

水稻螟虫对 4 种 Bt 杀虫蛋白的敏感性测定

张广林, 韩成香, 姚洪渭, 叶恭银*

(浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029)

摘要 采用人工饲料喂毒法和浸叶喂毒法测定了二化螟、大螟和稻纵卷叶螟初孵幼虫对 4 种 Bt 杀虫蛋白的敏感性。二化螟对 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C 和 Cry2A 的 LC_{50} 分别为 1.739、2.645、2.794 ng/mg 和 15.965 ng/mg; 大螟依次为 2.455、10.046、11.803 ng/mg 和 35.359 ng/mg; 稻纵卷叶螟依次为 4.000、1.611、69.031 $\mu\text{g/mL}$ 和 12.708 $\mu\text{g/mL}$ 。作者就不同水稻螟虫对不同 Cry 蛋白的敏感性差异及其在转基因抗虫作物中的应用作了讨论。

关键词 苏云金杆菌; Cry 蛋白; 二化螟; 大螟; 稻纵卷叶螟

中图分类号 S 435.112.1

Susceptibility of rice lepidopterans to four insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*

Zhang Guanglin, Han Chengxiang, Yao Hongwei, Ye Gongyin

(Institute of Insect Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The susceptibility of the neonates of rice lepidopterans, striped stem borer *Chilo suppressalis* (Walker), pink stem borer *Sesamia inferens* (Walker) and leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) to four Cry proteins, i. e. Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, and Cry2A, from *Bacillus thuringiensis* were bioassayed using diet-feeding method and leaf-immersion method. The LC_{50} values of Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, and Cry2A to *C. suppressalis* were 1.739 ng/mg, 2.645 ng/mg, 2.794 ng/mg, and 15.965 ng/mg, respectively; and those to *S. inferens* were 2.455 ng/mg, 10.046 ng/mg, 11.803 ng/mg, and 35.359 ng/mg, respectively; and to *C. medinalis*, 4.000 $\mu\text{g/mL}$, 1.611 $\mu\text{g/mL}$, 69.031 $\mu\text{g/mL}$, and 12.708 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Finally, the difference in susceptibility of rice lepidopterans to Cry proteins and its application to transgenic insect-resistant crops were also discussed.

Key words *Bacillus thuringiensis*; Cry protein; *Chilo suppressalis*; *Sesamia inferens*; *Cnaphalocrocis medinalis*

水稻螟虫,如二化螟[*Chilo suppressalis* (Walker)]、大螟(稻蛀茎夜蛾)[*Sesamia inferens* (Walker)]和稻纵卷叶螟[*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)]等是严重威胁水稻生产的鳞翅目害虫。全球每年因其为害而造成的产量损失高达 100 亿 $\text{kg}^{[1]}$,其中我国水稻螟虫年发生面积约 0.15 亿 hm^2 ,年防治代价 45.7 亿~60.0 亿元,残虫造成的作物损失近 65.0 亿元,总经济损失达 115.0 亿元^[2]。至今,生产上一直使用化学杀虫剂防治水稻螟虫,但长期大量不合理用药已导致水稻螟虫产生抗药性,引起防效降低,防治成本增加^[3-4]。微生物杀虫剂如苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)

制剂等对水稻螟虫具较好防效^[5-6],但由于见效慢、易受环境条件影响等而在实际应用中颇受限制。

为有效控制水稻螟虫为害、减少化学杀虫剂使用量,自 20 世纪 90 年代以来,转基因抗虫水稻,特别是转 Bt 基因水稻不断培育成功,不少抗虫效果好的水稻品系已进入或通过了田间试验^[7-9]。2005 年,伊朗率先开展了转 Bt 基因水稻的商业化种植^[10]。我国亦正积极推进转基因水稻的商业化进程^[9]。但是,水稻螟虫作为靶标生物,在转 Bt 基因水稻大面积商业化推广后能否产生抗性的风险问题一直颇受关注^[11]。鉴于目前有关水稻螟虫对 Bt 杀虫蛋白(Cry 蛋白)的敏感性尚少有研究,本文就不

收稿日期: 2007-06-12

基金项目: 国家“973”项目(001CB109004)

* 通讯作者 Tel:0571-86971696;E-mail:chu@zju.edu.cn

同水稻螟虫田间种群对常用于转基因抗虫作物/水稻培育的目的基因所编码的4种Cry蛋白(Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C和Cry2A等)的敏感性进行了测定,为水稻螟虫的Bt抗性研究以及转多价基因抗虫水稻的培育提供必要的依据。

1 材料与方法

1.1 杀虫蛋白和供试昆虫

2006年自杭州稻田分别采集二化螟、大螟和稻纵卷叶螟第2代成虫,置养虫室内于稻苗上产卵。饲养温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度80%,光周期L//D=16h//8h。待卵孵化后,取初孵幼虫测定对Bt杀虫蛋白的敏感性。杀虫蛋白由加拿大渥太华大学的I. Altosaar教授提供。

1.2 生物测定

采用人工饲料喂毒法测定二化螟和大螟对Bt杀虫蛋白的敏感性。分别参照FAO^[12]和Chatterji等^[13]配方配制二化螟和大螟幼虫的人工饲料。分别取4种Cry蛋白(Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C和Cry2A等,由本实验室保存)按一定浓度梯度与人工饲料充分混合均匀,装入玻璃指形管($d=2.0\text{ cm}$, $l=10.0\text{ cm}$)中。每处理浓度设3个重复,每重复接虫10头,共处理180头。以不含Cry蛋白的人工饲料为对照。接虫后,用棉花球封口,在无光照、温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度80%条件下饲养,96h后统计幼虫死亡率。

稻纵卷叶螟对Cry蛋白的敏感性测定采用浸叶法。分别配制不同Cry蛋白系列浓度溶液(含0.1%

Triton X-100),取新鲜稻叶切成6.0 cm长,经灭菌双蒸水漂洗后于蛋白溶液中浸没30 s,取出晾干后置于铺有润湿滤纸的培养皿($d=12.0\text{ cm}$)中,两端压以含保鲜液的棉花球保湿。每处理浓度设3个重复,每重复接虫30头,共处理300头。以未经蛋白溶液处理的为对照。接虫后,用Parafilm膜封口,在温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度80%、光周期L//D=16h//8h条件下饲养,96h后统计幼虫死亡率。

数据采用POLO-PC软件^[14]计算获得 LC_{50} 及其95%置信限,以两者 LC_{50} 的95%置信限互不重叠示为显著性差异。

2 结果

不同水稻螟虫对4种Cry蛋白的敏感性不尽相同(表1)。二化螟以Cry2A的 LC_{50} 显著较高,分别是Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1C的9.2、6.0倍和5.7倍;其中后3种Cry蛋白的 LC_{50} 无显著性差异。大螟对不同Cry蛋白的敏感性变化与二化螟的相似,亦以Cry2A的敏感性显著较低,分别是Cry1Ab、Cry1Ac和Cry1C的14.4、3.5倍和3.0倍;其中Cry1Ac和Cry1C的 LC_{50} 无显著差异,但均显著高于Cry1Ab的。4种Cry蛋白对大螟的 LC_{50} 均明显较二化螟的为高,即大螟对该4种Cry蛋白的敏感性相对较低,其中对Cry1C和Cry2A的敏感性差异均达显著。稻纵卷叶螟以对Cry1C的敏感性显著较低,其次为Cry2A,其 LC_{50} 为前者的18.4%;Cry1Ab和Cry1Ac的 LC_{50} 显著较低,其中Cry1Ac的 LC_{50} 是Cry1Ab的2.5倍,但两者间差异不显著。

表1 4种Cry蛋白对水稻螟虫的 LC_{50} 比较

Cry 蛋白	LC_{50} (95%置信限)/ $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$		
	二化螟	大螟	稻纵卷叶螟 ¹⁾
Cry1Ab	1.739(1.136~2.276)	2.455(1.745~3.138)	4.000(2.284~6.182)
Cry1Ac	2.645(1.169~4.669)	10.046(4.171~18.473)	1.611(0.796~2.883)
Cry1C	2.794(1.533~4.447)	11.803(8.611~15.196)	69.031(21.049~305.522)
Cry2A	15.965(11.550~20.067)	35.359(24.415~46.347)	12.708(8.071~17.463)

1) LC_{50} 单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4种Cry蛋白对二化螟、大螟和稻纵卷叶螟的LD-p线的斜率均以Cry2A和Cry1Ab的相对较高,即3种水稻螟虫田间种群对Cry2A和Cry1Ab敏感性的异质性相对较低(表2)。不同水稻螟虫之间,以4种Cry蛋白对稻纵卷叶螟LD-p线的斜率相对较低,即种群异质性相对较高。

表2 4种Cry蛋白对水稻螟虫的LD-p线斜率比较

Cry 蛋白	二化螟	大螟	稻纵卷叶螟
Cry1Ab	2.754 $\pm$ 0.561	3.143 $\pm$ 0.603	1.310 $\pm$ 0.177
Cry1Ac	1.205 $\pm$ 0.228	1.275 $\pm$ 0.236	0.866 $\pm$ 0.136
Cry1C	1.615 $\pm$ 0.294	2.502 $\pm$ 0.397	0.524 $\pm$ 0.135
Cry2A	3.494 $\pm$ 0.682	2.709 $\pm$ 0.492	1.896 $\pm$ 0.287

3 讨论

二化螟对4种Cry蛋白的敏感性依次为: Cry1Ab>Cry1Ac>Cry1C>Cry2A,这与Alcantara等报道的结果一致^[15],而与Lee等报道的Cry2A>Cry1C>Cry1Ac不尽相同^[16]。二化螟对不同Cry蛋白的敏感性差异主要与其幼虫中肠表皮刷状缘膜囊泡(brush border membrane vesicles, BBMV)上特异性受体对Cry蛋白的结合能力及数量不同有关。二化螟中肠BBMV受体对Cry1Ab和Cry1Ac具有相同的结合位点,且结合亲和力较强;对Cry1C和Cry2A的结合位点与Cry1Ab及Cry1Ac的明显不同,亲和力虽相对较弱,但位点数量则明显较多^[15-16]。本文测得不同Cry蛋白对二化螟的LC₅₀比Lee等^[16]和Alcantara等^[15]报道的均明显较低,这可能与杭州地区稻田较少使用Bt制剂防治水稻螟虫而导致当地二化螟种群对Bt相对较为敏感有关。Cry1Ab对杭州地区二化螟种群的LD₅₀线斜率相对较高,也表明该种群对Cry1Ab敏感性的异质性较低。

大螟对4种Cry蛋白的敏感性及种群异质性变化与二化螟的相似,但不同Cry蛋白对大螟的LC₅₀均明显高于二化螟的,即大螟对Cry蛋白的敏感性相对较低。这与现已有报道的夜蛾科害虫对转Bt基因作物的敏感性比螟蛾科的普遍较低相一致^[17]。稻纵卷叶螟对不同Cry蛋白的敏感性变化与二化螟和大螟的不尽相同,但仍以对Cry1Ab和Cry1Ac相对较为敏感。对Cry1C很不敏感,LC₅₀高达69.031 μg/mL,可能是其对稻纵卷叶螟本身毒性不强,其内在机制尚有待进一步研究。

不同水稻螟虫对Cry1Ab的敏感性均较高,这与转Cry1Ab基因水稻(克螟稻及其杂交后代)表现的优异杀螟效果相一致^[18-19]。目前,4种Cry蛋白的基因均被广泛用于转基因抗虫作物的培育,其中Cry1C和Cry2A因与Cry1Ab、Cry1Ac在鳞翅目害虫中肠BBMV上具有不同的结合位点,该2种基因被用来与后2种基因组合共同转入作物体内,培育成转双价基因抗虫作物^[20],不仅获得较理想的杀虫效果,而且可延缓靶标害虫产生抗性。

参考文献

[1] HERDT R W. Research priorities for rice biotechnology[C]// KHUSH G S, TOENNIENSEN G H. Rice biotechnology. Wallingford: CAB International, 1991: 19-54.
[2] 盛承发, 王红托, 盛世余, 等. 我国稻螟灾害的现状 & 损失估计[J]. 昆虫知识, 2003, 40(4): 289-294.
[3] 王荫长, 韩召军. 我国农业害虫抗药性发生概况[J]. 昆虫知识, 1991, 2: 58-59.

[4] 黄诚华. 二化螟和大螟对氟虫脲和三唑磷敏感性 & 机理研究[D]. 杭州: 浙江大学农业 & 生物技术学院, 2006.
[5] 王忠柳. Bt 乳剂防治水稻螟虫效果显著[J]. 植物保护, 1990, (S1): 11.
[6] 范仰东, 莫小平. Bt 与锐劲特混用防治水稻二化螟的效果评价[J]. 昆虫知识, 2001(4): 33-35.
[7] 叶恭银, 胡萃, 舒庆尧. 转基因抗虫水稻的转育 & 其合理持续利用[C]//程家安, 周伟军. 跨世纪农业发展与研究. 北京: 中国环境科学出版社, 1998: 406-414.
[8] BAJAJ S, MOHANTY A. Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 275-307.
[9] HUANG J K, HU R F, ROZELLE S, et al. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity & health effects in China[J]. Science, 2005, 308(5722): 688-690.
[10] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2005. ISAAA Briefs No. 34[R]. ISAAA: Ithaca, NY, 2005.
[11] HIGH S M, COHEN M B, SHU Q Y, et al. Achieving successful deployment of Bt rice[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 286-292.
[12] FAO Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides[R]. ROME: FAO, 1980: 21.
[13] CHATTERJI S M, SHARMA G C, SIDELIQUI K H, et al. Laboratory rearing of the pink stem borer, *Sesamia inferens* Walker on artificial diet[J]. Indian Journal of Entomology, 1969, 31: 75-77.
[14] LEORA. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis[M]. Berkeley LeOra Software; Berkeley, CA, 1987.
[15] ALCANTARA E P, AGUDA R M, CURTISS A, et al. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers[J]. Archive of Insect Biochemistry Physiology, 2004, 55: 169-177.
[16] LEE M I, AGUDA R M, COHEN M B, et al. Determination of binding of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin receptors to rice stem borer midguts[J]. Applied Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1453-1459.
[17] FITT G P, MARES C L, DEACON J, et al. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia[J]. Biocontrol Science and Technology, 1994(4): 535-548.
[18] YE G Y, SHU Q Y, YAO H W, et al. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers[J]. Journal Economic Entomology, 2001, 94: 271-276.
[19] YE G Y, YAO Y W, SHU Q Y, et al. High levels of stable resistance in transgenic rice with a *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions[J]. Crop Protection, 2003, 22: 171-178.
[20] ZHAO J Z, CAO J, LI Y X, et al. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(12): 1493-1497.