

棉铃虫对Bt生物农药早期抗性及与转Bt基因棉抗虫性的关系*

沈晋良 周威君 吴益东 林祥文

(南京农业大学植保系 南京 210095)

朱协飞

(南京农业大学农学系 南京 210095)

摘要 用饲料感染法建立了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 敏感品系 (SUS₁) 对 Bt 生物农药的敏感毒力基线和区剂量，1995年测定了五省六县棉铃虫初孵幼虫对 Bt 生物农药的敏感性，结果表明：山东阳谷、河北邯郸、河南新乡、安徽萧县及江苏丰县棉铃虫已产生早期抗性，抗性个体百分率为 5%~10%，与敏感品系相比，LC₅₀值稍有增加，但斜率 b 值明显变小；而江苏东台棉铃虫仍属敏感。这是国内外首次诊断到棉铃虫对 Bt 生物农药抗性。用棉叶喂饲法测定比较了转 Bt 基因棉花品系对不同种群棉铃虫的抗虫性效果，结果表明：用早期抗性的阳谷和新乡棉铃虫初孵幼虫接虫 5 d 后平均死亡率较敏感品系下降 16%~29%，说明棉铃虫对 Bt 农药与转 Bt 生物基因棉花品系间存在交互抗性。还讨论了 Bt 农药的抗性治理对策。

关键词 棉铃虫，Bt 生物农药，抗药性，转 Bt 基因棉花

自从美国太平洋酵母公司于 1957 年生产出第一个苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 商品制剂 (thuricide) 以来，由于发酵技术的进展，Bt 作为一种对人畜安全、无环境污染的微生物杀虫剂，在农、林及卫生害虫的防治中发挥了重要作用，成为国内外开发利用最成功的一种生物农药。预期到 2000 年全世界 Bt 制剂销售额可接近达到 3 亿美元^[1]。近年来各类转 Bt 基因遗传工程植物已成为国际上十分活跃的研究领域。自 70 年代比利时 Montagu 实验室首次报道将 Bt δ-内毒素基因转入烟草 (vaecketal) 以来，转 Bt 番茄、马铃薯、烟草、棉花及玉米等在国内外已相继报道^[2~3]。中国农科院生物技术研究中心和江苏省农科院经作所及中国农科院棉花研究所等单位正在培育转 Bt 基因抗虫棉。可以预料，在未来的害虫防治中，Bt 生物制剂和转 Bt 基因植物将成为害虫综合防治中的一项重要手段。

90 年代以来，我国棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 连年大发生，并对常用杀虫剂特别是一些拟除虫菊酯类杀虫剂产生抗药性^[4]，因此在我国华北棉区的山东、河北、河南等省应用 Bt 生物农药已成为棉铃虫综合防治中的一项重要措施。据 Georghiou 报

*“九五”国家重点科技攻关与国家自然科学基金资助项目

1996-04-23 收稿，1997-01-06 收修改稿

道^[5]，与化学农药相比，害虫对Bt生物农药产生抗性的速度比较缓慢，这主要与Bt杀虫剂残效期短，以及它是由芽孢杀虫晶体蛋白（ICP）及β-外毒素等组成的混合物有关。尽管如此，室内抗性选育试验表明多种害虫具有对Bt发展抗性的潜在性危险^[6]，已报道室内能选育出抗性的害虫如家蝇 *Musca domestica*、黑尾果蝇 *Drosophila melanogaster*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、五带淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus*、粉斑螟 *Ephestia cautella*、印度谷蛾 *Plodia interpunctella*、烟芽夜蛾 *H. virescens* 及向日葵斑螟 *Homoeosoma electellum* 等^[5,7]。大田小菜蛾由于对常用化学农药产生抗性问题，从而大量广泛地应用Bt生物农药进行防治，近年来，已经导致了美国夏威夷，美国本土和亚洲小菜蛾对Bt生物农药产生抗药性，而且对Bt *kurstaki* 亚种为高水平抗性，对Bt *aizawai* 亚种为较低水平抗性^[8]。至今，这是在大田农作物上唯一的一种害虫，因对Bt内毒素产生抗性而引起防治失败的例子。关于棉铃虫对Bt生物农药的抗性问题，仅澳大利亚^[9]进行了棉铃虫和斑实夜蛾 *H. punctigera* 对Bt抗性监测方法和建立敏感毒力基线等研究外，至今国内未见报道。棉铃虫对Bt生物农药抗性风险如何？它与转Bt基因棉花对棉铃虫抗虫性有何关系？本文就棉铃虫对Bt生物农药的抗性早期监测和这种抗性与转Bt基因棉花抗虫效果的关系进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 棉铃虫：1995年采自山东阳谷、河南新乡、河北邯郸、安徽萧县、江苏丰县第二代棉铃虫及江苏东台第四代棉铃虫和室内选育的敏感品系^[10]，田间采集种群在实验室用棉铃虫人工饲料饲养到F₁代（东台种群饲养至F₃代）的初孵幼虫供抗性测定和转Bt基因棉抗虫性测定。

1.1.2 供试药剂：*B. thuringiensis* (*kurstaki* 亚种) 制剂标准品 Dipelx (效价为16 000 Iu/mg) 由美国芝加哥 Abbott 实验室提供。

1.1.3 人工饲料：棉铃虫一般室内饲养人工料按照谭福杰的饲料配方^[11]；饲料感染法用人工饲料配方为：每份饲料总量为115.25 g，其中包括黄豆粉7 g、酵母粉（高活性干酵母）4 g、抗坏血酸（R. A）0.5 g、冰醋酸（36%）1.25 mL、琼脂2.5 g 及水100 mL；Dipelx 制剂用磷酸缓冲液（由NaCl 8.5 g/L、K₂HPO₄ 6.0 g/L、KH₂PO₄ 3.0 g/L 及1% 吐温-80 10 mL/L 组成）稀释。

1.1.4 转Bt基因抗虫棉品系：转Bt基因抗虫棉品系 R₁₉ 和 R₁₆ 在我校江浦农场大田种植，均从中国农业科学院棉花所引进，经系统选择和抗性测定获得的纯系，定名为 R₁₉，而 R₁₆ 抗虫性稍低于 R₁₉。

1.2 方法

1.2.1 饲料感染法：将称量的Bt制剂标准品倒入磷酸缓冲液配制成一定浓度，加入饲料感染法人工饲料中，按等比法配制成6~8个不同Bt浓度（单位为mg/mL）的人工饲料，然后将其倒入指形管中（3 mL/管~4 mL/管），每管接未取食的初孵幼虫5头，管口用棉

花塞塞紧，每浓度重复10次，共处理50头。接虫后饲养条件为：温度（30±1）℃，光周期L:D=14h:10h。接虫后48 h 检查死虫数，用机率值分析法计算毒力回归式、 LC_{50} 、 LC_{99} 及其95%置信范围。用室内选育的棉铃虫敏感品系(SUS₁)建立相对敏感毒力基线和区分剂量(LD_{99})，以区分剂量测定大田棉铃虫种群的抗性个体百分率。

1.2.2 棉叶喂饲法：采集各种转Bt基因棉花品系植株顶心的倒第3、4片嫩叶，分别编号入小塑料袋。当天用自来水浸湿脱脂棉包扎叶柄基部以保持叶片新鲜(可保持4~6 d)，放入玻璃果酱瓶内，每瓶接未取食的初孵幼虫30头，用保鲜膜封口，并用小针扎孔透气。接虫后果酱瓶放入光照培养箱内，测定温度为(27±2)℃，光周期L:D=14h:10h。每抗虫棉品系测5~10株，共接虫150~300头，接虫后第5天检查结果，计算平均死亡率(\bar{M})及标准差(SD)。

2 结果与讨论

2.1 饲料感染法影响因素的研究

2.1.1 测定温度对初孵幼虫毒力的影响：用含不同浓度Bt的人工饲料，接入1995年采自山东阳谷、河北邯郸、河南新乡及安徽萧县及SUS₂种群棉铃虫未取食初孵幼虫，光周期为L:D=14h:10h，在(27±1)℃和(30±1)℃两个测定温度下，48 h 检查结果。从表1可看出，上述五地棉铃虫在27℃时所测得 LC_{50} 值变动范围(0.1 mg/mL~1.32 mg/mL)明显大于30℃时所测得 LC_{50} 值的变动范围(0.10 mg/mL~0.22 mg/mL)，前者相对毒力指数仅为后者的10.2%~93.3%；再从同一地点的棉铃虫对Bt的反应来看，在27℃下所测b值(除新乡种群外)均小于30℃下所测b值，即30℃下结果的变异性小。上述结果表明，测定温度影响到测定结果的变异性。用饲料感染法测定Bt生物农药对棉铃虫初孵幼虫的毒力时，温度为30℃时所测结果比27℃时所测结果的变异性小。处理温度从27℃增加到30℃，可能加快了幼虫体内蛋白水解酶对摄入的δ-内毒素晶体蛋白的活化，因为活化作

表1 不同测定温度对Bt饲料感染法(初孵幼虫)毒力的影响

虫种	处理(℃)	毒力回归式 $y=a+bx$	b值下降 (%)	LC_{50} (mg/mL) (95%置信限)	相对毒力 指数
山东阳谷	30	$y=6.33+1.33x$		0.10 (0.07~0.14)	100
	27	$y=5.01+0.83x$	37.6	0.98 (0.59~2.37)	10.2
河北邯郸	30	$y=5.80+1.21x$		0.22 (0.16~1.06)	100
	27	$y=5.60+1.16x$	4.1	0.30 (0.22~0.42)	36.4
河南新乡	30	$y=6.18+1.31x$		0.13 (0.09~0.17)	100
	27	$y=5.99+1.34x$	-2.3	0.18 (0.14~0.25)	72.2
安徽萧县	30	$y=6.24+1.44x$		0.14 (0.10~0.19)	100
	27	$y=5.79+0.96x$	33.3	0.15 (0.10~0.23)	93.3
SUS ₂	30	$y=5.88+1.03x$		0.14	100
	27	$y=4.90+0.88x$	14.6	1.32	10.6

注：SUS₂种群是自1991年采自河南偃师棉铃虫选育敏感品系SUS₁时淘汰下来的比较敏感种群

用是抑制昆虫取食和引起中毒反应的基础；也可能温度的升高不仅有利于活化，而且有利于毒素晶体蛋白与中肠上皮细胞纹缘膜上受体结合和引起上皮细胞裂解，从而促进了整个中毒致死过程。

2.1.2 喂饲时间对3龄幼虫毒力的影响：用含不同浓度Bt的人工饲料喂山东阳谷、河北邯郸、河南新乡、安徽萧县及江苏灌云棉铃虫刚脱皮3龄幼虫，测定温度为(30±1)℃，光照周期为L:D=14h:10h，接虫后5d和7d检查结果。从表2可以看出，接虫后处理喂饲7d的毒力(LC₅₀范围为0.03 mg/mL~0.33 mg/mL)明显比5d的毒力(LC₅₀范围为0.13 mg/mL~3.03 mg/mL)高，而且b值也明显增大，即喂饲7d毒力的变异性小。上述结果表明用饲料感染法测定Bt对3龄幼虫的毒力时，以接虫后7d观察结果为好。这与澳大利亚Forrester^[8]报道的结果相一致。

表2 不同喂饲时间对Bt饲料感染法(3龄幼虫)毒力的影响

虫种	LC ₅₀ (mg/mL) (95%置信限)		斜率b值	
	7 d	5 d	7 d	5 d
阳谷9522	0.03 (0.004~0.07)	0.13 (0.02~0.26)	1.36	0.74
邯郸9522	0.11 (0.06~0.15)	0.25 (0.16~0.36)	2.14	1.40
新乡9522	0.19 (0.12~0.27)	2.31 (1.56~4.40)	1.58	1.52
萧县9522	0.33 (0.16~0.46)	3.03 (1.92~3.19)	2.18	1.45
灌云9522	0.07 (0.02~0.10)	0.15 (0.06~0.26)	2.48	1.05

鉴于Bt生物农药在棉田应用的时间一般为棉铃虫卵孵盛期至高峰期，Bt喷药后在田间残效期又较短，主要用于防治初孵幼虫，另外3龄幼虫饲料感染法处理后观察时间太长，因此选用既比较接近大田实际用药情况，又比较简便的初孵幼虫饲料感染法作为棉铃虫对Bt生物农药抗性的测定方法。

2.2 棉铃虫对Bt生物农药早期抗性检测

Brent^[12]曾指出：“为了得到农药因抗性将失效的最初征兆，我们应需要能分离和鉴定出 1×10^{-10} 那样极低频率的抗性突变体。然而，没有巨大的投入和努力，这是不容易达到的。抗性频率只有达到高于1%或0.1%才能检测到，而且这还要取决于所采集试虫样本数量和统计分析所要求的显著程度”。众所周知，区分剂量方法通常是用敏感种群的LD₉₉(即杀死供试群体中99%敏感个体的剂量)处理，得到群体中抗性个体存活百分率；而剂量反应法(即毒力回归线和LD₅₀方法)是测定群体中大多数个体对药剂的反应，如果用LD₅₀进行比较，往往忽略了群体中少数抗性个体。正如Zhao和Graefius^[13]与Ffrench-Constant和Roush^[14]曾指出的“用区分剂量(或浓度)进行的诊断试验来检测低频率抗性比70年代就采用的剂量对数死亡机率值反应标准方法更有效”。澳大利亚在棉铃虫抗性治理中就采用区分剂量方法监测抗性，1989年Forrester^[15]曾报道：“1983~1984年生长季早期Namoi和Gwgdir地区棉铃虫对拟除虫菊酯为低水平抗性，抗性个体百分率低于10%”。沈晋良等^[16]曾报道类似的结果：“1989年我国山东昌乐、河南黄泛区、偃师、河北晋县等地棉铃虫对氯戊菊酯抗性为0.9~1.7倍，但抗性个体百分率达6%~10%，这

些结果表明用区分剂量法监测早期抗性比常规的剂量反应法更有效”。并根据1983~1991年抗性监测的系统结果，提出“棉铃虫对氯戊菊酯抗性个体百分率为0%~3%、6%~10%、15%~65%、70%~85%及大于90%时，分别代表敏感、敏感性下降（即早期抗性）、低水平抗性、高水平抗性及极高水平抗性”。

用初孵幼虫饲料感染法建立了棉铃虫敏感品系(SUS₁)对Bt生物农药的敏感毒力基线和区分剂量（即敏感基线的LD₉₀值，2 mg/mL）。监测了1995年采自山东阳谷、河北邯郸、河南新乡、安徽萧县、江苏丰县二代棉铃虫室内F₁代初孵1龄幼虫对Bt农药的敏感性变化，并用区分剂量测定各大田种群的抗性个体百分率。从表3可看出，尽管上述五地棉铃虫对Bt农药的LC₅₀值较敏感基线的LC₅₀值变化不大，但毒力回归线的斜率(b)及置信限与敏感基线(SUS₁种群)的斜率(b)及置信限相比，差异显著（仅萧县斜率的95%置信范围与SUS₁种群斜率的95%置信范围稍有重叠），斜率的明显降低说明这些地区棉铃虫对药剂反应的遗传异质性增大^[17]；用区分剂量处理后抗性个体百分率为5%~10%。上述结果表明这些地区棉铃虫对Bt生物农药已产生早期抗性。仅江苏东台棉铃虫仍属敏感的，抗性个体百分率为2%。这警告我们，即使比较安全，产生抗性比较缓慢的Bt生物农药，如果大量使用，也会产生抗性。当前是治理棉铃虫对Bt抗性的关键时刻，必须采取严格限制使用Bt生物农药的措施，建议每年仅在第二代使用2次，以防止或延缓棉铃虫对Bt农药抗性的进一步上升。

表3 1995年五省棉铃虫对Bt生物农药抗性监测结果

虫种	毒力回归式		斜率 (95%置信限)	LC ₅₀ (mg/mL) (95%置信限)	抗性个体 百分率 (%)
	y=a+bx				
SUS ₁	y=6.77+1.91x	1.91 (1.62~2.20)	0.12 (0.08~0.15)	0	
新乡9521	y=6.18+1.31x	1.31 (1.13~1.49)	0.13 (0.09~0.17)	6	
萧县9521	y=6.24+1.44x	1.44 (1.23~1.65)	0.14 (0.10~0.19)	7	
阳谷9521	y=6.33+1.33x	1.33 (1.14~1.52)	0.10 (0.07~0.14)	9	
邯郸9521	y=5.80+1.21x	1.21 (0.98~1.44)	0.22 (0.16~0.06)	9~10	
丰县9521	y=6.23+1.35x	1.35 (1.16~1.54)	0.12 (0.09~0.17)	5	
东台9521					2

表4 转Bt基因棉叶对敏感及抗性棉铃虫初孵幼虫抗虫性比较

转Bt 抗虫棉	棉铃虫 种群	接虫 株数	处理 幼虫数	幼虫平均死亡率(%) ($\bar{M} \pm SD$)	
				处理后第3天	处理后第5天
R ₁₉	SUS ₁	10	300	78.7±11.36	90.0±5.21
	新乡9521	5	150	69.3±22.52	74.0±23.99
R ₁₆	SUS ₂	10	300	39.7±25.12	53.0±21.45
	阳谷9521	18	540	10.38±8.64	24.61±15.32

注：SUS₁为敏感品系，SUS₂见表1注

2.3 抗Bt棉铃虫对转Bt基因棉抗虫效果的影响

1995年7月18日与29日采摘转Bt基因抗虫棉品系棉株的顶部倒第3~4片棉叶，用棉叶喂饲法在室内测定对棉铃虫敏感品系(SUS₁及SUS₂)与1995年采自山东阳谷和河南新乡二代棉铃虫室内F₁代初孵幼虫(均对Bt有早期抗性)的抗虫效果。从表4可看出，R₁₉和R₁₆转Bt基因抗虫棉品系的叶片对上述两类棉铃虫抗虫性反应都存在明显差异。R₁₉抗虫棉品系对棉铃虫敏感品系(SUS₁)和新乡棉铃虫处理后第5天平均死亡率分别为(90.0±5.21)%和(74.0±23.99)%，两者相差16%；R₁₆抗虫棉品系对棉铃虫敏感品系(SUS₂)和阳谷棉铃虫处理后第5天平均死亡率分别为(53.0±21.45)%和(24.61±15.32)%，两者相差28.39%。上述结果似乎表明，我国新乡和阳谷棉铃虫对Bt kurstaki亚种和上述转Bt基因棉花品系间存在交互抗性。这对这类抗虫棉的推广是一个非常危险的信号，在上述地区应用转Bt基因抗虫棉，可能会直接影响到其抗虫效果和使用寿命，这方面的研究工作尚待继续进行。

致谢 张天真、陈进、陈岗兵、郭书巧等同志参加部分工作，谨表感谢。

参 考 文 献

- 1 Gelernter W. *Bacillus thuringiensis*, Bioengineering and the future of bioinsecticides. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases-1990, 7A-3, 617~624
- 2 周威君，沈晋良(译). 生物农药的抗性潜在性及考虑对策，农药译丛，1992，14(5): 40~44
- 3 谢道昕等. 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株，中国科学，1991，(4): 367~373
- 4 沈晋良，吴益东. 棉铃虫抗药性及其治理. 北京：中国农业出版社，1995
- 5 Georghiou G P. Resistance potential to biopesticides and consideration of countermeasures. In: *Pesticides and Alternative*. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), 1990, 409~420
- 6 Tabashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., 1994, 39: 47~79
- 7 Brewer G J. Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the sunflower moth (Lepidoptera: Pyralidae). Environ. Entomol., 1991, 20 (1): 316~322
- 8 Heckel D G, Gahan L J, Tabashnik B E et al. Randomly amplified polymorphic DNA differences between strains of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) susceptible or resistant to *Bacillus thuringiensis*. Ann. Entomol. Soc. Am., 1995, 88 (4): 531~537
- 9 Forrester N W, Forsell L. Development of discriminating dose assays for *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in Australian *Helicoverpa* spp. Paper prepared for "The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Impact to the Environment". 1994
- 10 吴益东，沈晋良，尤子平. 棉铃虫对氯戊菊酯抗性和敏感品系的选育. 昆虫学报，1994，37(2): 129~136
- 11 谭福杰. 农业害虫抗药性测定方法. 南京农业大学学报，1987，(4)增：107~122
- 12 Brent K J. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. In: *Pesticide resistance: strategies and tactics for management*. National Academy Press. Washington, D. C. 1986, 298~312
- 13 Zhao J Z, Graefius E. Assessment of different bioassay techniques for resistance monitoring in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. entomol., 1993, 86 (4): 995~1 000
- 14 Ffrench-Constant R H, Roush R T. Resistance detection and document: the relative doses of pesticidal and biochemical assays. In: Roush R T, Tabashnik B E (eds). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman & Hall,

- New York, 1991, 4~38
- 15 Neil Forrester. Updated insecticide resistance levels. Australian Cottongrower, 1989, (1): 30
- 16 Shen Jinlang, Wu Yidong, Tan Jianguo et al. Comparison of two monitoring methods for pyrethroid resistance in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). Resistant Pest Management, 1993, 5 (1): 5~7
- 17 Stone T B, Sims S R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol., 1993, 86 (4): 989~994

EAPLY RESISTANCE OF *HELICOVERPA ARMIGERA* (HÜBNER) TO *BACILLUS THURINGIENSIS* AND ITS RELATION TO THE EFFECT OF TRANSGENIC COTTON LINES EXPRESSING BT TOXIN ON THE INSECT

Shen Jinliang Zhou Weijun Wu Yidong Lin Xiangwen

(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095)

Zhu Xiefei

(Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095)

Abstract Susceptible bioassay base line and discrimination doses for biopesticide *Bacillus thuringiensis* (Bt) on susceptible strain (SUS₁) of *Helicoerpa armigera* (Hübner) with the diet infection method were established. The susceptibilities to commercial Bt subspecies *kurstaki* formulation in newly hatched larvae of *H. armigera* collected from six counties of five provinces were tested in 1995. The results indicated that the five populations of *H. armigera* from Yanggu (Shandong), Handan (Hebei), Xinxiang (Henan), Xiaoxian (Anhui) and Fengxian (Jiangsu) showed early resistance to Bt. The proportion of resistant individuals in this insect at the 5 locations was 5%~10%; LC₅₀ values increased slightly but the slope (*b*) decreased significantly as compared with those of susceptible strain. However, Dongtai population (Jiangsu) was still susceptible. The biopesticide Bt resistance of *H. armigera* was diagnosed for the first time. The effects of transgenic cotton lines expressing Bt toxin on various populations of *H. armigera* with foliage-feeding method were also determined. The results indicated the average mortality of newly hatched larvae of *H. armigera* (Yanggu and Xinxiang) with early resistance to Bt declined significantly (about 16%~29%) compared with those of susceptible strain. It's suggested that populations of *H. armigera* from Yanggu and Xinxiang were resistant to biopesticide Bt and transgenic cotton expressing Bt toxin. The resistant management strategy of biopesticide Bt is discussed.

Key words *Helicoverpa armigera*, biopesticide Bt, resistance transgenic cotton