

转 *cry1Ab* 基因玉米对粘虫的抗性评价

常 雪 常雪艳 何康来* 王振营 白树雄

(中国农业科学院植物保护研究所,植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100094)

摘要:粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 是我国玉米上的重要害虫。转 Bt 基因玉米为防治粘虫提供了新的途径。从室内生测和田间抗性鉴定分别研究了转 *cry1Ab* 基因抗虫玉米 YieldGard® 对粘虫的杀虫效果。用 4~7 叶期转 *cry1Ab* 基因玉米心叶室内饲养 1~3 龄粘虫幼虫 3、7 和 10 天的死亡率分别为 39.0%~92.0%、96.0%~98.0% 和 97.0%~100%, 第 14 天全部死亡, 而对照的死亡率分别为 3.0%~8.0%、6.0%~20.0% 和 11.0%~28.0%, 差异极显著。取食转 *cry1Ab* 基因玉米的幼虫不能正常生长发育, 存活 10 天的幼虫其体重仅为取食对照玉米的 9.0%。田间玉米 4~5 叶期, 分别接 1~6 龄粘虫幼虫于转 *cry1Ab* 基因和非转基因玉米心叶。转 *cry1Ab* 基因玉米上各龄期幼虫平均存活率仅为 0.0~6.7%, 极显著低于非转基因玉米的 8.3%~80.0%。转 *cry1Ab* 基因玉米的危害级别 0.1~0.7, 显著小于非转基因玉米的 2.1~7.3。结果说明转 *cry1Ab* 基因玉米 YieldGard® 对粘虫各龄幼虫有很高的杀虫作用和田间控制效果, 同时能有效保护玉米免受危害。

关键词: Bt 玉米; 粘虫; 抗性

Resistance evaluation of transgenic Bt maize to Oriental armyworm

CHANG Xue CHANG Xue-yan HE Kang-lai* WANG Zhen-ying BAI Shu-xiong

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: The Oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker), is an important insect pest of maize. Planting transgenic Bt maize is a new way for the control of corn borers. Monsanto's YieldGard® transgenic Bt maize expressing Cry1Ab protein and a non-Bt control were evaluated through laboratory bioassays by exposing 1st–3rd instar larvae of Oriental army worm directly to whorl leaves. The 1st–3rd instar larvae fed on Bt maize leaves could lead to 39.0%–92.0%, 96.0%–98.0%, and 97.0%–100% mortalities within 3, 7, and 10 days, respectively. All larvae could not survive longer than 14 days. There were significant difference compared with only 3.0%–8.0%, 6.0%–20.0%, and 11.0%–28.0% mortalities for the non-Bt control. The development of larvae was also severely inhibited when feeding on Bt maize. Larvae survived 10 days on Bt maize leaves weighted only 9% of that on non-Bt control. Field trials were also conducted with artificial infestations of 1st–6th instar larvae into the maize whorl at V4–V7 stage, respectively. There were only 0.0–6.7% of survival on Bt maize. In contrast, there were 8.3%–80.0% of survival on non-Bt control, which were significantly higher than Bt maize. Damage ratings of Bt maize were 0.1–0.7, which were significantly lower than 2.1–7.3 of non-Bt control. These results indicated that YieldGard® could provide good controls to Oriental armyworm and protect maize well from the damage.

Key words: Bt maize; *Mythimna separata*; resistance

基金项目:“863”课题(2002AA212161)资助

作者简介:常雪,女,1981年生,硕士研究生,主要从事 Bt 玉米抗虫效果评价和害虫抗性治理研究, email: changxue1981209@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), email: kanglai.he@263.net; 收稿日期:2007-04-28

粘虫 *Mythimna separata* (Walker), 俗称行军虫, 属鳞翅目 Lepidoptera, 夜蛾科 Noctuidae, 是一种寄主范围非常广的农业害虫, 当其幼虫成群迁移时能使作物大幅减产, 甚至颗粒无收^[1]。我国东北春玉米区和华北夏玉米区常遭受二、三代粘虫的危害。转 Bt 基因玉米为防治玉米害虫提供了新的途径, 对玉米上的靶标害虫欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner) 和亚洲玉米螟 *O. furnacalis* (Guenée) 有很好的防治效果^[2-4]。Bt 玉米对其它鳞翅目害虫的作用国内外已作了探讨。有研究报道室内生测 Bt 玉米对粘虫初孵幼虫和 4、5 龄幼虫有很强的杀虫效果^[5-6]。但也有研究发现 Bt 玉米对粘虫的杀虫效果并不理想, 如 Bt 玉米叶片对 1 龄粘虫幼虫致死作用仅为 35%, 2~4 龄更低^[7]。此外, 由于田间自然环境条件远比室内复杂, 而目前还没有 Bt 玉米田间杀虫效果的研究报道。作者研究了孟山都公司转 *cry1Ab* 基因玉米 YieldGard[®] 心叶组织对粘虫幼虫存活和生长发育的影响以及田间抗虫效果, 旨在明确转 *cry1Ab* 基因玉米对粘虫的杀虫活性与田间防治效果, 为今后组建以 Bt 玉米为基础的主要害虫综合治理技术体系提供科学依据。

目前, 全世界转基因玉米 (Bt 或 Bt&HT) 先后有 35 个转化系 (events) 获得批准, 分别在美国、加拿大、阿根廷、菲律宾、西班牙、法国等 13 个国家商业化种植, 2006 年已达到 20 万 hm^2 ^[8]。我国也有 3 个转 Bt 基因抗虫玉米品种进入环境释放或生产性试验阶段。研究转 Bt 基因玉米对其它鳞翅目害虫粘虫的影响, 对于明确转基因玉米的生态安全性具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试玉米 转 Bt 基因抗虫玉米品种 YieldGard[®] (MON810) 及其非转基因对照品种由孟山都远东有限公司提供, 种植在中国农业科学院植物保护研究所试验农场内。每小区 30 m^2 (6 m × 5 m), 行距 60 cm, 株距 30 cm, 试验重复 3 次, 试验小区随机排列, 生长期不使用任何农药, 常规管理。

1.2 供试昆虫 所用粘虫由中国农业科学院植物保护研究所粘虫组提供。1 龄幼虫均为孵化后不超过 24 h 的初孵幼虫, 大龄幼虫则用玉米幼苗室内人工饲养至所需虫龄 (以头壳大小鉴别龄期), 蜕皮后不超过 12 h 的大小相近、活跃健壮的幼虫。

1.3 转 *cry1Ab* 基因玉米对粘虫抗性的生物测定

在玉米心叶 4~7 叶期时从田间采回植株, 选用未完全展开的内层心叶, 消毒处理 (先将叶片放在 0.3% 的 NaClO 溶液中浸泡 3 min 左右, 用自来水冲洗两遍, 再用蒸馏水冲洗一遍, 用滤纸吸去表面水珠备用) 后剪成 2 cm × 3 cm 的小块, 放入塑料测试盒 (直径 3 cm × 5 cm) 中, 每盒放 1~2 片, 接 1~3 龄粘虫幼虫 1 头, 置于 26 ± 1℃、80% RH、光照周期 14 L:10 D 养虫室中。每天调查 1 次, 根据组织被取食消耗情况随时添加或更换相同来源的新组织, 记录存活幼虫数, 直到幼虫全部死亡或化蛹。每处理 100 头幼虫。

1.4 田间试验 在玉米 4~5 叶期, 分别接粘虫 1~6 龄幼虫于玉米喇叭口内, 用直径约 25 cm、高 55 cm 的透明塑料圆筒将整株玉米苗罩住, 上面用纱布封口, 防止试验粘虫逃逸和避免田间自然粘虫的迁入以及捕食性天敌的影响。接虫量: 1 龄幼虫 20 头/株, 2 龄幼虫 5 头/株, 3 龄幼虫 3 头/株, 4~6 龄幼虫 2 头/株, 每处理接 30 株。在接虫 5~7 天后, 逐株调查植株被害程度, 记录每株存活幼虫数和食叶级别, 作为判断 YieldGard[®] 抗性评价标准。食叶级别按照叶片被害面积的百分率分 1~10 级, 1 级为叶片被害面积 < 5%, 9 级为叶片被害率 ≥ 80%。

1.5 统计分析 采用 SAS 程序 PROC TTEST 进行统计分析 (SAS V8.2), 百分数首先进行反正弦转换。

2 结果与分析

2.1 Bt 玉米心叶对 1~3 龄粘虫的杀虫效果

结果表明, 取食 Bt 玉米心叶的 1~3 龄幼虫 3、7 和 10 天的死亡率达 39.0%、96.0% 和 97.0% 以上, 而取食非转 *cry1Ab* 基因玉米心叶的死亡率为 8.0%、20.0% 和 28.0% 以下 (表 1), 差异极显著。虽然取食 Bt 玉米心叶的幼虫少数可存活 13 天, 但其体重几乎没有增加。从饲养 3 龄幼虫体重变化看, 取食 Bt 玉米的幼虫体重增加非常缓慢, 存活 10 天的幼虫其体重仅为取食非 Bt 玉米幼虫的 9% (图 1), 差异极显著 ($P < 0.01$)。取食 Bt 玉米 14 天, 所有幼虫全部死亡。

2.2 田间抗虫效果

田间人工接虫鉴定结果表明, 1~6 龄幼虫平均存活率 Bt 玉米 YieldGard[®] 为 0.0~6.7%, 而非 Bt 玉米对照为 8.3%~80.0%, 二者间存在极显著差

表 1 取食 Bt 和非 Bt 玉米心叶的亚洲玉米螟 1~3 龄幼虫的存活率

Table 1 Survival of 1st–3rd instar larvae of *M. separata* fed on Bt and non-Bt maize whorl leaves

龄期 Instar	玉米品种 Maize variety	幼虫存活率 Larval survival (%)		
		3 d	7 d	10 d
1 龄 1st instar	YieldGard®	29.0 ± 8.1**	3.0 ± 2.1**	0.0 ± 0.0**
	CK	98.0 ± 1.3	80.0 ± 4.5	72.0 ± 4.9
2 龄 2nd instar	YieldGard®	61.0 ± 7.4**	4.0 ± 1.6**	3.0 ± 1.5**
	CK	97.0 ± 1.5	94.0 ± 3.1	89.0 ± 4.1
3 龄 3rd instar	YieldGard®	8.0 ± 1.3**	2.0 ± 1.3**	1.0 ± 1.0**
	CK	92.0 ± 2.0	86.0 ± 2.7	82.0 ± 2.5

注: ** 同龄幼虫取食 Bt 与非 Bt 玉米的平均存活率间差异显著 (*t*-测验)。Note: ** The means within same instars were significantly different between Bt and non-Bt maize by *t*-test ($t_{1-3d} = -9.62$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{1-7d} = -12.39$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{1-10d} = -17.97$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{2-3d} = -5.95$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{2-7d} = -15.08$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{2-10d} = -12.75$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{3-3d} = -15.56$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{3-7d} = -17.61$, $df = 18$, $P < 0.0001$; $t_{3-10d} = -24.17$, $df = 18$, $P < 0.0001$).

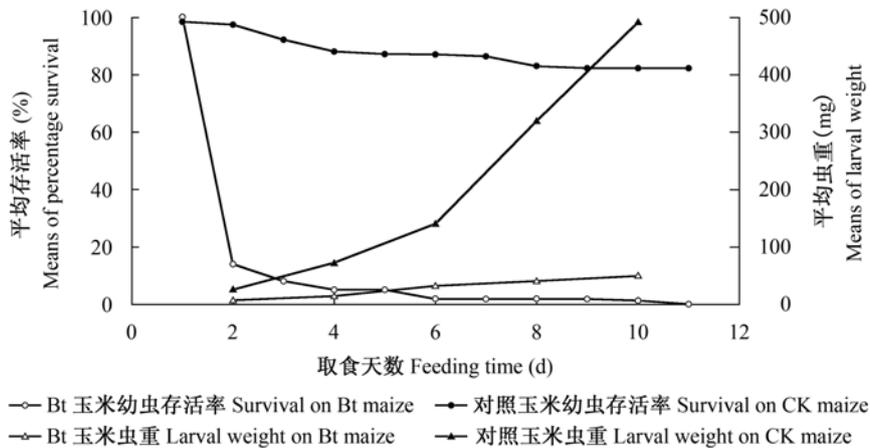


图 1 粘虫 3 龄幼虫取食 Bt 和非 Bt 玉米心叶的存活率和平均虫重

Fig. 1 Survival and larval weight of *M. separata* 3rd instar larvae fed on the whorl leaves of Bt and non-Bt maize

异(表 2)。Bt 玉米 YieldGard® 的平均危害级别为 0.1~0.7,而非 Bt 玉米对照的平均危害级别为 2.1~7.3,差异显著或极显著。这些结果说明,Bt 玉米对粘虫各龄幼虫有显著的杀虫作用,亦能显著降低幼虫对玉米的危害,即对粘虫具有较高的杀虫活性和田间防治效果。

3 讨论

尽管 Bt 玉米 YieldGard® 的主要靶标害虫是欧洲玉米螟和亚洲玉米螟,且田间防治效果达 96% 以上^[2-4],其对玉米田其它鳞翅目害虫如美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Boddie)、棉铃虫 *H. armigera* (Hübner)、秋粘虫 *Spodoptera frugiperda* (Smith)、西南玉米螟 *Diatraea grandiosella* Dyar 等的防治效果亦达 93% 以上^[9-13]。负桂玲等^[7]报道了 Bt 玉米(MG95,转 *cry1Ab* + *cry1Ac* 基因)叶片对 1~4 龄粘虫幼虫的影响,1 龄幼虫的死亡率为 35%,其它龄期更低。王振

营等^[5]用 Bt 玉米(Bt11 和 MON810)心叶饲养初孵、4 龄和 5 龄粘虫幼虫,死亡率 100%。说明不同转基因玉米品种的抗虫性及对不同虫龄的抗性间存在显著差异。本研究室内生测结果表明,Bt 玉米 YieldGard® 对 1~3 龄粘虫幼虫有很高的生长抑制作用和致死作用(死亡率 100%)。

粘虫幼虫为多食性害虫,低龄幼虫具有吐丝下垂,借风在作物株间及杂草间扩散的习性,3 龄以上幼虫有假死落地再转移到寄主上危害的习性。4 龄以上幼虫具有很强的爬行迁移能力,当把大部分作物或杂草吃光后,可爬行迁移,转移到其它作物上危害^[1]。与初侵害龄期为初孵幼虫的玉米螟相比较,田间 Bt 玉米随时可能受到粘虫各个龄期幼虫的侵害。因此,Bt 玉米对粘虫不同龄期幼虫的控制效果,特别是高龄幼虫的控制效果将直接影响到 Bt 玉米在防治粘虫中所起的作用。本研究田间人工接虫鉴定结果表明了 Bt 玉米 YieldGard® 对粘虫各龄幼

表 2 Bt 玉米对 1~6 龄粘虫的田间防治效果

Table 2 Damage ratings and larval surviving for the Bt and non-Bt maize evaluated in the field under artificial infestation with 1st-6th instar *M. separata* larvae

龄期 Instar	玉米品种 Maize variety	平均存活率(%) Larval surviving	危害级别 Damage rating
1 龄 1st instar	YieldGard®	0.0 ± 0.0**	0.10 ± 0.00**
	CK	8.3 ± 4.4	2.10 ± 0.70
2 龄 2nd instar	YieldGard®	5.3 ± 1.7**	0.60 ± 0.10**
	CK	53.3 ± 10.2	4.30 ± 0.50
3 龄 3rd instar	YieldGard®	2.2 ± 2.2**	0.30 ± 0.10**
	CK	66.7 ± 7.5	7.10 ± 0.90
4 龄 4th instar	YieldGard®	6.7 ± 4.9**	0.60 ± 0.10**
	CK	80.0 ± 4.5	7.20 ± 0.60
5 龄 5th instar	YieldGard®	6.7 ± 4.2**	0.70 ± 0.20**
	CK	70.0 ± 10.6	7.30 ± 0.60
6 龄 6th instar	YieldGard®	0.0 ± 0.0**	0.25 ± 0.03**
	CK	53.3 ± 12.8	3.90 ± 0.60

注: ** 同龄幼虫取食 Bt 与非 Bt 玉米的平均存活率、危害级别间差异显著 (*t*-测验)。Note: ** The means [larval surviving and damage rating (DR)] within same instars were significantly different between Bt and non-Bt maize by *t*-test ($t_{1-\%} = -3.8$, $df = 10$, $P = 0.0035$; $t_{1-DR} = -2.9$, $df = 10$, $P = 0.0159$; $t_{2-\%} = -4.79$, $df = 10$, $P = 0.0007$; $t_{2-DR} = -6.77$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{3-\%} = -8.5$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{3-DR} = -7.66$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{4-\%} = -7.87$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{4-DR} = -11.79$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{5-\%} = -5.55$, $df = 10$, $P = 0.0002$; $t_{5-DR} = -10.00$, $df = 10$, $P < 0.0001$; $t_{6-\%} = -4.46$, $df = 10$, $P = 0.0012$; $t_{6-DR} = -3.11$, $df = 10$, $P = 0.0001$).

虫均有很高的致死作用,同时亦显著地降低了幼虫对玉米的危害,即 Bt 玉米 YieldGard®对粘虫具有较高的田间防治效果和有效地减轻幼虫对玉米的危害率。这与大龄幼虫室内生测结果一致^[4~5]。

虽然室内生测结果表明粘虫不能在 Bt 玉米上存活,但是田间试验接虫 5~7 天后,在 Bt 玉米植株上有少数存活个体。此外,Bt 玉米对粘虫幼虫取食有抑制作用,加上大龄幼虫的爬行迁移习性,对 Bt 玉米敏感性略差的个体很可能发生转移到杂草或非 Bt 玉米的其它寄主上危害,从而起到抗性筛选的作用。因此在大面积种植转基因玉米时要严密监测粘虫对 Bt 玉米的演化抗性。

参考文献(References)

- 李光博. 杂食性害虫:粘虫. 中国农业科学院植物保护研究所(主编). 中国农作物病虫害(第二版)(上册). 北京:中国农业出版社, 1995, 697-720
- Koziel M G, Beland G L, Bowman C, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11(2): 194-200
- He K L, Wang Z Y, Zhou D Y, et al. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 2003, 96(3): 935-940
- He K L, Wang Z Y, Wen L P, et al. Field evaluation of Asian corn borer control in hybrid of transgenic maize event MON 810. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2(12):1363-1368
- 王振营,王冬妍,何康来,等. 转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价. *植物保护学报*, 2005, 32(2):153-157
- 王冬妍,王振营,何康来,等. 粘虫高龄幼虫对转 Bt 基因玉米的消化和利用. *昆虫学报*, 2004, 47(2):141-145
- 负桂玲,邓曙东,张青文,等. Bt 玉米(MG95)对粘虫的抗性和拒食作用. *昆虫知识*, 2004, 41(5):422-426
- James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006, ISAAA Briefs. Brief 35
- Burkness E C, Hutchison W D, Bolin P C, et al. Field efficacy of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for management of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 2001, 94(1): 197-203
- Lynch R E, Wiseman B R, Plaisted D, et al. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing CryIA(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 1999, 92(1): 246-252
- 常雪艳,何康来,王振营,等. 转 Bt 基因玉米对棉铃虫的抗性评价. *植物保护学报*, 2006, 33(4):374-378
- Williams W P, Sagers J B, Hanten J A, et al. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and Southwestern corn borer. *Crop Science*, 1997, 37(3): 957-962
- Williams W P, Buckley P M, Sagers J B, et al. Evaluation of transgenic corn for resistance to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae), fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in a laboratory bioassay. *Journal of Agricultural Entomology*, 1998, 15(2): 105-112