分类号：Q965, Q966, Q7　　单位代码：10335
密　级：无　　学　　号：10916076

浙江大学

博士学位论文

三种转 Bt 基因玉米的抗虫性评估及其对非靶标经济昆虫家蚕和捕食性天敌瓢虫的安全性评价

Efficacy evaluation of three transgenic Bt maize events to target pests and the risk assessment to non-target silk worm and predator ladybird

作者姓名　常 雪

指导教师　叶恭银教授

学科(专业)　农业昆虫与害虫防治

所在学院　农业与生物技术学院

提交日期　二零一三年六月

万方数据

三种转 Bt 基因玉米的抗虫性评估及其对非靶标经济昆虫家蚕和捕食性天敌瓢虫的安全性评价

Y2663955

论文作者签名：常雪

指导教师签名：叶恭银

论文评阅人：隐名评阅

答辩委员会主席：彭于发 研究员 博导 中国农业科学院植保所

委员 1：刘树生 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 2：俞晓平 教授 博导 中国计量学院生命科学学院

委员 3：陈学新 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 4：沈志成 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 5：吕仲贤 研究员 博导 浙江省农业科学院植保所

委员 6：叶恭银 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

答辩日期：2013 年 6 月 6 日

万方数据

Efficacy evaluation of three transgenic Bt maize events to target pests and the risk assessment to non-target silk worm and predator ladybird

Author's signature: Xue Chang

Supervisor' s signature: Gongyin Ye

Examining Committee Chairperson:

Prof. Yufa Peng, The Chinese Academy of Agriculture Sciences

Examining Committee Members:

Prof. Shusheng Liu, Zhejiang University

Prof. Xiaoping Yu, China Jiliang University

Prof. Xuexin Chen, Zhejiang University

Prof. Zhicheng Shen, Zhejiang University

Prof. Zhongxian Lv, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences

Prof. Gongyin Ye, Zhejiang University

Date of oral defence: June, 2013

万方数据

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得**浙江大学**或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 常雪　　签字日期：2013 年 6 月 6 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解**浙江大学**有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权**浙江大学**可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 常雪　　导师签名：叶恭银

签字日期： 2013 年 6 月 6 日　　签字日期：2013 年 6 月 6 日

万方数据

本研究承蒙

国家自然科学基金创新研究群体科学基金

（编号：31021003）

资助

万方数据

致 谢

时光冉冉，如白驹过隙，自 2009 年 9 月初至浙大以来，已然匆匆四载，回首所经之路，有欢声笑语，亦有氤氲雾霾。汗水和着泪水的成长，使我终于破蛹而出，走入人生的另一个阶段。回想这一路的成长除自己的学习与努力外，也凝聚了身边许多人的心血。在此，我想对这些曾经帮助、引导以及关心过我的所有人表达最诚挚的谢意！

首先，我的成长和蜕变离不开导师叶恭银教授的悉心教导和栽培。论文从选题到设计及实验开展的各个环节都凝聚着导师的心血和汗水。叶老师渊博精深的学识、敏锐灵活的思路、勤奋忘我的工作态度，让我深深的感受到作为一个科研工作者应该有的职业素养。叶老师雷厉风行的工作作风和灵活求变的创新精神，帮助我突破原有思维模式的限制，领会到可以站在不同的角度，通过不同的方式来分析和解决同一个问题。在这四年的时间里，叶老师一直对我严格要求，常用毛主席的话“扫帚不到，灰尘不会跑掉”来督促我，帮助我改掉拖拖拉拉的毛病，建立起做事情积极主动的习惯。这些都是我人生中宝贵的财富，在此，谨向叶老师表示真诚的谢意！

我还要感谢本所沈志成教授提供的转基因玉米实验材料，使我能够顺利的开展实验并取得一定结果，也要感谢中国农业科学院植物保护研究所何康来研究员提供的亚洲玉米螟及其在论文写作中给予的指导和建议。我还要感谢昆虫所其他老师对我无私的关心和指导，从他们身上我感受到浙大昆虫所是一个团结互助、和睦友爱的大家庭。

本实验室博士后方琪、慎小晶，博士生卢增斌、吴顺凡、祖风、钱岑、汪芳、王飞、朱宇、徐刚、严志超、齐易香，硕士生程璐、姚尧、刘玉娥，已毕业的博士陈洋、田俊策、王磊、郭建洋、张倩倩，硕士李艳敏、梁莉、李兆亮、李秀花、朱洋铿、王伟、郭燕、孙方达，他们在平时的实验及日常生活中都给予过我关心和帮助，在此一并致以真挚的谢意。

我要特别感谢我的父母，在这四年的时间里，他们陪我一起面对所有的困难和压力，气馁时鼓励，失败时安慰，他们的爱是我前进的动力和路上的明灯。

万方数据

最后，再次感谢所有给我以帮助、鼓励、爱护的老师、亲人、同学和朋友。同时向参加论文评阅及答辩委员会的各位专家、教授致以诚挚的谢意！

常雪

2013 年 5 月于紫金港

万方数据

摘要

转 Bt 基因抗虫玉米是目前世界上种植面积最广的转基因作物之一，自 1996 年商业化推广以来，已有 17 个国家种植转 Bt 基因玉米，至 2012 年，具有 Bt 抗虫性状的玉米的种植面积超过 6 千万公顷，占玉米总种植面积的 35%。然而靶标害虫会对 Bt 玉米产生抗性一直威胁着 Bt 玉米的可持续利用，而且 Bt 玉米的生态安全性也是人们关注的焦点。目前，将多个杀虫基因转入同一植株成为开发抗虫转基因玉米的趋势，大量实验数据表明，转入多个抗虫基因的玉米不但能扩大杀虫范围，增强抗虫性，对延缓害虫抗性产生和抗性治理方面也具有极大的优势。本论文评价了三种表达融合蛋白的转 Bt 基因玉米的抗虫性及其在延缓害虫抗性产生和抗性治理上的潜力，同时评估了其对非靶标生物家蚕和瓢虫的环境安全性，为我国玉米育种提供备选材料，并为其环境释放提供实验数据和理论支持。

主要结果如下：

以 7 个转 *cry1Ab/cry2Aj* 玉米事件（N10-N70）、1 个转 *cry1Ab/vip3DA* 玉米事件（V3）和 1 个转 *cry1Ab/cry1I*（J223）和非转基因亲本 Hind II 的不同组织，包括叶片、雄穗、花丝、苞叶和雌穗对靶标害虫亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 敏感种群室内生测结果表明，取食 Bt 玉米的亚洲玉米螟初孵幼虫在 48 h 的死亡率达到 69.2-99.3%，168 h 后全部死亡，而且 Bt 玉米的取食叶面积显著低于非转基因对照。2011 年春、夏两季玉米田间人工接虫后，Bt 玉米的食叶级别为 1.0-1.5，仅有个别叶片有针孔状虫孔，而对照玉米部分植株叶片有绿豆大小虫孔，平均食叶级别为 3.9 和 5.0，差异显著。剖杆调查没有发现 Bt 玉米植株有虫孔或存活的幼虫和蛹，雌穗也没有被害状。以上结果说明 9 个转化事件在整个生育期内对亚洲玉米螟有很好的防治效果，可以防治心叶期和穗期玉米螟为害。而且综合评价认为，转 *cry1Ab/cry2Aj* 玉米 7 个转化事件中 N30 品系抗性最佳。

Cry1Ab 抗性玉米螟取食 N30、V3 和 J223 花丝和雌穗的死亡率差异较大，取食 N30 和 V3 的花丝和雌穗的玉米螟 96 h 后死亡率达到 95.00%，168 h 后全部死亡，而取食 J223 花丝和雌穗的幼虫在 168 h 后死亡率只有 12.50%和 20.83%，与对照没有显著性差异，大部分 J223 存活幼虫与对照一样，均已达到 3 龄末 4 龄初，体重也没有显著性差异。

万方数据

室内生物学测试表明N30、V3和J223对棉铃虫*Helicoverpa armigera*有较高的抗虫性，96 h后的死亡率在90.00%左右。斜纹夜蛾*Prodenia litura*初孵幼虫取食Bt玉米叶片和雌穗48 h后死亡率只有10.00%左右，168 h后才到达90.00%以上。N30、V3和J223对甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*没有明显的致死作用，但能够抑制其生长发育，与对照相比，体重抑制率在85.00%以上。

以上结果表明转*cry1Ab/cry2Aj*和*cry1Ab/vip3DA*玉米对靶标主要害虫和次要害虫都有较好的防治效果，并在玉米螟的抗性治理上有很大的应用潜力。

N30、V3和J223的花粉以40 mg/ml，约10000粒/cm^2的密度涂在桑叶上时，家蚕*Bombyx mori*在14 d后全部死亡，而且大部分蚁蚕无法蜕皮进入下一个生长阶段。当桑叶上花粉密度为4 mg/ml，约1000粒/cm^2时，对家蚕幼虫存活没有不利影响，但各龄眠蚕体重减轻，发育历期延长，但茧重和茧壳重与取食非转基因玉米花粉和无花粉的对照相比没有显著差异。当桑叶上的花粉密度为0.4 mg/ml，约100粒/cm^2时，家蚕的生长发育不受Bt花粉的影响。在实际环境中，桑叶上花粉的密度很难达到1000粒/cm^2，Bt玉米不会对家蚕养殖带来影响。

以取食N30、V3、J223和对照玉米雌穗的甜菜夜蛾饲喂异色瓢虫*Harmonia axyridis*，幼虫至蛹的存活率分别为45.95%、29.73%、40.54%和41.89%，至羽化的存活率分别为31.08%、20.27%、28.38%和35.14%。幼虫发育历期、蛹期、蛹重及雌雄成虫重、产卵前期和产卵量与对照相比没有显著性差异。Cry1Ab蛋白沿着玉米-甜菜夜蛾-瓢虫食物链流动，但没有在瓢虫体内富集和积累。以花粉直接饲喂异色瓢虫成虫，7 d和30 d后取食N30、V3、J223花粉的雌雄虫的体重与取食对照花粉的雌雄虫体重没有显著差异，30 d后雌虫的存活率、产卵量和卵孵化园也与对照没有显著差异。以上结果说明N30、V3和J223对异色瓢虫的生长发育没有不利影响。

综上所述，转Bt基因玉米N30和V3对玉米主要害虫亚洲玉米螟，次要害虫棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾有较高的防治效果，且有防治Cry1Ab抗性玉米螟的潜力。其花粉在桑叶上的密度为1000粒/cm^2时对非靶标经济昆虫家蚕生长发育有不利影响，但实际环境中很难达到这一浓度。捕食性天敌异色瓢虫可以通过猎物和花粉接触到其表达的杀虫蛋白，但是存活率和生长发育等各项生物学指标没有受影响。因此，推荐N30和V3作为开发新型抗虫转基因玉米的备选材料。

万方数据

关键词：转 Bt 基因玉米，抗虫性评估，抗性治理，家蚕，异色瓢虫

万方数据

Abstract

Bt maize is one of the most popular genetically modified crops in the world, and it has been planted in 17 countries since commercialized in the United States in 1996. However, the controversy about theresistance of target insect pests to Bt maize for itslong term and continual implementation, and the environmental risk to non-target organisms is continuedsince it has been developed. So far, pyramided transgenic maize with multiple dissimilar Bt insecticidal proteins offers a superior route for pests control and pest resistant management compared with one single Bt maize.

In this study, three novel pyramided transgenic Bt maize events which contained a fused gene *cry1Ab/cry2Aj*, *cry1Ab/vip3DA and cry1Ab/cry1I,* respectively, and their non-Bt maize control Hind II were evaluated. There were 7 events of transgenic *cry1Ab/cry2Aj* mazie named N10 to N70 in sequence, 1 event of transgenic *cry1Ab/vip3DA* mazie named V3, and 1 event of transgenic *cry1Ab/cry1I* mazie named J223.In the laboratory bioassay, their efficacy on protection against four target insect pests was conducted. The mortalities of maize major pest *Ostrinia furnacalis* were more than 69.20-99.30% when neonate larvae fed on the whorl leaves, tassels, husks, silks, kernels of N30, V3, and J223 at 48 h, and the larvae could survive no-longer than 168 h. There were no significant leaf, silk, and stalk damage on these transgenic maize plants in the field under artificial infestation at middle whorl and silking stages compared with severe leaf feeding, stalk born, and ear damage in control. According to the Topsis analysis, N30 was the most efficacious in the seven transgenic *cry1Ab/cry2Aj* mazie events.

More than 95.00% of Cry1Ab-resistant *O. furnacalis* larvae were killed when feeding on silks and kernels of N30 and V3 within 96 h in the laboratory, and no larvae could survive after 168 h. While the mortalities of neonate larvae were 12.50% and 20.83% when they fed on J223 silks and kernels after 168 h, and the larval weights were not significant difference with those reared in control maize silks and

万方数据

kernels. The result suggested that N30 and V3 could provide the potential for overcoming Cry1Ab resistance in *O. furnacalis*.

The laboratory bioassay results showed that N30, V3 and J223 offerred a high level of control for *Helicoverpa armigera*, the mortalities were around 90.00% after neonate larvae infestation 96 h. As for *Prodenia litura*, the mortalities were just around 10.00% at first 48 h, and rose up to 90.00% after 168 h. N30, V3 and J223 were not lethal to *Spodoptera exigua*, but could inhibit neonate larvae growth dramatically and the weight inhibit rate was above 85.00% compared with control larvae.

The result suggested that N30 and V3 could provide high efficacy to control target insect pests and could be considered as candidates to overcome the resistance of *O. furnacalis to* Cry1Ab.

When the concentration of N30, V3 and J223 pollen on the leaves of mulberry, *Morus alba,* was about 10000 grains/cm^2, the neonate larvae of silk worm, *Bombyx mori*, could not survive beyond 14 d and most of neonate could not molt into 2nd instar. The concentration of pollen which was about 1000 grains/cm^2 was not lethal to neonate larvae, but inhibited their development. The molter weights of different instar larvae were significantly decreased, and the development time were significantly prolonged than control larvae. However, the concentration of 100 grains/cm^2 has no significant effect on the life parameters of silk worm larvae compared with control larvae.

Predator ladybird beetle, *Harmonia axyridis,* could be exposed to Bt protein through prey *S. exigua* larvae reared on N30, V3 and J223 kernels or feeding maize pollon directly. The survival rate of pre-imaginal were 45.95%, 29.73%, 40.54% and 41.89% when *H. axyridis* larvae fed *S. exigua* which reared on N30, V3, J223 and control. The life parameters such as larval stage, pupal stage, pupal weight and adult weight, pre-oviposition, and total fecundity were not effected by these Bt maize events. While the concentration of Cry1Ab protein in *H. axyridis* was 8 to 13 times lower than preys. The weights of female and male adults which fed on N30, V3 and J223 pollens were not significantly different compared with adults which fed on

万方数据

non-Bt control pollen after 7 d and 30 d. Additionally, the survival, fecundity of female adults and egg hatching rates were not impacted by N30, V3 and J223 pollen.

In short, N30 and V3 provided a high level of control for maize pests *O. furnacalis*, *H. armigera*, *P. litura* and *S. exigua*, and they had the potential to counter Cry1Ab resistance in *O. furnacalis*. As for the environmental risk assessment, when the pollen concentration on the leaves of mulberry was 1000 grains/cm^2, the development and growth of silk worm larvae could be effected. Howerver, this concentration was hard to achieve in the real environment. Furthermore, they had no negative effects on predator *H. axyridis*. Therefore, we recommended N30 and V3 to be used as breeding sources for the development of transgenic maize.

Keywords: Bt maize, host plant resistance, target insect pests, non-target insects, resistance management

万方数据

附表 1

玉米抗螟性田间鉴定评价标准

Damage rating scales and categories for evaluation of maize whorl stage resistance to Asian corn borer

心叶被害状 Leaf damaged		食叶级别 Rating scales	蛀茎（孔/株） Stalk cavities	抗螟类型 Resistant type
针刺状或针孔状虫孔 Pinholes	个别叶片、稀少、分散 Rare or sporadic on few leaves	1	0-2	1+R
	个别叶片、中等数量 Intermediate on few leaves	2		
	少数叶片、大量 Many on several leaves	3		R
虫孔绿豆大小，个别呈短条孔花叶 Match-head size holes	个别叶片、稀少、分散 Rare or sporadic on few leaves	4		
	少数叶片、中等数量 Intermediate on few leaves	5	3-5	MR
	部分叶片、大量 Many on several leaves	6		
虫孔大于绿豆呈排孔，长条孔花叶，枯心 Holes bigger than match head size	少数叶片、稀少、分散 Rare or sporadic on few leaves	7		S
	部分叶片、中等数量 Intermediate on several leaves	8		
	大部分叶片、大量 Many on most leaves	9	>6	HS

何康来等. 2000. 玉米抗螟性鉴定方法与评价标准. 沈阳农业大学学报 31: 439-443.

万方数据

附表 2

玉米穗期受亚洲玉米螟为害程度的分级标准

Diagrammatic descriptions of scales used for measuring Asian corn borer injury

雌穗被害级别 Ear damage rating	分级标准 Numerical class descriptions
0	雌穗没有被害 No damage
1	花丝被害 Silk damgae
2	雌穗被害 1 cm Feeding to 1 cm beyond ear tip
3...n	雌穗被害增加 1 cm，被害级别增加 1 级 Injury class is increased by 1 unit for each additional cm depth of feeding

Widstrom, N. 1967. An evaluation of method for measuring corn earworm injury. J. Econ. Entomol. 60: 791-794.

万方数据

目录

致 谢 I

摘要 I

Abstract IV

目录 IX

前言 1

第一章 文献综述 3

1.1 转 Bt 基因作物发展背景 3

1.2 转聚合基因作物发展状况 4

1.3 获得转聚合基因作物方法 9

1.4 转聚合基因作物抗虫优势 11

1.4.1 靶标害虫产生抗性情况 11

1.4.2 高剂量/庇护所策略的限制 12

1.4.3 转聚合基因作物抗虫优势 13

1.4.4 转聚合基因作物的限制 15

1.5 转 Bt 基因玉米的生态安全性研究进展 17

1.5.1 Bt 玉米的生态安全评估方法 18

1.5.2 Bt 玉米对非靶标生物的影响 18

第二章 三种转 Bt 基因玉米对四种靶标害虫的抗虫性评价 26

2.1 材料与方法 27

2.1.1 供试玉米 27

2.1.2 供试昆虫 27

2.1.3 室内抗虫性鉴定 28

2.1.4 田间抗虫性鉴定 29

2.1.5 Cry1Ab 蛋白表达量测定 29

2.1.6 数据统计与分析 29

万方数据

2.2 结果与分析.....30
2.2.1 室内生测结果.....30
2.2.2 田间抗虫性鉴定结果.....41
2.2.3 Cry1Ab 蛋白表达含量测定.....42
2.2.4 Topsis 分析.....43
2.3 讨论.....44
第三章 三种转 Bt 基因玉米花粉对家蚕的安全性评价.....48
3.1 材料与方法.....48
3.1.1 供试玉米.....48
3.1.2 供试家蚕.....48
3.1.3 转融合基因玉米花粉对家蚕生物学影响.....48
3.1.4 转 Bt 基因玉米花粉中 Bt 蛋白含量测定.....49
3.1.5 家蚕对花粉的消化情况.....49
3.1.6 数据分析.....50
3.2 结果与分析.....50
3.2.1 幼虫存活率.....50
3.2.2 各龄眠蚕、茧和茧壳重.....51
3.2.3 转 Bt 基因玉米花粉对家蚕发育历期的影响.....53
3.2.4 转 Bt 基因玉米花粉对家蚕化蛹率、羽化率和产卵量.....55
3.2.5 转 Bt 基因玉米花粉 Cry1Ab 蛋白含量及家蚕对花粉的消化情况.....56
3.3 讨论.....58
第四章 转 Bt 基因玉米对非靶标捕食性天敌-异色瓢虫的风险评估.....60
4.1 材料与方法.....60
4.1.1 供试玉米.....60
4.1.2 供试昆虫.....60
4.1.3 转 Bt 基因玉米通过甜菜夜蛾对异色瓢虫的生物学影响.....60
4.1.4 Bt 蛋白在玉米-甜菜夜蛾-异色瓢虫食物链中的流动.....61
4.1.5 转 Bt 基因玉米花粉对异色瓢虫成虫寿命和生殖力的影响.....61

万方数据

4.1.6 统计分析.....62
4.2 结果与分析.....62
4.2.1 转基因玉米通过猎物甜菜夜蛾对异色瓢虫的生物学影响.....62
4.2.2 Cry1Ab 蛋白在转基因玉米-甜菜夜蛾-异色瓢虫中的流动.....65
4.2.3 转基因玉米花粉对异色瓢虫成虫的生物学影响.....66
4.3 讨论.....69
第五章 总讨论.....71
参考文献.....76

万方数据

前言

自 1996 年第一例转 Bt 基因作物商业化种植以来，其种植面积和范围不断扩大，至 2012 年，种植转 Bt 基因作物的国家已达到 27 个，种植面积超过 2000 万公顷。然而，常年大面积种植转 Bt 基因作物会引发靶标昆虫产生抗性，威胁 Bt 作物的可持续利用，降低其带来的经济和环境效益。迄今为止，已有报道包括棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*、谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*、玉米稻夜蛾 *Busseola fusca*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 和玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 在内的靶标害虫在田间对 Bt 棉和 Bt 玉米产生抗性。产生这种现象主要有以下几种原因： Bt 作物只表达一种杀虫蛋白，靶标害虫能够在一段时间进化适应后，对其产生抗性。同时 Bt 蛋白杀虫范围比较窄，有些靶标害虫本身对其有一定程度的耐受力，而植株表达的 Bt 蛋白不足以杀死这些靶标害虫，导致抗性产生；庇护所和农户经济利益的冲突，使得庇护所种植未能达到有效面积，也是导致靶标害虫产生抗性的原因之一。然而，将多个杀虫基因转入同一植株可以解决这些问题，大量实验数据表明，转入多个 Bt 基因的作物不但能扩大杀虫范围，增强抗虫性，降低庇护所的种植面积，对延缓害虫抗性产生和抗性治理方面也具有极大的优势，是抗虫转基因作物发展的新趋势。

玉米是世界重要的粮食作物和工业原料，被广泛应用于生产和生活的各个领域。自 2008 年起，我国玉米的种植面积超过水稻，成为种植面积最大的作物，达到 2986 万 hm^2。亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 是影响我国玉米生产的重要害虫，每年可造成 600-900 万吨的产量损失。此外，玉米螟的为害还经常导致玉米病害，如玉米茎腐病和穗腐病的发生，降低籽粒品质。表达 Cry1Ab 的玉米可以很好的防治亚洲玉米螟为害，但已有报道抗 Cry1Ab 的亚洲玉米螟可以在 MON810（*cry1Ab*）的花丝上存活，因此，亟需开发新型抗虫玉米防治亚洲玉米螟为害。棉铃虫是玉米的另一种害虫，主要为害雌穗和籽粒生长。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和斜纹夜蛾 *Prodenia litura* 是一种多食性、暴食性害虫，有时也取食玉米。在防治玉米螟的同时，要防止因为地位的变化而引起的次要害虫的爆发。

万方数据

Bt 玉米的生态安全性一直是人们关注的焦点。尤其在 1999 年，Losey 等在《自然》杂志上报道转 *cry1Ab* 玉米花粉能对君主斑蝶 *Danaus plexippus* 造成伤害后，在全世界范围内引起关于 Bt 玉米生态安全性的讨论。目前，Bt 玉米的生态安全性主要研究害虫抗性产生、外源基因漂流、对非靶标生物的影响及对自然生物群落的影响等几个方面。其中对非靶标天敌及经济昆虫的影响研究的较广泛和深入。表达多个杀虫蛋白的转基因玉米的环境安全性评价仍遵循 case-by-case 原则，按照从室内到田间的次序对非靶标生物进行安全性评价，为其环境释放提供实验数据和理论支持。总之，为保证转 Bt 基因玉米的可持续利用，有关转基因抗虫玉米在环境中对非靶标和有益昆虫的影响需要进行大范围的、长期的监测。

万方数据

第一章 文献综述

1.1 转 Bt 基因作物发展背景

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* Berliner（Bt）是一种好氧的、革兰氏阳性细菌，由于其在形成芽孢过程产生的伴孢晶体蛋白（Insecticidal Crystal Protein，ICPs）对昆虫有很高的选择杀虫活性，对人畜、天敌和其他有益生物安全无毒，使得 Bt 制剂成为目前世界上生产量最大的生物杀虫剂而被广泛应用于防治农、林、贮藏害虫和医学昆虫(Beegle and Yamamoto 1992, Sanahuja et al. 2011)。

随着生物技术不断的进步和发展，科学家们设想将 Bt 基因转入到植物中去，让植物自身表达 Bt 杀虫蛋白，抵御害虫。这一梦想在 1987 年成为现实，比利时科学家 Vaeck 及同事成功将一段编码 Cry1 蛋白的 Bt 基因转入到烟草中，获得世界上首例转基因抗虫植物(Vaeck et al. 1987)。此后，科学家成功地将不同的 Bt 基因转入不同作物，如转 *cry1A* 烟草、棉花、玉米、大豆、油菜和马铃薯，转 *cry3A* 马铃薯，转 *cry1C* 苜蓿等(Jouanin et al. 1998)。由于转 Bt 基因作物能够全株、全生育期表达杀虫蛋白，对靶标害虫有很好的控制效果，对非靶标昆虫没有不利影响，不污染环境且大大减少杀虫剂的使用等优点，人们开始采用 Bt 作物代替传统非转基因作物。1996 年，美国政府批准 Bt 棉花和 Bt 玉米商业化种植，同年澳大利亚和墨西哥开始商业化种植 Bt 棉，此后，阿根廷、中国、印度、巴西、南非和哥伦比亚等 6 个国家开始种植 Bt 棉，加拿大、南非、阿根廷等 13 个国家开始种植 Bt 玉米(Hellmich et al. 2008, Naranjo et al. 2008)。2012 年是转 Bt 基因作物商业化种植的第 17 年，种植的国家增加到 27 个，种植面积超过 2000 万公顷。Bt 棉和 Bt 玉米仅次于转基因大豆成为种植面积最大的 2 种转基因作物，其中 Bt 棉占世界棉花总种植面积的 81%，Bt 玉米占世界玉米总种植面积的 35%。中国与 1997 年开始种植 Bt 棉花，2012 年，中国约有 720 万农户种植了 400 万公顷的 Bt 棉花，采用率为 80%（James, 2012）。

迄今为止，人们已经克隆出 200 多种 ICP 基因，按照氨基酸序列的同源性分为 32 类 *cry* 基因和 2 类 *cyt* 基因，*cry* 基因表达的 Cry1、Cry2 和 Cry9 表现出对鳞翅目有强烈的杀虫特异性，Cry3、Cry7 和 Cry8 对鞘翅目有杀虫特异性，Cry4

万方数据

和 Cry11 对双翅目有杀虫特异性。还有一些 Bt 蛋白表现出对多个科目有杀虫活性，如 Cry1I 对鳞翅目和鞘翅目都有杀虫活性，Cry1B 对鳞翅目、鞘翅目和双翅目都有杀虫活性(Wang et al. 2003a)。

随着研究的深入，人们发现一种新型杀虫蛋白 Vip（Vegatative insecticidal protein），与 ICPs 不同，Vip 在 Bt 营养期生长阶段就开始分泌，它并不形成晶体，在氨基酸序列的进化上与 ICPs 没有任何同源性，是一类新型的杀虫蛋白。根据蛋白质序列的同源性，Vip 分为 Vip1、Vip2 和 Vip3 三种，其中以 Vip3 的研究较为深入，Vip3A 对鳞翅目害虫具有广谱杀虫活性，极大地拓宽了转基因作物的抗虫谱(Estruch et al. 1996, 韩丽珍等. 2009, 李朋波等. 2010)。

目前，转 Bt 抗虫作物的基因主要是 *cry1*、*cry2*、*cry3* 三大类，*cry1* 基因中应用比较广泛的是 *cry1A*，*cry2* 基因中主要是 *cry2A*，*cry3* 基因中主要是 *cry3B*，另外，转 *vip3* 的棉花和玉米可以有效控制多种害虫为害(Yu et al. 2011)。

1.2 转聚合基因作物发展状况

随着生物技术的突飞猛进，将不同外源基因转入植物并实施基因叠加（gene stacking）成为是植物基因工程技术发展的一个重要方向。基因叠加是指将 2 个或 2 个以上目的基因转入到同一种作物中去，与基因聚合（gene pyramiding）、多基因转化（multigene transfer）指的是同一过程。转入的目的基因表达的特性叫叠加特性（stacked traits），含有叠加基因的作物叫转聚合基因作物（pyramided transgenic plant）。

相比单个基因的转化，多个基因的叠加在转基因植物中具有明显的优势。如利用多基因转化调控代谢途径可以实现植物复杂性状的有效改良，其中著名的例子是将类胡萝卜素合成代谢途径中三个不同的关键酶基因联合转入水稻，得到富含维生素 A 的全新优良品种“金色水稻”（Golden Rice）。基因叠加还可以实现优良性状重组，如转入多种毒素蛋白基因提高作物持久的抗虫性，拓宽植物抗虫范围，或将不同的抗病、抗虫、抗除草剂基因融合获得多功能转基因植株。2012 年，Bt 抗虫+耐除草剂复合性状的转基因作物种植面积达到 4370 万公顷，占转基因作物种植面积的 26%，比 2011 年增加了 170 万公顷（James，2013）。

万方数据

目前转基因棉花和转基因玉米是种植面积最广、转入基因种类最多的转聚合基因作物，大部分商业化种植的品种均具有耐除草剂和抗虫双重特性（表 1.1）。不但如此，人们还将不同 Bt 基因叠加转入同一植株，增加植株抗虫范围，扩大其抗虫谱，如Bt棉花Bollgard® II(*cry1Ac* + *cry2Ab*)、WideStrike®(*cry1Ac* +*cry1F*)，Bt 玉米 Genuity® VT Double PRO®（*cry1A.105* + *cry2Ab*)、Optimum® Intrasect™（*cry1F* + *cry1Ab*)、Agrisure®Viptera™ 3220（*cry1Ab* + *cry1F* + *vip3A*)、PowerCore®（*cry1A.105* + *cry2Ab2* + *cry1F*)，另外，孟山都与杜邦公司联合开发的转基因玉米 Genuity® SmartStax™，叠加了 6 种 Bt 基因和 2 种耐除草剂基因（*cry1Fa2* + *cry1A.105* + *cry2Ab2* + *cry3Bb1*+ *cry34Ab1*+ *cry35Ab1* + *cp4 epsps* + *pat*)，其中 *cry1Fa2*、*cry1A.105*、*cry2Ab2* 主要防治谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（Boddie)、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Hübner)、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（Smith)、小蔗螟 *Diatraea saccharalis*（Fabricius)、小地老虎 *Agrotis ipsilon*（Hüfnagel）等鳞翅目害虫，*cry3Bb1*、*cry34Ab1*、*cry35Ab1* 主要防治玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte 等鞘翅目地下害虫，*cp4 epsps* 使得植株有耐草甘膦特性，*pat* 使得植株有耐草铵膦特性。

表 1.1 已获得的 Bt 棉和 Bt 玉米

Table 1.1 Cotton and maize varieties with *Bacillus thuringiensis*genes for resistance to targets pests

Crop	Bt genes[c]	Trait target	Commercial trait[a]	Dveloper	Trade name[b]
Cotton	*cry1Ac*	Lepidoptera	A	Monsanto	Bollgard™Cotton
			A+B		BXN™ Plus Bollgard™ Cotton
			A	JK Agri Genetics Ltd (India)	JK 1
	cry1F	Lepidoptera	A	Dow AgroSciences LLC	-
	cry1Ac + *cry1F*	Lepidoptera	A+B	Dow AgroSciences LLC	WideStrike™ Cotton
				Monsanto+Dow AgroSciences LLC	WideStrike™ Roundup Ready™ Cotton, Widestrike™ Roundup Ready Flex™ Cotton
	vip3A(a)	Lepidoptera	A	Syngenta	VIPCOT™ Cotton

万方数据

	vip3A + cry1Ab	Lepidoptera	A	Syngenta	VIPCOT™ Cotton
			A+B	Syngenta+Monsanto	VIPCOT™ Roundup Ready Flex™ Cotton
	cry1Ab	Lepidoptera	A	Syngenta, Bayer CropScience	-
	cry1Ab/cry1Ac	Lepidoptera	A	Nath Seeds/Global Transgenes Ltd (India)	-
				Chinese Academy of Agricultural Sciences	-
	cry2Ae	Lepidoptera	A+B	Bayer CropScience	-
	cry1Ac + cry2Ab2	Lepidoptera	A	Monsanto	Bollgard II™ Cotton
			A+B		Roundup Ready™ Bollgard II™ Cotton
				Bayer CropScience	Fibermax™ Liberty Link™ Bollgard II™
	cry1Ab + cry2Ae	Lepidoptera	A+B	Bayer CropScience	TwinLink™ Cotton Glytol™ ×Twinlink™
	cry1C	Lepidoptera	A	Metahelix Life Sciences Pvt. Ltd (India)	-
	cry1Ac + CpTI	Lepidoptera	A	Chinese Academy of Agricultural Sciences	-
Maize	*cry1Ab*	Lepidoptera	A+B+C	Syngenta	-
			A+B		Bt10, Agrisure™ CB/LL, Agrisure™ GT/CB/LL, NaturGard KnockOut™, Maximizer™
				Monsanto	Roundup Ready™ YieldGard™ maize
			A		YieldGard™, MaizeGard™
			A+C	Monsanto	Mavera™ YieldGard™ Maize
	mcry3A+ cry1Ab	Lepidoptera, Coleoptera	A+B+C	Syngenta	-
			A+B		Agrisure™ CB/LL/RW, Agrisure™ 3000GT

万方数据

	mcry3A	Coleoptera	A	Syngenta	Agrisure™ RW
			A+C		-
	mcry3A+ cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
				DuPont	Optimum™ TRIsect
	ecry3.1Ab	Lepidoptera, Coleoptera	A	Syngenta	Agrisure® Duracade™
	ecry3.1Ab + mcry3A + cry1Ab + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	Agrisure® Duracade™ 5122
	ecry3.1Ab + mcry3A + cry1Ab + cry1Fa2 + vip3Aa20	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	Agrisure® Duracade™ 5222
	cry34Ab1 + cry35Ab1	Coleoptera	A+B	Dow AgroSciences LLC and DuPont	Herculex™ RW
	cry34Ab1 + cry35Ab1 + mcry3A	Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	cry34Ab1 + cry35Ab1 + mcry3A + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	cry34Ab1 + cry35Ab1 + cry1Ab	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	DuPont	-
	cry34Ab1 + cry35Ab1 + cry3Bb	Coleoptera	A+B	Monsanto and Dow AgroSciences LLC	-
	cry34Ab1 + cry35Ab1 + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta, Dow AgroSciences LLC+DuPont	-
	cry34Ab1+ cry35Ab1 + mcry3A+ cry1Ab	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Dow AgroSciences LLC+DuPont	Herculex™ I, Herculex™ CB, Herculex™ I RR
	cry1Ab + cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Syngenta	-
				DuPont	Optimum™ Intrasect
	cry34Ab1+ cry35Ab1 + mcry3A + cry1Ab + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	Agrisure® 3122
	cry34Ab1+ cry35Ab1 + cry1Ab + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	vip3Aa20	Lepidoptera	A	Syngenta	Agrisure™ Viptera
	cry1Ab + vip3Aa20	Lepidoptera	A+B	Syngenta	Agrisure® Viptera™ 2100, Agrisure® Viptera™ 3110
	vip3Aa20 + mcry3A	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	vip3Aa20 + cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Syngenta	-

万方数据

	cry1Ab + vip3Aa20 + mcry3A	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	Agrisure® Viptera™ 3100,Agrisure® Viptera™ 3111
	cry1Ab + vip3Aa20 + mcry3A + cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Syngenta	-
	cry1Ab + vip3Aa20 + cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Syngenta	Agrisure™ Viptera 3220
	cry1Ab + mcry3A + cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Syngenta	-
	cry9C	Lepidoptera	A+B	Syngenta	Starlink™ Maize
	cry1Ac + pinII	Lepidoptera	A+B	Monsanto	Bt Xtra™ Maize
	cry3Bb1	Coleoptera	A	Monsanto	YieldGard™ Rootworm RW, MaxGard™
			A+B		YieldGard™ RW + RR, YieldGard™ VT™ Rootworm™ RR2
	cry3Bb1+ cry1Ab	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Monsanto	YieldGard™ VT Triple, YieldGard™ Plus with RR
	cry3Bb1+ cry1Fa2	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Monsanto+Dow AgroSciences LLC	
	cry1A.105 + cry2Ab2	Lepidoptera	A+B	Monsanto	Genuity® VT Double Pro™ , YieldGard™ VT Pro™
	cry1A.105 + cry2Ab2 + cry3Bb1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B+D	Monsanto	-
			A+B		Genuity® VT Triple Pro™
	cry1A.105 + cry2Ab2 + cry1Fa2	Lepidoptera	A+B	Monsanto	Power Core™
	cry1A.105 + cry2Ab2 + cry34Ab1+ cry35Ab1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Monsanto	-
	cry1A.105 + cry2Ab2 + cry3Bb1+ cry34Ab1+ cry35Ab1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Monsanto+Dow AgroSciences LLC	-
	cry1Fa2 + cry1A.105 + cry2Ab2 + cry3Bb1+ cry34Ab1+ cry35Ab1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Monsanto+Dupont	Genuity® SmartStax™
	cry1Fa2 + cry1Ab + mcry3A + cry34Ab1+	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Dupont	Optimum™ Intrasect Xtreme

万方数据

	cry35Ab1				
	cry1Fa2 + cry34Ab1+ cry35Ab1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Dow AgroSciences LLC+DuPont	Herculex XTRA™, Herculex XTRA™ RR
	cry1Fa2 + cry1Ab + cry34Ab1+ cry35Ab1	Lepidoptera, Coleoptera	A+B	Dupont	Optimum™ Intrasect XTRA
	mocry1F	Lepidoptera	A+B	Dow AgroSciences LLC	-

Source: GM approval database, http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp

[a]A：Insect Resistance

B：Herbicide Tolerance

C：Modified Product Quality

D：Abiotic Stress Tolerance

[b]-：未获得商品名.

[c]Gene	Gene Source	Target pest order
cry1Ab/cry1Ac	synthetic fusion gene derived from*cry1Ab*and *cry1Ac*	Lepidoptera
CpTI	trypsin inhibitor(*Vigna unguiculata*)	
mcry3A	modified *cry3A* delta-endotoxin	Coleoptera
ecry3.1Ab	synthetic form of *cry3A* and *cry1Ab*	Lepidoptera, oleoptera
cry1Fa2	synthetic form of *cry1F*	Lepidoptera
pinII	protease inhibitor protein (*Solanum tuberosum*)	
cry1A.105	synthetic form of*cry1Ab*, *cry1F* and *cry1Ac*	Lepidoptera
mocry1F	modified *cry1F*	

1.3 获得转聚合基因作物方法

围绕多个基因的植物转化，主要有以下几种方法：

杂交转化（Hybrid stacking），先是产生不同的转基因植株，然后采用常规育种手段再将这些植株进行杂交，借助分子标记辅助选择，获得转基因纯系。即将含有不同目的基因的转基因植物进行杂交、回交等方式，将目的基因聚合到同一个基因组，以实现有利基因的聚合。如转基因玉米 Bt11 ×MIR162 × TC1507×

万方数据

GA21 的杂交获得转聚合基因玉米 Agrisure™ Viptera™ 3220，转基因棉花 MON88913 × MON15985 得到 Roundup Ready™ Flex Bollgard™ II。

单载体一次转化（Linked genes or multigene cassette transformation），是指将 2 个或 2 个以上目的基因串联在一起组建于同一表达载体中，经一次转化就可以获得具有两个或多个功能基因的转基因植株。其中应有较广的是利用融合基因获得转基因植物。所谓融合基因，是指将两个或两个以上基因的编码区首尾相连，置于同一套调控序列（包括启动子、增强子和终止子等）控制之下，构成嵌合基因，然后构建到同一表达载体上，使用一套调控序列，导入植物体后发挥不同蛋白的功能。这一方法不但省时省力，可以让多个功能基因同步表达，而且减少了启动子的数目，可以降低基因沉默的几率。同时，将多个基因置于一套调控元件控制之下，也便于对外源多基因进行时空表达的调控。另一种方法是目的基因串联在同一载体中，但目的基因的两端均具有各自的启动子、增强子、终止子等转录和翻译调控元件，转入植株后以单体蛋白的形式发挥作用。转基因玉米 Herculex™ I（TC1507）、Herculex™ RW（59122）、Agrisure™ CB/LL（Bt11）即是单载体一次转化获得的转基因植株。

多转化（Re-transformation），是指多次将多个基因转入植物基因组中，即构建多个表达载体，分多次将不同目的基因转入到同一植物中。如转基因棉 Bollgard™ II 是将 *cry1Ac* 转入棉花后再次将 *cry2A* 转入同一植株。

共转化（Co-transformation），是指将位于不同载体上的多个目的基因同时转到同一植物中。如转基因玉米 YieldGard™（MON810，MON809，MON802）。

利用分子生物学手段实现基因叠加在实际操作中存在一些难题，如载体的容量、可整合的目的基因的数目、如何保证转入基因高效表达又防止同源重组和基因沉默、多个基因在同一个转基因植株中的转录和表达水平不一致及插入片段过长而引起转化效率降低等问题。就目前来看，杂交聚合是最简单的基因叠加方法，但比较费时和繁琐，含有不同基因的亲本需要 2-3 代达到纯合，若聚合 3-4 个基因需要 4-6 代，甚至更长的时间。因此，将分子生物学与传统育种技术相结合，创造优良作物种质资源，科学合理地利用基因资源进行转基因操作，快速培育高产、优质、多抗作物新品种是目前发展趋势。

万方数据

1.4 转聚合基因作物抗虫优势

1.4.1 靶标害虫产生抗性情况

目前世界上有 400 多种昆虫对化学杀虫剂产生抗性，自 1996 年 Bt 棉和 Bt 玉米商业化种植以来，种植面积持续增加，至 2007 年累计种植面积超过 2 亿公顷，至 2009 年，种植国家达 22 个，种植面积达 4760 万公顷(Tabashnik 2008)。人们担心如同化学杀虫剂一样，常年大面积种植转 Bt 基因作物会引发靶标昆虫产生抗性，威胁 Bt 作物的可持续利用，降低其带来的经济和环境效益。事实上，早在 1985 年，McGaughey 等报道印度谷螟 *Plodia interpunctella*（Hübner）对 Bt 制剂产生抗性，随后有报道小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（Hübner）分别在大田和温室环境中对 Bt 蛋白产生抗性(McGaughey 1985, Tabashnik et al. 1990)。目前，已有 5 种鳞翅目和 1 种鞘翅目害虫在田间对 Bt 作物产生抗性（表 1.2），分别是：南非的玉米稻夜蛾 *Busseola fusca*（Fuller）对表达 Cry1Ab 的转基因玉米（MON810）产生抗性(Van Rensburg 2007)；中国河北的棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）对表达 Cry1Ac 的 Bt 棉产生抗性(Liu et al. 2009)；波多黎各的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（J.E. Smith）对表达 Cry1F 的 Bt 玉米（TC1507）产生抗性(Storer et al. 2010)；美国 Arkansas 和 Mississippi 的谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*（Boddie）对表达 Cry1Ac 的 Bt 棉产生抗性(Tabashnik et al. 2008)；印度 Amreli 地区棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*（Saunders）对表达 Cry1Ac 的 Bt 棉产生抗性(Dhurua and Gujar 2011)；美国 Iowa 的玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte 对表达 Cry3Bb 的 Bt 玉米产生抗性(Gassmann et al. 2011)。除此以外，室内建立的 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Guenée）、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Hübner）、小蔗螟 *Diatraea saccharalis*（Fabricius）等亦可在转 *cry1Ab* 玉米上存活(Xu et al. 2010, Wangila et al. 2012)。另外，至少有 10 种蛾类，2 种甲虫和 4 种蝇类已在室内建立起 Bt 的抗性种群(Tabashnik 1994)。

万方数据

表 1.2 已在大田对 Bt 作物产生抗性的靶标害虫

Table 1.2 Target insect pests which have evolved field resistance to Bt crops

Target pest	Crop	Bt protein	Country	Reported year
Busseola fusca	Maize (MON810)	Cry1Ab	South Africa	2007
Helicoverpa zea	Cotton	Cry1Ac	USA, Arkansas, Mississippi	2008
Helicoverpa armigera	Cotton	Cry1Ac	China, Hebei	2009
Spodoptera frugiperda	Maize (TC1507)	Cry1F	Puerto Rico	2010
Pectinophora gossypiella	Cotton	Cry1Ac	India, Amreli	2011
Diabrotica virgifera virgifera	Maize	Cry3Bb	USA, Iowa	2011

1.4.2 高剂量/庇护所策略的限制

为延缓靶标害虫抗性的产生，确保转基因作物的可持续利用，科学家提出多种抗性治理策略，目前利用的比较广泛的是“高剂量/庇护所策略”（High dose/Refuge strategy）。即要求 Bt 作物能高剂量（远高于杀死害虫的用量）的表达杀虫蛋白，能杀死 99%以上的敏感个体和 95%以上的杂合体害虫，并按比例在 Bt 作物周围种植非 Bt 作物，提供敏感个体与抗性个体进行交配，使其后代成为杂合体，达到稀释抗性基因的目的，从而延缓抗性的产生。

田间抗性监测数据显示，“高剂量/庇护所策略”确实可以有效延缓靶标昆虫产生抗性。Bt 棉和 Bt 玉米在北美商业化种植 15 年后，对欧洲玉米螟、西南玉米杆螟 *Diatraea grandiosella*（Dyar）、烟芽夜蛾和棉红铃虫等主要靶标害虫仍然能取得很好的防治效果，是源于美国和加拿大对“高剂量/庇护所策略”的有效实施(Huang et al. 2011)。西班牙种植 Bt 玉米 5 年后，田间的粉茎螟 *Sesamia nonagrioides*（Lefebvre）和欧洲玉米螟的抗性没有增加，而室内筛选 8 代的粉茎螟和欧洲玉米螟对 Cry1Ab 的抗性已经分别达到 21 倍和 10 倍(Farinós et al. 2003)。玉米根叶甲在没有庇护所的条件下连续 3 代就可以对表达 Cry3Bb 的玉米产生很

万方数据

高的抗性，存活率与非转基因对照相似，而有庇护所时筛选 3 代后的幼虫对 Bt 玉米的敏感性与敏感幼虫相同(Meihls et al. 2008)。

但“高剂量/庇护所策略”的有效性需要几个前提条件：抗性是隐性遗传，抗性等位基因频率低，而且敏感和抗性个体随机交配。这些条件使得这个策略在实际应用中受到诸多限制。已有报道室内筛选的欧洲玉米螟、亚洲玉米螟、一个小菜蛾种群和烟蚜夜蛾 SEL 种群对 Bt 的抗性是不完全显性遗传（Huang et al. 1999；Sim et al. 1991；Sayyed et al. 2000）；Bt 蛋白对不同害虫的杀虫性不同，如 Cry1Ab 对欧洲玉米螟和 Cry1Ac 对烟芽夜蛾的杀虫活性比谷实夜蛾高，因此抗虫植株不可能杀死所有的害虫；对 Bt 产生抗性的幼虫发育历期通常比敏感幼虫的发育历期长，由此产生的时间差异使得成虫无法随机交配；从现有的研究结果看，Bt 作物表达的杀虫蛋白随着生长发育呈下降趋势，而大龄幼虫对 Bt 的抗性显著高于低龄幼虫，这些因素都直接增加了昆虫产生抗性的风险。另外，为确保庇护所能真正发挥作用，需要种植一定比例的非转基因作物，然而这个比例是否可以被种植者和种子公司接受，如美国环境保护署（Environmental Protection Agency，EPA）要求庇护所的非转基因棉的种植比例高达 50%，因此，作物产量和种植者利益的最大化、降低杀虫剂的使用与庇护所种植面积之间的矛盾，限制了“庇护所策略”的实施(Shelton et al. 2000)。南非的玉米稻夜蛾、波多黎各的草地贪夜蛾及美国的玉米根叶甲在田间产生抗性，主要因为没有种植庇护所和高含量杀虫蛋白的Bt作物所致(Van Rensburg 2007, Gassmann et al. 2011, Huang et al. 2011)。

由于“高剂量/庇护所策略”在实际应用中遇到的挑战，促使科学家们寻找新的、更有效的方法进行害虫抗性治理。

1.4.3 转聚合基因作物抗虫优势

植物在不同的生长阶段遭受多种害虫攻击，第一代转 Bt 基因抗虫作物只表达一个杀虫蛋白，杀虫范围比较窄，而将不同类型的杀虫蛋白基因导入同一受体植物使其同时表达，可以显著提高作物的杀虫活性，扩大杀虫谱。

1996 年，表达 Cry1Ac 的 Bt 棉 Bollgard®（Monsanto，St. Louis，MO）开始在美国商业化种植，其对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（F.）和棉红铃虫有非常好

万方数据

的防治效果，但对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）、草地贪夜蛾和谷实夜蛾等害虫的防治效果比较差，因此棉田中需要另外喷洒杀虫剂来控制这些害虫。2003 年，孟山都公司通过杂交在 Bollgard®基础上转入一个新 Bt 基因 *cry2Ab*，开发出表达两种不同杀虫蛋白的 Bt 棉 Bollgard®II。室内试验表明，Bollgard®II 不但可以较好的控制谷实夜蛾、甜菜夜蛾、草地贪夜蛾和大豆尺夜蛾 *Pseudoplusiaincludes*（Walker）(Adamczyk Jr et al. 2001, Stewart et al. 2001)。田间试验表明，在不使用杀虫剂的情况下，Bollgard®与普通棉上 L4-L5 龄的谷实夜蛾幼虫数目相近，但成虫数与被为害的棉铃数显著低于普通棉。而 Bollgard®II 棉田中 L4-L5 龄虫、成虫数与被为害的棉铃数显著低于 Bollgard®与普通棉。在使用杀虫剂的情况下，Bollgard®II 比 Bollgard®被为害的棉铃数低，而且几乎没有铃虫可以存活(Chitkowski et al. 2003, Jackson et al. 2004)。另一种表达 Cry1Ac 和 Cry1F 的 Bt 棉 WideStrike®对甜菜夜蛾和草地贪夜蛾的控制效果也优于单独表达 Cry1Ac 的 Bt 棉(Adamczyk Jr and Gore 2004, Adamczyk Jr et al. 2008)。另外，利用对鳞翅目和对鞘翅目有杀虫作用的基因叠加构建的转聚合基因玉米可以同时防治多种地上和地下害虫，如 PowerCore®（*cry1A.105* + *cry2Ab2* + *cry1F*），Genuity® SmartStax™（*cry1Fa2* + *cry1A.105* + *cry2Ab2* + *cry3Bb1*+ *cry34Ab1*+ *cry35Ab1*），极大的拓宽了植株的抗虫范围。

转聚合基因作物是害虫抗性治理的有效方法，因为害虫几乎不可能同时对 2 种或 2 种以上的 Bt 蛋白产生抗性(Roush 1998, Christou et al. 2006, Manyangarirwa et al. 2006, Storer et al. 2012)。实验表明，表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的 Bt 棉可以完全控制已经对 Cry1Ac 产生抗性的棉红铃虫为害，该虫在 *cry1Ac* 棉和非 Bt 棉上的存活率分别是22.4%和20.4% (Tabashnik et al. 2002)。抗 Cry1Ab 小蔗螟 *Diatraea saccharalis*（Fabricius）可以在 MON810（Cry1Ab）上完成幼虫发育，但不能在表达 Cry1A.105 和 Cry2Ab2 的转基因玉米上存活(Huang et al. 2007, Ghimire et al. 2011, Wangila et al. 2012)。转双基因 *cry1Ac+cry1C* 花椰菜能够有效防治 Cry1Ac 或 Cry1C 抗性的小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)(Zhao et al. 2003)。同时表达 Cry1Ac 和 Cry1Ie 的转基因烟草比表达单独一种蛋白的转基因烟草对敏感和 Cry1Ac 抗性的棉铃虫杀虫效果更好，两种蛋白共同作用使得转基因烟草杀虫性更高(Lian et al. 2008)。

万方数据

转聚合基因作物在延缓害虫产生抗性上比单基因作物有明显的优势(Storer et al. 2012)。如果聚合基因作物表达的多种 Bt 蛋白能够杀死 95%以上的敏感害虫，庇护所的面积比例为 10%，则害虫产生抗性的代数比在单基因作物上延后 25-100 代。此外，转聚合基因基因作物可以降低庇护所的种植面积，增加种植者收益。种植单 Bt 基因作物时，美国环境保护署要求种植 20%非 Bt 玉米、50%非 Bt 棉花作为庇护所，但对表达多个 Bt 蛋白的抗虫作物，只需 5%非 Bt 玉米和 20%的非 Bt 棉作为庇护所。Bollgard®II 可以使用其他非 Bt 作物如大豆、玉米、高粱、花生等作为烟芽夜蛾和谷实夜蛾的庇护所。巴西对单 Bt 基因作物的庇护所比例要求为 10%，对转聚合基因玉米 PowerCore®则下降到 5%，加拿大当局只要求种植 5%的非转基因玉米作为 SmartStax™的庇护所。

1.4.4 转聚合基因作物的限制

靶标害虫在不同 Bt 蛋白间产生交互抗性，是应用转聚合基因作物防治害虫的一个严重威胁，因而在开发转基因作物前，需要明确昆虫对不同 Bt 蛋白的抗性。

目前开发的 Bt 蛋白及转基因作物基本是以鳞翅目和鞘翅目为靶标害虫，据报道，昆虫对不同 Bt 蛋白产生交互抗性的情况不同，如抗 Cry1Ab 的亚洲玉米螟对 Cry1Ah 有 131 倍的交互抗性，对 Cry1Ac 有 36 倍的抗性，对 Cry1Ie 无交互抗性 (Xu et al. 2010)。抗 Cry1Ac 的亚洲玉米螟同样表现的对 Cry1Ah 有较高的交互抗性，对 Cry1Ab 有低水平的抗性，对 Cry1Ie 无交互抗性(韩海亮等. 2009)。抗 Cry1Ab 的欧洲玉米螟对 Cry1Ac 和 Cry1Aa 表现出很高的抗性，但对 Cry1F 的抗性比较低，对 Cry9C 无交互抗性(Siqueira et al. 2004, Crespo et al. 2011)。抗 Cry1F 的欧洲玉米螟对 Cry1Ac 有低水平的交互抗性，对 Cry9C 和 Cry1Ab 完全无交互抗性(Pereira et al. 2007)。抗 Cry1Ab 的小蔗螟对 Cry1Aa 和 Cry1Ac 亦表现出很高的抗性，对 Cry1A.105 有低水平抗性，对 Cry2Ab2 无交互抗性(Wu et al. 2009)。中国河南新乡和河北廊坊的两个室内棉铃虫种群分别对 Cry1Ac 产生 2971 倍和 253 倍的抗性，但对 Cry2Ab 只有 1.1 倍和 1.0 倍的抗性(Luo et al. 2007)。抗 Cry1Ac 的烟芽夜蛾对 Vip3A 无交互抗性(Jackson et al. 2007)。

万方数据

经过多年研究，现已明确 Bt 杀虫晶体蛋白（ICPs）的作用机制：当昆虫摄入 Bt 蛋白后，ICPs 首先在昆虫中肠碱性条件下被蛋白酶水解成有活性的毒性肽（toxic peptides），毒性肽一般由三个结构域组成。在杀虫过程中，毒性肽首先通过结构域II或结构域III的特殊部位与昆虫中肠上皮细胞膜上的受体蛋白发生专一性结合，继而诱发毒性肽分子发生空间构象变化，使得结构域 I 中的某些 α-螺旋从 α -螺旋束中弹出并插入细胞膜，并通过寡聚合作用造成膜穿孔，导致细胞渗透平衡破坏、中肠破裂、昆虫死亡(Gill et al. 1992, 刘子绎等. 2000, 邵宗泽等. 2001)。位于昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜囊泡（Brush border membrane vesicles，BBMV）上的受体蛋白具有特异性，即不同受体结合不同类型的 Bt 蛋白，因而造成 Bt 蛋白杀虫的专一性，而受体蛋白的变异或者与 Bt 蛋白的亲和力下降也是昆虫产生抗性的一个主要原因。

从分子机制来看，昆虫对不同的 Bt 蛋白产生交互抗性，主要是因为这两种蛋白在昆虫中肠的 BBMV 上享有相同的结合蛋白，没有产生交互抗性则是因为受体蛋白不同(Pigott and Ellar 2007)。这一说法得到众多实验的证实。欧洲玉米螟对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 间存在较高的交互抗性，与 Cry1F 有较低的交互抗性，主要是因为前两种蛋白的结合受体相同，都是钙粘蛋白和氨肽酶等膜蛋白，而体外结合试验（Drosophila S2 cells）表明 Cry1F 不与钙粘蛋白结合(Crespo et al. 2011)。异源竞争结合试验表明 Cry1I 在亚洲玉米螟中肠 BBMV 上不与 Cry1Ac 竞争结合位点，说明 Cry1I 与 Cry1Ac 没有相同的结合位点(Guo et al. 2011)。Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 竞争小菜蛾和棉铃虫中肠 BBMV 上相同的结合位点，而 Cry2Aa 则不与之结合(Ballester et al. 1999, Karim et al. 2000)。另外有实验证实，I^{125} 标记的 Cry2Ab 在棉铃虫和谷实夜蛾中肠 BBMV 上有高亲和力的结合位点，而且异源竞争实验（Heterologous-competition assay）表明这一位点可以被 Cry2A 家族的其他蛋白 Cry2Aa、Cry2Ab、Cry2Ae 分享，但不能被 Cry1Ac 分享(Hernández-Rodríguez et al. 2008)。Gouffon 等（2011）利用 I^{125} 标记 Cry2Ae 后测试其与 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Fa、Vip3A、Cry2Ae 和 Cry2Ab 在棉铃虫、烟芽夜蛾和谷实夜蛾中肠 BBMV 中的竞争结合情况，得到类似的结果，即 Cry2Ae 的结合蛋白也可以结合 Cry2Ab，但不能结合 Cry1 或者 Vip3A(Gouffon et al. 2011)。

万方数据

Vip3A是Bt营养生长期形成的一种非晶体状胞外杀虫蛋白，杀虫范围很广，可以防治对Cry蛋白不敏感的小地老虎*Agrotis ipsilon*（Hüfnagel），对棉铃虫、甜菜夜蛾、小菜蛾和草地贪夜蛾高毒，对已产生Cry1Ac抗性的粉纹夜蛾和烟蚜夜蛾也具有良好的杀虫活性，是构建转聚合基因作物的优良基因。许多实验结果都表明昆虫不会对Vip3A与Cry蛋白产生交互抗性，因为Vip3A蛋白序列高度保守，与Cry类蛋白没有同源性，蛋白结构也不相同(Estruch et al. 1996)。Vip3A杀虫机理主要体现在其对昆虫中肠细胞的破坏，症状与Cry蛋白相似，但比Cry蛋白需要更长的时间。进一步的研究表明，Vip3A和Cry蛋白在昆虫中肠BBMV上结合的受体蛋白位点和受体蛋白大小都不同，Vip3A能结合烟草天蛾*Manduca sexta*(L.)BBMV上分子量分别为80 kDa和100 kDa的靶蛋白，不能结合Cry1Ab的受体蛋白（120 kDa的氨肽酶N和250 kDa的类钙粘蛋白）(Lee et al. 2003)。体外竞争结合试验表明，Vip3Aa与Vip3Af竞争相同的结合位点，但不与Cry1F和Cry1A竞争同一个结合位点(Sena et al. 2009)。

因此，在开发转聚合基因作物前，需要确定靶标昆虫对叠加基因的抗性情况，从目前的趋势看，人们常将*cry1A*与*cry1F*，或与*cry2A*、*vip3A*等无交互抗性的基因堆叠在一起开发转聚合基因作物，以期获得具有较广泛抗虫谱和抗虫效果的转基因植株，并能够较好的进行害虫抗性治理。

1.5 转Bt基因玉米的生态安全性研究进展

随着转Bt基因玉米的大面积推广应用，人们在关注其所带来巨大的社会、经济和生态效益时，对Bt玉米及其产品的安全性问题也提出疑问，尤其是在1999年，Losey等在《自然》杂志上报道转*cry1Ab*玉米花粉能对君主斑蝶*Danaus plexippus*（L.）造成伤害后，立刻在全世界范围内引起关于Bt玉米生态安全性的争论。Bt玉米的生态安全主要指其外源基因漂流、对非靶标生物的影响及对自然生物群落的影响等。以下主要对Bt玉米对非靶标生物的影响进行总结和回顾。

万方数据

1.5.1 Bt 玉米的生态安全评估方法

我国环境保护部在 2012 年发布的“抗虫转基因植物生态环境安全检测导则”中对抗虫作物的生态安全评价方法做出了详细的规定。在此仅阐述评估抗虫作物对非靶标生物的影响的方法，其中的原则适用于 Bt 玉米的非靶标生物安全性评估。

首先确定具有代表性的非靶标生物作为指示生物，要满足以下条件：是否对 Bt 蛋白敏感；暴露于 Bt 蛋白的几率；是否具有重要的生态功能；在生物多样性保护、经济和文化等方面的价值；在 Bt 植物生长地点及其周围环境中的出现品读和丰富度；要注意中国的特有物种。

根据自然条件下非靶标生物受到 Bt 植物影响的途径、方式、时间等因素，设计室内条件下 Bt 作物对特定非靶标生物影响的实验，包括毒理学实验及以捕食性天敌和寄生性天敌为对象的二级或三级营养学实验。

使用亲本植物或非转基因品种为阴性对照，直接使用 Bt 植物组织或含有 Bt 蛋白的人工饲料饲喂受试非靶标生物，并使暴露剂量高于该非靶标生物在自然条件下的最大预期暴露剂量。

测试指标包括非靶标生物的生长发育指标，如死亡率、发育历期、体重、酶活性，繁殖指标，如产卵量、生殖力等。

如果 Bt 植物对特定非靶标生物产生显著影响，应进一步检测产生这一影响所需的最小暴露剂量，并在开放条件下调查特定非靶标生物对 Bt 植物的实际暴露剂量，以及在该剂量下非靶标生物受到的影响。

1.5.2 Bt 玉米对非靶标生物的影响

1.5.2.1 非靶标植食者

Bt 玉米对非靶标植食害虫的影响有较多报道，蚜虫—玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis*（Fitch）、麦长管蚜 *Sitobion avenae*（Fabricius）、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*（L.）是刺吸式口器的非靶标害虫，主要取食植物韧皮部汁液，Bt 蛋白可以在韧皮部和木质部表达，但是能否转运到韧皮部汁液中主要取决于 Bt 蛋白的大小和结构(Raps et al. 2001)。现有的 ELISA 方法没有检测到取食 Bt 玉米的蚜虫体

万方数据

内含有 Cry 蛋白，仅有几例报道蚜虫体内检测到 Cry1Ab 蛋白可能是因为实验材料中混杂了蓟马和花粉，推测蚜虫没有接触到 Bt 蛋白(Lawo et al. 2009, Romeis and Meissle 2011)。比较取食 Bt 玉米（Cry1Ab）与非转基因对照玉米的蚜虫的死亡率、发育速率、有翅蚜比率、生殖前期和生殖期、生殖力和内禀增长率、周限增长率和种群净增殖率、寿命和繁殖历期等生物学参数，没有发现两者间存在显著差异(Ramirez-Romero et al. 2008a)。Bt 玉米苗期的禾谷缢管蚜密度高于非转基因对照，此时蚜虫处于定殖期，其他生育期密度与对照玉米无显著差异(Lumbierres et al. 2004)。虽然蚜虫没有接触到 Cry 蛋白，生长发育不受 Bt 玉米表达的杀虫蛋白的影响，但插入外源基因引起玉米表型性状或一些代谢物的变化会影响到蚜虫的取食行为，如玉米蚜更倾向于取食 Bt 玉米，因为 Bt 玉米韧皮部汁液中一些氨基酸含量显著高与对照(Faria et al. 2007)。

另外，转 *cry1Ab* 玉米的非靶标害虫玉米跳甲 *Chaetocnema pulicuria*（Melsheimer）、日本弧丽金龟 *Popillia japonica*（Newman）和南方玉米根虫 *Diabrotica undecimpunctata*（Barber）体内都可检测到一定量的 Cry1Ab 蛋白，但生长发育未受影响(Harwood et al. 2005)。

由此可见，转基因抗虫玉米对非靶标植食害虫的生长发育和繁殖没有直接的抑制作用，即转基因抗虫玉米生态系统不会直接引起非靶标害虫地位演化，但种植转基因抗虫玉米会改变靶标害虫传统综合治理体系的技术构成，如减少化学杀虫剂的使用，这可能引起某些非靶标害虫在生态系统中的地位发生改变，如 Bt 棉控制了棉铃虫为害，使得次要害虫盲蝽上升为主要害虫(Lu et al. 2008)。

1.5.2.2 非靶标天敌

捕食性天敌：

瓢虫是一类常见而且种类丰富的天敌昆虫，幼虫和成虫都有捕食性，而且食性很广，可以捕食蚜虫、蓟马、鳞翅目幼虫及卵，在食物匮乏时也取食植物组织，如花粉。

瓢虫可以通过猎物间接接触到 Bt 蛋白，在已发表的文献中，大部分报道表明转 Bt 基因玉米对瓢虫没有不利影响。为避免 Bt 玉米影响猎物质量，许多实验用对 Bt 不敏感或已经对该玉米产生抗性的猎物饲喂瓢虫，以便更直接的检验

万方数据

Bt 玉米对瓢虫的影响。取食玉米叶片的二斑叶螨 *Tetranychus urticae*（Koch）体内 Cry3Bb1 的含量是叶片的 56%，而深点食螨瓢虫 *Stethorus punctillum*（Weise）中 Cry3Bb1 的含量比叶螨低 6-20 倍，Bt 蛋白在食物链中被稀释，与非转基因对照相比，取食转 *cry3Bb1* 玉米饲喂的二斑叶螨的深点食螨瓢虫幼虫存活率与发育历期、成虫存活率和体重无显著变化(Li and Romeis 2010)。Cry1F 在转 *cry1F* 玉米、草地贪夜蛾和具斑食蚜瓢虫 *Coleomegilla maculata*（DeGeer）三级营养关系中亦呈下降趋势，叶片中 Cry1F 含量为 2.38-4.33μg/g FW，草地贪夜蛾体内 Cry1F 含量为 96.9-211.8ng/g FW，瓢虫幼虫所含 Cry1F 含量比草地贪夜蛾低 3-10 倍，仅为 20-32 ng/g FW，表现为 4 龄幼虫含量最高，蛹重含量最低，成虫检测不到 Cry1F 蛋白。用抗 Cry1F 的草地贪夜蛾体饲喂深点深点食螨瓢虫，没有发现瓢虫及后代的生物学指标与对照有差异(Tian et al. 2012)。用取食 MON863（Cry3Bb1）的蚜虫饲喂具斑食蚜瓢虫，瓢虫的各项生物学指标与取食非转基因对照的蚜虫的瓢虫没有显著差异，在蚜虫和瓢虫体内未检测到 Cry3Bb1 蛋白(Lundgren and Wiedenmann 2005)。取食 MON810 对异色瓢虫 *Harmonia axyridis*（Pallas）影响的试验中，Cry1Ab 在 MON810 的叶片中含量为 23-33μg/g DW，在草地贪夜蛾中的含量为 2.1-2.2μg/g，在瓢虫体内的蛋白含量仅为 0.01-0.2μg/g，而且三龄瓢虫和成虫对取食 MON810 和非转基因对照玉米的草地贪夜蛾没有偏好性(Dutra et al. 2012)。

瓢虫可以通过取食花粉直接接触到 Bt 蛋白，玉米散粉期间，田间瓢虫数量显著增多，卵块也增加，解剖发现瓢虫幼虫和成虫肠道内含有大量花粉(Lundgren et al. 2004, Lundgren et al. 2005)。与对照相比，含有不同比例的转 *cry3Bb1* 玉米（MON863）花粉的人工饲料对具斑食蚜瓢虫的适合度指标没有影响，而且取食 Cry3Bb1 花粉和蚜虫的具斑食蚜瓢虫比只取食蚜虫和人工饲料的瓢虫发育历期短、存活率高、蛹重增加(Lundgren and Wiedenmann 2002)。同样，MON863 花粉对茄二十八星瓢虫 *Epilachna vigintioctopunctata*（Fabricius）的生长发育也没有不利影响(Shirai 2006)。转 *cry1Ab* 玉米花粉（MON810）对异色瓢虫发育历期和体重没有影响，而且多数龄期内取食转基因玉米花粉的异色瓢虫体内的 α-乙酸萘酯酶活性、乙酰胆碱酯酶活性以及谷光甘肽-S-转移酶活性与对照组相比没有显著差异(张永军 et al. 2005)。对取食转 *cry1Ah* 玉米花粉的龟纹瓢虫 *Propylea*

万方数据

japonica（Thunberg）的各龄期幼虫的发育历期和存活率与取食对照花粉的幼虫相比稍有差异，但幼虫总发育历期、蛹期和成虫寿命均无显著差异。取食含有Cry1Ah花粉的龟纹瓢虫4 龄幼虫和蛹的α-乙酸萘酯酶及蛹的弱碱性类胰凝蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性显著低于取食非 Bt 玉米花粉的龟纹瓢虫。由此可见，龟纹瓢虫取食含有 Cry1Ah 杀虫蛋白的玉米花粉后，体内代谢解毒酶和中肠蛋白酶与 Cry1Ah 杀虫蛋白相互作用，可能会引起某些酶活性的变化(崔蕾等. 2011a, b)。

除玉米外，还有许多研究其他转 Bt 基因作物对瓢虫的影响的报道，如表达Cry1Ac和Cry2Ab的转基因棉BollGard®II对具斑食蚜瓢虫的生长发育没有影响，转 *cry1Ac* 棉对龟纹瓢虫及后代的各项生物学指标无显著影响，转 *cry1Ab* 水稻通过花粉及猎物褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Stål）对龟纹瓢虫存活、发育历期和繁殖力等也没有显著影响(Bai et al. 2005, Bai et al. 2006, Zhang et al. 2006, Zhu et al. 2006, Li et al. 2011)。

对 Bt 蛋白对瓢虫的安全性也存在一些争议。Hilbeck 等（2009）认为 Bt 蛋白会导致二星瓢虫 *Adalia bipunctata*（L.）幼虫死亡，他们用胰蛋白酶活化的Cry1Ab 和 Cry3Bb 饲喂二星瓢虫，发现幼虫的死亡率显著高于对照，这一数据被证明Bt玉米对捕食性天敌存在不利影响，使得德国政府禁止MON810在德国种植(Schmidt et al. 2009)。Romeis 及其同事等对 Hilbeck 的实验方法提出质疑并做了重复实验，将蜘蛛螨（Spider mites）作为 Cry 蛋白载体，并用高于蜘蛛螨体内 10 倍的 Cry1Ab 和 Cry3Bb 纯蛋白直接饲喂二星瓢虫幼虫两种方法，考察幼虫死亡率、体重、发育历期等指标，结果表明二星瓢虫对 Cry1Ab 和 Cry3Bb 蛋白不敏感，而且表达这两种蛋白的 Bt 玉米（MON810，MON88017）对其生长发育等生物学指标没有不利影响(Alvarez-Alfageme et al. 2011)。Hilbeck（2012）解释 Alvarez-Alfageme 等用的是 Exposure/Recovery 方法，不同的实验方法产生了完全相反的实验结果(Hilbeck et al. 2012)。Romeis 等则坚持认为二星瓢虫对 Bt 不敏感，即使在 Bt 含量高于 worst-case exposure concentrations 10 倍的情况下仍未见二星瓢虫的各项生物学指标受到影响，因为在田间实际情况下二星瓢虫接触到 Cry1Ab 的量很少，因此 Bt 玉米对二星瓢虫的影响可以忽略不计(Romeis et al. 2012)。

万方数据

草蛉是另一类重要的捕食性天敌，Bt 玉米对草蛉的安全性也有很多报道。早在 1998 年 Hilbeck 等报道 Cry1Ab 蛋白对普通草蛉 *Chrysoperla carnea*（Stephens）有毒，用含有 Cry1Ab 的人工饲料喂养的普通草蛉幼虫死亡率达到 57% (Hilbeck et al. 1998b)。同年，Hilbeck 等用 Bt 玉米（Cry1Ab）靶标害虫欧洲玉米螟和非靶标害虫斜纹夜蛾幼虫饲喂普通草蛉幼虫，发现取食两种猎物的普通草蛉幼虫死亡率达到 67%，显著高于饲喂取食非转基因玉米猎物的普通草蛉，而且取食欧洲玉米螟和斜纹夜蛾的普通草蛉幼虫死亡率之间没有显著差异，另外，取食 Bt 玉米的欧洲玉米螟饲喂的普通草蛉幼虫的发育历期显著长于取食非转基因玉米的欧洲玉米螟饲喂的普通草蛉，但以斜纹夜蛾为猎物时不存在这种情况，Hilbeck 推测是因为普通草蛉幼虫接触到 Cry1Ab 蛋白和取食 Bt 玉米造成猎物欧洲玉米螟质量下降造成的，他在 1999 年的实验中取得相似的结论(Hilbeck et al. 1998a, Hilbeck et al. 1999)。但在 Hilbeck 之后的实验结果大多表明 Bt 玉米对普通草蛉没有不利影响。Cry1Ab 蛋白可通过食物链（转 *cry1Ab* 基因玉米-欧洲玉米螟-普通草蛉）进入草蛉体内并保持活性，但未对草蛉的生长发育和存活造成不利影响，进一步的试验证明草蛉中肠 BBMV 上没有与 Cry1Ab 和 Cry1Ac 蛋白结合的位点，而且草蛉取食 Cry1Ab 蛋白后未发现其中肠有组织病变现象（No histopathological effects）(Obrist et al. 2006a, Rodrigo-Simón et al. 2006)。普通草蛉取食含 Cry1Ab 或 Cry3Bb1 蛋白的玉米花粉后，其存活率、产卵前期、生殖力、产卵量及成虫干重与取食非转基因玉米花粉的草蛉没有显著差异，草蛉成虫中肠含有大量未被消化的花粉粒，由于草蛉无法弄破花粉壁，只能通过酶解或渗透等方式消化花粉粒，因此草蛉只能接触到很少量的 Bt 蛋白，而且只有 39.5%的 Cry1Ab 和 21.2%的 Cry3Bb1 被消化吸收(Li et al. 2008, 2010)。

胡瓜钝绥螨 *Neoseiulus cucumeris*（Oudemans）捕食了取食转 *cry1Ab* 玉米（Bt 11）和非转基因玉米的二斑叶螨后，其死亡率、发育历期和产卵率均没有显著的差别(Obrist et al. 2006b)。在三级营养试验中 Cry1Ab 蛋白的含量会随着食物链的延伸递减，转基因玉米田中捕食性步甲 *Poecilus cupreus*（L.）体内 Cry1Ab 蛋白含量仅为 8%，对步甲的幼虫和蛹的生长发育均无影响(Meissle et al. 2005)。在转 *cry1Ab* 玉米-猎物二斑叶螨-隐翅虫 *Athetacoriaria*（Kraatz）食物链中得出类似的实验结果，隐翅虫成虫取食 Bt 喂养的二斑叶螨 24 h 后体内就检测不到 Cry1Ab

万方数据

蛋白，而且在猎物质量没有受 Bt 玉米影响的情况下，隐翅虫的存活率、发育历期、性比、繁殖力（fecundity）和产卵量（egg fertility）与对照相比没有显著差异(García et al. 2010)。

寄生性天敌：

赤眼蜂属卵寄生蜂，是许多农林害虫的重要天敌，成蜂取食植物花粉、花蜜或寄生卵来获取营养。玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostriniae*（Pang et Chen）是亚洲玉米螟的优势卵寄生蜂，也是防治欧洲玉米螟的优良候选寄生蜂种。研究表明，表达 Cry1Ab 蛋白的 Bt11 和 MON810 玉米花粉对玉米螟赤眼蜂雌蜂的寿命、繁殖力、子代羽化数和性比无不利影响(Wang et al. 2007, 吴研等. 2008)。

由于靶标害虫取食转基因抗虫玉米后发育受到抑制，即使是抗性品系其体重等往往与取食常规玉米的敏感品系相比要小，作为营养下降的的寄主提供给寄生蜂。因此寄生于取食转基因抗虫玉米寄主的寄生蜂常出现表现为发育历期延长、成虫虫体小、生殖力下降等。如寄生于取食 Bt 玉米的斜纹夜蛾幼虫的齿唇姬蜂 *Campoletis sonorensis*，其成蜂体重比对照减少了 15%-30%。寄生于已经对 Bt 产生抗性的地中海粉螟 *Ephestia kuehniella*（Zeller）幼虫的仓蛾圆柄茧蜂 *Venturia canescens*（Gravenhorst）发育历期较长，但虫体较寄生于 Bt 敏感寄主的寄生蜂大(Rahman et al. 2004)。寄生取食了转基因玉米的草地贪夜蛾的缘腹绒茧蜂 *Cotesia marginiventris*（Cresson），其发育历期，成虫大小和生殖力都受到影响(Ramirez-Romero et al. 2007)。

齿唇姬蜂 *Campoletis sonorensis* 对取食转 *cry1Ab* 玉米和非转基因玉米的欧洲玉米螟幼虫的寄生选择性没有差异，成蜂体内没有检测到 Cry1Ab 蛋白(Sanders et al. 2007)。

1.5.2.3 经济昆虫

家蚕 *Bombyx mori*（L.）属于鳞翅目，蚕蛾科，是我国重要的经济昆虫，属于目前主要转基因抗虫玉米靶标害虫范围。有实验表明 Bt 可湿性粉剂对家蚕有毒性，超微结构观察发现 Cry1Ab 蛋白进入虫体内腔，造成中肠病理学变化，说明家蚕对 Bt 蛋白敏感(王玉华等. 2001, 蒋彩英 2004)。Bt 玉米对家蚕的影响的报道较少，只有李文东等报道 MON810 花粉对家蚕各龄期的死亡率、蛹重、茧重、

万方数据

茧层重、化蛹率、羽化率和产卵量等生物学指标无多大影响，且无明显的剂量效应，对柞蚕 *Antheraea pernyi* 的存活率和体重也没有影响(李文东等. 2002, Li et al. 2005)。但 Bt 水稻对家蚕有一定影响，王忠华等报道 KMD3（Cry1Ab）花粉对初孵家蚕幼虫无致死效应，而对家蚕的体重有较大影响，其中三龄期家蚕体重与取食非转基因水稻花粉的同龄家蚕存在极显著差异(王忠华等. 2001)。姚洪谓等报道家蚕对 Bt 水稻 B1（Cry1Ab）和 KMD1（Cry1Ab）的花粉敏感，对 TT9-3（Cry1Ab/Cry1Ac）不敏感，而且 1 龄幼虫比其他龄期对 Bt 花粉更敏感(Yao et al. 2008)。

以上不同的实验结果可能与转入基因的启动子有关，目前转基因作物使用的启动子主要有 ubiquitin、actin I 和 CaMV35S，这三类启动子都是非组织特异性的，可以在全株中表达 Bt 蛋白。但是不同启动子，Bt 蛋白的表达量是不同的，TT9-3 使用的启动子是 actin I，KMD1 和 B1 的启动子是 ubiquitin，KMD1 花粉中 Bt 蛋白含量是 TT9-3 的 4.5 倍，B1 花粉中 Bt 蛋白含量是 TT9-3 的 3.4 倍(Yao et al. 2008)。玉米 Bt 176 使用的在花粉中高表达的启动子 phosphoenol pyruvate carboxylase promoters，Mon810 使用的启动子是 CaMV35S，其花粉中 Cry1Ab 的表达量只有 Bt 176 的 1/40。

Bt 蛋白需要在家蚕中肠积累到一定剂量才发挥作用，而家蚕中肠和粪便中含有大量完整的花粉粒，说明家蚕无法消化花粉粒壁，只能通过肠道内的酶分解或渗透作用消化花粉，所以实际接触到的杀虫蛋白浓度很低，这也可能是一些 Bt 花粉对家蚕无影响的原因。因此，Bt 花粉要对家蚕产生影响，需要达到一定密度，但实际生态环境中很难达到室内试验设置的密度。樊龙江等（2003）调查杭州余杭桑稻混种地区水稻花粉的密度，20 个采样点的调查结果显示，超过一半的桑叶检测到了水稻花粉，其浓度变化范围为 13.3-199.0 粒/ cm^2，平均浓度为 92.9 粒/ cm^2，基本达到影响家蚕生长发育的阈值。玉米比水稻植株高，散粉量大（3000 万花粉粒/每玉米雄穗），但花粉粒重，没有水稻花粉传播远。目前尚未有玉米花粉向桑叶上自然飘落的报道，但 Bt 玉米花粉向马利筋叶片（*Asclepias syriaca*）上自然飘落的调查结果显示，在田间玉米地里的马利筋叶片上 Bt 玉米花粉平均为 170.6 粒/ cm^2，最高可达 1400 粒/ cm^2，随着距玉米地边缘的距离增大，花粉密度显著减少，当距离为 2m 时，下降到 14.2 粒/ cm^2(Pleasants

万方数据

et al. 2001)。另一篇调查结果表明，在距离 Bt 玉米地边缘 0.5 m 和 1.0 m 的马利筋叶片上最高平均花粉浓度分别可达 260 和 170 粒/ cm^2(Zangerl et al. 2001)。桑叶表面光滑，桑树比马利筋高，而且降雨冲刷、风力和人为采集桑叶时的抖动都会降低桑叶上的花粉密度。此外，还受玉米品种、气候条件和地理环境的影响。

花粉中 Bt 蛋白的含量，家蚕对花粉粒的消化情况及桑叶上的花粉密度是决定 Bt 玉米是否对家蚕的生长发育造成影响的主要因素，因此在蚕区应谨慎种植抗鳞翅目害虫的转基因玉米。目前只有 Cry1Ab 蛋白对家蚕影响的报道，未有 Cry1 类其它蛋白如 Cry1F、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1Ie，Cry2A 和 Vip3A 类蛋白对家蚕影响的实验数据，考虑到目前 Bt 玉米表达杀虫蛋白的多样化及转聚合基因玉米的迅猛发展，我国非常需要建立一条家蚕对不同 Bt 蛋白的敏感基线，并完善转 Bt 基因玉米对家蚕的环境风险评估方法体系，以便可以更加准确地判断不同 Bt 玉米对家蚕生长发育的影响程度，为家蚕养殖提供理论指导。

Bt 玉米对蜜蜂的存活和生长发育没有显著的影响(Duan et al. 2008)。室内用表达 Cry1Ab 和 Cry1F 蛋白的玉米花粉饲喂 4-5 日龄的工蜂幼虫与非转基因对照玉米相比，蜜蜂幼虫和蛹的死亡率及蛹重均无显著差异(Hanley et al. 2003)。转 *cry1Ab* 玉米 MON810 花粉及转聚合基因玉米（*cry1A.105* + *cry2Ab2* + *cry3Bb1*）2 mg 花粉加入饲料中饲喂 3 日龄幼蜂，其存活率与预蛹重与非转基因对照玉米无显著差异(Hendriksma et al. 2011)。进一步的研究发现，低浓度的 Cry1Ab 蛋白（3μg/kg）对蜜蜂的取食行为和取食量没有影响，浓度达到 1000μg/kg 时会降低蜜蜂的觅食行为，当浓度达到 5000μg/kg（相当于 Bt 176 玉米花粉中的表达量）时 Cry1Ab 蛋白虽然对蜜蜂没有致死作用，但会影响蜜蜂的取食行为，进而影响到蜜蜂的学习能力(Ramirez-Romero et al. 2005, Ramirez-Romero et al. 2008b)。

万方数据

第二章 三种转 Bt 基因玉米对四种靶标害虫的抗虫性评价

玉米是我国重要的粮食作物和工业原料，广泛应用于生产和生活的各个领域。2008 年起，其种植面积超过水稻，成为我国种植面积最大作物，达到 2986 万 hm^2(李宁等. 2011)。亚洲玉米螟 Asian corn borer，*Ostrinia furnacalis*（Guenée）是影响我国玉米生产的重要害虫，每年可造成 600-900 万吨的产量损失。此外，玉米螟的为害还经常导致玉米病害，如玉米茎腐病和穗腐病的发生，降低籽粒品质(Wang et al. 2003b)。仅 2009 年，我国玉米病虫害发生面积达 6353.6 万 hm^2 次，造成玉米损失 435.49 万吨，其中玉米螟 1976 万 hm^2 次(李宁等. 2011)。棉铃虫是玉米的另一种害虫，近年来成为黄淮海地区夏玉米穗期的主要害虫之一，严重为害雌穗和籽粒生长，有些年份其为害程度甚至超过玉米螟(王振营等. 2001)。甜菜夜蛾和斜纹夜蛾是一种多食性、暴食性害虫，主要寄主为蔬菜，也为害玉米、棉花等作物(秦厚国等. 2006, 张彬等. 2008)。

转 Bt 基因抗虫玉米能够全株表达杀虫蛋白，可以在整个生育期内有效防治亚洲玉米螟和棉铃虫为害(He et al. 2003a, Wang et al. 2012)。第一代转基因玉米只转入一个杀虫蛋白基因，如 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry9C*、*cry1Fa2*、*mcry3A*、*cry3Bb* 等，靶标为鳞翅目和鞘翅目害虫，其中商业化应用最广的为转 *cry1Ab* 基因玉米 MON810 和 Bt11(Hellmich et al. 2001, Raybould et al. 2007, Nguyen and Jehle 2009)。第二代转基因玉米是利用基因聚合分子育种方法，将不同杀虫机理的基因转入同一作物，构建转聚合基因玉米(Zhao et al. 2003, Bates et al. 2005, Gould et al. 2006)。相比转单基因玉米，转多基因玉米能更有效的控制害虫，扩大杀虫范围，且有效对靶标害虫进行抗性治理。目前，已经在美国和欧盟登记注册的转聚合基因玉米中含有的杀虫基因主要包括 *cry1F+cry34Ab1+cry35Ab1*，*cry1A.105+cry2Ab2+cry3Bb1*，*cry1Ab+mcry3A*，*cry34Ab1+cry35Ab1*，*vip3Aa20+mcry3A+cry1Ab*，*cry1A.105+cry2Ab2*，*cry1A.105+cry2Ab2+cry1Fa2+cry3Bb1+cry34Ab1+cry35Ab1* 等(Meissle et al. 2011, Yu et al. 2011)。2010 年，防治鳞翅目害虫的两个转聚合基因玉米品系 Genuity®VT Triple Pro™ 和 Genuity®SmartStax™ 在美国商业化种植，且种植面积逐年增加(Wangila et al. 2012)。

万方数据

本试验就三种转融合基因玉米对玉米主要害虫亚洲玉米螟的室内杀虫及田间抗虫效果，及三种次要害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner），甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner），斜纹夜蛾 *Prodenia litura* Fab.的抗虫性进行了评估，以期为开发新型抗虫转基因玉米提供备选材料，亦为亚洲玉米螟的综合治理提供理论依据。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试玉米

供试转基因玉米品系，包括 7 个 NJB 转化事件（N10、N20、N30、N40、N50、N60、N70），1 个 V3 转化事件和 1 个 J223 转化事件，及亲本非转基因对照 HindII 由浙江大学昆虫科学研究所沈志成实验室提供。转基因玉米 NJB 系列、V3 和 J223 通过农杆菌介导法分别转入融合基因 *cry1Ab/cry2Aj*，*cry1Ab/vip3DA*，*cry1Ab/cry1I*，同时转入的还有抗草甘膦的 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶（5-enolpyruvylshikmate-3-phosphate synthase，EPSPS）基因。各转基因玉米品系 T_1 和 T_2 代及亲本与 2011 年 4 月和 7 月播种于浙江大学华家池农场（杭州，浙江），5-6 叶期喷洒 41%草甘膦水剂 300 倍稀释液以去除非转基因个体。所有植株按照常规方式管理，整个生育期没有使用杀虫剂。

2.1.2 供试昆虫

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)(Lepidoptera: Crambidae)敏感和 Cry1Ab 抗性种群由中国农业科学院植物保护所玉米害虫研究室提供。棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner），甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner），斜纹夜蛾 *Prodenia litura* Fab.购自河南济源白云实业有限公司（济源，河南）（Henan Jiyuan Baiyun Industry Co.，Ltd.，East Section Of Jishui Street，Jiyuan，Henan，China）。虫卵置于 28±2 °C，相对湿度 70±5%，光周期 16:8 h（light : dark）条件下，孵化 24 h 之内的幼虫供实验用。

万方数据

2.1.3 室内抗虫性鉴定

2.1.3.1 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟敏感种群的抗虫性评估

对转基因玉米心叶、雄穗、苞叶、花丝和雌穗进行抗虫性鉴定。玉米心叶中期从田间采回心叶，剪成 4 cm 小片放入指形管（6.5 x 2.0 cm）中，叶片底部和两端放有含 100 ppm 苯并咪唑的滤纸片杀菌保湿，每管放 25 头初孵幼虫，2-3 天更换一次叶片，每个处理重复 10 次。幼嫩尚未抽出的雄穗，4-5 个小花为一组，幼嫩雌穗切成 1cm^3 左右小块，放入 24 孔细胞培养板中，每孔接一头初孵幼虫，雄穗重复 7 次，雌穗重复 5 次。苞叶从田间取回后剪成小块，放入 6 孔细胞培养板中，每孔接 5 头初孵幼虫，共测试 30 头幼虫，每处理重复 5 次。取新鲜未授粉的花丝，剪成 5 cm 放入塑料培养皿（直径 6 cm）中，皿底部放有滤纸保湿，每皿接 25 头初孵幼虫，重复 12 次。

接虫 48 h，96 h 和 168 h 后记录幼虫存活头数，仍处于 1 龄或重量≤ 0.1 mg 的幼虫算做死亡。测量幼虫在 48 h 和 96 h 的累计取食叶面积（mm^2/25 头），具体方法参照 Chen et al.（2010）。所有实验在 28±2 °C，相对湿度 70±5%，光周期 16:8 h（light : dark）条件下进行。

2.1.3.2 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性种群的抗虫性评估

选取转基因玉米 N30、V3 和 J223 的花丝和雌穗对 Cry1Ab 抗性种群进行生物学测定，具体方法同敏感玉米螟测定。花丝重复 6 次，共测试 120 头初孵幼虫，雌穗重复 5 次，共测试 120 头初孵幼虫。

调查方法同敏感玉米螟测定，存活幼虫 7 d 后称重，每个处理称 25 头。

2.1.3.3 转 Bt 基因玉米对棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的抗虫性评估

选取转基因玉米 N10、N30、N40、V3 和 J223 的心叶、花丝和雌穗进行抗虫性鉴定。心叶从田间取回后剪成 3 cm^2 左右小块，放入 6 孔细胞培养板中，每孔放 3 片，各接 5 头初孵棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾初孵幼虫，每细胞板测试 30 头幼虫，重复 4 次。花丝剪短后放入 9 cm 塑料培养皿中，每皿接 5 头初孵棉铃虫或甜菜夜蛾或斜纹夜蛾，每个重复测试 30 头幼虫，6 次重复。棉铃虫和斜

万方数据

纹夜蛾雌穗抗性鉴定使用 24 孔细胞培养板，具体方法同玉米螟，每孔 1 头初孵幼虫，重复 4 次。甜菜夜蛾雌穗抗性鉴定用 6 孔细胞培养板，每孔放 5 头初孵幼虫，每细胞板测试 30 头幼虫，重复 4 次。7 d 后对在转基因玉米上存活的幼虫称重。

2.1.4 田间抗虫性鉴定

在玉米植株生长至心叶中期和花丝期，分别进行田间抗虫性鉴定。将黑头的玉米螟卵块放进 1.5 ml 离心管后倒插在玉米喇叭口中或花丝上，第二天检查卵块孵化情况，每个植株约接 80 头初孵幼虫，每个处理接 10 株。心叶中期接虫 2 周后调查食叶级别，采用 9 级标准（附表 1），1 级表示无叶片被害，9 级表示大部分叶片含有绿豆排孔或长条孔，被害严重。待玉米雌穗成熟后进行田间剖杆调查，记录每株存活的幼虫和蛹数、蛀孔数和隧道长度，以及雌穗被害级别（附表 2）等，作为抗性评价的标准。

2.1.5 Cry1Ab 蛋白表达量测定

在转基因玉米对玉米螟抗虫性鉴定时，取各品系心叶、雄穗、苞叶、花丝和雌穗保存在-70 °C 冰箱中，冷冻干燥 16 h 后取 20 mg 左右样品，用高通量组织研磨仪（25 frequencies/s）研磨 1-2 min 后以 20:1 比例加入提取液（mg 样品：ml PBST），充分振荡悬浮后在 4 °C 下静止 30 min 让蛋白充分溶解在提取液中，经离心和适当稀释后按照 Cry1Ab/Cry1Ac 试剂盒（Envirologix Inc.，Portland，ME,USA）说明书进行定量测定，只是加入抗体后 4 °C 过夜代替室温下孵育 2 h。Cry1Ab 纯蛋白（Case Western Reserve University）稀释不同浓度（5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15 ng/mg）作为标准曲线，在多功能酶标仪（Bio Tek Instruments，Winooski， VT）下测量各样品的吸光值。

2.1.6 数据统计与分析

室内生测和田间抗性调查结果及 Cry1Ab 蛋白含量等试验数据用 DPS 系统软件 version 13.5 进行方差分析（one-way ANOVA，LSD），Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟

万方数据

存活幼虫体重比较利用 student-*t* 测验，各处理的死亡率先进行反正弦平方根转换后再做方差分析分析，利用 Topsis 方法对 7 个 NJB 系列转基因玉米事件的亚洲玉米螟抗虫性进行排序比较。

2.2 结果与分析

2.2.1 室内生测结果

2.2.1.1 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟敏感种群的抗虫性评估

亚洲玉米螟取食转基因玉米各株系心叶 48 h 后的死亡率差异较大(表 2.1)，其中取食 N30 心叶的幼虫死亡率最高，为 96.40%，N50、N60、N70 的死亡率在 70.00%以上，N10、N20 的死亡率在 65.00%以上，N40 的死亡率最低，只有 60.00%。取食 96 h 后各株系幼虫死亡率都高于 99.00%，只有 N10 为 93.20%，而取食对照心叶的幼虫在 48 h 和 96 h 的死亡率分别为 2.80%和 6.40%。亚洲玉米螟幼虫取食各株系雄穗 48 h 后，死亡率为 90.48-98.81%，96 h 后达到 100.00%。取食 N40 和 N60 苞叶 48 h 后，幼虫死亡率达到 100.00%，其他株系死亡率为 97.33-99.33%，96 h 后达到 100.00%。取食 N10 花丝 48 h 后，幼虫死亡率为 85.83%，取食其他株系花丝的幼虫死亡率都在 95.00%以上，96 h 后所有株系幼虫的死亡率都达到 100.00%。幼虫取食 N70 雌穗 48 h 后死亡率为 67.50%，其他株系的死亡率为 86.67-98.33%，取食花丝 96 h 后，转基因玉米各株系幼虫全部死亡。

万方数据

表 2.1 亚洲玉米螟取食 Bt 玉米与非转基因对照玉米不同组织的死亡率

Table 2.1 The mortality of Cry1Ab-susceptible Asian corn borer neonate larvae infected different tissues of maize lines and their non-Bt control

组织 Tissues	品系 Genotypes	n	死亡率 Mortality (%)	
			48 h	96 h
心叶	N10	10	65.20± 5.99cd	93.20± 3.58b
Whorl leaf	N20	10	66.80± 5.47cd	99.60± 0.40a
	N30	10	96.40± 1.39a	100.00± 0.00a
	N40	10	60.00± 3.68d	99.20± 0.53a
	N50	10	76.80± 5.19bc	100.00± 0.00a
	N60	10	71.60± 5.04cd	99.60± 0.40a
	N70	10	74.80± 3.27c	100.00± 0.00a
	V3	10	86.40± 2.81b	100.00± 0.00a
	J223	10	69.20± 3.27cd	100.00± 0.00a
	Control	10	2.80± 1.04e	6.40± 0.88c
雄穗	N10	7	90.48± 3.37bc	97.62± 2.38a
Tassel	N20	7	97.02± 1.75abc	100.00± 0.00a
	N30	7	91.07± 3.07c	100.00± 0.00a
	N40	7	94.64± 2.36abc	100.00± 0.00a
	N50	7	98.81± 0.77a	100.00± 0.00a
	N60	7	97.62± 2.38ab	100.00± 0.00a
	N70	7	97.02± 1.97abc	100.00± 0.00a
	V3	7	95.83± 2.23abc	100.00± 0.00a
	J223	7	92.26± 3.21abc	100.00± 0.00a
	Control	7	4.17± 1.57d	6.55± 1.54b
苞叶	N10	5	98.67± 1.33ab	100.00± 0.00a
Husk	N20	5	97.33± 1.23b	100.00± 0.00a
	N30	5	99.33± 0.67ab	100.00± 0.00a
	N40	5	100.00± 0.00a	100.00± 0.00a
	N50	5	98.67± 1.33ab	100.00± 0.00a
	N60	5	100.00± 0.00a	100.00± 0.00a
	N70	5	98.67± 0.82ab	100.00± 0.00a
	V3	5	98.67± 1.33ab	100.00± 0.00a
	J223	5	99.33± 0.67ab	100.00± 0.00a
	Control	5	2.00± 1.33c	8.67± 2.49b
花丝	N10	12	85.83± 6.96c	93.89± 3.25b
Silk	N20	12	99.17± 0.56a	100.00± 0.00a
	N30	12	96.67± 1.28abc	100.00± 0.00a
	N40	12	98.75± 0.89a	100.00± 0.00a
	N50	12	99.58± 0.42a	100.00± 0.00a
	N60	12	97.92± 0.97ab	100.00± 0.00a
	N70	12	98.33± 0.71ab	100.00± 0.00a
	V3	12	93.33± 2.25bc	100.00± 0.00a

万方数据

	J223	12	97.92± 1.14ab	100.00± 0.00a
	Control	12	2.50± 1.15d	3.75± 1.52c
雌穗	N10	5	86.67± 4.25b	100.00± 0.00a
Kernel	N20	5	90.00± 3.86b	100.00± 0.00a
	N30	5	88.33± 3.33b	100.00± 0.00a
	N40	5	90.00± 3.86b	100.00± 0.00a
	N50	5	98.33± 1.02a	100.00± 0.00a
	N60	5	93.33± 3.39ab	100.00± 0.00a
	N70	5	67.50± 2.76c	100.00± 0.00a
	V3	5	88.33± 1.56b	100.00± 0.00a
	J223	5	88.33± 4.45b	100.00± 0.00a
	Control	5	2.50± 1.67d	3.33± 1.56a

Note: Mean ± SE, the different letters in the same column indicate significant difference according to One-way ANOVA test (LSD, $P< 0.05$).

接虫 48 h 后亚洲玉米螟对转基因玉米各株系的累计取食叶面积为 1.3-13.1 mm^2/25 头，显著低于对照 119.5 mm^2/25 头（$F = 36.921$，df = 7，79，$P< 0.001$）（图 2.1），96 h 后各转基因玉米的取食叶面积为 1.3-26.8 mm^2/25 头，仍显著低于对照 263.0 mm^2/25 头（$F = 38.299$，df = 7，79，$P< 0.001$），但各处理间没有显著差异。

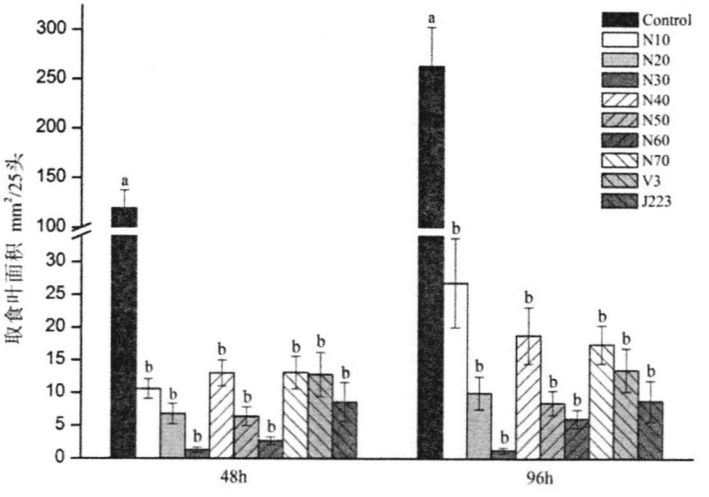


图 2.1 Cry1Ab-敏感亚洲玉米螟在 48h 和 96h 后取食叶面积（mean ± SE，n=10）

Fig. 2.1 The cumulative leaf feeding area (mean ± SE, n = 10) of Cry1Ab-susceptible neonates of the Asian corn borer, Ostrinia furnacalis at 48h and 96h after infestation.

Note: The different letters at the top of the bars in the same feeding time indicate significant difference according to one-way ANOVA (LSD, P < 0.05).

万方数据

2.2.1.2 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性种群的抗虫性评估

Cry1Ab 抗性玉米螟取食 N30、V3 和 J223 花丝和雌穗的死亡率差异较大（表 2.2）。幼虫取食 N30 和 V3 花丝 48 h 后，死亡率分别为 65.83%和 77.50%，96 h 后达到 95.00%，168 h 后全部死亡，而取食 J223 花丝的幼虫死亡率只有 9.17%、11.67%和 12.50%，与对照没有显著性差异（$F_{48h}=46.463$，df = 3，23，$P<0.001$；$F_{96h}=91.702$，df = 3，23，$P<0.001$；$F_{168h}=205.786$，df = 3，23，$P<0.001$）。取食 N30 和 V3 雌穗 48 h、96 h 和 168 h 幼虫的死亡率亦显著高于 J223 和非转基因对照，但 J223 和对照之间没有显著性差异（$F_{48h}=60.458$，df = 3，19，$P<0.001$；$F_{96h}=169.975$，df = 3，19，$P<0.001$；$F_{168h}=339.606$，df = 3，19，$P<0.001$）。7 d 后大部分 J223 存活幼虫与对照一样，均已达到 3 龄末 4 龄初，体重也没有显著性差异（花丝：$t=1.6510$，df = 58，$P=0.1041$；雌穗：$t=0.4378$，df = 48，$P=0.6635$）（图 2.2）

表 2.2 转 Bt 基因玉米花丝和雌穗对 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟的抗虫性结果

Table 2. The mortality of Cry1Ab-resistant neonate larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*feeding on silk and kernel of fused Bt maize N30, V3, J223 and their non-Bt control

Tissues	Lines	Mortality (%)		
		48 h	96 h	168 h
Silk	J223	9.17 ± 3.96b	11.67 ± 4.01b	12.50 ± 3.82b
	N30	65.83 ± 5.07a	95.00 ± 1.83a	100 ± 0a
	V3	77.50 ± 3.81a	95.00 ± 1.83a	100 ± 0a
	Control	5.83 ± 2.71b	9.17 ± 2.71b	10.00 ± 2.89b
Kernel	J223	10.00 ± 3.63b	18.34 ± 4.86b	20.83 ± 4.75b
	N30	67.50 ± 3.33a	99.17 ± 0.83a	100 ± 0a
	V3	62.50 ± 5.43a	99.17 ± 0.83a	100 ± 0a
	Control	3.33 ± 1.56b	10.84 ± 2.83b	11.67 ± 2.43c

Note: mean ± SE, for the same tissue, mean values in the same column followed by different letters mean significant difference according to one-way ANOVA (LSD, $P<0.05$).

万方数据

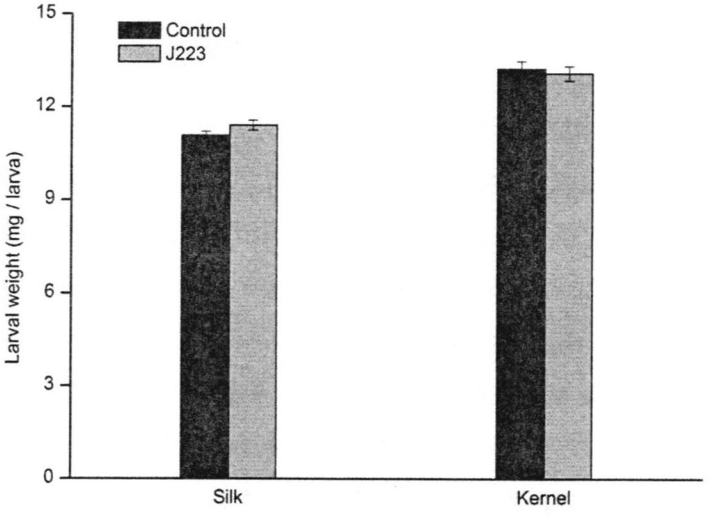


图 2.2 取食 J223 花丝和雌穗 7 d 后的 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟的体重（mean ± SE, n = 25）

Fig. 2.2 The survived larval weight (mean ± SE, n = 25) of Cry1Ab-resistant neonate larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* at 7 days after infestation.

2.2.1.3 转 Bt 基因玉米对棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的抗虫性评估

棉铃虫初孵幼虫取食转基因玉米 N10、N30、N40、V3 和 J223 叶片 48 h 和 96 h 后死亡率分别为 40.00-53.33%和 82.50-90.00%（表 2.3），各品系间没有显著性差异，但均显著高于非转基因对照（F_{48h} = 29.700，df =5，23，P < 0.001；F_{96h} = 97.299，df = 5，23，P < 0.001），取食转基因玉米叶片的幼虫 168 h 后全部死亡。取食转基因玉米花丝的棉铃虫幼虫死亡率高于叶片死亡率，48 h 已达到 75.56-91.11%，N10 死亡率显著低于其他品系，但高于对照（F_{48h} = 108.003，df = 5，35，P < 0.001）。96 h 后取食转基因花丝 97.00%以上的测试幼虫死亡，但 N10 死亡率为 91.11%，低于其他品系但与 J223 差异不显著（F_{96h} = 102.482，df = 5，35，P < 0.001）。取食转基因玉米雌穗的棉铃虫的死亡率最高，48 h 就达到 90.00%以上，而对照死亡率只有 2.09%，转基因玉米各品系间死亡率差异不显著（F_{48h} = 33.699，df = 5，23，P < 0.001）。

万方数据

转基因玉米对甜菜夜蛾的杀虫效果不如玉米螟和棉铃虫，但能显著抑制其体重增长（表 2.4，图 2.3）。取食转基因玉米叶片 48 h 和 96 h 后甜菜夜蛾幼虫死亡率分别在 5.00%和 10.00%左右，与对照没有显著差异（F_{48h} = 0.830，df =5，23，P = 0.5447；F_{96h} = 0.886，df = 5，23，P = 0.5105）。168 h 后死亡率达到 26.67-40.83%，其中 N10 死亡率最低，与 N30 差异不显著，低于其他品系，但显著高于对照（F_{168h} = 16.161，df = 5，23，P < 0.001）。取食转基因玉米花丝 48 h 和 96 h 后幼虫死亡率分别为 0.83-7.50%和 2.50-9.17%，与对照没有显著差异（F_{48h} = 0.807，df = 5，35，P = 0.5594；F_{96h} = 0.743，df = 5，35，P = 0.6012）。168 h 后死亡率为 44.17-68.34%，显著高于对照，其中 N30 死亡率显著高于除 J223 外的其他品系，N10 死亡率最低，但与其他品系无显著性差异（F_{168h} = 7.683，df = 5，23，P < 0.001）。取食转基因玉米雌穗的甜菜夜蛾在 48 h 和 96 h 的死亡率仍不高，与对照没有显著性差异（F_{48h} = 0.588，df = 5，23，P = 0.7090；F_{96h} = 0.989，df =5，23，P = 0.4516），168 h 后 N30 和 N40 的死亡率分别达到 57.50%和 59.17%，显著高于其他品系，V3 死亡率最低，但仍显著高于对照（F_{168h} = 25.625，df = 5，23，P < 0.001）。

万方数据

万方数据

表 2.3 转 Bt 基因玉米对棉铃虫的抗虫性评价结果

Table 2.3 Resistance evaluation of transgenic maize leaves, silks and young kernels to *Helicoverpa armigera*neonate larvae

品系 Genotypes	死亡率 Mortality %							
	叶片 Leaves			花丝 Silks			雌穗 Kernels	
	48h	96h	168h	48h	96h	168h	48h	96h
N10	43.33 ± 3.60a	90.00 ± 1.36a	100 ± 0	75.56± 2.53b	91.11± 2.94	98.89± 1.11	91.67 ± 5.10a	100 ± 0
N30	51.67 ± 1.67a	88.33 ± 2.89a	100 ± 0	90.56± 1.81a	98.33± 1.14	100 ± 0	92.71 ± 4.62a	100 ± 0
N40	53.33 ± 2.36a	89.17 ± 1.59a	100 ± 0	91.11± 2.38a	98.33± 0.74	100 ± 0	96.88 ± 1.99a	100 ± 0
V3	47.50 ± 6.72a	87.50 ± 2.84a	100 ± 0	87.78± 1.86a	99.44± 0.56	100 ± 0	93.75 ± 3.99a	100 ± 0
J223	40.00 ± 3.04a	82.50 ± 3.70a	100 ± 0	90.00± 2.86a	97.22± 1.02	99.44± 0.56	90.63 ± 3.12a	100 ± 0
Control	3.33 ± 2.36b	8.33 ± 2.15b	15.00 ± 2.15	3.33± 1.22c	6.11± 2.00	12.78± 2.34	2.08 ± 1.20b	14.58± 5.51

Note: Mean ± SE, The different letters in the same column indicate significant difference according to One-way ANOVA test (LSD, $P< 0.05$).

万方数据

表 2.4 不同转 Bt 基因玉米品系对甜菜夜蛾初孵幼虫的抗虫性结果

Table 2.4 Resistance evaluation of transgenic maize leaves, silks and young cobs to *Spodoptera exigua*neonate larvae

品系 Genotype	死亡率 Mortality %								
	叶片 Leaves			花丝 Silks			雌穗 Kernels		
	48h	96h	168h	48h	96h	168h	48h	96h	168h
N10	3.33± 2.36a	11.67± 2.89a	26.67± 3.04b	4.17± 2.50a	7.50± 2.85a	44.17± 4.38b	0.83± 0.83a	6.67± 2.36a	34.17± 4.17b
N30	7.50± 2.10a	10.83± 1.59a	31.67± 2.15ab	7.50± 3.70a	9.17± 4.38a	68.33± 4.41a	1.67± 1.67a	11.67± 3.47a	57.50± 3.69a
N40	5.00± 2.15a	7.50 ± 2.85a	40.83± 3.70a	0.83± 0.83a	2.50± 1.60a	45.00± 6.45b	0.83± 0.83a	5.00± 2.15a	59.17± 2.85a
V3	5.83± 3.44a	6.67± 3.04a	40.00± 3.60a	5.83± 2.85a	5.83± 2.85a	44.17± 4.38b	3.33± 1.97a	9.17± 3.70a	22.50± 3.70c
J223	5.83± 3.44a	9.17± 2.85a	38.33± 2.89a	2.50± 1.60a	3.33± 1.36a	57.50± 7.12ab	1.67± 1.67a	9.17± 2.85a	25.00± 3.47bc
Control	10.00± 2.36a	11.67± 2.15a	11.67± 2.15c	5.83± 3.70a	8.33± 2.89a	26.67± 3.04c	0.00 ± 0.00a	5.00± 2.15a	13.33± 3.04d

Note: Mean ± SE, the different letters in the LW column indicate significant difference according to One-way ANOVA test (LSD, $P< 0.05$).
LW=larvae weight (mg/5 larvae)

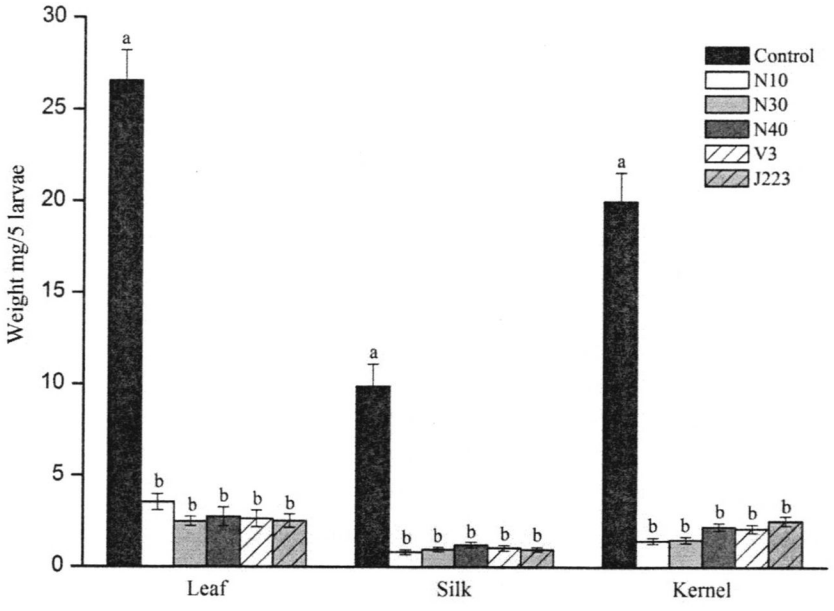


图 2.3 甜菜夜蛾取食转 Bt 基因玉米 7 d 后的体重

Fig. 2.3 The survived larval weight (mean ± SE, n = 25) of Cry1Ab-resistant neonate larvae of the *Spodoptera exigua*at 7 days after infestation.

取食转基因玉米叶片、花丝和雌穗的甜菜夜蛾 7 d 后体重显著低于对照（表 2.5），体重范围分别 2.50-3.55 mg/5 头、0.83-1.23 mg/5 头和 1.45-2.55 mg/5 头，而对照分别为 26.58 mg/5 头、9.90 mg/5 头和 20.03 mg/5 头，转基因玉米对甜菜夜蛾的体重抑制率均在 85.00-95.00%之间。7 d 后取食转基因玉米幼虫生长至 1 龄末 2 龄，而对照大部分幼虫已达到 3 龄末。

万方数据

表 2.5 甜菜夜蛾取食转 Bt 基因玉米 7 d 后的体重及体重抑制率

Table 2.5 The survived larval weight of Cry1Ab-resistant neonate larvae of the *Spodoptera exigua*at 7 days after infestation.

品系 Genotype	幼虫体重 Larvae weight （mg/5 头）					
	叶片 Leaves	抑制率% Weight inhibit	花丝 Silks	抑制率% Weight inhibit	雌穗 Kernels	抑制率% Weight inhibit
N10	3.55± 0.44b	86.64	0.83 ± 0.13b	91.67	1.45 ± 0.17b	92.76
N30	2.50± 0.26b	90.59	0.98 ± 0.12b	90.15	1.50 ± 0.18b	92.51
N40	2.75± 0.52b	89.65	1.23 ± 0.15b	87.63	2.23 ± 0.21b	88.89
V3	2.65± 0.46b	90.03	1.05 ± 0.16b	89.39	2.13 ± 0.23b	89.39
J223	2.53± 0.37b	90.50	0.98 ± 0.13b	90.15	2.55 ± 0.25b	87.27
Control	26.58± 1.64a		9.90± 0.19a		20.03± 1.59a	

Note: Mean ± SE, n = 25, the different letters in the same column indicate significant difference according to One-way ANOVA test (LSD, P< 0.05).

转基因玉米叶片、花丝和雌穗对斜纹夜蛾的杀虫效果不一致（表 2.6）。斜纹夜蛾幼虫取食转基因玉米叶片和雌穗 48 h 后，死亡率分别为 3.33-8.33%和 4.17-10.42%，与对照没有显著性差异（叶片：F_{48h} = 0.534，df = 5，23，P = 0.7475；雌穗：F_{48h} = 1.471，df = 5，23，P = 0.2478）。96 h 后，取食转基因玉米叶片的幼虫死亡率均在 35.00%以上，J223 最高，为 51.67%，与 N40 差异不显著，与其他品系差异显著（F_{96h} = 12.069，df = 5，23，P < 0.001）。取食转基因玉米雌穗的幼虫死亡率为 23.96-53.13%，各品系间差异不显著，均显著高于对照（F_{96h} = 26.133，df =5，23，P < 0.001）。168 h 后，90.00%以上取食转基因玉米叶片和雌穗的幼虫死亡，其中取食 N40 叶片的幼虫死亡率显著高于 J223（F_{168h} = 48.357，df = 5，23，P < 0.001），取食 N40 雌穗的幼虫死亡率显著高于 N30 和 V3（F_{168h} = 83.374，df = 5，23，P < 0.001）。取食转基因玉米各品系花丝的幼虫 48 h 后的死亡率为 45.00-57.78%，N40 最低，但与 N10 和 N30 差异不显著（F_{48h} = 38.737，df = 5，35，P < 0.001），96 h 和 168 h 后幼虫死亡率达到 76.00%和 90.00%以上，显著高于对照（F_{96h} = 65.548，df = 5，35，P < 0.001；F_{168h} = 56.386，df = 5，35，P < 0.001）

万方数据

万方数据

表 2.6 转 Bt 基因玉米对斜纹夜蛾室内生测评价结果

Table 2.6 Resistance evaluation of transgenic maize leaves, silks and young cobs to *Prodenia litura* neonate larvae

品系 Genotype	死亡率 Mortality %								
	叶片 Leaves			花丝 Silks			雌穗 Kernels		
	48h	96h	168h	48h	96h	168h	48h	96h	168h
N10	3.33 ± 1.36a	35.83 ± 2.85b	95.84 ±3.15ab	51.11 ±3.06ab	76.67 ± 1.22c	96.11 ± 1.59a	10.42±2.69a	53.13± 2.62a	97.92 ± 2.08ab
N30	6.67 ± 2.36a	35.00 ± 2.15b	94.17 ±1.60ab	54.44 ±2.94ab	78.89 ±1.65bc	93.33 ± 2.85a	5.21 ± 1.99a	45.83±4.50a	95.83 ± 1.70bc
N40	8.33 ± 3.19a	43.34 ±5.27ab	97.50 ± 1.60a	45.00 ± 2.82b	76.67 ± 3.75c	93.33 ± 2.44a	9.38 ± 2.62a	45.83 ± 1.70a	100.00 ± 0.00a
V3	5.00 ± 2.15a	35.00 ± 3.47b	95.00 ±2.15ab	57.78 ± 2.81a	88.34 ± 3.52a	96.67 ± 1.72a	5.21 ± 1.99a	47.92 ± 5.51a	91.67 ± 1.70c
J223	4.17 ± 3.15a	51.67 ± 5.69a	90.83 ± 1.59b	57.22 ± 3.15a	85.56 ±2.81ab	97.23 ± 0.56a	4.17 ± 2.95a	23.96 ± 3.13a	96.88 ± 1.99ab
Control	8.33 ± 3.19a	11.67 ± 3.47c	16.67 ± 1.36c	7.78 ± 2.94c	14.45 ±2.22d	17.78 ± 1.11b	3.13 ± 1.99a	5.21 ± 2.62b	7.29 ± 1.99d

Note: Mean ± SE, the different letters in the same column indicate significant difference according to One-way ANOVA test (LSD, $P< 0.05$).

2.2.2 田间抗虫性鉴定结果

春玉米田间调查结果显示（表 2.7），N10 个别植株叶片上有针孔状虫孔，食叶级别为 1.20，其他株系无叶片被害，食叶级别均为 1.00，而对照植株部分叶片有绿豆大小虫孔，平均食叶级别为 3.90，差异显著（$F = 87.716$，df = 7，79，$P < 0.001$）。转基因玉米各株系雌穗没有被害，即被害级别为 0，对照雌穗籽粒被害严重，被害级别达 5.30。此外剖杆调查发现各转基因株系植株上没有虫孔或存活的幼虫和蛹，而对照玉米平均每株有 2.90 头幼虫或蛹，2.80 个孔洞，隧道长度为 7.50 cm。

夏玉米田间调查结果与春玉米基本一致（表 2.7），N10、N40、N50 和 N60 叶片有针孔状虫孔，其他转基因玉米株系无叶片被害，而对照植株大部分叶片被害，呈现绿豆大小虫孔，食叶级别为 5.00，差异达显著水平（$F = 51.565$，df = 7，79，$P < 0.001$）。剖杆结果显示，转基因玉米各株系没有存活幼虫、蛹和蛀孔，对照玉米平均每株发现 5.10 头幼虫或蛹，2.30 个蛀孔，平均隧道长度为 14.15 cm。这些数据显示在田间环境下，转基因玉米各株系在整个生育期内对亚洲玉米螟有很好的控制效果。

万方数据

表 2.7 转 Bt 基因玉米田间抗虫性鉴定

Table 2.7 Resistance evaluation of transgenic Bt maize lines under field conditions

玉米 Generation	品系 Genotypes	食叶级别[a] Foliar damage rating	雌穗被害级别[b] Ear damage rating	存活幼虫/蛹数（头/株） Larvae/pupae surviving/plant	蛀孔数（个/株） Tunnels/stalk	隧道长度(cm) Tunnell ength
春玉米 Spring maize	N10	1.20 ± 0.13b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N20	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N30	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N40	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N50	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N60	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N70	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	V3	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	J223	1.00 ± 0.00b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Control	3.90 ± 0.28a	5.30 ± 0.60	2.90 ± 0.43	2.80 ± 0.55	7.50 ± 1.63
夏玉米 Summer maize	N10	1.30 ± 0.21bc	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N20	1.00 ± 0.00c	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N30	1.00 ± 0.00c	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N40	1.10 ± 0.10bc	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N50	1.10 ± 0.10bc	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N60	1.50 ± 0.22b	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N70	1.00 ± 0.00c	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	V3	1.00 ± 0.00c	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	J223	1.00 ± 0.00c	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Control	5.00 ± 0.42a	5.10 ± 0.41	2.30 ± 0.37	3.40 ± 0.37	14.15 ± 2.31

Note: The data is expressed as mean ± SE (n = 10). [a] Foliar damage rating ranges from 1-9 where 1 is no damage and 9 is most leaves with long lesions and several leaves with broken mid ribs according to Koziel et al. (1993) and He et al. (2000). [b] Ear damage rating starts from 0 where no ear damage according to Widstrom (1967).

2.2.3 Cry1Ab 蛋白表达含量测定

转基因玉米各组织中融合蛋白 Cry1Ab/Cry2Aj 的表达量通过测定 Cry1Ab 的含量来确定（图 2）。转基因玉米各株系心叶中 Cry1Ab 的表达范围为 14.31- 38.47 ng/mg（DW），其中 N30 表达量最高 38.47 ng/mg，显著高于其他株系，N60 和 N70 最低，分别为 14.31 ng/mg 和 14.69 ng/mg（F=26.513，df = 7，79，P< 0.001）。雄穗中 N30 的 Cry1Ab 含量亦显著高于其他株系（F = 11.424，df = 7，63，P <

万方数据

0.001）。苞叶中 N30 的 Cry1Ab 表达量最高，但与 N10、N40、N60 没有显著性差异（$F=2.804$，df＝7，41，$P=0.0247$）。花丝中各株系的 Cry1Ab 含量差异较大，N70 的表达量显著高于其他株系，但与 N60 差异不显著，N40 表达量最低，但与 N30 差异不显著（$F=5.537$，df＝7，79，$P<0.001$）。雌穗中 Cry1Ab 表达量变化范围为 75.00-41.84 ng/mg，N60 最高，N70 最低（$F=2.867$，df＝7，47，$P=0.0223$）。

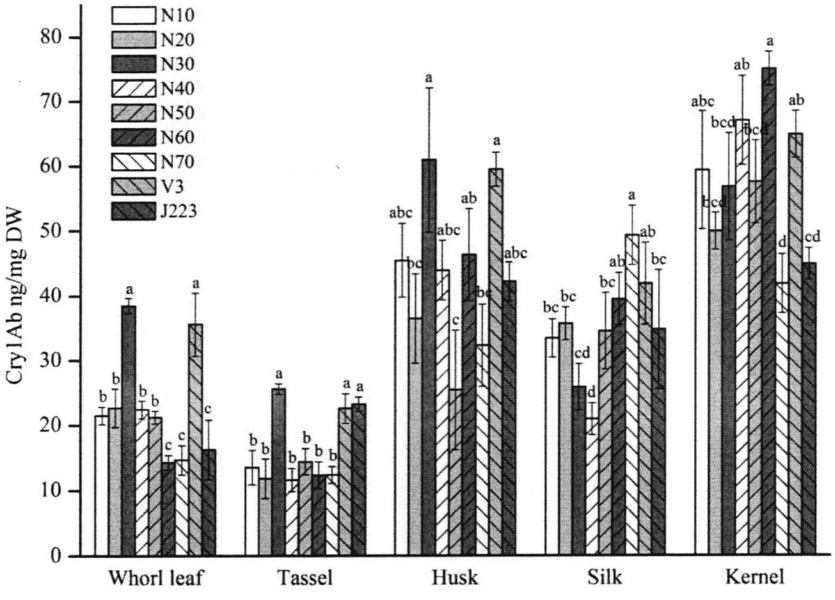


图 2.4 转 Bt 基因玉米不同组织中 Cry1Ab 蛋白含量

Fig. 2.4 Concentrations of Cry1Ab in different tissues of Bt maize lines at different growing stages.

Note: The data in all samples are expressed as mean ± SE (n = 10 for whorl leaf, 8 for tassel, 6 for husk, 10 for silk, 6 for kernel). For the same tissues, the different letters represent significant difference (P< 0.05) according to one-way ANOVA. (DW = dry weight).

2.2.4 Topsis 分析

根据 NJB 系列转基因玉米对亚洲玉米螟室内和田间的抗虫性结果，利用 Topsis 法对 7 个转化事件的抗虫性排序（表 2.8），其结果为：N30＞N50＞N20＞

万方数据

N70 > N60 > N40 > N10。

表 2.8 转 *cry1Ab/cry2Aj* 基因玉米对亚洲玉米螟的抗虫性排序

Table 2.8 Resistance ranks of seven transgenic *cry1Ab/cry2Aj* gene maize lines against Asian corn borer

转化事件 Event	D_i^+	D_i^-	C_i	Rank
N10	0.2130	0.8350	0.7968	9
N20	0.1560	0.9231	0.8554	5
N30	0.0540	0.9749	0.9475	1
N40	0.1941	0.8978	0.8223	8
N50	0.1073	0.9500	0.8985	3
N60	0.1897	0.9009	0.8260	7
N70	0.1725	0.9049	0.8399	6

Note: D_i^+: distance of design from the ideal solution for the *i*th candidate line; D_i^-: distance of design from the negtive solution for the *i*th candidate line; C_i: the relative closeness of the *i*th candidate line to the ideal solutions.

注：D_i^+：第 *i* 个评价对象与最优方案的距离；D_i^-：第 *i* 个评价对象与最劣方案的距离；C_i：第 *i* 个评价对象与最优方案的接近程度。

2.3 讨论

亚洲玉米螟一般分为心叶期和穗期两个世代危害玉米，心叶期初孵幼虫先在未展开的心叶内取食，而后为害雄穗；穗期玉米螟主要为害花丝和雌穗(何康来等. 2000)。本研究测试了转基因玉米心叶、雄穗、花丝、苞叶、雌穗等玉米螟主要为害部位的抗虫性，其结果显示大部分幼虫在取食这些组织 96 h 后死亡，其造成的叶面积损失亦远远低于非转基因对照。田间抗虫性鉴定结果显示转基因玉米叶片和雌穗基本没有被亚洲玉米螟为害，茎秆中没有发现蛀孔和存活的幼虫，其抗虫效果与 MON810 和 Bt11 一致，说明转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米能够有效控制心叶期和穗期亚洲玉米螟为害(He et al. 2003b, 何康来等. 2005)。

转基因抗虫作物中杀虫蛋白稳定高量表达对抗虫效果至关重要，其表达量一般是营养生长期较高，生殖生长期略低，即生殖期抗虫性有所下降，如 Bt 176 不能很好的防治第二代欧洲玉米螟 (Archer et al. 2001, 张永军等. 2001, 王冬妍等.

万方数据

2004)。根据 ELISA 结果，本试验三种 Bt 玉米 9 个转化事件中 Cry1Ab 蛋白在心叶、雄穗、花丝、苞叶和雌穗中稳定表达， N60 和 N70 叶片中 Cry1Ab 蛋白含量最低，为 14.31 ng/mg（DW）和 14.69 ng/mg（DW），N40 花丝的表达量最低，为 20.93 ng/mg（DW），9 个转化事件雌穗中的表达量为 41.83-75.00 ng/mg(DW)，中国不同地理种群亚洲玉米螟对 Cry1Ab 蛋白的敏感基线为 0.10-0.81 ng/mg(Diet)(He et al. 2005)，Bt 玉米中 CryAb 的含量是其 10 倍以上，足以杀死敏感的玉米螟。

转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米对棉铃虫也有很好的防治效果。棉铃虫在取食 Bt 玉米 96 h 后的死亡率在 90%左右，168 h 后全部死亡。这与其他研究结果相似，棉铃虫对 Cry1Ac 和 Cry1Ab 蛋白都非常敏感。常雪艳等（2006）报道 MON810（Cry1Ab）的花丝、苞叶和幼嫩雌穗对棉铃虫具有较高的杀虫活性，取食 MON810 花丝和幼嫩雌穗的棉铃虫初孵幼虫 5 天后全部死亡(常雪艳等. 2006)。

本试验中三种转 Bt 融合基因玉米对甜菜夜蛾初孵幼虫有致死作用，但死亡率较低，取食 168 h 后的死亡率为 22.5%-60.0%，但甜菜夜蛾的生长发育受到抑制，体重抑制率为 86.6%-92.7%。由于可用于实验的 Bt 玉米数量的限制，没有进一步开展甜菜夜蛾是否能完成世代发育的实验。其他研究结果表明，表达 Cry1Ab 蛋白的 MON810 和 Bt11 的不同组织对对甜菜夜蛾初孵幼虫具有杀虫活性，取食心叶、苞叶、籽粒的甜菜夜蛾在幼虫期死亡，取食花丝的幼虫化蛹率为 1.0%和 2.1%，但不能羽化(王振营等. 2005)。薛明等（2002）报道取食 Bt 棉与取食普通棉相比，甜菜夜蛾幼虫发育历期延长平均延长 9.7 d，有 5 龄增加到 7 龄，雌蛾生殖力降低，幼虫的存活率和化蛹率下降(薛明等. 2002)。结合以上研究结果，本试验所用的 Bt 玉米可以在一定程度上控制甜菜夜蛾为害。

据报道，斜纹夜蛾对 Cry1Ab 蛋白不是非常敏感，单价棉 GK12、科棉 1 号及双价棉中棉所 45、中棉所 41 的抗虫性并不明显，甚至 Bt 棉上的百株虫量高于非 Bt 对照 (邓曙东等. 2003, 余月书等. 2004, 黄东林等. 2006)。在本试验中，斜纹夜蛾取食三种转 Bt 基因玉米 168 h 后的死亡率均在 90.0%以上，抗虫效果显著。不同的是，叶片和雌穗 48 h 后的死亡率只有 10.0%左右，168 h 后才到达 90.0%以上，取食花丝的幼虫在 48 h 就达到 50.0%左右，可能是由于 Bt 作物不同部位

万方数据

对斜纹夜蛾的杀虫作用不同，如 Bt 棉叶片对斜纹夜蛾初孵幼虫的杀虫活性高于蕾(郭建英等. 2003)。

取食 N30 和 V3 花丝和雌穗的 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟有很高的死亡率，而 J223 则对其无效。N30 花丝中 Cry1Ab 的表达量为 25.82 ng/mg（DW），3.87 ng/mg（fresh weight，FW），低于 CryAb 抗性玉米螟的 LC_{50} 5.97 ng/mg（FW），据报道 Cry2A 对欧洲玉米螟有很好的杀虫效果，由于亚洲玉米螟和欧洲玉米螟对 Bt 蛋白的敏感度和抗性机理相似，所以推测 N30 中融合的 Cry2Aj 在抗 Cry1Ab 抗性玉米螟中起到关键作用(Huang and McGaughey 1999, He et al. 2007, Tan et al. 2011, Storer et al. 2012)。Vip3 对欧洲玉米螟的杀虫效果存在两种截然相反的研究结果，Estruch 等（1996）报道 Vip3A 对欧洲玉米螟没有杀虫作用，Palma 等（2012）报道 Vip3C 对欧洲玉米螟低毒，但 Fang 等（2007）报道 N 端来自 Vip3Ac1，C 端来自 Vip3Aa1 的嵌合蛋白（chimeric protein）Vip3AcAa，对欧洲玉米螟有杀虫活性(Fang et al. 2007)。同时表达 Vip3A 和 Cry1Ab 的转基因玉米比只表达其中一种杀虫蛋白的玉米能更好的防治多种鳞翅目害虫，其中包括欧洲玉米螟和西南玉米螟 *Diatraea grandiosella*（Dyar）(Dively 2005)。本试验没有对 Vip3DA 蛋白对亚洲玉米螟的杀虫活性进行单独测定，由于实验技术限制，亦无法获得其在玉米植株中确切的表达含量。虽然本试验未能证实是 Cry1Ab，还是 Vip3DA，又或者两者同时对抗性玉米螟起杀虫作用，但生测结果表明 V3 穗期对抗性玉米螟的防治效果优于 MON810，取食 MON810 花丝的 Cry1Ab 抗性玉米螟可以存活至化蛹，而取食 V3 花丝和雌穗的抗性玉米螟第 7 天全部死亡(Xu et al. 2010)。CryI 对亚洲玉米螟有杀虫活性，但玉米螟对其的敏感性要远低于 Cry1Ab 和 Cry1Ac，其 LC_{50} 比 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的 LC_{50} 高 10 倍(韩海亮等. 2009)。因此，推测玉米螟在一定程度上的耐受 Cry1I 使 J223 没有杀虫效果的原因，但是其具体原因还需进一步验证。

应用多基因策略时，要确保靶标害虫对同一植株表达的不同 Bt 蛋白间无交互抗性。据报道，多种鳞翅目害虫可在不同 Bt 蛋白间产生交互抗性，如亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性种群对 Cry1Ah 有 131 倍的交互抗性，对 Cry1Ac 有 36 倍的抗性(Xu et al. 2010)。抗 Cry1Ab 的欧洲玉米螟和小蔗螟对 Cry1Ac 和 Cry1Aa 亦有很高的抗性(Siqueira et al. 2004, Wu et al. 2009, Crespo et al. 2011)。Cry2A 是以鳞

万方数据

翅目害虫为靶标的杀虫蛋白，杀虫效果显著，如表达 Cry2A 的转基因水稻、表达 Cry2Ab 和 Cry1Ac 的转基因二价棉和表达 Cry1A.105 和 Cry2Ab2 的转聚合基因玉米都有很好的杀虫和害虫抗性治理效果(Jackson et al. 2004, Chen et al. 2005, Ghimire et al. 2011)。虽然 Cry2A 与 Cry1A 都是针对鳞翅目的杀虫蛋白，但它们在昆虫中肠 BBMVs（Brush Border Membrane Vesicles）上的结合位点不同，异源竞争结合试验表明两种蛋白间不存在交互抗性，但也有报道称对 Cry2Ab 有 240 倍抗性的棉红铃虫对 Cry1Ac 产生 420 倍的交互抗性(Hernández-Rodríguez et al. 2008, Tabashnik et al. 2009, Gouffon et al. 2011)。

许多实验结果都表明昆虫不会对 Vip3A 与 Cry 蛋白产生交互抗性，因为 Vip3A 蛋白序列高度保守，与 Cry 类蛋白没有同源性，蛋白结构也不相同(Estruch et al. 1996)。Vip3A 杀虫机理主要体现在其对昆虫中肠细胞的破坏，症状与 Cry 蛋白相似，但比 Cry 蛋白需要更长的时间。进一步的研究表明，Vip3A 和 Cry 蛋白在昆虫中肠 BBMV 上结合的受体蛋白位点和受体蛋白大小都不同，Vip3A 能结合烟草天蛾 *Manduca sexta*（L.）BBMV 上分子量分别为 80 kDa 和 100 kDa 的靶蛋白，不能结合 Cry1Ab 的受体蛋白（120 kDa 的氨肽酶 N 和 250 kDa 的类钙粘蛋白）(Lee et al. 2003)。体外竞争结合试验表明，Vip3Aa 与 Vip3Af 竞争相同的结合位点，但不与 Cry1F 和 Cry1A 竞争同一个结合位点(Sena et al. 2009)。

综上所述，转 Bt 融合基因玉米 N30 和 V3 能够有效控制玉米主要害虫亚洲玉米螟和次要害虫棉铃虫、斜纹夜蛾和甜菜夜蛾为害，并对亚洲玉米螟的抗性治理有很大的应用潜力，可以作为抗虫转基因玉米育种的备选材料。

万方数据

第三章 三种转 Bt 基因玉米花粉对家蚕的安全性评价

家蚕 *Bombyx mori* L.是我国重要的经济昆虫，与目前主要转 Bt 基因抗虫玉米靶标害虫同属鳞翅目。转基因抗虫玉米的商业化种植是否会对家蚕造成不良影响，是人们非常关注的问题。研究表明，Bt 水稻花粉可随风飘落于稻田附近的桑树上，而且不同启动子的 Bt 水稻对家蚕的影响不同，启动子是 ubiquitin 的 Bt 水稻花粉对家蚕的生长发育存在不利影响，玉米比水稻植株高，散粉量大，而且研究 Bt 玉米对家蚕的影响结果表明，玉米花粉达到 15 粒/cm^2 时就可以明显降低家蚕幼虫的体重，在 75 粒/cm^2 时，与对照相比，家蚕幼虫体重降低 60%以上，个别幼虫开始死亡，但也有报道 Bt 玉米 MON810 对家蚕的生存和生长发育没有任何不利影响。Bt 玉米的散粉量受品种、当地气候和地理条件的影响，家蚕是否受 Bt 玉米花粉的影响与转入启动子和桑叶上的密度有关，因此应谨慎评估转不同 Bt 基因玉米对家蚕的影响，为家蚕养殖提供理论依据和实验指导。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试玉米

供试玉米为 N30、V3 和 J223 及其非转基因对照 HindII，具体田间管理同第二章 1.1。当玉米生长至抽雄期，每株雄穗套上透气的硫酸纸袋（20×40 cm），每日收集花粉。收集到的花粉经冷冻干燥后过滤，除去花药和其他杂质。处理好的花粉保存在-75℃冰箱备用。

3.1.2 供试家蚕

家蚕 *Bombyx mori* L. 购于浙江省蚕种公司，品种为菁松 X 皓月。蚁蚕孵化后在人工培养箱中饲养，饲养条件为 28±2℃，RH 75±5%，光周期 16h: 8h(L : D)。

3.1.3 转融合基因玉米花粉对家蚕生物学影响

花粉设置 3 个浓度 40 mg/ml、4 mg/ml、0.4 mg/ml。将花粉溶于无菌水中，加入吐温-20 作为乳化剂（0.2%），充分悬浮后涂在桑叶上，自然晾干。利用体

万方数据

视显微镜检测花粉密度依次为 10000、1000、10 粒/cm^2(Wraight et al. 2000)。以含有非转基因玉米花粉（CKnb）和不含花粉的桑叶（CKnp）为对照，饲喂家蚕蚁蚕，每处理测试 20 头，每个处理重复 4 次。家蚕第三次蜕皮后，每个处理取 10 头继续喂养。饲养条件为 28±0.5℃，RH 75±5%，光周期为 16：8h（L:D）。每天观察记录家蚕的存活及各龄的发育历期，并在各龄末称量眠蚕的重量，化蛹后考察各处理的蛹重、化蛹率、蛹历期、茧重、茧壳重、羽化率。

家蚕羽化后同一处理雌雄配对，交配（明交暗产）4 h 后放在产卵圈内使其产卵，计算每头雌蛾 24 h 的产卵量。

3.1.4 转 Bt 基因玉米花粉中 Bt 蛋白含量测定

转 Bt 基因玉米花粉和非转基因对照玉米花粉冷冻干燥后，称取 20 mg 左右于 2 ml 离心管中，利用组织研磨仪充分研磨（25 fequency/min，1min），加入 1 ml 提取液，充分悬浮，冰上放置 10 min，使蛋白溶解在提取液中之后，12，000 rpm，4℃离心 10 min，保留上清液待用。

Cry1Ab 蛋白：将原液稀释 100 倍后，利用 ELISA 方法（QualiPlate™ Kit for Cry1Ab/Cry1Ac，Envirologix™）测试具体方法同第二章 2.1.5 节，。

Cry2A 蛋白：N30 花粉研磨后加入 1 ml Extraction/Dilution Buffer 溶解蛋白，其他步骤同上，上清液直接测定 Cry2A 蛋白含量（QualiPlate™ Kit for Cry2A，Envirologix™）。包被板和其他试剂至少在室温下放置 30 min 后按照说明书的操作步骤开展实验。

取 2.5 mg 花粉溶于 1000 μl 碱性品红（Basic fuchsin）中，混匀后取 5 μl 在 12.5 倍的显微镜下观察计算花粉粒数，重复 12 次。结果的 80 倍即为 1.0 mg 花粉中所含的花粉粒数，由此可计算出每粒转 Bt 基因玉米花粉的蛋白含量。

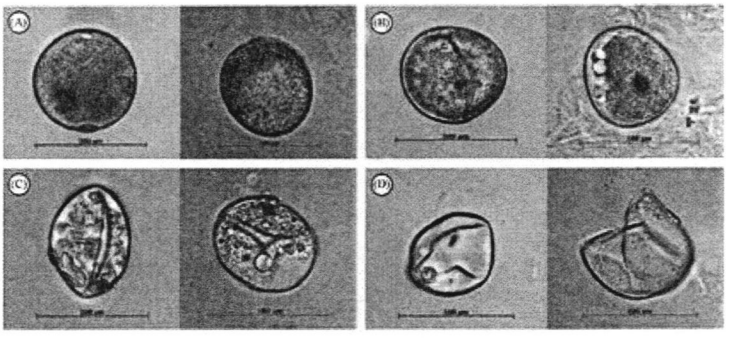
3.1.5 家蚕对花粉的消化情况

为确定不同阶段家蚕对花粉的消化程度，取刚蜕完皮的 5 龄家蚕 10 头，饥饿 2 h 清空肠道后，喂含 4 mg/ml 花粉的桑叶，收集粪便统计完整和破损花粉粒。具体方法将粪便溶解在 0.5 M 蔗糖溶液中，滴在载玻片上，加一滴棉乳酚蓝（lactophenol cotton blue）对细胞质染色，再加碱性品红将外壁膜染成粉色，以

万方数据

方便观察花粉内含物被消化情况(Li et al. 2010)。

按照被消化的程度，花粉粒被分成以下四个等级：（A）含有 90-100%内含物，基本保持新鲜花粉粒形状，即为完整颗粒；（B）内含物有 50-90%，不规则形状；（C）内含物剩余 10-50%，花粉粒收缩；（D）内含物剩余 0-10%，花粉粒严重收缩或破裂；



3.1.6 数据分析

各处理平均数比较采用单因素方差分析（ANOVA）与 LSD 测验，百分数经反正弦平方根转换后进行比较分析，所有数据使用 DPS 统计软件分析（version 13.5）。

3.2 结果与分析

3.2.1 幼虫存活率

N30、V3 和 J223 的花粉以 40 mg/ml，约 10000 粒/cm^2 的密度涂在桑叶上时，家蚕在 14 d 后全部死亡，而且大部分蚁蚕无法蜕皮进入下一个生长阶段。当桑叶上转基因玉米花粉浓度为 0.4 mg/ml 和 4 mg/ml 时对家蚕幼虫存活没有不利影响（图 3.1）。第三次蜕皮后除 V3 在 4 mg/ml 时幼虫的存活率为 86.25%，其他转基因玉米花粉处理的幼虫存活率均在为 90.00%以上。4-5 龄的大蚕除个别蜕皮时死亡外，全部完成幼虫期发育，上蔟前的存活率达到 97.50-100.00%。当转基因玉米花粉浓度达到时 40 mg/ml 时，蚁蚕不能正常生长发育，取食 J223 花粉的幼虫 12 d 后全部死亡，取食 N30 和 V3 花粉的幼虫 13-14 d 后全部死亡。非转基

万方数据

因玉米花粉对家蚕幼虫的存活没有不利影响，其浓度为 40 mg/ml 时，第三次蜕皮后和上蔟前幼虫存活率分别为 91.25%和 97.50%。

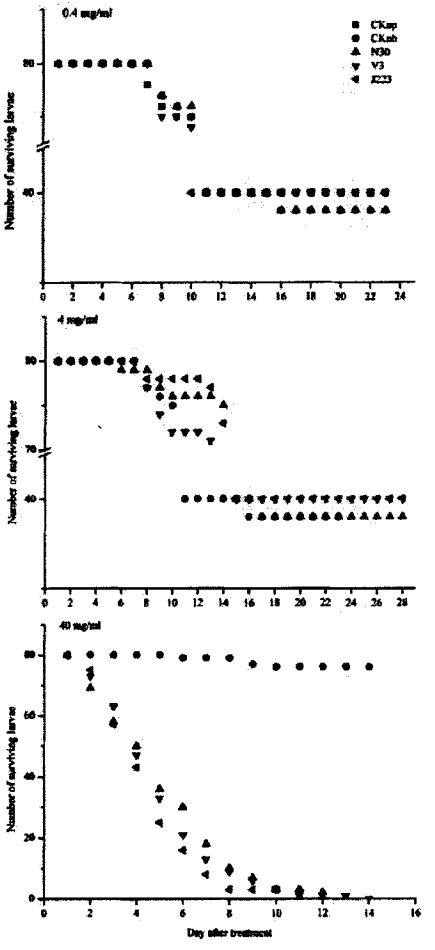


图 3.1 不同浓度转 Bt 基因玉米和非转基因玉米花粉处理的家蚕幼虫生存曲线

Fig. 3.1 Survival curves for silkworm larvae administered different doses of Bt or non-Bt maize pollens

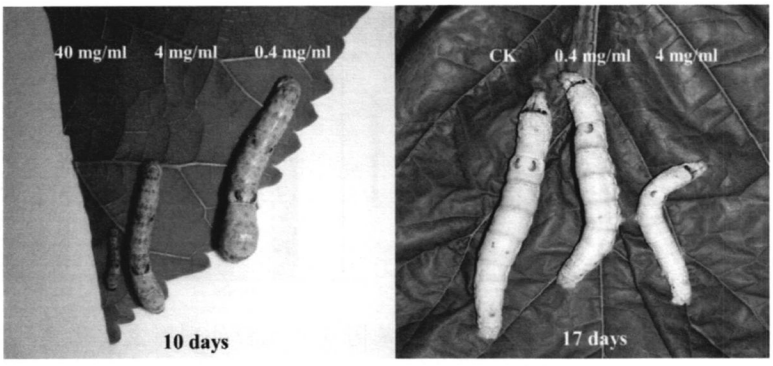
Note: CKnp: without maize pollen; CKnb: control maize pollen

3.2.2 各龄眠蚕、茧和茧壳重

取食 0.4 mg/ml、4 mg/ml 和 40 mg/ml 转基因玉米花粉的 1 龄眠蚕体重显著低于取食非转基因对照花粉和无花粉处理的家蚕（$F_{0.4}$=23.278，df = 4，59，P < 0.0001；F_4= 15.227，df =4，59，P < 0.0001；F_{40}= 135.189，df = 4，59，P < 0.0001），

万方数据

说明转基因玉米的花粉对蚁蚕的体重有抑制作用（图 3.2）。40 mg/ml 转基因玉米花粉处理的家蚕幼虫仅有几头生长至 2 龄，没有入眠即死亡，故以后重量统计只有 0.4 mg/ml 和 4 mg/ml 花粉浓度的处理。在花粉浓度为 0.4 mg/ml 时，N30 和 V3 花粉处理的 2 龄眠蚕体重显著低于对照和 J223（2 龄：$F = 20.376$，df = 4，99，$P < 0.0001$），3 龄以后转基因玉米花粉对家蚕眠蚕体重的抑制作用明显下降，与非转基因对照玉米花粉处理的眠蚕重没有显著差异，而取食无花粉桑叶的眠蚕比其他处理的眠蚕体重略轻，但尚未达到显著水平（3 龄：$F = 5.119$，df = 4，99，$P = 0.0009$；4 龄：$F = 2.056$，df = 4，99，$P = 0.0927$）。转基因玉米花粉浓度在 4 mg/ml 时对眠蚕体重抑制作用明显，取食 N30 花粉的 2 龄眠蚕体重显著低于 J223，但与 V3 无显著差异（2 龄：$F = 169.539$，df = 4，99，$P < 0.0001$），取食这三种转基因玉米花粉的 3 龄和 4 龄眠蚕体重无显著差异，但均低于非转基因玉米花粉和无花粉对照（3 龄：$F = 34.131$，df = 4，99，$P < 0.0001$；4 龄：$F = 20.136$，df = 4，99，$P < 0.0001$）。



比较非转基因玉米花粉对各龄期眠蚕体重及茧重发现（图 3.2），0.4 mg/ml、4 mg/ml 和 40 mg/ml 花粉浓度对 1 龄眠蚕体重无影响（$F_{1st} = 0.909$，df = 3,47，$P = 0.4443$），对其他龄期眠蚕体重影响明显。取食 40 mg/ml 花粉浓度的 2-4 龄眠蚕体重显著低于 0.4 mg/ml 和 4 mg/ml 及无花粉处理，说明即使非转基因花粉在高浓度时对家蚕体重也有一定抑制作用。4 mg/ml 花粉处理的 2-4 龄眠蚕体重均高于无花粉处理，说明适量花粉会增加营养。0.4 mg/ml 花粉处理和无花粉处理的各龄期眠蚕体重差异不显著，推测是该浓度较低的原因（$F_{2nd} = 3.122$，df = 3，79，$P = 0.0308$；$F_{3rd} = 3.492$，df = 3，79，$P = 0.0196$；$F_{4th} = 6.019$，df = 3，79，$P = 0.001$；）。玉米花粉和无花粉处理对茧重和茧壳重无显著差异（$F_{cocoon} = 2.557$，df = 3，79，$P = 0.0614$；$F_{cocoon\ shell} = 3.578$，df = 3，79，$P = 0.0177$）。

万方数据

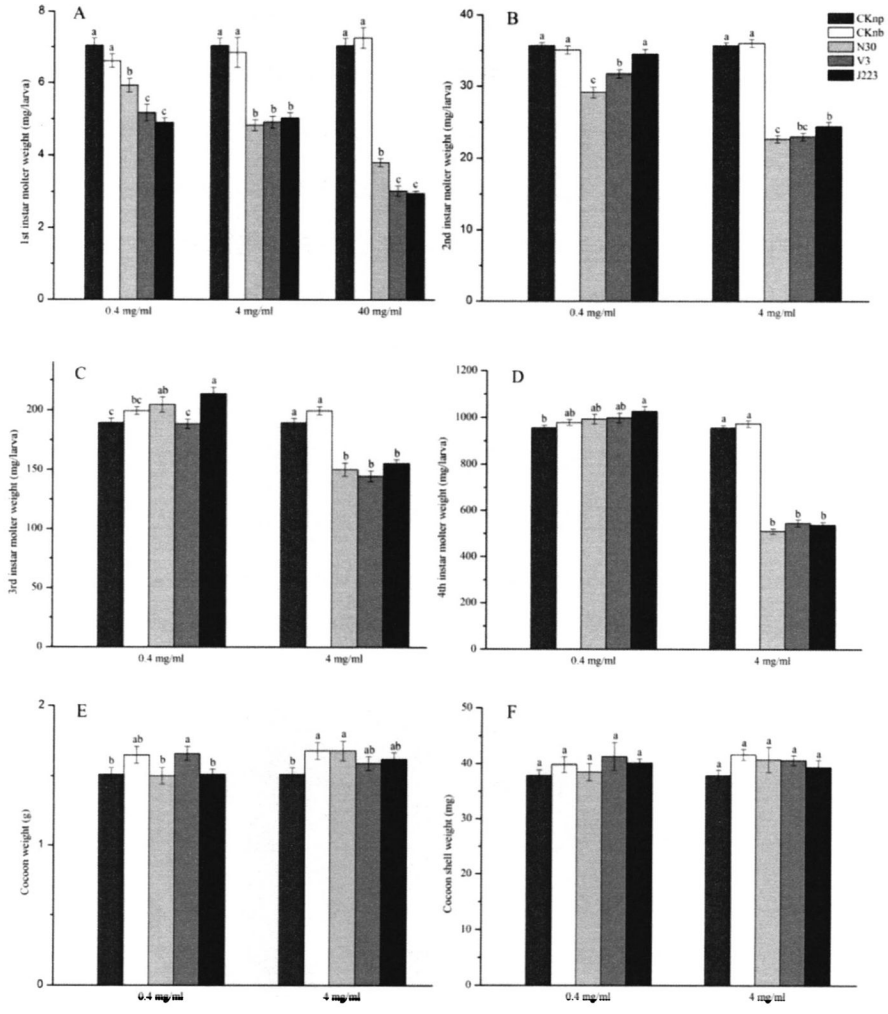


图 3.2 不同浓度转基因玉米花粉和非转基因及无花粉处理对家蚕体重和茧重影响

Fig. 3.2 Body and cocoon weight of silkworm fed with different densities of Bt maize pollens, non-Bt maize pollen and no pollen (mean ± SE)

Note: mean ± SE, A-D: 1^{st}-4^{th} instar larva weight (mg); E: cocoon weight (g); F: cocoon shell weight (mg)

3.2.3 转 Bt 基因玉米花粉对家蚕发育历期的影响

家蚕取食 0.4 mg/ml（约 100 粒/cm^2）浓度转基因玉米花粉后，1 龄幼虫的发育历期延长约 0.50 d，显著长于非转基因对照玉米花粉和无花粉处理（F_{1st} = 6.812，df = 4，19，P = 0.0025）（表）；2 龄幼虫生长没有受转基因玉米花粉影响（F_{2nd} = 1.401，df = 4，19，P = 0.2811）；取食 N30 的 3 龄幼虫发育历期显著长于对照花

万方数据

粉和无花粉处理，但 V3 和 J223 与对照没有显著差异（$F_{3rd}=2.896$，df＝4，19，$P=0.0584$）；4 龄幼虫发育历期比非转基因花粉和无花粉对照延长 0.60-0.80 d（$F_{4th}=10.801$，df＝4，19，$P=0.0003$）；5 龄幼虫除 J223 发育时间显著短于无花粉处理外，其他处理间无显著差异，即转基因玉米花粉对该龄历期的影响不显著（$F_{5th}=1.382$，df＝4，19，$P=0.2871$）；取食非转基因玉米花粉对各龄幼虫生长没有显著影响，各处理家蚕蛹的发育历期没有差别（$F_{pupae}=0.950$，df＝4，19，$P=0.4625$）。

取食 4 mg/ml（约 1000 粒/cm^2）转基因玉米花粉的家蚕发育历期比非转基因玉米和无花粉处理显著延长，但三种转基因玉米的影响程度各不相同。相对于非转基因玉米和无花粉对照，1 龄家蚕发育历期显著被延长 1 d 左右，其中 N30 和 V3 显著长于 J223（$F_{1st}=77.766$，df＝4，19，$P=0.0000$）；J223 和 V3 对 2 龄家蚕历期的影响大于 N30，对 3 龄历期影响小于 N30（$F_{2nd}=22.715$，df＝4，19，$P=0.0000$；$F_{3rd}=12.953$，df＝4，19，$P=0.0001$）；V3 对 4 龄家蚕影响较大，与 N30 差异显著（$F_{4th}=83.103$，df＝4，19，$P=0.0000$）；5 龄家蚕受转基因玉米花粉影响较小，除 J223 外，取食 V3 和 N30 与取食对照花粉的 5 龄幼虫发育历期没有显著差异，但显著长于无花粉处理（$F_{5th}=7.920$，df＝4，19，$P=0.0012$）。取食 4 mg/ml 转基因玉米花粉的家蚕蛹期显著被延长 1 d 左右（$F_{pupae}=7.314$，df＝4，19，$P=0.0018$）。

不同浓度非转基因玉米花粉对家蚕发育历期的影响较小，取食 40 mg/ml 非转基因玉米花粉处理的 1 龄幼虫的发育历期为 2.85 d，稍长于其他浓度和无花粉处理，差异达显著水平（$F_{1st}=5.440$，df＝3，15，$P=0.0135$）。三个花粉浓度处理和无花粉处理的 2 龄、3 龄幼虫和蛹的发育历期没有统计上的差异（$F_{2nd}=0.480$，df＝3，15，$P=0.7024$；$F_{3rd}=0.926$，df＝3，15，$P=0.4579$；$F_{pupae}=0.757$，df＝3，15，$P=0.5393$）。无花粉处理的 4 龄幼虫发育历期最长，与 4 mg/ml 花粉浓度处理的差异显著，但三个花粉浓度间差异不显著（$F_{4th}=2.386$，df＝3，15，$P=0.1202$）。40 mg/ml 和 4 mg/ml 比 0.4 mg/ml 花粉浓度处理的 5 龄蚕发育历期延长 0.8 d，差异达显著水平，比无花粉处理延长 0.4 d，差异不显著（$F_{4th}=2.604$，df＝3，15，$P=1002$）。以上结果表明非转基因玉米花粉对家蚕生长发育稍有影响，花粉浓度太高会延长 1 龄幼虫发育历期，而适量浓度（4 mg/ml）则为家蚕

万方数据

生长提供营养，缩短其发育历期。

表 3.1 转 Bt 基因及非转基因玉米花粉对家蚕各阶段发育历期的影响

Table 3.1 The impact of Bt and non-Bt maize pollen on silkworm developmental duration

Density (mg/ml)	Pollen	Stadium (d ± SE)					
		1st star	2nd instar	3rd instar	4th instar	5th instar	Pupal stage
0.4	N30	2.90±0.06a	2.94±0.08a	4.24±0.12a	4.80±0.09a	9.07±0.21ab	13.68±0.21a
	V3	3.01±0.12a	2.85±0.12a	4.05±0.12ab	4.74±0.11a	8.99±0.14ab	14.09±0.23a
	J223	2.85±0.11a	2.94±0.12a	3.99±0.09ab	4.90±0.11a	8.89±0.21b	14.02±0.08a
	CKnp	2.53±0.03b	3.20±0.10a	3.83±0.16b	4.10±0.19b	9.45±0.16a	14.22 ±0.32a
	CKnb	2.49±0.09b	3.10±0.16a	3.74 ±0.07b	4.09 ±0.08b	9.10 ±0.18ab	13.75 ±0.27a
4	N30	4.00±0.16a	3.59±0.16b	4.80±0.06a	5.79±0.13b	10.22±0.12ab	15.26±0.07a
	V3	3.84±0.02a	3.94±0.05a	4.37±0.08b	6.26±0.09a	10.19±0.11ab	14.81±0.09a
	J223	3.55±0.04b	4.19±0.03a	4.40±0.12b	5.90±0.11ab	10.60±0.07a	14.94±0.13a
	CKnp	2.53±0.03c	3.20±0.10c	3.83±0.16c	4.10±0.19c	9.45±0.17c	14.22 ±0.32b
	CKnb	2.58±0.07c	3.03±0.12c	4.01 ±0.06c	3.55 ±0.13d	9.84 ±0.24bc	14.13 ±0.17b

Note: The data in all samples are expressed as mean ± SE. For the same density, the different letters in the same column represent significant difference ($P< 0.05$) according to one-way ANOVA.

3.2.4 转 Bt 基因玉米花粉对家蚕化蛹率、羽化率和产卵量

转基因玉米花粉对家蚕化蛹率和羽化率没有影响（表 3.2），三种转基因玉米花粉处理的家蚕化蛹率均在 95.00%以上，羽化率在 92.50%以上，产卵量与非转基因玉米花粉和无花粉处理的产卵量没有显著差异（$F_{0.4}=0.674$，df＝4，49，$P=0.6136$；$F_4=1.255$，df＝4，49，$P=0.3016$）。

非转基因玉米花粉在 0.4 mg/ml 浓度时的产卵量显著低于 4 mg/ml 浓度，其他处理间产卵量无显著差异（$F=1.729$，df＝3，39，$P=0.1785$）。

万方数据

表 3.2 不同浓度转 Bt 基因和非转基因玉米花粉对家蚕化蛹率、羽化率和产卵量的影响

Table 3.2 The impact of Bt and non-Bt maize pollens on silkworm pupation rate, emergence rate and fertility.

Density (mg/ml)	Pollen	Pupation rate (%)	Emergence rate (%)	Fertility (Num. of eggs)
	N30	100.00	100.00	519.30 ± 26.36a
	V3	97.50	97.50	558.30 ± 29.92a
0.4	J223	97.50	95.00	559.10 ± 16.01a
	CKnp	97.50	95.00	577.00 ± 13.62a
	CKnb	97.50	97.50	554.00 ± 35.34a
	N30	95.00	95.00	609.00 ± 22.67a
	V3	95.00	92.50	588.90 ± 16.84a
4	J223	95.00	95.00	574.70 ± 22.53a
	CKnp	97.50	95.00	577.00 ± 13.62a
	CKnb	97.50	95.00	621.00 ± 12.02a

Note: The data in the fertility are expressed as mean ± SE. For the same density, the different letters in the same column represent significant difference ($P< 0.05$) according to one-way ANOVA.

3.2.5 转 Bt 基因玉米花粉 Cry1Ab 蛋白含量及家蚕对花粉的消化情况

如表 3.3 所示，N30 和 V3 花粉中 Cry1Ab 蛋白的含量分别是 21.36 ng/mg 和 28.03 ng/mg （DW），显著高于 J223 花粉中 Cry1Ab 的表达量 2.67 ng/mg（$F = 13.872$， $df = 2, 8$， $P = 0.0056$）。N30 花粉中融合的另外一个蛋白 Cry2Aj 的表达量只有 0.13 ng/mg，比 Cry1Ab 蛋白的含量低 164 倍，推测 Cry2Aj 降解。

万方数据

表 3.3 转 Bt 基因玉米花粉中 Bt 蛋白的含量

Table 3.3 Bt proteins concentration in pollon of these Bt maize events

Event	n	Bt (mean ± SE) ng/mg DW			
		Cry1Ab	CV (%)	Cry2A	CV (%)
N30	3	21.36 ± 0.45a	3.62	0.13 ± 0.003	4.58
V3	3	28.03 ± 6.10a	37.70		
J223	3	2.67 ± 0.33b	21.73		

Note: CV, a coefficient of variation and is calculated as follows: SD/mean×100%.

Means within the same column followed by different letter are significant different ($P < 0.05$, LSD) according to one-way ANOVA.

花粉中所含的花粉粒数平均为 5566 粒/mg，经计算得 N30 每粒花粉中 Cry1Ab 蛋白含量为 0.0038 ng/mg，V3 每粒花粉中 Cry1Ab 蛋白含量为 0.0050 ng/mg，J223 每粒花粉中 Cry1Ab 蛋白含量为 0.0005 ng/mg。5 龄家蚕粪便中有 96%的花粉为完整颗粒，基本保持新鲜花粉粒形状，1.2%的花粉粒收缩，内含物为 50-90%，2.4% 的花粉粒内含物剩余 10-50%，仅有 0.4%的花粉内含物剩余 0-10%，花粉粒严重收缩或破裂。因此，如果 5 龄家蚕取食 N30 的 100 粒花粉，最高可以接触到的 Cry1Ab 蛋白含量为 0.012 ng/mg。

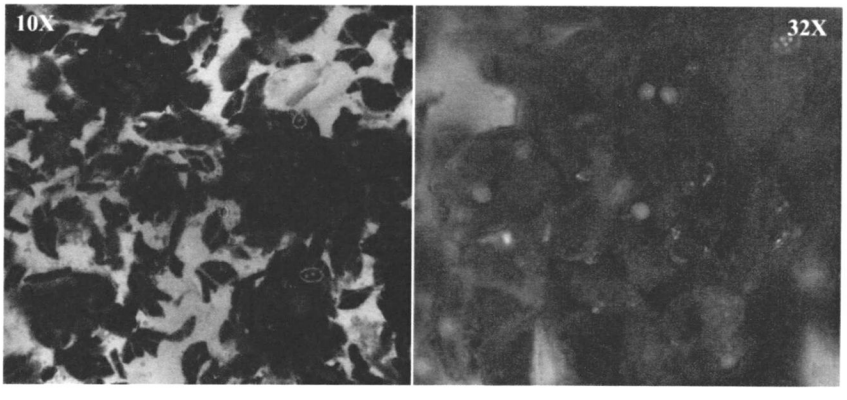


图 3.3 5 龄家蚕粪便内含物

Figure 3.3 5th instar silk worm larve feces

万方数据

3.3 讨论

转 Bt 基因玉米 N30、V3 和 J223 的花粉对不同龄期家蚕幼虫影响程度不同。鳞翅目低龄幼虫通常抗逆性较弱，本试验中蚁蚕对 Bt 花粉表现的相对敏感，死亡率和体重抑制率较明显，5 龄家蚕幼虫取食量大，摄入花粉较多，但大部分花粉粒没有被消化而直接排出体外，实际接触到 Bt 蛋白量少，抗逆力强，故受影响小。

非转基因玉米花粉对家蚕生长发育稍有影响，当花粉浓度超过 10000 粒/cm^2 时，眠蚕体重降低，1 龄幼蚕发育历期稍延长，这与姚洪谓等（2008）的报道不同，姚洪谓等用高浓度非转基因水稻花粉饲喂家蚕后发现家蚕的死亡率升高，姚等归因于花粉中氨基酸干扰了家蚕正常的生理代谢过程。

Bt 玉米对家蚕的影响的报道较少，只有李文东等报道 MON810 花粉对家蚕各龄期的死亡率、蛹重、茧重、茧层重、化蛹率、羽化率和产卵量等生物学指标无多大影响，且无明显的剂量效应，对柞蚕 *Antheraea pernyi* 的存活率和体重也没有影响(李文东等. 2002, Li et al. 2005)。但 Bt 水稻对家蚕有一定影响，王忠华等报道 KMD3（Cry1Ab）花粉对初孵家蚕幼虫无致死效应，而对家蚕的体重有较大影响，其中三龄期家蚕体重与取食非转基因水稻花粉的同龄家蚕存在极显著差异(王忠华等. 2001)。姚洪谓等报道家蚕对 Bt 水稻 B1（Cry1Ab）和 KMD1（Cry1Ab）的花粉敏感，对 TT9-3（Cry1Ab/Cry1Ac）不敏感，而且 1 龄幼虫比其他龄期对 Bt 花粉更敏感(Yao et al. 2008)。

以上不同的实验结果可能与转入基因的启动子有关，目前转基因作物使用的启动子主要有 ubiquitin、actin I 和 CaMV35S，这三类启动子都是非组织特异性的，可以在全株中表达 Bt 蛋白。但是不同启动子，Bt 蛋白的表达量是不同的，TT9-3 使用的启动子是 actin I，KMD1 和 B1 的启动子是 ubiquitin，KMD1 花粉中 Bt 蛋白含量是 TT9-3 的 4.5 倍，B1 花粉中 Bt 蛋白含量是 TT9-3 的 3.4 倍(Yao et al. 2008)。MON810 使用 CaMV35S 启动子，花粉中 Cry1Ab 蛋白含量很低，只有 0.09μg/g（FW）（AGBIOS），比叶片（9.35μg/mg）中 Cry1Ab 的含量低 100 倍，玉米 Bt 176 使用的在花粉中高表达的启动子 phosphoenol pyruvate carboxylase promoters，其花粉中 Cry1Ab 的表达量是 Mon810 的 40，其花粉对帝王斑蝶幼虫有致死作用，导致 Bt 176 直接被淘汰出市场。本试验三种转 Bt 基因玉米使用的

万方数据

启动子均为 ubiquitin，其中 N30 和 V3 花粉中 Cry1Ab 的含量分别为 21.36 ng/mg 和 28.03 ng/mg，远高于 J223 中的 2.67 ng/mg，N30 中融合的另一个蛋白 Cry2Aj 在花粉中的含量很低，只有 0.13 ng/mg，比 Cry1Ab 低 164 倍，推测是由于 Cry2Aj 降解的缘故。另外，本试验未获得这 Bt 玉米中 Vip3DA 和 Cry1Ie 的表达量，由于缺少纯蛋白，亦未能进一步研究 Cry2Aj、Vip3DA 和 Cry1Ie 三种蛋白是否对家蚕生长发育造成不利影响。

Bt 蛋白需要在家蚕中肠积累到一定剂量才发挥作用，而家蚕中肠和粪便中含有大量完整的花粉粒，说明家蚕无法消化花粉粒壁，只能通过肠道内的酶分解或渗透作用消化花粉，所以实际接触到的杀虫蛋白浓度很低，这也可能是一些 Bt 花粉对家蚕无影响的原因。因此，Bt 花粉要对家蚕产生影响，需要达到一定密度，但实际生态环境中很难达到室内试验设置的密度。樊龙江等（2003）调查杭州余杭桑稻混种地区水稻花粉的密度，20 个采样点的调查结果显示，超过一半的桑叶检测到了水稻花粉，其浓度变化范围为 13.3-199.0 粒/ cm^2，平均浓度为 92.9 粒/ cm^2，基本达到影响家蚕生长发育的阈值。玉米比水稻植株高，散粉量大（3000 万花粉粒/每玉米雄穗），但花粉粒重，没有水稻花粉传播远。目前尚未有玉米花粉向桑叶上自然飘落的报道，但 Bt 玉米花粉向马利筋叶片（*Asclepias syriaca*）上自然飘落的调查结果显示，在田间玉米地里的马利筋叶片上 Bt 玉米花粉平均为 170.6 粒/ cm^2，最高可达 1400 粒/ cm^2，随着距玉米地边缘的距离增大，花粉密度显著降低，当距离为 2 m 时，下降到 14.2 粒/ cm^2(Pleasants et al. 2001)。另一篇调查结果表明，在距离 Bt 玉米地边缘 0.5 m 和 1.0 m 的马利筋叶片上最高平均花粉浓度分别可达 260 和 170 粒/ cm^2(Zangerl et al. 2001)。桑叶表面光滑，桑树比马利筋高，而且降雨冲刷、风力和人为采集桑叶时的抖动都会降低桑叶上的花粉密度。此外，还受玉米品种、散粉量、种植条件、气候条件和地理环境的影响。

花粉中 Bt 蛋白的含量，家蚕对花粉粒的消化情况及桑叶上的花粉密度是决定 Bt 玉米是否对家蚕的生长发育造成影响的主要因素，因此在蚕区应谨慎种植抗鳞翅目害虫的转基因玉米。

万方数据

第四章转Bt基因玉米对非靶标捕食性天敌-异色瓢虫的风险评估

瓢虫是一类常见而且种类丰富的天敌昆虫，幼虫和成虫都有捕食性，而且食性很广，可以捕食蚜虫、蓟马、鳞翅目幼虫及卵，在食物匮乏时也取食植物组织，如花粉。瓢虫可以通过猎物和花粉间接或直接接触到 Bt 蛋白，在已发表的文献中，大部分报道表明转 Bt 基因玉米对瓢虫没有不利影响，但也有人对 Bt 蛋白对瓢虫的安全性提出质疑，而且曾一度因此产生争论，双方都提供实验数据支持自己的观点。本实验评估三种新开发的表达 Cry1Ab/Cry2Aj、Cry1Ab/Vip3DA 和 Cry1Ab/Cry1Ie 融合蛋白的 Bt 玉米对异色瓢虫生长发育及成虫繁殖力的影响，为该玉米的环境安全性提供实验依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 供试玉米

供试玉米为 N30、V3 和 J223 及其非转基因对照 HindII。2012 年 4 月 27 日种植于浙江大学实验农场，非转基因个体的去除和日常管理同第二章 2.1，花粉的收集同第三章 3.1。待玉米吐丝后（7 月 6 日左右）取下幼嫩雌穗保存在 4℃冰箱中供实验用。

4.1.2 供试昆虫

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）和异色瓢虫 *Harmonia axyridis*（Pallas）卵均购自河南济源白云科技有限公司，甜菜夜蛾孵化后喂以玉米幼嫩雌穗，异色瓢虫孵化后喂 1 龄的甜菜夜蛾幼虫（1 d），三龄后及成虫用 1 龄末 2 龄初甜菜夜蛾饲养（3-4 d）。饲养条件为 27 ± 2℃，RH 70 ± 5%，光周期 16:8（L:D）。

4.1.3 转 Bt 基因玉米通过甜菜夜蛾对异色瓢虫的生物学影响

N30、V3、J223 和对照玉米雌穗切成 $1cm^3$ 小块后放入 24 孔细胞培养板，每个培养板选取 6 个孔，每孔接入已取食相应玉米品系雌穗 2 h 的甜菜夜蛾初孵幼虫 40 头，之后每个孔接入一头异色瓢虫初孵幼虫，培养板盖子内侧放有两张滤

万方数据

纸，并用橡皮圈勒紧整个培养板，以防止虫子逃逸。每隔 4 h 检查瓢虫的取食情况，并酌情添加甜菜夜蛾。将第一次蜕皮的 2 龄瓢虫幼虫转移到直径 3.5 cm，高 2.5 cm 的有盖塑料盒中，放入相应的玉米雌穗及已取食 12 h 的甜菜夜蛾初孵幼虫 40 头，非转基因对照为 20 头，每隔 4 h 检查瓢虫取食情况并添加猎物。将甜菜夜蛾初孵幼虫在非转基因玉米雌穗上饲喂 3 d 后，转移到 N30、V3 和 J223 雌穗上饲养 24 h，至 2 龄初后饲喂异色瓢虫 3 龄、4 龄幼虫及成虫。

每个处理测试 74 头瓢虫，每天记录瓢虫幼虫存活头数，以及蜕皮、预蛹、化蛹和羽化的时间，称量蛹重，成虫羽化 1 d 后称重。相同处理成虫雌雄配对后置于塑料培养皿（直径 8.5 cm，高 1.5 cm）中，连同放入一块餐巾纸（长×宽：5.0 cm×2.5 cm）供产卵用，餐巾纸每天更换，记录雌虫开始产卵后 10 d 的产卵量，每个处理测试 50 粒卵的孵化率，重复 4 次。所有实验在 25±2 °C，相对湿度 70±5%，光周期 16:8 h（L:D）条件下进行。

4.1.4 Bt 蛋白在玉米-甜菜夜蛾-异色瓢虫食物链中的流动

测试转基因玉米 N30、V3 和 J223 的雌穗，取食雌穗 24 h 的 2 龄初甜菜夜蛾，取食甜菜夜蛾 2 h 后的异色瓢虫 3 龄幼虫和刚羽化的成虫，及卵中的 Cry1Ab 蛋白含量。将上述样本取样后保存在-75℃冰箱中，称取 0.2 g 雌穗，3 头甜菜夜蛾，单头异色瓢虫幼虫和成虫，10 粒瓢虫卵各自称重，利用组织研磨仪研磨后，加入适量 PBST，ELISA 方法同第二章。

甜菜夜蛾和瓢虫，及虫卵测试前用 PBST 冲洗 3 次，以除去可能沾染的 Cry1Ab 蛋白。每个处理重复 4 次。

4.1.5 转 Bt 基因玉米花粉对异色瓢虫成虫寿命和生殖力的影响

异色瓢虫羽化后称重，雌雄配对放在塑料培养皿（直径 8.5 cm，高 1.5 cm）中，取 10 mg 左右玉米花粉与一个直径 3.5 cm 的塑料盖子中供瓢虫食用，连同放入含 20%蜂蜜水的棉球保湿，放一张餐巾纸（长×宽：5.0 cm×2.5 cm）供瓢虫产卵用。每天上午 9 点，下午 2 点和晚上 8 点添加新鲜花粉，每隔 2 d 更换一次花粉盘。除 N30、V3、J223 和非转基因对照外，另设一无花粉对照。每处理测试 25 对瓢虫，称量供试瓢虫第 7 d 和第 30 d 的重量，记录瓢虫每天存活和产卵

万方数据

情况，每个处理测试 50 粒卵的孵化率，重复 4 次。整个实验进行 30 d，如遇雄虫死亡及时补充新雄虫，如雌虫死亡则停止此对瓢虫的测试。实验条件为 25±2 °C，相对湿度 70±5%，光周期 16:8 h（L:D）。

4.1.6 统计分析

利用 Wilcoxon 方法比较异色瓢虫取食甜菜夜蛾和玉米花粉的存活情况，每个转基因玉米处理与对照比较或两个转基因玉米处理间比较。利用 DPS 软件对瓢虫的发育历期、体重、产卵前期和产卵量等做单因素方差分析（One-way ANOVA，LSD）。百分数都经过反正弦平方根转换后在进行方差分析，但图表中的数据是未转换数据，未产卵和中途死亡瓢虫的产卵量在统计时剔除。

4.2 结果与分析

4.2.1 转基因玉米通过猎物甜菜夜蛾对异色瓢虫的生物学影响

取食饲喂不同玉米雌穗的异色瓢虫的生存曲线如图 4.1，不同转基因玉米品系与对照非转基因玉米处理的异色瓢虫的生存情况不同，转基因玉米 N30、V3 和 J223 与对照非转基因玉米处理的异色瓢虫至化蛹时的存活率分别为 45.95%、29.73%、40.54%和 41.89%，至羽化后的存活率分别为 31.08%、20.27%、28.38%和 35.14%。从统计分析结果看，N30 和 J223 与对照的差异不显著（N30：$\chi^2 = 0.025$，df =1，$P = 0.8753$；J223：$\chi^2 = 1.439$，df =1，$P = 0.2304$），V3 与对照的差异显著（$\chi^2 = 6.056$，df =1，$P = 0.0139$）。

万方数据

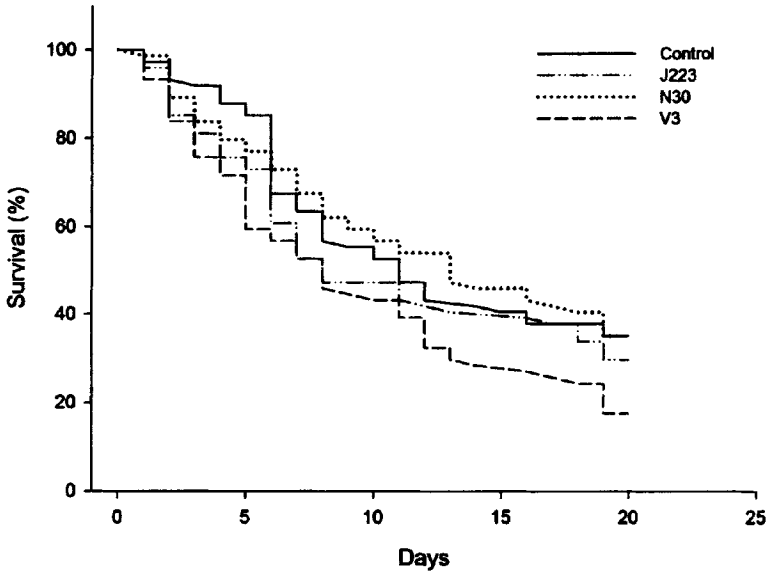


图 4.1 取食 Bt 玉米饲养的甜菜夜蛾幼虫的异色瓢虫幼虫-蛹的存活率

Fig 4.1 Survival of *H. axyridis*pre-imaginal fed preys which reared on different Bt maize lines and non-Bt control

以取食转基因玉米 N30、V3 和 J223 的甜菜夜蛾饲喂异色瓢虫，其发育历期与取食非转基因玉米饲喂的甜菜夜蛾的异色瓢虫发育历期没有显著差异（表 4.1）。转基因玉米处理的异色瓢虫从 1 龄至蛹和 1 龄至成虫的发育历期分别为 13.14-13.50 d 和 17.04-17.36 d，非转基因对照的发育历期较短，分别为 12.75 d 和 16.46 d，但没有统计上的差异（$F_{\text{larvae-pupae}}=1.583$，df = 3，108，$P=0.1979$；$F_{\text{larvae-adults}}=1.496$，df = 3，86，$P=0.2217$）。从各龄期看，1 龄异色瓢虫发育历期为 2.16-2.30 d，各处理间没有显著差异（$F_{1st}=1.739$，df = 3，259，$P=0.1594$）。J223 处理的 2 龄瓢虫发育历期较短，平均为 2.19 d，N30、V3 和对照均> 2.50 d，差异显著（$F_{2nd}=6.766$，df = 3，215，$P=0.0002$）。V3 处理的 3 龄异色瓢虫发育历期为 2.88 d，与对照 2.53 d 存在显著差异，但与 N30 和 J223 的差异不显著（$F_{3rd}=2.009$，df = 3，167，$P=0.1147$）。各处理间 4 龄幼虫发育历期为 4.46-4.93 d，J223 处理的幼虫发育时间较长，但各处理间无显著差异（$F_{4th}=1.132$，df = 3，110，$P=0.3396$）。取食对照的异色瓢虫预蛹时间较长，为 1.14 d，N30、V3 和 J223 预蛹的发育历期分别为 1.03 d、1.05 d 和 1.07 d，差异不显著（$F_{\text{pre-pupae}}=1.008$，

万方数据

df = 3，108，P = 0.3925)。蛹的发育历期在转基因玉米 N30、V3、J223 和对照非转基因玉米间无差异，平均为 3.73-3.88 d(F_{pupae} = 0.316, df = 3, 86, P = 0.8134)。

转基因玉米对异色瓢虫体重没有明显影响（表 4.1），N30、V3 和 J223 处理的蛹重为 21.49-21.84 mg，非转基因对照处理的蛹重稍高，达到 22.61 mg，但不存在显著差异（F_{pupae} = 0.639，df = 3，100，P = 0.5918)。雌虫和雄虫体重也是非转基因对照稍高，分别为 21.01 mg 和 20.79 mg，转基因玉米处理的雌雄虫重分别为 19.91-20.85 mg 和 19.11-19.69 mg，差异不显著（F_{female} = 0.505，df = 3，40，P = 0.6810；F_{male} = 1.038，df = 3，42，P = 0.3863)。

非转基因对照处理的异色瓢虫产卵前期平均为 13.25 d，N30 为 12.14 d，V3 和 J223 处理的异色瓢虫产卵前期稍短，为 10.00 d 和 9.17 d，但各处理间差异不显著（$F_{pre\text{-}ovi}$ = 1.754，df = 3，19，P = 0.1964)。V3 处理的瓢虫成虫产卵量最高，10 d 平均产卵 235.33 粒，其次为非转基因对照，209.50 粒，N30 和 J223 较低，分别为 188.20 粒和 180.50 粒，但各处理间没有统计学上差异（$F_{fecundity}$ = 0.863，df = 3，17，P = 0.4832)。转基因玉米 N30、V3 和 J223 处理的卵孵化率与非转基因对照间无显著差异，平均孵化率都在 88%以上（$F_{hatching}$ = 0.554，df = 3，15，P = 0.6555)。

万方数据

表 4.1 转 Bt 基因玉米通过猎物甜菜夜蛾对异色瓢虫的生物学影响

Table 4.1 Tri-trophic effects on the table parameters of *Harmonia axyridis* when fed larvae that were reared on different transgenic Bt maize lines and non-Bt isoline control kernels

Parameters	N30	V3	J223	Control
Development time (d)				
1st instar	2.30 ± 0.06(63) a	2.17 ± 0.05(58) a	2.16 ± 0.04(70) a	2.26 ± 0.05(69) a
2nd instar	2.53 ± 0.08(59) a	2.63 ± 0.10(41) a	2.19 ± 0.05(54) b	2.60 ± 0.08(62) a
3rd instar	2.82 ± 0.11(49) ab	2.88 ± 0.11(34) a	2.60 ± 0.13(40) ab	2.53 ± 0.13(45) b
4th instar	4.74 ± 0.19(34) a	4.57 ± 0.16(21) a	4.93 ± 0.21(28) a	4.46 ± 0.16(28) a
Pre-pupal stage	1.03 ± 0.03(33) a	1.05 ± 0.05(20) a	1.07 ± 0.05(28) a	1.14 ± 0.07(28) a
Pupal stage	3.87 ± 0.11(23) a	3.79 ± 0.11(14) a	3.88 ± 0.15(24) a	3.73 ± 0.12(26) a
Larvae-pupae	13.42 ± 0.24(33) a	13.50 ± 0.24(20) a	13.14 ± 0.34(28) a	12.75 ± 0.21(28) a
Larvae-adults	17.04 ± 0.25(23) a	17.36 ± 0.29(14) a	17.04 ± 0.35(24) a	16.46 ± 0.27(26) a
Pupa weight (mg)	21.49 ± 0.58(29) a	21.65 ± 0.88(18) a	21.84 ± 0.53(27) a	22.61 ± 0.64(27) a
Male fresh weight (mg)	19.11 ± 0.68(12) a	19.40 ± 1.02(6) a	19.69 ± 0.72(11) a	20.79 ± 0.77(14) a
Female fresh weight (mg)	20.85 ± 0.56(11) a	19.91 ± 1.08(8) a	19.91 ± 0.85(10) a	21.01 ± 0.85(12) a
Pre-oviposition period (d)	12.14 ± 1.28(7) a	10.00 ± 1.52(3) a	9.17 ± 1.11(6) a	13.25 ± 1.80(4) a
Total fecundity	188.20±18.46(5) a	235.33±49.67(3) a	180.50±22.23(6) a	209.50±11.41(4) a
Egg hatching rate (%)	92.50 ± 3.59(4) a	90.50 ± 2.63(4) a	90.50 ± 2.75(4) a	88.00 ± 2.16(4) a

Note: Mean (± SE) followed by same letters in the same row have no significant difference (One-way ANOVA, P > 0.05)

4.2.2 Cry1Ab 蛋白在转基因玉米-甜菜夜蛾-异色瓢虫中的流动

Cry1Ab 蛋白在 Bt 玉米-猎物-捕食者食物链中的流动呈下降趋势，N30、V3 和 J223 雌穗中 Cry1Ab 表达量在 40ng/mg DW 以上，取食 24 h 后甜菜夜蛾体内 Cry1Ab 为 3.16-4.98ng/mgDW，下降了 10-19 倍，3 龄瓢虫幼虫体内 CryAb 的含量是猎物中的 8-13 倍，成虫和卵中没有检测到 Cry1Ab 蛋白。

万方数据

表 4.2 Cry1Ab 蛋白在 Bt 玉米-猎物-捕食者食物链中的流动

Table 4.2 Cry1Ab protein levels in transgenic Bt maize lines, prey and predator

Variety	n	Maize kernel (ng/mg DW)	Prey (ng/mg DW)	*Harmonia axyridis* (ng/mg DW)		
			Spodoptera exigua	3rd instar	Adult	Eggs
N30	3	59.36 ± 9.10a	3.16 ± 0.56b	0.24 ± 0.05c	-	-
V3	3	64.84 ± 4.88a	4.98 ± 0.37b	0.59 ± 0.08c	-	-
J223	3	44.87± 4.56a	4.61 ± 0.17b	0.35± 0.03c	-	-
Control	3	-	-	-	-	-

Note: Mean ± SE within an row followed by different letters are significantly different (One-way ANOVA, $P< 0.05$)

4.2.3 转基因玉米花粉对异色瓢虫成虫的生物学影响

转基因玉米 N30、V3 和 J223 花粉饲喂的瓢虫雌虫 30 d 的存活率与对照差异不大（表 4.3）。取食 N30 花粉的瓢虫存活率与对照均为 72.0%，差异不显著（$\chi^2 = 0.124$，df=1，$P = 0.7248$），取食 V3 花粉的雌虫存活率稍低，为 64.0%，但和非转基因对照差异不显著（$\chi^2 = 0.343$，df=1，$P = 0.5582$），取食 J223 花粉的雌虫存活率为 76.0%，与对照差异不显著（$\chi^2 = 0.152$，df=1，$P = 0.6967$），仅取食蜂蜜水的瓢虫存活率较低，仅为 48.0%，但与非转基因对照玉米花粉没有统计学上差异（$\chi^2 = 3.816$，df=1，$P = 0.0508$）。

取食转基因玉米和非转基因玉米花粉的瓢虫产卵前期为 14.13-15.26 d（表 4.3），各处理间没有显著差异（$F_{\text{pre-ovi}} = 0.194$，df = 3，73，$P = 0.9004$），仅取食蜂蜜水的瓢虫未能产卵，说明花粉是补充营养。取食 V3 花粉的雌虫平均产卵量最高，达 108.06 粒，N30 和 J223 分别为 80.88 粒和 88.79 粒，与对照差异不显著（$F_{\text{fecundity}} = 0.614$，df = 3，68，$P = 0.6085$）。取食转基因玉米 N30、V3 和 J223 花粉的瓢虫卵孵化率分别为 90.50%，90.50%和 93.00%，与对照 90.50%差异不显著（$F_{\text{hatching}} = 0.219$，df = 3，15，$P = 0.8811$）.

万方数据

表 4.3 转基因玉米和非转基因玉米花粉对异色瓢虫雌虫存活和生殖影响

Table 4.3 Impact of pollen consumption from transgenic Bt maize lines or the non-transformed control on survival and reproduction of adult *Harmonia axyridis*

Treatment	Survival (%) [a]	Pre-oviposition period (days ± SE)	Total fecundity (± SE)	Eggs hatching rate (% ± SE)
N30	72.0a	15.26 ± 1.17 (20) a	80.88 ± 11.33 (16) a	90.50 ± 3.86 (4) a
V3	64.0a	14.13 ± 1.19 (17) a	108.06 ± 15.87 (16) a	90.50 ± 2.50 (4) a
J223	76.0a	15.00 ± 1.06 (19) a	88.79 ± 11.33 (19) a	93.00 ± 2.52 (4) a
Control	72.0a	14.53 ± 1.14 (18) a	90.44 ± 16.41 (18) a	90.50 ± 2.22 (4) a
Honey	48.0a	-	-	-

平均数 ±SE，相同列的同一字母表示无显著差异（One-way ANOVA，LSD，P> 0.05）

[a] 每一个处理与对照比较（Wilcoxon test，P> 0.05）

- 只取食蜂蜜水的异色瓢虫雌虫没有产卵

Note: Means (± SE) within a column followed by same letters are not significantly different (One-way ANOVA, LSD, P> 0.05). [a] Means of the Bt maize lines and honey treatments are compared to the control using Wilcoxon test (α = 0.05). - No eggs for the female adults which only fed on honey.

比较实验初与实验开始后 7 d、30 d 各处理瓢虫的体重（图 4.2）。实验开始时，5 个处理的雌成虫和雄成虫体重分别在 26.26-27.65 mg 和 23.32-24.44 mg 之间，各处理间没有显著差异（F_{female} = 0.553, df = 4, 124, P = 0.6973; F_{male} = 0.722, df = 4, 124, P = 0.5786）。7 d 后，仅取食蜂蜜水的雌虫平均体重为 30.34 mg，平均增加 2.73 mg，雄虫平均体重为 25.80 mg，平均增加 2.16 mg，取食转基因玉米花粉的雌虫体重则达到 36.45-37.76 mg，平均增加 9.37-10.11 mg，雄虫体重达到 29.59-30.23 mg，平均增加 5.77-6.57 mg。取食非转基因对照玉米花粉的雌虫体重由最初的 26.26 mg 增加到 34.99 mg，平均增加 8.72 mg，雄虫体重由 23.32 mg 增加到 28.42 mg，平均增加 5.11 mg。利用单因素方差分析得出仅取食蜂蜜水的瓢虫雌虫和雄虫体重显著低于取食花粉的雌虫和雄虫体重，取食转基因玉米花粉和非转基因玉米花粉的雌虫体重没有显著差异，雄虫体重也没有显著差异（F_{female} = 4.531，df = 4，104，P = 0.0021；F_{male} = 3.682，df = 4，95，P = 0.0080）。与第

万方数据

7 d 相比，第 30 d 瓢虫体重没有明显增加或下降，仅取食蜂蜜水的雌虫平均体重仍显著低于取食花粉的雌虫，但取食 V3 和 J223 花粉的雌虫平均体重分别为 39.83 mg 和 40.74 mg，显著高于取食非转基因玉米的雌虫体重 35.97 mg，取食 N30 花粉的雌虫平均体重为 38.99 mg，与对照差异不显著（F_{female} = 8.429，df = 4，80，P = 0.0000）。仅取食蜂蜜水的雄虫第 30 d 平均体重为 25.45 mg，比取食非转基因对照玉米花粉和 V3、J223 花粉的雄虫低 4.11-5.13 mg，差异显著，比取食 N30 花粉的雄虫低 3.15 mg，差异不显著（F_{male} = 3.767，df = 4，52，P = 0.0096）。

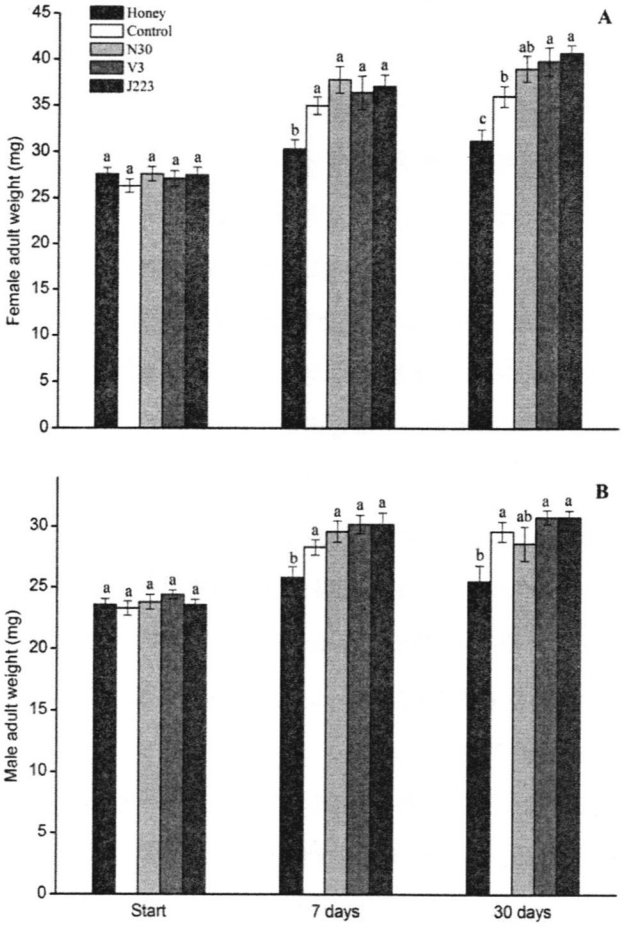


图 4.2 转基因玉米对异色瓢虫成虫体重（± SE）的影响

A. 雌成虫重（mg）B. 雄成虫重（mg）

Fig. 4.2 Impact of feeding transgenic Bt maize and non-Bt maize pollens on adult weight (± SE) of *Harmonia axyridis*. A. Female adult (mg) B. Male adult (mg)

万方数据

4.3 讨论

异色瓢虫可以通过猎物甜菜夜蛾和玉米花粉间接和直接的接触到转基因玉米表达的 Bt 蛋白，而且 Bt 蛋白含量沿着食物链的流动含量降低，这与其他报道一致。Cry1F 在转 *cry1F* 玉米、草地贪夜蛾和具斑食蚜瓢虫 *Coleomegilla maculata*（DeGeer）三级营养关系中亦呈下降趋势，叶片中 Cry1F 含量为 2.38-4.33μg/g FW，草地贪夜蛾体内 Cry1F 含量为 96.9-211.8ng/g FW，瓢虫幼虫所含 Cry1F 含量比草地贪夜蛾低 3-10 倍，仅为 20-32 ng/g FW，表现为 4 龄幼虫含量最高，蛹重含量最低，成虫检测不到 Cry1F 蛋白(Tian et al. 2012)。

转 Bt 基因玉米 N30 和 J223 通过猎物甜菜夜蛾对异色瓢虫的存活没有不利影响，取食 V3 饲喂的甜菜夜蛾的瓢虫存活率显著低于取食非转基因对照饲养的瓢虫，但其他生物学指标如发育历期和蛹重等与对照相比没有显著差异，而且 3 龄瓢虫的发育历期甚至比对照短。虽然 J223 处理的猎物饲喂瓢虫后，其 2 龄幼虫的发育历期比对照延长，但整体发育历期没有显著差异。与非转基因对照相比，三种 Bt 玉米对瓢虫的产卵量和繁殖力也没有明显的负面影响。总体来看，这一研究结果与其他关于瓢虫的报道一致。用抗 Cry1F 的草地贪夜蛾体饲喂深点深点食螨瓢虫，没有发现瓢虫及后代的生物学指标与对照有差异(Tian et al. 2012)。表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的转基因棉 BollGard®II 对具斑食蚜瓢虫的生长发育没有影响，转 *cry1Ac* 棉对龟纹瓢虫及后代的各项生物学指标无显著影响，转 *cry1Ab* 水 98 稻通过花粉及猎物褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Stål）对龟纹瓢虫存活、发育历期和繁殖力等也没有显著影响(Bai et al. 2005, Bai et al. 2006, Zhang et al. 2006, Zhu et al. 2006, Li et al. 2011)。

瓢虫可以通过取食花粉直接接触到 Bt 蛋白，玉米散粉期间，田间瓢虫数量显著增多，卵块也增加，解剖发现瓢虫幼虫和成虫肠道内含有大量花粉(Lundgren et al. 2004, Lundgren et al. 2005)。因此，检测 Bt 玉米花粉对瓢虫成虫生殖力的影响非常重要。取食三种 Bt 玉米的瓢虫雌虫的存活率、产卵前期、产卵量和卵孵化率与取食非 Bt 玉米雌虫没有显著差异，除 J223 的存活率比对照低之外，N30 和 V3 的存活率都高于对照，虽然只取食蜂蜜水的雌虫的存活率与其他处理没达到显著差异，但只有 48%的雌虫存活，而且未能产卵，说明这三种 Bt 玉米花粉能为雌虫繁殖后代提供必要的营养，而且对其繁殖力未有负面影响。另外，用三

万方数据

种 Bt 玉米花粉饲喂的雌虫和雄虫体重在总体上与非 Bt 玉米花粉饲喂的雌雄虫没有显著性的差异，甚至在多数情况下要稍高于对照，说明瓢虫接受对 Bt 玉米花粉作为其食物来源。关于 Bt 作物花粉对瓢虫的影响，有很多研究也得出相似结果。对异色瓢虫发育历期和体重没有影响，而且多数龄期内取食转基因玉米花粉的异色瓢虫体内的 α-乙酸萘酯酶活性、乙酰胆碱酯酶活性以及谷光甘肽-S-转移酶活性与对照组相比没有显著差异(张永军等. 2005)。与对照相比，含有不同比例的转 *cry3Bb1* 玉米（MON863）花粉的人工饲料对具斑食蚜瓢虫的适合度指标没有影响，而且取食 Cry3Bb1 花粉和蚜虫的具斑食蚜瓢虫比只取食蚜虫和人工饲料的瓢虫发育历期短、存活率高、蛹重增加(Lundgren and Wiedenmann 2002)。同样，MON863 花粉（Cry3Bb）对茄二十八星瓢虫 *Epilachna vigintioctopunctata*（Fabricius）的生长发育也没有不利影响(Shirai 2006)。转 *cry1Ab* 玉米花粉（MON810）对取食转 *cry1Ah* 玉米花粉的龟纹瓢虫 *Propylea japonica*（Thunberg）的各龄期幼虫的发育历期和存活率与取食对照花粉的幼虫相比稍有差异，但幼虫总发育历期、蛹期和成虫寿命均无显著差异。取食含有 Cry1Ah 花粉的龟纹瓢虫 4 龄幼虫和蛹的 α-乙酸萘酯酶及蛹的弱碱性类胰凝蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性显著低于取食非 Bt 玉米花粉的龟纹瓢虫。由此可见，龟纹瓢虫取食含有 Cry1Ah 杀虫蛋白的玉米花粉后，体内代谢解毒酶和中肠蛋白酶与 Cry1Ah 杀虫蛋白相互作用，可能会引起某些酶活性的变化(崔蕾等. 2011a, b)。

万方数据

第五章 总讨论

转 Bt 基因抗虫玉米是目前世界上种植面积最广的转基因作物之一，自 1996 年商业化推广以来，已有 17 个国家种植转 Bt 基因玉米，至 2012 年，具有 Bt 抗虫性状的玉米的种植面积超过 6 千万公顷，占玉米总种植面积的 35%。然而靶标害虫会对 Bt 玉米产生抗性一直威胁着 Bt 玉米的可持续利用，而且 Bt 玉米的生态安全性也是人们关注的焦点。目前，将多个杀虫基因转入同一植株成为开发抗虫转基因玉米的趋势，大量实验数据表明，转入多个抗虫基因的玉米不但能扩大杀虫范围，增强抗虫性，对延缓害虫抗性产生和抗性治理方面也具有极大的优势。

1 转 Bt 基因玉米对四种靶标害虫的抗虫性评估

本研究测试的三种转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米能够有效控制心叶期和穗期亚洲玉米螟为害，室内生测表明心叶、雄穗、花丝、苞叶、雌穗等玉米螟主要为害部位的抗虫性很高。田间抗虫性鉴定结果显示转 Bt 基因玉米叶片和雌穗基本没有被亚洲玉米螟为害，茎秆中没有发现蛀孔和存活的幼虫，其抗虫效果与 MON810 和 Bt11 相似，但 MON810 植株中 Cry1Ab 含量随生长而下降，籽粒中 Cry1Ab 含量是叶片的 1/30，只有 0.31 ng/mg(FW)(AGBIOS)。本试验所用 Bt 玉米花丝和雌穗中 Cry1Ab 含量在 20.93 ng/mg（DW）以上，中国不同地理种群亚洲玉米螟对 Cry1Ab 蛋白的敏感基线为 0.10-0.81 ng/mg(Diet)，Bt 玉米中 CryAb 的含量是其 10 倍以上，足以杀死敏感的玉米螟。

表达 Cry1Ab 的玉米对其他靶标害虫如棉铃虫和粘虫有很好的防治作用，但对 Cry1Ab 不太敏感的甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的防治效果较差(郭建英等. 2003, 王振营等. 2005, 常雪艳等. 2006, 常雪等. 2007)。本试验所用 Bt 玉米对棉铃虫和斜纹夜蛾有很好的防治效果，取食 Bt 玉米叶片和雌穗的棉铃虫和斜纹夜蛾不能存活，虽然对甜菜夜蛾没有明显的致死作用，但可以抑制甜菜夜蛾的生长发育，在一定程度上控制其为害。

以上结果说明转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米不但可以控制玉米主要害虫亚洲玉米螟为害，也能够控制次要害虫棉铃虫、甜菜夜蛾和

万方数据

斜纹夜蛾为害，有较宽的抗虫范围。

2 转 Bt 基因玉米在害虫抗性治理方面的潜力

转多基因作物是延缓害虫抗性产生和抗性治理的有效方法，因为害虫几乎不可能同时对 2 种或 2 种以上的 Bt 蛋白产生抗性。大量的室内和田间试验表明，表达多个 Bt 杀虫蛋白的转基因作物能够杀死已经对其中一种 Bt 蛋白产生高抗的害虫。如表达 Cry1Ac 和 Cry2Ab 的 Bt 棉可以完全控制已经对 Cry1Ac 产生抗性的棉红铃虫为害，该虫在 *cry1Ac* 棉和非 Bt 棉上的存活率分别是 22.4%和 20.4% (Tabashnik et al. 2002)。

本试验中转 *cry1Ab/cry2Aj* 和 *cry1Ab/vip3DA* 玉米的花丝和雌穗对 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟有很高的抗虫效果，而转 *cry1Ab/cry1I* 玉米则对其无效。转 *cry1Ab/cry2Aj* 玉米花丝中表达的 CryAb 不足以杀死所有的 CryAb 抗性玉米螟，而据报道 Cry2A 对欧洲玉米螟有很好的杀虫效果，亚洲玉米螟和欧洲玉米螟对 Bt 蛋白的敏感度和抗性机理相似，所以推测转 *cry1Ab/cry2Aj* 玉米融合的 Cry2Aj 在抗 Cry1Ab 抗性玉米螟中起到关键作用(Huang and McGaughey 1999, He et al. 2007, Tan et al. 2011, Storer et al. 2012)。关于 Vip3 对欧洲玉米螟的杀虫效果存在两种截然相反的研究结果，Estruch 等（1996）报道 Vip3A 对欧洲玉米螟没有杀虫作用，Palma 等（2012）报道 Vip3C 对欧洲玉米螟低毒，但 Fang 等（2007）报道 N 端来自 Vip3Ac1，C 端来自 Vip3Aa1 的嵌合蛋白（chimeric protein）Vip3AcAa, 对欧洲玉米螟有杀虫活性(Fang et al. 2007)。本试验没有对 Vip3DA 蛋白对亚洲玉米螟的杀虫活性进行单独测定，由于实验技术限制，亦无法获得其在玉米植株中确切的表达含量。虽然本试验未能证实是 Cry1Ab，还是 Vip3DA，又或者两者同时对抗性玉米螟起杀虫作用，但生测结果表明 V3 穗期对抗性玉米螟的防治效果优于 MON810，取食 MON810 花丝的 Cry1Ab 抗性玉米螟可以存活至化蛹，而取食 V3 花丝和雌穗的抗性玉米螟第 7 天全部死亡(Xu et al. 2010)。CryI 对亚洲玉米螟有杀虫活性，但玉米螟对其的敏感性要远低于 Cry1Ab 和 Cry1Ac，其 LC_{50} 比 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的 LC_{50} 高 10 倍(韩海亮等. 2009)。因此，推测玉米螟在一定程度上的耐受 Cry1I 使 J223 没有杀虫效果的原因，但是其具体原因还需进一步验证。

万方数据

3 转 Bt 基因玉米对经济昆虫家蚕的安全性评价

家蚕是我国重要的经济昆虫，与目前主要转 Bt 基因抗虫玉米靶标害虫同属鳞翅目。抗虫转基因玉米的商业化种植是否会对家蚕造成不利影响，是人们非常关注的问题。研究表明，Bt 水稻花粉可随风飘落于稻田附近的桑树上，而且不同启动子的 Bt 水稻花粉对家蚕的影响不同，启动子是 ubiquitin 的 Bt 水稻花粉对家蚕的生长发育存在不利影响。玉米比水稻植株高，散粉量大，虽然有报道 Bt 玉米 MON810 对家蚕的生存和生长发育没有任何不利影响，主要是由于 MON810 花粉中 Cry1Ab 蛋白含量非常低，只有 0.09 μg/g（FW）（AGBIOS）。

本试验中转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米的花粉在桑叶上的密度达到 100 粒/cm^2 时，对家蚕的生长发育基本没有影响，在 1000 粒/cm^2 时，对家蚕的生长发育有抑制作用，在 10000 粒/cm^2 时，对家蚕有致死作用。而且 Bt 玉米花粉对不同龄期家蚕幼虫影响程度不同，蚁蚕对 Bt 花粉比较敏感，死亡率和体重抑制率较明显，5 龄幼虫虽然取食量大，摄入花粉较多，但大部分花粉粒没有被消化而直接排出体外，而且 5 龄家蚕粪便中含有大量完整的花粉粒，说明家蚕无法消化花粉粒壁，只能通过肠道内的酶分解或渗透作用消化花粉，所以实际接触到的杀虫蛋白浓度很低，这也可能是低浓度的 Bt 花粉对家蚕无影响的原因。

虽然本试验 Bt 花粉会对家蚕生长发育产生不利影响，但实际生态环境中很难达到室内试验设置的密度 1000 粒/cm^2。在玉米地里的马利筋叶片上 Bt 玉米花粉平均为 170. 6 粒/ cm^2，随着距玉米地边缘的距离增大，花粉密度显著降低，当距离为 2 m 时，下降到 14. 2 粒/ cm^2(Pleasants et al. 2001)。另一篇调查结果表明，在距离 Bt 玉米地边缘 0.5 m 和 1.0 m 的马利筋叶片上最高平均花粉浓度分别可达 260 和 170 粒/ cm^2(Zangerl et al. 2001)。桑叶表面光滑，桑树比马利筋高，降雨冲刷、风力和人为采集桑叶时的抖动都会降低桑叶上的花粉密度。而且 Bt 玉米的散粉量受品种、栽培环境、当地气候和地理条件的影响，因此这三种转 Bt 基因玉米对家蚕产生影响的几率很小。

万方数据

4 转 Bt 基因玉米对捕食性天敌瓢虫的安全性评价

瓢虫是一类常见而且种类丰富的天敌昆虫，幼虫和成虫都有捕食性，是转基因作物环境安全性评价的重要非靶标生物。瓢虫食性很广，可以捕食蚜虫、蓟马、鳞翅目幼虫及卵，在食物匮乏时也取食植物组织，如花粉。瓢虫可以通过猎物和花粉间接或直接接触到 Bt 蛋白，在已发表的文献中，大部分报道表明转 Bt 基因玉米对瓢虫没有不利影响，但也有人对 Bt 蛋白对瓢虫的安全性提出质疑，而且曾一度因此产生争论，双方都提供实验数据支持自己的观点(Hilbeck et al. 2012, Romeis et al. 2012)。

根据 case-by-case 原则，本实验评估转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 和 *cry1Ab/cry1I* 玉米对异色瓢虫生长发育及成虫繁殖力的影响，为该玉米的环境安全性评估提供数据支持。异色瓢虫通过猎物甜菜夜蛾可以接触到 Bt 蛋白，但其存活、生长发育、体重和生殖力等生物学性状未受影响，而且 Bt 蛋白未在瓢虫体内富集。异色瓢虫雌成虫取食 Bt 玉米花粉可以正常产卵，生殖力与取食非 Bt 玉米花粉的雌成虫没有差异，但仅取食蜂蜜水的雌成虫未能产卵，说明 Bt 玉米花粉能为雌成虫繁殖后代提供必要的营养，而且对其繁殖力未有负面影响。这一结果与其他研究结果类似(Zhu et al. 2006, Li and Romeis 2010, Tian et al. 2012)。

综上所述，转 *cry1Ab/cry2Aj* 和 *cry1Ab/vip3DA* 玉米对靶标害虫亚洲玉米螟、棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾有很高的抗虫性，且具有控制 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟的潜力，对非靶标昆虫家蚕和天敌异色瓢虫无不利影响，因此推荐转 *cry1Ab/cry2Aj* 和 *cry1Ab/vip3DA* 玉米作为开发新型抗虫转基因玉米的备选材料。

创新点

- 较全面地评价了三种表达 2 种 Bt 蛋白的转基因玉米对主要靶标害虫及次要靶标害虫的抗虫性，明确其抗虫范围；
- 初步研究了这三种转 Bt 基因玉米对 Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟的抗虫效果，探讨其在玉米螟的抗性治理上的应用潜力；
- 明确了这三种 Bt 玉米花粉在桑叶上达到一定密度时会对非靶标经济昆虫家蚕产生致死作用或对其生长发育带来不利影响，但实际生产中桑叶上很难达

万方数据

到这一密度；

- 明确了捕食性天敌异色瓢虫可以通过猎物或花粉接触到这三种 Bt 玉米表达的杀虫蛋白，但其生存及生长发育、成虫的体重和繁殖力没有显著影响，而且 Bt 蛋白通过食物链的流动呈下降趋势，没有在天敌体内积累和富集。
- 目前，将多个杀虫基因转入同一植株是开发抗虫转基因作物的趋势，本论文评价了针对我国玉米生产的实际情况而开发的 Bt 玉米的抗虫性及其在延缓害虫抗性产生和抗性治理上的潜力，并评估了其对非靶标生物的风险，为我国玉米育种提供备选材料，并为其环境释放提供实验数据和理论支持。

今后的研究方向

本论文基本全面地评价了三种转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA*、*cry1Ab/cry1I* 玉米对靶标害虫的抗虫性，及对非靶标生物家蚕和瓢虫的影响，但受实验材料的限制，没有评价 Cry2Aj 蛋白、Vip3DA 蛋白、Cry1I 蛋白对靶标与非靶标昆虫的影响，及其与 Cry1Ab 蛋白的交互抗性或协同作用。另外没有深入研究家蚕和瓢虫在暴露于 Bt 蛋白后其生理上的变化，未提出瓢虫不受 Bt 蛋白影响的分子生物学证据。这些不足之处都是今后主要的研究内容和方向。

万方数据

参考文献.

Adamczyk Jr, J., and J. Gore. 2004. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F, and both Cry1Ac and Cry1F (widestrike®) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Fla Entomol 87: 427-432.

Adamczyk Jr, J., L. Adams, and D. Hardee. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. J Econ Entomol 94: 1589-1593.

Adamczyk Jr, J., S. Greenberg, J. Armstrong, W. Mullins, L. Braxton, R. Lassiter, and M. Siebert. 2008. Evaluations of Bollgard®, Bollgard II®, and Widestrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Fla Entomol 91: 531-536.

[AGBIOS] Agriculture and Biotechnology Strategies Incorporated. 2001. Crop database, MON810. Essential Biosafety. (http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=ShowProd&data=MON810).

Alvarez-Alfageme, F., F. Bigler, and J. Romeis. 2011. Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. Transgenic Res 20: 467-479.

Archer, T., C. Patrick, G. Schuster, G. Cronholm, E. Bynum Jr, and W. Morrison. 2001. Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuriengiensis* transgenic maize. Crop Prot 20: 139-144.

Bai, Y., M. Jiang, and J. Cheng. 2005. Effects of transgenic cry1Ab rice pollen on fitness of *Propylea japonica* (Thunberg). J Pest Sci 78: 123-128.

Bai, Y., M. Jiang, J. Cheng, and D. Wang. 2006. Effects of Cry1Ab toxin on *Propylea japonica* (Thunberg)(Coleoptera: Coccinellidae) through its prey, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae), feeding on transgenic Bt rice. Environ Entomol 35: 1130-1136.

万方数据

Ballester, V., F. Granero, B. E. Tabashnik, T. Malvar, and J. Ferré. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl Environ Microb 65: 1413-1419.

Bates, S. L., J. Z. Zhao, R. T. Roush, and A. M. Shelton. 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. Nat Biotechnol 23: 57-62.

Beegle, C. C., and T. Yamamoto. 1992. Invitation paper (CP Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. The Canadian Entomologist 124: 587-616.

Chen, H., W. Tang, C. Xu, X. Li, Y. Lin, and Q. Zhang. 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. TAG Theoretical and Applied Genetics 111: 1330-1337.

Chitkowski, R., S. Turnipseed, M. Sullivan, and W. Bridges Jr. 2003. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two Bacillus thuringiensis var. kurstaki Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. J Econ Entomol 96: 755-762.

Christou, P., T. Capell, A. Kohli, J. A. Gatehouse, and A. M. Gatehouse. 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. Trends in Plant Science 11: 302-308.

Crespo, A. L., A. Rodrigo-Simón, H. A. Siqueira, E. J. Pereira, J. Ferré, and B. D. Siegfried. 2011. Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. J Invertebr Pathol 107: 185-192.

Dhurua, S., and G. T. Gujar. 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. Pest Manag Sci 67: 898-903.

Dively, G. P. 2005. Impact of transgenic VIP3A × Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. Environ Entomol 34: 1267-1291.

Duan, J. J., M. Marvier, J. Huesing, G. Dively, and Z. Y. Huang. 2008. A

万方数据

meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). Plos One 3: e1415.

Dutra, C. C., R. L. Koch, E. C. Burkness, M. Meissle, J. Romeis, W. D. Hutchison, and M. G. Fernandes. 2012. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) exhibits no preference between Bt and non-Bt maize fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Plos One 7: e44867.

Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5389-5394.

Fang, J., X. Xu, P. Wang, J. Z. Zhao, A. M. Shelton, J. Cheng, M. G. Feng, and Z. Shen. 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. Appl. Environ. Microbiol. 73: 956-961.

Faria, C. A., F. L. Wäckers, J. Pritchard, D. A. Barrett, and T. C. Turlings. 2007. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. Plos One 2: e600.

Farinós, G. P., M. De La Poza, P. Hernández - Crespo, F. Ortego, and P. Castañera. 2003. Resistance monitoring of field populations of the corn borers Sesamia nonagrioides and Ostrinia nubilalis after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. Entomologia Experimentalis Et Applicata 110: 23-30.

García, M., F. Ortego, P. Castañera, and G. P. Farinós. 2010. Effects of exposure to the toxin Cry1Ab through Bt maize fed-prey on the performance and digestive physiology of the predatory rove beetle *Atheta coriaria*. Biol Control 55: 225-233.

Gassmann, A. J., J. L. Petzold-Maxwell, R. S. Keweshan, and M. W. Dunbar. 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. Plos One 6: e22629.

Ghimire, M. N., F. Huang, R. Leonard, G. P. Head, and Y. Yang. 2011. Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis*

万方数据

genes. Crop Prot. 30: 74-81.

Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoxins. Annu Rev Entomol 37: 615-634.

Gouffon, C., A. Van Vliet, J. Van Rie, S. Jansens, and J. Jurat-Fuentes. 2011. Binding Sites for Bacillus thuringiensis Cry2Ae Toxin on Heliothine Brush Border Membrane Vesicles Are Not Shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A Toxin. Appl Environ Microb 77: 3182-3188.

Gould, F., M. B. Cohen, J. Bentur, G. G. Kennedy, and J. Van Duyn. 2006. Impact of small fitness costs on pest adaptation to crop varieties with multiple toxins: a heuristic model. J Econ Entomol 99: 2091-2099.

Guo, S., C. Zhang, X. Lin, Y. Zhang, K. He, F. Song, and J. Zhang. 2011. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. Protein Expression and Purification 78: 204-208.

Hanley, A. V., Z. Y. Huang, and W. L. Pett. 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of Apis mellifera and Galleria mellonella. Journal of Apicultural Research 42: 77-81.

Harwood, J. D., W. G. Wallin, and J. J. Obrycki. 2005. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. Molecular Ecology 14: 2815-2823.

He, K., Z. Wang, D. Zhou, L. Wen, Y. Song, and Z. Yao. 2003a. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J Econ Entomol 96: 935-940.

He, K., Z. Wang, D. Zhou, L. Wen, Y. Song, and Z. Yao. 2003b. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). J Econ Entomol 96: 935-940.

He, K., Z. Wang, L. Wen, S. Bai, X. Ma, and Z. Yao. 2005. Determination of baseline susceptibility to Cry1Ab protein for Asian corn borer (Lep., Crambidae). J Appl Entomol 129: 407-412.

He, K., X. Chang, X. Chang, Z. Wang, N. Ferry, and A. Gatehouse. 2007. Inheritance and molecular mechanism of the resistance of Asian corn borer to

万方数据

Cry1Ab. Plant protection 33: 92-93.

Hellmich, R. L., R. Albajes, D. Bergvinson, J. R. Prasifka, Z. Y. Wang, and M. J. Weiss. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs: 119-158.

Hellmich, R. L., B. D. Siegfried, M. K. Sears, D. E. Stanley-Horn, M. J. Daniels, H. R. Mattila, T. Spencer, K. G. Bidne, and L. C. Lewis. 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. Proc Natl Acad Sci USA 98: 11925-11930.

Hendriksma, H. P., S. Härtel, and I. Steffan-Dewenter. 2011. Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt-maize on in vitro reared honey bee larvae. Plos One 6: e28174.

Hernández-Rodríguez, C. S., A. Van Vliet, N. Bautsoens, J. Van Rie, and J. Ferré. 2008. Specific binding of Bacillus thuringiensis Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of Helicoverpa species. Appl Environ Microb 74: 7654-7659.

Hilbeck, A., M. Baumgartner, P. M. Fried, and F. Bigler. 1998a. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla cornea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environ Entomol 27: 480-487.

Hilbeck, A., W. J. Moar, M. Pusztai-Carey, A. Filippni, and A. Bigler. 1998b. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environ Entomol 27: 1255-1263.

Hilbeck, A., W. J. Moar, M. Pusztai - Carey, A. Filippini, and F. Bigler. 1999. Prey - mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator Chrysoperla carnea. Entomologia Experimentalis Et Applicata 91: 305-316.

Hilbeck, A., J. M. McMillan, M. Meier, A. Humbel, J. Schläpfer-Miller, and M. Trtikova. 2012. A controversy re-visited: Is the coccinellid *Adalia bipunctata* adversely affected by Bt toxins? Environmental Sciences Europe 24: 1-12.

万方数据

Huang, F., and W. McGaughey. 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. Science 284: 965-967.

Huang, F., B. R. Leonard, and X. Wu. 2007. Resistance of sugarcane borer to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. Entomol Exp Appl 124: 117-123.

Huang, F., D. A. Andow, and L. L. Buschman. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. Entomol Exp Appl 140: 1-16.

Jackson, R., J. Bradley Jr, J. Van Duyn, and F. Gould. 2004. Comparative production of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) from transgenic cotton expressing either one or two *Bacillus thuringiensis* proteins with and without insecticide oversprays. J Econ Entomol 97: 1719-1725.

Jackson, R., M. Marcus, F. Gould, J. Bradley, and J. Van Duyn. 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. J Econ Entomol 100: 180-186.

James C. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 37, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA. 2013

Jouanin, L., M. Bonadé-Bottino, C. Girard, G. Morrot, and M. Giband. 1998. Transgenic plants for insect resistance. Plant Sci 131: 1-11.

Karim, S., S. Riazuddin, F. Gould, and D. H. Dean. 2000. Determination of Receptor Binding Properties of *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxins to Cotton Bollworm (*Helicoverpa zea*) and Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) Midgut Brush Border Membrane Vesicles. Pesticide Biochemistry and Physiology 67: 198-216.

Lawo, N. C., F. L. Wäckers, and J. Romeis. 2009. Indian Bt cotton varieties do not affect the performance of cotton aphids. Plos One 4: e4804.

Lee, M. K., F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J.-S. Chen. 2003. The mode of action of the Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A

万方数据

differs from that of Cry1Ab δ-endotoxin. Appl Environ Microb 69: 4648-4657.

Li, W., K. Wu, X. Wang, G. Wang, and Y. Guo. 2005. Impact of pollen grains from Bt transgenic corn on the growth and development of Chinese tussah silkworm, *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). Environ Entomol 34: 922-928.

Li, Y., and J. Romeis. 2010. *Bt* maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite,*Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. Biol Control 53: 337-344.

Li, Y., M. Meissle, and J. Romeis. 2008. Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Plos One 3: e2909.

Li, Y., M. Meissle, and J. Romeis. 2010. Use of maize pollen by adult *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) and fate of Cry proteins in *Bt*-transgenic varieties. Journal of Insect Physiology 56: 157-164.

Li, Y., J. Romeis, P. Wang, Y. Peng, and A. M. Shelton. 2011. A comprehensive assessment of the effects of Bt cotton on *Coleomegilla maculata* demonstrates no detrimental effects by Cry1Ac and Cry2Ab. Plos One 6: e22185.

Lian, Y., Z. Jia, K. He, Y. Liu, F. Song, B. Wang, and G. Wang. 2008. Transgenic tobacco plants expressing synthetic Cry1Ac and Cry1Ie genes are more toxic to cotton bollworm than those containing one gene. Chinese Science Bulletin 53: 1381-1387.

Liu, F., Z. Xu, Y. C. Zhu, F. Huang, Y. Wang, H. Li, H. Li, C. Gao, W. Zhou, and J. Shen. 2009. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. Pest Management Science 66: 155-161.

Lu, Y., F. Qiu, H. Feng, H. Li, Z. Yang, K. Wyckhuys, and K. Wu. 2008. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. Crop Protection 27: 465-472.

Lumbierres, B., R. Albajes, and X. Pons. 2004. Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. Ecological Entomology 29: 309-317.

万方数据

Lundgren, J. G., and R. N. Wiedenmann. 2002. Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera: Coccinellidae). Environ Entomol 31: 1213-1218.

Lundgren, J. G., and R. N. Wiedenmann. 2005. Tritrophic interactions among Bt (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). Environ Entomol 34: 1621-1625.

Lundgren, J. G., A. A. Razzak, and R. N. Wiedenmann. 2004. Population responses and food consumption by predators *Coleomegilla maculata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. Environ Entomol 33: 958-963.

Lundgren, J. G., A. Huber, and R. N. Wiedenmann. 2005. Quantification of consumption of corn pollen by the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. Agr Forest Entomol 7: 53-60.

Luo, S., K. Wu, Y. Tian, G. Liang, X. Feng, J. Zhang, and Y. Guo. 2007. Cross-resistance studies of Cry1Ac-resistant strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab. J Econ Entomol 100: 909-915.

Manyangarirwa, W., M. Turnbull, G. McCutcheon, and J. Smith. 2006. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: How sustainable is this strategy? Afr J Biotechnol 5.

McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science (New York, NY) 229: 193.

Meihls, L. N., M. L. Higdon, B. D. Siegfried, N. J. Miller, T. W. Sappington, M. R. Ellersieck, T. A. Spencer, and B. E. Hibbard. 2008. Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant greenhouse selection. Proc Natl Acad Sci USA 105: 19177-19182.

Meissle, M., E. Vojtech, and G. M. Poppy. 2005. Effects of Bt maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L.(Coleoptera: Carabidae). Transgenic Res 14: 123-132.

万方数据

Meissle, M., J. Romeis, and F. Bigler. 2011. Bt maize and integrated pest management - a European perspective. Pest Manag Sci 67: 1049-1058.

Naranjo, S. E., J. R. Ruberson, H. C. Sharma, L. Wilson, and K. Wu. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified cotton in IPM. Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs: 159-194.

Nguyen, H. T., and J. A. Jehle. 2009. Expression of Cry3Bb1 in transgenic corn MON88017. J Agr Food Chem 57: 9990-9996.

Obrist, L., A. Dutton, J. Romeis, and F. Bigler. 2006a. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. Biocontrol 51: 31-48.

Obrist, L. B., H. Klein, A. Dutton, and F. Bigler. 2006b. Assessing the effects of Bt maize on the predatory mite *Neoseiulus cucumeris*. Experimental & applied acarology 38: 125-139.

Pereira, E. J., B. A. Lang, N. P. Storer, and B. D. Siegfried. 2007. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. Entomologia Experimentalis Et Applicata 126: 115-121.

Pigott, C. R., and D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol R 71: 255-281.

Pleasants, J. M., R. L. Hellmich, G. P. Dively, M. K. Sears, D. E. Stanley-Horn, H. R. Mattila, J. E. Foster, P. Clark, and G. D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. Proc Natl Acad Sci USA 98: 11919-11924.

Rahman, M. M., H. L. Roberts, and O. Schmidt. 2004. The development of the endoparasitoid *Venturia canescens* in Bt-tolerant, immune induced larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. J Invertebr Pathol 87: 129-131.

Ramirez-Romero, R., J. Chaufaux, and M. Pham-Delegue. 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative

万方数据

approach. Apidologie 36: 601.

Ramirez-Romero, R., J. S. Bernal, J. Chaufaux, and L. Kaiser. 2007. Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. Crop Protection 26: 953-962.

Ramirez-Romero, R., N. Desneux, J. Chaufaux, and L. Kaiser. 2008a. Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. Pesticide Biochemistry and Physiology 91: 110-115.

Ramirez-Romero, R., N. Desneux, A. Decourtye, A. Chaffiol, and M. Pham-Delègue. 2008b. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae)? Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 327-333.

Raps, A., J. Kehr, P. Gugerli, W. Moar, F. Bigler, and A. Hilbeck. 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. Molecular Ecology 10: 525-533.

Raybould, A., D. Stacey, D. Vlachos, G. Graser, X. Li, and R. Joseph. 2007. Non-target organism risk assessment of MIR604 maize expressing mCry3A for control of corn rootworm. J Appl Entomol 131: 391-399.

Rodrigo-Simón, A., R. A. de Maagd, C. Avilla, P. L. Bakker, J. Molthoff, J. E. González-Zamora, and J. Ferré. 2006. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. Appl Environ Microb 72: 1595-1603.

Romeis, J., and M. Meissle. 2011. Non - target risk assessment of Bt crops-Cry protein uptake by aphids. J Appl Entomol 135: 1-6.

Romeis, J., F. Álvarez-Alfageme, and F. Bigler. 2012. Putative effects of Cry1Ab to larvae of *Adalia bipunctata*-reply to Hilbeck et al.(2012). Environmental Sciences Europe 24: 1-5.

万方数据

Roush, R. 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: 1777.

Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell, and P. Christou. 2011. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J 9: 283-300.

Sanders, C. J., J. K. Pell, G. M. Poppy, A. Raybould, M. Garcia-Alonso, and T. H. Schuler. 2007. Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Biol Control 40: 362-369.

Schmidt, J. E., C. U. Braun, L. P. Whitehouse, and A. Hilbeck. 2009. Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. Arch Environ Contam Toxicol 56: 221-228.

Sena, J. A., C. S. Hernández-Rodríguez, and J. Ferré. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with Spodoptera frugiperda midgut binding sites. Appl Environ Microb 75: 2236-2237.

Shelton, A. M., J. D. Tang, R. T. Roush, T. D. Metz, and E. D. Earle. 2000. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. Nat Biotechnol 18: 339-342.

Shirai, Y. 2006. Laboratory evaluation of effects of transgenic Bt corn pollen on two non-target herbivorous beetles, *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) and *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae). Appl Entomol Zool 41: 607-611.

Siqueira, H. A., D. Moellenbeck, T. Spencer, and B. D. Siegfried. 2004. Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Bacillus thuringiensis δ-endotoxins. J Econ Entomol 97: 1049-1057.

Stewart, S., J. Adamczyk, K. Knighten, and F. Davis. 2001. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner

万方数据

on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. J Econ Entomol 94: 752-760.

Storer, N. P., G. D. Thompson, and G. P. Head. 2012. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 3: 154-162.

Storer, N. P., J. M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G. D. Thompson, J. W. Bing, and R. M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. J Econ Entomol 103: 1031-1038.

Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol 39: 47-79.

Tabashnik, B. E. 2008. Delaying insect resistance to transgenic crops. Proc Natl Acad Sci USA 105: 19029-19030.

Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J Econ Entomol 83: 1671-1676.

Tabashnik, B. E., A. J. Gassmann, D. W. Crowder, and Y. Carriere. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. Nat Biotechnol 26: 199-202.

Tabashnik, B. E., G. C. Unnithan, L. Masson, D. W. Crowder, X. Li, and Y. Carrière. 2009. Asymmetrical cross-resistance between Bacillus thuringiensis toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. Proc Natl Acad Sci USA 106: 11889-11894.

Tabashnik, B. E., T. J. Dennehy, M. A. Sims, K. Larkin, G. P. Head, W. J. Moar, and Y. Carrière. 2002. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. Appl Environ Microbiol 68: 3790-3794.

Tan, S., B. Cayabyab, E. Alcantara, Y. Ibrahim, F. Huang, E. E. Blankenship, and B. D. Siegfried. 2011. Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. Crop Protection 30: 1184-1189.

万方数据

Tian, J.-C., H. L. Collins, J. Romeis, S. E. Naranjo, R. L. Hellmich, and A. M. Shelton. 2012. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. Transgenic Res: 1-8.

Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. V. Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328: 33-37.

Van Rensburg, J. 2007. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. S. Afr. J. Plant Soil 24: 147-151.

Wang, J., A. Boets, J. Van Rie, and G. Ren. 2003a. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. J Invertebr Pathol 82: 63-71.

Wang, P., K. L. He, Z. Y. Wang, and Y. L. Wang. 2012. Evaluating transgenic *cry1Ac* mazie for resistance to *Ostrinia furnacalis* (Guenée). Acta Phytophylacica Sinica 39: 395-400.

Wang, Z., Y. Wu, K. He, and S. Bai. 2007. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* in laboratory conditions. Bull Insectology 60: 49.

Wang, Z. Y., K. L. He, J. Z. Zhao, and D. R. Zhou. 2003b. Integrated pest management in China. Integrated Pest Management in the Global Arena, CABI Publishing, Wallingford/Cambridge USA: 197-207.

Wangila, D. S., B. R. Leonard, Y. Bai, G. P. Head, and F. Huang. 2012. Larval survival and plant injury of Cry1Ab-susceptible, -resistant, and -heterozygous genotypes of the sugarcane borer on transgenic corn containing single or pyramided Bt genes. Crop Prot. 42: 108-115.

Widstrom, N. 1967. An evaluation of method for measuring corn earworm injury. J Econ Entomol 60: 791-794.

Wraight, C., A. Zangerl, M. Carroll, and M. Berenbaum. 2000. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. Proc Natl Acad Sci USA 97: 7700-7703.

万方数据

Wu, X., B. Rogers Leonard, Y. C. Zhu, C. A. Abel, G. P. Head, and F. Huang. 2009. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. J Invertebr Pathol 100: 29-34.

Xu, L., Z. Wang, J. Zhang, K. He, N. Ferry, and A. M. R. Gatehouse. 2010. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins. J Econ Entomol 134: 429-438.

Yao, H. W., C. Y. Jiang, G. Y. Ye, C. Hu, and Y. F. Peng. 2008. Toxicological assessment of pollen from different Bt rice lines on *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyxidae). Environ Entomol 37: 825-837.

Yu, H. L., Y. H. Li, and K. M. Wu. 2011. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. J Integr Plant Biol 53: 520-538.

Zangerl, A. R., D. McKenna, C. Wraight, M. Carroll, P. Ficarello, R. Warner, and M. Berenbaum. 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.

Zhang, G.F., F. H. Wan, G. L. Lövei, W. X. Liu, and J. Y. Guo. 2006. Transmission of Bt toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic Bt cotton. Environ Entomol 35: 143-150.

Zhao, J. Z., J. Cao, Y. Li, H. L. Collins, R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. Nat Biotechnol 21: 1493-1497.

Zhu, S., J. Su, X. Liu, L. Du, E. N. Yardim, and F. Ge. 2006. Development and reproduction of *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) raised on *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) fed transgenic cotton. Zoological Studies 45: 98-103.

常雪，常雪艳，何康来，王振营，白树雄. 2007. 转 *crylAb* 基因玉米对粘虫的抗

万方数据

性评价. 植物保护学报 34: 225-228.

常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄. 2006. 转 Bt 基因玉米对棉铃虫的抗性评价. 植物保护学报 33 (4): 374-378.

崔蕾, 王振营, 何康来, 白树雄. 2011a. 转 *cry1Ah* 基因玉米花粉对龟纹瓢虫生长发育和成虫移动能力的影响. 中国生物防治学报 27 (4): 564-568.

崔蕾, 王振营, 何康来, 白树雄. 2011b. 转 *Bt-cry1 Ah* 基因玉米花粉对龟纹瓢虫解毒酶和中肠蛋白酶活性的影响. 生物安全学报 20: 64-68.

邓曙东, 徐静, 张青文, 周世文, 徐冠军. 2003. 转 Bt 基因棉对非靶标害虫及害虫天敌种群动态的影响. 昆虫学报 46: 1-5.

郭建英, 董亮, 万方浩. 2003. 取食转 Bt 基因棉对斜纹夜蛾幼虫存活的影响. 中国生物防治 19: 145-148.

韩海亮, 李光涛, 王振营, 张杰, 何康来. 2009. Cry1Ac 抗性亚洲玉米螟对四种 Bt 蛋白的交互抗性. 植物保护学报 36: 329-334.

韩丽珍, 刘辰, 谢柳, 李有志. 2009. 苏云金芽孢杆菌营养期杀虫蛋白 VIP3 研究进展. 基因组学与应用生物学.

何康来, 王振营. 2000. 玉米抗螟性鉴定方法与评价标准. 沈阳农业大学学报 31: 439-443.

何康来, 王振营, 文丽萍, 白树雄, 周大荣. 2005. 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟的抗性评价. 中国农学通报 20: 240-242.

黄东林, 刘汉勤, 蒋思霞. 2006. 转双价基因抗虫棉对斜纹夜蛾实验种群的影响. 植物保护学报 33: 1-5.

蒋彩英. 2004. Bt 水稻花粉对家蚕安全性评价及对家蚕安全的 Bt 菌株生物学的研究. 浙江大学.

李宁, 何康来, 崔蕾, 王振营. 2011. 转基因抗虫玉米环境安全性及我国应用前景. 植物保护 37: 18-26.

李朋波, 曹美莲, 杨六六, 刘惠民, 李燕娥. 2010. 转 *vip3* 基因作物研究进展. 山西农业科学 38: 81-84.

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影响的评价. 中国农业科学 35: 1543-1549.

万方数据

刘子绎，喻子牛. 2000. 苏云金芽抱杆菌及其杀虫晶体蛋白作用机制的研究进展. 昆虫学报 43(2): 207-213

秦厚国，汪笃栋，丁建，黄荣华，叶正襄. 2006. 斜纹夜蛾寄主植物名录. 江西农业学报 18: 51-58.

邵宗泽，喻子牛. 2001. 苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白作用的分子机制研究进展. 生物工程进展 21: 38-42.

王冬妍，王振营，何康来，丛斌，白树雄，文丽萍. 2004. Bt 玉米杀虫蛋白含量的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果. 中国农业科学 37: 1155-1159.

王玉华，黄可威. 2001. 高效 Bt 可湿性粉剂对家蚕的毒性与防治研究. 中国蚕业 22: 13-13.

王振营，何康来，文丽萍，张广义，郑礼. 2001. 第四代棉铃虫卵在华北夏玉米田的时空分布. 中国农业科学 34: 153-156.

王振营，王冬妍，何康来，白树雄，刘慧，丛斌. 2005. 转 Bt 基因玉米对甜菜夜蛾幼虫存活和发育的影响. 昆虫学报 48: 214-220.

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: 463-466.

吴研，王振营，何康来. 2008. 转 Bt 基因玉米 Bt11 花粉对玉米螟赤眼蜂繁殖和存活的影响 昆虫学报 51: 227-233.

薛明，董杰，张成省. 2002. 取食转 Bt 基因棉等植物对甜菜夜蛾生长发育和药剂敏感性的影响. 植物保护学报 29: 13-18.

余月书，康晓霞，陆宴辉，梁江亚，王红，吴洁云，杨益众. 2004. 转 Bt 基因棉对斜纹夜蛾种群增长的影响. 江苏农业学报 20 (3): 169-172.

张彬，刘怀，王进军，周旭. 2008. 甜菜夜蛾研究进展. 中国农学通报 24: 427-433.

张永军，吴孔明. 2001. 转 Bt 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及棉铃虫的毒杀效果. 植物保护学报 28: 1-6.

张永军，孙毅，袁海滨，吴孔明，彭于发，郭予元. 2005. 转 *Bt-cry1Ab* 玉米花粉对异色瓢虫生长发育及体内三种代谢酶活性的影响. 昆虫学报 48: 898-902.

万方数据