2 种靶标害虫的发生与危害; 但由于其主要以表达 Cry1Ac 蛋白为主, 甜菜夜蛾和斜纹夜蛾对该蛋白不敏感 (Pujiastuti *et al.*, 1999; Sivasupramaniam *et al.*, 2008), 导致这 2 种害虫的种群数量逐渐上升, 在 Bt 棉花中从次要害虫逐渐演化为主要害虫, 严重威胁了 Bt 棉花的种植 (刘悦秋和

收稿日期 (Received): 2013-03-20 接受日期 (Accepted): 2013-04-25

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项 (2013ZX08011-002)

作者简介: 路献勇, 男, 硕士研究生。研究方向: 转基因棉花安全评价。E-mail: nzg1021@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: cuijinjie@126.com

江幸福,2002; Wan *et al.*, 2008)。

国外有关 Bt 毒素对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾作用的报道较多,主要集中于 Bt 有效菌株系的分离和不同杀虫晶体蛋白的克隆与表达 (Ferre *et al.*, 1991; Lalitha *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2007)。国内外多数研究认为,转 Cry1Ac 基因棉花对甜菜夜蛾的控制作用不太理想 (夏敬源等, 2000; 周海霞, 2002; Arshad & Suhall, 2011)。研究表明,在人工饲料中添加不同浓度的 Cry1Ac 杀虫晶体蛋白,随着蛋白浓度的增大,甜菜夜蛾低龄幼虫死亡率逐渐升高,体质量抑制作用明显,但转移至不含毒素的饲料后,幼虫能迅速恢复生长,并正常生长发育 (陈建等, 2010; 钟勇等, 2009)。同时,多数研究认为,转 Cry1Ac 基因棉花对斜纹夜蛾没有抗性 (黄东林等, 2006; 杨进, 2008; 余月书等, 2004; Basavaraja *et al.*, 2008)。

与一代转基因棉花 (转 Cry1Ac 基因棉花) 相比,转 Cry1Ac + Cry2Ab 基因棉花新品种在提高对棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾等害虫的抗性方面具有良好的应用前景。本文通过研究 Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾低龄幼虫的抗性,为转 Cry1Ac + Cry2Ab 双价棉的培育及商业化种植提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

甜菜夜蛾和斜纹夜蛾卵由南京农业大学提供,在中国农业科学院棉花研究所棉花生物学国家重点实验室 (以下简称本实验室) 用人工饲料饲养至 14 代后,选择发育良好的虫体作为供试虫源。

1.2 Bt 蛋白干粉来源

Cry2Ab 蛋白从中国农业科学院植物保护研究所下属的中保科农生物科技有限公司购买,以 $10 \text{ mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 分装,纯度在 37% 左右,置于 -20°C 低温冰箱中保存备用。

1.3 人工饲料配方

甜菜夜蛾和斜纹夜蛾幼虫的人工饲料配方经本实验室参照胡凤林等 (2008) 及黄艳君和浦冠勤 (2011) 改进而成。

1.4 试验方法

将一定量的 Cry2Ab 蛋白干粉用 5 mL pH 9.5 的 Na_2CO_3 溶液溶解后置于 7 mL 离心管中,放入冰

盒中备用,用电子天平 (精度为 0.01 g) 称取 100 g 约 50°C (用水银温度计测量) 的人工饲料置于 250 mL 左右的塑料盒中。用 5 mL 移液枪将离心管中的溶液分别定量加入塑料盒中并迅速搅拌,分别配制成含 Cry2Ab 蛋白质量浓度为 1.25、2.5、5.0、10.0 和 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的人工饲料作为处理 (Li *et al.*, 2011); 以加入相同体积 pH 9.5 Na_2CO_3 溶液的饲料作为对照。

将初孵幼虫 (孵化后 12 h 内)、1 龄幼虫 (蜕皮后 12 h 内)、2 龄幼虫 (蜕皮后 12 h 内) 和 3 龄幼虫 (蜕皮后 12 h 内) 接入每孔含约 1 g 饲料的 24 孔细胞培养板中,每孔饲养 1 头幼虫。每个处理接 48 头幼虫,3 个重复,7 d 后统计存活数,并计算成活率。取食 7 d 后 (甜菜夜蛾 3 龄幼虫 5 d),每个处理随即抽取 15 头幼虫,用电子天平 (精度为 0.00001 g) 称其质量,并计算体质量抑制率。

体质量抑制率 (%) = (对照组平均体质量 - 处理组平均体质量) / 对照组平均体质量 $\times 100$

1.5 数据统计与分析

处理间的存活率和体质量抑制率经反正弦转换后进行方差分析,用 SSR (Duncan 氏新复极差法) 多重比较方法测定差异显著性。通过 SAS 8.1 统计软件处理数据,辅助工具为 Office 办公软件 Word 和 Excel。

2 结果与分析

2.1 Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾低龄幼虫的抗性

研究结果 (表 1) 表明, Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾初孵幼虫和 1 龄幼虫存活率具有显著影响 (初孵幼虫, $df=5$, $F=4.51$, $P=0.0207 < 0.05$; 1 龄幼虫, $df=5$, $F=12.84$, $P=0.0004 < 0.01$); 但 2 龄幼虫和 3 龄幼虫的存活率在不同 Cry2Ab 浓度之间差异不显著 (2 龄幼虫, $df=5$, $F=1.39$, $P=0.3070 > 0.05$; 3 龄幼虫, $df=5$, $F=0.25$, $P=0.9318 > 0.05$)。进一步多重比较结果表明, 10.0 和 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cry2Ab 处理下, 甜菜夜蛾初孵幼虫 7 d 后的成活率分别为 45.80% 和 44.44%, 极显著低于对照 (80.39%); $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cry2Ab 处理下, 1 龄幼虫 7 d 后的成活率为 35.99%, 极显著低于对照 (65.30%); 其他浓度下的成活率与对照差异不显著。

表1 Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾低龄幼虫存活率的影响

Table 1 Effects of Cry2Ab protein on the survival rate of *S. exigua* low-instar larva

Cry2Ab 蛋白浓度 Cry2Ab protein concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	甜菜夜蛾幼虫存活率 Survival rate of <i>S. exigua</i> larva (%)			
	初孵幼虫 Neonate larvae	1 龄幼虫 First-instar larvae	2 龄幼虫 Second-instar larvae	3 龄幼虫 Third-instar larvae
0	80.56 ± 8.45aA	65.30 ± 4.00aA	98.61 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA
1.25	79.17 ± 2.40aA	61.07 ± 2.54aA	95.83 ± 2.40aA	100.00 ± 0.00aA
2.5	69.45 ± 2.78aA	62.02 ± 2.52aA	93.05 ± 5.01aA	97.22 ± 2.78aA
5.0	80.56 ± 7.35Aa	64.05 ± 2.75aA	94.45 ± 2.78aA	98.61 ± 1.39aA
10.0	51.39 ± 2.78bB	54.83 ± 2.59aA	87.50 ± 2.41aA	98.61 ± 1.39aA
20.0	44.44 ± 6.84bB	35.99 ± 3.08bB	93.06 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA

数据为平均值 ± 标准误;每个数据为3次重复的平均值,每次重复的幼虫为48头。同列数据后附不同大、小写字母者分别表示经 Duncan 氏多重比较在0.01、0.05水平上差异显著。

The datas are mean ± SE; each data is the mean of three replications which each consisted of 48 larvae. Different big and small letters in the same column represent significant differences at 0.01 and 0.05 levels by Duncan’a multiple ranging test, respectively.

由表2可以看出,Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾初孵幼虫、1 龄幼虫、2 龄幼虫和3 龄幼虫的体质量均有极显著影响(初孵幼虫, $df = 4$, $F = 97.6$, $P < 0.01$; 1 龄幼虫, $df = 4$, $F = 44.61$, $P < 0.01$; 2 龄幼虫, $df = 4$, $F = 39.51$, $P < 0.01$; 3 龄幼虫, $df = 4$, $F = 160.14$,

$P < 0.01$)。进一步多重比较结果表明,初孵幼虫取食7 d 后的体质量抑制率在5种Cry2Ab 浓度处理间的差异极显著;Cry2Ab 高浓度(20.0和10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)处理下,1 龄幼虫和2 龄幼虫7 d 后、3 龄幼虫5 d 后的体质量抑制率极显著高于其他浓度。

表2 Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾低龄幼虫体质量抑制率的影响

Table 1 Effects of Cry2Ab protein on the body mass inhibition rate of *S. exigua* low-instar larva

Cry2Ab 蛋白浓度 Cry2Ab protein concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	甜菜夜蛾幼虫体质量抑制率 Body mass inhibition rate of <i>S. exigua</i> larva (%)			
	初孵幼虫 Neonate larvae	1 龄幼虫 First-instar larvae	2 龄幼虫 Second-instar larvae	3 龄幼虫 Third-instar larvae
1.25	82.30 ± 0.90eE	37.28 ± 4.22cC	46.43 ± 4.88bB	52.65 ± 2.08eC
2.5	86.19 ± 0.12dD	49.76 ± 0.92cC	48.15 ± 5.41bB	67.49 ± 0.65dB
5.0	90.06 ± 0.61cC	74.18 ± 1.10bB	56.10 ± 2.16bB	70.69 ± 0.83cB
10.0	93.91 ± 0.32bB	90.65 ± 4.57aA	84.99 ± 1.18aA	79.30 ± 0.54bA
20.0	96.03 ± 0.45aA	96.98 ± 0.57aA	86.80 ± 1.88aA	80.53 ± 0.55aA

数据为平均值 ± 标准误;每个数据为3次重复的平均值,每次重复的幼虫为48头。同列数据后附不同大、小写字母者分别表示经 Duncan 氏多重比较在0.01、0.05水平上差异显著。

The datas are mean ± SE; each data is the mean of three replications which each consisted of 48 larvae. Different big and small letters in the same column represent significant differences at 0.01 and 0.05 levels by Duncan’a multiple ranging test, respectively.

2.2 Cry2Ab 蛋白对斜纹夜蛾低龄幼虫的抗性

研究结果(表3)表明,Cry2Ab 蛋白对斜纹夜蛾初孵幼虫、1 龄幼虫、2 龄幼虫和3 龄幼虫的成活率没有显著影响(初孵幼虫, $df = 5$, $F = 2.47$, $P = 0.1049 > 0.05$; 1 龄幼虫, $df = 5$, $F = 0.76$, $P = 0.5992 > 0.05$; 2 龄幼虫, $df = 5$, $F = 2.64$, $P = 0.0901 > 0.05$; 3 龄幼虫, $df = 5$, $F = 0.59$, $P = 0.7065 > 0.05$)。

从表4可以看出,Cry2Ab 蛋白对斜纹夜蛾初孵幼虫、1 龄幼虫、2 龄幼虫和3 龄幼虫的体质量抑制率有极显著影响(初孵幼虫, $df = 4$, $F = 13.61$, $P = 0.0012 < 0.01$; 1 龄幼虫, $df = 4$, $F = 18.97$, $P =$

$0.0004 < 0.01$; 2 龄幼虫, $df = 4$, $F = 22.07$, $P = 0.0002 < 0.01$; 3 龄幼虫, $df = 4$, $F = 55.49$, $P < 0.01$)。多重比较结果表明,斜纹夜蛾低龄幼虫的体质量抑制率随着Cry2Ab 蛋白浓度的升高而增大。其中,初孵幼虫的体质量抑制率在浓度10.0与20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 以及2.5与5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,1 龄幼虫的体质量抑制率在浓度10.0、5.0与2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 以及5.0、2.5与1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,2 龄幼虫的体质量抑制率在浓度10.0与5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 以及2.5与1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,3 龄幼虫的体质量抑制率在浓度10.0、5.0与2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,差异均不显著。

表 3 Cry2Ab 蛋白对斜纹夜蛾低龄幼虫存活率的影响
Table 3 Effects of Cry2Ab protein on the survival rate of *S. litura* low-instar larva

Cry2Ab 蛋白浓度 Cry2Ab protein concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	斜纹夜蛾幼虫存活率 Survival rate of <i>S. litura</i> larva (%)			
	初孵幼虫 Neonate larvae	1 龄幼虫 First-instar larvae	2 龄幼虫 Second-instar larvae	3 龄幼虫 Third-instar larvae
0	95.83 ± 0.00aA	97.22 ± 1.39aA	100.00 ± 0.00aA	100.00 ± 0.00aA
1.25	93.06 ± 1.39aA	95.83 ± 2.40aA	97.22 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA
2.5	88.89 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA	100.00 ± 0.00aA	100.00 ± 0.00aA
5.0	91.67 ± 0.00aA	100.00 ± 0.00aA	97.22 ± 1.39aA	100.00 ± 0.00aA
10.0	90.28 ± 3.68aA	97.22 ± 2.78aA	97.22 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA
20.0	93.06 ± 1.39aA	97.22 ± 1.39aA	98.61 ± 1.39aA	97.22 ± 2.78aA

数据为平均值 ± 标准误;每个数据为 3 次重复的平均值,每次重复的幼虫为 48 头。同列数据后附不同大、小写字母者分别表示经 Duncan 氏多重比较在 0.01、0.05 水平上差异显著。
The datas are mean ± SE; each data is the mean of three replications which each consisted of 48 larvae. Different big and small letters in the same column represent significant differences at 0.01 and 0.05 levels by Duncan’a multiple ranging test, respectively.

表 4 Cry2Ab 蛋白对斜纹夜蛾低龄幼虫体质量抑制率的影响
Table 4 Effects of Cry2Ab protein on the body mass inhibition rate of *S. litura* low-instar larva

Cry2Ab 蛋白浓度 Cry2Ab protein concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	斜纹夜蛾幼虫体质量抑制率 Body mass inhibition rate of <i>S. litura</i> larva (%)			
	初孵幼虫 Neonate larvae	1 龄幼虫 First-instar larvae	2 龄幼虫 Second-instar larvae	3 龄幼虫 Third-instar larvae
1.25	49.50 ± 2.74cC	36.49 ± 2.79cC	21.43 ± 4.79cD	2.46 ± 0.11cC
2.5	59.76 ± 3.36bB	45.67 ± 1.61bcBC	25.22 ± 4.12cCD	21.52 ± 2.52bB
5.0	64.13 ± 0.15bB	44.86 ± 1.88bcBC	35.17 ± 2.46bBC	17.95 ± 0.92bAB
10.0	66.95 ± 2.05aA	52.05 ± 3.91bB	42.40 ± 1.02bAB	24.70 ± 3.00bAB
20.0	80.26 ± 0.48aA	69.28 ± 1.76aA	56.66 ± 1.91aA	34.39 ± 2.45aA

数据为平均值 ± 标准误;每个数据为 3 次重复的平均值,每次重复的幼虫为 48 头。同列数据后附不同大、小写字母者分别表示经 Duncan 氏多重比较在 0.01、0.05 水平上差异显著。
The datas are mean ± SE; each data is the mean of three replications which each consisted of 48 larvae. Different big and small letters in the same column represent significant differences at 0.01 and 0.05 levels by Duncan’a multiple ranging test, respectively.

3 讨论

Monsanto 公司育成的双价转基因棉花 BollgardⅡ (Cry1Ac + Cry2Ab) 对甜菜夜蛾和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J E Smmith) 有一定的控制作用 (Sivasupramaniam *et al.*, 2008), 但对斜纹夜蛾的控制效果不理想 (Rao *et al.*, 2011)。Dow Agro 公司培育的 WidestrikeTM (Cry1Ac + Cry1F) 双价棉被研究证实对斜纹夜蛾幼虫有一定的控制作用 (Moudgal *et al.*, 2011)。本试验通过研究 Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾低龄幼虫的影响发现,随着 Cry2Ab 浓度的增大,甜菜夜蛾初孵幼虫和 1 龄幼虫的死亡率显著升高,但斜纹夜蛾低龄幼虫的死亡率差异不显著,说明其对斜纹夜蛾的控制效果较差。高浓度 Cry2Ab 蛋白可以显著抑制甜菜夜蛾和斜纹夜蛾幼虫的体质量,因而可能延缓这 2 种害虫的生长发育,进而减轻其对棉花等作物的危害。Li *et al.* (2011) 使用 ELISA 法测定了 Bollgard Ⅱ 棉花叶片、花瓣、铃和花粉中 Cry2Ab 的表达量,发现叶片和花

瓣中的表达量最高,为 16.8 ~ 22.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;花粉次之,表达量为 5.5 ~ 6.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;铃中 Cry2Ab 表达量最低,为 2.0 ~ 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结合本试验的研究结果推测,Bollgard Ⅱ 棉花前期对甜菜夜蛾低龄幼虫的控制作用较强,后期随着 Cry2Ab 表达量的减少,对甜菜夜蛾的控制作用也会下降。
虽然 Bollgard Ⅱ 双价棉对甜菜夜蛾有一定的控制作用,但是控制效果不及对棉铃虫和红铃虫。据报道,Cry1Fa 和 Cry1Ca 对甜菜夜蛾幼虫毒性较高,而 Cry1Ac 对其没有杀虫活性 (Luo *et al.*, 1999); Cry1Ac 和 Cry1Ca 以 1:1 混合能增强其对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒杀活性 (Xue *et al.*, 2005); 而 Cry1Ac 和 Cry2Ab 以 1:1 或 1:4 混合,对棉铃虫的毒杀活性有增效作用 (Ibargutxi *et al.*, 2008)。因此,为了延迟靶标害虫棉铃虫和红铃虫对 Cry1Ac 抗性的产生和扩大 Bt 棉花的杀虫范围,可以将 Cry1Ac、Cry2Ab 和 Cry1Ca 3 个基因同时转入 Bt 棉花植株中,培育转多价 Bt 基因作物是未来转基因技术的发展趋势。

Cry 毒素已经被作为生物杀虫剂或转入大田作物中表达来广泛控制农业害虫。然而,并非所有的害虫都对 Cry 毒素敏感,昆虫对 Bt 毒素的抗性将会更加频繁,这将大大降低 Bt 作物的使用时间。Pardo-López *et al.* (2009) 通过比较前人的研究成果,总结了几种能提高 Cry 毒素杀虫活性的策略。一方面,通过在生物测定中使用另一种蛋白如蛋白抑制剂、几丁质酶、Cyt 毒素和包含毒素结合位点的钙粘蛋白片段可以加强 Cry 蛋白的杀虫活性;另一方面,Cry 基因的不同变异类型,如定向位点的突变、Cry 蛋白特殊区域剪切位点的引入和氨基末端小片段的缺失,能够提高其杀虫活性或延缓靶标害虫抗性的产生。

转基因作物中 Bt 蛋白表达量的时空差异能够降低其对靶标害虫的控制效率。许多环境因素,如高温、严重干旱、涝害、CO₂ 浓度升高和氮素缺乏,被证实能降低 Bt 毒素的表达量(Rochester,2006)。因此,通过一些农艺措施改善 Bt 作物的生长条件将有助于提高其杀虫效率。另外,启动子的甲基化对调节 Bt 蛋白在转基因植物中的表达量也起着十分重要的作用,因此可在转基因作物育种时,使用组织特异性启动子增强 Bt 作物后期(尤其是果实成熟期)的 Cry 蛋白表达量,从而减轻靶标害虫对 Bt 作物的危害,降低害虫的控制成本(Bakhsh *et al.*, 2011)。

参考文献

陈建,江幸福,罗礼智,胡毅. 2010. 甜菜夜蛾低龄幼虫取食含 Cry1Ac 毒素的人工饲料对其生长发育和成虫繁殖的影响. 昆虫学报, 53(10): 1119–1126.

胡凤林,彭正松,蔡平钟,王闵霞,龙虎,曲继鹏,陈先红. 2008. 甜菜夜蛾的人工饲养方法. 安徽农业科学, (36): 68–69.

黄东林,刘汉勤,蒋思霞. 2006. 转双价基因抗虫棉对斜纹夜蛾实验种群的影响. 植物保护学报, 36(1): 1–5.

黄艳君,浦冠勤. 2011. 斜纹夜蛾的人工饲养技术. 中国蚕业, 76(3): 76–79.

刘悦秋,江幸福. 2002. 甜菜夜蛾的生物防治. 植物保护, 28(1): 54–56.

夏敬源,崔金杰,常蕊芹. 2000. 转基因抗虫棉对甜菜夜蛾的抗性研究. 中国棉花, 27(9): 10–11.

杨进. 2008. 斜纹夜蛾在不同棉花品种上的种群动态及其与体内解毒酶活性的关系研究. 扬州: 扬州大学.

余月书,康晓霞,陆宴辉,梁江亚,王红,吴洁云,杨益众. 2004. 转 Bt 基因棉对斜纹夜蛾种群增长的影响. 江苏农业学报, 20(3): 169–172.

钟勇,陈国华,刘小侠,张青文,李建成. 2009. Bt 杀虫蛋白对甜菜夜蛾生长发育的影响. 云南农业大学学报, 24(2): 195–198.

周海霞. 2002. 转 Cry1Ac 和 Cry1A + CpTI 基因棉花对甜菜夜蛾生长发育的影响及生理生化机制研究. 泰安: 山东农业大学.

Arshad M and Suhall A. 2011. Field and laboratory performance of transgenic Bt cotton containing Cry1Ac against beet armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 43: 529–535.

Bakhsh A, Shahzad K and Husnain T. 2011. Variation in the spatio-temporal expression of insecticidal genes in cotton. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47: 1–9.

Basavaraja H, Chhillar B S and Ram S. 2008. Effect of transgenic Bt cotton top leaves on consumption-utilization indices of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae. *Journal of Cotton Research and Development*, 22: 101–106.

Ferre J, Real M D, van Rie J, Jansens S and Peferoen M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bio-insecticide in a field population of *plutella-xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 5119–5123.

Ibargutxi M A, Munoz D, De Escudero I R and Caballero P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control*, 47: 89–96.

Lalitha C and Muralikrishna T. 2012. Laboratory evaluation of native *Bacillus thuringiensis* isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius). *Current Biotica*, 5: 428–435.

Li Y H, Romeis J, Wang P, Peng Y F and Shelton A M. 2011. A comprehensive assessment of the effects of Bt cotton on *Coelomegilla maculata* demonstrates no detrimental effects by Cry1Ac and Cry2Ab. *PLoS ONE*, 6: e22185.

Luo K, Banks D and Adang M J. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environ-*

- mental Microbiology*, 65: 457 – 464.
- Moudgal R K, Chetan C, Gajendra B, Sundara R and Thompson G D. 2011. *Field Efficacy of Widestrike™ Bt Cotton, Expressing Cry1Ac and Cry1F Proteins, against Lepidopteran Pests in India*. New Delhi, India: Excel India Publishers.
- Pardo-López L, Munoz-Garay C, Porta H, Rodriguez-Almazan C, Soberon M and Bravo A. 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 30: 589 – 595.
- Pujiastuti Y, Asano S I, Sahara K, Bando H and Toshihiko L. 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* crystal protein to *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 68: 195 – 199.
- Rao G M V P, Sujatha T, Grace G A D, Prasad N V V S D and Reddy V C. 2011. *Intrinsic Rate of Increase and Life Parameters of Cotton Leaf Eating Caterpillar Spodoptera litura on Boll-gardIII Hybrids*. New Delhi, India: Excel India Publishers.
- Rochester I J. 2006. Effect of genotype, edaphic, environmental conditions and agronomic practices on Cry1Ac protein expression in transgenic cotton. *Journal of Cotton Science*, 10: 252 – 262.
- Sivasupramaniam S, Moar W J, Ruschke L G, Osborn J A, Jiang C, Sebaugh J L, Brown G R, Shappley Z W, Oppenhuizen M E, Mullins J W and Greenplate J T. 2008. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. *Journal of Economic Entomology*, 101: 546 – 554.
- Wan P, Wu K M, Huang M, Yu D and Wu J. 2008. Population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) oil Bt cotton in the Yangtze River Valley of China. *Environmental Entomology*, 37: 1043 – 1048.
- Xue J L, Cai Q X and Yuan Z M. 2005. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 460 – 465.
- Young J, Li M S, Shim H J, Roh J Y, Woo S D, Jin B R, Boo K S and Je Y H. 2007. Isolation and characterization of strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* containing two novel cry1-type toxin gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 1498 – 1503.

(责任编辑:杨郁霞)

