

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2014.01.007

不同 Bt 蛋白对棉铃虫存活率和生长发育的影响

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 Bt 棉主要以 Cry1Ab 或 Cry1Ac 为主,其他新型 Bt 基因未被转入棉花中用来控制害虫,然而大面积种植单价 Bt 基因的棉花,将可能会大大增加靶标害虫对该类型 Bt 棉花抗性频率,因此研究其他新型 Bt 蛋白对靶标害虫的控制作用显得十分必要。【方法】采用蛋白混入人工饲料的生物测定方法,在室内测定了 6 种 Bt 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的毒力,比较了浓度为 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时不同 Bt 蛋白对棉铃虫幼虫生长发育的影响。【结果】毒力测定结果表明,不同 Bt 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的毒力不同, LC_{50} 值由低到高依次为 Cry1Ab $0.065\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、Cry1Ac $0.074\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、Cry2Ab $0.133\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、Cry2Aa $11.670\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、Cry1Ah $13.010\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 Cry1Ca $>20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。生长发育测定结果表明,Cry1Ab 和 Cry1Ac 对棉铃虫幼虫的生长发育影响最大,Cry2Ab 次之;Cry1Ah 和 Cry2Aa 对 1 龄幼虫的校正死亡率和体重抑制率差别不大,但对 2 龄幼虫的差异较大,Cry1Ah 处理 2 龄幼虫后体重和生长发育参数与 Cry2Ab 接近,而 Cry1Ca 对棉铃虫幼虫生长发育几乎没影响。【结论与意义】Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry2Ab 的毒力不如 Cry1Ac 和 Cry1Ab,但仍可以作为控制棉铃虫幼虫的替代策略。**关键词:** Bt 蛋白; 棉铃虫; 致死中浓度; 生长发育

The effect of different Bt proteins on the survival rate, growth and development of cotton bollworm larvae

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】In China, genes of Bt cotton mainly express Cry1Ab or Cry1Ac proteins. Until now, few new Bt genes have not be studied as potential used topest control pests. However, large-scale cultivation of Bt cotton will most likely increase the possibility of pests to become resistant against these types of Bt cotton. It is necessary to examine the responses of cotton bollworm to other Bt proteins. 【Method】Using a diet incorporation method, we evaluated the toxicity of six types of Bt proteins ($1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) against cotton bollworm’s larval growth and development. 【Result】The results showed that the LC_{50} of Bt proteins to neonate larvae of cotton bollworm were Cry1Ab ($0.065\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Cry1Ac ($0.074\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Cry2Ab ($0.133\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Cry2Aa ($11.67\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Cry1Ah ($13.010\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and Cry1Ca ($>20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). When a concentration of $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ was applied, Cry1Ab and Cry1Ac had the strongest effects among the six Bt proteins followed by Cry2Ab. There were no difference between Cry1Ah and Cry2Aa effects on first-instar larval mortality and weight reduction. However, there were significant differences between these two proteins at the second-instar larvae. There were no significant differences between Cry1Ah and Cry2Ab in terms of body weight and growth rate of cotton bollworm second-instar larvae. Cry1Ca has almost no effect on the survival rate, growth and development of cotton bollworm when compared with the control. 【Conclusion and significance】The LC_{50} of Cry1Ah, Cry2Aa and Cry2Ab are comparable to Cry1Ac and Cry1Ab. They could be used as an alternative strategy to control cotton bollworm larvae.**Key words:** Bt protein; cotton bollworm; mean lethal concentration; growth and development

自 1990 年国外首次用农杆菌介导法获得植物基因工程,并培育出了转基因抗虫棉用于大规模生产。中国研究人员也于 1993 年将 Cry1Ac 基因导入到中国主产棉区的数个栽培品种中,获得了

收稿日期(Received): 2014-01-10 接受日期(Accepted): 2014-02-05
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: 转基因棉花环境安全评价
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: cuijinjie@126.com

第1代单价抗虫棉(郭三堆等,1999)。目前中国主要以种植转单价 Bt 基因的抗虫棉花为主,由于转入的 Bt 基因类型单一,长期种植容易导致棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 对 Cry1Ac 基因的抗性增加,因此,为了延缓靶标害虫对 Cry1Ac 蛋白的抗性,培育叠加基因的抗虫棉花品种受到广泛重视。目前,转 Cry1Ac + Cry2Ab 基因棉已在美国、澳大利亚、墨西哥等国家商业化种植,我国也培育出了转双价基因 Cry1Ac + Cry2Ab 的抗虫棉(雒珺瑜等,2011)。为了揭示不同 Bt 蛋白的抗虫效果,本文研究了 Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab、Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca 6 种 Bt 蛋白对棉铃虫幼虫室内种群存活率、体重和生长发育的影响,期望为新一代转基因抗虫棉花的培育提供依据,为新型转基因棉花材料的抗虫性鉴定和安全评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试棉铃虫

室内敏感品系:2005 年 6 月采自河南省安阳县白壁镇中国农业科学院棉花研究所棉田第 2 代,在室内不用任何药剂处理,连续用人工饲料饲养 70 代。

1.2 供试 Bt 蛋白

Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab、Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca 6 种 Bt 蛋白均由中国农业科学院植物保护研究所中保科农公司(北京)提供。

1.3 棉铃虫人工饲料

采用卓乐似等(1981)的棉铃虫人工饲料配方经稍微改进。人工饲料配方如下:黄豆粉 200 g,玉米粉 300 g,小麦粉 300 g,抗坏血酸 10 g,酵母粉 80 g,甲醛 10 mL,36% 乙酸 60 mL,苯甲酸钠 9 g,琼脂 35 g,水 2000 mL。成虫期饲喂 10% 的蜂蜜水。养虫室每月用紫外灯消毒 1 次,棉铃虫蛹用甲醛消毒 15 min,以防止棉铃虫遭受核角体病毒的侵染。

在配制饲料过程中,当饲料内的温度降到 55 ~ 60 ℃ 时,取不同浓度的 Bt 蛋白分别加到不同处理的人工饲料中,每个处理的饲料量为 100 g;用搅棒迅速搅匀,待饲料凝固后放入 4 ℃ 冰箱备用。使用前切成 1 g 左右的块状,分别放入 24 孔培养板中用于饲养棉铃虫幼虫,培养板表面覆盖白布以防止幼虫逃逸。

1.4 生物测定方法

1.4.1 不同 Bt 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的毒力测定

测定包括预备试验和正式试验 2 个部分。预备试验共设置 5 个质量浓度梯度,将供试幼虫的死亡率控制在 10% ~ 90% 范围内;其中 Cry1Ab、Cry1Ac 和 Cry2Ab 的浓度梯度为 1.0、0.5、0.1、0.01 和 0.001 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca 的质量浓度梯度为 20.0、5.0、2.0、1.0 和 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。正式试验共设置 7 个浓度梯度,其中 Cry1Ac、Cry1Ab 和 Cry2Ab 的浓度梯度为 1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.01 和 0.001 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca 的浓度梯度为 20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 和 0.3125 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。均用 5 mL 的 Na_2CO_3 溶液作为对照。

毒力测定前先用 pH 9.5 的 Na_2CO_3 溶液对毒蛋白进行稀释,然后将稀释后的 Bt 毒蛋白混入饲料中(Beegle *et al.*, 1990)。测定时在饲料中接入孵化后 1 日龄幼虫(24 h $\pm$ 2 h),在温度(27 $\pm$ 1) ℃、湿度(75 $\pm$ 5)%、光周期(光照/黑暗)14/10 以及合适的光强条件下饲养。每处理 24 头幼虫,重复 6 次。饲养 7 d 后记录幼虫存活数,计算校正死亡率。用 SPSS 19.0 软件进行 Probit 回归分析,计算 LC_{50} 值(贾春生,2006)。

1.4.2 不同 Bt 蛋白对棉铃虫幼虫生长发育的影响

配制饲料前用 pH 9.5 的 Na_2CO_3 溶液分别将 6 种蛋白稀释成 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,配制饲料时取稀释好的 Bt 蛋白溶液 5 mL 混入 100 g 饲料,使其在饲料中的浓度为 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,对照仅混入 5 mL 的 Na_2CO_3 。

测定设初孵幼虫、1 龄幼虫和 2 龄幼虫 3 组试验。每组试验设 6 种 Bt 蛋白和对照共 7 个处理,每处理 32 头幼虫,重复 3 次。测定时在饲料中接入幼虫,放置在与 1.4.1 相同的条件下饲养。初孵幼虫和 1 龄幼虫饲养 7 d 后,分别记录幼虫死亡率,并用电子天平(精确到 0.00001 g)称取所有活虫体重,计算体重抑制率。

体重抑制率(%) = (对照组平均体重 - 处理后平均体重) / 对照组平均体重 $\times$ 100。

2 龄幼虫饲养 3、5、7 和 9 d 后分别称取幼虫体重,每天记录幼虫发育天数、化蛹数、蛹重、蛹期天数和羽化数,直至羽化完成。试验数据用 SAS 8.1 软件分析。

2 结果与分析

2.1 不同 Bt 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的毒力测定

由表 1 可知,不同 Bt 蛋白对棉铃虫的毒力效

应不同,用 Bt 蛋白连续饲喂 7 d 后的致死中浓度 (LC_{50}) 依次为 Cry1Ab > Cry1Ac > Cry2Ab > Cry2Aa > Cry1Ah。

表 1 不同 Bt 蛋白处理的棉铃虫初孵幼虫的致死中浓度 (LC_{50}) 和线性回归方程参数

Bt 蛋白 Bt proteins	卡平方(自由度) $\chi^2(df)$	斜率 Slope $\pm SE$	截距 Intercept $\pm SE$	LC_{50} ($\mu g \cdot g^{-1}$)	95% 置信限 95% confidence limits	
					置信下限 Lower	置信上限 Upper
Cry1Ac	1.049(4)	1.417 $\pm$ 0.156	1.239 $\pm$ 0.109	0.074	0.045	0.096
Cry1Ab	2.313(4)	1.212 $\pm$ 0.124	1.438 $\pm$ 0.097	0.065	0.039	0.094
Cry2Ab	4.690(4)	0.743 $\pm$ 0.150	0.840 $\pm$ 0.106	0.133	0.108	0.213
Cry1Ah	1.934(3)	-1.594 $\pm$ 0.415	1.434 $\pm$ 0.334	13.010	8.474	19.127
Cry2Aa	4.643(3)	-2.008 $\pm$ 0.383	1.842 $\pm$ 0.341	11.670	8.669	15.639
Cry1Ca	-	-	-	-	-	-

2.2 不同 Bt 蛋白对棉铃虫低龄幼虫校正死亡率和体重抑制率的影响

棉铃虫初孵幼虫和 1 龄幼虫取食含不同 Bt 蛋白饲料 7 d 后,不同处理间的校正死亡率有极显著差异(初孵幼虫, $df=5$, $F=341.81$, $P<0.0001$;1 龄幼虫, $df=5$, $F=329.02$, $P<0.0001$)。不同处理间的体重抑制率也有极显著差异(初孵幼虫, $df=5$, $F=337.50$, $P<0.0001$;1 龄幼虫, $df=5$, $F=57.84$, $P<0.0001$)。Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白对棉铃虫初孵幼虫的校正死亡率极显著高于 Cry2Ab 蛋白,与 Cry2Ab 蛋白相比,Cry1Ah 和 Cry2Aa 蛋白处理的棉铃虫初孵幼虫的校正死亡率显著降低,Cry1Ca 处理下,初孵幼虫死亡率极显著低于另外 5 种蛋白。而对于 1 龄棉铃虫则略有不同,Cry1Ab 蛋白显著高于其余 5 种蛋白,Cry1Ac 和 Cry2Ab 蛋白极显著高于 Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca,而 Cry1Ah 蛋白极显著高于 Cry2Aa,Cry1Ca 蛋白极显著低于 Cry2Aa。Cry1Ac、Cry1Ab 和 Cry2Ab 处理的初孵幼虫体重抑制率极显著高于 Cry1Ah 和 Cry2Aa 蛋白处理,而 Cry1Ca 处理下的棉铃虫体重抑制率则极显著低于 Cry1Ah 和 Cry2Aa 蛋白;6 种蛋白处理的 1 龄幼虫的体重抑制率的多重比较结果与初孵幼虫相同(图 1)。

2.3 不同 Bt 蛋白处理棉铃虫 2 龄幼虫后的体重变化

棉铃虫 2 龄幼虫取食含不同 Bt 蛋白的饲料后,不同处理间幼虫体重有极显著性差异(1 d, $df=6$, $F=175.29$, $P<0.0001$;3 d, $df=6$, $F=94.77$, $P<0.0001$;7 d, $df=6$, $F=66.42$, $P<0.0001$;9 d, $df=6$, $F=924.33$, $P<0.0001$)。多重比较结果表明,对

照和 Cry1Ca 处理之间棉铃虫的体重在 1、3、7 和 9 d 均没有显著差异;Cry1Ac、Cry1Ab 处理下的 2 龄幼虫仅在 9 d 后体重极显著高于 Cry2Ab 蛋白;而 Cry1Ah 处理下的幼虫体重仅在 7 d 后显著低于 Cry2Aa,而在 1、3 和 9 d 后均是极显著低于该蛋白。与 Cry2Ab 相比,Cry1Ah 处理下的幼虫体重仅在 1 d 后极显著增加,其他时间段均没有显著差异(表 2)。

2.4 不同 Bt 蛋白处理棉铃虫 2 龄幼虫后的生物学参数差异

棉铃虫 2 龄幼虫取食含不同 Bt 蛋白的饲料后,不同处理间除了蛹期显著差异外,其他生物学参数均为极显著差异(11 d 后幼虫死亡率, $df=6$, $F=9.47$, $P=0.0006<0.001$;幼虫发育历期, $df=4$, $F=183.54$, $P<0.0001$;化蛹率, $df=6$, $F=97.92$, $P<0.0001$;蛹重, $df=6$, $F=27.92$, $P<0.001$;蛹期, $df=4$, $F=6.41$, $P=0.0129<0.05$;羽化率, $df=6$, $F=107.37$, $P<0.0001$)。Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白处理下 11 d 后棉铃虫的死亡率显著高于其他 4 种蛋白,差异不显著。用 Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白处理的棉铃虫无法完成整个幼虫发育历期,而用 Cry1Ah、Cry2Aa、Cry2Ab、Cry1Ca 和对照处理的棉铃虫幼虫发育历期均有显著差异,幼虫发育历期的顺序为 CK < Cry1Ca < Cry2Aa < Cry1Ah < Cry2Ab。对照、Cry1Ca 和 Cry2Aa 处理的棉铃虫化蛹率显著高于 Cry1Ah 和 Cry2Ab、Cry1Ac 和 Cry1Ab,但 Cry1Ca、对照和 Cry2Aa 处理之间无差异,Cry1Ah 和 Cry2Ab、Cry1Ab 和 Cry1Ac 之间也无差异。蛹重 Cry1Ca 除与对照间没有差异外,均显著高于其他几种 Bt 蛋

白, Cry2Aa 与 CK、Cry1Ah 和 Cry2Ab 之间无差异, 但 Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白与 Cry2Ab 之间也无显著差异, 可能是由于这 2 种 Bt 蛋白处理下的棉铃虫化蛹数量较少引起的。蛹期对照显著短于其他几种 Bt 蛋白, 这几种 Bt 蛋白之间无显著差异

(Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白处理棉铃虫无法完成蛹期过程)。Cry1Ab 和 Cry1Ac 蛋白处理下的棉铃虫羽化率为 0, Cry1Ca 和 CK 之间、Cry1Ah 和 Cry2Ab 之间羽化率无显著差异。

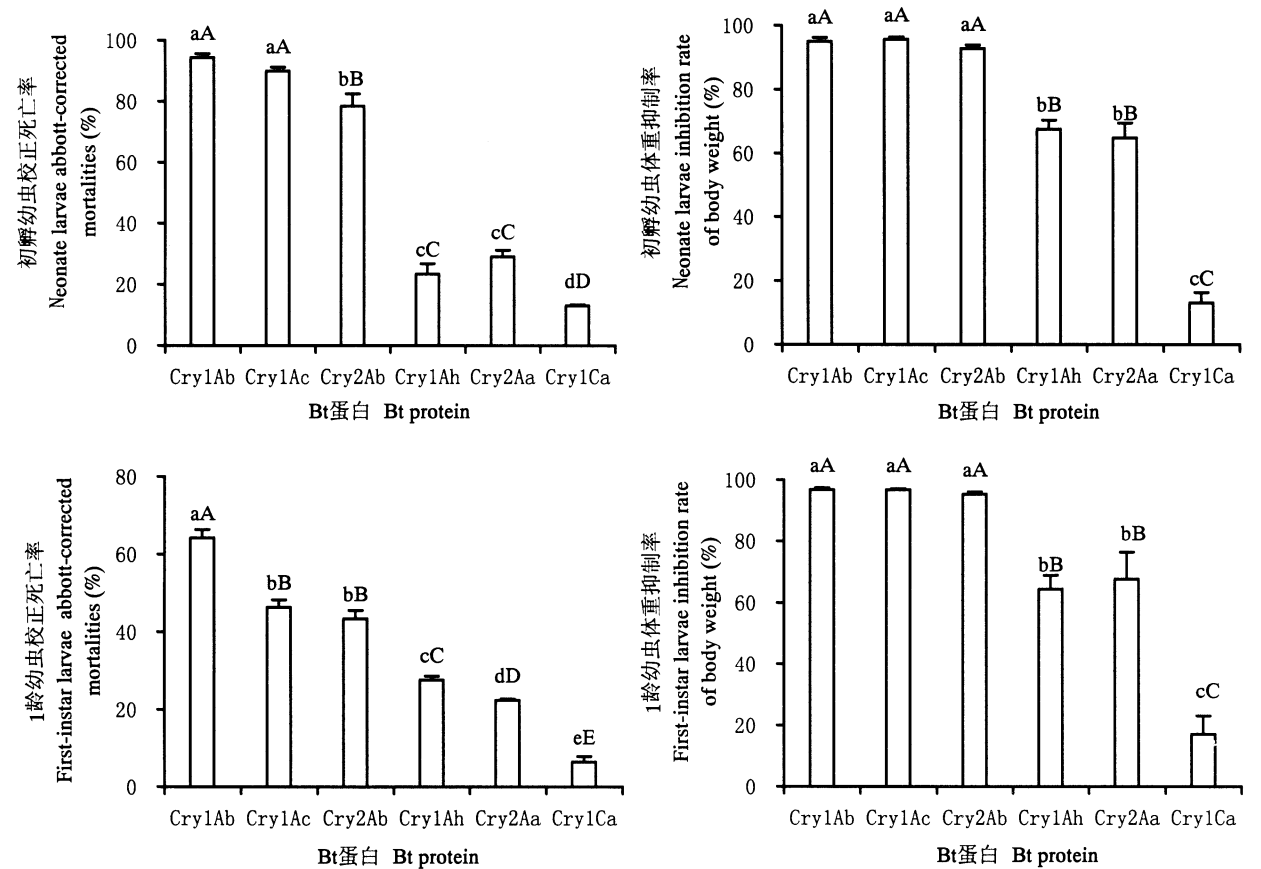


图 1 1.0 μg · g⁻¹不同 Cry 蛋白对棉铃虫初孵幼虫和 1 龄幼虫校正死亡率和体重抑制率的影响

Fig. 1 Abbott-corrected mortality rates and weight inhibition rates caused by active Cry proteins against the newly hatched and first-instar larvae of cotton bollworm (*H. armigera*) fed with 1.0 μg of toxin /g food

图中数据为平均数 ± 标准误; 柱子上不同字母表示数据经 Duncan 氏法多重比较差异显著, 大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

The data in the figure are mean ± SE, and bars with the different letters above are significantly different by Duncan's multiple ranging test. Capital letters show highly extremely significant differences ($P < 0.01$), and small letters, show significant differences ($P < 0.05$).

表 2 1.0 μg · g⁻¹的 6 种 Bt 蛋白分别处理棉铃虫 2 龄幼虫后的体重变化情况

Table 2 Weight changes in second-instar larvae of cotton bollworm (*H. armigera*) fed with 1.0 μg of the six types of Bt proteins /g food

处理 Treatment	棉铃虫幼虫体重 Cotton bollworm larval body weight (mg)			
	1 d	3 d	7 d	9 d
Cry1 Ac	1.28 ± 0.22dD	1.50 ± 0.51dC	3.50 ± 1.26dD	8.92 ± 1.61dD
Cry1 Ab	0.98 ± 0.03dD	1.89 ± 0.14dC	8.07 ± 2.01dD	15.41 ± 3.63dD
Cry2Ab	1.17 ± 0.18dD	3.02 ± 0.96cdC	30.45 ± 3.30cC	68.89 ± 6.67cC
Cry1 Ah	1.86 ± 0.17cC	4.52 ± 0.20cC	33.23 ± 3.26cBC	67.35 ± 11.70cC
Cry2Aa	3.13 ± 0.10bB	12.45 ± 1.09bB	72.97 ± 8.85bB	158.87 ± 0.85bB
Cry1 Ca	4.46 ± 0.57aA	18.87 ± 2.78aA	188.09 ± 31.36aA	331.63 ± 9.14aA
CK	3.62 ± 0.19aA	16.73 ± 0.78aA	175.97 ± 32.38aA	336.54 ± 11.65aA

表中不同字母表示数据经 Duncan 氏法多重比较差异显著, 大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters represent significant differences among treatments when using a Duncan's multiple ranging test. Capital letters show highly significant differences ($P < 0.01$) and small letters, significant differences ($P < 0.05$).

表 3 1.0 μg · g⁻¹ 的 6 种 Bt 蛋白分别处理棉铃虫 2 龄幼虫后生物学参数的显著差异

Table 3 Responses of cotton bollworm fed with 1.0 μg of the six types of Bt proteins /g food

处理 Treatment	11d 后幼虫死亡率 Larval mortality rate after 11 d (%)	幼虫发育历期 Larval developmental time (d)	化蛹率 Pupation rate (%)	蛹重 Pupal weight (mg)	蛹期 Pupal developmental time (d)	羽化率 Emergence rate (%)
Cry1Ac	0.41 ± 0.07bB	—	5.56 ± 1.92cC	168.78 ± 31.60cdCD	—	0dD
Cry1Ab	0.41 ± 0.08bB	—	4.44 ± 1.92cC	172.01 ± 9.53dD	—	0dD
Cry2Ab	0.24 ± 0.11aAB	22.61 ± 0.73aA	47.84 ± 5.11bB	195.24 ± 4.76cdCD	12.03 ± 0.34aA	41.11 ± 5.09cC
Cry1Ah	0.19 ± 0.05aA	19.44 ± 0.05bB	48.92 ± 6.93bB	218.07 ± 7.85cC	12.75 ± 0.18aAB	42.22 ± 6.94cC
Cry2Aa	0.11 ± 0.04aA	16.41 ± 0.24cC	77.83 ± 1.19aA	261.56 ± 8.38bB	12.01 ± 0.17aAB	54.44 ± 1.92bB
Cry1Ca	0.13 ± 0.03aA	14.39 ± 0.43dD	83.34 ± 8.82aA	296.34 ± 4.14aA	12.03 ± 0.23aAB	68.89 ± 8.39aA
CK	0.17 ± 0.07aA	13.23 ± 0.55eD	88.91 ± 4.23aA	287.73 ± 9.53abAB	11.18 ± 0.60bB	71.11 ± 5.09aA

表中不同字母表示数据经 Duncan 氏法多重比较差异显著,大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different letters represent significant differences among treatments when using a Duncan's multiple ranging test. Capital letters show highly significant differences ($P < 0.01$) and small letters, significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

本文系统测定了 Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab、Cry1Ah、Cry2Aa 和 Cry1Ca 6 种蛋白对棉铃虫幼虫的毒力,国内外也有一些文献报道了 Cry 蛋白对棉铃虫毒力(韩岚岚等,2008; Lee *et al.*, 1996; Chakrabarti *et al.*, 1998; Kalia *et al.*, 2005; Li & Bouwer, 2012)。

在澳大利亚,已报道只有 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Aa 和 Cry2Ab 蛋白能够在可接受的剂量下杀死棉铃虫,而 Cry1Ca 被认为对棉铃虫是无毒的(Liao *et al.*, 2002)。在印度,Cry1Ac 对棉铃虫幼虫的毒力最大,Cry1Ab 和 Cry1Aa 次之(Kalia *et al.*, 2005)。在南非,Cry1Ac 和 Cry2Aa 对棉铃虫的毒力最大,Cry1Ab 次之,Cry1Aa 毒性较小(Li & Bouwer, 2012)。在中国,Cry1Ac 被认为是对棉铃虫幼虫毒力最强的 Cry 蛋白,Cry2Ab 次之,此外,Cry1Ah 对棉铃虫幼虫也有一定的杀虫活性,但由于纯化时易形成寡聚体导致其杀虫活性不很稳定(韩岚岚等,2008; 周子珊等,2011)。而本试验中测得的 LC_{50} 显示,Cry1Ab 和 Cry1Ac 对棉铃虫幼虫的毒力最强,Cry2Ab 次之,Cry1Ah 和 Cry2Aa 对棉铃虫幼虫毒性较低。由此可见,不同国家和地区的棉铃虫种群对同一 Bt 毒素的敏感性存在差异,其原因可能是长时间的地理隔离。

估算棉铃虫田间种群抗性基因频率时,一般采用 Wu *et al.* (1999)确定的 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 饲料为诊断浓度。李海强等(2012)对新疆北部地区转 Bt 基因棉外源蛋白的表达量进行了测定,发现 4 个品种苗期叶片的 Bt(Cry1Ac)蛋白含量平均为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 左

右时,对当地棉铃虫有较好的控制作用。本试验以相同质量浓度($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)的 6 种 Bt 蛋白分别对棉铃虫初孵幼虫、1 龄幼虫和 2 龄幼虫进行处理,发现 Cry1Ab 和 Cry1Ac 对 3 种发育状态下的棉铃虫幼虫毒性均是最强,用这 2 种蛋白对 2 龄幼虫连续处理,棉铃虫羽化率为 0,不能完成整个生长发育。Cry2Ab 对 2 龄前的幼虫控制效果较好,但对 2 龄幼虫控制较差;而 Cry1Ah 和 Cry2Aa 对 2 龄前的棉铃虫毒力接近, LC_{50} 几乎相近,但两者对 2 龄幼虫控制效果却相差很大,可能是由于 Cry1Ah 蛋白纯化过程中形成了寡聚体,杀虫活性不稳定引起的(周子珊等,2011)。

为了阻止或推迟靶标害虫对 Cry1Ac 蛋白抗性的产生,人们提出了多基因策略,即将多个 Bt 基因同时转入植物中用来控制农田害虫,Cry1Ac 和 Cry2Aa、Cry1Ac 和 Cry2Ab 可被同时转入植物中控制棉铃虫,因为这 2 个蛋白可使用不同的受体结合位点(Caccia *et al.*, 2010; Gahan *et al.*, 2005)。对 Cry1Ac 产生抗性的棉铃虫品系,对 Cry2Aa 和 Cry2Ab 是敏感的(Akhurst *et al.*, 2003)。而对 Cry2Ab 产生抗性的棉铃虫品系,则被认为对 Cry2Aa 也有抗性,但对 Cry1Ac 敏感(Mahon *et al.*, 2007)。尽管 Cry2Ab、Cry2Aa 和 Cry1Ah 对棉铃虫幼虫的毒性不如 Cry1Ab 和 Cry1Ac,但是仍然可以作为控制中国棉铃虫幼虫的替代策略。

参考文献

郭三堆,崔洪志,夏兰芹. 1999. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学, 32(3): 3-9.
韩岚岚,宋福平,张杰. 2008. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白

- 对棉铃虫活性分析. 东北农业大学学报, 39(8): 21–24.
- 贾春生. 2006. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC_{50} . 昆虫知识, 43(3): 414–417.
- 李海强, 李号宾, 王冬梅. 2012. 转基因抗棉铃虫抗草甘膦棉花对棉铃虫的抗虫性及对二种地老虎幼虫生长发育的影响. 应用昆虫学报, 49(4): 882–888.
- 雒珺瑜, 崔金杰, 辛惠江. 2011. 转 *Cry1Ac + Cry2Ab* 基因棉花对天敌生长发育的影响. 中国棉花, 38(12): 11–12.
- 周子珊, 束长龙, 梁革梅, 苍晶, 宋福平, 张杰. 2011. *Cry1Ah* 蛋白活性片段在溶液中的单体和寡聚体杀虫活性分析. 植物保护, 37(3): 48–51.
- 卓乐似, 黄月兰, 杨家荣. 1981. 棉铃虫人工饲料的研究. 昆虫学报, 24(1): 108–110.
- Akhurst R J, James W and Bird L J. 2003. Resistance to the *Cry1Ac* delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1290–1299.
- Beegle C C, Hickie L A and Fitch W L. 1990. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins // Hickie L A and Fitch W L. *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*. Washington, DC: American Chemical Society, 14–21.
- Caccia A S, Hernandez-rodriguez C S and Mahon R J. 2010. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* *Cry2A* insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. *PLoS ONE*, 5: e9975.
- Chakrabarti S K, Mandaokar A and Kumar P A. 1998. Efficacy of lepidopteran specific delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 336–337.
- Gahan L J, Ma Y T and Coble M L M. 2005. Genetic basis of resistance to *Cry1Ac* and *Cry2Aa* in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 98: 1357–1368.
- Lee M K, Curtiss A and Alcantara E. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins *CryIAa* and *CryIAC* on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 583–586.
- Liao C Y, Heckel D G and Akhurst R. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8: 55–63.
- Li H and Bouwer G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* *Cry* proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 110–116.
- Mahon R J, Olsen K M and Downes S. 2007. Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins *Cry1Ac* and *Cry2Ab* in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 100: 1844–1853.
- Perlak F J, Deaton R W and Armstrong T A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio-Technology*, 8: 939–943.
- Wu K, Guo Y and Lv N. 1999. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. *Journal of Economic Entomology*, 92: 273–278.

(责任编辑:郭莹)

