转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价

王振营[1] 王冬妍[1,2] 何康来[1] 白树雄[1] 丛 斌[2]

(1. 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; 2. 沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110161)

摘要: 在室内用生测法研究了表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的 Bt 玉米 MON810 和 Bt11 小苗和心叶对粘虫 *Mythimna separata* (Walker)初孵幼虫以及玉米叶片对暴食期4龄和5龄幼虫的杀虫效果。结果表明,2种 Bt 玉米小苗及心叶对粘虫初孵幼虫都具有很好的控制效果,取食 MON810 和 Bt11 小苗的粘虫初孵幼虫第1天的存活率分别为69.44%和86.11%,到第3天时,取食 Bt11 小苗的幼虫全部死亡,此时取食 MON810 小苗的幼虫存活率仅为4.17%,到第7天全部死亡,而此时在各自相对应的对照玉米 DK647 和 NX4906 小苗上幼虫存活率分别为91.66%和88.89%。取食 MON810 和 Bt11 心叶的粘虫初孵幼虫第2天时幼虫存活率急剧下降,分别为13.89%和19.45%,到第7天时,取食两种 Bt 玉米心叶的初孵幼虫全部死亡,而取食对照玉米心叶幼虫存活率分别为94.45%和97.22%,差异极显著。两种 Bt 玉米对粘虫4龄幼虫有很好的杀虫效果,取食的第11天4龄幼虫全部死亡,对照幼虫存活率均为100%;在 Bt11 和 MON810 叶片上取食的粘虫5龄幼虫也不能存活,分别在取食的第11天和12天全部死亡,对照存活率分别为96.00%和98.00%,差异极显著。表明 Bt 玉米对粘虫初孵幼虫和暴食期的4龄和5龄粘虫都具有显著的致死作用。

关键词: 粘虫; Bt 玉米; Cry1Ab 杀虫蛋白; 幼虫; 杀虫效果

Evaluation the control effects of the transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing Cry1Ab protein on the larvae of *Mythimna separata* (Walker) in laboratory

WANG Zhen-ying[1] WANG Dong-yan[1,2] HE Kang-lai[1] BAI Shu-xiong[1] CONG Bin[2]

(1. State Key Laboratory of Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Control effects of the seedlings, whorl leaves and the leaves of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on the 1st instar, 4th instar and 5th instar larvae of *Mythimna separata* (Walker) were evaluated in laboratory. Two Bt corn hybrids of events MON810 and Bt11 expressing Cry1Ab protein and their non-Bt controls were employed in the bioassays. Results showed the survival was 4.17% and 0 at the 3rd day when the 1st instar larvae feeding on the seedlings of MON810 and Bt11, compared with 91.66% and 88.99% in corresponding non-transgenic isogenic hybrid, respectively. The survival rate was 13.89% and 19.45% for the 1st instar larvae when feeding on whorl leaves of MON810 and Bt11 at the 2nd day, respectively, and none survived at the 7th day. The mortality was 100% for 4th instar larvae of *M. separate* when feeding on the leaves of MON810 and Bt11 at the 11th day, compared with 0 mortality in non-

基金项目:国家"863"课题(2002AA212161)资助
作者简介:王振营,男,1961年生,研究员,主要从事玉米病虫害综合治理和转基因玉米的生态安全性评价研究(email: zywang@ippcaas.cn)
收稿日期:2004-07-09

transgenic isogenic hybrid. The 4th and 5th instar larvae exhibited weight loss when fed on MON810 and Bt11 leaves, and showed weight gain when fed on two non-Bt controls. It was shown that the Bt corn expressing Cry1Ab toxin had good control effects on *M. separate*, not only the 1st instar larvae, but also the 4th and 5th instar larvae.

Key words: *Mythimna separata*; Bt corn; Cry1Ab protein; larvae; control effect

粘虫 *Mythimna seperata*(Walker)属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae,又称剃枝虫、五色虫、行军虫等。主要危害稻、麦、粟、黍、玉米、高粱、糜子、甘蔗等作物,也危害禾本科牧草和芦苇。东北春玉米区和华北夏玉米区常遭受二、三代粘虫的危害。粘虫是一种暴食性害虫,尤其在幼虫成群结队迁移时,更是饥不择食,除极少数几种植物外,几乎所有绿色作物均被掠食一空,造成大幅度减产,甚至颗粒无收。寄主植物是影响植食性昆虫生长发育、存活、繁殖等行为的重要限制因素之一,粘虫的寄主植物广,玉米田杂草及其周围寄主作物上发生粘虫危害后,有可能会转移或迁移到玉米上危害,特别是粘虫的5、6龄幼虫进入暴食期后,食量骤增,取食量分别占全幼虫期的14.3%和75.1%,常造成植株叶片被大量取食,仅剩叶脉,对玉米造成的危害最为严重[1]。

转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 抗虫玉米对欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*(Hübner)等鳞翅目害虫具有很好的杀虫效果[2~5],已在美国等9个国家商业化种植,2003年播种面积已达910万 hm^2[6]。我国研发的转 Bt 基因玉米以及美国孟山都公司的 MON810 和瑞士诺华公司(现为先正达公司)的 Bt11 转 Bt 基因抗虫玉米也先后被批准在我国部分省区进行中间试验、环境释放(environmental release)或生产性试验阶段,对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*(Guenée)具有很好的控制作用[7~8]。转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米对粘虫的控制作用还没有研究报道,而 Bt 玉米对粘虫的控制效果关系到 Bt 玉米在玉米害虫综合治理中的作用。作者就 Bt 玉米对粘虫的杀虫效果进行了室内测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试虫源

试验所用粘虫卵由中国农业科学院植物保护研究所粘虫组提供。以孵化后不超过 12 h 的初孵幼虫作试虫。试验选用的4龄和5龄粘虫是用高油298玉米苗饲养、蜕皮后不超过24 h的健壮、体重大小相近的4龄或5龄幼虫。

1.1.2 供试玉米

供试玉米分别为孟山都公司的 MON810(品种为 DK647BTY)和诺华公司的 Bt11(品种为 NX4777),均为表达 *cry1Ab* 杀虫蛋白 Bt 基因的抗虫玉米(以下简称 Bt 玉米),以各自的非 Bt 玉米品种 DK647 和 NX4906 作为对照。供试 Bt 玉米及对照品种种植在中国农业科学院植物保护研究所试验田,每小区 30 m^2(6 m×5 m),行距 60 cm,株距 33 cm。试验重复3次。试验小区随机区组排列,生长期不施用任何农药,按常规管理。

1.2 方法

1.2.1 Bt 玉米小苗对初孵粘虫的杀虫活性

在玉米4叶期(V4)时,取植株的第2片叶进行生测试验。消毒处理后,剪成 2.0 cm 长的小片,放入24孔细胞培养板(孔径 1.5cm×2.0cm,美国 Corning 公司)中,每孔放3片叶片,用毛笔接1头供试粘虫初孵幼虫,每处理3次重复。加盖后放入 26±1℃,相对湿度 80%,光照 14L∶10D 的养虫室中。每24 h调查1次存活的幼虫数,直至取食供试 Bt 玉米小苗的粘虫幼虫全部死亡。检查时以毛笔尖轻触虫体无反应为死亡判断标准,并视玉米组织的新鲜程度,更换相同来源的组织。

1.2.2 Bt 玉米心叶对初孵粘虫的杀虫活性

在玉米心叶期(V10),从田间采回心叶。选用最里层白色幼嫩的心叶部位。处理和重复次数同小苗。

1.2.3 Bt 玉米叶片对4龄和5龄粘虫的杀虫活性

在玉米7叶期(V7)(5龄粘虫在10叶期),取第4、5叶片(5龄粘虫用第6、7叶片)进行室内生测。消毒处理后,剪成5cm×3cm的小片,放入小塑料养虫盒(Φ3cm×5cm)中,每盒接入1头4龄或5龄粘虫,所放叶片要求可以满足1头4龄或5龄幼虫1天的取食,10头幼虫为1个处理,试验4次重复(5龄粘虫生测为5次重复)。最后放入养虫室中。记录每24 h的活虫数,并用1/10000电子分析天平(TA450型,美国 CAHN 公司)称量单头幼虫重。

2 结果与分析

2.1 Bt 玉米小苗对粘虫初孵幼虫的杀虫活性

取食 MON810 和 Bt11 小苗的粘虫初孵幼虫第 1 天的存活率分别为 86.11% 和 69.44%,与其对照非 Bt 玉米间差异显著或极显著;取食两种 Bt 玉米小苗的幼虫第 2 天的存活率均低于 50%;取食 Bt11 的初孵幼虫在接虫第 3 天全部死亡,此时 MON810 上的幼虫存活率仅为 4.17%,第 7 天全部死亡。取食非 Bt 玉米小苗的粘虫初孵幼虫在接虫的第 2 天出现死亡,到第 7 天时 DK647 和 NX4906 上的存活幼虫分别为 88.89% 和 91.66%,与 Bt 玉米间差异极显著(图 1)。可见,Bt 玉米小苗对粘虫初孵幼虫具有很高的杀虫活性。

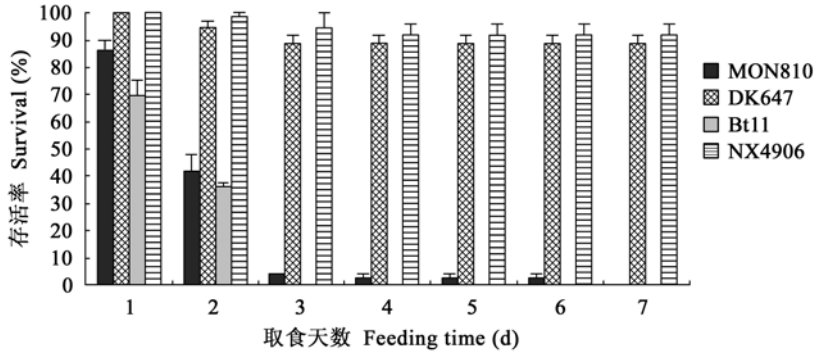

图 1 Bt 和非 Bt 玉米小苗对粘虫初孵幼虫存活率的影响

Fig. 1 Survival of *M. separata* neonates fed on the seedlings of Bt and non-transgenic corns

2.2 Bt 玉米心叶对粘虫初孵幼虫的杀虫活性

取食 MON810 和 Bt11 玉米心叶的粘虫初孵幼虫第 1 天的存活率分别为 81.94% 和 80.56%,与取食非 Bt 玉米的幼虫存活率存在显著差异;取食 Bt 玉米叶片第 2 天时幼虫存活率急剧下降,取食 MON810 和 Bt11 心叶幼虫存活率分别为 13.89% 和 19.45%,到第 7 天时全部死亡,而此时在非 Bt 对照玉米 DK647 和 NX4906 叶片上取食的幼虫存活率分别为 94.45% 和 97.22%,差异极显著(图 2)。结果表明,Bt 玉米心叶对粘虫初孵幼虫具有很强的杀虫效果。

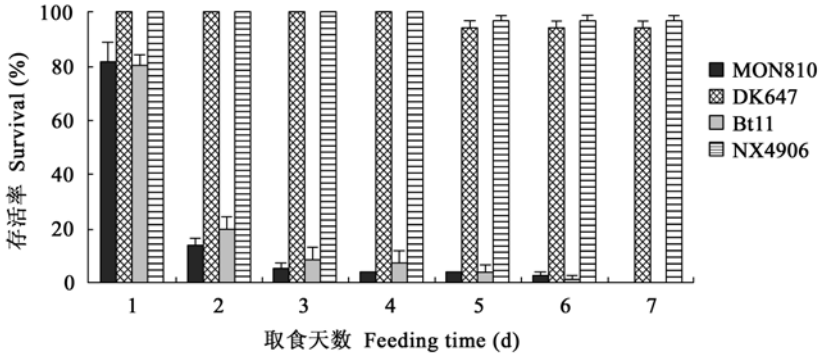

图 2 Bt 和非 Bt 玉米心叶对粘虫初孵幼虫存活率的影响

Fig. 2 Survival of *M. separata* neonates fed on the whorl leaves of Bt and non-transgenic corns

2.3 Bt 玉米叶片对 4 龄粘虫的杀虫活性

在两种 Bt 玉米上的粘虫 4 龄幼虫取食 1 天的存活率均为 97.50%,而取食非 Bt 对照玉米的幼虫存活率为 100%,二者差异不显著。第 2 天时,取食 MON810 的 4 龄幼虫存活率为 85%,与其对照品系差异显著;而取食 Bt11 的粘虫存活率为 97.50%,与其非 Bt 玉米对照差异不显著。到第 8 天,在 MON810 和 Bt11 叶片上取食幼虫存活率分别为 15.0% 和 22.5%,而此时在对照玉米叶片上取食的 4 龄粘虫已全部化蛹。到第 11 天,在两种 Bt 玉米上取食的幼虫全部死亡,与非 Bt 玉米存在极显著差异。可见,Bt 玉米对粘虫 4 龄幼虫具有很好的杀虫

活性(图 3)。

粘虫 4 龄幼虫取食 MON810 叶片的第 1 ~4 天,其体重的增加量为负值,且随时间的增加逐渐降低,而在第 5 天平均体重增加 3.63mg,第 6、7 天继续降低,为负值。粘虫 4 龄幼虫取食 Bt11 叶片的第 1 天体重下降,第 2 ~5 天体重略有增加,随后又降低;但总体上取食 Bt 玉米叶片的 4 龄幼虫的体重变化不大;而取食非 Bt 对照玉米叶片上的 4 龄幼虫平均体重在第 1 ~5 天呈上升趋势,第 5 天取食 DK647 和 NX4906 的幼虫体重分别增加 163.69 和 160.05mg,达到生长最高峰;第 6 天体重的增加量开始下降,第 7 天为负值,幼虫进入预蛹阶段。取食 Bt 玉米与非 Bt 玉米的幼虫体重日增加量存在极显著差异。说明转 *cry1Ab* 基因的 Bt 玉米对粘虫的生长发育具有明显的抑制作用。

2.4 Bt 玉米叶片对 5 龄粘虫的杀虫活性

取食 MON810 和 Bt11 叶片的粘虫 5 龄幼虫第 1 天就出现死亡,存活率分别为 92% 和 88%。第 2 天时,取食 MON810 和 Bt11 叶片的 5 龄幼虫存活率分别为 80% 和 58% ,而取食非 Bt 对照玉米叶片的幼虫全部存活,差异显著性分别达到显著和极显著水平;到第 6 天时,取食两种 Bt 玉米的幼虫存活率都低于 10%,而取食非 Bt 玉米叶片的幼虫全部存活,且已进入预蛹期,Bt 玉米与非 Bt 玉米间差异极显著。5 龄幼虫在 Bt11 和 MON810 玉米叶片上取食分别在第 11 天和 12 天时全部死亡,而此时取食非 Bt 玉米 DK647 和 NX4906 的存活率分别为 98% 和 96%,与 Bt 玉米存在极显著差异(图 4)。可见,粘虫 5 龄幼虫在 Bt 玉米叶片上取食不能存活,进一步说明转 *cry1Ab* 基因的 Bt 玉米对暴食期的粘虫幼虫仍有很好的控制效果。

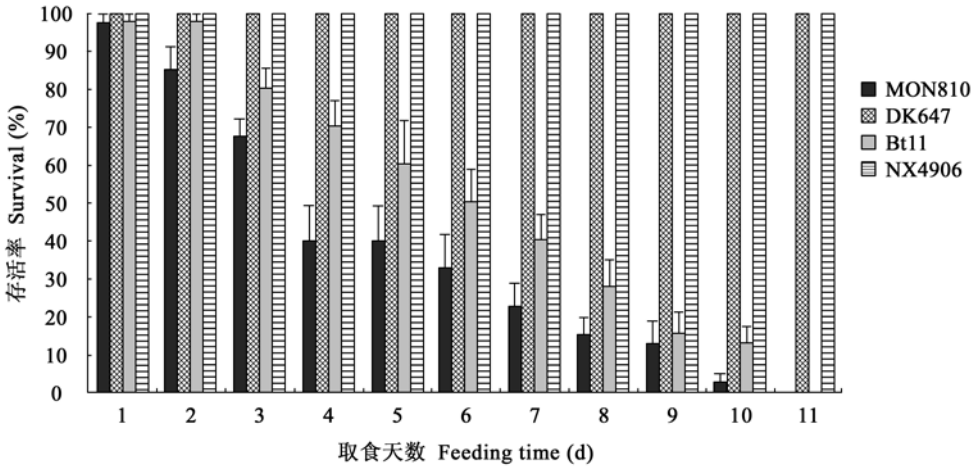

图 3 Bt 和非 Bt 玉米叶片对粘虫 4 龄幼虫存活率的影响

Fig. 3 Survival of the 4th instar *M. separata* larvae fed on the leaves of Bt and non-transgenic corn leaf material

3 讨论

在华北地区,3 代粘虫危害夏玉米苗,叶片被取食成缺刻状,严重时小苗被吃光,严重危害玉米的生长。两种转 *cry1Ab* 基因的 Bt 玉米 MON810 和 Bt11 小苗及心叶对粘虫初孵幼虫具有很好的杀虫活性,取食 Bt 玉米的初孵幼虫不能存活,说明这两种 Bt 玉米在苗期可以很好地保护玉米苗免受粘虫的危害。两种 Bt 玉米在对粘虫初孵幼虫的杀虫速度上存在显著差异,取食 Bt11 和 MON810 小苗的幼虫在取食第 1 天的存活率分别为 69.44% 和 86.11%。取食 Bt11 小苗的幼虫在第 3 天全部死亡,而取食 MON810 的幼虫在取食的第 7 天全部死亡,因此,Bt11 小苗的杀虫活性比 MON810 强;两种 Bt 玉米心叶对粘虫初孵幼虫的杀虫效果不存在差异,说明粘虫初孵幼虫不能在玉米苗期和心叶期存活下来。

许多田间杂草是粘虫的寄主植物,低龄幼虫可在杂草上取食,然后再转移到玉米上危害[9],若玉米田杂草较多, 则易引起粘虫的发生危害,。高龄粘虫的暴食习性,很可能对玉米造成严重损失。对暴食期高龄粘虫的控制效果直接关系到 Bt 玉米在防治玉米田粘虫中所起的作用。已有的研究表明,当敏感的昆虫摄食的 Bt 蛋白进入中肠后,经过溶解和激活作用,释放出核心片段,然后作用于中肠上皮

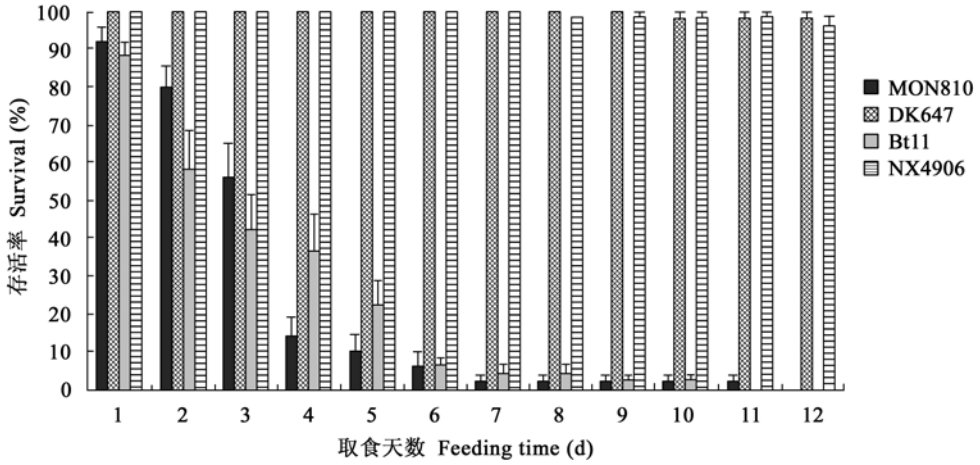

图 4　Bt 和非 Bt 玉米叶片对粘虫 5 龄幼虫存活率的影响

Fig. 4　Survival of the 5th instar *M. separata* larvae fed on the leaf tissues of Bt and non-transgenic corns

细胞,引起该细胞的膨胀和裂解,最后导致昆虫肠道功能丧失,直至幼虫死亡[10]。本研究结果表明,转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米 MON810 和 Bt11 对粘虫 4 龄和 5 龄幼虫同样具有很好的致死作用,说明粘虫对 Cry1Ab 杀虫蛋白敏感性强。虽然 Bt 玉米对高龄幼虫的杀虫效果较初孵幼虫慢,但 Bt 玉米显著抑制了幼虫的取食和对食物的消化、利用率,严重影响了幼虫的生长发育,最终导致幼虫死亡[11],说明转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米可以有效地控制粘虫暴食期幼虫的危害。

参 考 文 献 (References)

1　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

2　Koziel M G, Beland G L, Brown C, *et al*. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology, 1993, 11(3): 194 – 200

3　Ostlite K R, Hutchison W D, Hellmich R L. Bt corn and European corn borer: long term success through resistance management. North Central Regional Extension Publication NCR602. St. Paul: University of Minnesota Extension Service, 1997

4　Archer T L, Patrick C, Schuster G, *et al*. Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. Crop Protection, 2001 20(2): 139 – 144

5　Archer T L, Schuster G, Patrick C, *et al*. Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. Crop Protection, 2000 ,19(3): 181 – 190

6　James C. Global status of commercialized transgenic crops: ISAAA Briefs, No. 26. Ithaca, NY: ISAAA, 2003

7　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

8　He K L, Wang Z Y, Wen L P, *et al*. Field evaluation of Asian corn borer control in hybrid of transgenic maize event MON810. Agricultural Sciences in China, 2003, 2(12): 1363 – 1368

9　赵圣菊. 粘虫与气象. 北京: 气象出版社, 1988,p38

10　Knowles B H, Dow J A T. The crystal δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. Bioassays, 1993, 15: 469 – 476

11　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