

Bt 毒蛋白在转 Bt 基因棉中的表达 及其在害虫-天敌间的转移

张桂芬, 万方浩*, 郭建英, 侯茂林

(中国农业科学院生物防治研究所, 农业部生物防治重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 以常规棉泗棉 3 号作为对照, 采用酶联免疫生测法(ELISA)和室内生物测定法, 研究了转 Bt 基因棉新棉 33B 和 GK-12 不同组织器官中 *Cry1Ac* 或 *Cry1Ab* 毒蛋白的表达及其向靶标害虫(棉铃虫)、非靶标害虫(棉蚜)以及天敌(龟纹瓢虫)的传递和影响。研究结果表明, 新棉 33B 各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量较高, 为 79.7~1 390.0 ng/g 鲜重, GK-12 较低为 16.5~264.0 ng/g 鲜重。在花盛期, 新棉 33B 各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量依次为: 柱头、花药 > 子房、花瓣 > 群尖; 而 5~7 叶期的初展嫩叶、现蕾初期的幼蕾及花铃期的幼铃表达量相当, 而且与花盛期群尖的表达量没有明显区别。同样处于花盛期的 GK-12, 其各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量依次为: 花药 > 柱头 > 花瓣 > 群尖 > 子房; 而 5~7 叶期的初展嫩叶、现蕾初期的幼蕾及花铃期的幼铃表达量相当, 而且与花盛期群尖的表达量没有明显差异。常规对照棉的幼铃、花药、柱头以及子房中痕量 Bt 毒蛋白的存在可能与传粉昆虫等的活动有关。在转 Bt 基因棉田采集的棉蚜和棉铃虫老龄幼虫, 其体内均可检测到 Bt 毒蛋白; 在新棉 33B 棉田采集的龟纹瓢虫幼虫和成虫体内也可检测出 Bt 毒素。当以 Bt 棉田的棉蚜饲喂龟纹瓢虫时, 龟纹瓢虫的生长发育、存活以及繁殖等基本没有受到影响。

关键词: 转 Bt 基因棉; Bt 毒蛋白; 棉铃虫; 棉蚜; 龟纹瓢虫; 毒素转移

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)03-0334-08

Expression of Bt toxin in transgenic Bt cotton and its transmission through pests *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii* to natural enemy *Propylaea japonica* in cotton plots

ZHANG Gui-Fen, WAN Fang-Hao*, GUO Jian-Ying, HOU Mao-Lin (Institute of Biological Control, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biological Control, MOA, Beijing 100081, China)

Abstract: The expression of *Cry1Ac* or *Cry1Ab* toxin in transgenic Bt cotton lines (NUCOTN 33B and GK-12) was detected; its transmission to the target pest insect, cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner), the non-target pest, cotton aphid *Aphis gossypii* Glover, and the ladybird *Propylaea japonica* (Thunberg) was measured; and its effects on the ladybird were evaluated with the traditional cotton line, Simian 3 (the isogenic non-transformed line of GK-12) as the control, in cotton plots in Nanpi, Hebei, in 2002. The amounts of expressed Bt toxin in organs of transgenic Bt cotton NUCOTN 33B were higher (79.7 - 1 390.0 ng/g fresh weight) than those in GK-12 (16.5 - 264.0 ng/g fresh weight). During the blooming period of NUCOTN 33B plants, the order of Bt toxin content was as follows: stigma, anther > ovary, petal > grouped tender tip; the Bt toxin concentrations were similar as well as equal to those in grouped tender tip, when the newly development tender leaf of 5 - 7 leaf stage, the young square of early squaring period and the young boll of blooming period of NUCOTN 33B plants were tested. And during the blooming period of GK-12 plants, the order of Bt toxin concentration was as follows: anther > stigma > petal > grouped tender tip > ovary; the Bt toxin concentrations were similar and equal to those in grouped tender tip, when the newly development tender leaf of 5 - 7 leaf stage, the young square of early squaring period and the young boll of blooming period of GK-12 plants were detected. Moreover, the detection of trace amounts of Bt toxin in young boll, anther, stigma and ovary of the control cotton line,

基金项目: 国家 973 项目(G2000016209); 国家自然科学基金资助项目(30000115)

作者简介: 张桂芬, 女, 1962 年 10 月生, 河北沧州人, 博士, 副研究员, 从事转基因作物和外来生物安全研究, E-mail: guifenzhang3@cjac.org.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wanfh@cjac.org.cn

收稿日期 Received: 2003-12-08; 接受日期 Accepted: 2004-04-01

Simian 3, might be related to pollinators. In GK-12 and NUCOTN 33B cotton plots, Bt toxin could be transmitted to cotton aphid and cotton bollworm elder larvae. In the body of *P. japonica* larvae and adults, trace amounts of Bt toxin were detected only in those collected from NUCOTN 33B cotton plot. In addition, when *P. japonica* fed on cotton aphid collected from the transgenic Bt cotton plots, the development and survival from hatching to emerging as well as the reproductive ability of the ladybird were not significantly different with those of the control.

Key words: Transgenic Bt cotton; Bt toxin; *Helicoverpa armigera*; *Aphis gossypii*; *Propylaea japonica*; toxin transmission

转基因抗虫植物的种植引起了人们对生态环境安全性问题的关注(Masood, 1999; Saegusa, 1999; Poppy, 2000), 而其中转基因抗虫植物对农业生态系统中非靶标生物的影响是生态风险评估的重要内容之一。转基因抗虫植物的种植不仅要求对靶标害虫具有良好的控制作用, 还应该与天敌协调共存(Gatehouse and Gatehouse, 1999)。转基因抗虫植物可能通过降低靶标害虫的种群数量而使其天敌尤其是寄生性天敌种群数量减少, 但是由于杀虫剂使用量和使用次数的减少又会促进非靶标害虫及其天敌种群的增加(Wilson *et al.*, 1992; Fitt *et al.*, 1994; 崔金杰和夏敬源, 1997, 1998, 1999, 2000a; Hardee and Bryan, 1997; 戴小枫等, 1998; Hoy *et al.*, 1998; van Tol *et al.*, 1998; 张学坤等, 2000; 刘万学等, 2002; 周洪旭等, 2003)。尽管多数室内生测研究也表明以转 Bt 基因抗虫植物上的靶标害虫或非靶标害虫为食的捕食性天敌, 其个体发育、生殖、捕食行为等均未受到不良影响(Dogan *et al.*, 1996; Lozzia *et al.*, 1998; 崔金杰和夏敬源, 1999, 2000b; Armer *et al.*, 2000; Riddick and Barbosa, 2000; Zwahlen *et al.*, 2000; Dutton *et al.*, 2002; 董亮等, 2003), 但也有研究表明, 以此类害虫为猎物的捕食性昆虫却受到了不良影响(Hilbeck *et al.*, 1998; Birch *et al.*, 1999; Dutton *et al.*, 2002)。因此研究田间转基因抗虫植物和害虫、天敌之间的关系是其生态安全性评价的焦点之一。

转 Bt 基因棉的靶标害虫为棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner), 棉蚜 *Aphis gossypii* Glover 是它的非靶标害虫但却是棉花生产的限制性因素之一, 而龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* (Thunberg) 是棉蚜及鳞翅目昆虫卵和初孵幼虫的主要捕食性天敌(方昌源和张宣达, 1998; 刘庆年等, 2000)。华北棉区是我国种植转 Bt 基因棉最早的地区(方宣钧和贾士荣, 1999; Pray *et al.*, 2001), 自转 Bt 基因棉种植以来, 科研工作者便采用室内生物测定法和田间调查的方法对转 Bt 基因棉抗虫性的时空表达进行了研究(董双林等, 1996; 崔金杰和夏敬源, 1997, 2000a; 沈晋良

等, 1998; 赵建周等, 1998; 赵奎军等, 2000; 范贤林等, 2001; 谭声江等, 2002; 孟凤霞等, 2003), 对转 Bt 基因棉杀虫蛋白含量的时空分布及对棉铃虫的毒杀效果也进行了探讨(陈松等, 1997; 沈晋良等, 1998; 张小四等, 2000; 邢朝柱等, 2001; 张永军等, 2001)。然而有关 Bt 毒蛋白在转 Bt 基因棉的表达以及在害虫(棉铃虫、棉蚜等)和天敌(龟纹瓢虫、寄生蜂等)间的转移及其影响的研究鲜见报道(任璐等, 2004)。为此我们以华北棉区种植的主要转 Bt 基因棉品系 GK-12(国抗)和新棉 33B(美国研发)为实验对象, 以 GK-12 的亲本泗棉 3 号作为对照, 采用酶联免疫生测法检测了 2 个 Bt 棉品系不同组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量, 转基因棉田和对照棉田棉铃虫、棉蚜和龟纹瓢虫体内 Bt 毒蛋白的含量, 以及转 Bt 基因棉田发生的棉蚜对龟纹瓢虫生物学特性的影响, 以期明确转 Bt 基因棉、靶标害虫/非靶标害虫以及捕食性天敌之间的关系和影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试棉花品系与种植

GK-12(转 Bt 基因棉, 表达 *Cry1Ab/Ac* 融合基因), 由中国农业科学院生物技术研究所抗虫棉生产基地山东省梁山县棉花种子生产有限公司提供; 新棉 33B(转 Bt 基因棉, 表达 *Cry1Ac* 基因), 杀菌剂包衣, 由美国孟山都河北省冀岱棉花种子生产有限公司提供; 泗棉 3 号(常规棉品系, GK-12 的亲本), 由江苏省泗阳棉花原种场提供。

试验地设在河北省南皮县中国科学院现代化研究所南皮生态农业试验站。2002 年 4 月 26 日播种, 每个品系 0.2 ha, 地膜覆盖。各品系播种量: 新棉 33B 15 kg/ha、GK-12 和泗棉 3 号 22.5 kg/ha(脱绒前重量), 不同品系之间以 2 行玉米(同期播种)隔离。整个生长期除防治绿盲蝽(使用生物源农药百草一号)外不使用任何农药, 常规栽培管理。

1.2 酶联免疫生测试剂盒及 Bt 毒蛋白浓度测定

酶联免疫生测试剂盒(Bt ELISA PathoScreen kit for Bt endotoxin in plants)由美国 Agdia 公司研制。实验中使用了两种试剂盒,即 Bt-Cry1Ab 和 Bt-Cry1Ac ELISA PathoScreen 试剂盒,分别用于检测 Bt 毒蛋白 Cry1Ab(GK-12)和 Cry1Ac(新棉 33B)。试剂盒配备以下试剂:抗体包被的 96 孔酶标生测板、碱性磷酸酯酶酶胶联物、BP-A 底物溶液、BP-B 底物溶液、Bt-Cry1Ab(Bt-Cry1Ab 试剂盒)或 Bt-Cry1Ac(Bt-Cry1Ac 试剂盒)纯化蛋白、脱脂奶粉,此 6 种试剂 4℃ 保存;吐温-20 和 20 倍 PBST(磷酸盐,含 0.05% 吐温-20)缓冲液室温保存。该试剂盒对植物组织中 Bt 毒蛋白的最小检测量为 0.5 ng/g 样本鲜重。Bt 毒蛋白浓度测定在酶标仪(MR 550, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)上于 630 nm 波长下进行。测定时每毫升含有 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 和 32.0 ng 纯化蛋白(Cry1Ab-GK-12 或 Cry1Ac-新棉 33B)的样本浸提缓冲液分别作为标准曲线(阳性对照),以空白和常规棉品系作为阴性对照。实验操作过程详见: <http://www.agdia.com> 酶联免疫生测试剂盒使用说明。样本中 Bt 毒蛋白的浓度以每克鲜重所含有的 Bt 毒蛋白的纳克数表示(ng/g 样本鲜重)。

1.3 棉花组织器官的采集与 Bt 毒蛋白表达量测定

在棉花不同生长期分别于各棉田棋盘式 20 点取样,每点 1 株,采集初展嫩叶(6 月上旬,5~7 叶期)、幼蕾(7 月上旬,现蕾初盛期)、群尖、花(7 月中旬,盛花期)和幼铃(8 月上旬,花铃期),单个分装,于低温状态带回室内 -30℃ 保存。分别取各品系、不同组织器官 10 个(即 10 次重复),以每个样本器官作为一个检测点,加入少量液氮后匀浆,匀浆液于 4℃ 浸提,待全部组织器官匀浆浸提完毕后 4℃ 离心(12 000 r/min, 10 min)。各组织器官称取的重量(精度 0.01 mg)及匀浆时加入样本浸提缓冲液的体积分别为:初展嫩叶、幼蕾(直径 0.5~0.7 cm)、幼铃(直径 1.0~1.2 cm)、群尖、花瓣:200 mg 加入 1 mL(1:5 (w/v))缓冲液;花药(不含花丝)、柱头分别为:41.84 ± 2.21 mg 和 45.08 ± 1.16 mg,以 1:20(w/v)的比例加入缓冲液;子房:100 mg,以 1:10(w/v)的比例加入缓冲液。Bt 毒蛋白表达量测定时,离心后样本上清液的稀释倍数分别为:GK-12 除柱头为 1:2 外,其余为 1:5;新棉 33B 为 1:5。常规对照棉未做稀释。

1.4 棉铃虫、棉蚜和龟纹瓢虫的田间采集与 Bt 毒蛋白含量测定

在伏蚜盛发期(8 月上旬)于各棉田 20 点取样,每点 5 株,每株采集嫩叶上棉蚜(成虫和若虫)3~4

mg;同时于各棉田随机采集棉铃虫幼虫(4~5 龄,采集部位主要为幼铃和蕾)及龟纹瓢虫幼虫(3~4 龄)和雌、雄性成虫各 20 头;离心管内 -30℃ 保存。分别取各棉田棉铃虫幼虫 10 头(单头称重、检测)、各取样点棉蚜 10 mg(即 10 mg/样点,10 样点/品系)及龟纹瓢虫幼虫和雌雄性成虫各 10 头(单头称重、检测),液氮冰冻后以 1:10 的比例加入样本浸提缓冲液匀浆、浸提、离心、检测。Bt 毒蛋白含量测定时离心后棉铃虫幼虫上清液的稀释倍数为 1:5,棉蚜和龟纹瓢虫未作稀释。

1.5 转 Bt 基因棉对龟纹瓢虫生长发育的影响

6 月上旬于实验站桃园采集龟纹瓢虫成虫 60 头,以雌雄性比 1:1 的比例在养虫缸(10 cm × 16 cm)内用苜蓿蚜 *Aphis medicaginis* Koch 饲养至成虫产卵。收集同一天卵块室内孵化后,用软毛笔挑取 1 头初孵幼虫(<12 h)放入塑料养虫皿(6.6 cm × 4.2 cm),皿内放 1 片采自田间、满布棉蚜的转 Bt 基因棉或常规棉叶片;养虫皿底和盖直径相同,以橡皮膏粘牢;室内自然条件(25℃~29℃, RH 70%~90%, 14L:10D)下饲养。以各品系棉花上的棉蚜饲养龟纹瓢虫的数量分别为:GK-12 和新棉 33B 各 51 头,对照 50 头。每天观察 1 次,记录幼虫发育状况、蜕皮、存活等,并及时补充以充足的食物,直至成虫羽化。初羽化的成虫随机配对后继续以各品系上的棉蚜饲养,直至交配产卵,计数单雌日产卵量,20 天后统计产卵高峰期(3~5 天)卵量。

1.6 数据分析

对于 2 个转 Bt 基因棉品系各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量数据进行单一变量方差分析——最小显著差测验(one-way ANOVA: LSD tests);对于相同组织器官 2 个转 Bt 基因棉品系之间 Bt 毒蛋白表达量的数据进行独立样本 *t* 测验;对于棉铃虫、棉蚜和龟纹瓢虫体内 Bt 毒蛋白的含量,以及以转 Bt 基因棉和常规棉上的棉蚜为食的龟纹瓢虫的发育、存活及繁殖等数据,进行非参数检验(卢纹岱,2000)。

2 结果与分析

2.1 转 Bt 基因棉各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量

2 个转 Bt 基因棉品系各组织器官中 Bt 毒蛋白表达量的测定结果表明(表 1),新棉 33B(79.7~1 390.0 ng/g 鲜重)的毒蛋白表达量明显高于 GK-12(16.5~264.0 ng/g 鲜重)($P < 0.01$)。检测结果同时还表明,同一物候期各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达

量不一致。盛花期,新棉 33B 各器官 Bt 毒蛋白的表达量依次为:柱头、花药 > 子房、花瓣 > 群尖;而 5~7 叶期的初展嫩叶、现蕾初期的幼蕾及花铃期的幼铃表达量相当,而且与盛花期群尖的表达量没有明显区别(表 1)。处于盛花期的 GK-12,其各器官 Bt 毒蛋白的表达量依次为:花药 > 柱头 > 花瓣 > 群尖

> 子房;而 5~7 叶期的嫩叶、现蕾初期的幼蕾及花铃期的幼铃表达量相当,而且与盛花期群尖的表达量没有明显差异(表 1)。此外,常规对照棉的幼蕾、群尖、嫩叶以及花瓣中未检测到 Bt 毒蛋白的存在,而幼铃、花药、柱头以及子房中检测到了痕量 Bt 毒蛋白(0.2~3.4 ng/g 鲜重)(表 1)。

表 1 转 Bt 基因棉各组织器官中 Bt 毒蛋白的表达量(ng/g 鲜重)

Table 1 Bt toxin content (ng/g FW) in different organs of transgenic Bt cotton plants

器官 Organ	转 Bt 基因棉 (Transgenic Bt cotton)		泗棉 3 号(对照) Simian 3 (CK)
	GK-12	新棉 33B NUCOTN 33B	
嫩叶(6 月上旬)Tender leaf (Early Jun.)	50.0 ± 2.2 a	138.3 ± 16.6 a	0
幼蕾(7 月上旬)Young square (Early Jul.)	38.0 ± 3.6 a	113.7 ± 20.7 a	0
群尖(7 月中旬)Grouped tender tip (Mid Jul.)	49.3 ± 3.4 a	94.3 ± 5.2 a	0
花瓣(7 月中旬)Petal (Mid Jul.)	77.7 ± 4.3 b	448.2 ± 45.2 b	0
子房(7 月中旬)Ovary (Mid Jul.)	16.5 ± 3.7 e	571.5 ± 52.9 b	0.5 ± 0.3
花药(7 月中旬)Anther (Mid Jul.)	264.0 ± 12.7 c	1194.0 ± 68.2 c	3.4 ± 0.9
柱头(7 月中旬)Stigma (Mid Jul.)	115.2 ± 3.4 d	1390.0 ± 198.5 c	0.3 ± 0.2
幼铃(8 月上旬)Young boll (Early Aug.)	37.5 ± 3.0 a	79.7 ± 18.5 a	0.2 ± 0.1

注:表中数据为平均值 ± SE;同一列数据中平均数后的字母不同表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。表 3 同。新棉 33B 各器官中 Bt 毒蛋白的含量均显著高于 GK-12 ($P < 0.01$)。

Notes: The data in the table indicate mean ± SE; the means in the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$. The same for Table 3. Those in the same organs from GK-12 and NUCOTN 33B differ significantly at $P < 0.01$.

2.2 Bt 毒蛋白在转基因棉-棉铃虫、棉蚜-龟纹瓢虫之间的转移

通过对田间的棉铃虫、棉蚜以及龟纹瓢虫体内 Bt 毒蛋白含量的检测,结果表明,在 Bt 棉的幼铃和蕾上采集的棉铃虫老龄幼虫其体内有一定量 Bt 毒蛋白的累积,而且在 GK-12 棉田取食的棉铃虫幼虫获取 Bt 毒蛋白的量(24.0 ng/g 鲜重)较在新棉 33B (15.0 ng/g)的高(表 2);在棉株幼嫩部位(嫩尖、嫩

叶)进行刺吸为害的棉蚜其体内也有少量 Bt 毒蛋白的存在,而且同样以在 GK-12 上的累积量较高(表 2)。此外,在 GK-12 棉田采集的龟纹瓢虫幼虫,雌、雄成虫体内均未检测到 Bt 毒蛋白的存在,而在新棉 33B 棉田采集的龟纹瓢虫其幼虫和成虫体内均检测到了一定量的 Bt 毒素。在常规对照棉田采集的棉铃虫、棉蚜以及龟纹瓢虫幼虫和成虫体内均未能检测到 Bt 毒蛋白(表 2)。

表 2 不同棉田的棉铃虫、棉蚜和龟纹瓢虫体内 Bt 毒蛋白的含量(ng/g 鲜重)

Table 2 Bt toxin content in *Helicoverpa armigera*, *Aphis gossypii* and *Propylaea japonica* from different cotton plots

棉田昆虫 Insect in cotton field	Bt 毒蛋白含量 Bt toxin content (ng/g FW)			假设主要食物 Supposed major food
	GK-12	新棉 33B NUCOTN 33B	泗棉 3 号(对照) Simian 3 (CK)	
棉铃虫幼虫(4~5 龄) <i>H. armigera</i> larva (4th-5th instar)	24.0 ± 2.7 a	15.0 ± 1.7 b	0 c	棉花幼铃、蕾 Young boll and square
棉蚜 <i>A. gossypii</i>	6.0 ± 1.0 a	2.5 ± 0.8 b	0 b	棉花嫩叶、嫩尖 Tender leaf and tip
龟纹瓢虫 幼虫 Larva	0 a	10.0 ± 3.0 b	0 a	棉蚜 <i>A. gossypii</i>
<i>P. japonica</i> 成虫 Adult (♀)	0 a	20.0 ± 5.4 b	0 a	
成虫 Adult (♂)	0 a	28.0 ± 7.0 b	0 a	

注:同一行数据中平均数后的字母不同表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Notes: The means in the same line followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.3 转 Bt 基因棉对龟纹瓢虫生长发育的影响

表 3 实验结果显示,当龟纹瓢虫从幼虫孵化到

成虫羽化均以 GK-12 或新棉 33B 上的棉蚜为食料时,其发育历期比取食常规棉上的棉蚜分别缩短了 0.6 天和 0.9 天,但其存活率没有受到影响;成虫羽化以后仍然以转 Bt 基因棉上的棉蚜为食时,其 20

天内产卵高峰期(3~5 天)的产卵量与取食常规对照棉上的成虫没有明显区别,2 个转 Bt 基因棉品系之间也没有明显差异。

表 3 用不同棉田的棉蚜饲养时龟纹瓢虫未成熟期的历期、存活率和成虫繁殖高峰期的繁殖力(25℃~29℃)

Table 3 Developmental duration and survival rate of immature *Propylaea japonica* and adult fecundity in their oviposition peak period feeding on the cotton aphid from different cotton plots at 25℃~29℃

棉花品系 Cotton line	历期(d)Duration	存活率(%) Survival	单雌产卵量(粒)Number of eggs laid/♀
GK-12	10.6 ± 0.1 a (n = 51)	92.2	16.8 ± 2.8 a (n = 11)
新棉 33B NUGOTN 33B	10.3 ± 0.1 a (n = 51)	94.1	33.0 ± 10.1 a (n = 9)
泗棉 3 号(对照) Simian 3 (CK)	11.2 ± 0.2 b (n = 50)	90.0	19.9 ± 5.5 a (n = 10)

3 讨论

本研究结果表明,转 Bt 基因棉的各组织器官均可表达一定量的 Bt 杀虫蛋白,而且新棉 33B 的平均表达量较高,约为 GK-12 的 6 倍;实验结果还表明在盛花期,转 Bt 基因棉的花药和柱头中 Bt 毒蛋白的表达量较嫩尖、花瓣等的高(表 1)。本实验的检测结果与前人的研究结果有所差异可能是由于检测工具、检测部位以及转 Bt 基因棉种植的时间、地点等的不同所致。前人进行酶联免疫生测实验时所使用的或是北京大学生命科学院研制的 ELISA 试剂盒如张小四等(2000)和张永军等(2001),或是自己制备的抗原抗体如邢朝柱等(2001),而本检测实验使用的 ELISA 试剂盒由美国 Agdia 公司研制;此外,前两项研究是以花心(含花药、花丝和子房)为检测对象,而本实验分别以花药、柱头和子房为检测对象,每克鲜重的花药、柱头、子房或花心的干物质含量是有区别的,从而导致 Bt 毒蛋白的表达量存在差异。Sachs 等(1998)研究发现,同样的材料在同一生育期、不同地点,由于管理条件不一样,Bt 毒蛋白的表达量存在较大差异。邢朝柱等(2001)指出,Bt 毒蛋白的含量与棉花生长发育时期存在一定的联系,即旺盛生长时期有利于 Bt 基因表达。蕾期至花铃期是棉花旺盛生长时期,此时棉株体内代谢活跃,Bt 基因较易表达,杀虫蛋白含量较高;而苗期生长比较缓慢,吐絮期棉花生长衰弱,因此受体内代谢的影响,这两阶段的 Bt 毒蛋白的表达量降低。孟凤霞等(2003)研究指出,在室内外不同气候条件下生长的 Bt 棉叶对棉铃虫的抗性有显著差异。此外,花药和柱头中高浓度 Bt 毒蛋白的检出说明确实存在由异型杂交(outcrossing)或异种杂交(hybridisation)导致的基因逃

逸或基因侵染的可能(Elstrand *et al.*, 1999; Lövei, 2001),因为棉花的花粉不能借助空气流动进行传播而只能通过蜜蜂、熊蜂等传粉昆虫实现(Theis, 1953; McGregor, 1959; Umbeck *et al.*, 1991),所以常规对照棉——泗棉 3 号的幼铃、花药、柱头以及子房中痕量 Bt 毒蛋白的存在与传粉昆虫的活动以及棉铃虫成虫的补充营养、产卵行为等有关(Theis, 1953; McGregor, 1959; Umbeck *et al.*, 1991; 郭予元, 1998),与取食花粉的昆虫(如棉蓟马、绿盲蝽)的活动也有某些关联。再者,在 GK-12 棉株中检测到的 Bt 毒蛋白的表达量较新棉 33B 中的低,可能是由于本实验中用于检测 GK-12 的试剂盒(Bt-Cry1Ab ELISA PathoScreen kit for Bt-Cry1Ab endotoxin in plants)只能检测 Cry1Ab 杀虫蛋白,而不能同时也检测 Cry1Ac 杀虫蛋白,因此检测到的仅是 Cry1Ab 的表达量而不是 Cry1Ab/Ac 融合基因的总表达量。

实验结果还显示,在 Bt 棉的幼铃和蕾(7 月上旬~8 月上旬)上采集到的棉铃虫老龄幼虫,通过咀嚼取食获取了一定量的 Bt 毒蛋白;在嫩尖、嫩叶上采集到的棉蚜,通过刺吸汁液体内也累积了少量的 Bt 毒素,而且通过被取食又将这些毒素传递给了龟纹瓢虫(表 2)。进而表明,在田间,Bt 毒蛋白在转 Bt 基因棉的各组织器官表达,植食性昆虫(如棉铃虫、棉蚜)通过取食这些器官获取 Bt 毒素,捕食性昆虫(如龟纹瓢虫)又通过捕食植食性猎物(如棉蚜)而间接的与 Bt 毒蛋白接触并在体内富积;同时,龟纹瓢虫还可以通过直接取食获取 Bt 毒蛋白(Pilcher *et al.*, 1997; 方昌源和张宣达, 1998)。此外,在 Bt 毒蛋白表达量较高的新棉 33B 上采集的棉铃虫幼虫,其 Bt 毒蛋白的获取量比在表达量较低的古 K-12 上的低,这可能是因为棉铃虫在 Bt 毒蛋白表达量较高的新棉 33B 上取食量较少(从而使 Bt 毒蛋白的累积量

较低),在表达量较低的 GK-12 上取食量较多(从而使 Bt 毒蛋白的累积量较高)(Dutton *et al.*, 2002)。而在 GK-12 棉田采集的龟纹瓢虫体内未能检测出 Bt 毒蛋白的原因尚需进一步探讨。

尽管在转 Bt 基因棉上取食的棉蚜其体内有少量 Bt 毒蛋白的存在,但是当以这种蚜虫饲喂龟纹瓢虫时,其生长发育、存活及生殖能力等基本没有受到影响(Dutton *et al.*, 2002),进而表明,在转 Bt 基因棉田棉蚜依然是龟纹瓢虫乃至其他捕食性天敌的重要猎物。然而棉蚜在转 Bt 基因棉上的生长、发育、存活以及繁殖特性等也需进行研究,以进一步明确两种转 Bt 基因棉田的棉蚜其体内 Bt 毒蛋白含量存在差异的原因。

参考文献 (References)

- Armer CA, Berry RE, Kogan M, 2000. Longevity of phytophagous heteropteran predators feeding on transgenic Bt-potato plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 95: 329 - 333.
- Birch ANE, Geoghegan IE, Majerus MEN, McNicol JW, Hackett C, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, 1999. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Molecular Breeding*, 5 (1): 75 - 83.
- Chen S, Wu JY, He XL, Huang JQ, Zhou BL, Zhang RX, 1997. Quantification using ELISA of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein expressed in the tissue of transgenic insect-resistant cotton. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 13(3): 154 - 156. [陈松,吴敬音,何小兰,黄骏麒,周宝良,张荣铎,1997. 转基因抗虫棉组织中 Bt 毒蛋白表达量的 ELISA 测定. 江苏农业科学,13 (3): 154 - 156]
- Cui JJ, Xia JY, 1997. Effects of transgenic Bt cotton on population dynamics of the main pests and their natural enemies. *Acta Agric. Univ. Henan.*, 31(4): 351 - 356. [崔金杰,夏敬源,1997. 转 Bt 基因棉对棉田主要害虫及其天敌种群消长的影响. 河南农业大学学报,31(4): 351 - 356]
- Cui JJ, Xia JY, 1998. Effects of Bt transgenic cotton (with early maturity) on population dynamics of main pests and their natural enemies. *Acta Gossypii Sinica*, 10(5): 255 - 262. [崔金杰,夏敬源,1998. 麦套夏播转 Bt 基因棉田主要害虫及天敌的发生规律. 棉花学报,10 (5): 255 - 262]
- Cui JJ, Xia JY, 1999. Effects of transgenic Bt cotton on the population dynamics of natural enemies. *Acta Gossypii Sinica*, 11(2): 84 - 91. [崔金杰,夏敬源,1999. 转 Bt 基因棉对天敌种群动态的影响. 棉花学报,11(2): 84 - 91]
- Cui JJ, Xia JY, 2000a. Effects of Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic cotton on the dynamics of pest population and their enemies. *Acta Phytopythologica Sinica*, 27(2): 141 - 145. [崔金杰,夏敬源,2000a. 一熟转 Bt 基因棉田主要害虫及其天敌的发生规律. 植物保护学报,27 (2): 141 - 145]
- Cui JJ, Xia JY, 2000b. Effect of transgenic Bt cotton R93-6 on the insect community. *Acta Entomol. Sin.*, 43(1): 43 - 51. [崔金杰,夏敬源,2000b. 麦套夏播转 Bt 基因棉 R93-6 对昆虫群落的影响. 昆虫学报, 43(1): 43 - 51]
- Dai XF, Wang WG, Dong SL, Yang XM, Song XX, Guo YY, 1998. Toxin and control efficiency of transgenic Bt cotton against *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Northern China. *J. Agric. Biotech.*, 6(2): 109 - 115. [戴小枫,王武刚,董双林,杨雪梅,宋晓轩,郭子元,1998. 我国转基因 Bt 棉对棉铃虫的控制效果. 农业生物技术学报, 6(2): 109 - 115]
- Dogan EB, Berry RE, Reed GL, Rossignol PA, 1996. Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato. *J. Econ. Entomol.*, 89(5): 1 105 - 1 108.
- Dong L, Wan FH, Zhang GF, Liu XJ, Li Q, 2003. Impacts of transgenic Bt cotton on the development and fecundity of *Chrysopa sinica* Tjeder. *Chinese J. Eco-Agric.*, 11(3): 16 - 18. [董亮,万方浩,张桂芬,刘小京,李强,2003. 转 Bt 基因抗虫棉对中华草蛉发育及繁殖的影响. 中国生态农业学报,11(3): 16 - 18]
- Dong SL, Wang RH, Ma LH, Zhong CZ, 1996. Brief report of insect resistance of transgenic Bt cotton. *Cotton Science*, 8(6): 334 - 335. [董双林,汪若海,马丽华,钟昌珍,1996. 转 Bt 基因棉的抗虫性研究简报. 棉花学报,8(6): 334 - 335]
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F, 2002. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.*, 27: 441 - 447.
- Elstrand NC, Prentice HC, Hancock JF, 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 30: 539 - 563.
- Fan XL, Rui CH, Xu CR, Meng XQ, Guo SD, Zhao JZ, 2001. Resistance of transgenic cottons expressing Bt and CpTI insecticidal protein genes to *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 44(4): 582 - 585. [范贤林,芮昌辉,许崇任,孟香清,郭三堆,赵建周,2001. 转双基因抗虫棉对棉铃虫的抗性. 昆虫学报,44(4): 582 - 585]
- Fang CY, Zhang XD, 1998. Mass reproduction and protection & utilization of ladybirds. In: Bao JZ, Gu DX eds. *China Biological Control*. Taiyuan: Shanxi Scientific and Technological Press. 189 - 202. [方昌源,张宣达,1998. 瓢虫的大量繁殖与保护利用. 见:包建中,古德祥主编. 中国生物防治. 太原:山西科学技术出版社. 189 - 202]
- Fang XJ, Jia SR, 1999. Progress of commercialization of transgenic cotton in China. *Biotech. Informat.*, 2: 39 - 41. [方宣钧,贾士荣,1999. 中国转基因抗虫棉产业化进展. 生物技术通报,2: 39 - 41]
- Fitt GP, Mares CL, Llewellyn DJ, 1994. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. *Biocont. Sci. Technol.*, 4: 535 - 548.
- Gatehouse JA, Gatehouse AMR, 1999. Genetic engineering of plants for insect resistance. In: Reischigl JE, Reischigl NA eds. *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*. London: Lewis Publishers. 211 - 241.
- Guo YY, 1998. Biological and ecological characteristics of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. In: Guo YY ed. *The Studies of Cotton Bollworm, Helicoverpa armigera*. Beijing: China Agriculture Press. 22

- 28. [郭予元, 1998. 棉铃虫的主要生物学与生态学特性. 见: 郭予元主编. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社. 22 - 28]
- Hardee DD, Bryan WW, 1997. Influence of *Bacillus thuringiensis*-transgenic and nectariless cotton on insect populations with emphasis on the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.*, 90 (2): 663 - 668.
- Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM, Bigler F, 1998. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 27(2): 480 - 487.
- Hoy CW, Feldman J, Gould F, Kennedy GG, Reed G, Wyman JA, 1998. Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops. In: Barbosa P ed. Conservation Biological Control. London: Academic Press. 185 - 205.
- Liu QN, Li JW, Wang XF, Zhang LS, Yang XJ, Zhou X, 2000. Differences of main pest and natural enemy populations in transgenic Bt cotton and traditional cotton fields. *Chinese Cotton*, 27(10): 20 - 21. [刘庆年, 李景文, 王绪芬, 张路生, 杨雪静, 周霞, 2000. 转 Bt 基因棉与常规棉主要害虫及天敌群落特征的区别研究. 中国棉花, 27(10): 20 - 21]
- Liu WX, Wan FH, Guo JY, 2002. Structure and seasonal dynamics of arthropods in transgenic Bt cotton field. *Acta Ecologica Sinica*, 22(5): 729 - 735. [刘万学, 万方浩, 郭建英, 2002. 转 Bt 基因棉田间节肢动物群落营养层及优势官能团的组成与变化. 生态学报, 22 (5): 729 - 735]
- Lövei GL, 2001. Ecological risks and benefits of transgenic plants. *New Zeal. Plant Prot.*, 54: 93 - 100.
- Lozza G, Furlanis C, Manachini B, Rigamonti I, 1998. Effects of Bt corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae) and on its predator *Chrysoperla carnea* Stephen (Neuroptera: Chrysopidae). *Bollettino di Zoologia agraria e di Bachicoltura*, 30(2): 153 - 164.
- Lu WD, 2000. SPSS for Windows Statistics and Analysis. Beijing: Publishing House of Electronics Industry. [卢纹岱, 2000. SPSS for Windows 统计分析. 北京: 电子工业出版社]
- Masood E, 1999. Europe and US in confrontation over GM food labeling criteria. *Nature*, 398(6 729): 641.
- McGregor SE, 1959. Cotton-flower visitation and pollen distribution by honey bees. *Science*, 129: 97 - 98.
- Meng FX, Shen JL, Chu SP, 2003. Temporal-spatial variation in efficacy of Bt cotton leaves against *Helicoverpa armigera* (Hübner) and effect of weather conditions. *Acta Entomol. Sin.*, 46(3): 299 - 304. [孟凤霞, 沈晋良, 褚姝频, 2003. Bt 棉叶对棉铃虫抗性的时空变化及气象因素的影响. 昆虫学报, 46(3): 299 - 304]
- Pilcher CD, Obrycki JJ, Rice ME, Lewis LC, 1997. Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.*, 26 (2): 446 - 454.
- Poppy G, 2000. GM crops: environmental risks and non-target effects. *Trends in Plant Science*, 5 (1): 4 - 6.
- Pray CE, Ma DM, Huang JK, Qiao FB, 2001. Impact of Bt cotton in China. *World Develop.*, 29(5): 813 - 825.
- Ren L, Yang YZ, Li X, Miao L, Yu YS, Qin QL, 2004. Impact of transgenic *Cry1A* plus *CpTI* cotton on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its two endoparasitoid wasps *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) and *Campoletis chloridae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Acta Entomol. Sin.*, 47(1): 1 - 7. [任璐, 杨益众, 李瑄, 苗麟, 余月书, 秦启联, 2004. 转基因抗虫棉对棉铃虫及其内寄生蜂的双重效应. 昆虫学报, 47(1): 1 - 7]
- Riddick EW, Barbosa P, 2000. *Cry3A*-intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* (Say) are palatable prey for *Lebia grandis* Heutz. *J. Entomol. Sci.*, 35: 342 - 346.
- Sachs ES, Benedict JH, Stelly DM, Taylor JF, Altman DW, Berberich SA, Davis SK, 1998. Expression and segregation of genes encoding *cry1A* insecticidal proteins in cotton. *Crop Sci.*, 38: 1 - 11.
- Saegusa A, 1999. Japan tightens rules on GM crops to protect the environment. *Nature*, 399(6738): 719.
- Shen JL, Zhou WJ, Wu YD, Lin XW, Zu XF, 1998. Early resistance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* and its relation to the effect of transgenic cotton lines expressing Bt toxin on the insect. *Acta Entomol. Sin.*, 41(1): 8 - 14. [沈晋良, 周威君, 吴益东, 林祥文, 朱协飞, 1998. 棉铃虫对 Bt 生物农药早期抗性及其与转 Bt 基因棉抗虫性的关系. 昆虫学报, 41(1): 8 - 14]
- Tan SJ, Chen XF, Li DM, 2002. Progress in the studies on *Helicoverpa* spp. resistance to transgenic Bt cotton and its management strategy. *Acta Entomol. Sin.*, 45(1): 138 - 144. [谭声江, 陈晓峰, 李典谟, 2002. 棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性及其治理策略研究进展. 昆虫学报, 45(1): 138 - 144]
- Theis SA, 1953. Agents concerned with natural crossing of cotton in Oklahoma. *Agronomy J.*, 45: 481 - 484.
- Umbeck PF, Barton KA, Nordheim EV, McCarty JC, Parrott WL, Jenkins JN, 1991. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *J. Econ. Entomol.*, 84 (6): 1 943 - 1 950.
- van Tol N, Lentz G, 1998. Influence of Bt cotton on beneficial arthropod populations. In: Dugger P, Richter D eds. Proceedings Beltwide Cotton Conferences 2. Memphis: National Cotton Council. 1 052 - 1 054.
- Wilson FD, Flint HM, Deaton WR, Fischhoff DA, Perlak FJ, Armstrong TA, Fuchs RL, Berberich SA, Parks NJ, Stapp BR, 1992. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *J. Econ. Entomol.*, 85(4): 1 516 - 1 521.
- Xing CZ, Jing SR, Cui XF, Guo LP, Wang HL, Yuan YL, 2001. The spatio-temporal distribution of Bt (*Bacillus thuringiensis*) insecticidal protein and the effect of transgenic Bt cotton on bollworm resistance. *Cotton Science*, 13(1): 11 - 15. [邢朝柱, 靖深蓉, 崔学芬, 郭立平, 王海滨, 袁有禄, 2001. 转 Bt 基因棉杀虫蛋白含量时空分布及对棉铃虫产生抗性的影响. 棉花学报, 13(1): 11 - 15]
- Zhang XK, Wang LM, Xu LR, Zhou Y, Wang SL, Liu RZ, 2000. Dynamics of main pests and their natural enemies in transgenic Bt cotton fields. *Shandong Cotton Industry*, 2: 12 - 19. [张学坤, 王留明, 许立瑞, 周玉, 王胜利, 刘任重, 2000. 转 Bt 基因抗虫棉田棉花主要害虫及其天敌的发生消长动态. 山东棉业, 2: 12 - 19]
- Zhang XS, Li SG, Xu CR, Zhao JZ, Zhao KJ, 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein levels in different tissues and growing period of

- transgenic cotton determination using ELISA. *Acta Sci. Natural. Univ. Pekin.*, 36(4): 477-484. [张小四,李松岗,许崇任,赵建周,赵奎军,2000. 转 Bt 棉不同生长期及不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定. 北京大学学报(自然科学版), 36(4): 477-484]
- Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2001. On the spatio-temporal expression of the contents of Bt insecticidal protein and the resistance of Bt transgenic cotton to cotton bollworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(1): 1-6. [张永军,吴孔明,郭予元,2001. 转 Bt 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及对棉铃虫的毒杀效果. 植物保护学报, 28(1): 1-6]
- Zhao JZ, Zhao KJ, Lu MG, Fan XL, Guo SD, 1998. Interactions between *Helicoverpa armigera* and transgenic Bt cotton in North China. *Sci. Agric. Sinica*. 31(5): 1-6. [赵建周,赵奎军,卢美光,范贤林,郭三堆,1998. 华北地区棉铃虫与转 Bt 杀虫蛋白基因棉花的互作研究. 中国农业科学, 31(5): 1-6]
- Zhao KJ, Zhao JZ, Fan XL, Rui CH, Mei XD, 2000. Temporal and spatial dynamics of transgenic Bt cotton toxins to cotton bollworm in North China. *J. Agric. Biotech.*, 8(1): 49-52. [赵奎军,赵建周,范贤林,芮昌辉,梅向东,2000. 我国转 Bt 抗虫基因棉杀虫活性的时间与空间动态分析. 农业生物技术学报, 8(1): 49-52]
- Zhou HX, Wan FH, Liu WX, Liu XJ, Li Q, 2003. Study on population dynamics and damage of *Lygus lucorum* Mayr in transgenic Bt cotton. *Chinese J. Eco-Agric.*, 11(3): 13-15. [周洪旭,万方浩,刘万学,刘小京,李强,2003. 绿盲蝽在转 Bt 基因抗虫棉的发生动态及其为害研究. 中国生态农业学报, 11(3): 13-15]
- Zwahlen C, Nentwig W, Bigler F, Hilbeck A, 2000. Tri-trophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* com, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environ. Entomol.*, 29(4): 846-850.

(责任编辑: 袁德成)