

杀虫蛋白 Vip3Aa11 对亚洲玉米螟及其寄生性天敌 腰带长体茧蜂的影响

郝杰^{1,2}, 王振营², 王勤英¹, 白树雄², 张天涛², 南宫自艳^{1,*}, 何康来^{2,*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071000;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】本文的研究目的是明确杀虫蛋白 Vip3Aa11 对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 及其寄生性天敌腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 的影响。【方法】首先利用生物测定的方法用含 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白的人工饲料饲喂亚洲玉米螟初孵幼虫, 7 d 后观察记录亚洲玉米螟的死亡情况和体重。然后用含 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白的人工饲料饲喂被腰带长体茧蜂寄生的亚洲玉米螟初孵幼虫, 以含 6 $\mu\text{g/g}$ 印楝素的人工饲料作为阳性对照, 10 d 后记录亚洲玉米螟幼虫的死亡和被寄生情况, 并在茧蜂化蛹结茧及羽化后分别记录茧重以及单个寄主的出蜂量, 以此评价 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的间接影响。再者, 用含 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白的 20% 蜂蜜水饲喂腰带长体茧蜂成虫, 以含 100 $\mu\text{g/g}$ 印楝素的 20% 蜂蜜水作为阳性对照, 观察记录腰带长体茧蜂成虫的死亡情况; 不同处理的腰带长体茧蜂寄生亚洲玉米螟 10 d 后记录亚洲玉米螟的死亡和被寄生情况, 并在子代茧蜂化蛹结茧及羽化后记录茧重及单个寄主的出蜂量, 以此评价 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的直接影响。【结果】生物测定结果显示, 100 $\mu\text{g/g}$ 的 Vip3Aa11 蛋白处理 7 d 后亚洲玉米螟幼虫的平均死亡率为 50.7%, 平均体重抑制率为 77.1%。间接影响试验结果显示, 被腰带长体茧蜂寄生后的亚洲玉米螟幼虫取食含有 Vip3Aa11 蛋白的人工饲料后死亡率明显升高, 腰带长体茧蜂茧重和单头出蜂量大幅度下降, 而寄生率及羽化后的成虫寿命没有受到不利影响。直接影响试验结果显示, 腰带长体茧蜂取食含有 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白的蜂蜜水对腰带长体茧蜂成虫寿命和寄生率、亚洲玉米螟幼虫死亡率以及腰带长体茧蜂子代的茧重、单头出蜂量和成虫寿命均没有产生不利影响。【结论】本研究利用生测体系从直接和间接两方面评价了 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的影响, 结果表明腰带长体茧蜂对高于 Bt 作物中表达的 Vip3Aa11 蛋白浓度不敏感, Vip3Aa11 蛋白不会对腰带长体茧蜂产生直接的不利影响; 造成的间接影响可能主要是由于寄主自身质量的下降而引起。

关键词: 腰带长体茧蜂; 亚洲玉米螟; 杀虫蛋白; Vip3Aa11; 生物测定; 寄生

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2017)07-0817-08

Effects of Vip3Aa11 protein on *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and its parasitoid *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae)

HAO Jie^{1,2}, WANG Zhen-Ying², WANG Qin-Ying¹, BAI Shu-Xiong², ZHANG Tian-Tao², NANGONG Zi-Yan^{1,*}, HE Kang-Lai^{2,*} (1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】The aim of this study is to clarify the effects of Vip3Aa11 toxin on the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, and its parasitoid *Macrocentrus cingulum*. 【Methods】The indirect effects of

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08003)

作者简介: 郝杰, 女, 1991 年 12 月生, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: haojcaro@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: ngzyheb@163.com; kanglai.he@263.net

收稿日期 Received: 2017-03-06; 接受日期 Accepted: 2017-05-27

Vip3Aa11 protein on *M. cingulum* were assessed by the bioassay with the artificial diet containing 6 $\mu\text{g/g}$ azadirachtin used as the positive control. The mortality and parasitism of *O. furnacalis* larvae parasitized by *M. cingulum* were recorded at 10 d after feeding with a diet containing 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 protein, and the cocoon weight of *M. cingulum* and the emergence number per *O. furnacalis* larva after pupation and emergence of *M. cingulum* were investigated. The direct effects of Vip3Aa11 protein on *M. cingulum* were assessed by the bioassay with 20% honey solution containing 100 $\mu\text{g/g}$ azadirachtin used as the positive control. The mortality of *M. cingulum* adults daily after feeding with 20% honey solution containing 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 protein, and the mortality and parasitism rate of *O. furnacalis* larvae at 10 d after being parasitized by *M. cingulum* adults from different treatments were recorded. The cocoon weight of *M. cingulum* and emergence number per *O. furnacalis* larva of next generation of *M. cingulum* were recorded after pupation and emergence. 【Results】The bioassay results showed that the average mortality and average inhibition rate of body weight of *O. furnacalis* larvae were 50.7% and 77.1%, respectively, at 7 d after exposure to 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 protein. In the bioassay of indirect effects, the mortality of *O. furnacalis* larvae significantly increased when they were fed with the artificial diet containing Vip3Aa11 protein after parasitized by *M. cingulum*, and the cocoon weight and the number of *M. cingulum* progenies produced per host decreased; however, the toxin had no effect on the parasitism rate and longevity of *M. cingulum* adults. In the bioassay of direct effects, the longevity and parasitism rate of *M. cingulum* adults, the mortality of *O. furnacalis* larvae, and the cocoon weight, the number of progenies produced per host and the adult longevity of next generation of *M. cingulum* were not affected when *M. cingulum* adults were fed with 20% honey solution containing 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 protein. 【Conclusion】This study assessed the potential effects of Vip3Aa11 toxin on *M. cingulum* from the indirect and direct aspects through bioassay system. The results demonstrate that *M. cingulum* is insensitive to Vip3Aa11 protein at the concentrations exceeding those encountered in Bt crop fields. Vip3Aa11 protein has no direct adverse effects on *M. cingulum*, and the indirect detrimental effects detected in the bioassay may be due to poor host quality.

Key words: *Macrocentrus cingulum*; *Ostrinia furnacalis*; insecticidal protein; Vip3Aa11; bioassay; parasitism

营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs)是在苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 在对数生长中期开始分泌,直到稳定前期达到最高峰的一种分泌性杀虫蛋白(Estruch *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 1998)。营养期杀虫蛋白极大地丰富了 Bt 杀虫毒素的种类,并且已成为 Bt 研究领域的热点。其中,Vip3A 蛋白对多种农林害虫特别是鳞翅目害虫具有广泛的杀虫活性。将 *vip* 基因转入玉米获得的转基因玉米对小地老虎 *Agrotis ypsilon*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和秋粘虫 *Spodoptera frugiperda* 等害虫具有高抗性(Estruch *et al.*, 2002);沈志诚(2006)使用农杆菌介导技术,将 *vip3* 基因和 *cry* 基因进行融合并转化,得到对二化螟和稻纵卷叶螟有抗性的转基因水稻。*vip* 基因与 *cry* 基因通过融合基因或杂交基因共同表达是培育转基因抗虫作物中的常见策略,*vip* 基因已被广泛应用于作物抗虫育种、延缓害虫产生抗性和减少作物产量损失等方面。

腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 是一种多胚胎发育的幼虫内寄生蜂,其卵、胚胎和幼虫在其寄主亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫血腔内发育,其自然寄生率可达 30% 左右,是亚洲玉米螟的优势天敌(刘德钧, 1985; 冯建国等, 1987; Ahmed *et al.*, 2016)。腰带长体茧蜂可在亚洲玉米螟幼虫的各个龄期进行寄生,以 3 龄幼虫的寄生为最佳(白树雄, 2011)。腰带长体茧蜂成虫发生期与玉米的抽丝散粉期相吻合,主要靠吸取玉米花粉在水中渗透或扩散出的养分获得营养,且花粉液能显著延长腰带长体茧蜂的成虫寿命(吕仲贤等, 1995)。已有研究证实,利用转 *cry1F* 基因抗虫玉米花粉作为补充食物饲喂腰带长体茧蜂,对腰带长体茧蜂的存活和繁殖没有显著影响(白树雄等, 2011)。

在转基因作物商业化发展的 20 年间,全球转基因作物累计种植面积达到 20 亿 hm^2 ,农民收益超过 1 500 亿美元,转基因作物的广泛种植为人类带来巨大的农业、环境、经济、健康和社会效益(James,

2016)。而转基因抗虫作物在创造了非凡价值和一定环境效益的同时,其对非靶标生物特别是害虫天敌、传粉者、经济昆虫、土壤生物等存在的潜在影响已成为生物学家和环境风险评价者关注的焦点之一(Romeis *et al.*, 2006, 2008)。转基因抗虫作物主要通过两条途径对天敌昆虫产生影响:其一为天敌昆虫直接取食转基因抗虫植物组织(如花粉、组织汁液等)或转基因抗虫植物上寄主体内的杀虫蛋白所造成的直接毒性;其二为转基因抗虫作物对寄主的影响,或者寄主挥发性物质发生变化间接影响到天敌昆虫的寄主搜索、寄主识别、寄主接受行为以及生长发育等。因此,本试验参考转基因杀虫蛋白对腰带长体茧蜂直接影响和间接影响的评价体系(王增霞, 2016),针对 Vip3Aa11 蛋白是否直接或间接影响亚洲玉米螟寄生性天敌——腰带长体茧蜂的寄生率、寿命、繁殖力等进行研究,以期明确杀虫蛋白 Vip3Aa11 对腰带长体茧蜂的潜在影响,为转基因作物环境风险评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟幼虫采用周大荣等的标准养虫技术和无琼脂半人工饲料(周大荣等, 1980; 宋彦英等, 1999)进行饲养,在温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的室内连续饲养多代,属于未接触过任何 Bt 制剂或杀虫蛋白的敏感品系。

腰带长体茧蜂采自河北廊坊试验基地被寄生的亚洲玉米螟幼虫,在室内利用亚洲玉米螟 3 龄幼虫作为寄主繁殖,寄生后培养于温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的人工气候培养箱中。腰带长体茧蜂成虫在温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的养蜂笼中繁殖,饲喂 20% 蜂蜜水(Wang *et al.*, 2016)。

1.2 供试试剂

Vip3Aa11 纯蛋白购自北京绽诺思特生物科技有限公司,试验前用无菌水进行溶解和稀释;0.3% 印楝素乳油购自北京科威拜沃生物技术有限公司。

1.3 生测饲料

生测饲料干粉的配制参考周大荣等标准养虫技术和无琼脂半人工饲料(周大荣等, 1980; 宋彦英等, 1999)。将配方中无菌水以外的所有成分充分混合均匀后,打磨为生测饲料干粉。试验中将

生测饲料干粉和溶液按 1:1 的比例充分混合后使用。

1.4 Vip3Aa11 蛋白对亚洲玉米螟的影响

Vip3Aa11 对亚洲玉米螟的毒力测定采用饲料混合法:将 5 mL 用无菌水稀释的 Vip3Aa11 蛋白稀释液与 5 g 亚洲玉米螟的生测饲料干粉充分混合,配制成浓度为 $100 \mu\text{g/g}$ 的 Vip3Aa11 蛋白生测饲料(该浓度为受试生物暴露于田间环境中实际接触的杀虫蛋白 10 倍以上的浓度),以纯水混合的生测饲料作为空白对照。饲料混合均匀后分入 48 孔生测板中,用毛笔将亚洲玉米螟初孵幼虫(孵化时间为 2 ~ 12 h)轻轻挑入生测板中,每孔接 1 头,用封口膜覆盖,防止幼虫逃逸。每个处理 48 头幼虫,试验重复 3 次。将接虫的 48 孔生测板培养于温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的光照培养箱中,7 d 后检查并记录幼虫存活数和存活幼虫体重,计算死亡率[死亡率(%) = 死亡虫数/接虫数 $\times 100$]和体重抑制率[体重抑制率(%) = (对照组平均体重 - 处理组平均体重)/对照组平均体重 $\times 100$]。

1.5 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的间接影响

将 20 对新羽化(48 h 以内)的腰带长体茧蜂成蜂放入养蜂笼(30 cm $\times$ 25 cm $\times$ 30 cm)内进行交配,并饲喂 20% 蜂蜜水。交配 24 h 后向每个养蜂笼内分别以新鲜玉米穗轴为载体引入 48 头亚洲玉米螟 3 龄幼虫供腰带长体茧蜂寄生。将 10 mL 纯水、无菌水稀释的 Vip3Aa11 蛋白溶液和无菌水稀释的印楝素分别与 10 g 生测饲料干粉充分混合,配制出空白对照生测饲料、浓度为 $100 \mu\text{g/g}$ 的 Vip3Aa11 蛋白生测饲料(该浓度为受试生物暴露于田间环境中实际接触的杀虫蛋白 10 倍以上的浓度)和含 $6 \mu\text{g/g}$ 的印楝素生测饲料(阳性对照,该浓度印楝素对亚洲玉米螟幼虫属于亚致死浓度),分别分装到 24 孔养虫板中,然后将养蜂笼内寄生 24 h 后的亚洲玉米螟取出,分别放入养虫板中,每孔 1 头,用封口膜封盖防止幼虫逃逸。将养虫板放置于 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的人工气候培养箱中饲养,每个处理 50 头亚洲玉米螟幼虫,试验重复 3 次,10 d 后记录亚洲玉米螟幼虫的死亡、化蛹及被腰带长体茧蜂寄生情况,计算死亡率和寄生率{寄生率(%) = [被寄生的亚洲玉米螟幼虫个数/(接种的亚洲玉米螟幼虫个数 - 亚洲玉米螟幼虫死亡数)] $\times 100$ }。为保证腰带长体茧蜂老熟幼虫顺利从寄主体内爬出并化蛹结茧,将确认被寄生后的

亚洲玉米螟幼虫单头放于 5 mL 离心管中 (Wang *et al.*, 2016) 进行培养,待腰带长体茧蜂老熟幼虫从亚洲玉米螟体内爬出并化蛹结茧后,对每个茧块进行称重并记录。当腰带长体茧蜂成虫羽化后,记录单个寄主的出蜂量。

1.6 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的直接影响

将 20 对新羽化(48 h 以内)的腰带长体茧蜂成蜂放入养蜂笼(30 cm × 25 cm × 30 cm)内进行交配,并分别饲喂 20% 蜂蜜水、含 100 μg/g Vip3Aa11 蛋白的 20% 蜂蜜水和含 100 μg/g 印楝素(阳性对照,该浓度印楝素对腰带长体茧蜂属于亚致死浓度)的 20% 蜂蜜水,每两天更换 1 次。每天定时对腰带长体茧蜂成蜂的死亡情况进行观察记录。

交配 24 h 后向每个养蜂笼内分别以新鲜玉米穗轴为载体引入亚洲玉米螟 3 龄幼虫供腰带长体茧蜂寄生。将养蜂笼内寄生 24 h 后的亚洲玉米螟取出,分别放入纯水配置的生测饲料的养虫板中,每孔 1 头,用封口膜封盖防治幼虫逃逸。将养虫板放置于 27 ± 1℃、相对湿度 70% ~ 80%、光周期为 16L:8D 的人工气候培养箱中饲养,每个处理 48 头亚洲玉米螟 3 龄幼虫,试验重复 3 次,10 d 后记录亚洲玉米螟死亡、化蛹及被腰带长体茧蜂寄生情况,计算死亡率和寄生率 { 寄生率 (%) = [被寄生的亚洲

玉米螟幼虫个数 / (接种的亚洲玉米螟幼虫个数 - 亚洲玉米螟幼虫死亡数)] × 100 }。为保证腰带长体茧蜂子代顺利从寄主体内爬出并化蛹结茧,将确认被寄生后的亚洲玉米螟幼虫单头放于 5 mL 离心管中 (Wang *et al.*, 2016) 进行培养,待子代腰带长体茧蜂老熟幼虫从亚洲玉米螟体内爬出并化蛹结茧后,对每个茧块进行称重并记录。当子代腰带长体茧蜂羽化后,记录单个寄主的出蜂量。

1.7 数据分析

试验结果采用单因子方差分析 (one-way ANOVA) 分析,平均值间差异用最小平方检验 (LSD), *P* < 0.05。所有统计分析计算用 SAS 软件实现。

2 结果与分析

2.1 Vip3Aa11 蛋白对亚洲玉米螟的影响

通过生物测定的方法,测定了 100 μg/g Vip3Aa11 蛋白对亚洲玉米螟初孵幼虫死亡率和体重抑制率的影响。生测结果显示,含 100 μg/g Vip3Aa11 蛋白的人工饲料饲喂 7 d 后,亚洲玉米螟初孵幼虫的平均死亡率为 50.7%,平均体重抑制率为 77.1% (表 1)。

表 1 Vip3Aa11 蛋白对亚洲玉米螟初孵幼虫的影响

Table 1 Effect of Vip3Aa11 protein on the neonate larvae of *Ostrinia furnacalis*

Vip3Aa11 浓度 (μg/g) Concentration of Vip3Aa11	死亡率 (%) Mortality	体重抑制率 (%) Inhibition rate of body weight
0	0.70 ± 0.70	—
100	50.70 ± 1.84	77.10 ± 1.57

将含 100 μg/g Vip3Aa11 的人工饲料饲喂亚洲玉米螟初孵幼虫,7 d 后调查死亡率和体重抑制率。表中数据为平均值 ± 标准误。The neonate larvae of *O. furnacalis* were fed with artificial diet containing 100 μg/g Vip3Aa11, and the mortality and the inhibition rate of body weight were investigated at 7 d after feeding. Data in the table are mean ± SE.

2.2 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的间接影响

Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂寄生亚洲玉米螟的间接影响所得结果见表 2,可知其寄生率及羽化后的成虫寿命没有受到显著影响,而亚洲玉米螟幼虫被腰带长体茧蜂寄生后取食含有 Vip3Aa11 蛋白的人工饲料,会导致其死亡率明显升高,腰带长体茧蜂的平均茧块重量和单头亚洲玉米螟的出蜂量也大幅度下降。印楝素处理的阳性对照组亚洲玉米螟死亡率显著高于其他处理组,腰带长体茧蜂的平均茧块重量显著低于纯水对照组,而与 Vip3Aa11 蛋白处理组无显著差异;阳性对照组单头亚洲玉米螟的出蜂量显著低

于纯水对照组和 Vip3Aa11 蛋白处理组。

2.3 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的直接影响

腰带长体茧蜂取食蜂蜜水、含 Vip3Aa11 蛋白和含印楝素的蜂蜜水后对其成虫寿命、寄生及其子代的影响见表 3,腰带长体茧蜂成蜂直接取食含有 100 μg/g 印楝素的蜂蜜水后,其寿命显著低于取食蜂蜜水的对照组和 Vip3Aa11 蛋白处理组。腰带长体茧蜂取食含有 Vip3Aa11 蛋白的蜂蜜水对自身的成虫寿命和寄生玉米螟寄生率以及亚洲玉米螟幼虫死亡率没有产生影响,同样也没有对腰带长体茧蜂子代的茧块重量、单头出蜂量和成虫寿命产生影响。

表 2 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂寄生亚洲玉米螟幼虫的间接影响

处理*	亚洲玉米螟 死亡率(%)	寄生率(%)	腰带长体茧蜂 平均茧块重量(mg)	单头亚洲玉米 螟的出蜂量	腰带长体茧蜂 成蜂寿命(d)
Treatments*	Mortality of <i>O. furnacalis</i>	Parasitism rate	Average cocoon weight of <i>M. cingulum</i>	Emergence number per <i>O. furnacalis</i> larva	Adult longevity of <i>M. cingulum</i>
纯水(CK)	9.0 ± 1.4 c	77.9 ± 2.0 a	108.7 ± 3.2 a	26.3 ± 1.3 a	8.5 ± 0.4 a
Pure water					
100 μg/g Vip3Aa11 蛋白	38.9 ± 1.9 b	81.8 ± 0.7 a	57.5 ± 3.4 b	15.6 ± 0.4 b	8.2 ± 0.3 a
100 μg/g Vip3Aa11 protein					
6 μg/g 印楝素(阳性对照)	49.3 ± 1.4 a	76.8 ± 4.7 a	57.7 ± 1.2 b	7.9 ± 0.4 c	8.3 ± 0.4 a
6 μg/g Azadirachtin (positive control)					
<i>F</i>	180.61	0.81	5.45	128.15	0.16
<i>df</i>	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6
<i>P</i>	<0.0001	0.4896	<0.0001	<0.0001	0.8524

* 分别用含 10 mL 纯水、100 μg/g Vip3Aa11 和 6 μg/g 印楝素的人工饲料饲喂亚洲玉米螟幼虫。处理 10 d 后计算亚洲玉米螟幼虫死亡率和寄生率,24 d 后计算腰带长体茧蜂平均茧块重量,当腰带长体茧蜂羽化后,记录单头亚洲玉米螟的出蜂量。表中数据为平均值 ± 标准误; 同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ($P < 0.05$, LSD 检验)。* *O. furnacalis* larvae were fed with the artificial diet containing 10 mL pure water, 100 μg/g Vip3Aa11 and 6 μg/g azadirachtin, respectively. The mortality and parasitism rate of *O. furnacalis* larvae were recorded at 10 d after feeding, the average cocoon weight of *M. cingulum* was recorded at 24 d, and the emergence number per *O. furnacalis* larva was recorded after emergence of *M. cingulum*. Data in the table are mean ± SE, and those followed by different small letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, LSD test).

表 3 Vip3Aa11 杀虫蛋对腰带长体茧蜂及其寄生亚洲玉米螟幼虫的影响

处理*	腰带长体茧蜂 成蜂寿命(d)	亚洲玉米螟 幼虫死亡率(%)	寄生率(%)	子代茧块重(mg)	子代单头出蜂量(头)	子代成蜂寿命(d)
Treatments*	Adult longevity of <i>M. cingulum</i>	Mortality of <i>O.</i> <i>furnacalis</i> larvae	Parasitism rate	Cocoon weight of next generation of <i>M. cingulum</i>	Emergence number per <i>O. furnacalis</i> larva of next generation of <i>M. cingulum</i>	Adult longevity of next generation of <i>M. cingulum</i>
20% 蜂蜜水(CK)	8.2 ± 0.3 a	7.0 ± 1.8 a	80.5 ± 2.4 a	106.9 ± 6.2 a	28.67 ± 1.5 a	7.9 ± 0.2 a
20% Honey solution						
100 μg/g Vip3Aa11 蛋白	8.5 ± 0.1 a	7.7 ± 2.5 a	82.0 ± 1.0 a	102.9 ± 4.7 a	27.4 ± 3.7 a	7.6 ± 0.3 a
100 μg/g Vip3Aa11 protein						
100 μg/g 印楝素 (阳性对照)	6.8 ± 0.2 b	5.6 ± 1.4 a	80.1 ± 2.4 a	100.1 ± 5.9 a	27.5 ± 2.6 a	8.1 ± 0.2 a
100 μg/g Azadirachtin (positive control)						
<i>F</i>	17.01	0.30	0.23	0.36	0.07	1.26
<i>df</i>	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
<i>P</i>	0.0034	0.7505	0.7983	0.7117	0.9365	0.3503

* 分别用 20% 蜂蜜水、含 100 μg/g Vip3Aa11 的 20% 蜂蜜水和 100 μg/g 印楝素的 20% 蜂蜜水饲喂腰带长体茧蜂。每天统计腰带长体茧蜂成蜂寿命,亚洲玉米螟被寄生 10 d 后计算亚洲玉米螟幼虫死亡率和寄生率,24 d 后计算子代腰带长体茧蜂平均茧块重量,当腰带长体茧蜂羽化后记录单头亚洲玉米螟的出蜂量。表中数据为平均值 ± 标准误; 同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异达到显著水平 ($P < 0.05$, LSD 检验)。* *M. cingulum* adults were fed with 20% honey solution, 20% honey solution containing 100 μg/g Vip3Aa11 and 20% honey solution containing 100 azadirachtin, respectively. The adult longevity of *M. cingulum* was recorded everyday, the mortality and parasitism rate of *O. furnacalis* larvae were recorded at 10 d after parasitized by this parasitoid, the average cocoon weight of *M. cingulum* progenies was recorded at 24 d, and the emergence number per *O. furnacalis* larva was recorded after emergence of *M. cingulum*. Data in the table are mean ± SE, and those followed by different small letters within a column are significantly different ($P < 0.05$, LSD test).

3 讨论

转基因抗虫作物对天敌昆虫以及其他非靶标生

物的潜在影响不仅是转基因作物环境风险评价的重要内容,也是影响制定害虫综合治理策略的重要因素(Sétamou *et al.*, 2002; O'Callaghan *et al.*, 2005; Romeis *et al.*, 2006)。大量的室内和田间试验被用

于评价转基因作物对非靶标生物的潜在影响 (Priestley and Brownbridge, 2009; Comas *et al.*, 2013)。一般评价转基因作物对非靶标害虫的影响都是从可控条件下的实验室试验开始的, 即 Tier-1 试验 (Romeis *et al.*, 2008)。

生态系统中多种植食性昆虫均可被寄生性天敌寄生。与取食多种植食性昆虫的捕食性天敌有所不同, 寄生性天敌的生长发育一般在一个寄主中完成, 因此会受到植食性昆虫寄主体内 Bt 蛋白的影响 (Ramirezromero *et al.*, 2007; Salama and Zaki, 2010; Desneux *et al.*, 2010)。大量试验结果表明转基因作物及其表达产物不会对非靶标生物造成不利影响 (Naranjo, 2005a, 2005b; Romeis *et al.*, 2006; Hellmich *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010; Alcantara, 2012)。例如, 有研究表明, 用表面喷洒了 Cry1Ac 蛋白溶液的蚜虫饲喂异色瓢虫 *Cycloneda sanguinea*, 其存活率、发育历期、取食蚜虫量和成虫寿命与对照均无显著差异 (Nakasu *et al.*, 2013)。用加入了 Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白的人工饲料和取食转 *cry1C* 基因水稻的蚜虫分别饲喂中华草蛉 *Chrysoperla sinica*, 其生命表参数都没有受到不利影响 (Li *et al.*, 2014a, 2014b)。对 Cry1Ab 蛋白不敏感的二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 取食 Bt 玉米后饲喂草蛉幼虫, 草蛉幼虫的各项生命表参数无显著影响; 而对 Cry1Ab 蛋白敏感的海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 取食 Bt 玉米后饲喂草蛉幼虫, 草蛉的生长发育受到负面影响 (Dutton *et al.*, 2002)。因此, 有研究学者认为杀虫蛋白对天敌造成的影响主要是由于猎物或者寄主自身质量的下降而造成的, 即“猎物质量介导效应” (Naranjo, 2005a; Lövei *et al.*, 2009; Shelton *et al.*, 2012)。

评价 Bt 蛋白对寄生蜂的影响不仅要通过寄主昆虫取食 Bt 蛋白测定 Bt 蛋白对寄生蜂的间接影响, 也要通过直接用 Bt 蛋白饲喂寄生蜂测定 Bt 蛋白对寄生蜂的直接影响 (Ramirezromero *et al.*, 2007; Salama and Zaki, 2010; Desneux *et al.*, 2010)。本试验以受试生物暴露于田间环境中实际接触的杀虫蛋白 10 倍以上的浓度来代表最坏的暴露环境, 通过生物测定证实 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白对亚洲玉米螟会产生一定的不利影响; 当用含 100 $\mu\text{g/g}$ Vip3Aa11 蛋白的人工饲料饲喂被腰带长体茧蜂寄生的亚洲玉米螟, 由于亚洲玉米螟受到 Vip3A 蛋白产生的不利影响, 从而导致腰带长体茧蜂的死亡率、茧块重量和单头出蜂量受到显著影响。有研究表明转基因作物

的三级营养关系试验都存在“猎物质量介导效应” (Naranjo, 2005a; Romeis *et al.*, 2006), 对此可通过使用对 Bt 蛋白产生抗性或对 Bt 蛋白不敏感的昆虫消除影响 (Wang *et al.*, 2016)。

寄生蜂通常因取食转基因作物蜜露或花粉而间接暴露于转基因作物表达的杀虫蛋白中 (白树雄等, 2011)。本研究通过将 Vip3Aa11 蛋白直接加入 20% 蜂蜜水中饲喂腰带长体茧蜂成虫的方法 (Wang *et al.*, 2016), 进行转基因作物对寄生蜂直接影响的评价。结果显示, 用含 Vip3Aa11 蛋白的蜂蜜水饲喂腰带长体茧蜂成虫不会对其寿命造成不利影响, 并且其子代茧块重量、单头出蜂量及寿命均与对照组无显著差异, 说明 Vip3A 蛋白并不能通过直接取食的途径对腰带长体茧蜂自身及子代造成不利影响。

本试验利用评价 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂潜在影响的生测体系, 从直接和间接两方面评价了 Vip3Aa11 蛋白对腰带长体茧蜂的影响, 证实腰带长体茧蜂对 Vip3Aa11 蛋白不敏感, 不会产生直接的不利影响; 由于 Vip3Aa11 蛋白对寄主亚洲玉米螟产生不利作用, 寄主自身质量的下降而导致毒素蛋白对腰带长体茧蜂产生一定程度的间接不利影响。

参考文献 (References)

- Ahmed T, Zhang TT, Wang ZY, He KL, Bai SX, 2016. Identification and expression pattern analysis of chemosensory receptor genes in the *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae) antennae. *Eur. J. Entomol.*, 113(1): 76–83.
- Alcantara EP, 2012. Postcommercialization monitoring of the long-term impact of Bt corn on non-target arthropod communities in commercial farms and adjacent riparian areas in the Philippines. *Environ. Entomol.*, 41(5): 1268.
- Bai SX, 2011. The Changes of Secondary Substances in Transgenic Insect-resistant Corn and Its Effect on the Larval Parasitoids *Macrocentrus cingulum* of Asian Corn Borer. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [白树雄, 2011. 转基因抗虫玉米次生代谢物质的变化及对亚洲玉米螟寄生性天敌腰带长体茧蜂的影响. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]
- Bai SX, Zhang HG, Ge X, Wang ZY, 2011. Effects of Bt-corn expressing Cry1F on the survival and fecundity of the parasitoid *Macrocentrus cingulum*. *Plant Prot.*, 37(6): 82–85. [白树雄, 张洪刚, 葛星, 王振营, 2011. 转 Cry1F 基因玉米花粉对腰带长体茧蜂存活和繁殖的影响. 植物保护, 37(6): 82–85]
- Carr B, Desai NM, Kostichka K, Koziel MG, Mullins MA, Warren GW, 1998. Pesticidal proteins and strains. United States Patent, US5840868A.
- Comas J, Lumbierres B, Pons X, Albajes R, 2013. Ex-ante

- determination of the capacity of field tests to detect effects of genetically modified corn on nontarget arthropods. *J. Econ. Entomol.*, 106(4): 1659–1668.
- Desneux N, Ramírezromero R, Bokononganta AH, Bernal JS, 2010, Attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* to host (*Spodoptera frugiperda*) frass is affected by transgenic maize. *Ecotoxicology*, 19(7): 1183–1192.
- 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(4): 441–447.
- Estruch JJ, Warren GW, Desai NM, Koziel MG, Nye GJ, 2002. Plant Pest Control. United States Patent, US6429360.
- Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(11): 5389–5394.
- Feng JG, Shi GS, Tao X, Zhang Y, Jiang SY, 1987. Biology of *Macrocentrus linearis* (Nees) and its use against Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Chin. J. Biol. Control*, 3(3): 102–105. [冯建国, 史更申, 陶训, 张勇, 蒋士蓉, 1987. 螟虫长距茧蜂生物学及其利用的研究. 中国生物防治学报, 3(3): 102–105.]
- Hellmich RL, Albajes R, Bergvinson D, Prasifka JR, Wang ZY, Weiss MJ, 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. In: Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG eds. Integration of Insect-resistant Genetically Modified Crops Within IPM Programs. Progress in Biological Control, Vol. 5. Springer, Netherlands. 195–221.
- James C, 2016. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2015. *J. Chin. Biotechnol.*, (4): 1–11. [James C, 2016. 2015 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志, (4): 1–11]
- Jensen PD, Dively GP, Swan CM, Lamp WO, 2010. Exposure and nontarget effects of transgenic Bt corn debris in streams. *Environ. Entomol.*, 39(2): 707–714.
- Li Y, Chen X, Hu L, Romeis J, Peng Y, 2014a. Bt rice producing Cry1C protein does not have direct detrimental effects on the green lacewing *Chrysoperla sinica* (Tjeder). *Environ. Toxicol. Chem.*, 33(6): 1391–1397.
- Li Y, Hu L, Romeis J, Wang Y, Han L, Chen X, Peng YF, 2014b. Use of an artificial diet system to study the toxicity of gut-active insecticidal compounds on larvae of the green lacewing *Chrysoperla sinica*. *Biol. Control*, 69(1): 45–51.
- Liu DJ, 1985. Method for prediction of emergence period of *Macrocentrus linearis* (Hymen.: Braconidae). *Nat. Enemies Insects*, 7(2): 95–99. [刘德钧, 1985. 螟虫长距茧蜂发生期的预测方法. 昆虫天敌, 7(2): 95–99]
- Lövei GL, Andow DA, Arpaia S, 2009. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. *Environ. Entomol.*, 38(2): 293–306.
- Lu ZX, Yang ZF, Hu C, 1995. The effect of corn pollen on the adult longevity of *Macrocentrus linearis*. *J. Biosafety*, 4(2): 61–64. [吕仲贤, 杨樟法, 胡萃, 1995. 玉米花粉对螟长距茧蜂成虫寿命的影响. 生物安全学报, 4(2): 61–64]
- Nakasu EYT, Dias SC, Pires CSS, Andow DA, Paula DP, Togni PHB, Macedo TR, Sujii ER, Desá MFG, Fontes EMG, 2013. Biotrophic toxicity of Cry1Ac to *Cycloneda sanguinea*, a predator in Brazilian cotton. *Entomol. Exp. Appl.*, 148(2): 105–115.
- Naranjo SE, 2005a. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1193–1210.
- Naranjo SE, 2005b. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the function of the natural enemy community. *Environ. Entomol.*, 34(5): 1211–1223.
- O'Callaghan M, Glare TE, Malone L, 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 50(1): 271–292.
- Priestley AL, Brownbridge M, 2009. Field trials to evaluate effects of Bt-transgenic silage corn expressing the Cry1Ab insecticidal toxin on non-target soil arthropods in northern New England, USA. *Transg. Res.*, 18(3): 425–443.
- Ramirezromero R, Bernal JS, Chaufaux J, Kaiser L, 2007. Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. *Crop Prot.*, 26(7): 953–962.
- Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MM, Hartley SE, Hellmich RL, Huesing JE, Jepson PC, Layton R, Quemada H, Raybould A, Rose RI, Schiemann J, Sears MK, Shelton AM, Sweet J, Vaituzis Z, Wolt JD, 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nat. Biotechnol.*, 26(2): 203–208.
- Romeis J, Meissle M, Bigler F, 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotechnol.*, 24(1): 63–71.
- Salama HS, Zaki FN, 2010. Interaction between *Bacillus thuringiensis* Berliner and the parasites and predators of *Spodoptera littoralis* in Egypt. *J. Appl. Entomol.*, 95(1–5): 425–429.
- Sétamou M, Bernal JS, Legaspi JC, Mirkov TE, 2002. Parasitism and location of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) on transgenic and conventional sugarcane. *Environ. Entomol.*, 31(6): 1219–1225.
- Shelton AM, Naranjo SE, Romeis J, Hellmich RL, 2012. Errors in logic and statistics plague a meta-analysis (response to Andow and Lövei 2012). *Environ. Entomol.*, 41(5): 1047–1049.
- Shen ZC, 2006. Insect-resistant Gene, Fusion Protein and Its Application. China Patent, CN1818067A. [沈志成, 2006. 抗虫融合基因、融合蛋白及其应用. 中国专利, CN1818067A]
- Song YY, Zhou DR, He KL, 1999. Studies on mass rearing of Asian corn borer; development of a satisfactory non-agar semi-artificial diet and its use. *Acta Phytophyl. Sin.*, 8(4): 324–328. [宋彦英, 周大荣, 何康来, 1999. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. 植物保护学报, 8(4): 324–328]
- Wang ZX, 2016. Safety Evaluation of Cry1Ac on *Macrocentrus cingulum* and Physiological Regulation and Cry1Ac on *Ostrinia furnacalis*. PhD Dissertation, China Agricultural University, Beijing. [王增

霞, 2016. Cry1Ac 蛋白对腰带长体茧蜂的安全性评价及两者对亚洲玉米螟生理机制的研究. 北京: 中国农业大学博士学位论文]

Wang ZX, Li YH, He KL, Bai SX, Zhang TT, Cai WZ, Wang ZY, 2016. Does Bt maize expressing Cry1Ac protein have adverse effects on the parasitoid *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae)? *Insect. Sci.*, DOI 10.1111/1744-7917.12352.

Zhou DR, Wang YY, Liu BL, Ju ZL, 1980. Studies on the mass rearing of corn borer. I. Development of a satisfactory artificial diet for larval growth. *Acta Phytophyl. Sin.*, 7(2): 113 – 122. [周大荣, 王玉英, 刘宝兰, 剧正理, 1980. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报, 7(2): 113 – 122]

(责任编辑: 赵利辉)