



害虫对转基因 Bt 作物的抗性及其管理对策^{*}

魏 伟^{**} 钱迎倩 马克平

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘 要 至今为止,已经有 26 种植物成功地转入了 Bt 毒蛋白基因,它们将在防治害虫中发挥重要作用. Bt 作物释放的潜在风险是害虫的抗性进化. 害虫对 Bt 毒蛋白产生抗性的机制包括行为躲避、生理生化机制及遗传机制. 抗性位点基因的初始频率和抗性的遗传稳定性等特性影响着抗性管理对策的实施和效用. 抗性管理对策包括 Bt 作物的轮作、转入多个杀虫基因、Bt 毒蛋白高剂量表达、低剂量表达和目标特异表达以及避难所策略等,它们是互为补充的. 其中,“高剂量/避难所”策略受到广泛的重视. 但是,这些策略来自理论数学模型和实验室数据,其有效性尚需要田间实验的检验并得到进一步的完善.

关键词 Bt 作物; Bt 抗性; 抗性机制; 对策

中图法分类号 S433.1 : Q789

PESTS RESISTANCE TO TRANSGENIC BT CROPS AND THEIR MANAGEMENT STRATEGIES^{*}

WEI Wei^{**}, QIAN Yingqian & MA Keping

(Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract Insect pests are a major cause of damage to the world's commercially important agricultural crops. Till now, 26 species of plants have been successfully transferred with insecticidal genes from *Bacillus thuringiensis* (Bt) to control insect pests. One of the potential risks of commercially release of Bt crops is that insect pest may well evolve resistance to Bt pesticidal proteins. The resistance mechanisms include behavioral avoidance, physiological and biochemical mechanisms and their genetic properties. Successful management for Bt resistance depends on the initial frequency of resistance alleles and genetic stability of resistance, as well as other factors. Based on genetic mathematical models and experimental data, several strategies are suggested to delay the insect resistance to Bt toxins. Among them, the 'high dose/refuges' tactic is paid more attention for managing resistance which depends on the assumption that resistance alleles are recessive. These tactics need further assessment in the field.

Keywords Bt crops; resistance to Bt toxins; resistance mechanisms; management strategies of Bt deployment

世界范围内,大约有 67 000 种害虫危害农作物,其中约 9 000 种是昆虫和螨类;如果不使用杀虫剂或其它非化学控制策略,损失将接近作物产量的 70%^[1]. 例如,仅玉米螟给美国玉米带来的损失每年可达 10 亿美元^[2]. 自从施用化学农药防治农业害虫以来,曾经取得了良好的效果. 然而,有 500 多种昆虫和螨类对化学农药产生了抗性^[3]. 并且人们逐步认识到化学农药给环境和人类健康带来的危害. 于是生物防治受到广泛的重

收稿日期: 1998-08-31 接受日期: 1998-09-02

^{*} 九五国家重点科技项目(攻关)计划;专题生物安全研究(97-925-02-04-05)

^{**} 现在通讯地址:中国农业大学农业生物技术国家重点实验室,北京 100094

视,其中来源于苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的生物杀虫剂(Bt)由于其专一性强,对环境无害并且对人、畜安全,已在许多国家和地区推广使用.但是 Bt 杀虫剂也有其局限性:这种杀虫剂的生产比较昂贵;它的应用需要农业机械;每个生长季一般都需要重复喷洒若干次,太阳光可以降低 Bt 杀虫剂有效成份;降水或露水会冲洗掉植株上的杀虫蛋白,从而缩短 Bt 杀虫剂的效用时间^[1].另外,在 70 年代晚期和 80 年代中期,人们发现一系列的 Bt 产品对防治烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)等棉花的害虫效果并不好,经过研究,原因是 Bt 制剂只能喷到作物表面,而这类害虫在花和棉铃内部生活的时期比较长,并且 Bt 毒蛋白只有被害虫食用后才有毒效^[4].随着基因工程技术的飞速发展,将 Bt 毒蛋白基因转入植物则在很好地控制害虫的同时,使得 Bt 制剂在应用中的弊端迎刃而解.目前,许多植物都已经成功地转入了 Bt 毒蛋白基因,并且一些主要的转基因农作物如玉米、棉花等已经获得批准进入市场.

如同化学农药的命运一样,昆虫对 Bt 杀虫剂也发生进化而产生了抗性^[5].迄今为止,在田间和实验室研究中已经发现有十多种昆虫对 Bt 杀虫毒蛋白产生了抗性^[6].由于转 Bt 作物能够持续地高水平表达单一的杀虫毒蛋白,因而 Bt 作物的释放将会加速昆虫的抗性进化.“自然界中的生物体对遗传工程作物的进化反应将使这类作物的优势消失殆尽”^[7].然而,转 Bt 基因作物具有很高的经济价值^[1,8],其商业化释放势在必行,而害虫对 Bt 作物的抗性是不可避免的,因此现在我们应该做的工作应该是研究如何延缓害虫 Bt 抗性的进化.在提出针对性的对策之前研究抗性发生的机制是非常必要的.虽然,前人对抗性机制和抗性管理的有关问题进行了综述,如 McGaughey 和 Whalon(1992)^[9]、Tabashnik(1994)^[10]、Bergvinson 等(1997)^[6]等等.但是,这些文献的侧重点各有不同.并且转 Bt 基因植物的种类不断增加,抗虫作物的释放面积从 1996 年至 1997 年增加了 3.8 倍^[8],其中主要是转 Bt 基因作物.1996 年,美国南部 8 000 hm² Bt 棉失去对害虫的控制,虽然 Monsanto 公司认为怀疑害虫对 Bt 毒蛋白产生了抗性是没有科学依据的,但人们开始重新提起害虫的抗性进化这一议题,并对那些通过理论和模型推算出来的抗性管理策略展开讨论^[11,12],这一点将在后文作详细介绍.因而,有必要根据新的进展就害虫的 Bt 抗性及其评价以及各种抗性管理对策的利弊进行全面的论述,为害虫的抗性管理增添新的内容并为寻求合理可行的抗性管理对策提供必要和有力适时的理论依据.

1 转 Bt 内毒素基因植物概况

由于植物种类的不同,害虫抗性产生的机制不同,因而管理对策也就可能因植物和害虫种类的不同而有所不同.所以本文在探讨害虫对 Bt 作物的抗性风险及其管理对策之前,首先概括介绍世界范围内转 Bt 基因植物的概况.

文献中,一般用 Cry 表示 Bt δ -内源毒蛋白的晶体状态, cry 表示编码这个蛋白的基因. Bt 毒蛋白和它们的基因一般被分为四类: Cry I (鳞翅目特异)、Cry II (鳞翅目和双翅目特异)、Cry III (鞘翅目特异)和 Cry IV (双翅目特异)^[13]. Feitelson 等(1992)又增添了两类 Cry V 和 Cry VI^[14]. Cry V 对鳞翅目和鞘翅目昆虫及线虫特异, Cry VI 对线虫特异, Koziel 等(1993)列出了目前的 Bt δ -内毒素以及它们的杀虫谱^[15].

第一例转 Bt 植物是抗烟草天蛾(*Manduca sexta*)的转基因烟草^[16].至 1997 年早些时候,在大约已经或即将被批准上市的 80 种转基因作物中,有 21 种是转 Bt 作物,其中 11 种是玉米(转 cry I A(b)或 cry I A(c))、5 种是马铃薯(转 cry III A(a))、另外 5 种是棉花(转 cry I A(a)或 cry I A(c))^[1].其它还有 20 余种成功转 Bt 植物的例子(表 1),有的只是田间试验,有的仅仅是获得了转基因植株,它们的上市只是一个时间问题,其商业化释放不能够回避 Bt 抗性进化这个问题.表 1 列出了迄今为止主要的转 Bt 植物以及它们的目标害虫,为探讨害虫对 Bt 作物的抗性进化提供了背景资料.

2 害虫对转基因 Bt 作物的抗性

2.1 Bt δ -内毒素蛋白的杀虫机理

为了探讨害虫对 Bt 抗性产生的机制,首先应该了解 Bt 毒素的杀虫机理.

害虫摄食 Bt 杀虫剂中的杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs)后,在中肠碱性条件下二硫键打

开,在胰道胰蛋白酶的作用下激活形成抗蛋白酶的毒性核心片段,才有活性^[48].在转基因植物体中,为了提高表达量,所转入的基因都是经过修饰的,所表达的 Bt 毒蛋白是已被活化的蛋白^[49,50].活性毒素与中肠上皮的刷状缘膜囊(brush border membrane vesicles, BBMV)上的中肠受体蛋白结合,研究表明,毒素活性与其对 BBMV 结合的能力呈正相关^[51].

Bt 活性蛋白与中肠上皮细胞结合后,有毒性的 α -螺旋穿透细胞质膜形成一个离子通道(孔),依 pH 的不同,这些孔具有选择性(仅 K^+ 可通过)和非选择性(Na^+ 和阴离子可通过).由于鳞翅目昆虫的中肠是碱性的,因而这些孔很有可能有 K^+ 渗漏,这种阳离子通道损坏了膜电势,细胞膨胀并裂解,导致中肠坏死,围食膜和上皮退化变性,肠壁受损后,中肠的碱性高渗内含物进入血腔,血淋巴 pH 升高而导致昆虫麻痹死亡.害虫死后由毒素导致了细菌败血症^[6,48].

表 1 转 Bt 基因作物概况*
Table 1 List of Major Transgenic Plants with Bt Genes*

作物 Crops	Bt 基因 Bt genes	目 标 害 虫 Target Pests	作物 Crops	Bt 基因 Bt genes	目 标 害 虫 Target Pests
烟草 Tobacco	cry I A(a)	烟草天蛾 (<i>Manduca Sexta</i>) ^[17]	白花三叶草 White Clover	cry I A(b) cry I B	<i>Orocrambus flexuosellus</i> ^[41] <i>Porina moth (Wiseana spp.)</i> ^[41]
	cry I A(b)	甜菜夜蛾 (<i>Spaloptera exigua</i>) ^[15,18-19]	花生 Peanut	cry I A(c)	南美玉米苗斑螟 (<i>Elasmopalpus lignosellus</i>) ^[38]
		棉铃虫 (<i>Heliothis zea</i>) ^[15,18-19]			
番茄 Tomato	cry I A(c)	烟芽夜蛾 (<i>H. virescens</i>) ^[20-21]	花茎甘蓝 Bracoli	cryIA(c)	小菜蛾 (<i>Plutella xylostella</i>) ^[42]
	cry I C(a)	甜菜夜蛾 (<i>Spaloptera exigua</i>) ^[22]	卷心菜 Cabbage		
	cry III A	马铃薯甲虫 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) ^[23]			
马铃薯 Potato	cry I A(b)	烟草天蛾 (<i>Manduca Sexta</i>), 棉铃虫 (<i>H. zea</i>), 番茄蠹蛾 (<i>Keiferia lycopersicella</i>) ^[24-25]	甘蓝型油菜 Oilseed rape / canola	cryIA(c)	棉铃虫 (<i>H. zea</i>), 粉纹夜蛾 (<i>Trichoplusia ni</i>), 小菜蛾 (<i>P. xylostella</i>), 甜菜夜蛾 (<i>S. exigua</i>) ^[43]
	cry I A(c)	鳞翅目昆虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]			
	cry I A(b)	马铃薯麦蛾 (<i>Phthorimaea operculella</i>) ^[27]	芜菁甘蓝 Rutabaga	cryIA(a)	菜粉蝶 (<i>Pieris rapae</i>) ^[44]
茄子 Eggplant	cry I A(c)	烟草天蛾 (<i>Manduca Sexta</i>) ^[28]			
	cry III A	马铃薯甲虫 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) ^[29-30]	苹果 Apple	cryIA(b) cryIA(c)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]
	cry I A(b)	茄白翅野螟 (<i>Leucinodes orbonalis</i>) ^[31]	酸果蔓 Cranberry	cryIA(a)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]
棉花 Cotton	cry I A(b)	烟芽夜蛾 (<i>Heliothis virescens</i>), 棉铃虫 (<i>Heliothis zea</i>)	葡萄 Grapevine	cryIA(c)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]
	cry I A(c)	等鳞翅目 (<i>Lepidoptera</i>) 害虫 ^[26,32-33]			
	cry II A	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]	山楂 Hawthorn	Bt* *	苹果蠹蛾 (<i>Laspeyresia pomonella</i>) ^[1]
玉米 Maize / Corn	cry I A(b)	巨座玉米螟 (<i>Diatraea grandiosella</i>), 小蔗螟 (<i>D. saccharalis</i>) ^[6]	唐棣 Juneberry	Bt* *	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[1]
	cry I A(b)	欧洲玉米螟 (<i>Ostrinia nubilalis</i>) ^[34]	梨 Pear	Bt* *	苹果蠹蛾 (<i>L. pomonella</i>) ^[1]
	cry I A(c)	亚洲玉米螟 (<i>O. turnacalis</i>) ^[35]	甘蔗 Sugarcane	cryIA(c)	小蔗螟 (<i>D. saccharalis</i>) ^[1]
	prt A	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]	草莓 Strawberry	cryIA(c)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[1]
	cry I H	鳞翅目害虫 (<i>Coleoptera</i>) ^[26]	杨树 Poplar	cryIA(a)	森林天幕毛虫 (<i>Malacosoma disstria</i>), 舞毒蛾 (<i>Lymantria dispar</i>) ^[45-46]
水稻 Rice	cry I A(b)	二化螟 (<i>Chilo suppressalis</i>), 稻纵卷叶螟 (<i>Cnaphalocrosis medinalis</i>) ^[36]	胡桃 Walnut	cryIA(c)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[1]
	cry I A(b)	三化螟 (<i>Scirpophaga incertulas</i>), 二化螟、稻纵卷叶螟和 <i>Marasmia patnalis</i> ^[37]	白云杉 White Spruce	cryIA	枞色卷蛾 (<i>Chorisonera fumiferana</i>) ^[47]
	cry I A(c)	鳞翅目害虫 (<i>Lepidoptera</i>) ^[26]			
苜蓿 Alfalfa	cry I C(a)	海灰翅夜蛾 (<i>S. litoralis</i>), 甜菜夜蛾 (<i>S. exigua</i>) ^[20]			
	cry VI A	鞘翅目害虫 (<i>Coleoptera</i>) ^[26]			
大豆 Soybean	cry I A(b)	黎豆夜蛾 (<i>Anicarsia gemmatialis</i>) ^[39]			
	cry I A(c)	烟芽夜蛾 (<i>H. virescens</i>), 黎豆夜蛾 (<i>A. gemmatialis</i>), 棉铃虫 (<i>H. zea</i>), 大豆夜蛾 (<i>Pseudoplusia includens</i>) ^[40]			

* 按照 Hofte 和 Whiteley(1989)^[13]对 Bt 基因的分类 According to the classification of Bt genes by Hofte and Whiteley(1989)^[13]

* * 一种 Bt 基因,名称未知 A Bt gene whose name is unknown

2.2 害虫对转基因 Bt 作物的抗性

抗性是一个种群对一种杀虫剂敏感度的降低,这种降低是以遗传为基础的.抗性使得种群中等位基因的频率发生变化,所以可以定义为一种进化现象^[10].1983 年,Georgiou 等首先从五带淡色库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 中检测到了它对 Bt ICPs 和其商品制剂的抗性^[48].培养 32 代后,发现五带淡色库蚊的 LC₅₀ 仅有 8 倍的增长^[10].1985 年,McGaughey 在实验室条件下进行抗性筛选,发现印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 选择两代后抗性增长近 30 倍,15 代以后比对照增长 100 倍^[5].Tabashnik (1994) 总结了在实验室选择条件下迄今对 Bt 产生抗性的害虫^[10]:鳞翅目——烟芽夜蛾,甜菜夜蛾,海灰翅夜蛾,粉纹夜蛾,小菜蛾,地中海粉螟 (*Anagasta kuehniella*),粉斑螟 (*Cadra cautella*),向日葵斑

螟(*Homoceros electellum*), 印度谷螟, 柞蚕卷蛾(*Choristoneura fumiferana*); 鞘翅目——黑杨叶甲(*Chrysomela scripta*), 马铃薯甲虫; 双翅目——埃及伊蚊(*Aedes aegypti*), 五带淡色库蚊, 黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*), 家蝇(*Musca domestica*)。欧洲玉米螟在实验室选择条件下也表现出了对 Bt 的抗性^[52]。其中, 只有一种害虫—小菜蛾在田间进化出对 Bt 的抗性^[53], 并且从夏威夷、佛罗里达、纽约, 到菲律宾、泰国和马来西亚的田间种群以及日本的温室种群中都报道了小菜蛾对 Bt 的抗性^[10]。中美洲的小菜蛾田间种群也报道了对 Bt 的抗性^[3]。其它 15 种害虫仅是在实验室选择的条件下发现了对 Bt 的抗性。而且 Tabashnik 等(1990)认为, 由于 Bt 毒蛋白和传统杀虫剂的作用方式不同, 因而 Bt 抗性的产生是由 Bt 的本身的选择压力引起的, 而不是来其它杀虫剂(如化学农药)的交叉抗性^[52]。如此多的害虫可以对 Bt 杀虫剂产生抗性, 那么人们就不能不考虑种植转 Bt 作物而导致害虫抗性的风险。转 Bt 棉在美国南部的失败^[11,12], 更加重了人们的这种担心。国内的一项研究表明, 抗 Bt 杀虫剂的棉铃虫品系同样对转 Bt 棉也有抗性^[55]。

与 Bt 杀虫剂相似, 高度抗虫的转基因植物也会导致类似的选择压力^[7], 由于单一的杀虫毒素的持续表达, 转 Bt 植物的选择压力甚至比 Bt 杀虫剂还要高, 因而在此较高的选择压力下, 害虫很有可能以更快的速度进化出对 Bt 的抗性。当害虫对 Bt 作物的抗性一旦产生, 不但 Bt 作物对害虫失去控制, 而且那些 Bt 杀虫剂也将变得毫无价值。

3 害虫对 Bt 抗性的机理及抗性的评估

一般来讲, 抗性产生的机制总体上可分为生理、生化、行为三方面的因素^[48]。但这几方面的机制应该是在与遗传控制因素紧密联系的^[56]。Heckel(1994)认为转 Bt 作物与传统的化学农药和杀虫剂情况不同, 它有些类似于植物与食草动物之间的协同进化: 植物可能会进化出一种新的化学防御的方法来逃避食草动物, 而食草动物则能够产生协同进化, 设计出一种机制, 来适应抗食草动物的植物^[56]。食草动物的适应受以下因素的影响: 选择强度、适应的等位基因初始强度、显性、上位性以及适应的生态学和生理学代价等^[7]。将害虫和转 Bt 作物的关系与食草动物和植物的关系相提并论, 将有助于我们理解和评价害虫对 Bt 作物潜在抗性的机制。

3.1 害虫 Bt 抗性的生理生化机制

生理与生化机制密切相关, 因此我们将它们放在一起讨论。目前对抗性机制研究的重点集中在蛋白质水解作用和结合位点的变化上^[56]。许多研究表明, 抗性的增加与 BBMV 上可能受体与毒素特异性结合的降低有关^[57-59]。另外, 在 Bt 毒素作用途径的许多步骤上都可以产生抗性机制。抗性机制的发生可能仅局限于 Bt 对昆虫伤害途径上某些作用因子的量变, 而非整套特异的作用机制的突变^[48]。我们将 Heckel(1994)所列出的可能产生抗性机制的毒素发生作用的各个阶段以及抗性的生理生化机制^[56]略加改动, 用于阐述害虫对 Bt 作物的抗性机制(表 2)。显然, 毒素的溶解和活化对于 Bt 杀虫剂的效力是至关重要的。然而, 对于 Bt 作物来说, 由于转入的 Bt 基因都是经过修饰或人工合成的, 其表达产物可能并不需要激活作用而直接与靶受体结合而发挥毒效。虽然如此, 为了对问题有个较全面的认识, 我们还是将原毒素的溶解作用和激活作用保留在表 2。

3.2 害虫 Bt 抗性的行为机制

Gould(1991)曾讨论过食草动物对植物抗性的行为适应^[60], 如果时空上 Bt 毒素的浓度有差异, 那么行为上尽量减少摄食将会构成一种抗性机制。表 2 中第 10 个机制即是一种行为抗性。对害虫和 Bt 作物的关系来说, 害虫可以进化成只是避免有毒植株或有毒的部分。Gould 在 1988 年就提出一个问题, 棉铃虫是以棉花和大豆为食的, 如果突然面对大面积的能够导致 80% 死亡的抗性棉花(比如 Bt 棉), 棉铃虫是在生理上产生适应而使抗性棉(Bt 棉)失去价值, 还是在行为上适应转而去以大豆为食, 而对大豆的取食仅会导致较少的损失并且易于控制^[7]。这个问题很难回答。实际上生理生化抗性机制和行为抗性机制可能同时存在, 哪种机制为主要依具体情况而定。在 CIMMYT 的 Bt 玉米中, CryIA(a)的表达需要光的条件由 PEP 羧化酶启动子启动。由于心叶见光少, 害虫就可能能够忍受受低量表达的 Bt 毒素, 所以, 研究发现, 害虫一般都在心叶中生活^[6]。

3.3 害虫 Bt 抗性的遗传机制

抗性的产生应该是以遗传为基础的^[10]。害虫 Bt 抗性的生理生化机制是与遗传机制紧密联系的^[56]。受体分子结构的变化将使毒素与受体的结合能力降低(表 2, 机制 5, 6)是抗性遗传机制最直接的证据。至于害虫的行为抗性机制

可能是一种生活习性改变的结果,有无遗传基础尚无定论.

Tabashnik 等(1997)研究发现,小菜蛾中一个抗性基因的存在可以提供对四种 Bt 毒素的抗性,当然还需要进一步的研究来确定提供这种多毒素抗性的遗传因素是一个位点,还是几个紧密连锁的位点,他们指出这个证据排除了这样一个观点—这些毒素的抗性需要各自独立的分离位点上的突变^[61].在对小菜蛾的大多数实验室选择和田间选择的研究中发现,昆虫对 Bt 的抗性是半隐性或完全隐性的^[3,10].

Table 2 Some potential Bt resistance mechanisms in pests and their likely properties					
受影响的阶段 Steps affected	抗性的本质 Nature of interference	保护程度 ^a Protection	交叉抗性 ^b Cross – resistance	是否隐性 ^c Recessive	代价 ^d Cost
1.溶解 ^e Solubilization	失去作用 Failure	M	+	+	H
2.激活 ^e Activation	未完全蛋白质水解 Deficient proteolysis	M	+	+	H
3.激活 ^e Activation	蛋白质过度水解 Over – proteolysis	M	+	–	M
4.接近靶受体 Access to target	竞争性抑制 Competitive inhibition	M	–	–	M
5.靶位点结合 Target binding	靶位点初级结构变化 Change in primary structure of target	H	–	+	M
6.靶位点结合 Target binding	靶位点修饰(糖基化作用) Change in target modification (glycosylation)	H	–	+ / – ^f	H
7.孔的形成 Pore formation	阻碍 Hindered	M	+	+	?
8.孔的功能 Pore function	堵塞 Plugged	H	+	–	L
9.中肠上皮损伤 Loss of midgut epithelium	生理学克服 Physiological coping	L	+	?	?
10.自我剂量测定 ^g Self – dosing	行为变化 Behavioral changes	L	+	?	?

注:a对最初选择毒素的抗性:分 L(低)、M(中等)或 H(高).Relative degrees of protection conferred against the primary selective toxin:L(Low), M(medium) or H(high). b 该机制是否有交叉抗性?+:有交叉抗性,–:无交叉抗性. Is substantial cross – resistance to other toxins also conferred by the mechanism?+:cross – resistance;–:no cross – resistance. c 该机制是否隐性?+:隐性;–:非隐性,?:表示未知. Is the resistance mechanism likely to be recessive?+:recessive;–:not recessive;?:Unknown. d 撤去毒素后抗性机制的相对适应代价:H(高)、M(中等)或 L(低),?:表示未知.Relative fitness cost of the resistance mechanism in the absence of toxin:H(High), M(Medium) or L(Low);?:Unknown. e 对 Bt 作物来说可能不起作用. It may have no function for Bt crops. f 如果由正常的糖基化作用的失败而引起就是隐性,如果由一个新的糖基化作用引起就是非隐性. Recessive if due to failure of a normal glycosylation pathway; Not recessive due to prescence of a novel glycosylation activity. g 对 Bt 作物来讲,害虫主要采用在时空上转变宿主对策.Pests avoid toxins by shifting hosts spatially and temporally for Bt crops.

* 来自文献[46],略加改动. According to reference [46] with a little modification.

害虫快速适应一种杀虫剂的风险主要依靠田间野生种群中的初始抗性等位基因频率^[62].目前广泛应用的抗性频率是 $10^{-2} \sim 10^{-13}$,它是基于突变—选择理论的一个估计值^[63].Crow 和 Kimura 的这个理论认为:有利选择前,任何一个等位基因的频率都是由突变产生的新等位基因和对杂合体的选择之间的平衡保持在种群中^[64].当然选择也应该作用于纯合个体,但由于稀少而被 Crow 和 Kimura(1970)忽略不计.然而,实际情况并不象人们用理论模型来预测的那样.Tabashnik 等(1997)发现小菜蛾中的初始抗性等位基因频率为 0.12,10 倍于目前所广泛引用的感性群体中初始抗性等位基因频率的估计值^[61].Gould 等(1997)通过采自美国 4 个州的烟芽夜蛾的雄性与实验室的抗 Bt 的雌蛾杂交,并观察 F₁ 和 F₂ 代对 Bt 毒蛋白的忍受能力,估计到田间抗性位基因的初始频率为 1.5×10^{-3} ,并指出他们的这种技术能够提高检测隐性抗性位基因的频率的能力^[62].Tabashnik (1997)^[3]高度评价了这个技术^[62],认为隐性纯合个体存在的概率是 P^2 (P 为隐性抗性位基因频率),远远小于杂合个体存在的概率 $2 \times P \times (1 - P)$,能够检出隐

性纯合体意味着敏感度提高了 2 000 倍.而这样做对确定隐性抗性位基因的初始频率是非常重要的.前人,如 Crow 和 Kimura(1970)^[62],根据遗传学模型估计抗性基因的初始频率时将抗性隐性纯合体忽略不计,这个错误导致低估了隐性抗性位基因的初始频率.

昆虫害虫的 Bt 抗性的遗传机制比较复杂,例如,马铃薯甲虫对 CryIII A 的抗性与一个以上的位点有关^[65].为了使问题简化,从前的工作认为抗性是受一个单一位点上的一个稀有的初始等位基因控制.为了更好地研究害虫 Bt 抗性的遗传机制,建立 Bt 抗性与标记位点的连锁作图是一个比较有用的方法.我们可以用连锁作图来研究复杂的 Bt 抗性机制.它有如下用途^[56]:1)能够明确地检出不同的抗性机制;2)用标记来帮助鉴定和分类抗性位点,这一点在抗性发生在几个特异位点上时特别重要;3)可以允许位点特异显性评估,也就是确定抗性位点的显隐性;4)检测出若干个位点以后,这些标记可以用来研究这些位点是如何相互作用提供抗性的;5)用于交叉抗性的分析;6)用于特异性等位基因适应代价(fitness cost)的细致研究.由于烟芽夜蛾的所有 31 条染色体上的具有标记位点的连锁图已经完成,因而适于进行标记位点和 Bt 抗性连锁作图的研究^[66].Heckel 等(1997)^[66]通过研究烟芽夜蛾对 Bt CryIA(c)的抗性发现,连锁群 9 由同工酶 MPI 位标记,是在烟芽夜蛾中发现的影响抗性的第 4 个连锁群,称为 BtR-4,提供烟芽夜蛾抗性品系(YHD2)对 CryIAc 80%的抗性.这个发现具有很大的意义:1)抗性品系 YHD2 是最近由田间获得的,BtR-4 位点上的抗性位基因在田间种群存在着不容忽视的频率,并将由于 Bt 棉的商业性释放而进一步增大;2)首次发现了昆虫中一个主要的 BtR 抗性位点与一个遗传标记的连锁,检测到 MPI 与 Bt 抗性间的连锁是揭示昆虫对相同选择压力(Bt)共同进化的第一步;3)BtR-4 的连锁对于建立烟芽夜蛾中 Bt 的抗性机制也是很很重要的一步.

3.4 害虫 Bt 抗性的评估

目前,许多抗性选择试验是在实验室里进行的,而实验室选择结果往往不能代表田间情况.特别是当实验室种群的遗传变异与田间相比比较有限时,实验室选择不能产生抗性并不意味着田间选择条件下也没有抗性的发生^[10].我们需要一个标准的方法来分析报道实验室的研究结果,并将其用于抗性的风险评价中.Tabashnik (1992, 1994)为我们提供了可以用来评价抗性对不同选择程度响应的现实遗传力这样一个参数的估计方法^[67,70].现实遗传力 h^2 为:

$$h^2 = R/S \quad (1)$$

这里 R 是选择响应, S 是选择差.其中,

$$R = \frac{\{\ln(LC_{50}^f) - \ln(LC_{50}^i)\}}{n} / n \quad (2)$$

这里 LC_{50}^f 是选择 n 代以后后代的最终半致死浓度, LC_{50}^i 是 n 代选择以前亲本世代的初始半致死浓度;

$$S = i\sigma_p \quad (3)$$

这里 i 是选择的强度,用文献[68]的附录 A 由选择的存活率 P 估计得出; σ_p 是表型标准偏差:

$$\sigma_p = [1/2(K_i + K_f)]^{-1} \quad (4)$$

K_i (初始斜率)和 K_f (最终斜率)分别是选择前亲本和 n 代选择后代概率回归线的斜率.

将公式(1)改换一下可以用来评价抗性对选择压力的反应:

$$R = h^2 S \quad (5)$$

当抗性选择停止后,不同昆虫(种或品种)对 Bt 抗性的稳定性是不相同的.例如,对印度谷螟选择 9 代后,抗性群体用不加 Bt 的饲料喂养,7 个世代中抗性并没有下降,表明抗性选择了一个纯合的抗性品系,或者抗性并没有什么显著的繁殖不利^[5].

在小菜蛾中,当选择停止时,其 Bt 抗性缓慢降低^[69].而对于马铃薯甲虫来说选择压力撤去 5 个世代以后其抗性水平下降,12 个世代以后抗性水平不再下降^[65].当去掉选择压力后,抗性水平下降的原因可能是提供 Bt 抗性的遗传变化在没有 Bt 的选择条件下会给害虫造成一个适应代价,当选择停止时,这个代价会引起混合种群中抗性的下降^[10].然而,基因流(感性个体的迁入和抗性个体的迁出)、突变和遗传漂变同样也会降低种群中抗性个体的频率^[69].

用于估计抗性响应的参数 R 可以用来定量选择停止后 LC_{50} 的变化,也就是抗性的稳定性.这时,公式(2)中的 LC_{50}^f 和 LC_{50}^i 分别代表选择停止 n 代后和 n 代前的 LC_{50} ,若 R 是负值则表示 LC_{50} 的降低,即抗性水平的下降. R 的倒数

是 $LC_{50}10$ 倍变化所需要的世代数。

4 害虫对 Bt 作物抗性的管理对策

前文已讲过,害虫对 Bt 毒素的抗性是不可避免的,我们所要做的是采取一系列有效的策略或对策来延迟抗性,延长转 Bt 作物或 Bt 杀虫剂的效用时间。害虫对 Bt 作物的抗性管理对策的制定一是要从化学农药和 Bt 杀虫剂的抗性管理中吸取经验,二是要结合转 Bt 作物的具体情况。

抗性管理应该是遵循综合害虫管理(IPM)基本原理的一项对策,后者就是将害虫种群密度控制在能导致经济损失的域值以下,同时尽量减小由施用杀虫剂而造成的社会经济和环境的负面影响。抗性管理来源 4 个基本对策:1)不要使害虫仅受一种致死机制的选择,使致死原因多样化;2)降低每种主要致死机制的选择压力;3)通过避难所(refuges)或迁入来提供感性个体;4)通过应用诊断工具,监测和模型来估计和预测抗性过程^[9]。依照这些原则,延迟害虫对 Bt 作物抗性的管理策略主要有以下几种: Bt 作物的轮作、开发新的毒素基因、避难所、毒素高剂量表达、毒素低剂量表达、转入多种杀虫基因以及毒素在时空上的特异表达,它们在实际应用中应该是互为补充,相辅相成的。

4.1 Bt 作物的轮作

McGaughey 和 Whalon 指出^[9], Bt 毒素与其它毒素,杀虫剂或者耕作防除或生物控制策略的轮作或变换可以用来管理抗性。虽然与 Bt 杀虫剂不同, Bt 作物一般具有持续的毒素表达,但是 Bt 作物的轮作,即与含有不同 Bt 毒素基因的作物或非转基因作物间的轮作,将会有助于害虫抗性的延迟。这个策略的有效性依赖于当选择压力不连续或者变化至另外一种毒素时,害虫种群对该选择压力敏感性的恢复。害虫的抗性稳定性在前文(3.4 部分)已作了详细讨论,虽然印度谷螟在不存在选择压力的情况下,抗性将持续较长的时期^[5],但大多数情况下,选择的早期抗性比较不稳定,当选择压力不连续时抗性水平会下降^[9]。另外,当用含有不同杀虫毒素基因的作物进行轮作时,要注意交叉抗性的问题。当然轮作的周期、面积等尚需根据害虫的不同、转基因作物的不同而进行细致深入的研究。

4.2 建立避难所策略

避难所是指在转 Bt 作物附近种植一定面积的非转基因作物,来保证感性昆虫的存活,并与潜在的抗性个体交配,从而降低抗性基因频率增大的可能性。许多理论模型的预测证明,避难所能够延迟害虫对 Bt 作物的抗性^[74~77]。还有很多文献论述了避难所的应用^[1,3,6~7,9~10,78]。

避难所有时间上还有空间上的,它在每种害虫与植物相互作用关系上都是独特的,避难所可以位于一特定植株(不同部分和不同发育阶段)上,也可以存在于不同植株上(混合种子)或不同的种植地中^[6,9]。一般地,避难所和高剂量方法是结合在一起应用的。Peferoen(1997)详细地说明了高剂量策略和避难所策略的结合的基本原理^[78]:消除抗性基因最有效的方法是将目标定在携带杂合抗性基因的害虫上,原因是种群中大多数抗性基因是以杂合状态存在,杂合抗性昆虫和纯合的感性昆虫都可以被高剂量表达的 Bt 作物杀死;在提供感性昆虫存活的一个避难所的条件下,纯合抗性个体和纯合感性个体间的交配导致杂合后代的产生,而杂合后代对 Bt 作物是敏感的;所以,现在的重点是如何设计一个避难所驱使纯合抗性个体和纯合感性个体进行交配。在这个策略中,由于在避难所中使用非转基因作物,害虫的危害可能会比较严重,造成一定的经济损失。为了改进这个策略,Alstad 和 Andow(1994)设计了一种改进型“高剂量/避难所”策略^[74],他们在转基因作物地中使用一种对欧洲玉米螟有吸引力的 Bt 玉米品种,吸引 6 月蛾到 Bt 玉米地中产卵,避免了避难所中由于使用非转基因作物而造成的损失,很好地控制了害虫对 Bt 作物和非 Bt 作物的危害。然而,如果在选择压力下害虫在行为上产生逃避这种有吸引力的 Bt 作物的抗性,这种方法的实用性尚需进一步的研究。

表 3 列出了为了延迟抗性,在美国上市的 5 个 Bt 作物品种所需要的避难所的最小面积。然而,1996 年夏天 Monsanto 公司的棉花在美国南部控制棉铃虫的失败^[11,12],使人们对这种避难所策略产生了怀疑。但是 Monsanto 公司的发言人认为没有迹象表明害虫进化出了抗性,昆虫的大发生只是由于异常干燥的气候。McGaughey 指出,当具有较高昆虫大发生的压力时,平时 100% 的杀虫剂量也会失去作用,异常的温度也会影响 Bt 毒素的合成和表达^[11]。Monsanto 的 Bt 棉的目标害虫是烟芽夜蛾^[61,62]和棉红铃虫^[11]。Gould 认为,4% 的避难所(或 20% 的喷药的避难所)对于控制棉花主要的害虫—烟芽夜蛾是合适的,这种害虫对 Bt 非常敏感。然而,棉铃虫对 Bt 有较低的敏感性,所以对

棉铃虫应用“高剂量/避难所”的方法是错误的.对于 Bt 不敏感的害虫需要较大面积的避难所来延迟抗性^[11].

表 3 不同 Bt 作物中延迟抗性的最小避难所面积^[1]
Table 3 Minimum refuge areas for different transgenic crops to delay the likelihood of insect resistance^[1]

公司 Company	产品名称 Product	作物 Crop	避难所面积 Minimum refuge areas
Monsanto	Bollgard™	棉花 Cotton	25% 面积的非转基因棉花(如果需要,可以用任何杀虫剂,但不包括与转基因棉相同的 Bt 杀虫剂措施)或 4% 的非转基因棉花(不用任何的杀虫措施) 25% of unprotected cotton(non-transgenic) as a refuge using conventional insect controls if desired or 4% of unprotected cotton(non-transgenic) as a total refuge using no insect control whatsoever
		玉米 Corn	使用对欧洲玉米螟有 99% 以上水平的致死高剂量对策;并且建议使用 5~50% 面积的非转基因玉米 High-dose strategy with levels exceeding the LC ₉₉ for European corn borer; proposing to plant 5~50% of unprotected corn(non-transgenic)
	Newleaf™	马铃薯 Potato	20% 的非转基因马铃薯(若需要,可用任何杀虫剂) 20% of non-transgenic potatoes as a refuge using conventional insect controls if desired
Novartis	Maximizer™	玉米 Corn	使用对欧洲玉米螟有 99% 致死量水平的高剂量对策;并且建议种植 5~50% 面积的非转基因玉米 High-dose strategy with levels exceeding the LC ₉₉ for European corn borer; proposing to plant 5~50% of non-transgenic corn
Mycogen	Yield Gard™	玉米 Corn	5% 面积的非转基因玉米,避难所中不用任何杀虫剂 5% of non-transgenic corn as a total refuge using no insect control whatsoever

在通常情况下,玉米也是棉铃虫的宿主,玉米田可以作为 Bt 抗性管理的避难所,但当 Bt 玉米商业化以后,这种情况就可能不复存在了.同时,为了避免棉铃虫抗性的加速,美国国家环保局已严令禁止 Bt 棉与 Bt 玉米邻近种植.

4.3 转入多个杀虫基因

在转基因抗虫作物研究中,除了开发新的 Bt δ -内毒素蛋白基因外,尚可利用其它的抗虫基因,如蛋白酶抑制剂,包括豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTi)基因、马铃薯蛋白酶抑制剂-II(PinII)基因和水稻疏基蛋白酶抑制剂基因,淀粉酶抑制剂基因,外源凝集素基因等等^[70,71].可以将它们与 Bt 基因一起转入作物,具有不同结合位点的两种以上的 Bt 基因也可同时转入同一作物,用于提高转基因抗虫作物延迟害虫抗性的能力.然而这个策略的应用需要避难所的协助^[72],其中一个原因就是防止交叉抗性^[1].

4.4 高剂量方法

高剂量方法就是使基因转作物的毒素表达量在一个高水平上(大于 LC₉₉,即超过 99% 的致死量),在理论上,昆虫克服这种毒素需要很长的时间.这个方法假设大多数或全部的抗性是隐性的或处于最差的可加性状态,并且大多数的抗性携带者是杂合的,甚至预计抗性纯合体也将被高水平表达的毒素杀死^[1].同样,高剂量方法也必须与避难所结合起来应用.如果没有避难所的同时存在,这个方法必须满足 6 个方面的假设:1)抗性因子的遗传方式;2)抗性因子的生态学代价;3)害虫幼虫和成虫对毒素的行为响应;4)幼虫在植物株之间的移动;5)成虫散布和交配行为;6)表达和不表达这些毒素宿主植株的分布^[73].当多种 Bt 作物和多种害虫分布在同一地区,并且作物受到两种以上的害虫的侵害,而这几种害虫对毒素的敏感程度不同,同时同一害虫能够以两种以上的作物作为宿主时,问题就变得比较复杂,结果就更加难于预测.

4.5 低剂量方法

一般地,我们可以这样假设,一种植物抗性因子降低食草动物适应的程度愈低,食草动物适应这个抗性因子的速度愈慢^[7].低剂量的毒素表达的目的是降低选择压.亚致死的剂量将会降低害虫种群的育性和生长,并且使得受

到影响的害虫易于被捕食和寄生^[1]。然而,如果昆虫开始就暴露于低剂量的毒素之下,表 2 中第 9 个抗性机制一使损伤的中肠上皮得到修复,就有可能形成。并且,从商业的角度来看,低剂量毒素表达导致的作物的损失不能被接受,因此这种方法已被有关公司弃用^[1]。

4.6 Bt 毒素的目标表达

这个策略就是在作物某一部分或作物发育的特定时期特异地表达 Bt 毒素。研究表明,棉花需要防护的最重要部分是幼棉铃,使抗性因子仅在幼铃中表达,幼虫就会依赖其它部分,引起较少的损失^[7]。这个方法将允许很多感性昆虫正常地生长和繁殖,因而增加了它们的捕食者和寄生者的数量,同时,在主要的部分或生活史阶段能够免受损失^[1]。然而,也有不同意见,如果组织特异性启动导致 Bt 在一些组织中高量表达,在另外一些组织中低量表达,那么害虫的抗性将会被加速而不是延迟,这是因为害虫将会由不同生活史阶段利用的组织的不同而被分化选择^[9]。

随着对基因调控的深入了解,这一策略将作为避难所和高剂量策略的补充有可能得到广泛应用。

4.7 建立数学模型对抗性管理的评估

由于在田间检验上述策略比较困难,所以现在一般用实验室数据^[75]和数学模型来评价延迟抗性的策略。

Mallet 和 Porter(1992)用数学模型比较了避难所策略(转基因作物和非转基因作物种植在不同的农田中)和种子混合策略(转基因和非转基因植株种植在同一农田中)或组织特异表达策略(避难所在同一植株上)对于延迟害虫 Bt 抗性的作用^[76]。Tabashnik(1994)^[77]则用 Mallet 和 Porter(1992)提供的模型^[76]评价了种子混合、避难所、种子混合 + 避难所与纯转基因农田对昆虫抗性的影响。

这个模型有几个假设:1)害虫对 Bt 毒素的抗性由单一位点控制;2)昆虫幼虫有两个生活史阶段,每个阶段上抗性的选择是独立的;3)在两个生活史阶段上,摄食不含毒素植株幼虫的适合度为 1;4)幼虫在两个生活史发育阶段之间并不迁入和迁出避难所;5)来自含毒素和不含毒素植株的成虫以及不同基因型的成虫之间的交配是随机的,表达毒素和不表达毒素的植株上的产卵是随机的^[76,77]。

该抗性位点上有两个等位基因: A_R 为抗性等位基因, A_S 为感性等位基因。于是,害虫种群中有三种基因型: $A_S A_S$ ——感性的; $A_R A_R$ ——抗性的; $A_R A_S$ ——杂合的。

首先根据假设定义各种参数。种子混合对策中,不表达毒素植株的比例定义为 V 。幼虫从阶段 1 到阶段 2,从一株植物到另一株植物的迁移比例定义为 M 。避难所中不表达毒素植株的比例定义为 C 。假设在第一个生活史阶段上,摄食 Bt 作物幼虫的选择系数为 S_1 ,遗传显性系数为 h_1 ,因而 $A_S A_S$ 、 $A_R A_S$ 和 $A_R A_R$ 的相对适合度分别为 $1 - S_1$, $1 - (1 - h_1)S_1$ 和 1;同样,在第二个生活史阶段上,摄食 Bt 作物的幼虫群体中 $A_S A_S$ 、 $A_R A_S$ 和 $A_R A_R$ 的适合度分别为 $1 - S_2$, $1 - (1 - h_2)S_2$ 和 1。如果不用避难所, A_{SS} 和 A_{RS} 总的适合度分别为:

$$W_{SS} = 1 - (1 - V)(S_1 + S_2) + \{1 - V[1 + M(1 - V)]\} S_1 S_2 \quad (6)$$

$$W_{RS} = 1 - (1 - V)[(1 - h_1)S_1 + (1 - h_2)S_2] + [1 - \{1 + M(1 - V)\}](1 - h_1)S_1(1 - h_2)S_2 \quad (7)$$

A_{RR} 总的适合度是 1。总的选择系数 $S = 1 - W_{SS}$, 总的显性系数 $H = 1 - (1 - W_{RS})/S$, 这样就得到一个标准的遗传学模型:

$$W_{SS} = 1 - S, W_{RS} = 1 - (1 - H)S, W_{RR} = 1 \quad (8)$$

如果使用避难所:

$$W_{SS} = 1 - (1 - C)S, W_{RS} = 1 - (1 - C)(1 - H)S, W_{RR} = 1 \quad (9)$$

然后计算出昆虫种群中抗性等位基因 A_R 的频率,将以上数据代入孙儒泳(1992)提供的公式^[79]得:

$$P_{(R,T+1)} = \frac{P_{(R,T)}^2 + P_{(R,T)}P_{(S,T)}W_{RS}}{P_{(R,T)}^2 + 2P_{(R,T)}P_{(S,T)}W_{RS} + P_{(S,T)}W_{SS}} \quad (10)$$

其中, $P_{(R,T+1)}$ 为 $T+1$ 世代,抗性等位基因的频率; $P_{(R,T)}$ 和 $P_{(S,T)}$ 分别为 T 世代抗性等位基因和感性等位基因的频率。

当抗性等位基因的频率即 $P_{(R,T+1)}$ 达到或超过 0.5 时,说明种群对 Bt 作物进化出了抗性, $(T+1)$ 则为抗性进化所需的世代。从而可以比较各种策略下昆虫种群进化出抗性所需世代数,用以说明它们各自在延迟昆虫抗性中的作用。

5 讨论

5.1 转基因抗虫作物展望

随着转 Bt 基因棉花、玉米和马铃薯的上市,标志着 Bt 作物成为抗虫转基因工程的主流.但是,害虫对 Bt 作物抗性的进化的潜在风险不容忽视.除了在 Bt 转基因作物释放后,在种植策略方面尽量延迟害虫的抗性,还可以在在进行转基因操作时进行一些改进,如组织特异和发育阶段特异表达以及采用一些别的害虫较难适应的抗虫基因,如蛋白酶抑制剂等(见前文).Estruch 等(1997)将这类转基因作物称为第一代杀虫植物^[80].

Bt 内毒素的杀虫活性仅需要在饲料中的质量浓度达到 50 ~ 500 ng/ml 即可^[15],而蛋白酶抑制剂、几丁质酶和凝血素等的活性则要求有 mg/mL 数量级的含量^[81].前者的杀虫活性是急性的,后者则是慢性的,慢性的杀虫蛋白往往在转基因植物中得不到高量表达而达不到合适的杀虫效果^[80].

现在发现包括 Bt 毒素在内的杀虫蛋白对某些害虫也是束手无策.于是,科学家们又在寻求新的杀虫蛋白.来自 *Bacillus* 营养生长的杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs)以及来自链霉菌培养物滤液的胆甾醇氧化酶(cholesterol oxidase, CO)具有很好的杀虫效果^[80],表达这两类杀虫蛋白的第二代转基因作物将为害虫的综合防治提供新的方法和策略.

5.2 Bt 作物的风险评价

害虫的抗性进化是一个长期的过程,而 Bt 作物的商业化释放为抗性进化提供了很好的选择条件.因而对于抗性的评价是一个长期而艰巨的任务.目前,虽然已经有了一些抗性管理策略,但这些策略的有效性大部分来自数学模型的预测和来自小规模试验.这样的结果不能够代替田间试验^[3].由于田间实验抗性管理策略是很困难的,人们还是需要借助于那些用模型预测和小规模测试得来的抗性管理策略.这就要求我们在进行室内实验或小规模测试时,一定要尽量选择能够代表田间种群遗传多样性的害虫群体来实行抗性选择.如果与田间种群相比,实验室群体的遗传变异比较有限,那么在实验室选择条件下没有抗性反应,并不能排除田间抗性产生的可能性^[10].而且,实验室选择和田间选择抗性的产生的因素各不相同,实验室抗性或多基因有关,而田间抗性则可能与单纯的主效基因有关^[63].

前文(2.2)总结了迄今为止报道的在田间或实验室条件了对 Bt 制剂产生抗性的 17 种害虫,在这些害虫中,有很大一部分是目前转基因作物的目标害虫(表 1).沈晋良等(1998)^[55]发现,棉铃虫对 Bt 生物农药与转 Bt 植株间存在着交互抗性,并指出在棉铃虫对 Bt 农药产生早期抗性的地区应用转 Bt 棉时,可能会直接影响到其抗虫效果和使用寿命.因而,我们在释放其目标害虫已经检测或选择出抗性的 Bt 抗虫作物,要特别谨慎,更要仔细研究和实施其抗性管理策略.

Bt 作物释放的风险除了害虫抗性进化的风险外,还包括 Bt 作物本身变成杂草的风险、Bt 毒蛋白基因通过基因流动逃逸到其野生亲缘种中的风险以及对非目标生物体的负面影响的风险.Stewart 等(1996)在将 *cryIAc* 基因转入甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)获得转基因植株时,就注意到 Bt 基因提高了转 Bt 植株的适合度的同时有使其杂草化的可能,并且 Bt 基因可能通过基因渐渗从转基因甘蓝型油菜进入其野生亲缘种的基因组,从而提高该野生亲缘种的适合度^[43].并且 Bt 基因提高转基因植株适合度已在田间得到证实^[82].有关转基因通过基因流动进入其野生亲缘种的风险评价,我们已经专门撰文讨论过^①,在这里不再重复.

Sims 和 Holden(1996)发现,Bt 玉米收获后,其残留组织中的杀虫蛋白 CryIA(b)需要 1447 d 的消散时间(dissipation time, DT₉₀)^[83].非目标生物体就有可能接触到这些残留的杀虫蛋白.虽然,Bt 棉和 Bt 马铃薯的杀虫蛋白对于一种弹尾虫和一种奥甲螨没有产生负面影响^[84],但是,Bt 杀虫蛋白对非目标生物影响的潜在风险不容忽视.瑞士联邦农业生态与农业研究站的科学家们研究了 Bt 玉米对一种益虫—绿草蛉(*Chrysoperla carnea*)的间接影响^[85].绿草蛉是以欧洲玉米螟为食的,研究者用分别取自 Bt 玉米和非转基因玉米的欧洲玉米螟喂食绿草蛉,发现食用来自 Bt 玉米的玉米螟的绿草蛉与对照相比,其死亡率较高,发育也比较延迟.

① 魏伟,钱迎倩,马克平.转基因作物与其野生亲缘种间的基因流动.植物学报(印刷中)

参考文献

- 1 Krattiger AF. Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries (ISAAA Briefs No.2). Ithaca, NY: ISAAA, 1997
- 2 Dutton G. Agbiotech companies' technologies lead the way toward a carbohydrate - based economy. *Genetic Engineering News*. 1997, June 15; 1, 6, 39
- 3 Tabashnik BE. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, **94**: 3488 ~ 3490
- 4 Beegle CC, Yamamoto T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can Ent*. 1992, **124**: 587 ~ 616
- 5 McLaughy WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*. 1985, **229**: 193 ~ 194
- 6 Bergvinson D, Willcox M, Hoisington D. Efficacy and deployment of transgenic plants for stemborer management. *Insect Sci Applic*. 1997, **17** (1): 157 ~ 167
- 7 Gould F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *BioScience*. 1988, **38**: 26 ~ 33
- 8 James C. Global status of transgenic crops in 1997 (ISAAA Briefs No. 5). Ithaca, NY: ISAAA, 1997
- 9 McLaughy WH, Whalon ME. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*. 1992, **248**: 1441 ~ 1444
- 10 Tabashnik BE. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*. 1994, **39**: 47 ~ 79
- 11 Fox JL. Bt cotton infestations renew resistance concerns. *Nat Biotech*. 1996, **14**: 1070
- 12 Kaiser J. Pests overwhelm Bt cotton crop. *Science*. 1996, **273**: 423
- 13 Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*. 1989, **53**: 242 ~ 255
- 14 Feitelson FS, Payne J, Kim L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology*. 1992, **10**: 271 ~ 275
- 15 Koziel MG, Carozzi NB, Currier TC, Warren GW, Evola SV. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future uses. *Biotechnol Gen Engin Rev*. 1993, **11**: 171 ~ 228
- 16 Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, de Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, van Montagu M, Leemans J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*. 1987, **328**: 33 ~ 37
- 17 Barton KA, Whiteley HR, Yang N - S. *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol*. 1987, **85**: 1103 ~ 1109
- 18 Carozzi NB, Warren GW, Desai N, Jayne SM, Lotstein R, Rice DA, Evola S, Koziel MG. Expression of a chimeric CaMV35s *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*. 1992, **20**: 539 ~ 548
- 19 Warren GW, Carozzi NB, Desai N, Koziel MG. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J Econ Entomol*. 1992, **85**: 1651 ~ 1659
- 20 Adang MJ, Firoozabady E, Kein J, DeBoer D, Sekar V, Murray E, Rocheleau TA, Rashka K, Staffeld G, Stock C, Sutton D, Merio DJ. Application of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein for insect control. In: Amtzen CJ, Ryan C ed. *Molecular Strategies for Crop Protection*. New York: Alan, R Liss, 1987. 345 ~ 353
- 21 McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology*. 1995, **13**: 362 ~ 365
- 22 Strizhov N, Keller M, Mathur J, Koncz - Kalman Z, Bosch D, Prudovsky E, Schell J, Sneh B, Koncz C, Zilberstein A. A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxin confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, **93**: 15012 ~ 15017
- 23 Sutton DW, Havstad PK, Kemp JD. Synthetic cryIIIA gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Res*. 1992, **1**(5): 228 ~ 236.
- 24 Fishhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick, Niedermeyer JG, Dean DA, KusanoKretzner K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fralay RT. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology*. 1987, **5**: 807 ~ 813
- 25 Delannay X, Lavalley BJ, Proksch RK, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Marrone PG, Dodson RB, Augustine JJ, Layton JC, Fischhoff DA. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology*. 1989, **7**: 1265 ~ 1269
- 26 Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm I. Insect - resistant transgenic plants. *TIBTECH*. 1998, **16**: 168 ~ 175
- 27 Jansens S, Cornelissen M, de Clercq R. *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in potato by expression of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) insecticidal crystal protein. *J Econ Entomol*. 1995, **88**(5): 1469 ~ 1476

- 28 Cheng J, Bolyard MG, Saxena RC, Sticklen MB. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *Plant Sci*.1992,**81**:83 ~ 91
- 29 Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fishhoff DA. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol Biol*.1993,**22**:313 ~ 321
- 30 Adang MJ, Brody MS, Cardineau G, Eagan N, Roush RT, Shewmaker CK, Jones A, Oakes JV, McBride KE. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII A gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol Biol*.1993,**21**:1131 ~ 1145
- 31 Kumar PA, Mandaokar A, Sreenivasu K, Chakrabarti SK, Bisaria S, Sharma SR, Kaur S, Sharma RP. Insect - resistant transgenic brinjal poants. *Molecular Breeding*.1998,**4**:33 ~ 37
- 32 Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*. 1990,**8**:939 ~ 943
- 33 Benedict JH, Sachs ES, Altman DW, Deaton WR, Kohell RJ, Ring DR, Berberich SA. Field performance of Cottons expressing transgenic CryIA insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*. 1996, **89**:230 ~ 238
- 34 Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*.1993,**11**:194 ~ 200
- 35 Wang GY(王国英),Du TB(杜天兵),Zhang H(张宏),Xie YJ(谢友菊),Dai JR(戴景瑞),Mi JJ(米景九),Li TY(李太源),Tian YC(田颖川),Qiao LY(乔利亚),Mang KQ(莽克强).Transfer of Bt - toxin protein gene into maize by high - velocity microprojectile bombardments and regeneration of transgenic plant. *Science in China(中国科学)(Series B)*.1995,**25**(1):86 ~ 92
- 36 Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojaka J, Shimamoto K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ - endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*.1993,**11**:1151 ~ 1155
- 37 Wunn J, Kloti A, Burkhardt PK, Biswas GCG, Launis K, Iglesias VA, Potreykus I. Transgenic indica rice breeding line IR48 expressing a synthetic cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology*.1996,**14**:171 ~ 176
- 38 Singisit C, Adang MJ, Lynch RE, Anderson WF, Wang A - M, Cardineau G, Ozias - Akins P. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA (c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. *Transgenic Res*.1997,**6**(2): 169 ~ 176
- 39 Parrott WA, All JN, Adang MJ, Bailey MA, Boerma HR, Stewart CN Jr. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In vitro Cell Dev Biol*.1994,**30P**: 144 ~ 149
- 40 Stewart CN, JR, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiol*.1996,**112**:121 ~ 129
- 41 Voisey CR, White DWR, Wigley PJ, Chilcott CN, McGregor PG, Woodfield DR, Hokkanen HMT. Release of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: an ecological perspective. *Biocontrol Sci Technol*.1994,**4**(4):475 ~ 481
- 42 Metz TD, Dixit R, Earle ED. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). *Plant Cell Rep*.1995,**15**: 287 ~ 292
- 43 Stewart CN Jr., Adang MJ, All JN, Raymer PL, Ramachandran S, Parrott WA. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiol*.1996,**112**:115 ~ 120
- 44 Li X - B, Mao H - Zh, Bai Y - Y. Transgenic Plants of rutabaga(*Brassica napobrassica*) tolerant to a pest insect. *Plant Cell Rep*.1995,**15**: 97 ~ 101
- 45 Kleiner KW, Ellis OD, McCown BH, Raffa KF. Field evaluation of transgenic poplar expressing a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) d - endotoxin gene against forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) and gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) following winter dormarry. *Environ Entomol*.1995,**24**:1358 ~ 1364
- 46 McCown BH, McCable DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Rep*.1991,**9**:590 ~ 594
- 47 Ellis DD, McCable DE, McInnis S, Ramachandran S, Russell DR, Wallace Km, Martinell BJ, Roberts DR, Raffa KF, McCown BH. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technology*.1993,**11**:84 ~ 89
- 48 Yu JX(余健秀),Yu RJ(余榕捷),Pang Y(庞义),Xu JM(徐建敏),Li JH(李建华).Advances in studies on insect resistance to *Bacillus thuringiensis* (I): Characteristics and mechanisms of resistance. *Natural Enemies of Insects(昆虫天敌)*.1997,**19**(4):173 ~ 179

- 49 Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fishhoff DA. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, **88**:3324 ~ 3328
- 50 Mang KQ(莽克强). A discussion on the biosafety of transgenic plants. *Prog Biotechnol*(生物工程进展). 1996, **16**(4):2 ~ 6
- 51 Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*. 1992, **37**: 615 ~ 636
- 52 Huang F, Higgins RA, Buschman LL. Baseline susceptibility and changes insusceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* under selection pressure in European corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol*. 1997, **90**(5): 1137 ~ 1143
- 53 Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson MW. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol*. 1990, **83**:1671 ~ 1676
- 54 Perez CJ, Shelton AM. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J Econ Entomol*. 1997, **90**(1): 87 ~ 93
- 55 Shen JL(沈晋良), Zhou WJ(周威君), Wu YD(吴益东), Lin XW(林祥文), Zhu XF(朱协飞). Early resistance of *Helicoverpa armigera* (Hubner) to *Bacillus thuringiensis* and its relation to the effect of transgenic cotton lines expressing Bt toxin on the insect. *Acta Entomol Sinica* (昆虫学报). 1998, **41**(1):8 ~ 14
- 56 Heckel DG. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol Sci Technol*. 1994, **4**(4):405 ~ 417
- 57 van Rie J, McGaughey WH, Jonhson DE, Barnett BD, Van Mellaert H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*. 1990, **247**:72 ~ 74
- 58 Ferre J, Real MD, van Rie J, Jansens S, Peferoen M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, **88**:5119 ~ 5123
- 59 Tabashnik BE, Finson N, Groeters FR, Moar WJ, Jhonson MW, Luo K, Adang MJ. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, **91**:4120 ~ 4124
- 60 Gould, F. Arthropod behavior and the efficacy of plant protectants. *Annu Rev Entomol*. 1991, **36**:305 ~ 330
- 61 Tabashnik BE, Liu Y-B and Finson N, Masson L, Heckel DG. One gene in diamondback moths confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, **94**:1640 ~ 1644
- 62 Gould F, Anderson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M. 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
- 63 Roush RT, McKenzie JA. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol*. 1987, **32**:361 ~ 380
- 64 Crow JF, Kimura M. An introduction to population genetics theory. New York: Harper & Row, 1970
- 65 Rahardja U, Whalon ME. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* spp. *tenebrionis* CryIII A δ - endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol*. 1995, **88**:21 ~ 26
- 66 Heckel DG, Gahan LC, Gould F, Anderson A. Identification of a linkage group with a major effect on resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIAc endotoxin in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*. 1997, **90**:75 ~ 86
- 67 Tabashnik BE. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctnidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chysomelidae). *J Econ Entomol*. 1992, **85**: 1551 ~ 1559
- 68 Falconer DS. Introduction to quantitative genetics. 3rd ed. New York: Longman, 1989
- 69 Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: Lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutelliae). *J Econ Entomol*. 1991, **84**:49 ~ 55
- 70 Zhou ZL(周兆澜), Zhu Z(朱祯). Advances in the genetic engineering of insect - resistance plant. *Prog Biotechnol*(生物工程进展). 1994, **14**(4):18 ~ 24
- 71 Kjellsson G, Simonsson V, Ammann K. Methods for risk assessment of transgenic plants:II. Pollination, transfer and population impacts. Basel: Birkhauser Verlag, 1997
- 72 Roush RT. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgtic crops be better than sprays? *Biocontrol Sci Technol*. 1994, **4**:501 ~ 516
- 73 Gould F. Potential and problems with high - dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocontrol Sci Technol*. 1994, **4**:451 ~ 461
- 74 Alstad DN, Andow DA. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*. 1995, **268**:1894 ~ 1896
- 75 Liu Y-B, Tabashnik BE. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proc R Soc Lond B*. 1997, **264**: 605 ~ 610

- 76 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
- 77 Tabashnik BE. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. *Proc R Soc Lond B*.1994,**255**:7 ~ 12
- 78 Peferoen M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *TIBTECH*.1997,**15**:173 ~ 177
- 79 Sun RY(孙儒泳). Principles of Animal Ecology. 2nd ed. Beijing: Beijing Normal University Press. 1992
- 80 Estruch J J, Carazzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Koziel MG. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nat Biotech*.1997,**15**:137 ~ 141
- 81 Boulter D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*.1993,**34**: 1453 ~ 1466
- 82 Stewart CN Jr., All JN, Paymer PL, Ramachandran S. Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. *Mol Ecol*.1997,**6**:773 ~ 779
- 83 Sims SR, Holden LR. Insect bioassay or determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* CryIA(h) protein in corn tissue. *Environ Entomol*.1996,**25**:659 ~ 664
- 84 Yu L, Berry RE, Croft BA. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). *J Econ Entomol*.1997,**90**(1):113 ~ 118
- 85 Union of Concerned Scientists(UCS). Risk research: transgenic insect - resistant crops harm beneficial insects. The Gene Exchange.1998, summer: 4