

棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性筛选及遗传方式的研究

梁革梅, 谭维嘉, 郭予元

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 通过室内筛选获得了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 对转 Bt 基因棉的抗性种群, 并在此基础上进行了抗性遗传方式的研究。试验结果表明: 经 16 代筛选, 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性倍数上升到 43.3 倍。筛选过程中, 棉铃虫 7 日龄幼虫的体重和成虫羽化率变化明显, 被选为确定筛选剂量的标准。敏感与抗性棉铃虫杂交, 正交、反交的显性度都小于 0、杂交过程中雌雄性比基本接近 1:1、假设抗性基因为单基因时的 χ^2 值较低, 因此, 初步认为棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性是常染色体单基因控制的不完全隐性遗传。

关键词: 棉铃虫; 转 Bt 基因棉; 抗性; 抗性遗传

中图分类号: S435.622

文献标识码: A

植物抗虫基因工程是通过遗传工程手段将抗虫基因导入植物, 并使其能稳定的遗传和表达。自 70 年代比利时 Montagu 实验室首次报道将 Bt δ -内毒素基因转入烟草以来, 转 Bt 番茄、马铃薯、烟草、棉花及玉米等已相继在国内外报道。最早获得转基因抗虫棉株的是美国 Agracetus 公司。1997 年美国 Monsanto 公司的“Bollgard”抗虫品种种植面积已达 180 万英亩, 占全美棉花总面积的 12%。近年我国的转基因棉花已取得很大的进展, 1992 年底中国农业科学院生物技术中心郭三堆研究组首先合成了 Cry1A 杀虫晶体蛋白结构基因, 又通过体外将 Cry1A 基因和非编码区调控序列加以重组, 并成功地转入棉株中; 中国农业科学院生物技术中心将毒素基因和改造后的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因重组构成双价抗虫基因, 并已经导入棉花中, 获得了一系列双价抗虫转基因棉^[1]。

转基因棉花越来越广泛地被应用于棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 这种重要的世界性害虫的防治中。目前, 对转基因棉花的研究主要在于品种开发、抗虫性、对天敌的影响及田间应用效果, 束春娥等^[2]还初步研究了 Bt 转基因棉花抗棉铃虫的毒性机理, 但关于棉花害虫对转 Bt 基因棉的抗性却很少研究。沈晋良等^[3]研究发现用转 Bt 基因棉叶饲喂对 Bt 有早期抗性的棉铃虫, 幼虫死亡率比敏感品系幼虫下降 16%~29%。在转基因棉花面积日益增加的今天, 密切关注棉铃虫对转 Bt 基因棉花的抗性的发展, 对合理种植转 Bt 基因棉花, 使之能够更好地发挥效力具有非常重要的理论和现实意义。因此, 我们就棉铃虫对转 Bt 基因棉花的抗性表现及抗性遗传方式进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试虫源：选用 1996 年采自河南省新乡县棉田、在室内用人工饲料饲养了 14 代而未接触任何杀虫剂的棉铃虫作为敏感种群。

棉铃虫在温度 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 60%~85%、光周期 16:8 (L:D) 的条件下饲养。幼虫在指形管中用人工饲料饲养，正常人工饲料配方参照梁革梅等^[4]，成虫在产卵笼中用 10% 糖水补充营养。

转 Bt 基因棉品种：中国农业科学院棉花研究所的“93R-4”；非转 Bt 基因棉品种：中国农业科学院棉花研究所的“中 12”。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选抗性种群的方法：采用饲喂法：在棉花蕾期、花期、花铃期及铃期分别采摘新鲜的转 Bt 基因棉嫩叶，混和，冷冻干燥后研磨成粉末，加入正常人工饲料中，混合均匀，用以饲喂棉铃虫。每代加入转 Bt 基因棉棉叶的量，以每代 7 日龄幼虫的体重抑制率（与对照种群相比）大于 50%，成虫羽化率约 70%，而又能保证种群可以繁殖下一代为标 准，随种群代别的增加，逐渐加大含量，使棉铃虫一直处于较高的选择压下。将初孵幼虫接入饲料中，直至化蛹、羽化。种群分为两组，一组称量 4 日龄、7 日龄、16 日龄幼虫体重、蛹重、蛾重，每处理接 10 头幼虫，重复 3 次；一组保种繁殖，并观测每代历期、化蛹率、羽化率，每处理接 100 头幼虫，重复 3 次。用正常人工饲料和混有“中 12”棉叶的人工饲料饲喂的棉铃虫作对照。

1.2.2 抗性倍数的测定方法：通过比较每代的体重抑制中浓度（median weight loss concentration, WLC_{50} ）确定抗性倍数。 WLC_{50} 的测定是将转 Bt 基因棉棉叶按一定比例加入正常人工饲料中，配成系列浓度，将孵化第 4 天的幼虫接到饲料中，7 天后检查结果，称量存活幼虫的体重。每处理接虫 10 头，重复 3 次，设正常饲料为对照。计算各处理的体重抑制百分率，用 Finney 机率值分析法，计算 WLC_{50} 值。

$$\text{体重抑制百分率} = 1 - \frac{\text{处理存活幼虫体重}}{\text{对照存活幼虫体重}} \times 100\%$$

1.2.3 抗性遗传分析：将转 Bt 基因棉抗性种群和敏感种群正交 ($R \text{♀} \times S \text{♂}$)、反交 ($S \text{♀} \times R \text{♂}$) 和回交 BC ($F_1 \text{♀} \times S \text{♂}$ 、 $S \text{♀} \times F_1 \text{♂}$)。成虫羽化时，将各种群的雌雄虫分开，按设计分选 25 对雌、雄虫放在同一产卵笼中交配，测定亲本 (R、S)、杂交代和回交后代的毒力曲线，计算 F_1 代显性度，对回交结果进行统计分析。据 Stone^[5] 的公式，计算显性度： $D = (2x_2 - x_1 - x_3) / (x_1 - x_3)$ ， x_1 、 x_2 、 x_3 分别代表抗性种群、杂交 F_1 代种群、敏感种群的 WLC_{50} 值的常用对数值。 $D = 1$ 为完全显性， $D = -1$ 为完全隐性， $D = 0$ 为中间型。

假设抗性为单个主基因控制，则回交后代在每个剂量下的期望反应为： $E(BC) = W(F_1) \times 0.50 + W(SS) \times 0.50$ 。 E 为某一剂量的期望值， W 为相应剂量下从毒力回归式计算的观察值^[6]。为进一步确定适合性，再进行 χ^2 分析。

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^R [(O - E)^2 / E]$$

O 为实际死亡虫数, E 为理论死亡虫数, R 为试验组数, 如 $\chi^2 > \chi_{0.05}^2(df = n - 1)$, 说明结果与期望不符合, 抗性不是单基因控制。

2 结果与分析

2.1 筛选选用剂量的变化

筛选的前 5 代是种群的适应阶段, 剂量没有变化, 此后根据试验方法中所列标准在一定代别增加转 Bt 基因棉棉叶的用量。棉铃虫对含转 Bt 基因棉的饲料逐渐适应, 到第 16 代时筛选剂量增加了 5.2 倍。取食含“中 12”饲料的对照种群在最初几代表现有幼虫体重下降的现象, 但棉铃虫很快适应, 此后再增加“中 12”的含量幼虫体重变化不大。

2.2 筛选种群各代体重、历期、化蛹率及羽化率的变化

筛选种群各代棉铃虫的体重、历期、化蛹率及羽化率的变化见表 1。从表 1 可以看出, 与对照相比, 棉铃虫取食含转 Bt 基因棉棉叶的饲料, 蛹重、蛾重及化蛹率都有所降低, 但在各代间差异不显著; 发育历期延长; 幼虫体重差异明显, 尤其是 4 日龄、7 日龄体重明显降低, 对照种群 7 日龄幼虫体重可达 21.43 mg, 而筛选种群的幼虫体重仅为对照的 8.45% ~ 38.17%, 因此选择 7 日龄体重变化作为确定每代筛选剂量的标准 (图 1); 羽化率也明显降低, 因此, 羽化率也被作为确定筛选剂量的标准 (图 2)。

表 1 转 Bt 基因棉种群棉铃虫各代体重、历期、化蛹率及羽化率

Table 1 Larval weights, durations, pupation rates and emergence rates of resistant cotton bollworm population to Bt transgenic cotton

代别 Generation	幼虫体重 Larval weight (mg)			蛹重 (mg)	蛾重 (mg)	历期 (d)	化蛹率 (%)	羽化率 (%)
	4 日龄 4-day	7 日龄 7-day	16 日龄 16-day	Pupal weight	Moth weight	Growth period	Pupation rate	Emergence rate
CK	1.72	21.43	344.20	318.82	197.74	33	95.78	96.52
1	0.81	3.92	218.3	268.10	158.00	36	94.81	69.84
2	0.60	2.21	85.5	245.00	154.61	37	98.32	63.32
3	0.42	2.11	123.84	256.82	150.37	34	92.78	70.61
4	0.48	2.41	199.06	271.90	175.30	37	78.79	72.90
5	0.54	2.63	170.53	245.63	151.72	37	77.77	80.71
6	0.44	1.81	68.16	240.61	110.89	40	90.35	86.70
7	0.54	2.86	214.55	262.35	176.27	39	98.01	88.14
8	0.76	4.98	296.37	276.47	188.06	40	94.74	91.65
9	0.54	5.26	238.35	243.14	153.29	40	91.07	78.04
10	0.54	5.78	245.61	221.69	150.14	39	95.33	85.74
11	0.65	7.54	259.41	231.12	142.80	40	89.38	81.00
12	1.17	8.18	253.67	265.48	168.74	36	92.33	72.56
13	1.02	7.47	254.97	258.46	157.53	37	97.33	77.40
14	1.12	7.82	323.01	277.38	165.10	38	94.33	65.37
15	0.72	4.57	199.09	268.92	167.17	38	98.00	76.87
16	0.58	3.65	214.05	261.46	168.99	38	89.67	81.04

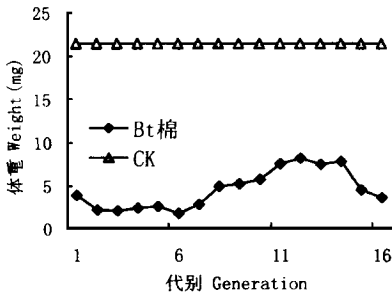


图 1 转 Bt 基因棉种群 7 日龄幼虫体重

Fig. 1 The weight of 7-day old larval cotton bollworm in Bt transgenic cotton population

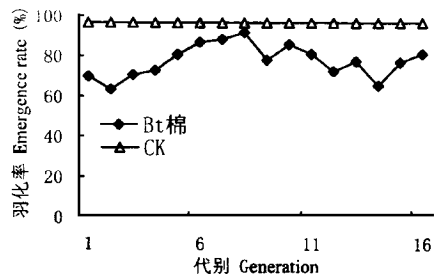


图 2 转 Bt 基因棉种群的羽化率

Fig. 2 The emergence rate of Bt transgenic cotton population

2.3 筛选种群相对抗性的变化

图 3 是用转 Bt 基因棉筛选的种群的相对抗性倍数的变化。经过 16 代筛选后，棉铃虫已经对转 Bt 基因棉花产生抗性，抗性倍数为 43.3 倍。采用曲线模拟的方法，模拟种群的抗性增长率，其 Gompertz 型曲线方程为：

$$\text{转 Bt 基因棉种群: } y = 0.99 \times 1.0125^x \pm 11.65 \quad (r = 0.9215)$$

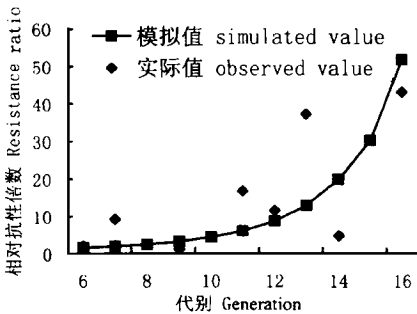


图 3 转 Bt 基因棉花筛选种群的相对抗性倍数变化

Fig. 3 The relative resistance ratios of Bt transgenic cotton population

2.4 棉铃虫对转 Bt 基因棉抗性的遗传方式

根据亲代、杂交代及回交代对转 Bt 基因棉的抑制效果、毒力曲线和 WLC_{50} 值 (表 2)，计算出正交和反交的显性度分别为 $D(RS) = -0.31$ ， $D(SR) = -0.25$ ，小于 0；绘制亲代、杂交代的毒力曲线图 (图 4)，从图中也看出 F_1 代的毒力曲线偏向 S 方。杂交试验中棉铃虫的雌雄性比基本不变，接近 1:1。通过 χ^2 分析，理论值与期望值基本符合，实际测定的回交后代的毒力曲线与期望曲线吻合较好 (图 5)。因此，初步认为棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性是常染色体单基因控制的不完全隐性遗传。

表 2 棉铃虫亲代、杂交代及回交代对转 Bt 基因棉的反应

Table 2 The response of cotton bollworm from parental, cross and backcross generations to Bt transgenic cotton

种群 Population	b 值	WLC_{50} (g/100 g)	相对抗性倍数 Resistance ratio	χ^2
SS	0.8572	0.50	-	-
RR	0.7444	18.65	37.30	-
F_1 (R×S)	1.8556	5.32	10.64	-
F_1 (S×R)	1.7633	4.78	9.56	-
BC (RS×SS)	1.0110	1.03	2.06	0.03
BC (SS×RS)	1.2678	1.88	3.76	0.01
BC (SR×SS)	1.2278	1.40	2.80	0.10

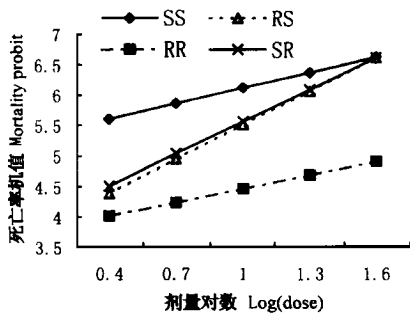


图4 棉铃虫对转基因棉的亲代、杂交交代毒力曲线

Fig. 4 The toxicity lines of cotton bollworm of parental and cross generations

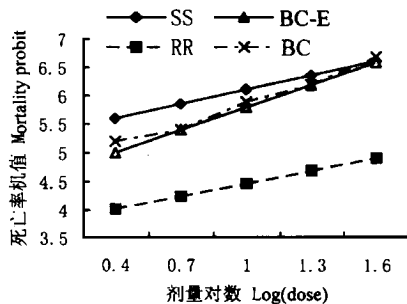


图5 棉铃虫 SS * RS 实际曲线与期望曲线的拟合

Fig. 5 The fitness of observed and expected curve

3 讨论

转基因植物具有育种期短，目的性强、不污染环境等许多优点，但现在却已经发现了对转基因作物有抗性的害虫。据报道，美国明尼苏达州、依阿华州和堪萨斯州的大田玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 已对转 ICPs (insecticidal crystal protein) 基因玉米产生抗性；根据 Ramachandran 等^[7]的研究，转基因芸薹可以杀死所有敏感小菜蛾个体，而抗性小菜蛾在转基因和非转基因芸薹植株上幼虫的存活、化蛹率、蛹重、羽化率等都没有明显差异。

已有的研究结果表明鳞翅目、鞘翅目和双翅目的多种昆虫对生物制剂和转基因植物均可产生抗性，鳞翅目昆虫更容易产生抗性。如 Gould 等^[8]筛选烟芽夜蛾对 Cry1Ac 的抗性，经 19 代后抗性上升到 500 多倍，进一步筛选其抗性高达 10 000 多倍。本文的研究结果表明，经 16 代室内筛选，棉铃虫对转 Bt 基因棉可以产生抗性。棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性水平不稳定，有起伏跳动的现象，这可能与害虫对生物产品的反应个体间差异较大、棉花中其它次生代谢物质对棉铃虫的抗性上升有一定的影响等因素有关。但筛选后抗性的总体趋势是上升的，经曲线模拟，符合 Gompertz 型曲线，相关系数达到 0.9 以上。

本文研究结果表明棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性遗传方式为常染色体、不完全隐性、单基因遗传。这与 McGaughey 和 Beeman^[9]在印度谷螟对 Bt 的抗性是常染色体部分隐性或不完全隐性遗传，是单基因遗传或涉及很少几个位点中的报道是一致的。但在对烟芽夜蛾的研究中，Sims 和 Stone^[10]发现，烟芽夜蛾对 Cry1Ab 的抗性是常染色体部分显性，为多因子加性遗传，对 Cry1C 的抗性是常染色体不完全显性遗传^[11]。Chaufaux 等^[12]认为筛选的抗 Cry1C 的棉贪夜蛾对 Cry1C 是部分显性遗传，由多基因控制。这些结果表明抗 Bt 昆虫种群的抗性遗传方式是复杂的，随昆虫种类和杀虫晶体蛋白 (ICP) 类型不同而变化。

参 考 文 献 (References)

[1] 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹等. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学, 1999, 32 (3): 1~7

- [2] 束春娥, 刘资金, 柏立新等. Bt 转基因棉花抗棉铃虫毒性机理研究. 棉花学报, 1996, 8 (4): 219~222
- [3] 沈晋良, 周威君, 吴益东等. 棉铃虫对 Bt 生物农药早期抗性及其与转 Bt 基因棉抗虫性的关系. 昆虫学报, 1998, 41 (1): 8~14
- [4] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 1999, 25 (2): 15~17
- [5] Stone B F. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. Bull. W. H. O., 1968, 38: 325~326
- [6] Georgioui G P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. Exp. Parasitol., 1969, 26: 224~255
- [7] Ramachandran S, Buntin G D, All J N *et al.* Survival development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. J. Econ. Entomol., 1998, 91 (6): 1 239~1 244
- [8] Gould F, Anderson A, Reynolds A *et al.* Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Econ. Entomol., 1995, 88 (6): 1 545~1 559
- [9] McGaughey W H, Beeman R W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol., 1988, 81 (1): 28~33
- [10] Sims S R, Stone T B. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. J. Invertebr. Pathol., 1991, 57: 206~210
- [11] Gould F, Martinez-Ramirez A, Anderson A *et al.* Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 7 986~7 990
- [12] Chaufaux J, Müller-cohn J, Buisson C *et al.* Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 1997, 90 (4): 873~878

Study on screening and inheritance mode of resistance to Bt transgenic cotton in cotton bollworm

LIANG Ge-mei, TAN Wei-jia, GUO Yu-yuan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: Laboratory screenings were conducted for obtaining resistant population of cotton bollworm (CBW) *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Bt transgenic cotton. The mode of inheritance of resistance in this population was also studied. The results showed that after selection for 16 generations, the WLC₅₀ (mean weight loss concentration) of CBW to Bt transgenic cotton was 43.3 times as many as that of the 1st generation. Owing to that the weights of the 7-day old larvae and emergence rate of adults, when fed on diets containing Bt transgenic cotton, changed significantly, these two characters were regarded as the resistance standards for screening in this study. The degrees of dominance of cross and reciprocal-cross between the resistant and susceptible populations were less than 0 according to Stone's formula. The sex ratios of the descendants of the cross and backcross groups were 1:1 approximately. The χ^2 values were low as if the resistance of CBW to Bt transgenic cotton was controlled by a single gene. It is suggested that the inheritance of resistance to Bt transgenic cotton in CBW is controlled by single autosomal incomplete recessive allele.

Key words: *Helicoverpa armigera* (Hübner); Bt transgenic cotton; resistance; resistance inheritance mode