

棉铃虫对转 *Bt* 基因棉的抗性及其治理策略研究进展

谭声江, 陈晓峰, 李典谟*

(中国科学院动物研究所, 农业虫害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 简述了苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) 毒素的作用方式及杀虫机理, 分析了 *Bt* 棉种植过程中面临的生态风险。综述了昆虫对 *Bt* 毒素的抗性机理、监测方法及治理策略方面的研究进展。棉铃虫对 *Bt* 棉的抗性可能主要与中肠上皮细胞膜上的特异性结合受体中结合位点的改变有关。在多种抗性治理策略中, 庇护所策略被公认为是目前最有效的并已广泛采用的抗性治理措施。应针对 *Bt* 棉在我国的种植情况, 在棉铃虫还未在田间表现出抗性以前, 制定合理的抗性预防、治理措施。

关键词: 棉铃虫; 转 *Bt* 基因棉; 抗性; 治理策略; 庇护所

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 01-0138-07

Progress in the studies on *Helicoverpa* spp. resistance to transgenic *Bt* cotton and its management strategy

TAN Sheng-Jiang, CHEN Xiao-Feng, LI Dian-Mo* (State Key Laboratory of Integrate Management of Insect Pests and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Advance in the research on monitoring and management strategies of resistance of *Helicoverpa* spp. to the transgenic *Bt* cotton was reviewed. Mechanism and pattern of *Bacillus thuringiensis* toxicity to pests were included and potential ecological risks of commercially planted *Bt* cotton, of which resistance of insect pests to *Bt* cotton may be the major one, were analyzed. Based on the information available it seems that modification of the site, where the *Bt* toxin and the specific receptor in the infected insect was bound, may be the most significant mechanism of the resistance occurrence in the Lepidoptera insect. The refuge tactic, considered as one of the effective strategies for resistance management, has been adopted in Australia and US. Since the transgenic cotton has been planted in China, it is necessary to develop effective strategies to manage the resistance before the cotton bollworm develops resistance in the field.

Key words: cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*); transgenic *Bt* cotton; resistance; management strategy; refuge

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是棉花的主要害虫。20 世纪 90 年代以来, 棉铃虫在我国连年大发生, 并对常用杀虫剂特别是一些菊酯类杀虫剂产生抗药性, 其猖獗危害已成为制约我国棉花生产持续、稳定发展的关键因子。对棉铃虫的综合治理包括农业防治、生物防治、物理防治、化学防治等常规防治措施。近年来, 随着生物工程技术的发展, 人们逐渐把注意力转向具有可持续抗虫性、无污染、保护生态平衡的转基因棉的研究开发及应用。

自美国太平洋酵母公司 1957 年生产出第一个苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) 商品制剂以来, 随着发酵技术的不断发展, *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, 成为目前世界上开发应用最成功的一种生物农药 (Paoletti and Pimentel, 1996)。20 世纪 70 年代比利时 Montagu 实验室首次将 *Bt*- δ 内毒素转入烟草以来, 转 *Bt* 烟草、西红柿、马铃薯、棉花、玉米等在国内外相继报道 (沈晋良等, 1998)。目前转 *Bt* 基因抗虫棉 (*Bt* 棉) 在我国山东、河南、河北等省已进行大面积试验示范种植。

虽然生物工程和分子生物学技术在农作物上的应用能提高害虫控制的质量, 保障农业产量的可持续性, 但随着生物农药和转基因作物的推广应用,

基金项目: 973 项目 (G2000016210)、IFS-C/2366-2 及农业虫害综合治理研究国家重点实验室开放基金项目 (9915)

第一作者简介: 谭声江, 男, 1972 年 1 月生, 汉族, 四川邻水人, 博士, 研究方向为分子生态学, Email: shengjiangtan@yahoo.com

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 1999-06-25; 接受日期 Accepted: 2000-05-05

它们可能带来的环境问题也不容忽视。害虫对生物农药和转基因作物的抗性是其面临的一个巨大生态风险 (Paoletti and Pimentel, 1996)。如同各种化学农药的使用一样, 随着 *Bt* 制剂及转 *Bt* 作物的推广应用, 害虫在持续的选择压力下, 也会产生对 *Bt* 毒素的抗性。甚至在一些转 *Bt* 作物的田间种植以前, 某些害虫已经在实验室或田间对该作物表达的 *Bt* 毒素产生了显著水平的抗性 (Tabashnik, 1994; Paoletti and Pimentel, 1996; 唐振华等, 1996)。为了保护生态环境, 保障 *Bt* 生物农药及转 *Bt* 作物的持续利用, 应加强昆虫对 *Bt* 产生抗性的生化和遗传基础的研究, 以制定合理的抗性治理措施。

1 *Bt* 毒素的作用方式及杀虫机理

Bt 的毒蛋白晶体 (又称原毒素, protoxin) 是苏云金杆菌在其孢子形成期产生的, 它由许多称为“杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPS)”或“ δ -内毒素 (δ -endotoxin)”或“Cry 蛋白”的亚单位组成。昆虫食入该毒蛋白晶体后, 在中肠的高 pH 环境和蛋白水解酶的作用下, 毒蛋白晶体溶解并被激活, 激活后的蛋白能引起中肠膜上皮细胞裂解、中肠的麻痹, 害虫在几天内死亡 (唐振华等, 1996)。

Bt 毒素进入昆虫体内必需经过溶解才能被蛋白酶激活而释放出活性毒素。激活后的毒素能与昆虫中肠上皮细胞膜上的受体特异结合, 引起中肠膜上皮细胞裂解。Masson 应用动力学研究方法发现在中肠上皮细胞上固定的刷缘状膜小泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 中含有与 *Bt*- δ -内毒素的高专一、高亲和的受体 (Masson *et al.*, 1995), *Bt* 毒素与特异受体上结合位点的识别也许对毒素毒力的大小没有显著的意义, 但却是毒素发挥毒力作用的重要环节。鳞翅目幼虫中肠上皮细胞膜上有许多 *Bt*- δ 内毒素的结合位点, 而且有的昆虫具有不同类型 *Bt*- δ -内毒素的受体。对一些 *Bt*- δ 内毒素来说, 其毒力与结合位点的数目有直接的相关性, 但另外一些 *Bt*- δ -内毒素却与此无关 (Masson *et al.*, 1995, 唐振华等, 1996)。

2 种植 *Bt* 棉的潜在风险

虽然 *Bt* 棉在害虫综合治理中能发挥巨大作用, 但它对环境和生态的影响也不容忽视。*Bt* 棉的潜

在威胁可分为两大类, 即对环境的影响和鳞翅目或其它害虫产生的适应性变化 (Fitt, 1997)。

Bt 棉对环境的影响体现在 4 个方面: (1) *Bt* 棉的杂草化; (2) *Bt* 基因有可能逃逸到相关植物上; (3) *Bt* 棉对害虫天敌及其它有益昆虫的负面影响; (4) *Bt* 棉种子及残株中 *Bt* 毒蛋白对非靶标动物的影响 (Fitt *et al.*, 1994)。

转基因作物获得了新的性状后, 可能具有更强的繁殖力、抗逆性、抗病抗虫性能, 一旦它们适应于自然生境, 可能会向其它农田或自然生态系统扩散, 破坏原有的生态平衡, 成为难以控制的有害生物 (陈晓峰, 1997)。*Bt* 棉不仅在抗虫性方面会发生变化, 在非抗虫性状方面, 也有可能产生相关的变化, 并产生一些不可预测的生态习性变化。转基因作物与野生植物间的基因流 (即转录基因的“逃逸”), 一直是转基因作物田间种植后备受关注的问题 (Fitt, 1997)。人工转录的基因可以“逃逸”原先的转基因作物, 进入其它作物或野生植物的基因组。在自然生态系统中, 转基因作物如果与近缘的作物品种或野生近缘植物杂交, 遗传重组的基因就有可能进入这些植物的基因组库, 导致其遗传结构的变化, 产生新的生态型或物种 (陈晓峰, 1997)。对于 *Bt* 棉来讲, *Bt* 基因有可能通过花粉传播而扩散到野生棉花或其它锦葵科植物中。尽管在小规模田间测试中表明, *Bt* 棉的花粉仅有 0.4% 传播到 1m 内的植株, 0.06% 传播到邻近 10 m 内随机分布的植株上, 但花粉的传播仍是基因扩散到野生棉花上的主要途径, 而且转基因植物与邻近植株间发生基因扩散频率最高可达 1.8% (Fitt, 1997)。另外, *Bt* 棉花对害虫天敌及其它有益昆虫以及对非靶标动物也会产生影响。棉花上有许多种类的昆虫, *Bt* 毒蛋白仅能对一部分的鳞翅目幼虫起到毒杀作用, *Bt* 棉花种植后, 棉铃虫种群数量的减少将影响捕食及寄生天敌的种群数量; 同时刺吸式害虫、棉红蜘蛛等可能成为棉田中的主要害虫, 从而带来新的害虫防治问题 (Fitt *et al.*, 1994; Fitt, 1997)。而且抗虫的 *Bt* 毒蛋白基因的表达产物也有可能进入到土壤中, 对土壤微生物、土壤动物及其它植物产生不利影响, 这些影响既包括短期效应, 也包括长期效应 (陈晓峰, 1997)。

Bt 棉大面积种植后, 鳞翅目或其它害虫很有可能会产生的适应性变化, 包括靶标害虫对 *Bt* 毒蛋白的抗性、次要鳞翅目害虫对 *Bt* 毒蛋白的抗性、新的主要及次要害虫的出现等 (Fitt, 1997)。

根据 50 年来使用有机合成化学杀虫剂的经验以及害虫抗性的经典遗传学研究结果, 美国环保局 (EPA) 及农业部 (USDA) 认为, 如果不采取有效的措施来阻止或延缓害虫的抗性发展, 一些害虫可能会在很短的时间 (有可能在 5 年内) 对转 *Bt* 作物产生抗性, 因此, 新的转基因作物申请注册时, 必须提供防止抗性发展的措施, 如种植 *Bt* 棉的同时, 在其旁边种植 4% (不喷洒任何农药) 或 20% (可喷洒除 *Bt* 制剂外的化学农药) 的普通棉花作为庇护所 (Environmental Protection Agency USA, 1998; McGaughey *et al.*, 1998)。自 McGaughey (McGaughey, 1985) 首次报道印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 对 *Bt* 产生抗性以来已 20 余年, 虽然目前在田间仅有小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 对 *Bt* 产生抗性, 但在实验室条件下, 已有烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*)、甜菜夜蛾 (*Spaloptera exigua*)、粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)、印度谷螟 (*Plodia interpunctella*)、粉斑螟 (*Cadra cautella*) 等多种昆虫产生了对苏云金杆菌的抗性 (唐振华等, 1996; Heckel *et al.* 1997; 沈晋良等, 1998)。

目前转入大多数 *Bt* 棉的抗虫基因均为单一基因, 由于基因单一, 害虫容易产生抗性。在种植 *Bt* 棉过程中, 我国部分地区如山东阳谷、河北邯郸、河南新乡、安徽萧县、江苏丰县已监测到了棉铃虫对 *Bt* 生物农药的早期抗性 (沈晋良等, 1998)。 *Bt* 棉能否在生产上推广应用, 除了丰产性外, 主要取决于抗虫棉的抗虫效果以及棉花害虫对其产生抗性的风险。如果害虫对转 *Bt* 棉产生抗性, 将可能交互影响到 *Bt* 生物农药的使用寿命。虽然 Monsanto 公司的代表指出, 1996 年 *Bt* 棉在美国 13 万公顷大面积种植时, 抗虫性不理想是由于美洲棉铃虫 (*Helicoverpa zea*) 和烟芽夜蛾数量多、天气酷热和干旱等原因造成的, 但一些科学家们担忧, 这种抗虫的失败有可能加速害虫对 *Bt* 抗性的发展; 而且由于 *Bt* 棉能不断的产生毒素, 将给害虫产生一个持续的选择压力, 其对 *Bt* 棉的抗性发展将比喷药要快 (Fox, 1996)。因此, 急需加强害虫对 *Bt* 棉的抗性机理、抗性遗传、交互抗性等方面的基础研究, 建立对 *Bt* 抗性的快速监测技术及治理策略、治理方案。

3 昆虫对 *Bt* 的抗性机理及监测

3.1 抗性的机理

不同昆虫对 *Bt* 毒素产生抗性的机理不一。在印度谷螟和小菜蛾中, *Bt* 毒素与中肠 BBMV 的结合力下降是抗性产生的主要机理 (Tabashnik, 1997)。 Heckel 等人利用连锁图谱方法, 发现对 *Bt* 棉产生抗性的 YHD 系烟芽夜蛾中, 对 Cry1Ac 的 80% 抗性水平与中肠受体 BtR-4 的位点有关, 而且该位点控制的抗性几乎是完全隐性 (Heckel *et al.*, 1997)。 Masson 等发现在小菜蛾抗性系中, 虽然抗性与受体同 Cry1Aa 的结合力降低有关, 但 Cry1Ac 毒素可竞争性地与 Cry1Aa 毒素的结合位点结合而减少毒素在细胞膜上形成孔道的机会, 从而导致毒性的降低 (Masson *et al.*, 1995)。 Heckel 等还建立了棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 的连锁图谱, 推测棉铃虫中存在一些类似于烟芽夜蛾 BtR-4 位点的锚定 (anchor) 位点。该位点的酶谱及 RFLP 图谱在烟芽夜蛾中已得到构建, 在两种害虫中可能具有高度的保守性; 而且棉铃虫对 *Bt* 抗性的连锁与烟芽夜蛾对 *Bt* 抗性的连锁相同, 显示它们可能具有共同的抗性机制 (Knight *et al.*, 1995)。 Gill 等成功地构建了烟芽夜蛾的 cDNA 文库, 并从 YHD 烟芽夜蛾中克隆了含有 N-氨基肽酶的与 *Bt* 毒素特异结合的 BTBPI 蛋白。标记结合实验显示, 细胞膜上的 BTBPI 蛋白或 N-氨基肽酶的降低导致了对 *Bt* 毒素的耐性 (tolerance) 或抗性, 而且 N-氨基肽酶在多种昆虫及脊椎动物中具有高度同源性 (Gill *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1995)。这对进一步从分子水平研究各种害虫对 *Bt* 的抗性提供了很好的资料。

Heckel 认为有 10 种潜在的抗性发展机制 (Heckel, 1994), 但害虫对 *Bt* 抗性的机制还未有定论, 结合位点改变、蛋白酶抑制和行为改变是最重要的, 也许代表主要的抗性机制。从实验室烟芽夜蛾和田间小菜蛾的抗性种群中, 已鉴别出结合位点改变所产生的强大的和专一性的抗性, 被认为是 *Bt* 抗性的主要机制, 而蛋白酶抑制和行为改变还未得到具体证实 (Ferre *et al.*, 1995; Heckel *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995)。这些突变绝大部分是隐性的。然而, 行为改变可能会使昆虫躲开最高的 *Bt* 剂量, 并减少有效的剂量接触。同样地, 蛋白酶改变也能减少有效剂量接触。这些机制可以导致产生部分杂合隐性抗性等位基因, 使害虫的防治效果降低, 从而加速抗性发展。

3.2 抗性的监测及预测

在害虫对 *Bt* 抗性的监测工作中, 目前采用较多的是区分剂量 (或浓度) 法。以该方法进行的诊

断试验来检测低频率抗性，比 20 世纪 70 年代就采用的剂量对数死亡率值反应标准方法更为有效（沈晋良等，1998）。沈晋良等（1998）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，诊断了采自山东、河北、河南、安徽、江苏等地二代棉铃虫室内 F_1 代初孵幼虫对 *Bt* 制剂的敏感性变化，并用区分剂量测定了各田间种群的抗性个体百分率。然而在害虫对杀虫剂抗性的监测工作中，生物测定的方法往往受到许多因子的影响，误差较大，数据可比性差。现代分子遗传标记技术和基因鉴定技术，为抗性机理和抗性监测技术的研究提供了先进手段。与常规的生测相比，以 DNA 分子标记为基础的分子监测的准确度更高，误差更小，可直接监测基因频率，为抗性的群体遗传学研究提供有力的监测手段，并为抗性的预防和治理提供有力的证据（唐振华等，1996）。目前利用分子生物学和酶学技术对抗性监测的报道较少，Heckel 等用基因连锁图谱方法，推测烟芽夜蛾 *BtR-4* 位点与抗性有关，可通过对相关位点的检测来监测昆虫可能发展的抗性（Knight *et al.*，1995）。DNA 分子标记（遗传连锁标记）不仅能够监测显性的基因变异，而且能够监测隐性基因变异。因此，它可以更好地监测抗性逐步发展的过程，适合于抗性早期鉴定，不必等到遗传变异积累到对表型性状有显著影响的时候（Fox，1996；Gill *et al.*，1995）。利用 DNA 分子监测的数据，有助于在害虫田间抗性表现出来以前，尽早制定抗性预防及治理措施，延长对人类及环境无害的 *Bt* 制剂及转 *Bt* 基因作物的应用。

在抗性的预测方面，Tabashnik（1994）提出了一个评估抗性风险的数学模型： $h^2 = R/S$ ，其中 h^2 为现实遗传力（realized heritability）， R 为对选择的反应， S 为选择差异。如果抗性是由一个或多个位点控制，因为 S 与多因子加性遗传变异（additive genetic variance）成比例，对 h^2 的估计可提供一个种群抗性发展能力的线索。

鉴于目前在大多数实例中都不能及时得到用作常规决策所需的数据，应继续开展对 *Bt* 抗性机制的生化及分子遗传方面的研究。在实验室和田间条件下，对 *Bt* 抗性基因的分子遗传标记的鉴别，将对抗性等位基因的遗传分析提供主要的手段。随着对 *Bt* 抗性机制的不断阐明，将会出现一些更为快速、精确、灵敏的方法，及时监测到昆虫的抗性而进行治理。

4 抗性的治理策略

由于害虫不可避免的将会对 *Bt* 毒素产生抗性，因此我们必须在深入研究害虫对 *Bt* 抗性的生化及遗传机制的基础上，按照害虫综合治理的原则，结合田间生态环境，建立合理、有效的抗性管理策略，从而延长 *Bt* 制剂及转 *Bt* 基因作物的应用。McGaughey 根据害虫综合治理（IPM）和害虫对 *Bt* 制剂抗性发展的特点，认为对抗性的治理，应遵循以下 4 条原则：①由于害虫的死亡机制有多种，应将杀虫方式多元化；②减少每种主要杀虫机制的选择压力；③通过保留庇护所或迁移方式提供敏感种群；④通过应用诊断工具、监测技术及多种模型来估计、预测害虫对抗性的产生过程（McGaughey and Whalon，1992）。在制定抗性治理策略时，有多种选择（表 1）。根据以上原则制定的抗性治理策略有多种（Tabashnik，1994；McGaughey and Whalon，1992；Fitt，1998；Gould，1998；EPA and USDA of USA，1999），主要集中在基因策略和田间策略两方面。

表 1 植物中培育杀虫基因的策略

Table 1 Tactics available for deploying insecticidal genes in plants

类别 Types	策略 Tactics
基因策略 gene strategies	单基因、多基因（金字塔型或叠加型）、嵌合基因 Single gene, multiple genes (pyrimid or stacked), chimeric genes. 构建组织特异表达基因、诱导表达（受伤、物候学、分泌物）
基因启动子 gene promoter	Constitutive, tissue-specific inducible (wound, phenology, elicitor)
基因表达 gene expression	高剂量、低剂量、混合使用 High dose, low dose, mixture
田间策略 field tactics	单基因的均一性、基因的混合、基因的轮作或顺序使用、镶嵌种植、庇护所（空间的、时间的） Uniform single gene, mixture of genes, gene rotation or sequence, mosaic planting, refuges (spatial, temporal)

4.1 基因策略

基因策略主要针对转基因作物的进行基因工程技术改进，包括在作物中转入多个杀虫基因、构建特异性表达的杀虫基因及提高或降低杀虫基因的表达量。

在同种作物中转入多个杀虫基因，可以是具有不同结合位点的 *Bt* 基因，也可将蛋白酶抑制剂基

因(如丝氨酸蛋白酶抑制剂基因、豇豆胰蛋白酶抑制剂基因、马铃薯蛋白酶抑制剂基因等)与 *Bt* 基因同时转入同一种作物中,以提高杀虫效果,延缓抗性的产生。由于害虫对不同的 *Bt* 杀虫晶体蛋白具有交互抗性,因此应用该策略时必须防止害虫对不同杀虫蛋白的交互抗性,尤其是当转入同一作物的多个基因都为 *Bt* 基因时(Tabashnik, 1994)。

构建组织特异性或特定时间表达杀虫基因作物,使 *Bt* 毒素在作物的某一部分或作物发育的特定时期表达(Williams *et al.*, 1992)。一般来讲,如能种植具有组织、时间专一表达 *Bt* 毒素的植株,调节 *Bt* 毒素在转基因植物上的时空表达特性,尽可能在害虫危害的高峰期表达将能较好地延缓抗性的发展(Williams *et al.*, 1992; Gould 1998)。如 *Bt* 毒素仅在幼棉铃中表达,可以在减少棉花产量损失的同时允许有足够的敏感幼虫正常的生长和繁殖,从而可延缓抗性的发生且增加天敌的数量,维持田间的群落生态结构。但是,组织特异性表达将使 *Bt* 毒素在一些组织中高量表达,另外一些组织中低量表达,害虫可能在不同发育阶段食用不同的组织而被分化选择,从而加速而不是延迟抗性的发生(McGaughey and Whalon, 1992)。

在作物中使毒素的表达维持在一个高水平(如超过 99% 的致死量, LC_{99})称为高剂量法。一些学者认为高剂量策略是防止抗性产生的较好方法(EPA of USA, 1998)。多数研究表明害虫对 *Bt* 的抗性是以隐性方式遗传,因此使用高剂量的 *Bt* 制剂或高剂量表达毒素,能杀死 95% 以上的敏感和抗性/敏感杂合体个体,从而延缓害虫对 *Bt* 毒素产生抗性。从简单的理论意义上来看,含有一两种毒素的高剂量策略很有吸引力;而实际上会有很多因素影响该策略的成功(Fitt *et al.*, 1994)。而且高剂量使用 *Bt* 制剂将会增加种植者的经济投入,在作物中持续的高剂量表达 *Bt* 毒素需要很大的技术投入,同时高剂量的毒素将增大抗性个体的选择压力加速抗性的发展,这些都将阻碍这种策略的推广应用,因此一些学者又提出将高剂量策略和庇护所策略结合起来,即高剂量/庇护所策略(Fitt *et al.*, 1994; EPA of USA, 1998)。低剂量法是要降低毒素的表达以降低选择压,但从商业角度来讲,该策略导致的作物的损失不能被种植者接受,故已被弃用(Tabashnik, 1994)。

4.2 田间策略

针对已推广的 *Bt* 棉,应在田间种植过程中采

取一些措施来延缓棉铃虫等害虫对其产生抗性。主要策略有提供庇护所、与其它作物轮作或套种(Tabashnik, 1994; EPA of USA, 1998)。由于害虫对 *Bt* 毒素的抗性主要是由单一的隐性或部分隐性基因控制,通过设立庇护所,在转基因棉田中间或附近种植普通棉花以提供足够数量的棉铃虫敏感种群,可以起到稀释抗性基因、延缓抗性产生的作用(Tabashnik, 1994; McGaughey *et al.*, 1998; EPA of USA, 1998; McGaughey and Whalon, 1992; Williams *et al.*, 1992; Fitt, 1998; Gould, 1998; EPA and USDA of USA, 1999)。但对于种植者来讲,他们最关心的问题是采用什么样的治理手段能更好地阻止或延迟害虫对 *Bt* 制剂或转 *Bt* 基因植物产生抗性。防止或延迟抗性产生,除设立庇护所提供足够的敏感种群外,同时应加强棉花收获后对转基因棉株种植田的管理,以除掉越冬的蛹,而且可在棉花生长晚季时使用生长调控杀虫剂不要破坏天敌种群数量(Fitt, 1998)。提供庇护所的策略应该实用,经济上能承受,不会破坏普通的田间种植。因此,有效的庇护所应该遵循以下 2 条准则:(1)庇护所内不能喷洒 *Bt* 制剂;(2)能提供足够的敏感种群,以阻止转基因作物上有抗性残存的害虫间的交配。由于转基因作物上的抗性害虫将会很少,因此没有必要建立与种植面积相当的庇护所;模拟研究表明,在转基因作物的种植区内,提供 5% ~ 10% 种植面积的庇护所就足够保证随机交配(Tabashnik, 1994; EPA of USA, 1998)。由于许多轮作的作物及转基因作物周围的作物(如玉米、大豆)也能提供大量的敏感种群,因此,可以考虑只在纯转基因作物种植区设立庇护所(Gould, 1998)。对于 *Bt* 棉,目前在澳大利亚和美国等地普遍采用的是在转基因棉田中设立 4% 种植面积的不使用任何杀虫剂的非 *Bt* 棉区,或在转基因棉田周围种植 20% ~ 30% 转基因棉种植面积的可使用化学杀虫剂的非 *Bt* 棉(EPA and USDA of USA, 1999)。此外, Fitt (1998) 还提供了其它 3 个策略,但由于各自的风险性而难以推广。如将 *Bt* 棉的种子与传统棉花的种子混和撒播有可能增强抗性的选择;将 *Bt* 棉与传统棉花套种虽能减少害虫的在不同作物间的迁移,但给实际的播种带来难度而不易被种植者接受;在 *Bt* 棉附近种植同样面积的传统棉花能提供足够的敏感种群,在经济上却不易被接受。

也有学者认为由于害虫对 *Bt* 毒素的抗性主要是因 *Bt* 毒素与中肠细胞膜上的特异结合位点的改

变造成的, 且由单一的隐性或部分隐性基因控制, 因此抗性治理的最佳策略应更多的从昆虫与植物间的相互关系入手 (Ferre *et al.*, 1995)。

在多种抗性治理策略中, 庇护所策略已得到政府和大多数学者重视 (Tabashnik, 1994; EPA of USA, 1998; Tabashnik, 1997; EPA of USA, 1998; Gould, 1998; EPA and USDA of USA, 1999)。用小菜蛾进行实验室、田间及计算机模拟结果显示, 庇护所能很好的延迟抗性的发展, 目前美国和澳大利亚在 *Bt* 棉种植中要求必须设立庇护所 (EPA of USA, 1998; EPA and USDA of USA, 1999)。“高剂量-庇护所”等其它大多数策略虽被认为能延迟或阻止抗性发展, 但目前还在田间试验阶段 (EPA of USA, 1998; Gould, 1998), Fox (1996) 认为由于棉铃虫对 *Bt* 毒素有较低的敏感性, 对棉铃虫采取“高剂量-庇护所”的方法是不合适的, 应增大庇护所的面积来延迟抗性的产生。

目前我国部分地区如山东阳谷、河北邯郸、河南新乡、安徽萧县, 江苏丰县已监测到了棉铃虫种群中尚未发现对 *Bt* 制剂的早期抗性。虽尚未见报道棉铃虫对 *Bt* 棉产生抗性, 但 *Bt* 棉对第三、四代棉铃虫的抗虫效果明显降低, 仍需进行必要的药物防治 (Zhang *et al.*, 2000)。在长江、黄河流域棉区存在棉铃虫的许多不同寄主作物, 可以构成自然的庇护所, 其面积相当大, 一般无需种植常规棉花品种作为庇护所, 但这还需要进一步分析不同寄主上棉铃虫的遗传结构才能定论。需要指出的是, 由于害虫有可能产生对 *Bt* 及其毒蛋白的抗性, 如果棉铃虫取食 *Bt* 毒素后成虫繁殖行为发生变化, 即抗性敏感个体间不能正常交配, 庇护所中的敏感个体并不能与来自 *Bt* 棉的携带抗性基因的个体进行随机交配, 抗性基因不能被稀释, 庇护所策略就不能延缓或阻止害虫对 *Bt* 毒素或 *Bt* 棉产生抗性。

在 *Bt* 棉迅速推广的情况下, 政府、企业及研究单位应对棉铃虫的抗性给予足够的重视, 及时提出抗性检测方法和抗性预防措施, 以保障转 (*Bt*) 基因技术在害虫治理中的可持续利用。同时应加强相关研究, 掌握不同选择压力下抗性发生机理和扩散速度; 建立可靠便利的抗性检测技术体系; 借鉴国外研究工作, 结合我国棉区生态特性, 研究适合我国国情的抗性预防和治理策略。而且在推广 *Bt* 棉的过程中, 应加强科普宣传, 为农民提供科学种植和害虫管理 (包括抗性预防、治理方法) 的技术指导。

参 考 文 献 (References)

- Chen X F, 1997. Ecological risk assessment of transgenic crops. In: Chen X F, Dai X F and Hu T eds. Ecological research and sustainable development. Beijing: China Environmental Science Press. 163 ~ 172. [陈晓峰, 1997. 转基因作物的生态环境问题. 见: 陈晓峰, 戴小枫, 胡涛 主编. 生态环境研究与可持续发展. 北京: 中国环境科学出版社. 163 ~ 172]
- Environmental Protection Agency. The environmental protection agency white paper on *Bt* plant-pesticide resistance management. Washington: EPA Publication 739-S-98-001, 1998.
- Ferre J, Escribano B, Bel Y *et al.*, 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiol. Letters*, 132: 1 ~ 7.
- Fitt G P, 1997. Risks, development and integration of insect resistant crops expressing genes from *Bacillus thuringiensis*. In: McLean G D, Waterhouse P M, Evans G, Gibbs M J eds. Commencement of transgenic crops: risk, benefit and trade considerations. Bureau of Resource Science, Australia, 273 ~ 284.
- Fitt G P, 1998. Getting the bugs out of cotton. *Austral. Sci.*, 9: 33 ~ 35.
- Fitt G P, Mares C L, Liewellyn D J, 1994. Field evolution and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. *Biocontrol Sci. Tech.*, 4: 535 ~ 548.
- Fox J L, 1996. *Bt* cotton infestations renew resistance concerns. *Nat. Biotech.*, 14: 1 070.
- Gill S S, Cowles E A, Francis V, 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryAc toxin-binding protein from the midgut of the Lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Bio. Chem.*, 270 (45): 27 277 ~ 27 282.
- Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 701 ~ 726.
- Heckel G D, 1994. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol Sci. Tech.*, 4: 405 ~ 417.
- Heckel D G, Gahan L C, Gould F *et al.*, 1997. Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* CryAc endotoxin in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 90 (1): 75 ~ 86.
- Heckel D G, Ganhan L J, Gauld F *et al.*, 1997. Genetics of *Heliothis* and *Helicoverpa* resistance to chemical insecticides and to *Bacillus thuringiensis*. *Pestic. Sci.*, 51: 251 ~ 258.
- Knight P J K, Knowles B H, Ellar D J, 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Bio. Chem.*, 270 (30): 17 765 ~ 17 770.
- Lee M K, Rajamohan F, Gould F *et al.*, 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryAc δ -endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (11): 3 836 ~ 3 842.
- Masson L, Mazza A, Brousseau B *et al.*, 1995. Kinetic of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Bio. Chem.*, 270 (20): 11 887 ~ 11 896.

- McGaughey W H, Gould F, Gelemter W, 1998. *Bt* resistance management, a plan for reconciling the needs of the many stakeholders in *Bt*-based products. *Nat. Biotech.*, 16: 144 ~ 146.
- McGaughey W H, Whalon M E, 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1 451 ~ 1 455.
- Paoletti M G, Pimentel D, 1996. Genetic engineering in agriculture and the environment, assessing risks and benefits. *Bioscience*, 46: 665 ~ 673.
- Shen J L, Zhou W J, Wu Y D *et al.*, 1998. Early resistance of *Helicoverpa armigera* 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, 吴益东等, 1998. 棉铃虫对 *Bt* 生物农药早期抗性及其与 *Bt* 棉抗虫性的关系. 昆虫学报, 41 (1): 8 ~ 14]
- Tabashnik B E, 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.*, 39: 47 ~ 79.
- Tabashnik B E, 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc. Natl. Sci. USA*, 94: 3 488 ~ 3 490.
- Tang Z H, Zhou X, Zhang G M, 1996. δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* and pest-insect resistance. In: Leng X F, Tang Z H, Wang Y C eds. *Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance*. Beijing: Chinese Agriculture Publication. 104 ~ 117. [唐振华, 周新, 张光美, 1996. 苏云金杆菌 δ -内毒素及害虫抗药性. 见: 冷欣夫, 唐振华, 王萌长 主编. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京: 中国农业出版社. 104 ~ 117]
- U. S. Environmental Protection Agency (EPA) and U. S. Department of Agriculture (USDA). EPA and USDA position paper on insect resistance management in *Bt* crops. Minor revision. Washington: EPA Publication. 1999.
- Williams S, Friedrich L, Dincher S *et al.*, 1992. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* toxins expression in transgenic plants. *Bio/Technology*, 10: 540 ~ 543.
- Zhang H Z, Wang M D, Dai H P *et al.*, 2000. The fluctuation and damage character of *Helicoverpa armigera* in the field of transgenic *Bt* cotton. *Entomol. Knowl.*, 37 (3): 146 ~ 148. [张惠珍, 王马的, 戴慧平等, 2000. 转基因抗虫棉田棉铃虫消长规律及危害特点. 昆虫知识, 37 (3): 146 ~ 148]
- Zhang T Z, Tang C M, 2000. The application of transgenic cotton and the management of resistance of cotton bollworm. *Chin. Sci. Bull.*, 45 (2): 119 ~ 127. [张天真, 唐灿明, 2000. 转基因抗虫棉品种的推广利用与棉铃虫抗性的治理. 科学通报, 45 (2): 119 ~ 127]