

浙江大学

博士学位论文

Bt水稻花粉对家蚕安全性评价及对家蚕安全的Bt  
研究

姓名：蒋彩英

申请学位级别：博士

专业：农业昆虫与害虫防治

指导教师：胡萃;叶恭银

20040501

# 中文摘要

本论文就转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的安全性作了系统评价, 并就对家蚕安全的 Bt 新菌株的生物学作了初步研究。结果如下。

## 1 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的毒理学效应

采用 ELISA 法测定不同 Bt 水稻品系花粉中毒蛋白含量。籼稻品系 TT9-3 花粉中毒蛋白含量约占总可溶性蛋白的 0.01%, 显著低于粳稻 KMD 系列及以其为亲本的杂交后代籼稻纯合品系华池 2000B 系列。采用生物测定法就家蚕不同龄期幼虫对华池 2000B1 和 TT9-3 花粉以及 Bt 纯蛋白 Cry1Ab 的敏感性作了测定。家蚕 1 龄幼虫对华池 2000B1 花粉的敏感性相对较高, 是其对 TT9-3 花粉的 313.2 倍。1 龄幼虫对华池 2000B1 花粉比 3 龄幼虫更敏感 3.83 倍。与 Cry1Ab 蛋白相比, Bt 水稻花粉对家蚕幼虫的毒性显著较低, 差异达 1000 倍以上。

## 2 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的生物学效应

在室内条件下, 选择相当于对家蚕 1 龄幼虫  $LC_{20}$  和  $LC_{50}$  剂量的华池 2000B1 花粉浓度 D1 ( $1311.4 \pm 161.8$  grains/cm<sup>2</sup>) 和 D4 ( $24824.6 \pm 1895.1$  grains/cm<sup>2</sup>), 分别对 1~3 龄、3~5 龄和 1~5 龄幼虫进行持续饲喂处理。Bt 水稻花粉, 特别在 D4 浓度下, 可导致家蚕幼虫死亡率显著增高, 发育历期显著延长, 低龄幼虫体重、化蛹率和羽化率显著降低以及蚕茧质量下降等。Bt 水稻花粉对低龄幼虫的影响较大, 其效应可一直延续至成虫期。这表明华池 2000B1 水稻花粉对家蚕存活、生长发育和蚕茧性状等指标均有极为显著的负面影响。

## 3 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的行为学效应

采用叶碟法就家蚕幼虫对 Bt 水稻花粉的取食选择行为作了观测。当较高浓度的水稻花粉与无花粉对照同时存在时, 家蚕幼虫极显著地选择无花粉对照; 当较低浓度的水稻花粉与无花粉对照同时存在时, 多选择低浓度的水稻花粉。不同龄期幼虫对较低浓度的不同水稻花粉的选择不尽相同。1 龄幼虫多选择非 Bt 水稻花粉, 后随虫龄增大, 逐渐趋向选择 Bt 水稻花粉。就 Bt 水稻花粉而言, 低龄幼虫显著偏向选择较低浓度花粉, 而高龄幼虫有较多选择较高浓度花粉。

## 4 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的生理学效应

对家蚕 1 龄幼虫分别持续饲喂 Bt 水稻华池 2000B1 花粉和 Cry1Ab 蛋白直至化蛹, 同时对经不同处理时间后的幼虫中肠消化酶系即淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶(包括类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶, 类弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)等的比活力进行了测定。Cry1Ab 蛋白持续处理的家蚕幼虫在 2 龄末即全部死亡。Cry1Ab 蛋白对低龄幼虫中肠消化酶系的活性存在明显影响,

而且经 Cry1Ab 处理的酶活随时间的变化趋势与对照的并不一致。Bt 水稻花粉可不同程度地影响幼虫中肠消化酶活性,其中以对脂肪酶、胰凝乳蛋白酶和类弹性蛋白酶活性的影响较为显著。这可能导致幼虫体内正常生理和代谢的动态平衡出现扰动,进而影响家蚕幼虫的生存和生长发育。

## 5 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的组织病理学效应

采用电镜技术就家蚕幼虫在持续饲喂 Bt 水稻花粉后,中肠细胞超微结构的病变过程作了连续观察。经 Bt 水稻花粉处理的 24h 内,家蚕幼虫中肠细胞内质网肿胀呈球形,并伴有少量空泡产生。此后中肠细胞不断空泡化,微绒毛逐渐与细胞断裂,并出现连片脱落;最终中肠细胞破裂,大量胞质外流至肠腔内。Bt 水稻花粉对家蚕幼虫中肠细胞的病理学效应与 Cry1Ab 蛋白处理的相似。

## 6 日照对转 Bt 基因抗虫水稻花粉毒蛋白的影响

不同自然日照时间处理的 Bt 水稻花粉中毒蛋白的含量存在一定变化。Bt 水稻花粉中毒蛋白的相对含量起初先明显下降,后随着时间延长,呈现上升趋势。日照处理对花粉中可溶性蛋白含量无显著影响。就不同日照时间处理的 Bt 花粉对家蚕蚁蚕的毒力测定结果表明,随处理时间延长,LC<sub>50</sub> 值虽有增高趋势,但变化不明显。这表明日照对 Bt 水稻花粉中的毒蛋白含量及活性均无明显影响。

## 7 转 Bt 基因抗虫水稻花粉的田间飘移分布

通过 2 年的田间调查,发现飘落在桑叶上的 Bt 水稻花粉数量随飘移距离增加而呈指数降低。2002 年花粉平均累积飘落密度从稻田内的最高密度 255.0 粒/cm<sup>2</sup> 降低至离田埂 9m 处的 34.6 粒/cm<sup>2</sup>。相似地,2003 年的水稻花粉平均飘落密度从稻田内的 190.8 粒/cm<sup>2</sup> 锐降至离田埂 9m 处的 6.0 粒/cm<sup>2</sup>。Bt 水稻花粉飘落密度随桑树植株高度增加而明显下降。与生长期较长的桑叶相比,水稻花粉在嫩叶上的飘落密度显著较低。降雨可极显著减少 Bt 水稻花粉在桑叶上的飘落密度。采用双面胶和涂有凡士林的载玻片监测水稻花粉飘落密度的结果与桑叶上测得的基本一致。

## 8 自然飘落的转 Bt 基因抗虫水稻花粉对家蚕生物学特性的影响

2002 年和 2003 年分别采集田间不同距离自然飘落有 Bt 水稻华池 2000B1 花粉的桑叶,在室内对家蚕初孵幼虫进行连续饲喂。田间不同距离自然飘落的 Bt 水稻花粉,对家蚕生存、生长发育、繁殖以及蚕茧质量等均无显著影响。2 年试验结果均表明,在 Bt 水稻平均种植面积 315.85m<sup>2</sup> 的条件下,自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕应无显著的负面影响。

## 9 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株的杀虫活性评价

应用时间-剂量-死亡率模型就 Bt 菌株 YJ-2000 对 6 种鳞翅目昆虫的杀虫活性作了初步评价。该菌株对家蚕基本无毒性,而对蔬菜害虫如小菜蛾和菜粉蝶、水稻害虫如三化螟和二化螟和桑树害虫如桑螟幼虫均有不同程度的毒性,其中对小菜蛾和菜粉蝶的毒性最强,幼虫死亡率可高达 100%。

## 10 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株对家蚕的安全性评价

通过与对家蚕蚁蚕表现高毒性的 Bt 菌株 CRY1Ab 和 YJ-1999 的比较,就对多种鳞翅目害虫具明显杀虫活性而对家蚕蚁蚕表现低毒的 Bt 菌株 YJ-2000 对家蚕的生物学安全性进行了研究。YJ-2000 菌株除导致 1 龄幼虫历期延长 11.1%、取食量减少 0%~60.0%及体重降低 52.3%~62.5%外,对 2 龄及其以后各龄幼虫的存活率、发育历期、取食量、眠蚕体重、化蛹率、蛹期、全茧量、蛹重、茧层量、羽化率和产卵量等均无显著影响。相比之下,CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株则不同,高浓度会导致全部蚁蚕死亡,呈现高急性毒性;低浓度虽不能使幼虫全部死亡,但对幸存幼虫的取食、生长发育、结茧和产卵等大多呈现明显的负影响。YJ-2000 菌株对家蚕不仅低毒,而且对其生长发育、结茧和生殖力等均无明显的负作用。

## 11 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株伴孢晶体的蛋白质、抗蛋白酶多肽及其基因型

通过与 Bt 菌株 CRY1Ab 和 YJ-1999 的比较,就菌株 YJ-2000 伴孢晶体的蛋白质、抗胰蛋白酶多肽以及基因型作了初步研究。3 个菌株的蛋白图谱基本相同,均有 136.6kD 主带。经家蚕幼虫中肠液作用后,YJ-2000 和 CRY1Ab 菌株出现 64.5kD 抗蛋白酶多肽,而 YJ-1999 菌株为 63.4kD 多肽;经菜青虫中肠液作用,3 菌株除家蚕中肠液作用产生的抗蛋白酶多肽外,均出现 56.2kD 多肽。在菌株 YJ-2000 中仅能检测到相对含量较低的 23.1kb 质粒,且未能检测到 *cry1*、*cry2* 和 *cry3* 类基因。

**关键词:** 苏云金杆菌; Bt 水稻; 花粉; 家蚕; 生物测定; 存活; 生长发育; 结茧; 生殖力; 消化酶; 淀粉酶; 脂肪酶; 类胰蛋白酶; 类胰凝乳蛋白酶; 类弹性蛋白酶; 氨肽酶; 比活力; 组织病理学; 中肠上皮细胞; 超微结构; 取食行为; 叶碟; 日照; 安全性评价; 非靶标昆虫; 生物安全; 菌株 YJ-2000; 时间-剂量-死亡率模型;  $\delta$ -内毒素; 抗蛋白酶多肽; 基因型

## 前 言

随着现代生物工程技术的迅猛发展,使得多种生物获得了来自其它生物或人工合成基因所编码的能促进优质高产、抵抗病虫害等生物灾害和非生物逆境等的优良性状。1983 年世界首例转基因植物培育成功,标志着人类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。2002 年全球转基因作物种植面积达到 5870 万公顷,较 1996 年约 170 万公顷猛增了 35 倍,其中大豆、棉花、玉米和油菜等 4 种主要转基因作物的种植面积已占这 4 种作物世界总面积的 22%。我国 2002 年转基因作物种植面积达到 210 万公顷,其中转苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 毒素蛋白基因棉花的种植面积在 2001~2002 年间增加了 40%,成为继美国、阿根廷和加拿大之后种植转基因作物面积最大的国家 (James, 2002)。转基因作物带来的社会、经济和生态效益十分明显。据估计,1999 年全球通过应用转基因作物而获得的经济利益达到甚至超过 10 亿美元 (James, 2001),2002 年美国因此获得的净收益高达 15 亿美元 (James, 2002)。

尽管转基因作物在解决人类面临的粮食、资源、环境等重大社会和经济问题以及推动社会进步等方面具有重要作用,但其环境释放后可能带来的潜在风险却引起了世界范围内的广泛关注 (Wolfenbarger 等, 2000; Obrycki 等, 2001)。Dale 等 (2002) 将转基因作物的潜在风险主要概括为: 侵入扩散 (invasiveness)、杂草化 (weediness)、对非靶标生物的毒害作用 (toxicity) 和对生物多样性 (biodiversity) 的影响等,其中转基因抗虫作物花粉飘移对非靶标有益昆虫 (如经济昆虫、天敌昆虫和观赏昆虫等) 的潜在影响,是当今转基因生物安全性的争论焦点之一 (Shelton 等, 2001)。近年来,国际社会对转基因作物安全性的担忧已成为影响世界经济贸易和国际关系的一个重要因素。例如 Losey 等 (1999) 在《Nature》杂志上发表了室内饲喂转 Bt 玉米花粉可导致大斑蝶 *Danaus plexippus* 幼虫死亡的结果后,国际各大主要媒体争相报道,社会公众反应异常激烈,最终导致欧盟委员会冻结了所有转 Bt 玉米的批准程序,转 Bt 玉米主要生产商——孟山都公司股票猛挫 10% (Shelton 等, 1999)。因此,系统开展转基因作物花粉对非靶标有益昆虫潜在风险的研究,对于深入认识、了解转基因作物的潜在风险并建立完整的生物安全研究、评价和管理科学技术体系以保障转基因作物的健康发展和合理利用具有十分重要的意义。

众所周知,水稻是地球上近 30 亿人口的主要食物来源。据估计,到 2025 年水稻产量需再增产 70% 才能满足日益增长人口的需求 (Khush, 1995)。然而水稻病虫害,特别是螟虫 (二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等) 为害严重威胁水稻生产,限制了增产的潜能。据 Herdt (1991) 估算,每年因水稻螟虫为害而造成的产量损失可达 100 亿公斤。为有效控制水稻螟虫为害,并减少化学杀虫剂使用量,自 20 世纪 90 年代以来,国内外已有多个研究组开展了转基因抗虫水稻的研究工作,并在转 Bt 基因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), 而且有些已进入了田间中试 (Tu 等, 2000; Shu 等, 2000; Ye 等, 2001a,b; 2003)。转 Bt 基因水稻的培育成功为水稻增产带来了可能, 其商业化前景十分广阔。但是, 作为转基因抗虫作物, 转 Bt 水稻同样也面临着释放环境之后的生态安全性问题, 其中包括转 Bt 水稻花粉对非靶标重要经济昆虫——家蚕 *Bombyx mori* 的潜在影响。

栽桑养蚕、制丝织绸是我国的历史传统。我国是世界上最大的蚕茧、蚕丝生产国和茧丝绸出口国 (顾国达等, 2002)。2000 年全国蚕茧、蚕丝年产量各为 50.1 万吨和 5.13 万吨, 分别占世界总产量的 73.4% 和 71.2%。蚕丝绸业作为我国传统产业, 涉及 2000 万户农户的收入和近 100 万职工的就业及社会稳定; 同时又作为特色出口创汇产业, 在国民经济中具有特殊的重要地位。据海关统计, 2001 年全国丝绸产品出口达到 38.03 亿美元, 占当年全国出口总值的 1.43%; 2002 年 1~10 月我国丝绸出口 26.79 亿美元 (不包括真丝针织品), 占同期全国出口总值的 1.02%。我国除西藏、青海外, 其他各省 (市、自治区) 均有蚕桑生产, 其中以浙江、江苏和四川等为主产省, 桑蚕茧产量占全国总产量 50% 以上。上述桑蚕主产区均为我国重要水稻产区, 而且这些地区的主要传统作物种植模式是桑稻间作。由于水稻花粉平均直径 (籼稻:  $33.14 \pm 2.47 \mu\text{m}$ ; 粳稻:  $32.78 \pm 1.40 \mu\text{m}$ ) 明显比玉米花粉直径 ( $73.4 \sim 92.6 \mu\text{m}$ ) 小, 而且玉米花粉经风传播距离至少可达 60m (Raynor 等, 1972), 有时甚至在 200m 之外 (Louette, 1997), 因此转 Bt 基因水稻花粉更有可能随风飘落于稻田附近桑园的桑叶上。家蚕对 Bt 毒蛋白十分敏感, 在蚕桑区内一般禁止使用 Bt 类生物杀虫剂。若家蚕一旦取食转基因水稻花粉, 就会接触到 Bt 毒蛋白, 对家蚕存活、生长发育和结茧等产生严重影响, 进而可能对当地养蚕业和全国蚕丝绸业造成严重后果。因此, 开展转 Bt 水稻花粉对家蚕的生态风险研究和筛选出对家蚕安全的 Bt 后备基因的研究, 对于我国国民经济发展和社会稳定具有十分重要的意义。此外, 这作为一项风险评估指标, 对于明确转基因作物在开发利用、环境释放和越境转移过程中可能对环境产生的不利影响, 力求对这些风险提供可靠的定量预测, 通过采用适当的机制以及与评估结果相适应的技术措施来管理转基因作物及其产品的开发工作, 从而使风险降低到最小程度, 都是十分必要的。

迄今, 有关转基因抗虫作物花粉对非靶标有益昆虫的生态风险研究相对较少, 主要集中在 Bt 玉米花粉对大斑蝶的影响 (Losey 等, 1999; Hansen 等, 2000; Hellmich 等, 2001a; Sears 等, 2001; Stanley-Horn 等, 2001; Zangerl 等, 2001; Wolt 等, 2003)。此外, 有关转基因作物花粉在胁迫条件下对其它非靶标昆虫如北美黑凤蝶 *Papilio polyxenes*、具斑食蚜蝇虫 *Coleomegilla maculate*、食蚜小花蝽 *Orius insidiosus*、普通草蛉 *Chrysoperla carnea* 和家蚕等的影响也有一些零星报道 (Pilcher 等, 1997; Wraight 等, 2000; 王忠华等, 2001; 李文东等, 2002)。这些研究多表明转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险是可以忽略。

尽管目前就转 Bt 玉米花粉对大斑蝶的生态风险问题已有初步定论, 但上述研究更多地从商业目的角度就已大面积种植的转基因玉米花粉可能的影响后果作了调查。由于自然条件

下的情况极为复杂,其中的影响因素繁多,因此个别年份的调查结果并不能证明转基因作物花粉对非靶标昆虫的潜在风险完全不存在;而且上述研究尚有些关键问题似未明确。如未能深入分析携带有不同启动子驱动的不同 Bt 毒蛋白基因类型的转基因玉米花粉对大斑蝶可能的毒理学影响,缺乏分析 Bt 毒蛋白基因表达及其产物数量及活性的时空动态变化(田间高温、太阳紫外光等作用)对暴露环境剂量的影响,忽视了非靶标昆虫对不同转基因花粉密度的取食选择性及其对潜在风险表现的影响程度,未能验证试虫在室内饲喂条件下的花粉实际取食量(即使在高浓度下)与暴露的环境剂量的关系等。而且,有关转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的潜在风险研究目前主要针对可能产生的表观影响(如死亡、生长发育等),而就昆虫体内生理和代谢等的内在影响则尚未见有报道。已有研究表明,Bt  $\delta$ -内毒素可引起昆虫体内磷酸酶、蛋白酶和乙酰胆碱酯等酶系活性发生变化,从而影响正常的生命活动(申继忠等,1994;谭维嘉等,1999;梁革梅等,2001)。因此,开展不同转 Bt 基因水稻品系花粉对家蚕生理和代谢等内在的影响研究,探讨转基因花粉对家蚕产生影响的生理和病理机制,对于指导桑蚕生产实践与抗性育种具有十分重要的理论意义和经济价值。

由于转 Bt 基因抗虫作物花粉含 Bt 杀虫晶体蛋白,其随风飘移或扩散可对养蚕业造成严重威胁,且人为措施较难控制,因此,在养蚕业区要全面推广针对鳞翅目害虫的 Bt 制剂及转 Bt 基因抗虫作物,筛出高效且对家蚕安全的 Bt 菌株是很有必要的。对此,日本学者在这方面已有一定的研究,已筛得对家蚕低毒而对菜粉蝶 *Pieris rapae* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 高毒力的 Bt 菌株 AF101,并对其杀虫晶体蛋白性质与功能区结构,及基因序列等作了初步研究(Kim 等,1998a; b),但在应用技术等方面尚乏研究,更未投入产业化应用。

有鉴于此,本文拟选择商业前景十分广阔的转 Bt 基因水稻,首先开展转 Bt 基因水稻花粉对家蚕潜在风险的系统研究以及高效并对家蚕安全的 Bt 菌株筛选。以探明转 Bt 基因水稻品系花粉(毒蛋白)对家蚕的生物学效应(生长发育、繁殖和取食行为等)、生理学和病理学效应等;探明转 Bt 基因水稻花粉在田间飘移扩散与分布规律及其毒蛋白含量与活性的时间变化动态;探讨并验证自然条件下产生潜在风险的可能性;筛选出高效且对家蚕安全的 Bt 菌株。最终为促进我国转基因抗虫水稻产业化发展以及相应的安全管理提供科学支撑,同时为转基因抗虫作物生物安全性的科学评估提供科学依据,并为我国桑蚕丝业的健康发展提供保障。

## 致 谢

在本论文付梓之际，我要衷心感谢指导、帮助与关心我的各位老师、学长、同学及朋友们！

首先，我要向尊敬的两位导师胡萃教授和叶恭银教授表示衷心的感谢与崇高的敬意！多年来，两位导师在学习、科研和生活各方面都给予了极大的关心与帮助。

胡萃教授从论文选题、设计到工作开展方面都予以全面关怀和悉心指导。在胡老师身上所感受到的“老老实实做人，踏踏实实做学问”的品德，以及一生所奉行的“敬业、爱国、乐群”精神，使我终身难忘和受益匪浅。

本论文能得以顺利完成，离不开叶恭银教授的精心指导！叶老师那广博的学识、刚正求是的学风、尖锐敏捷的思路、诲人不倦的风范、兢兢业业的精神、勤奋忘我的品质，无时无刻都在激励着我当以奋发拼搏，不断向前。

我要感谢本所何俊华教授、程家安教授、刘树生教授、冯明光教授、陈学新教授、张传溪教授、徐志宏教授、施祖华教授、娄永根教授、莫建初教授、祝增荣研究员和唐启义研究员等对我多年来的授业解惑、关心指导！这无疑为我顺利完成学业奠定了坚实的基础。蒋明星副教授、吴晓晶副教授、余虹副教授、马云高级实验师、刘银泉讲师和张志钰老师、芮开宁老师在论文期间也给予了热心指点与帮助，为论文完成提供了便利。浙江大学分析测试中心洪健研究员、高其康研究员、徐颖副研究员和方月鲜老师为本论文电镜样品制备与观察提供了便利和帮助。浙江大学核农所夏英武教授给予了极大的关心和鼓励。中国水稻研究所张志涛研究员、刘光杰研究员和傅强博士、省农科院俞晓平研究员、吕仲贤博士和郑许松硕士、南开大学蔡峻博士、浙江大学图书馆吕慧平博士、上海交通大学刘志诚博士也给予了悉心帮助。在校期间，还得到了农学院和植保系各级领导、老师的热情关怀和支持，在此一并谢过！

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，他们是朱光辉博士、孙萌博士、张焘硕士、吴国艳硕士、滕凯硕士、张发成硕士和邓峥硕士，博士生李凯、张忠、陈茂、吴国星、黄诚华、石宇、董胜张、李芳芳、林建国、杜孟浩、王芳、鄢卫弟，以及硕士生姚鹏程、韦国栋、陈亮、王慧、谭红、卢新民、王会美、陈美军等。扬州大学应化专业 2001 届本科生沈春晓、安徽农业大学植保系 2002 届本科生舒勇、本系本科生朱新星、方琦、田俊策、姚崇巍、董卉和李国钧、技术员余新友和叶恭堂等为本论文的实验提供了不少便利和帮助。

我要感谢我的先生、父母、家人和亲朋好友对我始终如一的理解、支持、关心和帮助！再次深深地感谢大家！

作 者

2004 年 5 月于华家池畔



## 第一部分 文献综述

# 第一章 转基因抗虫作物及其生态安全性评价

作物虫害是影响农作物优质高产和稳产的重要限制因素之一。尽管全球每年用于农业害虫化学防治的费用超过 100 亿美元,但每年因虫害造成的损失仍占总产量的 14% (Hilder 等, 1999), 其中我国每年虫害损失亦高达 60~100 亿元(朱新生等, 1997)。化学杀虫剂自问世以来在害虫防治中起了巨大作用,但由于长期大量地不合理施用化学农药,导致害虫产生抗药性、害虫再猖獗、污染与残留等严重后果。如在美国每年因害虫抗药性而额外增加使用药剂的开支达 12 亿美元,且由此造成的作物损失达 20~70 亿美元;为了提高防效而开发另一种新的药剂需投资 80~150 百万美元 (Palumbi, 2001)。Pimentel 等(1992)就化学农药对环境与社会代价的分析表明,农药的使用每年给美国农户造成的直接损失(天敌杀伤、抗性增强、作物损失)近 30 亿美元,所引起的社会与环境总代价高达 81 亿美元。该代价相当于美国化学农药效益值 162 亿美元的 50%,说明化学农药在产生一份经济效益的同时,也导致了半份的环境与社会负效应。微生物杀虫剂或天敌释放虽然在一定程度上克服了化学农药的缺点,但由于见效慢、杀虫谱窄、易受环境影响和成本高等因素,其实际应用颇受限制。因此,寻求安全有效的害虫治理新途径与新策略以减少化学农药使用量,已成为当前世界农业可持续发展中亟待解决的重要课题之一 (Matteson, 1995)。

抗虫作物作为害虫治理的有效手段之一,具有操作简便、经济合理和对环境友好等特点,为全球各国所重视 (Panda 等, 1995),但由于常规育种耗时长、且往往缺乏理想的亲本资源,因而进展缓慢。现代分子生物学特别是植物生物技术的迅猛发展,为通过基因工程手段将外源抗虫基因转入农作物,大量、快速培育高水平抗虫新品种提供了可能,同时也为防治农业害虫提供了新的思路和途径。利用基因工程手段培育抗虫作物新品种具有以下优点:(1) 扩大了植物获得抗虫性状的基因源,不仅可利用植物本身拥有的抗虫基因,且能利用微生物和动物中的抗性活性物质基因;(2) 提高了作物抗虫能力和抗虫范围,可导入一个或多个抗虫基因,并控制其在植物中的表达时间和部位,克服喷施杀虫剂防治虫害的时效性和易被冲刷、流失、分解等缺点,同时减缓害虫抗药性的发生和发展;(3) 缩短了育种周期,使得抗虫新品种的培育和更新更为快速;(4) 减少了环境污染,在植物体内表达抗虫基因,避免喷施杀虫剂对人畜造成的意外伤害。正因如此,利用基因工程手段培育抗虫作物在国内外已受到普遍关注,并亦成为当今植物基因工程研究和应用的热点。

## 1 转基因抗虫作物的研发概况

转基因抗虫作物的问世被称之为继化学杀虫剂诞生以来,在害虫治理方面最为重要的技术革命 (Vaecck 等, 1987)。至今,利用基因工程手段培育抗虫作物用于控制害虫的研究与应用主要集中在以下几个方面。

## 1.1 抗虫基因

寻求不同来源的抗虫新基因是培育高效抗虫转基因作物的首要条件,是扩大转基因作物抗虫谱、延缓害虫对其产生耐/抗性的重要保证。目前,有关的转基因抗虫作物研究主要利用由单基因调控的编码具杀虫活性蛋白或酶类的基因。这些蛋白类杀虫活性物质根据其来源可分为:(1)微生物来源,主要有来自苏云金杆菌*Bacillus thuringiensis* (Bt)的 $\delta$ -内毒素(又称杀虫晶体蛋白insecticidal crystal proteins, ICPs)和营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, Vips)、来自根癌农杆菌*Agrobacterium tumefaciens*的异戊烯转移酶(iosipentenyl transferase, Ipt)、以及来自链霉菌属*Streptomyces*真菌的胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase)等;(2)植物来源,主要包括蛋白酶抑制剂(proteinase inhibitors)、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂( $\alpha$ -amylase inhibitors)、凝集素(lectins)、几丁质酶(chitinases)、色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase)、脂氧化酶(lipoxygenase)和蔗糖酶(invertase)及已糖转移酶(hexosyltransferase)等;(3)动物来源,主要是蝎子毒素、蜘蛛毒素、蜂毒、昆虫几丁质酶以及来自昆虫或其他动物的蛋白酶抑制剂等。

根据杀虫活性物质的作用方式可分为:(1)直接致死作用,如Bt内毒素、植物胆固醇氧化酶等直接攻击昆虫中肠上皮细胞膜,以及蝎子毒素和蜘蛛毒素等作用于昆虫膜离子通道,导致昆虫死亡;(2)间接致死作用,主要包括蛋白酶抑制剂、淀粉酶抑制剂和凝集素等通过与昆虫必需营养物质结合,以及多酚氧化酶和蔗糖酶等通过改变昆虫食物营养或产生毒素,干扰昆虫正常营养生理而导致死亡。

有关杀虫活性物质的作用机理、生化特性及其基因结构与应用情况,朱新生等(1997)、Hilder等(1999)和叶恭银等(2001)等均已详细介绍,在此不作赘述。

## 1.2 抗虫基因的转化

将外源抗虫基因导入植物离不开遗传转化技术。近年来,基因转化技术飞速发展,对于一些诸如禾本科单子叶植物和木本植物等曾被认为比较难以转化的植物也先后取得成功。目前,国内外常用的转基因技术体系有:(1)DNA直接转化系统,主要包括通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、脂质体、电激、超声波、显微注射、激光微束和基因枪等介导的基因转化;(2)以质粒DNA为载体的转化系统,如根癌农杆菌Ti质粒介导的基因转化;(3)以种质系统介导的转化系统,包括花粉管通道法、生殖细胞浸泡法以及胚囊与子房注射法等(王关林等, 1998)。

不同的转化技术体系对于外源基因整合到受体细胞染色体上的作用机制不尽相同,最终可影响到外源基因在转基因植物中遗传与表达的稳定性。外源基因通常是随机地整合到受体细胞染色体上,这可以是插入到植物基因组的任何一条染色体的任何位点,而且还可以是单基因位点或多基因位点整合。DNA直接转化系统和以种质系统介导的转化系统往往导致外源基因在受体细胞中的整合呈现复杂化,并在转化当代及子代中出现DNA环化、甲基化、外源基因片段分离或丢失、基因重排、串联及多拷贝插入等现象(Finnegan等, 1994; Casas

等, 1995); 以质粒DNA为载体的转化系统通常可形成1-2个拷贝或低拷贝整合, 而且外源基因结构较为完整, 整合位点较为稳定 (Zambryski, 1988), 其遗传稳定性相对较高 (吴刚, 2000)。许多研究发现外源基因在转基因植物中出现转基因沉默 (transgene silencing) 和表达活性降低现象, 这在很大程度上与不同的转化技术体系所引起的外源基因在受体植物中不同的遗传与表达模式有关。转基因沉默与失活现象已严重影响转基因抗虫作物在农业生产上的应用, 例如1996年7月美国Texas州东部出现Bt棉对美洲棉铃虫*Helicoverpa zea*失控问题 (Kaiser, 1996)。此外, 转基因沉默与失活也是许多转基因抗虫作物未能进入商品化生产的主要原因之一。因此, 如何稳定、提高外源抗虫基因在植物体内的表达, 是当前植物抗虫基因工程的一个重要研究方向。

### 1.3 转基因抗虫作物的培育与应用

1983 年世界首例转基因烟草的培育成功, 标志着人类利用转基因技术改良农作物的开始。1986 年首批转基因作物批准进入田间试验, 1992 年商业化种植, 1994 年美国第一例转基因作物产品 (延熟保鲜转基因番茄) 批准上市, 转基因作物发展非常迅猛。2002 年全世界转基因作物种植面积达 5870 万公顷, 产值 42.5 亿美元, 其中种植面积较 1996 年 170 万公顷增加 35 倍, 产值较 2000 年 30.0 亿美元增加 1.4 倍 (James, 2002)。

就转基因抗虫作物而言, 至今已获得百余种转Bt内毒素蛋白基因、蛋白酶抑制剂基因、凝集素基因以及 $\alpha$ -淀粉酶基因等不同抗虫基因的转基因植物 (Hilder等, 1999; 叶恭银等, 2001)。目前, 在美国至少有18种转基因抗虫作物通过田间试验, 其中转基因玉米、棉花和烟草等已被广泛种植 (Obrycki等, 2001)。

在现有的转基因抗虫作物中, 以转Bt内毒素蛋白基因作物的研究与利用最为广泛、深入。根据转基因植株获得的先后以及外源Bt基因表达水平的高低, 转Bt基因作物的发展可分为2个阶段。第一阶段为20世纪80年代中后期, 以Vacek等 (1987) 获得的首例转基因烟草为代表, 其特点是Bt基因表达水平相当低, 植株抗性较差。这是由于当时所使用的Bt杀虫晶体蛋白基因直接来源于细菌, 富含AT碱基, 密码子偏好与高等植物差异较大, 使得外源杀虫基因的转录不稳定, 翻译效率差。第二阶段为20世纪90 年代, 以Perlak等 (1991) 培育的转基因棉花为代表。在不改变编码氨基酸序列的情况下, 对*cry*基因进行修饰 (去除富含AT区, 提高GC含量) 以适宜于植物中表达, 使得外源基因的表达水平提高近100倍, 并获得良好的抗虫效果。此外, 也有通过利用组织特异性启动子或强启动子等方法提高Bt内毒素表达水平 (Koziet等, 1993)。

至今全球已获得了60 多种转Bt基因抗虫植物, 其中以双子叶植物居多, 而单子叶植物因其遗传转化较困难, 所以获得的转Bt基因植物相对较少。近年来, 许多国家已开展了大规模转Bt毒素蛋白基因植物的环境释放试验。自1986年PGS公司首次在美国和法国进行转基因烟草的田间试验以来, 全球进行转基因抗虫植物田间试验800余次, 占有转基因植物田间试验的18%。至1999年初, 70多种转基因作物已经在10多个国家得到商品化, 在80种已经批

准或即将批准的商品化转基因作物中, 21种为转Bt基因作物, 其中以玉米、马铃薯和棉花为主。2002年全球仅Bt玉米和Bt棉花这两种转基因作物的商业化种植面积就高达1.45亿公顷 (James, 2002)。在我国, 已获得转Bt基因植物有棉花、玉米、水稻、番茄、欧洲黑杨、花椰菜、马铃薯和烟草等, 其中Bt棉花已得到商品化生产, 2002年种植面积210万公顷, 已超过全国棉花种植总面积的51%; 转Bt抗虫玉米、水稻已进行环境释放试验。

就其它转基因抗虫植物而言, 国内外已至少获得20余种蛋白酶抑制剂基因植物和14种转外源凝集素基因植物, 而且亦已将 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂基因、几丁质酶基因和Bt营养期杀虫蛋白基因等导入不同的植物中, 其中多数表现显著抗虫性, 少数已进行环境释放, 但均尚未进入推广应用阶段 (叶恭银等, 2001)。

## 2 转基因抗虫作物的潜在风险

尽管转基因抗虫作物可以带来巨大的经济效益, 而且发展速度也相当迅猛, 但其环境释放之后可能带来的安全性问题却引起了世界范围内的广泛关注 (Wolfenbarger 等, 2000; Obrycki 等, 2001)。近来, 国际社会对转基因作物安全性的担忧已成为影响世界农产品贸易和国际关系的一个重要因素; 农业转基因作物安全性科学研究和技术支撑的水平已成为反映国家综合科技水平和农产品国际竞争力的重要指标之一。因此, 转基因作物的安全性问题已成为国家加强生物安全管理、保障转基因产业健康发展、促进生物产品国际贸易、维护国家权益急需解决的重大科学问题和社会问题。

转基因作物中导入的外源目的基因、外源非目的基因片段 (如启动子序列、载体骨架序列和标记基因等) 以及因外源DNA插入引起的位置效应(position effect)、插入突变(insertional mutagenesis)、体细胞变异(somaclonal variation)、目标基因产物多效性和次级效应(pleiotropic and secondary effects)等均可影响其安全性。当前, 有关转基因作物安全性的争论主要针对其生态安全性和食品安全性。生态安全性主要包括转基因作物通过对生态系统中不同营养层:

(1) 生产者 (作物及其近缘种、野生种等)、(2) 消费者 (靶标和非靶标消费者等)、(3) 分解者 (土壤生物等) 等影响, 从而引发新的生态环境问题, 如杂草化、外源基因漂移扩散与污染、产生新有害种、靶标害虫产生抗性和次要害虫发生加剧等。食品安全性主要包括转基因作物产品对人体的毒性、过敏性、营养成分变化与抗营养因子影响以及抗生素抗性等。

近年来, 转基因抗虫作物的安全性研究多集中在生态安全性中有关对消费者 (非靶标昆虫) 和分解者 (土壤昆虫与根系微生物) 等影响方面。

### 2.1 转基因抗虫作物对非靶标昆虫的影响

#### 2.1.1 对非靶标植食昆虫的影响

外源抗虫基因的导入改变了作物原有的抗虫性, 势必造成对其它非靶标植食性昆虫的影响。转基因作物对非靶标植食性昆虫的影响包括: (1) 对一些非靶标植食性昆虫如大斑蝶 *Danaus plexippus* 和北美黑凤蝶 *Papilio polyxenes* 等因被动取食飘落在寄主植物叶片的转基

因玉米花粉而可能受到不利影响 (Losey 等, 1999; Hansen 等, 2000; Wraight 等, 2000; Zangerl 等, 2001); (2) 对转基因作物上某些非靶标害虫致害性的影响, 例如转 Bt 棉花上甘薯白粉虱 *Bemisia tabaci* (Wilson 等, 1992)、棉蚜 *Aphis gossypii*、棉叶蝉 *Empoasca biguttula* 和棉盲蝽 *Lygus lucorum* 等 (崔金杰等, 1998; 2000) 以及转 Bt 马铃薯上蚕豆小绿叶蝉 *Empoasca fabae* (Riddick 等, 1998) 的发生与为害加重, 转 *cry1Ab* 基因籼稻和转豇豆胰蛋白酶抑制剂基因杂交稻上褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的取食痕数增多、蜜露排泄量减少 (陈茂等, 2003)。目前, 有关转基因抗虫作物上非靶标害虫致害性变化的研究尚较少, 多是对现象的描述, 而缺乏规律性探讨。

### 2.1.2 对传粉昆虫的影响

转基因抗虫植物对传粉昆虫如蜂类可能产生直接或间接影响。转基因抗虫作物花粉/花蜜中表达的毒素蛋白可能对传粉蜂类有直接毒害作用。目前研究多集中于已纯化的毒素蛋白对蜜蜂 *Apis mellifera* 和熊蜂 *Bombus terrestris* 的影响。研究表明, 除对鞘翅目具杀虫活性的 Bt 菌株 *tenebrionis* (Vandenberg, 1990) 外, 绝大多数 Bt 内毒素对蜜蜂的存活、生长发育以及飞行能力等均无显著影响 (Sim, 1995; Arpaia, 1996; Malone 等, 1999; 2001); 蛋白酶抑制剂对蜜蜂与熊蜂的影响似存在明显剂量效应, 低浓度蛋白酶抑制剂对传粉蜂类体内消化酶活性、存活、飞行和嗅觉学习行为等无明显影响 (Belzunces 等, 1994; Malone 等, 1995; 1998; 2001; Burgess 等, 1996; Picard-Nizou 等, 1997; Girard 等, 1998; Arruego 等, 2000), 而高浓度毒素可导致蜜蜂与熊蜂行为改变、存活率与体内消化酶活性等降低 (Belzunces 等, 1994; Malone 等, 1995; 1998; 2000; Burgess 等, 1996; Picard-Nizou 等, 1997; Pham-Delegue 等, 2000); 其它毒素蛋白如几丁质酶和  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶等对蜜蜂未显现明显的毒性效应, 且其嗅觉学习行为也未受到明显影响 (Picard-Nizou 等, 1997)。蜜蜂取食 Bt 玉米花粉对幼虫生长发育无明显影响 (Hilbeck 等, 2000; Schur 等, 2000)。

转基因抗虫作物对传粉昆虫的间接影响可能来自于外源基因遗传转化而导致转基因植物表型异常变化, 如花香、花粉/花蜜中营养成分及其比例改变等。有关这方面研究多针对转基因抗虫作物对蜂类取食偏向行为是否有所变化, 而且目前尚未发现有明显差异。如蜜蜂除在转蛋白酶抑制剂油菜上搜寻频率明显较高外, 其访花时间、总停留时间及采集行为等并无显著变化 (Grallien 等, 1995)。

### 2.1.3 对天敌昆虫的影响

转基因抗虫作物可能从以下两个层面对天敌昆虫产生影响: (1) 个体水平, 天敌昆虫通过直接取食转基因抗虫作物组织 (如花粉等)、取食/寄生以转基因抗虫作物为食的猎物以及感受因遗传转化导致组成与含量发生变化的转基因植株挥发性物质而对其存活、生长发育、繁殖和对猎物/寄主搜索行为等产生直接或间接影响。(2) 种群水平, 因取食转基因抗虫作物的猎物/寄主种群数量与结构改变, 从而引起天敌昆虫种群相应的动态变化。

至今, 就转基因抗虫作物对天敌昆虫的胁迫作用及其相互关系研究主要集中在转 Bt 基

因作物上。虽然大多数天敌昆虫往往缺乏适合 Bt 内毒素蛋白作用的生理生化条件 (Flexner 等, 1986), 但由于转 Bt 基因作物产生的是高水平表达的经截短的活性蛋白 (Kozziel 等, 1993; Perlaek 等, 1990), 因此不能排除对天敌昆虫的影响。就现有研究来看, 尚未发现天敌昆虫因取食转 Bt 作物组织如花粉而造成不利影响。如具斑食蚜瓢虫 *Coleomegilla maculata*、食蚜小蜂 *Orius insidiosus* 和普通草蛉 *Chrysoperla carnea* 取食转 *cry1Ab* 基因玉米 (176) 花粉对其存活和生长发育均无显著影响 (Pilcher 等, 1997)。用含有 Cry3Bb1 蛋白的 Bt 玉米 (MON 863) 花粉饲养的具斑食蚜瓢虫在生物学指标上无明显变化 (Duan 等, 2003)。

天敌昆虫在取食/寄生以转 Bt 作物为食的猎物/寄主后, 其存活、生长发育以及捕食/寄生能力的变化情况不尽相同。以取食转 *cry1Ab* 基因玉米叶片的欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 饲喂的普通草蛉幼虫死亡率较高、发育历期延长 (Hilbeck 等, 1998)。瓢虫 *Adalia bipunctata* 取食转雪莲凝集素 (GNA) 基因马铃薯叶片饲喂的蚜虫 *Myzus persicae* 后, 其生长发育及繁殖能力均受明显影响 (Birch 等, 1999)。取食转豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因马铃薯叶片的番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 可导致其外寄生姬蜂 *Eulophus pennicornis* 的寄生率明显降低 (Bell 等, 2001a), 二化螟茧蜂 *Apanteles chilonis* 对以转 Bt 基因水稻 (克螟稻) 为食的二化螟 *Chilo suppressalis* 的寄生率明显较低 (姜永厚等, 2004), 拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus* 对取食转 *cry1Ab* 基因水稻的稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 幼虫的瞬时攻击率显著较低 (刘志诚等, 2003); 而转 Bt 基因烟草上棉铃虫毁灭姬蜂 *Campoletis sonorensis* 对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Johnson 等, 1992)、转 GNA 基因马铃薯上姬蜂对番茄夜蛾 (Bell 等, 2001b) 的寄生率却有明显提高。其他相关报道多数则认为以转基因抗虫作物为食的猎物/寄主对其天敌昆虫应无明显影响 (Dogan 等, 1996; Pilcher 等, 1997; Orr 等, 1997; Lozzia 等, 1998; Riddick 等, 1998; Pilcher, 1999; Zwahlen 等, 2000; Al-Deeb 等, 2001; Schuler 等, 2001)。

转基因抗虫作物可能因外源基因插入而导致其体内化学组分 (张永军等, 2001a), 特别是挥发性物质组成的变化 (张永军等, 2001b; 阎凤鸣等, 2002), 从而影响寄生蜂对寄主的信息搜索与定位。据我们室内研究结果表明, 二化螟茧蜂 *Apanteles chilonis* 对转 Bt 水稻有极显著偏好, 而对转 Bt 粳稻 (克螟稻) 则更显著偏向亲本对照; 二化螟黑卵蜂 *Telenomus chilocolus* 亦显著偏好选择转 Bt 水稻, 但对克螟稻则无明显偏好。在田间, 稻飞虱和叶蝉的卵寄生蜂: 稻飞虱小蜂 *Anagrus* spp. 和叶蝉柄翅小蜂 *Lyneaeon longicrus* 多从 Bt 水稻区向对照区扩散 (陈茂等, 2003)。转 Bt 基因棉田及转 Bt 基因稻田中的靶标害虫寄生蜂如茧蜂或姬蜂的数量明显较少 (崔金杰等, 1998; Pilcher, 1999; Jasinski 等, 2001; 刘志诚, 2002), 这可能与转基因抗虫作物田块中靶标害虫种群数量较少有关, 但也不能排除转基因抗虫作物对寄生蜂搜索寄主行为影响的可能性。

从作物虫害防治角度来看, 取食转基因抗虫作物可导致靶标害虫生长发育延缓, 这在一定程度上有利于天敌的捕食/寄生 (Johnson 等, 1992; 1997; Arpaia 等, 1997), 可延缓靶标害虫的抗性发展 (Gould 等, 1991; Arpaia 等, 1997; Johnson 等, 1997), 即发挥协同控害作用。

当转基因抗虫作物表达高水平毒素蛋白时,对靶害虫表现出较快、较强的致死作用,一方面因田间寄主种群数量显著降低而导致天敌种群下降,另一方面因寄主高死亡率致使出蜂率较低(Chilcutt 等,1999)或因寄主个体变小和体重降低致使天敌捕食量不足而影响其生长发育(崔金杰等,1997)。这显然对天敌昆虫自然种群的发展较为不利。因此,关于转基因抗虫作物与天敌相互关系,特别转基因抗虫作物对天敌的直接或间接作用的内因方面以及在作物虫害防治中的合理有效持续协调利用,均有待于深入而系统的研究。

## 2.2 转基因抗虫作物对土壤生物的影响

转基因抗虫作物中的毒素蛋白主要通过根系分泌物、植株残体和花粉等3种形式进入土壤生态系统(白耀宇等,2003)。毒素蛋白如Bt内毒素等通常极易与土壤活性颗粒(如蒙脱石、高岭土和腐殖质酸复合物等)结合(Venkateswerlu 等,1992; Tapp 等,1994; 1995a,b; Crecchio 等,1998; 2001; Stotzky, 2000),不仅难以被生物降解,且能保持较强杀虫活性(Tapp 等,1998; Sexana, 2000; 2001)。转基因抗虫作物对土壤微生物组成和种类的影响不尽相同。种植转Bt抗虫棉土壤中的微生物数量、种类和组成等与常规棉差异显著(Donegan, 1995),可提高土壤中细菌和真菌数量(Watrud 等,1998),转蛋白酶抑制剂基因烟草、转 $\alpha$ -淀粉酶基因苜蓿等根际土壤中的微生物数量与组成亦发生明显变化(Donegan 等,1997; Donegan, 1999);而转Bt马铃薯和转Bt玉米等对根际土壤微生物却无明显影响(Donegan, 1996; Watrud 等,1998; Saxena 等,2001)。然而值得注意的是,转基因作物中的外源基因可能会水平转移到其它微生物中(Hoffmann 等,1994)。此外,转Bt基因棉花和马铃薯中的毒素蛋白对土壤昆虫如弹尾虫 *Folsomia candida* 和奥甲螨 *Oppia nitens* 等也无显著负面影响(Yu 等,1997)。鉴于目前国内外有关转基因抗虫作物对土壤生态、肥力和土壤特异生物种群、功能类群以及生物多样性等影响的研究尚处于起步阶段,这方面研究还有待于不断深入探讨。

## 2.3 靶害虫适应转基因抗虫作物的风险

当前已获得的多数转基因抗虫作物,在其整个生育阶段均能持续高水平地表达杀虫毒素蛋白,这势必对靶害虫造成持续的强选择压,最终可促使害虫对转基因作物产生抗性。鉴于害虫对Bt制剂及其毒素蛋白的抗性发展速度相对较快,并可能导致防治失效(Tabashnik, 1994),因此靶害虫对转基因抗虫作物(特别是转Bt基因作物)在短期间能否产生抗性颇受关注和担忧。

目前通过室内筛选已获得数个抗转Bt作物的害虫品系。如Stone等(1989)报道烟草夜蛾在室内以转Bt荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 连续饲养7代后,产生24倍抗性(达显著水平),并对纯化的Bt内毒素蛋白及Bt杀虫剂Dipel的敏感性有明显降低。该抗性品系对转Bt植物的抗性系由多因子控制的位于常染色体上的不完全显性遗传,但其遗传稳定性并不强,停止筛选5代后,其抗性水平由原来的69倍降为13倍(Sims 等,1991)。国内梁革梅等(2000a)经过室内16代筛选,获得了对转Bt棉产生43.3倍抗性的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 品系,并发现该抗性系由单个不完全隐性基因控制。对Bt杀虫剂产生



抗性的马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Whalon 等, 1994) 和棉铃虫 (沈晋良等, 1998; 梁革梅等, 2000b) 可分别对转 Bt 马铃薯和转 Bt 棉花产生不同程度的交互抗性。

许多理论研究表明若不进行抗性治理, 靶标害虫能对转基因抗虫作物很快产生抗性适应 (Gould, 1988; Roush 等, 1998; Ives 等, 2002; Linacre 等, 2004)。对于如何延缓并治理这种抗性产生与发展, 国内外已作了些研究与探讨, 提出了如提供避难所(Refuge)、转育强毒力植株、同一作物中导入多种抗虫基因、在特定组织和特定时间内表达毒素蛋白以及与天敌协调利用等有关策略(Roush, 1996, 1997; Gould, 1998; Carriere 等, 2001)。值得庆幸的是, 至今在田间尚未监测到靶标害虫对转基因抗虫作物产生抗性 (Fox, 2003)。

### 3 转基因抗虫作物的生态安全性评价

转基因作物风险评价是以保证人类健康和环境安全为目的, 包括食品安全性评价和生态安全性评价。转基因作物食品安全性因与人类健康密切相关而颇受关注, 对其评价均采用经济发展合作组织 (OECD) 1993 年提出的实质等同性原则 (substantial equivalence)。转基因抗虫作物的生态安全性评价适用于转基因作物生态安全性讨论的一般原则与方法。

#### 3.1 转基因抗虫作物生态风险评价的基本概念与原则

风险 (risk) 通常表示发生特定危害事件的可能性及事件后果的严重程度。在风险分析中, 风险是综合危害发生可能性 (暴露 exposure) 与严重程度 (效应 effects) 的一种概率表示, 即  $\text{风险} = \text{效应} \times \text{暴露}$ 。生态风险评价 (ecological risk assessment) 是在暴露于一个或多个胁迫作用下, 对生态将要产生或正在产生的不利影响 (危害) 的可能性评估过程 (EPA, 1992)。

转基因抗虫作物的生态安全性不仅与外源基因供体、载体、受体以及转基因作物的生物学特征密切相关, 还受到转基因抗虫作物预设用途和释放环境条件等影响。限于当前对转基因抗虫作物的认识水平, 系统、定量评估转基因抗虫作物环境释放后的生态风险是相当困难的。因此, 在具体的生态风险评估实践中, 为最大限度地保证风险评估的科学性和评估结果的准确性, 通常遵循实质等同性、预先防范性 (precaution)、个案评估 (case-by-case)、逐步评估 (step-by-step)、风险效益平衡 (balance of benefits and risks) 和熟悉性 (familiarity) 等原则 (阎新甫, 2003)。

#### 3.2 转基因抗虫作物的生态风险评价

转基因抗虫作物生态风险评价是转基因生物风险评价的重要组成部分。转基因抗虫作物与一般转基因生物的最大区别在于可产生对靶标昆虫具有杀虫活性的毒素蛋白, 因此其生态风险评价多偏重于评价毒素蛋白对所在生态系统中生物多样性的负面影响。目前有关转基因抗虫作物的生态风险评价体系在很大程度上承用了以前生态毒理学中有毒化合物释放后对环境风险分析的概念与方法 (钱迎倩等, 1998), 采用以提出问题 (problem formulation)、特征分析 (analysis) 和风险鉴定 (risk characterization) 为过程的概念性框架模式 (图 1.1),

即暴露-效应分析模式（王根绪等, 2003）。该模式主要围绕效应特征（characterization of effects）和暴露特征（characterization of exposure）这两个基本要素对潜在的生态风险展开系统分析与评价，主要包括危害识别（hazard identification）、剂量-反应关系评价（nature of dose response to a toxin）、暴露在有效剂量下的概率（probability of exposure to an effective dose）和风险特性鉴定（characterization of risk）等 4 个重要部分（NRC, 1983）。

转基因抗虫作物生态风险评价的一般过程首先是危害识别，包括确定评价对象、目标以及评价范围与尺度，明确胁迫及其效应、胁迫对象以及所处的生态系统等相关特征，明确与之相关的主要危险特征，即评估关键因子（assessment endpoints），形成概念性评价模型（conceptual models）；然后针对在所处生态环境条件下可能发生的各种危险（评估关键因子）估算可能发生的概率（暴露于有效胁迫作用下的可能性，即暴露概率）及其潜在的危害程度（生态效应，即胁迫响应程度），再根据“ $\text{风险(R)} = \text{胁迫响应程度} \times \text{暴露概率}$ ”，估算各关键因子的风险；最后综合评价转基因抗虫作物在其所处的生态系统中所有关键因子的总体风险，科学地确定转基因抗虫作物在该环境条件下对生态系统是否安全。

转基因抗虫作物生态风险评价的暴露-效应分析模式既可对转基因抗虫作物对整个生态系统安全性进行评估，也可以是转基因抗虫作物部分组织对生态系统中组成部分安全性的风险评估。有关转基因抗虫作物生态风险评价均已成功的事例，前者如对转 Bt 棉花、转 Bt 玉米和转 Bt 马铃薯的生态安全性评价（阎新甫, 2003），后者如转 Bt 玉米花粉对非靶标昆虫一大斑蝶的生态安全性评价（Hellmich 等, 2001a; Sears 等, 2001; Stanley-Horn 等, 2001; Wolt 等, 2003）。

转基因抗虫作物的生态风险是一个极其复杂的问题。近十余年的研究表明，短期的、小规模试验结果并不能全面评价转基因作物大范围环境释放后的长期效应。因此，研究、建立并规范转基因抗虫作物生态风险的长期监测、评价体系是十分必要的。

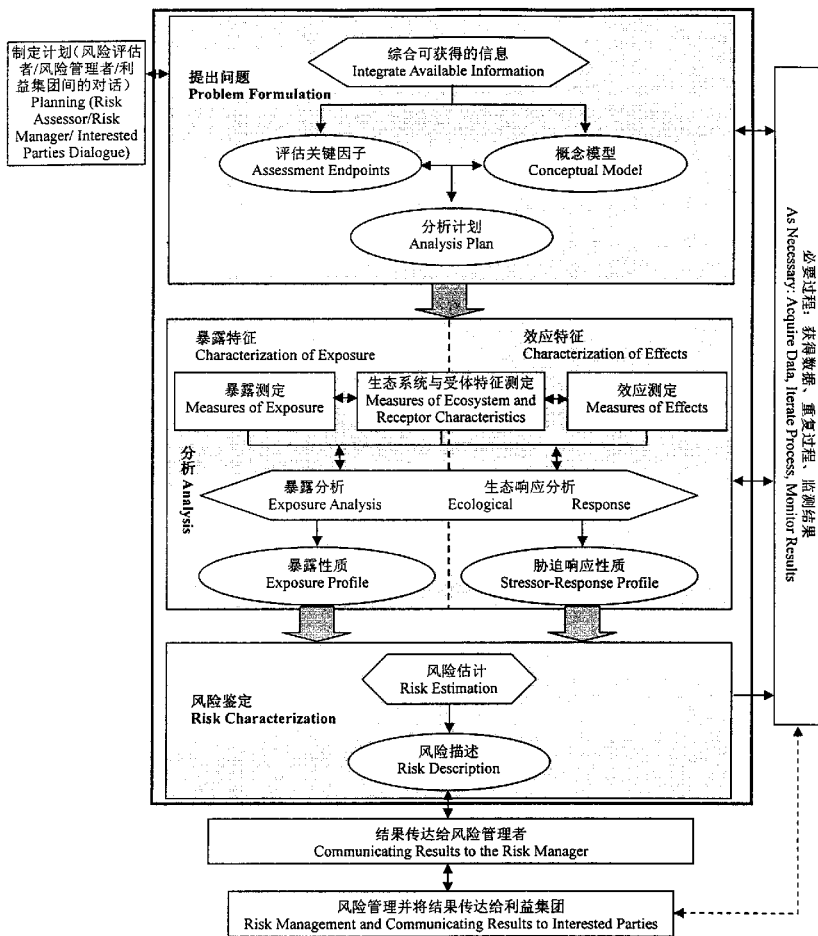


图 1.1 生态风险评价框架体系 (EPA, 1998)

## 第二章 转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险

自 1983 年世界首例转基因抗病毒植物培育成功, 1986 年转基因农作物获得批准进入田间试验, 1994 年转基因延熟番茄首先在美国获准商业化种植以后, 全球转基因作物应用取得了突飞猛进的发展。目前, 在美国至少有 18 种转基因抗虫作物通过田间试验, 其中转基因玉米、棉花和烟草等已被广泛种植 (Obrycki 等, 2001)。从 1996 到 2001 的 5 年内, 全世界转基因作物的种植面积累计 1.75 亿公顷。2002 年全球种植面积高达 0.587 亿公顷, 较 1996 年增长了 35 倍, 其中大豆、棉花、玉米和油菜等转基因作物的种植面积已占这 4 种作物世界总面积的 22% (James, 2002)。转基因作物带来的社会、经济和生态效益十分明显。据估计, 1999 年全球通过应用转基因作物而获得的经济利益达到 10 亿美元 (James, 2001), 2001 年美国因此获得的净收益高达 15 亿美元 (James, 2002)。

尽管转基因作物在解决人类面临的粮食、资源、环境等重大社会和经济问题以及推动社会进步等方面具有重要作用, 但其环境释放后可能带来的潜在风险却引起了世界范围内的广泛关注 (Wolfenbarger 等, 2000; Obrycki 等, 2001)。Dale 等 (2002) 将转基因作物的潜在风险主要概括为: 侵入扩散 (invasiveness)、杂草化 (weediness)、对非靶标生物的毒害作用 (toxicity) 和对生物多样性 (biodiversity) 的影响等, 其中转基因抗虫作物花粉飘移对非靶标昆虫的潜在影响, 已成为当今转基因生物安全性的争论焦点之一 (Shelton 等, 2001)。近年来, 国际社会对转基因作物安全性的担忧已成为影响世界经济贸易和国际关系的一个重要因素。例如 Losey 等 (1999) 在《Nature》杂志上发表了室内饲喂转苏云金杆菌毒素蛋白基因玉米 (Bt 玉米) 的花粉可导致大斑蝶幼虫死亡的结果后, 国际各大主要媒体争相报道, 社会公众反应异常激烈, 最终导致欧盟委员会冻结了所有 Bt 玉米的批准程序, Bt 玉米主要生产商——孟山都公司股票猛挫 10% (Shelton 等, 1999)。鉴于开展转基因作物花粉对非靶标昆虫潜在风险的研究, 对深入了解转基因作物的潜在风险以及保障转基因作物的健康发展和合理利用具有十分重要的意义, 本文就当前有关研究概况作一简介。

### 1 转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的影响

迄今, 有关转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险研究并不多, 主要集中在 Bt 玉米花粉对大斑蝶的影响。继 Losey 等 (1999) 报道之后, Hansen 等 (2000) 发现大斑蝶幼虫取食田间自然飘落的 Bt 玉米“176”品系花粉 48h 后, 死亡率显著高于对照, 而该转 Bt 玉米品系花粉对另一种非靶标植食性昆虫——北美黑凤蝶幼虫亦存在显著的致死作用 (Wraight 等, 2000; Zangerl 等, 2001)。上述结果被理解成转基因作物对非靶标昆虫会产生严重的负面影响, 而一些民众和“环境主义”等组织据此纷纷提出要求限制甚至停止转基因玉米的生产与销售, 这在一定程度上影响了转基因作物的研究、开发和产业化的进程。为了恢

复公众对转基因作物的信心，在生物技术公司资助下，美国环境保护局（EPA）组织专家小组就大斑蝶问题展开了调查研究。经过为期 2 年的田间多点调查，最终认定除 Bt 玉米 176 品系（含花粉特异性表达启动子，Bt 毒蛋白在花粉中表达水平特别高）外，当前已商业化种植的 Bt 玉米品系的花粉对大斑蝶应无负面影响（Hellmich 等，2001a; Sears 等，2001; Stanley-Horn 等，2001）。

有关转基因抗虫作物花粉在胁迫条件下对其它非靶标昆虫的影响也有一些零星报道。如 Pilcher 等（1997）报道取食转 Bt *cry1Ab* 基因玉米花粉对捕食性天敌昆虫：具斑食蚜瓢虫、食螨小花蝽和普通草蛉的存活及生长发育均无显著影响。以含有 Cry3Bb1 蛋白的 Bt 玉米（MON 863）花粉饲养的具斑食蚜瓢虫在生物学指标上无明显变化（Duan 等，2003）。取食 Bt 玉米花粉对蜜蜂幼虫的生长发育和一种水蚤 *Daphnia magna* 的存活并无明显影响（Hilbeck 等，2000）。王忠华等（2001）发现家蚕幼虫连续取食转 Bt 基因水稻花粉至 3 龄后，除体重有明显变化外，对幼虫死亡率无显著影响。李文东等（2002）以转 Bt *cry1Ac* 基因棉花、转 *cry1A+CpTI* 双价抗虫棉花以及转 *cry1Ab* 基因玉米花粉饲喂家蚕 1 龄幼虫 72h 后，对后来的生长发育及繁殖并无显著影响。

就现有研究来看，转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的影响因昆虫种类和转基因抗虫作物品种/系而异（表 2.1），其影响按作用结果可分为三种情况：（1）非靶标昆虫取食转基因花粉后，对其生长发育、存活等产生明显/显著的不利影响。如大斑蝶和北美黑凤蝶幼虫取食 Bt 玉米 176 品系花粉后，死亡率显著增高，生长发育明显减缓（Losey 等，1999; Hansen 等，2000; Wraight 等，2000; Zangerl 等，2001）。（2）取食转基因花粉后，非靶标昆虫的生物学指标无明显变化。如大斑蝶取食 Bt 玉米 Mon810 品系花粉（Hellmich 等，2001a; Stanley-Horn 等，2001），具斑食蚜瓢虫、食螨小花蝽和普通草蛉等取食 Bt 玉米 176 品系花粉等。（3）取食转基因花粉后，对非靶标昆虫的生长发育可能起促进作用。如具斑食蚜瓢虫单独取食以转 Bt *cry3A* 基因马铃薯叶片为食的马铃薯甲虫后，其羽化率明显低于同时又取食转 Bt 马铃薯花粉的（Riddick 等，1998）；取食 Bt 玉米花粉的蜜蜂羽化率显著高于取食其非转基因玉米花粉的（Hilbeck 等，2000）。

转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的影响按作用途径可分为两种情况：（1）直接影响，通过非靶标昆虫直接取食而产生。如蜜蜂、瓢虫等具有摄食植物花粉习性的非靶标昆虫取食转基因花粉后，就有机会接触到杀虫毒蛋白，从而可能遭受潜在的不利影响。此外，有些非靶标植食性昆虫却被被动地取食飘落在寄主植物叶片的转基因花粉而可能受到不利影响。如大斑蝶和北美黑凤蝶等（Losey 等，1999; Hansen 等，2000; Wraight 等，2000; Zangerl 等，2001）。（2）间接影响，植食性害虫取食转基因抗虫作物花粉后，再通过食物链传递方式影响其天敌的生长发育、寄生或捕食行为、以及种群数量等。这方面虽已有报道天敌昆虫因其寄主取食转基因抗虫作物而受到不利影响，如普通草蛉饲喂以 Bt 玉米为食的欧洲玉米螟或其它鳞翅目幼虫后，幼虫死亡率显著增加（Hilbeck 等，1998），但至今尚未见有因寄主取食

转基因花粉而对天敌产生影响的研究报道。

转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的不利影响,一般被认为主要是通过昆虫直接取食花粉,接触花粉中表达的外源杀虫毒蛋白而引起的,但是,这其中也不能排除因外源基因片段的插入效应而造成不利影响的可能性。外源基因片段随机插入、整合到植物基因组中,可能导致植物体内次生物质组成、含量发生改变(张永军等, 2001a;b; 阎凤鸣等, 2002),从而对植食性昆虫产生影响(Maessen, 1997)。有关这方面尚待研究确证。

## 2 转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫生态风险的影响因素

转基因抗虫作物对非靶标昆虫的影响程度主要取决于两方面:(1)杀虫基因/毒蛋白的种类,即外源基因表达的毒蛋白杀虫特异性(对非靶标昆虫是否具有杀虫活性)。以Bt杀虫晶体蛋白为例,属多基因家族,以其基因序列同源性及其晶体蛋白杀虫谱来分类。Cry1类群主要对鳞翅目昆虫具特异杀虫活性,Cry2对鳞翅目/双翅目、Cry3类群对鞘翅目、以及Cry4对双翅目等有特异活性。当非靶标昆虫不属于外源基因表达毒蛋白的杀虫谱范围内时,其取食含有该毒蛋白的花粉后,受到影响的可能性就不明显。转Bt *cry1Ab* 基因玉米植株体内表达的杀虫蛋白对鳞翅目昆虫有杀虫活性,而对诸如鞘翅目昆虫如瓢虫等可能不会产生明显影响。研究结果也得以证实,如Bt玉米176品系花粉对大斑蝶和北美黑凤蝶幼虫的生长发育与存活可造成显著影响(Losey等, 1999; Hansen等, 2000; Wraight等, 2000; Zangerl等, 2001),而对具斑食蚜蛾等则未有明显作用(Pilcher等, 1997)。(2)非靶标昆虫摄入毒蛋白的数量。即使花粉中的毒蛋白对某种非靶标昆虫具杀虫活性,但是当摄入的毒蛋白数量还不足于对昆虫产生毒害时,转基因花粉对非靶标昆虫的影响程度也就相应减弱,甚至不产生作用。非靶标昆虫对毒蛋白的摄入量与杀虫基因在花粉中的表达水平以及昆虫接触到转基因花粉的机会有关,其中就那些具有摄食花粉习性的非靶标昆虫而言,前者显得更为重要,而对于被动取食花粉的非靶标昆虫如大斑蝶、北美黑凤蝶等则两者均相当重要。

### 2.1 转基因花粉中毒蛋白的表达水平

外源杀虫基因在花粉中的表达水平决定着花粉中毒蛋白的丰度。显然,毒蛋白含量高,非靶标昆虫只要取食少量的转基因花粉即可产生不利影响;反之,影响程度就小。研究表明,毒蛋白在花粉中的表达水平与所使用的启动子密切相关。当前在转基因抗虫作物培育中常用的启动子包括:(1)在植株体内系统表达的组成型启动子(constitutive promoter),如烟草花叶病毒35S启动子(CaMV35S)、玉米泛素启动子(Ubiquitin)和水稻肌动蛋白启动子(Actin-I)等;(2)在植株特定组织或器官中表达的组织特异性启动子(tissue-specific promoter),如玉米烯醇丙酮酸磷酸羧化酶启动子(PEPC,在绿色组织中表达)、花粉特异表达基因(*lat52*)启动子(Pollen-specific promoter, PSP,在花粉中表达)和菜豆植物凝集素-L启动子(PHA-L,在种子内表达)等;(3)特定条件下诱导表达的诱导型启动子(inducible promoter),如马铃薯蛋白酶抑制剂-II启动子(Pot PT-IIK,损伤诱导)和烟草发病相关蛋白

-1a 启动子 (PR-1a, 化学诱导) 等 (王关林等, 1998; 叶恭银等, 2001)。以 CaMV35S 启动子驱动的杀虫外源基因在 Bt 玉米全株中都能表达, 其中一般以根、茎、叶中的毒蛋白含量为高, 穗部相对较低, 花粉中最少 (表 2.2)。如果选用花粉特异性启动子, 花粉中的毒蛋白表达量则会显著增高。例如 Bt 玉米 176 品系花粉含有 PSP 启动子, 毒蛋白表达量大约是以 CaMV35S 启动子驱动的 MON810 品系的 45 倍 (Wright 等, 2000), 而这可能就导致了大斑蝶和北美黑凤蝶对 Bt 玉米不同品系花粉敏感性差异的变化 (Hansen 等, 2000; Wright 等, 2000; Zangerl 等, 2001)。从转基因作物生态安全性角度而言, 使用具有诱导表达特性的启动子似更为适宜。

## 2.2 非靶标昆虫与转基因花粉的接触机率

在室内条件下虽能通过检测毒蛋白在花粉中的表达量及其对非靶标昆虫的毒力, 以明确转基因花粉的危害, 但就花粉对非靶标昆虫的生态风险评价而言, 还需要探明自然环境条件下转基因花粉对非靶标昆虫的暴露剂量。与室内人为胁迫条件相比, 非靶标昆虫在自然环境中接触、摄入转基因花粉的情况远为复杂, 其中受到诸多因素如转基因作物本身、非靶标昆虫和许多环境条件等的影响。

### 2.2.1 转基因抗虫作物生产、释放花粉的能力

在一定地域范围的自然生态环境中, 非靶标昆虫对转基因花粉的接触机率很大程度上决定于该地域范围内的花粉绝对数量, 而后者又取决于转基因抗虫作物生产、释放花粉的能力和该作物在这个地区的种植面积。虽然至今尚未见有关植物在导入外源基因后, 其花粉生产和释放发生变化的研究报道, 但这种可能性还是存在的。而且, 不同地区、不同年份的气候变化, 也可能对转基因抗虫作物花粉的生产和释放量造成一定影响。此外, 转基因抗虫作物种植面积越大, 在一定范围内的花粉生产绝对量就越大, 非靶标昆虫接触到转基因花粉的机率也就越高。

### 2.2.2 非靶标昆虫发生与转基因抗虫作物扬花期的重迭程度

非靶标昆虫发生期与转基因抗虫作物扬花期的一致性, 是非靶标昆虫可能遭受转基因花粉生态胁迫的关键所在。有研究表明, 非靶标昆虫幼虫不同龄期对 Bt 毒蛋白敏感性是明显不同的, 其中以低龄幼虫较为敏感。因此, 在转基因抗虫作物扬花期间, 而非靶标昆虫正处低龄幼虫时, 则更容易受到转基因花粉的不利影响。非靶标昆虫发生敏感期与转基因抗虫作物扬花期的重迭程度在不同年份、不同地区会有所变化。例如, 2000 年田间调查发现, 位于美国相对偏北的爱荷华州和马里兰州, 大斑蝶 1~2 龄幼虫的田间发生时间与玉米扬花期约有 15~20% 重迭, 而在相对偏南的明尼苏达州和安大略湖地区的重迭比例高达 40~60% (Oberhauser 等, 2001)。

此外, 非靶标昆虫接触转基因花粉的持续毒性还与飘积在寄主叶片上的花粉中毒蛋白的降解/失活速率有关。通常, 植物花粉会在扬花后的若干小时内快速失活, 而且自然条件下的田间高温及太阳紫外线照射, 必然影响花粉中毒蛋白活性的持续时间, 从而使有效重迭性

发生变化。

### 2.2.3 转基因花粉的田间飘移扩散和分布

对于那些被动摄食花粉的非靶标昆虫来说,当其幼虫发生期与转基因抗虫作物扬花期吻合或部分重迭时,转基因花粉在田间的飘移扩散和分布就显得非常重要。转基因花粉的飘移密度分布与扩散距离是对非靶标昆虫遭遇花粉机率作准确评估所必须的检测内容。研究结果表明,虽然玉米花粉经风传播距离至少可达 60m (Raynor 等, 1972),有时甚至在 200m 之外 (Louette, 1997),但绝大部分玉米花粉飘落沉积发生在玉米田块当中,飘移沉积在大斑蝶寄主叶片上的花粉数量及比例在距离玉米田块 2~3m 内就急剧下降 (Wraight 等, 2000; Pleasants 等, 2001)。如在玉米田中花粉的平均沉积密度高达  $170.6 \text{ 粒}/\text{cm}^2$ ,而在田边 2m 处的花粉平均飘落密度仅为  $14.2 \text{ 粒}/\text{cm}^2$ 。

降雨、风向/速、以及非靶标昆虫寄主植物叶大小、着生部位与朝向等均能影响花粉的飘移扩散和分布 (Pleasants 等, 2001)。一次降雨过程可冲刷去约 90% 飘落于寄主植物叶片上的花粉。

### 2.2.4 非靶标昆虫的行为生态学

虽然具有摄食花粉习性的非靶标昆虫对转基因花粉和非转基因花粉是否有选择性,至今尚不得而知,但对于那些被动取食花粉的非靶标昆虫如大斑蝶而言,花粉的存在可以影响其取食行为变化 (Hellmich 等, 2001b)。有研究结果表明,当撒落有大量花粉的寄主叶片和没有花粉的叶片同时存在时,大斑蝶幼虫更多地选择取食没有花粉的叶片;对于撒落少量花粉的叶片和没有花粉的叶片,大斑蝶多选择取食前者。这表明不同剂量的花粉对大斑蝶幼虫取食行为的影响是不同的。有关转基因花粉对非靶标昆虫幼虫取食、雌成虫产卵选择行为的作用,及其对潜在风险的影响程度还有待进一步研究。

## 3 转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险评价

生态风险评价是评估在暴露于一个或多个胁迫作用下,对生态系统将要产生或正在产生不利影响(危害)可能性的过程 (EPA, 1998)。目前有关转基因作物的生态风险评价体系在很大程度上承用了以前生态毒理学中有毒化合物释放后对环境风险分析的概念与方法(钱迎倩等, 1998),采用以提出问题、特征分析和风险鉴定为过程的概念性框架模式,即暴露-效应分析模式(王根绪等, 2003)。该模式主要围绕效应特征和暴露特征这两个基本要素对潜在的生态风险展开系统分析与评价。其一般过程是首先提出问题,包括确定评价对象、目标以及评价范围与尺度,明确胁迫及其效应、胁迫对象以及所处的生态系统等相关特征,确定评估关键因子并形成概念性评价模型;然后进入分析阶段,通过对相关指标的量化与分析,明确在该生态系统中暴露于有效胁迫作用下的可能性(暴露概率)以及可能产生的生态效应(胁迫响应程度);最后在风险鉴定阶段,综合暴露与效应的分析结果,估算可能产生风险的概率,并为风险管理提供依据。



转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险评价作为转基因作物生态风险评价的重要组成部分,它适用于后者的评价体系与方法,多采用暴露-效应分析评价模式。以Bt玉米花粉对大斑蝶的生态风险评价为例,Sears等(2001)通过对Bt玉米花粉中表达的毒蛋白类型和数量、大斑蝶各龄幼虫对毒蛋白敏感性以及Bt花粉取食量的分析,估计可能的危害程度(即效应特征, $P_t$ );同时通过调查导致对大斑蝶幼虫及其发育后期产生致死或亚致死作用的Bt花粉密度(阈值)、田间自然飘落的Bt花粉密度达到或超过阈值的寄主植物叶片比例、取食玉米田间寄主植物的大斑蝶种群数量以及大斑蝶幼虫发生与玉米抽穗扬花的时空重迭程度,明确Bt花粉对大斑蝶的暴露程度、作用时间以及空间分布与影响大小等(即暴露特征, $P_e$ ),然后综合概率化的效应特征与暴露特征,估算出Bt玉米花粉对大斑蝶的生态风险( $R = P_e \times P_t$ ),即大斑蝶暴露在Bt玉米花粉胁迫作用下产生不利影响的种群比例。得出的最后结论是目前大多数转Bt玉米品系花粉中的毒蛋白表达量较低,大斑蝶的自然种群发生与Bt花粉的时空重迭可能性不大,且存在多种自然因素(如降雨等)影响,使得Bt花粉在田间飘移、分布的密度远不及室内研究时的试验浓度,因此,Bt玉米花粉对大斑蝶自然种群造成不利影响的风险很低。

Wolt等(2003)采用screening-level法就Bt玉米花粉对大斑蝶生态风险也作了评估。该方法同样基于暴露-效应分析模式,但与Sears等(2001)不同,是通过逐个量化分析Bt玉米花粉的田间密度、寄主植物分布比例、毒蛋白在花粉中的表达量以及毒力效果、Bt花粉扬花时间、大斑蝶幼虫发生时间、幼虫对毒蛋白的剂量响应以及Bt花粉与大斑蝶敏感幼虫的时空分布等特征,从而估计环境中Bt毒蛋白的浓度(estimated environmental concentration, EEC)以及可致大斑蝶种群90%个体产生胁迫效应的毒蛋白的有效浓度( $LC_{90}$ ),以此算得风险系数(Risk quotients,  $RQ = EEC/LC_{90}$ ),即Bt花粉胁迫大斑蝶种群导致生态风险的相对强度。上述两种评估方法虽然在评价指标上不尽相同,但最终所得结论是一致的。

## 4 展望

总的说来,目前有关转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的潜在风险研究均主要针对可能产生的表现影响(如死亡、生长发育等),但就昆虫体内生理和代谢等的内在影响则尚乏研究,而且今后对以下问题还有待于加强深入研究:(1) 探明携带有不同启动子驱动的不同Bt毒蛋白基因类型的转基因玉米花粉对大斑蝶可能的毒理学影响;(2) 分析Bt毒蛋白基因表达及其产物数量及活性的时空动态变化(田间高温、太阳紫外光等作用)对暴露环境剂量的影响;(3) 明确非靶标昆虫对不同转基因花粉密度的取食选择性及其对潜在风险表现的影响程度;(4) 验证试虫在室内饲喂条件下的花粉实际取食量(即使在高浓度下)与暴露的环境剂量的关系,等。

尽管当前就Bt玉米花粉对大斑蝶的生态风险问题已有初步定论,但这些研究更多地从商业目的角度就已大面积种植的转基因玉米花粉可能的影响后果作了调查。由于自然条件下

的情况极为复杂，其中的影响因素繁多，因此个别年份的调查结果并不能完全表明转基因作物花粉对非靶标昆虫的潜在风险并不存在；而且随着新的转基因抗虫作物不断培育成功，就转基因花粉对非靶标昆虫生态安全性的潜在风险，需作常年、多点、连续的系统监测与评估，同时选用对非靶标昆虫生态安全的转基因抗虫作物品种，合理布局种植，以减轻或改善转基因花粉对非靶标昆虫的生态胁迫，从而保障转基因抗虫作物的合理利用与转基因植物产业健康发展。

表 2.1 转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的影响

| 昆虫种类                                   | 转基因作物           | 杀虫基因 <sup>1)</sup> | 启动子 <sup>1)</sup> | 表达水平 <sup>1,2)</sup>           | 试验点         | 影响程度                               | 参考文献                                       |
|----------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|-------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| 大斑蝶<br><i>Danaus plexippus</i>         | Corn (Bt11)     | <i>cryIAb</i>      | CaMV35S           | 1.25ng/mg protein              | Lab         | 幼虫取食减少, 发育延<br>缓, 死亡率增高            | Losey 等, 1999                              |
|                                        | Corn (Bt11)     |                    |                   | 0.39µg/g pollen*               | Lab         | 幼虫死亡率显著增高                          | Hansen 等, 2000                             |
|                                        | Corn (Bt11)     |                    |                   |                                | Field       | 无明显影响                              | Hellmich 等, 2001a;<br>Stanley-Horn 等, 2001 |
|                                        | Corn (176)      | <i>cryIAb</i>      | PEPC/PSP          | 7.1µg/g<br>weight of pollen    | fresh Lab   | 幼虫死亡率显著增高                          | Hansen 等, 2000                             |
|                                        | Corn (176)      |                    |                   | 1.60µg/g pollen*               | Field       | 幼虫死亡率显著增高                          | Hansen 等, 2000;<br>Hellmich 等, 2001a       |
|                                        | Corn (176)      |                    |                   |                                | Field       | 无明显影响                              | Wraight 等, 2000                            |
|                                        | Corn (176)      |                    |                   |                                | Field       | 低剂量: 体重降低; 高<br>剂量: 体重下降、死亡<br>率增高 | Stanley-Horn 等, 2001                       |
|                                        | Corn (Mon810)   | <i>cryIAb</i>      | CaMV35S           | 0.09 µg/g<br>weight of pollen  | fresh Field | 无明显影响                              | Hellmich 等, 2001a;<br>Stanley-Horn 等, 2001 |
|                                        | Corn (Mon 863)  | <i>cry3Bb1</i>     |                   | 37.4 µg/g<br>weight of pollen  | fresh Lab   | 无明显影响                              | EPA, 2002                                  |
|                                        | Corn (Ddt418)   | <i>cryIAc</i>      | CaMV35S           |                                | Field       | 无明显影响                              | Hellmich 等, 2001a                          |
| 北美黑凤蝶<br><i>Papilio polyxenes</i>      | Corn (Tc1507)   | <i>cryIF</i>       | Ubiquitin         |                                | Field       | 无明显影响                              | Hellmich 等, 2001a                          |
|                                        | Corn (Cbh351)   | <i>cry9C</i>       | CaMV35S           |                                | Field       | 无明显影响                              | Hellmich 等, 2001a                          |
|                                        | Corn (Mon810)   |                    |                   | 2.1±0.3ng/g pollen*            | Lab         | 无明显影响                              | Wraight 等, 2000                            |
|                                        | Corn (176)      |                    |                   | 90.5±2.6ng/g<br>pollen*        | Lab         | 幼虫死亡率显著增高                          | Wraight 等, 2000                            |
|                                        | Corn (176)      |                    |                   |                                | Field       | 亚致死效应明显                            | Wraight 等, 2000                            |
|                                        | Corn (Mon810)   |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | 李文东等, 2002                                 |
|                                        | Cotton          | <i>cryIAc</i>      |                   | 11.5ng/g pollen                | Lab         | 无明显影响                              | 李文东等, 2002                                 |
|                                        | (NuCOTN33B)     |                    |                   |                                |             |                                    |                                            |
|                                        | Cotton (SGK321) | <i>cryIAc+CpTI</i> |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | 李文东等, 2002                                 |
|                                        | Rice (KMD)      | <i>cryIAb</i>      | Ubiquitin         |                                | Lab         | 幼虫体重降低                             | 王忠华等, 2001                                 |
| 具斑食蚜瓢虫<br><i>Coleomegilla maculate</i> | Corn (176)      |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | Pilcher 等, 1997                            |
|                                        | Corn (Mon 863)  | <i>cry3Bb1</i>     | CaMV35S           | 77.1 µg/g<br>weight of pollen* | fresh Lab   | 无明显影响                              | Duan 等, 2003                               |
|                                        | Potato          | <i>cry3A</i>       |                   |                                | Lab         | 无明显影响, 羽化率显<br>著增加                 | Riddick 等 1998                             |
| 食蚜小花蝽<br><i>Orius instidiosus</i>      | Corn (176)      |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | Pilcher 等, 1997                            |
| 普通草蛉<br><i>Chrysoperla carnea</i>      | Corn (176)      |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | Pilcher 等, 1997                            |
| 蜜蜂<br><i>Apis mellifera</i>            | Corn (176)      |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | Hilbeck 等, 2000                            |
| 水蚤<br><i>Daphnia magna</i>             | Corn (176)      |                    |                   |                                | Lab         | 无明显影响                              | Hilbeck 等, 2000                            |

注: 1) 相同的转基因作物品系只标写在第一次出现时;

2) 毒素蛋白在花粉中的表达水平数据摘自 EPA(2001), 带\*的数据引自相应的文献。

表 2.2 Cry1Ab 蛋白在玉米 “Bt 11” 品系中的表达量<sup>1)</sup>

| 组织 Tissues |                                     | 毒素蛋白含量 Toxin level<br>(ng Cry1Ab/mg protein) |
|------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| 叶片 Leaf    |                                     | 9.4-168                                      |
| 茎秆 Stalk   | 茎髓 Pith                             | 8.8-27                                       |
|            | 茎表皮 Stalk epidermis                 | 9.0-36                                       |
| 根 Root     | 次生根 Sub surface roots               | 2.2-37                                       |
|            | 支持根 Brace roots                     | 3.2-7.0                                      |
| 穗 Tassel   |                                     | 6.8-8.8                                      |
|            | 花丝 Silk                             | 2.4-6.6                                      |
|            | 花粉 Pollen                           | 1.25                                         |
|            | 籽粒 Kernel                           | 0.4-8.2                                      |
|            | 颖壳、穗轴和穗柄<br>Husk, cob and ear shank | 2.6-27.2                                     |

注：1) 数据引自 EPA (2001)。

### 第三章 苏云金杆菌研究进展

苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性、能够产生伴孢晶体的细菌。Bt 伴孢晶体其实是一种具杀虫活性的蛋白质，即杀虫晶体蛋白（ICPs）或  $\delta$ -内毒素（Knowles, 1994）；伴孢晶体一般含有一种或多种杀虫晶体蛋白。而且，Bt 的杀虫活性和杀虫特异性均取决于 ICPs 的性质。到目前为止，Bt 对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目、直翅目和食毛目的昆虫以及对线虫、螨类和原生动物等都具有一定的毒力作用，且对哺乳动物和非靶标生物（如捕食性天敌和昆虫病原寄生生物）无毒，在生物防治中备受青睐，其生物制剂广泛应用于农林防治和蚊虫控制中。到 1995 年为止，在美国环境保护局登记注册的 Bt 产品已经有 182 种，但是直到 1999 年 Bt 杀虫剂只占杀虫剂总销售额的不到 2%。随着害虫对化学杀虫剂的抗性的增强，Bt 也被越来越广泛地使用。与此同时，Bt 基因也被转进不同作物中以控制日趋严重的昆虫抗药性问题。

## 1 Bt 由来及其杀虫晶体蛋白的结构和功能

### 1.1 Bt 重要事件回顾

Bt 首先于 1901 年由日本人 Ishiwata Shigetane 在患猝倒病的家蚕中分离得到，当时只认为是由一种杆状细菌所引起的疾病，因此该病原未能保存下来。1909 年，E. Berliner 从德国苏云金省的地中海粉蛾 *Ephestia kühniella* Zell 中重新分离得到，并于 1911 年将感染家蚕幼虫的这种致病菌正式定名为苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*。1938 年，Bt 的第一个商品制剂 Sporéine 在法国问世，并用于防治地中海粉蛾。Angus 在 1954 年证实 Bt 在孢子形成过程中产生的晶体蛋白内含体具有杀虫活性，即 Bt 杀虫特性由其杀虫晶体蛋白决定。Schnepf 等（1981）首次成功克隆得到第一个编码杀虫晶体蛋白基因，此后不断有新基因被发现并克隆。1983 年首例转基因烟草问世，这为 Bt 基因广泛而深入的应用提供了新的发展方向。随后，转 Bt 基因抗虫烟草最先培育成功（Veack 等, 1987）。迄今，已经至少获得了 50 多种转 Bt 基因抗虫作物，其中有些已进入大田试验，少数已商品化生产应用。转 Bt 基因棉花于 1996 年在美国上市；截止 2001 年，在美国种植的约 69%棉花和 26%玉米均为遗传修饰体。Bt 基因已经成为植物基因工程及转基因育种中最具应用潜力且应用最广泛的抗虫基因资源。

### 1.2 Bt 的作用机制

到目前为止，Bt 的作用方式主要是通过对 CryI 类杀虫晶体蛋白的研究来认知的。昆虫中肠的碱性环境对 Bt 毒力的发挥是必要的。Bt 对昆虫产生致病性必须击毁昆虫自身的各种防御机制。Bt 晶体蛋白被昆虫摄入后，其毒力发挥依赖于一个多步骤的复杂过程，包括晶体蛋白的溶解、原毒素到活性形式的蛋白水解过程、与中肠受体高亲和力的结合过程以及毒素插入膜的不可逆过程。为了能通过昆虫的前肠，Bt 必须以非常小的孢子形式而不是营养

体的形式出现。在中肠中,碱性环境不利于孢子的生长,而杀虫晶体蛋白则刚好可以发挥作用。从 Bt 孢子的晶体内容物中释放出的 Cry 蛋白是以非活性的原毒素形式存在的。在毒力发生以前,原毒素必须经过蛋白水解过程。这过程则需要昆虫中肠的高 pH 值环境和各种消化酶的参与。活化过程包括晶体蛋白羧基端和氨基末端的去除 (Gringorten, 2001)。毒素一旦被活化,就由内腔经壁膜扩散进入内膜空间,这样就到达了柱状上皮细胞的表面 (Hill 和 Pinnock, 1998)。在细胞表面, Cry 蛋白与受体结合 (Ferre 和 Van Rie, 2002)。在此过程中,氨肽酶和类似于钙粘着蛋白的细胞支持分子被认为是 Cry 蛋白的结合受体 (Luo 等, 1997; Vadlamudi 等, 1995)。Dorsch 等 (2002) 认为 Cry 蛋白的结合过程通常发生在与膜结合蛋白结构最接近的膜区域。此外, Jurat-Fuentes 等 (2002) 通过对受体结合的研究发现 Cry 蛋白在细胞表面可以和多个位点结合,且认为糖基化对蛋白和受体间的相互作用起着积极重要的作用。

### 1.3 Bt 杀虫晶体蛋白结构和功能

#### 1.3.1 ICPs 的结构特征

Bt 杀虫晶体蛋白分子量一般为 27~140kD, 主要以原毒素 (protoxin) 形式存在。Bt 杀虫蛋白能自发形成伴孢晶体,这在一定程度上防止该蛋白在环境中的被迅速降解。伴孢晶体通常具有菱形、正方形、卵形和锥形等几何形状。不同类型 ICPs 可同时存在于同一伴孢晶体中。杀虫晶体蛋白的一级结构即氨基酸序列是由不同的基因编码,除编码 Cry4D 的蛋白外其可以分为毒性区 (N-端) 和非毒性区 (C-端)。C-端氨基酸序列有高度的保守性,大多数半胱氨酸均位于此,可以形成二硫键,这与伴孢晶体的形成和结构的稳定性有关,而 N-端则包含有 5 个保守序列区,除 Cry2 和 Cry4D 外,都含有一个 120 个左右氨基酸序列的疏水区域。

此外,到目前为止,通过 X 射线晶体衍射分析, Li 等 (1991)、Grochulski (1995) 和 Li 等 (1996) 分别对 Cry3A、CryIAa 和 Cyt2A 这三种晶体蛋白的结构进行了分析。结果发现 Cry3A 和 CryIAa 的三维构象极其相似,其氨基酸序列同源性的为 36%,而 Cyt2A 则与 CryIAa 和 Cry3A 氨基酸序列间的同源性低于 20%,即 Cyt2A 与 CryIAa 和 Cry3A 的结构明显不同。

Cyt 毒素不同于 Cry 的  $\delta$ -内毒素,其能在体外溶解很多细胞类型。而且 Cyt2A 只有一个结构域组成,即 2 个外层的  $\alpha$ -螺旋围绕于混合  $\beta$ -折叠片。据此推测, Cyt1A 可能有类似于 Cyt2A 的结构。与 Cyt2A 相比, Cry3A 和 CryIAa 则由三个结构域组成。结构域 I 由 7 个反平行的  $\alpha$ -螺旋组成,其中  $\alpha_5$  螺旋被其余  $\alpha$  螺旋围在中心。结构域 II 和结构域 III 并列排在结构域 I 的旁边。结构域 II 由 3 个反平行的  $\beta$ -折叠组成,形成典型的“Greek key”拓扑结构,即形成了所谓的  $\beta$ -棱柱折叠 (Shimizu 等, 1996)。结构域 III 则由 2 个反平行的  $\beta$ -折叠高度缠绕形成一个  $\beta$ -三夹板的结构组成,即形成典型的“jelly roll”拓扑结构。

#### 1.3.2 杀虫晶体蛋白结构与功能的关系

研究表明, Bt 杀虫晶体蛋白由三个不同的结构域组成。N-端结构域即结构域 I 由 7 个

$\alpha$ -螺旋组成,其参与了膜插入过程。结构域 II 由 3 个对称折叠的  $\beta$ -折叠片组成,其在受体识别和结合过程中发挥作用。C-端即结构域 III 则由 2 个  $\beta$ -折叠片组成,则与结合、识别、孔结构和通道特异性有关。三个结构域形成一个倒的“L”型,结构域 III 堆积在结构域 II 上,而结构域 I 则位于边上。以 Cry 蛋白为例,当受体与晶体蛋白结合后,结构域 I 首先发生重排,形成象“伞”一样的结构,其三对  $\alpha$ -螺旋打开并插入膜中,把结构域 III 带至于膜的表面。Li 等 (2001) 研究发现 Cry 蛋白的插入是个不可逆的过程。随着插入过程 Cry 蛋白发生了聚合,孔结构也随之形成。孔结构在很大程度上是一个四聚物,也形成  $K^+$  选择通道 (Gringorten,2001)。此通道的形成,立即给昆虫带来了两个致命的生理变化。首先,上皮细胞中的  $K^+$  梯度被破坏,导致血淋巴中  $K^+$  浓度的增加。其次, pH 值梯度的破坏,导致中肠内腔 pH 值的下降和血淋巴中 pH 值的提高。最终,导致受影响的细胞被破坏和渗透裂解。随着中肠上皮细胞的裂解,孢子也得以在中性环境中生长,从破坏中汲取营养。大多数昆虫并不是被毒素直接杀死,而是由于中肠被麻痹、取食受抑制,最终死于饥饿或败血症。

## 2 Bt 杀虫晶体蛋白基因

Bt 杀虫晶体蛋白因其所具有的杀虫特异性和在环境中广泛存在,得到了广泛的关注与研究。自从 Schnepf 和 Whiteley (1981) 克隆了第一个杀虫晶体蛋白基因以来,许多新的 Bt 基因序列也被相继分离测定。截止 2004 年 3 月 22 日,已经分离并命名杀虫晶体蛋白基因有 311 个 ([http://www.biois.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/toxins2.html](http://www.biois.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html))。起初,新克隆的 Bt 基因或蛋白由发现者自行命名,如 *icp*, *cry*, *kurhd1*, *Bta*, *bt1*, *bt2*, *type B*, *type C*, 4.5 kb, 5.3 kb 和 6.6 kb 等 (McLinden 等,1985; Geiser 等, 1986; Höfte 等, 1986; 1988; Kronstad 等, 1986; Ward 等, 1987; Donovan 等, 1988; Sanchis 等, 1989)。为此, Höfte 和 Whiteley (1989) 提出了以 Bt 晶体蛋白的杀虫谱为依据的分类方法,把他们分为 4 个大类 14 个亚类,即 *cryI* (对鳞翅目昆虫具杀虫专一性)、*cryII* (对鳞翅目和双翅目昆虫具杀虫专一性)、*cryIII* (对鞘翅目昆虫具杀虫专一性) 和 *cryIV* (对双翅目昆虫具杀虫专一性)。

随着新基因的不断克隆,此分类方法的不足之处也日益暴露。此外一些不规则的现象如 *cryIC* 基因对双翅目双翅目和鳞翅目均具杀虫活性 (Bradley 等, 1995)、*cryIB* 基因对鳞翅目和鞘翅目均具杀虫活性等 (Smith 等, 1994) 也与原有的命名方法均不协调,这就需要建立一种新的分类系统。鉴于此, Crickmore 等 (1998) 提出了一个新的命名方法,即根据 Bt 基因的序列同源性进行分类,新的命名系统阶元为:阿拉伯数字代表群,替代原先的罗马字,表示氨基酸序列的同源性小于 45%;大写英文字母代表亚群,表示氨基酸序列的同源性达 45%~75%;小写英文字母代表类,表示氨基酸序列的同源性达 75%~95%;最后阿拉伯数字代表亚类,表示氨基酸序列的同源性高达 95%以上;*cyr* 则继续保留。

根据 Crickmore 等 (1998) 提出的分类标准,对现已分离的 311 个 Bt 蛋白基因进行归

类, 将 *cry* 基因分为 44 群、72 亚群、91 类、155 亚类; 将 *cyt* 基因则分为 2 群、6 亚群、9 类、22 亚类。现将已分离到的部分基因列于表 3.1。

### 3 现有转 Bt 作物的概况

随着生物技术的不断发展, 通过转基因技术来改变一些传统育种所不能及的作物特性已成为可能。Bt 内毒素蛋白基因目前研究最多, 至今已克隆得基因已达 300 余种。然而自然的野生型 Bt 内毒素蛋白基因在转基因植物中的表达水平较低。因此为了获得高效抗虫的转基因植物, 就须对野生型基因进行修饰, 消除对高效表达不利的因素。如 Perlak 等 (1991) 对 *cryIAb* 和 *cryIIAc* 进行修饰, 改变了 21% 的核苷酸, 经修饰的基因在棉花中获得了高效表达, 表达量由原来的占可溶性蛋白总量的 0.001% 提高到 0.05~0.1%, 增加了 50~100 倍。1993 年 Fujimoto 等对 *cryIAb* 进行广泛地修饰, 66% 密码子第三位的 A 或 T 碱基被 G 或 C 所取代, *cryIAb* 经修饰后不仅消除了其 mRNA 不稳定的因素, 而且使其密码子更适合于水稻的翻译系统, 不存在调控密码子, 大大提高了翻译效率。该修饰的 *cryIAb* 在水稻中能进行高效表达, 其蛋白表达量近占可溶性蛋白总量的 0.05%。此外, 经修饰的 *cry3A* 和 *cryIAb* 分别在马铃薯和玉米中得到了高效的表达, 从而达到了高效抗虫之效果。

自 1987 年第一个转 Bt 基因抗虫烟草问世以来, 至今全球已获得了 60 多种转 Bt 基因抗虫植物 (表 3.2)。近年来, 许多国家已开展了大规模转 Bt 毒素蛋白基因植物的环境释放试验。自 1986 年 PGS 公司首次在美国和法国进行转基因烟草的田间试验以来, 全球进行转基因抗虫植物田间试验 800 余次, 占所有转基因植物田间试验的 18%。至 1999 年初, 70 多种转基因作物已经在 10 多个国家得到商品化, 在 80 种已经批准或即将批准的商品化转基因作物中, 21 种为转 Bt 基因作物, 其中以玉米、马铃薯和棉花为主。2002 年全球仅 Bt 玉米和 Bt 棉花这两种转基因作物的商业化种植面积就高达 1.45 亿公顷 (James, 2002)。在我国, 已获得转 Bt 基因植物有棉花、玉米、水稻、番茄、欧洲黑杨、花椰菜、马铃薯和烟草等, 其中 Bt 棉花已得到商品化生产, 2002 年种植面积 210 万公顷, 已超过全国棉花种植总面积的 51%; 转 Bt 抗虫玉米、水稻已进行环境释放试验。



表 3.1 GenBank 上登记的 *cry* 和 *cyt* 基因

| 基因类型            | 杀虫谱 | 编码蛋白分子量 (Da) | 氨基酸序列数 | 编码区域      | 基因编号     | 来源株系                        | 作者/年份              |
|-----------------|-----|--------------|--------|-----------|----------|-----------------------------|--------------------|
| <i>cryIAa1</i>  | L*  | 133500       | 4222   | 527-4057  | M11250   | <i>Bt kurstaki</i> HD1      | Schnepf 等, 1985    |
| <i>cryIAb1</i>  | L   | 130615       | 3778   | 142-3609  | M13898   | <i>Bt berliner</i> 1715     | Wabiko 等, 1986     |
| <i>cryIAc1</i>  | L   | 133330       | 4300   | 388-3924  | M11068   | <i>Bt kurstaki</i> HD73     | Adang 等, 1985      |
| <i>cryIAd1</i>  | L   | 131000       | 3540   | 1-3540    | M73250   | <i>Bt aizawai</i> PS811     | Payne 等, 1993      |
| <i>cryIAe1</i>  | L   | 131000       | 3722   | 81-3626   | M65252   | <i>Bt alesti</i>            | Lee 等, 1991        |
| <i>cryIAf1</i>  | L/D | 130215       | 3453   | 172->2905 | U82003   | <i>Bt</i> NT0423            | Kim 等, 2001        |
| <i>cryIAG1</i>  | L   |              | 3859   | 159-3689  | AF081248 |                             | Mustafa, 1999      |
| <i>cryIAh1</i>  |     |              |        |           | AF281866 |                             | Tan 等, 2000        |
| <i>cryIAi1</i>  |     |              |        |           | AY174873 |                             | Wang 等, 2002       |
| <i>cryIBa1</i>  | L/C | 136500       | 3687   | 1-3687    | X06711   | <i>Bt thuringiensis</i> HD2 | Brizzard 等, 1988   |
| <i>cryIBb1</i>  | L   | 136500       | 3934   | 67-3756   | L32020   | <i>Bt</i> EG5847            | Donovan 等, 1994    |
| <i>cryIBc1</i>  | D   | 138000       | 3842   | 141-3842  | Z46442   | <i>Bt morrisoni</i>         | Bishop 等, 1994     |
| <i>cryIBd1</i>  | L/D |              | 8306   | 842-4537  | U70726   | <i>Bt wuhanensis</i> HD525  | Kuo 等, 2000        |
| <i>cryIBe1</i>  | L   |              | 3684   | 1-3684    | AF077326 | <i>Bt</i> PS158C2           | Payne 等, 1998      |
| <i>cryIBf1</i>  |     |              | 3687   | 1-3687    | AX189649 |                             | Arnaut 等, 2001     |
| <i>cryIBg1</i>  |     |              |        |           | AY176063 |                             | Wang 等, 2002       |
| <i>cryICa1</i>  | L   | 132000       | 3706   | 47-3616   | X07518   | <i>Bt entomocidus</i> 60.5  | Honee 等, 1988      |
| <i>cryICb1</i>  | L   | 130500       | 4106   | 296-3823  | M97880   | <i>Bt galleriae</i> HD29    | Kalman 等, 1993     |
| <i>cryIDa1</i>  | L   | 129500       | 3903   | 264-3761  | X54160   | <i>Bt aizawai</i> HD68      | Hofte 等, 1990      |
| <i>cryIDb1</i>  | L   | 12900        | 3913   | 241-3723  | Z22511   | <i>Bt</i> BTS00349A         | Lambert, 1993      |
| <i>cryIEa1</i>  | L   | 133236       | 3655   | 130-3645  | X53985   | <i>Bt kenyae</i> 4F1        | Visser 等, 1990     |
| <i>cryIEb1</i>  | L   | 130500       | 3525   | 1-3525    | M73253   | <i>Bt aizawai</i> PS81A2    | Payne 等, 1993      |
| <i>cryIFa1</i>  | L   | 130500       | 5649   | 478-4002  | M63897   | <i>Bt aizawai</i> EG6346    | Chambers 等, 1991   |
| <i>cryIFb1</i>  |     | 13100        | 4120   | 483-4007  | Z22512   | <i>Bt</i> BTS00349A         | Lambert, 1993      |
| <i>cryIGa1</i>  |     | 129500       | 3886   | 67-3567   | Z22510   | <i>Bt</i> BTS00350A         | Lambert, 1994      |
| <i>cryIGb1</i>  | L/D |              | 5711   | 532-4041  | U70725   | <i>Bt wuhanensis</i> HD525  | Kuo 等, 1999        |
| <i>cryIGc1</i>  | L   |              | 1167   | 1-1167    | AAQ52381 |                             | Baum 等, 2003       |
| <i>cryIHa1</i>  |     | 130000       | 4148   | 530-4048  | Z22513   | <i>Bt</i> BTS02069AA        | Lambert, 1993      |
| <i>cryIHb1</i>  |     |              | 4350   | 728-4195  | U35780   | <i>Bt morrisoni</i> BF190   | Koo 等, 195         |
| <i>cryIIa1</i>  | C/L | 81200        | 2965   | 355-2514  | X62821   | <i>Bt kurstaki</i>          | Tailor 等, 1992     |
| <i>cryIIB1</i>  | C/L | 80000        | 2847   | 237-2396  | U07642   | <i>Bt entomocidus</i> BP465 | Shin 等, 1995       |
| <i>cryIIc1</i>  |     |              | 2180   | 1-2160    | AF056933 | <i>Bt</i> C18               | Osman 等, 1998      |
| <i>cryIId1</i>  | L/C |              | 2855   | 502-2661  | AF047579 |                             | Choi, 2000         |
| <i>cryIIe1</i>  | L   |              | 2920   | 310-2469  | AF211190 | <i>Bt</i> BTC007            | Song 等, 2000       |
| <i>cryIIIf1</i> |     |              |        |           | AAQ52382 |                             | Baum 等, 2003       |
| <i>cryIJa1</i>  | L   | 129500       | 3713   | 99-3602   | L32019   | <i>Bt</i> EG5847            | Donovan 等, 1994    |
| <i>cryIJb1</i>  | L/C | 13100        | 3766   | 177-3689  | U31527   | <i>Bt</i> EG5092            | Von Tersch 等, 1994 |
| <i>cryIJc1</i>  | L   |              |        |           | I90730   |                             | Payne 等, 1998      |
| <i>cryIId1</i>  | L   |              | 3507   | 1-3507    | AX189651 |                             | Arnaut 等, 2001     |
| <i>cryIKa1</i>  | L   |              | 4623   | 451-4098  | U28801   | <i>Bt morrisoni</i> BF190   | Koo 等, 1995        |
| <i>cry2Aa1</i>  | L/D | 70500        | 2269   | 156-2057  | M31738   | <i>Bt kurstaki</i>          | Donovan 等, 1989    |

续上表

| 基因类型            | 杀虫谱   | 编码蛋白分子量 (Da) | 氨基酸序列数  | 编码区域      | 基因编号     | 来源株系                          | 作者/年份                   |
|-----------------|-------|--------------|---------|-----------|----------|-------------------------------|-------------------------|
| <i>cry2Aa1</i>  | L/D   | 70500        | 1912    | 1-1902    | M23724   | <i>Bt kurstaki</i> HD1        | Widner 等, 1989          |
| <i>cry2Ac1</i>  | L/D   | 69000        | 4315    | 2125-3993 | X57252   | <i>Bt shanghai</i> S1         | Wu 等, 1991              |
| <i>cry2Ad1</i>  |       |              | 3121    | 666-2567  | AF200816 | <i>Bt</i> BR30                | Choi 等, 1999            |
| <i>cry2Ae1</i>  | L     |              |         |           | AAQ52362 |                               | Baum 等, 2003            |
| <i>cry3Aa1</i>  | C/L   | 65000        | 1956    | 1->1956   | M22472   | <i>Bt sandiego</i>            | Herrnstadt 等, 1987      |
| <i>cry3Ba1</i>  | C     | 74300        | 1977    | 1->1977   | X17123   | <i>Bt tolworthi</i> 43F       | Sick 等, 1990            |
| <i>cry3Bb1</i>  | C     | 74237        | 2277    | 202-2160  | M89794   | <i>Bt</i> EG4961              | Donovan 等, 1992         |
| <i>cry3Ca1</i>  | C     | 73000        | 2415    | 232-2181  | X59797   | <i>Bt kurstaki</i> Bt109P     | Lambert 等, 1992         |
| <i>cry4Aa1</i>  | D     | 130000       | 3543    | 1-3543    | Y00423   | <i>Bt israelensis</i>         | Ward 等, 1987            |
| <i>cry4Ba1</i>  | L/D   | 130000       | 3684    | 157-3567  | X07423   | <i>Bt israelensis</i> 4Q2-72  | Chungiatpomchai 等, 1988 |
| <i>cry5Aa1</i>  | N     | 153500       | 4155    | 1->4155   | L07025   | <i>Bt darmstadiensis</i> PS17 | Narva 等, 1994           |
| <i>cry5Ab1</i>  | N     | 143000       | 3867    | 1->3867   | L07026   | <i>Bt darmstadiensis</i> PS17 | Narva 等, 1991           |
| <i>cry5Ac1</i>  | H     |              | 3660    | 1-3660    | I34543   |                               | Payne 等, 1997           |
| <i>cry5Ba1</i>  |       | 139000       | 3735    | 1->3735   | U19725   | <i>Bt</i> PS86Q3              | Foncerrada 等, 1997      |
| <i>cry6Aa1</i>  | N     | 52500        | 1425    | 1->1425   | L07022   | <i>Bt</i> PS52A1              | Narva 等, 1993           |
| <i>cry6Ba1</i>  | N     | 44000        | 1185    | 1->1185   | L07024   | <i>Bt</i> PS69D1              | Narva 等, 1991           |
| <i>cry7Aa1</i>  | C     | 129000       | 4004    | 184-3600  | M64478   | <i>Bt galleriae</i> PGS1245   | Lambert 等, 1992         |
| <i>cry7Ab1</i>  | C     | 126500       | 3414    | 1->3414   | U04367   | <i>Bt dakota</i> HD511        | Payne 等, 1994           |
| <i>cry8Aa1</i>  | C     | 128500       | 3471    | 1->3471   | U04364   | <i>Bt kumamotoensis</i>       | Narva 等, 1992           |
| <i>cry8Ba1</i>  | C     | 130000       | 3507    | 1->3507   | U04365   | <i>Bt kumamotoensis</i>       | Narva 等, 1993           |
| <i>cry8Bb1</i>  | C     |              | 3621    | 1-3621    | AX543924 |                               | Abad 等, 2002            |
| <i>cry8Bc1</i>  | C     |              | 3633    | 1-3633    | AX543926 |                               | Abad 等, 2002            |
| <i>cry8Ca1</i>  | C     | 130000       | 3483    | 1-3483    | U04366   | <i>Bt japonensis</i> Buibui   | Ogiwara 等, 1995         |
| <i>cry8Da1</i>  | C     |              | 1144 aa | 1-1144    | AB089299 | <i>Bt galleriae</i>           | Yamamoto 等, 2002        |
| <i>cry8Ea1</i>  |       |              |         |           | AY329081 | <i>Bt</i> 185                 | Fuping 等, 2003          |
| <i>cry8Fa1</i>  |       |              |         |           | AY551093 | <i>Bt</i> 185                 | Fuping 等, 2004          |
| <i>cry9Aa1</i>  | L     | 128500       | 12579   | 5807-9277 | X58120   | <i>Bt galleriae</i>           | Smulevitch 等, 1991      |
| <i>cry9Ba1</i>  |       | 127000       | 4000    | <56-3490  | X75019   | <i>Bt galleriae</i>           | Shevelev 等, 1993        |
| <i>cry9Ca1</i>  | L     | 129800       | 5772    | 2096-5569 | Z37527   | <i>Bt tolworthi</i>           | Lambert 等, 1996         |
| <i>cry9Da1</i>  |       |              | 3759    | 47-3556   | D85560   | <i>Bt japonensis</i> N141     | Asano 等, 1997           |
| <i>cry9Ea1</i>  |       |              | 3867    | 211-3663  | AB011496 | <i>Bt atzawai</i> SSK-10      | Midoh 等, 1998           |
| <i>cry9Eb1</i>  |       |              | 3459    | 1-3459    | AX189653 |                               | Arnaut 等, 2001          |
| <i>cry9Ec1</i>  | L     |              | 3465    | 1-3465    | AF093107 | <i>Bt galleriae</i>           | Wasano 等, 2003          |
| <i>cry10Aa1</i> | L/D   | 75000        | 3753    | 941-2968  | M12662   | <i>Bt israelensis</i>         | Thorne 等, 1986          |
| <i>cry11Aa1</i> | D     | 72000        | 2100    | 41-1972   | M31737   | <i>Bt israelensis</i>         | Donovan 等, 1988         |
| <i>cry11Ba1</i> | D     | 81293        | 2434    | 64-2238   | X86902   | <i>Bt jegathesan</i> 367      | Delecluse 等, 1995       |
| <i>cry11Bb1</i> | D     | 88200        | 2349    | 97-2349   | AF017416 | <i>Bt medellin</i>            | Orduz 等, 1998           |
| <i>cry12Aa1</i> | N     | 139500       | 3771    | 1->3771   | L07027   | <i>Bt</i> PS33F2              | Narva 等, 1991           |
| <i>cry13Aa1</i> | N     | 89000        | 2412    | 1-2412    | L07023   | <i>Bt</i> PS63B               | Narva 等, 1992           |
| <i>cry14Aa1</i> | C     | 132800       | 3561    | 1-3561    | U13955   | <i>Bt sotto</i> PS80J11       | Narva 等, 1994           |
| <i>cry15Aa1</i> | L/D/C | 34000/40000  | 2259    | 45-971    | M76442   | <i>Bt thompsoni</i>           | Brown 等, 1992           |

续上表

| 基因类型            | 杀虫谱 | 编码蛋白分子量 (Da) | 氨基酸序列数 | 编码区域      | 基因编号     | 来源株系                           | 作者/年份                   |
|-----------------|-----|--------------|--------|-----------|----------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>cry16Aa1</i> | D   | 71128        | 1999   | 158-1999  | X94146   | <i>Cb malaysia</i> CH18        | Barloy 等, 1996          |
| <i>cry17Aa1</i> | D   | 71727        | 1868   | 12-1868   | X99478   | <i>Cb malaysia</i> CH18        | Barloy 等, 1998          |
| <i>cry18Aa1</i> | C   | 80000        | 2960   | 139-666   | X99049   | <i>Paenibacillus popilliae</i> | Zhang 等, 1997           |
| <i>cry18Ba1</i> |     |              | 3611   | 1477-3504 | AF169250 | <i>Paenibacillus popilliae</i> | Patel 等, 1999           |
| <i>cry18Ca1</i> |     |              | 2433   | 229-2316  | AF169251 | <i>Paenibacillus popilliae</i> | Patel 等, 1999           |
| <i>cry19Aa1</i> | D   | 74700        | 4391   | 719-2665  | Y07603   | <i>Bt jegathesan</i> 367       | Rosso 等, 1996           |
| <i>cry19Ba1</i> | D   | 78467        | 3668   | 626-2674  | D88381   | <i>Bt higo</i>                 | Hwang 等, 1998           |
| <i>cry20Aa1</i> | D   | 86000        | 2666   | 60-2321   | U82518   | <i>Bt fukuokaensis</i>         | Lee 等, 1997             |
| <i>cry21Aa1</i> | N   |              | 3504   | 1-3504    | I32932   |                                | Payne 等, 1996           |
| <i>cry21Ba1</i> |     |              | 4380   | 397-4257  | AB088406 | <i>Bt roskildensis</i>         | Sato 等, 2002            |
| <i>cry22Aa1</i> | H   |              | 2172   | 1-2172    | I34547   |                                | Payne 等, 1997           |
| <i>cry22Ab1</i> |     |              | 2344   | 92-2257   | AAK50456 | <i>Bt EG4140</i>               | Baum 等, 2000            |
| <i>cry22Ba1</i> |     |              | 1965   | 28-1926   | AX472770 | <i>Bt</i>                      | Isaac 等, 2002           |
| <i>cry23Aa1</i> |     |              | 804    | 1-804     | AAF76375 | <i>Bt</i>                      | Donovan 等, 2000         |
| <i>cry24Aa1</i> |     |              | 2024   | 1-2024    | U88188   | <i>Bt jegathesan</i>           | Kawalek 等, 1998         |
| <i>cry25Aa1</i> |     |              | 2028   | 1-2028    | U88189   | <i>Bt jegathesan</i>           | Kawalek 等, 1998         |
| <i>cry26Aa1</i> |     |              | 6930   | 897-4388  | AF122897 | <i>Bt finitimus</i> B-1166     | Wojciechowska 等, 1999   |
| <i>cry27Aa1</i> | D   | 94000        | 3190   | 523-3003  | AB023293 | <i>Bt higo</i>                 | Saitoh, 1999            |
| <i>cry28Aa1</i> |     |              | 4896   | 1129-4458 | AF132928 | <i>Bt finitimus</i> B-1161     | Wojciechowska 等, 1999   |
| <i>cry29Aa1</i> | D   |              | 6009   | 642-2594  | AJ251977 | <i>Bt medellin</i>             | Delecluse 等, 2000       |
| <i>cry30Aa1</i> | D   |              | 3644   | 1467-3533 | AJ251978 | <i>Bt medellin</i>             | Delecluse 等, 2000       |
| <i>cry30Ba1</i> | D   |              | 3752   | 1-2052    | BAD00052 | <i>Bt entomocidus</i>          | Ikeya 等, 2003           |
| <i>cry31Aa1</i> |     | 81045        | 3417   | 534-2705  | AB031065 | <i>Bt</i> 84-HS-1-11           | Mizuki 等, 2000          |
| <i>cry32Aa1</i> | L   | 139200       | 4799   | 112-3822  | AY008143 | <i>Bt yunnanensis</i>          | Balasubramanian 等, 2002 |
| <i>cry32Ba1</i> |     |              | 3813   | 1-3813    | BAB78601 | <i>Bt</i>                      | Takebe 等, 2001          |
| <i>cry32Ca1</i> |     |              | 3765   | 1-3765    | BAB78602 | <i>Bt</i>                      | Takebe 等, 2001          |
| <i>cry32Da1</i> |     |              | 3843   | 1-3843    | BAB78603 | <i>Bt</i>                      | Takebe 等, 2001          |
| <i>cry33Aa1</i> |     |              | 1980   | 96-896    | AAL26871 | <i>Bt dakota</i>               | Kim 等, 2003             |
| <i>cry34Aa1</i> | C   | 13600        | 1918   | 26-385    | AAG50341 | <i>Bt</i> PS80JJ1              | Ellis 等, 2002           |
| <i>cry34Ab1</i> | C   | 13600        | 2132   | 305-676   | AAG41671 | <i>Bt</i> PS149B1              | Moellenbeck 等, 2001     |
| <i>cry34Ac1</i> | C   | 13600        | 2230   | 480-851   | AAG50118 | <i>Bt</i> PS167H2              | Ellis 等, 2002           |
| <i>cry34Ba1</i> | C   |              | 3607   | 1773-2171 | AAK64565 | <i>Bt EG4851</i>               | Rupar 等, 2001           |
| <i>cry34Bb1</i> |     |              |        |           | AY536900 |                                | Schnepf 等, 2004         |
| <i>cry34Bc1</i> |     |              |        |           | AY536898 |                                | Schnepf 等, 2004         |
| <i>cry35Aa1</i> | C   | 43800        | 1918   | 506-1663  | AAG50342 | <i>Bt</i> PS80JJ1              | Ellis 等, 2002           |
| <i>cry35Ab1</i> | C   | 43800        | 2132   | 784-1935  | AAG41672 | <i>Bt</i> PS149B1              | Moellenbeck 等, 2001     |
| <i>cry35Ac1</i> | C   | 43800        | 2230   | 958-2109  | AAG50117 | <i>Bt</i> PS167H2              | Ellis 等, 2002           |
| <i>cry35Ba1</i> | C   |              | 3607   | 2264-3427 | AAK64566 | <i>Bt EG4851</i>               | Rupar 等, 2001           |
| <i>cry35Bb1</i> |     |              |        |           | AY536894 |                                | Schnepf 等, 2004         |
| <i>cry35Bc1</i> |     |              |        |           | AY536893 |                                | Schnepf 等, 2004         |
| <i>cry36Aa1</i> | C   |              | 1952   | 70-1632   | AAK64558 | <i>Bt</i>                      | Rupar 等, 2001           |

续上表

| 基因类型            | 杀虫谱    | 编码蛋白分子量 (Da) | 氨基酸序列数 | 编码区域      | 基因编号     | 来源株系                           | 作者/年份               |
|-----------------|--------|--------------|--------|-----------|----------|--------------------------------|---------------------|
| <i>cry37Aa1</i> |        |              | 381    | 1-381     | AAF76376 | <i>Bt</i>                      | Donovan 等, 2000     |
| <i>cry38Aa1</i> | C      |              | 1022   | 83-1015   | AAK64559 | <i>Bt</i>                      | Rupar 等, 2000       |
| <i>cry39Aa1</i> | D      |              | 3725   | <1-1981   | BAB72016 | <i>Bt aizawai</i>              | Ito 等, 2001         |
| <i>cry40Aa1</i> | D      |              | 3746   | <1-2002   | BAB72018 | <i>Bt aizawai</i>              | Ito 等, 2001         |
| <i>cry40Ba1</i> | D      |              | 4100   | 279-2279  | BAC77648 | Bun1-14                        | Ito 等, 2003         |
| <i>cry41Aa1</i> |        |              |        |           | AB116649 |                                | Yamashita 等, 2003   |
| <i>cry41Ab1</i> |        |              |        |           | AB116651 |                                | Yamashita 等, 2003   |
| <i>cry42Aa1</i> |        |              |        |           | AB116652 |                                | Yamashita 等, 2003   |
| <i>cry43Aa1</i> |        |              |        |           | AB115422 | <i>P. lentimorbus semadara</i> | Yokoyama 等, 2003    |
| <i>cry43Ba1</i> |        |              |        |           | AB115422 | <i>P. lentimorbus semadara</i> | Yokoyama 等, 2003    |
| <i>cry44Aa</i>  | D      |              | 3931   | 1-2061    | BAD08532 | <i>Bt entomocidus INA288</i>   | Ikeya 等, 2004       |
| <i>cyl1Aa1</i>  | D      | 27340        | 1052   | 140-889   | X03182   | <i>Bt israelensis</i>          | Waalwijk 等, 1985    |
| <i>cyl1Ab1</i>  | D      | 21370        | 796    | 28-780    | X98793   | <i>Bt medellin</i>             | Thiery 等, 1997      |
| <i>cyl1Ba1</i>  |        |              | 798    | 1-798     | U37196   | <i>Bt neoleoensis</i>          | Payne 等, 1995       |
| <i>cyl1Ca1</i>  |        |              | 127923 |           | AL731825 | <i>Bt israelensis</i>          | Berry 等, 2002       |
| <i>cyl2Aa1</i>  | L/D/CY | 29236        | 1244   | 270-1049  | Z14147   | <i>Bt kyushuensis</i>          | Koni 等, 1993        |
| <i>cyl2Ba1</i>  | CY     | 29000        | 1093   | 287-1078  | U52043   | <i>Bt israelensis</i> 4Q2      | Guerchicoff 等, 1997 |
| <i>cyl2Bb1</i>  | D/CY   | 30100        | 1400   | 416-1207  | U82519   | <i>Bt jegathesan</i>           | Cheong 等, 1997      |
| <i>cyl2Bc1</i>  | D      | 29700        | 6632   | 1456-2238 | CAC80987 | <i>Bt medellin</i>             | Delecluse 等, 1999   |
| <i>cyl2Ca1</i>  | C/CP   |              | 928    | 29-724    | AAK50455 | <i>Bt</i>                      | Baum 等, 2001        |

注: \*L: 鳞翅目; D: 双翅目; C: 鞘翅目; H: 膜翅目; N: 线虫; CP: 蚤; CY: 细胞毒素

表 3.2 转 Bt 内毒素蛋白基因抗虫植物部分种类\*

| 基因                     | 转基因植物种类                                                   | 靶标害虫 |
|------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| <i>cry1Aa</i>          | 烟草、水稻、花椰菜、棉花、大果酸果蔓、杨树、莞菁、甘蓝                               | 鳞翅目  |
| <i>cry1Ab</i>          | 棉花、玉米、马铃薯、水稻、甘蔗、烟草、番茄、苹果、三叶草、白云杉                          | 鳞翅目  |
| <i>cry1Ac</i>          | 棉花、水稻、大豆、花生、番茄、马铃薯、烟草、茄、花椰菜、结球甘蓝、芥菜、苹果、柿、葡萄、油菜、胡桃、杨树、欧洲黑杨 | 鳞翅目  |
| <i>cry2A</i>           | 水稻                                                        | 鳞翅目  |
| <i>cry1B</i>           | 白三叶草、水稻                                                   |      |
| <i>cry1Ca</i>          | 苜蓿、烟草、拟南芥菜                                                | 鳞翅目  |
| <i>cry1H</i>           | 玉米                                                        | 鳞翅目  |
| <i>cry2Aa</i>          | 棉花                                                        | 鳞翅目  |
| <i>cry3A</i>           | 马铃薯、茄、烟草                                                  | 鞘翅目  |
| <i>cry6A</i>           | 苜蓿                                                        | 鞘翅目  |
| <i>cry9C</i>           | 玉米                                                        | 鳞翅目  |
| 其它(非特定的 <i>cry</i> 基因) | 唐棣、山楂、甘蔗、梨                                                |      |

注：\*引自叶恭银等（2001）

## 第二部分 转Bt基因抗虫水稻花粉对家蚕 的生态安全性评价

## 第四章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的毒理学效应

20 世纪 90 年代以来,随着转苏云金杆菌内毒素蛋白基因棉花、玉米和马铃薯等的商业化应用,转基因抗虫植物的培育与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)。就转基因抗虫水稻而言,国内外已有不少研究机构开展了这方面的工作,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),而且有些已进入了田间中试(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,其商业化前景十分广阔。但是,作为转基因抗虫作物,Bt 水稻同样也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——家蚕的潜在影响。

我国是世界上最大的蚕茧、蚕丝生产国和茧丝绸出口国(顾国达等, 2002)。除西藏、青海外,其他各省(市、自治区)均有蚕桑生产,其中以浙江、江苏和四川等为主产省,桑蚕茧产量占全国总产量 50%以上。上述桑蚕主产区均为我国重要水稻产区,而且这些地区的主要传统作物种植模式是桑稻间种(图 4.1),Bt 水稻花粉可随风飘落于稻田附近桑园的桑叶上。由于家蚕对绝大多数 Bt 内毒素蛋白十分敏感,在蚕桑区内一般禁止使用 Bt 类生物杀虫剂,而且目前 Bt 水稻多采用系统表达启动子(如玉米泛素 Ubiquitin 启动子和水稻肌动蛋白 *actin 1* 启动子等),在花粉中亦能表达 Bt 毒素蛋白,因此当家蚕取食飘落有 Bt 水稻花粉的桑叶后,就可能接触到 Bt 毒蛋白,从而产生毒害。本章就 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫的急性毒性进行了测定,结果如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试水稻品系

TT9-3 为第 R<sub>7</sub> 代转 Bt 基因籼稻纯合品系,采用微粒轰击法获得,含有 *cryIAb/cryIAc* 融合基因和 *actin 1* 启动子基因,室内和田间条件下对水稻螟虫表现高抗(Tu 等, 1998; Ye 等, 2001b)。亲本为籼稻品种 IR72。

克螟稻 1 号(KMD1)和克螟稻 2 号(KMD2)为第 R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub> 代转 Bt 基因粳稻纯合品系,采用农杆菌介导法获得,含有 *cryIAb* 基因和 Ubiquitin 启动子,室内和田间条件下对水稻螟虫均表现高抗(舒庆尧等, 1998; Shu 等, 2000; Ye 等, 2001a)。亲本为粳稻品种秀水 11。

华池 2000B1(B1)和华池 2000B6(B6)为 KMD1 分别与早籼稻品种浙辐 504 和嘉早 935 杂交后,与早籼亲本连续 3 次回交,再自交选育的第 R<sub>8</sub> 代(BC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)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(数据未发表)。

## 1.2 供试家蚕品种

家蚕春蚕品种：青松×皓月，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。

## 1.3 供试桑树品种

家蚕室内饲养所用桑叶均采自浙江大学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

水稻扬花期期间，采用盆拍法收集田间不同水稻品系花粉。用手轻拍水稻稻穗，在稻穗另一侧基部以搪瓷盆收集飘落的花粉。待收集完毕，盖上盆盖并置于装有冰块的塑料盒中，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 $\mu$ m）过筛后，置于 -70℃ 冰箱中保存备用。

## 1.5 生物测定

准确称取 0.5g 水稻花粉于 10ml 灭菌蒸馏水（无菌水）中制成花粉悬浮原液（0 $\times$ ），振荡摇匀后用无菌水按 1 $\times$ 、5 $\times$ 和 25 $\times$ 连续稀释，依花粉浓度由低到高分别记为 D1~D4。在系列浓度花粉悬浮液中加入 0.2%吐温作为乳化剂，以无菌水为对照。取大小一致的新鲜桑叶分别浸入系列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，取出后自然晾干，取样用 1% I<sub>2</sub>-KI 液染色、镜检计数单位面积桑叶上的花粉颗粒（图 4.2）后，分别置于灭菌果酱瓶（500ml）中饲喂家蚕蚁蚕、3 龄和 5 龄幼虫，48h 后，将存活试虫移至更换过的灭菌果酱瓶中，改喂未经花粉悬液处理的鲜叶继续饲养。每天考查记载死亡情况直至 7d（1 周）。各处理 30 头，重复 3 次。饲养温度为 25 $\pm$ 0.5℃，相对湿度 75 $\pm$ 1.0%，光周期 L:D 为 16:8h。

纯 Bt 毒素蛋白 Cry1Ab 对家蚕蚁蚕的毒力测定步骤同上。

## 1.6 Bt 水稻花粉中毒素蛋白含量测定

采用美国 EnviroLogix 公司生产的 Cry1Ab/Cry1Ac 酶标板试剂盒以 ELISA 法测定 Bt 水稻花粉中毒素蛋白含量。严格按试剂盒说明书操作，设 3 次重复，以非转基因亲本水稻花粉为阴性对照。采用考马斯亮蓝 G<sub>250</sub> 比色法（Bradford, 1976）测定花粉中可溶性蛋白含量。

## 1.7 数据分析

本章数据包括平均数、标准误（=标准差/ $\sqrt{n}$ ， $n$  为重复数）的计算和  $t$  测验等均采用 SAS 统计软件（SAS, 1996）进行分析，生物测定结果由软件 POLO-PC（LeOra, 1997）分析获得。



## 2 结果与分析

### 2.1 不同 Bt 水稻品系花粉中毒素蛋白含量的比较

不同 Bt 水稻品系花粉中的毒素蛋白含量存在极显著差异 ( $F=237.925$ ;  $df=4,10$ ;  $p<0.001$ ) (图 4.3), 其中以 KMD1 和 B6 品系的含量为最高, Bt 毒素蛋白在花粉中的表达量占总可溶性蛋白含量的 0.05% 强。籼稻 TT9-3 品系花粉中毒蛋白含量最低, 约为 KMD1 和 B6 的 1/5。B1 品系花粉中毒蛋白含量显著低于 KMD1 和 B6, 相差约 20% 左右, 但显著高于 KMD2 和 TT9-3。不同 Bt 水稻品系花粉中的可溶性蛋白含量并无显著差异 ( $F=0.759$ ;  $df=4,5$ ;  $p=0.5936$ )。

根据 Bt 水稻花粉中的毒素蛋白含量可推算出系列浓度花粉悬浮液中的毒蛋白含量 (表 4.1)。经不同浓度水稻花粉悬浮液处理后, 桑叶表面粘着的花粉密度梯度与浓度系列一致, 且 Bt 水稻与其非转基因亲本花粉在不同浓度处理桑叶上的密度均无显著差异 (D1:  $t=1.795$ ,  $df=58$ ,  $p=0.0778$ ; D2:  $t=0.506$ ,  $df=58$ ,  $p=0.6147$ ; D3:  $t=0.404$ ,  $df=58$ ,  $p=0.6879$ ; D4:  $t=0.394$ ,  $df=58$ ,  $p=0.6953$ )。

### 2.2 家蚕幼虫对 Bt 水稻花粉敏感性的测定

家蚕对蚕对不同 Bt 水稻品系花粉的敏感性明显不同 (表 4.2), 籼稻 TT9-3 花粉中的毒素蛋白对蚁蚕的  $LC_{50}$  值为早籼稻 B1 品系的 313.2 倍。家蚕不同龄期幼虫对 Bt 花粉的敏感性亦显著不同, 其中以 1 龄幼虫最为敏感, 3 龄幼虫敏感性相对较低。B1 品系花粉对 3 龄幼虫的  $LC_{50}$  值约为蚁蚕的 3.83 倍。将 B1 花粉对家蚕各龄幼虫的  $LC_{50}$  值分别折算为水稻花粉密度: 1 龄幼虫 21405.17 粒/cm<sup>2</sup>、3 龄幼虫 117226.19 粒/cm<sup>2</sup> 和 5 龄幼虫 28535.13 粒/cm<sup>2</sup>。与 Bt 纯毒素蛋白 Cry1Ab 相比, Bt 水稻花粉对蚁蚕的毒性相对较小, 差异高达 1000 倍以上。

## 3 讨论

Bt 水稻花粉对不同龄期家蚕幼虫的  $LC_{50}$  值各不相同。鳞翅目低龄幼虫抗逆性通常较弱, 故蚁蚕对 Bt 水稻花粉表现出相对较高的敏感性。家蚕 5 龄幼虫可能由于取食量相对较大, 摄入花粉中毒素蛋白的积累量较多而导致其致死中浓度 ( $LC_{50}$ ) 偏低。就总体趋势而言, 家蚕低龄幼虫易受 Bt 水稻花粉的毒害作用。

不同 Bt 水稻品系花粉对家蚕的毒性存在明显差异, 这可能与导入的外源 Bt 毒蛋白基因种类以及在花粉中的表达丰度有关。家蚕一般对 CryI 家族 (具鳞翅目特异杀虫活性) 的 Bt 内毒素蛋白相当敏感, 如本文 Cry1Ab 蛋白对蚁蚕的高毒性。但现有研究表明, 同一家族内不同类的 Bt 毒素蛋白以及来自不同 Bt 菌株的同一种内毒素蛋白的杀虫特异性亦有明显不同, 如 Cry1Aa 蛋白对家蚕的毒性比 Cry1Ac 高 400 倍左右 (Ge 等, 1989), 来自 AF101 菌株的 Cry1Ab 蛋白对家蚕的杀虫活性比来自 HD-1 菌株的低约 6-11 倍 (Kim 等, 1998a)。因此, Bt 水稻 TT9-3 品系花粉对蚁蚕的毒性明显较 B1 品系低, 可能是由其外源 *cry1Ab/cry1Ac*

融合基因在花粉中表达的毒素蛋白本身对家蚕的活性不强而导致产生与 B1 品系的差异。

TT9-3 品系花粉对蚁蚕的低毒性还可能与外源 Bt 基因的低表达量有关。一方面, 虽然 TT9-3 和 B1 均采用可使外源基因在植株体内系统表达的组成型 (constitutive) 启动子 (王关林等, 1998), 但这 2 种启动子引导基因表达的水平并不相同。在水稻悬浮细胞中, Ubiquitin 启动子的引导表达能力明显高于 *actin I* 启动子 (吴刚, 2000)。另一方面, 外源 Bt 基因在水稻 TT9-3 和 B1 品系染色体上的插入位点不同, 其表达水平亦不相同。如 *cryIA* 基因在不同插入位点的棉花株系中的表达差异十分明显 (Sachs 等, 1998)。

我们测得的在不同水稻品系花粉中的 Bt 毒蛋白表达量与其在相应品系的叶片、茎秆和根等组织/器官中的表达水平相一致 (Shu 等, 2000; Wu 等, 2002)。与已报道的 Bt 玉米花粉中毒蛋白表达水平相比 (详见第二章表 2.1), Bt 水稻如 KMD 系列和华池 2000B 系列的花粉中毒蛋白表达水平除了与转 *cry3Bb1* 基因 Mon863 品系 (EPA, 2001; Duan 等, 2003) 相当或较低外, 比其它 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。从 Bt 水稻对家蚕生态安全性的角度考虑, 应避免使用在花粉中特异表达的组织特异性启动子 (tissue-specific promoter), 而应使用诱导型启动子 (inducible promoter) 或在花粉中不表达的特异性启动子则更为安全。



图 4.1 中国长江流域典型的桑稻间种模式  
(2001 年 9 月摄于杭州余杭, 浙大农学系樊龙江教授提供)

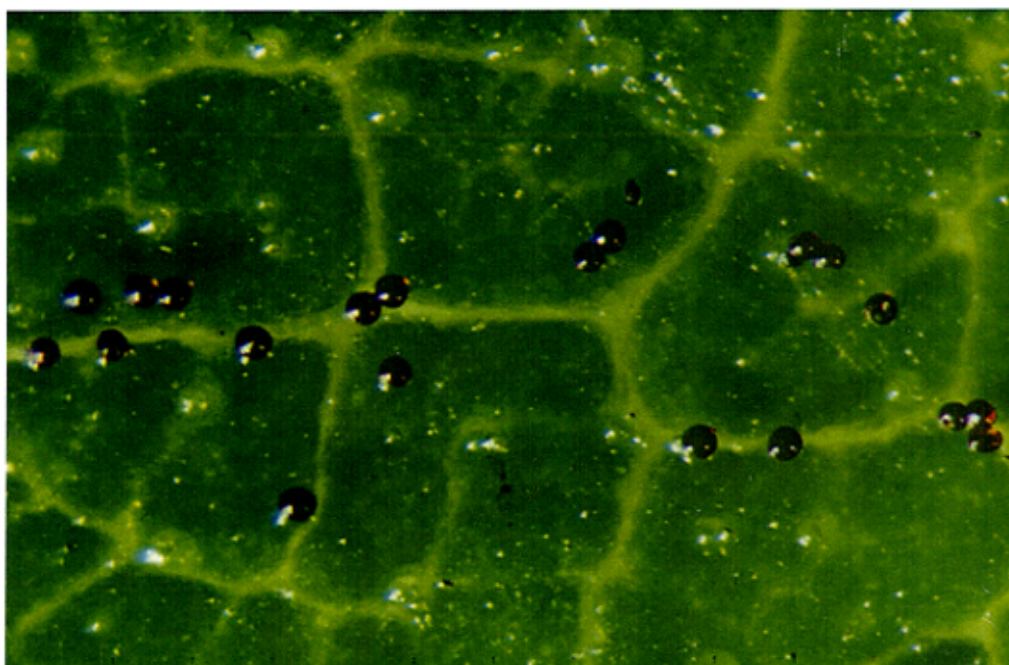


图 4.2 桑叶上经染色处理后的水稻花粉颗粒 (80×10 倍)

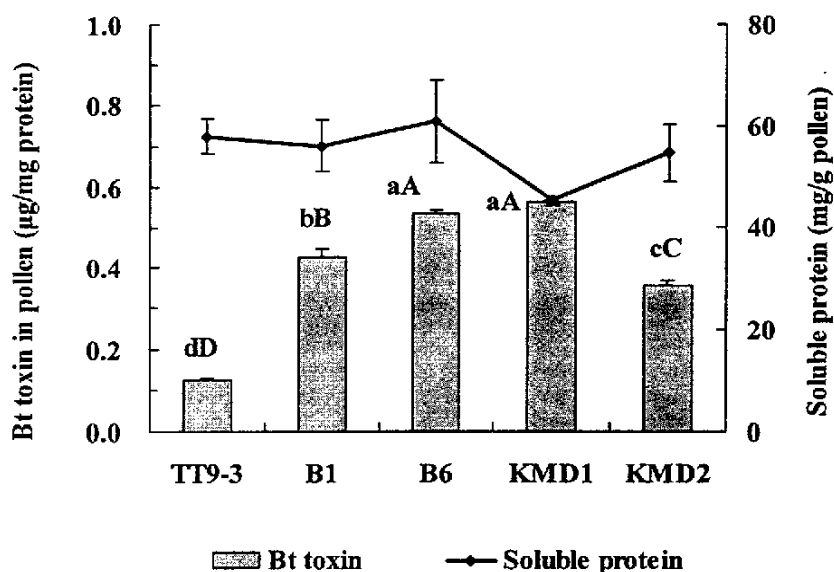


图 4.3 不同 Bt 水稻品系花粉中的毒素蛋白与可溶性蛋白含量比较

表 4.1 B1 品系不同浓度花粉悬浮液中的毒蛋白含量及相应粘着在桑叶上的花粉密度

| 编号 | 花粉浓度<br>(g/ml) | 花粉中毒素蛋白含量<br>( $\mu\text{g CryIAb/ml}$ )<br>Mean $\pm$ S.D. | 粘着桑叶上的水稻花粉密度<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) Mean $\pm$ S.E. |                      |
|----|----------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|
|    |                |                                                             | Bt                                                        | Non-Bt               |
| D1 | 0.002          | 0.0477 $\pm$ 0.0039                                         | 1311.4 $\pm$ 161.8                                        | 841.9 $\pm$ 89.6     |
| D2 | 0.010          | 0.2384 $\pm$ 0.0196                                         | 3235.1 $\pm$ 362.7                                        | 2918.7 $\pm$ 252.7   |
| D3 | 0.025          | 0.5960 $\pm$ 0.0489                                         | 9787.0 $\pm$ 1003.0                                       | 10547.3 $\pm$ 875.9  |
| D4 | 0.050          | 1.1920 $\pm$ 0.0979                                         | 24824.6 $\pm$ 1895.1                                      | 26141.1 $\pm$ 1415.4 |

表 4.2 家蚕幼虫对 Bt 水稻花粉与纯 Bt 毒素蛋白的敏感性

| 龄期      | LD-P 线            | $\chi^2$ | P     | LC <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g CryIAb/ml/larvae}$ ) | 95%置信区        | 体重(g)<br>Mean $\pm$ S.D. | Ratio    |
|---------|-------------------|----------|-------|--------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|----------|
| B1:     |                   |          |       |                                                        |               |                          |          |
| 1 龄     | y=0.6354x+4.9576  | 2.698    | 0.260 | 1.1660                                                 | 0.4522~2.238  | 0.349 $\pm$ 0.490*       | 1575.7   |
| 3 龄     | y=0.6327x+4.5888  | 3.017    | 0.221 | 4.4689                                                 | 1.1003~9.3718 | 0.028 $\pm$ 0.011        | 6039.1   |
| 5 龄     | y=0.1800x+4.9475  | 0.332    | 0.564 | 1.9575                                                 | —             | 1.097 $\pm$ 0.371        | 2645.3   |
| TT9-3:  |                   |          |       |                                                        |               |                          |          |
| 1 龄     | y=0.3985x+3.9177  | 1.181    | 0.277 | 519.970                                                | —             | 0.349 $\pm$ 0.490*       | 702662.2 |
| CryIAb: |                   |          |       |                                                        |               |                          |          |
| 1 龄     | y=0.22844x+5.7156 | 0.618    | 0.734 | 0.00074                                                | 0~0.00892     | 0.349 $\pm$ 0.490*       | 1.0      |

注: \*单位为 mg。

## 第五章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的生物学效应

自 Losey 等 (1999) 报道大斑蝶取食 Bt 玉米花粉导致死亡率明显增高后, 转基因抗虫作物的生态安全性, 尤其是对非靶标生物如珍稀昆虫或经济昆虫的安全性一直倍受全世界关注。不少学者就 Bt 玉米花粉在室内与田间条件下对大斑蝶和北美黑凤蝶的影响以及 Bt 玉米花粉的田间飘移沉降分布展开系统研究 (Hansen 等, 2000; Wraight 等, 2000; Helfmich 等, 2001a; Sears 等, 2001; Stanley-Horn 等, 2001; Zangerl 等, 2001), 通过综合分析最后认定当前商业化种植的 Bt 玉米品系的花粉在自然条件下对大斑蝶应无负面影响 (Shelton 等, 2001)。目前, 除 Bt 玉米 176 品系花粉在室内胁迫条件下可对大斑蝶和北美黑凤蝶产生明显不利影响 (Losey 等, 1999; Hansen 等, 2000; Wraight 等, 2000; Stanley-Horn 等, 2001) 外, 转基因抗虫作物如 Bt 玉米、Bt 棉花和 Bt 马铃薯等花粉对其它非靶标昆虫如具斑食蚜瓢虫、食螨小花蝽、普通草蛉、蜜蜂和家蚕等均不构成风险 (Pilcher 等, 1997; Riddick 等, 1998; Hilbeck 等, 2000; 李文东等, 2002; Duan 等, 2003)。

有关转基因抗虫水稻花粉对家蚕的生态安全性影响, 仅王忠华等 (2001) 报道家蚕幼虫室内连续饲喂人工抖落有 Bt 水稻花粉的桑叶至 3 龄后, 幼虫死亡率无显著差异, 而体重有极显著变化。我们研究结果表明, 家蚕不同龄期幼虫在室内 Bt 水稻花粉的胁迫作用下, 出现明显的急性中毒现象, 而且不同龄期幼虫对 Bt 花粉的敏感不尽相同 (详见第四章结果)。在此, 我们根据 Bt 花粉对家蚕不同龄期的毒力测定结果, 并考虑到水稻扬花期通常持续 2 周左右 (这大概是家蚕在常温下 1~3 龄幼虫发育所需时间), 分别选择可导致 1 龄幼虫 50% 左右死亡的 Bt 花粉浓度 D4 (即  $LC_{50}$ , 相当于 3 龄幼虫的  $LC_{35}$ ) 和 3 龄幼虫 10% 左右致死的花粉浓度 D1 (即  $LC_{10}$ , 相当于 1 龄幼虫的  $LC_{20}$ ) 对 1 龄幼虫始和 3 龄幼虫始进行持续饲喂处理, 期望在室内条件下从可能出现的最大风险角度, 评估 Bt 花粉对家蚕生物学指标的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试水稻品系为华池 2000B1 (B1) 及其非转基因亲本, 有关 Bt 水稻品系背景介绍与花粉田间采集方法详见第四章 1.1 和 1.4。桑叶采自浙江大学华家池校区实验桑园, 桑树品种为农桑 8 号。

配制 Bt 水稻及其非转基因亲本的花粉悬浮液原液 (D4) 及其 25×稀释液 (D1), 分别处理用打孔器 (Φ7.0cm) 制成一定面积的新鲜桑叶。花粉悬浮液配制及桑叶处理方法同第四章 1.5。

家蚕品种: 秋丰×白玉, 购于浙江省蚕种公司。

## 1.2 试验设计

根据家蚕幼虫饲喂水稻花粉的龄期及持续时间不同,设计以下3种试验方案:(1)1~3龄幼虫(低龄期)连续饲喂,将自然晾干的经过不同水稻品系不同浓度花粉悬浮液处理的桑叶持续饲喂蚁蚕至3龄结束,后改喂未经花粉处理的新鲜桑叶直至化蛹。(2)3~5龄幼虫(中高龄期)连续饲喂,挑取以新鲜桑叶饲喂的个体大小基本一致的家蚕新蜕皮3龄幼虫,喂以不同处理的桑叶直至化蛹。(3)1~5龄幼虫(全幼虫期)连续饲喂,用不同水稻花粉处理的桑叶持续饲喂蚁蚕直至化蛹。

所有试验均在人工气候室内进行,室内温度 $25\pm0.5^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 $75\pm1.0\%$ ,光照L:D为16:8h。各处理重复5次,每重复处理10头试虫。试验期间每天观察并记录死亡和脱皮情况,在各龄末称量眠重,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。

## 1.3 数据分析

幼虫存活率分析采用生存分析(LIFETEST)方法,各处理平均数比较采用单因素方差分析(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。所有数据均用SAS统计软件(SAS,1996)进行分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 幼虫期相关生物学指标

### 2.1.1 幼虫存活率

1~3龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉的幼虫存活率曲线存在极显著差异( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=322.5260$ ,  $df=4$ ,  $p<0.0001$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=332.7930$ ,  $df=4$ ,  $p<0.0001$ ) (图5.1)。Bt花粉D1和D4处理第37天的幼虫存活率各为30.0%和12.8%,均极显著低于非Bt花粉的91.5%和81.1%(D1:  $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=53.1179$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=52.4392$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ; D4:  $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=121.0371$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=120.7484$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ )。D4浓度的Bt花粉处理期间,家蚕低龄幼虫的存活率急剧下降,而D1浓度Bt花粉处理下的幼虫存活率平缓下降,在改喂未处理的新鲜桑叶后,幼虫存活率变化均不明显。不同浓度非Bt花粉处理的家蚕幼虫存活率与无花粉处理的差异未达显著水平( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=3.7183$ ,  $df=2$ ,  $p=0.1558$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=3.9152$ ,  $df=2$ ,  $p=0.1412$ )。

3~5龄幼虫连续喂食不同水稻花粉,对其存活率曲线影响显著( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=29.3201$ ,  $df=4$ ,  $p<0.0001$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=34.6737$ ,  $df=4$ ,  $p<0.0001$ )。D1浓度Bt和非Bt花粉连续处理下的幼虫存活率曲线之间无显著差异( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=0.5926$ ,  $df=1$ ,  $p=0.4414$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=0.7496$ ,  $df=1$ ,  $p=0.3866$ ),而D4浓度下,两者似存在一定差异( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=3.7085$ ,  $df=1$ ,  $p=0.0541$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=4.2487$ ,  $df=1$ ,  $p=0.0393$ )。Bt或非Bt花粉不同浓度对3~5龄幼虫生存的影响显著不同(Bt花粉D1和D4:  $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=13.7940$ ,  $df=1$ ,  $p=0.0002$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=17.0240$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ; 非Bt花粉D1和D4:

$\chi^2_{\text{Log-Rank}}=6.3482, df=1, p=0.0118$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=7.7735, df=1, p=0.0053$ ), 这表明水稻花粉对家蚕中高齡幼虫存活率的影响主要与花粉的处理浓度有关, 即 D4 浓度花粉连续处理对中高齡幼虫生存的影响较为显著。

不同水稻花粉全幼虫期 (1~5 齡) 连续喂食, 对家蚕幼虫存活率存在极显著影响 ( $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=46.4080, df=4, p<0.0001$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=65.6834, df=4, p<0.0001$ )。持续取食 Bt 花粉对幼虫存活率的影响比持续取食非 Bt 花粉的影响显著较大 (D1:  $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=5.4996, df=1, p=0.0190$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=7.3993, df=1, p=0.0065$ ; D4:  $\chi^2_{\text{Log-Rank}}=4.8787, df=1, p=0.0272$ ;  $\chi^2_{\text{Wilcoxon}}=18.8684, df=1, p<0.0001$ )。从总的趋势来看, Bt 花粉对家蚕幼虫低齡阶段存活率的影响较大, 而 D4 浓度花粉 (不论 Bt 或非 Bt 花粉) 对家蚕中高齡幼虫的生存影响较为明显, 这与 1~3 齡连续饲喂和 3~5 齡连续饲喂的结果一致。

### 2.1.2 幼虫历期与体重

取食 Bt 水稻花粉, 尤其是 D4 浓度花粉可显著延长家蚕 1 齡幼虫的发育历期 (图 5.2 和图 5.4), 取食非 Bt 花粉对 1 齡历期并无显著影响。继续饲喂水稻花粉可导致 2 齡幼虫的发育历期较对照均显著延长, 但 3 齡历期则出现不同程度缩短。3 齡以后停止喂食 Bt 花粉, 其 4 齡历期无显著变化, 5 齡历期则显著增长; 停止喂食非 Bt 花粉对 4 齡、5 齡历期无显著影响。自 3 齡开始喂食水稻花粉, 对该齡历期的影响并不显著, 而 4 齡历期显著较短, 5 齡历期却相对较长 (图 5.3)。持续喂食 Bt 花粉对 4 齡、5 齡历期影响不甚明显, 而持续喂食非 Bt 花粉的幼虫 5 齡历期显著较长。从整个幼虫期来看, 自低齡开始喂食 Bt 花粉, 不论期间是否停止饲喂, 均可显著延长幼虫历期; 1~3 齡喂食非 Bt 花粉对幼虫历期影响不明显, 而 1~5 齡持续喂食则可导致幼虫历期有不同程度增长; 3 齡开始饲喂水稻花粉对幼虫历期无显著影响。这表明取食 Bt 花粉对低齡幼虫的发育有显著影响, 而持续喂食非 Bt 花粉对高齡幼虫的发育影响较大。

不同水稻花粉不同持续时间喂食对家蚕各齡幼虫体重的影响程度各不相同 (图 5.5~5.7)。从总体变化趋势来看, 除 D4 浓度 Bt 花粉对低齡幼虫体重的影响较大, 幼虫体重显著较低之外, 其它处理对幼虫体重, 特别对高齡幼虫的体重均无显著影响。

### 2.2 蛹期相关生物学指标

Bt 水稻花粉以及 D4 浓度非 Bt 花粉的持续喂食均可导致家蚕幼虫的化蛹率显著降低 (图 5.8~5.10)。家蚕经过不同水稻花粉不同持续时间的处理, 其蛹期虽有一定变化, 但差异未达显著。1~3 齡饲喂水稻花粉的蛹重多无显著差异, 而 3~5 齡喂食 D4 浓度水稻花粉的蛹重却显著较低。这表明在高齡幼虫阶段, D4 浓度水稻花粉持续可显著影响家蚕蛹重。1~5 齡持续饲喂水稻花粉对蛹重的影响并不明显。

1~3 齡持续喂食 Bt 花粉可明显提高茧重和茧壳重, 喂食非 Bt 花粉对茧重和茧壳重无明显影响。3~5 齡喂食水稻花粉的茧重比对照明显较高, 喂食 Bt 花粉的茧壳重却明显较低, 但所有差异均未达显著。1~5 齡饲喂水稻花粉的茧重比对照有所降低, 其中 D4 浓度 Bt 花粉处理的茧重显著较低; 全幼虫期持续喂食 D1 浓度水稻花粉的茧壳重无显著差异, 但 D4 浓

度花粉处理后的蚕壳重比对照明显要低, 其中 D4 浓度 Bt 花粉的达显著水平。这表明家蚕幼虫期持续喂食 D4 浓度 Bt 水稻花粉, 对蚕茧的经济性状存在显著影响, 而这可能是 D4 浓度 Bt 花粉对低龄幼虫的作用加剧了对高龄幼虫的影响, 最终导致蚕茧质量的变化。

## 2.3 成虫期相关生物学指标

1~3 龄连续饲喂水稻花粉可在一定程度上提高成虫羽化率, 其中 Bt 水稻花粉的影响较非 Bt 花粉明显, D4 浓度水稻花粉的影响较 D1 浓度花粉明显, 但所有差异均未达显著 (图 5.11)。3~5 龄饲喂水稻花粉除 D4 浓度 Bt 花粉处理的成虫羽化率明显较低外, 其它处理差异均不明显 (图 5.12)。1~5 龄幼虫连续饲喂水稻花粉, 其成虫羽化率比对照明显较低, 其中 Bt 花粉处理的差异达显著水平, D4 浓度处理的成虫羽化率为 0 (图 5.13)。

不同水稻花粉不同持续时间喂食对蚕蛾寿命和雌蛾比率均无显著影响。1~3 龄连续喂食 D1 浓度 Bt 花粉的雌蛾怀卵量明显较低; 非 Bt 花粉连续处理 1~3 龄幼虫的雌虫怀卵量与对照无显著差异。不同水稻花粉连续饲喂 1~3 龄幼虫对雌蛾产卵量无显著影响。3~5 龄幼虫连续喂食不同水稻花粉的雌虫怀卵量和产卵量相对较高, 其中怀卵量的差异不显著。全幼虫期持续饲喂不同水稻花粉对雌蛾怀卵量及产卵量的影响与 1~3 龄处理的相似。

## 3 讨论

在室内持续胁迫饲喂下, Bt 水稻花粉对家蚕的存活、生长发育和蚕茧性状等指标均有极为显著的负面影响。Bt 水稻花粉, 特别是在 D4 浓度下, 可导致家蚕幼虫死亡率显著增高, 发育历期显著延长, 低龄幼虫体重、化蛹率和羽化率显著降低以及蚕茧质量下降等。此外, Bt 水稻花粉对家蚕幼虫低龄阶段的作用较大, 其影响一直可延续至成虫期。较高浓度 (D4) 的水稻花粉 (无论 Bt 或非 Bt) 对家蚕高龄幼虫的影响相对较大。本章的结果与王忠华等 (2001) 的报道不尽相同, 而且 Bt 水稻花粉对家蚕产生不利影响的程度更甚于 Bt 玉米 176 品系花粉对大斑蝶和北美黑凤蝶的影响 (Loosey 等, 1999; Hansen 等, 2000; Wraight 等, 2000; Zangerl 等, 2001)。这一方面可能与 Bt 水稻花粉中毒蛋白本身的表达水平较高有关, 另一方面可能与 Bt 花粉处理的剂量与时间相对较高、较长有关。

虽然室内的研究结果清楚地证实了 Bt 水稻花粉对家蚕具有较强烈的毒害作用, 即已产生危害, 但是不能由此轻易断言, 在自然条件 (非人为胁迫) 下 Bt 水稻花粉对家蚕也同样存在严重的生态风险。由于风险是危害与暴露的函数, 因此 Bt 水稻花粉对家蚕的风险还与家蚕暴露在这种危害作用下的可能性有关。如果在自然条件下, 家蚕暴露在 Bt 水稻花粉有效剂量下的概率很小, 那么即使是对家蚕高毒性的 Bt 水稻花粉, 其带来的风险也相对较小。何况从 Bt 水稻产生有毒花粉到家蚕摄入至有效剂量这一过程中, 可受到众多环境和人为等因素的影响。以 Bt 玉米花粉对大斑蝶的风险为例, 虽然 Bt 玉米 176 品系在室内条件下对大斑蝶存活与生长发育存在明显的不良影响, 但在自然环境条件下, 由于 176 品系的种植面积较少, 而且其它多数 Bt 玉米品系花粉中的毒蛋白含量较低, 大斑蝶自然种群发生与 Bt 花粉的时空重叠程度较小, 加上还有许多自然因素 (如降雨等) 的影响, 使得大斑蝶在田间接触、



摄入 Bt 花粉的剂量远不及室内研究时的试验剂量，最后 Bt 玉米花粉对大斑蝶自然种群的风险程度足可忽略（Hellmich 等, 2001a; Oberhauser 等, 2001; Pleasants 等, 2001; Sears 等, 2001; Stanley-Horn 等, 2001; Zangerl 等, 2001; Wolt 等, 2003）。

由于室内研究并不能完全重复自然环境中的所有因子，因而不能真实反映在自然条件下所发生的事件（Gatehouse 等, 2002）。室内研究表明是有风险的转基因生物在自然界中可能并不会出现风险。这是因为自然条件通常比较恶劣，在实验室内发现的风险也许在自然界中根本就不存在（Muir, 2002）。因此，要真正明确 Bt 水稻花粉对家蚕的风险，尚需在探明自然条件下影响 Bt 花粉对家蚕有效暴露的因素基础上进行综合性评价。

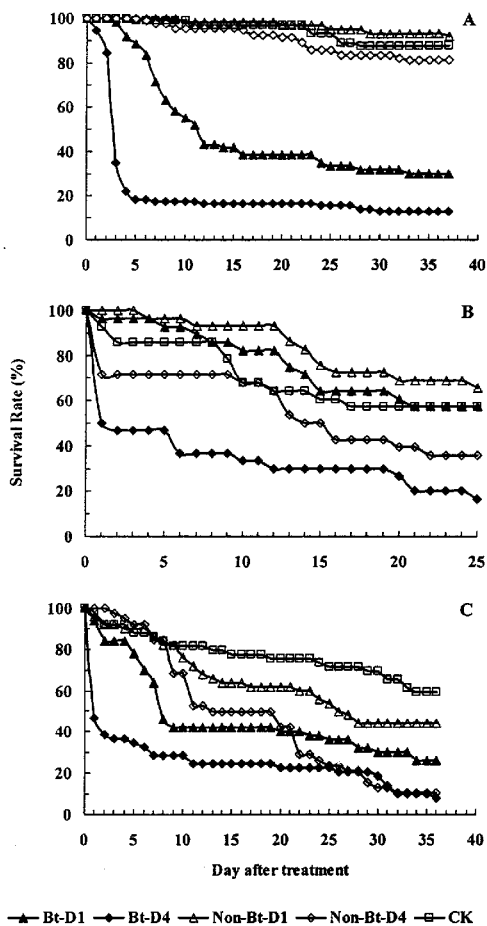


图 5.1 不同水稻花粉处理的家蚕幼虫生存曲线  
A. 1~3 龄幼虫连续饲喂；B. 3~5 龄幼虫连续饲喂；C. 1~5 龄幼虫连续饲喂

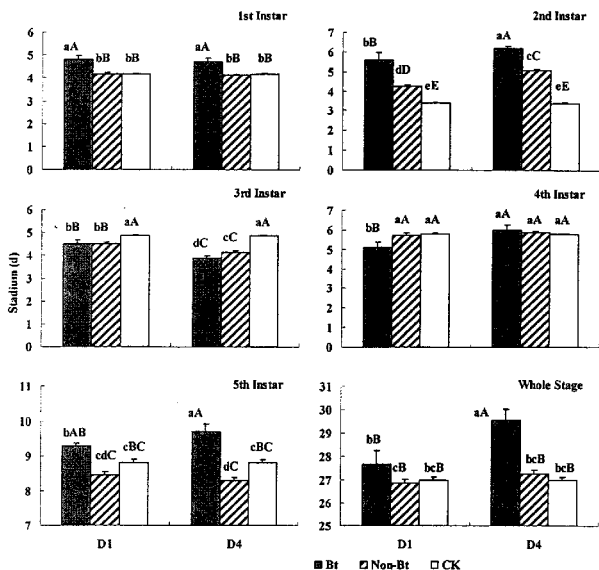


图 5.2 家蚕 1~3 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫历期变化

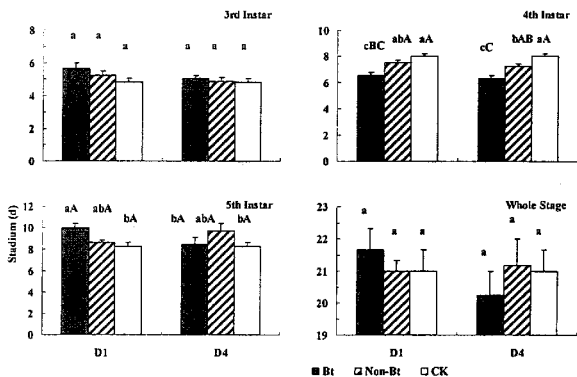


图 5.3 家蚕 3~5 龄幼虫期连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫历期变化

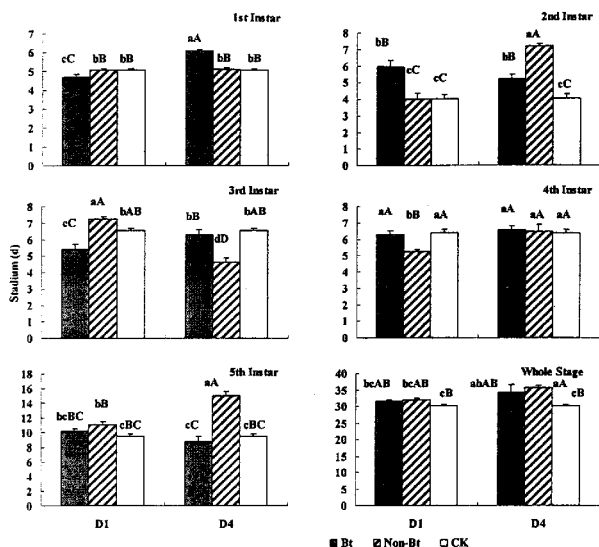


图 5.4 家蚕 1~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫历期变化

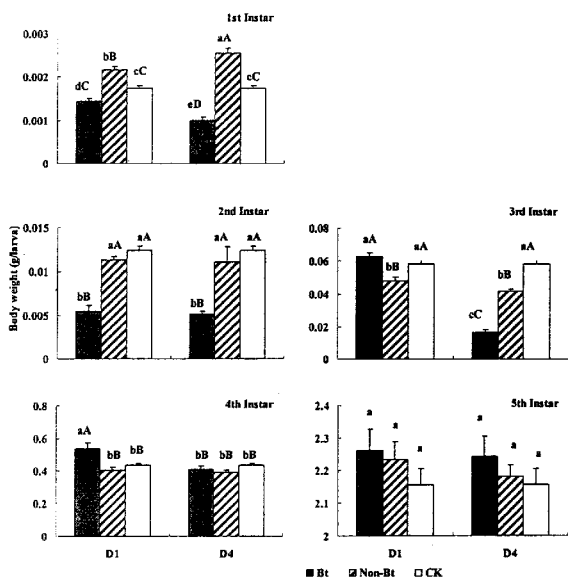


图 5.5 家蚕 1~3 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫体重变化

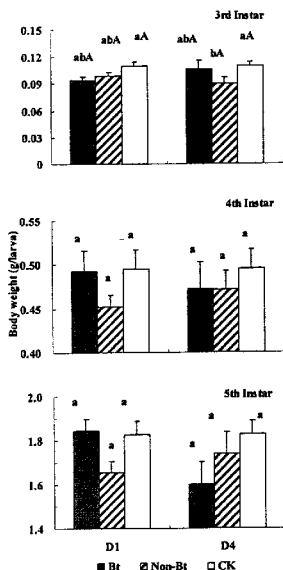


图 5.6 家蚕 3~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫体重变化

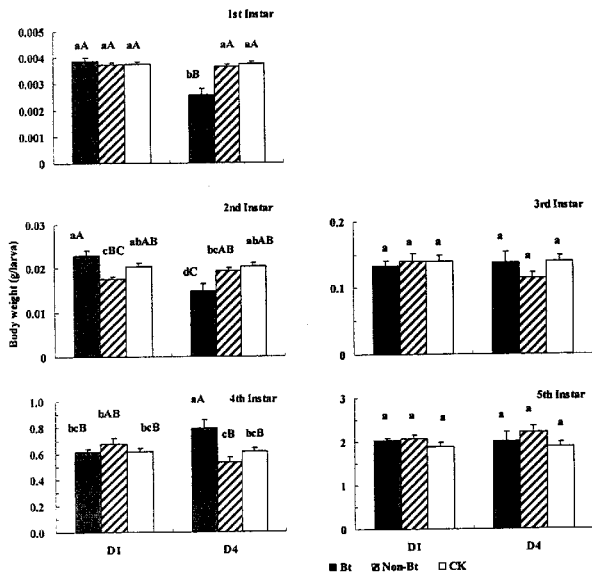


图 5.7 家蚕 1~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的幼虫体重变化

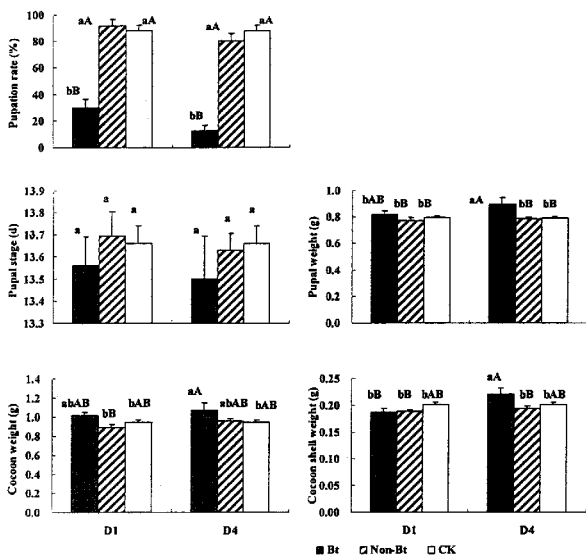


图 5.8 家蚕 1~3 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的蛹期相关指标变化

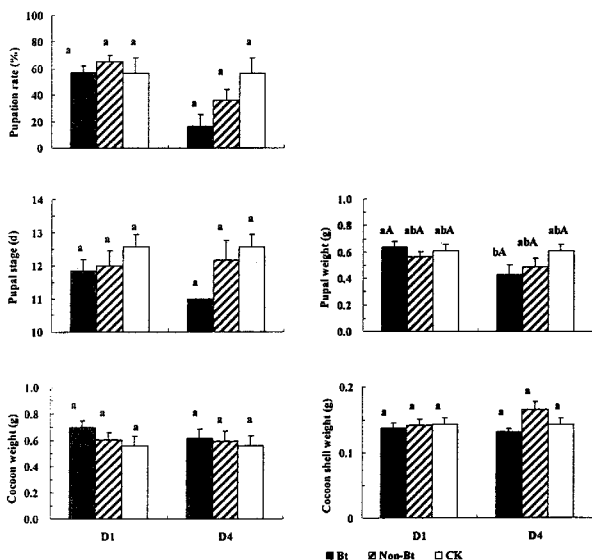


图 5.9 家蚕 3~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的蛹期相关指标变化

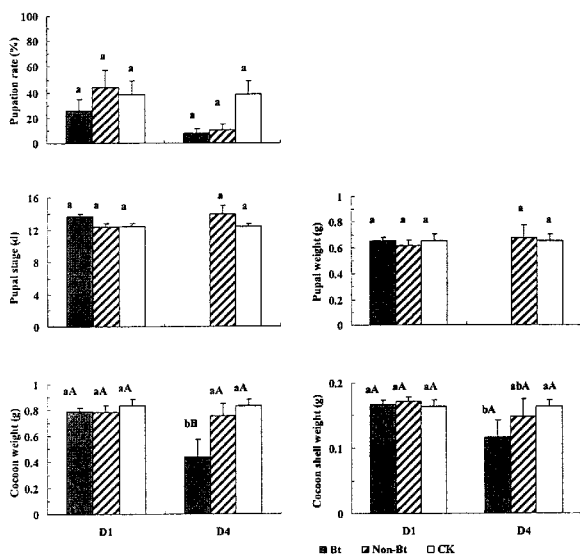


图 5.10 家蚕 1~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的蛹期相关指标变化

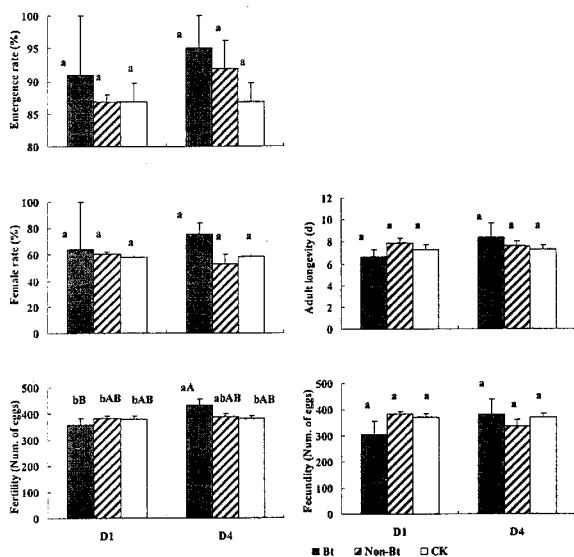


图 5.11 家蚕 1~3 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的成虫期相关指标变化

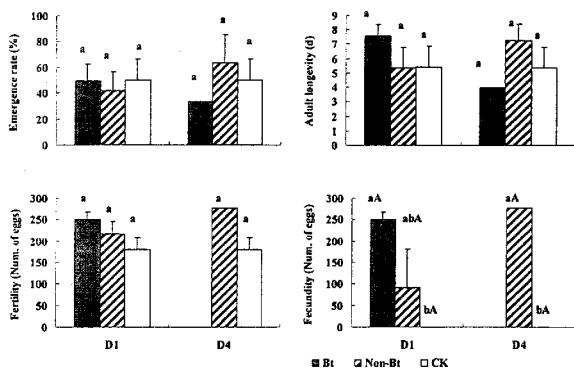


图 5.12 家蚕 3~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的成虫期相关指标变化

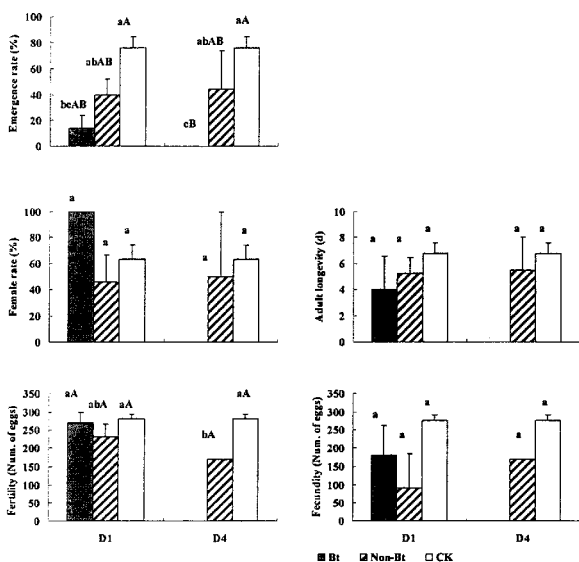


图 5.13 家蚕 1~5 龄幼虫连续饲喂不同水稻花粉后的成虫期相关指标变化



## 第六章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的行为学效应

客观评价 Bt 水稻花粉在自然条件下对家蚕的生态风险,需在明确 Bt 花粉对家蚕产生危害效应的同时,正确评估家蚕对 Bt 花粉危害的暴露机率。家蚕对 Bt 花粉的暴露机率不仅受到 Bt 水稻花粉产量、飘落在桑叶上花粉密度、环境因子(如降雨)以及水稻扬花期与养蚕期重迭程度等的影响,还受到家蚕幼虫取食行为的影响。桑叶上存在一定数量的水稻花粉可在一定程度上改变家蚕食物的性质,从而影响食物适口性、营养成分比例以及摄入后的消化吸收等,过量摄入水稻花粉(即使是非 Bt 水稻)对家蚕也多存在明显的不利影响。更何况, Bt 水稻花粉在室内人为胁迫条件下可导致家蚕幼虫发生急性中毒(第四章),并对家蚕主要生物学特性(第五章)产生明显的负面效应。这些均可能导致家蚕幼虫取食行为发生改变,使得家蚕对 Bt 水稻花粉暴露机率的变化,最终影响 Bt 水稻花粉对家蚕的生态风险。本章报道家蚕幼虫对不同水稻花粉的取食选择性差异及其对 Bt 水稻花粉生态风险的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试水稻品系为华池 2000B1 (B1) 及其非转基因亲本,有关 Bt 水稻品系背景介绍与花粉田间采集方法详见第四章 1.1 和 1.4。桑叶采自浙江大学华家池校区实验桑园,桑树品种为农桑 8 号。

配制 Bt 水稻及其非转基因亲本的花粉悬浮液原液(D4)及其 125×(D0)、25×(D1)、5×(D2)和 1×(D3)稀释液,分别处理用打孔器(Φ7.0cm)制成一定面积的新鲜桑叶(叶碟, leaf disc)。花粉悬浮液配制及桑叶处理方法同第四章 1.5。

家蚕品种:青松×皓月,蚕卵购于浙江省蚕种公司。按常规方法催青得初孵蚁蚕,部分蚁蚕以新鲜桑叶分别饲养至 3 龄、5 龄,供试验用。

#### 1.2 试验设计

##### 1.2.1 不同龄期幼虫对不同水稻花粉的取食选择行为

将同一浓度 Bt 和非 Bt 水稻花粉(D0、D1 和 D4)以及无菌水处理的叶碟沿周边等距离随机放于一圆盘上,用双面胶固定以防止叶碟移位。取个体大小、龄期一致的蚁蚕、3 龄或 5 龄幼虫饥饿 12h 后,分别置于圆盘中央,加盖黑布遮光形成黑暗环境。一定时间间隔(1h、2h、4h、8h、12h 和 24h)后观察、计数在不同处理叶碟上取食的幼虫数。每处理 10 头初孵家蚕,重复 6 次。处理期间控温  $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度  $75 \pm 1.0\%$ 。

##### 1.2.2 不同龄期幼虫对不同浓度花粉的取食选择行为

取 Bt 或非 Bt 水稻花粉不同浓度以及无菌水处理的叶碟沿周边等距离用双面胶随机固定于圆盘上,其余处理方法及条件同上。

### 1.3 数据分析

所得数据采用唐启义等(2002) DPS 数据处理软件进行非参数 Kruskal-Wallis 检验(Jaccard 等, 2001) 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕幼虫对不同水稻花粉的取食选择

家蚕 1 龄幼虫在 D0 浓度 Bt 水稻花粉处理桑叶上的比例与非 Bt 水稻花粉处理的大致相同, 均明显高于对照处理的, 但差异未达显著, 且随时间延长并无显著变化(图 6.1)。在 D1 浓度下, 1 龄幼虫开始选择无花粉处理桑叶的较多; 随着时间延长, 选择非 Bt 水稻花粉处理桑叶的比例逐渐增多, 明显大于选择 Bt 水稻花粉和对照处理的; 最后对三者的选择比例趋于相同。整个选择过程中, 所有差异均未达显著。在 D4 浓度下, 1 龄幼虫选择无花粉处理桑叶的比例极显著为高, 且随时间延长无明显变化。

3 龄幼虫对 D0 浓度水稻花粉处理桑叶的取食选择随时间变化而呈现明显的波动, 其中对 Bt 花粉的选择趋势与对非 Bt 花粉的正相反(图 6.2)。3 龄幼虫开始对无花粉处理的选择比例相对较高, 后随时间延长而逐渐降低, 最后三者比例趋于相同。整个选择过程中, 所有差异均未达显著。3 龄幼虫对 D1 浓度不同花粉处理的选择比例及其时间变化多与 D0 浓度处理的相似。在 D4 浓度下, 3 龄幼虫对不同处理桑叶的选择比例虽有一定变化, 但多以对无花粉处理桑叶的选择显著为高。

5 龄幼虫对 D0 浓度 Bt 水稻花粉处理桑叶的选择比例明显较高, 且随时间变化并无明显改变(图 6.3)。5 龄幼虫对 D1 浓度不同水稻花粉处理桑叶的选择比例随时间变化出现较大的波动, 在总体上亦以选择 Bt 水稻花粉的明显较多。在 D4 浓度下, 5 龄幼虫对无花粉处理的选择比例明显较高, 多数差异达显著水平。

### 2.2 家蚕幼虫对不同浓度水稻花粉的取食选择

家蚕 1 龄幼虫对不同浓度 Bt 水稻花粉处理桑叶的选择, 开始多以 D0 浓度处理的显著为高, 无花粉对照处理的显著为低; 但在后期, 对无花粉处理的取食选择比例明显增多, 与 D0 浓度处理的无显著差异(图 6.4)。1 龄幼虫对不同浓度非 Bt 水稻花粉处理桑叶的选择趋向与对 Bt 花粉的大致相同, 开始多选择 D0 浓度花粉处理的, 后期选择无花粉处理的增多; 但所有差异均达显著。

3 龄幼虫对不同浓度 Bt 水稻花粉处理桑叶的选择, 多以 D0 浓度和无花粉对照处理的明显较高; 后期对 D1 浓度处理亦有一定的选择比例, 但所有差异并不显著(图 6.5)。3 龄幼虫对不同浓度非 Bt 水稻花粉处理桑叶的选择主要以 D0、D1 浓度和无花粉对照处理的明显较多, 其中有些不同浓度处理间的差异达显著水平。

5 龄幼虫对 Bt 水稻花粉的选择开始以 D0 浓度的相对较多, 后随时间延长, 对 D1、D2 浓度和无花粉对照的选择比例有明显增多, 整个选择过程中的所有差异均未达显著(图 6.6)。

5 龄幼虫对非 Bt 水稻花粉的选择多以无花粉对照的相对较多, 其中个别对 D0 和 D1 浓度花粉的选择比例相对较高些。5 龄幼虫对不同浓度非 Bt 水稻花粉的选择差异均未达显著。

### 3 讨论

当高浓度水稻花粉处理与无花粉对照处理的桑叶同时存在时, 家蚕幼虫极显著地选择取食无花粉处理的桑叶; 对于以相对较低浓度 (D0 或 D1) 处理与无花粉处理的桑叶, 家蚕幼虫多选择取食前者。这与 Hellmich 等 (2001b) 就大斑蝶对寄主叶片上有无玉米花粉的选择试验结果一致, 表明不同浓度花粉对诸如家蚕和大斑蝶等这些被动取食花粉的非靶标昆虫取食行为的影响是不同的。

家蚕不同龄期幼虫对相对较低浓度 (D0 或 D1) 的不同水稻花粉选择亦不尽相同。1 龄幼虫多选择非 Bt 水稻花粉的, 后随虫龄增大, 逐渐趋向选择 Bt 水稻花粉的。

对于同种水稻花粉不同浓度处理, 家蚕幼虫更多选择较低浓度 (D0 或 D1) 或无花粉对照。就 Bt 水稻花粉而言, 低龄幼虫显著偏向选择 D0 浓度处理的, 而高龄幼虫有较多选择 D1 浓度。这表明随着虫龄增长, 家蚕幼虫可耐受 Bt 水稻花粉的剂量相应提高, 即不同龄期幼虫对 Bt 花粉选择的阈值不同。

家蚕偏向选择取食落有一定水稻花粉 (较低密度) 的桑叶, 可能与水稻花粉中富含氨基酸、糖、维生素、微量元素、激素和有机酸等 (蔡继炯等, 1987) 有关。家蚕取食少量花粉可能有利于其生长发育及繁殖, 但过多摄入水稻花粉则对其生长发育明显不利 (第四章)。家蚕幼虫对 Bt 和非 Bt 水稻花粉不同浓度的选择趋向并不完全一致, 可能与外源基因插入而导致其体内化学组分 (张永军等, 2001a), 特别是挥发性物质组成的变化 (张永军等, 2001b; 阎凤鸣等, 2002) 有关。

水稻花粉, 特别是 Bt 水稻花粉的存在可影响家蚕取食行为的变化, 从而影响家蚕对 Bt 水稻花粉的暴露机率, 最终影响 Bt 水稻花粉的生态风险程度。家蚕幼虫偏食低剂量水稻花粉, 增加了其接触 Bt 水稻花粉中毒蛋白的概率, 并在一定程度上加剧了 Bt 水稻花粉的生态风险。

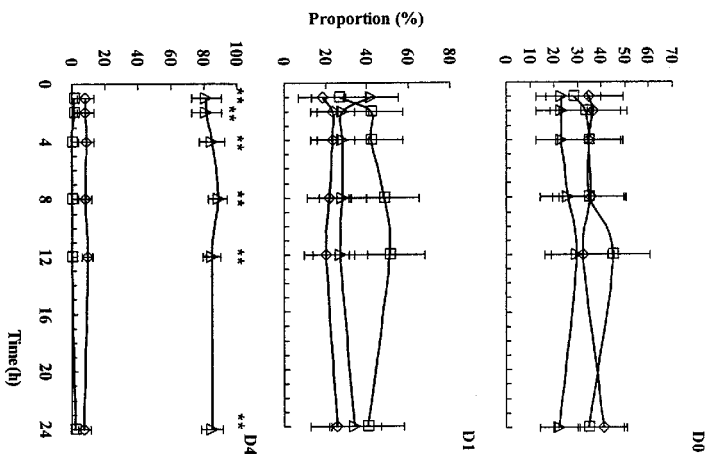


图 6.1 家蚕 1 龄幼虫对不同水稻花粉取食选择行为的时间动态

注: \*\*表示经 Kruskal-Wallis 检验, 差异达极显著水平 ( $p < 0.01$ )

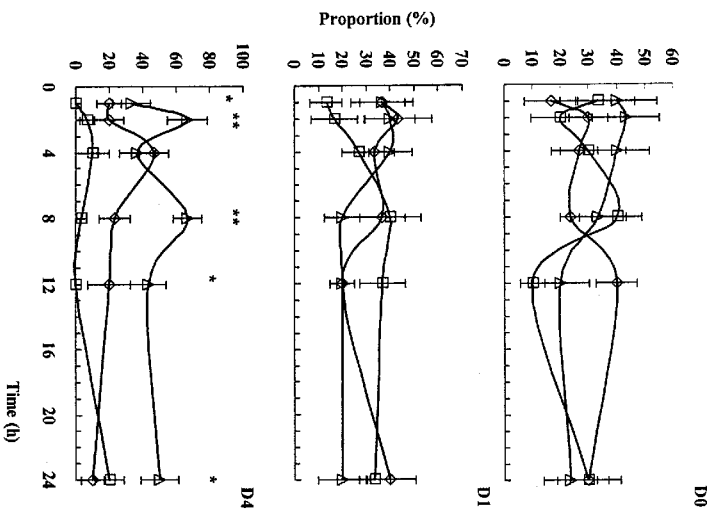
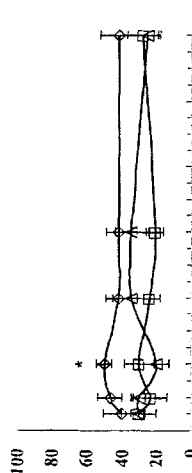


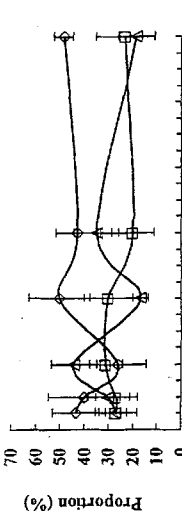
图 6.2 家蚕 3 龄幼虫对不同水稻花粉取食选择行为的时间动态

注: \*, \*\* 分别表示经 Kruskal-Wallis 检验, 差异达显著 ( $p < 0.05$ ) 和极显著水平 ( $p < 0.01$ )

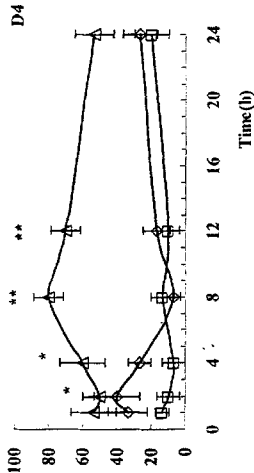
D0



D1



D4

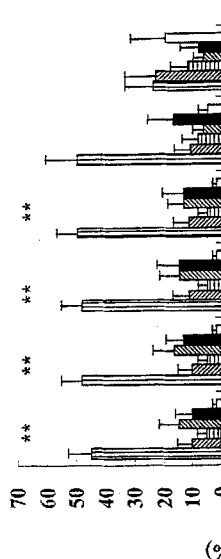


—○— Bt —□— Non-Bt —△— CK

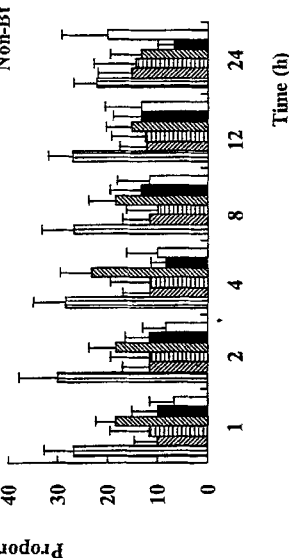
图 6.3 家蚕 5 龄幼虫对不同水稻花粉取食选择行为的时间动态

注: \*, \*\* 分别表示经 Kruskal-Wallis 检验, 差异达显著 ( $p < 0.05$ ) 和极显著水平 ( $p < 0.01$ )

Bt



Non-Bt



□ D0 ▨ D1 ▩ D2 ▤ D3 ▦ D4 □ CK

图 6.4 家蚕 1 龄幼虫对不同浓度水稻花粉取食选择行为的时间动态

注: \*\* 表示经 Kruskal-Wallis 检验, 差异达极显著水平 ( $p < 0.01$ )

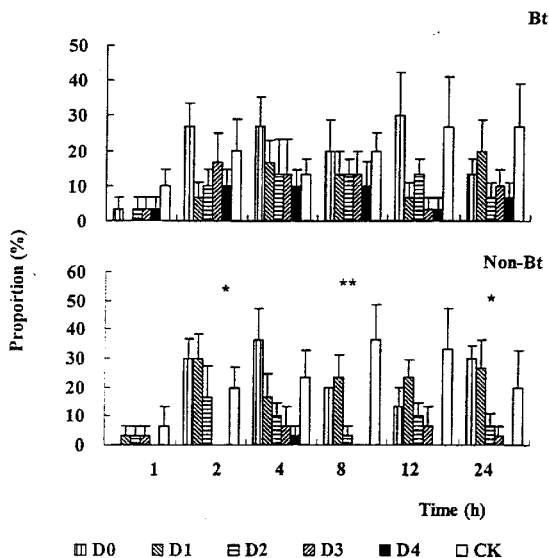


图 6.5 家蚕 3 龄幼虫不同浓度水稻花粉取食选择行为的时间动态

注：\*、\*\*分别表示经 Kruskal-Wallis 检验，差异达显著 ( $p < 0.05$ ) 和极显著水平 ( $p < 0.01$ )

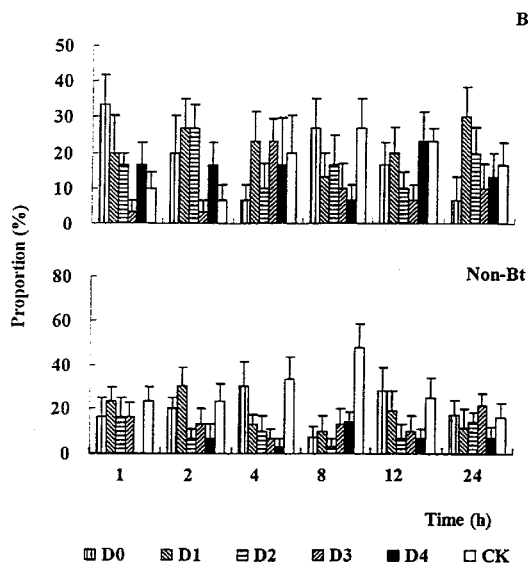


图 6.6 家蚕 5 龄幼虫不同浓度水稻花粉取食选择行为的时间动态

## 第七章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的生理学效应

至今,国内外有关转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫潜在风险的研究均主要针对可能产生的表观影响(如死亡、生长发育等),而就昆虫体内生理和代谢等的内在影响则尚未见有报道。当昆虫体内正常的生理功能和代谢平衡受到干扰后,通常会表现出生长发育发生改变,如体重减轻、生长加快或发育延缓等,进而可导致死亡率增高。现有研究表明, Bt  $\delta$ -内毒素可引起昆虫体内蛋白酶等代谢相关酶系活性发生变化,从而影响正常的生命活动(申继忠等, 1994; 梁革梅等, 1998; 2001)。因此,当非靶标昆虫取食转 Bt 基因花粉后, Bt 毒蛋白可能会引起昆虫体内正常生理水平和代谢平衡的扰动,导致对其生长发育及生存等的负面影响。

家蚕幼虫在室内持续胁迫饲喂 Bt 水稻花粉后,其存活、生长发育和蚕茧性状等生物学指标均发生极显著的不利变化。这一方面可能因花粉中 Bt 毒蛋白的直接毒杀作用而引起存活率下降,另一方面也可能因 Bt 毒蛋白的毒害作用引起对家蚕幼虫体内正常代谢生理水平的紊乱而造成生长发育等生物学指标的变化。鉴于消化代谢相关酶系在维持、稳定昆虫体内正常生理代谢平衡过程中的重要性,本章就家蚕幼虫取食 Bt 水稻花粉后,其中肠内主要的消化酶活性变化作了初步研究,以探讨 Bt 水稻花粉对家蚕体内生理代谢的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

家蚕品种为秋丰 $\times$ 白玉,蚕卵购于浙江省蚕种公司。按常规方法催青得初孵蚁蚕后,即进行连续饲喂 Bt 水稻和非 Bt 水稻花粉,直至幼虫结茧化蛹。同时,以无菌水为阴性对照和以纯 Bt 毒素蛋白 Cry1Ab 为阳性对照。水稻品系、花粉浓度与桑叶处理以及饲养条件同第五章 1.1 和 1.2, Cry1Ab 毒蛋白处理浓度为 0.5 $\mu$ g/ml。在对初孵幼虫不同处理的第 2d 即开始每天定时取样,直至入眠;2 龄以后则分别在龄初(眠醒取食后第 2d)、龄末(入眠第 1d)进行取样,供酶活测定。

#### 1.2 中肠酶液的制备

中肠酶液的制备过程主要参照王琛柱等(1996)。当天取样的幼虫立即在冰台上迅速解剖,用冰冷的 0.15mol/L NaCl 溶液冲洗,截取中肠及其内含物, -70 $^{\circ}$ C 冰冻保存。测试前,取出稍融后,用 0.15mol/L NaCl 溶液在冰浴内匀浆, 12000g 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 取上清液即为粗提酶液。

#### 1.3 淀粉酶活性测定

参照 Shaw 等(1995)和 Silva 等(2001),取 20 $\mu$ l 酶液,加 30 $\mu$ l 底物(0.5%可溶性淀粉溶于含有 2mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 20mmol/L NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 9.0 中)于 37 $^{\circ}$ C 保温 1h,加 200 $\mu$ l 反应终止剂(1g 3,5-二硝基水杨酸和 30g 酒石酸钾钠,加 20ml 2mol/L

NaOH 溶液,再用双蒸水定容至 100ml) 后 100℃ 水浴 5 min, 自然冷却后加入 200 $\mu$ l 双蒸水混匀, 取 300 $\mu$ l 用 MQX200 型 UQuant 酶标仪 (Bio-Tek 公司) 于 550nm 处测定吸光值。以麦芽糖制作标准曲线:  $y = 3.2131x - 0.0521$  ( $R^2 = 0.9992, p < 0.01$ ), 其中  $x$  为 OD 值,  $y$  为底物量 (单位  $\mu$ mol)。

#### 1.4 脂肪酶活性测定

参照李影林 (1987), 取 10 $\mu$ l 酶液, 加入 50 $\mu$ l 50mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 pH10.0 和 50 $\mu$ l 0.2% 三油酸甘油酯水溶液, 于 37℃ 保温 1h 后, 加 50 $\mu$ l 氧化剂 (0.5g 过碘酸钠溶于 300ml 双蒸水中, 加 38.5g 无水醋酸铵溶解, 再加冰醋酸 30ml, 用蒸馏水定容至 500ml) 和 50 $\mu$ l 乙酰丙酮溶液 ( $v/v = 1:1$ ), 65℃ 水浴 15min, 自然冷却后, 取 200 $\mu$ l 用 MQX200 型 UQuant 酶标仪 (Bio-Tek 公司) 于 420nm 处测定吸光值。以甘油制作标准曲线:  $y = 1717.3x + 0.0205$  ( $R^2 = 0.9946, p < 0.01$ ), 其中  $x$  为 OD 值,  $y$  为底物量 (单位  $\mu$ mol)。

#### 1.5 蛋白酶活性测定

蛋白酶活性测定主要参照 Christeller 等 (1989)、王琛柱等 (1996) 和 Baker 等 (2000) 等方法。

总蛋白酶活性用氨苯磺胺偶氮酪蛋白 (azocasein) 为底物测定。取 10 $\mu$ l 酶液, 加入 40 $\mu$ l 50mM 甘氨酸-NaOH 缓冲液 pH10.0, 30℃ 温育 10min, 加 100 $\mu$ l 1.5% 偶氮酪蛋白底物, 30℃ 保温 3h, 加 150 $\mu$ l 10% 三氯乙酸终止反应。反应混合物经 12000g 4℃ 离心 20min, 取 200 $\mu$ l 上清液用 MQX200 型 UQuant 酶标仪 (Bio-Tek 公司) 于 415nm 处测定吸光值, 以 1 个吸收单位的变化定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。

类胰蛋白酶 (trypsin-like proteases) 活性用专性底物  $\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺 ( $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide, BApNA) 测定。取 10 $\mu$ l 酶液, 加入 40 $\mu$ l 50mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液 pH10.0, 30℃ 温育 10min, 加 100 $\mu$ l 1.0mmol/L BApNA 底物 (含 5% 二甲亚砜), 30℃ 保温 30min, 加 150 $\mu$ l 30% 乙酸终止反应。用 MQX200 型 UQuant 酶标仪 (Bio-Tek 公司) 于 410nm 处测定吸光值。BApNA 摩尔消光系数  $\epsilon = 8800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

类胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin-like proteinase) 活性用专性底物 N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯 (N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester, BTEE) 测定。取 10 $\mu$ l 酶液, 加入 40 $\mu$ l 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH8.0, 37℃ 温育 10min, 加 200 $\mu$ l 1.0mmol/L BTEE 底物 (含 10% 甲醇) 迅速混匀后, 用 MQX200 型 UQuant 酶标仪 (Bio-Tek 公司) 于 256nm 处测定吸光值变化。BTEE 摩尔消光系数  $\epsilon = 964 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

类弹性蛋白酶 (elastase-like proteases) 活性用专性底物 N-琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-亮氨酸-p-硝基苯胺 (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu p-Nitroanilide, SAAPLpNA) 测定。反应体系和测定方法等均与类胰蛋白酶相同。SAAPLpNA 摩尔消光系数  $\epsilon = 8800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

氨肽酶 (aminopeptidases) 活性用专性底物 L-亮氨酸-p-硝基苯胺 (L-Leucine-p-Nitroanilide, LpNA) 测定。反应体系和测定方法等均与类胰蛋白酶相同。LpNA 摩尔消光系数  $\epsilon = 8800$



$\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

## 1.6 可溶性蛋白含量测定

参照 Bradford (1976), 用考马斯亮蓝  $G_{250}$  测定各酶液中可溶性蛋白含量。以牛血清蛋白制作标准曲线  $y = 0.0781x + 0.1976$  ( $R^2 = 0.9708, p < 0.01$ ), 其中  $x$  为 OD 值,  $y$  为蛋白含量 (单位  $\mu\text{g}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 对家蚕幼虫中肠淀粉酶活性的影响

连续饲喂 Bt 或非 Bt 水稻花粉的家蚕 1 龄幼虫中肠淀粉酶活性随时间延长无显著变化, 且与对照多无显著差异 (表 7.1)。家蚕幼虫 2 龄以后的淀粉酶活性在不同花粉处理之间虽有一定变化, 其中 5 龄末幼虫淀粉酶活性以非 Bt 水稻花粉持续处理的显著为高, 但在总体水平上与对照基本一致。家蚕幼虫连续饲喂 Cry1Ab 蛋白, 在 2 龄末的死亡率即达 100%。低龄幼虫中肠淀粉酶活性随 Cry1Ab 蛋白处理时间延长呈下降趋势。此外, Bt 水稻花粉 D4 浓度和 Cry1Ab 蛋白处理均导致家蚕 1 龄幼虫历期延长 1d。

通过对不同处理、不同发育阶段家蚕幼虫中肠淀粉酶活性随时间的变化比较, 发现连续取食水稻花粉 (Bt 或非 Bt) 的酶活变化与对照存在极显著的正相关 (表 7.2)。连续处理 Cry1Ab 蛋白的幼虫中肠淀粉酶活性变化与花粉处理及对照的相关性均不显著。

### 2.2 对家蚕幼虫中肠脂肪酶活性的影响

家蚕 1 龄幼虫中肠脂肪酶活性以经不同处理 1d 后, 以 Bt 水稻花粉和 Cry1Ab 蛋白处理的显著较高, 非 Bt 水稻花粉处理的显著为低 (表 7.3)。此后随处理持续时间延长, 不同处理的幼虫脂肪酶活性变化呈现多样化。

就不同处理、不同发育阶段的脂肪酶活性变化进行相关性分析, 表明在低龄期 Bt 水稻花粉处理的酶活变化与 Cry1Ab 蛋白处理的呈极显著正相关, 而 Bt 水稻花粉 D4 浓度和 Cry1Ab 蛋白处理的酶活变化与对照相关性不显著 (表 7.4)。从整个幼虫期看, Bt 水稻花粉 D1 浓度和非 Bt 水稻花粉持续处理的脂肪酶活性变化与对照呈显著正相关。这表明, Bt 毒蛋白对家蚕低龄幼虫中肠脂肪酶活性有着明显影响, 且其中似存在剂量效应。

### 2.3 对家蚕幼虫中肠蛋白水解酶活性的影响

#### 2.3.1 总蛋白酶活性

连续饲喂水稻花粉的家蚕低龄幼虫中肠总蛋白酶活性多存在显著变化 (表 7.5)。经水稻花粉处理 1d 的幼虫总蛋白酶活性显著低于对照, 后随处理时间延长而呈现不同变化。对照家蚕 1 龄幼虫总蛋白酶活性随发育时间延长而显著降低, 2 龄以后通常以龄初的活性相对较低, 龄末的活性相对较高。不同水稻花粉处理家蚕幼虫总蛋白酶活性在 2 龄以后的变化与对照一致。Cry1Ab 蛋白处理的酶活多显著低于对照的。

就总蛋白酶活性变化的相关分析表明, 不同水稻花粉处理之间以及与对照的酶活变化趋势均呈显著正相关, 表明水稻花粉对家蚕幼虫总蛋白酶活性的影响不明显; 而 Cry1Ab 蛋白

处理的酶活变化与水稻花粉处理以及对照多无显著相关性,表明 Bt Cry1Ab 蛋白对家蚕总蛋白酶活性存在明显影响(表 7.6)。

### 2.3.2 类胰蛋白酶

家蚕幼虫中肠类胰蛋白酶在不同处理之间的活性差异及其时间变化趋势多与总蛋白酶的情况相似(表 7.7~7.8)。

### 2.3.3 类胰凝乳蛋白酶

家蚕幼虫中肠类胰凝乳蛋白酶活性多随龄期延长而呈降低趋势(表 7.9)。不同水稻花粉及 Cry1Ab 蛋白处理 1d 后,1 龄幼虫类胰凝乳蛋白酶的活性即有显著提高,后随处理时间延长而出现不同程度变化,但在总体上,各处理的酶活多较对照明显为高。

不同水稻花粉、Cry1Ab 蛋白以及对照处理之间的相关性,除 Bt 水稻花粉 D1 浓度和 Cry1Ab 蛋白、非 Bt 水稻花粉 D1 浓度与对照间达显著外,其它相关性多不显著(表 7.10)。这似表明水稻花粉以及 Bt 水稻花粉中的毒蛋白均可以不同方式、不同程度影响家蚕幼虫中肠内的类胰凝乳蛋白酶活性,而且水稻花粉组分与 Bt 毒蛋白间似存在交互影响作用。

### 2.3.4 类弹性蛋白酶

不同水稻花粉和 Cry1Ab 蛋白处理可导致家蚕幼虫中肠内类弹性蛋白酶活性的复杂变化(表 7.11)。在不同水稻花粉处理 1d 后,类弹性蛋白酶活性即显著降低,后随虫龄增加而多趋增高;Cry1Ab 蛋白处理 1d 后,酶活性有显著提高,后随处理时间延长而呈下降。

不同处理的酶活变化多无显著相关性(表 7.12)。这表明水稻花粉组分以及 Bt 毒蛋白可不同程度地影响中肠类弹性蛋白酶活性,致使该酶代谢功能出现扰动。

### 2.3.5 氨肽酶

不同水稻花粉处理对家蚕低龄幼虫中肠氨肽酶活性的影响多不显著,且与对照无显著差异(表 7.13)。此后,酶活随虫龄增加而呈上升趋势,其中在 5 龄末花粉处理的酶活显著较对照为高。Cry1Ab 蛋白处理 1d 即可导致氨肽酶活性显著增高,后随处理时间延长而少有变化。

不同水稻花粉处理的酶活变化均与对照极显著相关,表明水稻花粉对家蚕幼虫氨肽酶活性无明显影响(表 7.14)。经 Cry1Ab 蛋白处理的酶活变化与水稻花粉处理、对照之间均无显著相关性,表明 Bt Cry1Ab 蛋白对家蚕氨肽酶活性存在明显影响。

## 3 讨论

在家蚕幼虫中肠中均可检测出不同活性程度的淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等消化酶。

淀粉酶是昆虫体内涉及食物消化和碳水化合物代谢的重要酶系之一(Abraham 等, 1992)。家蚕淀粉酶活性高低因与幼虫存活、生长发育和蚕丝产量密切相关而颇受重视,并在家蚕育种中作为衡量品种优劣的关键性状之一(Chatterjee 等, 1993; Patnaik 等, 1995; Maribashetty 等, 1998)。研究表明高温可导致家蚕幼虫中肠淀粉酶活性明显增高,幼虫历期显著缩短(Basavaraju 等, 1996)。家蚕幼虫连续饲喂较高浓度 Bt 水稻花粉后,其中肠淀粉

酶活性多无显著变化。经非 Bt 水稻花粉 D4 浓度处理的 5 龄末幼虫, 淀粉酶活性显著增高。尚不清楚这是否与 5 龄幼虫有关生物学指标的相应变化(详见第五章)有关。

脂肪酶是昆虫体内参与脂类消化与代谢的重要水解酶, 而脂类通常是昆虫贮存能量的载体, 也是表皮和细胞膜的结构要素(王荫长, 1994)。经 Bt 水稻花粉处理和 Cry1Ab 蛋白处理的家蚕低龄幼虫脂肪酶活性, 与对照多存在显著差异; 而且 Bt 水稻花粉 D4 浓度和 Cry1Ab 蛋白处理的酶活变化与对照并无显著相关性。这表明 Bt 毒蛋白对家蚕低龄幼虫中肠脂肪酶的活性存在明显影响, 从而使体内脂肪含量变化, 导致其它代谢水平改变。

昆虫肠道蛋白酶是一类能够催化蛋白质肽键断裂形成氨基酸的系列水解酶(蒋彩英等, 2001)。根据酶作用方式, 蛋白酶可分为内切肽酶(endopeptidases)和外切肽酶(exopeptidases), 其中前者根据酶催化机制又可分为丝氨酸蛋白酶(serine proteases)、半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteases)、天冬氨酸蛋白酶(aspartic acid proteases)和金属蛋白酶(metallo-proteases)。丝氨酸蛋白酶属碱性蛋白酶(alkaline proteases), 半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶属酸性蛋白酶(acidic proteases), 金属蛋白酶属中性蛋白酶(neutral proteases)。外切肽酶包括氨肽酶(aminopeptidases)、羧肽酶(carboxypeptidases)和 $\omega$ -外切肽酶(omega-peptidases)。本章测定的类胰蛋白酶、类凝乳蛋白酶和类弹性蛋白酶均同属丝氨酸蛋白酶。

昆虫肠道蛋白酶一方面消化降解食物中的蛋白质为多肽或氨基酸, 由肠壁细胞吸收, 为机体提供氨基酸来源; 另一方面可降解 Bt 伴孢晶体在中肠碱性环境中溶解形成的原毒素为激活的毒性肽, 与专性受体结合后产生病理效应。有研究表明, 昆虫肠道类胰蛋白酶和类凝乳蛋白酶参与 Bt 杀虫蛋白的激活过程, 而类弹性蛋白酶可能参与 Bt 毒素蛋白的沉淀作用, 限制毒蛋白的激活(农广等, 1998)。本章结果表明, Bt Cry1Ab 蛋白对家蚕中肠不同类型的蛋白酶均存在不同程度的影响; 水稻花粉, 特别是 Bt 水稻花粉处理可导致家蚕类胰凝乳蛋白酶和类弹性蛋白酶活性明显变化。由于 Bt 水稻花粉中表达的毒蛋白是活性肽, 无需蛋白酶的降解激活, 而且水稻花粉中富含氨基酸(蔡继炯等, 1987), 因此水稻花粉引起家蚕肠道蛋白酶活性变化, 一方面可能是因为食物中氨基酸比例增高引起蛋白酶活性改变, 另一方面可能因为 Bt 毒性肽对家蚕机体的病理效应而导致部分蛋白酶活性变化。

无论如何, Bt 水稻花粉与 Bt 毒素蛋白可不同程度地影响家蚕幼虫肠道消化酶活性变化, 从而导致体内正常生理和代谢的动态平衡出现扰动, 进而影响幼虫生存、生长发育等生物学指标。

表 7.1 家蚕幼虫中肠淀粉酶比活力 (μmol/min/mg protein) 比较

|        | Br-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ )    | Br-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Non-Br-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Non-Br-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Cp1Ab ( $\bar{x} \pm SD$ )   | CK ( $\bar{x} \pm SD$ ) |                               |      |                               |      |               |     |
|--------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|------|-------------------------------|------|---------------|-----|
| 1 龄 Id | 2.950±0.2885 <sup>a**</sup>   | deCDEF <sup>a</sup>        | 2.6488±0.0773                  | cdCfCD                         | 2.7269±0.4070                | dE                      | 2.4369±0.1352                 | cC   | 3.2734±0.9618                 | aA   | 2.8607±0.2413 | dDE |
| 1 龄 2d | 3.4184±0.1175 <sup>aA</sup>   | cdCD                       | 2.8719±0.1843 <sup>a</sup>     | cdCfCD                         | 2.6823±0.2466 <sup>a</sup>   | dE                      | 2.7381±0.3250 <sup>a</sup>    | cC   | 2.9054±0.1352                 | abAB | 3.2734±0.2466 | dD  |
| 1 龄 3d | 2.5931±0.2194 <sup>abAB</sup> | fgEF                       | 2.9277±0.4192 <sup>bcAB</sup>  | cdCfCD                         | 2.1581±0.0580 <sup>cB</sup>  | cE                      | 2.2808±0.1267 <sup>cB</sup>   | cC   | 2.9723±0.2923 <sup>bcAB</sup> | abAB | 2.3477±0.2533 | cEF |
| 1 龄 4d | 3.1061±0.3731 <sup>aA</sup>   | cdCDE                      | 2.3254±0.1206 <sup>aA</sup>    | cCfCD                          | 2.2808±0.4700 <sup>bB</sup>  | cE                      | 2.6377±0.3215 <sup>abAB</sup> | cC   | 2.3477±0.5187 <sup>aA</sup>   | bcAB | 1.9574±0.1739 | cF  |
| 1 龄 5d | —                             | —                          | 2.5596±0.1338 <sup>bAB</sup>   | cdCfCD                         | —                            | —                       | 1.8570±0.0669 <sup>abAB</sup> | cB   | —                             | —    | —             | —   |
| 2 龄初   | 2.6377±0.5011 <sup>abA</sup>  | cEgEF                      | 2.3366±0.2923 <sup>aA</sup>    | cCfCD                          | 3.0503±0.5378 <sup>abA</sup> | dDE                     | 4.7456±2.6904 <sup>aA</sup>   | bB   | 2.7492±0.3351 <sup>abA</sup>  | abAB | 2.3477±0.3250 | cEF |
| 2 龄末   | 2.3477±0.0697 <sup>abAB</sup> | gF                         | 2.1470±0.3162 <sup>abcAB</sup> | fD                             | 2.4815±0.1509 <sup>aA</sup>  | dE                      | 2.1135±0.1581 <sup>bcAB</sup> | cC   | 1.8681±0.2017 <sup>cB</sup>   | cB   | 2.3142±0.0697 | cEF |
| 3 龄初   | 3.0057±0.2704 <sup>aA</sup>   | cdCfCDEF                   | 2.9500±0.0966 <sup>aA</sup>    | cdCD                           | 2.2250±0.2526 <sup>bB</sup>  | cE                      | 2.3366±0.1843 <sup>bB</sup>   | cC   | —                             | —    | 2.4035±0.2017 | cEF |
| 3 龄末   | 3.4630±0.1206 <sup>bB</sup>   | cC                         | 4.6229±0.2885 <sup>aA</sup>    | bbB                            | 4.4333±0.7717 <sup>aAB</sup> | bcBC                    | 3.3180±0.2420 <sup>bB</sup>   | cBC  | —                             | —    | 3.9760±0.2374 | cC  |
| 4 龄初   | 2.7715±0.1352 <sup>bB</sup>   | cEgDEF                     | 2.9834±0.2725 <sup>bB</sup>    | cdC                            | 4.8571±0.3036 <sup>aA</sup>  | bbB                     | 2.6711±0.2177 <sup>bB</sup>   | cC   | —                             | —    | 4.8460±0.1352 | bbB |
| 4 龄末   | 5.2921±0.3578 <sup>aA</sup>   | bbB                        | 3.1284±0.7474 <sup>bcC</sup>   | cC                             | 3.8534±0.1393 <sup>bBC</sup> | cCD                     | 3.3961±0.1673 <sup>bcC</sup>  | bcBC | —                             | —    | 4.6564±0.1352 | bbB |
| 5 龄初   | 2.4258±0.1206 <sup>a</sup>    | gF                         | 2.3812±0.2555 <sup>gF</sup>    | deCfCD                         | 2.2139±0.1843 <sup>a</sup>   | cE                      | 2.3700±0.2806 <sup>bcC</sup>  | cC   | —                             | —    | 2.2919±0.3227 | cEF |
| 5 龄末   | 6.1732±0.2194 <sup>aC</sup>   | aA                         | 6.2290±0.2923 <sup>aC</sup>    | aA                             | 8.3480±0.3295 <sup>aA</sup>  | aA                      | 14.4153±0.0697 <sup>aA</sup>  | aA   | —                             | —    | 6.5412±0.4192 | aA  |

注: a、\*\*表示同一列、同一行数据具相同大、小写字母者表示经 Duncan's 新复极差测验, 其差异分别未达  $F_{0.01}$  和  $P_{0.05}$  水平, 下同。

表 7.2 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠淀粉酶比活力的相关分析

| 处理        |          | Bt-D4         | Non-Bt-D1         | Non-Bt-D4     | Cry1Ab  | CK                |
|-----------|----------|---------------|-------------------|---------------|---------|-------------------|
| Bt-D1     | R        | 0.7782        | 0.78169           | 0.7757        | 0.42892 | 0.82485           |
|           | <i>p</i> | <b>0.0029</b> | <b>0.0027</b>     | <b>0.003</b>  | 0.3961  | <b>0.001</b>      |
|           | N        | 12            | 12                | 12            | 6       | 12                |
| Bt-D4     | R        |               | 0.89356           | 0.83504       | 0.63223 | 0.82651           |
|           | <i>p</i> |               | <b>&lt;0.0001</b> | <b>0.0007</b> | 0.1276  | <b>0.0009</b>     |
|           | N        |               | 12                | 12            | 7       | 12                |
| Non-Bt-D1 | R        |               |                   | 0.88412       | 0.24409 | 0.93944           |
|           | <i>p</i> |               |                   | <b>0.0001</b> | 0.6411  | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        |               |                   | 12            | 6       | 12                |
| Non-Bt-D4 | R        |               |                   |               | 0.14963 | 0.73469           |
|           | <i>p</i> |               |                   |               | 0.7772  | <b>0.0065</b>     |
|           | N        |               |                   |               | 6       | 12                |
| Cry1Ab    | R        |               |                   |               |         | 0.56281           |
|           | <i>p</i> |               |                   |               |         | 0.2449            |
|           | N        |               |                   |               |         | 6                 |

表 7.3 家蚕幼虫中脂肪酶活力( $\mu\text{mol/min/mg protein}$ )比较

|        | B-D1 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) | B-D4 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) | Non-B-D1 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) | Non-B-D4 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) | Cy1Ab ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) | CK ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) |                              |                            |                            |                           |                              |        |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|--------|
| 1 龄 1d | 0.0364 $\pm$ 0.0062<br>aA        | cB                               | 0.0346 $\pm$ 0.0044<br>aAB           | cC                                   | 0.0016 $\pm$ 0.0006<br>cC         | 0.0043 $\pm$ 0.0037<br>cC      | gF                           | 0.0348 $\pm$ 0.0024<br>aAB | abA                        | 0.0196 $\pm$ 0.0121<br>bB | eDDE                         |        |
| 1 龄 2d | 0.0395 $\pm$ 0.0008<br>aA        | bcb                              | 0.0127 $\pm$ 0.0025<br>cC            | dD                                   | 0.0385 $\pm$ 0.0033<br>aA         | cdCD                           | 0.0383 $\pm$ 0.0016<br>aA    | bcbCD                      | 0.0264 $\pm$ 0.0057<br>bB  | bA                        | 0.0433 $\pm$ 0.0056<br>aA    | bcdBC  |
| 1 龄 3d | 0.0390 $\pm$ 0.0044<br>abA       | bcb                              | 0.0104 $\pm$ 0.0026<br>cB            | dDE                                  | 0.0372 $\pm$ 0.0056<br>abA        | cdCD                           | 0.0366 $\pm$ 0.0104<br>abA   | bcdBCD                     | 0.0276 $\pm$ 0.0041<br>bA  | bA                        | 0.0402 $\pm$ 0.0066<br>aA    | bcdBCD |
| 1 龄 4d | 0.0400 $\pm$ 0.0015<br>aA        | bcb                              | 0.0403 $\pm$ 0.0017<br>aA            | bcbC                                 | 0.0121 $\pm$ 0.0006<br>bB         | fFG                            | 0.0181 $\pm$ 0.0106<br>bAB   | cEgDEF                     | 0.0358 $\pm$ 0.0152<br>aA  | abA                       | 0.0345 $\pm$ 0.0043<br>aA    | cdeBCD |
| 1 龄 5d | —                                | —                                | 0.0410 $\pm$ 0.0014<br>a             | bcbC                                 | —                                 | —                              | —                            | —                          | 0.0415 $\pm$ 0.0019<br>a   | aA                        | —                            | —      |
| 2 龄初   | 0.0087 $\pm$ 0.0013<br>cC        | dC                               | 0.0019 $\pm$ 0.0010<br>dC            | eE                                   | 0.0288 $\pm$ 0.0056<br>aA         | deDE                           | 0.0304 $\pm$ 0.0026<br>aA    | bcdBCD                     | 0.0056 $\pm$ 0.0010<br>cdC | cB                        | 0.0192 $\pm$ 0.0026<br>bB    | eDDE   |
| 2 龄末   | 0.0461 $\pm$ 0.0010<br>aA        | bB                               | 0.0446 $\pm$ 0.0027<br>aA            | bBC                                  | 0.0279 $\pm$ 0.0020<br>bB         | deDE                           | 0.0220 $\pm$ 0.0083<br>bB    | cdeBCDEF                   | 0.0418 $\pm$ 0.0020<br>aA  | aA                        | 0.0102 $\pm$ 0.0018<br>cC    | fE     |
| 3 龄初   | 0.0389 $\pm$ 0.0020<br>bA        | bcb                              | 0.0453 $\pm$ 0.0024<br>aA            | bBC                                  | 0.0461 $\pm$ 0.0014<br>aA         | bcbC                           | 0.0458 $\pm$ 0.0031<br>aA    | bB                         | —                          | —                         | 0.0427 $\pm$ 0.0053<br>abA   | bcdBC  |
| 3 龄末   | 0.0465 $\pm$ 0.0064<br>bBCD      | bB                               | 0.0694 $\pm$ 0.0018<br>aA            | aA                                   | 0.0467 $\pm$ 0.0091<br>bBC        | bcbC                           | 0.0295 $\pm$ 0.0071<br>cCE   | bcdBCDE                    | —                          | —                         | 0.0567 $\pm$ 0.0048<br>bAB   | bB     |
| 4 龄初   | 0.0052 $\pm$ 0.0019<br>cB        | dC                               | 0.0470 $\pm$ 0.0019<br>aA            | bB                                   | 0.0200 $\pm$ 0.0129<br>bcbAB      | eDEF                           | 0.0065 $\pm$ 0.0034<br>cB    | fEgEF                      | —                          | —                         | 0.0285 $\pm$ 0.0145<br>bAB   | deCDE  |
| 4 龄末   | 0.0407 $\pm$ 0.0087<br>a         | bcb                              | 0.0421 $\pm$ 0.0107<br>a             | bcbC                                 | 0.0564 $\pm$ 0.0026<br>a          | bB                             | 0.0439 $\pm$ 0.0172<br>a     | bBC                        | —                          | —                         | 0.0514 $\pm$ 0.0023<br>a     | bcbC   |
| 5 龄初   | 0.0132 $\pm$ 0.0066<br>cB        | dC                               | 0.0128 $\pm$ 0.0081<br>cB            | dD                                   | 0.0347 $\pm$ 0.0027<br>abAB       | dCD                            | 0.0200 $\pm$ 0.0152<br>bcdAB | deGDEF                     | —                          | —                         | 0.0408 $\pm$ 0.0046<br>aA    | bcdBCD |
| 5 龄末   | 0.0819 $\pm$ 0.0072<br>cBC       | aA                               | 0.0717 $\pm$ 0.0032<br>cC            | aA                                   | 0.1152 $\pm$ 0.0060<br>aA         | aA                             | 0.1102 $\pm$ 0.0114<br>abAB  | aA                         | —                          | —                         | 0.0906 $\pm$ 0.0211<br>bcdBC | aA     |

表 7.4 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠脂肪酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4         | Non-Bt-D1     | Non-Bt-D4         | Cry1Ab        | CK            |
|-----------|----------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|
| Bt-D1     | R        | 0.61127       | 0.68581       | 0.74663           | 0.93324       | 0.66296       |
|           | <i>p</i> | <b>0.0347</b> | <b>0.0138</b> | <b>0.0053</b>     | <b>0.0065</b> | <b>0.0188</b> |
|           | N        | 12            | 12            | 12                | 6             | 12            |
| Bt-D4     | R        |               | 0.4632        | 0.37827           | 0.90126       | 0.51277       |
|           | <i>p</i> |               | 0.1294        | 0.2253            | <b>0.0056</b> | 0.0882        |
|           | N        |               | 12            | 12                | 7             | 12            |
| Non-Bt-D1 | R        |               |               | 0.96232           | -0.35688      | 0.88725       |
|           | <i>p</i> |               |               | <b>&lt;0.0001</b> | 0.4874        | <b>0.0001</b> |
|           | N        |               |               | 12                | 6             | 12            |
| Non-Bt-D4 | R        |               |               |                   | -0.47158      | 0.84136       |
|           | <i>p</i> |               |               |                   | 0.3451        | <b>0.0006</b> |
|           | N        |               |               |                   | 6             | 12            |
| Cry1Ab    | R        |               |               |                   |               | -0.09967      |
|           | <i>p</i> |               |               |                   |               | 0.851         |
|           | N        |               |               |                   |               | 6             |

表 7.5 家蚕幼虫中脲总氮白酶比活力(U/min/mg protein)比较

|        | Bi-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ )   | Bi-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ )   | Non-Bi-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Non-Bi-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Cy1Ab ( $\bar{x} \pm SD$ )  | CK ( $\bar{x} \pm SD$ )     |
|--------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 龄 1d | 0.4625 $\pm$ 0.2136<br>bcBC  | 0.2763 $\pm$ 0.0782<br>cdBC  | 0.0962 $\pm$ 0.0238<br>dC      | 0.2886 $\pm$ 0.0513<br>cdBC    | 0.6453 $\pm$ 0.1014<br>baB  | 0.9362 $\pm$ 0.1475<br>aA   |
| 1 龄 2d | 0.2199 $\pm$ 0.0587<br>cdB   | 0.1645 $\pm$ 0.0673<br>dB    | 0.7993 $\pm$ 0.0751<br>aA      | 0.3315 $\pm$ 0.0473<br>cB      | 0.3190 $\pm$ 0.0658<br>cB   | 0.6590 $\pm$ 0.0655<br>bA   |
| 1 龄 3d | 0.3158 $\pm$ 0.0939<br>cB    | 0.3378 $\pm$ 0.1311<br>cB    | 0.7111 $\pm$ 0.0821<br>aA      | 0.5990 $\pm$ 0.1388<br>abAB    | 0.4836 $\pm$ 0.1712<br>abAB | 0.3972 $\pm$ 0.1665<br>bcAB |
| 1 龄 4d | 0.2814 $\pm$ 0.0871<br>bcABC | 0.2728 $\pm$ 0.1098<br>bcABC | 0.2366 $\pm$ 0.0894<br>bcBC    | 0.3963 $\pm$ 0.1193<br>abAB    | 0.4957 $\pm$ 0.0223<br>aA   | 0.1472 $\pm$ 0.0252<br>cC   |
| 1 龄 5d | —                            | 0.7745 $\pm$ 0.1384<br>aA    | —                              | —                              | 0.3653 $\pm$ 0.1348<br>baA  | —                           |
| 2 龄初   | 0.2499 $\pm$ 0.0290<br>cA    | 0.3659 $\pm$ 0.0561<br>abA   | 0.2729 $\pm$ 0.0928<br>bcA     | 0.0587 $\pm$ 0.0189<br>dB      | 0.3948 $\pm$ 0.0827<br>baB  | 0.2716 $\pm$ 0.0256<br>bcA  |
| 2 龄末   | 0.0232 $\pm$ 0.0116<br>dC    | 0.4302 $\pm$ 0.1069<br>bB    | 0.7281 $\pm$ 0.0670<br>aA      | 0.2871 $\pm$ 0.0630<br>cB      | 0.1126 $\pm$ 0.0502<br>dC   | 0.6505 $\pm$ 0.0304<br>aA   |
| 3 龄初   | 0.2485 $\pm$ 0.0349<br>cC    | 0.5030 $\pm$ 0.0481<br>bB    | 0.6563 $\pm$ 0.0529<br>aA      | 0.5051 $\pm$ 0.0809<br>bB      | —                           | 0.6827 $\pm$ 0.0085<br>aA   |
| 3 龄末   | 1.3243 $\pm$ 0.1462<br>aA    | 0.5901 $\pm$ 0.0431<br>cC    | 0.8216 $\pm$ 0.0635<br>bB      | 0.9634 $\pm$ 0.0628<br>bB      | —                           | 1.2116 $\pm$ 0.0751<br>aA   |
| 4 龄初   | 0.3990 $\pm$ 0.0503<br>cBC   | 0.5044 $\pm$ 0.0397<br>bB    | 0.7019 $\pm$ 0.0617<br>aA      | 0.3092 $\pm$ 0.0428<br>cC      | —                           | 0.3280 $\pm$ 0.0377<br>cC   |
| 4 龄末   | 0.6835 $\pm$ 0.0695<br>eD    | 1.9665 $\pm$ 0.1334<br>bA    | 1.6220 $\pm$ 0.0866<br>cB      | 2.1682 $\pm$ 0.0664<br>aA      | —                           | 1.1374 $\pm$ 0.0396<br>dC   |
| 5 龄初   | 0.7513 $\pm$ 0.0196<br>cB    | 0.8313 $\pm$ 0.0388<br>cB    | 0.4114 $\pm$ 0.0391<br>dC      | 0.9751 $\pm$ 0.0707<br>baA     | —                           | 1.0603 $\pm$ 0.0450<br>aA   |
| 5 龄末   | 2.4867 $\pm$ 0.0989<br>cB    | 1.4908 $\pm$ 0.0832<br>dC    | 3.3728 $\pm$ 0.1647<br>aA      | 2.4322 $\pm$ 0.1287<br>cB      | —                           | 2.9695 $\pm$ 0.2630<br>baA  |



表 7.6 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠总蛋白酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4       | Non-Bt-D1     | Non-Bt-D4         | CryIAb        | CK                |
|-----------|----------|-------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| Bt-D1     | R        | 0.5981      | 0.83036       | 0.79532           | 0.98331       | 0.93138           |
|           | <i>p</i> | <b>0.04</b> | <b>0.0008</b> | <b>0.002</b>      | <b>0.0004</b> | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        | 12          | 12            | 12                | 6             | 12                |
| Bt-D4     | R        |             | 0.73626       | 0.9326            | -0.25472      | 0.65951           |
|           | <i>p</i> |             | <b>0.0063</b> | <b>&lt;0.0001</b> | 0.5815        | <b>0.0196</b>     |
|           | N        |             | 12            | 12                | 7             | 12                |
| Non-Bt-D1 | R        |             |               | 0.86618           | -0.69905      | 0.87852           |
|           | <i>p</i> |             |               | <b>0.0003</b>     | 0.1222        | <b>0.0002</b>     |
|           | N        |             |               | 12                | 6             | 12                |
| Non-Bt-D4 | R        |             |               |                   | 0.20366       | 0.82946           |
|           | <i>p</i> |             |               |                   | 0.6987        | <b>0.0008</b>     |
|           | N        |             |               |                   | 6             | 12                |
| CryIAb    | R        |             |               |                   |               | 0.03823           |
|           | <i>p</i> |             |               |                   |               | 0.9427            |
|           | N        |             |               |                   |               | 6                 |

表 7.7 家蚕幼虫中肠类胰蛋白酶活力(mmol/min/mg protein)比较

|        | B-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ )          |     | B-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ )          | Non-B-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ )      | Non-B-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ )       | Cy1Ab ( $\bar{x} \pm SD$ )         | CK ( $\bar{x} \pm SD$ )             |
|--------|------------------------------------|-----|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 龄 1d | 0.4322 $\pm$ 0.00428 <sup>aA</sup> | dD  | 0.2167 $\pm$ 0.0377 <sup>bB</sup>  | 0.2014 $\pm$ 0.0745 <sup>bB</sup>  | 0.2420 $\pm$ 0.0154 <sup>bB</sup>   | 0.5094 $\pm$ 0.1494 <sup>aA</sup>  | 0.5109 $\pm$ 0.0368 <sup>aA</sup>   |
| 1 龄 2d | 0.2373 $\pm$ 0.0167 <sup>cC</sup>  | eEF | 0.2450 $\pm$ 0.0226 <sup>cC</sup>  | 0.4938 $\pm$ 0.0000 <sup>aA</sup>  | 0.3081 $\pm$ 0.0451 <sup>cBC</sup>  | 0.2403 $\pm$ 0.0998 <sup>cC</sup>  | 0.3971 $\pm$ 0.0355 <sup>bAB</sup>  |
| 1 龄 3d | 0.1888 $\pm$ 0.0143 <sup>bC</sup>  | F   | 0.2234 $\pm$ 0.0416 <sup>bBC</sup> | 0.4197 $\pm$ 0.0247 <sup>aAB</sup> | 0.4317 $\pm$ 0.1426 <sup>aA</sup>   | 0.2269 $\pm$ 0.0210 <sup>bBC</sup> | 0.2808 $\pm$ 0.0988 <sup>bABC</sup> |
| 1 龄 4d | 0.2054 $\pm$ 0.0463 <sup>cB</sup>  | F   | 0.1400 $\pm$ 0.0255 <sup>dC</sup>  | 0.2664 $\pm$ 0.0128 <sup>bB</sup>  | 0.3380 $\pm$ 0.0178 <sup>aA</sup>   | 0.2300 $\pm$ 0.0115 <sup>bCB</sup> | 0.0694 $\pm$ 0.0114 <sup>dD</sup>   |
| 1 龄 5d | —                                  | —   | 0.3782 $\pm$ 0.0739 <sup>aA</sup>  | —                                  | —                                   | 0.1435 $\pm$ 0.0215 <sup>bB</sup>  | —                                   |
| 2 龄初   | 0.3358 $\pm$ 0.0429 <sup>aA</sup>  | dE  | 0.3529 $\pm$ 0.0619 <sup>aA</sup>  | 0.3049 $\pm$ 0.0384 <sup>aAB</sup> | 0.2059 $\pm$ 0.0258 <sup>bC</sup>   | 0.1857 $\pm$ 0.0123 <sup>bBC</sup> | 0.2302 $\pm$ 0.0050 <sup>bBC</sup>  |
| 2 龄末   | 0.0382 $\pm$ 0.0069 <sup>dD</sup>  | gG  | 0.3223 $\pm$ 0.0329 <sup>bB</sup>  | 0.4828 $\pm$ 0.0285 <sup>aA</sup>  | 0.1043 $\pm$ 0.0162 <sup>cC</sup>   | 0.0151 $\pm$ 0.0024 <sup>dD</sup>  | 0.3215 $\pm$ 0.0311 <sup>bB</sup>   |
| 3 龄初   | 0.2150 $\pm$ 0.0275 <sup>cB</sup>  | EF  | 0.3627 $\pm$ 0.0107 <sup>bA</sup>  | 0.4013 $\pm$ 0.0427 <sup>aBA</sup> | 0.2022 $\pm$ 0.0208 <sup>cB</sup>   | —                                  | 0.4605 $\pm$ 0.0757 <sup>aA</sup>   |
| 3 龄末   | 1.1399 $\pm$ 0.0167 <sup>aA</sup>  | BB  | 0.8059 $\pm$ 0.0421 <sup>bB</sup>  | 0.6503 $\pm$ 0.0377 <sup>cB</sup>  | 1.1198 $\pm$ 0.1173 <sup>aA</sup>   | —                                  | 1.0420 $\pm$ 0.0357 <sup>aA</sup>   |
| 4 龄初   | 0.2253 $\pm$ 0.0244 <sup>cC</sup>  | EF  | 0.3736 $\pm$ 0.0247 <sup>bB</sup>  | 0.6616 $\pm$ 0.0230 <sup>aA</sup>  | 0.1584 $\pm$ 0.0174 <sup>dD</sup>   | —                                  | 0.2009 $\pm$ 0.0132 <sup>cCD</sup>  |
| 4 龄末   | 1.0976 $\pm$ 0.0230 <sup>cC</sup>  | BB  | 2.2578 $\pm$ 0.0604 <sup>bB</sup>  | 2.3937 $\pm$ 0.0778 <sup>bB</sup>  | 3.8087 $\pm$ 0.2587 <sup>aA</sup>   | —                                  | 2.4421 $\pm$ 0.1145 <sup>bB</sup>   |
| 5 龄初   | 0.5933 $\pm$ 0.0071 <sup>cCD</sup> | cC  | 0.6076 $\pm$ 0.0369 <sup>cC</sup>  | 0.4934 $\pm$ 0.0353 <sup>dD</sup>  | 0.7161 $\pm$ 0.0355 <sup>bB</sup>   | —                                  | 1.0296 $\pm$ 0.0603 <sup>aA</sup>   |
| 5 龄末   | 3.7845 $\pm$ 0.1729 <sup>bB</sup>  | aA  | 1.8772 $\pm$ 0.1499 <sup>cC</sup>  | 4.9415 $\pm$ 0.0888 <sup>aA</sup>  | 4.3003 $\pm$ 0.7538 <sup>abAB</sup> | —                                  | 3.8902 $\pm$ 0.1392 <sup>aA</sup>   |

表 7.8 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠类胰蛋白酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4         | Non-Bt-D1         | Non-Bt-D4         | Cry1Ab        | CK                |
|-----------|----------|---------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|
| Bt-D1     | R        | 0.74665       | 0.94447           | 0.8553            | 0.84124       | 0.93611           |
|           | <i>p</i> | <b>0.0053</b> | <b>&lt;0.0001</b> | <b>0.0004</b>     | <b>0.0358</b> | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        | 12            | 12                | 12                | 6             | 12                |
| Bt-D4     | R        |               | 0.84558           | 0.96945           | -0.51512      | 0.91435           |
|           | <i>p</i> |               | <b>0.0005</b>     | <b>&lt;0.0001</b> | 0.2367        | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        |               | 12                | 12                | 7             | 12                |
| Non-Bt-D1 | R        |               |                   | 0.93016           | -0.6942       | 0.96273           |
|           | <i>p</i> |               |                   | <b>&lt;0.0001</b> | 0.126         | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        |               |                   | 12                | 6             | 12                |
| Non-Bt-D4 | R        |               |                   |                   | 0.33747       | 0.96703           |
|           | <i>p</i> |               |                   |                   | 0.513         | <b>&lt;0.0001</b> |
|           | N        |               |                   |                   | 6             | 12                |
| Cry1Ab    | R        |               |                   |                   |               | 0.48962           |
|           | <i>p</i> |               |                   |                   |               | 0.3243            |
|           | N        |               |                   |                   |               | 6                 |

表 7.9 家蚕幼虫中肠类胰凝乳蛋白酶比活力(nmol/min/mg protein)比较

|        | Bt-D1   | Bt-D4   | Non-Bt-D1 | Non-Bt-D4 | Cry1Ab  | CK      |
|--------|---------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
| 1 龄 1d | 17.0348 | 12.1542 | 14.8020   | 15.3713   | 24.8183 | 6.7581  |
| 1 龄 2d | 5.3366  | 17.4115 | 12.9983   | 3.2690    | 5.5678  | 8.2322  |
| 1 龄 3d | 13.7790 | 12.3712 | 7.7013    | 12.5841   | 12.1706 | 5.3460  |
| 1 龄 4d | 3.5514  | 6.5459  | 4.1303    | 14.2896   | 9.4051  | 8.3014  |
| 1 龄 5d | —       | 9.4293  | —         | —         | 5.2732  | —       |
| 2 龄初   | 6.0771  | 7.5991  | 15.2432   | 5.9357    | 6.8289  | 8.3193  |
| 2 龄末   | 7.7339  | 13.7084 | 5.3955    | 24.1368   | 10.9660 | 4.1078  |
| 3 龄初   | 10.6359 | 6.7479  | 17.2453   | 7.8424    | —       | 11.9487 |
| 3 龄末   | 1.6000  | 5.6722  | 3.9089    | 9.1228    | —       | 1.6041  |
| 4 龄初   | 4.9626  | 3.0733  | 3.6649    | 1.8833    | —       | 0.9253  |
| 4 龄末   | 4.6939  | 5.4952  | 6.7114    | 2.6122    | —       | 3.9699  |
| 5 龄初   | 5.6358  | 4.0934  | 8.9036    | 9.6967    | —       | 5.2226  |
| 5 龄末   | 4.3670  | 7.2321  | 8.5037    | 3.8245    | —       | 2.3111  |

表 7.10 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠类胰凝乳蛋白酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4   | Non-Bt-D1 | Non-Bt-D4 | Cry1Ab        | CK            |
|-----------|----------|---------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| Bt-D1     | R        | 0.44199 | 0.52871   | 0.40101   | 0.85978       | 0.36969       |
|           | <i>p</i> | 0.1502  | 0.0772    | 0.1964    | <b>0.0281</b> | 0.2369        |
|           | N        | 12      | 12        | 12        | 6             | 12            |
| Bt-D4     | R        |         | 0.31877   | 0.38195   | 0.08883       | 0.30287       |
|           | <i>p</i> |         | 0.3126    | 0.2205    | 0.8498        | 0.3386        |
|           | N        |         | 12        | 12        | 7             | 12            |
| Non-Bt-D1 | R        |         |           | -0.13086  | 0.20524       | 0.75196       |
|           | <i>p</i> |         |           | 0.6852    | 0.6965        | <b>0.0048</b> |
|           | N        |         |           | 12        | 6             | 12            |
| Non-Bt-D4 | R        |         |           |           | 0.44296       | 0.1165        |
|           | <i>p</i> |         |           |           | 0.379         | 0.7184        |
|           | N        |         |           |           | 6             | 12            |
| Cry1Ab    | R        |         |           |           |               | -0.30517      |
|           | <i>p</i> |         |           |           |               | 0.5565        |
|           | N        |         |           |           |               | 6             |

表 7.11 家蚕幼虫中肠类弹性蛋白酶比活力(nmol/min/mg protein)比较

|        | BT-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | BT-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | ghGH | Non-Bt-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | IG   | Non-Bt-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | fgEF                      | CryIAb ( $\bar{x} \pm SD$ ) | CK ( $\bar{x} \pm SD$ )     |
|--------|----------------------------|----------------------------|------|--------------------------------|------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 龄 1d | 5.5412 $\pm$ 0.1222<br>eC  | 3.6049 $\pm$ 0.0754<br>dD  | ghGH | 2.2485 $\pm$ 0.0903<br>eE      | IG   | 3.6091 $\pm$ 0.0364<br>dD      | fgEF                      | 8.3626 $\pm$ 0.2693<br>aA   | 6.5524 $\pm$ 0.2449<br>fF   |
| 1 龄 2d | 3.8256 $\pm$ 0.1481<br>cdC | 3.3444 $\pm$ 0.0870<br>dC  | hH   | 10.4284 $\pm$ 0.7947<br>aA     | aA   | 4.5778 $\pm$ 0.5093<br>cC      | deD                       | 3.7503 $\pm$ 0.2632<br>cdC  | 8.0376 $\pm$ 0.8845<br>eE   |
| 1 龄 3d | 3.1392 $\pm$ 0.2164<br>eD  | 4.0586 $\pm$ 0.3730<br>cdC | fgFG | 8.2080 $\pm$ 0.5466<br>aA      | bcB  | 6.9649 $\pm$ 0.2766<br>bbB     | bcBC                      | 4.3928 $\pm$ 0.1643<br>cC   | 3.5978 $\pm$ 0.2360<br>deCD |
| 1 龄 4d | 3.7068 $\pm$ 0.1301<br>bB  | 2.2651 $\pm$ 0.0212<br>dD  | II   | 3.1310 $\pm$ 0.0667<br>cC      | hFG  | 5.0397 $\pm$ 0.0697<br>aA      | dD                        | 3.6073 $\pm$ 0.0377<br>bbB  | 1.1897 $\pm$ 0.0113<br>eE   |
| 1 龄 5d | —                          | 5.3528 $\pm$ 0.0833<br>aA  | deDE | —                              | —    | —                              | 2.8405 $\pm$ 0.0774<br>dD | —                           | —                           |
| 2 龄初   | 6.4829 $\pm$ 0.1979<br>aA  | 4.2636 $\pm$ 0.2780<br>bB  | fF   | 4.4343 $\pm$ 0.2192<br>bbB     | fgDE | 2.4926 $\pm$ 0.0744<br>cC      | hG                        | 2.5764 $\pm$ 0.0746<br>cC   | 4.3546 $\pm$ 0.1316<br>bbB  |
| 2 龄末   | 1.0423 $\pm$ 0.0254<br>dD  | 7.7872 $\pm$ 0.3394<br>bB  | cC   | 7.9199 $\pm$ 0.5441<br>bbB     | cBC  | 3.1269 $\pm$ 0.2312<br>cC      | ghFG                      | 0.9490 $\pm$ 0.1508<br>dD   | 10.3176 $\pm$ 0.7361<br>aA  |
| 3 龄初   | 3.9828 $\pm$ 0.2285<br>cC  | 4.0153 $\pm$ 0.0918<br>cC  | fgFG | 7.0809 $\pm$ 0.4912<br>bbB     | dC   | 4.2460 $\pm$ 0.0497<br>cC      | efDE                      | —                           | 9.1532 $\pm$ 0.5117<br>cdCD |
| 3 龄末   | 7.7232 $\pm$ 0.3083<br>aA  | 5.3612 $\pm$ 0.5053<br>cC  | deDE | 5.3514 $\pm$ 0.2606<br>cC      | eD   | 6.3938 $\pm$ 0.3812<br>bbB     | cC                        | —                           | 5.5531 $\pm$ 0.2771<br>cBC  |
| 4 龄初   | 2.8070 $\pm$ 0.0247<br>cC  | 4.9440 $\pm$ 0.2489<br>aA  | eE   | 3.8625 $\pm$ 0.1164<br>bbB     | gEF  | 2.5137 $\pm$ 0.1152<br>dC      | hG                        | —                           | 0.9809 $\pm$ 0.0183<br>eD   |
| 4 龄末   | 6.8685 $\pm$ 0.3318<br>dC  | 10.8738 $\pm$ 0.4026<br>bA | aA   | 10.0673 $\pm$ 0.2940<br>cB     | aA   | 11.3835 $\pm$ 0.0873<br>aA     | aA                        | —                           | 9.6592 $\pm$ 0.1410<br>cB   |
| 5 龄初   | 7.6080 $\pm$ 0.1813<br>cC  | 10.0577 $\pm$ 0.3310<br>bB | bB   | 5.0429 $\pm$ 0.2458<br>dD      | eD   | 11.4683 $\pm$ 0.7794<br>aA     | aA                        | —                           | 11.7994 $\pm$ 0.4256<br>aA  |
| 5 龄末   | 8.9592 $\pm$ 0.1192<br>aA  | 5.7369 $\pm$ 0.0609<br>cC  | dD   | 8.7786 $\pm$ 0.3354<br>aA      | bbB  | 7.4431 $\pm$ 0.7762<br>bbB     | bbB                       | —                           | 8.6300 $\pm$ 0.1334<br>aA   |

表 7.12 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠类弹性蛋白酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4   | Non-Bt-D1 | Non-Bt-D4     | Cry1Ab   | CK            |
|-----------|----------|---------|-----------|---------------|----------|---------------|
| Bt-D1     | R        | 0.31797 | -0.00363  | 0.57144       | 0.50921  | 0.28636       |
|           | <i>p</i> | 0.3138  | 0.9911    | 0.0523        | 0.3022   | 0.3669        |
|           | N        | 12      | 12        | 12            | 6        | 12            |
| Bt-D4     | R        |         | 0.34133   | 0.71633       | -0.56343 | 0.66674       |
|           | <i>p</i> |         | 0.2776    | <b>0.0088</b> | 0.1878   | <b>0.0179</b> |
|           | N        |         | 12        | 12            | 7        | 12            |
| Non-Bt-D1 | R        |         |           | 0.36954       | -0.47342 | 0.50818       |
|           | <i>p</i> |         |           | 0.2371        | 0.3429   | 0.0916        |
|           | N        |         |           | 12            | 6        | 12            |
| Non-Bt-D4 | R        |         |           |               | 0.19258  | 0.49673       |
|           | <i>p</i> |         |           |               | 0.7147   | 0.1004        |
|           | N        |         |           |               | 6        | 12            |
| Cry1Ab    | R        |         |           |               |          | -0.19878      |
|           | <i>p</i> |         |           |               |          | 0.7058        |
|           | N        |         |           |               |          | 6             |

表 7.13 家蚕幼虫中肠氨基酸酯比活力(nmol/min/mg protein)比较

|        | Be-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | Ile-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | eDE  | Non-Bc-D1 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | IgDE  | Non-Bc-D4 ( $\bar{x} \pm SD$ ) | CryIAb ( $\bar{x} \pm SD$ )  | CK ( $\bar{x} \pm SD$ )     |
|--------|----------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------|-------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 龄 1d | 0.9204 $\pm$ 0.1167<br>bB  | 0.8855 $\pm$ 0.1958<br>bB   | eDE  | 0.6511 $\pm$ 0.1386<br>cdBC    | fgDE  | 0.4577 $\pm$ 0.0101<br>dC      | 1.6872 $\pm$ 0.1294<br>aA    | 0.7762 $\pm$ 0.0425<br>bcBC |
| 1 龄 2d | 0.5980 $\pm$ 0.0294<br>eE  | 0.9254 $\pm$ 0.0272<br>aA   | eDE  | 0.7645 $\pm$ 0.0923<br>bB      | eDE   | 0.6103 $\pm$ 0.0274<br>cC      | 0.7504 $\pm$ 0.0328<br>bB    | 0.6029 $\pm$ 0.0516<br>cC   |
| 1 龄 3d | 0.6088 $\pm$ 0.0847<br>eE  | 1.0839 $\pm$ 0.1743<br>aA   | cdcd | 0.6221 $\pm$ 0.0314<br>cBC     | gE    | 0.6872 $\pm$ 0.0546<br>bcBC    | 0.5546 $\pm$ 0.0425<br>cC    | 0.8182 $\pm$ 0.0601<br>bB   |
| 1 龄 4d | 0.4532 $\pm$ 0.0177<br>dC  | 0.6317 $\pm$ 0.1048<br>bcB  | fEF  | 0.6657 $\pm$ 0.0557<br>bB      | fgDE  | 0.8425 $\pm$ 0.0647<br>aA      | 0.5497 $\pm$ 0.0471<br>bcdBC | 0.5386 $\pm$ 0.0532<br>cdBC |
| 1 龄 5d | —                          | 1.1005 $\pm$ 0.0128<br>aA   | cdcd | —                              | —     | —                              | 0.7076 $\pm$ 0.0293<br>bB    | —                           |
| 2 龄初   | 1.0858 $\pm$ 0.0145<br>aA  | 0.9053 $\pm$ 0.0619<br>bB   | eDE  | 0.7522 $\pm$ 0.0334<br>cC      | efgDE | 0.8849 $\pm$ 0.0616<br>bB      | 1.0572 $\pm$ 0.0616<br>aA    | 0.3733 $\pm$ 0.0330<br>dD   |
| 2 龄末   | 0.3803 $\pm$ 0.0356<br>dC  | 1.0444 $\pm$ 0.0554<br>aA   | deCD | 0.8160 $\pm$ 0.1000<br>bAB     | eD    | 0.7759 $\pm$ 0.0568<br>bcAB    | 0.6061 $\pm$ 0.2191<br>cBC   | 0.9665 $\pm$ 0.0329<br>aBA  |
| 3 龄初   | 0.9254 $\pm$ 0.0755<br>bBC | 1.2841 $\pm$ 0.1239<br>aA   | cC   | 1.0421 $\pm$ 0.0356<br>bB      | dC    | 0.6750 $\pm$ 0.0083<br>cD      | —                            | 0.7378 $\pm$ 0.0642<br>cCD  |
| 3 龄末   | 1.1390 $\pm$ 0.0260<br>cCD | 1.8389 $\pm$ 0.0778<br>aA   | bB   | 1.1809 $\pm$ 0.0277<br>cC      | cC    | 1.5898 $\pm$ 0.0599<br>bB      | —                            | 0.9770 $\pm$ 0.0961<br>dD   |
| 4 龄初   | 0.3683 $\pm$ 0.0218<br>eE  | 0.5272 $\pm$ 0.0087<br>cC   | fF   | 1.0673 $\pm$ 0.0217<br>aA      | cdC   | 0.4716 $\pm$ 0.0222<br>dD      | —                            | 0.7562 $\pm$ 0.0134<br>bB   |
| 4 龄末   | 1.4350 $\pm$ 0.0430<br>cC  | 1.1899 $\pm$ 0.0184<br>dD   | cdCD | 1.6682 $\pm$ 0.1461<br>bB      | bB    | 2.7380 $\pm$ 0.0931<br>aA      | —                            | 1.2980 $\pm$ 0.0694<br>cdCD |
| 5 龄初   | 0.4192 $\pm$ 0.0245<br>bB  | 0.6448 $\pm$ 0.0161<br>aA   | fEF  | 0.4073 $\pm$ 0.0110<br>bB      | hF    | 0.3886 $\pm$ 0.0444<br>bB      | —                            | 0.6037 $\pm$ 0.0030<br>aA   |
| 5 龄末   | 5.9914 $\pm$ 0.1369<br>aA  | 3.8027 $\pm$ 0.3246<br>cC   | aA   | 4.4024 $\pm$ 0.0394<br>bcBC    | aA    | 5.2152 $\pm$ 1.0403<br>abAB    | —                            | 2.5234 $\pm$ 0.0927<br>dD   |

表 7.14 不同处理后家蚕不同幼虫阶段中肠氨肽酶比活力的相关分析

|           |          | Bt-D4   | Non-Bt-D1 | Non-Bt-D4 | Cry1Ab   | CK      |
|-----------|----------|---------|-----------|-----------|----------|---------|
| Bt-D1     | R        | 0.95133 | 0.97288   | 0.94102   | 0.74912  | 0.92112 |
|           | <i>p</i> | <0.0001 | <0.0001   | <0.0001   | 0.0865   | <0.0001 |
|           | N        | 12      | 12        | 12        | 6        | 12      |
| Bt-D4     | R        |         | 0.93416   | 0.90958   | -0.12458 | 0.91811 |
|           | <i>p</i> |         | <0.0001   | <0.0001   | 0.7901   | <0.0001 |
|           | N        |         | 12        | 12        | 7        | 12      |
| Non-Bt-D1 | R        |         |           | 0.96269   | -0.19304 | 0.9576  |
|           | <i>p</i> |         |           | <0.0001   | 0.714    | <0.0001 |
|           | N        |         |           | 12        | 6        | 12      |
| Non-Bt-D4 | R        |         |           |           | -0.60517 | 0.94384 |
|           | <i>p</i> |         |           |           | 0.2031   | <0.0001 |
|           | N        |         |           |           | 6        | 12      |
| Cry1Ab    | R        |         |           |           |          | -0.0911 |
|           | <i>p</i> |         |           |           |          | 0.8637  |
|           | N        |         |           |           |          | 6       |



## 第八章 转 Bt 基因水稻花粉对家蚕的组织病理学效应

苏云金杆菌杀虫晶体蛋白 (ICPs) 引起鳞翅目幼虫中肠细胞的病理变化, 国内外已有较多报道 (Sutter 等, 1967; Ebersold 等, 1977; Lacey 等, 1979; Endo 等, 1980; 1981; Lüthy 等, 1981; Percy 等, 1983; Mathavan 等, 1989; 王程等, 1991; 项秀芬等, 1996)。然而, 有关转 Bt 基因抗虫作物中表达的经人为修饰的活性肽对鳞翅目幼虫中肠细胞病变的影响, 除王世贵 (2002) 对二化螟取食转 Bt 基因水稻 KMD1 号后的中肠细胞超微结构曾有观察外, 尚未见有其它报道。本章报道 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫中肠细胞的组织病理学影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试水稻品系、花粉采集与 D4 浓度花粉悬浮液配制以及桑叶处理等详见第四章 1.1 和 1.3~1.5。家蚕品种: 秋丰×白玉, 蚕卵购于浙江省蚕种公司。

#### 1.2 试验处理与电镜观察

取家蚕初孵幼虫若干头分别饲喂 D4 浓度 Bt 和非 Bt 水稻花粉, 同时设以 0.5 $\mu$ g/ml Cry1Ab 纯蛋白作相同处理的阳性对照。在不同处理 12h、24h、48h 和 72h 后分别取样。将取样的家蚕幼虫置于载玻片上冰冷的生理盐水中, 在双筒解剖镜下截取其中肠后放于 2.5% 戊二醛固定液中预固定。

超薄切片样品的制备过程如下: 从预固定液中取出中肠, 用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 pH7.2 漂洗三次, 每次 15min。尔后投入 1%四氧化锇固定液中常温固定 1h, 结束后重复磷酸缓冲液的漂洗过程。再将固定好的中肠样品投入系列浓度梯度酒精 (50%、70%、80%、90%、95%、100%) 以及丙酮中脱水, 脱水过程除 100%酒精和丙酮处理 20min 外, 其余均为 15min。然后经 812 环氧树脂包埋, 用 LKB-8800 型超薄切片机切片。

将切片样品置于 2%醋酸双氧铀酒精液中染色 30 分钟, 柠檬酸铅复染 15 分钟, 最后在 JEM-1230 型透射电镜下观察并拍照, 加速电压为 60KV。

### 2 结果

在家蚕幼虫肠道内, 被摄入的水稻花粉颗粒清晰可见 (图 8.1-1)。

家蚕幼虫持续饲喂非 Bt 水稻花粉后, 中肠细胞的结构随处理时间延长均少有变化。图 8.1-2 和图 8.1-3 分别示意非 Bt 水稻花粉处理 12h 内的中肠细胞微绒毛和内质网。

Bt 毒蛋白处理 12h 内的家蚕幼虫中肠细胞内质网端池出现肿胀 (图 8.1-4, 箭头示意处), 并有空泡产生, 其它细胞结构无明显变化。经毒蛋白处理的 24h 内, 发现中肠细胞内空泡明显增大、增多 (图 8.1-5), 在中肠细胞靠近微绒毛处存在明显的质膜褶 (图 8.1-6, 箭头示

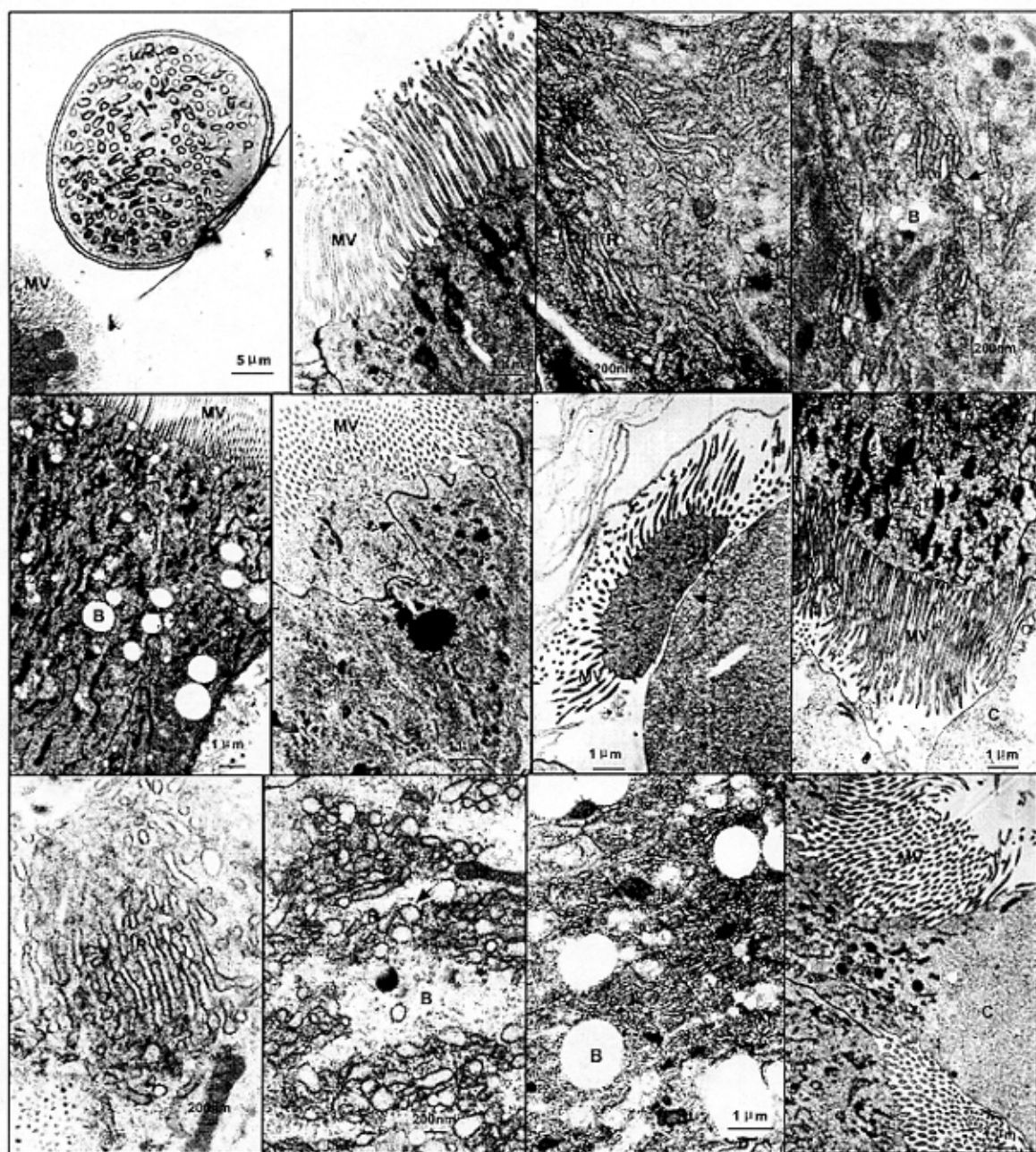
意处)，连片的微绒毛沿质膜褶出现脱落（图 8.1-7），大量细胞质流入肠腔内（图 8.1-8）。

经 Bt 水稻花粉处理的 12h 内，家蚕幼虫中肠细胞内质网端池出现轻度肿胀，并且网状组织膜间距离稍有增大（图 8.1-9），其它细胞结构未有明显变化。Bt 水稻花粉处理 24h 内，幼虫中肠细胞内质网肿胀呈球形，并伴有空泡产生（图 8.1-10）；此后中肠细胞空泡不断增大、增多（图 8.1-11）；最终中肠细胞破裂，大量胞质外流至肠腔内（图 8.1-12）。

### 3 讨论

家蚕幼虫持续饲喂高浓度 Bt 水稻花粉，其中肠细胞出现与 Bt 毒蛋白作用相似的组织病理变化，表明 Bt 水稻花粉中表达的毒蛋白活性肽确实可对家蚕幼虫造成严重的病理学影响。Bt 水稻花粉对家蚕幼虫中肠细胞的病变过程比 Bt Cry1Ab 蛋白处理的明显缓慢，这可能与家蚕幼虫需摄入较多的 Bt 水稻花粉，才能在中肠内累积足够量的活性毒蛋白有关。

本研究结果与王世贵（2002）的 Bt 水稻对二化螟、王程等（1991）的 Bt 菌株 HD-1 纯晶体蛋白对粘虫 *Mythimna separata* 的病理学效应基本一致。



**B:空泡; C:细胞质; MV:微绒毛; P:花粉粒; R:内质网**

**图 8.1 家蚕幼虫经不同处理后中肠细胞超微结构的时间变化**

1. 家蚕幼虫肠道中的花粉粒 1500×; 2. 非 Bt 水稻花粉处理 12h 的中肠细胞微绒毛 7500×; 3. 非 Bt 水稻花粉处理 12h 的中肠细胞内质网 20000×; 4. Bt 毒蛋白处理 12h 的中肠细胞内质网 20000×; 5. Bt 毒蛋白处理 24h 的中肠细胞内空泡 5000×; 6. Bt 毒蛋白处理 24h 的中肠细胞质膜褶 6000×; 7. Bt 毒蛋白处理 24h 的中肠细胞质微绒毛脱落 6000×; 8. Bt 毒蛋白处理 24h 的中肠细胞破裂 6000×; 9. Bt 水稻花粉处理 12h 的中肠细胞内质网 20000×; 10. Bt 水稻花粉处理 24h 的中肠细胞内质网 20000×; 11. Bt 水稻花粉处理 48h 的中肠细胞内空泡 8000×; 12. Bt 水稻花粉处理 72h 的中肠细胞破裂 6000×

|   |    |    |    |
|---|----|----|----|
| 1 | 2  | 3  | 4  |
| 5 | 6  | 7  | 8  |
| 9 | 10 | 11 | 12 |

## 第九章 日照对转 Bt 基因抗虫水稻花粉毒蛋白的影响

田间条件下,水稻花粉的活力丧失很快,如 3min 内即有 50%失去活力,5min 几乎全部失活(李要民等,1998)。随着花粉快速失活,转 Bt 基因水稻花粉中毒蛋白的含量和活性是否受到影响,至今尚缺乏研究。此外,阳光中的紫外线能迅速致使 Bt 伴胞晶体失活(Ignoffo 等,1977),而且这是造成 Bt 制剂田间防效差的首要原因(Leong 等,1980;崔云龙等,1993)。田间喷洒的 Bt 制剂经过 2~3d 的日光照射,其生物活性基本丧失(张益,1984)。紫外线可破坏 Bt 伴胞晶体表面结构,导致后者在碱性溶液或家蚕胃液中的溶解度降低,不能被降解为原毒素和具杀虫作用的活性片段而丧失活性(Pusztai 等,1991;崔云龙等,1993)。由于水稻花粉中表达的是截短的活性毒蛋白,其活性是否也受到自然日照的影响,至今尚不清楚。鉴于田间 Bt 水稻花粉中毒蛋白活性保持时间的长短关系到家蚕对该毒蛋白有效剂量的暴露概率,最终影响到 Bt 水稻花粉对家蚕的生态安全性,本章就日照对 Bt 水稻花粉中的毒蛋白含量与活性的影响进行了初步研究,结果如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试水稻品系为华池 2000B1 (B1),该品系背景与花粉田间采集方法详见第四章 1.1 和 1.4。桑叶采自浙江大学华家池校区实验桑园,桑树品种为农桑 8 号。家蚕品种:丰一×五四,蚕卵购于浙江省蚕种公司。

#### 1.2 Bt 水稻花粉的日照处理

将田间收集的 Bt 水稻花粉分成若干等分,分别置于培养皿中。自 2003 年 9 月 23 日上午 10 时始,将培养皿放在日光下进行暴晒,于 0、2、4、8、24、48 和 72h 后,各取一等分置于 -70℃ 冰箱中保存,直至日照处理结束。处理期间的温湿度数据采用数据记录仪(浙江大学电气设备厂研制)自动采集,日照紫外线辐射强度由杭州市气象局提供。处理期间日均温为  $30.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ,日均湿度为  $62.9 \pm 5.2\%$ ,日均紫外辐射强度为  $13.6 \pm 2.2\text{W/m}^2$ ,其中日最高紫外辐射强度为  $20.3 \pm 2.7\text{W/m}^2$ 。

采用 ELISA 法(美国 EnviroLogix 公司 Cry1Ab/Cry1Ac 酶标板试剂盒)和考马斯亮蓝 G<sub>250</sub> 比色法(Bradford,1976)分别测定不同日照处理后花粉中的毒蛋白和可溶性蛋白含量。

#### 1.3 生物测定

自冰箱中取出不同日照处理的 Bt 水稻花粉,按第四章 1.5 方法配制系列浓度花粉悬浮液并处理桑叶后,对家蚕蚁蚕作生物测定。相关数据分析同第四章 1.7。

## 2 结果与分析

### 2.1 日照对 Bt 水稻花粉毒蛋白含量的影响

不同日照时间处理的 Bt 水稻花粉中毒蛋白的含量存在显著变化 ( $F=42.602$ ,  $df=6,14$ ,  $p<0.0001$ ) (图 9.1)。在日照处理的开始阶段, Bt 水稻花粉中毒蛋白的相对含量明显降低, 后随着时间延长, 却呈现上升趋势。Bt 水稻花粉中的可溶性蛋白含量在开始日照处理的 1h 内有明显上升, 这可能与花粉迅速丧失水份有关; 后随处理时间延长而逐渐降低。不同日照时间处理的花粉中可溶性蛋白含量之间并无显著差异 ( $F=0.872$ ,  $df=6,7$ ,  $p=0.558$ )。

### 2.2 日照对 Bt 水稻花粉毒蛋白活性的影响

经过不同日照时间处理的 Bt 花粉对蚁蚕的  $LC_{50}$  值虽有一定变化, 但总体差异并不显著 (95%置信限相互重叠交叉); 而且随处理时间延长,  $LC_{50}$  值虽呈增高趋势, 但变化相当平缓 (图 9.2)。这表明连续经过 3d 日均紫外辐射强度为  $13.6\pm 2.2 \text{ W/m}^2$  的日照处理下, Bt 水稻花粉对家蚕 1 龄幼虫的毒性几乎不受影响。

## 3 讨论

经过不同日照时间处理的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫的毒性不存在显著差异, 这与已报道的日照可致使 Bt 伴胞晶体迅速失活 (Ignoffo 等, 1977; Leong 等, 1980; 张益, 1984; Myasnik 等, 2001) 的结果并不一致。由于 Bt 水稻中导入的是经人工改造的直接编码活性毒蛋白的基因片段, 在花粉中表达的即是具杀虫活性的毒素蛋白, 可直接靶标昆虫中肠上皮细胞的刷状缘微绒毛膜 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上特异性受体结合 (van Rie 等, 1990; Gill 等, 1992; Knowles, 1994), 进而形成孔洞或离子通道, 引起胶体渗透裂解 (colloid-osmotic lysis) 而导致虫体死亡 (Gill 等, 1992), 由此表明短期日照紫外线处理对 Bt 水稻花粉中活性毒蛋白并无明显影响。至于 Bt 水稻花粉中毒蛋白的相对含量随日照时间延长而显著升高, 可能与花粉含水量和可溶性蛋白含量降低有关。

Bt 水稻花粉中毒蛋白的活性在田间条件下具有较强的稳定性, 势必提高家蚕对毒蛋白有效剂量的暴露概率, 从而在一定程度上增加 Bt 水稻花粉对家蚕的生态风险。此外, Bt 水稻花粉中毒蛋白可随花粉飘落或经雨水冲刷进入土壤生态系统, 对土壤生物多样性造成生态风险。

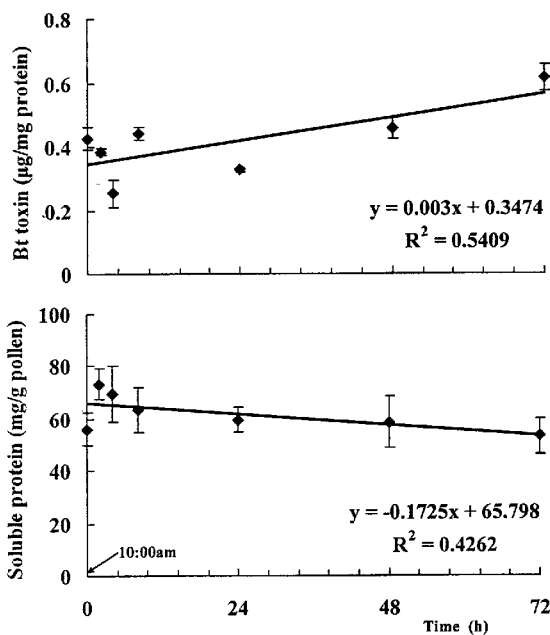


图 9.1 不同日照时间处理对 Bt 水稻花粉毒蛋白与可溶性蛋白含量的影响

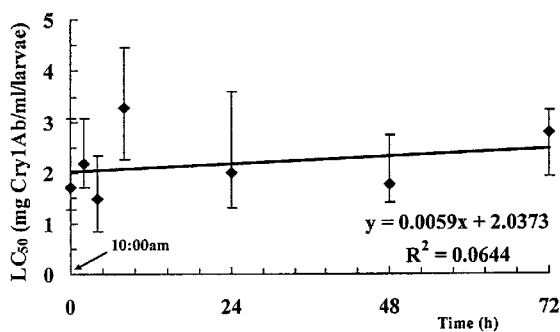


图 9.2 不同日照时间处理对 Bt 水稻花粉毒蛋白活性的影响

## 第十章 转 Bt 基因抗虫水稻花粉的田间飘移分布

在自然条件下,明确 Bt 水稻花粉在桑叶上的实际飘移密度是否达到室内条件下对家蚕产生影响的有效剂量,以及达到有效剂量的花粉密度发生频度,这是正确评估家蚕对 Bt 水稻花粉的暴露概率,从而准确评价转 Bt 基因水稻花粉对家蚕生态风险的重要保证。本章报道转 Bt 基因水稻花粉在田间的飘移密度分布。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试水稻品系为华池 2000B1 (B1),该品系背景与花粉田间采集方法详见第四章 1.1 和 1.4。

#### 1.2 Bt 水稻花粉的田间飘移密度调查

试验在农业部批准的浙江大学实验农场 Bt 水稻中试圃中进行。气候条件属温暖湿润的亚热带季风气候,夏季盛行东南风。

2002 年 Bt 水稻田块面积为 308.5m<sup>2</sup>,周围无其它水稻品种与开花植物种植。水稻于 5 月 20 日移栽,行距×株距为 15×15cm。自水稻扬花期开始,取高度、长势基本一致的盆栽桑苗,在顺风向距离田埂-3.0、0、1.0、3.0、5.0、7.0 和 9.0m 处并排放置。这里将田埂定义为 0m 处,负整数表示在田块当中至田埂的距离,正整数表示水稻田块外至田埂的距离。在不同距离放置的桑苗上,离地面高度 0.5、1.0 和 1.5m 处各随机选取 6 张长相相似的桑叶,在其正面分别小心贴上双面胶(大小 5×5cm<sup>2</sup>)。每天傍晚定时随机采摘不同距离不同高度处 8~10 张长相相似的桑叶,同时回收、更换桑叶上的双面胶。将采摘的桑叶与回收的双面胶小心带回室内,经 1%I<sub>2</sub>-KI 染色后,随机选取 5~6 点镜检单位面积上的花粉数,直至扬花期结束。在扬花期间,还在不同距离桑苗的 0.5m 高度处分别随机采摘 6 张嫩叶和老叶,相同方法处理并镜检单位叶面积上的花粉数。

2003 年 Bt 水稻田块面积 323.2m<sup>2</sup>,于 5 月 12 日移栽。Bt 水稻花粉飘移密度调查除桑叶和双面胶外,还采用表面涂布有凡士林的载玻片来监测花粉飘移密度。在距离田埂不同距离(-3.0、0、1.0、3.0、5.0、7.0 和 9.0m)处分别设立木桩,将经凡士林处理的载玻片水平分别固定在木桩的不同高度(0.5、1.0 和 1.5m)上。每个高度放置 6 块载玻片,每天傍晚定时回收、更换。花粉镜检方法同上。

在扬花末期,就水稻分蘖数、叶片数和株高(穗高和剑叶高)等指标进行测定,结果如表 10.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 Bt 水稻花粉不同距离的飘移分布

2002 年: Bt 水稻花粉在桑叶和双面胶上的飘落密度均随飘移距离增加而呈指数降低, 桑叶:  $y=138.7541e^{-0.2026x}$  ( $r^2=0.9803$ ;  $F=249.1$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.001$ )、双面胶:  $y=64.8890e^{-0.1269x}$  ( $r^2=0.9070$ ;  $F=48.7$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.001$ ) (表 10.2~10.3)。飘落在桑叶上的 Bt 水稻花粉密度明显高于双面胶上的, 这可能与在桑叶上的是花粉累积密度, 而在双面胶上的是每日飘落密度有关。降雨可明显影响 Bt 水稻花粉在桑叶上的数量, 但对双面胶上的花粉数量却少有影响 (图 10.1)。7 月 22 日的降雨可导致第二天桑叶上的花粉密度至少降低了 39.9~70.0%, 而 25 日的降雨使得桑叶上的花粉密度下降了 70.3~84.9%。飘落在双面胶上的水稻花粉密度随天数增加而呈单峰曲线变化, 这与水稻花粉在扬花期的释放数量变化相一致。

2003 年: 与 2002 年结果相似, Bt 水稻花粉在桑叶、双面胶和载玻片上的飘落密度均以距离田埂-3m 处的为明显较高, 并均随飘移距离增加而呈指数降低, 桑叶:  $y=76.1386e^{-0.3126x}$  ( $r^2=0.9417$ ;  $F=80.0$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.001$ )、双面胶:  $y=104.1697e^{-0.2655x}$  ( $r^2=0.9819$ ;  $F=270.7$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.001$ ) 和载玻片:  $y=79.3020e^{-0.3275x}$  ( $r^2=0.9893$ ;  $F=463.0$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.001$ ) (表 10.4~10.6)。在距离田埂 1m 处, 桑叶上的花粉密度比在-3m 处的降低了 83.9%; 在离田埂 9m 处桑叶上的花粉密度仅为-3m 处的 3.1%。飘落在桑叶上的花粉密度略低于双面胶和载玻片上的, 这可能与扬花期期间风速较大而使桑叶叶面上沉积的花粉大多被吹落有关。7 月 6 日午后降雨导致在桑叶上的花粉密度至少降低了 32.3~93.8% (图 10.2)。

### 2.2 Bt 水稻花粉不同高度的飘落分布

2002 年和 2003 年, Bt 水稻花粉不同高度的飘落密度均以 50cm 的明显较高, 其中在距离田埂 3m 以内的显著为高 (图 10.3~10.4)。这与水稻植株高度 (穗高) 密切相关, 即水稻小花着生的穗部离地面距离稍高于 50cm (表 10.1)。扬花时, 水稻花粉大部分飘落于高度为 50cm 左右的桑叶、双面胶和载玻片上。上升气流虽可将 Bt 水稻花粉带至较高高度, 且随飘移距离增加, 不同高度间花粉密度的差异逐渐缩小, 直至不显著, 而与此同时, 远距离飘落的花粉密度亦明显降低。

### 2.3 Bt 水稻花粉在不同生长期桑叶上的密度分布

在 50cm 高度处, Bt 水稻花粉较多飘落沉降在生长期相对较长的桑叶 (老叶) 上, 而较少在生长期较短的桑叶 (嫩叶) 上 (图 10.5)。在离田埂-3m 处, 沉降在老叶上的花粉密度是嫩叶上的 3.1 倍, 差异达极显著 ( $t=5.219$ ,  $df=178$ ,  $p<0.001$ )。水稻花粉在不同生长期桑叶上的飘落密度不同, 可能与老叶叶片老化, 叶面腊质层受损而变得较为粗糙, 致使花粉不易脱落有关。



### 3 讨论

经过 2 年以不同载体（桑叶、双面胶和载玻片）形式对 Bt 水稻花粉田间飘落的密度调查，发现在不同载体上的花粉密度分布基本一致，均以稻田中 50cm 高度处为最高，且随着飘移距离增加而呈指数降低。水稻花粉平均密度在不同年份、不同距离和不同载体上的变化较大，为 6.0~255.0 粒/cm<sup>2</sup>，其中最高观测到的花粉密度为 46 粒/视野，约 7041.7 粒/cm<sup>2</sup>。这与樊龙江等（2003）田间观测到普通水稻花粉在桑稻混栽区桑叶上的实际飘落平均密度为 13.3~199.0 粒/cm<sup>2</sup> 是基本一致的，而比 Bt 玉米花粉在田间的自然飘落密度分布（Wraight 等，2000；Pleasants 等，2001）略低。虽然水稻花粉颗粒明显比玉米花粉较小（花粉直径：籼稻 33.14±2.47μm；粳稻 32.78±1.40μm；玉米 73.4~92.6μm），随风传播距离相对较远（玉米花粉经风传播距离一般在 60m 左右，而水稻常规育种的安全间隔距离通常为 100m），但是，玉米产生花粉的能力明显较高（玉米：3000 万粒 / 雄穗；水稻：22 万粒 / 稻穗）（樊龙江等，2003），而且玉米植株相对较高，因此，在近距离范围内，花粉的自然飘落密度就相对较高。另一方面，Bt 水稻花粉在较高高度飘落的密度比例似与飘移距离呈正比，即随风飘移越远，在较高高度上的花粉密度的分布比例相对较高。事实上，在桑稻混栽区，种植桑树的畦垄一般明显高于水稻田块，畦面通常与水稻稻穗齐平，而且桑枝高度通常在 2.0~2.5m 左右（图 4.1）。因此，Bt 水稻花粉在近距离范围内很难飘落至如此高度的桑叶上，即使随风飘移至较远距离的枝头叶面，其密度也是相当低的。

在自然条件下，许多因子影响水稻花粉在桑叶上的飘落密度分布（Pleasants 等，2001），其中以降雨和风向/速的影响程度较大。一次降雨过程可至少冲刷去约 80% 飘落于桑叶上的水稻花粉，这与 Pleasants 等（2001）报道的降雨对 Bt 玉米花粉在大斑蝶寄主植物叶片上的密度分布影响相一致。较高风速虽可将水稻花粉飘移至更远距离，但花粉不易在叶面附着，从而导致花粉密度降低。2003 年桑叶上累积的花粉密度不及在双面胶或载玻片上粘着的花粉密度，很大程度上可能是由于在 7 月初水稻扬花期期间受东南季风或热带风暴高速气流的影响。

Bt 水稻花粉在田间飘落的平均密度远低于室内毒力测定测得的对家蚕各龄幼虫的 LC<sub>50</sub> 值（详见第四章），也远低于在室内连续饲喂家蚕幼虫而无明显影响的 DI 浓度。由此可见，Bt 水稻花粉田间飘落在桑叶上的平均密度远不及室内对家蚕幼虫产生不利影响的有效剂量，故可推测田间飘落在桑叶上的 Bt 水稻花粉的数量不足以对家蚕幼虫产生明显影响。当然，这尚有待于试验证实。

表 10.1 不同年份 Bt 水稻扬花末期的生长指标

| 年份   | 穗高(cm)   | 剑叶高(cm)  | 分蘖数/丛    | 有效分蘖数/丛  | 叶片数/分蘖  |
|------|----------|----------|----------|----------|---------|
| 2002 | 67.1±0.5 | 83.9±0.6 | 8.9±0.2  | —        | 3.9±0.1 |
|      | (100)    | (100)    | (100)    | —        | (100)   |
| 2003 | 76.2±0.4 | 85.6±0.4 | 11.1±0.4 | 10.7±0.4 | 4.1±0.1 |
|      | (60)     | (60)     | (60)     | (60)     | (60)    |

表 10.2 2002 年田间不同距离桑叶上飘落的 Bt 水稻花粉密度频率分布

| Pollen density<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) | From edge of rice paddy |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                             | -3m                     | 0m    | 1m    | 3m    | 5m    | 7m    | 9m    |
| 0-500                                       | 0.829                   | 0.902 | 0.940 | 0.963 | 0.979 | 0.983 | 0.993 |
| 500-1000                                    | 0.090                   | 0.057 | 0.038 | 0.027 | 0.014 | 0.012 | 0.006 |
| 1000-1500                                   | 0.043                   | 0.023 | 0.013 | 0.004 | 0.002 | 0.004 | 0.001 |
| 1500-2000                                   | 0.027                   | 0.012 | 0.005 | 0.005 | 0.004 | 0.001 | 0.000 |
| 2000-2500                                   | 0.006                   | 0.004 | 0.002 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 |
| 2500-3000                                   | 0.002                   | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 3000-3500                                   | 0.001                   | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 3500-4000                                   | 0.001                   | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Average                                     | 255.0                   | 152.9 | 97.5  | 65.1  | 51.8  | 40.1  | 34.6  |
| Samples                                     | 840                     | 840   | 840   | 840   | 840   | 840   | 810   |

表 10.3 2002 年田间不同距离双面胶上飘落的 Bt 水稻花粉密度频率分布

| Pollen density<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) | From edge of rice paddy |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                             | -3m                     | 0m    | 1m    | 3m    | 5m    | 7m    | 9m    |
| 0-200                                       | 0.847                   | 0.942 | 0.959 | 0.958 | 0.969 | 0.969 | 0.985 |
| 200-400                                     | 0.100                   | 0.048 | 0.036 | 0.035 | 0.020 | 0.022 | 0.012 |
| 400-600                                     | 0.035                   | 0.009 | 0.005 | 0.007 | 0.009 | 0.008 | 0.002 |
| 600-800                                     | 0.017                   | 0.001 |       |       | 0.002 | 0.001 |       |
| 800-1000                                    | 0.001                   |       |       |       |       |       |       |
| Average                                     | 103.2                   | 55.0  | 46.9  | 45.5  | 36.9  | 34.5  | 25.5  |
| Sample size                                 | 810                     | 810   | 810   | 810   | 810   | 780   | 810   |

表 10.4 2003 年田间不同距离桑叶上飘落的 Bt 水稻花粉密度频率分布

| Pollen density<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) | From edge of rice paddy |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                             | -3m                     | 0m    | 1m    | 3m    | 5m    | 7m    | 9m    |
| 0-250                                       | 0.816                   | 0.868 | 0.960 | 0.973 | 0.990 | 0.993 | 0.998 |
| 250-500                                     | 0.093                   | 0.069 | 0.034 | 0.024 | 0.009 | 0.007 | 0.002 |
| 500-1000                                    | 0.051                   | 0.039 | 0.006 | 0.002 | 0.000 |       |       |
| 1000-1500                                   | 0.017                   | 0.011 |       |       | 0.001 |       |       |
| 1500-2000                                   | 0.008                   | 0.010 |       |       |       |       |       |
| 2000-2500                                   | 0.004                   | 0.001 |       |       |       |       |       |
| 2500-3000                                   | 0.003                   | 0.002 |       |       |       |       |       |
| 3000-4000                                   | 0.001                   |       |       |       |       |       |       |
| 4000-5000                                   | 0.003                   |       |       |       |       |       |       |
| >5000                                       | 0.003                   |       |       |       |       |       |       |
| Average                                     | 190.8                   | 107.3 | 30.8  | 20.9  | 14.6  | 9.9   | 6.0   |
| Samples                                     | 900                     | 900   | 900   | 900   | 900   | 879   | 900   |

表 10.5 2003 年田间不同距离双面胶上飘落的 Bt 水稻花粉密度频率分布

| Pollen density<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) | From edge of rice paddy |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                             | -3m                     | 0m    | 1m    | 3m    | 5m    | 7m    | 9m    |
| 0-250                                       | 0.753                   | 0.842 | 0.911 | 0.950 | 0.972 | 0.992 | 0.986 |
| 250-500                                     | 0.126                   | 0.088 | 0.074 | 0.043 | 0.028 | 0.008 | 0.013 |
| 500-1000                                    | 0.051                   | 0.051 | 0.013 | 0.007 |       |       | 0.001 |
| 1000-1500                                   | 0.036                   | 0.017 | 0.001 |       |       |       |       |
| 1500-2000                                   | 0.016                   | 0.003 |       |       |       |       |       |
| 2000-2500                                   | 0.011                   |       |       |       |       |       |       |
| 2500-3000                                   | 0.003                   |       |       |       |       |       |       |
| 3000-3500                                   | 0.001                   |       |       |       |       |       |       |
| 3500-4000                                   | 0.003                   |       |       |       |       |       |       |
| Average                                     | 230.3                   | 118.7 | 63.1  | 41.7  | 32.3  | 17.0  | 19.6  |
| Samples                                     | 900                     | 890   | 890   | 900   | 900   | 900   | 900   |

表 10.6 2003 年田间不同距离载玻片上飘落的 Bt 水稻花粉密度频率分布

| Pollen density<br>(grains/cm <sup>2</sup> ) | From edge of rice paddy |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                             | -3m                     | 0m    | 1m    | 3m    | 5m    | 7m    | 9m    |
| 0-250                                       | 0.810                   | 0.892 | 0.912 | 0.959 | 0.974 | 0.996 | 0.987 |
| 250-500                                     | 0.083                   | 0.078 | 0.061 | 0.037 | 0.020 | 0.004 | 0.012 |
| 500-1000                                    | 0.038                   | 0.026 | 0.023 | 0.004 | 0.006 |       | 0.001 |
| 1000-1500                                   | 0.026                   | 0.004 | 0.002 |       |       |       |       |
| 1500-2000                                   | 0.026                   |       | 0.001 |       |       |       |       |
| 2000-2500                                   | 0.007                   |       |       |       |       |       |       |
| 2500-3000                                   | 0.006                   |       |       |       |       |       |       |
| 3000-4000                                   | 0.000                   |       |       |       |       |       |       |
| 4000-5000                                   | 0.002                   |       |       |       |       |       |       |
| >5000                                       | 0.003                   |       |       |       |       |       |       |
| Average                                     | 214.1                   | 70.2  | 56.5  | 33.0  | 21.6  | 11.9  | 17.2  |
| Samples                                     | 900                     | 900   | 900   | 830   | 900   | 890   | 900   |

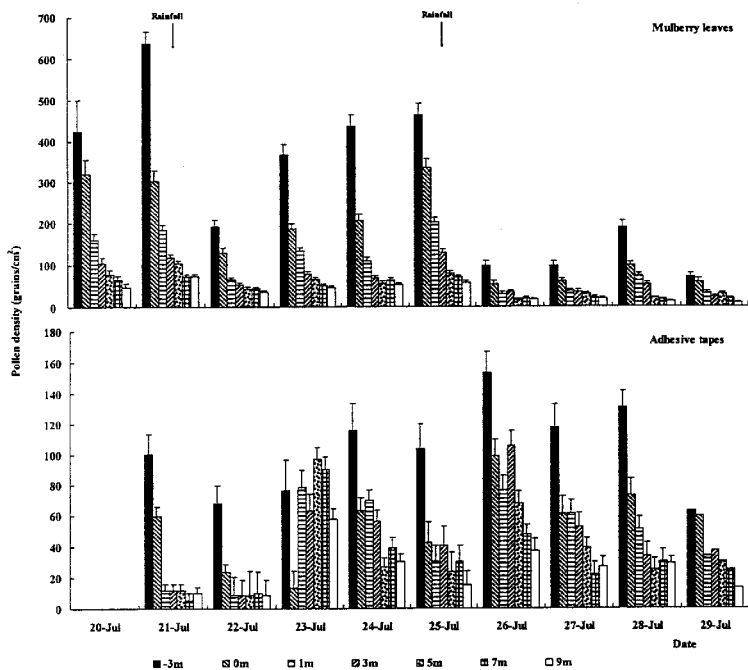


图 10.1 2002 年 Bt 水稻花粉在田间不同距离的飘落密度分布

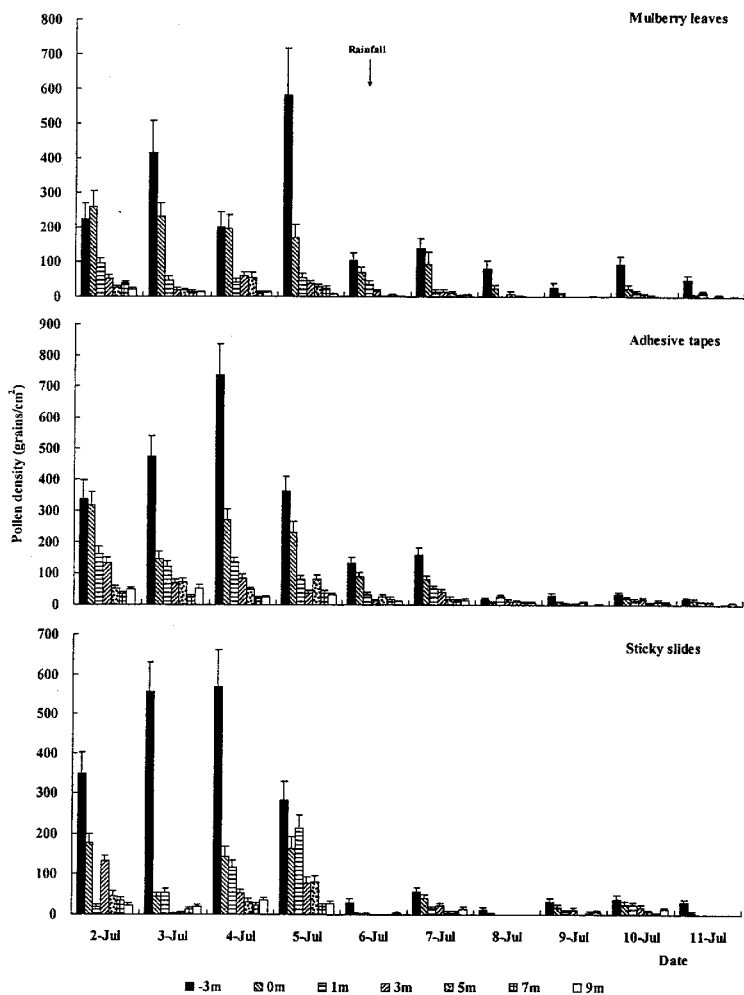


图 10.2 2003 年 Bt 水稻花粉在田间不同距离的飘落密度分布

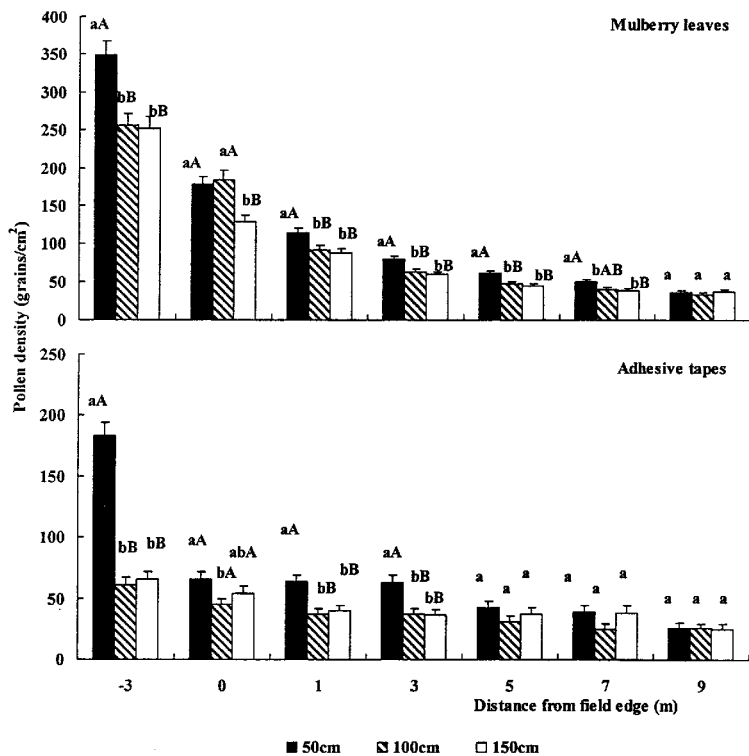


图 10.3 2002 年 Bt 水稻花粉在田间不同距离不同高度上的飘落密度分布

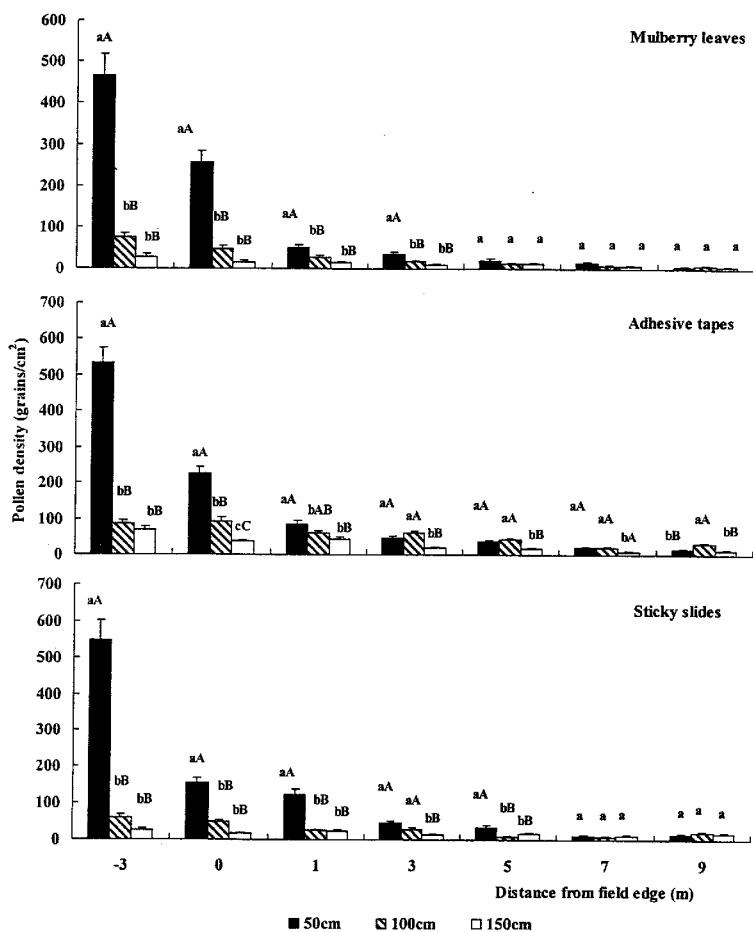


图 10.4 2003 年 Bt 水稻花粉在田间不同距离不同高度上的飘落密度分布



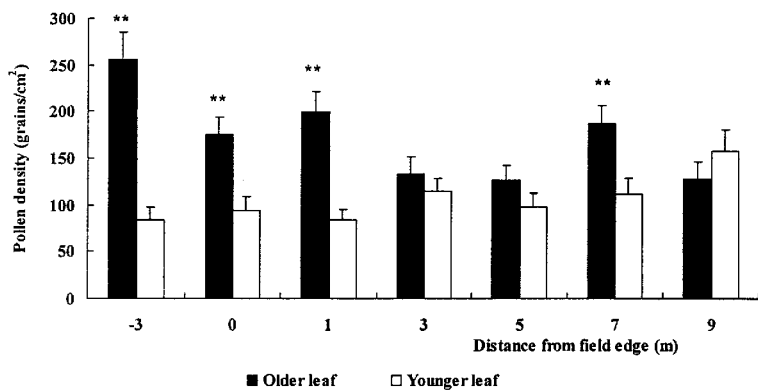


图 10.5 Bt 水稻花粉在不同生长期桑叶上的飘落密度差异

注: \*\*表示经  $t$  测验, 差异达极显著水平, 即  $p < 0.01$ 。

# 第十一章 自然飘落的转 Bt 基因抗虫水稻花粉对家蚕生物学特性的影响

室内人为胁迫条件下,高剂量 Bt 水稻花粉对家蚕生物学、生理学、病理学和行为学等指标均可产生明显的负面影响。但是,在自然条件下,在田间不同飘移距离的桑叶上的 Bt 水稻花粉密度均远不及室内条件下对家蚕幼虫产生影响的有效剂量。从理论上而言,田间如此较低的 Bt 水稻花粉飘落密度应不足引起对家蚕幼虫的不利影响,但实际情况如何尚不得知。本章报道饲喂田间自然飘落有 Bt 水稻花粉的桑叶对家蚕生物学指标的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试水稻品系为华池 2000B1 (B1),该品系背景与花粉田间采集方法详见第四章 1.1 和 1.4。家蚕品种:青松×皓月,蚕卵购于浙江省蚕种公司。

### 1.2 田间飘落有 Bt 水稻花粉桑叶的饲喂处理

本试验与第十章 Bt 水稻花粉的田间飘移调查同时进行。前期工作如 Bt 水稻田间栽培管理以及盆栽桑苗田间摆置等均与第十章 1.2 同。自水稻扬花期始,在不同距离桑苗的不同高度分别随机采摘桑叶,小心带回实验室。部分抽样镜检花粉数,其余同一距离的桑叶混合后对家蚕初孵幼虫进行连续饲喂,同时设无水稻花粉的桑叶对照。在扬花期结束,继续采摘田间的桑叶进行饲喂,直至家蚕幼虫结茧化蛹、成虫羽化、交配和产卵。试验每处理 10 头初孵幼虫,重复 5~6 次。饲养条件、考查指标以及数据处理等均与第五章 1.2 同。

## 2 结果与分析

### 2.1 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫期指标的影响

对家蚕初孵幼虫分别连续饲喂田间不同距离自然飘落的 Bt 水稻花粉,其幼虫生存曲线之间均无显著影响(2002 年:  $\chi^2_{Log-Rank}=10.2608$ ,  $df=7$ ,  $p=0.1743$ ;  $\chi^2_{Wilcoxon}=10.3486$ ,  $df=7$ ,  $p=0.1697$ ; 2003 年:  $\chi^2_{Log-Rank}=12.4342$ ,  $df=7$ ,  $p=0.0872$ ;  $\chi^2_{Wilcoxon}=13.1678$ ,  $df=7$ ,  $p=0.0681$ ) (图 11.1)。连续饲喂田间不同距离自然飘落的 Bt 水稻花粉后,家蚕幼虫生存率的变化似与花粉的飘移距离并无明显关系。

饲喂田间不同距离自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫各龄历期的影响,不同年份之间存在一定的差异(图 11.2)。2002 年,家蚕幼虫 1 龄历期之间无显著差异,后随龄期增长,飘移距离越近的花粉处理的幼虫历期越高于对照,多达显著水平,但在 5 龄期的差异并不显著。就整个幼虫期来看,连续喂食田间不同距离自然飘落 Bt 水稻花粉的幼虫历期显著高于

无 Bt 水稻花粉对照, 其中饲喂距离田埂-3m 处桑叶的幼虫历期较取食对照桑叶的延长 7.3%, 约 1.7d。2003 年, 取食不同距离自然飘落 Bt 水稻花粉的 1~3 龄幼虫的历期多显著高于对照, 4~5 龄幼虫的历期变化则正相反。从整个幼虫期来看, 不同飘移距离花粉处理的幼虫历期变化趋势大致与 2002 年相同。

2002 年, 连续饲喂不同距离自然飘落 Bt 水稻花粉的 1~4 龄幼虫的体重多显著低于对照, 但在 5 龄期, 体重差异并不显著 (图 11.3)。2003 年的幼虫体重结果似与 2002 年正相反, 取食 Bt 花粉的各龄幼虫体重多显著高于对照。

## 2.2 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕蛹期和成虫期指标的影响

2002 年和 2003 年经不同距离自然飘落 Bt 水稻花粉处理的家蚕化蛹率与对照的差异均不显著 (2002 年:  $F=1.383$ ,  $df=7,24$ ,  $p=0.2575$ ; 2003 年:  $F=0.544$ ,  $df=7,39$ ,  $p=0.7956$ ) (图 11.4)。经不同处理距离自然飘落 Bt 水稻花粉处理的家蚕成虫羽化率的变化与化蛹率相似, 无显著差异 (2002 年:  $F=1.756$ ,  $df=7,24$ ,  $p=0.1432$ ; 2003 年:  $F=1.247$ ,  $df=7,32$ ,  $p=0.3070$ )。

自然飘落 Bt 水稻花粉处理的家蚕蛹重和茧重在不同年份、不同飘移距离间的差异多不显著 (图 11.5), 而不同处理的茧壳重似比无花粉处理的对照要明显较重, 表明摄入一定数量的水稻花粉可能有增加蚕丝产量的趋势。

2002 年和 2003 年不同距离自然飘落花粉处理的家蚕蛹历期之间无显著差异 (图 11.6)。家蚕成虫寿命在不同年份、不同距离飘落花粉处理间存在一定变化, 但总体差异多不显著。

不同距离自然飘落花粉处理的家蚕雌成虫产卵量与怀卵量多比无花粉处理的对照明显较高 (图 11.7), 不同处理间的差异虽多不显著, 但从趋势上看, 似存在取食一定水稻花粉可增强家蚕生殖力的可能。

## 3 讨论

经过 2 年不同距离自然飘落 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫的处理, 结果表明在自然条件下, Bt 水稻花粉对家蚕的生物学指标无显著的不利影响。虽然在室内人为高剂量 Bt 水稻花粉的胁迫下, 家蚕的生物学、生理学、病理学和行为学指标受到显著不利影响, 但如此高剂量的花粉密度在田间出现的可能性较小, 即家蚕对 Bt 水稻花粉有效剂量的暴露概率极小。因此, 在自然条件下, Bt 水稻花粉对家蚕的生态风险可忽略。该结果与 Bt 玉米花粉对大斑蝶的风险评价结论一致 (Sears 等, 2001; Wolt 等, 2003)。

目前有关转基因抗虫作物花粉对非靶标昆虫的生态风险研究多以室内研究为主, 而在田间条件下研究转基因抗虫作物花粉的非靶标风险主要限于转 Bt 基因玉米花粉对大斑蝶的影响 (Hansen 等, 2000; Wraight 等, 2000; Stanley-Horn 等, 2001; Zangerl 等, 2001)。与大斑蝶这一野生昆虫种类不同, 家蚕已是被人类长期驯化成只能在室内饲养的昆虫种类, 其在野外根本无法生存。因此, 有关自然条件下 Bt 水稻花粉对家蚕的风险评价主要在室内进行, 这比 Bt 玉米花粉对大斑蝶的风险评价要更为简单、便利, 且其评价过程不易受外界环境的干扰。

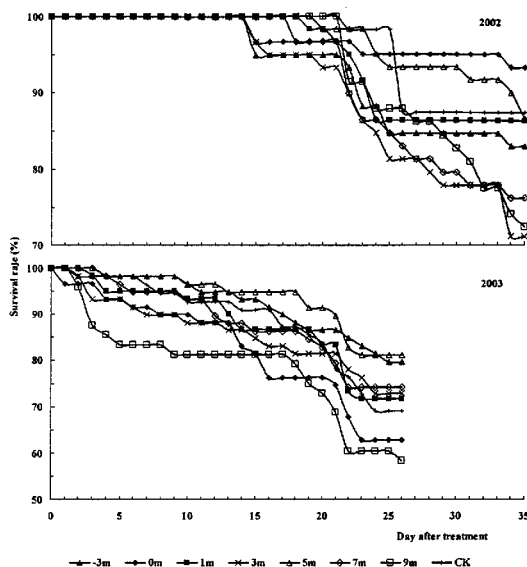


图 11.1 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫生存曲线的影响

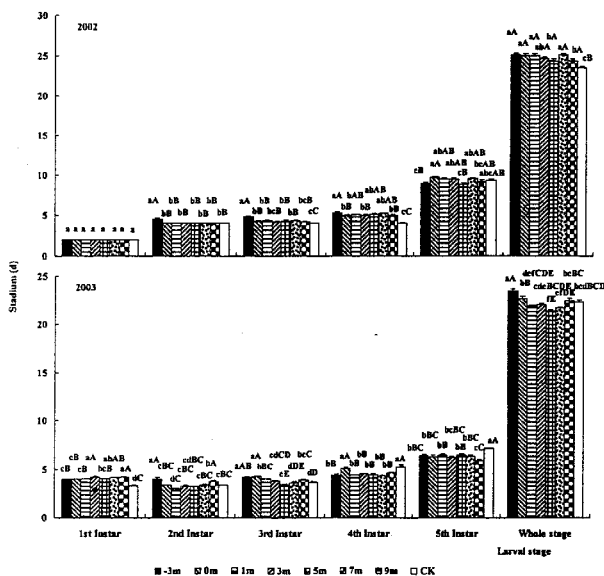


图 11.2 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫历期的影响

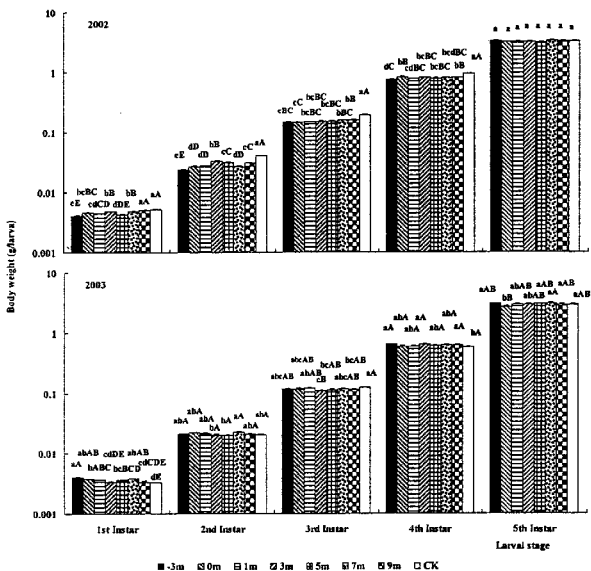


图 11.3 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕幼虫体重的影响

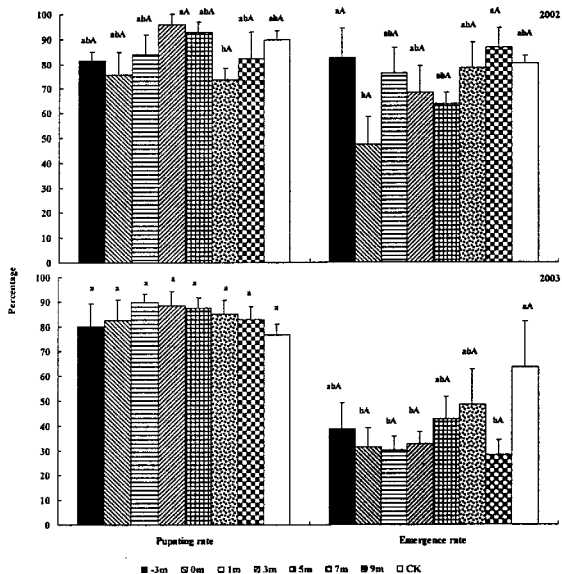


图 11.4 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕化蛹率和羽化率的影响

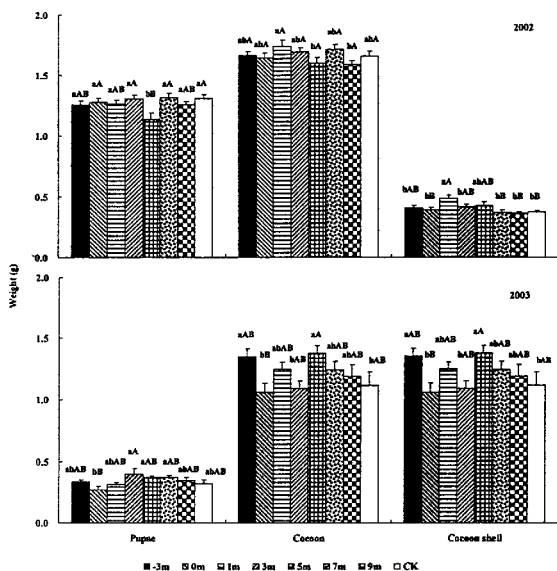


图 11.5 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕蛹重、茧重和茧壳重的影响

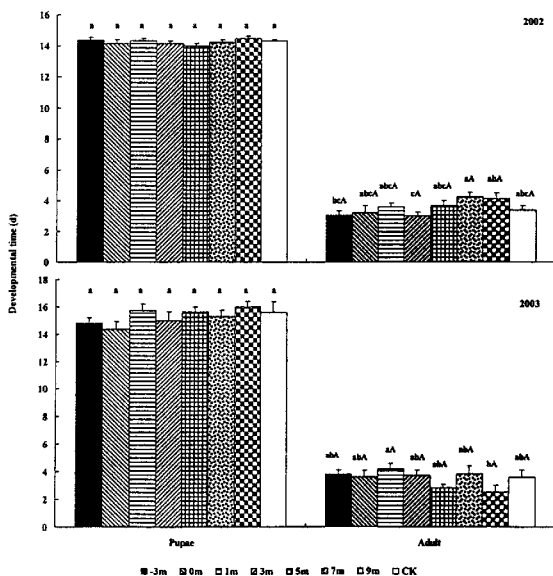


图 11.6 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕蛹期和成虫寿命的影响

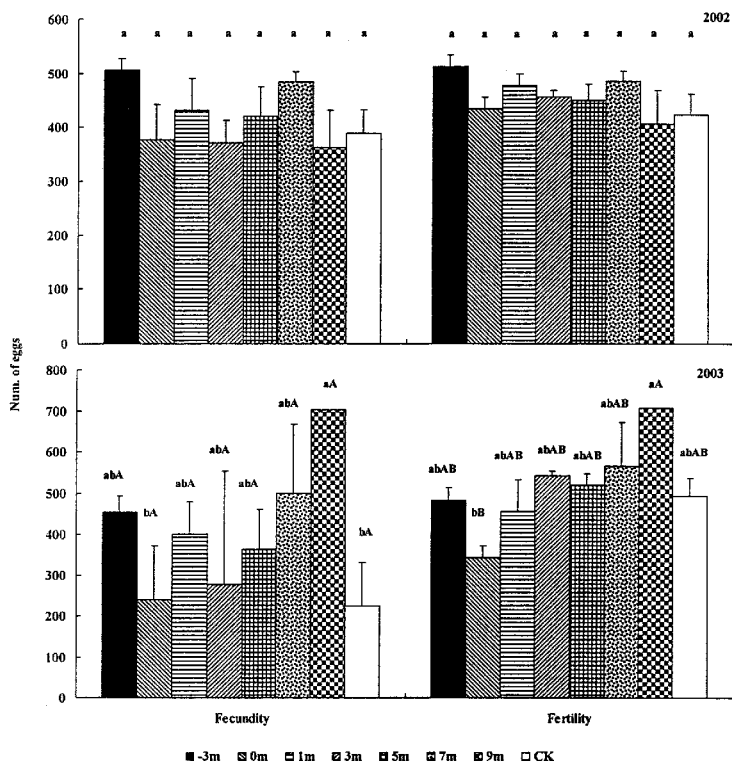


图 11.7 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕产卵量和怀卵量的影响

### 第三部分 高效并对家蚕安全的Bt菌株 YJ-2000



## 第十二章 苏云金芽孢杆菌 YJ-2000 菌株杀虫活性评价

苏云金芽孢杆菌是一种革兰氏阳性的昆虫病原细菌,它在形成芽孢过程中能产生具有杀虫活性的蛋白晶体。由于 Bt 菌株资源丰富,杀虫谱广,能防治包括鳞翅目、双翅目、鞘翅目和蜉蝣目等数百种害虫,且具有对人畜安全、易于工业化生产等优点,因此,Bt 制剂已成为当前世界上应用最广泛、最有效的微生物杀虫剂,并取得了显著的经济、社会和生态效应(喻子牛,1990)。目前绝大多数对鳞翅目害虫高效的 Bt 制剂对家蚕皆高毒性,因此这些制剂在亚洲蚕桑地区的应用受到了严格限制(Aizawa,1987)。自 20 世纪 90 年代转 Bt 基因作物的问世及其商业化的应用后,其花粉的飘移也颇受担忧,譬如在我国南方水稻和玉米田常邻近桑园,若转 Bt 基因水稻或玉米花粉飘于桑叶即可能对养蚕业带来问题。这种担忧自 Losey 等(1999)于室内观察到转 Bt 基因玉米花粉对大班蝶幼虫有明显毒性后更受关注。因此,筛选与研制适于养蚕区桑树及其邻近作物害虫防治用并对家蚕安全的 Bt 菌株,或以其毒蛋白基因培育出花粉对家蚕安全的转 Bt 基因抗虫作物已显得相当重要。为此,本实验室近年通过采样、分离与鉴定,就对家蚕安全且对其它鳞翅目害虫具杀虫活性的 Bt 菌株的筛选作了系列工作,其中已获得 1 株菌株(编号 YJ-2000),并在室内证实了该菌株对家蚕幼虫几乎无毒性,而对其它多种鳞翅目重要害虫呈现有不同程度的杀虫活性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株与试虫

苏云金杆菌 YJ-2000 菌株由本实验室筛选获得。供试昆虫包括:家蚕、二化螟、三化螟和菜粉蝶 *Pieris rapae* 初孵幼虫,小菜蛾的 2 龄幼虫和桑螟 *Diaphania pyralis* 的 3 龄幼虫。家蚕为春蚕品种:青松×皓月,购于浙江省蚕种公司;其它试虫均采自野外,经室内繁殖 1 代后供试验用。

#### 1.2 杀虫活性测定

##### 1.2.1 发酵液制备

参照喻子牛(1990),采用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1.0%和 NaCl 0.5%) pH7.0~7.2。30℃下 220 rpm 摇床上培养 36h,即至 70~90%晶体脱落,得该菌株发酵液。镜检计数,计算单位体积晶体数。

##### 1.2.2 生物测定

将发酵液按比例稀释成系列浓度,加入 0.2%吐温作为乳化剂,以无菌水为对照。把生长期、大小一致的新鲜桑叶、甘蓝叶或水稻茎秆分别浸入系列浓度的 YJ-2000 稀释菌液中,不断摇晃使叶片或稻秆充分粘着胞晶混合体液,取出后自然晾干,分别饲喂各试虫。设相应对照。48h 后,考查死亡虫数。尔后,再将各浓度系列处理的存活试虫移至更换过的灭菌果

酱瓶中,改饲喂未经菌液处理的鲜叶或稻秆继续饲养。每隔 48h 考查记载死亡情况。每试虫各处理和对照供试虫均为 30 头,重复 3 次。其中,家蚕的处理浓度 C1-C5 依次为:  $2.38 \times 10^5$ 、 $1.19 \times 10^5$ 、 $5.96 \times 10^4$ 、 $1.49 \times 10^4$  和  $3.72 \times 10^3$  晶体/ml; 桑螟的处理浓度 C1-C5 依次为:  $1.95 \times 10^5$ 、 $9.75 \times 10^4$ 、 $4.88 \times 10^4$ 、 $1.22 \times 10^4$  和  $3.05 \times 10^3$  晶体/ml; 菜粉蝶的处理浓度 C1-C5 依次为:  $2.81 \times 10^5$ 、 $1.40 \times 10^5$ 、 $7.02 \times 10^4$ 、 $1.75 \times 10^4$  和  $4.39 \times 10^3$  晶体/ml; 小菜蛾的处理浓度 C1-C5 依次为:  $9.75 \times 10^4$ 、 $4.88 \times 10^4$ 、 $1.22 \times 10^4$ 、 $3.05 \times 10^3$  和  $7.61 \times 10^2$  晶体/ml; 三化螟的处理浓度 C1-C5 依次为:  $2.38 \times 10^5$ 、 $5.96 \times 10^4$ 、 $1.49 \times 10^4$ 、 $3.72 \times 10^3$  和  $9.31 \times 10^2$  晶体/ml; 二化螟的处理浓度 C1-C5 依次为:  $1.40 \times 10^5$ 、 $7.02 \times 10^4$ 、 $1.75 \times 10^4$ 、 $4.39 \times 10^3$  和  $1.10 \times 10^3$  晶体/ml。

### 1.2.3 数据分析

应用时间-剂量-死亡率模型(TDM 模型,又称互补重对数模型,即 CLL 模型)(冯明光,1998; Preisler, 1989) 分析所得数据; 其中累计死亡概率  $p_{ij}=1-\exp(-\exp(\tau_j+\beta\log_{10}(d_{ij})))$ ; 条件死亡概率  $q_{ij}=1-\exp(-\exp(\gamma_j+\beta\log_{10}(d_{ij})))$ , 式中  $d_{ij}$  为剂量,  $\beta$ 、 $\tau_j$  和  $\gamma_j$  为未知参数。 $\beta$  表示描述剂量效应的斜率,是  $\tau_j$  对应于时间  $t_j$  的参数,  $\gamma_j$  是相应于测试时间区间  $(t_{j-1}, t_j)$  的参数,由  $\gamma_j$  可估计得  $\tau_j$ 。以上参数估计使用 DPS 数据处理软件(唐启义等,2002)。

## 2 结果与分析

### 2.1 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株对不同试虫毒力的比较

YJ-2000 菌株对家蚕的毒性明显较弱,即使在高剂量 ( $1 \sim 2 \times 10^5$  晶体/ml) 处理下,家蚕的累计死亡率始终低于 10% (图 12.1)。对于其它试虫,在不同剂量处理后第 2d 起均出现不同程度的死亡,其中小菜蛾在高剂量处理后第 2d 的死亡率就高达 100%,菜粉蝶幼虫在不同剂量处理后 6d 的累积死亡率均在 70% 以上,表明该菌株对蔬菜害虫的毒力相对较高。水稻害虫如三化螟和二化螟经不同剂量 YJ-2000 处理后,死亡率多在第 6d 达到最高,其中较高剂量下的累积死亡率分别为 60.7~86.2% 和 50.0~66.7%,后趋于稳定。YJ-2000 对桑螟的毒力相对较低,低剂量 ( $< 1 \times 10^4$  晶体/ml) 下无明显致死效应;高剂量下,桑螟的死亡率及达到较高死亡率的时间分别低于和晚于其它试虫。就总体而言,饲喂不同浓度 YJ-2000 后,不同试虫的累计死亡率多随处理剂量增高、处理后时间延长而呈递增趋势,这表明累计死亡率不仅是剂量相关函数,而且还是时间相关函数。

### 2.2 时间-剂量-死亡率模型模拟

YJ-2000 菌株对菜粉蝶的作用模型参数  $\hat{\beta}$  相对较低,表明剂量效应的斜率较小;对小菜蛾的  $\hat{\beta}$  相对较高,说明出现致死效应的时间较短(表 12.1)。不同试虫的参数  $\hat{\tau}$  均随处理时间的延长而增加,表明条件死亡率与时间明显相关。

拟合的 CLL 模型可形象直观地描述 YJ-2000 菌株对各试虫的累计死亡率随剂量和时间的变化趋势 (图 12.2)。在处理剂量与时间范围内, 各试虫的累计死亡率均为随剂量和时间而变化的曲面。根据曲面的高度和变化趋势, 可看出 YJ-2000 菌株对不同试虫的毒力强弱差异。综合剂量效应和时间效应, YJ-2000 菌株对蔬菜害虫的毒力最强, 水稻害虫次之, 桑树害虫最弱。

由 CLL 模型考察死亡概率与剂量关系可知,  $\log(LC_{50})$  和  $\log(LC_{90})$  值随时间延长而平缓降低 (图 12.3)。YJ-2000 菌株对菜粉蝶和小菜蛾的  $\log(LC_{50})$  较低, 表明毒力较强, 而对桑螟的则正相反, 其中饲毒后第 6d 对菜粉蝶、小菜蛾、三化螟、二化螟和桑螟的  $LC_{50}$  分别为 3378.8、13688.0、14535.2、173157.0 和 386384.8 晶体/ml,  $LC_{90}$  分别为 1141221.6、53449.1、107961771.0、6005234.9 和 1855026.0 晶体/ml。

由 CLL 模型考察 YJ-2000 菌株不同剂量对各试虫致死率的时间效应可知, 各试虫  $LT_{50}$  值均随剂量增加而降低, 其中小菜蛾和桑螟的  $LT_{50}$  降幅最大, 表明不同剂量下毒性作用时间的差异较大; 菜粉蝶的降幅最小, 毒性作用时间相对一致 (图 12.4)。此外, 在同一时限内,  $LT_{50}$  所对应的剂量越低, 表示对该虫毒力越强; 同一剂量下,  $LT_{50}$  值越小, 对该虫毒力亦越强。较高剂量 YJ-2000 对各试虫的  $LT_{50}$  值大小依次为桑螟>二化螟>三化螟>菜粉蝶>小菜蛾, 即对各试虫的毒力依次增强。此结果与剂量效应所得结论基本一致。

### 3 讨论

Bt 菌株及其杀虫晶体蛋白基因是极其多样的。至今国内外已分离的 Bt 菌株超过 4 万株 (张光美, 2001), 其中有 70 个血清型、分属 83 个亚种 (Lacadet 等, 1999); 在 GenBank 上登记的杀虫晶体蛋白基因已超过 300 个。由于 Bt 各亚种间的杀虫谱及其毒力均不尽相同, 甚至同一亚种不同菌株间亦有较大差异, 使得寻找高效和特异的 Bt 菌株及其杀虫晶体蛋白基因已是当前 Bt 研究的重点和热点之一。本文结果表明 YJ-2000 菌株对家蚕毒性甚低, 即使在高剂量 ( $1\sim 2\times 10^5$  晶体/ml) 处理下, 累计死亡率始终低于 10% 而无法测出  $LC_{50}$ , 但对菜蛾科 (Plutellidae) 的小菜蛾、螟蛾科 (Pyralidae) 的三化螟、二化螟和桑螟及粉蝶科 (Pieridae) 的菜粉蝶均有强或较强的毒性。这与其它已报道的对家蚕低毒的 HD-73 菌株 ( $LC_{50}$  为 3521.0 mg 晶体/ml) (李荣森等, 1989) 和对家蚕低毒 ( $LC_{50}$  为 0.342 mg 晶体蛋白/ml) 而对小菜蛾、菜粉蝶和美国白蛾 *Hyphantria cunea* (灯蛾科 Arctiidae) 呈较高毒性的 AF101 菌株 (Aizawa 等, 1975) 等相比, YJ-2000 菌株对家蚕的毒性更低, 而对其他鳞翅目害虫的杀虫谱较广且有较强的杀虫效果。因此, YJ-2000 菌株是一株对家蚕安全而对其他鳞翅目杀虫效果较强的理想 Bt 菌株。它一方面有望开发出供养蚕地区桑树及其邻近作物上害虫防治使用的微生物农药; 另一方面可望将其晶体蛋白杀虫基因用于工程 Bt 微生物杀虫剂和转 Bt 基因抗虫植物的研发或培育, 并使得它们可在我国养蚕区推广应用。至于本文对桑螟幼虫毒性偏低的原因, 可能与供试虫龄偏高有关, 若用 1~2 龄幼虫, 毒性会有所提高, 因为一般情况下低龄幼虫对

Bt 晶体蛋白更敏感，具体有待验证。

本文结果表明，TDM 模型能较好地反映 YJ-2000 毒力的时间和剂量效应，获得信息完全，生物学意义明确。因此该模型适用于不同 Bt 菌株杀虫效果的综合评价。

表 12.1 苏云金杆菌 YJ-2000 对不同试虫毒力的时间-剂量-死亡率模型模拟与参数估计

| 试虫                            | 条件死亡概率模型         |          |        |        |        | 累积死亡概率模型       |          |        |
|-------------------------------|------------------|----------|--------|--------|--------|----------------|----------|--------|
|                               | 参数*              | 估计值      | 标准误    | t 测验   | P 值    | 参数*            | 估计值      | 标准误    |
| 家蚕<br><i>B. mori</i>          | $\hat{\beta}$    | 0.2337   | 0.5694 | 0.4104 | 0.6861 | $\hat{\beta}$  | 0.2337   | 0.1651 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -6.2117  | 2.9589 | 2.0993 | 0.0494 | $\hat{\tau}_2$ | -6.2117  | 4.4596 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -4.8110  | 2.5433 | 1.8916 | 0.0739 | $\hat{\tau}_4$ | -4.5907  | 3.3944 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -6.1830  | 2.9000 | 2.1321 | 0.0463 | $\hat{\tau}_6$ | -4.4055  | 3.4362 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -6.1768  | 2.7325 | 2.2605 | 0.0357 | $\hat{\tau}_8$ | -4.2484  | 3.3951 |
| 桑螟<br><i>D. pyralis</i>       | $\hat{\beta}$    | 1.7621   | 0.4378 | 4.0244 | 0.0007 | $\hat{\beta}$  | 1.7621   | 0.0896 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -11.5626 | 2.2302 | 5.1845 | 0.0001 | $\hat{\tau}_2$ | -11.5626 | 2.3239 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -11.6758 | 2.2379 | 5.2173 | 0.0000 | $\hat{\tau}_4$ | -10.9244 | 2.2865 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -10.8847 | 2.1719 | 5.0115 | 0.0001 | $\hat{\tau}_6$ | -10.2112 | 2.2209 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -11.1867 | 2.2293 | 5.0179 | 0.0001 | $\hat{\tau}_8$ | -9.8913  | 2.2291 |
| 菜粉蝶<br><i>P. rapae</i>        | $\hat{\beta}$    | 0.0171   | 0.1497 | 0.1145 | 0.9101 | $\hat{\beta}$  | 0.0171   | 0.0403 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -0.5755  | 0.6749 | 0.8526 | 0.4051 | $\hat{\tau}_2$ | -0.5755  | 0.8199 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -1.5747  | 0.7168 | 2.1969 | 0.0414 | $\hat{\tau}_4$ | -0.2620  | 0.7943 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -1.5391  | 0.7823 | 1.9673 | 0.0648 | $\hat{\tau}_6$ | -0.0160  | 0.7932 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -1.3229  | 0.8994 | 1.4710 | 0.1586 | $\hat{\tau}_8$ | 0.2235   | 0.8279 |
| 小菜蛾<br><i>P. xylostella</i>   | $\hat{\beta}$    | 2.0293   | 0.2615 | 7.7599 | 0.0000 | $\hat{\beta}$  | 2.0293   | 0.0800 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -9.3663  | 1.2206 | 7.6738 | 0.0000 | $\hat{\tau}_2$ | -9.3663  | 1.7418 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -10.1621 | 1.1653 | 8.7205 | 0.0000 | $\hat{\tau}_4$ | -8.9939  | 1.6601 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -10.3298 | 1.1665 | 8.8554 | 0.0000 | $\hat{\tau}_6$ | -8.7605  | 1.6108 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -10.5354 | 1.1967 | 8.8040 | 0.0000 | $\hat{\tau}_8$ | -8.6039  | 1.5858 |
| 三化螟<br><i>S. incertulas</i>   | $\hat{\beta}$    | 0.3102   | 0.1447 | 2.1436 | 0.0452 | $\hat{\beta}$  | 0.3102   | 0.0440 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -2.2166  | 0.6697 | 3.3099 | 0.0037 | $\hat{\tau}_2$ | -2.2166  | 0.9434 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -3.2707  | 0.6867 | 4.7628 | 0.0001 | $\hat{\tau}_4$ | -1.9176  | 0.9099 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -3.1315  | 0.7210 | 4.3431 | 0.0004 | $\hat{\tau}_6$ | -1.6575  | 0.9131 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -4.6004  | 0.9271 | 4.9621 | 0.0001 | $\hat{\tau}_8$ | -1.6061  | 0.9056 |
| 二化螟<br><i>C. suppressalis</i> | $\hat{\beta}$    | 0.7795   | 0.2123 | 3.6724 | 0.0016 | $\hat{\beta}$  | 0.7795   | 0.0611 |
|                               | $\hat{\gamma}_2$ | -5.2573  | 1.0533 | 4.9912 | 0.0001 | $\hat{\tau}_2$ | -5.2573  | 1.5052 |
|                               | $\hat{\gamma}_4$ | -5.7138  | 1.0406 | 5.4909 | 0.0000 | $\hat{\tau}_4$ | -4.7666  | 1.4484 |
|                               | $\hat{\gamma}_6$ | -5.7545  | 1.0500 | 5.4807 | 0.0000 | $\hat{\tau}_6$ | -4.4500  | 1.4236 |
|                               | $\hat{\gamma}_8$ | -6.6957  | 1.1724 | 5.7110 | 0.0000 | $\hat{\tau}_8$ | -4.3494  | 1.4263 |

注: \*参数符号下标表示处理后相应的时间区间 (d)。

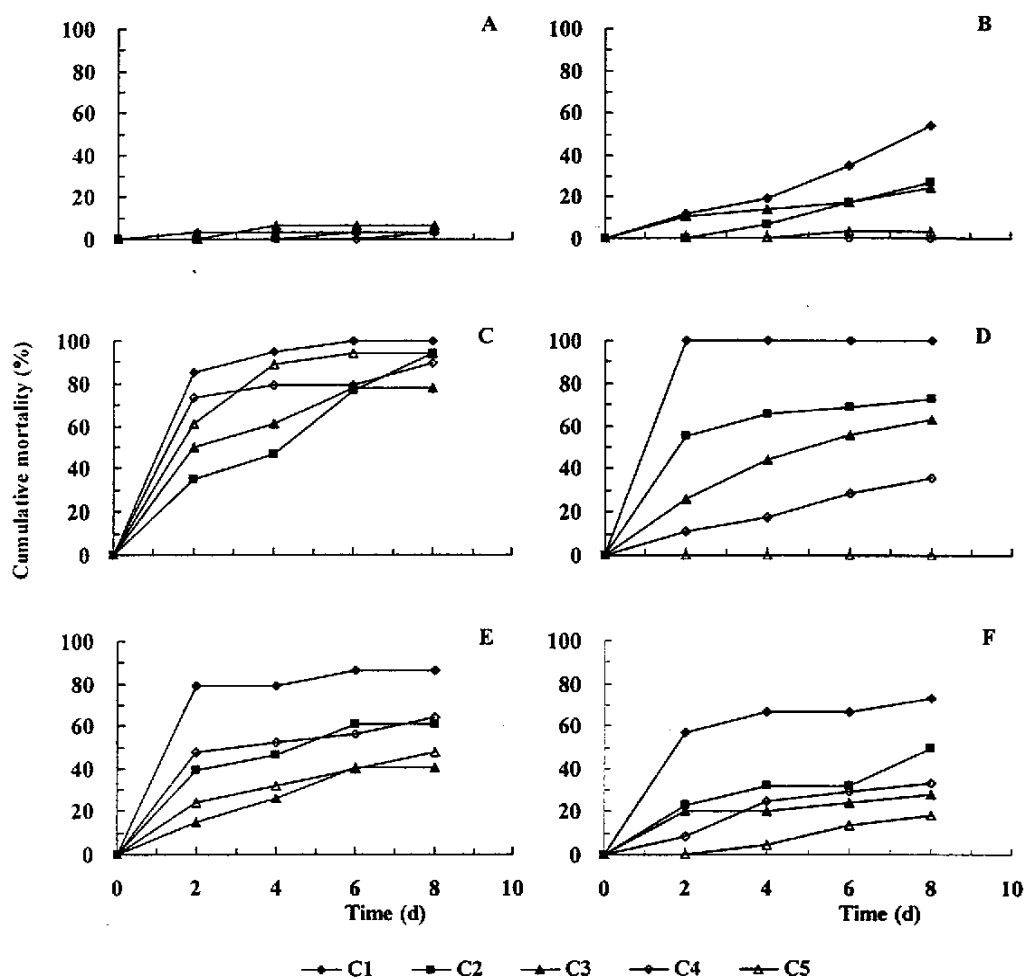


图 12.1 各试虫饲喂不同浓度苏云金杆菌 YJ-2000(晶体数/ml)后的累积死亡率  
A. 家蚕 *Bombyx mori*; B. 桑螟 *Diaphania pyralis*; C. 菜粉蝶 *Pieris rapae*; D. 小菜蛾 *Plutella xylostella*;  
E. 三化螟 *Scirpophaga incertulas*; F. 二化螟 *Chilo suppressalis*。下同。

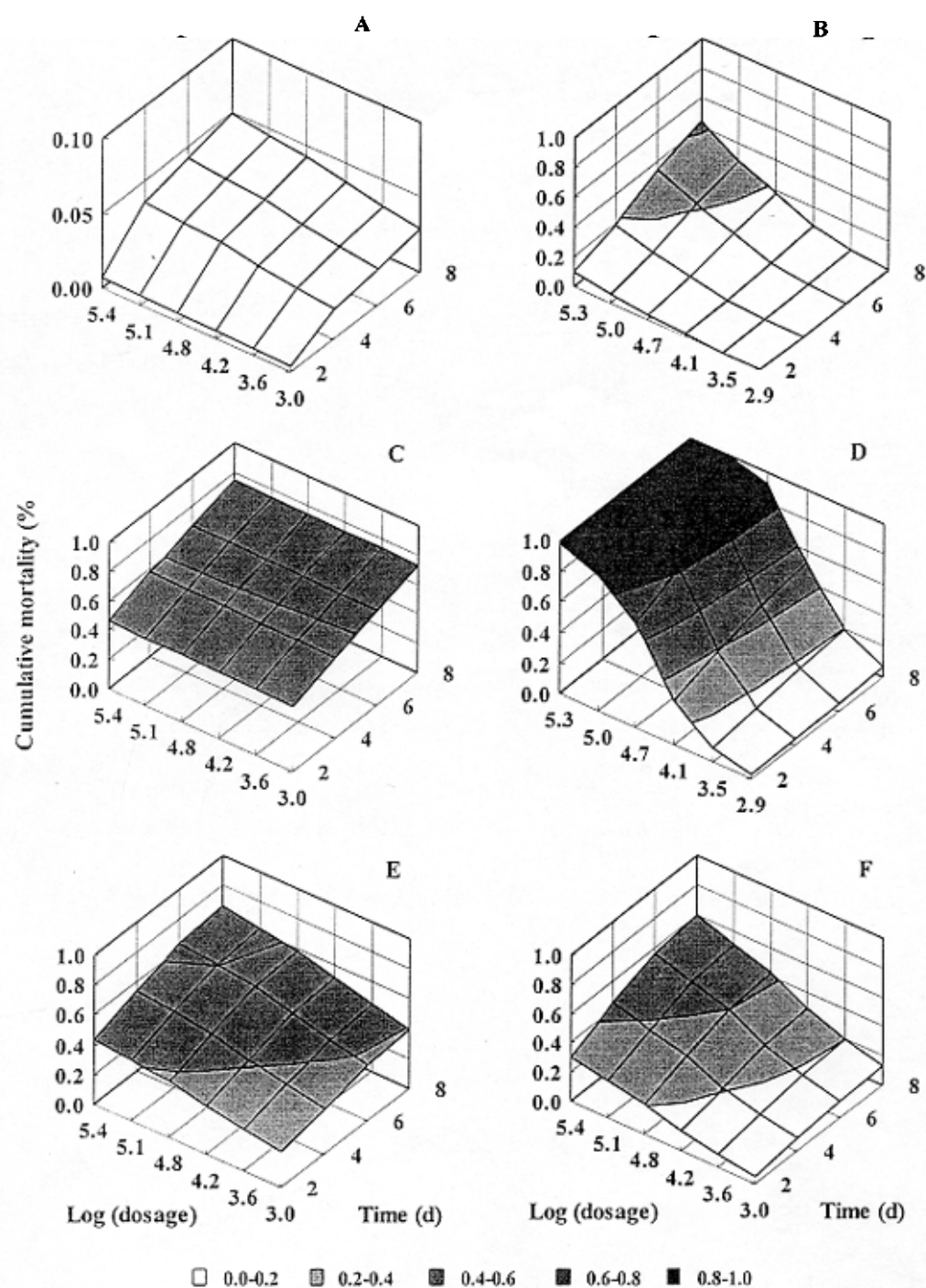


图 12.2 苏云金杆菌 YJ-2000 对各试虫作用的 CLL 模型拟合

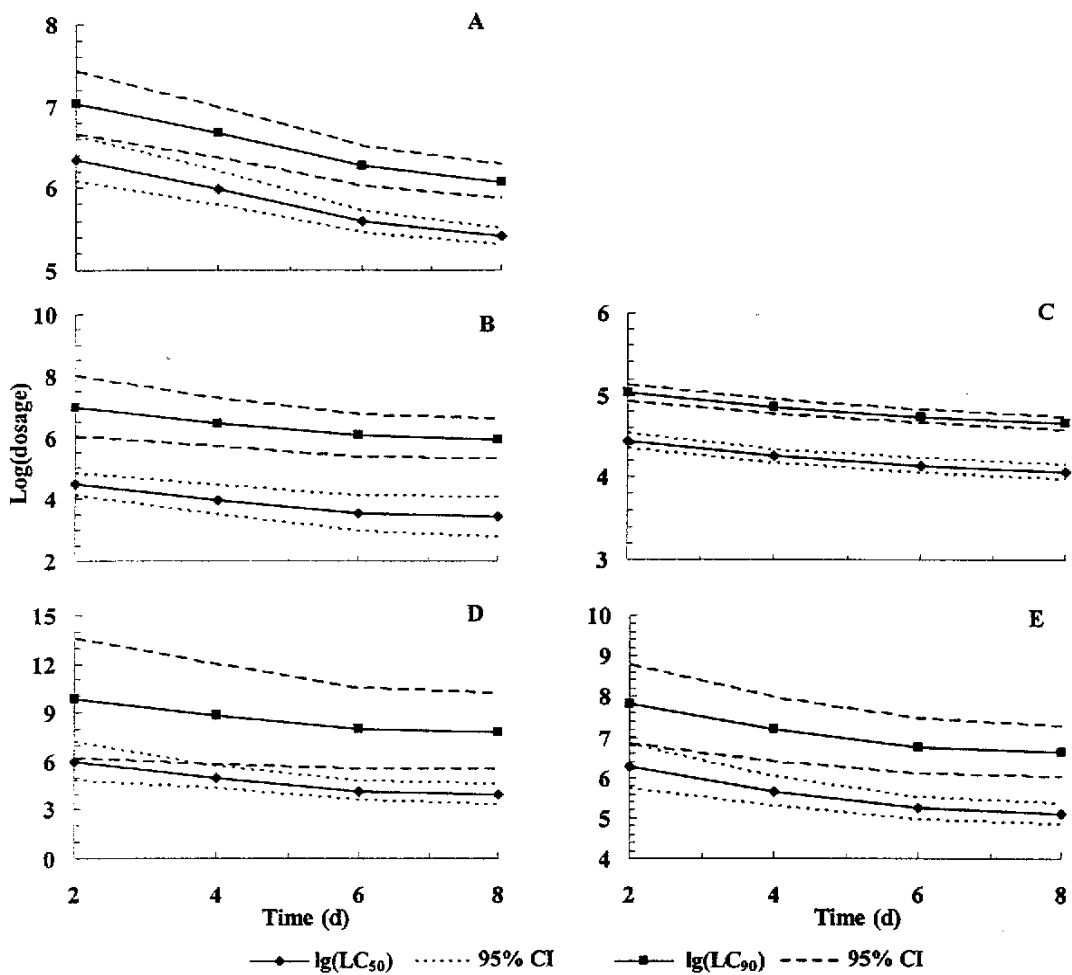


图 12.3 苏云金杆菌 YJ-2000 对各试虫随时间变化的剂量效应

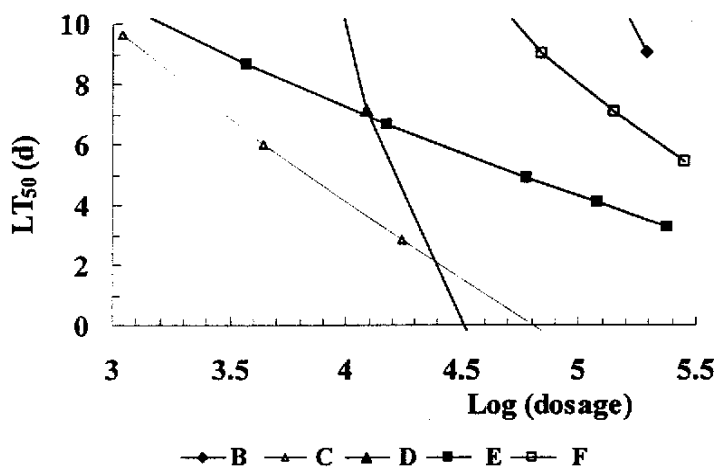


图 12.4 苏云金杆菌 YJ-2000 对各试虫随剂量变化的时间效应



## 第十三章 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株对家蚕安全性的评价

YJ-2000 菌株是一株对家蚕无毒性而对其他鳞翅目杀虫效果较强的理想 Bt 菌株。至今虽已有对家蚕低毒的 Bt 菌株如 AF101 (Aizawa, 1987) 和 HD-73 (李荣森等, 1989) 等报道, 但均仅限于对这些菌株产生杀虫活性差异的可能机理进行了些探讨(邵宗泽等, 1995; Kim 等, 1998a;b), 而未见有关它们对家蚕生物学安全性评价的研究。为此, 本章就其对家蚕生物学特性和产丝量有否影响作进一步的研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株

供试苏云金芽孢杆菌菌株包括 YJ-2000、YJ-1999 (由本实验室筛选获得), CRY1Ab 菌株(本室保存)为 *cry1Ab* 基因转入 *D11L* 受体中单一表达的工程菌。本试验以 CRY1Ab 和 YJ-1999 为对照菌株。

#### 1.2 供试家蚕品种

家蚕为春蚕品种: 青松×皓月, 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。

#### 1.3 发酵液制备

采用喻子牛(1990)牛肉膏蛋白胨培养基, 30℃下 220 r/min 摇床上培养至 70%~90% 晶体脱落, 得 Bt 菌株发酵液, 其中 CRY1Ab 菌株培养基中加有红霉素(终浓度 25 µg/mL)。镜检计算单位体积晶体数。YJ-2000、CRY1Ab 和 YJ-1999 的发酵原液浓度分别为  $2.38 \pm 0.38$ 、 $1.85 \pm 0.13$  和  $2.17 \pm 0.12$  ( $\times 10^5$  个晶体/mL), 统计检验无显著差异。

#### 1.4 致死中浓度的测定

将各菌株发酵原液按比例稀释成系列浓度, 并加 1%吐温作展着剂, 以无菌水为对照。取大小一致的新鲜桑叶分别浸入系列浓度发酵液中, 不断摇晃使叶片充分黏附发酵液, 取出后自然晾干。分别饲喂家蚕蚁蚕 24 h 后, 考查死亡虫数。每处理 20 头, 重复 3 次。最后计算各菌株的毒力曲线、致死中浓度  $LC_{50}$  及 95%置信限。

#### 1.5 存活率、取食量、历期、体重和茧质的测定

根据毒力测定结果, 每菌株分别设置 3 个稀释浓度处理, 即原液 (0×) 和 16×、256× 稀释液, 加无菌水为对照。按方法 1.4 处理, 并持续饲喂蚁蚕 48 h 后, 将存活幼虫转移至已灭菌果酱瓶中, 饲喂正常新鲜桑叶, 3 龄后在果酱瓶中进行单头饲养。每天定时考查记载取

食、蜕皮和死亡情况等。化蛹后 15 天，称量全茧量、蛹重和茧层量。每菌株各浓度处理 30 头蚁蚕，重复 3 次。

## 1.6 蚕蛾羽化率、寿命和产卵量的测定

在方法 1.5 的基础上，继续考查供试菌株的各处理存活蚕蛹的羽化率、羽化后蚕蛾的寿命，并将同一处理的雌雄蚕蛾进行配对，任其自由交配，再考查单头雌蛾的产卵量。

# 2 结果与分析

## 2.1 对蚁蚕的毒力

YJ-2000 菌株对家蚕蚁蚕的致死率极低，与对照相比无明显差异，而 CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株则有较强的毒力，其中 YJ-1999 菌株更强（表 13.1）。

## 2.2 对幼虫的影响

### 2.2.1 存活率

YJ-2000 菌株对幼虫无明显致死作用，不同浓度处理下的幼虫存活率均保持在 85% 以上，其存活率曲线与对照无明显差异，两者几乎重叠（图 13.1）。CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株对幼虫存活的影响均具明显的剂量效应，处理浓度越高，幼虫存活率越低，存活率曲线降幅越显著。相同稀释倍数下，YJ-1999 对家蚕的致死效应比 CRY1Ab 更明显。就各龄幼虫死亡率而言，YJ-2000 处理与对照无显著差异。CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株高浓度处理均可导致 1 龄幼虫全部死亡；低浓度处理 1、2 龄幼虫死亡率显著较高，但仍有部分幼虫免于死亡，且这些幸存者进入 3 龄后的死亡率与对照差异不显著，即 CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株低浓度处理仅对低龄幼虫具较明显的影响。

### 2.2.2 发育历期

3 种 Bt 菌株处理对低龄幼虫的发育均有一定的影响（表 13.2）。YJ-2000 可使 1 龄历期极显著延长 11.1%，且高浓度处理的影响可持续至 2 龄，此后各龄历期与对照间无显著差异。CRY1Ab 和 YJ-1999 的低浓度处理结果与 YJ-2000 正相反，存活幼虫 1 龄历期均极显著缩短，而 2 龄及其以后各龄的历期则大多明显长于对照，表明这两种 Bt 菌株处理对幼虫发育的影响较为持久。从总幼虫历期来看，除 YJ-1999 导致总历期极显著延长外，其余处理与对照间均无显著差异。

### 2.2.3 取食量与体重

Bt 菌株对 1 龄幼虫食叶量的影响与其它各龄相比则更为明显。CRY1Ab、YJ-1999 和高浓度 YJ-2000 (0×) 处理均可使 1 龄幼虫食叶面积显著减少，分别为 21.0%~90.0%、90.0%

和 60.0%，且多随处理浓度增高而减少更多，即表现抑食效应，其中 YJ-1999 菌株的抑食效应可延续至 3 龄。这表明家蚕对这些菌株均有不同程度拒食现象，但对 YJ-2000 的拒食程度相对较低。

Bt 处理可导致 1 龄眠蚕体重明显降低，其中 CRY1Ab、YJ-1999 和 YJ-2000 处理的 1 龄眠重分别降低了 50.0%~51.1%、83.0%和 52.3%~62.5%，这可能与取食量减少有关。此后，除 YJ-1999 处理的眠蚕体重偏低外，其余均与对照无显著差异。

### 2.3 对蛹及成虫的影响

YJ-2000 对化蛹率、蛹历期、蛹重和茧量等指标均无显著影响，而 CRY1Ab 和 YJ-1999 处理均可导致这些指标不同程度降低，其中化蛹率差异达显著水平（表 13.3）。

YJ-2000 对家蚕蛹羽化率、成虫寿命和产卵量均无显著影响（表 13.4）。当以 CRY1Ab 的 256 倍稀释液处理时，幸存的蛹能正常羽化，但羽化后雌蛾不能正常产卵；除此之外，CRY1Ab 和 YJ-1999 的其它所有处理，其幸存的蛹均不能正常羽化。

## 3 讨论

毒力测定和全幼虫期存活率持续考查的结果表明，Bt 菌株 YJ-2000 明显不同于 CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株，对家蚕蚁蚕的致死作用甚微，而且对整个幼虫期幼虫的存活率、化蛹率和羽化率均无明显的影响，这与我们第十二章结果完全相符，也即再次证明 Bt 菌株 YJ-2000 对家蚕基本无毒性。就 Bt 菌株 YJ-2000 对家蚕幼虫历期、取食量、幼虫体重、全茧重、蛹重、茧壳重、羽化率和产卵量等生物学特征指标的影响来看，除导致 1 龄幼虫历期延长、取食量减少及体重降低外，对 2 龄及其以后各龄幼虫的生物学特性均无显著的影响；不仅如此，而且对茧层量和产卵量也无显著影响。与此相比，CRY1Ab 和 YJ-1999 菌株则不同，高浓度会导致全部蚁蚕死亡，呈现强急性毒性；低浓度虽不至于使幼虫全部死亡，但对幸存幼虫的生长发育、茧层量和产卵量等大多呈现明显的负影响。综合分析可知，YJ-2000 菌株不仅对家蚕存活与生长发育基本无负作用，而且对养蚕或制种所需的某些重要指标，如茧层量和单蛾产卵量等均无显著影响，即系一株对家蚕安全性颇高的特异性菌株。

该菌株的获得只是为今后开发用于蚕桑地区害虫生防提供了物质准备，但如何将其得以真正的应用尚待进一步探讨。

表 13.1 三种 Bt 菌株对家蚕蚁蚕的毒力

| 菌株      | 毒力曲线               | $\chi^2_{df=4}$ | $P$   | $LC_{50}$<br>( $\times 10^3$ 个晶体/mL) | 95%置信区间     |
|---------|--------------------|-----------------|-------|--------------------------------------|-------------|
| YJ-2000 | -                  | -               | -     | -                                    | -           |
| CRY1Ab  | $y=1.0313x-1.5746$ | 11.24           | 0.024 | 33.65                                | 7.98~188.55 |
| YJ-1999 | $y=0.9402x-0.6217$ | 6.59            | 0.160 | 4.58                                 | 2.21~7.98   |

表 13.2 三种 Bt 菌株处理后家蚕幼虫历期的比较

| 菌株      | 稀释倍数         | 历期 (d) Mean $\pm$ S. E. |                   |                  |                  |                    |
|---------|--------------|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
|         |              | 1 龄                     | 2 龄               | 3 龄              | 4 龄              | 5 龄                |
| YJ-2000 | 0 $\times$   | 3.0 $\pm$ 0.0 aA        | 3.1 $\pm$ 0.1 bB  | 3.0 $\pm$ 0.0 cC | 5.6 $\pm$ 0.1 bB | 7.8 $\pm$ 0.1 bB   |
|         | 16 $\times$  | 3.0 $\pm$ 0.0 aA        | 2.5 $\pm$ 0.1 bcB | 2.9 $\pm$ 0.1 cC | 5.4 $\pm$ 0.1 bB | 7.9 $\pm$ 0.1 bB   |
|         | 256 $\times$ | 3.0 $\pm$ 0.0 aA        | 2.3 $\pm$ 0.1 cB  | 3.1 $\pm$ 0.1 cC | 5.4 $\pm$ 0.1 bB | 8.1 $\pm$ 0.1 bB   |
| CRY1Ab  | 16 $\times$  | 2.0 $\pm$ 0.0 cC        | 4.9 $\pm$ 0.1 aA  | 4.5 $\pm$ 0.5 bB | 3.5 $\pm$ 1.5 cC | 8.0 $\pm$ 0.0 bB   |
|         | 256 $\times$ | 2.0 $\pm$ 0.0 cC        | 2.7 $\pm$ 0.1 bcB | 3.1 $\pm$ 0.1 cC | 5.0 $\pm$ 0.1 bB | 8.7 $\pm$ 0.2 abAB |
| YJ-1999 | 256 $\times$ | 2.0 $\pm$ 0.0 cC        | 3.0 $\pm$ 0.0 bB  | 6.4 $\pm$ 0.6 aA | 8.0 $\pm$ 0.6 aA | 9.5 $\pm$ 0.3 aA   |
| CK      |              | 2.7 $\pm$ 0.1 bB        | 2.5 $\pm$ 0.1 bcB | 3.2 $\pm$ 0.1 cC | 4.9 $\pm$ 0.2 bB | 8.1 $\pm$ 0.1 bB   |

注: Duncan's 新复极差测验表明,同一列数据中具相同大、小写字母者差异分别未达极显著 ( $P>0.01$ )和显著 ( $P>0.05$ )水平(下同)。

表 13.3 三种 Bt 菌株处理后家蚕蛹期有关指标的比较

| 菌株      | 稀释倍数         | 化蛹率 (%)            | 蛹期 (d)              | 全茧量 (g)              | 蛹重 (g)            | 茧层量 (g)           |
|---------|--------------|--------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|         |              | Mean $\pm$ S. E.   | Mean $\pm$ S. E.    | Mean $\pm$ S. E.     | Mean $\pm$ S. E.  | Mean $\pm$ S. E.  |
| YJ-2000 | 0 $\times$   | 82.6 $\pm$ 6.3 abA | 16.4 $\pm$ 0.4 aAB  | 1.73 $\pm$ 0.05 abcA | 1.33 $\pm$ 0.04 a | 0.41 $\pm$ 0.01 a |
|         | 16 $\times$  | 88.9 $\pm$ 6.4 aA  | 16.1 $\pm$ 0.5 abAB | 1.63 $\pm$ 0.06 abcA | 1.13 $\pm$ 0.07 a | 0.38 $\pm$ 0.01 a |
|         | 256 $\times$ | 81.5 $\pm$ 9.8 abA | 15.9 $\pm$ 0.5 abAB | 1.78 $\pm$ 0.06 abA  | 1.36 $\pm$ 0.05 a | 0.40 $\pm$ 0.01 a |
| CRY1Ab  | 16 $\times$  | 3.3 $\pm$ 3.3 dB   | 18.0 $\pm$ 0.0 aA   | 1.40 $\pm$ 0.00 bcA  | 1.04 $\pm$ 0.00 a | 0.33 $\pm$ 0.00 a |
|         | 256 $\times$ | 66.0 $\pm$ 7.3 bA  | 17.3 $\pm$ 0.5 aAB  | 1.80 $\pm$ 0.06 aA   | 1.25 $\pm$ 0.10 a | 0.43 $\pm$ 0.02 a |
| YJ-1999 | 256 $\times$ | 16.7 $\pm$ 6.7 cB  | 13.0 $\pm$ 0.0 bB   | 1.38 $\pm$ 0.13 cA   | 1.04 $\pm$ 0.09 a | 0.33 $\pm$ 0.04 a |
| CK      |              | 81.3 $\pm$ 4.3 abA | 17.5 $\pm$ 0.4 aAB  | 1.70 $\pm$ 0.04 abcA | 1.32 $\pm$ 0.04 a | 0.38 $\pm$ 0.02 a |

表 13.4 三种 Bt 菌株处理后家蚕成虫有关指标的比较

| 菌株      | 稀释倍数         | 羽化率 (%)           | 成虫寿命 (d)         | 每雌产卵量 (粒)             |
|---------|--------------|-------------------|------------------|-----------------------|
|         |              | Mean $\pm$ S. E.  | Mean $\pm$ S. E. | Mean $\pm$ S. E.      |
| YJ-2000 | 0 $\times$   | 74.7 $\pm$ 1.8 a  | 3.2 $\pm$ 0.3 a  | 253.9 $\pm$ 108.6 abA |
|         | 16 $\times$  | 91.7 $\pm$ 8.3 a  | 3.8 $\pm$ 0.4 a  | 374.8 $\pm$ 123.5 aA  |
|         | 256 $\times$ | 79.6 $\pm$ 4.6 a  | 3.4 $\pm$ 0.3 a  | 400.1 $\pm$ 117.6 aA  |
| CRY1Ab  | 256 $\times$ | 79.2 $\pm$ 20.8 a | 2.1 $\pm$ 0.3 a  | 0.0 $\pm$ 0.0 bA      |
| YJ-1999 |              | —                 | —                | —                     |
| CK      |              | 82.7 $\pm$ 5.4 a  | 3.5 $\pm$ 0.3 a  | 289.2 $\pm$ 91.2 abA  |

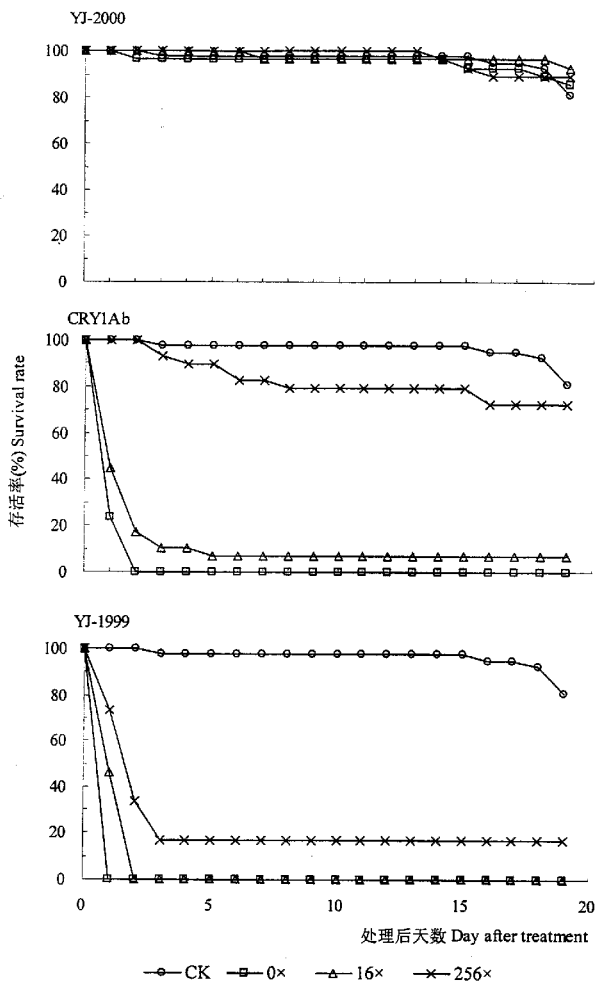


图 13.1 三种 Bt 菌株处理后家蚕幼虫存活率曲线的比较

# 第十四章 苏云金杆菌 YJ-2000 菌株伴孢晶体的蛋白质、抗蛋白酶多肽及其基因型初探

YJ-2000 菌株是新获得的对家蚕安全且对其它鳞翅目害虫具较强杀虫活性的特异性 Bt 菌株。明确该菌株杀虫晶体蛋白的结构与功能的关系以及杀虫基因序列结构与表达调控,可为该菌株在今后得到广泛而深入应用提供重要的理论保证,同时还可改造生产具有选择性高效工程菌株以及培育对家蚕安全的转 Bt 基因抗虫作物提供候选基因资源。鉴于 Bt 杀虫晶体蛋白的毒力特性与其蛋白质组成、抗蛋白酶毒性多肽性质以及晶体蛋白基因型等密切相关,本章就 YJ-2000 菌株伴孢晶体的蛋白及其基因相关的特性作了初步探索,结果如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

供试苏云金芽孢杆菌菌株包括 YJ-2000、YJ-1999 和 CRY1Ab 工程菌株,其中 YJ-2000 和 YJ-1999 由本实验室筛选获得,CRY1Ab 菌株由本实验室保存,仅含 *cry1Ab* 基因。本试验以 CRY1Ab 和 YJ-1999 为对照菌株。

### 1.2 发酵液制备

参照喻子牛(1990),采用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1.0%和 NaCl 0.5%) pH7.0~7.2、30℃下 220rpm 摇床上培养 36h,即至 70~90%晶体脱落,得该菌株发酵液。CRY1Ab 菌株发酵液制备中,需加终浓度为 25μg/ml 的红霉素。

### 1.3 伴孢晶体的分离与提纯

参照喻子牛(1990),采用液体双相分离法分离、提纯伴孢晶体。将发酵液 10000g 4℃离心 30min,收集菌体,尔后用无菌水洗涤、离心 3 次,再用生理盐水洗涤沉淀,再离心,收集沉淀。然后按 70mg 沉淀每毫升蒸馏水制成悬液于分液漏斗中,剧烈摇动,将下层水相放入烧杯中以去除泡沫。再转入分液漏斗,加入 1%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液及 CCl<sub>4</sub> 溶液(晶体悬液:1%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CCl<sub>4</sub>三者体积比为 7:6:7),振荡约 10min,静置约 15min,将上层水相吸出,离心。再用双蒸水洗一次,离心,收集沉淀物。如第一次提纯的晶体纯度不够,可重复分离,直到符合要求(镜检观察每一视野中少于一个芽孢)。将沉淀物真空冷冻干燥后保存备用。

### 1.4 原毒素的制备

将提纯的伴孢晶体 10mg/ml 悬浮于含 10mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)的 0.05mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-HCl (pH10.0)缓冲液中,37℃作用 60min,5000rpm 离心 10min,收集原毒素的上清液。280nm 处紫外分光光度法测定蛋白含量,以牛血清蛋白为标准。

### 1.5 昆虫肠液制备及原毒素的体外酶激活

取家蚕和菜青虫 5 龄幼虫,解剖肠道吸取肠液,5000rpm 4℃离心 30min,取上清液置

-20℃冰箱保存备用。

取 0.7-1.2mg 晶体蛋白，以含胰蛋白酶 10mg/ml 的 0.5mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  (pH9.5) 37℃消化 1h 后。在所取样品中加入终浓度 1% SDS，并立即于沸水浴中加热 3min 终止酶反应。原毒素溶液加家蚕和菜青虫肠液抽提物 (5:1, V/V)，37℃温育 60min，以 4mmol/L 的 PMSF 终止酶反应。

## 1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

对原毒素及毒性肽进行 SDS-PAGE 分析。浓缩胶浓度 5%，分离胶 10%，电泳缓冲液 SDS-Tris-Gly (pH8.5)，样品缓冲液 SDS-MDP (1%SDS, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 25mmol/L DTT)。晶体以蒸馏水悬浮，按 1:1 加入样品缓冲液，沸水浴 3min，10000g 离心 5min 取上清点样。对晶体蛋白酶降解产物分析时，不加样品缓冲液。每种样品取约 20μg 蛋白质，并测定分子量。

## 1.7 质粒提取 (Triton X-100 裂解法)

接种 Bt 菌株于 LB (胰化蛋白胨 1%，酵母提取物 0.5%，NaCl 1%) 平板上，培养 16-18h 后，取单菌落于 3ml LB 液体培养基中，30℃振荡培养过夜；取 1.5ml 培养液于 Eppendorf 管中，以 4000r/min 离心 5min，去上清；加入 100μl TES (50mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, pH8.0) 洗涤菌体，4000r/min 离心 2min，弃上清。

于 Eppendorf 管内加入 150μl 溶液 1 (5mg/L Lysozyme, 100μg/ml RNase 溶于 TES)，37℃水浴 60min；加入 300μl 溶液 2 (6% Triton X-100, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA, 100μg/L Pronase K)，37℃水浴 90min，每隔 30min 摇匀一次；加入 60μl 5mol/L NaCl，混匀，室温放置 2min；用等体积饱和酚连续抽取 3 次，再用酚:氯仿和氯仿各抽取一次；12,000×g 离心 10min，弃上清，加 2 倍体积冰冷无水乙醇沉淀，-20℃放置 1h，离心，再用 70%乙醇洗涤，真空抽干，即得质粒 DNA；用 20μl TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 缓冲液溶解质粒 DNA，0.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后，于-20℃保存备用。

## 1.8 Bt 晶体蛋白基因类型的快速 PCR 检测

Bt 菌株用 LB 平板划线培养后，用接种环刮取菌苔一满环于 100μl 无菌水中，-20℃冰冻 20min 后煮沸 10min，8000rpm 离心 2-3min，取上清 4μl 为模板进行 PCR 扩增。

参照 Ceron 等 (1995) 和 Bravo 等 (1998)，根据 Bt 基因不同类型设计特异性引物如下：

1. cryIAa-SP: 5'-GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC-3' (724 bp)
2. cryIAb-SP: 5'-TCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTA-3' (238 bp)
3. cryIAC-SP: 5'-TCACTTCCCACATCCGACACTCTACC-3' (487 bp)
4. cryIB-SP: 5'-GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC-3' (830 bp)
5. cryIC-SP: 5'-CAACCTCTATTGGTGCAGGTTC-3' (288 bp)
6. cryID-SP: 5'-GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC-3' (414 bp)
7. cryIE-SP: 5'-CTTAGGGATAAATGTAGTACAG-3' (883 bp)

8. cry1F-SP: 5'-CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC-3' (368 bp)  
cry1A-F-AP: 5'-ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC-3'
9. cryII-SP: 5'-ATGAAACTAAAGAATCAAGA-3' (700 bp)  
cryII-AP: 5'-ACCTGTGCTATACCATTTC-3'
10. cry1-SP: 5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3' (558 bp)  
cry1-AP: 5'-TGAGTCGCTTGGCATATTTGACT-3'
11. cry2-SP: 5'-ACTATTTGTGATGGGTATAATGTA-3' (600 bp)  
cry2-AP: 5'-AATTCCCCATTCTCTGC-3'
12. cry3-SP: 5'-TTAACCGTTTTTCGCAGAGA-3' (700 bp)  
cry3-AP: 5'-TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 Bt 菌株伴孢晶体的蛋白质和抗蛋白酶多肽

Bt 菌株 YJ-2000、YJ-1999 和工程菌株 CRY1Ab 中原毒素的 SDS-PAGE 图型基本一致, 都含有 136.9kD 蛋白组分 (图 14.1)。在相同蛋白加样量情况下, YJ-2000 菌株 136.9kD 蛋白组分的含量较其它 2 菌株明显偏低。经胰蛋白酶作用, YJ-2000 和 CRY1Ab 菌株原毒素主要被降解为数条在 64.5kD 左右的抗蛋白酶多肽, 而 YJ-1999 菌株的降解产物主要为 63.4kD; 经家蚕幼虫中肠液作用, YJ-2000 和 CRY1Ab 菌株原毒素主要被降解为 64.5kD 多肽, 而 YJ-1999 菌株的降解产物仍主要为 63.4kD 多肽; 经菜青虫中肠液作用, 除 YJ-2000 和 CRY1Ab 菌株的 64.5kD 多肽、YJ-1999 菌株的 63.4kD 多肽外, 均出现 56.2kD 多肽。不同 Bt 菌株原毒素经酶解后的 64.5kD 多肽以 YJ-2000 菌株的含量明显较低, 但对于 56.2kD 多肽的相对含量, 不同菌株间则无明显差异。

### 2.2 不同 Bt 菌株的质粒组成及其杀虫晶体蛋白基因型的 PCR 分析

YJ-2000 菌株的质粒相对含量较低, 仅检测到长度约为 23.1kb 的质粒 (图 14.2)。YJ-1999 和 CRY1Ab 菌株至少含 3 种大小不一的质粒, 其中均以 23.1kb 质粒的相对含量较高。

用快速 PCR 检测不同菌株所含杀虫晶体蛋白基因型, 发现在菌株 YJ-2000 中均未检测到 *cry1*、*cry2* 和 *cry3* 类杀虫晶体蛋白基因 (图 14.3、表 14.1)。YJ-1999 菌株中检测出含有 *cry1~3* 类基因, 而工程菌株 CRY1Ab 中无 *cry2* 类基因。

## 3 讨论

我们对 YJ-2000 菌株内毒素蛋白组分以及所含质粒作了初步分析, 发现该菌株中的毒素蛋白含量明显偏低, 这可能与该菌株内含有杀虫晶体蛋白编码基因的质粒数量明显较低有关。YJ-2000 菌株原毒素经家蚕幼虫中肠液作用的主要降解产物为 64.5kD 多肽, 而经菜青



虫中肠液作用后的主要产物为 64.5kD 和 56.2kD 多肽, 其中 56.2kD 多肽的相对含量较高, 且与 YJ-1999 和 CRY1Ab 菌株中的含量相当。

利用 Bt 菌株及其杀虫晶体蛋白基因多样性来筛选具有特异杀虫活性的 Bt 新菌株已成为当前该领域研究热点之一。至今已报道对家蚕低毒并对其它鳞翅目害虫具一定活性的 Bt 菌株有 AF101 (Aizawa, 1987) 和 HD-73 (李荣森等, 1989) 等。AF101 菌株的杀虫晶体蛋白基因与库斯塔克亚种 HD-1 菌株的 *cry1Ab* 基因 93% 同源, 其中活性区序列同源性高达 97% (Kim 等, 1998b)。将两菌株编码晶体蛋白羧基端 (非活性区) 的基因序列互换, 重组表达后测定杀虫活性, 发现 AF101 菌株 Cry1Ab 蛋白羧基端序列差异可能是导致对家蚕毒性较低的主要原因 (Kim 等, 1998a)。而 HD-73 菌株的伴孢晶体含有 *cry1Ac* 编码的原毒素, 但其中缺少 138kD 蛋白组分, 导致其对鳞翅目昆虫的毒性降低 (李荣森等, 1989)。邵宗泽等 (1995) 报道鳞翅目幼虫胃液 pH 值差异可引起对 Bt 的敏感性变化。至于 YJ-2000 菌株对家蚕的较低毒性, 推测一方面可能与其体内毒素蛋白的 136.9kD 蛋白组分含量以及含有该蛋白编码基因的质粒数量较低有关, 另一方面还可能与经家蚕中肠液降解产生的对家蚕具杀虫活性的 64.5kD 多肽含量偏低有关。限于本章对 YJ-2000 菌株的粗浅研究, 不能排除存在其它原因导致该菌株对家蚕的低活性。

目前已知 *cry1* 和 *cry9* 类毒素蛋白对鳞翅目昆虫、*cry2* 类对双翅目/鳞翅目具有杀虫活性, *cry3* 类主要对鞘翅目有杀虫活性, 而个别如 Cry3Aa1 对鳞翅目亦有一定活性。我们采用 *cry1*~*3* 类基因型特异性引物对 YJ-2000 菌株作了快速 PCR 检测, 发现该菌株体内编码杀虫晶体蛋白的基因均不属于这 3 类基因型, 因此该菌株杀虫晶体蛋白应属于其它类别的基因型。有关 YJ-2000 菌株杀虫蛋白的基因型以及杀虫基因结构与家蚕不敏感性之间的关系等还有待于今后深入研究。

表 14.1 不同 Bt 菌株杀虫晶体蛋白的基因型

| 编号 | 菌株      | 1             | 2             | 3             | 4            | 5            | 6            | 7            | 8            | 9            | 10          | 11          | 12          |
|----|---------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|    |         | <i>cryIAa</i> | <i>cryIAb</i> | <i>cryIAc</i> | <i>cryIB</i> | <i>cryIC</i> | <i>cryID</i> | <i>cryIE</i> | <i>cryIF</i> | <i>cryII</i> | <i>cryI</i> | <i>cry2</i> | <i>cry3</i> |
| A  | YJ-2000 | -             | -             | -             | -            | -            | -            | -            | -            | -            | -           | -           | -           |
| B  | YJ-1999 | +             | +             | +             | -            | -            | +            | -            | +            | +            | +           | +           | +           |
| C  | CryIAb  | -             | +             | -             | -            | +            | +            | -            | +            | -            | +           | -           | +           |

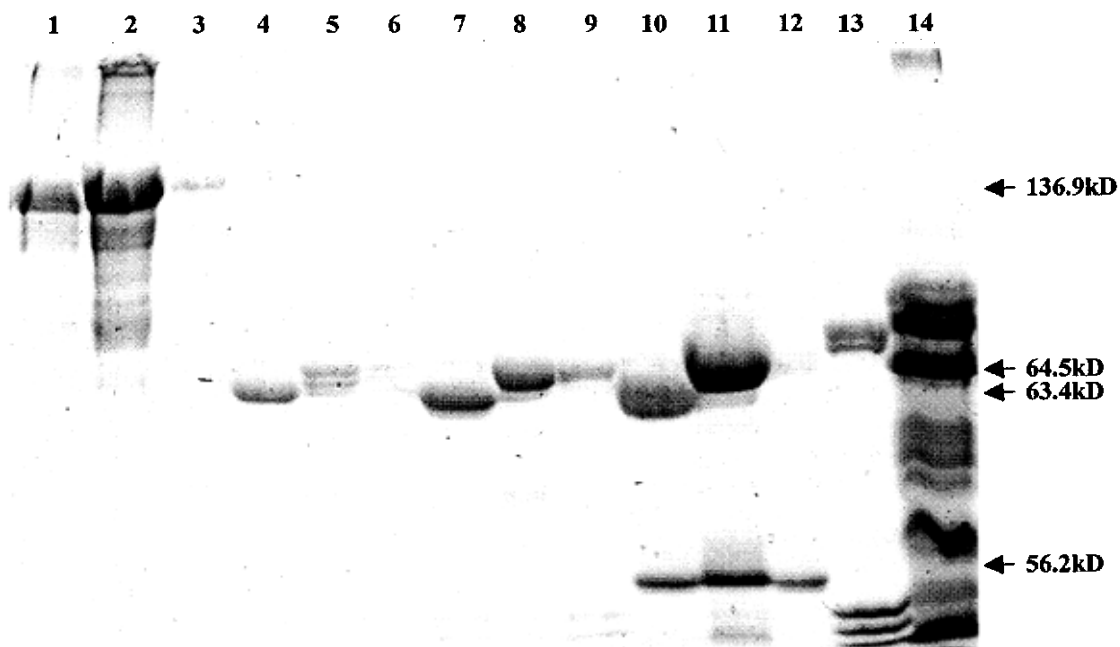


图 14.1 不同 Bt 菌株杀虫晶体蛋白及其酶解产物的 SDS-PAGE 电泳分析

注：1~3 分别为 YJ-1999、CRY1Ab 和 YJ-2000 菌株杀虫晶体蛋白；4~6 分别为 YJ-1999、CRY1Ab 和 YJ-2000 菌株的胰蛋白酶的水解产物；7~9 分别为 YJ-1999、CRY1Ab 和 YJ-2000 菌株的家蚕幼虫中肠液的水解产物；10~12 分别为 YJ-1999、CRY1Ab 和 YJ-2000 菌株的菜青虫幼虫中肠液的水解产物；13：家蚕幼虫中肠液；

14：菜青虫中肠液

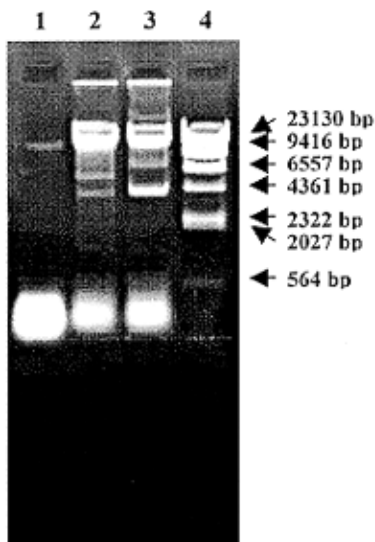


图 14.2 不同 Bt 菌株质粒的琼脂糖凝胶电泳分析

注：1：YJ-2000；2：CRY1Ab；3：YJ-1999；4：Marker

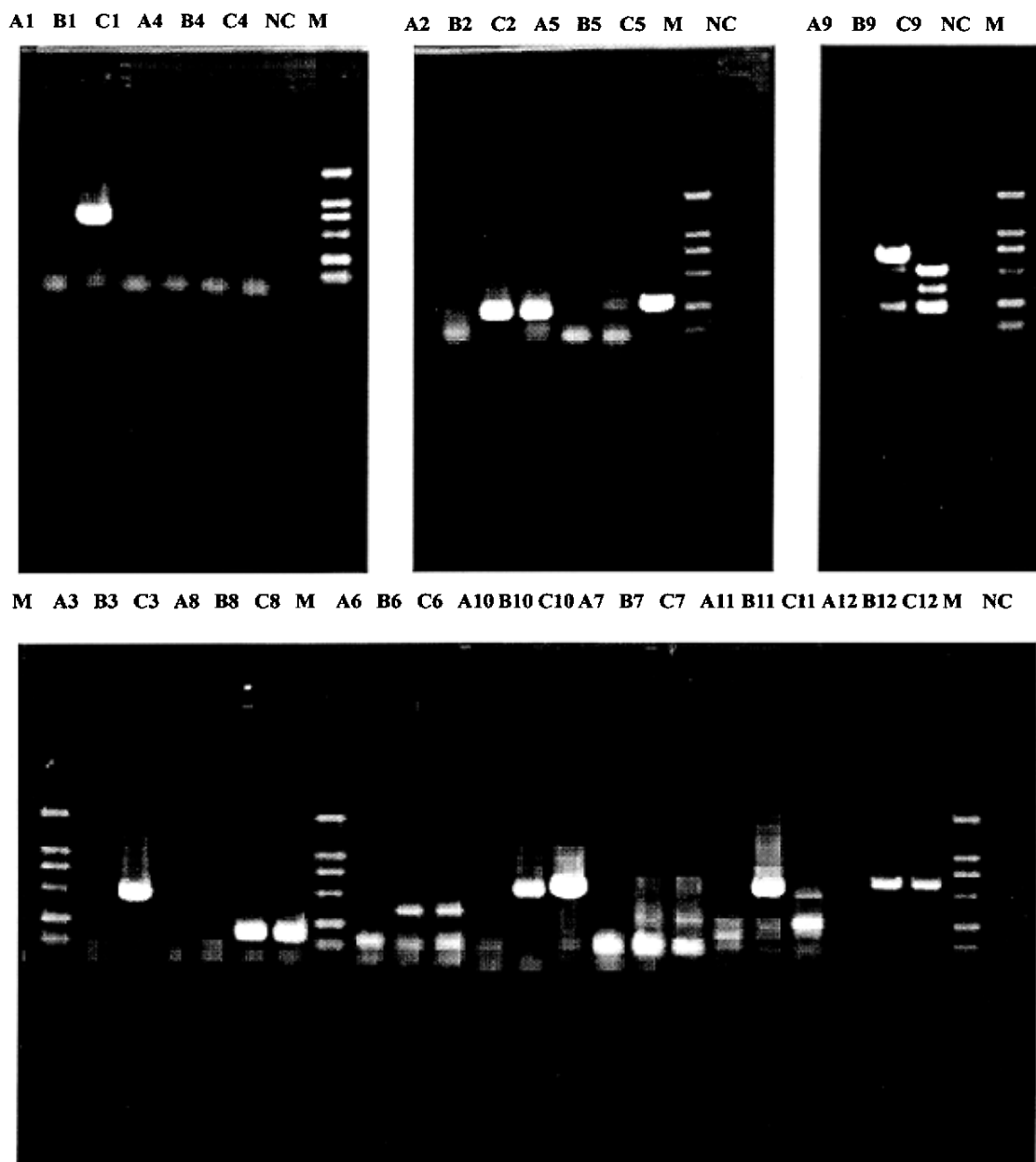


图 14.3 不同 Bt 菌株杀虫晶体蛋白基因的 PCR 分析

注：A：YJ-2000；B：CRY1Ab；C：YJ-1999；M：Marker；NC：阴性对照；1~12：特异性引物编号

## 第四部分 总讨论

## 1 转 Bt 基因抗虫水稻花粉对家蚕生态安全性的评价

本文就转Bt基因抗虫水稻花粉对家蚕的生态风险作了较为全面而系统的评价。至今,有关转基因抗虫植物花粉对非靶昆虫影响的研究并不多,而就转基因抗虫植物花粉对非靶标昆虫生态风险开展系统而全面的评价更是缺乏。目前仅就Bt玉米花粉对大斑蝶自然种群的生态风险作过为期2年的系列调查研究,其结论是已商品化种植的Bt玉米花粉在自然条件下对大斑蝶的生态风险可以忽略(Hellmich等, 2001; Oberhauser等, 2001; Pleasants等, 2001; Sears等, 2001; Stanley-Horn等, 2001)。

与大斑蝶不同,家蚕系经人工驯化的需在室内人为饲养、繁殖的绢丝昆虫,已完全不能适应野外的生存条件。因此,相对于大斑蝶而言,转Bt基因抗虫水稻花粉对家蚕的生态胁迫作用更易受人操作的影响,而且其生态风险也更易人为管理与控制。

### 1.1 Bt 水稻花粉对家蚕的危害

就Bt水稻花粉对家蚕的生态安全性开展评价,首先需明确Bt水稻花粉对家蚕幼虫是否能产生毒害效应。由于目前Bt水稻多采用系统表达启动子,在花粉中亦能表达一定含量的Bt毒蛋白。因此,当家蚕取食飘落Bt水稻花粉的桑叶时,即有可能摄入花粉中表达的Bt毒蛋白,从而造成危害。事实上,在室内人为强迫连续饲喂经高浓度Bt水稻花粉处理的桑叶后,家蚕确实出现急性中毒症状,死亡率明显增高。虽然Bt水稻花粉处理对家蚕幼虫的 $LC_{50}$ 值远不及纯Bt毒蛋白Cry1Ab处理的,但这显示出一个危险的信号,即高浓度Bt水稻花粉处理对家蚕存在明显的致死效应。

通过对家蚕幼虫连续饲喂不同剂量Bt水稻花粉处理的桑叶,发现家蚕生物学相关的指标均受到明显的负面影响,具体表现在幼虫死亡率显著增高,发育历期显著延长,低龄幼虫体重、化蛹率和羽化率显著降低以及蚕茧质量下降等;而且家蚕幼虫中肠消化酶如脂肪酶、类胰凝乳蛋白和类弹性蛋白酶的活性亦受到显著影响。在家蚕幼虫取食Bt水稻花粉处理的桑叶后,就其中肠的组织病变情况进行了电镜观察,并与Bt毒蛋白Cry1Ab处理的病变过程作了比较分析,发现家蚕幼虫能够摄入桑叶上的Bt水稻花粉,而且取食Bt水稻花粉处理的桑叶后,其中肠细胞超微结构的病变情况与Bt毒蛋白Cry1Ab处理的基本一致。这充分证明了Bt水稻花粉中表达的毒蛋白确实能够引起家蚕中肠细胞的病变,致使家蚕幼虫体内正常生理和代谢的动态平衡受到干扰与破坏,从而使得相关的生物学指标发生明显变化,最终导致家蚕死亡。

由于在Bt水稻中转入的是经过人工截短、改造的Bt杀虫蛋白结构基因,因此在花粉中表达产生的应为活性肽,可直接与家蚕幼虫中肠细胞膜上的受体结合,快速产生病理症状。然而,电镜观察结果显示,Bt水稻花粉引起家蚕中肠细胞的病变过程明显比Cry1Ab蛋白处理的要缓慢得多。而且,Bt水稻花粉对家蚕幼虫的 $LC_{50}$ 值亦远低于Cry1Ab蛋白的。这表明Bt水稻花粉对家蚕幼虫产生毒害可能存在一个累积过程,即家蚕幼虫需摄入足够多的Bt水稻花粉,使得家蚕体内的Bt毒蛋白累积到一定数量后才可能引发病症。此外,高剂量的非Bt水稻花粉对家蚕幼虫,特别是高龄幼虫的生物学指标亦存在明显的不利影响。

## 1.2 家蚕暴露在 Bt 水稻花粉有效剂量下的概率

室内人为胁迫试验结果表明,高剂量的Bt水稻花粉对家蚕确实存在危害。然而,在自然条件下,飘落在稻田附近桑叶上的Bt水稻花粉密度能否达到在室内人为胁迫条件下的有效剂量,这关系到家蚕对Bt水稻花粉危害的暴露概率。

经过2年的田间调查,发现在Bt水稻种植面积为315.85m<sup>2</sup>的条件下,年均花粉累积飘落密度从稻田内的平均最高密度221.8粒/cm<sup>2</sup>降低至离田埂9m处的19.5粒/cm<sup>2</sup>,飘落在桑叶上的Bt水稻花粉数量随飘移距离增加而呈指数函数 $y=106.9824e^{-0.24599x}$  ( $r^2=0.9667$ ;  $F=145.1$ ,  $df=1,5$ ,  $p<0.0001$ ) 降低。仅从Bt水稻花粉在桑叶上自然飘落的平均密度来看,即使是稻田内的花粉飘落密度也远小于室内的处理剂量 (D1: 1311.4±161.8粒/cm<sup>2</sup>; D4: 24824.6±1895.1 粒/cm<sup>2</sup>)。

田间Bt水稻花粉在桑叶上的自然飘落密度受诸多因素的影响,其中包括桑叶特征(如嫩/老叶)、桑叶在植株上位置(高度)、桑树与稻田的距离以及气候因子(如降雨和风等)等。本文结果表明,在50cm高度处,稻田内(-3m处)Bt水稻花粉飘落在老叶上的密度是嫩叶上的3.1倍,在1m处两者的密度差异为2.4倍。这可能与老叶叶面腊质层受损而变得较为粗糙,使得飘落的花粉不易掉落有关。Bt水稻花粉在不同高度上的飘落密度以50cm处明显较高,这可能与水稻穗的高度多为50cm有关。花粉在不同高度上的密度分布随飘移距离增加而趋于平均,但桑叶上的花粉密度也相应明显降低。而且,在江浙地区的桑稻混栽区,种植桑树的畦垄一般明显高于水稻田块,畦面通常与水稻稻穗齐平,而桑枝高度通常在2.0~2.5m左右(图4.1)。因此,Bt水稻花粉在近距离范围内很难飘落至如此高度的桑叶上,即使随风飘移至较远距离的枝叶叶面,其密度也是相当低的。

降雨可显著减少桑叶上的花粉密度。一次降雨过程可冲去桑叶上30~80%的水稻花粉颗粒。而较高风速虽可将水稻花粉飘飞至更远距离,但使得花粉却不易在叶面上附着,更易掉落,从而导致叶面上的花粉密度显著降低。由于本论文的水稻试验品种为早籼稻,其扬花期通常在每年6月下旬至7月上旬。这期间在江浙地区正值夏季雷阵雨天气,且伴有热带气流的频繁活动,因此,Bt水稻花粉在桑叶上的自然飘落密度可受到天气的影响,花粉密度不易累积。

此外,家蚕对Bt水稻花粉危害的暴露概率还受到自然飘落的Bt水稻花粉中毒蛋白的含量变化、家蚕幼虫对Bt水稻花粉的取食选择行为、家蚕幼虫龄以及水稻扬花期与养蚕期的重叠程度等的影响。自然日照对Bt水稻花粉中的毒蛋白含量及其毒性均无显著影响。这表明随着Bt水稻花粉在桑叶上的累积,毒蛋白的绝对量也相应增加。家蚕幼虫偏向取食飘落有一定水稻花粉密度(约262.3粒/cm<sup>2</sup>)的桑叶,而该密度与Bt水稻花粉田间飘落的平均最高密度相当。上述结果在一定程度上增加了家蚕对Bt水稻花粉危害的暴露概率。

家蚕不同龄期幼虫对Bt水稻花粉的敏感性并不相同,明显以低龄幼虫较为敏感。由于水稻扬花期约2周左右,相当于家蚕1龄幼虫发育至3龄所需的时间,因此当水稻扬花期与家蚕幼虫低龄期相吻合时,Bt水稻花粉对家蚕的影响最大。本文供试Bt水稻扬花期正值夏蚕的饲

养时间。在江浙蚕区，家蚕饲养多以春蚕（4月下旬至6月上旬）和中秋蚕（8月下旬至9月下旬）为主，夏蚕饲养比例仅占春蚕的25~30%，约占全年桑蚕饲养总量的9.1~10.5%（顾国达等，2002）。因此，从全年的桑蚕饲养量来看，Bt早籼稻花粉对桑蚕生产的影响相对较小。

### 1.3 田间自然飘落的 Bt 水稻花粉对家蚕的影响

经过2年分别采集田间不同距离自然飘落有Bt水稻花粉的桑叶，在室内对家蚕初孵幼虫进行连续饲喂。2年试验结果均表明，在Bt水稻种植面积为315.85m<sup>2</sup>的条件下，田间不同距离自然飘落的Bt水稻花粉，对家蚕生存、生长发育、繁殖以及蚕茧质量等均无显著影响，即Bt水稻花粉在自然条件下对家蚕应无明显的负面影响。

由于Bt水稻目前尚处于田间中试阶段，因此，仅根据现有Bt水稻种植面积的结果，尚不能于推断在Bt水稻大面积推广后，产生的花粉数量足以对家蚕造成不利的影响。如果以樊龙江等（2003）田间观测到普通水稻花粉在桑稻混区桑叶上的实际平均飘落密度（13.3~199.0粒/cm<sup>2</sup>）为参照，假设Bt水稻生产花粉的能力未有变化，则可推断本文试验的Bt水稻品系——华池2000B1花粉对家蚕应无明显的生态风险。

此外，考虑到家蚕人工饲喂的特点，还可就Bt水稻花粉对家蚕的生态风险进行有效管理。例如在桑稻交界处设置隔离带；尽量避免在水稻扬花期间饲养低龄幼蚕；对桑叶进行漂洗、晾干后再饲喂家蚕幼虫等。

## 2 家蚕对 Bt 菌株的敏感性差异

苏云金芽孢杆菌（Bt）于1901年首次在患猝倒病的家蚕中分离得到，至今已逾百年。这百年来，无论是菌株筛选、形态与培养特征观察、生理生化鉴定、杀虫谱测定、发酵工艺与制剂研制、伴孢晶体蛋白结构与功能分析、杀虫蛋白基因克隆、序列结构与表达调控分析、基因遗传改造与高毒性工程菌株开发以及转基因抗虫植物培育等各方面的不断深入研究，还是Bt制剂在农、林、仓储和环卫等害虫防治上的广泛应用（现已成为世界上生产量最大的微生物杀虫剂），以及转Bt基因抗虫作物培育与在全球范围内的广泛推广种植（如Bt棉和Bt玉米等），Bt占据了微生物学理论研究与害虫生防应用的中心地位（喻子牛，1990）。然而，Bt毕竟是导致家蚕病害暴发流行的病源菌，可严重威胁桑蚕业的生产与发展，而且目前绝大多数对鳞翅目有效的Bt制剂对家蚕均是高毒性，因此Bt在各桑蚕生产国养蚕区的应用很受限制（Aizawa, 1987）。尤其在近年来，随着转Bt抗虫植物品种的不断创新，Bt作物全球商业化种植面积的不断扩大，家蚕作为敏感的非靶标昆虫，势必可能受到因转Bt基因抗虫植物花粉飘移而带来的Bt毒蛋白的不利影响。因此，筛选、开发新的对家蚕低毒或无毒的高效Bt菌株及其特异性杀虫蛋白基因已显得相当重要。这不仅为更广泛、深入地开发利用Bt防治害虫提供物质资源，还为创制对家蚕安全的高效特异性工程菌株和转Bt基因抗虫作物提供候选基因。



## 2.1 对家蚕低毒的 Bt 菌株及其杀虫蛋白基因

Bt 菌株及其 ICP 基因极为多样。目前全世界至少已分离获得 4 万株 Bt 菌株 (张光美, 2001), 其中包括 70 个血清型和 83 个血清型亚种 (Lacadet 等, 1999)。截止 2004 年 1 月, 在 GenBank 上登记的 ICP 基因共 311 条, 分属 46 个不同类群 (*cry1-44* 和 *cyl1-2*), 其中对鳞翅目具杀虫活性的类群有 *cry1-4*、*cry9-10*、*cry15*、*cry32* 和 *cyl2*, 共涉及约 43 个 ICP 基因 (其中 27 个基因对鳞翅目具专一活性)。研究表明, Bt 各亚种的寄主范围以及毒力各不相同, 同一亚种不同菌株间亦有较大差异 (喻子牛, 1990)。而且, 同一菌株内不同基因编码的杀虫蛋白的杀虫谱与活性都不尽相同, 不同菌株中相同基因编码的杀虫蛋白对昆虫的毒力差异也很大。以家蚕为例, Bt 鮎泽亚种 (subsp. *aizawai*) IPL7 菌株 Cry1Aa 蛋白的毒力是来自同一菌株的 Cry1Ab 蛋白的 17 倍 (Ihara 等, 1993); 来自库斯塔克亚种 (subsp. *kurstaki*) HD-1 菌株的 Cry1Ab 蛋白的毒力是来自猝倒亚种 (subsp. *sotto*) AF101 菌株相同基因编码的 Cry1Ab 蛋白的 5.6~11 倍 (Kim 等, 1998b)。

目前, 有关对家蚕相对低毒或无毒性的 Bt 菌株与 ICP 基因在国内外已有些报道 (表 15.1)。这些报道多是以家蚕作为标准试虫来比较 Bt 菌株对不同鳞翅目昆虫的杀虫活性水平高低 (Kondo 等, 1987; van Frankenhuyzen 等, 1991; 1993; Ihara 等, 1993; Nakatani 等, 1994; Koo 等, 1995; Shin 等, 1995; Sasaki 等, 1996; 1997; Kim 等, 1998b; Pujiastuti 等, 1999; Choi 等, 2000), 而部分涉及 Bt 菌株或 ICPs 对家蚕以及其它鳞翅目昆虫产生毒力差异的机理探讨 (李荣森等, 1989; Ge 等, 1989; Lee 等, 1992; Lu 等, 1994; 邵宗泽等, 1995; Kim 等, 1998a)。

## 2.2 Bt 菌株及杀虫晶体蛋白对家蚕毒力的差异机制

Bt 菌株的杀虫谱以及毒力差异不仅与 ICPs 及其编码基因有关, 还受到寄主昆虫种类的影响。

### 2.2.1 杀虫晶体蛋白

ICPs 的蛋白质组成直接影响到 Bt 菌株杀虫特异性。如 HD-73 菌株的伴孢晶体含有 *cry1Ac* 编码的原毒素, 但其中缺少 138kD 蛋白组分, 导致其对鳞翅目昆虫的毒性降低 (李荣森等, 1989)。YJ-2000 菌株中 ICPs 含量明显较低, 经家蚕中肠液作用产生的抗蛋白酶多肽 (毒性肽) 含量亦明显偏低, 而经菜青虫中肠液作用后产生的 56.2kD 毒性肽的水平与 Cry1Ab 菌株相当。这表明 ICPs 及其特异性毒性肽的含量高低也可影响 Bt 菌株特异活性。

ICPs 蛋白序列与结构差异是导致 Bt 菌株产生杀虫特异性的根本原因。ICPs 的氨基酸序列变化中导致蛋白结构改变, 从而直接影响其功能。通常情况下, Bt 的毒性肽一般由三个结构域 (活性区域) 组成。结构域 I 位于毒性肽 N 端, 由两条亲性  $\alpha$ -螺旋组成, 主要参与在昆虫中肠细胞膜形成穿孔; 结构域 II 由  $\beta$ -折叠构成, 参与毒素与膜受体蛋白的专一识别和特异性结合; 结构域 III 位于 C 端, 亦由  $\beta$ -折叠组成, 主要调节毒素活性, 在不同毒素中的功能不同 (Li 等, 1991; Grochulski 等, 1995)。毒性肽结构域中的氨基酸差异往往可导致杀虫活性的显著变化。如库斯塔克亚种 HD-1 菌株的 Cry1Aa 蛋白位于结构域 II 中的 365-371 氨基酸组成的超可变

区 (hypervariable region) 对家蚕中肠BBMV高亲和地不可逆结合, 从而导致该蛋白对家蚕的毒力比来自相同亚种HD-244菌株Cry1Ac蛋白要高400多倍 (Ge等, 1989; Lee等, 1992; Lu等, 1994)。在ICPs的非活性区域的氨基酸变异, 也能导致杀虫活性的明显差异。如AF101菌株 *cry* 基因序列与HD-1菌株 *cry1Ab* 基因93%同源, 其中活性区序列同源性高达97% (Kim等, 1998b)。将两菌株编码晶体蛋白羧基端 (非活性区) 的基因序列互换, 重组表达后测定杀虫活性, 发现AF101菌株Cry1Ab蛋白羧基端序列变化可能是导致对家蚕毒性较低的主要原因 (Kim等, 1998a)。

### 2.2.2 Bt 菌株的质粒与杀虫蛋白基因定位

Bt菌株中的质粒类型以及ICP基因定位也可影响杀虫活性的多样性。Bt不同亚种之间的质粒类型不尽相同, 甚至同一亚种的不同菌株之间质粒也不相同。达姆斯塔特亚种 (*subsp. darmstadensis*) 不同菌株间质粒差异较大, 导致其ICPs形态和杀虫谱各不相同, 如对鳞翅目幼虫有毒性的菌株含有107.15MD的质粒, 并产生菱形伴胞晶体; 而对双翅目幼虫有毒性的菌株含有4个大分子质粒, 产生球形伴胞晶体; 对鳞翅目和双翅目均无毒性菌株则含有107.15MD和7.78MD两种质粒, 产生钻石形具凹形表面的伴胞晶体 (喻子牛, 1990; Carlson等, 1994; 张光美, 2001)。在本文的YJ-2000菌株中, 仅能检测到7.69MD质粒, 且其类型以及含量均明显少于其它Bt菌株。

ICP基因在Bt菌不同亚种之间的分布也并不均衡, 即使在同一菌株内也可能位于不同质粒或不同染色体上 (Kronstad等, 1983)。有些Bt菌株是多个ICP基因定位于同一质粒上; 而有些则同一ICP基因定位于不同质粒上, 或者同时定位于质粒和染色体上。如库斯塔克亚种HD-1菌株的 *cry1* 基因位于质粒上, 而属同一亚种的HD-73菌株 *cry1* 基因却同时位于质粒和染色体上 (Carlson等, 1993)。Bt菌株ICP基因定位的多样性和复杂性在很大程度上影响菌株的杀虫特异性。如HD-2菌株中75Mu质粒丢失可导致该菌株丧失产生伴胞晶体能力 (Gonzalez等, 1981); Bt以色列亚种 (*subsp. israelensis*) 突变株HD567-26中存在75MD可转移质粒, 该质粒丢失则导致菌株不形成ICPs并丧失活性 (Gonzalez等, 1984)。

### 2.2.3 寄主昆虫

Bt菌株及ICPs的杀虫活性大小与寄主昆虫种类密切相关。不同种类的昆虫对Bt不同亚种、不同菌株乃至不同的ICPs的敏感性各不相同。不同昆虫对Bt的敏感性差异通常与ICPs的作用机制有关。ICPs被敏感昆虫摄食后, 在昆虫中肠碱性环境和肠道胰蛋白酶作用下被分解并激活, 形成具活性的抗蛋白酶多肽, 与中肠细胞膜上特异性受体结合, 形成穿孔, 进而通过胶体渗透裂解将细胞膨胀并裂解, 最终导致昆虫死亡 (Aroson, 1993; Knowles, 1994)。因此, Bt菌株及ICPs的杀虫活性受到昆虫中肠环境pH值、蛋白酶组成与活性以及中肠细胞膜受体的影响。

不同种类昆虫对ICPs的溶解和激活能力存在明显差异, 并因此而使得ICPs表现不同的毒力水平 (Jaquet等, 1987; Dai等, 1993; 农广等, 1998); 而且, 同一ICPs经不同方式和程度的

激活,也可表现出不同的杀虫特异性(Haider等,1986;李荣森等,1993;邵宗泽等,1995)。本文YJ-2000菌株ICPs经家蚕和菜青虫中肠液作用后,产生的毒性肽的蛋白质组成也不相同。此外,有研究表明,昆虫肠液中蛋白酶对ICPs不仅有激活作用,还有降解作用(Keller等,1996)。高活性的特异蛋白酶对ICPs的过度消化,可能导致毒性降低。还有研究发现,肠液蛋白酶对ICPs还具有共沉淀作用。一种具有类弹性蛋白酶活性的75kD蛋白可引起ICPs专一性沉淀,限制ICPs被激活,从而导致毒力下降(Milne等,1995)。多种鳞翅目昆虫肠道中均存在共沉淀作用,但在家蚕肠道中,这种作用似较弱。

ICPs杀虫活性是通过昆虫中肠细胞膜上专一性受体蛋白而起作用的。ICPs的毒性大小与昆虫中肠受体的结合能力呈正相关(Hofmann等,1988)。因此,昆虫中肠细胞膜上受体蛋白的类型、数量以及结合亲和性决定了ICPs的毒力和专一性。研究表明,毒蛋白与受体的结合不是简单的识别作用,而是极具多样性和复杂性(Garczynski等,1991;Oddou等,1991;1993;Knight等,1994;Gill等,1995;Vadlamudi等,1995;Valaitis等,1995;de Magged等,1996)。这具体表现在同一种毒蛋白与不同昆虫中肠上的受体结合的位点和专一性可能并不相同,一种毒蛋白还可能和多个受体相结合;同一种昆虫中肠上的受体与不同的毒蛋白结合的位点和专一性程度也可能不尽相同。正是由于昆虫中肠细胞膜上受体种类、数量和亲和力的差异,使得不同昆虫对Bt毒蛋白的敏感性各不相同。

综上所述,目前有关Bt菌株及ICPs的杀虫特异性研究,尤其是关于对家蚕低毒且具杀虫活性的Bt菌株的研究相对较零散,且更未见有生产应用的报道,可见这方面尚具有深入研究和应用开发的潜力和空间。本文的YJ-2000菌株不仅对家蚕安全,且对其它鳞翅目害虫具较强毒性。该菌株对于今后无论是在深入开展理论研究,还是在进一步应用开发方面均是理想的试验材料与物质资源。

### 3 本研究的特色与创新点

本研究针对的转基因水稻花粉对非靶标昆虫的生态安全性,属我国转基因生物产业化中亟待解决的重大科学问题,体现了国家的重大需求。

就转基因抗虫植物花粉对非靶标昆虫体内生理和代谢等的内在影响开展研究,在国内外尚属首次。

开展转基因水稻花粉漂移对非靶标重要经济昆虫——家蚕生态风险的系统评价,既有中国国特色,又居国际领先。

就对蔬菜、茶树或桑树等作物主要鳞翅目害虫表现高毒力,而对家蚕又安全的苏云金杆菌新菌株开展杀虫谱与安全性研究,在国内外尚属首次。

## 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花粉对家蚕的安全性作了相对较为系统的评价, 同时就对家蚕安全的Bt新菌株的生物学作了初步研究, 今后可在以下几方面再作深入探讨。

1. 明确Bt水稻花粉对不同家蚕品种(原种与杂交种、春蚕种与秋蚕种)的影响, 进而探明对家蚕育种的影响;
2. 明确Bt水稻花粉对家蚕体内解毒酶、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Bt水稻花粉对家蚕抗逆性影响的研究;
3. 明确YJ-2000菌株基因型, 在克隆杀虫蛋白基因基础上, 探明该菌株对家蚕无毒性的分子机制;
4. 探索、筛选YJ-2000菌株的适宜培养基、培养条件和有效制剂配方, 为产业化生产提供技术保障。

表15.1 对家蚕相对低毒或无毒的Bt菌株及其杀虫蛋白基因种类

| Gene              | Isolate                         | Assay Type         | Instar Age | LC <sub>50</sub> (95% CI) | Units              | Ref.                      |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>cry1Ab</i>     | <i>B.t. sotto</i> AF101         | Diet surface       | L3         | 220(194-248)              | ng/ml              | Kim 等, 1998b              |
| <i>cry1Ab</i>     | <i>B.t. sotto</i> AF101         | Diet surface       | L3         | 342(306-453)              | ng/ml              | Kim 等, 1998b              |
| <i>cry1Ab</i>     | <i>B.t. kurstaki</i> HD-1       | Force feed         | L4         | —*                        |                    | van Frankenhuyzen 等, 1991 |
| <i>cry1Ab4</i>    | <i>B.t. kurstaki</i> HD-1       | Diet incorporation | L3         | 5100                      | ng/ml              | Kondo 等, 1987             |
| <i>cry1Ab5</i>    | <i>B.t. wuhanensis</i>          | Force feed         | L5         | —*                        |                    | Nakatani 等, 1994          |
| <i>cry1Ab5</i>    | <i>B.t. wuhanensis</i>          | Force feed         | L4         | >1000                     | ng/larva           | Pujiastuti 等, 1999        |
| <i>cry1Ab8</i>    | <i>B.t. aizawai</i> IPL7        | Diet incorporation | L4         | 175800                    | ng/ml              | Ihara 等, 1993             |
| <i>cry1Ab8</i>    | <i>B.t. aizawai</i> IPL7        | Diet incorporation | L4         | 27800                     | ng/ml              | Ihara 等, 1993             |
| <i>cry1Ab8</i>    | <i>B.t. aizawai</i> IPL7        | Diet incorporation | L4         | 74000                     | ng/ml              | Ihara 等, 1993             |
| <i>cry1Ac</i>     | <i>B.t. kurstaki</i> HD-1       | Force feed         | L4         | —*                        |                    | van Frankenhuyzen 等, 1991 |
| <i>cry1Ac</i>     | <i>B.t. kurstaki</i> HD-73      | Leaf surface       | L5         | —                         |                    | 邵宗泽等, 1995                |
| <i>cry1Ac1</i>    | <i>B.t. kurstaki</i> HD-244     | Leaf surface       | /          | >150000                   | ng/larva           | Ge 等, 1989                |
| <i>cry1Ac1</i>    | <i>B.t. kurstaki</i> HD-244     | Force feed         | L4         | 421                       | ng/larva           | Lee 等, 1992               |
| <i>cry1Ba1</i>    | <i>B.t.</i> HD-2                | Diet incorporation | L3         | >46320                    | ng/cm <sup>2</sup> | Koo 等, 1995               |
| <i>cry1Ba2</i>    | <i>B.t. entomocidus</i> HD-110  | Force feed         | L4         | >208                      | ng/larva           | van Frankenhuyzen 等, 1993 |
| <i>cry1Bb1</i>    | <i>B.t. entomocidus</i> BP465   | Diet incorporation | L3         | >260000*                  | ng/ml              | Shin 等, 1995              |
| <i>cry1Id1</i>    | <i>B.t.</i> BR30                | Diet incorporation | L3         | 439560(214280-709120)     | ng/ml              | Choi 等, 2000              |
| <i>cry1Ka1</i>    | <i>B.t. morrisoni</i> BF190     | Diet incorporation | L3         | >46320                    | ng/cm <sup>2</sup> | Koo 等, 1995               |
| <i>cry2</i> (SKW) | <i>B.t. sotto</i> SKWO1-10.2-06 | Force feed         | L4         | 4170(2250-11270)          | ng/larva           | Sasaki 等, 1997            |

注: \*无活性 (not active)

# **Risk assessment of *Bt* rice pollen on the domestic silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) and biological study of the *Bt* strain safe to the silkworm**

## **Abstract**

In this paper, the safety of transgenic *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) rice pollen grains on the domestic silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombycidae) is systematically evaluated under both laboratory and field conditions, and some biological properties of a new *Bt* strain, being safe to the silkworm, are also studied. The results are shown as follows.

### **1 Toxicity effects of *Bt* rice pollen grains on the domestic silkworm, *Bombyx mori***

An ELISA was employed to quantify levels of the Cry protein in pollen grains from transgenic *Bt* rice lines KMD1, KMD2, Huachi2000B1, Huanchi2000B6 and TT9-3 using a kit purchased from EnviroLogix Inc. (Portland, USA). The expression level of the *Bt* insecticidal crystal protein was estimated up to about 0.01% of total soluble proteins in pollen grains of TT9-3, which was significantly lower than that in pollen grains of other tested lines. The susceptibilities of the silkworm larvae with different instars to purified Cry1Ab protein and pollen grains from Huachi2000B1 and TT9-3 were respectively measured using the bioassay method. TT9-3 pollen grains were about 313.2 times less toxic to the first instar silkworm larvae than pollen grains from Huachi2000B1. The first instar larvae were about 3.83 times more susceptible to Huachi2000B1 pollen grains by comparison with the third instar ones. The purified Cry1Ab protein acted higher toxic to the silkworm larvae, being over 1000 times more than pollen grains from different tested *Bt* rice lines.

### **2 Biological effects of *Bt* rice pollen grains on the domestic silkworm, *Bombyx mori***

The silkworm larvae were continuously exposed to the mulberry leaves contaminated by pollen grains on from *Bt* rice line, Huachi2000B1 and its non-*Bt* parental control cultivar (Jiazao 935) at two concentrations of D1 ( $1311.4 \pm 161.8$  grains/cm<sup>2</sup>) and D4 ( $24824.6 \pm 1895.1$  grains/cm<sup>2</sup>), being equivalent to LC<sub>20</sub> and LC<sub>50</sub> values of Huachi2000B1 pollen grains against the first instar larvae for different exposure periods under laboratory conditions. The exposure periods included from the first to third instar, the third to fifth instar and whole larval stage of the silkworm larvae.

*Bt* rice pollen, especially at the concentration of D4, resulted in significantly higher larval mortality, longer developmental time, less body weight gain of early instar larvae, lower pupation and emergence rate, and poorer cocoon quality. The impact of *Bt* pollen grains on early instar silkworm larvae was more significant, and its consequence could be extended to the adulthood. These results suggested that high concentration of *Bt* rice pollen grains have dramatically adverse effects on biological characteristics of the silkworm such as larval survival, growth and development, and cocoon traits under laboratory conditions.

### **3 Behavioral effects of *Bt* rice pollen grains of the domestic silkworm, *Bombyx mori***

Choice tests were conducted to determine the changes in feeding behavior of silkworm larvae to *Bt* rice pollen using the method of leaf discs. When presented with a choice of leaf discs without pollen and leaf discs with high amounts of pollen, more larvae were found on the discs without pollen. However, when presented with leaf discs without pollen and leaf discs with small amounts of pollen, more larvae were found on the leaves with pollen. Choices of different instars to the discs with *Bt* or non-*Bt* pollen at low density were much different. More first instars were found on the discs with non-*Bt* pollen, while late instars were found more and more on the discs with *Bt* pollen. As for *Bt* rice pollen, early instar larvae tended to choose leaf discs with the lower density of pollen, and late instars tended to the higher density of pollen.

### **4 Physiological effects of *Bt* rice pollen grains on the domestic silkworm, *Bombyx mori***

The silkworm larvae with the first instar had been treated respectively by pollen grains from *Bt* rice line, Huachi2000B1 and Cry1Ab protein until pupation, and the activities of some digestive enzymes in the larval midgut, including amylase, lipase, trypsin-like proteinase, chymotrypsin-like proteinase, elastase-like protease and aminopeptidase were measured within different times after treatment. The larvae were all dead at the end of the second instar after continuously treated by Cry1Ab protein. Treatment of Cry1Ab protein could obviously influence the activities of digestive enzymes in the midgut of early instars, and there were no significant correlation relationships in the time-changing patterns of the activity of digestive enzymes between Cry1Ab treatment and the negative control. Exposed continuously to *Bt* rice pollen could also influence the activities of digestive enzymes in the midgut of the silkworm larvae to various degrees, among them the impact on the lipase, chymotrypsin-like proteinase and elastase-like proteinase was more remarkable. It suggested that these changes cause the disruption of normal physiological and metabolic equilibrium, and then influence larval survival, growth and development.

## **5 Histopathological effects of *Bt* rice pollen grains on the domestic silkworm, *Bombyx mori***

Sequential observations were made of the ultrastructural effects on midgut epithelial cells of the silkworm after exposed to *Bt* rice pollen. Transmission electron micrographs showed that the microvilli of the midgut epithelial cells became disrupted, after which the endoplasmic reticulum became swollen, and the cells became vacuolated. Finally, the epithelial cells lysed, and releasing cytoplasmic contents into the midgut lumen. The histopathological changes of the midgut epithelial cells of silkworm larvae exposure to *Bt* rice pollen were similar to those affected by the Cry1Ab protein.

## **6 Effects of the sunlight on content and activity of Cry protein in *Bt* rice pollen grains**

Contents of Cry protein were much different after the *Bt* rice pollen exposed to direct sunlight with different times. Relative contents of Cry protein decreased obviously at the beginning, and then tended to get higher along with the increase of treatment time. There was no significant effect of direct sunlight on the content of soluble protein in *Bt* rice pollen. In the laboratory bioassay, the toxicities of the pollens after treated by direct sunlight with different time were similar against silkworm first instars though the values of  $LC_{50}$  of the pollens increased with treatment time prolonging. It suggested that there were no remarkable effects of exposure to direct sunlight on the content and activity of Cry protein in *Bt* rice pollen.

## **7 Deposition of *Bt* rice pollen grains under field conditions**

The results of field investigation in 2002 and 2003 showed that the density of rice pollen grains on leaves of mulberry exponentially decreased with the increase of distance from edge of the rice field. In 2002, the average of cumulative deposition of *Bt* pollen grains was highest within the rice field (255.0 grains/cm<sup>2</sup>) and decreased to 34.6 grains/cm<sup>2</sup> pollen at 9m from the edge of the field. Similarly in 2003, pollen load declined steeply from a mean of 190.8 grains/cm<sup>2</sup> within the field to a mean of 6.0 grains/cm<sup>2</sup> at a distance of 9m from the rice field. The deposition of pollen also declined with the increase of mulberry plant highness. The density of pollen on younger leaves was markedly less than that on older leaves. Rainfall can highly significantly reduce the amounts of pollen on the mulberry leaves. Adhesive tapes and sticky slides were also used to investigate the deposition of pollen in the rice field, whose results were similar with those on mulberry leaves.

## **8 Impact of *Bt* rice pollen grains deposited on mulberry leaves under field conditions on the**



### **domestic silkworm, *Bombyx mori***

Mulberry leaves deposited with pollen grains of *Bt* rice line Huachi2000B1 at different distance from the *Bt* rice field were collected and fed to silkworm larvae with the first instar respectively in 2002 and 2003. No significant adverse effects were observed on the survival, growth and development, fertility of the silkworm as well as the quality of cocoon. The 2-year studies suggested that the impact of *Bt* rice pollen grains from the tested *Bt* rice line on the silkworm is negligible in natural settings.

### **9 Toxicity evaluation of *Bt* strain YJ-2000**

Insecticidal activities of *Bt* strain YJ-2000 against six species of lepidopterous insects were evaluated with the time-dose-mortality model. The strain was safe to the silkworm, *Bombyx mori* with very low toxicity, while showed the toxicity with different levels to vegetable insect pests such as *Pieris rapae* neonate larvae and 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*, rice insect pests such as neonate larvae of *Chilo suppressalis* and *Scirpophaga incertulas* as well as mulberry insect pests such as 3rd or 4th instar larvae of *Diaphania pyloalis*. Among tested insect species, larvae of *Plutella xylostella* and *Pieris rapae* were the most susceptible to the strain, with the highest mortality of 100%.

### **10 Safety evaluation of *Bt* strain YJ-2000 on the domestic silkworm, *Bombyx mori***

The biological safety of *Bt* strain YJ-2000, which acted the low toxicity to *Bombyx mori* neonate larvae, while the marked insecticidal activity to other lepidopterous insects was evaluated, compared with other two *Bt* strains, CRY1Ab and YJ-1999 with high toxicity to *Bombyx mori* neonate larvae. As compared with those of the control, the survival rate, stadia, feeding amount and molter body weight of 2nd instar and more older larvae, pupation rate, pupal span, cocoon weight, pupal weight, cocoon shell weight, emergence rate and amount of laid eggs were not affected after treatment with *Bt* YJ-2000, except that about 11.1% in the stadia, 0%~60.0% in feeding amount and 52.3%~62.5% molter body weight of 1st instar larvae were markedly lengthened, minimized and lightened, respectively. In contrast, CRY1Ab and YJ-1999 could cause all neonate larvae death as treated at high concentration. They could not kill all neonate larvae as treated at low concentration, however perform marked negative effects on growth and development, cocooning and oviposition of the survived larvae, which were restored from CRY1Ab or YJ-199 treatment at low concentration, at most cases. It was concluded that YJ-2000 not only showed low toxicity to the silkworm, but also acted no marked negative impacts on growth and development, cocooning as well as fecundity of the silkworm.

## 11 Proteins, proteinase-resistant polypeptides and genotype of $\delta$ -endotoxins from *Bt* strain YJ-2000

Proteins, proteinase-resistant polypeptides (PRP) and genotype of parasporal crystals ( $\delta$ -endotoxins) from *Bt* strain YJ-2000 were preliminarily investigated, compared with other two *Bt* strains, CRY1Ab and YJ-1999. The peptide mapping of *Bt* strains were similar, which all showed one main band of 136.6kD. After treated with midgut juice from silkworm larvae, there was a PRP of 64.5kD in YJ-2000 and CRY1Ab, and a PRP of 63.4kD in YJ-1999. After treated with midgut juice from *Pieris rapae* larvae, there were two PRP in all 3 strains which the one was same to the PRP after treated by midgut juice of silkworm larvae, and another was a PRP of 56.2kD. Only one plasmid of 23.1kb was detected weakly in YJ-2000 strain. PCR analysis showed that YJ-2000 did not contain *cry1*, *cry2* and *cry3* genes.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*; *Bt* rice; pollen; *Bombyx mori*; bioassay; survival; growth and development; cocooning; fertility; digestive enzymes; amylase; lipase; trypsin-like proteinase; chymotrypsin-like proteinase; elastase-like protease; aminopeptidase; special activity; histopathology; midgut epithelial cell; ultrastructure; feeding behavior; leaf disc; sun-light; safety assessment; non-target insect; biosafety; strain YJ-2000; Time-dose-mortality model;  $\delta$ -endotoxins; proteinase-resistant polypeptide; genotype

## 参考文献

- 白耀宇, 蒋明星, 程家安, 姜永厚. 2003. 转 Bt 基因作物 Bt 毒蛋白在土壤中的安全性研究. 应用生态学报. 14(11):2062-2066
- 蔡继炯, 俞中仁. 1987. 蜜源植物花粉形态与成分. 杭州: 浙江科技出版社
- 陈茂, 叶恭银, 胡萃, Tu J, Datta SK. 2003. Bt 水稻对飞虱和叶蝉及其卵寄生蜂扩散规律的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版). 29(1):29-33
- 崔金杰, 夏敬源. 1997. 转 Bt 基因棉对棉田主要捕食性天敌捕食功能的影响. 中国棉花. 24(2):19-21
- 崔金杰, 夏敬源. 1998. 麦套夏播转 Bt 基因棉田主要害虫及其天敌的发生规律. 棉花学报. 10(5):255-262
- 崔金杰, 夏敬源. 2000. 一熟转 Bt 基因棉田主要害虫及其天敌的发生规律. 植物保护学报. 27(2):141-145
- 崔云龙, 田明, 邵宗泽. 1993. 紫外线使苏云金杆菌伴胞晶体失活机理的研究. 微生物学通报. 20(4):193-195
- 樊龙江, 吴月友, 庞洪泉, 吴建国, 舒庆尧, 徐孟奎, 陆剑飞. 2003. 转基因 Bt 水稻花粉在桑叶上的自然飘落浓度. 生态学报. 23(4):826-833
- 冯明光. 1998. 时间-剂量-死亡率模型取代机率分析技术. 昆虫知识. 35(4):233-237
- 顾国达, 楼成富, 鲁兴萌. 2002. 简明养蚕手册. 北京: 中国农业大学出版社
- 顾国达, 王昭荣, 张磊. 2002. 世界蚕茧和生丝生产量的预测. 蚕业科学. 28(3):242-246
- 姜永厚, 傅强, 程家安, 叶恭银, 白耀宇, 张志涛. 2004. 转 Bt 基因水稻对二化螟绒茧蜂生物学特性的影响. 昆虫学报. 47(1):124-129
- 蒋彩英, 叶恭银, 胡萃. 2001. 昆虫肠道蛋白酶的研究概况. 见: 彭图治主编. 浙江省第二届青年学术论文文集. 北京: 中国科学技术出版社. 372-374
- 李荣森, 罗成. 1989. 苏云金杆菌伴胞晶体的蛋白质和抗蛋白酶多肽及其毒力特性. 微生物学报. 29(6): 397-404
- 李荣森, 盛竹蓁. 1993. 昆虫肠道蛋白酶作用下 $\delta$ -内毒素的毒性肽及毒力特异性的变化. 昆虫学报. 36(3):263-269
- 李文东, 叶恭银, 吴孔明, 王小奇, 郭予元. 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
- 李要民, 陈良碧. 1998. 不同温湿条件下贮藏的3种禾本科植物花粉活力变化. 植物生理学通讯. 34(1):35
- 李影林. 1987. 临床医学检验手册. 长春: 吉林科学技术出版社. 331-334
- 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 2000a. 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性筛选及遗传方式的研究. 昆虫学报. 43(增刊):57-62

- 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 2000b. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学. 33(4):46-53
- 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 2001. 棉铃虫 Bt 抗感种群间数种解毒酶和中肠蛋白酶活性的比较. 植物保护学报. 28(2):133-138
- 刘志诚, 叶恭银, 傅强, 张志涛, 胡萃. 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. 2002. Bt 水稻对稻田节肢动物群落和优势天敌的生态风险评价. 浙江大学博士学位论文
- 农广, 庞义. 1998. 昆虫对 Bt 晶体蛋白杀虫作用的影响. 中国生物防治. 14(1):43-46
- 钱迎倩, 田彦, 魏伟. 1998. 转基因植物的生态风险评价. 植物生态学报. 22(4):289-299
- 邵宗泽, 崔云龙. 1995. 两种鳞翅幼虫对 Bt 敏感性的差异及其机理的探讨. 中国生物防治. 11(2):75-79
- 申继忠, 钱传范. 1994. 苏云金杆菌对昆虫生理和代谢的影响. 生物防治通报. 10(2):82-84
- 沈晋良, 周威君, 吴益东, 林样文, 朱协飞. 1998. 棉铃虫对 Bt 生物农药早期抗性及与转 Bt 基因棉抗虫性的关系. 昆虫学报. 41(1):8-14
- 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 项友斌, 高明尉. 1998. 转基因水稻“克螟稻”选育. 浙江农业大学学报. 24(6):579-580
- 谭维嘉, 梁革梅, 郭予元. 1998. 苏云金杆菌预处理对棉铃虫乙酰胆碱酯酶的影响. 植物保护学报. 25(1):65-71
- 唐启义, 冯明光. 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社
- 王琛柱, 钦俊德. 1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报. 39(1):7-14
- 王程, 沙槎云. 1991. 苏芸金杆菌感染粘虫后中肠组织学病变的研究. 昆虫学报. 34(1):50-53
- 王根绪, 程国栋, 钱鞠. 2003. 生态安全评价研究中的若干问题. 应用生态学报. 14(9):1551-1556
- 王关林, 方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社
- 王世贵. 2002. Bt 水稻对靶标害虫二化螟的生物学与病理学效应. 浙江大学博士学位论文
- 王荫长. 1994. 昆虫生理生化学. 北京: 中国农业出版社. 28-53
- 王忠华, 倪新强, 徐孟奎, 舒庆尧, 夏英武. 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
- 吴刚. 2000. cry1Ab 基因在转基因水稻中的遗传、表达与沉默. 浙江大学博士学位论文.
- 项秀芬, 王琛柱, 张书芳. 1996. 棉铃虫幼虫感染苏云金杆菌戈尔斯德亚种 (HD-1) 后中肠细胞的病理变化. 昆虫知识. 33(5):266-268
- 闫新甫. 2003. 转基因植物. 北京: 科学出版社. 475-479
- 阎凤鸣, 许崇任, Bengtsson M, Witzgall P, Anderson P. 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(4):425-429
- 叶恭银, 胡萃, 舒庆尧. 1998. 转基因抗虫水稻的转育及其合理持续利用. 见: 程家安, 周伟军主编. 跨世纪农业发展与研究. 北京: 中国环境科学出版社. 406-414
- 叶恭银, 张传溪, 鲁兴萌. 2001. 转基因抗虫作物与转基因昆虫. 见: 程家安, 唐振华主编. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社. 327-365
- 喻子牛. 1990. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社. 1-15
- 张光美. 2001. 苏云金芽胞杆菌及其伴胞晶体蛋白. 见: 程家安, 唐振华主编. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社. 293-326
- 张益. 1984. Bt 杀虫剂的残效期研究. 微生物学通报. 11(2):49-50
- 张永军, 王武刚, 郭予元. 2001a. 转 Bt 基因棉花抗虫萜烯类化合物时空动态的 HPLC 分析. 应用与环境生物学报. 7(1):37-40
- 张永军, 徐广, 郭予元, 吴孔明. 2001b. 转 Bt 基因棉花及其受体品种主要挥发性物质的测定. 生态学报. 21(12):2051-2056
- 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
- Abraham EG, Nagarau J, Datta RK. 1992. Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. Insect Biochem. Mol. Biol., 22(8):867-873
- Aizawa K, Fujiyoshi N, Ohba M, Yoshikawa N. 1975. Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strains for microbial control. In: Proceeding of 1<sup>st</sup> Intersectional Congress of IAMS, Tokyo. Vol.2, 597-606
- Aizawa K. 1987. Strain improvement of insect pathogens. In: Maramorosch K. (ed.) Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. San Diego: Academic Press. 3-11
- Albert ZG, Shivarova NI, Dean DH. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86(8):4037-4041
- Al-Deeb MA, Wilde GE. 2001. Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn rootworm control on aboveground nontarget arthropods. J. Environ. Entomol., 32(5):1164-1170
- Aronson AI. 1993. Insecticidal toxins. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R. (eds.) *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Washington, DC: American Society for Microbiology, 953-963
- Arpaia S, Gould F, Kennedy G. 1997. Potential impact of *Coleomegilla maculata* predation on adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* to Bt-transgenic potatoes. Entomol. Exp. et Appl., 82:91-100
- Arpaia S. 1996. Ecological impact of Bt-transgenic plants: I. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. J. Genet. Breed., 50:315-319

- Arruego X, Franceschi J, Picard-Nizou AL, Laloi D, Jouani N L, Pham-Delegue MH. 2000. Impact of a proteinase inhibitor used in plant genetic engineering on bumblebees (*Bombus terrestris* L.). Bull. OILB/SROP, 23(9):141-148
- Baker JE, Fabrick JA. 2000. Host hemolymph proteins and protein digestion in larval *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). Insect Biochem. Mol. Biol., 30:937-946
- Basavaraju CD, Kumari BL, Ananthanarayana SR. 1996. Effect of temperature on the activity of amylase in silkworm *Bombyx mori* L. Entomol., 21(2):171-176
- Bell HA, Fitches EC, Down RE, Ford L, Marris GC, Edwards JP, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. 2001a. Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). J. Pest Manag. Sci., 57:57-65
- Bell HA, Fitches EC, Marris GC, Bell J, Edwards JP, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. 2001b. Transgenic GNA expressing potato plants augment the beneficial biocontrol of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera; Noctuidae) by the parasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera; Eulophidae). Transgenic Res., 10:35-42
- Belzunces LP, Lenfant C, DiPasquale S, Colin ME. 1994. *In vivo* and *in 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
- Bennett J, Cohen MB, Katiyar SK, Ghareyazie B, Khush GS. 1997. Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. In: Carozzi N, Koziel M. (eds.) Advances in Insect Control: The role of transgenic plants. Taylor & Francis: London. 75-92
- Birch ANE, Geoghegan IE, Majerus MEN, McNicol JW, Hackett CA, Gatehouse AMR, Gatehouse JA. 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
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72:248-254
- Bradley D, Harkey MA, Kim MK, Biever D, Bauer LS. 1995. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. J. Invertebr. Pathol., 65:162-173
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R. 1998. Characterization of *cry* genes in a

- Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol., 64(12):4965-4972
- Burgess EPJ, Malone LA, Christeller JT. 1996. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honeybees (*Apis mellifera*). J. Insect Physiol., 42(9): 823-828
- Carlson CR, Cagant DA, Kosto AB. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol., 60:1719-1725
- Carlson CR, Kolsto AB. 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. J. Bacteriol., 175(4):1053-1060
- Carriere Y, Ellers-Kirk C, Liu YB, Sims MA, Patin AL, Dennehy TJ, Tabashnik BE. 2001. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Econ. Entomol., 94(6):1571-1576
- Casas AM, Kononowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM. 1995. Cereal transformation through particle bombardment. Plant Breed Rev., 13:235-264
- Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol., 61(11):3826-3831
- Chatterjee SN, Rao CGP, Chatterjee GK, Ashwath SK, Patnaik AK. 1993. Correlation between yield and biochemical parameters in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Theoret. Appl. Genet., 87(3):385-391
- Chilcutt CF, Tabashnik BE. 1999. Simulation of integration of *Bacillus thuringiensis* and the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) for control of susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Environ. Entomol., 28(3):505-512
- Choi SK, Shin BS, Kong EM, Rho HM, Park SH. 2000. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* cryII-type crystal protein gene. Curr. Microbiol., 41(1):65-69
- Christeller JT, Shaw BD, Gardiner SE, Dymock J. 1989. Partial purification and characterization of the major midgut proteases of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*, Coleoptera: Scarabaeidae). Insect Biochem., 19(3):221-231
- Crecchio C, Stotzky G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. Soil Bio. Biochem., 30:463-470
- Crecchio C, Stotzky G. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. Soil Biol. Biochem., 33:573-581
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. 1998.

- Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62 (3) :807-13
- Dai SM, Gill SS. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. Insect Biochem. Mol. Biol., 23(2):273-283
- Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. Nature Biotechnol., 20:567-574
- Datta K, Vasquez A, Tu J, Torrizo L, Alam MF, Oliva N, Abrigo E, Khush GS, Datta SK. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pests. Theor. Appl. Genet., 97:20-30
- De Maagd RA, Klei HVD, Bakker PL, Stiekema WJ, Bosch D. 1996. Different domains of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. Appl. Environ. Microbiol., 62(8):2753-2757
- Dogan EB, Berry RE, Reed GL, Rossignol PA. 1996. Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato. J. Econom. Entomol., 89:1105-1108
- Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucio LQ, Seidler RJ. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. Appl. Soil Ecol., 2:111-124
- Donegan KK, Schaller DL, Stone JK, Ganio LM, Reed G, Hamm PB, Seidler RJ. 1996. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. Transgenic Res., 5:25-35
- Donegan KK, Seidler RJ, Fieland VJ, Schaller DL, Palm CJ, Ganio LM, Cardwell DM, Steinberger Y. 1997. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. J. Appl. Ecol., 34:767-777
- Donegan KK, Seidler RJ. 1999. Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms. Recent Research Developments in Microbiology, 3:415-424.
- Donovan W P, Dankocsik C, Gilbert MP. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol., 170:4732-4738
- Dorsch JA, Candas M, Griko NB, Maaty WSA, Midboe EG, Vadlamudi RK, Bulla LA. 2002. CryIA toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the



- membrane-proximal extracellular domain of BT-R-1 in *Manduca sexta*: Involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol., 32:1025-1036
- Duan JJ, Head G, McKee MJ, Nickson TE, Martin JW, Sayegh FS. 2003. Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. Entomol. Exp. et Appl., 104:271-280
- Ebersold HR, Luthy P, Muller M. 1977. Changes in the fine structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bull. Soc. Entomol. Suisse, 50:269-276
- Endo Y, Nishiitsutsuji-Uwo J. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol., 36:90-103
- Endo Y, Nishiitsutsuji-Uwo J. 1981. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin: Ultrastructural changes of midgut epithelium of *Pieris*, *Lymantria* and *Ephesia* Larvae. Appl. Entomol. Zool., 16:231-241
- EPA. 1992. Framework for ecological risk assessment. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. EPA/630/R-92/001
- EPA. 1998. Guidelines for Ecological Risk Assessment. Federal Register, 63(93):26846-26924
- EPA. 2001. Biopesticides Registration Action Document: Revised Risks and Benefits Sections -*Bacillus thuringiensis* Plant-Pesticides. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency ([http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/old/bt\\_reassess/4-Environmental Assessment.pdf](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/old/bt_reassess/4-Environmental%20Assessment.pdf))
- Ferre J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., 47:501-533
- Finnegan J, McElroy D. 1994. Transgene inactivation: Plants fight back. Nature Biotechnol., 12:883-888
- Flexner JL, Lighthart B, Croft BA. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. Agri. Ecosys. Environ., 16:203-254
- Fox JL. 2003. Resistance to Bt toxin surprisingly absent from pests. Nature Biotechnol., 21:958-959
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Nature Biotechnol., 11:1151-1155
- Garczynski SF, Crim JW, Adang MJ. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins by protein blot

- analysis. Appl. Environ. Microbiol., 57:2816-2820
- Gatehouse AMR, Ferry N, Raemaekers RJM. 2002. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. Trends in Genet., 18(5):249-251
- Ge AZ, Shivarova NI, Dean DH. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(11):4037-4041
- Geiser M, Schweitzer S, Grimm C. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. *kurstaki* HD1. Gene, 48:109-118
- Gill SS, Cowles EA, Francis V. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., 270:27277-27282
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol., 37:615-636
- Girard C, Picard Nizou AL, Grallien E, Zaccomer B, Jouanin L, Pham-Delegue MH. 1998. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. Transgenic Res., 7:239-246
- Gonzalez JM Jr, Carlton BC. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. Plasmid, 11:28-38
- Gonzalez JM Jr, Dulmage HT, Carlton BC. 1981. Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid, 5:351-365
- Gould F, Kennedy GG, Johnson MT. 1991. Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. Entomol. Exp. et Appl., 58:1-14
- Gould F. 1988. Evolutionary biology and genetically engineered crops. Bioscience, 38:26-33
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Intergrating pest genetics and ecology. Annu. Rev. Entomol., 43:701-726
- Grallien E, Marilleau R, Pham-Delegue MH, Picard-Nizou AL, Jouanin L, Marion-Poll F. 1995. Impact of pest insect resistant oilseed rape on honeybees. Proc. 9th Int. Rapeseed Congr., "Rapeseed today and tomorrow", Cambridge, United Kingdom, 4-7 July 1995, p784-786
- Gringorten JL. 2001. Ion balance in the Lepidoptera midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In: Ishaaya I (ed.) Biochemical sites of insecticidal action and resistance. Heidelberg: Springer. 167-207
- Grochulski PL, Masson S, Borisova M, Pusztai-Carey JL, Schwartz R, Brousseau, Cygler M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol., 254:447-464

- Haider MZ, Knowles BH, Ellar DJ. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal  $\delta$ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.*, 156:531-540
- Hansen LC, Obrycki JJ. 2000. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: Lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125:241-248
- Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, Mattila HR, Spencer T, Bidne KG, Lewis LC. 2001a. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(21):11925-11930
- Hellmich RL, Siegfried BD. 2001b. Bt corn and the monarch butterfly: research update. *In*: Nelson GC. (ed.) *Genetically Modified Organisms in Agriculture-Economics and Politics*. Academic Press, London
- Herdt RW. 1991. Research priorities for rice biotechnology. *In*: Khush GS, Toenniessen GH. (eds.) *Rice Biotechnology*. Wallingford, CAB International. 19-54
- Hilbeck A, Baumcabtner M, Fried PM, Bicler F. 1998. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 27(2):180-187
- Hilbeck A, Meier MS, Raps A. 2000. Review on non-target organisms and Bt-plants. Report to Greenpeace International, Amsterdam. EcoStrat GmbH, Switzerland. p77 (<http://www.greenpeaceusa.org>)
- Hilder VA, Boulter D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance -A critical review. *Crop Prot.*, 18:177-191
- Hill CA, Pincock DE. 1998. Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse, *Bovicola ovis*. *J Invertebr. Pathol.*, 72:9-20
- Hoffmann T, Golz C, Schieder O. 1994. Foreign DNA sequences are received by a wildtype strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Curr. Genet.*, 27:70-76
- Hofmann C, Vanderbruggen HV, Hofte H, Van Rie J, Jansens S, Van Mellaert H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -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
- Höfte H, de Greve H, Seurinck J, Jansens S, Mahillon J, Ampe C, Vandekerckhove J, van Montagu M, Zabeau M, Vaecq M. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J. Biochem.*, 161:273-280
- Höfte H, Van Rie J, Jansens S, Van Houtven A, Vanderbruggen H, Vaecq M. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific

- insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 54:2010-2017
- Höfte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., 53:242-255
- Ignoffo CM, Hostteter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM. 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. Environ. Entomol., 6(3):411-415
- Ihara H, Kuroda E, Wadano A, Himeno M. 1993. Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem., 57:200-204
- Ives AR, Andow DA. 2002. Evolution of resistance to Bt crops: Directional selection in structured environments. Ecol. Lett., 5(6):792-801
- Jaccard J, Becker MA. 2001. Statistics for the Behavioral Sciences (4 edition). Wadsworth Publishing. p660-661
- James C. 2001. Global status of commercialized transgenic crops: 2001. ISAAA Briefs No. 24: Preview. ISAAA: Ithaca, NY
- James C. 2002. Preview: Global status of commercialized transgenic crop: 2002. ISAAA Briefs No. 27. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jaquet F, Hutter R, Luthy P. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 53:500-504
- Jasinski J, Easley B, Young C, Willson H, Kovach J. 2001. Beneficial arthropod survey in transgenic and non-transgenic field crops in Ohio. Special Circular -Ohio Agricultural Research and Development Center, 179:99-102
- Johnson MT, Gould F, Kennedy GG. 1997. Effects of natural enemies on relative fitness of *Heliothis virescens* genotypes adapted and not adapted to resistant host plants. Entomol. Exp. et Appl., 82:219-30
- Johnson MT, Gould F. 1992. Interaction of genetically engineered host plant resistance and natural enemies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in tobacco. Environ. Entomol., 21:586-597
- Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ. 2002. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. Appl. Environ. Microbiol., 68:5711-5717
- Kaiser J. 1996. Pests overwhelm Bt cotton crop. Science, 273(5274):423
- Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prudovsky E, Regev A, Koncz C, Schell J, Zilberstein A. 1996.

- Digestion of  $\delta$ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26:365-373
- Khush GS. 1995. Breaking the yield frontier of rice. *GeoJournal*, 35: 329-332
- Kim YS, Kanda K, Kato F, Murata A. 1998a. Effect of the carboxyl-terminal portion of Cry1Ab in *Bacillus thuringiensis* on toxicity against the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.*, 33(3):473-477
- Kim YS, Kanda K, Yamaguchi K, Kato F, Murata A. 1998b. Genetic analysis of the *cry1Ab* gene in *Bacillus thuringiensis* strain AF101. *Appl. Entomol. Zool.*, 33(3):441-447
- Knight PJK, Crickmore N, Ellar DJ. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 11:429-436
- Knowles BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.*, 24:275-308
- Kondo S, Tamura N, Kunitate A, Hattori M, Akashi A, Ohmori I. 1987. Cloning and nucleotide sequencing of two insecticidal  $\delta$ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 DNA. *Agric. Biol. Chem.*, 51:455-463
- Koo BT, Park SH, Choi SK, Shin BS, Kim JI, Yu JH. 1995. Cloning of a novel crystal protein gene *cry1K* from *Bacillus thuringiensis* subsp *morrisoni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134:159-164
- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnol.*, 11:194-200
- Kronstad JW, Schnepf HE, Whiteley HR. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.*, 154(1):419-428
- Kronstad JW, Whiteley HR. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene*, 43:29-40
- Lacey LA, Federici BA. 1979. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 33:171-182
- Lee MK, Milne RE, Ge AZ, Dean DH. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *J. Biol. Chem.*, 267:3115-3121
- Leong KL, Cano RJ, Kubinski AM. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. *Environ. Entomol.*, 9:593-599

- LeOra Software. 1997. POLO-PC: a user's guide to Probit or Logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA
- Li J, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. *Nature*, 353:815-821
- Li J, Derbyshire DJ, Promdonkoy B, Ellar DJ. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Transact.*, 29:571-577
- Li J, Koni PA, Ellar DJ. 1996. Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.*, 257:129-152
- Linacre NA, Thompson CJ. 2004. Dynamics of insect resistance in Bt-corn. *Ecol. Modelling*, 171(3):271-278
- Losey JE, Rayor LS, Carter ME. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399:214
- Louette D. 1997. Seed exchange among farmers and gene flow among maize varieties in traditional agricultural systems. *In: Serratos JA, Willcox MC, Castillo F. (eds.) Gene Flow Among Maize Landraces, Improved Maize Varieties, and Teosinte: Implications for Transgenic Maize*, CIMMYT, Mexico, D. F. pp.56-66
- Lozzia GC, Rigamonti IE. 1998. Preliminary study on the effects of transgenic maize on non-target species. *IOBC Bull.*, 21(8):171-180
- Lu H, Rajamohan F, Dean DH. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.*, 176(17):5554-5559
- Luo K, Sangadala S, Masson A, Brousseau R, Adang MJ. 1997. The *Heliothis virescens* 170kDa aminopeptidase functions as receptor A by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27:735-743
- Lüthy P, Ebersold HR. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: histopathology and molecular mode of action. *In: Davidson EW. (ed.) Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Allanheld, Osmun & Co., Totowa, NJ. 235-267
- Maessen GDF. 1997. Genomic stability and stability of expression in genetically modified plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 46(1):3-24
- Malone LA, Burgess EPJ, Christeller JT, Gatehouse HS. 1998. *In vivo* responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *J. Insect Physiol.*, 44(2):141-147
- Malone LA, Burgess EPJ, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. 2001. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity

- and longevity. *Apidologie*, 32(1):57-68
- Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D, Gatehouse HS. 2000. Effects of four protease inhibitors on the survival of worker bumblebees, *Bombus terrestris* L. *Apidologie*, 31:25-38
- Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D. 1999. Effects of a *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 LA, Gjacon HA, Burgess EPJ, Maxwell JZ, Christeller JT, Laing WA. 1995. Toxicity of trypsin endopeptidase inhibitors to honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 88:46-50
- Maribashetty VG, Chandrakala MV, Ahamed CAA, Jyothi HK. 1998. Biochemical studies on digestive amylase in new bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis of yield traits. *Entomol.*, 23(3):241-243
- Mathavan S, Sudha PM. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: A histopathological and histochemical study. *J. Invertebr. Pathol.*, 53:217-227
- Matteson PC. 1995. The "50% pesticides cur" in Europe: A glimpse of our future? *American Entomol.*, 41:210-220
- McLinden JH, Sabourin JR, Clark BD, Gensler DR, Workman WE, Dean DH. 1985. Cloning and expression of an insecticidal k-73 type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:623-628
- Milne RE, Pang ASD, Kaplan H. 1995. A protein complex from *Choristoneura fumiferana* gut juice involved in the precipitation of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25:1101-1114
- Muir W. 2002. USA: Ecological risks of GMOs come in unexpected ways, Purdue model shows. ([http://www.just-food.com/news\\_detail.asp?art=50020](http://www.just-food.com/news_detail.asp?art=50020))
- Myasnik M, Manasherob R, Ben-Dov E, Zaritsky A, Margalith Y, Barak Z. 2001. Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies and other *Bacillus* sp. *Current Microbiol.*, 43:140-143
- Nakatani I, Asano S, Bando H, Iizuka T. 1994. *CryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis*: DNA sequence analysis and insecticidal activity. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 63(2):140-148
- NRC. 1983. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. National Research Council, Natl. Acad. Press, Washington, DC
- Oberhauser KS, Prysby MD, Mattila HR, Stanley-Horn DE, Sears MK, Dively G, Olson E,

- Pleasants JM, Lam WF, Hellmich RL. 2001. Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:11913-11918
- Obrzycki JJ, Losey JE, Taylor OR, Jesse LCH. 2001. Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *Bioscience*, 51:353-361
- Oddou P, Hartmann H, Geiser M. 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.*, 202:673-680
- Oddou P, Hartmann H, Radecke F, Geiser M. 1993. Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.*, 212:145-150
- OECD. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: Concepts and principles. OECD, Paris
- Orr DB, Landis DL. 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
- Palumbi SR. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293:1786-1790
- Panda N, Khush GS. 1995. Host plant resistance to insects. CAB International Wallingford, UK. p431
- Patnaik AK, Datta RK. 1995. Amylase - its genetics and prospects as a marker in silkworm breeding. *Indian J. Sericulture*, 34(2):82-89
- Percy J, Fast PG. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.*, 41:86-89
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA. 1990. Insect resistant cotton plants. *Nature Biotechnol.*, 8:939-943
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3324-3328
- Pham-Delegue MH, Girard C, Metayer ML, Picard-Nizou AL, Hennequet C, Pons O, Jouanin L. 2000. Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomol. Exp. et Appl.*, 95(1):21-29
- Picard-Nizou AL, Grison R, Olsen L, Pioche C, Arnold G, Pham-Delegue MH. 1997. Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioral study in the honeybee. *J. Econ. Entomol.*, 90(6):1710-1716
- Pilcher CD, Obrzycki JJ, Rice ME, Lewis LC. 1997. Preimaginal development, survival, and field



- abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. Environ. Entomol., 26:446-454
- Pilcher CD. 1999. Phenological, physiological, and ecological influences of transgenic Bt corn on European corn borer management. PhD dissertation, Iowa State University, Ames, IA
- Pimentel D, Acquay H, Biltonen M, Rice P, Silva M, Nelson J, Lipner V, Giordano S, Horowitz A, D'Amore M. 1992. Environmental and economic costs of pesticide use. BioScience, 42:750-759
- Pleasant JM, Hellmich RL, Dively GP, Sears MK, Stanley-Horn DE, Mattila HR, Foster JE, Clark P, Jones GD. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:11919-11924
- Preisler HK, Robertson JL. 1989. Analysis of time-dose-mortality data. J. Econ. Entomol., 82(6):1534-1542
- Pujiastuti Y, Asano SI, Sahara K, Bando H, Iizuka T. 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* crystal protein to *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*. J. Seric. Sci. Jpn., 68(3):195-199
- Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey PR. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochem. J., 273:43-47
- Raynor GS, Ogden EC, Hayes JV. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. Agron. J., 64:420-427
- Riddick EW, Dively G, Barbosa P. 1998. Effect of a seed-mix deployment of cry3A-transgenic and nontransgenic potato on the abundance of *Lebia grandis* (Coleoptera: Carabidae) and *Coleomegilla maculate* (Coleoptera: Coccinellidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 91(5):647-653
- Roush RT, Denholm I, Pickett JA, Devonshire AL. 1998. Two toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: Can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? Phil.Trans. R. Soc. Lond. B, 353(1376):1777-1786
- Roush RT. 1996. Can we slow adaptation by pests to insect transgenic crops? In: Persley GJ. (ed.) Biotechnology and Integrated Pest Management. CAB Int. Oxon, UK, 242-263
- Roush RT. 1997. Managing risk of resistance in pests to insect-tolerant transgenic crops. In: Waterhouse PW, Enans G, Gibbs MJ. (eds.) Commercialization of Transgenic Crops: Risk, Benefit and Trade Considerations. Cooperative Research Center for Plant Science and Bureau of Statistics, Canberra, Australia, 259-271
- Sachs ES, Benedict JH, Stelly DM, Taylor JF, Altman DW, Berberich SA, Davis SK. 1998. Expression and segregation of genes encoding cry1A insecticidal proteins in cotton. Crop Sci., 38:1-11

- Sanchis V, Lereclus D, Menou G, Chaufaux J, Guo S, Lecadet MM. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.*, 3:229-238
- SAS. 1996. The SAS Systems for Windows, Version 6.12. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sasaki J, Asano S, Hashimoto N, Lay BW, Hastowo S, Bando H, Iizuka T. 1997. Characterization of a *cry2A* gene cloned from an isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto*. *Curr. Microbiol.*, 35:1-8
- Sasaki J, Asano S, Iizuka, Bando H, Lay BW, Hastowo S, Powell GK, Yamamoto T. 1996. Insecticidal activity of the protein encoded by the *cryV* gene of *Bacillus thuringiensis kurstaki* INA-02. *Curr. Microbiol.*, 32 (4):195-200
- Saxena D, Stotzky G. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 33(1):35-39
- Saxena D, Stotzky G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1225-1230
- Schnepf HE, Whiteley HR. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2893-2897
- Schuler TH, Denholm I, Jouarin L, Clark SJ, Clark AJ, Poppy GM. 2001. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. *Mol. Ecol.*, 10:1845-1853
- Schur A, Tornier I, Neumann C. 2000. Bt-Mais und non Bt-Mais: Vergleichende Untersuchungen an Honigbienen (Tunnelzeltversuch). *Apidologie*, 31:616-618
- Sears MK, Hellmich RL, Stanley-Horn DE, Oberhauser KS, Pleasants JM, Mattila HR, Siegfried BD, Dively GP. 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(21):11937-11942
- Shaw JF, Lin FP, Chen SC, Chen HC. 1995. Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp.. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 36:195-200
- Shelton AM, Roush RT. 1999. False reports and the ears of men. *Nature Biotechnol.*, 17:832
- Shelton AM, Sears MK. 2001. The monarch butterfly controversy: Scientific interpretations of a phenomenon. *Plant J.*, 27:483-488
- Shimizu T, Morikawa K. 1996. The  $\beta$ -prism: A new folding motif. *Trends Biochem. Sci.*, 21:3-6
- Shin BS, Park SH, Choi SK, Koo BT, Lee ST, Kim JI. 1995. Distribution of *cryV*-Type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV*-Type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. *Appl.*

- Shu Q, Ye G, Cui H, Cheng X, Xiang Y, Wu D, Gao M, Xia Y, Hu C, Sardana R, Altosaar I. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breeding*, 6:433-439
- Silva CP, Terra WR, de Sá MFG, Samuels RJ, Isejima EM, Bifano TD, Almeida JS. Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor I. *J. Insect Physiol.*, 47:1283-1290
- Sim SR. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Cry1Ac) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomol.*, 20(4):493-500
- Sims SR, Stone TB. 1991. Genetic basis of tobacco budworm resistance to an engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki*. *J. Invert. Pathol.*, 57(2):206-210
- Smith GP, Ellar DJ. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.*, 302:611-616
- Stanley-Horn DE, Dively GP, Hellmich RL, Mattila HR, Sears MK, Rose R, Jesse LC, Losey JE, Obrycki JJ, Lewis L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(21):11931-11936
- Stone TB, Sims SR, Marrone PG. 1989. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the alpha-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Invert. Pathol.*, 53(2):228-234
- Stotzky GJ. 2000. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.*, 29:691-705
- Sutter GR, Raun ES. 1967. Histopathology of European corn-born larvae treated with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9:90-103
- Tabashnik BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 39:47-79
- Tapp H, Calamai L, Stotzky G. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay-minerals. *Soil Biol. Biochem.*, 26:663-679
- Tapp H, Stotzky G. 1995a. Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2):602-609

- Tapp H, Stotzky G. 1995b. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. Appl. Environ. Microbiol., 61(5):1786-1790
- Tapp H, Stotzky G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. Soil Biol. Biochem., 30:471-476
- Tu J, Datta K, Alam MF, Fan YL, Khush GS, Datta SK. 1998. Expression and function of a hybrid *Bt* toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pest. Plant Biotechnol., 15:195-203
- Tu J, Zhang G, Datta K, Xu C, He Y, Zhang Q, Khush GS, Datta SK. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Nat. Biotechnol., 18(10):1101-1104
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji T, Bulla L. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem., 270:5490-5494
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 327:33-37
- Valaitis AP, Lee MK, Rajamohan F, Dean DH. 1995. Brush border membrane aminopeptidase N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIAc  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol., 25:1143-1151
- van Frankenhuyzen K, Gringorten JL, Gauthier D, Milne RE, Masson L, Peferoen M. 1993. Toxicity of Activated CryI Proteins from *Bacillus thuringiensis* to Six Forest Lepidoptera and *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 62(3):295-301
- van Frankenhuyzen K, Gringorten JL, Milne RE, Gauthier D, Pusztai M, Brousseau R, Masson L. 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera. Appl. Environ. Microbiol., 57:1650-1655
- van Rie J, McGaughey WH, Johnson DE, Barnett BD, van Mellaert H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 247:72-74
- Vandenberg JD. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol., 83(3):755-759
- Venkateswerlu G, Stotzky G. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. Current Microbiol., 25:225-233
- Ward ES, Ellar DJ. 1987. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 kDa delta-endotoxin. Nucleic Acids Res., 15:7195
- Watrud LS, Seidler RJ. 1998. Non-target ecological effects of plant, microbial and chemical introductions to terrestrial systems. In: Huang PM. (ed.) Soil Chemistry and Ecosystem

- Health. Soil Science Society of America Special Publication No. 52. Madison, WI. NHEERL- COR-1983J. 313-340
- Whalon ME, Wierenga JM, Hokkanen HMT, Deacon J. 1994. *Bacillus thuringiensis* resistant Colorado potato beetle and transgenic plants: Some operational and ecological implications for deployment. *Biocontrol Sci. Technol.*, 4(4):555-561
- Whiteley WP, Dankocsik C, Gilbert MP. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.*, 170:4732-4738
- Wilson FD, Flint HM, Deaton WR, Fischhoff DA, Perlak FJ, Armstrong TA, Fuchs RL, Berberich SA, Parks NJ, Stapp BR. 1992. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *J. Econ. Entomol.*, 85(4):1516-1521
- Wolfenbarger LL, Phifer PR. 2000. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290:2088-2093
- Wolt JD, Peterson RKD, Bystrak P, Meade T. 2003. A screening level approach for nontarget insect risk assessment: transgenic Bt corn pollen and the monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae). *Environ. Entomol.*, 32(2):237-246
- Wraight CL, Zangerl AR, Carroll MJ, Berenbaum MR. 2000. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:7700-7703
- Wu G, Cui H, Ye G, Xia Y, Sardana R, Cheng X, Li Y, Altosaar I, Shu Q. 2002. Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.*, 104:727-734
- Ye GY, Shu QY, Yao HW, Cui HR, Cheng X, Hu C, Xia YW, Gao MW, Altosaar I. 2001a. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *J. Econ. Entomol.*, 94:271-276
- Ye GY, Tu J, Hu C, Datta K, Datta SK. 2001b. Transgenic IR72 with fused Bt gene *cry1Ab/cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* resistant against four lepidopteran species under field conditions. *Plant Biotechnol.*, 18(2):125-133
- Ye GY, Yao YW, Shu QY, Cheng X, Hu C, Xia YW, Gao MW, Altosaar I. 2003. High levels of stable resistance in transgenic rice with a *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions. *Crop Prot.*, 22:171-178
- Yu L, Berry RE, Croft BA. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and

potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae). J. Econ. Entomol., 90(1):113-118

Zambryski P. 1988. Basic process underlying agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet., 22:1-30

Zangerl AR, Mckenna D, Wraight CL, Carroll M, Ficarello P, Warner R, Berenbaum MR. 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