

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2014.04.005

盐城棉区棉铃虫田间种群对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率

刘 标^{1*}, 方志翔¹, 郑央萍¹, 徐文华²

¹环境保护部南京环境科学研究所生物安全重点实验室, 江苏 南京 210042;

²江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002

摘要:【背景】转 *Bt* 基因抗虫棉已经在我国进行了近 20 年的大规模商业化种植, 产生了显著的经济和环境效益。但是, 靶标害虫棉铃虫的抗性是转 *Bt* 基因抗虫棉产业健康发展所面临的重大问题, 而抗性监测是解决这一问题的必要管理措施。盐城市是江苏省转基因抗虫棉的主产区, 但有关该地区棉铃虫对转 *Bt* 基因抗虫棉的抗性基因频率未见报道。【方法】于 2012 年在盐城三龙镇和东台镇棉区采集田间棉铃虫种群, 检测了初孵幼虫对花铃期转 *Bt* 基因抗虫棉中 30 幼嫩叶片的敏感性, 用区分剂量法检测了 2 龄幼虫对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率。【结果】取食转 *Bt* 基因抗虫棉叶片后, 棉铃虫初孵幼虫在 9 d 内全部死亡; 三龙镇和东台镇棉铃虫 2 龄幼虫对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率分别为 7.6×10^{-3} 和 6.9×10^{-3} 。【结论与意义】目前, 盐城棉区的棉铃虫对转 *Bt* 基因抗虫棉仍保持很高的敏感性, 棉铃虫种群对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率没有发生显著变化, 但仍需持续监测。

关键词: 棉铃虫; 盐城; *Bt* 蛋白; 抗性

Frequency of resistance alleles to *Bt* toxin in the populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) from cotton fields in Yancheng, Jiangsu Province

Biao LIU^{1*}, Zhi-xiang FANG¹, Yang-ping ZHENG¹, Wen-hua XU²

¹Key Lab on Biosafety, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing, Jiangsu 210042, China; ²Institute of Agricultural Sciences in Coastal Area of Jiangsu Province, Yancheng, Jiangsu 224002, China

Abstract:【Background】Transgenic *Bt* cotton has been grown commercially in a large scale in China for nearly 20 years. The evolution of resistance by the target pest, the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner) is the most important threat to the sustainable development of the cotton industry. Resistance monitoring is a necessary management measure to extend the usefulness of transgenic *Bt* cotton. The Yancheng area is the principal planting area of transgenic *Bt* cotton in Jiangsu Province, but the resistant gene frequency of *H.armigera* in this area has not been reported.【Method】Populations of *H.armigera* were collected in the cotton fields near Yancheng City in 2012 and the sensitivity of newly hatched larvae to the young leaves of *Bt* cotton (Zhong-30) was tested. The resistance allele frequency of second instar larvae was studied using the distinguishing dosage method.【Result】All the individuals of newly hatched larvae of *H.armigera* from Yancheng died within 9 d after feeding on transgenic *Bt* cotton leaves. The resistance allele frequency to *Bt* protein of second instar larvae from Sanlong and Dongtai Towns were 7.6×10^{-3} and 6.9×10^{-3} respectively.【Conclusion and significance】The current populations of *H.armigera* from the Yancheng cotton fields remained highly sensitive to transgenic *Bt* cotton, and their frequency of resistance alleles did not change significantly. However, continuous monitoring of the resistance allele frequency in field populations is still necessary.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Yancheng; *Bt* protein; resistance

转 *Bt* 基因作物因其高效杀虫性而被广泛应用, 已经在全世界推广种植长达近 20 年之久。但是, 随着 *Bt* 作物种植时间的延长以及关于害虫 *Bt*

抗性研究的深入, 越来越多的科学家开始关注田间靶标害虫对 *Bt* 作物产生抗性风险的问题。多方面研究已经证实了害虫对 *Bt* 作物产生抗性的潜在风

收稿日期 (Received): 2014-10-11 接受日期 (Accepted): 2014-11-03

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2014ZX08012-005); 国家科技支撑计划 (2013BAD11B01)

作者简介: 刘标, 男, 研究员。研究方向: 转基因生物安全。

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: liubiao@nies.org

险(Ferré & Van Rie, 2002; Griffiths & Aroian, 2005; Meng et al., 2004; Tabashnik, 1994)。因此, 针对靶标害虫对转 *Bt* 作物抗性检测和监测显得尤为重要。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 是转 *Bt* 基因抗虫棉的靶标害虫, 有关河北、河南、山东、山西等地的棉铃虫抗性已有较多研究(何丹军等, 2001; Wu, 2007), 但是, 关于长江中下游地区棉铃虫的抗性变化情况尚未见报道。为此, 本研究选择我国长江流域盐城棉区为试验地, 开展了田间棉铃虫种群对 *Bt* 毒素抗性基因频率的监测工作, 以期对转 *Bt* 基因抗虫棉花的长期发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 试虫采集及饲养

于 2012 年 8 月(第 3 代棉铃虫盛发期), 在江苏盐城市三龙镇和东台镇棉花种植区内随机采集 500 余头棉铃虫 4 龄幼虫, 带回实验室放入培养皿中, 在室内温度(27 ± 1) °C、光周期 L:D=14 h:10 h、相对湿度 75%~85% 的条件下用人工饲料饲养至化蛹并羽化。然后将羽化后的成虫放入一次性塑料杯内单对交配(同一棉区 1 头雌成虫与 1 头雄成虫交配), 每个单对编号, 收集每个单对的有效卵, 每个单对独立孵化饲养。取部分初孵棉铃虫幼虫用于测定其对转基因抗虫棉的敏感性, 其余幼虫用人工饲料饲养至 2 龄初期, 体重 1 mg 左右, 用于测定其对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率。

1.2 供试棉

供试棉分别为由中国农业科学院棉花研究所研制的中棉系列中 16 和由山东省棉花研究中心研制的鲁棉系列转 *Bt* 基因抗虫棉中 30。

1.3 供试毒蛋白

Bt (CryIAc) 活化毒素购自美国 Case Western Reserve University。将活化后的 *Bt* 毒素溶于 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH=7.4), 配成 0.1 μg·μL⁻¹ 的毒蛋白溶液; 对照组试剂(CK)为 pH 7.4、0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液。

1.4 转 *Bt* 基因棉花对棉铃虫死亡率和体重的影响

把湿润的滤纸放入培养皿中, 每皿接初孵棉铃虫幼虫 5 头后分别饲喂转 *Bt* 基因棉花(中 30)及其对照非转基因棉花(中 16)的幼嫩叶片。接虫后用纱布封严培养皿, 防止幼虫逃逸和保持皿内湿度,

置于(26 ± 1) °C、L:D=14 h:10 h 的养虫室内。试验设 5 个重复。每天更换新鲜的棉花叶片, 并调查各处理幼虫死亡情况, 计算死亡率, 用分析天平精确称量各处理组存活幼虫的体重。

1.5 棉铃虫幼虫对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率

区分剂量法是在生物测定的基础上发展起来的, 其原理是用杀死 99% 敏感个体的剂量作为诊断剂量, 在此浓度下存活的个体为抗性个体, 反之则为非抗性个体。根据陈海燕等(2007)的方法, 棉铃虫 2 龄初期幼虫对活化 CryIAc 毒素的区分剂量为 10 μg·头⁻¹。具体操作步骤:(1)取已冷却凝结的棉铃虫人工饲料, 以切片器将之切成 3 mm 厚的薄片; 然后用打孔器打成圆片状, 用镊子放入 24 孔培养板底部。(2)将 24 孔培养板每个孔中的饲料压实, 并将孔口和孔壁等可能沾有饲料的地方清理干净。(3)将 100 μL 0.1 μg·μL CryIAc 活化毒素加入每个孔, 培养板数量以供试幼虫数量而定。取一个 24 孔培养板作对照, 只加入 100 μL 磷酸盐缓冲液。(4)待 24 孔培养板饲料表面的溶液晾干后, 每孔接入上述 1.1 中获得的 1 头体重约 1 mg 左右的 2 龄初期幼虫, 用 2 层尼龙纱和 1 层黑布覆盖防止其逃跑。置于恒温光照培养箱(26 ± 1) °C、L:D=14 h:10 h、相对湿度 75%~85% 条件下, 5 d 后检查幼虫的死亡状况。完全死亡或生长发育受到限制(体重小于 5 mg)均视为死亡。

1.6 统计分析

采用 Excel 2007 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 转 *Bt* 基因棉花对棉铃虫死亡率和体重的影响

由表 1 可见, 初孵棉铃虫幼虫取食转 *Bt* 基因棉花幼嫩叶片之后, 在 9 d 之内全部死亡, 而取食非转基因棉花叶片的初孵棉铃虫幼虫在 9 d 之内绝大多数存活, 且生长发育正常。这说明目前盐城棉铃虫田间种群对转基因抗虫棉仍保持很高的敏感性。

2.2 盐城田间棉铃虫种群对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率

三龙镇和东台镇的受试总虫数分别为 397 和 448 头。2 龄幼虫经区分剂量处理 5 d 后, 绝大多数死亡, 两地的死亡虫数分别为 394 和 445 头, 由此计算出三龙镇和东台镇的田间棉铃虫种群对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率分别为 7.6×10^{-3} 和 6.9×10^{-3} 。

表1 初孵棉铃虫取食不同棉叶后的死亡率和体重

Table 1 Mortality and body mass of the newly hatched larvae of the cotton bollworm exposed to different cotton leaves

棉花 Cotton lines	幼虫死亡率 Larval mortality (%) at				幼虫体重 Larval body mass (mg)		
	1 d	3 d	6 d	9 d	3 d	6 d	9 d
中 16 Zhong-16	3.33±1.26A	5.76±2.31A	5.76±2.31A	5.76±2.31A	2.61±0.46A	7.35±0.50A	24.52±2.15A
中 30 Zhong-30	11.54±3.86B	57.14±9.67B	97.64±11.54B	100.00±0.00B	1.35±0.09B	2.24±0.14B	0.00±0.00B

数据为 5 个重复的平均值±标准偏差, 同列数据后附不同大写字母者表示不同品种间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Datas are means±SD, the same column followed by different capital letters show very significant differences between different cottons.

3 结论与讨论

转 *Bt* 基因棉长期大量种植, 造成的潜在风险之一是靶标害虫对 *Bt* 棉的抗性进化, 这将严重威胁 *Bt* 棉的持续有效应用。靶标害虫对转 *Bt* 基因作物的抗性进化依赖于多种因素, 包括靶标害虫种群中抗性等位基因的初始频率、害虫抗性遗传模式、抗性的显隐性度及适合度、害虫在不同寄主上的时空分布情况以及不同地理种群间的基因流等 (Gould, 1998; McGaughey & Whalon, 1992; Tabashnik, 1994)。抗性监测是了解害虫抗性发展的有效途径, 能够为防治抗性害虫种群提供科学依据 (Huang, 2006)。Akhurst *et al.* (2003) 将田间采集的 3 个棉铃虫种群与室内敏感品系交配, 在含有 Cry1Ac 毒素的饲料上筛选 16 代后检测 *Bt* 抗性, 研究结果显示, 对 *Bt* 有抗性的棉铃虫能够在表达 Cry1Ac 毒素蛋白的转基因棉上完成幼虫生长发育且羽化繁殖, 说明棉铃虫有可能对 *Bt* 棉产生抗性。Li *et al.* (2004) 通过 F_1 代筛查法检测到 2002 年采自河北安次县和山东夏津县的棉铃虫田间种群对 Cry1Ac 的抗性基因频率分别为 1×10^{-3} 和 0.6×10^{-3} 左右。陈海燕等 (2007) 采用改进的 F_1 筛查法检测到 2005 年采自河南安阳和河北沧县的棉铃虫种群对 Cry1Ac 的抗性基因频率分别为 1.4×10^{-3} 和 1.5×10^{-3} 。刘凤沂等 (2008) 采用 F_1 代法在室内用喂饲法检测了 2006 年采自河北省邱县 *Bt* 棉田间棉铃虫对 *Bt* 棉的抗性等位基因频率, 发现 127 头田间雄虫中 24 头携带抗性基因, 估测抗性等位基因频率为 0.94, 该值为我国首次检测到的高抗性等位基因频率。须志平 (2008) 采用单雌系 F_2 代法监测到河北邱县地区 2003~2005 年棉铃虫种群对转基因 *Bt* 棉的抗性等位基因频率为 0.0146, 该频率值明显高于 1999 年的监测结果 (何丹军等, 2001), 表明持续监测棉铃虫田间种群的抗性变化十分必要。

本研究表明, 盐城地区棉铃虫种群对我国目前的主栽转基因抗虫棉仍保持很高的敏感性, 三龙镇

和东台镇 2 龄幼虫对 *Bt* 蛋白的抗性基因频率分别为 7.6×10^{-3} 和 6.9×10^{-3} 。这个结果与河北、河南、山东等地的监测结果 (卢美光等, 2000) 属于同一数量级水平, 表明我国种植转基因棉花地区的田间棉铃虫种群还未出现明显的抗性进化。但是, 管理措施不足已经导致某些靶标害虫对转 *Bt* 基因抗虫作物抗性的快速发展 (van Rensburg, 2007), 且根据近年来冀、鲁、豫棉区抗虫棉抗性监测结果, 抗虫棉对棉铃虫的防效有下降的趋势 (吕丽敏等, 2013)。这说明棉铃虫抗性风险依然存在, 对此绝不能放松警惕, 必须连续、系统地做好棉铃虫抗性监测工作。

参考文献

- 陈海燕, 杨亦桦, 武淑文. 2007. 棉铃虫田间种群 *Bt* 毒素 Cry1Ac 抗性基因频率的估算. 昆虫学报, 50(1): 25-30.
- 何丹军, 沈晋良, 周威君, 高聪芬. 2001. 应用单雌系 F_2 代法检测棉铃虫对转 *Bt* 基因棉抗性等位基因的频率. 棉花学报, 13(2): 105-108.
- 刘凤沂, 朱玉成, 沈晋良. 2008. F_1 代法监测田间棉铃虫对转 *Bt* 基因棉的抗性. 昆虫学报, 51(9): 938-945.
- 卢美光, 赵建周, 范贤林. 2000. 华北地区棉铃虫对 *Bt* 杀虫蛋白的抗性监测. 棉花学报, 12(4): 180-183.
- 吕丽敏, 雒珺瑜, 刘全义, 杨子山, 张帅, 王春义, 崔金杰. 2013. 冀鲁豫棉区 *Bt* 棉 Cry1A 蛋白表达及对棉铃虫控制效果监测. 棉花学报, 25(5): 459-466.
- 须志平. 2008. 应用单雌系 F_2 代法监测田间棉铃虫种群对转 *Bt* 基因棉的抗性. 南京: 南京农业大学.
- Akhurst R J, James W, Bird L and Beard C. 2003. Resistance to the Cry1Ac-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1290-1299.
- Ferré J and Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47: 501-533.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrate pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701-726.