

转 Bt 基因抗虫棉品种的推广利用与棉铃虫抗性的治理

张天真 唐灿明

(农业部农作物种质资源与育种重点开放实验室, 南京农业大学农学系, 南京 210095. Email: cgbrlnau@public1.ptt.js.cn)

摘要 我国现有 3 类转 Bt 基因抗虫棉种质材料: 94-24, 中心 94 和 R19. 它们对棉铃虫初孵幼虫都表现出显著的抗虫性. 用它们作亲本材料都已培育出转基因抗虫棉的品种或杂交种. 这三类抗虫棉在不同生育期抗虫性表现程度不同. 苗期 (10 片主茎叶以下) 叶片饲喂初孵幼虫的死亡率一般达 100%. 生育后期抗虫性则有所下降. Bt 基因转入棉花后能稳定遗传给后代, 不同世代的抗虫性表现基本一致. 通过室内汰选, 烟芽夜蛾等害虫很容易对 Bt 杀虫晶体蛋白产生抗性, 但在目前我国长江流域、黄河流域棉区棉花栽培制度下以及从抗虫棉的多方面表现来看, 除了新疆棉区外, 尽管棉铃虫产生抗性的可能性依然存在, 转 Bt 基因抗虫棉推广利用后棉铃虫不会很快产生抗性. 同时讨论了延缓棉铃虫产生抗性的一些抗性治理策略.

关键词 转 Bt 基因抗虫棉 棉铃虫 抗虫性 时空表达 抗性治理

1 转 Bt 基因抗虫棉研究和利用的现状

我国是世界主要产棉国之一, 棉花是我国最重要的经济作物之一. 近几年来, 由于气候条件和生态条件的变化, 害虫抗药性的增强, 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 对菊酯类农药的抗药性比 1980 年增强近百倍. 虽然棉农用药量增加, 喷药次数增多, 棉铃虫仍大面积暴发成灾, 损失惨重. 化学农药防治害虫不仅药效低, 耗资大, 而且污染环境, 破坏生态平衡. 因此棉铃虫已成为制约我国棉花生产的一个重要因素. 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称为 Bt) 是一种能产生杀虫晶体蛋白的土壤杆菌. 这种细菌作为防治农田、果园和森林中鳞翅目害虫的生物药剂已使用了近 30 年. 随着分子生物学研究的进展, 已从苏云金芽孢杆菌中克隆出了 50 多个杀虫晶体蛋白基因^[1, 2].

比利时的植物遗传 (PGS) 公司首次报道了转 Bt 基因的烟草植株. 转化的基因是全长的 CryIA(b) 基因和 3' 端缺失只保留 5' 端编码晶体蛋白核心区域 (N-端) 的 CryIA 基因. 两种转基因植株都能有效地抵抗 1 龄烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 幼虫^[3]. 随后, 孟山都 (Monsanto)、Agricetus 等其他公司的科技人员, 以及中国农业科学院生物技术研究中心也先后把 Bt 杀虫晶体蛋白基因转化到棉花、番茄、烟草等多种植物中^[4]. 但是这些转基因抗虫植物晶体蛋白的表达量低, 抗虫效果不理想^[2, 5, 6]. 通过启动子的改造和 Bt 基因修饰, Bt 晶体蛋白的表达量从原来的占可溶性蛋白的 0.001% 提高到 0.05% ~ 0.1%, 抗虫效果明显改善^[7].

孟山都公司和美国农业部的有关实验室联合对前者培育的转 Bt 基因抗虫棉进行了田间试验. 发现转基因抗虫棉对棉铃虫、红铃虫 (*Pectinophora gossypiella* Saunders) 都有显著抗性, 还高抗其他一些棉花害虫. 此外, 转基因抗虫棉对益虫没有什么不利的影响, 相反由于减少了治虫次数, 有利于害虫天敌的滋生与繁殖^[8]. 研究也表明, 通过农杆菌介导遗传转化培育的转基因抗虫棉, 外源基因整合对产量、纤维品质没有什么不利的影响. 除了抗虫基因外, 有的体细胞无性系比珂字棉 312 的农艺性状有进一步的改良, 可以作为育种基础材料进

一步筛选^[9]。1993年,孟山都公司成了岱字棉公司的控股公司后,岱字棉公司育种家把孟山都公司的转 Bt 基因抗虫棉抗性基因回交转入到了 DP5415, DP5690 两个品种中,用保铃棉 (Bollgard™) 商标注册的 NuCOTN33, NuCOTN35 抗虫棉品种,从 1996 年起,每年推广种植都在 8×10^5 hm² 以上。棉农每种 1 英亩(约 0.4 hm²)抗虫棉需付孟山都公司基因费 30 美元,仅此一项孟山都公司 1996 年就赚回了 6 000 万美元。岱字棉公司的抗虫棉已打入澳大利亚^[10~12],在中国河北省也栽种了 13.3×10^4 hm²。目前,一大批新的转 Bt 基因抗虫棉、转基因抗草甘膦除草剂以及抗虫、抗除草剂的双价转基因棉花已发放^[13]。但是,阿肯色州大学的研究调查表明,1996 年该州保铃棉表现很好,而 1997 年则不是很满意。在 1997 年 7 个观察点中,有 4 个保铃棉减产,7 个点平均减产 24 磅/英亩(约 26.9 kg/hm²),净收入减少 25 美元。减产的原因是保铃棉需更多的生长调节剂和收花 2 次^[14]。

澳大利亚除了引种美国的抗虫棉外,正在用当地的品种 Siokral-4, Siokra s324, Sicala VI, CS 7s, CS50, 84023-74 品系为轮回亲本,与转 Bt 抗虫棉种质 Mon81 (为非轮回亲本)进行回交以选育适合澳大利亚种植的抗虫棉品种。

中国农业科学院生物技术中心自 80 年代末期开始进行 Bt 基因的克隆研究。1992 年郭三堆等人^[15]在国内首先合成了 CryIA 杀虫晶体蛋白结构基因,并和山西省农业科学院棉花研究所、江苏省农业科学院经作所合作分别通过根癌农杆菌介导和花粉管通道法将 Bt 基因转入泗棉 3 号及晋棉 7 号等推广棉花品种中,获得了抗虫性好的转 Bt 基因抗虫棉品系^[16~18]。这些品系的抗虫性好,对棉铃虫具有很高的抗性和控制危害的能力^[19]。已有国抗棉 1 号、国抗棉 12 号、晋棉 26 号品种审定,在生产上推广种植。中国农业科学院棉花研究所通过生物技术和常规育种相结合的手段培育出了转 Bt 基因的抗虫棉品种中棉所 29 杂交种、中棉所 30, 31 等,并在河南、山东、河北等省开始示范种植^[20]。南京农业大学棉花遗传育种研究室则培育出转基因抗虫杂交种“南抗 3 号”,它的产量高、抗性好、品质优良,即将在江苏省推广。我国已审定了转基因抗虫棉品种(杂交种)7 个,在不久的将来,还会有更多的转 Bt 基因抗虫棉品种或杂交种审定并在生产上推广利用。美国岱字棉公司的保铃棉系列品种栽种面积也将不断扩大。因此,棉铃虫是不是会很快产生抗性,尤为引人注意。

2 转 Bt 基因抗虫棉的抗性表现特性

(i) 转基因抗虫棉的抗性遗传。通过农杆菌介导,花粉管通道法培育的转基因棉花,目标性状的遗传一般符合 Mendel 经典遗传的 3:1 或 15:1 的分离。整合拷贝数一般是 1~3 个。从育种应用角度看,最好一个。拷贝数增多并不一定增加目的基因的表达量,拷贝数 2 个以上后,可能会发生转基因沉默。

我国目前主要有 3 类转 Bt 基因抗虫棉,它们都已培育出品种或杂交种在生产上推广利用。本研究室从山西省农业科学院棉花研究所、中国农业科学院生物技术中心、中国农业科学院棉花研究所引入山西 94-24、中心 94 和 R19 这三类转 Bt 抗虫棉品系。引入后进行自交纯化,将农艺性状和抗虫性纯合的品系用于遗传研究。山西 94-24 和中心 94 导入的基因相同^[17,18],但导入的方法不一样。遗传分析表明,山西 94-24、中心 94 和 R19 这三类转 Bt 基因抗虫棉亲本品系对棉铃虫的抗性各由一对显性基因所控制,它们的抗虫基因非等位。R19、山西 94-24、中心 94 三个抗虫棉品系间互交杂种,抗虫性与亲本类似,表明抗虫基因在杂合状态

下无共抑制现象存在^[21~25]。我国现有的3类转Bt基因抗虫棉的抗虫性均由一对显性基因所决定,这为育种上利用这些抗虫种质资源提供了较方便的技术途径。通过杂交、回交等手段可以比较容易地将抗虫基因转育至其他高产、优质、抗病的陆地棉品种中,从而培育出抗棉铃虫的优良品种。

(ii) 抗虫性的遗传稳定性。1997年,本研究室对R19品系3个不同繁殖世代冰柜保存的种子同时播种,于7月底采摘主茎顶部幼嫩叶片进行抗虫性鉴定,3个世代植株上叶片饲喂棉铃虫初孵幼虫5d后,幼虫的死亡率、存活幼虫的龄期一致,世代数的增加并未使R19的抗虫性下降。1998年对94-24、中心94和R19共3种抗虫棉品系3~4个繁殖世代的种子同时播种(5月5日),9月初同时测定不同世代主茎幼嫩叶片的抗虫性。结果表明,从幼虫死亡率、存活幼虫的虫龄及受害程度看,3种抗虫棉不同世代植株对初孵幼虫表现出显著抗性,且3种抗虫棉不同世代的植株抗性水平无显著差异,存活幼虫中1龄虫分别占 $9.5\% \pm 8.9\%$, $7.7\% \pm 6.0\%$, $13.2\% \pm 16.7\%$, 2龄虫分别占 $90.5\% \pm 8.9\%$, $92.2\% \pm 6.0\%$, $86.8\% \pm 16.7\%$ 。这一结果与上述1997年R19不同世代测定结果一致。转基因玉米的结果^[26]说明Bt基因整合到作物的染色体后能够稳定地复制并传给后代,繁殖代数的增加不会影响抗虫性状的表达。

(iii) 不同发育时期转Bt基因抗虫棉对棉铃虫的抗性表现有差异。1997年在南京(长江流域棉区)对3类抗虫棉主茎叶定位进行抗性测定,取苗龄一致的棉苗45株,分3组,每组15株。6月20日~7月19日分别采摘主茎上的叶片(3组轮流采摘)测定抗虫性,得出主茎叶片抗虫性的时空变化规律。7月22日和8月5日分别测定主茎及果枝倒数第2~3片展开叶的抗虫性。为比较抗虫棉品系的抗虫性,每次测定均加入10株左右的苏棉12或泗棉3号叶片作对照。处理5d后,对照幼虫死亡率一般在10%~20%,存活的幼虫中,主要是3龄虫,2龄及4龄虫占的比例极低,基本无1龄虫。

1997年对R19主茎叶的抗虫性测定表明,R19主茎叶的抗性水平基本可分为两个阶段(表1),2~10叶位叶片的抗性最好,其饲喂5d后,幼虫平均死亡率为99.2%,其中2~8主茎叶的平均死亡率为100%。存活幼虫中,仅第10叶有68.2%的2龄虫。而对照苏棉12幼虫平均死亡率仅8.9%,存活幼虫以3龄虫为主(71.1%),平均受害程度3.4级。这正值棉花苗期-初花期和棉铃虫第2代发生期,一般发生年份根本不需用药防治。第11~15叶抗虫性显著下降,平均死亡率为 $52.4\% \pm 11.6\%$ (范围37.5%~67.5%),但其中第12和13叶片的死亡率稍偏低。存活幼虫中以2龄虫为主,平均占 $78.4\% \pm 11.4\%$,叶片平均受害为 (1.7 ± 0.3) 级。对照苏棉12幼虫死亡率为 $10.3\% \pm 7.3\%$,存活幼虫以3龄虫为主,占 $94.7\% \pm 5\%$,叶片平均受害级别为 (3.6 ± 0.4) 级。

1997年还同时测定了中心94两个株系(8081,8082)和山西94-24主茎叶抗虫性的时空变化,结果基本上和R19一致。随着生育期的推进,转基因抗虫棉叶片的抗虫性表现出有逐渐下降的趋势,而存活幼虫中,1龄虫比例逐步下降,2龄和3龄幼虫的比例逐步升高,即幼虫取食叶片后,发育速度逐步加快。这表明转基因抗虫棉叶片的室内抗虫性表现出前期好后期差的特点。中国农业科学院植物保护研究所、棉花研究所的室内研究结果也表明在黄河流域棉区抗虫棉的抗虫性有同样的表现特性^[27,28]。

Fitt等人^[29]的室内试验也证明,随着植株的生长发育,美国引入的转Bt基因抗虫棉的抗性也逐渐减弱,在现蕾开花期(12月~1月),饲喂抗虫棉花蕾的棉铃虫*H. punctigera*死亡率

很高, 3 d 的死亡率可高达 85%, 而对照则为 5%. 7 天后, 棉铃虫全死亡. 但是到 2 月份, 死亡

表 1 R19 主茎叶片对棉铃虫 (*SuS₂*) 的抗性 (1997 年, 5 天)

叶位	测定株数	平均死亡率 / %	存活幼虫百分率 / %			受害级别
			1 龄	2 龄	3 龄	
2	17	100	0	0	0	1.0±0.0
3	35	100	0	0	0	1.1±0.3
4	6	100	0	0	0	1.0±0.0
5	17	100	0	0	0	1.0±0.0
6	34	100	0	0	0	1.0±0.3
7	7	100	0	0	0	1.1±0.4
8	17	100	0	0	0	1.1±0.2
9	35	99.4±3.4	100	0	0	1.1±0.2
10	59	93.6±15.9	31.6	68.4	0	1.1±0.3
11	16	67.5±31.7	26.9	65.4	7.7	1.4±0.6
12	36	45.4±19.6	21.1	80.8	7.1	1.9±0.5
13	8	37.5±22.5	0	96.0	4.0	2.0±0.5
14	16	52.5±34.9	23.1	76.9	0	1.7±0.9
15	60	59.0±27.2	27.4	72.6	0	1.5±0.5

率逐渐下降, 最后低到 20%. 现蕾开花期饲喂抗虫棉叶片 5 天后, 存活的棉铃虫多为 1 龄, 而对照则可发育到 2 龄或 3 龄. 而到 2 月份, 喂养抗虫棉叶片的棉铃虫存活率明显增加, 2, 3 龄棉铃虫的比例也增加. 用 2 龄虫喂养, 趋势一致.

棉蕾的抗虫性变化趋势基本上与叶片一致, 但下降的趋势没有叶片明显^[27,28]. 这可能是棉花从营养生长转入生殖生长后, 叶片的营养物质向蕾铃等生殖器官转移, 从而叶片中杀虫晶体蛋白的含量下降, 造成了叶片的抗虫性下降.

转基因抗虫棉田间抗性表现有所不同, 具体结果见第 3 节.

美国孟山都公司的转基因抗虫棉通过长达 6 年的田间试验后, 1996 年进入了商业化应用, 其中在美国超过 72×10^4 hm², 约占当年全国植棉面积的 13%, 涉及 5 700 余农户. 在澳大利亚超过 3×10^4 hm², 约占当年植棉面积的 10%. 然而, 在转基因保铃棉大面积推广的第一年, 在美国约 40% 棉农施药防治了棉花的目标害虫^[10, 11]. 尤其是澳大利亚, 在棉铃虫的轻发生年, 抗虫棉意外地表现效果差、变异大、杀虫晶体蛋白的下降期提前, 不仅普遍施药, 而且与常规棉相比一般只减少施药次数 50%, 最差的几乎无效. 已引起棉农对昂贵棉种和抗虫效果差的不满和有关各界的强烈关注^[12,30]. 两国都排除了田间出现抗性棉铃虫的可能性. 我们认为这可能也与抗虫棉后期叶片抗性的减弱有关. 在遇上高温、干旱以及棉铃虫密度高的情况下, 转基因抗虫棉后期的抗性可能更差.

3 棉铃虫抗性产生的风险

1985 年, McGaughey^[31]首次发现了害虫对 Bt 生物药剂的抗性. 他发现印度谷螟(*Plodia interpunctel* (Hübner) 仓虫对 Bt 药剂的抗性可以在几代之内产生. 其中一个品系在用 Bt 处理的饲料上饲养 2 代, 抗性增加近 30 倍, 5 代之后抗性达到 100 倍. 其抗性随后呈稳定状态不再增加, 当选择作用中断后, 抗性保持稳定. 抗性表现为单基因隐性遗传. 后来, 有更多的害虫在实验室饲喂下也对 Bt 生物农药产生了抗性^[32]. Tabashnik 等人^[33]报道了在夏威夷田间小菜蛾(*Plutella xylostella* CL)对 Bt 生物农药产生了抗性. 由田间采集的具有适度抗性的种

群, 在实验室内进行筛选, 可以对 Bt 产生抗性. 而在田间条件下 5 次叶面喷施 Bt 生物农药对具有适度抗性的种群没有增加其抗性水平. 田间筛选的抗性在 Bt 停用后消失缓慢. 小菜蛾对实验室筛选作用的迅速响应, 说明它们对 Bt 的敏感性在种群内存在着遗传差异, 加强选择作用可能会产生比以前报道的田间抗性更高水平的抗性.

研究发现, 害虫对 Bt 生物农药的抗性表现为单基因隐性遗传, 例外的不多^[34~37]. 抗性产生的生理生化机制包括肠内 pH 值的改变以及影响晶体蛋白溶解、活化等酶的改变. 印度谷螟、小菜蛾抗性的产生是由于特异受体亲和力降低, 以及幼虫中肠道筛状缘细胞膜上的结合位点发生了变化^[32].

根据上述研究结果, 很多学者认为, 如果大面积使用转基因杀虫晶体蛋白保护植物, 抗性的产生是不可避免的. 采用遗传转化的方法把 Bt 晶体蛋白基因导入番茄、棉花、玉米和其他作物, 就是让它在作物体内从幼苗期直到收获期内表达, 并不受紫外光解作用和其他降解作用的影响. 害虫对转 Bt 基因植物的抗性发展速率依赖于害虫与 Bt 晶体蛋白的接触强度, 这又与转基因植物的应用面积有关. 如果转 Bt 基因的棉花、玉米和高粱同时推广利用防治夜蛾科害虫, 抗性的产生更快. 另外, 由于害虫对转基因 Bt 杀虫晶体蛋白的产生还会导致害虫对发酵生产的 Bt 生物农药也产生抗性, 使它们也无法用来防治抗性害虫. Gould 等人^[34]报道, 通过 12 个世代实验室的定向选择, 烟芽夜蛾(*H. virescens*)对 Cry1A(c)产生了中等程度的抗性(大约为 7~8 倍). 通过 19 个世代的选择后, 抗性增加了 500 多倍; 进一步选择, 抗性增加 10 000 倍. 高抗品系(YHD2)不仅对转 Bt 基因的烟草也有抗性, 还对 CryA(a), CryA(b), Cry1F 有交叉抗性, 对 Cry1B, Cry1C, Cry11A 也有中等抗性. 小菜蛾 No-QA 抗性品系也对 Cry1A(a), Cry1A(b), Cry1A(c), Cry1F 有交叉抗性^[36,37]. 赵建周等人^[27]用 Bt 棉叶片逐代汰选棉铃虫初孵幼虫 6, 11, 17 代后, 对单一 Bt 杀虫晶体蛋白 Cry1A(c)的抗性指数分别为 1.5, 4.0 和 7.1 倍, 比用 Bt 粉剂汰选的抗性发展速度明显加快. 虽然室内汰选导致的棉铃虫抗性指数不高, 但 Bt 棉对汰选 6, 11, 17 代种群的抗虫等级分别降低为抗、抗和中抗级. 据 Gould 等人^[38]测定, 美国 4 个州大田自然烟芽夜蛾群体中, 对 Bt 的抗性基因(r)频率为 1.5×10^{-3} , 抗性纯合体为 10^{-6} .

从 1995 年起, 美国大面积栽种转基因抗虫棉. 为了防止棉铃虫对转基因抗虫棉花产生抗性, 主要采取“高剂量-庇护所”的策略. 用“高剂量-庇护所”策略来防止棉铃虫产生抗性的理论基础是: 用混有 Bt 生物农药的饲料喂养烟芽夜蛾等多种害虫的试验结果表明, 对 Bt 生物农药产生抗性的害虫是由于发生了隐性基因突变, 即这种抗性是由一对隐性基因(rr)控制的. 因而, 在转基因抗虫棉的大面积推广过程中, 棉铃虫产生基因突变, 由 RR 变成 Rr, 在转基因抗虫棉杀虫晶体蛋白高剂量表达下, 杂合体 (Rr) 棉铃虫也将被杀死. 即使产生基因型为(rr)的抗性棉铃虫, 由于可以与“庇护所”中的野生型棉铃虫(RR)交配, 产生基因型为 Rr 的后代, 它们对转基因抗虫棉敏感, 仍然可以被杀死. 无论是计算机模拟还是室内实验都已证实“高剂量-庇护所”策略可防止棉铃虫产生抗性^[39~44]. 要成功地除去杂合体(Rr)的敏感棉铃虫, 在棉花的整个生长季节转基因抗虫棉都必须高剂量表达杀虫晶体蛋白. 如果生长后期抗性减弱, 杂合体棉铃虫(Rr)就能存活下来, 从而增加下个世代抗性基因的频率. 鉴于此, 在我国长江流域和黄河流域棉区目前的耕作制度情况下, 棉花分散种植, 有很多的天然庇护所, 棉铃虫不太容易很快地产生抗性. 但是, 它的前提条件是转基因抗虫棉必须高剂量表达 Bt 杀

虫晶体蛋白。我国现有的转基因抗虫棉早期抗虫性好,后期叶片抗虫性有所下降,表达的杀虫晶体蛋白含量能否杀死杂合体的棉铃虫就与棉铃虫对转 Bt 基因抗虫棉的抗性产生关系密切。用不同龄期棉铃虫的幼虫喂养转基因棉花叶片的死亡率比较表明,转基因抗虫棉对初孵和 1 龄幼虫的抗性好,随着龄期的提高,死亡率逐渐下降^[26~28]。但是,统计棉铃虫体重的变化表明,用 2~5 龄棉铃虫饲喂转 Bt 基因抗虫棉叶片 3 天后,棉铃虫的体重没有增加,反而有所下降。对照棉铃虫的体重则成倍增加^[29,44]。此外,除了 6 龄虫外,即使取食 8 月份大田抗虫棉叶片的初孵和 1~5 龄幼虫都不能化蛹,6 龄虫也仅有 19.8% 的幼虫化蛹。很明显转基因抗虫棉叶片对棉铃虫还是有很高的抗性。田间试验的结果也表明,即使盛花期后抗虫棉每株人工接种 300 头棉铃虫的初孵幼虫,一星期后调查,抗虫棉未受危害,无存活幼虫。而对照泗棉 3 号受棉铃虫危害重,蕾、花、铃的受害率分别为 62.2%, 42.9% 和 7.7%, 每植株存活棉铃虫 18 头。在黄河流域棉区, GK-2, GK-12 (源于中心 94 抗虫棉) 转基因抗虫棉在整个生育期对棉铃虫保持极高的抗性。对 2, 3, 4 代棉铃虫的控制效果分别达到 88.71%~95.45%, 92.75%~97.65% 和 93.33%, 存活的棉铃虫都未达到化学防治的指标。因此,我们认为,目前推广的转 Bt 基因抗虫棉在正常条件下,已达到高剂量表达,再加上有很多天然“庇护所”,在长江流域和黄河流域棉区,棉铃虫不会很快产生抗性。

最近发现欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 对 Bt 生物农药 Dipel 的抗性表现为不完全显性,因此,玉米用“高剂量-庇护所”策略来防止欧洲玉米螟产生抗性的效果就会下降^[45]。

4 棉铃虫的抗性治理

文献^[41,44]提议在 6 个方面开展研究,以尽量避免害虫对 Bt 产生抗性所带来的危害。这对我国转基因抗虫棉的推广利用以及棉铃虫的抗性治理有很大的参考价值。为了避免棉铃虫产生抗性,我们认为应开展以下工作:

(1) 提高转基因棉花 Bt 杀虫晶体蛋白的表达量。转基因育种实践表明,目的基因的整合最好是单基因,否则会引起目的基因的沉默^[24, 25]。我们的研究结果证明,不同转基因抗虫棉品系间杂种的 Bt 基因间无同源重复引起的抑制现象,这和前人报道的结果不太一样^[23]。但与 Hobbs 等人^[46]报道的结果相一致。在他们的研究中, GUS 基因表达量高的拟南芥转基因品系间互交, GUS 基因的表达有累加效应。如果转基因抗虫棉品系间杂种后代也有累加效应,这将为多个不同的 Bt 基因转入同一遗传背景,通过 Bt 基因的累加效应而提高转基因抗虫棉的抗性效果。据报道,将 Bt 基因导入烟草叶绿体基因组,可以显著提高烟草对烟草夜蛾的抗性^[47]。

(2) 培育出转化有双价或多价的复合转基因抗虫棉。除了把 Bt 杀虫晶体蛋白基因转化到陆地棉品种外,再把对主要害虫具有广谱抗性的蛋白酶抑制剂基因也转化到同一品种中,培育出转化有双价或多价的复合转基因抗虫棉。这类品种上抗性产生的频率可以降低。因为害虫要克服寄主的抗性,就必须在几个基因位点上同时发生突变,但这种机率一般很低。我国已成功培育出了双价 (Bt+CpTI) 的抗虫棉^[48, 49]。实验室汰选试验表明,转 (Bt+CpTI) 基因烟草可以延缓棉铃虫生产抗性^[50]。它们可取代单价的转基因抗虫棉在生产上推广利用。另外,在棉花抗虫育种中,除了转移 Bt 杀虫晶体蛋白、蛋白酶抑制剂基因和其他多肽毒素基因外,也可考虑把无蜜腺、鸡脚叶等形态抗性和一些生理抗性等结合起来,培育复合的转基因抗虫棉

品种,以增加抗虫的有效性^[51].

(3) 转基因抗虫棉的合理利用. 抗病虫品种的推广和应用的实践证明,只要合理利用抗源,培育多种类型的单抗品种轮流种植或作为多系品种混合种植就可延缓抗虫品种的使用寿命.但是,如果在栽种转基因抗虫棉的同时,大面积推广转基因的玉米,那么,棉铃虫的抗性就可能较容易产生.美国就规定转基因棉花在南方栽种,而转基因的玉米则在北方推广.我国也应参考实行.此外,如转基因抗虫棉在新疆棉区推广,应强制在新疆建立“庇护所”.

(4) 综合防治技术的合理应用.各种棉花害虫综合防治技术应该也适用于转基因抗虫棉.3类转Bt基因抗虫棉对棉铃虫均具有显著的抗性表现,但是抗性随着生育期的变化而改变,表现出前期(苗期、蕾期)抗性高、开花后降低的特点.生产上,黄河流域棉区棉铃虫发生重的2代一般可不用化学防治;而在长江流域棉区,棉铃虫发生较重的3和4代需适当化学防治.防治指标及农药用量等指标需加以系统研究.不同棉铃虫的防治方法例如黑光灯诱蛾,建立诱集带,化学防治,耕作制度和栽培措施的合理利用等也应综合运用,同时做好抗性产生的预报预测.

致谢 作者非常感谢潘家驹教授对本文提出修改意见.参加本项目研究的还有南京农业大学棉花遗传育种研究室的朱协飞、孙敬、郭旺珍、闵留芳、周兆华、刘康、陈兆夏等,植物保护系的沈晋良、周威君、孟风霞、高丛芬、陈进等.本工作为国家“八六三”高科技研究项目及国家发展棉花生产专项基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Barton K A, Miller M J. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in plants. In: Kung S, Wu R, eds. Transgenic Plants', Vol 1. Wisconsin: Academic Press Inc, 1993. 297 ~ 315
- 2 Murray E E, DeBoer D L. Transgenic cotton. In: Kung S, Wu R, eds. Transgenic Plants', Vol 2. Wisconsin: Academic Press Inc, 1993. 153 ~ 168
- 3 Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, et al. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 1987, 328(2): 33 ~ 37
- 4 周兆谟, 朱 祯. 植物抗虫基因工程研究进展. 生物工程进展, 1994, 14(4): 23 ~ 25
- 5 Benedict J H, Altma D W, Umbeck P F, et al. Behavior, growth, survival, and plant injury by *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic Bt cottons. J Econ Entomol, 1992, 85(2): 589 ~ 593
- 6 谢道昕, 范云六、倪万潮, 等. 苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白导入棉花获得转基因植株. 中国科学, B辑, 1991, (4): 367 ~ 373
- 7 Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A, et al. Insect resistant cotton plants. Bio Tech, 1990, 8: 939 ~ 943
- 8 Wilson F D, Flint H M, Deaton W R, et al. Cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. J Econ Entomol, 1992, 85: 1516 ~ 1521
- 9 Wilson F D, Flint H M, Deaton W R, et al. Yield components and fiber properties of insect resistant cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin gene. Crop Sci, 1994, 34: 38 ~ 41
- 10 Fox J L. Bt cotton infestations renew resistance concerns. Nature Biotech, 1996, 14: 1070
- 11 Fox J L. EPA seeks refuge from Bt resistance. Nature Biotech, 1997, 15: 409
- 12 Forrester N, Pyke B. The Bt report. The Australia Cotton Growers, 1997, (1): 23
- 13 王淑民. 岱字棉公司 1998 年发放的转基因棉花新品种. 中国棉花, 1998, 25(8): 36
- 14 Sutton A. Plant Bt cotton strategically. Cotton Grower, 1998, (4): 14
- 15 郭三堆. CryIA 杀虫基因的人工合成. 中国农业科学, 1997, 26(2): 85 ~ 86
- 16 倪万潮, 黄骏麒, 郭三堆, 等. 转 Bt 杀虫蛋白基因的抗棉铃虫棉花新种质. 江苏农业学报, 1996, 12(1): 1 ~ 6

- 17 倪万潮, 张震林, 郭三堆. 转基因抗虫棉的培育. 中国农业科学, 1998, 31(2): 8~13
- 18 焦改丽, 郭三堆, 李淑君, 等. 棉花遗传转化和植株再生的研究. 华北农学报, 1997, 12(2): 82~85
- 19 王武刚, 姜永幸, 杨雪梅, 等. 转基因棉花对棉铃虫抗性鉴定及利用研究初报. 中国农业科学, 1997, 30(1): 7~12
- 20 夏敬源, 汪若海, 文绍贵, 等. 抗虫棉在棉铃虫综合治理中的作用研究初报. 中国棉花, 1995, 22(8): 8~11
- 21 唐灿明, 朱协飞, 张天真, 等. 转 Bt 基因抗虫棉 R19 品系的棉铃虫抗性表现及抗性遗传研究. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 194~201
- 22 唐灿明, 张天真, 朱协飞, 等. 转 Bt 基因抗虫棉的遗传. 见: 王连铮, 戴景瑞, 主编. 全国作物育种学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 275~279
- 23 唐灿明, 孙敬, 朱协飞, 等. 我国现有的3类转 Bt 基因抗虫棉品系棉铃虫抗性的遗传分析. 科学通报, 1999, 44(19): 2064~2068
- 24 Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. Proc Natl Acad Sci, USA, 1994, 91: 3490~3491
- 25 Matzke M A, Matzke J, Scheid O M. Inactivation of repeated genes-DNA-DNA interaction? In: Paszkowski J, ed. Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 271~307
- 26 Fearing P L, Brown D, Vlachos D, et al. Quantitative analysis of Cry1A(b) expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. Molecular Breeding, 1997, 3:169~176
- 27 赵建周, 赵奎军, 卢美光, 等. 华北地区棉铃虫与转杀虫蛋白基因棉花间的互作研究. 中国农业科学, 1998, 31(5): 1~6
- 28 崔金杰, 夏敬源. 转 Bt 基因棉对棉铃虫抗性的时空动态. 棉花学报, 1999, (113): 141~146
- 29 Fitt G P, Mares C L, Llewellyn D J. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons in Australia. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4: 535~548
- 30 Kaiser J. Pests overwhelm Bt cotton crop. Science, 1996, 14: 1070
- 31 McGaughey W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 1985, 229: 193~195
- 32 Tabashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Ent, 1994, 39: 47~79
- 33 Tabashnik B E, Cushing N L, Finson N, et al. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J Econ Entomol, 1990, 83(5): 1671~1676
- 34 Gould F, Anderson A, Reynolds A, et al. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J Econ Entomol, 1995, 88(6): 1545~1559
- 35 Liu Y B, Tabashnik B E. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. Appl Envir Micro, 1997, 63(6): 2218~2223
- 36 Tabashnik B E, Malvar T, Liu Y B, et al. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain of *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl Envir Micro, 1996, 62(8): 2839~2844
- 37 Tabashnik B E, Liu Y B, Finson N, et al. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. Proc Natl Acad Sci, USA, 1997, 94: 1640~1644
- 38 Gould F, Anderson A, Jones A, et al. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proc Natl Acad Sci, USA, 1997, 94: 3519~3523
- 39 Peferoen M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. TIBTECH, 1997, 1(5): 173~177
- 40 Liu Y B, Tabashnik B E. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. Proc R Soc Lond B, 1997, 264: 605~610
- 41 McGaughey W H, Whalon M E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science, 1992, 258: 1451~1455
- 42 Mallet J, Porter P. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? Proc R Soc, Lond B, 1992, 250: 165~169
- 43 Parker C D, Luttrell R G. Inter-plant movement of tobacco budworm larvae in mixed-plantings of Bt and not-Bt cotton. Proc

- Beltwide Cotton Prod Res Conf, London, 1975. 775 ~ 779
- 44 McGaughey W H, Gould F, Gelernter W. Bt resistance management. *Nature Biotech*, 1998, 16: 144 ~ 146
- 45 Huang F, Buschman L L, Higgins R A, et al. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 1999, 284: 965 ~ 967
- 46 Hobbs S L A, Thomas D W, DeLong C M O. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Bio*, 1993, 21: 17 ~ 26
- 47 Kota M, Daniell H, Varma S, et al. Overpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry 2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999, 96: 1840 ~ 1845
- 48 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 等. 双价抗虫转基因棉花研究. *中国农业科学*, 1999, 32(3): 1 ~ 7
- 49 Li F G, Guo S D, Liu C L, et al. The study on the transformation and selection of insect-resistant cotton harboring double-gene. *棉花学报*, 1999, 11(2): 106 ~ 112
- 50 Zhao J Z, Fan X L. Gene pyramiding: an effective strategy of resistance management for *Helicoverpa armigera* and *bacillus thuringiensis*. *Resistant Pest Management*, 1997, 9(2): 19 ~ 21
- 51 Sachs E S, Benedict J H, Taylor J F, et al. Pyramiding Cry1A(b) insecticidal protein and terpenoids in cotton to resist tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol*, 1996, 25: 1257 ~ 1266

(1999-07-21 收稿, 1999-10-10 收修改稿)