

抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食 与产卵行为影响的评价

陈 茂¹, 叶恭银¹, 姚洪渭¹, 胡 萃¹, 舒庆尧²

(¹ 浙江大学应用昆虫学研究所 / 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310029; ² 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 比较测定褐飞虱在转 *cry1Ab* 基因籼稻 (B1、B6) 和转 *SCK* 基因杂交稻恢复系 (MSA) 及各自亲本对照上的取食与产卵行为。在自由选择寄主植株条件下, 褐飞虱于转 *cry1Ab* 基因籼稻和转 *SCK* 基因杂交稻恢复系上的着虫比率、产卵选择性和产卵量与各自对照嘉早 935 和明恢 86 相比均无显著差异, 但取食总痕数除 B1 外则均显著高于对照。在非自由选择寄主植株条件下, 褐飞虱不论于转 *cry1Ab* 基因籼稻上还是于转 *SCK* 基因杂交稻恢复系上, 其取食总痕数均显著多于各自对照, 而取食 24 h 后排泄的蜜露则恰反之。综合可见, 3 个供试抗虫转基因水稻材料对褐飞虱取食是不利的, 而对产卵则无显著的影响。

关键词: 褐飞虱; 转基因水稻; *cry1Ab* 基因; *SCK* 基因; 取食行为; 产卵行为

Evaluation of the Impact of Insect-resistant Transgenic Rice on the Feeding and Oviposition Behavior of Its Non-target Insect, the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)

CHEN Mao¹, YE Gong-yin¹, YAO Hong-wei¹, HU Cui¹, SHU Qing-yao²

(¹ State key Laboratory of Rice Biology/Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029;

² Institute of Nuclear Agricultural Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: The feeding and oviposition behavior of the brown planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens* on two transgenic indica rice homogenous genotypes (B1 and B6) with *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* and transgenic restored line of hybrid rice (MSA) with *SCK* gene (a modified *CpTI* gene) were measured, and compared with those on their corresponding non-transgenic parental cultivar Jiazao935 and Minghui 86 performed by BPH. Under the selection condition of host plants by BPH, loading percentage, oviposition preference and laying egg number of BPH both on transgenic *cry1Ab* rice and transgenic *SCK* rice were not significantly different from those on their controls, while their total number of probing wound caused by BPH expect for feeding on B1 plants was markedly more than that on the control. In contrast, under the non-selection condition, total number of probing wound caused by BPH on either transgenic *cry1Ab* rice or transgenic *SCK* rice was obviously more than those on their controls. Conversely, their honeydew weight secreted by BPH after feeding for 24 h was significantly less than those on the control. It is concluded that the three tested transgenic rice genotypes with insect resistance acts adverse effect on BPH feeding, and no marked effect on BPH oviposition.

Key words: *Nilaparvata lugens*; Transgenic rice; *cry1Ab* gene; *SCK* gene; Feeding behavior; Oviposition behavior

二化螟 (*Chilo suppressalis*) 和三化螟 (*Scirpophaga incertulas*) 是水稻的主要害虫, 每年因其造成损失约占水稻总产量的 5%~30%。为有效、安全地控制其为害, 近 10 多年国内外在抗

收稿日期: 2003-03-04

基金项目: 国家“973”资助项目 (001CB109004), 国家自然科学基金资助项目 (39970507) 和教育部全国优秀博士学位论文专项资助项目 (199944)

作者简介: 陈 茂 (1977-), 男, 安徽巢湖人, 博士研究生, 主要从事转基因生物安全性研究。叶恭银为通讯作者, Tel: 0571-86971696; E-mail: chu@zju.edu.cn

虫转基因水稻培育研究方面已取得较大进展, 获得了不少抗性强的籼稻、粳稻或杂交稻恢复系材料或品系, 有的还进入了田间中试, 展示了良好的应用前景^[1-4]。但最终能否商业化, 很大程度上还取决于它们的环境安全性和食品安全性。环境安全性评价主要是评价其对生态系统中物种多样性、生物群落结构稳定性、非靶标生物生存与种群动态的影响, 以及靶标害虫对其产生抗性的风险性等。然而, 迄今就抗虫转基因水稻的环境安全性评价还开展不多, 除评价了转 *Bt* 基因水稻对非靶标害虫褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 及其捕食者黑肩绿盲蝽 (*Cyrtorhinus lividipennis*) 取食或生长发育^[5], 及主要非靶标害虫和蜘蛛优势种田间种群动态^[6] 的影响外, 尚乏其它正式报道。近年来笔者就不同抗虫转基因水稻材料对稻田节肢动物群落稳定性, 以及优势天敌和非靶标害虫取食与产卵行为、生长发育与繁殖和种群动态等的影响, 分别开展了较系统的评价。笔者就两类抗虫转基因水稻对其非靶标害虫褐飞虱取食和产卵行为的影响进行了研究, 以分析褐飞虱在抗虫转基因水稻田中发生与为害的可能趋势。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与水稻材料

虫源: 褐飞虱采自杭州田间, 在室内以感虫水稻品种 TN1 继代饲养 3 代, 供试验用。

水稻材料: 2 个转 *cry1Ab* 基因籼稻纯合系 B1 和 B6 (浙江大学培育), 1 个转 *SCK* 基因 (即用外源蛋白细胞内定位技术改造的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因, Signal-CpTI-KEDL) 杂交稻恢复系 MSA (福建省农业科学研究院农业遗传工程重点实验室提供); 它们非转基因亲本对照各为嘉早 935 和明恢 86。各材料播种且移栽于无虫网室大棚内, 移栽后 30 d 供试验用。

1.2 取食选择性测定

试验 I: 取 B1、B6 和嘉早 935 稻株主茎各 1 株, 呈等边三角形栽种于同一圆形塑料盆中, 而后罩于聚乙烯薄膜塑料笼罩 (直径 15 cm, 高 50 cm) 内, 每笼接入 10 头经保湿饥饿 2 h 的 4~5 龄褐飞虱雌虫。设 15 次重复。试验于人工气候室内 (温度 25±1℃, RH 80±1%, 漫射光光照 14 h·d⁻¹) 进行。接虫后 2、4、8、24、48、72 h, 分别考查各供试材料稻株上的着虫数。

试验 II: 取 MSA 和明恢 86 稻株主茎各 1 株, 栽

种于同一圆形塑料盆的直径线上, 每盆接入 6 头 4~5 龄褐飞虱雌虫, 其它方法和条件同试验 I。

1.3 取食刺痕测定

1.3.1 选择性刺探 试验 I: 将 B1、B6 和嘉早 935 稻株统一截成高 30 cm, 按方法 1.2 之试验 I 栽种、接虫。设 15 次重复。接虫后 48 h 移去试虫, 分别取各材料的外叶鞘于 1% 曙红 Y 溶液中染色 12 h。染色后用清水漂洗叶鞘、风干, 再置显微镜下分别考查褐飞虱于稻株不同部位 (按比例等分成上、中、基部) 因取食而留下的洋红色口针刺痕数。试验于人工气候室内进行。

试验 II: MSA 和明恢 86 稻株栽种方法和接虫量同 1.2 之试验 II, 其它处理同 1.3.1 之试验 I。

1.3.2 非选择性刺探 试验 I: 取等高 (30 cm) 的 B1 稻苗 3 株, 呈等边三角形栽种于同一塑料盆中 (B6 和嘉早 935 栽种法同之), 其它处理同 1.3.1 之试验 I。

试验 II: 取等高 (30 cm) 的 MSA 稻苗 2 株, 栽种于同一塑料盆的直径线上 (与明恢 86 栽种法同之), 每盆接虫 6 头, 其它处理同 1.3.1 之试验 I。

1.4 取食量测定

分别取各试验材料稻株, 去掉次生分蘖, 而后参照 Pathak 等在主茎上套 1 只对接膜小袋 (2 cm × 3.5 cm)^[7], 每袋接 1 头经保湿已饥饿 2 h 的短翅型雌成虫。各材料设 30 个重复。24 h 后取下小袋, 以电子天平称量每虫的蜜露重量。试验场所和条件同方法 1.2。

1.5 产卵选择性测定

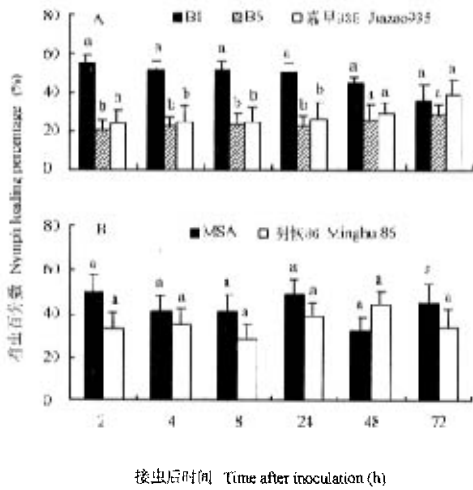
按方法 1.2 分别栽种各供试材料。在 B1、B6 和对照的对比试验中, 每盆接 3 头卵短翅型雌成虫; 在 MSA 和对照的对比试验中, 每盆接虫 2 头。各设 10 个重复。产卵 48 h 后将虫取出, 于解剖镜下解剖, 统计各材料各稻株上的卵块数和各卵块的卵粒数。试验场所和条件同方法 1.2。

2 结果与分析

2.1 取食选择性比较

褐飞虱于 24 h 内在转 *cry1Ab* 基因水稻 B1 上的着虫比率显著高于转 *cry1Ab* 基因水稻 B6 和对照嘉早 935 ($P < 0.05$), 而 B6 和嘉早 935 间无显著差异 ($P > 0.05$)。此后, 三者上的着虫比率均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1-A)。相比之下, 褐飞虱于 72 h 内在转 *SCK* 基因水稻 MSA 和对照明恢

86 上的着虫率则无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1-B)。



图中数据由平均数±标准误。Duncan's 新复极差多重比较 (A) 或 t 测验比较 (B) 结果表明, 具相同字母的平均值间差异未达显著 ($P_{0.05}$) 水平。图 2、3 同之

In the figure, the data are means ± standard error. Means sharing with the same low-case letter were not significant different at the level of $P_{0.05}$, analyzed by Duncan's multiple range test (A) or t-test(B). The same for Fig.2 and Fig.3

图 1 褐飞虱对转 cry1Ab 基因水稻 (B1、B6)(A) 和转 SCK 基因水稻 (MSA) (B) 及各自对照 (嘉早 935、明恢 86) 取食选择性的比较

Fig.1 The feeding selection preference of the brown planthopper (BPH), Nilaparvata lugens on transgenic cry1Ab rice (B1 and B6)(A) and transgenic SCK rice (MSA) (B), compared with their matched non-transgenic controls, Jiaozao935 and Minghui86

2.2 取食刺痕数比较

2.2.1 选择性刺探 自由选择条件下, 褐飞虱在转 cry1Ab 基因水稻 (B1 和 B6) 和对照间呈现有一定的选择性。褐飞虱于 B6 稻株基、中和上部的取食刺探频率各为 17.0、17.1 和 9.0 次·d⁻¹, 48 h 内的取食刺痕数显著 ($P < 0.05$) 高于 B1 和嘉早 935, 而 B1 与嘉早 935 间取食刺痕数无显著差异 ($P > 0.05$), 其中对 B1 稻株基、中、上部的刺探频率各为 9.3、9.6 和 5.3 次·d⁻¹, 对嘉早 935 的各为 9.6、7.8、5.1 次·d⁻¹ (图 2-A)。

相比之下, 褐飞虱对转 SCK 基因水稻的选择不及对 Bt 水稻 B6 的明显。虽 48 h 内, 对 MSA 的总取食刺痕数显著 ($P < 0.05$) 高于明恢 86, 但就

各部位的取食刺痕数与明恢86相比差异则未达显著水平 ($P > 0.05$), 其中对 MSA 稻株基、中和上部的刺探频率各为 10.6、15.3 和 15.2 次·d⁻¹, 对明恢 86 的各为 4.9、11.9 和 11.8 次·d⁻¹ (图 2-B)。

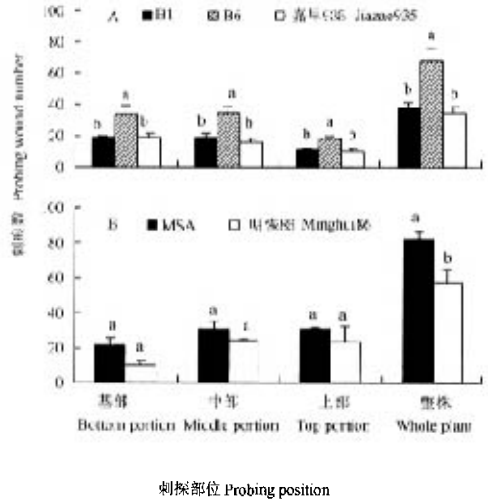


图 2 褐飞虱对转 cry1Ab 基因水稻 (B1、B6) (A) 和转 SCK 基因水稻 (MSA) (B) 及各自对照 (嘉早 935、明恢 86) 选择性刺痕数(48 h 内) 的比较

Fig.2 The probing wound number of the brown planthopper (BPH), Nilaparvata lugens on transgenic cry1Ab rice (B1 and B6)(A) and transgenic SCK rice (MSA) (B) under selection condition of host plants for 48 h, compared with their matched non-transgenic controls, Jiaozao935 and Minghui86

2.2.2 非选择性刺探 非选择条件下, 褐飞虱对转 cry1Ab 基因水稻 (B1 和 B6) 和对照嘉早 935 的刺探频率有一定的差异。褐飞虱于 B1、B6 和嘉早 935 稻株上部和基部的取食刺痕数无显著差异 ($P > 0.05$), 但总取食刺痕数则以 B1 和 B6 显著 ($P < 0.05$) 为高, 其中以 B6 为最高。褐飞虱对 B6 稻株基、中和上部的刺探频率各为 10.4、17.3 和 7.9 次·d⁻¹, 而对 B1 各为 10.4、11.2 和 7.1 次·d⁻¹, 对嘉早 935 各为 9.0、7.4 和 5.5 次·d⁻¹ (图 3-A)。

褐飞虱于转 SCK 基因水稻 MSA 的取食刺痕数除基部外, 均显著 ($P < 0.05$) 高于对照明恢 86, 其中对 MSA 稻株基、中和上部的刺探频率各为 5.8、14.8 和 12.6 次·d⁻¹, 对明恢 86 各为 4.9、8.2 和 6.2 次·d⁻¹ (图 3-B)。

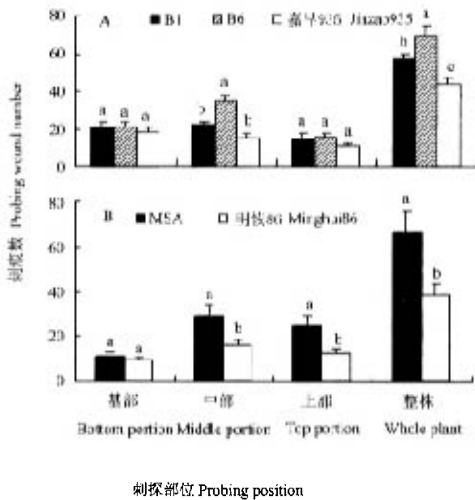


图3 褐飞虱对转 *cry1Ab* 基因水稻 (B1、B6)(A) 和转 *SCK* 基因水稻 (MSA) (B) 及各自对照 (嘉早935、明恢86) 非选择性刺探数 (48 h内) 的比较

Fig.3 The probing wound number of the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* on transgenic *cry1Ab* rice (B1 and B6)(A) and transgenic *SCK* rice (MSA) (B) without selection condition of host plants for 48 h, compared with their matched non-transgenic controls, Jiazao935 and Minghui86

2.3 蜜露量比较

褐飞虱于转 *cry1Ab* 基因水稻 B1 和 B6 上取食 24 h 所排泄的蜜露量 (±标准误) 各为 1.4 ± 0.13 和 $1.2 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{头}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, Duncan's 新复极差多重比较结果表明两者均极显著少于嘉早 935 上的分泌量 ($2.2 \pm 0.17 \text{ mg} \cdot \text{头}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) ($P < 0.01$)。可见, 褐飞虱于转 *cry1Ab* 基因水稻的取食量极显著低于对照。

褐飞虱于转 *SCK* 基因水稻 MSA 和对照明恢 86 上取食 24 h 所排泄的蜜露量 (±标准误) 各为 1.6 ± 0.10 、 $2.6 \pm 0.18 \text{ mg} \cdot \text{头}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, t 测验表明两者间差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。可见, 褐飞虱于转基因 *SCK* 水稻的取食量极显著低于对照。

2.4 产卵选择性比较

褐飞虱对转 *cry1Ab* 基因水稻 (B1 和 B6) 和对照明恢 935 无显著的产卵选择性, 且在三者上所产的卵块数、卵粒总数等均无显著差异 ($P > 0.05$), 即产卵量无显著差异 (表)。

褐飞虱对转 *SCK* 基因水稻 MSA 的产卵选择率、卵块数 (±标准误) 和卵粒数 (±标准误) 分别为 53.10% (±11.06%)、4.4 (±1.56) 块/♀ 和 27.2 (±7.83) 粒/♀, 对照明恢 86 的相应者各为 46.90% (±11.06%)、2.9 (±0.66) 块/♀、22.8 (±6.28) 粒/♀。t 测验结果表明, 两者间各参数者差异均未达显著水平 ($P > 0.05$)。

表 褐飞虱对转 *cry1Ab* 基因水稻 (B1、B6) 和对照 (嘉早 935) 的产卵选择性比较¹⁾

Table The oviposition preference of the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* on transgenic *cry1Ab* rice (B1 and B6), compared with the non-transgenic control (Jiazao935)

| 供试材料 | 卵块数/♀ | 卵粒总数/♀ | 卵粒数/卵块 | 产卵选择率 |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Test material | Number of egg mass/♀ | Total number of eggs/♀ | Egg number/egg mass | Oviposition selection ratio (%) |
| B1 | $5.7 \pm 2.21 \text{ a}$ | $49.5 \pm 24.27 \text{ a}$ | $4.90 \pm 1.37 \text{ a}$ | $30.32 \pm 10.76 \text{ a}$ |
| B6 | $6.4 \pm 2.23 \text{ a}$ | $51.5 \pm 17.93 \text{ a}$ | $4.84 \pm 1.41 \text{ a}$ | $31.91 \pm 9.73 \text{ a}$ |
| 嘉早935 Jiazao935 | $7.1 \pm 2.45 \text{ a}$ | $57.3 \pm 18.26 \text{ a}$ | $6.37 \pm 1.27 \text{ a}$ | $37.77 \pm 9.11 \text{ a}$ |

¹⁾ 表中数据系平均数±标准误。Duncan's 新复极差多重比较表明, 同列中具相同小写字母的平均值间差异未达显著 ($P_{0.05}$) 水平

The data are means ± standard error. In the same column, means sharing with the same low-case letter were not significantly different at the level of $P_{0.05}$, analyzed by Duncan's multiple range test

3 讨论

稻飞虱取食后排泄的蜜露量和取食痕 (刺探痕) 一直被认为是水稻品种或材料抗虱性评价的两个重要指标。蜜露量多者, 则示抗虱性弱, 反之抗虱性高^[8]。在寄主非自由选择条件下取食痕多少与水稻抗虱性的关系, 恰与蜜露量相反, 即取食痕多者为抗虱性高^[9]。研究结果表明, 褐飞虱不论取食转 *cry1Ab* 基因水稻 (B1、B6) 还是取食转 *SCK* 基因水稻 MSA 后在非选择条件下的总取食痕

均显著多于相应的对照, 而排泄的蜜露量显著少于对照, 可见, 这 3 个供试转基因材料对褐飞虱的抗性高于相应的对照。就品系间相比, 转 *cry1Ab* 基因水稻 B6 的抗虱性又高于 B1, 因为褐飞虱于 B6 上的取食痕总数不论在选择和非选择条件下均明显多于 B1, 且蜜露量也少于 B1。就褐飞虱对供试转基因抗虫水稻材料及其对照取食和产卵选择性来看, 除在 24 h 内于 B1 上着落虫数显著为多外, 均无显著的偏向性, 可见褐飞虱着落于转基因抗虫水稻材料及其对照上取食或产卵的机率是均等的。鉴

于着落后因供试转基因材料对褐飞虱的抗性高于相应的对照,可推测在自然田间条件下与对照相比供试转基因水稻不会像Bt棉和Bt马铃薯那样在有效控制靶标害虫的同时反引发各自非靶标害虫如棉蚜 *Aphis gossypii* 等^[10]和蚕豆小绿叶蝉 *Empoasca fabae*^[11]发生加重,而导致褐飞虱的发生与为害加重,反可能减轻。具体如何有待田间调查验证。

另外值得一提的是,这3个供试转基因材料均不利于褐飞虱取食,取食后排泄的蜜露量均极显著低于对照,这与Bernal等报道的褐飞虱分别取食含 *CaMV35S*、*trpA*、*actin*、*PEPC*和 *ubiquitin* 等启动子基因的转Bt基因水稻材料木质部后排泄的蜜露量显著高于相应对照,而取食韧皮部后排泄的蜜露量与对照间均无显著差异的结果^[5]不一致,这可能与供试材料不同有关。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^[12]提出了因时、因地、因种地去评估转基因作物的环境安全性个案原则逐一评估分析。

References

- [1] Tu J, Zhang G, Datta K, Khush G S, Datta S K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 1 101-1 104.
- [2] 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.
Cheng J A, Zhou W J. *Research in Agriculture Development in the 21st Century*. Beijing: Environmental Science Publisher of China. 1998: 406-414. (in Chinese)
- [3] Ye G Y, Tu J, Hu C, Datta K, Datta S K. Transgenic IR72 with fused *Bt* gene *cryIAb/cryIAc* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four Lepidopteran species. *Plant Biotechnology*, 2001, 18: 125-133.
- [4] Ye G Y, Shu Q Y, Yao H W, Cui H R, Cheng X Y, Hu C, Xia Y W, Gao M W, Altosaar I. Field resistance evaluation of transgenic rice containing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Journal of Economic Entomology*, 2001, 94: 271-276.
- [5] Bernal C C, Aguda R M, Cohen B M. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2002, 102(1): 21-28.
- [6] 刘志诚, 叶恭银, 胡 萃, Datta S K. Bt水稻对主要非靶标害虫和蜘蛛优势种田间种群动态的影响. 植物保护学报, 2002, 29(2): 138 144.
Liu Z C, Ye G Y, Hu C, Datta S K. Effects of transgenic Bt rice on population dynamics of main non-target insect pests and dominant spiders in rice paddies. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2002, 29(2): 138-144. (in Chinese)
- [7] Pathak P K, Saxena R C, Heinrichs E A. Parafilm sachet for measuring feeding activity of *Nilaparvata lugens* on rice varieties. *Philippine Entomology*, 1982, 11:85-90.
- [8] Sogawa K, Pathak M D. Mechanism of brown planthopper resistance in Mudgo variety of rice. *Applied Entomology & Zoology*, 1970, 5: 145-158.
- [9] 朱 麟, 古德祥, 张古忍, 游金平. 褐飞虱和白背飞虱在抗褐飞虱水稻品种上的行为反应. 植物保护学报, 2002, 29(2): 145-152.
Zhu L, Gu D X, Zhang G R, You J P. Behavioral responses of brown planthopper and white-backed planthopper to BPH-resistant rice varieties. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2002, 29(2): 145-152. (in Chinese)
- [10] 崔金杰, 夏敬源. 麦套夏播转Bt基因棉田主要害虫及其天敌的发生规律. 棉花学报, 1998, 10(5): 255-262.
Cui J J, Xia J Y. Effects of Bt transgenic cotton (with early maturity) on population dynamic, of main pests and their natural enemies. *Acta Gossypii Sinica*, 1998, 10 (5): 255-262. (in Chinese)
- [11] Riddick E W, Direly G, Barbosa P. Effect of a seed-mix deployment of *Cry3A*-transgenic and nontransgenic potato on the abundance of *Lebia grandis* (Coleoptera: Carabidae) and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 1998, 91: 647-653.
- [12] Timmons A M, Charters Y M, Crawford J W, Burn D, Scott S E, Dubbels S J, Wilson N J, Robertson A, O'Brien E T, Squire G and Wilkinson M J. Risks from transgenic crops. *Nature*, 1996, 380: 487.

(责任编辑 王红艳)