

密级

论文编号

# 中国农业科学院 学位论文

亚洲玉米螟 *Cry1Ab* 抗性种群的生物学及其  
抗性遗传规律研究

**Biology and Genetic Analysis of *Cry1Ab* Resistant Asian Corn  
Borer (Lepidoptera: Pyralidae)**

硕士研究生：李光涛

指导教师：何康来 副研究员

申请学位类别：农学硕士

专 业：农业昆虫与害虫防治

研 究 方 向：转基因作物与害虫治理

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院

中国农科院植物保护研究所

提交日期 2004 年 6 月

**Level of Security**

**Number**

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**

**Master Thesis**

**Biology and Genetic Analysis of *Cry1Ab* Resistant Asian Corn  
Borer (Lepidoptera: Pyralidae)**

**A Thesis**

**Submitted to the Graduate School of Chinese Academy of Agriculture  
Sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of  
Master of Science in Agriculture**

**Candidate : Li Guangtao**

**Supervisor : Prof. He Kanglai**

**June, 2004**

# 独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确地说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：        年     月     日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

研究生签名：

时间：        年     月     日

导师签名：

时间：        年     月     日

## 摘 要

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 是我国转 *Cry1Ab* 杀虫蛋白基因 *Bt* 抗虫玉米的主要靶标害虫，大面积种植转单一基因的 *Bt* 玉米有可能会引发亚洲玉米螟对 *Bt* 杀虫蛋白的抗性。只有实施合理的抗性治理对策，才能使这一现代化技术成果得以持久的利用。深入研究抗性种群的生物学和遗传规律，是制定抗性治理计划、实施合理的抗性治理措施的基础。本论文从生物学和遗传学的角度，首次就亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白抗性的种群生物学和抗性遗传规律以及与 *Cry1Ac* 杀虫蛋白之间的交互抗性关系作了系统的研究。主要结果如下：

通过饲料混合法以 *Cry1Ab* 杀虫蛋白对亚洲玉米螟进行室内汰选 38 代，与敏感种群相比，抗性种群的幼虫发育历期明显延长，平均蛹重明显下降。用表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的 MON810 玉米对 *Cry1Ab* 抗性种群连续 4 代生测结果表明，亚洲玉米螟初孵幼虫不能在 MON810 玉米的心叶和苞叶上存活，但是能够在花丝上完成幼虫期并化蛹和繁殖后代，首次用转基因作物离体生测的方法发现了室内汰选的亚洲玉米螟抗性种群可以在 MON810 花丝上完成幼虫发育历期。在羽化期相同的条件下，抗、感种群雄蛾间交尾竞争力没有显著差异，抗、感雌蛾对敏感雄蛾的竞争力差异不显著，但对抗性雄蛾的竞争力，抗性雌蛾显著强于敏感雌蛾。当环境中抗性雄蛾的种群密度相对高时，发生抗性种群内交尾的概率要高，将增加亚洲玉米螟对 *Bt* 玉米产生抗性的风险。抗、感种群的交尾日活动节律一致。抗、感种群非滞育老熟幼虫的过冷却点没有显著差异；而抗性种群滞育幼虫的过冷却点显著高于敏感种群及  $F_1$  代约  $1 \sim 2$  。

用饲料混合法测定了亚洲玉米螟 *Cry1Ab* 抗性种群、敏感种群及其正反交  $F_1$  和 *Cry1Ac* 抗性种群对 *Cry1Ab* 的毒力回归曲线；同时测定了 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 抗性种群以及敏感种群对 *Cry1Ac* 的敏感水平。从  $LC_{50}$  计算正反交的  $D_{LC}$ （抗性基因显性水平）分别为 0.22 和 0.63，这表明目前亚洲玉米螟对杀虫蛋白 *Cry1Ab* 的抗性遗传为受母性影响的不完全隐性遗传。以 *Bt* 玉米花丝作为衡量标准，对抗性种群和对照种群及其  $F_1$  代进行生测，结果表明其有效显性为完全隐性遗传（ $D_{ML}=0$ ）。MON810 花丝中 *Cry1Ab* 蛋白表达量足以杀死杂合个体，符合高剂量加庇护所的要求。比较不同种群对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 的毒力回归曲线和  $LC_{50}$  可以看出，以 *Cry1Ab* 汰选的对 *Cry1Ab* 产生了 107 倍抗性的 *Cry1Ab* 抗性种群，对 *Cry1Ac* 产生了 10.4 倍的抗性；以 *Cry1Ac* 汰选对 *Cry1Ac* 产生了 14.0 倍抗性的 *Cry1Ac* 抗性种群，对 *Cry1Ab* 产生了约 6 倍的抗性。这说明亚洲玉米螟对 *Cry1Ac* 和 *Cry1Ab* 存在着很强的交互抗性。*Cry1Ab* 抗性种群去掉选择压后，在普通饲料上连续饲养 3 代后，幼虫发育历期开始下降，6 代以后基本上与敏感种群一致，而且蛹重也有不断增加的趋势。MON810 花丝生测表明，亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的抗性不能稳定遗传，失去选择压后，其抗性会迅速丢失。

**关键词：**亚洲玉米螟，转 *Bt* 基因玉米，抗性，遗传规律，生物学

## Abstract

Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenée, (ACB), is the primary insect pest targeted by transgenic *Bt* corn in China. *Bt* corn can provide season long protection from this insect, but its success will be short-lived if ACB adapt to *Bt* corn. The primary strategy for delaying ACB resistance to *Bt* corn is to provide refuges of non *Bt* corn and other host plants. However, the feasibility of refuge strategy depends on the biology of resistant colony and inheritance of resistance. We investigated the biology of a laboratory-selected *Cry1Ab* resistant colony of ACB and inheritance of resistance, which included the survival of resistant colony fed on diet incorporated with *Cry1Ab* protein and transgenic *Bt* corn event MON810, mating attractiveness between resistant and susceptible colonies, cold tolerance among resistant, susceptible and their hybrid progeny  $F_1$  colonies, resistant gene dominant level, mater effect, stability, and the cross resistance between *Cry1Ab* and *Cry1Ac*.

There were 70% survival of larvae and 60% pupation rate when resistant colony fed on the diet incorporated with 100ng/g *CryAb*. The larval developmental time of resistant colony was significantly longer (5 days) than susceptible. The average pupal weight of resistant colony was 42.0% less than susceptible. When the resistant colony was exposed to the high dosage of *Cry1Ab* protein diet, the survival and the pupation decreased in a few generations and then increased. This indicated that ACB would evolve resistant to *Cry1Ab* when it was selected by the *Cry1Ab* protein.

Bioassays with neonate of resistant and susceptible colonies infested on whorl leaves, fresh husks and silks of *Bt* corn Event MON810 for 4 generations, showed that the resistant colony could not survive more than 7 days on the whorl leaves and husks of *Bt* corn, but it could complete the development of larva and average pupation rate was 14.5%. This was the first report that laboratory-selected *Bt* resistant colony could complete the development of larva on fresh silk of *Bt* maize. The expression of *Cry1Ab* protein in the silk of Event MON810 was 585.46ng/g (fresh weight) according to enzyme-linked immunosorbent assays.

Among four type of mating combinations ( $RR \times SS/RR$ ,  $SS \times SS/RR$ ,  $SS/RR \times SS$ ,  $SS/RR \times RR$ ), the inter-population mating was 43~62.5% in the combinations of  $RR \times SS/RR$ ,  $SS \times SS/RR$ , and  $SS/RR \times SS$ , no significantly was observed between the inter-population and intro-population mating, i.e. the mating between resistant and susceptible moths was random. However, the inter-population mating was only 28.0% in the combinations of  $SS/RR \times RR$ , which was significantly lower than intro-population mating. This indicated that the resistant males were more attracted to the resistant females, i.e. the mating between the inter- and intro-population. In this case, when the population density of resistant males was higher, the mating within resistant population could be higher, and the resistant homozygous of offspring were increase. Both resistant and susceptible moths had the same daily mating activity rhythm. This indicates that if resistant and susceptible moths emerge synchronizing well, the daily mating activity rhythm would not affect the random mating between resistant and susceptible colonies.

The supercooling points were tested for diapaused and non-diapaused larvae of resistant and susceptible colonies and their  $F_1$  progeny. There was no significant difference in supercooling points and freezing points between resistant (-11.5 °C) and susceptible (-11.4 °C) colonies of non-diapaused

larvae. The supercooling point of diapause larvae from resistant colony was significant higher than those from susceptible and  $F_1$  progeny of resistant and susceptible colonies. There were no significant different among susceptible and  $F_1$  progeny of resistant and susceptible colonies. Although the supercooling point was only 1.5 higher for resistant colony than susceptible, this could not impact the overwintering of resistant larvae.

Susceptibility to the *Cry1Ab* protein was determined by dose mortality response for resistant, susceptible colonies and their  $F_1$  progenies. Significant differences in susceptibility were observed among the four colonies.  $LC_{50}$  of resistant colony was 33.80  $\mu\text{g/g}$ , which was 106 fold greater than that of susceptible colony.  $F_1$  progeny from  $RR \times SS$  was more tolerant than the susceptible colony and  $F_1$  progeny from  $SS \times RR$ . The magnitude of differences were 18 and 6 fold greater based on the  $LC_{50}$  values.  $LC_{50}$  between susceptible colony and  $F_1$  progeny from  $SS \times RR$  was not significant different.  $D_{LC}$  values, the dominance level of resistance gene, were 0.22 and 0.63 for SR and RS, respectively. This suggested that resistance to *Cry1Ab* in Asian Corn Borer transmission to the  $F_1$  was incomplete recessive with mater effect. In addition, the survival of the four colonies were evaluated by infesting the neonates on fresh silk of *Bt* corn MON810, the results indicated that the resistance to *Bt* corn is complete recessive ( $D_{ML}=0$ ). Although the resistant colony could survive on the silk of *Bt* corn, all hybrid  $F_1$  progenies could not. This suggested that the refuge strategy could be a functional strategy to delaying ACB resistance to transgenic *Bt* corn if the random mating occurs between resistant and susceptible moths.

Cross resistance was evaluated by determining the susceptibility to *Cry1Ab* and *Cry1Ab* of *Cry1Ab* resistant colony and *Cry1Ac* resistant colony, respectively.  $LC_{50s}$  of *Cry1Ac* resistant and susceptible colonies to *Cry1Ac* protein were 9.6746  $\mu\text{g/g}$  and 0.6894  $\mu\text{g/g}$ , respectively. This indicated that resistant colony had evolved 14.0 fold resistant to *Cry1Ac*. Based on  $LC_{50s}$ , *Cry1Ab* resistant colony evolved 10.4 fold resistant to *Cry1Ac* protein and *Cry1Ac* resistant colony evolved 6 fold resistance to *Cry1Ab*. This indicates that there is a high cross resistance between *Cry1Ab* and *Cry1Ac* in ACB. Because the resistant level of *Cry1Ac* resistant colony was low, the neonate larvae fed on the silk of *Bt* corn MON819 that produces *Cry1Ab* protein could not survive.

When *Cry1Ab* resistant ACB maintained on the diet without *Cry1Ab* protein, the development time of larvae was decreased from generation 3. After 6 generations, the development time of larvae was not significant different with susceptible colony, which was significant shortened than resistant colony with selecting pressure.

**Key words:** *Ostrinia furnacalis*, *Bt* corn, resistance, inheritance, biology

# 目录

摘要 .....	
Abstract .....	
第一章 引言 .....	1
1. <i>Bt</i> 的开发与应用 .....	1
2. 害虫对 <i>Bt</i> 的抗性 .....	2
2.1 抗性的生化机制 .....	2
2.2 抗性的遗传基础 .....	3
2.3 抗性的分子基础 .....	4
3. 转 <i>Bt</i> 基因抗虫作物应用 .....	6
4. 害虫对转 <i>Bt</i> 基因作物的抗性 .....	7
5. 害虫对 <i>Bt</i> 作物抗性治理策略 .....	8
5.1 高剂量/避护所策略 .....	8
5.2 其他抗性治理策略 .....	10
6. 本项研究的意义 .....	10
第二章 抗性种群生物学研究 .....	12
1. 材料与方法 .....	13
1.1 实验材料 .....	13
1.2 实验方法 .....	13
1.3 数据统计分析 .....	17
2. 结果与分析 .....	17
2.1 亚洲玉米螟 <i>Bt</i> 玉米抗性种群在人工汰选饲料上的生存力 .....	17
2.2 <i>Cry1Ab</i> 抗性亚洲玉米螟种群对 <i>Bt</i> 玉米的抗性 .....	20
2.3 抗性种群与敏感种群的交尾竞争力 .....	23
2.4 抗性种群的抗寒能力-过冷却点 .....	24
3. 讨论 .....	28
第三章 抗性遗传规律研究 .....	31

1. 材料与方法 .....	31
1.1 实验材料 .....	31
1.2 实验方法 .....	32
1.3 数据统计分析 .....	33
2. 结果与分析 .....	33
2.1 抗性水平及其遗传方式 .....	33
2.2 <i>Cry1Ab</i> 和 <i>Cry1Ac</i> 的交互抗性研究 .....	38
2.3 抗性遗传的稳定性分析 .....	42
3. 讨论 .....	42
第四章 结论 .....	45
参考文献 .....	47
致谢 .....	56
作者简介 .....	57



# 第一章 引言

## 1. *Bt* 的开发与应用

*Bt* (*Bacillus thuringiensis*), 即苏云金芽孢杆菌是一种好氧的, 革兰氏阳性产芽孢土壤杆菌。1911 年 Berliner 首先从土壤中分离并将其命名。在其生活史的生长稳定期能够产生一种芽孢晶体, 而这种芽孢晶体具有杀虫活性 (Schnepf 等 1998)。传统上, *Bt* 菌株依据营养细胞鞭毛抗原分为 34 个亚种, 这种命名法的弊端在于其不能反映内含蛋白的结构与杀虫活性专一的关系。依据其结构、抗原特征、活性谱, 将杀虫蛋白及其基因分为四大类: *CryI*(鳞翅目), *CryII*(鳞翅目及双翅目), *CryIII*(鞘翅目), *CryIV*(双翅目)。每类中又进一步分几个型(McGaughey 等 1992)。自 1983 年第一次报道了一晶体蛋白基因的部分序列以来, 已经有 100 多种蛋白基因被测序。几乎每一种杀虫蛋白都有其专一的杀虫活性谱, 如 *Cry1Ab* 蛋白对欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis* (Hbn.))具有高毒性, *Cry1Ac* 杀虫蛋白对烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)和棉铃虫(*Helicoverpa armigera* (Hübner))都高毒, *Cry3A* 对马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)高毒等。杀虫晶体蛋白杀虫作用过程: 当杀虫晶体蛋白被敏感昆虫摄取以后, 晶体就会溶解并释放出原毒素, 原毒素在中肠中蛋白酶的作用下变成了一种对蛋白酶有抗性的核心片段即毒性肽, 毒性肽会穿过围食膜并结合到中肠细胞的刷状缘的特异结合位点上, 然后插入到细胞膜, 形成穿孔, 细胞因失去渗透平衡死亡, 最后导致昆虫死亡(Ferré 等 2002)。

自 1959 年以来 *Bt* 作为生物杀虫剂应用于作物保护已经有 40 多年的历史 (Amos 2000, Cannon 1993), 主要用来控制如鳞翅目、双翅目、鞘翅目的害虫, 最近也报道了一些对膜翅目、直翅目、食毛目昆虫以及线虫、螨、原生动物有活性的 *Bt* 菌株。*Bt* 作为生物杀虫剂具有以下优点: *Bt* 毒素具有高度的专一性, 只对靶标害虫有效, 对天敌等其他昆虫无害; 对人畜安全; 环境中易降解, 环境安全。而以上几点都是化学杀虫剂难以克服的。所以 *Bt* 被 Ferré 称为是“化学杀虫剂最有希望的取代者”, 是目前世界上产量最大, 应用最广的生物杀虫剂。自 1987 年以来, 以色列就用 *Bt* 代替了化学杀虫剂来防治松林中的 *Thaumtopoea pityocampa*。在欧洲和北美, *Bt* 已经代替了化学杀虫剂防治森林害虫食叶昆虫。*Bt* 生物杀虫剂在目前农作物保护市场上占的份额仍然不足 1% (Amos 2000), 主要原因是 *Bt* 制剂在应用上存在很多的缺点如: 田间不稳定, 持效期短; 对隐蔽害虫效果不大; 活性谱窄等。*Bt* 制剂的广泛应用, 有待于对上述一系列不利因素的解决。目前 *Bt* 制剂的添加剂主要包括润湿剂、粘着剂、遮光剂、增效剂和诱食剂等。Cohen 等 (1991) 报道几种可用于保护 *Bt* 光解的几种生色团, 但其在商业化的应用有待于对环境安全和昆虫取食行为的影响的评价。将 *Bt* 封装在生物高聚物中可以减少雨水的冲刷 (Ramos 等 1998)。以淀粉包埋 *Bt* 施用, 能够吸引害虫摄取 *Bt* 毒素, 可以显著的增加其对欧洲玉米螟防治的效果 (Dunkle 等 1989)。自二十世纪九十年代以来, 随着对 *Bt* 分子生物学知识的了解, 通过遗传操纵的手段将两种或多种 *Bt* 菌株的毒素蛋白组合到一种 *Bt* 产品中, 从而扩大了 *Bt* 制剂的杀虫谱, 使得一种遗传改良的 *Bt* 产品可以控制所有危害作物的鳞翅目害虫 (Amos 2000)。但田间持效期短仍然是影响 *Bt* 广泛应用的一个重要因素, 其一般的持效期为 2 到 3 天。防治鳞翅目害虫的 *Btk* 在棉花上以及用于防治马铃薯甲虫的 *Btt* 制剂在马铃薯上的持效期仅为 48 小时 (Fuxa 1989, Ferro 等 1993)。 *Bt* 能较好的防治食叶害虫, 但对棉铃虫、玉米螟等钻柱性害虫以及地下害虫等防治

效果比较差 (Navon 1993)。

## 2. 害虫对 *Bt* 的抗性

昆虫的抗药性一直是农业害虫和卫生害虫控制中的一个严重问题, 据报道, 已经有 500 多种昆虫和螨类对一种或多种杀虫剂、杀螨剂产生了不同程度的抗性。这在许多国家特别是发展中国家, 对人类健康和农业生产构成了巨大的威胁。

起初人们认为苏云金芽孢杆菌是一种昆虫病原菌与昆虫共进化, 害虫不会对 *Bt* 产生抗性。在多年的应用中, 虽然害虫对 *Bt* 产生的田间抗性非常少, 但在某些过度使用的地区已经发现了抗性的产生 (Martínez-Ramírez 等 1995)。自 1985 年 McGaughey 首次报道了印度谷螟 (*Plodia interpunctella* (Hübner)) 对 *Btk* 产生了抗性后, 陆续有了很多类似报道, 至少有 10 种鳞翅目昆虫、2 种鞘翅目昆虫和 4 种膜翅目昆虫在室内汰选的条件下对 *Bt* 产生了不同程度的抗性, 如: 烟芽夜蛾的 YHD2 种群对 *Cry1Ab* 产生了大于 2300 倍的抗性, 对 *Cry1Ac* 产生了大于 10000 倍的抗性 (Gould 等 1995, Lee 等 1995); 印度谷螟的 343-R 种群对 *Dipel* 产生了大于 250 倍的抗性 (McGaughey 等 1988), 对 *Cry1Ab* 的抗性为 877 倍 (VanRie 等 1990); 欧洲玉米螟对 *Dipel* 产生了 65 倍的抗性 (Huang 等 1997); 科罗拉多马铃薯甲虫对 *Cry3A* 产生了 700 倍抗性等 (Andrei 等 1999)。但是至目前为止, 仅有小菜蛾 (*Plutella xylostella* (Curtis)) 对 *Bt* 产生了田间抗性, 美国夏威夷田间的小菜蛾对 *Btk* 产生了 25~33 倍的抗性。另外, 小菜蛾的 BL 种群对 *Cry1Ab* 产生了大于 200 倍的抗性 (Ferré 等 1991); SEED3 种群在田间汰选的条件下, 对 *Dipel* 和 *Florbac* 分别产生了 300、160 倍的抗性 (Wright 等 1997)。

害虫对 *Bt* 产生抗性的生化机制和遗传基础比较复杂, 就目前的研究来看, 不同的昆虫对不同的杀虫蛋白有着不同的抗性机制和遗传基础, 即使同一种昆虫的不同种群对同一种杀虫蛋白也可能存在着不同的抗性机制和遗传基础。

### 2.1 抗性的生化机制

目前研究报道的最主要的抗性机制是杀虫蛋白与中肠靶标位点 (受体蛋白) 结合的减少导致抗性的产生。这也是报道的产生田间抗性的一种主要的机制 (Ferré 等 1991)。1988 年 Hofmann 等发现 *Bt* 杀虫蛋白的专一性是由于靶标昆虫中肠的刷状缘膜囊泡 (Brush Border Membrane Vesicles, BBMV) 存在着与 *Bt* 杀虫蛋白高度亲和的结合位点, 研究进一步发现 BBMV 中含有与杀虫蛋白特异结合的受体蛋白。已知的在昆虫中与 *Bt* 杀虫蛋白结合的蛋白主要有两类: 氨肽酶-N 类和钙粘着蛋白类。已从几种昆虫中分离和鉴定出的 *Bt* 结合蛋白, 多数属于氨肽酶-N 类。如在舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 的 BBMV 中, 结合 *Cry1Ac* 的蛋白与氨肽酶表现抗原一致性, 结合实验表明 *Cry1Ac* 能与氨肽酶强烈结合 (Valaitis 等 1995)。不同昆虫的 BBMV 中, 存在着一种或多种结合蛋白, 大小从 63kD 到 155kD 不等。对印度谷螟 343-R 抗性种群幼虫中分离的刷状缘膜囊泡 (BBMV) 进行受体结合研究, 表明其对 *Cry1Ab* 的亲和力下降了 50 倍, 而结合位点的数量并没有改变 (van Rie 等 1990)。与 343-R 种群相似, *Dpl*<sup>I</sup> 种群对 *Cry1Ab* 的抗性是由于其亲和力下降了 60 倍。小菜蛾的 BL、PHI、NO-QA、Loxa A、PNE、SEED3、1AcSEL-MEL 7 个抗性种群对 *Cry1Ab* 的抗性机制表现为杀虫蛋白与靶标位点结合的明显减少 (Ferré 等 1991, Tabashnik 等 1997, 1996, 1994, Wright 等 1997, Sayyed 等 2000a)。这说明小菜蛾中肠中 *Cry1Ab* 受体蛋白的修饰是其对

*Cry1Ab* 产生抗性的主要原因。小菜蛾的 NO-QA 和 PEN 抗性种群对 *Cry1Ac* 蛋白结合的下降 (Tabashnik 等 1994, 1997), 但是 PHE 和 SEED3 种群对 *Cry1Ac* 的结合不变(Ballester 等 1999, Wright 等 1997), 这说明小菜蛾对 *Cry1Ac* 的抗性除了结合位点受体蛋白的修饰外, 还存在着其他抗性机制。小菜蛾的 NO-95 种群对 *Cry1Ca* 的结合并没有改变, 但对晶体 *Cry1Ca* 原毒素的抗性水平比对 *Cry1Ca* 毒性肽的抗性水平高约 2.5 倍, 因此, 减少原毒素向毒性肽的转化也是其一个次要的抗性机制(Liu 等 2000)。

印度谷螟 198<sup>r</sup> 抗性种群的中肠分泌物对一些 p-nitroanilide 底物的水解活性比敏感昆虫低, 并且中肠有活性 *Cry1Ac* 原毒素的量减少(Oppert 等 1996)。进一步研究证明, 其对 *Cry1Ac* 敏感性的降低与一种主要的中肠蛋白酶的缺少直接相关(Oppert 等 1997)。而且这一种群对 *Cry1Ac* 原毒素的抗性比对 *Cry1Ac* 毒性肽的抗性高 11 倍(Herrero 等 2001), 这说明中肠蛋白水解酶对抗性有一定的影响。

烟芽夜蛾的 CP73-3 种群的四龄幼虫摄取了亚致死剂量的 *Cry1Ac* 后, 其柱状肠道细胞的组织病变与敏感幼虫相似(Martínez-Ramírez 等 1999)。同样, 烟芽夜蛾 KCB 抗性种群幼虫与敏感种群幼虫摄取 *Cry1Ac* 后也表现出相似的中肠上皮细胞损伤(Forcada 等 1999)。因此, CP73-3 和 KCB 种群抗性产生的原因可能是中肠细胞的有效修复或替换, 这也可能是高龄幼虫比低龄幼虫对 *Bt* 的敏感度低的一个重要原因。

另外, Griffiths 和 Aroian 等(2001)通过对线虫 *Caenorhabditis elegans* 诱变研究认为缺少催化脂类和蛋白糖基化的 -1,3-半乳糖基转移酶是抗性产生的一个重要原因, 并提出受体蛋白的非糖基化是对 *Bt* 产生抗性的一个重要机制。

对烟芽夜蛾的 CP73-3 种群的研究表明, 其对 *Cry1Ac* 的结合没有改变, 但是原毒素的活性降低, 活性肽的降解加速, 细胞的修复功能增强(Gould 等 1992, Forcada 等 1996, 1999, Martínez-Ramírez 等 1999)。对 *Cry1Ca* 产生了 850 倍抗性的甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 种群表现为结合的轻微减少和非特异位点结合的增加(Moar 等 1995)。因此, 一种或多种昆虫对一种或多种杀虫蛋白抗性的产生往往是多种抗性机制共同作用的结果, 而这种抗性的产生可以发生在 *Bt* 杀虫晶体蛋白杀虫作用过程的任何一个步骤, 如晶体溶解、蛋白水解过程、围食膜的穿透、受体结合、膜插入、穿孔形成、及中肠细胞渗透失衡等。

## 2.2 抗性的遗传基础

通过对抗性种群、敏感种群及其正反交  $F_1$  代的检测, 可以获得抗性基因的显性水平和性别连锁的信息。比较给定死亡水平下, 杂合个体与两纯合种群死亡率曲线的相对位置(Bocrguet 等 2000)。这是杀虫剂抗性的显性水平, 以  $D$  或  $D_{LC}$  表示。据 Stone(1964)公式:  $D = (2\log LC_{RS} - \log LC_R - \log LC_S) / (\log LC_R - \log LC_S)$ , 其中  $LC_S$ ,  $LC_{RS}$ ,  $LC_R$  分别表示敏感, 杂合, 抗性个体的致死浓度,  $D$  值从 -1 到 1 (-1 表示完全隐性, 1 表示完全显性)。  $D$  值的计算通常采用致死中浓度。这一公式在杀虫剂抗性显性水平估测中应用最广泛。为了使值在经典的 0-1 范围内, Bourguet 等提出了  $D_{LC}$  的计算公式:  $D_{LC} = (\log LC_{RS} - \log LC_S) / (\log LC_R - \log LC_S)$ , 其中, Liu 和 Tabashnik 提出:  $D_{LC} = (D + 1) / 2$ 。可以通过浸叶生测或人工饲料生测的方法检测。所谓浸叶生测就是让昆虫在摄取 *Bt* 毒蛋白或芽孢晶体混合物时伴随着新鲜植物组织, 为昆虫在摄取 *Bt* 毒蛋白或芽孢晶体混合物伴随着新鲜植物组织, 所以较好的模拟了田间情况。在小菜蛾的不同抗性种群的研究中大多采

用了这种方法,如 NO-Q 种群对 Dipel 的  $D_{LC}$  为 0.09 (Tabashnik 等 1992), Loxa A 种群对 Javelin 的  $D_{LC}$  为 0.16 (Tang 等 1997), 1AcSEL-MEL 种群对 *Cry1Ac* 的  $D_{LC}$  为 0.29 (Sayyed 等 2000a), BTK-SEL 种群对 Dipel 的  $D_{LC}$  为 0.35 (Sayyed 等 2000b), *Cry1C*-Sel 种群对 *Cry1Ca* 的  $D_{LC}$  为 0.39 (Zhao 等 2000) 等。所谓人工饲料生测就是让昆虫取食含有 *Bt* 毒蛋白的人工饲料,通过这种方法测得小菜蛾的 BL 种群对 *Cry1Ab* 的  $D_{LC}$  为 0.34 (Martínez-Ramírez 等 1995), 烟芽夜蛾的 CP73-3 对 *Cry1Ac* 的  $D_{LC}$  为 0.31 (Gould 等 1992) 和 YHD2 种群对 *Cry1Ab* 的  $D_{LC}$  为 0.24 (Gould 等 1995)。以上的结果说明,害虫对 *Bt* 抗性多数为隐性或半隐性遗传,但也有例外,如用人工饲料的方法测得欧洲玉米螟的 KS-SK-R 种群对 Dipel 的  $D_{LC}$  为 0.86 (Huang 等 1999), 用浸叶法测得马铃薯甲虫对 *Cry3Aa*(CC)的  $D_{LC}$  高达 0.88 (Rahardja 等 1995), 更接近显性或共显性遗传。因为杀虫剂的不同浓度可以在浸叶和人工饲料生测中运用,而基于单个毒素浓度变化的死亡率的显性水平必须依据这一浓度测验。如果剂量-死亡率曲线被用于决定显性水平,这一值将表示敏感纯合体、抗性纯合体和杂合体的  $LC$  值(通常为  $LC_{50}$ )之间的关系,但是,通过这种方法获得的显性水平,对于抗性治理意义不大,因为延缓抗性的关键点在于决定找到一个能杀死杂合害虫个体的剂量的技术可能性。

在对抗性种群和敏感种群及其  $F_1$  检测以后,获得了初步的遗传信息,然后,  $F_1$  代与抗性(R)或敏感(S)种群亲本回交即标准回交测试 (Tabashnik 1991)。通常情况下,  $F_1$  代和与  $F_1$  代差异较大的亲本种群间回交。如果抗性为部分或完全隐性,  $F_1$  代与抗性种群(R)亲本回交;如果抗性为部分或完全显性,则回交类型为  $F_1 \times S$ 。标准回交方法中假设测试的是抗性受同一位点的一对等位基因(R, S)控制。如果  $F_1$  与抗性亲本回交,则抗性亲本为 100% RR,  $F_1$  代为 100% RS。如果假设为真,那么在给定剂量  $x$  下,  $RS \times RR$  后代的期望死亡率( $y_x$ )为:
$$y_x = 0.50(W_{RS} + W_{RR})$$
其中  $W_{RR}$  和  $W_{RS}$  表示在给定剂量  $x$  下,假设的 RS 和 RR 基因型的死亡率。假设的 RS 和 RR 可直接在剂量  $x$  下测量,也可以通过概率回归计得。实际值与测交值的适合性用卡平方测验分析  $\chi^2 = (F_1 - \hat{p}n)^2 / \hat{p}\hat{q}n$ , 其中  $F_1$  表示在  $x$  剂量下回交种群中死亡数的观察值,  $\hat{p}$  表示期望死亡率,  $n$  表示测试个体总数,  $\hat{q} = 1 - \hat{p}$ 。从表 3 可以看出,在报道的小菜蛾的 6 个种群中有 4 个种群(NO-Q、ROO、Loxa A、BTK-SEL)能较好的符合单基因模式,而另外两个种群(BS、SEL)不符合单基因模式 (Ferré 2002)。欧洲玉米螟对 Dipel 的抗性遗传能较好的符合单基因模式 (Huang 等 1999)。

另外,多数研究表明对 *Bt* 的抗性是不稳定的,如在夏威夷,采自未产生抗性的小菜蛾种群的三个实验室汰选种群(2800 倍),当去掉选择压后,对 Dipel ( $R$  值从 -0.26 到 -0.30)抗性迅速下降,十三代后其  $LC_{50}$  与敏感种群的  $LC_{50}$  相近 (Tabashnik 等 1994),如烟芽夜蛾 SEL 种群对 *Cry1Ab* 的抗性在去掉选择压后 5 代中从 69 倍下降到 13 倍,而后有保持稳定的趋势 (Sim 等 1991); 欧洲玉米螟一室内汰选种群对 *Cry1Ac* 的抗性也不稳定 ( $R = -0.31$ ) (Bolin 等 1999)。但也有一些例外,选择撤消后,抗性并不下降,如印度谷螟的 343-R 种群对 Dipel 的抗性在未处理的饲料上饲养 29 代其抗性水平未明显下降 (McGaughey 等 1988); 小菜蛾种群中也有三个例外的例子 (Liu 等 1996, Perez 等 1997, Tabashnik 等 1995), 在去掉选择压后仍然保持高而稳定的抗性水平。

不同的昆虫对不同的杀虫晶体蛋白可能产生不同的交互抗性。用 *Cry1Ac* 对烟芽夜蛾进行汰选获得了超过一万倍的抗性 (Gould 等 1995), 这一种群 (YHD2) 对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Aa* 有高的交互抗性,而对与 *Cry2Aa* 为中等的交互抗性,对 *Cry1Ca* 和 *Cry1Ba* 几乎没有抗性。用 *Cry1Ca* 汰

选的另一烟芽夜蛾品系对 *Cry1Ac* 产生了 50 倍的抗性, 其对 *Cry1Ab* 和 *Cry2Aa* 的抗性分别为 13 倍和 53 倍(Gould 等 1992), 这一种群的抗性还扩大到 *Cry1Aa*、*Cry1Ba*、*Cry1Ca*。用 *Cry1Ca* 对甜菜夜蛾的一个种群进行汰选, 对 *Cry1Ca* 产生了 850 倍的抗性, 并对 *Cry1Ab*、*Cry2Aa*、*Cry9Ca* 产生了交互抗性(Moar 等 1995)。

### 2.3 抗性的分子基础

运用同功酶多态性的经典遗传连锁分析方法, 在烟芽夜蛾的 YHD2 品系中回交设计了 10 个标记位点(分布在烟芽夜蛾 31 条染色体上的 10 条染色体上), 揭示了一个主效基因位点即 Btk-4, 在第九连锁群, 标记位点是甘露糖-6-磷酸酯异构酶, 控制着对 *Cry1Ac* 全部抗性的 80%。另外, 连锁群 11(标记位点 鸟嘌呤脱氨酶)也对其抗性有一定的贡献(Heckel 等 1997)。Gahan 等(2001)对烟芽夜蛾 YHD2 品系进行进一步研究, 考虑到在一些昆虫中对 *Bt* 抗性产生是由于毒素不能与中肠上皮细胞结合的原因, 测试了编码 *Bt* 中肠结合蛋白的基因是否在第 9 染色体上。目前所知在昆虫中肠中有两种类型的 *Bt* 结合蛋白即氨肽酶(在昆虫肠道中帮助消化蛋白的一种酶)和钙粘着蛋白(一些位于细胞表面或细胞内粘着物)。Heckel 和 Gahan (2001)很快排除了两个在烟芽夜蛾中已经分离得到的 *Bt* 结合氨肽酶基因, 170-kD 氨肽酶(受体 A)通过 AFLP 定位在第 12 连锁群, 120-kD *Cry1Ac* 结合氨肽酶被定位在第 23 连锁群。那么另一类型 *Bt* 结合蛋白就是钙粘着蛋白超家族, 而目前在烟芽夜蛾中目前还没有分离出这种蛋白, 他们用聚合酶链式反应分离了一个钙粘着蛋白基因的一个片段并定为在了 BtR-4 的同一位点。这被 Erik Stokstad 称为 *Bt* 抗性遗传基础的第一线曙光, Tabashnik 也称其为一次飞跃(Erik Stokstad 2001)。

同功酶连锁的方法应用于小菜蛾的 PHI 种群揭示了其对 *Cry1A* 抗性与两种甘露糖-6-磷酸异构酶密切相关(Herrero 等 2001)。值得一提的是, 对 *Cry1A* 的抗性与同一同功酶标记的连锁已在两种鳞翅目昆虫中发现。这表明, 烟芽夜蛾的 YHD2 种群与小菜蛾的 PHI 种群具有相同的抗性遗传机制, 即一个主效基因。同时也是不同的鳞翅目昆虫一些抗性种群可能具有相同的对 *Cry1A* 蛋白的抗性遗传机制这一假说的有力支持(Tabashnik 等 1998)。

另外, 通过用甲基硫磺乙酯对线虫 *Caenorhabditis elegans* 进行诱变分离了抗 *Cry15B* 的 10 个隐性突变。基于互补实验, 一些突变是等位的并确定了分布在 3 条染色体上的 5 个抗性基因, 而没有一个基因的位点与氨肽酶-N 或钙粘着蛋白的基因位点相似(Marroquin 等 2000)。其中一个基因已被克隆即 *C. elegans* bre-5, 它编码推定 -1, 3-半乳糖基转移酶, 一种催化在脂类和蛋白上加碳水化合物基的酶。肠道中缺少 bre-5 不仅会导致对 *Bt* 毒素 *Cry5B* 的抗性, 而且也表现出对 *Cry14A*(一种对线虫和昆虫都能致死的毒蛋白)的抗性, 这表明缺少碳水化合物修饰的抗性机制与对多种 *Bt* 杀虫晶体蛋白的抗性有关。由于受体相同的碳水化合物修饰, 使得一种晶体蛋白能至少可以结合在两个序列上完全不相干的受体, 所以缺少碳水化合物引起的抗性特别危险, 而且比单个受体突变更具威胁性。缺少一种普遍的修饰会影响多个 *Bt* 蛋白与多个受体的结合, 导致对单个杀虫蛋白高水平抗性和多个杀虫蛋白交互抗性的产生(Griffitts 等 2001)。这一研究的意义不仅在于 *Bt* 作为杀线虫剂的抗性治理, 而且开辟了一条以 *C. elegans* 作为模式系统来鉴定昆虫中的 *Bt* 抗性基因的新路。

抗性基因的获得, 不仅使我们对抗性的生化和遗传有更深入的了解, 而且为田间抗性的监测提供了有力的工具。

### 3. 转 *Bt* 基因抗虫作物应用

分子生物学家通过对 *Bt* 基因进行修饰改良, 将其导入植物体内, 获得了能在作物植株中高剂量表达具有杀虫活性蛋白的基因及转 *Bt* 基因抗虫作物。1987 年 Vacek 等首次获得转 *Bt* 基因烟草, 第一例转 *Bt* 基因植物诞生。1995 年, 孟山都公司的抗马铃薯甲虫的马铃薯 (*Cry3A*) 成为第一个在美国和加拿大开始商业运作转基因抗虫作物, 随后靶标害虫为烟芽夜蛾, 棉铃虫, 棉红铃虫 (*Pectinophora gossypiella*) 的转 *Cry1Ac* 基因抗虫棉以及靶标害虫为欧洲玉米螟, 西南玉米螟 (*Diatraea graridiosella*), 玉米穗虫 (*Helicoverpa zea*) 的转 *Cry1Ab* 基因抗虫玉米, 也相继开始环境释放和商业化运作 (Riebe 1999)。由于转基因抗虫作物自身表达 *Bt* 杀虫蛋白, 这就克服了 *Bt* 制剂的不稳定性和持效期短的缺点; 对于传统方法不易防治的隐蔽性害虫 (如蛀茎害虫等) 有效, 从而提高了防治效率; 而且降低了成本, 减少了害虫防治的时间和人力, 是一种新型的害虫防治策略。

近年来, 转 *Bt* 基因抗虫植物发展迅速, 目前能成功表达 *Bt* 杀虫毒蛋白并对目标害虫具有杀虫活性的转 *Bt* 基因抗虫作物已有 30 多种 (Anthony 1996)。在 1996 至 2002 年间, 全球转基因作物种植面积从 170 万公顷迅速扩大到 5870 万公顷, 连续 6 年的增长速度超过 10%。2002 年的 *Bt* 转基因作物主要是 *Bt* 玉米和 *Bt* 棉花, 其中 *Bt* 玉米面积为 990 万公顷, 占转基因玉米面积的 80%; *Bt* 棉花面积为 460 万公顷, 占转基因棉花面积的 68% (<http://www.biotech-online.com.cn/MediaCenter/international.htm>)。2001 年在美国环境保护署重新注册的转 *Bt* 基因玉米有 5 种, 棉花和马铃薯各 1 种 (<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet.plant.pesticides.htm>)。在我国, 自 1991 年开始 *Bt* 抗虫棉的研究, 1993 年开始双价抗虫棉研究, 目前已达国际先进水平。国家农业部批准可进行商品化生产的抗虫棉品种有 6 个, 抗虫棉品种 (系) 11 个; 获准环境释放的单、双价抗虫棉品系 41 个; 培育出增产、优质的抗虫棉杂优组合 10 多个。截止 2000 年, 转基因抗虫棉已在河北、河南、新疆、山东、湖南、湖北、山西、江苏、安徽、辽宁等省累计推广 36.6 万公顷, 其中双价抗虫棉 2000 年的种植面积为 2.4 万公顷。我国政府于 1997 年正式批准 Monsanto 和迪卡公司的 *Bt* 玉米在河北省涿州进行中间试验, 1998 年在河南、山东、吉林、辽宁等玉米产区进行环境释放试验。2000 年又批准了诺华的转 *Bt* 基因玉米在进行我国环境释放。虽然我国 *Bt* 玉米的研究起步较晚, 但也取得了重大进展。

转 *Bt* 基因抗虫作物对靶标害虫的防治非常显著, 表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 *Bt* 玉米对食叶和蛀茎的第一、二代欧洲玉米螟和亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis* (Guenée)) 都有较高水平的抗性 (Koziel 等 1993, Armstrong 等 1995, He 等 2003a, 2003b), 在自然侵染和人工接种条件下, *Bt* 玉米的产量不受玉米螟的影响, 比非 *Bt* 玉米增产 10% 以上 (Lauer 等 1999)。同时, *Bt* 玉米还能较好的控制西南玉米螟、玉米穗虫、棉铃虫、粘虫 (*Mythimna seperata*) (Archer 等 2000, Burkness 等 2001, 王冬妍等 2004)。转 *Bt* 基因抗虫棉的田间试验表明平均比敏感着增产 7.7% (Jones 1996)。但是, 转 *Bt* 基因作物对杀虫蛋白的表达存在着时空差异, 不同的生长期, 不同的部位, 其杀虫效果不同。转 *Bt* 基因棉营养器官的抗性要高于繁殖器官 (崔金杰等 1999), R19-137 株系主茎 2-10 片叶片抗性最高 (褚妹频等 2003), 棉花生长的前期要比后期的杀虫活性高 (刘东辉等 2003)。转 *Bt* 基因抗虫玉米 Envent 176 由于只在植株的绿色组织和花粉中表达, 因此对穗期螟害的抗制效果只有 75%, 二代欧洲玉米螟可以其上完成生长发育。另外, 棉铃虫幼虫对

转 *Bt* 基因棉叶有明显的取食忌避反应, 取食的时间减少, 爬行、静息和叶丝下垂的时间增加(董双林等 1997)。

自 1999 年 Losey 等报道了 *Bt* 玉米花粉引起大量帝王斑蝶大量死亡以来, 转基因抗虫作物的可能带来的生态安全和环境问题已成为国际社会关注的焦点。大量研究表明, *Bt* 玉米对有益昆虫如瓢虫、草蛉、花蝽等没有不良影响(Lozzia 等 1998, Pilcher 等 1997, Wold 等 2001)。对转基因的油菜、玉米、甜菜、马铃薯在 12 个地点进行 10 年的观察, 并没有发现这些转基因作物具有较强的入侵性(Crawley 等 2001)。但随着转基因抗虫作物的大面积推广, 转基因抗虫作物对田间昆虫群落结构以及农田生态系统的影响等, 仍需深入研究。

#### 4. 害虫对转 *Bt* 基因作物的抗性

转基因抗虫作物与传统的化学保护不同, 一是, 由于作物自身能够表达杀虫蛋白, 形成了时间和空间的连续性, 在实际操作中任何杀虫剂也无法做到这一点, 从而对害虫造成的选择压也是巨大, 容易引发害虫抗性, 这就构成了转基因作物可持续利用的最大威胁。二是, 这种转基因作物的杀虫活性具有着作物或者品种专一性和靶标害虫专一性, 它不能像广谱的杀虫剂那样应用, 因此, 转基因抗虫作物的经济价值依赖于一种或者几种害虫始终对其保持敏感(Riebe 1999)。目前, 虽然至今没有害虫对 *Bt* 作物产生抗性的报道, 但是室内汰选以及田间对 *Bt* 产生抗性的种群对转基因作物已经表现出一定的抗性。

Metz 等(1995)发现在佛罗里达州对 *Btk* 产生田间抗性的一个小菜蛾种群可以在转 *Cry1Ac* 基因花椰菜上存活并繁殖。在转基因花椰菜上饲养四代, 他观察到小菜蛾的这一抗性种群造成叶片脱落的危害, 而且种群迅速扩大。经过一段时间的室内汰选以后, 抗性种群的大部分个体可以在转基因花椰菜上存活(Tang 等 1997)。这是关于昆虫对 *Bt* 产生抗性的种群可以在 100% 杀死其敏感种群的转基因作物上存活并产卵的第一次报道。

Ramachandran 等(1998)对夏威夷的两个小菜蛾种群 NO-QA(*Cry1Ac* 抗性种群)和 LAB-PS(敏感种群)在转 *Cry1Ac* 基因油菜和非转基因油菜的存活、发育以及产卵进行了研究, 这种转基因油菜的 *Cry1Ac* 蛋白在叶片的表达量占总可溶性蛋白的比例为  $238 \pm 29\text{ng/mg}$ 。研究结果表明, 这两个种群的幼虫发育历期、蛹期、蛹重以及羽化在非转基因油菜上相似, 但在转基因油菜上差异非常显著, 转基因油菜能够在 5 天内杀死敏感种群的所有个体。但是抗性种群在转基因和非转基因油菜上 5 天的存活率和头壳大小、化蛹率、蛹重、羽化率以及危害情况没有差别。无论是抗性种群还是敏感种群, 是在转基因作物还是非转基因作物, 都没有取食或产卵倾向。从在转基因花椰菜和非转基因花椰菜上幼虫取食和雌蛾产卵来看, 其寄主选择行为与对 *Cry1Ac* 的敏感无关。也就是说, 这一抗性种群可以在转基因油菜上正常发育。

但对小菜蛾的 Loxa A 种群和 *Cry1C-Sel* 种群分别在表达 *Cry1Ac* 和 *Cry1Ca* 的转基因椰菜上(Metz 等 1995, Tang 等 2001, Zhao 等 2000)以及棉红铃虫在表达 *Cry1Ac* 的转基因棉上(Liu 等 1999)杂合体个体的存活率的研究表明其有效的显性水平都为零, 也就是说抗性基因呈完全隐性遗传。这也是符合高剂量/避护所策略的要求的。

Andrei 等 1999 年对室内汰选获得了 700 倍抗性的科罗拉多马铃薯甲虫的抗性种群和非抗性种群成虫在转基因马铃薯、普通马铃薯以及先在普通马铃薯后移至转基因马铃薯上三种饲料上的死亡率、产卵力和飞行行为进行了室内比较。用飞行磨测定其飞行能力, 通过解剖检查飞行肌的

发育情况。持续喂食转基因马铃薯叶片的敏感种群甲虫死亡率非常高,而且飞行肌没有发育,不能产卵。持续喂食转基因马铃薯叶片的抗性种群个体能够飞行并产卵,但是与其它处理相比其起飞时间延长,产卵力下降。抗性种群在取食 *Cry3A* 毒素能显著的提高其飞翔能力,而在敏感种群中没有这种想象发生,因此其生理抗性可能通过逃避毒素的行为而加强。在普通马铃薯叶片喂食的情况下,抗性种群的飞行力显著的低于敏感种群。抗性种群与敏感种群生物学行为的差异可能影响到转基因作物和邻近的庇护所之间基因的交流。

另外, Gould 等 (1995) 对烟芽夜蛾的 YHD2 种群及其敏感种群 YDK 在表达 *Cry1Ab* 蛋白的转基因烟草及其敏感上叶片上的存活作了评价,结果表明, YHD2 种群在转基因烟草商的存活率显著高于 YHK 种群,但在非转基因烟草上的存活率没有显著差异。14 天的生测中,死亡率发生的高峰在第 3 天和第 7 天。虽然 YHD2 种群比 YHK 种群存活率高,但是 YHD2 种群在转基因烟草上的死亡率通比在非转基因烟草上的死亡率高,而且幼虫个体较小。

在转 *Bt* 基因抗虫作物商业化之前,某些昆虫在室内或田间条件下已经对 *Bt* 产生了显著的抗性 (Tabashnik 1994)。因此,合理有效的抗性治理策略对转基因抗虫作物的长期利用来说是必需的,而成功的抗性治理必须依赖于对其抗性生理生化和抗性遗传基础的全面了解。

## 5. *Bt* 作物抗性治理策略

抗性治理策略应根据抗性的遗传基础、害虫的生物学习性、害虫与 *Bt* 玉米的互作关系以及不同生态区的玉米布局制定相应的对策。目前可用于转 *Bt* 基因抗虫作物的抗性治理的策略主要有:高剂量加庇护所策略、多基因策略、特异性或诱导性启动表达策略、转基因作物轮作策略等。

### 5.1 高剂量/庇护所策略

高剂量/庇护所策略由 Georgiou 和 Taylor (1977) 提出,而后 Alstad 和 Andow (1995) 将该理论发展,是目前比较流行的用于治理害虫对转基因作物的抗性的策略。这一策略要求转基因抗虫作物整个生育期整株的杀虫蛋白高表达,同时,在转基因抗虫作物的周围种植非转基因作物作为敏感个体的庇护所。

所谓高剂量通常指能杀死抗性基因的最丰富携带者杂合个体的剂量。针对 *Bt* 植物杀虫剂抗性治理,在 1998 年 FIFRA 科学专门委员会的一次会议上将高剂量定义为杀死全部敏感个体剂量的 25 倍(Bocrguet 等 2000)。这一剂量假设抗性特征为隐性,使得抗性渗透可以得到延缓。在抗性为隐性时,所需剂量最低;为显性时,所需剂量最高。这一策略在传统害虫治理中也很少被采用,因为它成本高,覆盖不均匀,毒素降解快,对昆虫各龄期控制不一致等。如果使用不当不仅不会延缓抗性,反而会加速抗性的产生,如覆盖不均会有残余的杂合个体,不能作用于隐蔽害虫。毒素的降解,以及人工施药的不连续等会对昆虫造成不同的选择压,从而加速抗性的产生。而转基因作物克服了其缺点,为这一策略的应用使用开辟了道路。

建立和保持庇护所以保护敏感个体的存活,是目前被认为最好的延缓抗性产生的方法。计算机模型模拟表明,保护敏感个体的存活与迁移,或对害虫种群中释放敏感个体可大大延缓抗性的产生 (Gould 等 1998, Bourguet 等 2000)。Liu 等(1997)为这一策略可以延缓害虫抗性的产生提供了实验证据。其庇护所可分为人工庇护和自然庇护,自然庇护要求作物分布有限,为害作物的



害虫寄主谱广,扩散能力强(Bourguet 等 2000)。对于寄主范围有限,迁移能力相对比较弱的昆虫,只能采取人工庇护。不同害虫与寄主互作的最优空间分布详见美国环保局官方网站([www.epa.org](http://www.epa.org))。总体上来说,迁移力差的昆虫,易采取转基因与非转基因作物种子混种(Davis 等 2000)或基因的时空表达特异性;对迁移力强的昆虫,可采取转基因与非转基因作物间作,或在转基因作物田外另设非转基因作物保护区。作为昆虫抗性治理的策略,科学家建议,在种植转基因抗虫作物的同时应至少种植 20%的非转基因作物作为庇护所,但同时庇护所的作物就会面临着较大的经济损失,Hyde 等(2001)研究表明条带式设计是种植 20%非转基因作物的损失最低的方式。

这一策略基于一个假设:抗性基因非常稀少,且呈隐性或部分隐性遗传,敏感个体与抗性个体随机交配。

杀虫剂抗性等位基因的最初频率是预测一个种群在周期性杀虫剂运用下抗性产生率的一个重要因子,现在田间估测主效抗性基因频率的研究还比较少。大多是通过室内进行间接估测。通过室内汰选对等位基因频率进行估测,用 *Bt* 对采自田间鳞翅目种群的一个样本(100~700)进行连续汰选实验(Gould 等 1992),在这些种群测得的抗性位点频率相对比较高( $1 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-3}$ )。Gould 等将试验室汰选的实际纯合抗性品系应用于烟芽夜蛾田间种群的主效 *Bt* 抗性基因频率的估测,用此方法估测的基因频率与最初汰选实验估测的一致( $1.5 \times 10^{-3}$ ) (Gould 等 1995, 1997)。但这一方法主要缺点是只能检测到室内品系的纯合抗性基因相对的隐性等位基因(即同一位点),而在其它位点的隐性等位基因则不能被估测到。Andow 和 Altad (1998)提出了  $F_2$  筛选法,来估计和检测田间种群的抗性等位基因频率。这一方法的主要优点是,不需要用抗性实验室种群,比用一个显著剂量测隐性位点更敏感(高 10 倍)(Andow 等 1998)。这一方法运用于两个欧洲玉米螟的种群中,没有发现主效抗性基因纯合个体,其对 *Cry1Ab* 的抗性等位基因频率分别为 $<0.013$ 和 $<0.0039$ (Andow 等 1998, Andow 等 2000)。在小菜蛾的抗性研究中,用这一方法测得的低抗性种群的基因频率为  $4 \times 10^{-3}$ ,高抗性种群的基因频率小于  $10^{-3}$ 。在棉铃虫中小于  $7 \times 10^{-4}$ (Ahmad 等 1999)这与 Tabashnik 1997 年报道的小菜蛾室内敏感种群的抗性基因频率为 0.12 和 2000 年报道的小菜蛾田间种群平均频率为 0.16 形成鲜明对比。总体来说,其抗性频率并非非常稀少。

大多数实验表明,害虫对 *Bt* 作物的遗传为隐性或部分隐性遗传,但 Huang 等(1999)分析了欧洲玉米螟的一个室内种群对 Dipel ES(一种 *Bt* 内毒素的商品)的抗性。结果表明欧洲玉米螟对 Dipel ES 的抗性呈不完全显性常染色体遗传,相反,绝大多数其他昆虫对 *Bt* 的抗性受隐性基因控制。如果对 *Bt* 的田间抗性与室内抗性表现一致,高剂量/避护所策略的效用将会被大大削弱。那么,它在环境署要求的 *Bt* 玉米重新注册时被提议的害虫抗性治理策略中的应用性,也应重新进行评估。Tabashnik 等指出了这项研究的不足:其一这一研究结果与欧洲玉米螟对 *Bt* 玉米的抗性潜力不直接相关,因为其用的 DipelES 与 *Bt* 玉米表达的杀虫晶体蛋白不同,DipelES 中含有 *Bt* 芽孢和至少三种 *Bt* 杀虫蛋白(*Cry1Aa*、*Cry2A*、*Cry2B*) 在 *Bt* 玉米中是没有的。其二抗性治理策略的关键是看杂合个体是否能在转基因作物上存活,Huang 等没有证据说明他们的 DipelES 抗性品系或杂合幼虫能在 *Bt* 玉米上发育到成虫。再者 Huang 等采用的欧洲玉米螟品系的幼虫对 Dipel 的抗性为 65 倍,而对 *Bt* 毒素 *Cry3A* 抗性高于 400 倍的马铃薯甲虫幼虫在在表达同样毒素的 *Bt* 玉米上不能存活,也就是说害虫需要极其高的抗性水平才能克服 *Bt* 植物表达的高剂量毒素浓度。Tabashnik 等还指出到目前为止,还没有欧洲玉米螟在 *Bt* 玉米上可以存活的报道,其对 *Bt* 植物的

抗性遗传为隐性。

庇护所策略有效的一个前提是在 *Bt* 作物上存活下来的抗性个体与庇护所内提供的敏感个体的发育一致,即两个种群的成虫同时出现并自由交尾 (Gould 1998)。Liu 等 (1999) 研究了棉红铃虫的一个实验室汰选种群、敏感种群及其杂交  $F_1$  代在 *Bt* 和非 *Bt* 棉上的存活率和发育速率,结果表明棉红铃虫对 *Bt* 棉的抗性呈隐性遗传,杂交  $F_1$  代的存活率 (2%) 与敏感种群的存活率 (6%) 没有显著差别,但都显著低于抗性种群的存活率 (37%)。但是抗性种群在 *Bt* 棉上的发育历期比敏感种群在非 *Bt* 棉上的发育历期平均延长了 5.7 天,而田间实验数据表明,棉红铃虫的成虫平均寿命不超过 7 天,实验室研究表明,其成虫在羽化三天内即完成交尾。这种发育的异步性会使来自 *Bt* 棉的抗性个体之间的交尾几率大大增加,从而产生相当数量的纯合抗性个体,从而加速抗性的产生。

## 5.2 其他抗性治理策略

针对目前应用的转 *Bt* 基因抗虫作物杂交种主要表达某一种 *Bt* 杀虫蛋白基因,且某一特定的杀虫蛋白只对某一种或几种害虫具有毒杀作用,抗虫谱窄,害虫易产生抗性。可以利用现代基因工程技术将两种或两种以上的 *Bt* 基因或不同杀虫机理的其它基因与 *Bt* 基因混合转入玉米中,增加外援基因的种类。这样既可以提高杀虫活性、扩大转基因作物的杀虫谱,又可以延缓害虫抗性的产生和发展。

让抗虫基因在特定的时期或特定的部位表达,看起来对某些作物非常有用,如在马铃薯上我们不让它在块茎上表达,棉花只让它在有经济价值的棉铃上表达等,仅从抗性的角度来看,有与抗性基因的时空表达不同会对害虫不同龄期造成不同程度的选择压,从而可能不是延缓而是加速了抗性的产生 (McGaughey 等 1992)。

如果害虫对 *Bt* 的抗性是不稳定的,那么不同转 *Bt* 基因作物或转基因抗虫作物与其他抗虫作物之间的轮作,也能有效的延缓抗性的产生。

另外,应当将转基因抗虫作物作为一种新型的害虫治理手段纳入到害虫综合治理 (IPM) 中来,在应用 *Bt* 作物的同时配合其他防治措施,对害虫进行综合治理,从而更好的发挥 *Bt* 作物的防治效果,保证其长期有效的合理利用。同时,还应当加强立法,以保证抗性治理计划的全面系统地执行,防治抗性种群的传播扩散 (王冬妍等 2003)。

## 6. 本项研究的意义

玉米是世界上重要的粮食作物之一,在世界农业生产中具有举足轻重的地位。玉米病虫害是严重影响玉米产量和品质的重要因素,其中欧洲玉米螟和亚洲玉米螟是为害玉米的两种最重要的害虫,前者分布于欧洲、北非和西亚,20 世纪初传入北美 (Hudon 等 1989),后者分布于东亚、东南亚及太平洋诸岛 (Nafus 等 1991)。据统计,仅在美国、欧洲玉米螟每年造成的产量损失及投入的防治费用达 10 亿美元;在我国,每年因亚洲玉米螟的为害,玉米减产 10% 左右,大发生年产量损失达 30% 以上,甚至完全绝收 (中国农作物病虫害编委会 1995)。70 年代以来,对棉花的危害也逐年加重,已成为长江下游棉区和黄淮流域棉区棉花的重要害虫 (刘德钧等 1981, 冯殿英等 1987)。近年来随着现代分子生物学技术的高速发展,特别是转基因抗病、虫植物的诞

生,为控制植物病虫害提供了新途径。自 1990 年获得在玉米植株中高剂量表达具有杀虫活性蛋白转 *Bt* 基因抗虫玉米,并于 1995 年在美国环保局批准登记以来,由于 *Bt* 玉米具有防治效果好、增产增收、对人畜安全、同时可减少化学农药用量、有利于保护环境,省时省力等优点,已在美国等国家大面积推广应用。如美国的 *Bt* 玉米栽培面积在 1997 年为 280 万  $\text{hm}^2$ , 1998 年达到 650 万  $\text{hm}^2$ , 占该国玉米种植面积的 22%, 到 1999 年约为 970 万  $\text{hm}^2$ , 大约占北美玉米种植面积的 30%。*Bt* 基因抗虫玉米的研究虽然起步较晚,但在国家“863”计划的支持下,已取得了进展,并已进入环境释放阶段。可望在近几年应用于生产。

亚洲玉米螟是转 *Bt* 基因抗虫玉米在我国的主要靶标害虫,田间和室内实验表明其效果非常显著(He 等 2003a, 2003b)。但由于转 *Bt* 基因玉米在其整个生育期整株杀虫蛋白的高表达,所以存在着很大的抗性风险,也就构成了对 *Bt* 玉米乃至所有转 *Bt* 基因作物可持续利用的最大威胁。目前,国内外对害虫对 *Bt* 的抗性研究的很多,但亚洲玉米螟对 *Bt* 的抗性的汰选工作以及遗传规律的研究还未见报道。本项研究的从亚洲玉米螟的室内抗性汰选、抗性评价及其抗性种群的部分生物学和抗性遗传规律及其与交互抗性等几个方面第一次对亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 杀虫晶体蛋白抗性发展和抗性遗传作了全面的研究,为亚洲玉米螟对转 *Cry1Ab* 基因抗虫玉米的抗性治理策略的利用、改进、设计提供了重要的理论基础,对于转基因抗虫玉米的可持续利用有着重要的现实意义。

## 第二章 抗性种群生物学研究

目前已商业化的转基因玉米大都为转 *Cry1Ab* 杀虫蛋白基因的抗虫玉米, 大面积连续种植将使玉米螟长期处于单一杀虫蛋白的高强选择压力环境中, 由于这一胁迫作用有可能引发害虫对转基因玉米的适应性和抗性的发展, 将严重阻碍转基因玉米以及转相同或近似基因的其他作物的长期可持续利用。因此, 害虫对转基因作物的抗性治理是目前各国科学家严重关注的焦点问题之一。美国是最早将转 *Bt* 基因玉米商业化的国家, 美国环保局(EPA)要求各公司在申请注册转 *Bt* 基因抗虫作物时必须同时提交抗性治理计划。

现在针对害虫对 *Bt* 作物的抗性治理策略很多, 如高剂量/避护所策略、多基因策略, 表达不同杀虫晶体蛋白的转基因作物轮作等(McGaughey 等 1992)。其中高剂量庇护所策略被认为是最具实际和可操作性的用于目标害虫对转 *Bt* 基因抗虫作物产生抗性的治理措施。其理论基础之一是, 种植转基因品种的同时, 种植一定比例的非转基因品种, 使转基因田存活的抗性个体与非转基因田产生的敏感种群之间进行随机交尾, 以降低种群中隐性纯合抗性个体出现的频率。然而, 进一步研究发现这一理论基础的有效性除与害虫抗性遗传基因的显、隐性有关外, 还与害虫抗性种群与敏感种群的生物学行为, 如生长发育历期、成虫选择异性个体的交尾行为等多种因素直接相关。有研究报道, 对 *Bt* 棉产生抗性的棉红铃虫 (*Pectinophora gossypiella*) 品系的抗性遗传基因为隐性, 但抗性品系和敏感品系在幼虫发育历期相差 7d, 棉红铃虫一般在羽化后 1~2d 完成交尾, 因此抗、感品系间由于成虫发生期的差异而导致不能实现随机交尾 (Liu 等 1999), 因而对高剂量/庇护所对策的科学性和抗性治理的有效性提出质疑。这一研究结果发表在国际权威杂志 *Nature* 上, 引起了国际上科学家的极大关注。深入研究 *Bt* 抗性害虫由于生物学、生态学适应性而引起的行为学变化与抗性治理对策的关系, 已成为近年来国际上害虫对转基因作物抗性治理研究的热点之一。

转 *Bt* 基因玉米的第一目标害虫是欧洲玉米螟, 室内汰选研究已经表明欧洲玉米螟能够对 *Bt* 蛋白产生适应性 (Huang 等 1999)。虽然欧洲玉米螟对 *Bt* 抗性的遗传学研究已有报道, 但对抗性种群的生物学和行为学还未见有研究报道。转 *Bt* 基因玉米对亚洲玉米螟亦具有很好的防治效果 (He 等 2003a, 2003b)。通过对我国玉米主要产区东北春播玉米区、黄淮海夏播玉米区的 9 省(区) 11 个亚洲玉米螟不同地理种群的初孵幼虫对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白种群敏感水平测试结果表明, 所有测试的亚洲玉米螟种群对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白都非常敏感,  $LC_{50}$  为 0.1957~0.8115  $\mu\text{g/g}$  (*Cry1Ab* 蛋白/亚洲玉米螟饲料), 不同地理种群的  $LC_{50}$  间有一定差异 (何康来等, 待发表), 说明亚洲玉米螟存在着对 *Bt* 杀虫蛋白产生抗性的潜力。为进一步进行亚洲玉米螟对转 *Bt* 基因的抗性风险评估, 明确其抗性遗传规律, 以便提出合理有效的田间监测方法和抗性治理对策, 自 2000 年来, 中国农科院植保所玉米螟组一直进行着亚洲玉米螟对 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 杀虫蛋白抗性的汰选工作。在室内人工汰选 27 代的亚洲玉米螟种群, 对 *Cry1Ab* 蛋白的抗性提高了 100 多倍。因此如果在我国生产上推广应用转 *Bt* 基因抗虫玉米, 也将面临亚洲玉米螟会对其产生抗性的风险, 而这将直接关系到转 *Bt* 基因玉米及其它转 *Bt* 基因作物的可持续利用。因此深入研究亚洲玉米螟对 *Bt* 的抗性发展, 及抗性种群对 *Bt* 产生适应性的生物学、行为学等方面的机理, 对于今后在推广转 *Bt* 基因玉米的同时, 制定科学合理的抗性治理对策并采取有效的抗性治理措施, 使这一技术能在我国得以长期的可持续的利用具有重要的意义。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验材料

用于抗性种群汰选的 *Cry1Ab* 杀虫蛋白，含量为 3.4 mg/mL，由孟山都公司提供。

亚洲玉米螟饲养条件为 26~28℃ 温度，70~90% RH 和光周期 L:D=16:8 h，中国农科院植保所玉米螟组现代化养虫室。

亚洲玉米螟 *Cry1Ab* 抗性种群：本实验室 2000 年采自河北省衡水市的亚洲玉米螟自然种群，在室内以饲料混合法进行抗性汰选，即在亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料（宋彦英等 1999）中加入一定量的 *Cry1Ab* 杀虫蛋白，进行幼虫全生育期汰选。起始浓度为 2.5ng/g (*Cry1Ab*/饲料)，筛选压为 40~70%。隔 1 或数代分离种群，浓度加倍继续汰选的方法，汰选至 27 代的亚洲玉米螟种群对 *Cry1Ab* 的抗性达到了 100 多倍。并在恒定剂量 100ng/g (*Cry1Ab*/饲料)下连续饲养，作为本项研究的供试抗性种群 (RR)。 *Cry1Ab* 抗性种群的汰选情况见图 1。

亚洲玉米螟敏感种群(SS)为在室内人工饲料上连续饲养多代的实验室种群。

*Bt* 玉米为表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的保丰玉米 MON810 及其非转基因受体玉米，由孟山都公司提供，分期播种在中国农业科学院植物保护研究所隔离试验田。常规栽培管理，播后苗前施用阿特拉津除草剂，之后整个生育期不施任何农药。在玉米植株生长发育至穗期，花丝未抽出之前，对雌穗进行套袋隔离。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 *Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟种群在人工汰选饲料上的生存力评价

将已用 *Cry1Ab* 蛋白汰选 26 代的亚洲玉米螟种群（终汰选浓度为 100ng/g），分为两个种群，一种群维持 100ng/g 的蛋白含量连续汰选，记为 RR；另一种群饲料中的蛋白含量加倍连续汰选，记为 RD。

检测 RR 种群 28 代、36 代分别在含 100、200 和 400ng/g *Cry1Ab* 的亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料上的存活情况，记录其不同浓度蛋白条件下的发育历期、存活率、化蛹率、蛹重、雌雄性比等发育指标。

RR 抗性种群 28 代分出部分在不含 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的常规亚洲玉米螟半人工饲料上连续饲养，记为 npr，并分别记录各代幼虫发育历期和蛹重。

敏感种群在不含 *Cry1Ab* 蛋白的亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料上饲养为敏感。

#### 1.2.2 亚洲玉米螟抗性种群对 *Bt* 玉米的抗性评价

##### 1.2.2.1 对 *Bt* 玉米心叶的抗性生测

当田间 *Bt* 玉米植株生长至 6-10 叶期，从田间采回植株，去除展开叶片和茎秆，选用未展开幼嫩叶片的黄白色部分，用蒸馏水冲洗 2-3 次，然后用滤纸吸取表面水分，剪成长为 1.5-2.0cm 的小方块，放入 24 孔细胞培养板（孔 1.5cm × 2.0cm，美国 corning 公司生产），每孔放 3-5 片。每孔接供试亚洲玉米螟初孵幼虫 1 头，用盖子内加一张吹塑纸和一张喷适量水的滤纸的盖子盖好，保持板湿度，并用两个皮筋扎紧，防止幼虫逃逸。每一个培养板为一个处理，每个处理重复 3 次。放入温度为 26 ± 2℃，相对湿度 70% 左右养虫室培养。每 48 h 调查一次幼虫存活数，并根据取食

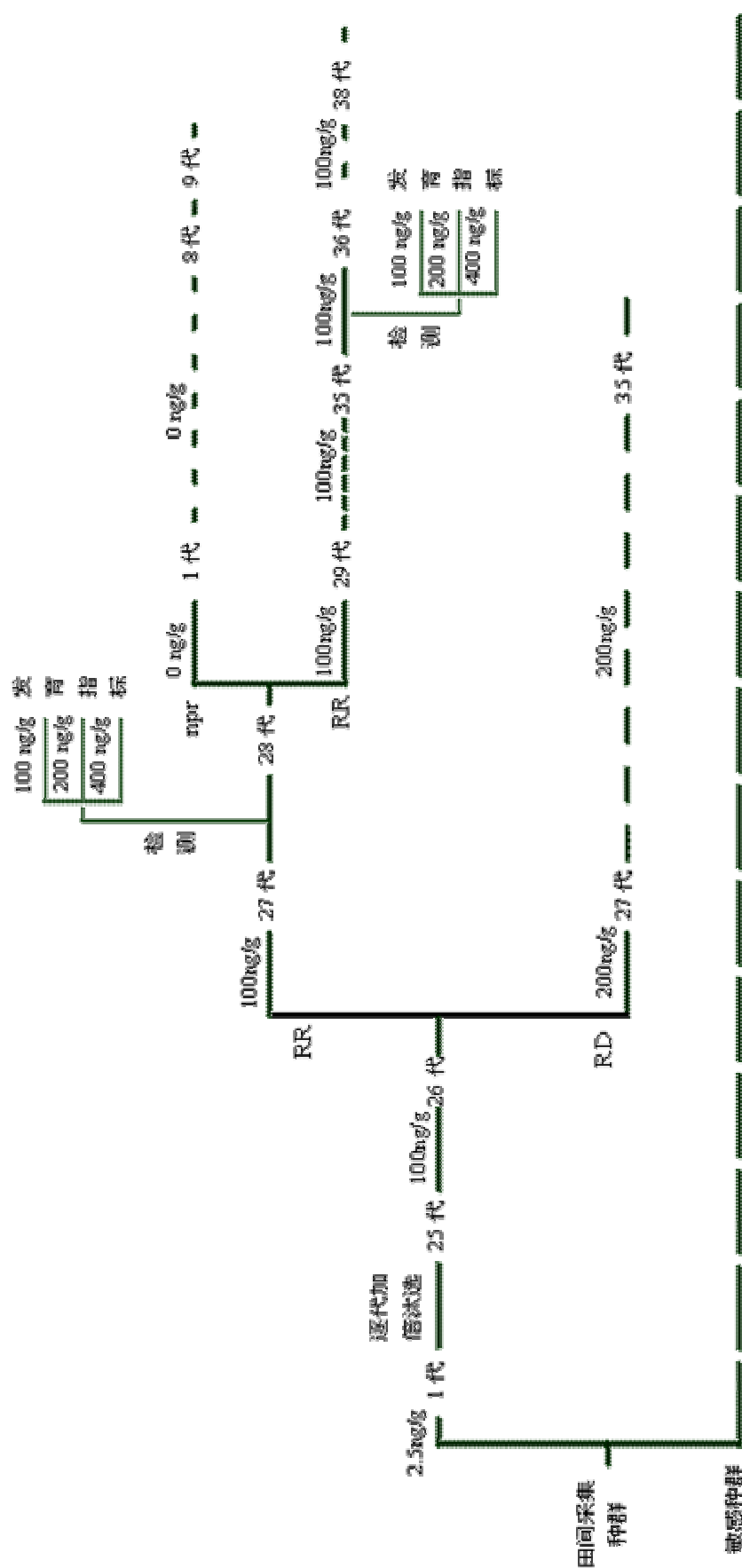


图 1 亚洲玉米螟对 Cyp1Ab 抗性的室内汰选

情况和叶片新鲜程度及时添加或更换来源相同的叶片。一周后将存活个体转移至 10 或 12 孔板，直至各个处理个体全部死亡或化蛹。以非转 *Bt* 基因受体玉米为敏感。

#### 1.2.2.2 对 *Bt* 玉米苞叶、花丝抗性生测

取已经套袋隔离的雌穗，在花丝刚抽出时，连同玉米幼嫩雌穗一起采回实验室，剥去外边的苞叶，留下里边 3 层幼嫩苞叶和花丝，用蒸馏水稍稍冲洗后，用滤纸吸干水分。苞叶的处理与抗性生测方法与心叶相同。将花丝从玉米穗轴上慢慢取下，每次取 3~5 根在食指指尖上绕成一小卷，放入 24 孔培养板的一孔中，操作过程中应尽量减少对花丝的损伤，然后接孵化时间不超过 12h 的亚洲玉米螟初孵幼虫 1 头，其余处理步骤同心叶抗性测定方法。

#### 1.2.2.3 *Bt* 玉米组织中 Cry1Ab 杀虫蛋白含量的测定

采用酶联免疫测定 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)。将新鲜的 *Bt* 玉米花丝在液氮中处理 30 分钟，然后在 -20℃ 冰箱冻存，用 *Bt*-Cry1Ab ELISA 试剂盒测 *Bt* 蛋白的表达量。

##### 1.2.2.3.1 ELISA 试剂盒

*Bt*-Cry1Ab ELISA 试剂盒，美国 agdia 公司生产。主要试剂包括：

Antibody-coated 96-well microtiter plates

Peroxidase enzyme conjugate

TMB Substrate

Positive control

Negative control

Nonfat Dried Milk

Tween-20

PBST wash buffer, 20X concentrate

Stop solution, 3M sulfuric acid

##### 1.2.2.3.2 配制缓冲液及标准试剂

**PBST** : PBST (20x) 50ml + 蒸馏水 950ml = 1000ml PBST(1x)

**MEB** : 0.4g 脱脂奶粉 (Nonfat Dried Milk) + 吐温 (Tween-20) 0.5g + PBST 缓冲液 100ml，在室温下慢慢搅拌直到完全溶解；

**ECM** : 0.1g 奶粉 + 25ml PBST，摇匀溶解；

**阳性敏感 (Positive control) 标准液** : 阳性敏感原液 + MEB 2ml = 32ng/ml，分配成 10 管，每管 250ul。分别稀释成 32ng/ml、16ng/ml、8ng/ml、4ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml。

**碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase enzyme conjugate)** : 取 110ul 酶，加入 11ml 的 ECM。必须在使用前 10 分钟配置。

##### 1.2.2.3.3 测试步骤

- 每个组织样品用 1/10,000 电子分析天平 (TA450 型，美国 CAHN 公司) 称 0.4 克，加入液氮研磨，再加入 1ml MEB，继续研磨成匀浆状，转入离心管中；样品均用组织研磨器 (38mm，涿州市长虹玻璃仪器厂) 研磨。
- 样品用旋涡混合器 (MS1 Minishaker 型，广州 IKA 公司) 振荡，再用 12000r/min 离心 8 分钟 (5415D 型，德国 eppendorf 公司)。

- c. 取样品上清液及正敏感、负敏感 (*Bt* 玉米的非转基因亲本) 100ul 分别加入酶标板内, 将板放入一湿润的盒子中培养 1h 或者在 4℃ 冰箱中培养一晚上。
- d. 洗板: 取出酶标板, 每孔加入 300ul PBST, 在瓷盘中放置 3 分钟, 快速甩去酶标板内的液体, 并在滤纸上轻磕, 除去残液, 重复七次;
- e. 稀释同源酶, 向每个孔中加入 100ul 的准备好的酶。
- f. 培养板: 在一湿润的瓷盘中室温下培养 1h。
- g. 洗板: 当第二次培养完成后进行洗板, 同上次, 重复 7 次。
- h. 加入底物溶液, 向板中的每个孔中加入 100ul 的 TMB 底物溶液。
- i. 培养板: 把板放入湿润的瓷盘中培养 20 分钟。
- j. 在酶标仪 (EL311SL 型, BIO-TEK 公司) 650nm 下测定吸光值。
- k. 整理数据, 作出标准曲线 1。
- l. 测定玉米组织中总可溶性蛋白的含量, 应用考马斯亮兰 G250 法。
- m. 6 只 Eppendorf 管中分别加入 0、15、30、45、60、75ul 的 0.5mg/ml 的 BSA, 以 0.15M NaCl 补至体积为 300ul, 再加入 3ml 考马斯亮兰 G250, 室温下反应 2min. 以不含 BSA 的管作敏感, 在 595nm 下测定吸光值, 做标准曲线 2。  
在 Eppendorf 管中加入 3ml 考马斯亮兰, 再加入 270ul 的 0.15M NaCl, 再加 30ul 样品上清液, 反应 2min, 在旋涡混合器上振荡混匀。以不含样品的管做敏感, 在紫外可见分光光度计 (752 型, 上海光谱仪器有限公司) 595nm 下测定吸光值。
- n. 数据的处理: 根据光吸收值在标准曲线 1 确定 *Bt* 蛋白的含量, 在标准曲线 2 上确定总蛋白的含量, 并计算出 *Bt* 蛋白占总可溶性蛋白的比重 (ng/g)。

#### 1.2.2.3.4 注意事项

- o. 甩去酶标板内的液体时, 动作要快, 避免相互污染; 且手指不要接触酶标板背面;
- p. 每次处理不同的样时要充分清洗研钵;
- q. 要做好点样图。

#### 1.2.3 抗性种群与敏感种群的交尾竞争与繁殖力测定

将同期化蛹的抗、感种群分别鉴别雌雄蛹并分别放入一羽化笼中, 对羽化的抗性种群 (RR) 的雌雄蛾进行外标记, 即在前翅端部标一黑色圆点。选择同一天新羽化的抗、感种群 (SS) 的雌、雄蛾分别配对放入产卵笼 (12 × 12 × 15 cm) 内, 按 4 种组合形式配对, 即: ♀<sub>R</sub> × ♂<sub>S,R</sub>、♀<sub>S</sub> × ♂<sub>S,R</sub>、♀<sub>S,R</sub> × ♂<sub>R</sub>、♀<sub>S,R</sub> × ♂<sub>S</sub>, 放入温度 24 ± 1℃, 相对湿度 > 80%, 光周期为 L : D 为 16:8 h 的成虫室, 每 30min 观察一次, 直至观察到第一次交尾并记录交尾时间、抗、感组合类型, 每天收集所产卵块并记录卵量。每组合观察 29~57 个重复。

#### 1.2.4 抗性种群的抗寒能力测定

##### 1.2.4.1 抗、感亚洲玉米螟滞育幼虫

将抗性种群 (RR) 接种在掺有 *Cry1Ab* 的人工饲料中, 敏感种群 (SS) 及其杂交 F<sub>1</sub> 代接种在没有掺入 *Cry1Ab* 的人工饲料中, 置于短光照 (L:D 为 11:13h) 温度为 22℃、相对湿度为 70% 的环境箱中饲养 45 d, 人工诱导滞育。本试验重复两次, 第一批试虫置于 13℃ ~ 15℃ 自然环境中



15 d, 以备测定过冷却点用;第二批试虫则将人工诱导滞育幼虫置于环境箱中以 2 /2 d 的降温速率降至 4 , 然后 0 保持 3 d, 以备用作测定过冷却点。

#### 1.2.4.2 实验仪器

TMC-40A 霜箱温度检测/控制器及配套的虫体温度计算机采集记录应用软件, 由中国农业科学院植物保护研究所和农业气象研究所共同研制开发; VM04/100 型超高低温箱( -40 ~ 180 ), 德国贺利氏( Heraeus ) 公司生产。

#### 1.2.4.3 过冷却点测试方法

将待测幼虫首先称重并编号, 然后分别放入 0.5ml 离心管(每管放 1 头幼虫), 将 TMC-40A 霜箱温度检测/控制器的虫体温度计算机采集热敏电阻感温探头固定在虫体的腹部, 并用无菌脱脂棉固定, 使感温探头和虫体保持紧密接触, 然后置于 VM04/100 型超高低温箱中。

VM04/100 型超高低温箱温度设定: 首先在 0 恒温 10 分钟; 然后以 1 /min 的速率降温, 虫体温度的变化由 TMC-40A 温度检测/控制器采集, 通过计算机及其相应软件进行记录和分析, 并绘制出虫体温度变化曲线, 每一种群测定幼虫 30~64 头。

非滞育抗性种群及敏感种群的 5 龄幼虫测试前首先在 4 预冷 10h。

### 1.3 数据统计分析

对种群间平均幼虫发育历期、存活率、化蛹率、蛹重、产卵量等的比较分析运用 SAS 统计软件的 PROC ANOVA 或 PROC GLM 进行分析, 平均均数显著性比较采用 LSD 法; 种群间过冷却点和结冰点的比较分析采用 PROC TTEST、PROC ANOVA 或 PROC GLM 进行分析, 平均数间的显著性比较采用 LSD 法。

竞争交尾类型的比较采用二项总体百分数  $p$  的假设检验, 检验样本百分数所属的总体百分数与假设总体百分数  $p_0 = 0.5$  的差异, 公式:

$$u = \frac{\hat{p} - p}{\sigma_{\hat{p}}}$$

$$\text{其中, } \sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

## 2. 结果与分析

### 2.1 亚洲玉米螟 *Bt* 玉米抗性种群在人工汰选饲料上的生存力

#### 2.1.1 同一汰选压胁迫下抗性种群的生存力

以梯度增加选择压的方法, 在人工饲料中混入 *Cry1Ab* 对亚洲玉米螟汰选到 27 代后, 开始在 100ng/g 的浓度上连续饲养, 并测定比较汰选不同代数种群在 *Cry1Ab* 蛋白不同浓度的人工汰选饲料上的存活能力。结果表明, 随着饲养代数的增加, 种群在汰选浓度下的存活和化蛹率明显提高, 平均蛹重增加, 雌、雄性比提高, 如在 100ng/g 的浓度下连续汰选 9 代, 存活率提高 17%, 化蛹率提高 15%, 平均蛹重增加 5%, 雌、雄性比提高 10% (表 1)。但在 200ng/g 和 400ng/g 高

浓度下，种群的存活率、化蛹率、蛹重和性比等生存能力没有明显变化。这些结果说明同一汰选压力胁迫下，可提高种群中抗性基因频率，但不能提高抗性水平。

表 1 抗性种群在含有不同浓度 *Cry1Ab* 蛋白的人工饲料上的发育指标  
Table 1 Development of *Cry1Ab* resistant ACB fed on diet incorporated with *Cry1Ab* protein

世代	浓度 (ng/g)	发育历期 (d)	存活率 (%)	化蛹率 (%)	平均蛹重 (mg)	性比 ( : )
第 1 代	100	21	60.5	52.0	52.43	1 : 1.31
	200	21	37.5	26.0	49.47	1 : 1.74
	400	21	48.0	36.5	49.11	1 : 1.38
第 9 代	100	20	77.5	67.5	55.23	1 : 0.90
	200	20	37.0	27.0	46.45	1 : 1.45
	400	20	42.5	36.0	45.60	1 : 1.06

2.1.2 抗性种群在不同汰选压力胁迫下幼虫的发育历期和蛹重

与敏感种群在正常的人工饲料上生长发育相比较 ,抗性种群在胁迫汰选饲料上幼虫发育历期显著延长 (表 2)。当抗性种群在提高或降低胁迫选择压的情况下，种群的发育历期亦发生显著改变。已在 100ng/g 浓度下汰选 4 代的抗性种群在 200ng/g 浓度下连续汰选 9 代后，其种群平均幼虫发育历期比在原浓度下同样汰选 9 代显著延长 2.4 d，比敏感种群延长了 8.12 d；100ng/g 恒压汰选的种群(RR)平均发育历期延长了 5.7 d。而抗性种群在无蛋白饲料上连续饲养 9 代后，种群平均幼虫发育历期比在原浓度下汰选 9 代的种群显著缩短 3.1 d，但仍显著高于敏感种群 2.6 d。

表 2 抗性种群在不同饲料上连续饲养的平均幼虫发育历期及蛹重  
Table 2 Development time and pupal weight of resistant colony maintained on different diet

种群	饲料中 <i>Cry1Ab</i> 含量(ng/g)	幼虫历期 (d)			蛹重 (mg)		
		平均数 ± SE	最大值	最小值	平均数 ± SE	最大值	最小值
RD	200	23.72±1.04 a*	29	19	37.82±2.55 a*	50.24	28.25
RR	100	21.33±0.38 b	23	19	38.43±1.78 a	47.12	29.50
npr	0	18.22±0.57 c	21	16	39.88±3.71 a	56.39	27.14
SS	0	15.60±0.48 d	18	13	67.68±2.73 b	83.18	57.64

\* Duncan’s 差异显著比较 ,均数(±SE)后具有相同字母表示差异不显著。(发育历期 : $F=31.05$ ;  $df=3,36$ ;  $P<0.0001$ , 蛹重 : $F=29.74$ ;  $df=3,36$ ;  $P<0.0001$ )

\* Means ± SE within a column followed by the same letters were not significantly different according to Duncan’s test. (Development time:  $F=31.05$ ;  $df=3,36$ ;  $P<0.0001$ , pupal weight:  $F=29.74$ ;  $df=3,36$ ;  $P<0.0001$ )

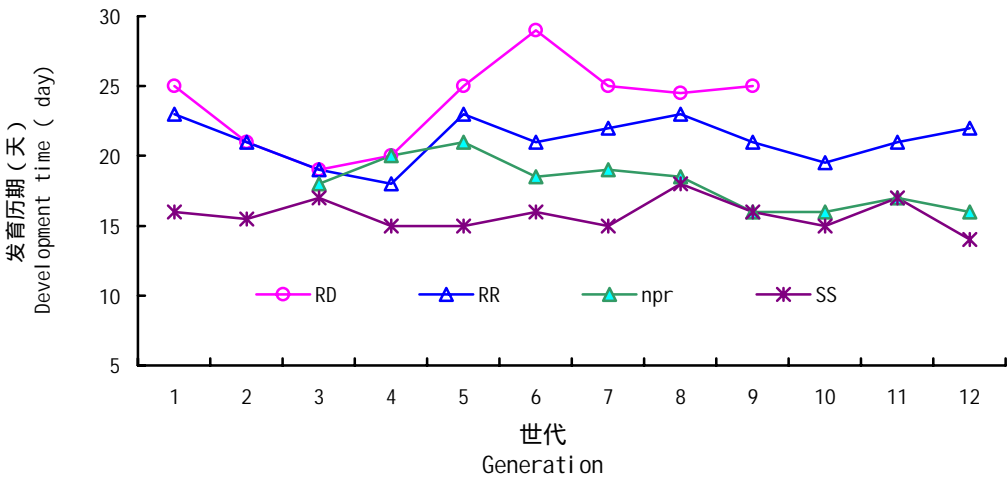


图2 抗、感种群以及抗性种群无蛋白饲养种群发育历期的比较  
Fig.2 The development time of different colonies

从 4 个种群 (RD、RR、npr、SS) 幼虫发育历期来看,在 100ng/g 上饲养的抗性种群基本上与敏感平行的维持在一定的水平上下波动,而在 100ng/g 的杀虫蛋白含量水平上加倍的 200ng/g 含量的人工饲料饲养的 RD 种群的发育历期波动较大,且在 4 代以后发育历期明显延长,并在 7 代以后在一个较长的发育历期水平上趋于平稳。而在无杀虫蛋白普通人工饲料上饲养的抗性种群 (npr),由 100ng/g 的杀虫蛋白饲料到无杀虫蛋白饲料的第一代其发育历期迅速下降,而后两代又恢复到抗性种群 (RR) 的水平,3 代以后其发育历期开始下降,6 代以后基本上恢复到敏感种群的幼虫发育历期水平(图 2)。

从表 2 中可以看出,敏感种群的蛹重显著高于抗性种群的蛹重以及无蛋白饲养的种群的蛹重,敏感种群的平均蛹重约是抗性种群的 1.75 倍。而在含 100ng/g 和 200ng/g *Cry1Ab* 的饲料上饲养的抗性种群和不含 *Cry1Ab* 杀虫蛋白饲养的抗性种群之间的蛹重没有显著差异。

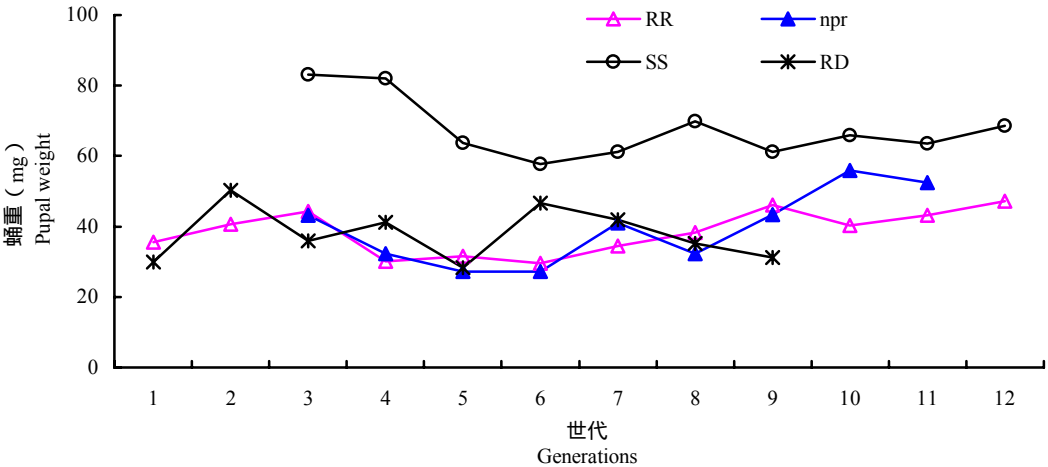


图3 抗、感种群及抗性种群无蛋白饲养种群的蛹重比较  
Fig.3 Pupal weight of different colonies

从 4 个种群连续饲养多代蛹重的变化趋势来看, 在含 100ng/g *Cry1Ab* 人工饲料上饲养的 RR 种群的蛹重相对波动比较小, 而且略有上升的趋势。由 100ng/g 加倍的抗性种群 RD 的蛹重代际间波动幅度比较大, 其前 6 代的蛹重与 RR 种群的蛹重相比呈交替趋势变化, 而后呈下降趋势。不含 *Cry1Ab* 杀虫蛋白饲料连续饲养的抗性种群 9 代蛹重除略有波动外其大体趋势与含 RR 抗性种群的基本一致, 第 8 代和第 9 代的蛹重与抗性种群相比有所增加, 结合幼虫的发育历期来看, RR 种群的历期基本趋于稳定, 而无蛋白饲养的种群则呈下降趋势 (图 3)。

## 2.2 *Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟种群对 *Bt* 玉米的抗性

### 2.2.1 对 *Bt* 玉米心叶期的抗性

以转 *Bt* 基因玉米 MON810 心叶饲养对 *Cry1Ab* 抗性和敏感的亚洲玉米螟种群的初孵幼虫, 24 h 后抗性种群幼虫在 *Bt* 玉米心叶上的存活率与抗、感种群在非 *Bt* 玉米上的存活率差异不显著, 而敏感种群在 *Bt* 玉米上的存活率显著低于其在非 *Bt* 玉米以及抗性种群在 *Bt* 和非 *Bt* 玉米上的存活率。取食 48 h 后, 抗性种群在 *Bt* 玉米上的存活率显著低于抗、感种群在非 *Bt* 玉米上的存活率, 而显著的高于敏感种群在 *Bt* 玉米上的存活率。当抗、感种群在 *Bt* 玉米心叶上取食 3 d 后则全部死亡, 而在非 *Bt* 玉米心叶上的存活率在 94% 以上 (表 3)。这一结果说明, 用人工饲料混入 *Cry1Ab* 杀虫蛋白汰选的亚洲玉米螟种群与未经汰选的敏感种群相比较, 其对 *Bt* 玉米心叶已经产生了明显的抗性。但抗性种群初孵幼虫取食转 *Bt* 基因玉米 MON810 的心叶不能完成幼虫期发育, 而在第 3 d 全部死亡, 说明其对 *Bt* 玉米心叶期表现为相对敏感。

表 3 亚洲玉米螟抗性种群及其敏感种群在 MON810 及其敏感心叶上的存活力评价

Table 3 Survival of resistant and susceptible colonies fed on the whorl leaves of *Bt* and non-*Bt* maize

玉米品种	亚洲玉米螟种群 <sup>*</sup>	存活率 (%) <sup>†</sup>		
		1d	2d	3d
非 <i>Bt</i> 玉米	RR	100.0 ± 0.0 a	100.0 ± 0.0 a	97.2 ± 1.4
非 <i>Bt</i> 玉米	SS	98.6 ± 1.4 a	97.2 ± 1.4 a	94.4 ± 1.4
<i>Bt</i> 玉米	RR	97.2 ± 2.8 a	25.0 ± 4.8 b	0.0 ± 0.0
<i>Bt</i> 玉米	SS	91.7 ± 2.4 b	2.8 ± 2.8 c	0.0 ± 0.0

<sup>\*</sup> RR—抗性种群, SS—敏感种群; RR—resistant colony, SS—susceptible colony

<sup>†</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ )

<sup>‡</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (1d,  $F=3.46$ ;  $df=3, 8$ ;  $P=0.0713$ ; 2d,  $F=302.04$ ;  $df=3, 8$ ;  $P<0.0001$ ; 3d,  $F=3715.33$ ;  $df=3, 8$ ;  $P<0.0001$ )

### 2.2.2 对穗期 *Bt* 玉米的抗性

#### 2.2.2.1 对散粉期苞叶的抗性

以转 *Bt* 基因玉米 MON810 散粉期苞叶饲养对 *Cry1Ab* 抗性和敏感的亚洲玉米螟种群的初孵幼虫, 24h 后抗性种群在 *Bt* 玉米苞叶上的幼虫存活率与抗、感种群在非 *Bt* 玉米上的存活率差异不显著, 而敏感种群在 *Bt* 玉米上的存活率显著低于抗、感种群在非 *Bt* 玉米上的存活率。取食 48

h 和 72 h 后, 抗性种群在 *Bt* 玉米苞叶上的存活率显著低于抗、感种群在非 *Bt* 玉米苞叶上的存活率, 而显著高于敏感种群在 *Bt* 玉米上的存活率。当抗、感种群在 *Bt* 玉米苞叶上取食 4 d 后则全部死亡, 而在非 *Bt* 玉米上的存活率 95% 以上 (表 5)。这一结果说明, 用人工饲料混入 *Cry1Ab* 杀虫蛋白汰选的亚洲玉米螟种群与未经汰选的敏感种群相比较, 其对 *Bt* 玉米苞叶已经产生了明显的抗性。但抗性种群初孵幼虫取食转 *Bt* 基因玉米 MON810 散粉期苞叶不能完成幼虫期发育, 而在第 4 d 全部死亡, 说明对 *Bt* 玉米抽丝散粉期苞叶表现为相对敏感。

表 4 亚洲玉米螟抗性种群及其敏感在 MON810 苞叶及其敏感上的存活力抗性评价  
Table 4 Survival of resistant and susceptible colonies fed on the husks of *Bt* and non-*Bt* maize

玉米品种	亚洲玉米螟种群 <sup>*</sup>	存活率 (%) <sup>†</sup>			
		1d	2d	3d	4d
非 <i>Bt</i> 玉米	RR	100.0 ± 0.0 a	98.6 ± 1.4 a	95.8 ± 4.2 a	95.8 ± 4.2 a
非 <i>Bt</i> 玉米	SS	100.0 ± 0.0 a	97.2 ± 2.8 a	97.2 ± 2.8 a	95.8 ± 2.4 a
<i>Bt</i> 玉米	RR	91.7 ± 2.4 ab	34.7 ± 2.8 b	2.8 ± 2.8 b	0.0 ± 0.0 b
<i>Bt</i> 玉米	SS	84.7 ± 6.1 b	1.4 ± 1.4 c	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b

<sup>\*</sup> RR—抗性种群, SS—敏感种群; RR—resistant colony, SS—susceptible colony

<sup>†</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ )

<sup>‡</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (1d,  $F=5.14$ ;  $df=3,8$ ;  $P=0.0286$ ; 2d,  $F=479.30$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 3d,  $F=368.22$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.000$ ; 4d,  $F=529.00$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ )

#### 2.2.2.2 对 *Bt* 玉米花丝的抗性

以转 *Bt* 基因玉米 MON810 和非转基因敏感玉米的新鲜花丝饲养 *Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟幼虫和室内敏感种群的结果表明, 亚洲玉米螟敏感种群在 *Bt* 玉米花丝上取食 5 d 的死亡率达到 97% 以上, 个别可存活 7 d, 但虫体发育停滞, 一般在 2 龄以下, 而在非转基因敏感玉米上 5 d 的存活率达 70% 以上, 47% 以上的个体可正常完成幼虫期发育并化蛹、羽化和交尾产卵 (表 5)。与之相比, 抗性种群的幼虫在 *Bt* 玉米花丝上取食 5 d 的存活率显著高于敏感种群, 有 1.4%~29.3% 的幼虫可正常完成幼虫期发育并化蛹、羽化和交尾产卵, 而在非转基因玉米上 5 d 的存活率为 91% 以上, 显著高于敏感种群, 59% 以上的个体可正常完成幼虫期发育并化蛹、羽化和交尾产卵。这一结果说明虽然 *Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟种群在 *Bt* 玉米花丝的存活率、化蛹率显著低于其在非转 *Bt* 玉米, 但与敏感种群相比, 其对转 *Bt* 基因玉米 MON810 已经产生了显著的抗性。

虽然敏感种群幼虫期取食非 *Bt* 玉米花丝的平均化蛹率低于抗性种群, 但平均蛹重显著高于抗性种群 15%~47%。抗性种群幼虫期取食 *Bt* 玉米花丝的平均蛹重与取食非 *Bt* 玉米花丝连续 4 代测试结果中, 除第 1 代显著高于取食敏感玉米花丝的蛹重外, 其余 3 代没有显著差异。与敏感种群在非 *Bt* 玉米花丝上的平均蛹重相比显著降低 10%~33%。抗性与敏感种群取食非 *Bt* 玉米的幼虫发育历期之间没有显著性差异, 而抗性种群取食 *Bt* 玉米花丝与敏感种群取食非 *Bt* 玉米花丝的幼虫发育历期在连续测试 4 代结果中, 除第 1 代与敏感种群在非 *Bt* 玉米花丝上差异不显著外, 其余 3 代则显著延长 2~8 d。这些结果说明抗性种群对 *Bt* 玉米已经产生了适应性, 而且这种适应性亦表现在其生长发育及生物学上的改变。

表 5 4 代抗性种群及敏感种群在 MON810 玉米及其敏感花丝上的存活率  
Table 5 Survival of resistant and susceptible colonies fed on the silk of *Bt* and non *Bt* maize

种群*	玉米品种	平均存活率 (%) <sup>†</sup>				化蛹率 (%)	平均蛹重 (mg)	发育历期 (d)
		3 d	5 d	7 d	15 d			
RR <sub>1</sub>	非 <i>Bt</i> 玉米	100 ± 0.00 a	97.2 ± 1.4 a	91.7 ± 2.4 a	83.3 ± 4.2 a	75.0 ± 2.4 a	42.48 ± 1.73 c	17.04 ± 0.37a
SS	非 <i>Bt</i> 玉米	84.7 ± 1.4 b	76.4 ± 5.0 b	65.8 ± 1.4 b	51.4 ± 3.7 b	50.0 ± 2.4 b	81.42 ± 3.25 a	18.95 ± 0.86a
RR <sub>1</sub>	<i>Bt</i> 玉米	81.9 ± 1.4 b	63.9 ± 7.4 b	51.4 ± 7.3 c	47.2 ± 6.9 b	37.5 ± 6.4c	56.37 ± 1.77 b	18.73 ± 0.69a
SS	<i>Bt</i> 玉米	23.6 ± 2.8 c	2.8 ± 1.4 c	2.8 ± 1.4 d	0c			
RR <sub>2</sub>	非 <i>Bt</i> 玉米	99.0 ± 1.0 a	93.8 ± 3.6 a	89.6 ± 3.6 a	75.0 ± 7.4 a	65.6 ± 9.5 a	43.88 ± 1.45 b	21.22 ± 0.43 ab
SS	非 <i>Bt</i> 玉米	96.9 ± 2.0 a	70.8 ± 5.1 b	63.5 ± 2.6 b	56.3 ± 2.7 b	54.2 ± 4.5 a	51.85 ± 3.91 a	20.00 ± 0.41 b
RR <sub>2</sub>	<i>Bt</i> 玉米	64.3 ± 7.1 b	34.5 ± 5.2 c	29.8 ± 5.9 c	25.6 ± 6.2 c	16.1 ± 3.9 b	40.35 ± 0.81 b	23.49 ± 0.68 a
SS	<i>Bt</i> 玉米	28.1 ± 5.2 c	0d					
RR <sub>3</sub>	非 <i>Bt</i> 玉米	93.8 ± 3.6 a	91.7 ± 5.6 a	80.2 ± 4.6 a	67.7 ± 4.9 a	59.4 ± 8.6 a	45.30 ± 2.54 b	22.33 ± 0.53 b
SS	非 <i>Bt</i> 玉米	100.0 ± 0.0 a	83.3 ± 6.4 a	73.6 ± 5.0 a	65.3 ± 5.0 a	58.3 ± 2.4 a	72.32 ± 2.25 a	21.86 ± 0.32 b
RR <sub>3</sub>	<i>Bt</i> 玉米	51.0 ± 5.2 b	42.7 ± 6.0 b	27.1 ± 7.2 b	18.8 ± 2.1 b	11.5 ± 2.6 b	47.76 ± 4.86 b	29.33 ± 1.70 a
SS	<i>Bt</i> 玉米	2.8 ± 2.8 c	0c					
RR <sub>4</sub>	非 <i>Bt</i> 玉米	98.6 ± 1.4 a	95.8 ± 2.4 a	93.1 ± 1.4 a	83.3 ± 8.7 a	70.8 ± 12.7 a	38.17 ± 0.48 b	20.58 ± 0.17 b
SS	非 <i>Bt</i> 玉米	84.7 ± 1.4 b	70.8 ± 4.2 b	63.9 ± 5.0 b	54.2 ± 2.4 b	47.2 ± 6.0 b	53.99 ± 1.62 a	21.41 ± 0.33 b
RR <sub>4</sub>	<i>Bt</i> 玉米	27.8 ± 3.7 c	9.7 ± 1.4 c	6.9 ± 1.4 c	4.2 ± 2.4 c	1.4 ± 1.4 c	48.40 ± 0.00 b	23.00 ± 0.00 a
SS	<i>Bt</i> 玉米	2.8 ± 2.8 d	0d					

\* RR—抗性种群，SS—敏感种群；RR—resistant colony，SS—susceptible colony

<sup>†</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ )

<sup>†</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (1, 3d:  $F=389.94$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 5d:  $F=79.47$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 7d:  $F=87.35$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 15d:  $F=59.67$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; pupation:  $F=75.00$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; pupae weight:  $F=279.14$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; development time:  $F=1.55$ ;  $df=2,6$ ;  $P=0.2863$ . 2, 3d:  $F=26.58$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; 5d:  $F=65.24$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; 7d:  $F=55.46$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; 15d:  $F=28.92$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; pupation:  $F=31.30$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; pupae weight:  $F=138.67$ ;  $df=3,15$ ;  $P<0.0001$ ; development time:  $F=8.62$ ;  $df=2,6$ ;  $P=0.0048$ . 3, 3d:  $F=122.08$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; 5d:  $F=55.13$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; 7d:  $F=87.33$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; 15d:  $F=78.17$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; pupation:  $F=32.82$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; pupae weight:  $F=70.04$ ;  $df=3,10$ ;  $P<0.0001$ ; development time:  $F=13.7$ ;  $df=2,6$ ;  $P=0.00264$ , 3d:  $F=332.00$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 5d:  $F=346.54$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 7d:  $F=279.91$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; 15d:  $F=74.93$ ;  $df=3,8$ ;  $P<0.0001$ ; pupation:  $F=24.47$ ;  $df=3,8$ ;  $P=0.0002$ ; pupae weight:  $F=8.62$ ;  $df=3,8$ ;  $P=0.0026$ ; development time:  $F=10.78$ ;  $df=2,6$ ;  $P=0.0245$ .)

2.2.3 MON810 花丝中 *Cry1Ab* 蛋白含量

总蛋白标准曲线： $y = 0.0203x^{1.0348} \pm 0.0007 \quad r = 0.9991$

*Bt* 蛋白曲线： $y = 4.3016x^{1.7261} \pm 0.8005 \quad r = 0.8295$

*Bt* 蛋白占总蛋白的比值：585.4571 (ng/g)

ELISA 测试结果表明，本研究用于离体生测的 MON810 玉米花丝中 *Cry1Ab* 蛋白的表达量为 585.5ng/g(鲜花丝重)。由前面生测结果可知，当 *Bt* 玉米花丝组织中 *Cry1Ab* 蛋白表达量在 585.5ng/g(鲜花丝重)以下时，亚洲玉米螟抗性种群已经可以在其上存活并繁殖后代。

2.3 抗性种群与敏感种群的交尾竞争力

2.3.1 供试成虫的交尾率

交尾结果表明，不同抗、感种群的 4 种竞争组合类型的交尾率均达到 80%以上，说明成虫交尾环境是适宜的。正常交尾的亚洲玉米螟雌蛾所产的卵为受精卵，且一般情况下每块卵的卵粒数 >5 粒，多数为 10~30 粒，而没有交尾或交尾不成功的雌蛾一般不产卵或所产的卵为未受精卵，且大多数情况下为单粒产，成块卵的卵粒数一般少于 5 粒。从未观察到交尾而能正常产卵的处理数看，有 3.7%~7.5%的成功交尾漏记，未交尾的仅有 7.4%~12.5%。

表 6 4 种竞争组合类型的交尾率  
Table 6 Percentage of moths mated in four combinations types

竞争类型	观察数量	交尾率 (%)		未 (观察到) 交尾率 (%)	
		RS / SR	RR / SS	产卵	未产卵
RR × SS/RR	54	42.59	46.30	3.70	7.41
SS × SS/RR	57	38.60	50.88	3.51	7.02
SS/RR × SS	40	50.00	30.00	7.50	12.50
RR/SS × RR	29	24.14	62.07	6.90	6.90

2.3.2 抗、感种群间的交尾率

抗、感种群雄蛾间竞争同一雌蛾 (抗或感) 交尾的结果表明，种群间 (RR × SS 或 SS × RR) 交尾率与种群内 (RR × RR 或 SS × SS) 交尾率之间没有显著性差异 (表 7)。说明抗、感种群雄蛾间交尾竞争力没有显著差异。抗、感种群雌蛾间竞争同一雄蛾 (抗或感) 交尾的结果因雄蛾不同而有变异，当雄蛾来自敏感种群时，种群间 (RR × SS) 交尾率与种群内 (SS × SS) 交尾率之间没有显著性差异，即抗、感雌蛾对敏感雄蛾的竞争力间没有显著差异；当雄蛾来自抗性种群时，种群间 (SS × RR) 交尾率与种群内 (RR × RR) 交尾率之间有显著差异，即抗性雌蛾对抗性雄蛾的竞争力显著高于敏感雌蛾。这一结果说明，抗性种群内已出现品系内交尾优先的趋势，当环境中抗性雄蛾的种群密度相对高时，发生抗性种群内交尾的概率要高，即产生抗性纯合基因后代的频率高，将增加亚洲玉米螟对 *Bt* 玉米产生抗性的风险。



表 7 不同竞争类型的种群间与种群内交尾率  
Table 7 Percentage of inter-population mating in four combinations

竞争类型	抗、感种群间交尾率( % )		95%得置信区间		p <sub>0</sub> =0.5 α=0.05	
	RS	SR	下限	上限	μ	P
RR × SS/RR	47.92		33.78	62.05	0.29	>0.05
SS × SS/RR		43.14	29.55	56.73	0.98	>0.05
SS/RR × SS	62.50		45.73	79.27	1.41	>0.05
RR/SS × RR		28.00	10.40	45.60	2.20	<0.05

2.3.3 抗、感种群间与种群内交尾雌蛾产卵量的比较

交尾雌蛾的平均产卵量在 150 粒以上 ,抗、感种群间和种群内交尾雌蛾的平均产卵量间差异不显著( ( 表 8 ) 。这说明尽管与敏感种群相比抗性种群的雌、雄蛾个体比较小 ,但繁殖力与敏感种群没有显著差异。

表 8 同一竞争类型的不同交尾类型产卵量的比较  
Table 8 Number of eggs laid per female from different mating combinations

交尾类型	产卵量 ( 粒/雌蛾 )		
	平均数 ± SE*	最大值	最小值
RR × RR	162.42 ± 33.67	585	24
RR × SS	150.34 ± 21.59	413	15
SS × RR	183.35 ± 33.46	555	18
SS × SS	191.29 ± 23.79	521	58

\* F=0.48; df=3,99; P=0.6944

2.3.4 抗、感种群成虫交尾日活动节律

亚洲玉米螟成虫从第 1 天的 17:00 到第 2 天 10:00 都有交尾发生 高峰期主要集中在分布 23:00 到 4:00。抗、感种群内及种群间交尾时间日活动节律和高峰期基本一致 ( 图 4 ) 。这一结果说明 , 当抗、感种群世代发生期一致时 , 成虫交尾日活动节律不会影响抗、感种群间的随机交尾。

2.4 抗性种群的抗寒能力-过冷却点

亚洲玉米螟人工诱导滞育与非滞育幼虫的过冷却点都呈单峰下降型曲线 ( 图 5-图 8 ) 。

2.4.1 抗性种群和敏感种群非滞育幼虫过冷却点的比较

Bt 玉米抗性亚洲玉米螟种群和敏感种群非滞育幼虫的过冷却点以及结冰点之间没有显著性差异 , 说明抗性种群抵御不良环境低温的能力与敏感种群相同 ( 表 9 ) 。



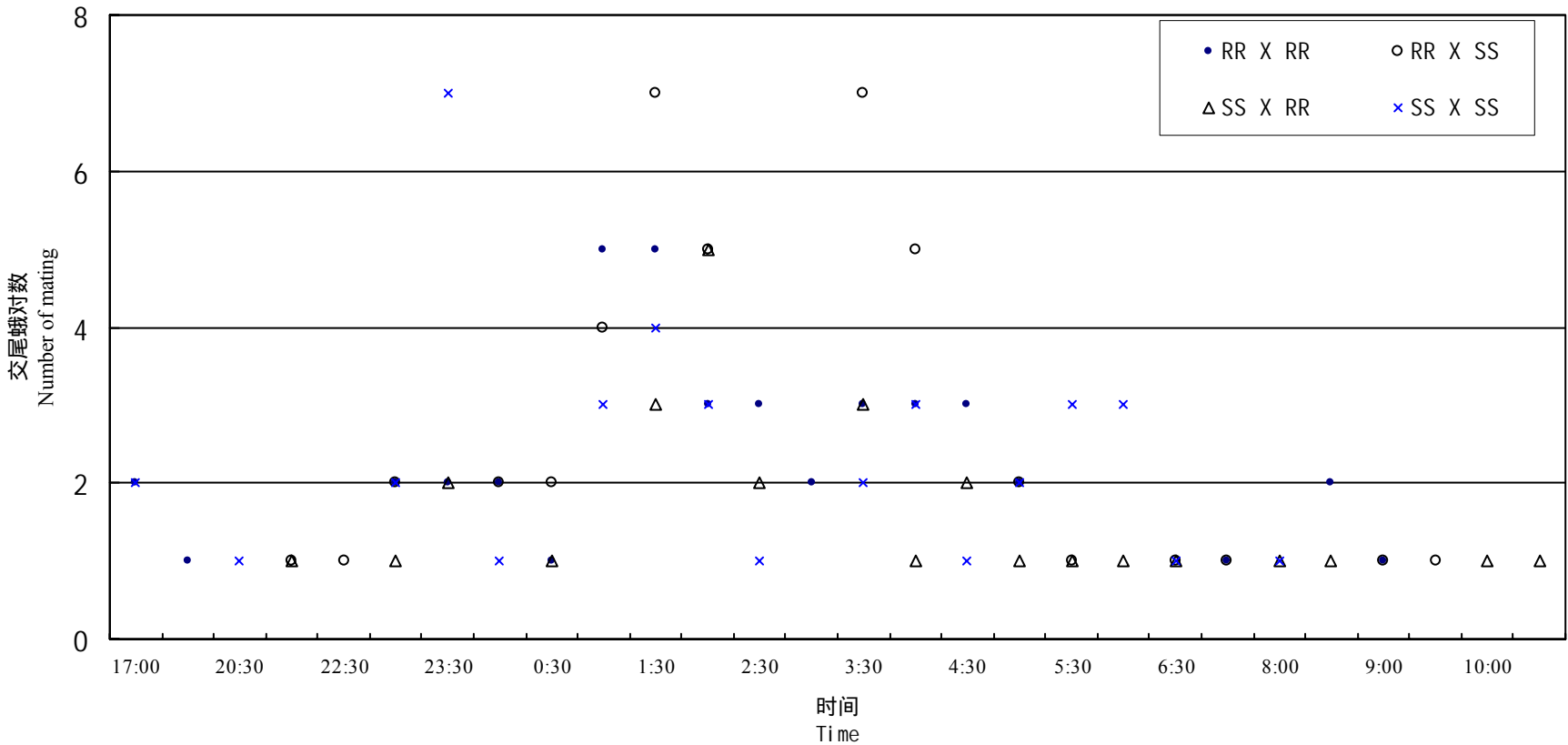


图4 抗、感种群成虫交尾日活动节律  
Fig 4 Mating time of resistant colony and susceptible colony

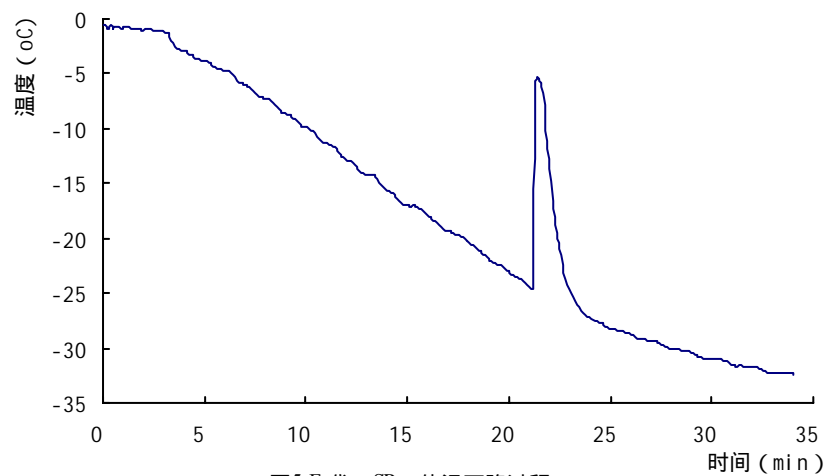


图5  $F_1$ 代 (SR) 体温下降过程  
Fig 5 Changing curve of body temperature of  $F_1$  (SR) colony

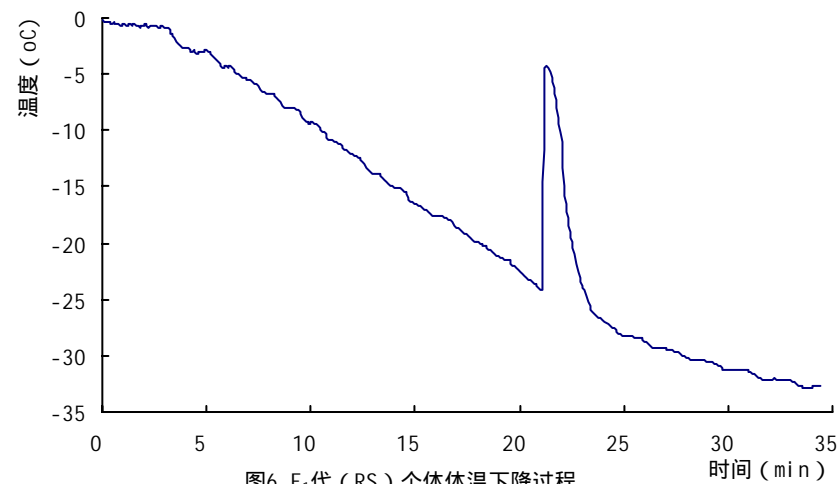


图6  $F_1$ 代 (RS) 个体体温下降过程  
Fig 6 Changing curve of body temperature of  $F_1$  (RS) colony

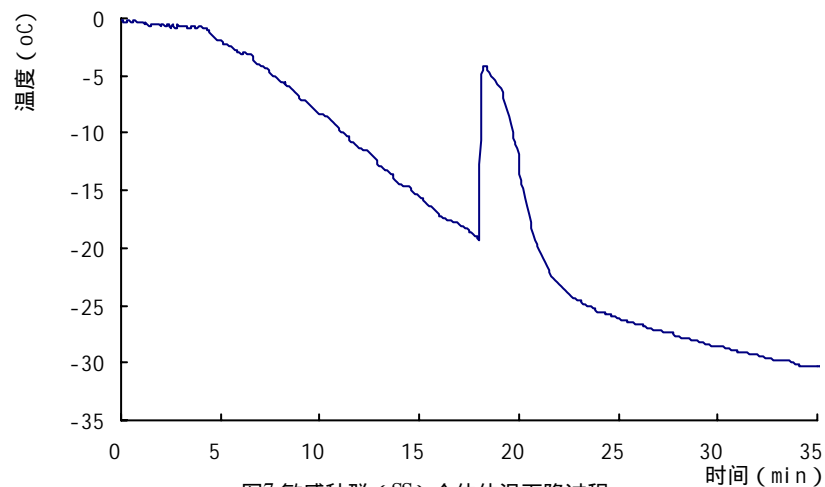


图7 敏感种群 (SS) 个体体温下降过程  
Fig 7 Changing curve of body temperature of susceptible colony

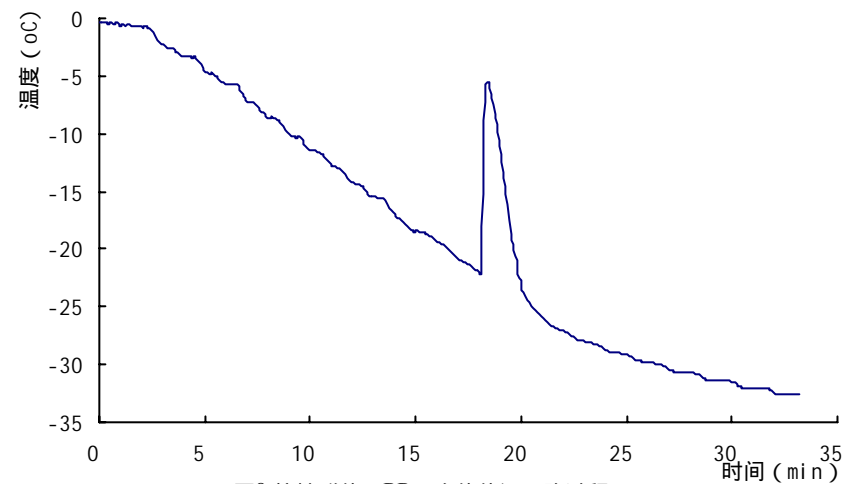


图8 抗性群体 (RR) 个体体温下降过程  
Fig 8 Changing curve of body temperature of resistant colony

表 9 抗性种群 (RR) 与敏感种群(SS)非滞育幼虫过冷却点与冰点比较  
Table 9 The super-cooling points and freezing points of non-diapaused larvae of resistant and susceptible colonies

种群	过冷却点(SCP)			结冰点(FP)		
	平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值
RR	-11.52 ± 0.53 <sup>¶</sup>	-7.14	-18.02	-2.84 ± 0.37 <sup>¶</sup>	-0.76	-8.48
SS	-11.39 ± 0.93 <sup>¶</sup>	-6.90	-18.81	-2.37 ± 0.34 <sup>¶</sup>	-0.55	-5.79

<sup>¶</sup> 同一列内平均数间 *t*-测验差异不显著 ( $t=-0.13$ ,  $df=39$ ,  $P=0.9008$ ;  $t=-0.88$ ,  $df=39$ ,  $P=0.3845$ )  
<sup>¶</sup> The means within a column were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) by *t*-test. ( $t=-0.13$ ,  $df=39$ ,  $P=0.9008$ ;  $t=-0.88$ ,  $df=39$ ,  $P=0.3845$ )

表 10 抗(RR) 感(SS)种群及其种群间杂交 F<sub>1</sub> 代(RS、SR)滞育幼虫过冷却点与冰点比较  
Table 10 the supercooling point and freezing point of diapaused larvae from resistant, susceptible, and F<sub>1</sub> colonies

亚洲玉米螟种群	过冷却点 ( )			结冰点 ( )		
	平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值
RR	-16.97 ± 0.44 a <sup>*</sup>	-6.34	-25.08	-3.49 ± 0.19	-0.59	-9.73
RS	-16.81 ± 0.49 a	-12.22	-22.16	-3.35 ± 0.26	-0.9	-6.54
SS	-18.08 ± 0.21 b	-12.65	-21.18	-4.21 ± 0.31	-1.59	-10.49
SR	-18.18 ± 0.31 b	-14.37	-22.48	-4.09 ± 0.41	-1.96	-12.75

<sup>\*</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ ) , (过冷却点,  $F=3.16$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0260$ ; 结冰点,  $F=2.12$ ;  $df=3,174$ ;  $P=0.0997$ )  
<sup>\*</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (Supercooling point,  $F=3.16$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0260$ ; freezing point,  $F=2.12$ ;  $df=3,174$ ;  $P=0.0997$ )

表 11 抗(RR) 感(SS)种群及其种群间杂交 F<sub>1</sub> 代(RS、SR)滞育幼虫过冷却点与冰点比较  
Table 11 Supercooling and freezing points of diapaused larvae from resistant, susceptible, and F<sub>1</sub> colonies

亚洲玉米螟种群	过冷却点 ( )			结冰点 ( )		
	平均数 ± SE	最大值	最小值	平均数 ± SE	最大值	最小值
RR	-18.34 ± 0.49 a <sup>*</sup>	-8.03	-23.23	-4.92 ± 0.34 ab <sup>*</sup>	-1.08	-11.62
RS	-19.91 ± 0.40 b	-14.63	-24.2	-4.26 ± 0.21 a	-2.26	-7.9
SS	-19.82 ± 0.32 b	-15.74	-24.22	-5.70 ± 0.40 bc	-1.82	-13.31
SR	-20.33 ± 0.35 b	-16.04	-24.62	-6.26 ± 0.34 c	-3.82	-14.25

<sup>\*</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ ) , (过冷却点,  $F=4.83$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0032$ ; 结冰点,  $F=6.94$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0002$ )  
<sup>\*</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (Supercooling point,  $F=4.83$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0032$ ; freezing point,  $F=6.94$ ;  $df=3,139$ ;  $P=0.0002$ )

2.4.2 抗性种群和敏感种群人工诱导滞育幼虫过冷却点的比较

抗性种群（RR）和敏感种群（SS）及其种群间杂交 F<sub>1</sub> 代（RS、SR）滞育幼虫的过冷却点之间存在显著差异。测定结果表明抗性种群及以抗性种群雌蛾与敏感种群雄蛾杂交的 F<sub>1</sub> 代滞育幼虫的过冷却点显著高于敏感种群及以敏感种群雌蛾与抗性种群雄蛾杂交的 F<sub>1</sub> 代滞育幼虫，而抗性种群和以抗性种群雌蛾与敏感种群雄蛾杂交的 F<sub>1</sub> 代及敏感种群和以敏感种群雌蛾与抗性种群雄蛾杂交的 F<sub>1</sub> 代之间没有显著性差异，各种群的结冰点之间差异不显著（表 10）。滞育幼虫经缓慢降温处理后的测定结果表明，抗性种群的过冷却点显著高于敏感种群及抗性种群间杂交 F<sub>1</sub> 代 1~2℃（表 11），各种群的结冰点间亦存在显著差异，以抗性种群过冷却点与结冰点间的温差最小，13.42℃，而其余各种群的过冷却点与结冰点间的温差大于 14℃。这些结果说明，抗性种群的抗寒能力比敏感种群有所下降。

2.4.3 虫重与过冷却点的相关分析

从表 12 中的数据可以看出，所有种群幼虫体重与其过冷却点之间没有显著性相关关系，说明个体大小与其抗寒能力没有直接的联系。因此不会因为抗性个体老熟幼虫比敏感个体的体重小而影响其正常越冬。

表 12 亚洲玉米螟 4 个种群间虫重与过冷却点的相关分析  
Table 12 Correlation between the supercooling point and larval weight of 4 Asian corn borer colonies

亚洲玉米螟种群	虫重（mg）	过冷却点（℃）	相关系数(r)	Prob> R
RR	43.49 ± 1.64	-18.34 ± 0.49	0.1066	0.5422
SS	47.77 ± 1.38	-19.82 ± 0.32	0.1813	0.2972
RS	59.16 ± 2.49	-19.91 ± 0.40	-0.0669	0.7072
SR	50.99 ± 1.58	-20.33 ± 0.35	-0.2808	0.1022

3. 讨论

经过室内人工汰选的方法，已有 10 多种鳞翅目昆虫已经对 *Bt* 产生了抗性，然而小菜蛾，*Plutella xylostella* (L.)是目前唯一发现的由于田间长期使用 *Bt* 制剂而对 *Bt* 产生抗性的害虫（Tabashnik 等 1990，Shelton 等 1993）。采自美国堪萨斯州的欧洲玉米螟种群经过室内人工汰选 16~21 代后，对 Dipel ES（一种由 *Bacillus thuringiensis* sub. *kurstaki* 生产的含有 *Cry1Aa*，*Cry1Ab*，*Cry1Ac*，*Cry2A*，*Cry2B* 等多种蛋白的商品制剂）产生了 60~70 倍以上的抗性（Huang 等 1997，1999a，1999b，2002）。然而，尽管这一抗性种群在已商品化种植的转 *Bt* 基因 MON810、*Bt11*、*Bt176* 和 DBT418 等玉米心叶（播种后 35~42 d）期比敏感种群能造成更严重的食叶级别（如 4 级，1~9 级标准），平均每株蛀孔<0.5 个(长度<1cm)的危害，但除仅在 DBT418 玉米上有个别存活 5 龄幼虫外，在其它品种上均未发现有存活的幼虫（Huang 等 2002）。即 Dipel ES 抗性欧洲玉米螟的抗性水平还达不到能在商业化的 *Bt* 玉米（包括 DBT418）心叶期上建立繁殖种群。本研究结果表明，经人工室内汰选 27 代的亚洲玉米螟种群，尽管对 *Cry1Ab* 蛋白的抗性提高了 107 倍，在转 *Cry1Ab* 基因 MON810 玉米心叶上的存活天数明显增加，但这一种群的抗性水平还未达到能在心叶期完成

世代发育。

欧、亚两种玉米螟一般在玉米整个生育期发生危害 1~2 个世代, 心叶期世代, 初孵幼虫主要取食危害玉米未展开的幼嫩心叶, 大龄幼虫( 4~5 龄 ) 转移蛀茎( Mason 等 1996, 周大荣等 1995 )。穗期世代, 初孵幼虫主要取食叶腋处沉积的花粉、叶片鞘舌处组织( sheath-collar )、幼嫩苞叶和新鲜的花丝等, 但穗期世代欧、亚玉米螟对这些组织的选择程度不同。欧洲玉米螟初孵幼虫大多喜欢在叶片鞘舌处组织上定居取食( Guthrie 等 1980 ), 而亚洲玉米螟初孵幼虫主要在新鲜的花丝上取食( He 等 2000 ), 因此玉米对亚洲玉米螟穗期世代的抗性实际上主要是指花丝抗性。

虽然目前开发的转 *Bt* 基因玉米心叶期都有很高的抗虫性, 然而由于各研发公司所用的启动子以及 *Bt* 毒蛋白目的基因插入位点不同, 植株体内 *Bt* 杀虫蛋白的表达存在时空差异, 因而对害虫的控制作用表现出随时间和空间上的动态变化, 如 MON810 和 *Bt*11 对西南玉米螟( *Diatraea grandiosella* Dyar ), 而 176 的防效仅有 19%( Koziel 等 1993, Amstrong 等 1995, Williams 等 1997, 1998, Archer 等 2000, 2001 )。田间及室内生测结果表明 MON810 玉米花丝对敏感的亚洲玉米螟具有很高的杀虫活性( He 等 2003 )。然而从本试验的结果分析, 虽然在 MON810 玉米幼嫩心叶上不能完成世代发育的 *Cry*1Ab 抗性亚洲玉米螟, 但是在新鲜的花丝上能完成世代, 说明这一抗性种群可能在 MON810 玉米穗期建立起种群。

已报道的 MON810 玉米植株组织中 *Cry*1Ab 蛋白表达量为 9.35 $\mu$ g/g 鲜重叶片、0.31 $\mu$ g/g 鲜雌穗组织、0.09 $\mu$ g/g 花粉( AGBIOS 2001 )。本实验用酶联免疫法测定 MON810 玉米花丝中 *Bt* 杀虫蛋白的表达量为 585.5ng/g 鲜花丝重。这说明 MON810 玉米 *Bt* 杀虫蛋白在花丝中的表达量显著低于心叶组织。杀虫蛋白在植株不同部位的差异表达, 会给抗性个体在低表达组织如花丝和花粉上提供存活机会, 这也可能对玉米螟不同龄期, 甚至同一龄期的不同发育阶段造成不同的选择压, 从而加速抗性的产生。

本实验结果分析说明通过人工汰选的抗性亚洲玉米螟能够很快的适应表达 *Cry*1Ab 转基因玉米, 因而对亚洲玉米螟抗性种群生物学以及抗性的遗传规律的研究就显得非常迫切, 以便利用、改进或者提出合理有效的抗性治理策略, 从而达到延缓抗性的产生目的, 使转 *Cry*1Ab 的抗亚洲玉米螟作物得到更好的利用。

避免害虫对转基因作物产生抗性的高剂量—庇护所策略是目前国际上公认的最具可行性的抗性治理策略。其理论基础的前题假设条件之一就是抗性个体与敏感个体间能实现随机交尾( Alstad 和 Andow 1995 )。只有抗、感个体间进行随机交尾, 使得庇护所产生大量敏感个体与转 *Bt* 基因作物田残存下来的极少数隐性纯合等位基因的抗性个体进行交尾, 从而产生带有一个隐性抗性等位基因的杂合敏感后代, 使其不能在转 *Bt* 基因抗虫作物上存活, 从而达到延缓害虫抗性产生。然而, 由于害虫对 *Bt* 产生适应性的同时, 本身亦会在生物学和生理上发生一些适应性的改变, 如抗性种群的个体发育一般比敏感个体小。而这些改变常常会影响到抗、感种群间的行为改变。有研究报道, 对 *Bt* 产生抗性的小菜蛾由于个体小, 与敏感个体竞争交尾的吸引力差( Groeters 等 1993 )。本研究的结果指出, 抗性亚洲玉米螟与敏感个体在同一种群密度下具有相同的交尾竞争力, 且抗性雌蛾比敏感雌蛾对抗性雄蛾更具有吸引力, 因此当环境中抗性雄蛾的种群密度相对高时, 发生抗性种群内交尾的概率将会增加, 即产生抗性纯合基因后代的频率高, 因而增加亚洲玉米螟对 *Bt* 玉米产生抗性的风险。由于本研究仅测试了相同种群密度下的一对一竞争力, 因此进一步工作应对不同抗、感种群密度下的交尾竞争力作深入研究, 这将有助于科学地

制定庇护所的大小。

影响抗、感种群间实现随机交尾的时间因素包括世代发生期及抗、感种群交尾时间日活动节律的同步性改变。本研究结果指出,亚洲玉米螟抗、感种群内及种群间交尾时间日活动节律基本一致。因此,当抗、感种群世代发生期一致时,成虫交尾活动日节律不会影响抗、感种群间的随机交尾。

由于亚洲玉米螟具有多次交尾的习性,在观察到的第二次交尾与第一次交尾不一致的百分率为75%,也就是说二次交尾具有选择非同一配偶的倾向,这对于种群的维持和发展有一定的意义,在害虫治理和抗性治理的时候也应当给予重视。这也提醒我们,应对亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 产生抗性的种群和敏感种群之间交尾的成功率进行进一步的研究。

由于栖息环境的多样性,昆虫在长期的进化中形成了多种多样的抗寒策略 (Sømme 1999, 2000),亚洲玉米螟在我国分布广泛,并能在当地顺利越冬,是多种抗寒策略共同作用的结果。据任明道 (1979) 报道亚洲玉米螟越冬幼虫具有很强的耐寒能力,可在-20 ~ -80 低温下生命仍能继续维持的能力。然而,对我国东北吉林省一、二化性 (年发生一、二代) 生物种群的抗旱能力研究表明,一化性种群的抗寒能力强,过冷却点显著低于二化性地理种群 (鲁新 1997)。本项研究结果指出,抗性种群的过冷却点高于敏感种群及抗感杂交后代,杂交后代与敏感种群间没有差异,即抗性种群的抗寒能力略有下降。应当指出的是,抗性种群的过冷却点仅比敏感种群高1~2℃,这对其在田间安全越冬可能不会造成很大的影响。本研究结果还表明,虽然抗性种群幼虫个体小,但过冷却点与虫重并没有显著相关,即抗性种群虫体重的改变,不会影响其安全越冬。

从两次对滞育后幼虫的处理来看,第二批滞育幼虫比第一批滞育幼虫的过冷却点平均降低了1.82℃。Sjursen(2000)报道,一种螨类的过冷却点在1月份和7月份分别为-35.3℃、-9.4℃,与当地气温(1月份-35℃,7月份55℃)呈显著相关。这说明昆虫抗寒能力是与环境互作的结果,昆虫为环境的改变做生理上的准备以适应环境,同时环境的改变诱导昆虫体内的生理生化变化或其他调节方式的发生。抗冻物质能促使昆虫维持过冷却状态,在一些昆虫中有抗冻物质时其过冷却点可达-40℃甚至更低,而没有抗冻物质时过冷却点仅达-12℃ (Zachariassen 1985)。低温和光照是抗冻物质形成的诱导因素,昆虫在低温下往往产生多种保护剂,从而增加体内束缚水的含量,或直接与酶及其他蛋白相互作用起到保护生物系统的作用(景晓红 2002)。

## 第三章 抗性遗传规律研究

有效的抗性治理对策必须建立在充分了解害虫抗性遗传规律的基础之上。表达不同杀虫蛋白的转基因作物轮作的理论基础就是当选择压去掉后,抗性亦消失,同时还应考虑交互抗性的产生。有研究表明当选择压去除后,害虫抗性是不稳定的。如烟芽夜蛾对 *Cry1Ab* 的抗性在去掉选择压后,第 5 代的抗性从 69 倍下降到 13 倍,而后有保持稳定的趋势(Sim 等 1991)。*Spodoptera littoralis* 的一抗性种群(抗性大于 500 倍)在去掉 *Cry1C* 的选择压后第 1 代的抗性下降,随后的 5 代中保持相对稳定,而后的 2 代又下降(Muller-Cohn 等 1996)。欧洲玉米螟一室内汰选种群对 *Cry1Ac* 的抗性也不稳定(Bolin 等 1999)。然而并非所有的抗性在去掉选择压后都是不稳定的,如印度谷螟(*Plodia interpunctella*)的 343-R 种群对 Dipel 的抗性在未处理的饲料上饲养 29 代其抗性水平未明显下降(McGaughey 等 1988)。小菜蛾的三个抗性种群,在去掉选择压后仍然保持高而稳定的抗性水平(Liu 等 1996, Perez 等 1997, Tabashnik 等 1995)。多基因策略是避免单一选择压力胁迫害虫产生抗性。可采取的方法有混种转不同单一 *Bt* 基因的植物或一种作物导入两种或多种 *Bt* 基因。交互抗性的产生会使这一策略失去效用。室内汰选实验表明不同的昆虫对不同的杀虫晶体蛋白可能产生不同的交互抗性。用 *Cry1Ac* 对烟芽夜蛾进行汰选获得了超过一万倍的抗性(Gould 等 1995)这一种群(YHD2)对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Aa* 有高的交互抗性,而对 *Cry1Ca* 和 *Cry1Ba* 几乎没有抗性。用 *Cry1Ca* 汰选的另一烟芽夜蛾种群对 *Cry1Ac* 产生了 50 倍的抗性,其对 *Cry1Ab* 和 *Cry2Aa* 的抗性分别为 13 倍和 53 倍(Gould 等 1992)这一种群的抗性还扩及到 *Cry1Aa*、*Cry1Ba* 和 *Cry1Ca*。用 *Cry1Ca* 对甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的一个种群进行汰选,对 *Cry1Ca* 产生了 850 倍的抗性,并对 *Cry1Ab*、*Cry2Aa*、*Cry9Ca* 产生了交互抗性(Moar 等 1995)。研究表明不同的昆虫对不同的杀虫晶体蛋白可能产生不同的交互抗性,应用这一策略应充分的考虑这一点。高剂量/避护所策略由 Georgiou 和 Taylor (1977)提出,Alstad 和 Andow (1995)发展,是目前比较流行的用于治理害虫对转基因作物产生抗性的策略。这一策略基于一个假设:抗性基因频率非常低,且呈隐性遗传,敏感个体与抗性个体能随机交配,转基因作物的杀虫蛋白表大量能杀死所有纯合和杂合敏感个体。虽然报道的绝大多数昆虫对 *Bt* 的抗性受隐性基因控制(Metz 等 1995, Tang 等 1999, Zhao 等 2000),然而 Huang 等(1999)报道欧洲玉米螟对一种 *Bt* 制剂 Dipel ES 的抗性呈不完全显性常染色体遗传。

亚洲玉米螟是我国玉米上的重大害虫,80 年代以来又发展成为长江流域棉区的重要棉花害虫,而目前的转基因抗虫作物主要是转 *Cry1Ab* 基因抗虫玉米和转 *Cry1Ac* 基因抗虫棉。在我国的玉米和棉花的混种区,明确亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 的交互抗性关系十分必要。因此,研究亚洲玉米螟对 *Bt* 蛋白抗性的遗传规律,建立亚洲玉米螟对转基因抗虫玉米的抗性评价技术体系,对于完善现存的抗性治理方法进而设计新的抗性治理策略,使转 *Bt* 基因抗虫作物在生产上得以长期的可持续利用具有重要意义。

### 1. 材料与方法

#### 1.1 实验材料

*Bt* 蛋白:*Cry1Ab* 杀虫蛋白,含量为 3.4 mg/mL,由孟山都公司提供。*Cry1Ac* 杀虫蛋白,含

量为 3.25mg/mL，中国农科院植保所生物技术组提供。

*Bt* 玉米为表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的保丰玉米 MON810 及其非转基因受体玉米，由孟山都公司提供，分期播种在中国农业科学院植物保护研究所隔离试验田。常规栽培管理，播后苗前施用阿特拉津除草剂，之后整个生育期不施任何农药。在玉米植株生长发育至穗期，花丝未抽出之前，对雌穗进行套袋隔离。

*Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟种群 (RR)：本实验室采自河北省衡水市的亚洲玉米螟自然种群，在室内以饲料混合法进行抗性汰选。即在亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料 (宋彦英等 1999) 中加入一定量的 *Cry1Ab* 杀虫蛋白，进行幼虫全生育期汰选。起始浓度为 2.5ng/g (*Cry1Ab*/饲料)，筛选压为 40~70%。隔 1 或数代分离种群，浓度加倍继续汰选的方法，汰选至 27 代的亚洲玉米螟种群对 *Cry1Ab* 的抗性达到了 100 多倍。并在恒定剂量 100ng/g (*Cry1Ab*/饲料) 下连续饲养，作为本研究的供试抗性种群。

将 *Cry1Ab* 抗性种群分出一部分在无蛋白普通饲料上连续饲养，获得的无蛋白饲养的抗性种群标记为 npr1、npr2 和 npr3。

*Cry1Ac* 抗性亚洲玉米螟种群 (Rc)：本实验室采自河北省衡水市的亚洲玉米螟自然种群，在室内以饲料掺入 *Cry1Ac* 的方法进行抗性汰选，起始浓度为 2.5ng/g (*Cry1Ab*/饲料)，筛选压为 40~70%。隔 1 或数代分离种群，浓度加倍继续汰选。

亚洲玉米螟 *Bt* 蛋白敏感种群 (SS)：为在室内人工饲料上连续饲养多代的实验室种群。

抗、感杂交种群(RS)：抗性种群 (RR) 和敏感种群 (SS) 在羽化之前，按蛹的外部形态区分雌、雄蛹，并按抗性种群雌蛹与敏感种群的雄、抗性种群的雄蛹与敏感种群的雌蛹组合分别放入两个羽化笼，然后放入 24℃、光周期 L:D 为 16:8 h、相对湿度 80% 以上的养虫室内饲养，羽化、产卵，收集卵块，获得抗、感种群间杂交  $F_1$  代种群 SR ( $\text{♀}_{RR} \times \text{♂}_{SS}$ ) 和 RS ( $\text{♀}_{SS} \times \text{♂}_{RR}$ )。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 毒力回归曲线测定

将 *Cry1Ab* 或 *Cry1Ac* 杀虫蛋白按一定的浓度梯度加入亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料中，本实验中 *Cry1Ab* 的浓度梯度为 0.01  $\mu\text{g/g}$ 、0.1  $\mu\text{g/g}$ 、1  $\mu\text{g/g}$ 、10  $\mu\text{g/g}$ 、20  $\mu\text{g/g}$ 、40  $\mu\text{g/g}$ 、80  $\mu\text{g/g}$ ，然后将测试人工饲料分装入 48 孔细胞培养板，每孔接 1 头初孵待测试种群的幼虫，每一板为一个处理，每个处理重复 3 次，即每浓度测试 144 头幼虫。放入温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相对湿度  $70\% \pm 10\%$ ，光周期为 16:8 养虫室培养，一周后调查存活数，并称重。

### 1.2.2 *Bt* 玉米离体生测

田间采集新鲜的 MON810 玉米花丝，对 4 个种群 (SS、RR、SR、RS) 进行生测，生测方法同前，比较存活率和校正死亡率。

### 1.2.3 不同虫态玉米螟体内 *Cry1Ab* 蛋白含量测定

将抗性种群和敏感种群的 5 龄幼虫、蛹 (分辨雌雄) 在液氮中处理 30 分钟，然后在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱冻存，用 *Bt-Cry1Ab* ELISA 试剂盒测 *Bt* 蛋白在玉米螟体内的含量，具体方法见第二章花丝中蛋白的测定。



1.3 数据统计分析

1.3.1 毒力回归曲线用 SAS 统计软件 PROC PROBIT 进行分析，各种群间  $LC_{50}$  和  $LC_{90}$  进行  $\mu$  测验比较，回归式斜率 (b) 用  $t$  测验进行比较；

1.3.2 存活率和校正死亡率用 SAS 统计软件中 PROC ANOVA 进行统计分析。

1.3.3 显性水平的计算

据 Stone (1968)的计算公式：

$$D = \frac{2\log LC_{RS} - \log LC_{RR} - \log LC_{SS}}{\log LC_{RR} - \log LC_{SS}}$$

其中， $LC_{RR}$ 、 $LC_{SS}$ 、 $LC_{RS}$  分别表示抗性种群、敏感种群及其杂交  $F_1$  代的致死浓度，D 值从 -1 到 1，-1 表示完全隐性，1 表示完全显性，0~1 之间为不完全显性，-1~0 之间表示为不完全隐性。为了使其值在经典的 0-1 范围内，Bourguet 等提出了  $D_{LC}$  的计算公式： $D_{LC} = (\log LC_{RS} - \log LC_S) / (\log LC_R - \log LC_S)$ ，其中，Liu 和 Tabashnik 提出：

$$D_{LC} = \frac{D+1}{2}$$

1.3.4 有效显性水平的计算

据 Roush 和 McKenzie (1987)的计算公式：

$$D_{ML} = \frac{ML_{RS} - ML_{SS}}{ML_{RR} - ML_{SS}}$$

其中， $ML_{RR}$ 、 $ML_{SS}$ 、 $ML_{RS}$  分别表示以给定剂量下的抗性种群、敏感种群及其杂交  $F_1$  代的死亡水平， $D_{ML}$  的值从 0 到 1，0 表示完全隐性，1 表示完全显性。

2. 结果与分析

2.1 抗性水平及其遗传方式

2.1.1 毒力回归曲线比较

表 13 Cry1Ab 蛋白对抗、感种群及其杂交  $F_1$  代的  $LC_{50}$   
Table 13  $LC_{50}$ s of Cry1Ab protein to RR, SS, RS, and SR colonies

亚洲玉米螟种群	$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	95%置信区间		抗性倍数	D 值	$D_{LC}$ 值
		下限	上限			
SS	0.3164	0.1173	0.7306			
SR	0.8981	0.2477	2.6008	2.8	-0.5533	0.2234
RS	5.9172	2.2436	12.4290	18.7	0.2539	0.6270
RR	33.8001	30.0708	38.1966	106.8		

\* RR—抗性种群，SS—敏感种群，RS、SR—抗感杂交  $F_1$  代；

\* RR—resistant colony, SS—susceptible colony, RS、SR— $F_1$  from the reciprocal crosses between resistant and susceptible colony.

比较抗性种群的致死中浓度（ $LC_{50}=33.8001\mu\text{g/g}$ ）与敏感种群的致死中浓度（ $LC_{50}=0.3164\mu\text{g/g}$ ），抗性种群比敏感种群对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的抗性提高约 106.8 倍（表 13）。以致死中浓度为衡量标准，据 Stone (1964) 计算 D 值的公式，计得以敏感群系为母本的  $F_1$ （SR）的 D 值为 -0.5533，应为不完全隐性遗传，而抗性种群做母本的  $F_1$ （RS）的 D 值为 0.2539，为不完全显性遗传。据 Liu 和 Tabashnik 提出： $D_{LC}=(D+1)/2$ ，计得  $D_{LC}$  分别为 0.2234 和 0.6270。这说明亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 的抗性遗传受到母性的影响。

表 14 *Cry1Ab* 蛋白对抗、感种群及其杂交  $F_1$  代的  $LC_{90}$   
Table 14  $LC_{90}$ s of *Cry1Ab* protein to RR, SS, RS, and SR colonies

亚洲玉米螟种群	$LC_{90}$ （ $\mu\text{g/g}$ ）	95%置信区间		抗性倍数	D 值	$D_{LC}$ 值
		下限	上限			
SS	5.9786	2.3648	24.3062			
SR	8.5514	2.9073	67.8324	1.4	-0.7421	0.1290
RS	69.7056	29.4362	374.5276	11.7	0.7702	0.8851
RR	95.8892	78.6333	125.2778	16.0		

从  $LC_{90}$  的值来看（表 14），敏感种群为母本的  $F_1$ （SR）的 D 值为 -0.7421，表现为不完全隐性遗传；而抗性种群为母本的  $F_1$ （RS）的 D 值为 0.7702，表现为不完全显性遗传。同时也说明在较高的致死浓度下，抗性种群和敏感种群杂交  $F_1$  表现为强烈的母性遗传。如图 9 所示，随着杀虫蛋白剂量的增加导致死亡率提高，其  $F_1$  代表现的抗性水平受母性的影响也越来越强烈。

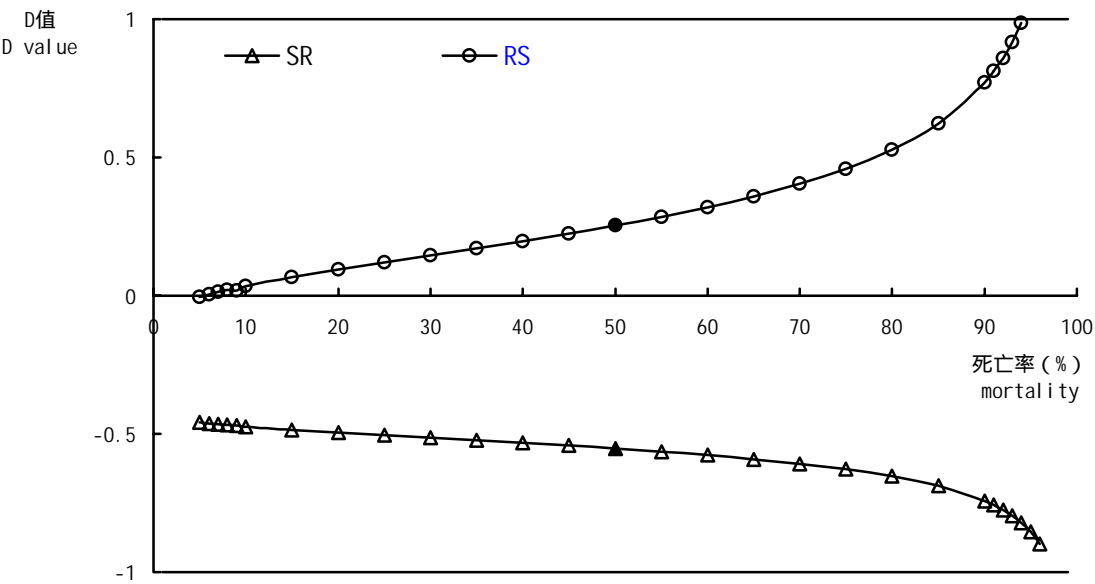


图9 杂交 $F_1$ 代死亡率与D值的关系  
Fig.9 Relationship between 2  $F_1$  inter populations and D values

表 15 四个种群之间对数半数致死剂量的 $\mu$ 检验  
Table 15  $\mu$  test for  $LC_{50}$ s of *Cry1Ab* protein to RR, SS, RS, and SR colonies

$\mu$	SS	SR	RS	RR
P				
SS	-	1.3730	4.5829	9.9277
SR	0.1698	-	2.5411	6.0173
RS	0.0000	0.0111	-	3.9518
RR	0.0000	0.0000	0.0001	-
$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	0.3164	0.8981	5.9172	33.8001

从 *Cry1Ab* 对四个种群的对数半数致死剂量的 U 检验结果 (表 15) 可以看出: 与 SS 种群 ( $LC_{50}=0.3164\mu\text{g/g}$ ) 相比, SR 种群( $LC_{50}=0.8981\mu\text{g/g}$ )和 SS 种群之间对 *Cry1Ab* 的半致死剂量没有显著差异, 说明以对 *Cry1Ab* 敏感的种群作为母本与抗性种群杂交获得的  $F_1$  代对 *Cry1Ab* 仍然是敏感的。而 RR 种群 ( $LC_{50}=33.8001\mu\text{g/g}$ ) 和 RS 种群 ( $LC_{50}=5.9172\mu\text{g/g}$ ) 的半致死剂量非常显著的高于 SS 种群; R 种群的半致死剂量也非常显著的高于 RS 种群; RS 种群的半致死剂量虽然显著的高于 SR 种群, 但其差异还未达及显著的水平。以对 *Cry1Ab* 产生抗性的种群作为母本与敏感种群杂交获得的  $F_1$  代对 *Cry1Ab* 表现为一定程度的抗性, 这种抗性已经显著的高于敏感种群, 但这种差异还未达及显著的水平, 而且这种抗性水平也及显著的低于抗性抗性种群的抗性水平。从  $LC_{90}$  的 U 检验结果 (表 16) 来看, 亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 的抗性遗传表现为强烈的母性影响, SR 种群 ( $LC_{90}=8.5514\mu\text{g/g}$ ) 和 SS 种群 ( $LC_{90}=5.9786\mu\text{g/g}$ ) 之间差异不显著, RS 种群 ( $LC_{90}=69.7056\mu\text{g/g}$ ) 和 RR 种群 ( $LC_{90}=95.8892\mu\text{g/g}$ ) 之间差异不显著, 但是 SR、SS 和 RS、RR 种群间的差异已达及显著。

表 16 四个种群之间对数  $LC_{90}$  的 $\mu$ 检验  
Table 16  $\mu$  test for  $LC_{90}$ s of *Cry1Ab* protein to RR, SS, RS, and SR colonies

$\mu$	SS	SR	RS	RR
P				
SS	-	1.4240	2.7913	4.5783
SR	0.1544	-	4.1406	6.5048
RS	0.0052	0.0000	-	0.4835
RR	0.0000	0.0000	0.6288	-
$LC_{90}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	5.9786	8.5514	69.7056	95.8892

表 17 四个种群之间毒力回归斜率的  $t$  测验  
Table 17  $t$ -test of slopes among dose-mortality curves of RR, SS, RS, and SR colonies

$t$	SS	SR	RS	RR
P				
SS	-	1.1552	0.8380	6.6056
SR	0.2480	-	0.3704	4.4496
RS	0.4020	0.7111	-	5.1763
RR	0.0000	0.0000	0.0000	-
斜率(b)	1.0040	1.3094	1.1964	2.8300

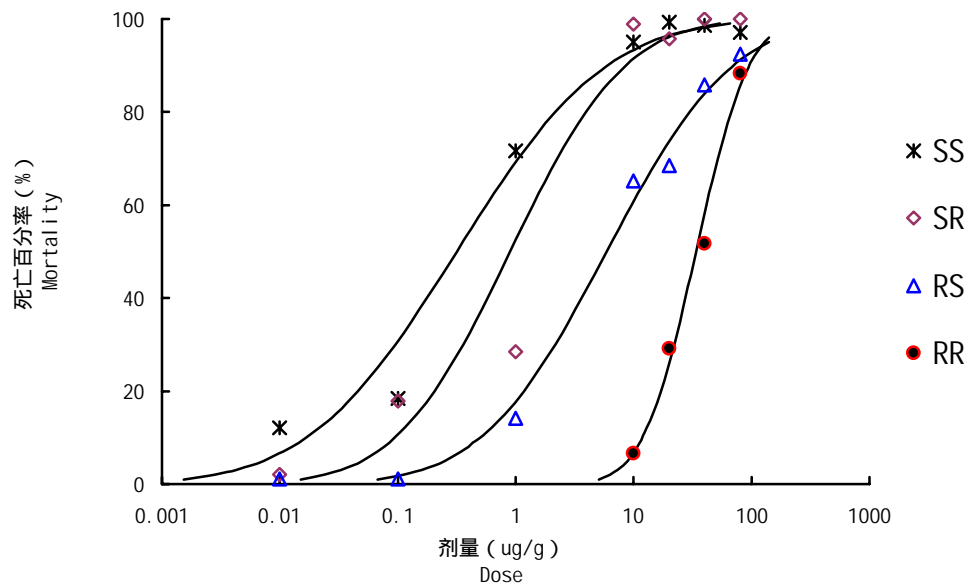


图10 抗感群体及其F<sub>1</sub>代致死中浓度曲线比较  
Fig.10 Dose-mortality curves of RR,SS, RS and SR colonies

四个种群毒力回归斜率的 T 测验结果（表 17）表明 RR 种群的斜率非常显著的高于其他三个种群，而这三个种群之间的回归斜率差异不显著。这说明抗性种群的抗性水平比较整齐，而敏感种群及其与抗性种群杂交的 F<sub>1</sub> 代虽然 LC<sub>50</sub> 比较低，但仍含有较多的抗性个体，具有发展成为抗性种群的潜能。

2.1.2 MON810 玉米花丝离体生测分析

表 18 抗、感种群及其杂交 F<sub>1</sub> 代在 MON810 玉米花丝上的存活率  
Table 18 Survival of RR, SS, RS, and SR colonies fed on the silk of MON810

玉米品种	亚洲玉米螟种群*	平均存活率 ( % ) †		
		d3	d5	d7
非 <i>Bt</i> 玉米	RR	98.6 ± 1.4 a	98.6 ± 1.4 a	95.8 ± 2.4 a
非 <i>Bt</i> 玉米	RS	98.6 ± 1.4 a	94.4 ± 1.4 ab	94.4 ± 2.8 a
非 <i>Bt</i> 玉米	SR	93.1 ± 2.8 a	93.1 ± 2.8 b	91.7 ± 2.4 a
非 <i>Bt</i> 玉米	SS	100.0 ± 0.0 a	98.6 ± 1.4 a	94.4 ± 1.4 a
<i>Bt</i> 玉米	RR	27.8 ± 3.7 b	9.7 ± 1.4 c	6.9 ± 1.4 b
<i>Bt</i> 玉米	RS	2.8 ± 2.8 c	0	
<i>Bt</i> 玉米	SR	6.9 ± 3.7 c	0	
<i>Bt</i> 玉米	SS	1.4 ± 1.4 c	0	

\* RR—抗性种群，SS—敏感种群，RS、SR—抗感杂交 F<sub>1</sub> 代；  
\* RR—resistant colony, SS—susceptible colony,RS、SR—F<sub>1</sub> from the reciprical crosses between resistant and susceptible colony  
† 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( *P*>0.05 )  
† The means within a column followed with same letter were not significantly different (*P*≥0.05) according to *t*-test (LSD) (d3: *F*=377.14; *df*=7,16; *P*<0.0001; d5: *F*=1308.86; *df*=7,16; *P*<0.0001; d7: *F*=844.57; *df*=7,16; *P*<0.0001)

用 MON810 花丝对抗性种群、敏感种群及其杂交 F<sub>1</sub> 代进行室内生测，实验结果（表 18）表明：四个种群在 MON810 敏感花丝上七天的存活率都大于 90%，而且第三天、第五天、第七天的存活率都无显著差异。但是杂合种群和敏感种群一样，不能在 MON810 花丝上存活，而且五天之内全部死亡。据 Roush 和 McKenzie (1987)的计算公式  $D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$  其中 ML 为死亡水平，DML 的值从 0 到 1（0：完全隐性，1：完全显性）。计得第三天、第五天、第七天的有效显性水平见表 19，如果以五天或七天的死亡率为标准，则抗性种群的有效显性水平为完全隐性。

表 19 抗、感种群及其杂交 F<sub>1</sub> 代在 MON810 玉米花丝上的校正死亡率和 D<sub>ML</sub> 值

Table 19 D<sub>ML</sub> Value of F<sub>1</sub> from resistant strain and susceptible strain reciprocal crosses

种群*	d3		d5		d7	
	校正死亡率 (%)	D <sub>ML</sub>	校正死亡率 (%)	D <sub>ML</sub>	校正死亡率 (%)	D <sub>ML</sub>
SS	98.9	0	100	0	100	0
SR	92.5	0.24	100	0	100	0
RS	97.2	0.06	100	0	100	0
RR	71.8	1	90.1	1	92.8	1

\* RR—抗性种群，SS—敏感种群，RS、SR—抗、感杂交 F<sub>1</sub> 代；

\* RR—resistant colony, SS—susceptible colony, RS、SR—F<sub>1</sub> from the reciprocal crosses between resistant and susceptible colonies

2.1.3 不同虫态中 Cry1Ab 蛋白的残留

总蛋白标准曲线： $y_T = 0.0203x^{1.0348} \pm 0.0007 \quad r = 0.9991$

Bt 蛋白曲线： $y_{Bt} = 4.3016x^{1.7261} \pm 0.8005 \quad r = 0.8295$

以 Cry1Ab 掺入人工饲料的方法汰选的亚洲玉米螟抗性个体不同虫态中的 Cry1Ab 蛋白的残留量差异显著，幼虫中残留量（25.06ng/g）最多，雌蛹重中残留（4.19ng/g）最少显著低于雄蛹中的残留量（15.25ng/g）（图 11）。这说明雌蛹可能存在着某种生理生化的机制，能使大大的减少杀虫蛋白在体内的残留。如果这种杀虫蛋白的残留量的减少与其抗性的产生一致，那么这一结果也说明其抗性的产生与发展受到母性的影响。

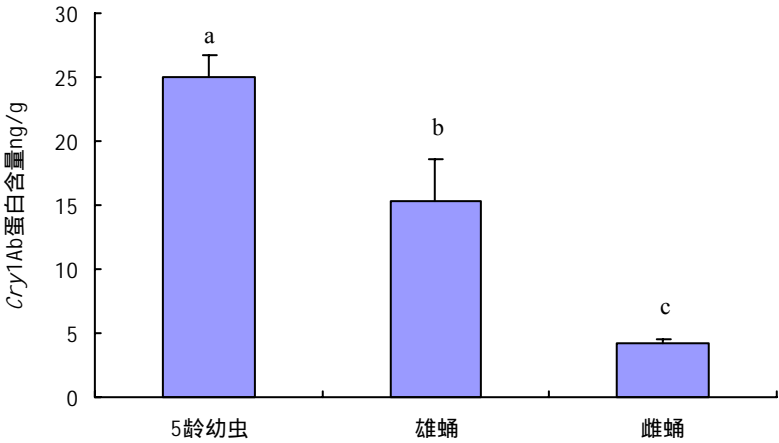


图11 Cry 1Ab抗性亚洲玉米螟种群体内蛋白残留量  
Fig. 11 Quantity of Cry 1Ab protein in resistant ACB

2.2 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的交互抗性研究

2.2.1 毒力回归曲线分析

如表 20 中所示，从 LC<sub>50</sub> 的水平上来看，对 Cry1Ab 产生了约 106.8 倍抗性的 Cry1Ab 汰选的抗性种群，对 Cry1Ac 的敏感度下降了 10.4 多倍。对 Cry1Ac 产生了 14.0 倍的 Cry1Ac 汰选的种群，对 Cry1Ab 的抗性也增加了 5.9 倍。这说明亚洲玉米螟对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 存在着很大的交互抗性。从 LC<sub>90</sub> 的水平上来看（表 21），这种交互抗性表现得更为强烈，以 Cry1Ab 的抗性种群对 Cry1Ab 的抗性倍数为 16.0，对 Cry1Ac 产生了 8.6 倍的抗性，而这已经高于了目前以 Cry1Ac 汰选的抗性种群对 Cry1Ac 的抗性倍数（6.0）。同时 Cry1Ac 抗性种群也对 Cry1Ab 的敏感度降低了 1.7 倍。

表 20 Cry1Ab、Cry1Ac 杀虫蛋白对不同抗性种群的 LC<sub>50</sub> 及抗性倍数  
Table 20 LC<sub>50</sub>s of Cry1Ab, Cry1Ac proteins to Cry1Ab and Cry1Ac selected colonies

亚洲玉米螟种群*	蛋白	LC <sub>50</sub> (μg/g)	95%置信区间		抗性倍数	
			下限	上限	Cry1Ab	Cry1Ac
SS	Cry1Ab	0.3164	0.1173	0.7306		
Cry1Ac RR	Cry1Ab	1.8560	0.8740	3.5917	5.9	
Cry1Ab RR	Cry1Ab	33.8001	30.0708	38.1966	106.8	
SS	Cry1Ac	0.6894	0.5234	0.8948		
Cry1Ab RR	Cry1Ac	7.1796	3.6328	12.8601		10.4
Cry1Ac RR	Cry1Ac	9.6746	6.3982	14.2269		14.0

\* Cry1Ac RR: Cry1Ac 抗性种群, Cry1Ab RR: Cry1Ab 抗性种群, SS: 敏感种群

\* Cry1Ac RR: Cry1Ab resistant colony; Cry1Ab RR: Cry1Ac resistant colony; and SS: susceptible colony

表 21 Cry1Ab、Cry1Ac 蛋白对不同抗性种群的 LC<sub>90</sub> 及抗性倍数  
Table 21 LC<sub>90</sub>s of Cry1Ab, Cry1Ac proteins to Cry1Ab and Cry1Ac selected colonies

亚洲玉米螟种群	蛋白	LC <sub>90</sub> (μg/g)	95%置信区间		抗性倍数	
			下限	上限	Cry1Ab	Cry1Ac
SS	Cry1Ab	5.9786	2.3648	24.3062		
Cry1Ac RR	Cry1Ab	9.8671	4.8366	41.5874	1.7	
Cry1Ab RR	Cry1Ab	95.8892	78.6333	125.2777	16.0	
SS	Cry1Ac	10.9036	7.8657	15.9247		
Cry1Ab RR	Cry1Ac	94.2223	43.5756	381.8489		8.6
Cry1Ac RR	Cry1Ac	65.0198	40.8045	123.1585		6.0

从 Cry1Ac、Cry1Ab 对三个种群（Cry1Ab 抗性种群，Cry1Ac 抗性种群，敏感种群）的对数半致死剂量的 U 检验结果（表 22）来看，Cry1Ab 抗性种群对 Cry1Ac 的敏感度（LC<sub>50</sub>=7.1796μg/g）和 Cry1Ac 抗性种群对 Cry1Ac 的敏感度（LC<sub>50</sub>=9.6746μg/g）没有显著差异，都及显著的低于敏感种群对 Cry1Ac 的敏感度（LC<sub>50</sub>=0.6894μg/g）。虽然 Cry1Ac 抗性种群对 Cry1Ab 的抗性（LC<sub>50</sub>=1.8560μg/g）远不如 Cry1Ab 抗性种群抗性（LC<sub>50</sub>=33.8001μg/g）高，但是与敏感种群

( $LC_{50}=0.3164\mu\text{g/g}$ ) 相比它对 *Cry1Ab* 的抗性有了及显著的提高。这说明亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 的抗性存在着很强的交互抗性。从表 23 中可以看出, *Cry1Ac* 抗性种群和 *Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ac* 蛋白的  $LC_{90}$  没有显著差异, *Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ac* 蛋白和 *Cry1Ab* 蛋白的  $LC_{90}$  没有显著差异, 也充分说明了亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 蛋白和 *Cry1Ac* 的交互抗性的存在。

表 22 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 蛋白对不同抗性种群  $LC_{50}$  的  $\mu$  检验  
Table 22  $\mu$  test for  $LC_{50}$  of *Cry1Ab*, *Cry1Ac* protein to *Cry1Ab* and *Cry1Ac* selected colonies

<i>P</i>	$\mu$	<i>Cry1Ab</i>			<i>Cry1Ac</i>		
		SS	<i>Cry1Ac</i> RR	<i>Cry1Ab</i> RR	SS	<i>Cry1Ab</i> RR	<i>Cry1Ac</i> RR
<i>Cry1Ab</i>	SS	-	3.0007	9.9277	1.6020	5.5048	6.7177
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.0027	-	7.9364	2.5685	2.7967	3.9863
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.0000	0.0000	-	25.9881	4.7204	5.8787
<i>Cry1Ac</i>	SS	0.1092	0.0102	0.0000	-	6.6895	10.7597
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.0000	0.0052	0.0000	0.0000	-	0.7818
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.4343	-
$LC_{50}(\mu\text{g/g})$		0.3664	1.8560	33.8001	0.6894	7.1796	9.6746

表 23 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 对不同种群对数  $LC_{90}$  的  $\mu$  检验  
Table 23  $\mu$  test for  $LC_{90}$ s of *Cry1Ab*, *Cry1Ac* protein to *Cry1Ab* and *Cry1Ac* selected colonies

<i>P</i>	$\mu$	<i>Cry1Ab</i>			<i>Cry1Ac</i>		
		SS	<i>Cry1Ac</i> RR	<i>Cry1Ab</i> RR	SS	<i>Cry1Ab</i> RR	<i>Cry1Ac</i> RR
<i>Cry1Ab</i>	SS	-	0.6194	4.5783	0.9677	3.3946	3.6281
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.5357	-	4.0492	0.1729	2.8942	3.0560
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.0000	0.0001	-	10.0828	0.0310	1.2703
<i>Cry1Ac</i>	SS	0.3332	0.8627	0.0000	-	3.7041	5.3405
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.0007	0.0038	0.9753	0.0002	-	0.5971
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.0003	0.0022	0.2040	0.0000	0.5571	-
$LC_{90}(\mu\text{g/g})$		5.9786	9.8671	95.8892	10.9036	94.2223	65.0198

表 24 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 蛋白对不同抗性种群的毒力回归曲线斜率的 *t* 测验  
Table 24 *t*-test of slopes among dose-mortality curves of *Cry1Ab*, *Cry1Ac* protein to *Cry1Ab* & *Cry1Ac* selected colonies

<i>P</i>	$\mu$	<i>Cry1Ab</i>			<i>Cry1Ac</i>		
		SS	<i>Cry1Ac</i> RR	<i>Cry1Ab</i> RR	SS	<i>Cry1Ab</i> RR	<i>Cry1Ac</i> RR
<i>Cry1Ab</i>	SS	-	2.3229	6.6056	0.4781	0.7169	3.003
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.0202	-	2.7059	2.2459	1.8088	0.6520
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.0000	0.0068	-	6.8975	5.7337	4.5344
<i>Cry1Ac</i>	SS	0.6326	0.0247	0.0000	-	0.4620	3.2581
	<i>Cry1Ab</i> RR	0.4735	0.0705	0.0000	0.6441	-	1.9475
	<i>Cry1Ac</i> RR	0.0027	0.5144	0.0000	0.0011	0.0515	-
斜率 (b)		1.0040	1.7662	2.8300	1.0678	1.1462	1.5489

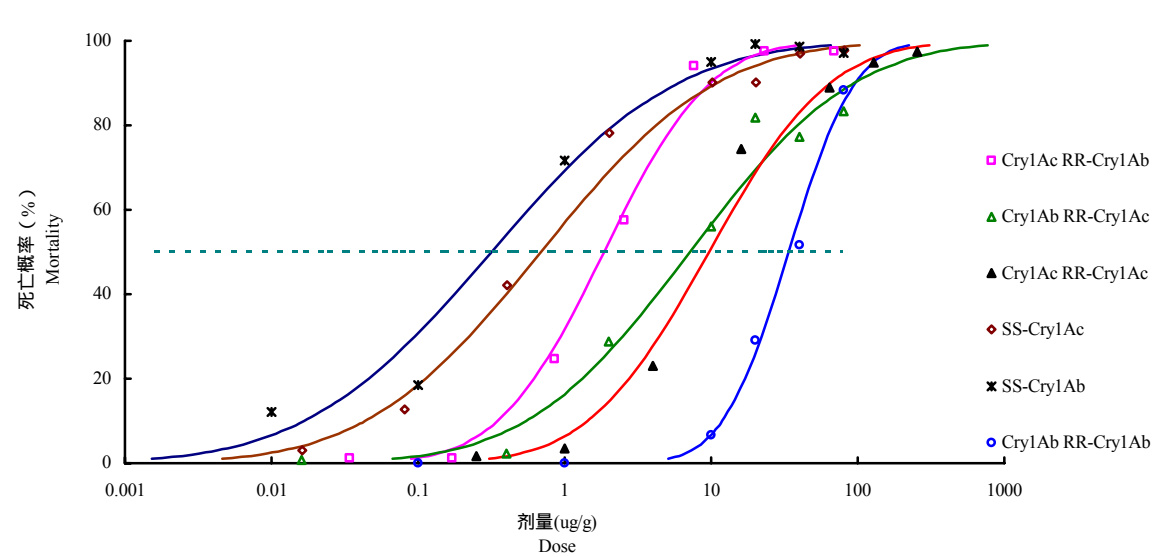


图12 不同群体对Cry1Ab、Cry1Ac的死亡率-剂量曲线  
Fig 12 Dose-mortality curves of Cry1Ab & Cry1Ac proteins to Cry1Ab & Cry1Ac selected colonies

从 *Cry1Ac*、*Cry1Ab* 对三个种群（*Cry1Ab* 抗性种群，*Cry1Ac* 抗性种群，敏感种群）的毒力回归斜率的 T 检验结果（表 24）来看，*Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ac* 的毒力回归曲线的斜率（ $b=1.1462$ ）和 *Cry1Ac* 抗性种群对 *Cry1Ac* 的毒力回归曲线的斜率（ $b=1.5439$ ）没有显著差异，结合对这两个种群对 *Cry1Ac* 的对数半致死剂量的分析，*Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ac* 的抗性水平已达到了现在用 *Cry1Ac* 汰选的抗性种群对 *Cry1Ac* 的抗性水平。而与 *Cry1Ab* 抗性种群的回归曲斜率（ $b=2.83$ ）相比，*Cry1Ab* 对 *Cry1Ac* 抗性种群的毒力回归曲线斜率（ $b=1.7662$ ）更接近于其对敏感种群（ $b=1.004$ ）。

2.2.2 MON810 玉米花丝生测分析

表 25 *Cry1Ac* 抗性种群在 MON810 花丝上的存活情况  
Table 25 Survival of *Cry1Ac* resistant and susceptible colonies fed on the silk of MON810 maize

玉米品种	种群	平均存活率（%） <sup>‡</sup>			平均虫重（mg）
		3 d	5 d	7 d	7 d
非 <i>Bt</i> 玉米	SS	100.0 ± 0.0 a	98.6 ± 1.4 a	98.6 ± 1.4	1.14 ± 0.01 a
<i>Bt</i> 玉米	SS	2.1 ± 2.1 b	0b		
非 <i>Bt</i> 玉米	<i>Cry1Ac</i> RR	100.0 ± 0.0 a	98.6 ± 1.4 a	98.6 ± 1.4	1.02 ± 0.05 b
<i>Bt</i> 玉米	<i>Cry1Ac</i> RR	6.3 ± 6.3 b	4.2 ± 4.2 b	0	

<sup>‡</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) ( $P>0.05$ )  
<sup>‡</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq0.05$ ) according to *t*-test (LSD)

虽然 *Cry1Ac* 抗性种群的个别个体能在 MON810 玉米花丝上存活超过五天，但与敏感基本上没有差异，对 MON810 花丝表现敏感。另外，敏感种群在非 *Bt* 玉米上一周的平均虫重显著的高于 *Cry1Ac* 抗性种群在非 *Bt* 玉米花丝上的平均虫重。



表 26 抗性种群无蛋白饲养三代在 MON810 及其敏感花丝上的存活比较

Table 26 Survival of 3 generations resistant colonies without selected pressure fed on the silk of MON810 and its negtiviae control

玉米品种	种群*	平均存活率 (%) <sup>†</sup>				平均化蛹率 (%) <sup>‡</sup>	平均蛹重( mg <sup>‡</sup> )	七天虫重( mg)	发育历期 (天) <sup>‡</sup>
		3 d	5 d	7 d	15 d				
非 <i>Bt</i> 玉米	RR	93.8 ± 3.6 a	91.7 ± 5.6 a	80.2 ± 4.6 b	67.7 ± 4.9 b	59.4 ± 8.6 a	45.30 ± 2.55 a	4.93 ± 0.44 b	22.3 ± 0.5 b
非 <i>Bt</i> 玉米	npr1	91.7 ± 2.9 a	69.8 ± 4.6 b	61.5 ± 2.0 c	50.0 ± 1.7 c	39.6 ± 4.0 b	41.89 ± 0.90 a	7.15 ± 0.27 a	22.7 ± 0.3 b
非 <i>Bt</i> 玉米	npr2	98.6 ± 1.4 a	97.2 ± 2.8 a	93.1 ± 3.7 a	69.4 ± 5.0 b	56.9 ± 3.7 a	42.55 ± 0.63 a	--	20.2 ± 0.2 b
非 <i>Bt</i> 玉米	npr3	100.0 ± 0.0 a	95.8 ± 0.0 a	94.4 ± 1.4 a	86.1 ± 3.7 a	--	--	--	--
<i>Bt</i> 玉米	RR	51.0 ± 5.2 b	42.7 ± 6.0 c	27.1 ± 3.6 d	18.8 ± 2.1 d	11.5 ± 2.6 c	47.76 ± 4.86 a	1.95 ± 0.24 c	29.3 ± 1.7 a
<i>Bt</i> 玉米	npr1	42.7 ± 4.3 b	21.9 ± 5.2 d	19.8 ± 5.5 d	9.4 ± 3.6 d	5.2 ± 2.0 c	41.28 ± 2.71 a	0.92 ± 0.37 c	29.0 ± 1.5 a
<i>Bt</i> 玉米	npr2	11.1 ± 3.7 d	0.0 ± 0.0 e						
<i>Bt</i> 玉米	npr3	27.8 ± 2.8 c	4.2 ± 0.0 e	1.4 ± 1.4 e	0.0 ± 0.0 e				

\*RR 表示抗性种群，npr1、npr2 和 npr3 分别表示在无蛋白饲料上饲养的 1 代、2 代和 3 代的种群。

\*R30— resistant colony; npr1, npr2, npr3 — resistant colonies maitaind on the non-*Cry*1Ab protein diet for 1, 2 and 3 generation(s)

<sup>†</sup> 同一列内数值后标有相同小写字母者表示平均数间差异不显著(LSD 测验法) (  $P>0.05$  )

<sup>‡</sup> The means within a column followed with same letter were not significantly different ( $P\geq 0.05$ ) according to *t*-test (LSD) (d3:  $F=87.11$ ;;  $df=7,20$ ;  $P<0.0001$ ; d5:  $F=76.12$ ;  $df=7,20$ ;  $P<0.0001$ ; d7:  $F=110.58$ ;  $df=7,20$ ;  $P<0.0001$ ; d15:  $F=103.00$ ;  $df=7,20$ ;  $P<0.0001$ ;Pupation:  $F=36.53$ ;  $df=7,20$ ;  $P<0.0001$ ; Pupae weight:  $F=0.85$ ;  $df=4,13$ ;  $P=0.5168$ ; Larva weight:  $F=67.38$ ;  $df=3,11$ ;  $P<0.0001$ ;Development time:  $F=014.82$ ;  $df=4,13$ ;  $P<0.0001$ )

## 2.3 抗性遗传的稳定性分析

### 2.3.1 抗性种群连续 9 代在不含 *Cry1Ab* 蛋白饲料上的生存分析

抗性种群在没有 *Cry1Ab* 杀虫蛋白饲料上连续饲养 3 代后, 其发育历期开始缩短, 6 代以后基本上与敏感种群一致(图 2)。而且蛹重也有不断增加的趋势(图 3)。说明这种抗性种群在失去杀虫蛋白的选择压以后, 有恢复为敏感种群的趋势。

### 2.3.2 抗性种群去掉选择压后连续 3 代在玉米花丝上的存活分析

由表 25 中可以看出, 在 MON810 敏感花丝上, 失去选择压的第 1 代与原来的抗性种群其生存率都表现为劣势, 在非 *Bt* 敏感花丝上的第 5 d、7 d 和 15d 存活率和化蛹率都显著的低于抗性种群, 但是其在 7d 后的虫重(7.15mg)却极显著的高于抗性种群(4.93mg), 而其最终的平均蛹重却没有显著差异。去掉选择压得第 2 代和第 3 代在敏感花丝上的存活率恢复到与敏感敏感种群没有差异的水平。在 MON810 花丝上, 去掉选择压第 1 代与抗性种群相比, 存活率有所下降, 平均化蛹率(5.21%)显著的低于抗性种群(11.46%), 而去掉选择压的第 2 代和第 3 代则对 *Bt* 花丝表现比较敏感, 第 2 代 5 d 之内就全部死亡, 而第 3 代个别个体的存活能超过 7 d。目前实验室汰选获得的对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白产生抗性的亚洲玉米螟种群的抗性, 在 *Bt* 花丝上表现极不稳定, 在去掉选择压的第 2 代就能恢复到相当敏感的水平。

## 3. 讨论

用于抗性遗传显性水平评价的分析方法主要有三种: 一是比较给定死亡水平下, 杂合个体与两纯合种群死亡率曲线的相对位置, 就是害虫对杀虫剂抗性的显隐性水平, 以  $D_{LC}$  表示。可以通过浸叶生测法(让害虫取食浸入 *Bt* 毒蛋白或芽孢晶体混合物的新鲜植物组织)或人工饲料生测法(让害虫取食加入杀虫蛋白或芽孢晶体的人工饲料)来实现。用浸叶法测得小菜蛾的 1Ac SEL-MEL 种群、NO-Q 种群对 *Cry1Ac*、Dipel 的  $D_{LC}$  分别为 0.29 和 0.09。用人工饲料生测的方法测的小菜蛾的 BL 种群对 *Cry1Ab* 的  $D_{LC}$  为 0.34, 烟芽夜蛾的 YHD2 种群、CP73-3 种群对 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 的  $D_{LC}$  分别为 0.24 和 0.31, 多数研究表明害虫对 *Bt* 的抗性在  $LC_{50}$  水平上表现为隐性或半隐性遗传, 但是也有例外, 如用浸叶法测得马铃薯甲虫对 *Cry3Aa*(CC)的  $D_{LC}$  值为 0.88, 用人工饲料法测得烟芽夜蛾的 SEL 种群和欧洲玉米螟的 KS-SC-R 种群对 *Cry1Ab*(CC)、Dipel 的  $D_{LC}$  值分别为 0.71 和 0.86, 呈显性或半显性遗传。

二是在一给定杀虫剂浓度下, 杂合个体相对与两纯合种群的死亡率, 这一值通常被称为有效显隐水平, 以  $D_{ML}$  表示。如果直接以表达 *Bt* 杀虫蛋白的转基因植物作为衡量标准, 它能最好的再现害虫被暴露在这种作物上将面临的情况, 对 *Bt* 作物的抗性治理策略运用最具有建设意义。以 1Ac-烟草测得小菜蛾的 Loxa A 种群对 *Cry1Ac* 的有效显性水平为 0, 1Ca-烟草测得小菜蛾的 *Cry1c*-Sel 种群对 *Cry1Ca* 的有效显性为 0, 用 1Ac-棉花测得红棉铃虫对 *Cry1Ac* 的有效显性水平为 0。就目前的研究表明, 害虫在 *Bt* 作物上的抗性遗传是完全隐性的。

三是在一给定的剂量下, 比较杂合种群和两纯合种群的适应性估测显隐性水平方法要求在一特定地区、给定浓度处理下比较自然抗性种群、隐性种群和杂合种群的对环境的相对适应性, 测定起来比较困难(Bocrguet 等 2000)。

到目前为止的多数研究表明抗性为常染色体遗传。但也有一些例外如小菜蛾中的 BL 和 *Cry1Ac*-SEL 种群以及 *S. littoralis* 的一个种群, 其抗性亲本的性别对  $F_1$  的存活率有显著影响 (MacIntosh 等 1995, Sayyed 等 2000a, Chaufaux 等 1997)。

本实验用在人工饲料加入蛋白和转基因玉米组织两种方法研究了亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 的抗性遗传的显性水平和母性影响。用饲料中掺入蛋白的方法测定亚洲玉米螟 *Cry1Ab* 抗性种群与敏感种群及其正反交  $F_1$  的  $LC_{50}$  分别为 33.80、0.32、5.92、0.90 $\mu\text{g/g}$ , 计得其正反交  $F_1$  代的  $M_{LC}$  值分别为 0.22、0.63。这表明亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的抗性遗传受母性影响的不完全隐性遗传。依据 Amparo 等 1995 年对小菜蛾的研究方法, 可以通过比较正反交  $F_1$  代接种到不同浓度的蛋白饲料的存活个体的性比的方法对母性影响进行进一步检测。但是母代效应在自然界普遍存在的现象, Mousseau 等 (1998) 认为母代效应 (maternal effect) 是母代所经历的环境 (光照、温度、和营养) 或采取的行为 (寄主选择、性选择、产卵行为和亲代照料), 对子代表现型差异的影响, 它是母代对子代的非遗传效应。近年来, 对这种代间转移的表现型可塑性的研究, 特别是数量遗传学引入生活史、行为和发育的研究, 表明子代个体表现型不只是基因型与环境相互作用的结果, 亲代的经历对子代的表现型影响很大 (刘柱东 2003)。

玉米花丝离体生测的结果表明虽然对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白产生抗性的玉米螟种群的一些个体能够在 MON810 花丝上存活, 对其  $F_1$  代的分析表明, 其有效显性水平为零 ( $D_{ML}=0$ ) 即亚洲玉米螟对 MON810 花丝的抗性遗传的有效显性水平仍为完全隐性。虽然, 目前 MON810 花丝中蛋白的表达量不稳定, 但足以杀死能够在花丝上存活的个体与敏感个体杂交获得的杂和个体, 另外, 还未发现抗性个体可以在其他部位可以存活。依据 FIFRA 科学委员会 1998 年对高剂量定义为杀死敏感个体剂量的 25 倍, 也就是说 *Bt* 作物杀虫蛋白的表达量必须大于其杀死全部敏感个体的 25 倍, 而在此剂量下的  $D_{ML}$  的期望值为零。所以在亚洲玉米螟对 *Bt* 的抗性治理中高剂量加庇护所策略实际应用是可行的, 但应当加强田间抗性的监测。

由于 *Cry1Ab* 杀虫蛋白和 *Cry1Ac* 杀虫蛋白氨基酸相似度达 85%, 害虫可能极易对这两种蛋白产生交互抗性。本实验研究以  $LC_{50}$  为标准衡量亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 这两种蛋白的交互抗性水平, 结果表明以 *Cry1Ab* 汰选获得的对 *Cry1Ab* 产生 106.8 倍的亚洲玉米螟抗性种群, 对 *Cry1Ac* 产生了 10.4 倍的抗性; 以 *Cry1Ac* 汰选获得的对 *Cry1Ac* 产生了 14.0 倍抗性的种群, 对 *Cry1Ab* 产生了 5.9 倍的抗性。这说明亚洲玉米螟对 *Cry1Ac* 和 *Cry1Ab* 存在着很强的交互抗性。

研究害虫对 *Bt* 杀虫蛋白的抗性能否稳定遗传, 对于治理害虫对转基因作物的抗性有着重要的指导意义。多数研究表明当撤去选择压后, 抗性种群的抗性是不稳定的。在夏威夷, 采自未产生抗性的小菜蛾种群的三个实验室汰选种群 (2800 倍), 当去掉选择压后, 对 Dipel ( $R$  值从 -0.26 到 -0.30) 抗性迅速下降, 13 代后其  $LC_{50}$  与敏感种群的  $LC_{50}$  相近, 而另一未汰选种群 (22 倍抗性,  $R=-0.06$ ) 下降的相对比较慢 (Tabashnik 等 1994)。采自田间产生抗性的小菜蛾 Loxa A 种群, 对 Javelin 的抗性在 2-3 代表现不稳定, 而其后至少 7 代中其抗性水平保持在 150-300 倍, 且保持相当稳定 (Tang 等 1997)。在目前对小菜蛾研究的多数种群中发现其抗性能快速恢复, 但也有三个例外的例子 (Liu 等 1996, Perez 等 1997, Tabashnik 等 1995), 在去掉选择压后仍然保持高而稳定的抗性水平。在其他昆虫中也进行了相应的研究, 如烟芽夜蛾 SEL 种群, 对 *Cry1Ab* 的抗性在去掉选择压后 5 代中从 69 倍下降到 13 倍, 而后有保持稳定的趋势 (Sim 等 1991)。棉贪夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 的一种群 (抗性大于 500 倍) 撤去 *Cry1C* 的选择压第 1 代的抗性下降, 随后的 5 代中

保持相对稳定，而后的 2 代又下降。如印度谷螟的 343-R 种群对 Dipel 的抗性在未处理的饲料上饲养 29 代其抗性水平未明显下降(McGaughey 等 1988)。欧洲玉米螟一室内汰选种群对 Cry1Ac 的抗性也不稳定 ( $R=-0.31$ ) (Bolin 等 1999)。本实验对目前获得的亚洲玉米螟对 Cry1Ab 产生抗性的种群抗性的稳定作了初步讨论。

连续九代在普通饲料上饲养表明其发育历期六代既可恢复到敏感种群的水平，平均蛹重也有不断增加的趋势。这说明目前的抗性种群的抗性，存在着不稳定因素。而并未达到如 Tabashink 所说的使其抗性趋于稳定的某一抗性水平。对于去掉选择压得抗性种群连续三代的花丝生测表明，这种抗性不能稳定遗传，失去选择压后，其抗性也会迅速丢失。

由于目前本研究所用的亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性种群能够在转 Cry1Ab 杀虫蛋白基因的 MON810 玉米花丝上完成幼虫发育，所以本实验以花丝作为衡量其抗性水平的标准，虽然受到花丝生测灵敏度以及花丝中杀虫蛋白表达量等因素的影响，但它能较好的反应亚洲玉米螟对 Bt 玉米抗性发展的实际水平。

## 第四章 结论

本论文从生物学和遗传学的角度,对亚洲玉米螟抗 *Cry1Ab* 杀虫蛋白种群的生物学、抗性遗传规律以及与 *Cry1Ac* 之间的交互抗性关系进行了研究。主要研究内容包括:*Cry1Ab* 抗性亚洲玉米螟种群在含 *Cry1Ab* 杀虫蛋白人工饲料以及转 *Cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 *Bt* 玉米上的生存力、抗、感种群间的交尾竞争能力;抗性种群的抗寒能力三个方面对抗性种群的生物学进行了初步探讨;利用人工饲料中加入杀虫蛋白的方法和转 *Bt* 基因玉米组织离体生测的方法,研究了亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 的抗性遗传的显性水平、抗性的母性遗传效应、抗性遗传的稳定性以及对 *Cry1Ac* 的交互抗性关系。主要结论如下:

通过在人工饲料中加入杀虫蛋白的方法,就亚洲玉米螟对 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 的抗性进行了室内汰选,到目前为止对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白汰选了 38 代,对 *Cry1Ac* 杀虫蛋白汰选了 31 代。*Cry1Ab* 抗性种群已经对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白产生了明显的抗性,在  $LC_{50}$  水平上,*Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的敏感度下降了约 107 倍。*Cry1Ab* 抗性种群能够在含有 100ng/g 的人工饲料上的存活率平均达 70%,化蛹率 60%,并且具有相对稳定的发育历期(21.1d)和平均蛹重(37.5mg),比敏感种群的发育历期(16d)明显延长,蛹重(敏感种群为 64.6mg)明显减少。*Cry1Ac* 抗性种群对 *Cry1Ac* 的敏感度下降了 14 倍。

用表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的 MON810*Bt* 玉米对室内汰选获得的上述 *Cry1Ab* 抗性种群连续 4 代的生测结果表明,亚洲玉米螟初孵幼虫不能在 MON810 的心叶和苞叶上存活,但是能够在花丝上完成幼虫期并化蛹,四代在花丝上的平均化蛹百分率分别为 29.3%、1.4%、16.1%、11.5%。*Bt-Cry1Ab* ELISA 试剂盒测试结果表明 MON810 玉米花丝中的表达量为 585.46ng/g,首次用转基因作物离体生测的方法发现了室内汰选的亚洲玉米螟抗性种群可以在 MON810 花丝上完成幼虫发育历期。这说明通过人工汰选的抗性亚洲玉米螟能够适应表达 *Cry1Ab* 转基因玉米。杀虫蛋白在植株不同部位的差异表达,会给抗性个体在低表达组织如花丝和花粉上提供存活机会,这有可能对玉米螟不同龄期,甚至同一龄期的不同发育阶段造成不同的选择压,从而加速抗性的产生。

对四种交尾竞争类型( $RR \times SS/RR$ 、 $SS \times SS/RR$ 、 $SS/RR \times RR$ 、 $SS/RR \times SS$ )的观察结果表明,抗性亚洲玉米螟与敏感个体在同一种群密度下具有相同的交尾竞争力,但敏感种群雌蛾和抗性种群雌蛾竞争同一抗性种群雄蛾( $SS/RR \times RR$ )的杂合百分率与 50%之间存在显著差异,敏感种群的雌蛾在竞争中处于劣势。这说明当环境中抗性雄蛾的种群密度相对高时,发生抗性种群内交尾的概率将会增加。四种竞争类型以及同一竞争类型的不同交尾型在交尾时间上表现高度一致,主要集中在晚上 23 时到凌晨 4 时,而且有 3 个高峰分别为 23 时、1:30 时和 4:00 时左右。其主要原因可能是竞争交尾的个体在人工控制条件下羽化时间基本一致的原因。这也说明抗性种群和敏感种群成虫个体的发育之间没有显著差异。当抗、感种群世代发生期一致时,成虫交尾活动日节律不会影响抗、感种群间的随机交尾。但从抗性种群汰选的情况来看,抗性种群个体的幼虫的发育历期明显延长,在复杂的自然条件下,抗性个体和敏感个体交尾竞争的时间动态,还有待于进一步观察和研究。在观察到的第二次交尾(32)与第一次交尾不一致的(24)百分率为 75%,也就是说二次交尾具有选择非同配偶的倾向。这对于种群的维持和发展有一定的意义,在害虫治理和抗性治理的时候也应当给予重视。

使用改进得过冷却点测定仪,分别对非滞育抗性种群和敏感种群的幼虫,滞育的抗性种群、敏感种群及其杂交  $F_1$  代的幼虫进行了过冷却点测定,其结果表明:非滞育虫态的抗性种群的过冷却点 ( $-11.5$ ) 和敏感种群的过冷却点 ( $-11.4$ ) 没有显著差异;抗性种群滞育幼虫的过冷却点高于敏感种群及抗感杂交  $F_1$  代,杂交后代与敏感种群间没有差异,即抗性种群的抗寒能力略有下降。应当指出的是,抗性种群的过冷却点仅比敏感种群高  $1\sim 2$ ,这对其在田间安全越冬可能不会造成很大的影响。本研究结果还表明,虽然抗性种群幼虫个体小,但过冷却点与虫重并没有显著相关,即抗性种群虫体重的改变,不会影响其安全越冬。

用饲料中掺入蛋白的方法测定了亚洲玉米螟 *Cry1Ab* 抗性种群与敏感种群及其正反交  $F_1$  毒力回归曲线,抗性种群 (RR)、敏感种群 (SS) 及其正反交  $F_1$  (RS, SR) 的  $LC_{50}$  分别为 33.80、0.32、5.92、0.90  $\mu\text{g/g}$ 。从  $LC_{50}$  的水平来看,其正反交的  $D_{LC}$  分别为 0.22 和 0.63。对  $LC_{50}$  进行  $\mu$  测验的结果表明,抗性种群显著的高于敏感和  $F_1$  种群,RS 种群显著的高于敏感种群和 SR 种群,SR 种群与敏感种群的差异不显著。对  $LC_{90}$  的进一步分析表明随着致死浓度的增加,其显性水平受到母本的影响也越来越强烈。这表明目前亚洲玉米螟对杀虫蛋白 *Cry1Ab* 的抗性遗传受母性影响的不完全隐性遗传。以 *Bt* 玉米花丝作为衡量标准,对抗性种群和敏感种群及其  $F_1$  代进行生测,结果表明其有效显性为完全隐性遗传 ( $D_{ML}=0$ )。虽然,目前 MON810 花丝中蛋白的表达量不稳定,但足以杀死能够在花丝上存活的个体与敏感个体交尾获得的杂和个体,而且还未发现抗性个体可以在其他部位存活,所以在亚洲玉米螟对 *Bt* 的抗性治理中高剂量加庇护所策略实际应用中是可行的,但应当加强田间抗性的监测。

用人工饲料中掺入杀虫蛋白的方法测定结果表明,*Cry1Ab* 抗性种群对 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 的  $LC_{50}$  为 33.80  $\mu\text{g/g}$  和 7.18  $\mu\text{g/g}$ ; *Cry1Ac* 抗性种群对 *Cry1Ac*、*Cry1Ab* 的抗性水平  $LC_{50}$  分别为 9.67  $\mu\text{g/g}$ 、1.86  $\mu\text{g/g}$ ;敏感种群对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 的  $LC_{50}$  为 0.32  $\mu\text{g/g}$ 、0.69  $\mu\text{g/g}$ 。以  $LC_{50}$  为标准衡量亚洲玉米螟对 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 这两种蛋白的交互抗性水平,结果表明对 *Cry1Ab* 产生了 107 倍的亚洲玉米螟抗性种群,对 *Cry1Ac* 产生了 10 倍的抗性,而且与目前的 *Cry1Ac* 抗性种群对 *Cry1Ac* 的抗性水平相当。用 *Cry1Ac* 汰选获得的对 *Cry1Ac* 产生了 14.0 倍抗性的种群,对 *Cry1Ab* 产生了 5.9 倍的抗性。这说明亚洲玉米螟对 *Cry1Ac* 和 *Cry1Ab* 存在着很强的交互抗性。在玉米花丝上,*Cry1Ac* 种群与敏感相比并没有表现出优越性。在 MON810 花丝杀虫蛋白表达剂量下,该种群仍然表现为敏感。

抗性种群去掉选择后,在普通饲料上连续饲养 9 代的结果表明,3 代以后发育历期开始下降,6 代以后基本上与敏感种群一致,而且蛹重也有不断增加的趋势。说明该抗性种群在失去杀虫蛋白的选择压以后,有恢复为原来敏感种群的趋势。花丝生测结果表明 *Cry1Ab* 抗性种群能够在表达 *Cry1Ab* 杀虫蛋白的 *Bt* 花丝上完成幼虫发育,所以本实验以花丝作为衡量其抗性水平的标准,它能较好的反应亚洲玉米螟对 *Bt* 玉米抗性发展的实际水平。去掉选择压后连续三代的花丝生测表明,这种抗性不能稳定遗传,失去选择压后,其抗性也会迅速丢失。

## 参考文献

1. 褚姝频, 孟凤霞, 沈晋良. *Bt* 棉叶对棉铃虫抗虫性的时空变化及气象因素的影响. 昆虫学报, 2003, 46 (3): 299~304
2. 崔金杰, 夏敬源. 转 *Bt* 基因棉花对棉铃虫抗性的时空动态. 棉花学报, 1999, 11(3): 141~146
3. 董双林, 马丽华, 夏敬源. 棉铃虫幼虫对转 *Bt* 基因棉的行为学反应研究. 植物保护学报, 1997, 24 (4): 373~374
4. 冯殿英, 高志民, 肖振山. 棉田玉米螟生物学特性观察. 中国棉花, 1987, 14 (2): 43~44
5. 何康来, 王振营, 文丽萍. *Bt* 玉米在玉米害虫持续控制中的作用、风险问题及对策. 面向 21 世纪的植物保护发展战略, 2001, 北京: 中国科学技术出版社. 344~349
6. 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性的测定和评价方法. 昆虫知识, 2004, 41(1): 7~10
7. 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性研究. 生态学报, 2002, 22 (12): 2202~2207
8. 刘德钧, 袁全昌. 棉田玉米螟防治指标的研究. 植物保护学报, 1981, 8: 241~247
9. 刘东辉, 汪飞, 宋荣. 新疆棉区转基因抗虫棉棉铃虫. 新疆农业科学, 2003, 40 (1): 36~37
10. 刘宁. 亚洲玉米螟不同地理种群生态适应性和种群遗传结构的 RAPD 分析: [中国农业科学院硕士学位论文]. 中国农业科学院研究生院, 2003
11. 刘柱东, 李典谟, 葛绍奎, 齐晔. 昆虫的母代效应. 昆虫学报, 2003, 46(1): 108~113
12. 鲁新, 周大荣, 李建平. 亚洲玉米螟化性与抗寒能力的关系. 玉米科学, 1997, 5(4): 72~73, 77
13. 宋彦英, 周大荣, 何康来. 亚洲玉米螟无琼脂人工饲料的研究与应用. 植物保护学报, 1999, 26: 324~328
14. 王冬妍. 转 *BtCry1Ab* 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟、棉铃虫、甜菜夜蛾、粘虫控制效果评价研究: [沈阳农业大学硕士学位论文]. 沈阳农业大学, 2003
15. 王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌. 转 *Bt* 基因抗虫玉米在害虫综合治理中的作用及生态风险. 植物保护学报, 2003, 30: 97~106
16. 王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌, 文丽萍, 白树雄. 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
17. 王金福. 黑缘红瓢虫亚种抗寒性研究. 植物保护学报, 1987, 14 (4): 259~262
18. 王荫长, 陈长琨, 尤子平. 小地老虎抗寒能力的研究. 植物保护学报, 1987, 14 (1): 9~14
19. 王音, 雷仲仁, 问锦曾等. 美洲斑潜蝇的越冬与抗寒性研究. 植物保护学报, 2000, 27 (3): 33~36
20. 吴孔明, 郭予元. 新疆棉铃虫的抗寒性研究. 昆虫学报, 1997, 40 (增): 20~24
21. 中国农作物病虫害委员会. 旱粮病虫害: 玉米螟. 中国农作物病虫害 (第二版). 北京: 中国农业出版社, 1995, 562~574
22. 周大荣, 何康来, 王振营, 文丽萍, 叶志华, 高云霞, 宋彦英. 玉米螟综合防治技术. 1995, 金盾出版社, 北京
23. AGBIOS. Agriculture and Biotechnology Strategies Incorporated. 2001. Crop database, MON810. Essential Biosafety. (<http://www.essentialbiosafety.info/dbase.php>)

24. Alstad D.N. and Andow D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 1995, 268: 1894
25. Amos Navon. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. *Crop Protection*, 2000, 19: 669~676
26. Anthony R.Ives. Evolution of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Transformed Plants. *Science*, 1996, 273: 1412~1413
27. Archer T.L., Schuster G., Patrick C., Cronholm G., Bynum E.D. Jr., and Morrison W.P. Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. *Crop Protection*, 2000, 19: 181~190
28. Archer T.L., Patrick C., Schuster G., Cronholm G., Bynum E.D. Jr., and Morrison W.P. Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. *Crop Protection*, 2001, 20: 139~144
29. Armstrong C.L., Parker G.B., Pershing J.C., Brown S.M., Sanders P.R., Duncan D.R., Stone T., Dean D.A., Deboer D.L., Hart J., Howe A.R., Morrish F.M., Pajean M.E., Petersen W.L., Reich B.J., Rodriguez R., Santino C.G., Sato S.J., Schuler W., Sims S.R., Stehling S.T., Arochione L.J., and Fromm M.E.. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Sci.*, 1995, 35: 550~557
30. Bale J.S. Insect cold hardiness: a matter of life and death. *Eur. J. Entomol.*, 1996, 93: 369~382
31. Ballester V., Granero F., Tabashnik B.E., Malvar T., and Ferré J. Integrative Model for Binding of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Susceptible and Resistant Larvae of the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Envir. Microbiol.*, 1999, 65: 1413~1419
32. Barnes D., Hodson A.C. Low temperature tolerance of the European corn borer in relation to winter survival in Minnesota. *J. Econ. Entomol.*, 1956, 49(1): 20 ~ 27
33. Baust J.G, Miller L.K. Seasonal variations in glycerol content and its influence on cold hardiness in the Alaskan carabid beetle *Pterostichus brevicornis*. *Journal of Isect Physiology*, 1970, 16: 979~900
34. Bocrguet D., Genissel A., Raymond M. Insecticide Resistance and Dominance Levels. *J. Econ. Entomol.*, 2000, 93(6): 1588~1595
35. Bolin P.C., Hutchison W.D., Andow D.A. Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borel(Lepidoptera:Crambidae). *J. Econ. Entomol.*, 1999, 93: 1588~1595
36. Burkness E.C., Hutchison W.D., Bolin P.C., Bartels D.W., Warnock D.F., and Davis D.W. Field efficacy of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for management of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Crambidae) and *Helicoverpa Zea* (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 2001, 94(1): 197~203
37. Cannon R.J.C. Prospects and Progress for *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 1993, 37: 331~335



38. Chaufaux J., Muller-Cohn J., Buisson C., Sanchis V., Lereclus D., Pasteur N.. Inheretanc of resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90: 873~878
39. Cohen E., Rozen H., Joseph T., Margulis L. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* from ultra-violet irradiation. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991, 57: 343~351
40. Crawley M.J., Brown S.L., Hails R.S., Kohn D.D., Rees M.. Biotechnology: transgenic crops in natural habits. *Nature*, 2001, 409: 682~683
41. Davis P.M., Onstad D.W. Seed mixtures as a resistance management strategy for European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) infesting transgenic corn expressing Cry1Ab protein. *J.Econ. Entomol.*, 2000, 93(3), 937~948
42. Dunkle R.L., Shasha B.S. Response of starch encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing UV screens to sunlight. *Environ. Entomol.*, 1989, 18: 1035~1041
43. Ferré J., Real M.D., Van Rie J., Jansens S., Peferoen M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *PNAS*, 1991, 88: 5119~5123
44. Ferré J., van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47, 501~533
45. Ferro D.H., Lyon S.M. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval mortality: operative effects of *Bacillus thuringiensis* subsp.*san diego*. *J. Econ. Entomol.*, 1991, 84: 806 ~ 809
46. Ferro D.H., Yuan Q.C., Slocombe A., Tuttle A. Residual activity of insecticides under field conditions for controlling the Colorado potato beetl (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 1993, 86: 511~516
47. Forcada C., Alcácer E., Garcerá M.D., Martínez R. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1996, 31: 257~272
48. Forcada C., Alcácer E., Garcerá M.D., Tato A., Martínez R.. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *HeLiothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1999, 42: 51~63
49. Fuxa J. Fate of released entomopathogens with reference to risk assessment of genetically engineered microorganisms. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 1989, 35: 12~24
50. Gahan L.J., Gould F., Heckel D.G., Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 2001, 293(5531), 857~860
51. Gould F., Anderson A., Reynolds A., Bumgarner L., William M. Selection and Genetic Analysis of a *Heliothis Virescens* (lepidotera: Noctuidea) Strain with High levels of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *J. Econ. Entomol.*, 1995, 88(6): 1545~1559
52. Gould F., Martinez A., Anderson A., Ferré J., Silva F.J. and William J.M. Spectrum resestance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis Virescens*. *PNAS*, 1992, 89: 7986~7990
53. Groeters F.R., Tabashnik B.E., Finson N., Johnson M.W. Resistant to *Bacillus thuringiensis*

- affects mating success of the diamondback moth (Lep.: Plu.). *J. Econ. Entomol.*, 1993, 86: 1035~39
54. Guthrie W.D., Onukogu F.A., Awadallah W.H., and Robbins J.C. European corn borer: evaluation of resistance in husk-silk tissue of inbred lines of corn. *J. Econ. Entomol.*, 1980, 73: 178~180
55. Griffiths J.S., Whitacre J.L., Stevens D.E., Aroian R.V. *Bt* toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, 2001, 293(5531): 860~864
56. Hanson S.M., Craig G. B. Jr. Relationship Between cold hardiness and supercooling point in *Aedes albopictus* eggs. *J. American Mosquito Control Association*, 1995, 11: 35~38
57. He K.L. Zhou D.R., and Wang Z.Y. Progress of maize resistance research to the Asian corn borer in China. In China Association of Agricultural Science Societies [eds], Prospects of maize genetics and breeding for the 21st century. *Proceedings of an International Maize Genetics and Breeding Symposium*, 15~17 September 2000, Changchun, China
58. He K.L., Wang Z.Y., Wen L.P., Bai S.X., Zhou D.R., Zhu Q.H. Field evaluation of the Asian corn borer control in hybrid of transgenic maize Event MON810. *Agricultural Sciences in China*, 2003a, 2(12): 1290~1295
59. He K.L., Wang Z.Y., Zhou D.R., Wen L.P., Song Y.Y., Yao Z.Y. Evaluation of transgenic *Bt* corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 2003b, 96(3): 935~940
60. Heckel D.G., Gahan L.J., Liu Y.B., and Tabashnik B.E. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *PNAS*, 1999, 96: 8373~8377
61. Heckel D.G., Gahan L.C., Gould F., Anderson A. Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in the tobacco budworm(Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90: 75~86
62. Herrero S., Oppert B., and Ferr J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Envir. Microbiol.*, 2001, 67(3): 1085~1089
63. Huang F., Bushman L.L., Higgins R.A., McGaughey W.H. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin(Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 1999a, 284: 965~967
64. Huang F., Higgins R.A., and Buschman L.L. Heritability and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bull. Entomol. Res.* 1999b, 89: 449~454
65. Huang F., Higgins R.A. and Bushman L.L. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki under selection pressure in European corn borer (lepidoptera, pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90: 1137~1143
66. Huang F., Buschman L.L., Higgins R.A., and Li H. Survival of Kansas Dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and Non-Bt corn hybrids. *J. Econ. Entomol.*, 2002, 95: 614~621

67. Hudon M., Leroux E.J. and Harcourt D.G. Seventy years of European corn bore (*Ostrinia nubilalis*) research in North America. *Agric. Zool. Rev.*, 1989, 3: 53~96
68. Hyde J., Marin M.A., Preckel P.V., Dobbins C.L., Edwards C. R. An economic analysis of non-*Bt* corn refuges. *Crop Protection*, 2001, 20: 167~171
69. Jones K. Performance of Nu COTN with bollgard<sup>TM</sup>[C]. *Pro Belt Cotton conf*, 1996, 46~48
70. Koziel M.G., Beland G.L., Bowman C., Carozzi N.B., Crenshaw R., Crossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPherson K., Meghji M.R., Merlin E., Rhodes R., Warren G.W., Wright M., and Evola S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus Thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11: 194~200
71. Lauer J. and Wedberg J. Grain yield of initial *Bt* corn hybrid introductions to farmers in the northern corn belt. *Journal of Production Agriculture*, 1999, 12(3): 373~376
72. Lee M.K., Rajamohan F., Gould F., Dean D.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1995, 61: 3836~3842
73. Lee R.E.Jr. Insect cold hardiness: to freeze or not to freeze. *Bioscience*, 1989, 39: 308~313
74. Liu Y.B., Tabashnik B.E. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the Royal Society of London: Series B: *Biological sciences*, 1997, 264:605
75. Liu Y.B., Tabashnik B.E., Masson L., Escriche B., Ferré J. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 2000, 93: 1~6
76. Liu Y.B., Tabashnik B.E., Puzsai-Carey M. Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1c in diamondback moth. *J. Econ. Entomol.*, 1996, 89: 798~804
77. Liu Y.B., Tabashnik B.E., Dennehy T.J., Patin A.I., Bartlett A.C. Development time and resistance to *Bt* crops. *Nature*, 1999, 400: 519
78. Losey J.E., Rayor L.S., and Carter M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, 399: 214.
79. Lozzia G.C., Furlanis C., Manachini B., Rigamonti I.E. Effects of *Bt* corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhynchotha Aphididae) and on its predator *Chrysoperla carnea* stephen(Neuroptera Chrysopidae). *Bollettino-di-Zoologia-Agraria-e-di-bachicoltura*, 1998, 30(2): 153~164
80. MacIntosh S., Stone T., Jokerst S., Fuchs R. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *PNAS*, 1991, 88(20): 8930~8933
81. Martínez-Ramírez A.C., Gould F., Ferré J. Histopathological effects and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1999, 9: 239~246
82. Martínez-Ramírez A.C., Escriche B., Real M.D., Silva F.J. & Ferré J. Inheritance of Resistance to a *Bacillus thuringiensis* Toxin in a Field Population of Diamondback Moth (*Plutella xylostella*).

- Pestic. Sci.*, 1995, 43: 115~120
83. Mason C.E., Rice M.E., Calvin D.D., van Duyn J.W., Showers W.B., Hutchison W.D., Witkowski J.F., Higgins R.A., Onstad D.W., and Dively G.P. European corn borer, ecology and management. *North Central Regional Extension Publication No. 327*, 1996, *Published by Iowa State University, Ames, Iowa.*
84. McDonald J.R., Head J., Bale J.S., Walters K.F.A. Cold tolerance, overwintering and establishment potential of *Thrips palmi*. *Physiological Entomology*, 2000, 25(2): 159~166
85. McGaughey W. H., Beeman R.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 1988, 81: 28
86. McGaughey W.H. Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 1985, 229: 193~194
87. McGaughey William H. and Whalon Mark E. Managing Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Science*, 1992, 258: 1451~1455
88. Metz T.D., Roush R.T., Tang J.D., Shelton A.M., and Earle E.D. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal crystal protein: implications for pest resistance management strategies. *Mol. Breed.*, 1995, 1: 309~317
89. Moar William J., Pusztai-carey Marianne, Faasen Henkvan, Bosch, Dirk Roger Frutos, Cecile Rang Keluo.. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIc Resistance by *Spodoptera exigua* a (hubner) (Lepidoptera; Noctuidae). *Appl. Envir. Microbiol.*, 1995, 61(6) :2086~2092
90. Mousseau T.A., Fox C.W. The adaptive significance of maternal effects. *TREE*, 1998, 13 :403~407
91. Muller-Cohn J., Chaufaux J., Buisson C., Gilois N., Sanchis V., Lereclus D. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIc and Cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* Crystal toxins. *J. Econ. Entomol.*, 1996, 89: 791~797
92. Nafus D. and I. Schreiner. Review of the biology and control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lep: Pyralidae). *Tropical Pest Management*, 1991, 37: 41~56
93. Navon A., Klein M., Braun S. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets. *J. Invertebr. Pathol.*, 1990, 55: 387~393
94. Navon A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Edit by Entwistle P.F. et al. Wiley, New York, USA, 1993, pp: 125~146
95. Oppert B., Kramer K.J., Johnson K., Upton S., McGaughey W.H. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the Hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIAc protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 26: 571~583
96. Oppert Brenda, Kramer Karl J., Beeman Richard W., Johnson Donovan, and McGaughey William H. Proteinase-mediated Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 23473~23476
97. Perez C.J., Shelton A.M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus*

- thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.*, 1997, 90: 87~93
98. Pilcher C.D., Obrycki J.J., Rice M.E. and Lewis L.C. Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.*, 1997, 26(2): 446~454
99. Rahardja U., Whalon M.E. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry3A  $\delta$ -endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 1995, 88: 21~26
100. Ramos L.M., McGuire M.R., Galan Wong L.J. Utilization of several biopolymers for granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 1998, 91: 1109~1113
101. Riebe J.F. The development and implementation of strategies to prebent resistance to *Bt*-expressing crop: an industry perspective. *J. Plant Pathol.*, 1999, 21: 101~105
102. Sayyed Ali H., Haward R., Herrero S., Ferré J., and Wright D. J. Genetic and Biochemical Approach for Characterization of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Field Population of the Diamondback Moth. *Plutella xylostella*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 2000a, 66: 1509~1516
103. Sayyed A.H., Ferré J., Wright D.J. Mode of inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in a diamondback moth (*Plutella xylostella*) population from Malaysia. *Pest Manag. Sci.*, 2000b, 56: 743~748
104. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., and Dean D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62(3): 775~806
105. Shelton A.M., Robertson J.L., Tang J.D., Perez C., Eigenbrode S.D., Preisler H.K., Wilsey W.T., and Cooley R.J. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.*, 1993, 86: 697~705
106. Sim S.R., Stone T.B. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the endotoxin of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991, 57: 206~210
107. Sjørnsen H., Sømme L. Seasonal changes in tolerance to cold and in desiccation in *Phauloppia* sp (Acari, Oribatida) from Finse, Norway. *J. Insect Physiol.*, 2000, 46: 1387~1396
108. Stokstad Erik. First light on Genetic Roots of *Bt* Resistance. *Science*, 2001, 293: 778
109. Sømme L. The history of cold hardiness research in terrestrial arthropods. *Cryo Letters*, 2000, 21(5): 289~296
110. Sømme L. The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *Eur. J. Entomol.*, 1999, 96: 1~10
111. Tabashnik B.E., Cushing N.L., Finson N., and Johnson M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth. *J. Econ. Entomol.*, 1990, 83: 1671~1676
112. Tabashnik B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *J. Econ. Entomol.*, 1991, 84: 703~712

113. Tabashnik B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 1994, 39: 47~79
114. Tabashnik B.E., Finson N., Johnson M.W., Heckel D. Prolonged selection affects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 1995, 88: 219~224
115. Tabashnik B.E., Malvar T., Liu Y.B., Finon N., Borthakur D. et al. Cross-resistance of diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1996, 62: 2839~2844
116. Tabashnik B.E., Schwartz J.M., Finson N., Johnson M.W. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 1992, 85: 1046.
117. Tabashnik Bruce E., Richard T. Roush, Elizabeth D. Earle, Anthony M. Shelton, Fangneng Huang, Lawrent Buschman, Randall Higgins, and William McGaughey . Resistance to *Bt* toxins. *Science*, 2000, 287: 41
118. Tabashnik B.E., Liu Y.B., Malvar T., Heckel D.G., Masson L., Ballester V., Granero F., Ménsua J.L., and Ferré J. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *B. thuringiensis*. *PNAS*, 1997, 94: 12780~12785
119. Tang J.D., Collins H.L., Roush R.T., Metz T.D., Earle E.D., Shelton A.M. Survival, weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella*(Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing *Cry1Ac* toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 1999, 92: 47~55
120. Tang J.D., Collins H.L., Roush R.T., Metz T.D., Earle E.D., Shelton A.M. Greenhouse tests on resistance management of *Bt* transgenic plants using refuge strategies. *J. Econ. Entommol.*, 1999, 94: 240~247
121. Tang J.D., Gilboa S., Roush R.T., Shelton A.M. Inheritance, stability, and lack of fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepdoptera: Plutellidae) from Florida. *J. Econ .Entomol.*, 1997, 90: 732~741
122. Valaitis A.P., Lee M.K., Rajamohan F. et al. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the *Cry1Ac* delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 1995, 25: 1143~1151
123. van Rie J., W.H.McGaughey, Johnson D.E., Barnett B.D., VanMeuaert H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 1990, 247: 572~574
124. Williams W.P., Buckley P.M., Sagers J.B., and Hanten J.A. 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. *J. Agric. Entomol.*, 1998, 15: 105~112
125. Williams W.P., Sagers J.B., Hanten J.A., Davis F.M., and Buckley P.M. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. *Crop. Sci.*, 1997, 37: 957~962
126. Wold S.J., Burkness E.C., Hutchison W.D., and Venette R.C. In-field monitoring of beneficial

- insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Journal of Entomological Science*, 2001, 36(2): 177~187
127. Wright D.J., Iqbal M., Granero F., Ferré J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp.kurstaki and *B. thuringiensis* subsp.aizawai. *Appl. Envir. Microbiol*, 1997, 63: 1814~1819
128. Zachariassen K.E. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, 1985, 65: 827~832
129. Zhao J.Z., ChangHui R., MeiGuang L., XianLin F., LinJun R., XiangQing M.. Monitoring and management of *Helicoverpa armigera* resistance to transgenic *Bt* cotton in Northern China. *Resistant Pest Management*, 2000, 11(1): 28~31
130. Zhao JianZhou, Collins H.L., Tang J.D., Jun C., Earle E.D., Roush R.T., Herrero S., Escriche Ferré B., Shelton A.M. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of *Cry1C*. *Appl. Envir. Microbiol*, 2000, 66(9): 3784~3789

## 致 谢

本项研究得到了国家 973 课题 (001CB109004) 和国家 863 课题(2002AA212161)的资助。

本论文是在导师何康来副研究员的悉心指导下完成的,从论文的选题、设计到试验计划的实施及最后论文的撰写无处不凝聚着导师的心血和汗水。导师渊博的知识、严谨的治学态度以及兢兢业业的敬业精神,使我受益匪浅。老师的谆谆教诲,激励和鞭策着我不断进取,令我终生难忘。三年来,无论生活、学习还是工作中,何老师都给了巨大的支持和帮助,特别是何老师平易近人的性格、诲人不倦的作风、一丝不苟的态度,是我学习的榜样。在此即将结束研究生学习之际,向何老师表示我最衷心的感谢!

本论文完成离不开王振营研究员的关心和帮助,特别是在实验的设计中,王老师提出了宝贵意见并给予了耐心的技术指导,在论文的撰写中,王老师给予了详尽的修改意见。王老师知识渊博、才思敏锐、为人谦和,永远值得我学习。在此,向王老师致以我最诚挚的谢意。

感谢中国农业科学院植物保护研究所玉米螟研究组为我提供的良好的生活和学习环境。研究生期间,无论是学习还是生活上,本实验室的周大荣先生、文丽萍副研究员、白树雄助理研究员自始至终都给予了热情的帮助。宋彦英高级实验师在亚洲玉米螟的饲养方面给予了精心指导。中国农业科学院植物保护研究所赵廷昌副研究员在过冷却点的研究中给予了热情的帮助。在试验的实施过程中,植物病虫害生物学国家重点实验室李世访副研究员给予了多方面的指导,尹蔚庄高级实验室和杨美霞老师在仪器使用上给予了很多的帮助,在此,向各位老师表示我深深的谢意。

感谢本组 2000 级硕士研究生刘宁、2002 级硕士研究生刘慧,以及在本实验室从事论文工作的沈阳农业大学 2000 级硕士研究生王冬妍、西北农林科技大学 2001 级硕士研究生李丽莉、吉林农业大学 2001 级研究生汪洋洲,河北农业大学 2002 级研究生杜茜,本实验室 2003 级博士李霞、徐艳玲以及本科实习生余应中、常雪艳、邢珍娟、吕军等同学在学习、研究和生活过程中给予的热情帮助。

特别感谢美国康乃尔大学昆虫学系赵建周博士和中国农业科学院植物保护研究所生物技术组张杰研究员提供 *Cry1Ac* 蛋白和技术指导。感谢孟山都公司提供 *Bt* 玉米和 *Cry1Ab* 蛋白。

感谢中国农业科学院植物保护研究所和中国农业科学院研究生院的领导、老师和同学。

最后感谢所有关心和帮助过我的人,感谢我的父亲以及亲朋好友对我的理解和支持,再次向他们致以诚挚的谢意!

李光涛

2004 年 6 月



## 作者简历

李光涛，男，1979 年 4 月出生，山东滕州人，1997 年 9 月至 2001 年 7 月就读于莱阳农学院植物保护系植物保护专业，获农学学士学位，2001 年 9 月至今就读于中国农业科学院研究生院，攻读农业昆虫与害虫防治专业硕士学位。

论文研究期间参加的研究项目：

国家自然科学基金项目转 *Bt* 基因棉和玉米对玉米螟控害作用和交互抗性风险预测（编号：39970489）

国家 973 课题“转基因作物农田生态系统生物群落结构的研究”（编号：2001CB109004）

国家 863 课题“转 *Bt* 基因抗虫玉米生态安全性评价技术研究”（编号：2002AA212161）。