

浙江大学农业与生物技术学院

硕士学位论文

转cry1Ab基因抗虫粳稻对褐飞虱生长发育及共生微生物的影响

姓名：高秀云

申请学位级别：硕士

专业：农业昆虫与害虫防治

指导教师：叶恭银

20080501

中文摘要

转基因作物的生态安全性备受关注,水稻作为人类主要粮食之一,转基因水稻的生态安全性研究显得尤为必要。本论文以转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻为材料,初步研究了其对褐飞虱生长发育及共生微生物的影响。结果如下:

1 转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱生长发育的影响

于转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻继代饲养褐飞虱,考察转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱生长发育的影响。结果表明,于转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻品系 KMD1 和 KMD2 上饲养的褐飞虱雌、雄若虫发育总历期与在对照 Xiushui 11 上饲养的褐飞虱雌、雄若虫发育总历期之间无显著性差异,转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻品系 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱的发育无显著影响。

2 转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱脂肪体类酵母共生菌的影响

从褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化趋势上看,于转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻上继代饲养后,雌成虫体内类酵母共生菌数量下降,而雄成虫体内类酵母共生菌数量总体呈上升趋势。从褐飞虱继代饲养代别上看,不论雌虫还是雄虫,从一代到五代 KMD1 对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响无显著性差异,而 KMD2 和 Xiushui 11 对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响有显著性差异。但就总体趋势上来看,于转基因水稻 KMD1 和 KMD2 上继代饲养的飞虱其体内脂肪体共生菌数量的变化与在非转基因水稻 Xiushui 11 上继代饲养的飞虱是相似的。因此推测,转基因水稻 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱脂肪体共生菌的数量并无显著影响。

3 Biolog 方法检测抗虫转 *cry1Ab* 水稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响

采用 Biolog 方法检测抗虫转 *cry1Ab* 粳稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响。室内结果表明,褐飞虱以 KMD1 或 KMD2 为食持续 1、3、5 代后,其肠道微生物多样性指数(包括 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数)与对照无明显差异;但以 KMD1 为食时,其微生物群落的平均颜色变化率(AWCD)明显高于 KMD2 和对照。田间调查结果与室内基本相符。综合分析认为, KMD1 和 KMD2 对其非靶标害虫褐飞虱肠道微生物群落多样性无明显的抑制作用。

关键词: 转基因水稻; *cry1Ab*; 褐飞虱; 发育历期; 类酵母共生菌; Biolog; 肠道微生物; 多样性; 平均颜色变化率

Abstract

The biosafety of transgenic crops has been becoming a focus in the world. Concerns of biosafety of transgenic rice are necessary, because rice is one of major foods of human. The effect of transgenic *cry1Ab* rice on the development and symbiotic microorganism of brown planthopper were studied and discussed in this paper.

1 Effects of transgenic *cry1Ab* rice on the development of the brown planthopper.

Raise the brown planthopper on transgenic *cry1Ab* rice in succession, and then studied the effect of transgenic *cry1Ab* rice on the development of brown planthopper. When brown planthopper feed on KMD1 and KMD2, there is no significant effect among the whole development of male or female with the brown planthopper feed on Xiushui 11. Transgenic *cry1Ab* rice KMD1 and KMD2 have no adverse effect on the development of brown planthopper.

2 The effect of transgenic *cry1Ab* rice on yeast-like endosymbiote in abdomen fat body of brown planthopper.

The quantity variety of yeast-like endosymbiote of brown planthopper shows that the number of yeast-like endosymbiote in female is descendent but ascending in male after feed on the transgenic *cry1Ab* rice. See from the generations, the number of yeast-like endosymbiote in female or male, there is no prominent difference from the first to the fifth generation after feed on KMD1, but have very prominent difference after feed on KMD2 and Xiushui 11. However, the quantity variety current of yeast-like endosymbiote of brown planthopper feed on KMD1 and KMD2 are same with the brown planthopper feed on Xiushui 11, therefore transgenic rice KMD1 and KMD2 have no adverse effect on the yeast-like endosymbiote of brown planthopper.

3 The effect of transgenic *cry1Ab* rice on the diversity of intestinal microbial community in the brown planthopper by Biolog method.

The diversity of intestinal microbial community in the brown planthopper,

Nilaparvata lugens between fed on transgenic *cry1Ab* rice (KMD1 and KMD2) and on the non-transgenic control (Xiushui 11) was compared using Biolog-Eco method. The laboratory results showed that the diversity indexes including Shannon index, Simpson index and McIntosh index of the intestinal microbial community in the brown planthoppers fed on KMD1 and KMD2 from the first to fifth generation were not significantly different from those fed on the control. In contrast, the average well color development (AWCD) of the intestinal microbial community in the brown planthoppers fed on KMD1 was markedly higher than that fed on either KMD2 or the control. As to the field test, the result was almost as the same as that of the laboratory tests. In conclusion, it is suggested that effects of KMD1 and KMD2 on the diversity of the intestinal microbial community of non-target insect pest, *Nilaparvata lugens* were not significantly negative.

Key words: Transgenic rice; *cry1Ab*; *Nilaparvata lugens* Stål; Dvelopment; Yeast-like endosymbiote; Biolog; Intestinal microbial; Diversity; Average well color development

前 言

随着现代生物工程技术的迅猛发展,使得多种生物获得了来自其它生物或人工合成基因所编码的能促进优质高产、抵抗病虫害等生物灾害和非生物逆境等的优良性状。1983 年世界首例转基因植物培育成功,标志着人类用转基因技术改良农作物的开始。1986 年转基因农作物获得批准进入田间试验,1994 年第一例转基因作物在美国获得批准商业化种植。此后,全球转基因作物应用取得了突飞猛进的发展。

2002 年全球转基因作物种植面积达到 5870 万公顷,较 1996 年约 170 万公顷猛增了 35 倍,我国 2002 年转基因作物种植面积达到 210 万公顷。2007 年转基因作物的国家增加到 23 个,其中包括 12 个发展中国家和 11 个工业化国家,超过全球 65 亿人口的一半(55%,即 36 亿)的人口生活在这 23 个国家,这 23 个国家种植了超过世界种植总面积(15 亿公顷)一半的转基因作物。2007 年,全球转基因作物种植面积增长率达 12%,即增加 1230 万公顷(3000 万英亩),达到 1.143 亿公顷(2.824 亿英亩)。转基因作物的种植面积以 67 倍的空前速度增长,成为近代历史上发展最快的作物技术(James, 2007)。2007 年,英国 Cropnosis 咨询公司评估转基因作物的全球市场为 69 亿美元,占 2007 年 422 亿美元的全球作物保护市场的 16%,以及 2007 年全球商业种子市场 340 亿美元的 20%。从 1996 年转基因作物首次商业化以来的 11 年期间累计的全球市场估计为 424 亿美元,预计 2008 年全球转基因作物市场大约为 75 亿美元(James, 2007)。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,是地球上近 30 亿人口的主要食物来源,它大约提供全世界能量消费的 23%,在一些国家水稻提供的食物能量可以占到 60%(Khush, 2003)。中国是世界上最大的稻米生产国和消费国,稻作面积和稻谷总产量分别占全世界的 23%和 37%。然而,水稻病虫害的发生严重影响了水稻优质高产和稳产,限制了水稻增产潜能,是严重威胁水稻安全生产的主要自然灾害之一。为有效控制水稻螟虫为害,并减少化学杀虫剂使用量,自 20 世纪 90 年代以来,国内外已有多个研究组开展了转基因抗虫水稻的研究工作,并在转 Bt 基因水稻培育方面取得了较大进展(Bennett *et al.*, 1997; 叶恭银等, 1998),获得了不少抗虫效果好的籼稻、粳稻和杂交稻株/品系(High *et al.*, 2004),而且有

些已进入了田间中试(Tu *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001a;b; 2003)。转 Bt 基因水稻的培育成功为水稻增产带来了可能, 其商业化前景十分广阔。

目前, 就转 Bt 基因抗虫植物对非靶标生物影响的研究主要以该非靶标生物在农田中的丰富度、农业生态系统中的经济价值、室内研究的可操作性及可能出现风险概率大小为出发点, 进而选择恰当、合适的非靶标生物作为研究对象, 分析 Bt 抗虫植物的生态风险(O' Callaghan *et al.*, 2005)。褐飞虱在亚洲是一类重要的水稻害虫, 它在为害水稻的同时, 也是一些植物病毒(如水稻草丛矮缩病和齿叶矮缩病)的传播媒介(叶恭银等, 2006), 对水稻生产造成的损失往往比螟虫更为严重(Dale, 1994)。近 20 年来, 褐飞虱在很多地区的爆发频率有所上升。虽然 Schoenly (2003)认为, Bt 水稻在田间条件下不可能影响原有的天敌害虫对飞虱和叶蝉等非靶标植食性害虫的生防控制作用(Schoenly, 2003)。但他的结论是由 Bt 药剂对水稻的喷雾实验得来的, 而不是直接来源于种植 Bt 水稻品系的田块。因此, 就不同 Bt 水稻品系对非靶标害虫飞虱种群的影响作具体的评价显得十分必要。

本论文就转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻在室内及大田条件下, 从个体到种群水平, 对非靶标重要害虫褐飞虱的生长发育进行了初步评价。检测了转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱生长发育的影响, 定量检测了转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对非靶标害虫褐飞虱脂肪体类酵母共生菌的影响, 运用 Biolog 方法定性检测了抗虫转 *cry1Ab* 水稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响。为转基因水稻对非靶标生物的安全性评价提供了依据旨在为转基因水稻的成功商业化及推广提供科学依据, 推动转基因产业在我国农业上的发展。

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：高秀云

签字日期：2008 年 06 月 09 日

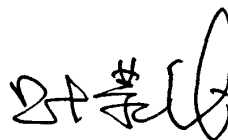
学位论文版权使用授权书

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：高秀云

导师签名：



签字日期：2008 年 06 月 09 日

签字日期：2008 年 6 月 09 日

致 谢

人生匆匆如白驹过隙，在这弥足珍贵的历程中，我生命中最珍贵的两年得以在华家池度过是我的荣幸。两年虽然短暂，却给了我人生中最宝贵的财富。研究生生活即将结束，留在我脑海中的是对我成长有着重大影响的人和事。在此论文完成之际，我要对曾经指导、帮助和陪伴过我的人表示诚挚的感谢和由衷的敬意！

本论文是在导师叶恭银教授的严格要求和精心指导下完成的。从论文的选题设计到工作开展，从组织撰写到修改定稿，各环节都凝聚着导师的心血和汗水。在学习、科研和生活各方面叶老师都给予了我无微不至的关心与帮助。叶老师渊博精深的学识、实事求是的学风、尖锐敏捷的思路、诲人不倦的风范、兢兢业业的精神、勤奋忘我的品质，无时无刻不在激励着我奋发拼搏，勇往直前。值此论文完成之际，谨向导师表示我最衷心的感谢和最崇高的敬意！

我要感谢本课题组姚洪渭副教授在实验中对我的指导帮助以及在生活中对我的关怀。感谢中国计量学院董胜张博士在学习与生活中对我的指导与帮助，感谢课题组博士生田俊策、陈洋在实验上对我的帮助与指导，课题组博士生方琦、朱家颖、张倩倩、郭建洋、石宇、吴玛莉、慎小晶、王欢，硕士生韩成香、张广林、董卉、吴珏靖、梁莉、李兆亮、李艳敏等为本论文的完成提供了不少便利和帮助，寝室室友韩秀玲硕士、王小娇硕士、林克克博士在生活上给了我无微不至的关心与照顾，在此对他们一并谢过。

感谢农药与环境毒理研究所虞云龙教授以及他课题组下的所有成员，他们为我的实验开展提供了很大的帮助。

感谢本所刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、娄永根教授、祝增荣研究员、施祖华教授、蒋明星教授、徐志宏教授、和唐启义研究员等的授业解惑和关心指导！这无疑为我顺利完成学业奠定了坚实的基础。

感谢我勤劳朴实、无私奉献的父母，感谢一直支持我的弟弟妹妹，此时，千言万语都无法表达我对你们的谢意，你们对我的期望与肯定将是我勇往直前的动力。

高秀云

2008年5月，于华家池畔

第一章 转 Bt 基因抗虫水稻的安全性评价

随着世界人口的不断增长,持续提高粮食产量显得更为迫切。减少病、虫害的损失是增加产量的重要途径。长期以来,农作物害虫防治依赖于合成化学杀虫剂,尽管它们全球的销售量每年高达 10 亿美元以上,但仍未根本控制害虫的为害,还严重污染了环境、食物链和水资源。因此,减少杀虫剂使用量,发展现代植物保护技术,已成为可持续发展农业中必须正视的课题之一。植物基因工程克服了传统育种受基因资源限制的缺陷,自 1983 年第一例转基因植物问世以来,转基因技术的应用取得飞速的发展。目前,已有一批转基因作物被成功应用到农业生产之中。

从 1996 年转基因作物第一次商业化以来,在转基因作物商业化的第一个 12 年(1996~2007)中,由于能得到持续稳定的收益,农民种植转基因作物量逐年增加。2007 年,全球转基因作物种植面积增长率达 12%,即增加 1230 万公顷(3000 万英亩),达到 1.143 亿公顷(2.824 亿英亩)。2007 年,种植转基因作物的国家增加到 23 个,其中包括 12 个发展中国家和 11 个工业化国家,超过全球 65 亿人口的一半(55%,即 36 亿)的人口生活在这 23 个国家,这 23 个国家种植了超过世界种植总面积 15 亿公顷的一半的转基因作物。转基因作物的种植面积以 67 倍的空前速度增长,成为近代历史上发展最快的作物技术(James, 2007)。转基因作物的高种植率反映在其稳定的良好表现,并且为发展中国家和工业化国家都带来了显著的经济、环境、健康和社会效益。

转基因作物带来了增产和减少农药使用量等显而易见的好处,结合以害虫抗性治理策略,其在农业上将会得到可持续性的利用。但是关于转基因作物利益与风险的争论,在世界的许多地方限制了这个技术的普及程度。

1 转Bt基因抗虫水稻的研究概况

1.1 水稻

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,是地球上近 30 亿人口的主要食物来

源，它大约提供全世界能量消费的 23%，在一些国家水稻提供的食物能量可以占到 60% (Khush, 2003)。水稻的生产遍及除南极以外的各大洲。中国是世界上最大的稻米生产国和消费国，稻作面积和稻谷总产量分别占全世界的 23% 和 37%。水稻是中国第一大粮食作物，也是单产水平最高的粮食作物，其常年播种面积约占全国粮食作物总面积的 30%，产量约占粮食总产量的 40%，2000 年，水稻播种面积 29962 千公顷，占粮食播种面积的 27.6%，稻谷产量 18791 万吨，占粮食产量的 40.7%。同时，中国是世界上水稻栽培历史最悠久的国家，据浙江余姚河姆渡发掘考证，早在六七千年以前这里就已种植水稻，比泰国还早千余年。

然而，水稻病虫害尤其是害虫如二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等的发生严重影响了水稻优质高产和稳产，限制了水稻增产潜能，是严重威胁水稻安全生产的主要自然灾害之一。近年来，我国稻螟虫(主要是二化螟、三化螟和大螟)爆发成灾，年发生面积 1500 万 hm^2 以上，防治代价约 50 亿元，残虫仍造成产量损失达 3.1% 左右，直接经济损失达 64.5 亿元，总经济损失 115 亿元左右(盛承发等, 2003)。

转基因技术的问世与发展,为高效、稳定地控制水稻螟虫的为害提供了条件。转基因水稻是将 Bt 中的杀虫蛋白(*Bacillus thuringiensis*)通过转基因技术转移到水稻体中，使水稻具抗虫性能。目前，国内外已有多个研究组相继开展转 Bt 基因抗虫水稻的培育(Ramesh *et al.*, 2004; Chen, *et al.*, 2005; Mehlo *et al.*, 2005)，已有多家实验室成功培育出转 Bt 基因抗虫水稻，并在室内和田间对它们的抗虫效果进行了初步的评价 (Huang *et al.*, 2005)。中国有世界上规模最大的转基因水稻计划，专一防治螟虫和水稻白叶枯病的转基因水稻，在大规模田间试验之后，目前正有待商业化种植的正式批准。CCAP 的黄季焜博士估计转基因水稻平均增加产量 2%~6%，每公顷杀虫剂用量可减少近 80%，即 17 千克。转基因水稻商业化种植每年能给中国带来 40 亿美元的效益，这将有助于提高可持续发展农业的环境效益，以及缓解资源匮乏的小农户的贫困(James, 2007)。但是 Bt 水稻与其它任何一种害虫防治方法一样，只要它能降低害虫的种群，它势必将对整个生物群落产生某些影响，Bt 水稻对环境、生物群落的影响有了一些报道，但总体水平仍处在初级阶段。

1.2 Bt (*Bacillus thuringiensis*)

Bt 是一种需氧的、可以运动的、革兰氏阳性菌，它形成于孢子内壁，能够产生对鳞翅目、双翅目、鞘翅目幼虫有毒的多种晶体杀虫蛋白。Bt 最初是由 Ishiwata 在日本分离出来的，是由 Berliner 于 1915 年正式描述的(Siegel, 2000)。Bt 的杀虫活性来源于内毒素，包括孢子形成期形成的杀虫晶体蛋白(Cry 蛋白)和孢子形成前形成的营养期杀虫蛋白(Vips)。在大部分 Bt 中，不同形式的杀虫晶体其晶体蛋白的结合形式是不同的，并且，不同的杀虫晶体蛋白对不同的昆虫有毒性。现在已有 100 多种 Bt 毒素基因被克隆并测序出来，为转基因植物表达毒素蛋白或者叶面敷施 Bt 毒素蛋白提供了条件。1995 年，EPA 已经注册了 182 种 Bt 产品，但是，直到 1999 年 Bt 制剂的总销售量还不到所有杀虫剂总销售量的 2 % (Shelton *et al.*, 2002)。虽然 Bt 已经是一种很好的生物类杀虫剂，不仅能够控制作物害虫，提高作物产量，而且比较环保，不会像化学类药剂那样污染环境。然而，近年来，人们越来越担心转基因粮食对人类的安全性以及 Bt 杀虫蛋白对生态的影响。Bt 转基因植物是否会对其周围的植物产生影响？Bt 转基因植物对其食入者的影响又有多大？

下表所列为 Bt 作物发展上的大事件。

Milestones in the development of Bt crop (High *et al.*, 2004).

1981 First <i>cry</i> gene cloned and sequenced; 1984-1999 Inception of The Rockefeller Foundation's International Rice Biotechnology Program; 1985 Transformation of plants with <i>cry</i> genes; 1986 First field tests of plants transformed with <i>cry</i> genes in the USA and France; 1988 First field trials of Bt cotton in the USA; 1993 First published report of japonica rice transformed with <i>cry</i> gene; 1994 Opening of containment greenhouse at International Rice Research Institute, The Philippines, for growth of transgenic plants; 1995 First published report of indica rice transformed with <i>cry</i> gene; 1996 First growing season by farmers of Bt maize, Bt cotton and Bt potato; 1997 First growing season by farmers of Bt cotton in China; 1997 Field trials of Bt cotton begin in India; 1998-1999 Field tests of Bt rice begin in China; 1999 First published report of rice transformed with two <i>cry</i> genes;. 2001 Field tests of Bt rice begin in India S.K. Raina, pers. commun; 2002 First growing season by farmers of Bt cotton in India; 2004 First commercialized Bt rice in Iran.
--

2 转基因水稻生态安全性评价研究进展

1998年苏格兰Rower研究所的科学家A. Pusztai在一部电视记录片中宣布他的一个试验结果：用转GNA(雪花莲凝集素)基因的土豆喂养老鼠10d后，老鼠器官生长异常，体重和器官重量减轻，免疫系统受损。此消息一经披露立即引起轩然大波。英国皇家学会经过认真评审，1999年5月作出了Pusztai的试验有6条缺陷的结论，认为研究者所见到的情况很可能是老鼠在节食状态下形成的。该事件以Pusztai提前从Rower研究所退休而告终。

稻田生物群落是一个以水稻为中心，多种害虫、天敌及中性昆虫参与的复合

网络系统。Bt基因水稻的应用,对靶标害虫的控制作用的加强,人为地改变了这个食物网或链上的某些链节,有可能导致稻田生物群落内的食物网络关系如天敌群落结构的变化,转Bt基因水稻将对稻田生态系统(包括稻田生境和廊道生境)的生物群落(天敌、害虫与土壤生物群落等)与生物多样性、迁移规律、生物种群组成与结构、生物量及系统功能等产生什么样的影响,对环境的潜在风险有多大,目前还没有系统详细的研究报告。

Bt水稻在室内和田间条件下都能有效地控制鳞翅目害虫,减少农药使用量并提高水稻产量,但是,目前Bt水稻并没有在世界范围内广泛地商业化,其中一个最主要的原因是:在稻田生态系统中,Bt水稻是否会对其非靶标害虫及其非靶标害虫的天敌有影响(Chen *et al.*, 2007)。Bernal (2002)发现取食Bt水稻的褐飞虱能够吸收Bt杀虫蛋白,并且其天敌昆虫黑肩绿盲蝽中也发现Bt杀虫蛋白的存在(Bernal *et al.*, 2002。Chen 等(2005)也报道了相似的结果,Bt水稻田中,褐飞虱及其天敌拟水狼蛛体内也含有Bt杀虫蛋白(Chen *et al.*, 2005)。在Bt水稻商业化之前,我们需要对其环境生态风险作出评估。

2.1 转基因水稻食品的安全性评价

转基因食品的安全性是转基因作物安全性的最主要争论问题。从20世纪90年代开始,一些国际组织和国家就致力于制订转基因食品的安全评价条例。1993年经合组织(OECD)在“现代生物技术安全性评价:概念和原则”的报告中提出了“实质等同性”的概念,即转基因食品是否与目前市场上销售的传统食品具有实质等同性。

*Bacillus thuringiensis*作为一种生物杀虫剂来使用已经有100多年了(Nester, *et al.*, 2002)。据美国国家环保局(EPA)报道,目前还没有发现已注册生产的Bt作物对人体有任何毒性或者过敏作用(Mendelsohn *et al.*, 2003)。就重组DNA或是蛋白质在高等动物消化道内的消化情况进行调查发现,消化道内基本检测不到任何完整的重组DNA或者蛋白质的存在。Wang等用含cry1Ab基因的KMD1和亲本的Xiushui 11面粉饲喂老鼠,当Bt水稻面粉用量达64g每千克体重时(即Bt水稻面粉占小鼠食物总组分的64%),小鼠每天摄入Bt毒素的最大量为123 μ g每千克体重,研究结果表明并没有对小鼠产生毒性,并且小鼠的行为、体重和取食的频率也没

有什么异常(Wang *et al.*, 2002)。同样用KMD1和Xiushui 11两个水稻品种, Malene Schröder等做了KMD1对Wistar老鼠的影响, 其中, KMD1水稻的Bt毒素含量为15mg/kg, Wistar老鼠平均每天的Bt毒素取食量为0.54mg每千克体重, 研究结果表明, 在Wistar老鼠的行为和取食方面, KMD1水稻并没有对其产生不利的影响(Malene Schröder *et al.*, 2007)。虽然这两个实验都表明KMD1水稻对老鼠没有毒性或者不利影响, 但是并不能说明转基因水稻就是安全的, 如果想说明这一点还需要更确切的证据。Malene Schröder分别对KMD1和Xiushui 11进行成分分析, 发现两者的蛋白、脂肪和矿物质含量有显著差异, 而在Wang等报道中, KMD1和Xiushui 11在成分含量上并没有显著差异。另外, Wu等比较Bt水稻及其非转基因母本水稻种子的主要营养成分和生理生化特性时发现, 除了在未碾稻谷中发现有少量cry1Ab蛋白外, KMD(Bt粳稻品系)与对照Xiushui 11, B6(Bt籼稻品系)和对照嘉早935间的粗蛋白、脂肪、游离氨基酸和总灰分及矿物质元素等主要营养指标均无明显差异。此外, 有趣的是在煮熟的稻米中并没有检测到杀虫蛋白(Wu, *et al.*, 2003)。Malene Schröder最后注释, 其检测出KMD1和Xiushui 11在成分上有差异性可能是因为生物差异而不是因为转基因的原因, 这一点还有待于田间试验来证明, 并且, 这个田间实验需要在最佳的水稻生长季节进行, 同时需要对各水稻品种进行随机分组设计。

2.2 生物安全性隐患问题

2.2.1 基因飘移

*Oryza*水稻起源于亚洲, 存在两个常见种*Oryza nivara*和*Oryza rufipogon*。这两种水稻和栽培品种*Oryza sativa*(L.)具有相同基因型, 在自然条件下相互间可以进行杂交。此外, 在亚洲还有很多杂草化水稻、杂交品种和野生稻均由*O. nivara*、*O. rufipogon*和*O. sativa*衍生而来(High *et al.*, 2004)。并不是所有的水稻植株都与其邻近的野生型水稻同时开花, 即使同时开花的话, 异型杂交发生的可能性也很低。在中国湖南省的一项研究发现, 水稻与*O. nivara*的最大杂交比率为3%(Song *et al.*, 2003)。一般水稻都是进行自花授粉的, 品种间发生杂交的比率非常之低。在西班牙的一项研究发现, 转基因品种与常规品种间发生杂交的比率为0.05% - 0.53%(Messeguer, 2003)。然而, 当大面积种植转基因水稻, 且存在野生水稻,

转基因还是可以通过杂交途径转移到非转基因品种的。目前正在考虑一些新的技术,如限制花粉的育性和种子萌发率,这在转基因水稻与非转基因水稻即使花期相遇的时候,可以减少发生杂交的频率。就转基因水稻能否通过杂交转移至野生型水稻或非转基因水稻品种中,并进行传播,则应该遵循个案原则进行具体的评价(陈茂, 2005)。

2.2.2 对生物多样性的影响

Bt作物的重要特性就是Cry杀虫蛋白对非靶标生物基本没有明显的影响(Mendelsohn *et al.*, 2003)。由室内或是田间对Bt玉米、Bt棉和Bt马铃薯的研究结果可知,其对有益的节肢动物和非靶标害虫基本无毒害作用(Dale *et al.*, 2002; O'Callaghan *et al.*, 2005)。此外,虽然Bt杀虫蛋白可以在土壤中保持活性达数月之久,但转Bt基因抗虫植物对土壤生物群落,如蚯蚓、弹尾虫及其它普通土壤微生物均无显著负面影响(O'Callaghan *et al.*, 2005)。关于Bt水稻的研究也提供了类似的结果。刘志诚等(2002)在一些小规模田间试验中发现, Bt水稻和非Bt水稻田间5种常见蜘蛛的种群密度没有明显的差异。当然,在Bt水稻环境释放前,还应该进行大规模的田间检测。国际水稻所采用Bt喷雾实验去模拟Bt水稻的作用,以控制食叶型害虫,并就其对稻田节肢动物的影响做了评价,结果发现,对非靶标植食性昆虫的生物防治作用没有产生任何不利影响(Schoenly, K. G. *et al.*, 2003)。刘志诚等(2004)就Bt水稻和化学杀虫剂对稻田节肢动物群落的影响进行了比较,发现, Bt稻田的节肢动物功能团及其优势度,各功能团内科组成及其优势度分布,功能团内个体数量的时间动态及物种丰富度、多样性指数、均匀性指数等参数,在多数情况下与对照常规水稻相比,均无显著差异。但化防田的功能团优势度等群落特征指标与非化防对照田块相比,有时具有明显甚至显著的差异。可见, Bt水稻田对稻田节肢动物群落的影响明显弱于化学杀虫剂。所以, Bt水稻的引入,因为导致杀虫剂使用量减少,可能会增强稻田内生物防治的能力,而不是降低(陈茂, 2005)。

2.2.3 抗虫基因的沉默

外源基因沉默(gene silencing)或基因失活(gene inactivation)现象是指表达的外源基因由于受到各种因素的影响,在转基因植株的当代或后代中受到了抑制。

早在80年代, Peerbolte 等(1986)就发现根瘤农杆菌T-DNA上的基因在转基因烟草中发生甲基化而使表达受到抑制(Peerbolte *et al.*, 1986)。近年来, 有大量文献报道, 包括转Bt基因水稻在内, 转基因植物中外援基因的沉默是较为普遍的现象。一般认为基因沉默有三种情况: 位置效应的基因沉默、转录水平的基因沉默和转录后水平的基因沉默。外援基因的沉默与转基因在受体植物中甲基化状况、导入的拷贝数、插入受体植物染色体位点及是否与受体植物中有同源基因有关。对于基因沉默, 可通过筛选单拷贝转基因个体, 构建细胞基质结合区(matrix attachment region, MAR)载体, 以及采用特殊功能的启动子和增强子等方法来有效地防止外源基因沉默。

2.2.4 抗性产生及治理

Bt水稻防治的靶标昆虫主要是鳞翅目幼虫, 如二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟。Bt水稻与其它许多虫害防治技术一样, 害虫可以演变对转Bt水稻品种的抗性从而限制Bt水稻对害虫的有效抗性。目前, Bt的抗性治理仍然是一个很严峻的问题。

延缓害虫对Bt作物的抗性发展, 一个被广泛认同的策略是“避难所”。在美国, Bt棉、Bt玉米、Bt马铃薯上都实施过这种策略。避难所由种植非Bt植物的田块或Bt田块内的非Bt植物构成, 用来维持对Bt敏感的昆虫种群。大量的对Bt敏感型昆虫可在避难所植物中生存, 以保证与Bt植物上生存的少量对Bt有抗性的昆虫交配, 交配后产生的后代取食高剂量的Bt植物时便不能存活(Cohen *et al.*, 2000a)。现在争论的焦点是, 需要的避难所的面积应该多大, 或者是足够大的避难所对Bt作物的种植者和消费者来说他们从经济上是否能接受(Shelton, 2002)。避难所的空间排列最好依赖于害虫的生物学特性。田内混合型避难所对可在水稻生长期间相互扩散的昆虫来说不是最好的避难所形式, 因为一些害虫同时可以取食Bt和非Bt水稻, 这样会稀释Bt水稻内杀虫蛋白的浓度(Gould, 1998)。

另一种延缓害虫对Bt水稻产生抗性的办法是“高剂量”策略, 即只释放含双价毒素且都是高剂量表达的Bt水稻品种。如Zhao等(2001; 2002; 2003)以专Bt抗虫花椰菜和小菜蛾为材料, 通过温室罩笼实验证明了转双价抗虫基因作物和避难所措施对延缓害虫抗性发展具有显著作用。如果很少有害虫能在只含一种高剂量Bt毒素的转基因植物上生存, 那么将有更少的害虫可以在含两种高剂量毒素的植物上存活。目前已有100多种Bt毒素基因被克隆并测序。这些毒素的氨基酸序列和

一些生化特性有很大差异。一些组合在一起的2个Bt毒素之间并不需要非常相似，因一个基因的单方面突变会表现出对2种毒素的交互抗性。

3 转基因水稻的前景

Bt水稻的引入可以带来农药使用量的减少、产量增加及节省劳力等好处，这对环境质量及农民和消费者的身体健康都是十分有益的。如Huang等(2005)报道，转基因抗虫水稻与常规水稻相比，可以减少80%的农药使用量，大大减少了农户因用药而造成的各种健康伤害，水稻产量也较常规品种提高了6-9%。同时，Bt水稻对毒枝菌素的防治也具备一定的积极作用(陈茂, 2005)。

一项技术，无论新的还是旧的，都会存在争议和风险性。生物技术被认为是继工业与计算机革命之后的第三大技术革命，现已成为公众的一个主要话题。虽然EPA还没有证据说明在美国种植的转基因作物对环境和人类健康有任何伤害，但也建议需要设计可信的生态实验研究。注册转基因作物，EPA要求提供转基因作物对关键害虫、害虫天敌和非靶标生物的毒物学研究，并且提供重要信息以供长期研究群落之用，以便于评价Bt技术的潜在影响。总体而言，Bt作物对环境、生物群落的影响虽已有一些报道，但尚属初级阶段。Bt水稻更是如此，就其生态安全性评价工作，还需长期、科学地检测，以确保科学、安全地利用Bt水稻为农业可持续发展提供新思路，为人类造福(陈茂, 2005)。Stewart & Wheaton在他们的文章中说到：现在并没有证据说明目前美国制造出的转基因作物产品对环境或人类健康有害。但他们仍然建议设计更可信的生态学实验，不仅是为了规则的要求，也为了明确在商品化之后的监测中需要哪些参数。如果过去我们更多地注意将农业生物技术与生态研究结合起来，也许今天的公众对转基因作物的态度也完全不同。

转基因作物的未来是令人鼓舞的。转基因作物种植国家的数量、转基因作物种类、转基因性状以及种植面积计划都将在商业化的第二个10年之间翻番。在亚洲的许多国家对转基因作物的研究发展都是很迅速的，光是在中国就有100多个实验室致力于改良作物质量和产量的研究。在中国已经有几项成功的Bt水稻的田间试验，但政府并没有允许Bt水稻商业化。加入世贸组织后，中国Bt水稻的商业化更显得遥遥无期。基于转基因产品潜在安全的不确定性，各国政府都加强对转

基因产品进行管理。我国也颁布了相应的条例，并且规定，在中国地区进口或销售转基因产品都必须注明标签，Bt作物种子的生产和商业管理也必须要与省的或地方的种子条例相一致。

第二章 褐飞虱脂肪体共生菌及肠道微生物研究进展

褐飞虱(*Nilaparvata lugens* stål)是我国及东南亚地区许多水稻生产国的主要害虫,不仅通过直接取食造成严重减产,而且作为植物病毒的介体造成间接危害(李汝铎等,1996)。近年来随着亚洲各国农业生产的发展,在品种、栽培制度及耕作技术上发生了深刻的变化,褐飞虱发生有逐年增加的趋势。利用抗性基因培育和推广抗性品种是综合治理褐飞虱的优先策略(wu *et al.*, 1986),但由于褐飞虱对水稻抗性品种有很强的适应能力,长期连续种植抗性水稻品种易使褐飞虱产生新的致害性,这对抗性水稻品种的选育和推广构成了严重的威胁(吕仲贤等,1999)。对稻田生态系统而言,Bt水稻的引入是否会引起褐飞虱种群发生新的变化值得深入探讨。国内的大量研究主要集中在水稻品种对褐飞虱的抗性、生物型监测和致害性变异等方面。有研究表明,刺吸危害的同翅目昆虫,如蚜虫、飞虱、叶蝉等,体内普遍存在内共生菌,为寄主昆虫提供生长发育所需的脂类化合物(胆固醇)、维生素和必需氨基酸,它们与寄主长期共存、互惠互利、协同进化(Baumann *et al.*,1995)。共生细菌为蚜虫提供营养物质和适应新寄主植物所需的代谢酶是蚜虫生物型形成的主要原因(Campbell, 1990)。在豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 对新寄主植物的适应过程中,共生菌遗传基因的易变性使其遗传背景容易发生变化或突变,导致蚜虫很快形成新的生物型(Ishikawa, 1986)。近年来,昆虫体内共生菌的研究越来越引起国内外的重视。本章对近些年来国内外有关褐飞虱脂肪体共生菌的研究情况进行概括,以期引起更多的学者关注褐飞虱体内的这种微生态现象。

1 褐飞虱脂肪体共生菌研究进展

昆虫与微生物的共生是一种普遍存在的现象,与昆虫共生的微生物从形态学或生活史上可大致分为三大类:细菌、酵母和立克次氏体。共生菌(symbiotes)是昆虫体内与昆虫在进化过程中长期共生的微生物,它在寄主的生长、繁殖过程中起着十分重要的作用(Leonardo *et al.*,2003)。共生微生物总是与特定的汁液取食紧密联系的,作为刺吸危害水稻汁液的主要害虫之一,褐飞虱体内也存在共生菌,即通常所讲的类酵母共生菌(yeast-like symbionts, YLS),属于子囊菌亚门

(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes)的假丝酵母属(*Candida*)，存在于腹部脂肪体内，以卵母细胞垂直传递的方式传给子代(Chen, 1981)。有关褐飞虱共生菌的研究，国外早在20世纪60年代就有报道，国内进入80年代才开始陆续报道这方面的试验结果。

1.1 褐飞虱脂肪体共生菌的存在部位、形态及数量研究

国外早在20世纪60年代就有有关褐飞虱体内酵母类共生菌的形态描述，Hook & Griffith (1980)观察还发现，酵母类共生菌在寄主褐飞虱腹部脂肪体细胞中形成其特有的器官——菌胞(Mycetocyte)。Cheng & Hou (2001)还证实了褐飞虱雌成虫腹部脂肪体内菌胞的存在，并结合电镜观察得出菌胞已经成为了寄主体内特有的细胞器，参与了酵母类共生菌在寄主褐飞虱世代间的传递过程。

研究发现，褐飞虱雌成虫的腹部脂肪体中存在大量类酵母共生菌，而头部和胸部均未发现酵母类共生菌的存在，显微镜下还观察到大量菌胞存在于虫体腹部的脂肪体中(陈法军等, 2006b)。褐飞虱体内的共生菌聚集在腹部脂肪体细胞中以出芽进行无性繁殖，以顶端芽殖为主，还有两端芽殖和侧面芽殖，褐飞虱脂肪体共生菌通过卵母细胞垂直传递的方式直接传给子代。褐飞虱体内有多种形态的酵母类共生菌(Chen, 1981)。其中，长梭形的个体最多，杆状类型其次，卵形酵母类共生菌较少，而球状个体更少见，此外，显微镜下还观察到一些不规则类型的共生菌，如具假膈梭状类型和具假膈不规则个体(陈法军等, 2006; Cheng & Hou, 1996)。在光学显微镜观察中发现，交配后雌成虫的受精囊和获得的精包中并无共生菌的存在(Cheng & Hou, 2001)。由此可推断，褐飞虱的雄虫并没有参与世代间体内共生菌的卵巢垂直传递过程(陈法军等, 2005)。

褐飞虱生长发育的各个阶段都与其体内共生菌息息相关，而共生菌的种群数量随着寄主的发育而不断增加。在产卵前，褐飞虱母体内共生菌的数量最多，产卵后母体内共生菌数量开始下降。其中，5龄若虫期共生菌的数量激增，增幅占整个若虫期的50%以上。雄虫体内的共生菌数量在5龄若虫期最多，而在5龄若虫期和成虫期，雌虫体内共生菌的数量均显著多于雄虫(Noda H, 1974; 1977)。

1.2 共生菌在寄主体内的侵染过程

光学和电子显微镜观察显示(Chen *et al.*, 1981; Cheng and Hou., 1996; 2001), 共生菌在褐飞虱体内的侵染过程可分为4个阶段:

1.2.1 脂肪体内增殖阶段

褐飞虱生长发育的各个阶段都与其体内共生菌紧密相关, 共生菌的种群数量随着寄主的发育而不断增加, 产卵前褐飞虱母体内共生菌的数量最多, 产卵后共生菌数量开始下降。有研究表明, 2~4龄若虫期共生菌的增殖缓慢, 进入5龄后共生菌数量急剧增加, 其增幅占整个若虫期的50%以上, 故5龄若虫期是共生菌增长的关键虫期(吕仲贤, 2001b)。

1.2.2 菌胞释放和合胞体胞外分泌

显微镜观察发现, 稻飞虱羽化为成虫72h后, 部分共生菌开始脱离菌胞进入合胞体, 并通过合胞体的胞外分泌作用(exocytosis)而进入血腔; 96h后, 随着合胞体的发育完全, 更多的共生菌进入血腔(Cheng and Hou., 2001)。褐飞虱的卵属于端滋式, 共生菌的侵染发生在卵巢管的生殖区(即原卵区)(陈法军等, 2005)。

1.2.3 卵巢侵染阶段

共生菌由亲代经卵巢传给正在发育的卵或胚胎, 这一过程称作卵巢侵染。进入血腔的共生菌, 一部分在随血淋巴流经卵巢管柄(pedicle)的上皮鞘(epithelial plug)时被滤胞细胞(follicle cells)包覆, 并通过细胞内吞作用(endocytosis)进入卵原母细胞(Hook and Griffith., 1980)。

1.2.4 卵内发育阶段

进入卵原母细胞的共生菌在卵的后端聚集, 随着卵黄的沉积, 形成共生球(symbiotic ball); 共生球以一层膜状结构与卵黄分离, 松散地分散共生球内, 且成为胚胎发育过程中腹部的一部分(Cheng and Hou., 1996; 2001)。至卵孵化这段时间内, 褐飞虱体内共生菌不断增殖(吕仲贤, 2001b)。

1.3 雌、雄褐飞虱体内共生菌的差异

共生菌在褐飞虱卵巢内垂直传递的过程中,雌、雄性个体作用不同。其中,雌虫占主导地位,而雄虫并未参与(Cheng and Hou., 2001)。由此推测,共生菌在雌、雄寄主体内的作用不同。已有的研究报道大都是有关飞虱雌虫体内的,而共生菌在雄虫寄主发育过程中的功能、侵染途径等未见报道。在雌虫中,共生菌存在于腹部脂肪体中(Chen *et al.*, 1981; Cheng and Hou., 1996; 2001)。从长期进化的角度看,腹部脂肪体距离生殖系统近,有利于寄主世代间的卵巢垂直传递,两者都能获得利益。雄虫并不参与共生菌在寄主世代间的传递过程,也就没有必要如雌虫那样仅在腹部脂肪体内存在共生菌,在头、胸部的脂肪体也可能存在共生菌(陈法军等, 2005)。但是,至今仍然缺乏有关共生菌在雄性褐飞虱体内的分布和侵染的研究报道。

1.4 褐飞虱脂肪体共生菌在寄主生长发育中的作用

通过长期的协同进化,共生菌的遗传背景已经与寄主褐飞虱母体的基本相同,在褐飞虱生长发育和繁殖过程中起着十分重要的作用(Noda *et al.*, 1977)。其功能主要表现为以下几个方面:

(1) 共生菌对褐飞虱的影响首先表现为延缓发育、降低生长速率和繁殖力(吕仲贤, 2001b)。经高温处理的褐飞虱产的卵共生菌含量非常低,并且不能孵化(Lee and Hou, 1987)。取食抗性品种(IR26、Mudgo和ASD7)后,褐飞虱体内共生菌数量的显著下降,是影响褐飞虱生长发育的重要原因之一(吕仲贤等, 2001)。

(2) 共生菌参与了褐飞虱胚胎发育和胚后发育所需蛋白质的合成,并对胚胎腹节分化具有促进作用,从而在寄主系统发育中起着重要作用(Lee *et al.*, 1987)。明显的例证包括,灰飞虱所产卵都带有共生菌,褐飞虱卵母细胞的成熟与共生菌的侵染密切相关(Chen, 1981a),而热处理后卵内共生菌的数量变少,且不能孵化(Lee, 1987)。由此不难推测,共生菌的卵巢侵染过程是影响褐飞虱繁殖的关键因子之一。

(3) 共生菌能将寄主体内废弃的氮进行脱毒和再循环(Sasaki *et al.*, 1996)。还能提高寄主对固醇类物质的利用,并合成寄主所必需的氨基酸(傅强等, 2001)。研究发现,当取食的氨基酸量变少时,褐飞虱体内的尿酸含量显著下降,并可在

体内检测分离得到尿酸酶,必需氨基酸如苏氨酸、组氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸及精氨酸等含量与正常饲养的试虫在同一水平,甚至高于后者,虫体仍能正常生长。而在热处理或用抗生素处理后的缺菌虫体内无法观察到相应的现象,虫体生长也受到了严重影响(Hongoh *et al.*, 1997)。这是关于共生菌在其寄主营养利用和新陈代谢方面的重要认识。

(4) 共生菌在褐飞虱致害性变异过程中可能发挥重要作用。通过长期的协同进化,共生菌的遗传特性与母体的基本相同(Noda *et al.*, 1977)。然而,在寄主适应抗性品种的过程中,其遗传背景可能发生变化或突变,以适应褐飞虱对寄主植物营养物质的吸收和利用,形成新的致害性种群。褐飞虱生物型I和田间种群(生物型 I, II, III和Mindanao型)在缺失共生菌和正常情况下取食感虫品种TN1后,若虫的生长发育出现明显分化,即生物型I的若虫历期和存活率的变化明显小于田间种群,说明生物型工体内共生菌的特性稳定,遗传背景已经发生变化且与TN1的营养特性相适应,在缺乏数量的情况下仍能发挥作用;而田间种群则不同,它们是不同的致害性褐飞虱个体组成的混合体,其体内共生菌的遗传成分复杂,故而使缺乏共生菌的褐飞虱在TN1上的存活率显著低于正常褐飞虱(吕仲贤等, 2001b)。

1.5 外界环境胁迫对褐飞虱脂肪体共生菌的影响

1.5.1 高温

Chen等曾报道高温处理褐飞虱初孵若虫可以明显降低试虫体内的共生酵母菌数量。经卵期高温(35℃)处理的试虫与对照试虫共生菌数量的差距主要表现在若虫期,成虫期二者的差异明显缩小,主要原因可能是处理试虫有较长的若虫期(比对照长8天),羽化时共生菌种群数量得以发展到较高的水平;而且,羽化初期处理试虫共生菌数量继续增长,而对照试虫趋于减少(至少单位体重的共生菌含量是如此),雄虫尤为明显(Chen, 1981; 傅强等, 2001)。

1.5.2 杀虫剂

杀虫剂处理后,褐飞虱短翅雌成虫体内共生菌数量有所降低,杀虫剂种类、浓度及处理时间的不同,对褐飞虱共生菌数量有不同的影响,共生菌的数量与褐

飞虱接触杀虫剂的时间长短有关,在杀虫剂处理的叶片上取食的时间越长,共生菌数量越低(徐红星等,2000)。

1.5.3 氮元素

氮元素含量高会提高若虫成活率、降低若虫历期、增加雌成虫的体重、提高产卵量、延长雌成虫寿命、并且大大提高孵化率,即是说如果某块水稻田的氮营养长期丰富的话,褐飞虱便会更容易适应这儿的环境(Lu *et al.*, 2004)。水稻田氮元素充足可以提高褐飞虱的抗逆能力,可以提高褐飞虱对高温、饥饿、杀虫剂的抵抗能力(Lu *et al.*, 2005)。

氨基酸对褐飞虱体内的类酵母共生菌数量也有一定影响。高温处理过的缺菌褐飞虱在多数缺失氨基酸饲料上饲养后共生菌数量明显高于全组分对照饲料上的处理试虫,缺失必需氨基酸较缺失非必需氨基酸的影响大。

另外,抗性水稻品种与褐飞虱互作会导致虫体内类酵母共生菌的形态变小、数量减少(陈法军等,2006);抗生素能显著抑制共生菌的数量;不同地里种群和致害性的褐飞虱体内共生菌也会有所不同(吕仲贤等,2001a)。

1.6 研究褐飞虱脂肪体共生菌的意义

近年来,对褐飞虱共生菌的研究越来越引起国内外的重视。多年来,由于抗虫水稻品种的大面积推广以及农药的大量使用,国内田间褐飞虱种群的抗药性明显上升。“抑菌防虫”可能有效解决这一问题。所谓“抑菌防虫”就是通过外源物质抑制褐飞虱体内共生菌来达到褐飞虱的防治目的(陈列忠,2006)。如前文所述,褐飞虱对抗虫性水稻品种的适应以及对杀虫剂抗药性的产生和迅速发展,共生菌起到了至关重要的作用。抑制褐飞虱体内的共生菌不但可直接或间接的达到控制褐飞虱的目的,而且还可有效提高目前杀虫剂的防治效果、延缓褐飞虱抗药性的发展,实现“抑菌防虫”,对褐飞虱防治具有重要意义。因此,通过“抑菌防虫”对提高目前杀虫剂的防治效果、延缓褐飞虱抗药性的产生、延长目前杀虫剂的使用寿命具有重要意义。

Treseder研究指出共生菌以其短的生活史及其与寄主密切的营养共生关系使其对寄主所处环境变化的反应更敏感、适应更迅捷(Treseder *et al.*, 2004)。在褐飞虱对抗性水稻品种互作过程中其体内的类酵母共生菌的个体发育变小和数量减

少等情况下必然减弱“褐飞虱-共生菌”这一营养共生关系,进而导致寄主昆虫对抗性水稻品种致害性(适应性)的降低。当然,通过长期的继代取食,褐飞虱体内共生菌可能产生变异或者适应品种的共生菌占优势。当体内共生菌的数量回升,达到稳定之后,“褐飞虱-类酵母共生菌”这一营养共生体又恢复功能,新的致害性种群形成。这都表明褐飞虱体内共生菌与褐飞虱对抗性水稻品种的致害性差异间可能存在着极为密切的关系。

我国大陆地区,褐飞虱体内共生菌的研究起步较晚,进入20世纪90年代才陆续开展,且该领域研究是结合抗性品种水稻防治褐飞虱危害的研究开展的(吕仲贤等,2000)。以往的研究已经证明类酵母菌在褐飞虱对水稻营养物质的吸收和利用过程中起着重要作用,褐飞虱种群对抗性水稻品种的致害性变化往往伴随着体内共生菌的变化(张志涛等,1997;吕仲贤等,2001)。为此,我们开展褐飞虱在与不同抗性水稻品种(KMD1、KMD2和Xiushui 11)互作过程中对共生菌影响的研究,以期为深入研究褐飞虱致害性变异与共生菌的关系提供科学依据。

2 昆虫肠道微生物的研究进展

大多数昆虫消化道中存在活性很强的原核生物,这些微生物可以促进营养的吸收,降解环境毒素,或者在昆虫的生活史中起着其它重要的作用。共生微生物也可能在氮循环中起重要作用,已经证明白蚁的后肠内有三种细菌,它们可以在厌氧条件下将尿酸降解成发酵产物,包括氨水(Potrikus and Breznak, 1977)。已经证明蟑螂中的细胞内细菌共生体可以将储存的尿酸转化成有价值的含氮化合物(Cochran, 1985)。大多数农业害虫是昆虫,因此,研究昆虫-微生物的交互作用是对农业害虫的生物防治是很有意义的。

动物的肠道中存在微生物群落是一种很普遍的现象,在哺乳动物种,这种肠道微生物与寄主的共生关系已经得到了广泛研究,包括人类在内(Kimiko *et al.*, 2006)。通过对鱼类的研究发现,肠道细菌跟寄主的营养和消化有关系,这与对哺乳动物的研究是一致的(Sugita *et al.*, 1997)。

目前,国内外对昆虫肠道微生物的研究还鲜见报道,这方面的研究主要是针对白蚁和蟑螂,集中在肠道细菌营养贡献方面的研究。基因组分析对肠道微生物的研究提供了新的方法,并将会揭示昆虫与它体内的微生物群系之间联系的分子学基

基础(R.J.Dillon and V.M.Dillon, 2004)。迄今，对褐飞虱肠道微生物的研究还未见诸报导，基于此，我们开展了褐飞虱与克螟稻互作过程中肠道微生物的功能多样性，看褐飞虱与克螟稻互作过程中肠道微生物多样性是否会有变化，以此反应Bt杀虫蛋白对褐飞虱肠道微生物是否产生影响。

第三章 转 *cry1Ab* 抗虫粳稻对褐飞虱发育历期的影响

为有效、安全地控制二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等危害,近 10 多年来国内外在抗虫转基因水稻培育研究方面已取得了较大的进展,业已获得了不少抗性强的籼稻、粳稻或杂交稻品系,有的已经进入田间试验(Tu *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001a; High *et al.*, 2004)或生产性实验。但是这些品系能否商业化应用,还取决于其环境生态安全性和食品安全性系统评价的结论。就环境生态安全性评价来说主要包括其对生态系统中生物群落稳定性,尤其是对天敌和非靶标害虫种群发生规律的胁迫程度。迄今,有关 Bt 水稻对非靶标生物影响的研究尚不多,主要探讨了 Bt 水稻对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的生存、取食、生长发育、产卵行为及田间扩散规律的影响(Bernal *et al.*, 2002; 陈茂等, 2003a, 2003b, 2004), 抗虫转 *cry1Ab* 基因籼稻对白背飞虱生长发育、产卵行为及生殖力的影响(谭红等, 2006), 对褐飞虱捕食性天敌黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis* (Bennal *et al.*, 2002)和拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus*(刘志诚等, 2003a)捕食或生长发育的影响,以及 Bt 杀虫蛋白在水稻-褐飞虱-拟水狼蛛食物链中的转移与富集(陈茂等, 2005)。本章从继代饲养的水平上就转 *cry1Ab* 基因粳稻及对照 Xiushui 11 对其非靶标害虫褐飞虱发育历期和死亡率的影响进行了研究,以评判转 *cry1Ab* 基因粳稻的种植在有效控制螟虫等靶标害虫的同时是否潜在有引起褐飞虱危害加重的风险,分析褐飞虱在抗虫转基因水稻田中发生与危害的可能趋势。

1 材料与方法

1.1 供试水稻与供试昆虫

供试水稻: 供试 Bt 水稻为处于 R_{15} 代的 2 个粳稻纯合品系,即 KMD1 和 KMD2。这 2 个品系源于 2 个独立的 R_0 代转化株,均含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子(Cheng *et al.*, 1998),且在田间对靶标害虫二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 表现高抗(Ye *et al.*, 2001, 2003)。对照为其非转基因亲本品种 Xiushui 11。

供试水稻材料均于大试管(R:3cm, L:25cm)内水培,放置于控温控光的智能人工气候箱内培养,其中培养条件为:温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 L: D14: 10h、光照 60 %、光强度 12000~14000 Lux、湿度 $75 \pm 5\%$ (下同),并于 10 日龄三叶期时选择同等粗细大小的稻株供试验用。

供试昆虫:供试原始代褐飞虱取自本实验室在杂交水稻(中浙优 1 号)上连续饲养的实验种群。试验开始后分别置苗龄为 60 天左右的 KMD1、KMD2 和 Xiushui 11 上于控温控光的养虫室内继代饲养,其中饲养条件为:温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期(明:暗) 14 h:10 h、光强度 3500~4000 Lux、湿度 $70 \pm 5\%$ 。分别于第 1、5、10 代测其发育历期。

水培营养液(Yoshida *et al.*, 1976):

储备液 1	NH_4NO_3 : 91.6g/L; CaCl_2 : 88.6g/L
储备液 2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 40.3g/L; K_2SO_4 : 71.4g/L
储备液 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 324g/L
微量元素储备液	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.5g/L; H_3BO_3 (硼酸): 0.934g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.031g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (七钼酸氨): 0.074g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.035g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 7.7g/L 柠檬酸(一水合物): 11.9g/L 以上试剂分别溶解,然后加入 50mL 浓硫酸,加蒸馏水至 1 升。
配方	储备液 1: 1.25ml/L; 储备液 2: 1.25ml/L; 储备液 3: 1.25ml/L; 微量元素储备液: 1ml/L 用 NaOH 调 PH 值为 4.5-5.0,不超过 6.0,稍偏酸无碍。

1.2 第一代发育历期的测定

将 KMD1, KMD2 和 Xiushui 11 的产卵苗放入大玻璃试管中水培,接入怀卵原始代褐飞虱,用纱布封口,放入智能人工气候箱内培养。三天后,将产卵后的褐飞虱吸出。初孵若虫用于以下实验。

将选择好的供试 KMD1, KMD2 和 Xiushui 11 水稻苗分别移入装有适量培养液的大玻璃试管中。每玻管移入 1 株稻株, 分别接入初孵若虫 1 头(孵化 12h

以内), 置智能人工气候箱内饲养。每隔 12h 观察、记录若虫的存活与蜕皮情况, 并及时更换新鲜的稻株和培养液, 重复 30 次。

1.3 第五代发育历期的测定

将 KMD1, KMD2 和 Xiushui 11 的产卵苗放入大玻璃试管中水培, 接入于克螟稻上继代饲养的第四代怀卵褐飞虱, 用纱布封口, 放入智能人工气候箱内培养。三天后, 将产卵后的褐飞虱吸出。以下操作同 1.2。

1.4 第十代发育历期的测定

将 KMD1, KMD2 和 Xiushui 11 的产卵苗放入大玻璃试管中水培, 接入于克螟稻上继代饲养的第九代怀卵褐飞虱, 用纱布封口, 放入人工气候箱内培养。三天后, 将产卵后的褐飞虱吸出。以下操作同 1.2。

2 结果与分析

2.1 同一代间发育历期的比较

单从每一代中 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱发育历期的影响来看, 结果如图 3.1 和图 3.2 所示。对雌性褐飞虱来讲, 第一代中二龄、五龄和全期的发育时间有差异, 其中从若虫全期看, 取食抗虫梗稻 KMD1 和 KMD2 的褐飞虱比取食 Xiushui 11 的褐飞虱发育历期长, KMD1 相对于 Xiushui 11 差异不显著, KMD2 相对于 Xiushui 11 差异显著。第五代中, 一龄、四龄、五龄和全期的发育时间都有差异, 其中从若虫全期看, 取食 Xiushui 11 的褐飞虱要比取食抗虫梗稻 KMD1 和 KMD2 的发育历期显著地延长。第十代中, 三龄、五龄和若虫全期的发育时间有差异, 并且都是取食 KMD1 的褐飞虱要比取食 KMD2 和对照 Xiushui 11 的发育历期显著地延长, 而取食 KMD2 和取食对照 Xiushui 11 的褐飞虱的发育时间并无显著差异。对雄性褐飞虱来讲, 第一代中取食抗虫梗稻 KMD1、KMD2 和 Xiushui 11 的褐飞虱各个龄期的发育时间均无显著差异。第五代中, 三龄、四龄、五龄和若虫全期的发育时间三者之间都有差异, 其中取食 Xiushui 11 的飞虱比取食 KMD2 的发育时间显著地延长。第十代中, 从若虫全期看, 取食 KMD1 的飞虱发育时

间要比取食 Xiushui 11 和 KMD2 的时间长，取食 Xiushui 11 和 KMD2 的飞虱之间发育时间无显著差异。

2.2 不同代间发育历期的比较

纵向地从继代饲养代数对褐飞虱发育的影响来看，结果如图3.3和图3.4所示。取食KMD1的飞虱，从若虫全期看，第五代和第十代雌虫的发育时间要显著地比第一代长，雄虫的发育时间第十代要显著地比第一代和第五代长。取食KMD2的飞虱，无论雌虫或者雄虫，不同的代别间对褐飞虱的发育时间并无显著影响。取食Xiushui 11的飞虱，无论雌虫或者雄虫，其中第五代的发育时间要显著地比第一代和第十代长，而第一代和第十代间无显著不同，关于这一点，笔者认为有可能是实验误差引起。

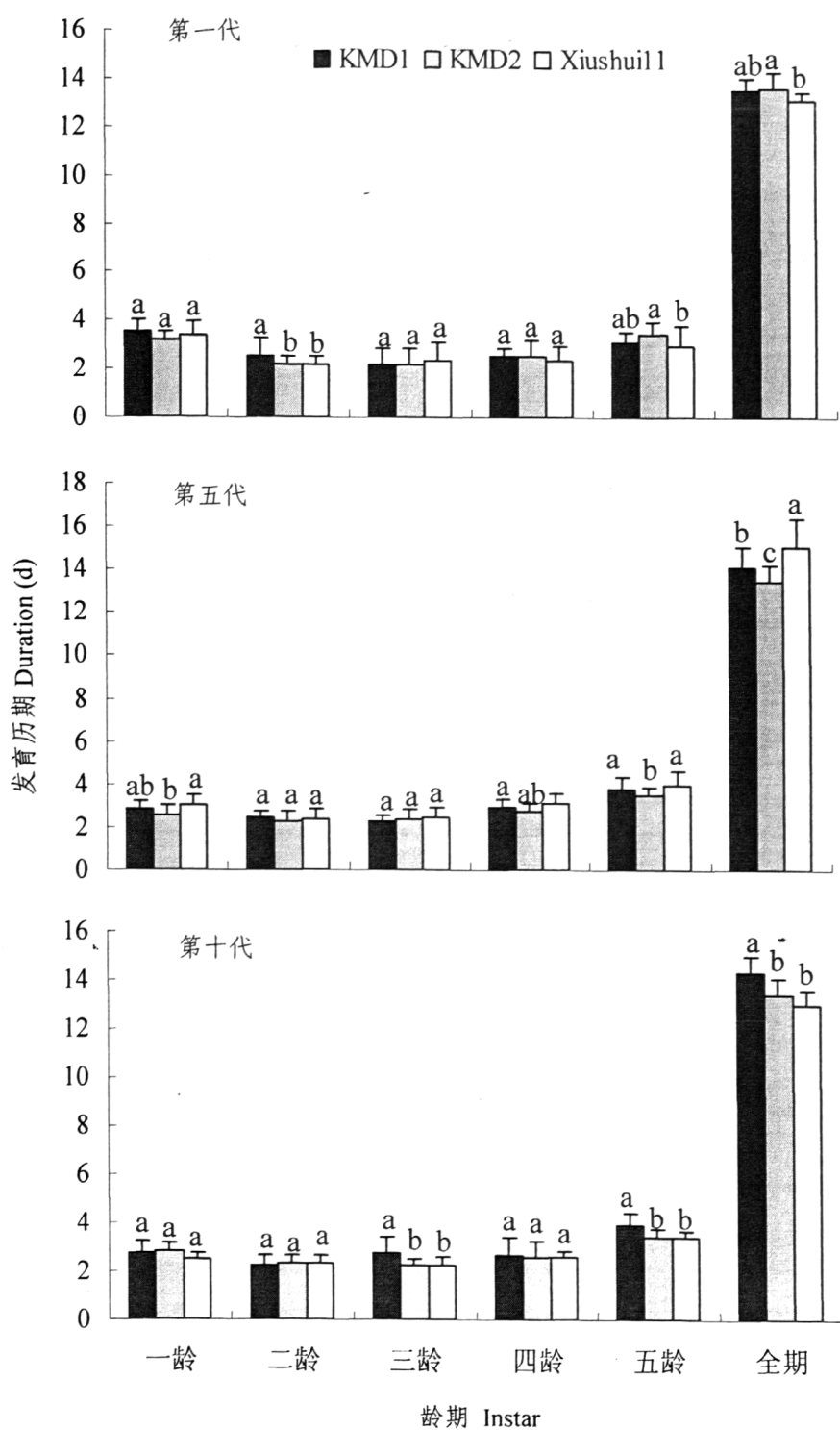


图 3.1 雌性褐飞虱在抗虫粳稻 KMD1 和 KMD2 和对照 Xiushui 11 上发育历期比较
 Fig. 3.1 The female nymph developmental duration of each instar and whole stage of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål on rice genotypes (KMD1 and KMD2) with insect resistance, compared with the non-transgenic control (Xiushui 11).

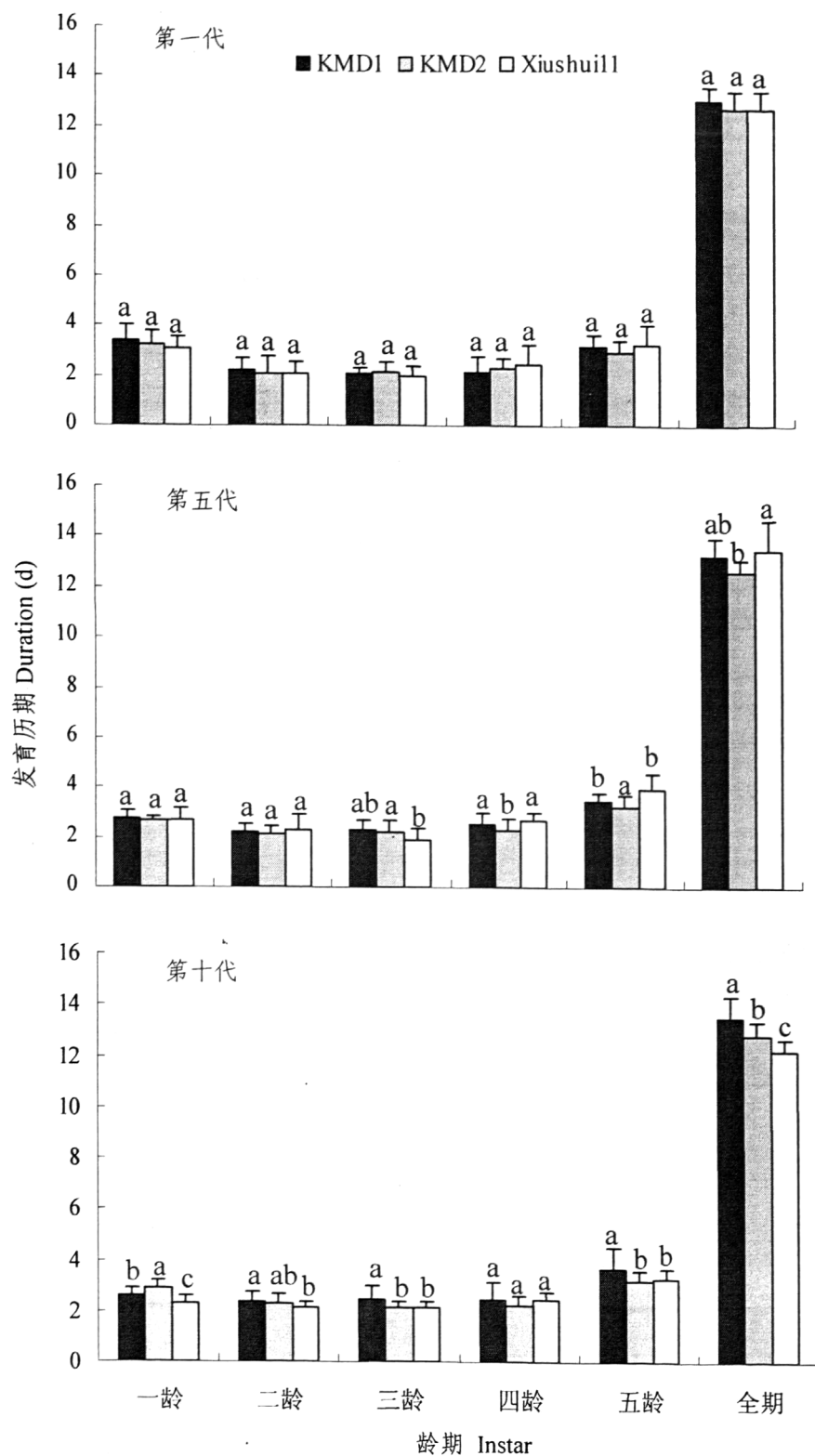


图 3.2 雄性褐飞虱在抗虫梗稻 KMD1 和 KMD2 和对照 Xiushui 11 上发育历期比较
 Fig. 3.2 The male nymph developmental duration of each instar and whole stage of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål on rice genotypes (KMD1 and KMD2) with insect resistance, compared with the non-transgenic control (Xiushui 11).

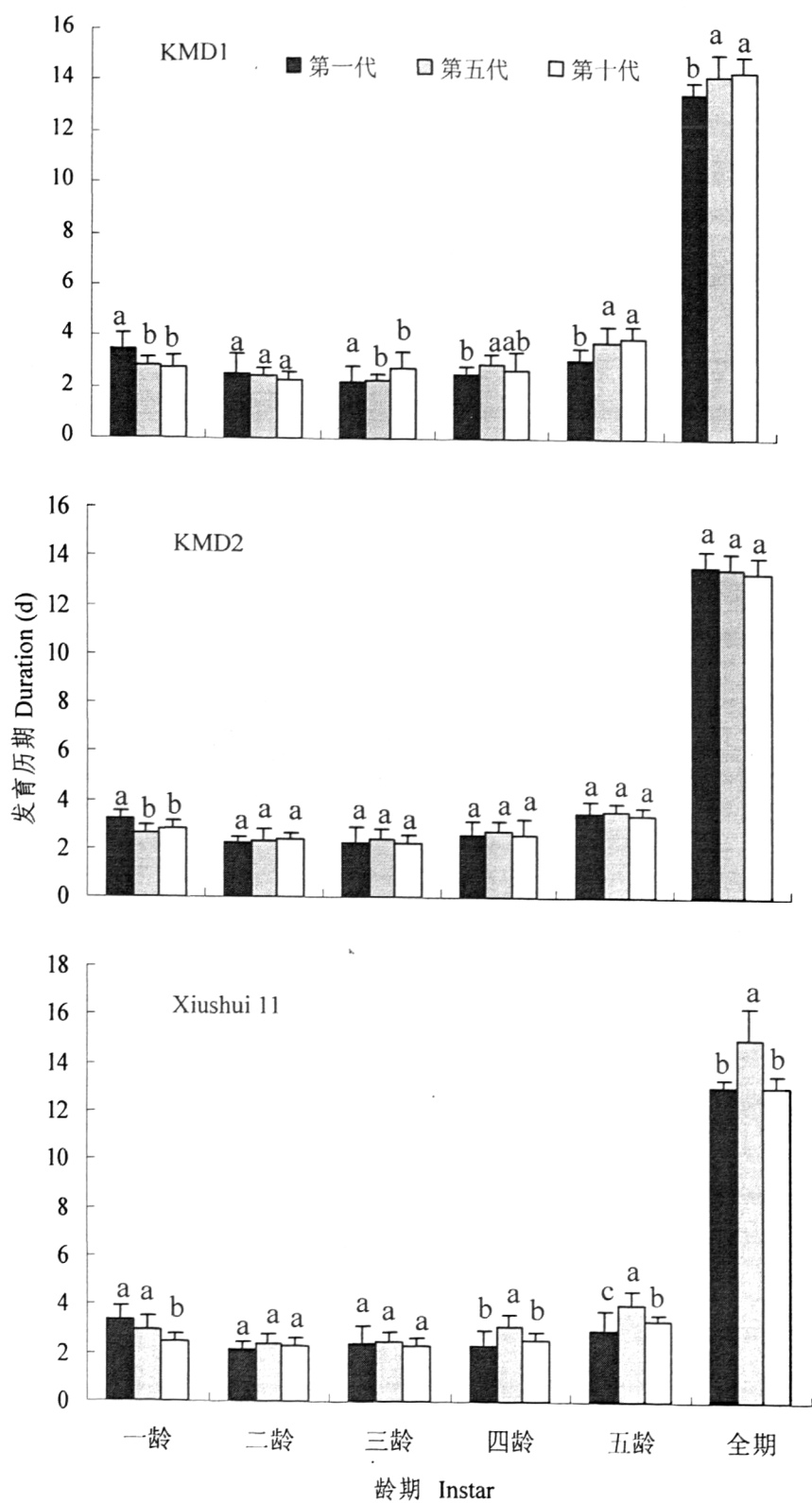


图 3.3 各代雌性褐飞虱在抗虫粳稻 KMD1 和 KMD2 和对照 Xiushui 11 上发育历期比较
 Fig. 3.3 The female nymph of every generation developmental duration of each instar and whole stage of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål on rice genotypes (KMD1 and KMD2) with insect resistance, compared with the non-transgenic control (Xiushui 11).

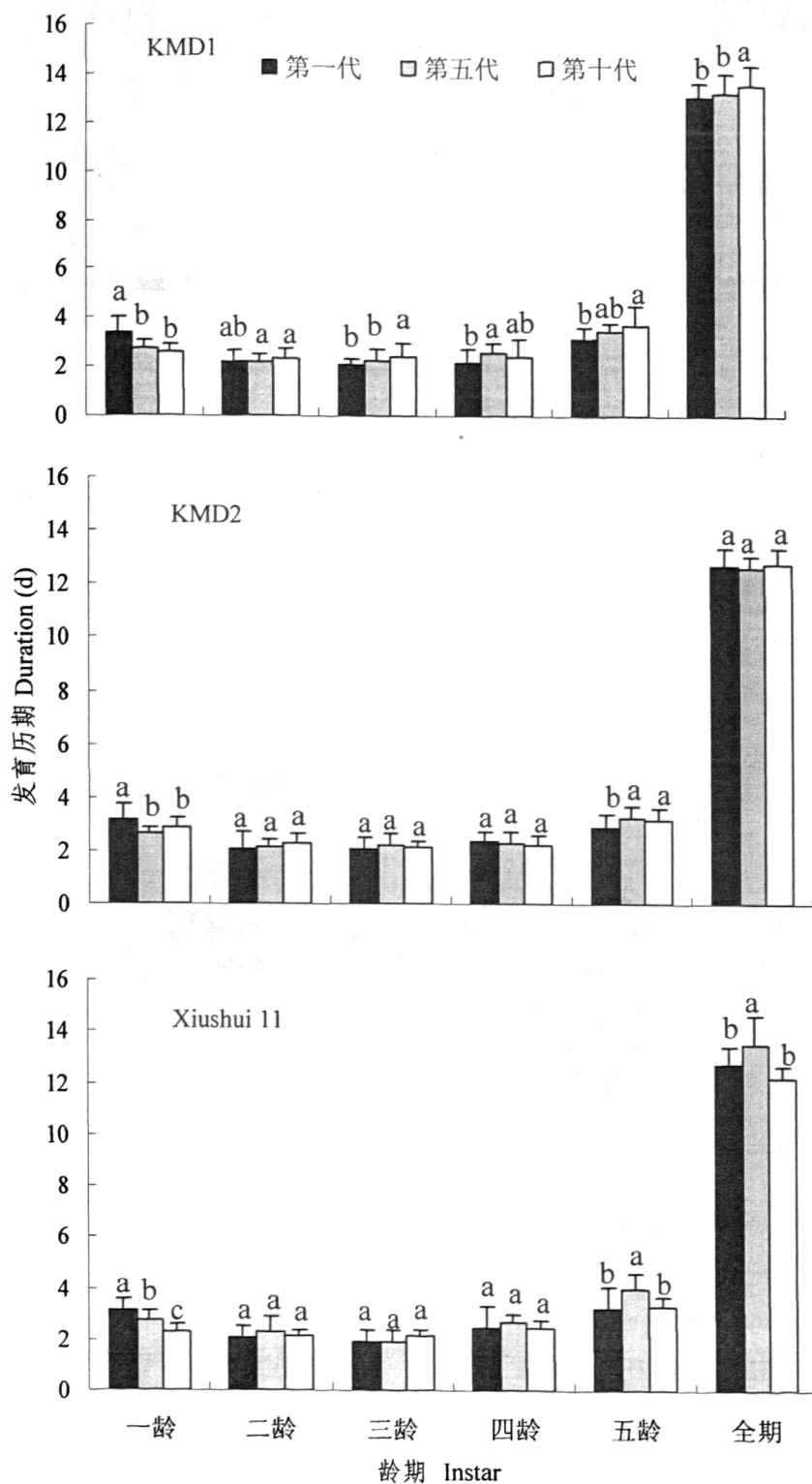


图 3.4 各代雄性褐飞虱在抗虫粳稻 KMD1 和 KMD2 和对照 Xiushui 11 上发育历期比较
 Fig. 3.4 The male nymph of every generation developmental duration of each instar and whole stage of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål on rice genotypes (KMD1 and KMD2) with insect resistance, compared with the non-transgenic control (Xiushui 11).

3 讨论

综合 2.1 和 2.2 的分析, 结果表明, 纵向地从继代饲养代数对褐飞虱发育的影响来看, 取食 KMD2 的飞虱一代、五代与十代间其发育历期无显著差异, 而取食 KMD1 的飞虱其发育时间由一代到十代有所延长, 其中雌虫五代和十代间无显著差异, 雄虫一代和五代间无显著差异; 横向地从基因型上来看, 排除第五代中取食 Xiushui 11 的飞虱发育时间显著延长的特异现象, 取食 KMD2 的飞虱相对于取食 Xiushui 11 的飞虱其发育历期无显著差异, 第十代中, 取食 KMD1 的飞虱相对于取食 Xiushui 11 的其发育时间显著地长一些。

综合起来看, 笔者认为, 褐飞虱以转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻品系 KMD1 和 KMD2 为食时, 其雌、雄若虫发育总历期与取食对照 Xiushui 11 的飞虱之间无显著性差异, 转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻品系 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱的发育无不利影响。这与转 SCK+*cry1Ac* 双基因抗虫水稻品系 MSA 和 MSB 对褐飞虱和白背飞虱若虫发育总历期均无显著影响(傅强等, 2003)的结果一致, 也与 Bernal 等报道的 5 种含不同 Bt 基因或启动子的转基因抗虫水稻品系对褐飞虱若虫发育无显著影响的结果相符(Bernal *et al.*, 2002)。至于取食 KMD1 的飞虱其发育时间显著地长这一点, 有可能与褐飞虱在 KMD1 上的取食量少, 不能为其生长发育提供足够的营养有关(陈茂, 2005)。然而, 谭红等的研究表明, 白背飞虱以转 *cry1Ab* 基因抗虫籼稻品系 B1 和 B6 为食时, 其雌、雄若虫发育总历期均显著长于对照, 证明 B1 和 B6 似不利于白背飞虱的发育(谭红等, 2006)。究其原因, 可能与供试水稻品系亲本本身抗虫性, 及其所含有的抗虫基因和启动子类型、外源基因插入位置等有关(谭红等, 2006)。

第四章 转 *cry1Ab* 抗虫粳稻对褐飞虱脂肪体共生菌的影响

近年来, 抗虫转 Bt 基因作物对其非靶标生物的影响业已成为人们关注的生物安全焦点之一(Poppy, 2000)。褐飞虱属同翅目飞虱科(Delphacidae), 是我国及东南亚诸多水稻生产国重要害虫之一。褐飞虱腹部脂肪体中存在类酵母共生菌, 其在褐飞虱生长发育和繁殖过程中起着十分重要的作用(Noda *et al.*, 1977)。我国大陆地区, 褐飞虱体内共生菌的研究起步较晚, 进入 20 世纪 90 年代才陆续开展, 且该领域研究是结合抗性品种水稻防治褐飞虱危害的研究开展的(吕仲贤等, 2000)。以往的研究已经证明类酵母菌在褐飞虱对水稻营养物质的吸收和利用过程中起着重要作用, 褐飞虱种群对抗性水稻品种的致害性变化往往伴随着体内共生菌的变化(张志涛等, 1997; 吕仲贤等, 2001)。为此, 本章开展褐飞虱在与不同抗性水稻品种(KMD1、KMD2)及对照 Xiushui 11 互作过程中对共生菌影响的研究, 以期为深入研究褐飞虱致害性变异与共生菌的关系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试水稻

供试 Bt 水稻为处于 R_{15} 代的 2 个粳稻纯合品系, 即 KMD1 和 KMD2。这 2 个品系源于 2 个独立的 R_0 代转化株, 均采用农杆菌介导法获得, 均含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子(Cheng *et al.*, 1998), 对照为其非转基因亲本品种 Xiushui 11。供试水稻材料均播种于防虫网室内, 并于 30 日龄左右移栽, 供室内试验用。

1.2 供试昆虫

供试原始代褐飞虱取自本试验室在杂交水稻(中浙优 1 号)上连续饲养的实验种群。试验开始后分别置苗龄为 60 天左右的 KMD1、KMD2 和 Xiushui 11 上于控温控光的养虫室内继代饲养, 其中饲养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期(明: 暗) 14 h:10 h、光强度 3500~4000 Lux、湿度 $70 \pm 5\%$ 。

1.3 样品采集

继代饲养期间，于 KMD1，KMD2 和 Xiushui 11 饲养的褐飞虱，分别于第 1 至 5 代的每一代各随机取羽化 24h 内的雌雄成虫各 50 头供实验用。

1.4 样品制备与褐飞虱脂肪体共生菌计数

样品每10头设为一个重复，雌雄各设5个重复。将每个重复置于1.5ml离心管中，1/10 000 电子天平称重以计算虫体重，然后回置于1.5ml离心管中，研磨，研磨充分后，加1ml0.8%生理盐水稀释。混匀，10×40倍显微镜下观察稀释液，血细胞记数板刻度不清晰，鉴于此，进一步做如下处理：稀释液离心(3000 r/min) 8min，弃上清(镜检无共生菌)，加1mL 0.8%的生理盐水震荡混匀后再次离心，弃上清(镜检无共生菌)，再加1mL 0.8%的生理盐水震荡混匀，吸取6μL匀浆液于血球计数板上，在10×40倍显微镜下观察，血细胞记数板刻度变得清晰，通过5点取样法观察共生菌数量，重复5次。

每一代样品都做如上处理。用原始代褐飞虱做一个对照处理，步骤同上。

1.5 数据分析

计数所用血球计数板为25格×16格规格，每毫升类酵母共生菌数(U)计算公式如下(方法参照：Ian Freshney, 2004)

$$U(\text{类酵母共生菌数} / \text{ml}) = (80 \text{小格内酵母细胞个数} / 80) \times 400 \times 10^4$$

$$\text{类酵母共生菌数} / \text{克虫体重} = U / \text{每个重复中10头虫的重量}$$

数据分析采用8.50版DPS试验统计分析软件进行分析(唐启义和冯明光, 2007)。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱类酵母共生菌数量变化趋势

褐飞虱于转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻上继代饲养后，褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化趋势如图 2.1 所示(共生菌数量数据取常用对数)。于转 *cry1Ab* 基因

抗虫粳稻上继代饲养后，相对于原始代褐飞虱来讲，雌成虫体内类酵母共生菌数量下降，而雄成虫体内类酵母共生菌数量总体呈上升趋势。相对于 KMD2 和 Xiushui 11，KMD1 对褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量的影响较平缓。

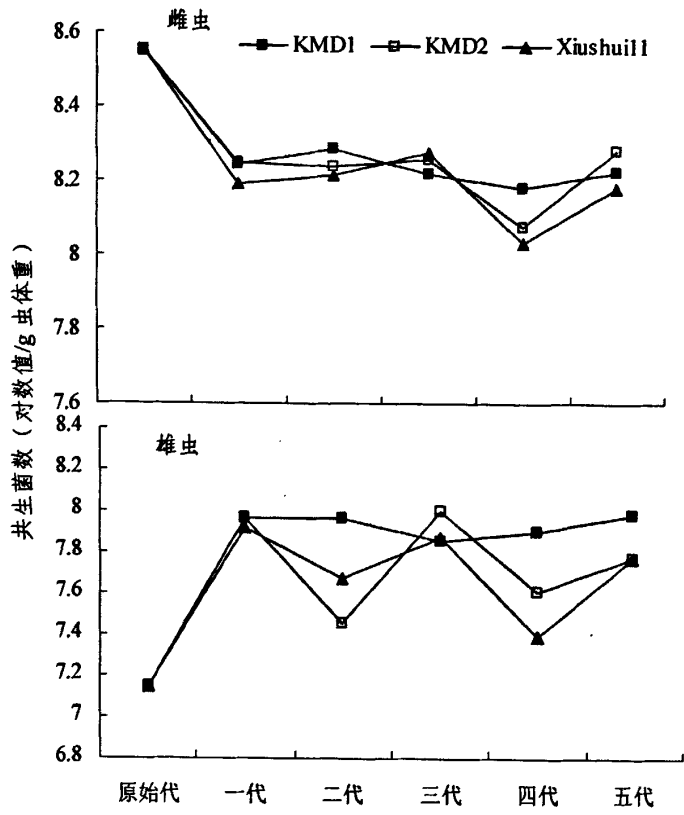


图 4.1 褐飞虱类酵母共生菌数量变化趋势

Fig. 4.1 Quantity variety of yeast-like endosymbiote of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.

2.2 转cry1Ab粳稻对褐飞虱雌成虫脂肪体共生菌数量的影响

统计数据显示，本实验中雌、雄成虫体内脂肪体类酵母共生菌数量上相差一个数量级，有极显著性差异的。由表 4.1 得知，横向的从水稻基因型上看，第一代、第二代和第三代中， p 值 >0.05 ，KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间是无显著性差异的，且第一代、第二代中取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱体内共生菌的数量相对于取食 Xiushui 11 的飞虱是有所

升高的，而第四代和第五代中 KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间有显著性差异的(p 值 <0.05)，且取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱体内共生菌的数量相对于取食 Xiushui 11 的飞虱显著性升高；纵向的从褐飞虱继代饲养代别上看，KMD1 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响无显著性差异(p 值 >0.05)，而 KMD2 和 Xiushui 11 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响有极显著性差异(p 值 <0.01)。

表 4.1 转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱雌成虫脂肪体类酵母共生菌的影响

Table 4.1 Effect of transgenic rice on quantity of yeast-like endosymbiote in female brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.

世代	供试材料 Genotypes			Duncan 检验
Generation	KMD1	KMD2	Xiushui 11	(P 值)
第 1 代(First)	8.241±0.0527ab	8.249±0.0484ab	8.191±0.0324b	>0.05
第 2 代(Second)	8.286±0.0875a	8.238±0.0716ab	8.215±0.119ab	>0.05
第 3 代(Third)	8.217±0.0657ab	8.257±0.0484ab	8.276±0.0308ab	>0.05
第 4 代(Forth)	8.182±0.0439b	8.075±0.0629c	8.035±0.107c	<0.05
第 5 代(Fifth)	8.222±0.0496ab	8.279±0.0315ab	8.183±0.0510b	<0.05
Duncan 检验(P 值)	>0.05	<0.01	<0.01	

注：表中数据为平均值±标准差。Duncan 氏多重比较结果表明，同一行或同一列中具同小写字母的数据间差异分别未达显著($P<0.05$)水平。表 4.2 同之。

Note: The date showed in the table were means± S. E. Means of the same genotype rice in different generation in the same vertical row followed by the different lowercase letter were significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple rang test, so as the means of different genotype rice in the same horizontal row. The same with table 5.2.

2.3 转 *cry1Ab* 粳稻对褐飞虱雄成虫脂肪体共生菌数量的影响

由表 4.2 得知，横向的从水稻基因型上看，第一代和第三代中，KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间无显著性差异的，而第二代、第四代和第五代中，KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间有显著性差异的，其中第四代差异极显著(p 值 <0.01)。其中第四代和第五代中，取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱体内共生菌的数量相对于取食 Xiushui 11 的飞虱显著性升高，这与雌性褐飞虱的结论是一致的；纵向的从褐飞虱继代饲养代别上看，KMD1 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响无

显著性差异，而 KMD2 和 Xiushui 11 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响有极显著性差异，这与对褐飞虱雌成虫的影响是一致的。

表 4.2 转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱雄成虫类酵母类酵母共生菌的影响

Table 2.2 Effect of transgenic rice on quantity of yeast-like endosymbiote in male brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.

世代 Generation	供试材料 Genotypes			Duncan 检验 (P 值)
	KMD1	KMD2	Xiushui11	
第 1 代(First)	7.959±0.0708ab	7.962±0.056ab	7.915±0.0763ab	>0.05
第 2 代(Second)	7.965±0.0966ab	7.459±0.178ef	7.675±0.348cd	<0.05
第 3 代(Third)	7.857±0.0595abc	8.004±0.0598a	7.869±0.182abc	>0.05
第 4 代(Forth)	7.902±0.146ab	7.605±0.110de	7.394±0.141f	<0.01
第 5 代(Fifth)	7.985±0.030ab	7.775±0.145bc	7.774±0.175bcd	<0.05
Duncan 检验(P 值)	>0.05	<0.01	<0.01	

3 讨论

水稻抗虫品种的利用是水稻害虫综合治理重要策略之一，尤其是在用于治理水稻重要害虫稻飞虱(如褐飞虱和白背飞虱)方面已发挥了很好的作用。随着以稻螟虫等鳞翅目害虫为靶标的抗虫转基因水稻的问世，如何使获得的抗虫转基因水稻材料至少仍保留其亲本原有的对非靶标害虫如稻飞虱的抗性是颇为重要的。考虑到褐飞虱脂肪体类酵母共生菌在褐飞虱生长发育中的重要作用，及时的为转基因水稻对褐飞虱脂肪体共生菌的影响作出评价显得尤为必要。

本章结果表明，从褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化趋势上看，于转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻上继代饲养后，相对于原始代褐飞虱来讲，雌成虫体内类酵母共生菌数量下降，而雄成虫体内类酵母共生菌数量总体呈上升趋势，这可能是由于雌成虫取食量多，雄成虫取食量少，进入新的环境后雄成虫取食量更少，而雌成虫体内共生菌数量基数大，雄成虫体内共生菌数量基数小，因此雄成虫需要更多的共生菌为其提供氮源，提高其对固醇类物质的利用(Sasaki *et al.*,1996)，并合成寄主所必需的氨基酸(傅强等, 2001)，以提高虫体的生长发育能力。其中取食 KMD2 和 Xiushui 11 的褐飞虱体内共生菌数量变化比较一致，且变化比较

剧烈,这可能与飞虱突然转移到一个新的环境,需要适应过程有关;而取食 KMD1 的褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化较平缓。这可能与相对于 KMD2 和 Xiushui 11 褐飞虱在 KMD1 排泄蜜露量少或取食量少有关(陈茂, 2005), 具体的机理问题目前尚不清楚,有待进一步研究。

转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻对褐飞虱成虫脂肪体类酵母共生菌的影响显示, 不论雌虫还是雄虫, 第一代和第三代中, KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间是无显著性差异的($p>0.05$), 而第四代和第五代中 KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间是有显著性差异的, 且从一代到五代的过程中, 相对于取食 Xiushui 11 的飞虱来讲, 取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱体内共生菌数量总体上呈现先升高、后降低、再升高的趋势。这可能是因为, KMD1 和 KMD2 不利于飞虱的取食, 而褐飞虱脂肪体共生菌在其寄主营养利用和新陈代谢方面有重要作用, 因此取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱需要多一些的共生菌为其提供营养并促进代谢。而由于第二代是褐飞虱适应抗性水稻的关键代, 第二代和第三代的共生菌数量便呈现减少的现象。这与已有的研究结果不太一致, 已有研究证明水稻品种抗性对褐飞虱体内共生菌的数量有明显影响, 如取食抗性水稻品种(Mudgo 含 *Bph1* 抗虱基因和 ASD7 含 *Bph2* 抗虱基因)后共生菌数量急剧减少(吕仲贤等, 2001), 连续取食抗性水稻品种(IR26 和 IR36, IR26 含 *Bph1* 抗虱基因, IR36 含 *Bph2* 抗虱基因)二三个世代后, 褐飞虱体内共生菌的数量均显著降低(陈法军等, 2006)。这应该是因为抗性水稻品种 Mudgo、ASD7、IR26 和 IR36 中含有抗虱基因, 而 KMD1 和 KMD2 中不含抗虱基因。

另外, 从褐飞虱继代饲养代别上看, 不论雌虫还是雄虫, KMD1 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响无显著性差异, 而 KMD2 和 Xiushui 11 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响有极显著性差异。笔者认为, 这可能与相对于 KMD2 和 Xiushui 11 褐飞虱在 KMD1 排泄蜜露量少或取食量少有关(陈茂, 2005), 具体的缘由机理还有待进一步研究。

总体来讲, 于转基因水稻(KMD1 和 KMD2)上继代饲养后褐飞虱体内的脂肪体共生菌数量相对于对照非转基因 Xiushui 11 上继代饲养的褐飞虱并无显著不同, 转基因水稻 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱脂肪体共生菌并无不利影响。

第五章 Biolog 检测转 *cry1Ab* 抗虫粳稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响

20 世纪 90 年代以来, 为了有效控制水稻螟虫的为害国内外有不少单位相继开展并成功获得了一些抗虫转 Bt 基因水稻(Bt 水稻)种质或品系(High *et al.*, 2004), 其中我国有几个 Bt 水稻材料已进入生产性试验阶段, 显示了良好的应用前景(Huang *et al.*, 2008; Wang and Johnston, 2007)。同时, 就 Bt 水稻的对非靶标节肢动物和土壤微生物等的影响、基因漂移、靶标害虫抗性生态安全性(Chen *et al.*, 2006)与食用安全性(Wang and Johnston, 2007)等相继也作了不同程度的评价研究。就对非靶标害虫影响的评价, 多关注于对其生物学与生态学特性的影响, 而没有关注对其体内肠道微生物的影响。其实, 这种潜在的影响也是很受关注的(Johann and Wackernagel, 2004; Nielsen and Townsend, 2004)。然而, 除有关抗除草剂油菜外源基因通过花粉水平转移至意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、熊蜂 *Bombus terrestris* 和壁蜂 *Osmia bicornis* 肠道细菌的探讨外(Mohr and Tebbe, 2007), 迄今尚乏对其他昆虫影响的报道, 更乏有关 Bt 水稻的研究。为此, 我们利用 Biolog-Eco 方法研究了 Bt 水稻对其非靶标害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的肠道微生物的影响, 以探明 Bt 水稻是否会对其体内肠道微生物的活性及其多样性产生影响, 进而为全面评价 Bt 水稻生态安全性提供信息参考。

1 材料与方 法

1.1 供试水稻

供试 Bt 水稻为处于 R_{15} 代的 2 个粳稻纯合品系, 即 KMD1 和 KMD2。这 2 个品系源于 2 个独立的 R_0 代转化株, 均含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子(Cheng *et al.*, 1998), 对照为其非转基因亲本品种 Xiushui 11。供试水稻材料均播种于防虫网室内, 并于 30 日龄左右移栽, 供室内试验用。

1.2 室内试验

供试原始代褐飞虱取自本试验室在杂交水稻(中浙优1号)上连续饲养的实验种群。试验开始后分别置苗龄为60天左右的KMD1、KMD2和Xiushui 11上于控温控光的养虫室内继代饲养,其中饲养条件为:温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期(明:暗)14 h:10 h、光强度3500~4000 Lux、湿度 $70 \pm 5\%$ 。试验期间,分别于KMD1, KMD2和Xiushui 11种群第1、3、5代随机取羽化后72h的雌成虫供作肠道微生物分析用。

1.3 田间试验

在浙江大学实验农场同一田块中设置3个小区,各小区分别于2007年7月25日单本插种(面积)KMD1、KMD2和对照Xiushui 11,其中对照置于2个Bt水稻品系小区间。小区面积为 333.3 m^2 ,小区间设有1.5 m的隔离田埂。整个生育期肥水管理按常规操作,但不施任何化学农药。在褐飞虱盛发的9月,分别于10日、20日和30日自各小区采集褐飞虱雌成虫。每小区每次随机3点取样,每样品取50头雌成虫,供肠道微生物检测。

1.4 取样与Biolog检测

随机取羽化72小时后的雌成虫50头,置 -20°C 迅速冻死,75%酒精体表消毒3 min,再用0.8%生理盐水清洗。尔后,在无菌状态下解剖并取出肠道,以0.8%生理盐水清洗,并收集至1.5 ml消毒的Eppendorf离心管中,加0.8%生理盐水200 μL ,研磨匀浆,定容至5 ml。最后,加样到Biolog-Eco微平板(Biolog Inc., Hayward, CA)上,每孔加120 μL ,每样一板(包括三个重复),将Biolog板置于 30°C 恒温箱中培养,4 h后用Biolog读数仪(Biolog, Inc., Hayward, CA)读数一次,此次读数设为初始值,然后每隔24 h读数一次,连续一周。具体参照Classen等(Classen *et al.*, 2003)。

1.5 数据统计分析

微生物代谢活性用每孔平均颜色变化率AWCD(Average well color

development)表示, 计算方法如下:

$$AWCD = [\sum (A - A_{CK})] / 31$$

其中: A 为每个碳源孔 590 nm 下的吸光度值减去 750 nm 下的吸光度值;

A_{CK} 为对照孔的吸光度值。

利用各样品培养 96 h 的数据, 计算其微生物群落多样性有关指数, 即 Shannon 指数(H')、Simpson 指数($1/D$)、McIntosh 指数(U)。计算方法参照 Magurran(Magurran, 1988)如下:

$$H' = -\sum p_i \cdot \ln p_i$$

$$D = \sum \frac{(n_i(n_i - 1))}{(N(N - 1))}$$

$$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$$

其中:

P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率

n_i 是第 i 孔的相对吸光值;

N 是相对吸光值总和。

数据分析采用 8.50 版 DPS 试验统计分析软件(唐启义, 冯明光, 2007)进行分析。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱肠道微生物利用碳源的动力学特征

室内试验结果如图 1。不论 Bt 水稻品系 KMD1/KMD2, 还是对照, 其反映肠道微生物利用碳源量的重要指标 AWCD 均随培养时间延长而呈逐渐增大的趋势, 其中 72 h 前增长较迅速, 此后渐趋于平稳。综合继代饲养的 5 代的结果可知, 以 KMD1 为食的褐飞虱肠道微生物 AWCD 明显高于 KMD2 和对照, 说明其肠道微生物利用碳源的能力相对较强。相比之下, 以 KMD2 为食的第 1、3 代褐飞虱肠道微生物 AWCD 在培养 72 h 后明显低于对照, 说明利用碳源的能力相对较弱

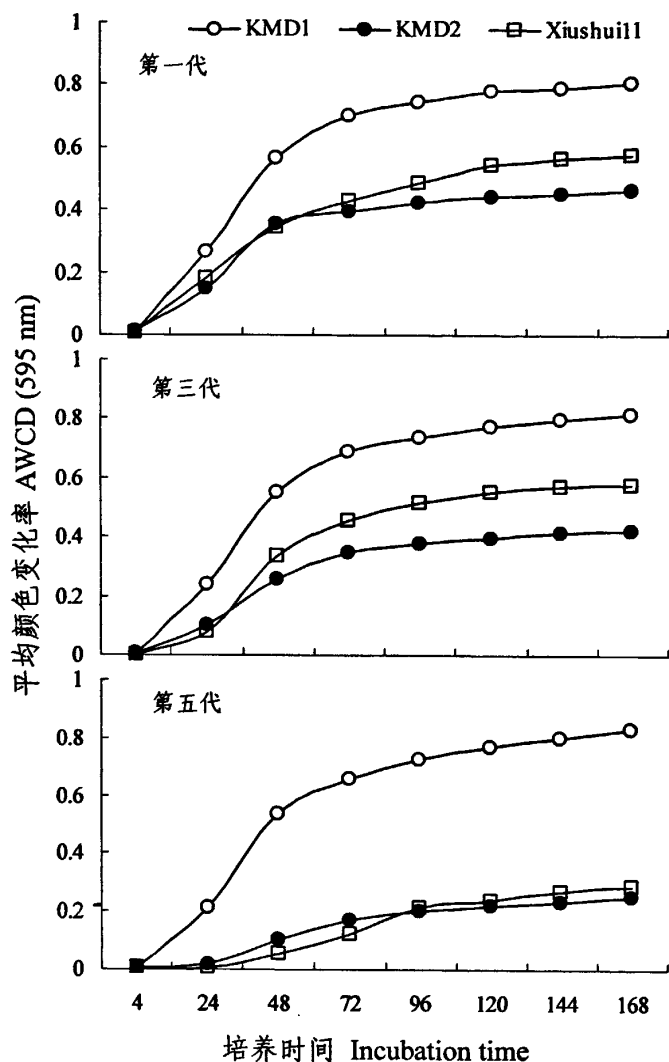


图 5.1 Bt 水稻和对照上室内不同世代褐飞虱肠道微生物群落 AWCD 的动力学

Fig.5.1 Kinetics of average well color development (AWCD) of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* fed on Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) from the 1st to 5th generation under laboratory conditions.

田间试验结果如图 2。不论 Bt 水稻品系 KMD1/KMD2，还是对照，其肠道微生物 AWCD 均随培养时间延长而呈逐渐增大的趋势与室内结果相似。综合 3 次调查结果可知，以 KMD1 为食的褐飞虱肠道微生物 AWCD 明显高于 KMD2 和对照，而 KMD2 和对照间差异不明显。

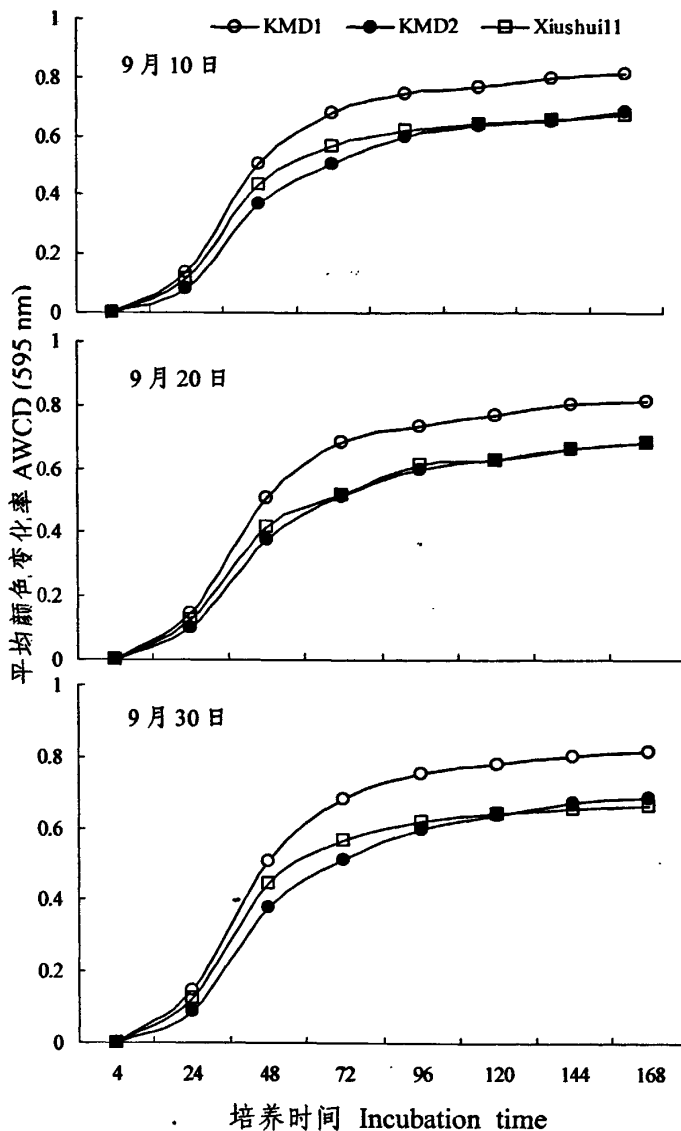


图 5.2 Bt 水稻和对照上田间褐飞虱肠道微生物群落 AWCD 的动力学

Fig.5.2 Kinetics of average well color development (AWCD) of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* fed on Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) under field conditions

2.2 褐飞虱肠道微生物多样性指数分析

室内继代试验结果如表 1。褐飞虱在室内于 Bt 水稻(KMD1/KMD2)上继代饲养 1、3、5 代后，其肠道微生物群落的 Shannon 和 Simpson 指数与对照相比均无

显著差异。就 McIntosh 指数而言, Bt 水稻(KMD1/KMD2)与对照相比则无极显著差异。可见, Bt 水稻对褐飞虱肠道微生物群落的物种丰富度、最常见物种的优势度和均匀度无明显的影响。

田间调查结果如表 2。Bt 水稻(KMD1/KMD2)对褐飞虱肠道微生物群落影响的结果与室内试验相仿, 即对物种丰富度、最常见物种的优势度和均匀度无明显的影响。

表 5.1 Bt 水稻和对照上室内不同世代褐飞虱肠道微生物群落的多样性指数
Table 5.1 Diversity indices of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* fed on Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) from the 1st to 5th generation under laboratory conditions

世代 Generation	供试材料 Genotypes	Shannon index	Simpson index	McIntosh index
第 1 代 First	KMD1	2.789±0.113a	54.951±19.108a	4.593±0.747 abA
	KMD2	2.589±0.187a	84.462±11.681a	2.984±1.105 ab A
	Xiushui 11	2.928±0.295a	129.691±114.942a	3.603±3.078 ab A
第 3 代 Third	KMD1	2.849±0.142a	54.085±11.660a	5.756±1.502 a A
	KMD2	2.418±0.804a	124.307±133.412a	3.485±1.800 ab A
	Xiushui 11	2.639±0.399a	95.441±43.752a	4.282±1.653 abA
第 5 代 Fifth	KMD1	2.988±0.241a	132.544±117.518a	5.407±0.984 abA
	KMD2	2.582±0.766a	36.893±16.107a	3.518±1.286 abA
	Xiushui 11	2.954±0.339a	39.713±24.398a	2.209±1.979 b A

注: 表中数据为平均值±标准差。Duncan 氏多重比较结果表明, 同列中具同一大、小写字母的数据间差异分别未达极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)水平。表 5.2 同之。

Note: The data showed in the table were means± S. E. Means of the same index of different rice in different generation followed by the different lowercase or capitalization letter, were very significantly different ($P<0.01$) or significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple rang test. The same with table 5.2.

3 讨论

Biolog 方法测定原理: 微生物在利用碳源的过程中产生自由电子, 与四唑燃料发生还原显色反应, 颜色的深浅可以反映微生物对碳源的利用程度; 因微生物对不同碳源的利用能力很大程度上取决于微生物种类和固有性质。因此, 在同一块微平板上同时测定微生物对不同单一碳源利用能力(sole carbon source utilization, SCSU), 就可以鉴定微生物种类或比较分析不同的微生物群落。迄今, 该方法因具有快速、简便等优点而在根际或土壤微生物群落的功能多样性等研究方面已得到广泛的应用(Preston *et al.*, 2002; Konopka *et al.*, 1998; 郑华等, 2004)。

但用于昆虫肠道微生物群落研究仍甚少，这方面有待尝试与验证。

昆虫肠道微生物与其消化、营养，以及发育是密切相关的(Dillon R J and Dillon V M, 2004)。因此，评价 Bt 水稻对非靶标害虫褐飞虱肠道微生物的影响，在一定程度也探明其对褐飞虱生物学的影响。本文不论室内还是田间的结果均表明，从AWCD 动力学特征来看以KMD1 为食的褐飞虱其肠道微生物的生理活性均显著地高于KMD2 和对照。这可能与褐飞虱在 KMD1 排泄蜜露少或取食少有关(陈茂, 2005)，即肠道微生物生理活性的提高或许能弥补取食少而造成营养不良的缺陷。是否确实如此尚待验证。从褐飞虱肠道微生物的 Shannon、Simpson、McIntosh 多样性指数综合分析可知，Bt 水稻(KMD1/KMD2)对褐飞虱肠道微生物多样性无明显的影响。这与田间调查得知，其对褐飞虱种群密度无显著影响(Chen *et al.*, 2007)是一致的。此外，至于褐飞虱肠道微生物群落究竟有哪些种类，这有待通过分离培养并结合分子标记检测等方法进行研究。

表 5.2 Bt 水稻和对照上田间褐飞虱肠道微生物群落的多样性指数

Table 5.2 Diversity indices of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* fed on Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) under field conditions

取样时间 (月/日) Sampled date (month/day)	供试材料 Genotypes	Shannon index	Simpson index	McIntosh index
9/10	KMD1	3.055 ± 0.071a	42.728 ± 3.046a	6.027 ± 0.529a
	KMD2	2.807 ± 0.144a	73.933 ± 27.811a	5.977 ± 0.919a
	Xiushui 11	2.534 ± 0.622a	36.377 ± 13.582a	5.220 ± 1.719a
9/20	KMD1	3.155 ± 0.271a	40.426 ± 4.020a	6.226 ± 0.544a
	KMD2	2.921 ± 0.168a	70.678 ± 27.566a	6.022 ± 1.214a
	Xiushui 11	2.614 ± 0.322a	34.868 ± 14.784a	5.622 ± 1.728a
9/30	KMD1	3.068 ± 0.056a	42.899 ± 3.604a	6.122 ± 0.548a
	KMD2	2.860 ± 0.144a	72.411 ± 28.548a	5.862 ± 1.028a
	Xiushui 11	2.628 ± 0.544a	35.766 ± 16.004a	5.834 ± 1.821a

第六章 总讨论

目前,转基因产品已经引起国内外各界的广泛关注。2007年,全球转基因作物种植面积增长率达12%,即增加1230万公顷(3000万英亩),达到1.143亿公顷(2.824亿英亩)。转基因作物的种植面积以67倍的空前速度增长,成为近代历史上发展最快的作物技术(James, 2007)。面对转基因作物如此迅速的增长,不论是反对者还是赞成者都不能对此视而不见。现在亟待解决的问题已不再是要不要研究和开发转基因产品,而是如何就转基因作物的生态安全性进行准确科学的评价,如何运用转基因技术为人类的生存与发展提供更多、更安全的优质产品。本论文就转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻对褐飞虱生长发育及共生微生物的影响进行了初步的研究,得到了一定的结果,为转基因水稻的生态安全性评价提供了一定的参考依据。

1 转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻对褐飞虱生长发育的影响

目前,关于转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱生长发育的影响已有报道,但还未有褐飞虱于转基因水稻上连续继代饲养后的影响有研究,为了更深入地反应转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱生长发育的影响,本文就褐飞虱于转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻上继代饲养后的发育历期进行了测定。实验结果表明,纵向地从继代饲养代数对褐飞虱发育的影响来看,取食 KMD2 的飞虱其发育时间无显著不同,而取食 KMD1 的飞虱其发育时间由一代到五代有所延长,其中雌虫五代和十代间无显著不同,雄虫一代和五代间无显著不同;横向地从基因型上来看,取食 KMD2 的飞虱相对于取食 Xiushui 11 的其发育时间无显著不同,第十代中,取食 KMD1 的飞虱相对于取食 Xiushui 11 的其发育时间显著地长一些。

结果表明,褐飞虱以转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻品系 KMD1 和 KMD2 为食时,其雌、雄若虫发育总历期与对照 Xiushui 11 之间无显著性差异,转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻品系 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱的发育无不利影响。这与转 *SCK+cry1Ac* 双基因抗虫水稻品系 MSA 和 MSB 对褐飞虱和白背飞虱若虫发育总历期均无显著影响的结果一致,也与 Bernal 等报道的5种含不同 Bt 基因或启动子的转基因抗虫水稻品系对褐飞虱若虫发育无显著影响的结果相符。然而,与谭红对转

cry1Ab 基因抗虫水稻品系 B1 和 B6 对白背飞虱影响的研究结果却不一致。这可能与供试材料有关,由此可见,在评价抗虫转基因水稻对非靶标害虫抗性程度及影响非靶标害虫发生与为害程度时应遵循 Timmons 等 (1996)提出了因时、因地、因种的个案原则去评估转基因作物的环境安全性。

2 转*cry1Ab*抗虫梗稻对非靶标害虫褐飞虱脂肪体共生菌的影响

从褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化趋势上看,于转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻上继代饲养后,相对于原始代褐飞虱来讲,雌成虫体内类酵母共生菌数量下降,而雄成虫体内类酵母共生菌数量总体呈上升趋势。其中取食 KMD2 和 Xiushui 11 的褐飞虱体内共生菌数量变化比较一致,且变化比较剧烈,这可能与飞虱突然转移到一个新的环境,需要适应过程有关;而取食 KMD1 的褐飞虱脂肪体内类酵母共生菌数量变化较平缓。这可能与相对于 KMD2 和 Xiushui 11 褐飞虱在 KMD1 排泄蜜露量少或取食量少有关(陈茂, 2005),具体的机理问题目前尚不清楚,有待进一步研究。转 *cry1Ab* 基因抗虫梗稻对褐飞虱成虫脂肪体类酵母共生菌的影响显示,不论雌虫还是雄虫,第一代和第三代中, KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间是无显著性差异的($p>0.05$),而第四代和第五代中 KMD1、KMD2 及 Xiushui 11 分别对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响之间是有显著性差异的,且从一代到五代的过程中,相对于取食 Xiushui 11 的飞虱来讲,取食 KMD1 和 KMD2 的飞虱体内共生菌数量总体上呈现先升高、后降低、再升高的趋势。另外,从褐飞虱继代饲养代别上看,不论雌虫还是雄虫, KMD1 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响无显著性差异,而 KMD2 和 Xiushui 11 从一代到五代对褐飞虱脂肪体共生菌数量的影响有极显著性差异。但是,从总体趋势上看,于 KMD1、KMD2 及对照 Xiushui 11 上继代饲养的褐飞虱其体内脂肪体共生菌数量变化是一致的,因此笔者认为转基因水稻 KMD1 和 KMD2 对褐飞虱脂肪体共生菌并无不利影响。

3 Biolog检测转*cry1Ab*抗虫粳稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响

昆虫肠道微生物与其消化、营养，以及发育是密切相关的，因此，评价 Bt 水稻对非靶标害虫褐飞虱肠道微生物的影响，在一定程度也探明其对褐飞虱生物学的影响。本论文首次采用 Biolog 方法检测了抗虫转 *cry1Ab* 水稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响。本文不论室内还是田间的结果均表明，从 AWCD 动力学特征来看以 KMD1 为食的褐飞虱其肠道微生物的生理活性均显著地高于 KMD2 和对照，这可能与褐飞虱在 KMD1 排泄蜜露少或取食少有关。从褐飞虱肠道微生物的 Shannon、Simpson、McIntosh 多样性指数综合分析可知，Bt 水稻 (KMD1/KMD2)对褐飞虱肠道微生物多样性无明显的影响。

4 本研究的特色与创新点

本论文采用继代饲养的方法研究转基因抗虫粳稻对非靶标害虫褐飞虱生长发育的影响，与以往只是单代评价转基因水稻对飞虱生长发育的影响相比能够更深层次的反应问题。本论文首次采用 Biolog 方法检测抗虫转 *cry1Ab* 基因水稻对褐飞虱肠道微生物功能多样性的影响，这在国内外尚属首例。

本文的结论对转基因水稻的安全性评价，及转基因水稻的商业化决策、管理与合理持续利用均有一定的参考价值。

5 今后有待研究的问题

由于时间等种种原因，本文仅对转 *cry1Ab* 基因抗虫粳稻对褐飞虱生长发育及共生微生物的影响进行了初步的研究，尚有很多工作需进一步加以研究，也存在一些不足之处。今后有待进一步研究的工作主要有：

- 1) 就对褐飞虱生物学性状影响方面应进一步考察产卵量、存活率、羽化率、取食量等指标；
- 2) 就更多转基因水稻品系对褐飞虱生物学特性及共生微生物的影响进行更系统的研究；

- 3) 明确 Bt 杀虫蛋白在褐飞虱体内的传递动态;
- 4) 检测 Bt 杀虫蛋白是否会转移到褐飞虱共生微生物中。

参考文献

- 陈法军, 张珏锋, 俞晓平. 稻飞虱酵母类胞内共生菌的组织学研究进展. 昆虫知识. 2005. 42(6): 607-611.
- 陈法军, 张珏锋, 夏湛恩, 等. 褐飞虱体内酵母类共生菌的形态观察. 动物分类学报. 2006a. 31(1): 55-62.
- 陈法军, 曾敏, 张珏锋, 等. 三种稻飞虱成虫体内酵母类共生菌的形态差异. 动物分类学报. 2006b. 31(4): 728-735.
- 陈法军, 张珏锋, 陈建明, 等. 水稻与褐飞虱互作过程中虫体内类酵母共生菌的个体大小及数量变化. 浙江农业学报. 2006c. 18(5): 294-298.
- 陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 等. 2006. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. 农药. 45(11): 726-729.
- 陈茂, 叶恭银, 胡萃, 等. 转 Bt 基因籼稻对褐飞虱取食、产卵行为的影响. 植物保护学报. 2003. 30(4): 365-370.
- 陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 等. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食与产卵行为为影响的评价. 中国农业科学. 2004. 37(2): 222-226.
- 陈茂. 转基因抗虫、抗病毒水稻对非靶标生物的生态安全性评价. 杭州: 浙江大学博士学位论文. 2005. 10-46.
- 傅强, 张志涛, 胡萃, 等. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. 昆虫学报. 2001. 44(4): 534-539.
- 傅强, 王峰, 李登虎, 等. 转基因抗虫水稻 MSA 和 MSB 对非靶标害虫褐飞虱和白背飞虱的影响. 昆虫学报. 2003. 46(6): 697-704.
- 刘志成, 叶恭银, 胡萃, 等. *cry1Ab/cry1Ac* 基因籼稻对稻田节肢动物群落的影响. 昆虫学报. 2003b. 46(4): 454-465.
- 刘志成, 叶恭银, 胡萃. 抗虫转基因水稻及化学杀虫剂对稻田节肢动物群落结构的影响. 应用生态学报. 2004. 15(12): 2309-2314.
- 刘雨芳, 尤民生. 转基因抗虫水稻对稻田捕食性节肢动物群落的影响[A]. 2004 年广东、湖南、江西、湖北四省动物学会学术研讨会论文集[C]. 武汉农业大学水产学院.

- 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 不同虫源和致害性的褐飞虱体内共生菌的种群动态. 华东昆虫学报. 2001a. 10(1): 44-49.
- 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响. 植物保护学报. 2001b. 28(3): 193-197.
- 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用. 昆虫学报. 2001c. 4(2): 197-204.
- 盛承发, 王红托, 高留德, 宣维健. 我国水稻螟虫大发生现状损失估计及防治对策. 植物保护. 2003. 29(1): 37-39.
- 谭红, 叶恭银, 沈君辉, 等. 转 *cry1Ab* 基因抗虫籼稻对非靶标害虫白背飞虱发育与繁殖的影响. 植物保护学报. 2006. 33(3): 251-256.
- 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统: 实验设计、统计分析及数据挖掘. 北京: 科学出版社, 2007. 1-1100.
- 叶恭银, 胡萃, 舒庆尧. 转基因抗虫水稻的转育及其合理持续利用. 见: 程家安, 周伟军主编. 跨世纪农业发展与研究. 北京: 中国环境科学出版社. 1998. 406-414.
- 叶恭银, 楼兵干, 郑经武等. 植物保护学. 浙江大学出版社. 2006. 251-256.
- 叶恭银, 张传溪, 鲁兴萌. 转基因抗虫作物与转基因昆虫. 见: 程家安, 唐振华主编. 昆虫分子科学. 北京: 科学出版社. 2001. 327-365.
- 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. 土壤学报. 2004. 41(3): 456-461.
- Shelton A M, Zhao J-Z, and Roush R T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. Ann. Rev. Entomol. 2002. 47: 845-881.
- Baumann P, Baumann L, Lai C Y *et al.* Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. Ann. Rev. Microbiol. 1995. 49: 55-94.
- Beever D E, Glenn K, Phipps R H. A safety evaluation of genetically modified feedstuffs for livestock production: the fate of transgenic DNA and proteins. Asian-Australas. J. Anim.Sci., 2003. 16.
- Bernal C C, Aguda R M, Cohen M B. Effect of rice line transformed *Bacillus*

- thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. Entomol. Exp. Appl. 2002. 102 (1):21-28.
- Campbell B C. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insect. In: Bernays E A ed. Insect-Plant Interaction. Vol.1. Florida: CRC Press Inc. 1990. 1-44.
- Chen C C. Studies On the intracellular yeas-tlike symbiote in brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. 1. Histological observations and population changes of the symbiote. Z. Ang. Entomol. 1981. 91: 321-327.
- Chen M, Zhao J Z, Ye G Y, *et al.*, Impact of insect-resistant transgenic rice on target insect pests and non-target arthropods in China. Insect Sci. 2006. 13: 409-420.
- Chen M, Ye G Y, Liu Z C, *et al.* Field assessment of the effects of transgenic rice expressing a fused gene of *cry1Ab* and *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on non-target planthopper and leafhopper populations. Environmental Entomol. 2006. 35: 127-134.
- Chen M, Liu Z C, Ye G Y, *et al.* Impacts of transgenic *cry1Ab* rice on non-target planthoppers and their main predator *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae)—A case study of the compatibility of Bt rice with biological control. Biological Control. 2007. 42: 242-250.
- Cheng D-J and Hou R-F. Ultrastructure of the yeast-like endosymbiont in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homopteran: Delphacidae). Endocytobiosis. Cell Res. 1996. 11, 107-117.
- Cheng D-J and Hou R-F. Histological observation on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). Tissue & Cell. 2001. 33 (3): 273-279.
- Cheng X, Sardana R, Altosarr I. Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic *cry1Ab* and *cry1Ac* genes are highly toxic to yellow stem borer and striped stem borer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. 95: 2767-2772.
- Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, *et al.*, Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. FEMS Microbiol Ecol. 2003. 44: 319-328.

- Clive James. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. 2007. ISAAA.
- Cohen MB, Gould F, Bentur J S. Bt rice: practical steps to sustainable use. *Int. Rice Res. News*. 2000a. 25. 4-10.
- Dale D. Insect pests of the rice plant-their biology and ecology. In Heinrichs, E. A. (eds) *Biology and management of rice insects*. Wiley Eastern and New Age International Limited. New Delhi. 1994. 363-485.
- Dale, P. J. et al., Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 2002. 20, 567-574.
- Dillon R J, Dillon V M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Ann. Rev. Entomol.* 2004. 49: 71-92.
- Gould F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 1998. 43: 701-26.
- Grove J A, Kautola H, Javadpour S, *et al.*, Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter. *Biochem Eng J.* 2004. 18: 111-114.
- High S M, Cohen M B, Shu Q Y, *et al.*, Achieving successful deployment of Bt rice. *Trends Plant Sci.* 2004. 19: 286-292.
- Hook E J, Griffith J W. *Ann. Rev. Entomol.* 1980. 25:161-187.
- Hongoh Y, Ishikawa H. Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zool Sci.* 1997.14:581-586.
- Huang J K, Hu R F, Rozelle S, *et al.*, Genetically modified rice, yields, and pesticides: assessing farm-level productivity effects in China. *Economic Development and Cultural Change.* 2008. 56: 241-263.
- Ian Freshney. *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique.* 2004. 363-366
- Ishikawa H. The molecular biology of symbiotic bacteria of Aphididae. *Microbiol. Sci.* 1986. (3): 117 ~ 125.
- Johann de Vries J, Wackernagel W. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant Soil.* 2004. 266: 91-104.
- John E, Losey. *et al.*, Transgenic pollen harms monarch larvae. *scientific*

correspondence.

- Kimiko Uchii, Kazuaki Matsui, Ryuji Yonekura, *et al.*, Genetic and Physiological Characterization of the Intestinal Bacterial Microbiota of Bluegill (*Lepomis macrochirus*) with Three Different Feeding Habits. *Microb. Ecol.* 2006. 51: 277-284.
- Konopka A, Oliver L, Jr. Turco R F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial. Ecol.* 1998. 35: 103-115.
- Lee Y. H. and Hou R. F. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *J. Insect Physiol.* 1987. 33, 851-860.
- Leonardo T E, Muiru G T. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proc.Res.Soc.Lond B (Suppl.)*. 2003. 270: S209-S212.
- Lu, Z X, Heong, K L, Yu X P, *et al.*, Effect of plant nitrogen on ecological fitness of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in rice. *J. Asia Pac. Entomol.* 2004. 7, 97-104.
- Lu Z X, Heong K L, Yu X P, *et al.*, Effects of nitrogen on the tolerance of brown planthopper, *Nilaparvata Lugens*, to adverse environmental factors. *Insect Sci.* 2005. 12, 121-128.
- Magurran A E. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 43-47.
- Malene Schrøder, Morten Poulsen, Andrea Wilcks, *et al.*, A 90-day safety study of genetically modified rice expressing *cry1Ab* protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 2007. 45. 339-349.
- Matteson, P C. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. *Annu. Rev. Entomol.* 2000. 45, 549-574.
- Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z *et al.*, Are Bt crops safe? *Nat. Biotechnol.* 2003. 21. 1003-1009.
- Mohr K I, Tebbe C C. Field study results on the probability and risk of a horizontal

- gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 2007. 75: 573-583.
- Nester E.W, Thomashow L S, Metz M, *et al.* 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: A Critical Scientific Assessment, American Academy of Microbiology, Washington, DC. 2002.
- Nielsen K M, Townsend J P. Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 2004. 22: 1110-1114.
- Noda H. Preliminary histological observation and population dynamics of intracellular yeast-like symbiotes in the smaller brown planthopper, *laodelphax striatellus*(Homoptera: Delphacidae). *App1. Entomol. Zoo1.*, 1974. 9: 275-277.
- Noda H, Histological and histochemical observation of intracenular yeast-like symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae), *App1. Entomol. Zoo1.*, 1977. 12(2): 134-141.
- O'Callaghan M, Glare T R, Burgess E P J, *et al.*, Effects of plants genetically modified of insect resistance on nontarget organisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 2005. 50: 271-292.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology: concepts and principle [R]. OECD. Paris. 1993.
- Peerbolte R, Leenhouts K, Hooykaas-van Slooter GMS, *et al.*, Clone from a shooty tobacco crown gall tumor II : irregular T-DNA structures and organization T-DNA, methylation and conditional expression of opine genes. *Plant Mol. Bio.* 1986. 7:285-299.
- Poppy G M, GM crops: environmental risks and nontarget effects. *Trends Plant Sci.*, 2000. 5: 4-6.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. 42: 1-14.

- R.J.Dillon and V.M.Dillon. THE GUT BACTERIA OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. *Ann. Rev. Entomol.* 2004. (49): 71-92.
- Sasha Ming High, Michael B. Cohen, Qing Yao Shu. *et al.* Achieving successful deployment of Bt rice. 2004. *Plant Sci.*
- Schoenly, K G. Effects of *Bacillus thuringiensis* on nontarget herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. *Environ. Biosafety Res.* 2003. 3, 181–206.
- Shu Q Y, Ye G Y, Hu C, *et al.*, Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breed.* 2000. 6: 433-439.
- Siegel J P. Bacteria. See Ref. 81a, 2000. 209–300.
- Stewart C N Jr, Wheaton S K. GM crop data–agronomy and ecology in tandem. *Nat. Biotechnol.* 2001. 19:3.
- Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. 24: 105–108.
- Tu J, Zhang G, Datta K, *et al.*, Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nat. Biotechnol.* 2000. 18: 1101-1104.
- Wang Y Q, Johnston S. The status of GM rice R&D in China. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25: 717-718.
- Wang Y, Johnston S. UNU-IAS Working Paper No. 152 (United Nations University-Institute of Advanced Studies, Yokohama, Japan, 2007), http://www.ias.unu.edu/resource_centre/152%20Yanqing%20Wang.pdf.
- Wang, Z H, Wang Y, Cui H R, *et al.*, Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis*. *J. Sci. Food Agric.* 2002. 82, 738–744.
- Wu D X, Shu Q Y, Ye Q F, *et al.*, Comparative studies on major nutritional components and physicochemical properties of the transgenic rice with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis*. *J. Food Chem.* 2003. 27, 295–308.

- Ye G Y, Tu J, Cui H, *et al.*, Transgenic IR72 with fused Bt gene *cry1Ab/cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions. Plant Biotechnol. 2001a. 18: 125-133.
- Ye G Y, Shu Q R, Yao H W, *et al.*, Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. J. Econ. Entomol., 2001b. 94: 270-276.
- Ye G Y, Yao H W, Shu Q R, *et al.*, High levels of stable resistance in transgenic rice with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions. Crop Prot, 2003. 22: 171-178.
- Yoshida S, Forno D, Cock J, *et al.*, Laboratory manual for physiological studies of rice . International Rice Research Institute, Manila,Philippines. 1976.
- Zhao J Z, Li Y X, Collins H L, *et al.*, Different cross-resistance patterns in the diamondback moth resistant to *Bacillus thurgiensis* toxin Cry1C. J. Econ. Entomol. 2001. 94: 1547-1552.
- Zhao J Z, Li Y X, Collins H L, *et al.*, Examination of the F₂ screen for rare resistance alleles to *Bacillus thurgiensis* toxins in the diamondback moth. J. Econ. Entomol. 2002. 95: 14-21.
- Zhao J Z, Cao J, Li Y X, *et al.*, Plants expressing two *Bacillus thurgiensis* toxins delay insect resistance compared to single toxins used sequentially or in a mosaic. Nature Biotech. 2003. 21: 1493-1497.

作者简历

基本情况

高秀云 女，汉族，中共预备党员，1984 年生于山东省汶上县。

教育经历

1999.9~2002.7 就读于山东省汶上县第一中学

2002.9~2006.7 就读于山东农业大学

2006.9~2008.7 就读于浙江大学

论文科研项目情况

研究生期间主要从事转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱脂肪体共生菌及共生微生物的影响的研究，从而对转基因水稻的生态安全性作出评价，本项目主要承蒙国家重点基础研究发展“973”计划课题(2007CB109202)和国家自然科学基金项目(30671377)资助。

2007 年 9 月以第二作者的身份于《昆虫学报》上发表题为“蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的制备及其应用方法的建立”的文章。

奖励情况

2003 年 3 月	专业奖学金二等奖	山东农业大学
2004 年 3 月	专业奖学金二等奖	山东农业大学
2004 年 9 月	获“优秀个人”荣誉称号	山东农业大学
2005 年 3 月	专业奖学金二等奖	山东农业大学
2005 年 9 月	专业奖学金二等奖	山东农业大学