

904399

浙江大学

硕士学位论文



Bt 水稻花粉对家蚕不同品种的毒力测定和
生物学影响研究

姓 名 袁志东

指导教师 姚洪涓 副教授

叶恭银 教授

学科(专业) 农业昆虫与害虫防治

所在学院 农业与生物技术学院

提交日期 二〇〇六年六月

中国·杭州

致 谢

硕士论文顺利完成的此时此刻我非常高兴，在庆幸的同时也感觉到时间的紧迫和仓促，两年前的今天，也是我来到这里的时刻，我充满了憧憬、期望与希望，两年后的今天，在论文完成之时，我即要离开这里。

非常感谢我的导师姚洪渭副教授和叶恭银教授！从论文选题、设计到工作开展，两位老师都给予了全方面的关心和指导；同时，两位老师在为人处事等方面也给予我潜移默化的影响，两年时间里，我不仅学会了学习与科研，更学会了做事，做人的道理。

姚老师对本专业知识的把握和对科研的刻苦、执着与追求，使我钦服；还有他平时对我兄弟般的关爱，让我感同深受。

叶老师广博的学识、刚正求是的学风、尖锐敏捷的思路、兢兢业业的精神、勤奋忘我的品质，催我奋发向上，不敢有丝毫懈怠。

胡老师的和蔼可亲和对学问的严格要求，让我领略到学术科研的真谛。

感谢所有在我论文完成过程中帮助我的老师，他们是本所的程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、施祖华教授、娄永根教授、沈志成教授、祝增荣研究员、唐启义研究员、蒋明星副教授、余虹副教授和马云高级实验师等对我的关心指导！

在平时科研及日常生活中，还得到了众多学长、同学和朋友们的关心与帮助，他们是陈茂博士、张忠博士、吴国星博士、黄诚华博士，博士生李凯、石宇、董胜张、李芳芳、杨琼、吴玛丽、慎小晶、张倩倩、朱家颖，以及硕士生陈亮、王慧、谭红、卢新民、方琦、花小燕、徐鹏、张广林、田俊策、董卉、李国钧和左文等。江西农业大学植保系硕士生王欢、山西农业大学林学院硕士生郭建洋和技术员陈威等为本论文的实验提供了不少便利和帮助。在此一并谢过！

此外，对我一直以来在物质上和精神上默默支持我的家人致以深深的谢意，没有他们的支持，我不可能有进步的精神动力，特此致谢！

作 者

2006年5月华家池畔

中文摘要

本论文测定了家蚕不同品种对转 Bt 基因水稻——华池 2000B1 花粉的敏感性，并就转 Bt 基因水稻花粉对家蚕夏秋杂交种——丰一×五四及其原种亲本等的生物学影响作了较系统的研究，结果如下：

1. 家蚕不同品种对转 Bt 基因水稻花粉的敏感性

除杂交种——丰一×五四外，家蚕不同品种对华池 2000B1 和 Bt 纯蛋白 (Cry1Ab) 均较敏感，其中以菁松初孵幼虫对华池 2000B1 花粉的敏感性为最高，丰一×五四的敏感性为最低，前者对华池 2000B1 花粉的 LC_{50} 值仅为后者的 1/10。家蚕不同品种幼虫经 Bt 水稻花粉 (0.05g 花粉/g 饲料; $1.19 \pm 0.10 \mu\text{g}$ 杀虫蛋白/g 饲料) 喂食 48h 后，存活曲线呈现明显差异性变化，其中除丰一×五四的存活曲线与非 Bt 水稻花粉处理的无显著差异外，其余家蚕品种的幼虫存活曲线均与非 Bt 水稻花粉处理的有极显著差异。丰一×五四幼虫经 Bt 水稻花粉处理后的存活率极显著高于其亲本和春蚕杂交种——菁松×皓月及其亲本，即丰一×五四对 Bt 水稻花粉的抗/耐性相对较强。家蚕不同品种幼虫经相同剂量非 Bt 水稻花粉喂食后，其存活曲线多与对照无显著差异，即非 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫的存活无显著不利影响。

2. 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕不同品种的生物学影响

在室内条件下，以夏秋蚕杂交种——丰一×五四及其亲本原种为对象，选择对丰一×五四幼虫的亚致死剂量华池 2000B1 花粉浓度 (0.002g/ml 和 0.050g/ml)，分别对不同品种初孵幼虫进行连续饲喂，直至化蛹。Bt 水稻花粉，特别在较高浓度处理下，可导致家蚕幼虫死亡率显著增高、取食量显著减少、发育历期显著延长、低龄幼虫体重明显降低、以及化蛹率、蚕茧质量、羽化率和产卵量等显著下降，而腹中残余卵量显著增高等。这表明室内持续饲喂亚致死华池 2000B1 水稻花粉，可对家蚕存活、生长发育和蚕茧性状等指标产生显著的不利影响。

关键词：Bt 水稻；花粉；家蚕；品种；生物测定；生物学影响

Abstract

The susceptibility of the different varieties of domestic silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombyxidae) to the pollen of Huachi2000B1, a transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) rice line was measured using bioassay method, and the effects of Bt rice pollen on the biological characteristics of Fengyi×Wusi, a hybrid variety for summer and autumn rearing, and its parent races were also studied under the laboratory conditions. The results are shown as follows:

1. Susceptibility of different varieties of *B. mori* to Bt rice pollen

Except for Fengyi×Wusi, the neonates from the varieties of *B. mori* were relatively sensitive to both Bt rice pollen and purified Cry1Ab protein. The susceptibility of Jingsong larvae to Bt rice pollen was the highest, contrasted with the lowest that of Fengyi×Wusi, which the LC₅₀ value of the latter was only about 1/10 of that of the former. After feeding with Bt rice pollen at the concentration of 0.05 g pollen/g artificial diet, i.e. $1.19 \pm 0.10 \mu\text{g}$ Cry1Ab/g artificial diet, for 48 h, survival curves of the larvae of different varieties of *B. mori* showed a obvious different variation pattern among the varieties. There was no distinct difference in the larval survival curves of Fengyi×Wusi between Bt rice pollen and non-Bt rice pollen treatments. In contrast, survival curves of the larvae of other varieties who exposed to Bt rice pollen were highly distinct different from those who exposed to non-Bt rice pollen. Larval survival rate of Fengyi×Wusi was highly significantly higher than that of other varieties including its parental races, such as Fengyi and Wusi, and Jingsong×Haoyue, a hybrid variety of spring rearing, and its parental races, Jingsong and Haoyue after exposure to Bt rice pollen, which indicated that Fengyi×Wusi was much more resistant or tolerant to Bt rice pollen than other varieties. There was no distinct difference in larval survival curves of different varieties between non-Bt rice pollen exposure and the control, which suggested that non-Bt rice pollen at such a dosage probably posed no marked impact on the survival of silkworm larvae.

2. Biological effects of Bt rice pollen on different varieties of *B. mori*

The neonates of Fengyi×Wusi and its parental races were continuously exposed to the pollen of Bt rice, Huachi2000B1 and its parent variety deposited on the mulberry leaves at the concentrations of 0.002g/ml and 0.050g/ml, the sublethal dosage for Fengyi×Wusi larvae, until pupation, respectively. The treatment of Bt rice pollen, especially at the concentration of 0.050g/ml, resulted in significantly higher larval mortality, longer developmental time, less body weight of early instar larvae, lower pupation and emergence rate, poorer cocoon quality, lesser number of eggs laid and more number of eggs unlaidd per female. It suggested that high concentration of Bt rice pollen has dramatically adverse effects on biological characteristics of the silkworm such as larval survival, growth and development, and cocoon traits under laboratory conditions.

Key Words: Bt rice; pollen; *Bombyx mori*; variety; bioassay; biological effect

前 言

自 1983 年世界首例转基因植物培育成功, 标志着人类利用转基因技术改良农作物的开始。1986 年转基因农作物获得批准进入田间试验, 1994 年第一例转基因作物在美国获得批准商业化种植。此后, 全球转基因作物应用取得了突飞猛进的发展。2005 年全球转基因作物种植面积达到 9000 万公顷, 是 1996 年约 170 万公顷的 53 倍。我国 2005 年转基因作物种植面积达到 330 万公顷, 成为继美国、阿根廷、巴西和加拿大之后种植转基因作物面积最大的国家 (James, 2005)。2005 年, 伊朗率先启动 Bt 水稻的商业化进程, 种植 Bt 水稻约 4,000 hm^2 , 为其翌年全面商业化种植提供种子储备。中国作为当今世界上最大的稻米生产和消费国, 亦正处于转基因水稻商业化抉择的关键时刻。目前, Bt 水稻的商业化前景虽然十分广阔, 但是也同时面临着释放环境之后的生态安全性问题, 其中包括 Bt 水稻花粉对非靶标重要经济昆虫——家蚕 (*Bombyx mori*) 的潜在影响。

我国的桑蚕主产区多为重要的水稻产区, 而且这些地区的主要传统作物种植模式是桑稻间种。因此, 转 Bt 基因水稻花粉有可能随风飘落于稻田附近桑园的桑叶上。家蚕通常对 Bt 毒蛋白十分敏感, 当取食含 Bt 毒蛋白的转基因水稻花粉后, 即可对家蚕存活、生长发育和结茧等产生不利影响, 从而可能对当地养蚕业和全国蚕丝绸业造成严重后果。至今, 国内外有关转 Bt 基因作物花粉对家蚕影响的报道相对较少, 且多集中对单一品种的生物学影响研究。如王忠华等 (2001) 报道家蚕新杭 \times 白云幼虫在室内连续饲喂人工抖落有转 *cryIAb* 基因水稻 (克螟稻) 花粉的桑叶至 3 龄后, 其死亡率无显著差异, 而体重有极显著变化。李文东等 (2002) 以转 *cryIAc* 基因棉花、转 *cryIA+CpII* 双价基因棉花和转 *cryIAb* 基因玉米花粉喂食丰一 \times 五四 1 龄幼虫 72h 后, 对其生长发育与繁殖无显著影响。蒋彩英 (2004) 研究表明在室内持续饲喂转 Bt 基因水稻品系——华池 2000B1 花粉对家蚕秋用品种——秋丰 \times 白玉的存活、生长发育和蚕茧性状等指标均有极为显著的负面影响。

由于我国是栽桑养蚕、缫丝织绸的发祥地, 蚕丝业发展已有五千年的悠久历史, 家蚕的种质资源极为丰富, 因此, 开展转 Bt 基因水稻花粉对家蚕不同品种的生物安全研究, 对于 Bt 水稻的商业化种植规划以及家蚕的抗性育种与品种布颇具指导意义与实用价值。有鉴于此, 本论文拟开展转 Bt 基因水稻花粉对家蚕不同品种的毒性以及生物学影响的研究, 以探明转 Bt 基因水稻花粉对不同家蚕品种的生物效应, 为促进我国转基因抗虫水稻的产业化发展以及对家蚕品种资源的安全管理提供理论和技术基础。

第一章 文献综述

1 转基因抗虫作物的研究现状

虫害已成为世界粮食增长的主要限制因素之一。全球每年因使用化学杀虫剂防治农业害虫的费用高达100亿美元，即使如此，每年的虫害损失仍高达数千亿美元，占总产量的14%。在我国，因虫害水稻减产在10%以上，小麦减产近20%，棉花减产在30%以上，总计损失达60~100亿元（James, 2005）。过量使用化学杀虫剂能造成不可再生资源的巨大浪费和不可接受的环境后果，如食物链污染、水资源污染、食品中的农药残留等，从而导致农业系统的非持续发展（Hilder等, 1999）。世界杀虫剂主要用户欧盟的使用量在逐渐减少，但我国化学杀虫剂用量仍呈上升趋势（叶恭银, 2001）。

微生物杀虫剂在一定程度上克服了化学杀虫剂的缺点，但因其见效慢、杀虫谱窄、受环境条件影响大而限制应用。微生物杀虫剂的用量仅占整个杀虫剂市场的3%（Hilder等, 1999）。目前仅在温室和森林中广泛使用，在一年生作物上使用较少。通过常规的育种手段获得抗虫作物品种已陷入了育种时间长，亲本资源缺乏的困境。

现代分子生物学特别是植物基因工程的迅速发展，为控制害虫提供了新途径。利用基因工程手段培育抗虫作物新品种，既扩大了可利用的潜在的基因库，又缩短了育种时间且可同时导入多个优良基因；培育的抗虫新品种既可控制在任何时期内、任何部位上发生的虫害，又对其它生物无毒害；而且在植株内部表达杀虫蛋白，避免了由于杀虫剂降解不得不多次喷洒的问题，减少了环境污染（刘志诚等, 2000）。自1983首次把抗虫基因转入植物以来，这项新技术在培育抗虫作物方面进展很快，已成为植物基因工程研究和应用的热点。

1.1 抗虫基因的研究

目前，已克隆得到的抗虫基因有很多种，根据它们的来源可分为三类：第一类是从细菌中分离出来的抗虫基因，主要是苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*）毒素蛋白基因；第二类是从植物组织中分离的抗虫基因，主要为蛋白酶抑制剂（protein inhibitor, PI）基因、淀粉酶抑制剂（starch inhibitor, SI）基因和外源凝集素（Lectin）基因等；第三类是从动物体内分离的毒素基因，主要是蜘蛛毒素基因和蝎毒素基因等（刘志诚等, 2000）。

1.1.1 苏云金杆菌晶体蛋白（*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein, Bt-ICP）基因

Bt-ICP是一类分子量130~160KD的蛋白质，在昆虫中肠被降解成60~65KD带有N-末端具有杀虫活性的毒性多肽分子，并与肠道中的氨肽酶N和钙粘着蛋白（cadherin）结合（Crickmore等, 1998）。随后插入到细胞膜上并形成穿孔，使细胞膜周质和中膜腔之间的离子平衡被破坏，引起细胞肿胀甚至裂解，从而导致昆虫停止进食而最终死亡。

Bt基因是世界范围内使用最为广泛的抗虫基因。自Schnepf等(1981)从苏云金杆菌库斯塔亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)变种HD-1菌株中克隆出第一个Bt毒素基因以来,到2002年为止,国际上已有230多种编码 δ -内毒素的基因被克隆,并进行了序列分析。根据Crickmore等(1998)确立的分类规则,把它们分成38群、72亚群、116类和235个亚杀虫蛋白基因。Feitelson等(1992)根据蛋白质的结构相似性及所编码蛋白的抗虫谱,把已克隆的Cry分为6大类:Cry I基因抗鳞翅目(Lepidoptera)昆虫、Cry II基因抗鳞翅目和双翅目(Diptera)昆虫、Cry III基因抗鞘翅目(Coleoptera)昆虫、Cry IV基因抗双翅目昆虫、Cry V基因抗鳞翅目和鞘翅目昆虫和Cry VI基因抗线虫。1997年,孙明等在国际GenBank中首例登记我国分离克隆的Cry IAC基因以来,国内已有15个Bt基因克隆登记获得专利。最近姚江(2003)克隆的Bt杀虫基因被正式命名为*cryIAC14*,标志着我国Bt基因克隆分离取得了较好的进展。

Vaeck等(1987)用基因工程方法培育了首例抗虫植物,是经修饰的Bt基因在烟草中的成功表达。早期的转Bt基因作物,毒素不能高效地表达,且不能有效地杀死靶标害虫。表达量低的原因是原核基因在植物细胞内转录时mRNA不稳定易降解,翻译效率低(Barton等,1987)。后来对Bt基因进行分子改造,提高其表达量,包括:(1)引入强启动子和增强子对Bt基因加以改造或重组,如用CaMV 35S启动子融合毒素基因,通过农杆菌Ti质粒转化系统转入烟草,获得表达量较高的转基因烟草;(2)使用植物偏爱的密码子,如Perlark等(1990)将Bt基因的5'端活性必需部分的序列用植物偏爱的密码子代替,然后导入植物中间载体发现表达水平得到极大提高;(3)对Bt毒素基因进行人工拼接和重组,消除一些不稳定元件,提高表达的稳定性;(4)灭活内源启动子,提高蛋白的表达量,从而提高工程植物的抗虫性(朱新生等,1997)。目前的表达量比天然Bt基因高出100倍以上,且已被成功转入许多作物并在大田条件下得到高效表达。这些作物除烟草外,还包括番茄、棉花、玉米、水稻、花生、油菜、大豆、青花菜、胡桃、落叶松、白杨、甘蔗、苹果、鹰嘴豆、苜蓿等(Hilder等,1999)。我国也已完成类似的基因工程改造工作,并导入烟草、棉花和水稻等(李向辉等,1998)。

1.1.2 蛋白酶抑制剂(Proteinase inhibitor, PI)基因

蛋白酶抑制剂是1938年发现的一类植物天然抗虫物质,主要存在于植物的储藏器官中,当蛋白酶抑制剂(PI)被昆虫摄食后在消化道内能与蛋白消化酶相互作用,形成酶-抑制剂复合物(EI),削弱或阻断消化酶对蛋白质的水解作用,从而影响昆虫体内蛋白质的正常消化;同时,EI能刺激蛋白酶的过量分泌,通过神经系统的反馈,使昆虫产生厌食反应,最终导致昆虫的非正常发育和死亡(朱新生等,1997)。目前,按PI基因作用特异性可划分为4类:丝氨酸蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂(曲晓华等,2003)。其抗虫机理在于其与昆虫消化道内的蛋白质消化酶相互作用,产生一种复合物,与昆虫消化道内的蛋白酶相互作用,削弱或阻断蛋白酶对食物中蛋白质的消化。同时,

能使昆虫产生厌食反应，最终导致昆虫的非正常发育和死亡（Hilder等，1999）。最引人瞩目的是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因、马铃薯蛋白酶抑制剂基因和水稻巯基蛋白酶抑制剂基因。豇豆胰蛋白酶抑制剂（Cowpea trypsin inhibitor, CpTI）是一类由80个左右氨基酸残基构成的小分子多肽，属于丝氨酸蛋白酶抑制剂类。它具有广谱杀虫性，对鳞翅目、鞘翅目及直翅目的许多昆虫有毒性。目前，已克隆了CpTI基因，并获得了转基因的烟草植株（Hilder等，1987）。CpTI在转基因烟草植株内能稳定遗传和正确的表达，表达量可占可溶性蛋白的0.9%。用烟芽夜蛾（*Heliothis virescens*）幼虫进行实验发现，只要CpTI的表达量达到可溶性蛋白的0.5%以上的植株均表现出明显杀虫性（Hilder等，1987）。除CpTI外，还有马铃薯蛋白酶抑制剂（Potato inhibitor, PI），也属于丝氨酸蛋白酶抑制剂类，杀虫谱与CpTI相似。根据其分子特点可分为两个家族：①PI-I家族，其成熟肽单体分子量为8.1KD，只有一个活性中心，主要抑制胰凝乳蛋白酶；②PI-II家族，其成熟肽单体分子量为12.3KD，有二个活性中心，可分别抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。经遗传转化，已得到了转基因的烟草、水稻、棉花、杨树以及甘蓝等（李向辉，1998）。水稻巯基蛋白酶抑制剂（Oryzacystatin, OC）对赤拟谷、米象、马铃薯甲虫、豇豆象等害虫的消化酶有明显的抑制作用，与CpTI有明显互补杀虫作用。目前已克隆到了OC基因的编码102个氨基酸的小肽，分子量约为11.5KD的cDNA序列（刘志诚等，2000）。

1.1.3 淀粉酶抑制剂(α -amylase inhibitor, α -AI)基因

在植物天然防御机制中，淀粉酶抑制剂对抵抗外侵病虫能发挥作用，它的杀虫机理也就在于其能抑制昆虫消化道内 α -淀粉酶的活性，使食入的淀粉无法正常消化水解，阻断了主要的能量来源；同时， α -AI和淀粉消化酶结合形成EI复合物，也会刺激昆虫的消化腺过量分泌消化酶，通过神经系统的反馈，使昆虫产生厌食反应，导致发育不良或死亡。将三种淀粉酶抑制剂（ α -AI-Pv, WNAII-1和14K-CL）基因导入烟草、豌豆等植物的研究表明，淀粉酶对某些鳞翅目和鞘翅目害虫抗性以来自小麦和菜豆的淀粉酶抑制剂特性最突出（刘志诚等，2000）。Carbonero等（1993）研究表明，取食转WAAI基因烟草后，鳞翅目幼虫的死亡率提高了30%~40%。Shade等（1994）将由菜豆的 α -AI基因转入豌豆，使之在籽粒中高效表达，转基因豌豆籽粒对豇豆象有明显抗性；Ishimoto（1996）等在azuki属的豆类植物中也得到同样的结果。但由于 α -AI具有抑制哺乳动物 α -淀粉酶活性的作用，因此，限制了其在生食作物基因工程中的应用。

1.1.4 外源凝集素（Lectin）基因

外源凝集素一种糖蛋白，Mn, Ni, Fe, Cu和Ca等二价金属离子主要存在于植物细胞的蛋白粒中（田超等，1995）。当Lectin被昆虫吞食至消化道时就释放出来，并与肠道周围细胞

壁膜糖蛋白结合,影响营养物质的消化吸收;同时,可在昆虫消化道内诱发病症,使害虫得病甚至死亡(Hilder等,1999)。Lectin基因对鳞翅目、同翅目、半翅目等昆虫具有良好的抗性。在育种上应用较多的外源凝集素(Lectin)基因类型主要有:豌豆外源凝集素(PL)、表胚外源凝集素(WGA)、雪花莲外源凝集素(GNA)等,并已在小麦、棉花、马铃薯等多种作物上研究利用(候丙凯等,2000)。

目前,已经克隆了几个对害虫抗性较好的凝集素基因,经农杆菌介导或微弹轰击等方法导入作物中。豌豆凝集素(pea lectin, P-lectin)基因是第一个用于基因工程的凝集素基因,它能结合葡萄糖基/甘露糖基。转P-lectin基因的烟草对烟芽夜蛾幼虫有显著抗性(Hilder等,1999)。随后,Boulter等(1990)获得了对昆虫毒性更强的麦胚凝集素(wheatgerm agglutinin, WGA)和菜豆凝集素(phaeohaemagglutinin, PHA),它们能特异地与几丁质结合。WGA基因被导入玉米后,对欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)和叶甲(*Doabrtica*)有一定抗性(Hilder等,1999)。自Hilder等(1995)提出稻飞虱、蚜虫一类刺吸性害虫可被某种外源凝集素控制的观点以来,转凝集素基因工程研究得到迅速发展。雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)结合受体是甘露糖残基,而人及哺乳动物中甘露糖残基很少,因而,对人的副作用小。GNA对于蚜虫、叶蝉、稻飞虱等同翅目刺吸性害虫具有极强的毒性,而蛋白酶抑制剂和其它的外源凝集素无此效应(Tang等,1999)。转GNA基因烟草,能抑制桃蚜(*Cyuzus persicae*)的生长,转GNA基因马铃薯显著降低桃蚜的繁殖力(Hilder等,1999)。

1.1.5 其它酶(Enzymes)基因

几丁质酶(chitinase)能破坏害虫消化道上皮保护层,导致肠道损伤,控制这种酶的基因也是抗真菌病的有用基因(Hilder等,1999)。转几丁质酶基因烟草增强了对一些鳞翅目昆虫抗性(Ding等,1998);胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase)对墨西哥棉铃象甲(*Anthonomus grandis*)有很强的毒性(Hilder等,1987);脂肪氧合酶(lipoxygenase)对褐飞虱有抗杀作用(李向辉等,1998)。

1.1.6 微生物营养期杀虫蛋白(Vegetative insecticidal proteins, VIPS)基因

一种发现理想杀虫蛋白的方法是大量筛选微生物培养液(基),从蜡质杆菌(*Bacillus cereus*)营养期的培养液中分离到两种蛋白质Vip1和Vip2,它们共同作用对玉米根螟有极强的毒性。从苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)营养期的培养液中分离到一种蛋白质Vip3A,对地夜蛾属(*Agrotis*)和贪夜蛾属(*Spodoptera*)的幼虫有极强的活性,其活性与Bt内毒素相似(Schuler等,1998)。

1.1.7 动物毒素基因

目前研究较多的主要是蝎毒素和蜘蛛毒素两类。蝎毒素按其作用对象可分为三类：哺乳动物神经毒素（MTx）、甲壳动物神经毒素（CTx）和作用于昆虫细胞膜离子通道的昆虫神经毒素（ITx）（Zilberberg等，1996；吉永华等，1993，1994），由于蝎毒素专一作用于昆虫，而对哺乳动物无害或毒性很小，因此可开发此类毒素作为一种高效生物杀虫剂。很多种蜘蛛在捕食或防卫时能从其螯爪末端排放毒液，称之为蜘蛛毒素。根据结构上的特点，可把这些蜘蛛毒素分为两大类：一类是蛋白质与多肽类毒素；另一类是分子量较小的非肽类毒素。体外实验表明，这种小肽能够杀死多种对农作物有害的昆虫。目前，这两类毒素基因都得到克隆和转化。捕食螨（Tomalski等，1991）和蝎子（Stewart等，1991）的神经毒素基因已被成功转入植物并得到表达，提高了作物的抗虫效果。

1.2.转基因水稻的转化方法

1.2.1 农杆菌介导法.

自Zembryski等（1983）利用农杆菌转化烟草获得首例转基因植株以来，该方法在双子叶植物中得到了广泛应用。由于单子叶植物不是农杆菌的天然寄主，对农杆菌反应不敏感，曾一度限制了其在单子叶植物中的应用。进入20世纪90年代以来，随着人们对农杆菌侵染机理的了解和转化技术的改进，相继在多种单子叶植物上取得了成功。Chan等（1993）和Hiei等（1994）利用此法转化粳稻获得转基因植株；Rashid等（1996）和瞿文学等（2000）在籼稻上也取得了成功。然而由于水稻品种间的遗传差异大且其对转化反应的基因型依赖性很强，从而增大了转化技术的复杂性和随机性。农杆菌介导的外源基因转化是农杆菌菌株与植物细胞之间相互作用的结果，凡是能影响植物细胞应答能力和农杆菌侵染能力以及转化子再生能力的各种因素都会对其转化效果产生影响。因此，农杆菌转化效率的提高依赖于对各种影响因子的优化和转化条件的改善。近年来，农杆菌转化单子叶植物之所以较成功，主要得益于以下几项技术的突破（易自力等，2001）：一是使用了Vir区基因活化物。因单子叶植物特别是禾谷类作物愈伤细胞所分泌的这类物质不足以形成有效的信号而诱导农杆菌Vir区基因的表达，而在共培养基中添加一定量的酚类化合物后能取得很好的效果，因此在水稻的转化中添加一定量的乙酰丁香酮至关重要。二是选用了超毒力的农杆菌菌株和超二元载体系统，而增强了农杆菌的侵染能力和T-DNA的整合能力，较好地解决了单子叶植物对农杆菌转化敏感性差的问题。三是选用了愈伤组织胚性细胞作为转化受体材料，因这些细胞处于较好的脱分化状态，有较强的分裂能力和再生能力，DNA的合成能力强，有利于T-DNA的整合。

1.2.2 基因枪转化法

该方法取得成功的实例最多,已成为单子叶植物最主要的转化方法,使许多重要的禾本科作物转化都获得了成功。基因枪法转化水稻周期短,不受外植体限制。幼胚、成熟胚、分生组织及胚性愈伤组织等多种外植体适于基因枪转化法。Oard(1996)首先应用基因枪法得到了转基因水稻愈伤组织,并检测了GUS基因的瞬时表达。Christou等(1991)率先应用基因枪法将*bar*基因转入水稻幼胚,获得可育的转基因植株,并优化了各种参数,大大提高了转化效率。

1.2.3 PEG 法

侯文胜(2002)应用此方法已将一些重要的农业性状基因导入了水稻。此法需要的设备简单,易于操作,成本低。但由于原生质体的分离困难,再生频率低,培养难度大,周期长,后代变异大,且受基因型限制。因而这一方法的普及受到限制。目前,该方法的应用趋向减少。

1.2.4 电激法

Toiyiyama等(1988)首先应用电激法获得卡那霉素抗性的转基因水稻植株。Matsuki(1988)将*GUS*, *HPT*, *NPT*等基因应用电激法导入水稻,并在后代中得到表达,得到了可育的水稻转基因植株。水稻的电激法转化同PEG法有一样的缺点,即原生质体的分离、植株再生困难和基因型依赖性问题,且其转化效率不高,各项参数还有待优化。

1.2.5 花粉管通道法

使外源DNA进入花粉管通道的实施方法,已发展到了子房注射,DNA直接涂抹柱头、供体花粉匀浆涂抹柱头、受体花粉与供体DNA混合后授粉以及直接将DNA滴入小穗等技术。应用此法,早期的研究主要是采用总体DNA导入(周光宇等,1979),试验缺少分子验证,因此人们曾对此方法有过争议。近年来研究者用此法将分离的目的基因定向地导入作物中,并在转化后代中得到了分子验证。如谢道昕等(1991)将Bt基因导入水稻,何迎春等(2002)将烟草几丁质酶基因导入水稻,均获得了变异的子代,并提供了分子杂交证据。但这一方法的转化效率还比较低,在操作上还受到开花季节的限制,而且对后代的筛选工作量很大。

1.2.6 其它方法

朱祯等(1992)应用转化脂介导法将人 α -干扰素基因导入水稻原生质体中,获得了转基因植株;邹冬生等(1993)采用浸胚法成功地将玉米DNA导入水稻,获得了集大穗、多穗

和高结实率为一体的转化稻；此外，王倍等（1995）应用低脉冲电泳转化仪，获得了转基因水稻再生株。

1.3 转基因抗虫水稻的研究回顾

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，全球约三分之一以上的人口以稻米为主食，因此，人们对水稻的遗传转化和育种利用等方面进行了深入细致的研究。

Uchimiya 等（1986）首先获得了卡那霉素抗性的转基因水稻愈伤组织，随后有3个实验室于1988年分别获得了转基因水稻植株。从此水稻转基因研究得到了飞速的发展，转化技术不断完善，同时获得了大量稳定遗传的转基因水稻植株，并逐渐进入了实用化阶段，成为水稻遗传改良的重要方法之一。

目前，应用于水稻抗虫性改良的外源基因主要有3种：一是从苏云金杆菌分离的苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因（Bt基因）；二是从植物中分离出的昆虫的蛋白酶抑制剂（PI基因）；三是植物凝集素基因。其中，Bt基因是当前应用最为广泛的杀虫基因（杨友才等，2003）。

继中国农科院生物技术中心杨虹等（1989）首次应用原生质体电融合技术将Bt基因导入水稻“台粳209”后，谢道昕（1991）用花粉管通道技术将Bt基因导入水稻栽培品种“中花11号”基因组中。日本Fujimoto（1993）用原生质体电激法获得了转Bt基因粳稻植株，并检测出Bt蛋白量占可溶性总蛋白的0.05%，对水稻二化螟（*Chilo suppressalis*）和稻纵卷叶螟（*Cnaphalocrocis medinalis*）2龄幼虫的最高致死率分别达45%和55%，并首次报道了经修饰的*cryIAb*基因能在转基因植株中高效表达，并能稳定地遗传到 R_2 代，同时讨论害虫对杀虫基因产生抗性的预防策略。

瑞士苏黎士植物研究所WunnI（1996）报道了用基因枪法将*cryIAb*基因导入籼稻“IR58”，在 R_0 、 R_1 和 R_2 代对鳞翅目水稻害虫有明显杀虫效果。对二化螟和三化螟（*Triporyza incertulas*）的致死率高达100%。

印度Nayak（1997）报道了用基因枪法将含有玉米*Ubi*启动子的*cryIAc*基因导入籼稻“IR64”，研究表明*cryIAc*基因在“IR64”中有效表达，检测出的毒蛋白量约为可溶性蛋白的0.02%~0.025%，对三化螟的最高致死率为92.4%。

国际水稻所(IRRI)的Ghareyazil（1997）报道了用基因枪法得到转*cryIAb*基因的香粳品系“827”，能表达分子量为67KDa的毒素蛋白，表达量相当于可溶性蛋白的0.1%。 T_2 代植株叶片对1龄二化螟、三化螟有高度抗性。IRRI的这项研究用玉米 C_4 PEP羧化酶基因为启动子，并指出该启动子使*cryIAb*基因在水稻籽粒灌浆期功能叶片中高效表达，而在水稻籽粒中即胚和胚乳中不表达。1997年国际水稻所植物遗传育种和生物化学系用基因枪法把以水稻*Acil*基因作为启动子的Bt基因导入粳稻品种“台粳309”基因组中，田间调查结果表明，经转基因后的株系对三化螟具高抗，最高致死率达100%。同年，中山大学生物工程中心许新萍也报道了以*Acil*为启动子的*cryIAb*基因导入“台粳309”。

加拿大渥太华大学生物化学系农业生物技术实验室Cheng等(1998)报道,用农杆菌介导法将以玉米*Ubi*基因为启动子的*cryIAb*、*cryIAc*基因导入水稻基因组,获得Bt蛋白高效表达的转基因植株。在R₀代检测出高达1%~3%的可溶性蛋白含量,较先前报道的高出10~100倍,R₁代植株高抗二化螟、三化螟的致死率为97%~100%。

项友斌等(1999)通过农杆菌介导法将抗虫基因*cryIAI*和*cryIAC*导入到籼稻幼穗愈伤组织中获得第一批转Bt基因籼稻植株。舒庆尧等(1998)与加拿大渥太华大学合作,同样利用农杆菌介导法成功地将Bt基因导入水稻栽培品种“秀水11”基因组中,获得稳定的转基因Bt品系“T₃S”和“T₃G”,并检测出Bt毒蛋白含量占可溶性蛋白的0.5%~3%,对二化螟、稻纵卷叶螟的1~5龄幼虫有100%的毒杀作用。王忠华等(2000)报道以获得的转基因Bt水稻克螟稻株系KMD₁和KMD₂为材料,应用杂交常规育种方法将转基因抗虫水稻的抗虫基因导入到新的推广水稻品种是可行的。2000年,Tu等将Bt的融合型内源杀虫蛋白基因(*cryIAb/cryIAc*)导入恢复系明恢63中,并通过广泛配组培育出Bt汕优63、马优63等杂交组合。

就其他抗虫基因而言,美国康奈尔大学早在1993年就成功地将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因*CPTI*导入水稻,获得转基因植株,经喂虫试验发现其对二化螟、三化螟具有一定的抗虫性(致死率为30%);Vain等(1998)报道了将半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因导入水稻所得的转基因植株使线虫的孵化率下降55%;Gatehouse等(1997)报道了雪花莲凝集素GNA基因在水稻抗褐飞虱的改良中的应用。李永春等(2002)构建了含有Bt基因*cryIAC*和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因*CpTI*的植物表达载体,并用于农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法水稻遗传转化,获得了转*cryIAC*和*CpTI*双价抗虫基因植株。马炳田等(2003)将双价抗虫基因*sck*和*sbk*转入光温不育系612s中,植株表现较好的抗虫性。姜明松等(2004)用转*Xa21*基因(抗白叶枯病)纯合稳定的圣稻301与转Bt(抗螟虫)、转*bar*基因(抗除草剂)的纯合稳定株系GK-1杂交,获得了多抗转基因水稻植株。何龙飞等(2005)研究表明,转*sck*基因抗虫水稻品种稻米的粒长/宽比增加、垩白度和垩白大小降低、胶稠度和蛋白质含量显著增加,稻米品质有显著改善。

2 转基因抗虫作物的非靶标效应

自转基因作物1996年首次商业化种植,到2005年全球转基因作物的种植面积为9000万公顷,在商业化种植的短短十年里,种植面积增加了50多倍,种植国家也从6个增至21个。据估算,2005年转基因作物的全球市场价值为52.5亿美元(James, 2005)。目前已商业化和正在研究中的转基因抗虫作物以转Bt基因作物为主,此外还有转豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)、Bt基因与豇豆胰蛋白酶抑制剂基因、Bt基因与抗除草剂基因双价基因以及转雪花莲凝集素基因等。转基因抗虫作物对靶标害虫具有很好的控制作用,减少了杀虫剂的使用,在产量和利润方面有了很大的提高(Cannon, 2000)。但转基因植物的生态安全性问题却成

了人们关注的焦点之一，如转基因抗虫作物由于作用目标单一，且对其靶标害虫的杀虫效果明显，从而使得农田生态系统内其它非靶标害虫的生存竞争压力减小，可能会导致非靶标害虫的发生加重，甚至猖獗为害。由于转Bt基因抗虫作物植株在整个生育期都能表达Bt杀虫蛋白，使取食Bt作物而存活下来的靶标及非靶标害虫体内的组织器官会不同程度的含有Bt杀虫蛋白，因昆虫种类的不同Bt蛋白在其体内存在的形式不同。当天敌昆虫捕食或寄生这些存活的靶标或非靶标昆虫，有可能会不同程度的受到Bt蛋白的影响。所以，与施用Bt杀虫剂相比，Bt蛋白会更广泛的通过食物链进行传播（Zwahlen等，2000）。同时，由于转基因抗虫作物对靶标害虫具有明显的致死作用，直接影响到猎物的数量和质量，进而影响到天敌昆虫的种类和数量。此外，在转基因抗虫作物的培育中，外源基因的随机插入，也可能会引起作物某些物质组分或含量产生非预期效应，有可能影响非靶标害虫的生长和繁殖，以及植物—害虫—天敌三级营养的食物链结构以及化学信息联系，进而影响到天敌昆虫的种群变化。同时转基因抗虫作物的大量种植是否会对如蜜蜂等传粉昆虫和家蚕等重要经济昆虫造成不利影响等。因此，人们除了研究Bt作物对靶标害虫的控制作用和抗性治理策略外，Bt作物对非靶标昆虫和天敌昆虫的作用更是目前所关注的重要问题。

2.1 对非靶标昆虫的影响

近年来，关于转基因作物是否会带来非靶标害虫数量上升和天敌昆虫数量的下降已引起了广泛的争论（Snow等，1999）。虽然有部分研究者利用自己的试验数据说明转基因作物不会产生类似的生态风险问题，但反对者则总以试验范围小、年份不连续等原因对这些试验结果提出质疑。

随着转Bt基因棉已在美国、中国和澳大利亚等国的广泛种植，显著降低了广谱性化学杀虫剂施用量，使得一些对Bt蛋白不敏感的次要植食性非靶标害虫如蚜虫(*Aphis*)、蓟马(*Odentothrips latii*)(Wilson等，1992)、烟粉虱(*Bemisia tabaci*)种群数量上升(Turnipseed等，1995；邓曙东等，2003)；棉象甲(*Anthonomus grandis grandis*)(Hardee等，1997)、美国牧草盲蝽(*Lygus lineolaris*)(Fitt等，1994)、棉叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)、棉叶蝉(*Empoasca biguttula*)、棉盲蝽(*Lygus pratensis lucorum*)、白粉虱(*Trialeurodes vaporariorum*)(Cui等，1999；2000)和斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)(邓曙东等，2003)等发生呈加重趋势。棉盲蝽等刺吸式害虫已成为转Bt棉田的主要害虫，如不采取有效的控制措施，随着Bt棉面积的扩大，棉盲蝽的危害还将加重(Wu等，2002)。Velders等(2002)研究表明，虽然Bt棉对苗期棉蚜(*Aphis gossypii*)种群数量没有明显影响，但同时转Bt和豇豆胰蛋白酶抑制剂(*CpTI*)基因的双价棉株对棉蚜表现出一定的抗蚜性，棉蚜的净增殖率及内禀增长率显著低于常规棉，口针在韧皮部分泌唾液的时间短，而在细胞膜外运动的时间长。崔金杰等(2002)等研究认为，这可能与转双价基因棉中可溶性糖和蛋白质等含量较少和质量较差有关，从而直接影响棉蚜的生长繁殖与取食行为。另外，豇豆胰蛋白酶抑制剂的存在，以及双价棉叶片

的组织结构,也可能对棉蚜的取食行为产生影响,但需进一步研究证实(刘向东等,2002)。

Orr等(1997)和Lozzia等(1999)研究表明,转*cryIAb*基因Bt玉米对鞘翅目害虫如玉米切根虫类(*Diabrotica* spp.)、金针虫类、蛴螬以及蚜虫、叶螨类、小地老虎和瓜种蝇等非靶标地下害虫没有杀伤作用。Lozzia等(1998)研究表明,转*cryIAb*基因Bt玉米对禾谷缢管蚜(*Rhopalosiphum padi*)的存活、繁殖及发育时间无显著影响。

刘志诚等(2003)研究表明转*cryIAb+cryIAc*杂合基因的Bt水稻对非靶标植食性昆虫,尤其是优势类群或种类的总数量和密度有时会呈现一定的负面或正面效应。刘志诚等(2002)和陈茂等(2003)研究表明,田间白背飞虱(*Sogatella furcifera*)和黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps*)成虫的虫口密度在整个生长季节无显著差异,而若虫密度则不同。刘志诚等(2003)研究表明,TT-9稻田中白背飞虱和黑尾叶蝉若虫密度分别于移栽后早中期和中后期显著高于对照;TT-9与对照间无显著差异,Bt水稻不会引起田间非靶标类群同翅目害虫数量的上升,相反,对这类害虫更有一定的驱避作用(陈茂等,2003)。转Bt基因水稻对白背飞虱和褐飞虱(*Nilaparvata-lugens*)种群均无不良影响(崔旭红等,2002;傅强等,2003)。

Howald等(2003)研究表明,菜叶蜂(*Athalia rosae*)取食转*cryIA*杀虫蛋白基因的油菜叶片对其生长、发育和繁殖没有影响。而Armer等(2000)研究表明,抗马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)的Bt马铃薯新品种,对马铃薯蚜虫(*Macrosiphum euphorbiae*)的生长和繁殖有不利的影响。

刘雨芳等(2005)研究了转*cryIAc+SCK*基因水稻及其杂交后代对稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)的大田抗性,结果表明,在自然生产条件下转*cryIAc+SCK*基因的两个株系MSA与MSB对稻纵卷叶螟具有极强的抗性,转*cryIAc+SCK*基因稻的杂交后代21S/MSB与II-32A/MSB都获得了高抗稻纵卷叶螟性状,MSA、MSB、21S/MSB与II-32A/MSB上的稻纵卷叶螟数量、卷叶率、卷叶株率与带虫株率均极显著低于常规对照稻。

Prasifka等(2005)通过大田试验,结果表明,大田试验很难检测到转基因作物田与非转基因田之间的差异,即转基因作物田与非转基因田的昆虫丰度无差异,因为大多昆虫通常具有典型的规模依赖型,在大面积的试验田与非试验田间迁徙,从而造成数据不精确,不具有说服力。Steven(2005a)通过6年的大田试验,研究Bt棉花产生的 δ -内毒素对22种昆虫天敌的影响,结果表明,Bt棉花没有对多种非靶标昆虫天敌有长期的不良影响,对非靶标昆虫群落的影响是微弱的。Steven(2005b)通过5年的大田试验,研究Bt棉花产生的CryIAc毒素蛋白对3种主要天敌*Bemisia tabaci*、*Lygus Hesperus*和*Pectinophora gossypiella*的捕食功能影响。结果表明,自然情况下天敌的捕食率、寄生能力等功能均不受Bt棉花的影响,Bt棉花对生态系统中的主要天敌没有或仅有较小的生态风险。Whitehouse等(2005)通过大田研究表明,*Helicoverpa*科昆虫的总丰度在Bt棉田和非Bt棉田间存在轻微的差异(4.5%);Jorge等(2005)通过大田研究表明,地下昆虫的数量不受Bt棉花的影响,其丰度在Bt棉田与非Bt棉田间相似;Head等(2005)研究表明,Bt棉花对非靶标昆虫(*Geocoris* spp.、*Orius* spp.和*Solenopsis invicta*)

没有显著的不良影响；Galen (2005) 在大田研究转VIP3A×Cry1Ab杂合基因玉米对非靶标昆虫的影响，结果表明，大田昆虫的丰度和生物多样性并没有受到杂合基因表达的蛋白的显著影响，并且，转单一基因玉米田与转杂合基因玉米田的非靶标昆虫丰度和多样性之间没有差异；Timothy(2005)等大田研究转Bt玉米MON810对鳞翅目非靶标昆虫的影响，结果表明，仅 *Carpophilus lugubris*和*Euxesta stigmatis*数量有轻微减少，对其它非靶标昆虫没有不良影响。

可见，转基因抗虫作物对非靶标害虫的影响以及影响的大小因作物的生物学特征、转入的基因类型和靶标害虫的种类而异。随着转基因作物的大面积种植，转基因作物对非靶标害虫的影响势必成为重要的研究内容，只有正确评估转基因抗虫作物对非靶标害虫的作用效果，才可更好地指导转基因作物的推广与害虫的防治，从而避免非靶标害虫的大暴发成灾。

2.2 对有益昆虫的影响

2.2.1 对经济昆虫的影响

家蚕 (*Bombyx mori*) 和柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 是我国的重要经济昆虫，与目前转基因抗虫作物靶标害虫同属鳞翅目。因此，转基因抗虫作物的大面积种植是否会对这两种经济昆虫造成不良影响，因为转基因抗虫作物花粉会飘落到柞树或桑树上，是否会对柞蚕或家蚕的生长发育造成负面影响，是人们十分关注的问题，特别是我国南方养蚕地区的传统种植模式是桑稻兼种，桑树都插种在自家的稻田埂上，养蚕季节每天都要到田埂采桑喂蚕（樊龙江等，2003）。王忠华等（2001）室内研究表明，当桑叶上的Bt水稻花粉浓度平均为109粒/cm²时，家蚕的生长发育会受到明显负面影响。转Bt水稻花粉在桑叶上的自然飘落浓度研究表明，在桑稻距离0~10m范围内，桑叶上花粉的浓度与距离呈反比，浓度范围在13.3~199.0粒/cm²、平均浓度为92.9粒/cm²，与能够影响家蚕生长发育的浓度（109粒/cm²）持平，说明Bt水稻在我国南方养蚕地区推广将有可能对家蚕的生长发育造成负面影响。同时，李文东等（2002）研究也表明，转*cry1Ac*基因抗虫棉、转*cry1Ac*+*CpTI*双价基因抗虫棉和转*cry1Ab*基因抗虫玉米花粉与非转基因常规棉花或玉米花粉对照相比，转抗虫基因棉花或转抗虫基因玉米花粉对家蚕幼虫各龄期的死亡率、蛹重、茧重、茧层厚、化蛹率、羽化率和产卵量均无多大影响，且无明显的剂量效应。李文东等（2003）研究表明，转*cry1Ac*基因抗虫棉、转*cry1Ac*+*CpTI*双价基因抗虫棉花花粉对柞蚕1~3龄期的死亡率、发育历期以及食物利用率、食物转化率等营养指标均无明显差别，说明转抗虫基因棉花花粉对家蚕和柞蚕以及转*cry1Ab*基因抗虫玉米花粉对家蚕的生长发育不会产生明显的负面影响。王忠华等（2002）研究了转Bt基因水稻米粉对家蚕生长发育及中肠亚显微结构的影响，以3龄家蚕为供食对象，用洒过转Bt基因水稻纯合品系KMD2生米粉或熟米粉的桑叶喂养，结果发现用前者喂养的家蚕体重熟茧数、结茧数、全茧量和茧层量均明显低于后者和对照，熟茧整齐度明显迟于后者和对照，而后者和对照之间无明显差异。进一步的病理切片电镜分析表明，用前者喂养的家蚕，其中肠细胞亚显微结构

发生了明显的变化，而后者和对照之间无明显差异。

Sims (1995) 报道转Bt基因棉花粉对意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*) 没有副作用。根据USEPA在2000年公布的资料, 当以相当于大田抗虫棉的花粉和花蜜中*cry1Ac*表达水平的1700倍和10000倍喂以蜜蜂的幼虫和成虫时, 没有发现蜜蜂成蜂和幼虫出现中毒症状; 转Bt玉米中抗鳞翅目害虫的*cry1Ab*和*cry9C*蛋白以及转Bt马铃薯中抗鞘翅目害虫的*cry3A*蛋白对蜜蜂没有毒性。Arpais等(1996)用浓度为转Bt基因花粉中表达量的400和1000倍的*cry3B*杀虫蛋白糖浆饲喂蜜蜂, 同时蜜蜂可以自由采集花粉, 持续58d的实验结果显示*cry3B*对蜜蜂幼虫的死亡率和干重没有影响。Malone (1999) 把对鳞翅目昆虫有活性*cryBa*纯杀虫蛋白以10mg/g、2.5mg/g和0.25mg/g的浓度加入花粉中饲喂蜜蜂成蜂7d后, 将蜜蜂放回各自的蜂房中进行常规喂养, 蜜蜂的存活率以及对食物的消化率并未受到显著影响。Anon (2000)和Schuler (1999) 在田间将种植的转*cryAb*蛋白基因的Bt玉米用粗纱网围成一隔离空间, 放入蜂群7d后没有发现含*cryAb*蛋白的玉米花粉对蜜蜂的存活、搜索行为及幼虫有影响, 将蜜蜂成蜂从纱网中取出30d后, 也没有发现对其幼虫的发育有影响。

相对于转Bt基因抗虫作物中表达的*cry1A*蛋白主要针对鳞翅目害虫而言, 转蛋白酶抑制剂基因的抗虫作物对蜜蜂的影响可能要大一些。Belzunces (1994) 室内研究表明, Bowman-Birk大豆胰蛋白酶抑制剂能引起意大利蜜蜂胰蛋白酶活性降低; 在体外, 可抑制大约80%非特异性蛋白酶活性和100%胰蛋白酶活性。Malone等(1995)和Burgess等(1996)以1mg/g、5mg/g和10mg/g的浓度将抑酶肽(BPTI)和Kunitz大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)加入糖浆中喂养蜜蜂可显著降低蜜蜂的存活率, 但0.01mg/g和0.1mg/g的浓度对蜜蜂没有影响。Malone (2001) 用马铃薯蛋白酶抑制剂1 (POT-1) 和抑制剂2 (POT-2) 饲喂刚孵化的蜜蜂幼虫, 在花粉和糖浆中蛋白酶抑制剂的浓度分别为2 mg/g和0.1mg/ml的处理与对照的存活率没有显著差异, 当浓度分别为10mg/g和2mg/ml时, 则显著降低了蜜蜂的存活率。Picard-Niaou (1997) 用豇豆胰蛋白酶抑制剂(*CpTI*)对羽化10d的蜜蜂成蜂进行喂养和注射, 结果没有显示出*CpTI*对蜜蜂的毒性效应; SBTI、大豆胰蛋白酶抑制剂(BBI)及Oryzacystain (OC-I)和BBI的混合物只有在剂量为1mg/ml时才能引起蜜蜂较高的死亡率。Girard等(1998)研究表明, 鸡血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂和BBI没有影响蜜蜂的嗅觉学习行为, BBI和OC-I也没有改变中肠消化酶的总活性, 但BBI诱导产生了一种新的蛋白酶。Malone等(2001)进一步证实了上述实验结果, 认为OC-I在1mg/ml、0.1mg/ml和0.01mg/ml的浓度时对低龄和高龄蜜蜂的死亡率没有影响, 而BBI在1mg/ml的浓度时降低了蜜蜂的存活率, 并导致中肠蛋白酶和胰蛋白酶等的大量增多。

Wang等(1996)和Ding等(1998)已经成功地将几丁质酶基因转入植物用来抗真菌和害虫为害。Picard-Niaou等(1997)用转几丁质酶基因番茄中提纯的几丁质酶加入糖浆中喂养蜜蜂的毒性实验表明, 当用11 μ g/只剂量的来源于转基因植物的几丁质酶喂养24h和48h对蜜蜂的存活没有明显的影响, 向每只蜜蜂注射1.69 μ g的几丁质酶时也没有显示出对蜜蜂的毒

性效应, 对其嗅觉学习行为也没有明显影响。Malone等(2001)研究了BPTI、SBTI、POT-1和POT-2对熊蜂(*Bombus sp.*)的存活及中肠蛋白酶活性的影响。将4种蛋白酶抑制剂按一定浓度范围混入花粉食物中连续的饲喂熊蜂成蜂, SBTI(10mg/g)及POT-1(10mg/g和5mg/g)显著降低了熊蜂存活率, POT-2在10mg/g浓度与比0.1mg/g和0.01mg/g浓度相比, 熊蜂的存活率显著降低, 而BPTI对熊蜂的存活没有显著影响。在熊蜂的中肠蛋白酶中的亮氨酸氨基酶(LAP)的活性不受上述4种蛋白酶抑制剂的影响; 而弹性蛋白酶活性受到所有试验浓度的POT-1和POT-2的强烈抑制, SBTI也显著抑制了该酶的活性, 且抑制程度剂量呈很好的相关性, 而BPTI对该酶没有抑制活性; 糜蛋白酶活性也受到所有浓度POT-1和POT-2的强烈抑制, 但只受到最高浓度SBTI抑制, 即BPTI对此酶没有影响。胰蛋白酶活性则受到4种蛋白酶抑制剂的抑制。因此, Malone等(2000)认为, 转基因抗虫作物对蜜蜂和熊蜂的直接影响因转基因的类型及编码蛋白的生物活性密切相关。

我国的转*cryIac+CpTI*双价抗虫棉花已开始商业化种植, 转*CpTI*抗虫水稻也已进入生产释放前的试验阶段, 这两种转胰蛋白酶抑制剂基因作物花粉对蜜蜂等传粉昆虫是否有毒理效应尚需进一步研究, 此外, 对转Bt抗虫棉及Bt水稻花粉对家蚕等经济昆虫的影响, 应进一步研究转基因抗虫作物花粉在桑叶等植物上的飘落及沉积以及杀虫蛋白的降解规律, 为转基因抗虫作物的生态安全提供重要的科学依据。

2.2.2 对捕食性天敌的影响

Sims(1995)报道Bt棉花对几种捕食天敌, 如锚斑长足瓢虫(*Hippodamia convergens*)、普通草蛉(*Chrysoperla carnea*)没有不利影响。Ma等(2000)报道了棉田中蜘蛛和捕食甲虫对Bt毒素不敏感。崔金杰等(1998,1999)报道了Bt棉不仅能直接毒杀靶标害虫而且能间接提高靶标害虫的被捕食率。吴孔明(2001)研究报道了Bt棉对龟纹瓢虫(*Propylaea japonica*)、七星瓢虫(*Coccinella septempunctata*)、中华草蛉(*Chrysopa sinica*)、大草蛉(*C.septempunctata*)、晋草蛉(*C.shansiensis*)、丽草蛉(*C.formosa*)、草间小黑蛛(*Erigonidium graminicolum*)、三突黑蛛(*Misumenopos tricuspidata*)以及南方小花蝽(*Orius similis*)均无不利影响。万方浩等(2002)认为, 由于转基因抗虫棉对靶标害虫的控制作用, 降低了化学农药的使用, 转Bt棉田捕食性天敌总量比常规综防田和化防田明显增加, 有利于保护瓢虫和草蛉, 有利于食虫蝽类和蜘蛛类天敌的增殖。秦秋菊等(2002)和邓曙东等(2003)认为, 由于Bt棉田棉铃虫数量的减少, 可以更好地发挥捕食性天敌对靶标害虫卵和其它害虫的控制作用。

Bt玉米对捕食性天敌的种群数量和捕食作用没有明显的副作用(Goy等, 1995; Dogan等, 1996; Orr等, 1997; Ostlite等, 1997; Pilcher等, 1997; Riddick等, 1998; Al-Deeb等, 2001), Bt玉米对有益昆虫的种类也没有影响(Lozzia等, 1998; Jarchow等, 1999; Wold等, 2001)。表达*cry3Bb1*蛋白的MON863是控制玉米切根叶甲虫(*Diabrotica spp.*)的转基因

因抗虫玉米品种, Duan 等 (2002) 给具斑食蚜瓢虫 (*Colemegilla maculata*) 提供含有50%的MON863玉米花粉时, 对幼虫存活及发育历期以及对成虫的存活和繁殖都没有不利影响。Lozzia等 (1998) 研究表明, Bt玉米与非Bt玉米田中步甲科昆虫的聚集数量十分的相似, 它们之间的微小差异与Bt玉米无关。Zwahlen等 (2000) 研究表明, Bt玉米花粉对捕食性天敌微小花蝽 (*Orius majusculus*) 没有致死性或亚致死性的影响。

Artuner等 (2000) 和Gary (2001) 研究表明, 转*cry3A*基因抗马铃薯甲虫的Bt马铃薯对捕食性天敌种群数量没有不利影响; Raymond 等 (2000) 研究表明, *cry13A*杀虫蛋白本身对捕食性瓢虫的发育和繁殖没有不利影响; Dogan等 (1996) 研究报道取食Bt马铃薯的桃蚜 (*Myzus persicae*) 对锚斑长足瓢虫的存活, 对蚜虫的消化, 发育和繁殖也没有明显的不利影响; Bt马铃薯与非Bt马铃薯混种田和Bt马铃薯单种田中的专食性宏伟壶步甲 (*Lebia grandis*) 的幼虫会由于马铃薯甲虫种群密度的降低数量逐渐减少, 而广食性的具斑食蚜瓢虫则能在Bt马铃薯田发展起来, 它的捕食作用可减少对转基因作物适应了马铃薯甲虫的数量。

转Bt基因水稻中的杀虫蛋白可随食物链进行转移 (姜永厚等, 2004), 而目前较多研究表明Bt水稻对蜘蛛应无不利影响。而刘志诚等 (2003) 研究认为, 蜘蛛种类组成及优势种在转*cry1Ab+cry1Ac*杂合基因籼稻和转*cry1Ab*基因粳稻两类Bt水稻与对照间虽然基本相同, 但转*cry1Ab*基因粳稻田蜘蛛的个体数均少于甚至显著少于对照。转*cry1Ab+cry1Ac*基因籼稻田蜘蛛亚群落的物种丰富度、Shannon-Winner多样性指数、均匀度指数和优势集中性指数与对照间无明显差异, 而转*cry1Ab*基因粳稻的物种丰富度、多样性指数和均匀性指数均低于对照, 优势集中性指数高于对照。这表明转*cry1Ab*基因粳稻对蜘蛛亚群落结构有一定的负效应。但是, Bt水稻对稻田优势捕食性昆虫的组成与丰富度无明显负作用, 甚至有时具有一定的正效应。刘志诚等 (2002) 研究认为, 转*cry1Ab+cry1Ac*杂合基因的Bt水稻与亲本对照田的锥腹肖蛸 (*Tetragnatha maxillasa*)、四斑锯螯蛛 (*Dyschiriognatha quadrimaculata*)、食虫沟瘤蛛 (*Ummeliata insecticeps*)、拟环纹豹蛛 (*Pardosa pseudoannulata*) 和拟水狼蛛 (*Pirata subpiraticus*) 种群数量动态相似, 数量上大多无显著差异。

也有研究表明转Bt作物对捕食性天敌有不利影响。Hilbeck等 (1998) 发现普通草蛉幼虫在捕食了Bt玉米上的欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 和棉贪夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 幼虫后, 死亡率明显高于对照; 用加入Bt蛋白的人工饲料饲喂草蛉幼虫, 其死亡率仍高于对照, 认为草蛉幼虫的死亡是由于Bt蛋白引起的, 而非猎物营养恶化所致; 之后的研究进一步表明, 暴露于Bt杀虫蛋白与病态被猎食者引起的营养不足共同作用导致普通草蛉幼虫的发育期明显延长。Dutton等 (2003) 利用取食喷过Bt制剂玉米叶片的棉贪夜蛾幼虫饲喂普通草蛉, 草蛉的死亡率增加, 生长发育缓慢, 体重降低, 结果与饲喂取食Bt玉米的棉贪夜蛾幼虫一致。苏格兰科学家Birch (1999) 用转雪莲凝集素基因的马铃薯饲喂的桃蚜来饲养二斑瓢虫 (*Adalia bipunctata*) 发现取食转基因马铃薯上的桃蚜12d后, 在以后的2~3周时间里, 瓢虫的产卵量、卵的生活力和寿命明显降低。取食在转基因马铃薯上桃蚜的瓢虫寿命比对照减少51%, 而转

基因植物本身对瓢虫没有任何毒性。

捕食性天敌在害虫综合治理中起着重要的作用,因此研究转基因作物对捕食性天敌的影响具有很重要生物学和经济学意义。现有的研究结果对转基因作物是否对捕食性天敌有负面影响还有些争议,还需要从机制方面进行更深一步的研究。

2.2.3 对寄生性天敌的影响

Sims (1995) 研究报道了Bt棉对丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonmia vitripennis*) 没有不利影响。Schuler等 (1999) 报道当给小菜蛾绒茧蜂 (*Cotesia plutellae*) 提供取食Bt油菜的小菜蛾的敏感和抗性品系以及取食常规油菜的小菜蛾幼虫时,对其幼虫存活、成虫寄主选择和寄生能力方面都没有不利影响。Johnson 等 (1992) 研究表明,索诺齿唇姬蜂 (*Camponotus sonorensis*) 对在转基因烟草上取食几天的烟芽夜蛾幼虫的寄生率高于非转基因烟草的寄生率; 随后, Johnson等 (1997) 作了索诺齿唇姬蜂和黑头折脉茧蜂 (*Cardiochiles nigriceps*) 与Bt烟草互作对烟芽夜蛾幼虫的控制研究。结果表明,索诺齿唇姬蜂与Bt烟草共同作用显著降低了烟芽夜蛾幼虫存活,而黑头折脉茧蜂没有明显减少烟芽夜蛾的幼虫数量,与Bt烟草没有互作效应。

Baur等 (2003) 研究发现,大豆夜蛾 (*Pseudoplusia includens*) 幼虫被一种茧蜂 (*Cotesia marginiventris*) 和跳小蜂 (*Copidosoma floridanum*) 寄生后,茧蜂在取食普通大豆和棉叶的大豆夜蛾幼虫体内比在取食Bt棉叶的幼虫体内发育明显快,在取食Bt棉叶的大豆夜蛾幼虫体内发育的茧蜂繁殖力降低,产卵量明显减少。同样,Bt棉影响被跳小蜂寄生大豆夜蛾幼虫的生长发育,进而影响了跳小蜂成虫生活史的参数,跳小蜂羽化数量也很少,但其蛹重和成虫寿命并没受影响;研究还表明,较老的Bt棉植株 (生长90~120d) 比生长时期短的Bt棉植株 (60~90d) 对跳小蜂发育和成虫存活的影响要小,这可能与棉株生长后期Bt蛋白表达量较低有关。崔金杰等 (1999) 研究表明,Bt棉对棉铃虫幼虫寄生蜂 (尤其是初龄幼虫的寄生蜂) 亦产生致死或亚致死作用。杨益众等 (2001) 研究认为,转基因棉田棉铃虫卵及幼虫寄生率均显著低于常规棉品种上的寄生率,是因为转基因棉对棉铃虫寄生性天敌存在非亲和性所致。张晖等 (2003) 研究认为转Bt基因棉田中螟蛉绒茧蜂 (*Apanteles ruficrus*) 生长受到了不良影响,种群数量显著下降,造成这种结果的原因可能是Bt棉田棉大卷叶螟 (*Sylepta derogata*) 幼虫数量明显低于常规棉田,Bt棉株受害程度明显低于常规棉;对于寄生性天敌的吸引作用减弱所致。

Bernal等 (2002) 研究表明,一种亚热带蛀茎螟虫 (*Eoreuma loftini*) 的幼虫取食Bt玉米组织后,会对其寄生性天敌 (*Parallorhogas pyralophagus*) 的某些适合度有负面影响,特别是*P. pyralophagus* 幼虫发育阶段死亡率增大,发育时间延长,雌成虫寿命缩短,但并不影响抱卵量、成虫个体大小与抱卵量、寿命和及性比的关系。

由于转基因抗虫作物对靶标害虫的控制作用,极大的降低了靶标害虫的种群数量,直接影响了寄生性天敌种群的增长,即使是取食转基因抗虫作物存活下来的幼虫,其生长发育也

受到很大的抑制作用，从而影响到体内寄生性天敌的生长发育，必然会导致一些靶标害虫的寄生性天敌的种群数量降低，甚至极显著的降低，但这种影响并不代表转基因抗虫作物本身对寄生性天敌的负面效应。转基因抗虫作物对寄生性天敌种群变化影响因素是复杂的，需要从化学生态学和生理学多方面进行深入研究。

2.2.4 对重要蝶类的影响

大斑蝶 (*Danaus plexippus*) 是北美重要的蝶类昆虫，其唯一的食物是马利筋属的杂草，特别是马利筋草 (*Asclepias curassavica*)，在玉米田及田边大量分布。Losey等 (1999) 报道用人工涂有Bt玉米花粉的马利筋草饲喂幼虫后，取食量减少，生长缓慢，导致幼虫大量死亡，推测大斑蝶幼虫的死亡是由Bt玉米花粉中所含杀虫蛋白引起。Hansen等 (2000) 在田间也观察到，在距Bt玉米田10m的地方大斑蝶幼虫取食飘落有Bt玉米花粉的叶片后，死亡率增加，特别是距Bt玉米田3m的区域幼虫的死亡率最高。“斑蝶事件”引起人们对Bt玉米生态安全性的广泛关注，美国科学家对此进行了大量细致的研究。Stanley-Horn (2001) 和 Hellmich 等 (2001) 研究发现，只有Event176玉米花粉对大斑蝶幼虫存活有影响，而Bt11和MON810以及表达*cry1F*和*cry9C*的Bt玉米花粉在田间条件下对大斑蝶没有影响。Koch 等 (2003) 研究发现，靠近Bt玉米田和常规玉米田马利筋草上的大斑蝶幼虫死亡率相似。Orr 等 (1997) 研究表明，大斑蝶老龄幼虫比幼龄幼虫对Bt玉米花粉有更强的耐受性。Oberhauser (2001) 等研究认为，目前已商业化的大多数Bt玉米花粉对大斑蝶种群还不会构成威胁。此外，Wraight (2000) 等研究认为，MON810花粉对黑斑凤蝶 (*Papilio polyxenes*) 野生种群的数量没有影响；Hansen 等 (2002) 研究表明，暴露在Bt玉米花粉条件下马利筋虎蛾 (*Euchatias egle*) 幼虫死亡率为0，而在非Bt玉米花粉上的死亡率为6.7%，说明大面积种植Bt玉米也不会对马利筋虎蛾种群构成不良影响。Felke 等 (2002) 在实验室利用菜粉蝶、大菜粉蝶和小菜蛾作为试验材料，研究Event176玉米花粉对蝶类昆虫的影响，结果表明，这些昆虫的幼虫对带有Bt玉米花粉的叶片取食量少、生长缓慢、死亡率增高，不同昆虫对Bt花粉的致死剂量不同，说明Event176玉米花粉对这3种鳞翅目昆虫生长和存活有不利影响。

影响Bt玉米花粉对重要鳞翅目蝶类生长发育的因素除了Bt玉米表达的杀虫蛋白不同外，表达量的差异也是造成Event176玉米花粉不同于其他Bt玉米花粉的重要因素，因为Event176玉米只能在植株的绿色组织和花粉中特异表达Bt杀虫蛋白，表达量高。此外，Oberhauser等 (2001) 和 Felke 等 (2002) 研究认为，距Bt玉米田的距离、花粉在杂草上的粘着度及沉积以及降水等都能影响飘落在杂草上的Bt花粉浓度。

3 研究展望

大规模的种植转基因抗虫作物是否影响农业生态系统中有益昆虫的种类及种群数量为

各国科学家关注，目前的研究结果虽然大多表明转基因抗虫作物对大多数非靶标害虫、捕食性、寄生性天敌和重要的经济昆虫的种群数量以及生长发育没有明显的负作用，但确有转基因抗虫作物对某些天敌存在杀伤作用等不利的影响的一些报道（Kareica等，1993；Hilbeck等，1998；Birch等，1999；Bernal等，2002；Dutton等，2003；Baur等，2003；Steven等，2005；Torres等，2005；Whitehouse等，2005）。也有实验证明Bt制剂对某些寄生性天敌具有亚致死作用毒性（Giroux等，1994；Blumberg等，1997）。由于Bt制剂喷雾所能覆盖的植物表面变化较大，而且其在自然条件下很快降解，因而无论是害虫还是天敌昆虫接触Bt蛋白仅是在其一生中的很短一段时间。然而目前已推广应用的转Bt基因抗虫作物中情况则完全不同，Bt蛋白在植株的整个生育期都能够表达，且所表达的Bt蛋白是经过一定的修饰改造，已不同于苏云金芽孢杆菌所产生的Bt蛋白。因此，Bt作物有可能对一些天敌种群总体上有负面影响。由于捕食性天敌是作物田控制害虫的重要天敌，而寄生蜂又是目前最成功用于生物防治的天敌，因此，捕食性以及寄生性天敌与转Bt基因抗虫作物之间的这种负交互作用特别重要。目前有关转基因抗虫作物对非靶标昆虫的研究，主要是田间直接观察，需要结合实验室研究进一步验证。

目前研究转基因抗虫作物对害虫和天敌的作用，主要集中在转基因作物对靶标、非靶标昆虫和天敌的种群数量的影响上，而对杀虫蛋白在转基因抗虫作物-害虫-天敌三层营养结构中的传递规律与机制，以及从生理学和病理学角度对杀虫蛋白在传递过程中是否会对一些非靶标害虫及捕食和寄生性天敌的生理代谢产生不良影响的研究很少，仅从昆虫的种群数量来看，并不能表明杀虫蛋白对非靶标昆虫以及天敌没有潜在的病理作用。因此，从食物链的角度研究杀虫蛋白在转基因抗虫植物-植食性昆虫-捕食和寄生性天敌三级营养结构中的传递规律和机制很有意义。由于外源基因插入位点的非预期效应，有可能影响转基因抗虫作物的生理特性和次生物质的变化，不仅会影响植食性昆虫对寄主的寻找和接受，植物的挥发性化学成分还起着引导害虫的天敌寻找寄主场所的作用，进而影响转基因作物田中寄生性天敌与靶标害虫的信息联系。阎凤鸣等（2002）研究表明，转Bt基因棉中 α 2-萜烯和 β 2-萜烯的相对含量比常规棉高许多，倍半萜烯C和一个含量很低的化合物是常规棉所没有的。因此，植物次生信息化学物质在浓度或成分上的任何改变，都可能影响到植食性昆虫及其天敌的群落组成和种群数量，从而对生态系统内的生物多样性造成影响。探讨转基因抗虫植物对非靶标害虫和天敌的潜在效应以及转基因抗虫植物与天敌的协同作用对非靶标害虫的控制途径是今后需要深入研究的重要方面。

转基因抗虫作物的种植在一定程度上减少了对靶标害虫发生进行预测和监测的必要性。然而，由于转基因抗虫作物的商业化种植时间尚短，种植的规模和转基因作物的种类有限，对非靶标生物和有益昆虫的影响还需要进行大范围的长期的监测，这是转基因作物全球化种植前的首要问题。

第二章 家蚕不同品种对转 Bt 基因水稻花粉的敏感性

20 世纪 90 年代以来,随着转苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 内毒素蛋白基因棉花、玉米和马铃薯等的商业化种植,转基因抗虫作物的培育与投放应用作为一种新型的虫害控制技术已愈来愈受到重视,现今约有百余种转基因抗虫植物问世 (Hilder 等, 1999)。在转基因抗虫水稻方面,国内外已有不少相关报道,并在转 Bt 基因水稻 (Bt 水稻) 培育方面取得了较大进展 (Bennett 等, 1997; 叶恭银等, 1998), 获得了不少抗虫效果好的籼稻、粳稻和杂交稻株/品系 (Datta 等, 1998; Tu 等, 1998; 叶恭银等, 1998), 有的已进入了田间投放前的试验阶段 (Tu 等, 2000; Shu 等, 2000; Ye 等, 2001a;b; 2003)。Bt 水稻的培育成功, 为水稻增产带来了可能性, 其商业化前景十分广阔。然而, 作为转基因抗虫作物, Bt 水稻却面临着投放环境之后的生态安全性问题, 包括 Bt 水稻花粉对非靶标中国传统重要的经济昆虫——家蚕的潜在影响。

目前, 国内外有关转 Bt 水稻对家蚕的影响的却少有报道, 仅王忠华等 (2001) 和蒋彩英 (2004) 报道了家蚕 2 个品种连续饲喂含转 Bt 基因水稻花粉的桑叶后, 生物学各项指标的变化。鉴于我国是栽桑养蚕、缫丝织绸的发祥地, 蚕丝业的发展已有五千年的悠久历史, 家蚕种质资源丰富, 不同品种的抗/耐性和适应性等性状各不相同, 因此, 开展转 Bt 基因水稻花粉对家蚕不同品种的影响, 以明确 Bt 水稻花粉对不同家蚕品种的毒性水平颇为必要。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试家蚕品种

春蚕品种: 菁松×皓月及其亲本、夏秋蚕品种: 丰一×五四及其亲本, 购于浙江省蚕种公司。按常规方法催青得初孵蚁蚕, 供试验用。

1.1.2 供试水稻品种

华池 2000B1 (B1) 为转 *cry1Ab* 基因粳稻——克螟稻 1 号 (KMD1) (舒庆尧等, 1998) 与早籼稻品种浙辐 504 杂交后, 与早籼亲本连续 3 次回交, 再自交选育的第 R_8 代 (BC₃F₈) 抗虫早籼稻纯合品系, 室内和田间条件下对水稻螟虫表现高抗 (Wang 等, 2002)。

1.1.3 Bt 水稻花粉收集

采用盆拍法收集田间 B₁ 水稻品系花粉 (蒋彩英等, 2004), 收集完后, 迅速带回实验室。用毛笔将搪瓷盆中的花粉轻轻拭下, 60 目 (孔径 250 μ m) 过筛后, 置于-70℃冰箱中保存备

用。

1.2 生物测定

采用人工饲料法测定 Bt 水稻及其非 Bt 亲本花粉对不同家蚕品种幼虫存活的影响。家蚕人工饲料参照陈瑞英等（1995）的配方。

准确称取系列重量的水稻花粉，在家蚕人工饲料中搅拌均匀，终浓度各为 0.002、0.01 和 0.05g 花粉/g 饲料。将花粉处理的和未经处理的人工饲料分别置于灭菌的果酱瓶（500ml）中饲喂蚁蚕，48h 后改喂未经花粉处理人工饲料，每天考查记载死亡情况直至 7d。以不含水稻花粉的饲料为对照，各处理 10 头，重复 3~6 次。饲养温度为 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，相对湿度 $75 \pm 1.0\%$ ，光周期 L:D 为 16:8h。

纯 Bt 毒素蛋白 Cry1Ab 对家蚕不同品种蚁蚕的毒力测定步骤同上。

1.3 数据分析

生物测定结果采用 DPS 统计软件（唐启义，1995）进行分析获得。家蚕幼虫经不同水稻花粉处理后的存活率曲线采用 SAS 统计软件（SAS Inc., Cary, NC）作生存分析。

2 结果与分析

2.1 Bt 水稻花粉对家蚕不同品种的毒性

不同家蚕品种对 Bt 水稻花粉的敏感性各不相同，其差异变化与对 Cry1Ab 纯蛋白的敏感性相似（表 1.1）。除杂交种——丰一×五四外，其余各家蚕品种对 Bt 水稻花粉的 LC_{50} 值相对较小，表明这些家蚕品种对 Bt 水稻花粉的敏感性较高。丰一×五四与其它家蚕品种的 LC_{50} 值差异达显著水平。

2.2 Bt 水稻花粉对家蚕不同品种幼虫生存曲线的影响

家蚕不同品种幼虫经不同水稻花粉处理后的存活曲线均存在极显著差异（菁松×皓月： $X^2_{\text{Log-Rank}}=102.619$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=102.832$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ；菁松： $X^2_{\text{Log-Rank}}=111.034$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=110.093$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ；皓月： $X^2_{\text{Log-Rank}}=81.761$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=80.767$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ；丰一×五四： $X^2_{\text{Log-Rank}}=29.771$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=29.645$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ；丰一： $X^2_{\text{Log-Rank}}=54.878$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ； $X^2_{\text{Wilcoxon}}=54.878$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ；五四： $X^2_{\text{Log-Rank}}=53.931$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ； $X^2_{\text{Wilcoxon}}=47.721$ ； $df=2$ ； $P<0.001$ ）（图 1.1）。秋蚕杂交品种——丰一×五四的幼虫取食 Bt 水稻花粉后，其存活曲线与取食非 Bt 水稻花粉的并无显著差异；其余各家蚕品种幼虫取食 Bt 水稻花粉后的存活率均极显著低于取食非 Bt

水稻花粉和对照的，且后两者无显著性差异（表 1.2）。

家蚕不同品种幼虫取食相同水稻花粉后的存活曲线亦存在显著差异，其中取食 *Bt* 水稻花粉的品种间差异达极显著（*Bt* 花粉： $X^2_{\text{Log-Rank}}=27.506$ ； $df=5$ ； $P<0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=35.031$ ； $df=5$ ； $P<0.001$ ；非 *Bt* 花粉： $X^2_{\text{Log-Rank}}=11.339$ ； $df=5$ ； $P=0.045$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=11.326$ ； $df=5$ ； $P=0.045$ ）。在菁松/皓月杂交体系中，经 *Bt* 水稻花粉处理后，两亲本间的存活曲线存在显著差异（ $X^2_{\text{Log-Rank}}=4.971$ ； $df=1$ ； $P=0.026$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=7.779$ ； $df=1$ ； $P=0.005$ ），而其杂交种的存活曲线与两亲本的差异却均不显著（菁松： $X^2_{\text{Log-Rank}}=1.842$ ； $df=1$ ； $P=0.175$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=1.664$ ； $df=1$ ； $P=0.197$ ；皓月： $X^2_{\text{Log-Rank}}=0.541$ ； $df=1$ ； $P=0.462$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=1.735$ ； $df=1$ ； $P=0.188$ ）；经非 *Bt* 水稻花粉处理后，菁松×皓月及其亲本间的存活曲线差异并不显著（ $X^2_{\text{Log-Rank}}=5.868$ ； $df=2$ ； $P=0.053$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=5.909$ ； $df=2$ ； $P=0.052$ ）。在丰一/五四杂交体系中，两亲本经 *Bt* 水稻花粉处理后的存活曲线差异并不显著（ $X^2_{\text{Log-Rank}}=0.196$ ； $df=1$ ； $P=0.658$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=0.588$ ； $df=1$ ； $P=0.443$ ），但其杂交种的存活曲线却与两亲本的均存在极显著差异（丰一： $X^2_{\text{Log-Rank}}=10.968$ ； $df=1$ ； $P=0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=10.743$ ； $df=1$ ； $P=0.001$ ；五四： $X^2_{\text{Log-Rank}}=11.041$ ； $df=1$ ； $P=0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=11.370$ ； $df=1$ ； $P=0.001$ ）；经非 *Bt* 水稻花粉处理后，三个品种间的存活曲线差异亦不显著（ $X^2_{\text{Log-Rank}}=2.641$ ； $df=2$ ； $P=0.267$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=2.620$ ； $df=2$ ； $P=0.270$ ）。

表 1 家蚕不同品种对 *Bt* 水稻花粉敏感性的比较

Table 1 Comparison on the susceptibility of different varieties of *B. mori* to *Bt* rice pollen

家蚕品种 Variety	处理 Treatment	LD-P 线 LD-P line	χ^2	<i>P</i>	LC ₅₀ (g pollen/g diet)	LC ₅₀ (μg Cry1Ab/ g diet)	95%置信区 95% CI
菁松×皓月 Jingsong×Haoyue	<i>Bt</i> pollen	$y=1.592x+7.619$	0.032	0.858	0.023	0.540	0.313~1.780
	Cry1Ab	$y=0.933x+5.455$	0.099	0.753	/	0.325	0.139~5.214
菁松 Jingsong	<i>Bt</i> pollen	$y=1.529x+6.001$	0.584	0.445	0.009	0.221	0.120~0.393
	Cry1Ab	$y=2.053x+2.729$	0.029	0.865	/	0.102	0.065~0.185
皓月 Haoyue	<i>Bt</i> pollen	$y=1.473x+5.378$	0.037	0.848	0.023	0.554	0.311~1.965
	Cry1Ab	$y=1.109x+3.252$	0.001	0.972	/	0.301	0.134~5.384
丰一×五四 Fengyi×Wusi	<i>Bt</i> pollen	$y=1.023x+4.633$	0.451	0.502	0.096	2.286	0.708~5.118
	Cry1Ab	$y=1.007x+3.295$	0.047	0.829	/	0.394	0.164~8.656
丰一 Fengyi	<i>Bt</i> pollen	$y=1.412x+5.658$	0.000	0.990	0.014	0.342	0.198~0.729
	Cry1Ab	$y=1.593x+5.216$	0.055	0.814	/	0.132	0.119~3.754
五四 Wusi	<i>Bt</i> pollen	$y=1.220x+5.576$	0.052	0.820	0.014	0.337	0.180~0.803
	Cry1Ab	$y=1.105x+6.081$	0.002	0.965	/	0.105	0.052~0.264

杂交品种——菁松×皓月和丰一×五四取食 *Bt* 水稻花粉后的生存曲线存在极显著差异 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=11.549$; $df=1$; $P=0.001$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=14.045$; $df=1$; $P<0.001$), 但经非 *Bt* 水稻花粉处理后, 两者的差异不显著 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=3.086$; $df=1$; $P=0.079$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=2.938$; $df=1$; $P=0.087$)。不同杂交体系的原种之间, 经 *Bt* 水稻花粉处理后的生存曲线差异各不相同。菁松在取食 *Bt* 水稻花粉后, 其存活曲线与丰一 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=6.579$; $df=1$; $P=0.010$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=11.018$; $df=1$; $P=0.001$) 和五四 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=4.656$; $df=1$; $P=0.031$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=7.906$; $df=1$; $P=0.005$) 的均存在极显著差异, 而皓月的存活曲线却与丰一 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=0.027$; $df=1$; $P=0.870$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=0.309$; $df=1$; $P=0.578$) 和五四 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=0.030$; $df=1$; $P=0.864$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=0.004$; $df=1$; $P=0.951$) 的均无显著差异。不同原种经非 *Bt* 水稻花粉处理后的生存曲线亦无显著差异 ($X^2_{\text{Log-Rank}}=6.369$; $df=3$; $P=0.095$ 、 $X^2_{\text{Wilcoxon}}=6.435$; $df=3$; $P=0.092$)。

3 讨论

家蚕不同品种幼虫对华池 2000B1 水稻花粉的敏感性存在明显差异, 其中以杂交种的敏感性明显较原种的为低, 而且夏秋蚕杂交种——丰一×五四的敏感性显著低于春蚕杂交——菁松×皓月。家蚕不同品种对 *Bt* 水稻花粉的敏感性明显低于对 Cry1Ab 纯蛋白的敏感性, 但两者的差异变化趋势一致。这表明 *Bt* 水稻花粉对家蚕的毒性与其表达的 *Bt* 杀虫蛋白有关, 且其毒效明显低于 Cry1Ab 纯蛋白。家蚕不同品种经非 *Bt* 水稻花粉喂食后, 其存活曲线多与对照无显著差异。这表明在 0.05g 花粉/g 饲料的剂量下, 非 *Bt* 水稻花粉对家蚕不同品种幼虫的存活并无显著不利影响。不同品种幼虫经相同剂量 *Bt* 水稻花粉 (即 $1.19 \pm 0.10 \mu\text{g}$ 杀虫蛋白/g 饲料) 处理后, 存活曲线呈现差异性变化, 其中除丰一×五四的存活曲线与非 *Bt* 水稻花粉处理的无显著差异外, 其余家蚕品种幼虫的存活曲线均与非 *Bt* 水稻花粉处理的存在极显著差异。丰一×五四幼虫经 *Bt* 水稻花粉处理后的存活率极显著高于其亲本和菁松×皓月及其亲本。上述结果表明, 丰一×五四对 *Bt* 水稻花粉的抗/耐性相对较强, 且似存在杂种优势。这与何斯美等 (1989) 报道丰一×五四抗氟性较强、菁松×皓月及其亲本抗氟性较弱的结果相一致。

家蚕的抗逆性表现 (包括抗高温、多湿、干旱、污染和病原物等) 具有明显的品种差异性, 这是抗性育种的前提条件 (向仲怀, 1995)。不同家蚕品种的抗逆性差异与其体内的生理代谢密切相关, 如家蚕不同品种肠道消化液中的蛋白酶活性与同工酶组成存在明显差异 (王章娥等, 1989), 且其体内代谢酶活性的变化与抗微孢子虫感染有关 (郭锡杰等, 1996; 沈中元等, 1996); 逆境条件下家蚕体内保护酶活性的变幅大小可作为衡量抗逆性强弱的重要生理指标 (吴小锋等, 1998; 陈萍等, 2000)。家蚕不同品种幼虫体内的生理代谢水平差异可能导致对 *Bt* 水稻花粉的敏感性不同。有研究表明, 昆虫肠道消化液中的蛋白酶对 *Bt* 杀虫蛋白不仅有激活作用, 还具降解作用 (Keller 等, 1996)。高活性特异蛋白酶对 *Bt* 杀虫

蛋白的过度消化, 可导致其毒性降低。如烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 抗 Bt 品系的中肠酶液在离体条件下具有对 Bt 杀虫蛋白的降解活性 (Forcada 等, 1996)。

家蚕不同品种幼虫对 Bt 水稻花粉的敏感性不同, 还可能与其中肠细胞膜上 Bt 杀虫蛋白受体的种类、数量和亲和力等差异有关。Bt 杀虫蛋白通过昆虫中肠细胞膜上专一性受体蛋白而起作用, 其毒性大小与中肠受体的结合能力呈正相关 (Hofmann 等, 1988)。因此, 家蚕不同品种幼虫中肠细胞膜上受体的类型、数量以及结合亲和性变化可导致对 Bt 水稻花粉的敏感性差异。此外, Bt 水稻花粉中表达的杀虫蛋白在家蚕幼虫肠道中的释放量亦可能影响不同品种对 Bt 水稻花粉敏感性的变化。至今, 有关家蚕不同品种幼虫对 Bt 水稻花粉敏感性差异的内在机制并不明了, 尚有待于进一步研究。

表 1.2 家蚕幼虫经不同水稻花粉处理后的生存分析比较
Table 1.2 Comparative survival analysis of silkworm larvae exposure to rice pollens

品种 Race		Bt 花粉 / 非 Bt 花粉 Bt pollen / Non-Bt pollen			Bt 花粉 / 对照 Bt pollen / CK			非 Bt 花粉 / 对照 Non-Bt pollen / CK		
		χ^2	df	P	χ^2	df	P	χ^2	df	P
菁松×皓月 Jingsong×Haoyue	Log-Rank	29.974	1	<0.001	85.898	1	<0.001	0.090	1	0.764
	Wilcoxon	28.709	1	<0.001	85.716	1	<0.001	0.089	1	0.765
菁松 Jingsong	Log-Rank	28.285	1	<0.001	104.389	1	<0.001	2.168	1	0.141
	Wilcoxon	26.311	1	<0.001	102.614	1	<0.001	2.168	1	0.141
皓月 Haoyue	Log-Rank	29.262	1	<0.001	65.406	1	<0.001	0.323	1	0.570
	Wilcoxon	28.306	1	<0.001	63.532	1	<0.001	0.433	1	0.511
丰一×54A Fengyi×54A	Log-Rank	1.935	1	0.164	31.016	1	<0.001	10.771	1	0.001
	Wilcoxon	2.062	1	0.151	30.829	1	<0.001	10.573	1	0.001
丰一 Fengyi	Log-Rank	15.445	1	<0.001	53.891	1	<0.001	4.842	1	0.028
	Wilcoxon	13.024	1	<0.001	51.116	1	<0.001	4.944	1	0.026
54A	Log-Rank	26.837	1	<0.001	39.662	1	<0.001	0.001	1	0.994
	Wilcoxon	24.821	1	<0.001	33.067	1	<0.001	0.010	1	0.921

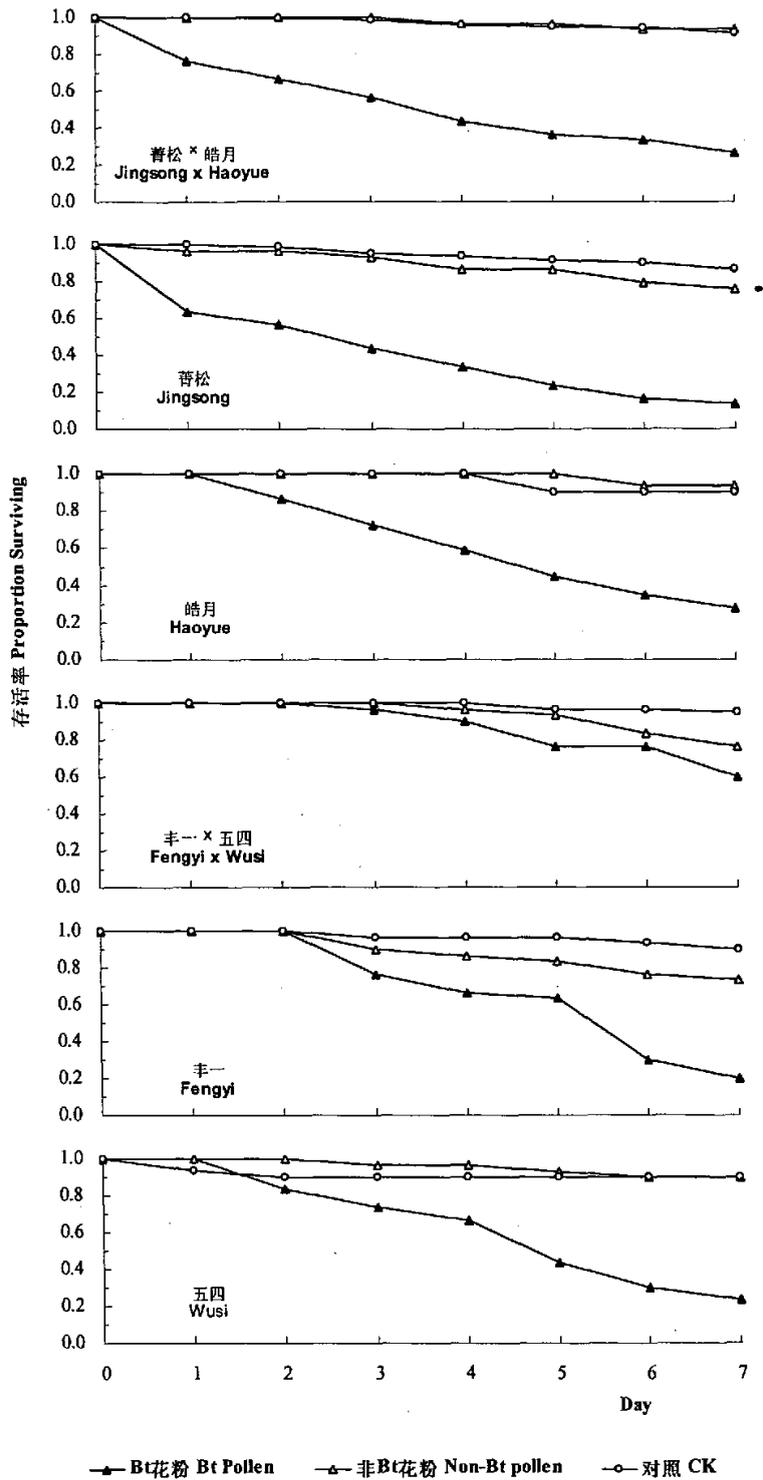


图 1.1 家蚕不同品种幼虫喂食不同水稻花粉后的存活曲线
 Figure 1.1 Survival curves of silkworm larvae from different varieties exposure to rice pollens

第三章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕不同品种的生物学影响

在室内条件下,持续饲喂转 Bt 基因水稻——华池 2000B1 花粉可对家蚕的存活、生长发育和蚕茧性状等指标造成极为显著的负面影响(蒋彩英,2004),而且华池 2000B1 花粉对家蚕不同品种幼虫的毒性不尽相同(见第二章),但对家蚕不同品种的生物学指标影响究竟如何,至今尚不明了。为此,我们根据家蚕不同品种对华池 2000B1 花粉的敏感性,并考虑田间实际情况如水稻扬花期通常与夏秋蚕饲养时间相重叠等因素,特选择丰一×五四及其亲本为对象,以对丰一×五四幼虫具亚致死剂量 Bt 水稻花粉处理的桑叶持续饲喂不同品种幼虫,冀以在室内条件下可能出现的最大风险角度,评估 Bt 花粉对不同家蚕品种生物学指标的影响。

1 材料与方法

1.1 供试家蚕品种

家蚕秋蚕品种:丰一×五四及其亲本丰一和五四,购于浙江省蚕种公司。按常规方法催青得初孵蚁蚕,供试验用。

1.2 供试水稻品系

供试水稻品系——华池 2000B1 同第二章 1.1.2。

1.3 供试桑树品种

家蚕室内饲养所用桑叶均采自浙大华家池校区实验桑园,桑树(*Morus alba* Linnaeus)品种为农桑 8 号。

1.4 水稻花粉田间采集

花粉的田间采集及处理过程同第二章 1.1.3。

1.5 花粉悬浮液配制及饲用桑叶处理

参照蒋彩英(2004)方法配制 Bt 水稻及其非转基因亲本的花粉悬浮液 D₃(0.05g/ml)及其 25×稀释液 D₁(0.002g/ml)。用打孔器(Φ7.0cm)制成一定面积的新鲜桑叶,分别浸入不同浓度的花粉悬浮液中,不断摇晃使叶片充分粘着花粉混合液,取出自然晾干后,分别

置于灭菌果酱瓶（500ml）中饲喂不同品种家蚕蚁蚕直至化蛹。各浓度处理重复 6 次，每重复处理 10 头试虫，以无菌水处理的桑叶为对照。

试验在人工气候室内进行，室内温度 $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $75\pm 1.0\%$ ，光照 L:D 为 16:8h。试验期间每天观察并记录死亡和脱皮情况，低龄幼虫龄末称量眠重并考察取食叶面积；化蛹后考查各处理的化蛹率、蛹历期、茧重、蛹重和茧壳重，待成虫羽化后考查羽化率、成虫寿命、怀卵量和产卵量等生物学指标。

1.6 数据分析

所有数据均用 DPS 统计软件（唐启义等，1995）进行分析。各处理平均数比较采用单因素统计分析（ANOVA）与 Duncan's 新复极差测验，百分数经反正弦平方根转换后进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 幼虫期相关生物学指标

2.1.1 幼虫死亡率

不同家蚕品种连续饲喂不同浓度 Bt 水稻花粉后，各龄幼虫死亡率呈现差异性变化（图 2.1）。就总体趋势而言，不同品种的幼虫死亡率随 Bt 水稻花粉浓度增高而增高，且差异达显著。

同一家蚕品种低龄幼虫的死亡率以较高剂量 Bt 水稻花粉处理（ D_3 ）的相对较高，较低剂量处理的相对较低，存在明显的剂量效应；此后，随着虫龄的增长，低剂量处理的幼虫死亡率似呈增高再降低的变化趋势。不同处理间，幼虫死亡率在低龄时存在显著性差异，而在高龄时差异则不显著。经非 Bt 水稻花粉处理的家蚕幼虫死亡率明显低于相同浓度 Bt 水稻花粉处理的，但两者间的差异多不显著；而且非 Bt 水稻花粉处理的幼虫死亡率变化与 Bt 水稻花粉处理的基本一致。

不同家蚕品种间，以杂交种——丰一×五四的各龄死亡率相对较低，其亲本——丰一和五四则以五四的各龄死亡率明显较高，这表明 Bt 水稻花粉对家蚕原种幼虫的存活影响显著高于杂交种的。

2.1.2 幼虫历期

持续取食水稻花粉后，家蚕不同品种各龄幼虫历期的变化趋势相对一致，均呈现不同程度的延长（图 2.2）。家蚕不同品种幼虫经水稻花粉持续饲喂后的各龄幼虫历期均存在极显著差异，其中以较高剂量（ D_3 ）Bt 花粉处理对幼虫历期的影响最为显著；非 Bt 水稻花粉的持

续处理亦能延长不同品种幼虫的各龄历期，但影响程度明显较 Bt 水稻花粉的为轻。

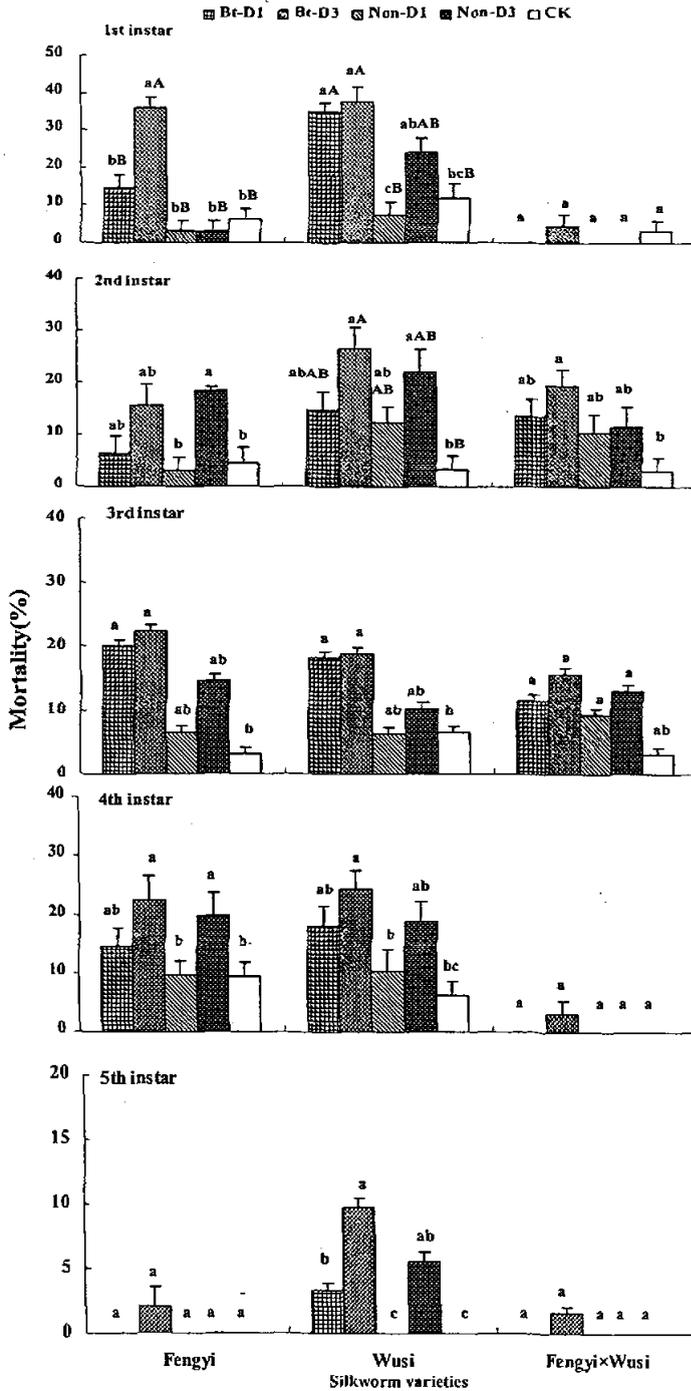


图 2.1 家蚕不同品种连续饲喂不同水稻花粉后的各龄死亡率

Figure 2.1 Larval mortality of different silk worm varieties after continuously exposed to different rice pollens (注: Bt-D₁, 0.002g/ml Bt 水稻花粉; Bt-D₃, 0.05g/ml Bt 水稻花粉; Non-D₁, 0.002g/ml 非 Bt 水稻花粉; Non-D₃, 0.05g/ml 非 Bt 水稻花粉, 下同)

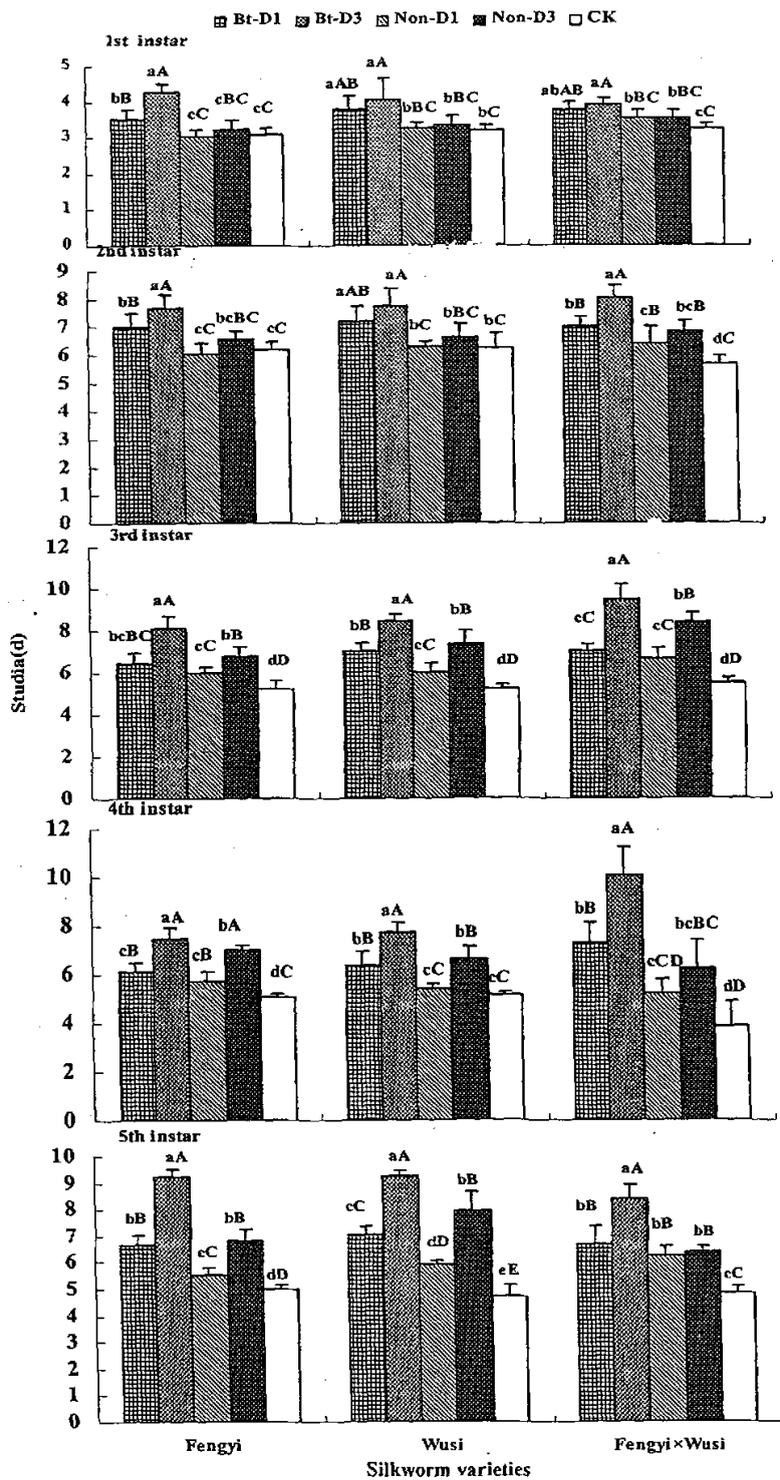


图 2.2 家蚕不同品种连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫历期

Figure 2.2 Larval studia of different silkworm varieties after continuously exposed to different rice pollens

2.1.3 幼虫体重

持续取食水稻花粉可导致家蚕不同品种幼虫体重的明显变化(图 2.3)。家蚕原种(丰一、五四)与杂交种(丰一×五四)的幼虫体重变化趋势并不一致,其中水稻花粉对杂交种低龄幼虫的影响较为明显,而对原种则以高龄幼虫的影响较为明显,但最终两者又趋于一致。不同品种幼虫取食 Bt 水稻花粉后,其体重多明显下降,且随处理浓度增高而下降更为显著;取食低浓度非 Bt 水稻花粉可促进家蚕不同品种幼虫的体重增加,但高浓度则可导致体重降低,其影响程度与低浓度 Bt 水稻花粉的相似。

2.1.4 低龄幼虫取食量

家蚕不同品种低龄幼虫在水稻花粉持续饲喂下,其取食量均受到不同程度的抑制,其中以高浓度 Bt 水稻花粉的抑制作用最为显著,其次为低浓度 Bt 水稻花粉、高浓度和低浓度非 Bt 水稻花粉(图 2.4)。不同家蚕品种间的取食量差异不明显。

2.2 蛹期相关生物学指标

2.2.1 化蛹率

家蚕不同品种幼虫经不同水稻花粉不同浓度持续喂食后,其化蛹率存在极显著差异(图 2.5)。不同水稻花粉对丰一×五四的化蛹率存在相似影响,经低浓度水稻花粉处理的化蛹率明显高于对照,但差异未达显著;高浓度水稻花粉处理的化蛹率明显低于低浓度水稻花粉处理的和对照,其中不同浓度水稻花粉处理间的差异达显著水平。不同水稻花粉对丰一化蛹率的影响与丰一×五四的较为相似,其中低浓度 Bt 水稻花粉处理的化蛹率未呈增高趋势,而且高浓度非 Bt 水稻花粉处理的影响亦没有丰一×五四的明显。不同水稻花粉处理可导致五四的化蛹率明显降低,其中以高浓度水稻花粉的影响更为明显。

2.2.2 蛹重与茧壳重

幼虫期连续饲喂经高浓度 Bt 水稻花粉处理的桑叶后,丰一×五四的蛹重和茧壳重虽均有所下降,但差异不显著;而丰一和五四则多有显著的负面影响(图 2.6)。同一家蚕品种、不同水稻花粉处理间的蛹重与茧壳重差异并不明显。

2.2.3 蛹历期

家蚕不同品种幼虫经不同水稻花粉处理后的蛹历期均存在显著性变化(图 2.7)。丰一×五四幼虫持续饲喂水稻花粉后,蛹历期呈现不同程度的缩短,其中以低浓度 Bt 水稻花粉处理的达显著差异。丰一和五四经 Bt 水稻花粉处理后的蛹历期均显著延长,其中以高浓度花

粉处理的影响最为显著；高浓度非 Bt 水稻花粉处理后，丰一和五四蛹历期亦有所延长，而低浓度非 Bt 水稻花粉处理的则无明显影响。

2.3 成虫期相关生物学指标

Bt 水稻花粉对家蚕幼虫期的持续处理，不仅对蛹期的生物学指标产生明显影响，而且该影响可一直延续至成虫期。

2.3.1 羽化率

不同水稻花粉处理对家蚕不同品种的羽化率影响较为相似（图 2.8）。家蚕的羽化率虽以较高浓度 Bt 花粉处理的明显较低，但不同处理间的差异并不显著。

2.3.2 成虫寿命

家蚕不同品种幼虫经不同水稻花粉持续处理后，其成虫寿命呈现极显著变化（图 2.9）。不同水稻花粉处理可导致成虫寿命多呈显著性缩短，其中以高浓度花粉的影响更为显著。不同品种间，以杂交种——丰一×五四的寿命显著较高。

2.3.3 产卵量与腹中残余卵量

不同水稻花粉处理后，家蚕雌蛾产卵量呈现极显著差异变化，其中以高浓度水稻花粉的影响极为显著，可导致不同品种的产卵量极显著降低（图 2.10）。不同水稻花粉相同浓度处理下，以 Bt 水稻花粉对产卵量的影响更为显著。不同家蚕品种之间，以丰一×五四的产卵量相对较高。

不同水稻花粉处理后，家蚕雌蛾腹中残余卵量的差异变化趋势与产卵量正相反，即高浓度水稻花粉处理的残余卵量显著较高；Bt 水稻花粉处理的残余卵量较相同浓度非 Bt 水稻花粉处理的显著较高。

3 讨论

家蚕不同品种幼虫经不同水稻花粉持续饲喂后，其生物学指标如幼虫存活、生长发育和繁殖等均受到不同程度影响，其中以高浓度 Bt 水稻花粉的影响较为显著。该结果与蒋彩英（2004）的研究结果相似，表明在室内人为胁迫条件下，Bt 水稻花粉对家蚕不同品种均具有较强的毒害作用。Bt 水稻花粉的室内人为胁迫作用并不足以说明在自然条件下对家蚕同样存在严重的不利影响，这还受到自然和人为等众多因素的影响。研究表明，尽管华池 2000B1 花粉在室内人为胁迫条件下对家蚕秋用品种——秋丰×白玉的存活、生长发育和蚕茧性状等指标存在极显著的负面影响，但在自然条件下对家蚕的生态风险却相对较低（蒋彩

英, 2004)。这与 Bt 玉米花粉对大斑蝶自然种群的生态风险可以忽略 (Wraight 等, 2000; Hellmich 等, 2001a; Oberhauser 等, 2001; Berenbaum, 2001; Pleasants 等, 2001; Sears 等, 2001; Stanley-Horn 等, 2001; Zangerl 等, 2001; Wolt 等, 2003) 相类似。在自然条件下, 有关 Bt 水稻花粉飘移对不同家蚕品种的生态安全性风险有待于今后作进一步的系统评价。

家蚕遭受 Bt 水稻花粉的生物学胁迫作用因不同品种而存在明显差异, 其中以杂交种——丰一×五四受到 Bt 水稻花粉的影响程度明显较其亲本——丰一和五四为轻。这与毒力测定结果 (见第二章) 一致, 表明家蚕对 Bt 水稻花粉的抵抗能力存在明显的品种差异。丰一×五四是由何斯美等 (1989) 育成的抗高温多湿和抗氟性强的夏秋蚕品种。本文试验表明该杂交种对 Bt 水稻花粉亦具有较强的抵抗性, 这可能与其本身具有较强的抗逆性有关。对 Bt 水稻花粉适应性的这种品种差异, 为家蚕对 Bt 水稻花粉/Bt 蛋白的抗性育种提供了前提保障, 同时亦可用于今后的家蚕品种布置以及 Bt 水稻的区划布局。

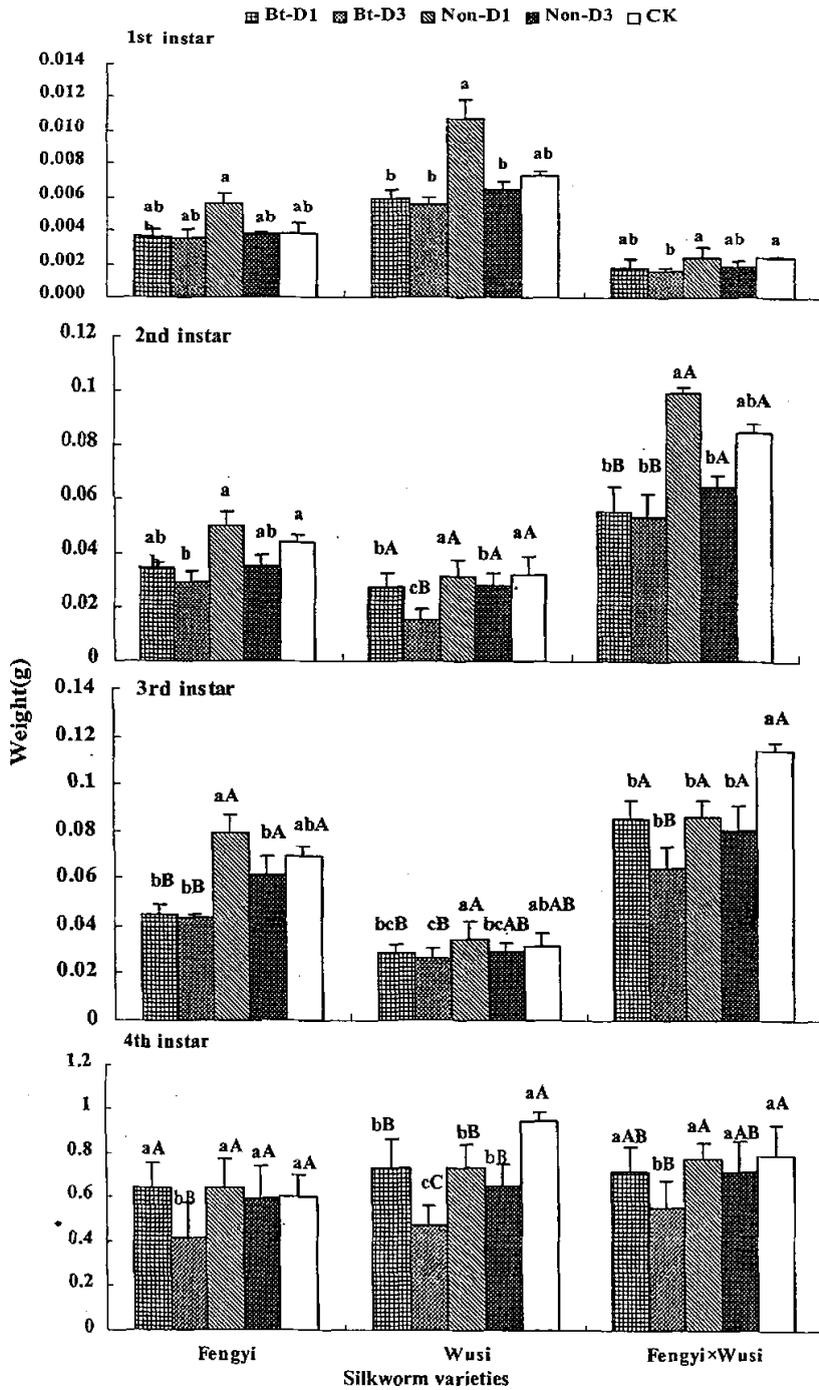


图 2.3 家蚕不同品种连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫体重

Figure 2.3 Body weight of the larvae from different silkworm varieties after continuously exposed to different rice pollens

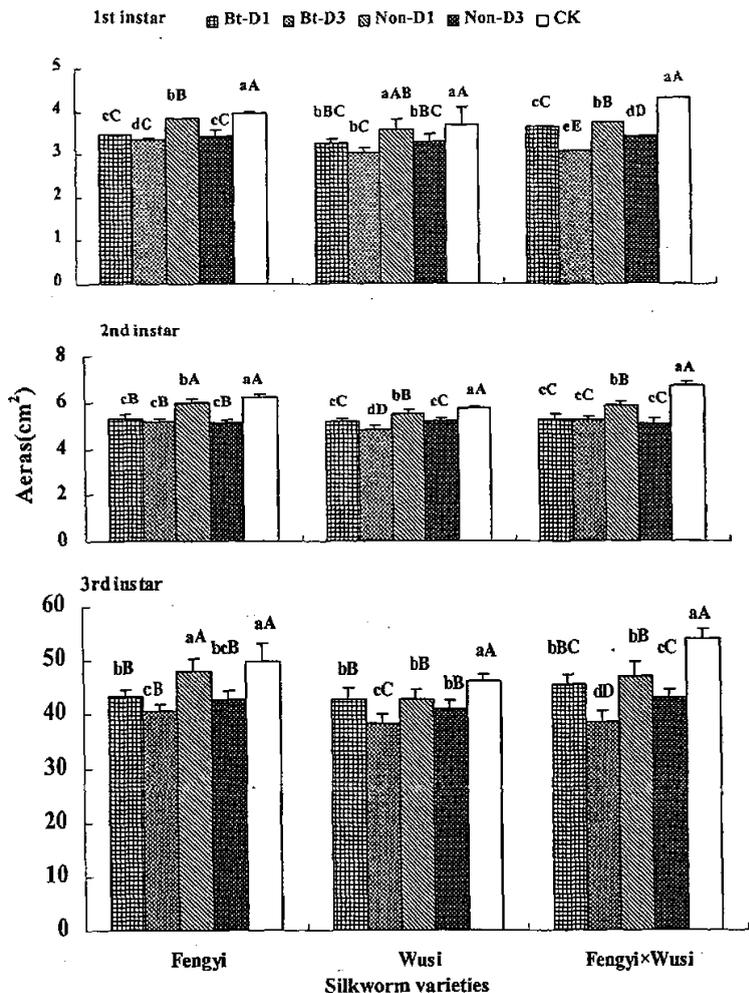


图 2.4 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的 1~3 龄取食量

Figure 2.4 Leaf consumption of 1st instar to 3th instar larva from different silkworm varieties after continuously exposed to different rice pollens

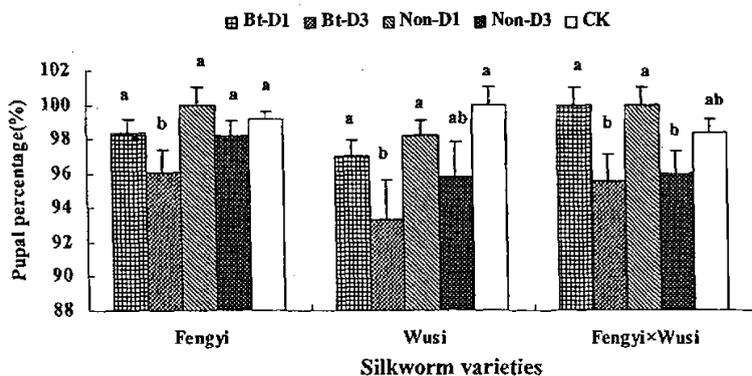


图 2.5 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的化蛹率

Figure 2.5 Pupation rate of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

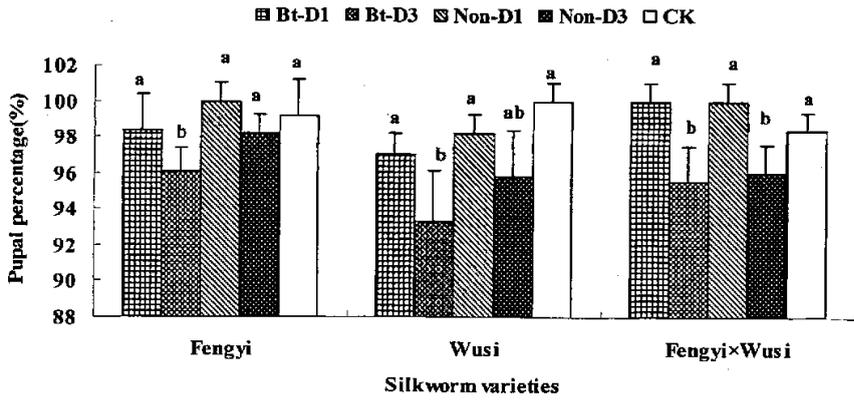


图 2.5 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的化蛹率

Figure 2.5 Pupation rate of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

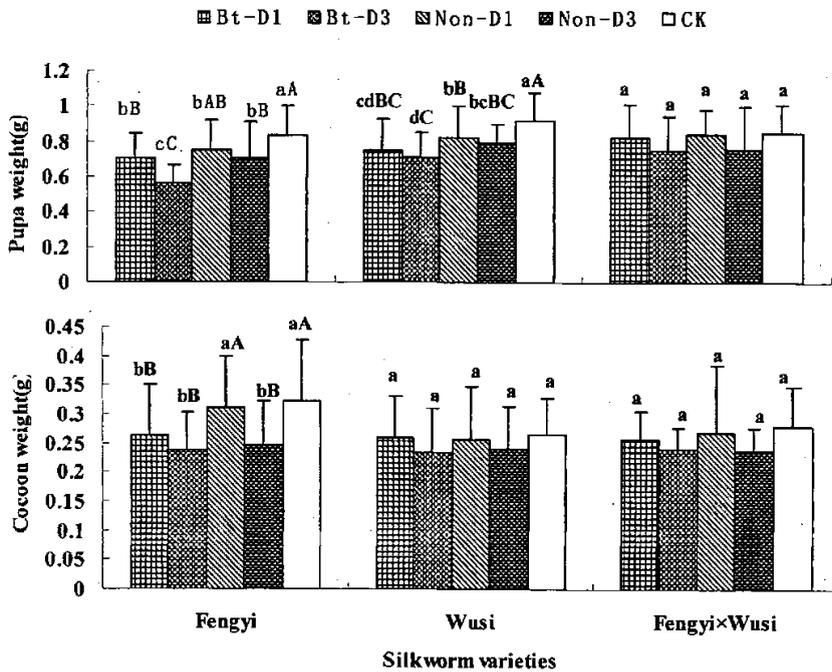


图 2.6 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的蛹重和茧壳重

Figure 2.6 Pupa weight and cocoon shell weight of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

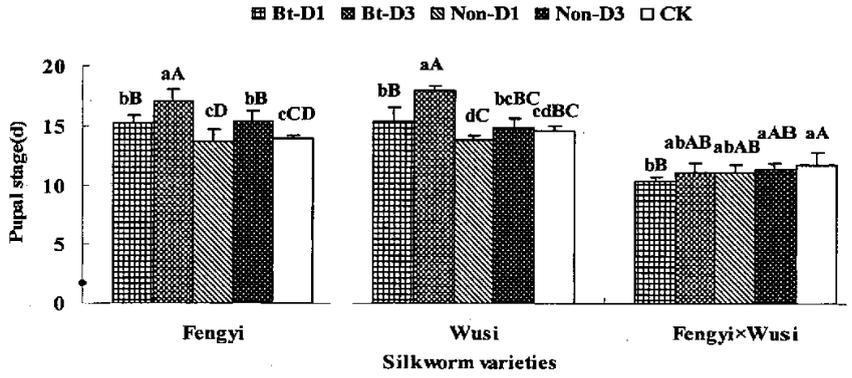


图 2.7 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的蛹历期

Figure 2.7 Pupal stadia of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

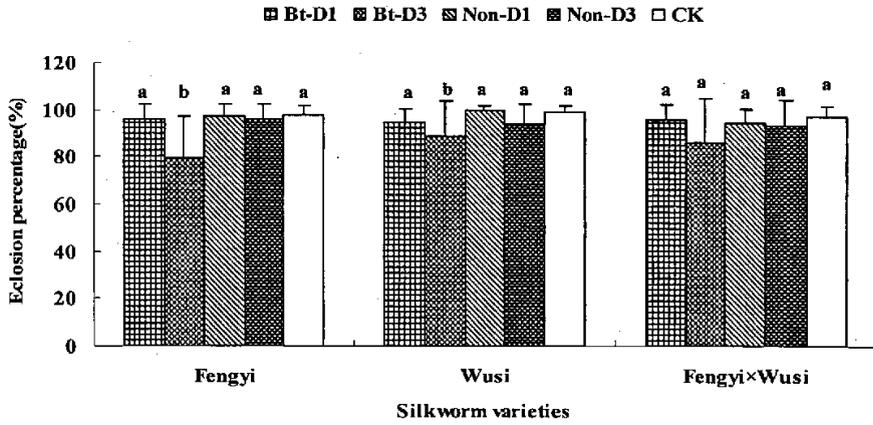


图 2.8 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的羽化率

Figure 2.8 Eclosion percentage of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

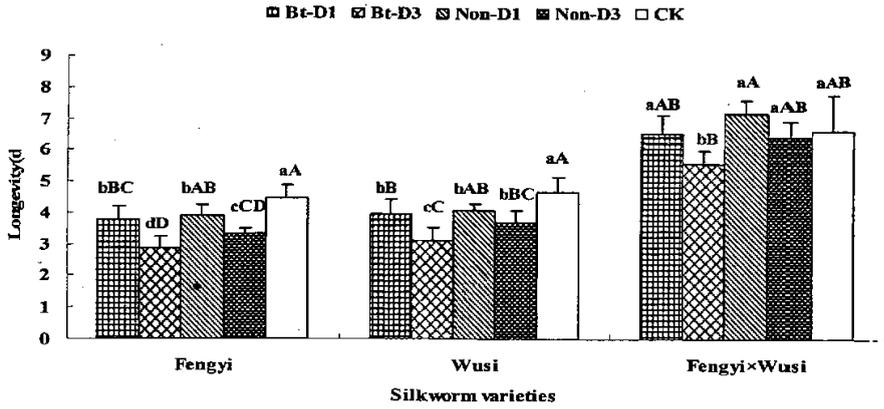


图 2.9 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的成虫寿命

Figure 2.9 Adult longevity of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

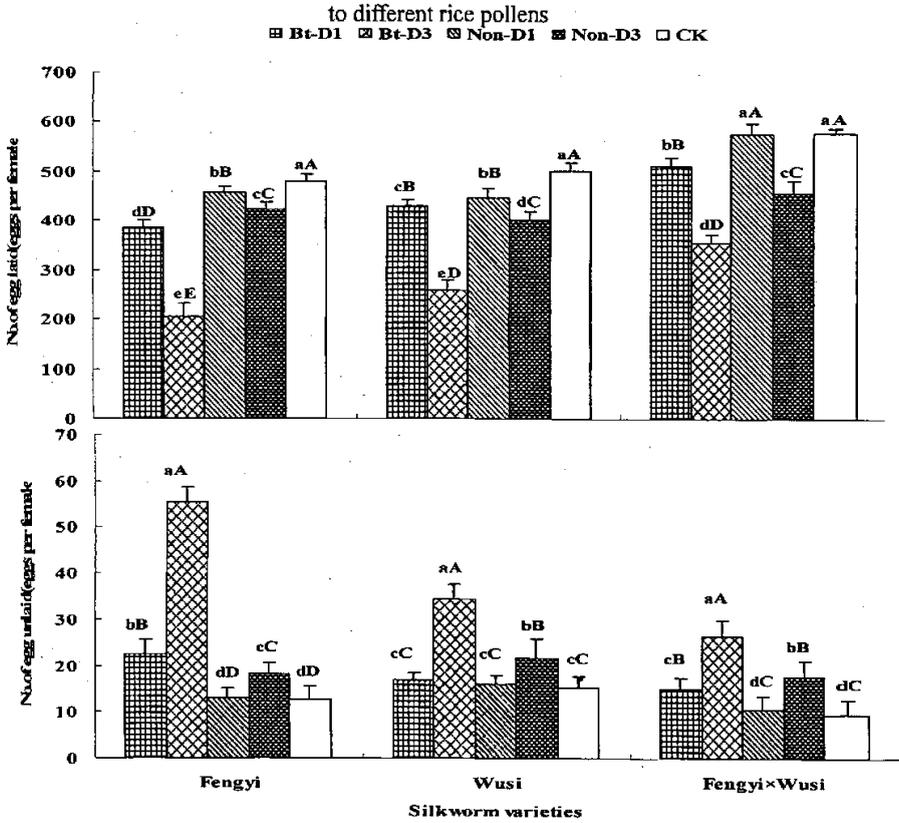


图 2.10 家蚕不同品种幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的雌虫产卵量与腹中残余卵量

Figure 2.10 Number of laid and unladen egg of different silkworm varieties after larvae continuously exposed to different rice pollens

第四章 总讨论

本文就转Bt基因抗虫水稻花粉对家蚕不同品种的毒理学与生物学影响了较全面地研究,基本明确了家蚕不同品种对Bt水稻花粉的敏感性差异,以及在室内持续饲喂条件下遭受Bt水稻花粉胁迫作用的程度差异,初步探明家蚕杂交种,特别是夏秋用杂交品种——丰一×五四对Bt水稻花粉胁迫作用的抵抗力较其亲本及其他原种要强。该结果对于今后Bt水稻推广规划以及家蚕的抗性育种与品种布局具有一定的指导意义。

1. 家蚕不同品种对 Bt 水稻花粉的敏感性差异

家蚕不同品种对Bt水稻花粉的敏感性差异受到许多因素的影响,如Bt水稻花粉中表达的Bt蛋白种类及其表达量(与启动子基因类型有关)、家蚕品种本身的抗逆性、中肠对水稻花粉的消化能力以及中肠细胞上Bt蛋白受体的数量与结合力等。

本文所使用的Bt水稻品系——华池2000B1系由含*cry1Ab*基因和Ubiquitin启动子的粳稻纯合品系——克螟稻1号(KMD1)与早籼稻品种浙辐504的杂交纯合品系。由于Ubiquitin启动子是系统表达的启动子,因此华池2000B1的花粉中亦能表达*cry1Ab*基因,其中Bt毒蛋白表达量与其叶片、茎秆和根等组织/器官中的表达水平相一致(Shu等, 2000; Wu等, 2002; 蒋彩英, 2004),且比已报道的Bt玉米品系如Bt11、Mon810和176品系等(Hansen等, 2000; Wraight等, 2000; EPA, 2001; Zangerl等, 2001)均明显要高。在室内条件下,家蚕不同品种对华池2000B1花粉所表现的毒理学与生物学指标变化与经Bt纯蛋白Cry1Ab处理后的变化相一致,这表明华池2000B1花粉中Bt蛋白的高水平表达是导致家蚕不同品种遭受不利影响的主要原因。但是,家蚕不同品种对该水稻花粉同时表现出的毒理学与生物学指标差异则主要与家蚕品种本身的抗逆性、对花粉消化能力以及中肠表皮细胞上Bt蛋白受体的特征有关。

家蚕不同品种对高温、多湿、干旱、污染和病原物等逆境的抵抗性存在明显的多样性(向仲怀, 1995)。通常认为,不同家蚕品种的抗逆性差异与其体内的生理代谢密切相关,如家蚕不同品种肠道消化液中的蛋白酶活性与同工酶组成存在明显差异(王章娥等, 1989),且其体内代谢酶活性的变化与抗微孢子虫感染有关(郭锡杰等, 1996; 沈中元等, 1996);逆境条件下家蚕体内保护酶活性的变幅大小可作为衡量抗逆性强弱的重要生理指标(吴小锋等, 1998; 陈萍等, 2000)。家蚕不同品种幼虫体内的生理代谢水平差异亦可能导致对Bt水稻花粉的敏感性不同。有研究表明,昆虫肠道消化液中的蛋白酶对Bt杀虫蛋白不仅有激活作用,还具降解作用(Keller等, 1996)。高活性特异蛋白酶对Bt杀虫蛋白的过度消化,可导致其毒性降低。如烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)抗Bt品系的中肠酶液在离体条件下具有对Bt杀虫蛋白的降解活性(Forcada等, 1996)。

由于Bt杀虫蛋白是通过与昆虫中肠细胞膜上专一性受体蛋白结合而起作用,其毒性大小与中肠受体的结合能力呈正相关(Hofmann等, 1988)。因此,家蚕不同品种幼虫中肠细胞膜上受体的类型、数量以及结合亲和性变化可导致对Bt水稻花粉的敏感性差异。此外,我们研究发现水稻花粉在不同家蚕品种食道中的破损比例亦存在明显差异,这表明不同家蚕品种对Bt水稻花粉的消化能力不同可导致花粉中表达的杀虫蛋白在家蚕幼虫肠道中的释放量不同,进而可能影响不同品种对Bt水稻花粉敏感性的变化。至今,有关家蚕不同品种幼虫对Bt水稻花粉敏感性差异的内在机制并不明了,尚有待于进一步研究。

2. Bt 水稻花粉对家蚕不同品种的生态安全性评价

室内条件下,Bt水稻花粉对家蚕不同品种的存活、生长发育与繁殖等存在显著的负面影响,这表明Bt水稻花粉对家蚕不同品种存在毒害效应,但不能由此断定在自然条件下Bt水稻花粉对家蚕存在严重的生物安全风险。风险被认为是危害与暴露的函数。要明确Bt水稻花粉对家蚕不同品种的生态风险,还需探明家蚕不同品种对Bt水稻花粉的暴露概率,而后者显然与Bt水稻释放花粉能力、家蚕饲养时期与Bt水稻扬花期的重迭程度和Bt水稻花粉在田间的自然飘移扩散以及风雨等自然气候条件的影响。

在室内人为胁迫条件下,Bt玉米花粉对大斑蝶存在明显的危害,但经过为期2年的田间调查研究,证明目前正商品化种植的Bt玉米花粉在自然条件下对大斑蝶的生态风险可以忽略(Wraight等, 2000; Hellmich等, 2001a; Oberhauser等, 2001; Berenbaum, 2001; Pleasants等, 2001; Sears等, 2001; Stanley-Horn等, 2001; Zangerl等, 2001; Wolt等, 2003)。华池2000B1花粉在室内持续饲喂条件下,对家蚕品种——秋丰×白玉存在显著的毒害作用,但经过2年田间调查与各种可能影响因素的综合分析,认为华池2000B1花粉对该家蚕品种应无明显的生态风险(蒋彩英, 2004)。

由于家蚕是经人工驯化的需在室内人为饲养、繁殖的绢丝昆虫,通常已经完全不能适应野外的环境条件。因此,转Bt基因抗虫水稻花粉对家蚕的生态胁迫作用更易受人为因素的影响,并且其生态风险也更容易人为管理并控制。有关Bt水稻花粉对家蚕不同品种的生态风险评价还需长期、系统地开展。

3. 本研究的特色与创新点

就转基因抗虫水稻花粉对非靶标经济昆虫——家蚕不同品种毒理学和生物学影响展开研究,这在国内外尚属首次。本文结果对于今后Bt水稻推广规划以及家蚕的抗性育种与品种布局具有一定的指导意义。

4. 今后的研究方向

由于试验时间的限制，本论文仅就转Bt基因水稻——华池2000B1花粉对6种家蚕品种的毒理学和生物学影响作了相对初步研究，今后可在以下方面再作深入探讨。

- 1) 明确不同Bt水稻花粉对家蚕不同品种的影响，进而系统评价Bt水稻花粉对家蚕不同品种的生物安全性；
- 2) 明确Bt水稻花粉对家蚕不同品种体内解毒酶、保护酶及其它代谢相关酶系的影响，并结合生产上氟污染严重的现状，开展家蚕对Bt水稻花粉的抗性研究。

参考文献

- 陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 等. 2004. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食与产卵行为的评价. 中国农业科学, 37(2): 222~226.
- 陈瑞英, 张亚平, 张传溪. 1995. 用正交试验法筛选无菌饲养用稚蚕人工饲料. 蚕业科学, 21(2): 124~127
- 崔金杰, 夏敬源, 马艳. 2002. 转双价基因 (*cryIAc+CpTI*) 抗虫棉ZGK9712对小地老虎抗性研究. 棉花学报, 14: 3~7.
- 崔金杰, 夏敬源. 1999. 转*Bt*基因棉对天敌种群动态的影响. 棉花学报, 11(2): 84~91.
- 崔旭红, 焦晓国, 张国安, 等. 2002. 转*Bt*基因水稻对稻飞虱及蜘蛛种群数量的影响. 华中农业大学学报, 21: 356~358.
- 邓曙东, 徐静, 张青文, 等. 2003. 转*Bt*基因棉对非靶标害虫及害虫天敌种群动态的影响. 昆虫学报, 46: 1~5.
- 傅强, 王锋, 李冬虎, 等. 2003. 转基因抗虫水稻MSA和MSB对非靶标害虫褐飞虱和白背飞虱的影响. 昆虫学报, 46(6): 697~704
- 郭锡杰, 朱峰, 黄可威, 等. 1996. 微粒子感染家蚕对肠液蛋白酶及中肠碱性磷酸酶活性的影响. 蚕业科学, 22(2): 123~124.
- 侯文胜, 郭三堆, 路明. 2002. 利用转基因技术进行植物遗传改良. 生物技术通报, (1): 10~15.
- 侯丙凯, 陈正华. 2000. 植物抗虫基因工程研究进展. 植物学通报, 17(5): 385~393.
- 姜永厚, 傅强, 程家安, 等. 2004. 转*Bt*基因水稻表达的毒蛋白Cry1Ab在害虫及其捕食者体内的积累动态. 昆虫学报, 47(4): 454~460.
- 瞿文学, 李晓兵, 田文忠, 等. 2000. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因*Xa21*转入我国的5个水稻品种. 中国科学(C辑), 2: 200~206.
- 李宝健, 欧阳学智, 许耀. 1990. 应用农杆菌Ti质粒系统将外源基因转入籼稻细胞研究. 中国科学(B辑), 2: 144~149.
- 李文东, 吴孔明, 王小奇, 等. 2003. 转*CryIAc*和*CryIA+CpTI*基因棉花花粉对柞蚕生长发育影响的评价. 农业生物技术学报, 11: 489~493.
- 李文东, 叶恭银, 吴孔明, 等. 2002. 转抗虫基因棉花和玉米花粉对家蚕生长发育的影响. 中国农业科学, 35(12): 1543~1549.
- 李向辉, 朱祯. 1998. 生物途径控制虫害. 科学通报, 43(19): 2025~2034.
- 李永春, 张宪银, 薛庆中. 2002. 农杆菌介导法获得大量转双价抗虫基因水稻植株. 农业生物技术学报, 10(1): 60~63.

- 刘巧泉, 姚泉洪, 王红梅, 等. 2004. 转基因水稻胚乳中表达铁结合蛋白提高稻米铁含量. 遗传学报, 31(5): 518~524.
- 刘向东, 翟保平, 张孝羲, 等. 2002. 转基因棉对棉蚜繁殖与取食行为的影响. 南京农业大学学报, 25(3): 27~30.
- 刘志诚, 叶恭银, 傅强, 等. 2003. 转cry1Ab基因水稻对拟水狼蛛捕食作用间接影响的评价. 中国水稻科学, 17(2): 175~178.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃, 等. 2003. 转cry1Ab/cry1Ac基因籼稻对稻田节肢动物群落影响. 昆虫学报, 46(4): 454~46.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃. 2002. Bt水稻对主要非靶标害虫和蜘蛛优势种田间种群动态的影响. 植物保护学报, 29: 138~143.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃. 2003. 转cry1Ab/cry1Ac基因籼稻对稻田节肢动物群落影响. 昆虫学报, 46: 454~465.
- 马炳田, 王玲霞, 李平, 等. 2003. 水稻抗虫转基因光温敏核不育系植株的获得. 应用与环境生物学报, 9(3): 246~249.
- 沈革志, 王新其, 殷丽青, 等. 2004. 通过共转化和花药培养快速获得直链淀粉含量降低且无抗性标记的转基因水稻. 植物生理与分子生物学学报, 30(6): 637~643.
- 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. 1998. Bt转基因水稻“克螟稻”选育. 浙江农业大学学报, 24(6): 579~580.
- 田文中, 丁力, 曹守云, 等. 1998. 植物抗霉素转化水稻和转基因植株的生物鉴定. 植物学报, 40(9): 803~808.
- 万方浩, 刘万学, 郭建英. 2002. 不同类型棉田棉铃虫天敌功能团的组成及时空动态. 生态学报, 22: 935~942.
- 王倍, 杨金水, 葛扣麟, 等. 1995. 低脉冲电泳介导的水稻转基因植株再生. 中国科学(B辑), 25(3): 295~301.
- 王关林. 1998. 植物基因工程原理与技术. 北京: 中国科学出版社, 295~305.
- 王忠华, 倪新强, 徐孟奎, 等. 2001. Bt水稻“克螟稻”花粉对家蚕生长发育的影响. 遗传, 23(5): 463~466.
- 王忠华, 舒庆尧, 崔海瑞, 等. 2002. Bt转基因水稻米粉对家蚕生长发育及中肠显微结构的影响. 中国农业科学, 35(6): 714~718.
- 韦得斯, 崔金杰, 夏敬源, 等. 2002. 中国北方棉区转基因抗虫棉对棉苗蚜及其两种天敌的影响. 棉花学报, 14: 175~179.
- 向仲怀. 1995. 中国蚕种学. 成都: 四川科学技术出版社, 245~270
- 项友斌. 1999. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因cry1Ab和cry1Ac在水稻中的遗传转化及蛋白表达. 生物工程学报, 15(4): 494~500.

- 谢道昕, 范云广, 倪工冲, 等. 1991. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花11号获得转基因植株. 中国科学(B辑), 8: 831~834.
- 阎凤鸣, 许崇任, M Bengtsson, 等. 2002. 转*Bt*基因棉挥发性气味的化学成分及其对棉铃虫的电生理活性. 昆虫学报, 45: 425~429.
- 姚江, 张杰, 宋福平, 等. 2003. 苏云金芽孢杆菌Ly30株*cryIIAc*基因的克隆及表达. 农业生物技术学报, 5: 516~519.
- 易自力, 曹守云, 王力. 2001. 提高农杆菌转化水稻频率的研究. 遗传学报, 28(4): 352~358.
- 曾晓慧. 1998. 甜菜夜蛾对苏云金芽孢杆菌抗性的研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文.
- 张宪银. 2001. 用农杆菌介导法将大豆球蛋白基因导入水稻. 浙江大学学报(生命科学版), 27(5): 495~499.
- 周光宇, 王自芬. 1979. 远源杂交的分子基础-DNA片段杂交假说的一个论证. 遗传学报, 6(4): 405~413.
- 周兆澜, 朱祯. 1994. 植物抗虫基因工程研究进展. 生物工程进展, 14: 18~24.
- 朱冰, 黄大年, 杨炜. 1996. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株. 中国农业科学, 29(6): 15~20.
- 朱新生, 朱玉贤. 1997. 抗虫植物基因工程研究进展. 植物学报, 39(3): 282~283.
- 朱祯. 1992. 转基因水稻植株再生及外源人 α -干扰素cDNA的表达. 中国科学(B), 35(2): 149~155.
- Al-Deeb M A, Wiled G E, Higgins R A. 2001. No effects of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environ. Entomol.*, 30: 625~629.
- Anon. 2000. Bt Plant Pesticides Biopesticides Registration Action Document, United States Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/scipoly/sap/October/brad2~scienceassessment.pdf>.
- Barton K A, Whiteley H R, Ying Ning Sun. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidoptera insects. *Plant Physiol.*, 85: 1103~1109.
- Belzunces L, Lenfant C. 1994. In vivo and vitro effects of wheat germ agglutinin and Bowman Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B: 63~69.
- Bernal J S, Grisct J G, Gillogly P O. 2002. Impacts of development on Bt maize intoxicated hosts on fitness parameters of a stem borer parasitoid. *J. Entomol. Sci.*, 37: 27~34.
- Birch A N E, Geoghegan I E, Majerus M E N, et al. 1999. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop

- lectin for aphid resistance. *Mol. Breed.*, 5: 75~83.
- Blumberg D, Navon A. 1997. Interactions among *Heliocoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconmidae), and *Bacillus thuringiensis*. *J. Entomol.*, 90: 1181~1186.
- Bravo A, Hendrickx K, Jansena S, *et al.* 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invert. Pathol.*, 60: 247~253.
- Burgess E P J, Malone L A, Christeller J T. 1996. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, 42: 823~828.
- Cannon R J C. 2000. Bt transgenic crops: risk and benefits. *Integ. Pest Manag. Rev.*, 151~173.
- Chan M T, Chang H H, Ho S L, *et al.* 1993. *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric amylase promoter / β -glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.*, 22: 491~506.
- Christou P, Ford T L, Kofrom M. 1991. Production of transgenic rice from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9: 957~962.
- Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, *et al.* 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3): 807~813
- Daly T, Buntin G D. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for Lepidopteran control on nontarget Arthropods. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1292~1301.
- Datta K. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cry1Ab* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Thero. Appl. Genet.*, 97: 20~30.
- Dively G P. 2005. Impact of transgenic VIP3A \times Cry1Ab Lepidopteran resistant field corn on the nontarget Arthropod community. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1267~1291.
- Dogan E B, Berry R E, Rossignol P A. 1996. Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1105~1108.
- Duan J J, Head G, Mckee M J, *et al.* 2002. Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomol. Exp. Appl.*, 104: 271~280.
- Dutton A, Klein H, Romeis J. 2003. Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biological Control.*, 26: 209~ 215.
- Feitelson J S. 1992. *Bacillus thurngiensis*. *Insects and Beyond Biotechnology*. 10: 271~275.
- Felke M, Lorenz N, Langenbruch G A. 2002. Laboratory studies on the effects of pollen from

- Bt maize on larvae of some butterfly species. *J. Appl. Entomol.*, 126: 320~325.
- Fitt G P. 1994. Field evaluation of transgenic cottons in Australia: environmental considerations and consequences of expanding trial sizes. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*, November Monterey, CA, 37~48.
- Forcada C, Akcacer E M, Garcera N D, *et al.* 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 31: 257~272
- Fujimoto H. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11(10): 1151~1155.
- Gatehouse A M R. 1997. Genetic engineering of rice for resistance to homopteran insect pests resistance to rice insect by gene engineering. *Theor. App. Genet.*, 25: 189~200.
- Ghareyazie B. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing asythetic *cryIAb* gene. *Molecul. Bree.*, (3): 401~414.
- Gill S S, Cowles E A, Pietrantonio P V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 615~636.
- Girard C, Picard-nizou A L, Grallien E, *et al.* 1998. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinase of the honeybee. *Transgenic Res.*, 7: 239~246.
- Goy A, Warren P, White J, *et al.* 1995. Interaction of an insect tolerance maize with organism in the ecosystem, 50~53. In: *Proc, Key Biosafety Aspects of Genetically Modified Organisms*, 10~11 April.
- Hansen Jesse L C, Obrycki J J. 2002. Assessment of the non-target effect of transgenic Bt corn pollen and anthers on the Milkweed tiger moth, *Euchatias egle Drury* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 75: 55~58.
- Hansen Jesse L C, Obrycki J J. 2000. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125: 241~248.
- Hardee D D , Bryan W W. 1997. Influence of *Bacillus thuringiensis transgenic* and nectariless cotton on insect populations with emphasis on the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.*, 90: 663~668.
- Head G, Moar W, Eubanks M, *et al.* 2005. A multiyear, large-scale comparison of Arthropod populations on commercially managed *Bt* and non-*Bt* cotton fields. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1257~1266.
- Hellmich R L, Siegfried B D, Sears M K, *et al.* 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 11925~11930.
- Hiei Y, Ohta S, Kumashiro T, *et al.* 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the T-DNA. *Plant*, 6(2): 271~282.

- High S M, Cohen M B, Shu Q Y, *et al.* 2004. Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends in Plant Science*, 9(5): 44~50
- Hilbeck A, Baumgartner M, Fried P M, *et al.* 1998. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 27: 480~487.
- Hilder V A, Boulter D. 1999. Genetic engineering of crop for insect resistance a critical review. *Crop Prot.*, 18: 177~191.
- Hilder V A, Boulter D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance-a critical revival. *Crop Prot.*, 18: 177~191.
- Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, *et al.* 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.*, 4: 18~25.
- Hofmann C, Vanderbruggen H V, Hofte H, *et al.* 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85(21): 7844~7848.
- Howald R, Zwahlen C, Nentwig W. 2003. Evaluation of *Bt* oilseed rape on the non-target herbivore *Athalia rosae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 106: 87~93.
- Huang J K, Hu R F, Rozelle S, *et al.* 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science*, 308(5722): 688~690.
- James C. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005. ISAAA Briefs No.34. ISAAA: Ithaca, NY
- Johnson M. 1997. Interaction of resistant plants and wasp parasitoids of Tobacco budworm (Lepidoptera:Noctuidae). *Environ. Entomol.*, 26: 207~214.
- JuminTu, Guoan Zhang, Karabi Datta, *et al.* 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotechnology*, 18(10): 1101~1140.
- Keller M, Sneh B, Strizhov N, *et al.* 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 365~373
- Koziel M G, Carozzi N B, Currier T C, *et al.* 1993. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and further uses. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.*, 11:171~228.
- LaKind J S, McKenna E A, Hubner R P, *et al.* 1999. A review of the comparative mammalian toxicity of ethylene glycol and propylene glycol. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 29(4): 331~365.
- Losey J E, Rayor L S, Carter M E. 1999. Transgenic pollen harms monarch butterfly. *Nature*, 399: 214.
- Lozzia G C. 1999. Biodiversity and structure of ground beetle assemblages Coleoptera:

- arbitidae) in *Bt* corn and its effects on non-target insects. *Bull. Zool. Agr. Bachi. Ser. II*, 31: 37~58.
- Malone L A, Pham D M H. 2001. Effect of transgenic products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees(*Bombus ssp.*) *Apidologie*, 32: 287~304.
- Malone L A, Burgess E P J, Gatehouse H S, *et al.* 2001. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie*, 32: 57~68.
- Malone L A, Burgess E P J, Stefanovic D. 1999. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie*, 30: 465~473.
- Malone L A, Giacon H A, Burgess E P J, *et al.* 1995. Toxicity of trypsin endopeptidase inhibitors to honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 88: 46~45.
- Manthavan S, Sudha P M, Pechimuthu S M. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. *J. Inver. Pathol.*, 53: 217~227.
- Miriam D L, Jarrad R P. 2005. Utility of ground beetle species in field tests of potential nontarget effect of Bt crops. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1317~1324.
- Murray E E, Rahleau T R, Eberle M, *et al.* 1991. Analysis of unstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. *Plant Mot. Biol.*, 16: 1055~1060.
- Nayak P, Basu D, Das S, *et al.* 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing *CryIAC* δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*scirpiphaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2111~2116.
- Orr D B, Landis D L. 1997. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *J. Econ. Entomol.*, 90(4): 905~909.
- Ostlite K R, Hutchison W D and Hellmich R L. 1997. Bt corn and European corn borer, long term success through resistance management. *North Cent. Reg. Ext. Publ. 602*. St. paul: Univ. Minn. Ext. Serv..
- Picard-Nizou A L, Grison R, Olsen L, *et al.* 1997. Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioral study in the honeybee. *J. Econ. Entomol.*, 90: 1710~1716.
- Pilcher C D, Obrychi J J, Rice M E, *et al.* 1997. Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.*, 26: 446~454.
- Prasifka J R, Hellmich R L, Dively G P, *et al.* 2005. Assessing the effects of pest management on nontarget arthropods: the influence of plot size and isolation. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1181~1192.

- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, *et al.* 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Rep.*, 15: 727~73.
- Raymond J C C. 2000. Bt transgenic crops: Risks and benefits. *Integr. Pest. Manag. Review.*, 5: 151~173.
- Riddick E W and Barbosa P. 1996. Impact of Cry3A intoxicated *Leptinotarsa decmilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and pollen on consumption, development, and fecundity of *Coleomegila maculate* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann.Entomol. Soc. Am.*, 91: 303~307.
- Schnepf H E, Whiteley H R. 1981. Cloning and expressing of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Esherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2893~2897.
- Schuler T H, Poppy G M, Kerry B R, *et al.* 1998. Insect resistant transgenic plants. *Trends in Biotech*, 16: 168~175.
- Schuler T H, Potting R P J, Denholm I, *et al.* 1999. Parasitoid behaviour and Bt plants. *Nature*, 400: 825.
- Sims S R. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*CryIAc*) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *suthwestern Entomol.*, 20(4): 493~500.
- Snow A A, Palma P M. 1997. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience*, 47: 86~96.
- Stanley-Horn D E, Dively G P, Hellmich R L, *et al.* 2001. Assessing the impact of *cryIAb* expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98(21): 11931~11936.
- Steven E, Naranjo. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the abundance of non-target arthropod natural enemies. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1193~1210.
- Steven E, Naranjo. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the function of the natural enemy community. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1211~1223.
- Stewart L M D, Hirst M, Ferber M L, *et al.* 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect specific toxin gene. *Nature*, 352: 85~88.
- Tang J D, Collins H L, Roush R T, *et al.* 1999. Survival, Weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella*(Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing *CryIAc* toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, 92: 47~55.
- Timothy Daly and G.David Buntin. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for Lepidopteran Control on Nontarget. *Arthropods. Environ. Entomol.*, 34(5): 1292~1301.
- Tomalski M D, Miller L L. 1991. Insect paralysis by baculo virus mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature*, 352: 82~85.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchmiya H., *et al.* 1998. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplast. *Bio/Technology*, 6: 1072~1074.

- Torres J B, Ruberson J R. 2005. Canopy and ground dwelling predatory arthropods in commercial *Bt* and non*Bt* cotton fields: patterns and mechanisms. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1242~1256.
- Turnipseed S G, Sullival M J, Mann J E, *et al.* 1995. Secondary pests in transgenic *Bt* cotton in South Carolina. In *1995 Proceeding Belwede Cotton Conferences*, Memphis, TN: National Cotton Council, USA, 768~769.
- Vain P. 1998. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystain-IND86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 266~271.
- Wang Z, Shu Q, Cui H, *et al.* 2002. Genetic analysis of resistance of *Bt* rice to stripe stem borer (*Chilo Suppressalis*). *Eupytica*, 123(3): 379~386
- Whitehouse M EA, Wilson L J, Fitt G P. 2005. A comparison of arthropod communities in transgenic *Bt* and conventional cotton in Australia. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1224~1241.
- Wilson F D, Flint F M, Deaton W R, *et al.* 1992. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *J. Econ. Entomol.*, 85: 1516~1521.
- Wold S J, Burkness E C, Hutchison W D, *et al.* 2001. In field monitoring of beneficial insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Entomol. Sci.*, 36: 177~187.
- Wraight C L, Zangerl A R, Carroll M J, *et al.* 2000. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7700~7703.
- Wu C, Fan Y, Zhang C, *et al.* 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIAb* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, 17: 129~132.
- Wu K, W Li, H Feng, *et al.* 2002. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris spp.* (*Aphis gossypii*) and its two major enemies in northern China. *Crop protection*, 21: 997~1002.
- Wunn J, Kloti A, Burkhardt P K, *et al.* 1996. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biotech*, 14(2): 171~178.
- Xiong Ying Cheng. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIAb* and *cryIAc* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 2767~2772.
- Zangerl A R, Mckenna D, Wraight CL. 2001. Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 11908~11912.
- Zembryski P, Joos H, Genetello C, *et al.* 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA

into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO*, 16(2): 2143~2150.

Zwahlen C, Nentwig W, Bigler F, *et al.* 2000. Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environ. Entomol.*, 29: 846~850.