应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2018, 55(3): 368–373. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2018.048

抗虫、耐除草剂转基因水稻对非靶标害虫玉米蚜取食行为影响的评价*

任少鹏[1,2**] 杨 帆[1] 高明清[1] 蒲德强[1] 叶恭银[1] 时 敏[1] 陈学新[1***]

（1. 浙江大学昆虫科学研究所，水稻生物学国家重点实验室，农业部农业昆虫重点实验室，杭州 310058；
2. 宁波市农业科学研究院，宁波 315040）

摘 要 **【目的】** 通过研究转基因水稻对玉米蚜 *Rhopalosiphum maidis* (Fitch)取食行为的影响，分析转基因水稻可能带来的潜在风险。**【方法】** 采用 Y-型嗅觉仪测定了玉米蚜对苗期水稻挥发物的行为反应，并利用 EPG 技术对玉米蚜的取食行为进行了分析。**【结果】** 在转基因水稻和对照之间，玉米蚜选择非转基因水稻较多，但是差异不显著；反应时间则是非转基因水稻大于转基因水稻。而在两个转基因水稻品系（KMD1 和 KMD2）之间，玉米蚜极显著地选择 KMD1。E1 波累计持续时间的百分比反映了蚜虫花费在将唾液分泌到韧皮部筛管的时间所占的比例，这一点在 KMD2 和 XS11 之间存在显著差异（KMD2>XS11）；而 np 波累计持续时间的百分比则反映了蚜虫花费在移动和寻找取食位点上的时间所占的比例，这一点在 223F-S21 和 XS134 之间存在显著差异（223F-S21<XS134）；玉米蚜在 G8-7 和 XS110 上的取食行为没有显著的差异。**【结论】** 2 个供试转基因水稻材料（KMD2 和 223F-S21）有利于玉米蚜的取食。

关键词 玉米蚜，转基因水稻，Y-型嗅觉仪，EPG，取食行为

The effects of transgenic rice on the feeding behavior of the non-target aphid *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Homoptera: Aphididae)

REN Shao-Peng[1,2**] YANG Fan[1] GAO Ming-Qing[1] PU De-Qiang[1]
YE Gong-Yin[1] SHI Min[1] CHEN Xue-Xin[1***]

(1. State Key Laboratory of Rice Biology and Ministry of Agriculture Key Laboratory of Agricultural Entomology, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China)

Abstract **[Objectives]** To assess the potential ecological risk of transgenic rice plants to a non-target pest; the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). **[Methods]** The behavioral responses of aphids to volatiles of rice seedling were studied in a Y-tube olfactometer, and physiological responses of aphids to volatiles was analyzed with EPG. **[Results]** Non-transgenic rice lines were more attractive to aphids than transgenic rice but this difference was not significant. The response time of aphids to non-transgenic rice lines was longer than that for transgenic rice lines. Aphids preferred KMD1 to KMD2. The percentage of accumulated duration (E1), which reflects the proportion of time that aphids secreted saliva into rice phloem, was significantly higher on KMD2 than on XS11. The percentage of accumulated duration (np), which reflects the proportion of time that aphids spent moving to feeding sites, was significantly lower on 223F-S21 than on XS134. There was no significant difference in feeding behavior between G8-7 and XS110. **[Conclusion]** Two tested transgenic rice lines (KMD2 and 223F-S21) have no obvious adverse effects on the feeding behavior of *R. maidis*.

Key words *Rhopalosiphum maidis*, transgenic rice, Y-tube olfactometer, EPG, feeding behavior

---

*资助项目 Supported projects：转基因生物新品种培育重大专项（2011ZX08011-006）

**第一作者 First author，E-mail：renshaopeng0522@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xxchen@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2017-12-20，接受日期 Accepted：2018-05-12

作为世界范围内人们普遍食用的作物之一，水稻在中国的栽培历史已经超过了 7000 年（Zong *et al.*，2007；Chen *et al.*，2011）。然而，一些水稻害虫，像二化螟 *Chilo suppressalis*（Walker）、三化螟 *Scirpophaga incertulas*（Walker）、大螟 *Sesamia inferens*（Walker）和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（Guenée），每年都造成了水稻产量的巨大损失（Savary *et al.*，2000；Chen *et al.*，2006）。尽管大量的杀虫剂已被用来防治这些害虫，但是由于长期的使用不但导致了害虫抗药性的出现，还造成了严重的环境污染。在这样的背景下，1989 年中国农业科学院的科学家利用聚乙二醇获得了首个转基因抗虫水稻品种，其表达在 CaMV 35S 启动子控制下的 Bt delta 内毒素基因（杨虹等，1989）。Bt 水稻为我们带来的生产成本降低、节省劳动力和减少农药使用量等优点显而易见，但是，它的出现也可能产生一些潜在的生态风险和弊端，比如对非靶标害虫及天敌可能产生负面影响、靶标害虫产生抗性和基因漂移等。

在大多数农田生态系统中，蚜虫（Hemiptera: Aphididae）是较为常见的一类植食性昆虫，是许多常见的捕食性和寄生性天敌昆虫，比如草蛉（Neuroptera: Chrysopidae）、食蚜蝇（Diptera: Syrphidae）和瓢虫（Coleoptera: Coccinellidae）等的主要甚至是专一的食物（Romeis and Meissle，2011），同时其排泄物蜜露也是一些节肢动物的重要能量来源（Hogervorst *et al.*，2007；Lawo *et al.*，2009；Zhang，2012），因此蚜虫经常作为指示性生物用于转基因作物的环境风险评价。在之前的研究中，大部分集中在转基因作物对蚜虫生命历期、产卵量、存活率以及种群动态等的影响上，而有关取食行为的报道甚少。相关研究也只有陈茂等（2003，2004）评价了抗虫转基因水稻对褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Homptera: Delphacidae）取食行为的影响。鉴于此，本研究以不同抗虫转基因水稻材料在室内利用 Y-型嗅觉仪和 EPG 技术对其非靶标害虫-玉米蚜取食行为的影响进行了研究，以评判转基因抗虫水稻的种植在有效控制螟虫等靶标害虫的同时是否有引起蚜虫危害加重的潜在风险。

1　材料与方法

1.1　供试水稻品种

转 Cry1Ab 基因的水稻由浙江大学和加拿大渥太华大学合作培育，其亲本材料为粳稻品种秀水 11（XS11），双元载体为 PKUB，其 TDNA 区内含有来自玉米的启动子 Ubiquition 驱动的 *Cry1Ab* 基因，以及由启动子 CaMV35S 驱动的抗潮霉素（Hygromycin）的 *hpt* 基因和抗卡那霉素的 *npt II* 基因以及 *gus* 基因，所用农癌杆菌菌株为 EHAl05，MOG301 和 MOG101，通过农癌杆菌介导法将双元载体导入粳稻幼穗愈伤组织中，然后经过在含有不同浓度潮霉素的培养基上进行数次筛选，获得一批转 *Cry1Ab* 基因水稻株系，通过专家组鉴定命名为“克螟稻”（KMD1 和 KMD2）（舒庆尧等，1998；项友斌等，1999）。

抗虫抗除草剂转基因水稻 223F-S21 及非转基因亲本品系秀水 134（XS134）。该转基因水稻导入抗草甘膦基因 G10evo-EPSPS 及抗虫基因 Cry1Ab-Cry1Ie （融合基因）。

抗虫抗除草剂转基因水稻 G8-7 及非转基因亲本品系秀水 110（XS110）。该转基因水稻由一个融合基因 Cry1Ab-Vip3DA、玉米泛素启动子（ZmUbi-1）、玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）终止子连接形成抗虫基因表达框。这个表达框被克隆到以抗草甘膦基因 G170 为筛选标记的 T-DNA 水稻转化载体中，获得了抗虫抗草甘膦的水稻转化载体 1300-Ubi-crylAbvip3DA-G170。通过农杆菌介导法将这个 T-DNA 转入到水稻中，获得抗虫抗除草剂转基因水稻。

1.2　供试虫源

供试昆虫玉米蚜来自实验室饲养的种群。玉米蚜最初采自浙江大学实验农场水稻田，然后连续饲养在非转基因水稻品系 XS134 上，水稻和玉米蚜均放入人工培养箱内（L14∶D10，（28±1）℃，RH 60%-80%）。

1.3 取食选择性的确定

玉米蚜的取食行为采用 Y-型嗅觉仪测定，以玻璃筒作味源瓶，内盛不同处理的水稻苗。嗅觉仪的两臂及直管均长 10.0 cm，内径 1.5 cm，内壁夹角 75°，嗅觉仪置于一前方敞开的半透明长方橱内，在其后方约 25 cm 处置水平放置 2 只 30 W 日光灯平衡照明。Y-型嗅觉仪两臂分别通过 Teflon 管与味源瓶相连。在气流进入味源瓶之前，先经过一个活性炭过滤器（Φ1.8 cm×10 cm）和一个蒸馏水瓶，以净化空气和增加空气的湿度。每臂的气流量通过气体流量控制在 250 mL/min。生测时，通过软毛笔，将玉米蚜逐头引入嗅觉仪的直管中，后观察记载 5 min 内玉米蚜的行为反应。

选择标准如下：当某蚜虫爬至超过某臂 3 cm 处并持续 1 min 以上或到达出口处者，就记该蚜虫对臂的气味源作出选择。如蚜虫引入后 5 min，仍不作出选择，则结束对该蚜虫的行为观察．并记为不反应。整个生测过程在（27±2）℃的室内进行，测定时间为 8:00-16:00。每测定 5 头，用 95%乙醇清洗嗅觉仪并用热风吹干，冷却。每测定 10 头调换嗅觉仪位一次。每个处理设 3 个重复，每个重复 30 头蚜虫。当更换处理时，用去污粉清洁整个装置，并用 95%乙醇清洗、吹干。

1.4 取食行为的检测

刺探电位放大器是由荷兰 Wageningen 大学昆虫实验室研制的 Giga-4 型直流放大器，试验用水基银胶、铜钉、铜丝、金丝均为购买仪器附带。实验时，先用导电胶将玉米蚜成虫的背部与昆虫电极自由端粘合。电极自由端为直径为 10 μm，长 5 cm 的金丝。粘合过程中，先用冰将其麻醉，避免玉米蚜活动。与玉米蚜粘合后，让玉米蚜接触水稻的茎秆部分，把连有玉米蚜的电极插入放大器的输入探头。放大器的水稻电极（直径约 3 mm，长约 10 cm 的铜棒） 插在待测水稻的营养液中。刺探电位波形的信号与计算机连接并记录。每个水稻品系处理连续记录 8 h，重复 10-12 次。玉米蚜 EPG 波形的鉴定依据 Tjallingii（1988）的描述。np 波：移动和寻找取食位点；C 波：刺探行为；E1 波：分泌唾液到韧皮部筛管；E2 波：从韧皮部取食；G 波：木质部取食。

1.5 数据统计分析

EPG 数据分析使用 STYLET2.5 软件。数据处理采用 SPSS 19.0（SPSS for Windows version 19.0，SPSS Inc.，Chicago，IL）。数据的比较采用 One-Way ANOVA 进行分析。

2 结果与分析

2.1 取食选择性比较

在转基因水稻 KMD1、KMD2 和对照 XS11 之间，玉米蚜选择非转基因水稻较多，但是差异不显著（P>0.05）。而在两个转基因水稻品系（KMD1 和 KMD2）之间玉米蚜极显著的选择 KMD1（P<0.01）。在 223F-S21 和 XS134 以及 G8-7 和 XS110 之间，玉米蚜也是选择非转基因水稻较多，但是差异不显著（P>0.05）（表 1）。

玉米蚜对各水稻品系的反应时间如表 2 所

表 1 玉米蚜对不同水稻品系的选择行为反应

Table 1 Attractive response of *Rhopalosiphum maidis* to different rice lines

处理 Treatment	XS11 vs KMD1		XS11 vs KMD2		KMD1 vs KMD2		XS134 vs 223F-S21		XS110 vs G8-7	
蚜虫数量 Number of aphid	14.3±1.86	13.7±1.33	15.3±0.88	13.0±0.58	16.7±0.33**	12.0±0.00	14.7±0.88	13.3±0.88	15.3±1.20	13.7±0.88

图中数据为平均值±标准误。**表明在水稻品系之间差异达到极显著（One way ANOVA；P<0.01）。

Data are mean ± standard error, and followed by ** indicate significant difference among different treatments at 0.01 level by One way ANOVA test.

表 2　玉米蚜对不同水稻品系的反应时间

Table 2　Response time of *Rhopalosiphum maidis* to different rice lines

	处理 1 Treatment 1			处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3	
水稻品系 Rice lines	KMD1	KMD2	XS11	223F-S21	XS134	G8-7	XS110
反应时间 Response time (s)	153.2±7.77ab	145.47±7.48b	172.1±8.00a	169.7±7.24	181.3±9.12	179.8±8.37	196.2±10.4

图中数据为平均值±标准误。数据后标有不同字母的水稻品系间差异达显著水平（One way ANOVA；$P<0.05$）。下表同。

In the figure, the data are mean ± standard error, and followed by different lowcase letters indicate significantly different from each other (One way ANOVA; $P<0.05$). The same below.

示，在 KMD1、KMD2 和 XS11 之间，玉米蚜对 KMD2 的反应时间显著地低于 XS11（$P<0.05$），总体上则是 XS11＞KMD1＞KMD2；在另外两对处理之间，反应时间都是非转基因水稻大于转基因水稻，但是差异不显著（$P>0.05$）。

2.2　玉米蚜 EPG 参数分析

E1 波累计持续时间的百分比反映了蚜虫花费在将唾液分泌到韧皮部筛管的时间所占的比例，这一点在 KMD2 和 XS11 之间存在显著差异（KMD2＞XS11）（$P<0.05$）；而 np 波累计持续时间的百分比则反映了蚜虫花费在移动和寻找取食位点上的时间所占的比例，这一点在 223F-S21 和 XS134 之间存在显著差异（223F-S21< XS134）（$P<0.05$）（表 3）。玉米蚜在 G8-7 和 XS110 上的取食行为没有显著的差异（$P> 0.05$）（表 3，表 4）。

3　讨论

刺吸式口器昆虫对寄主植物的选择和取食行为，长期以来一直是国内外昆虫学家研究的重要内容，这对研究此类昆虫的取食、传毒行为，了解植物抗虫机制和昆虫寄主选择机制有着重

表 3　玉米蚜在不同水稻品系上 8 h 内不同波累计时间的百分比（%，平均值±标准误）

Table 3　Percentage of the accumulative duration of waveform of *Rhopalosiphum maidis* measured by 8 h EPG recordings on different rice lines (%, mean±SE)

	处理 1 Treatment 1			处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3	
	KMD1	KMD2	XS11	223F-S21	XS134	G8-7	XS110
np	44.08±16.32	26.11±5.77	24.51±14.66	22.11±3.54b	42.78±7.52a	25.75±9.73	22.73±6.61
C	36.43±13.13	31.71±10.29	47.96±12.90	31.82±4.46	34.83±2.73	45.56±7.96	50.22±9.17
E1	9.74±0.67ab	12.46±0.81a	4.73±2.52b	7.64±2.46	14.36±4.67	13.49±6.28	17.78±4.83
E2	1.91±0.67	28.28±15.35	18.92±11.79	20.10±8.20	3.07±2.39	4.27±3.65	5.70±2.99

表 4　玉米蚜在不同水稻品系上 8 h 的不同波的平均值（±标准误）

Table 4　Mean (±SE) number of waveform of *Rhopalosiphum maidis* measured by 8 h EPG recordings on different rice lines

	处理 1 Treatment 1			处理 2 Treatment 2		处理 3 Treatment 3	
	KMD1	KMD2	XS11	223F-S21	XS134	G8-7	XS110
np	13.00±4.62	9.33±2.85	6.80±1.62	6.00±0.44	8.00±0.95	7.20±1.59	8.00±1.63
C	21.67±7.80	19.67±5.93	13.00±3.45	15.71±1.69	17.60±2.40	14.20±2.85	17.14±3.64

要的意义。本文则通过研究玉米蚜在不同水稻品系上的取食行为，来反映外源基因的插入可能给植物带来的变化，从而判定转基因植物的生态风险。

研究结果表明，就取食选择性而言，在各转基因水稻品系与其对照之间，除了玉米蚜对 KMD2 的反应时间显著地低于 XS11 外，其余差异均不显著。基本上可以认为，转基因水稻对非靶标害虫玉米蚜的取食选择性不存在影响。这一结果在另一刺吸式害虫褐飞虱中也得到了验证，陈茂等（2003，2004）的研究也表明褐飞虱对转基因抗虫水稻的选择性与对照间无显著差异。

EPG 记录的结果发现玉米蚜在 223F-S21 上的 np 波百分比较小，在 KMD2 上 E1 波的百分比较大，说明蚜虫在转基因水稻上寻找合适的刺吸位置花费的时间更短，并且分泌到韧皮部筛管内的唾液较多，有利于蚜虫的取食。同样地，Liu 等（2005）的研究结果也发现棉蚜 *Aphis gossypii*（Glover）在转基因 Bt 棉花上的 np 波百分比较小。这可能是由于转基因作物的某些组织结构特点更适合蚜虫的取食。Lumbierres 等（2004）就报道了 Bt 玉米对禾谷缢管蚜的定殖有一定的促进作用。此外，一些研究也发现蚜虫在转基因作物上有着更高的繁殖率（Liu *et al.*，2005；Faria *et al.*，2007；Kim *et al.*，2012），这可能和蚜虫的取食有关。

综合本研究实验结果，转基因水稻可能更有利于玉米蚜的取食，但这是否完全因为外源基因的插入而导致水稻组织结构发生变化，尚不能肯定。植物与植食性昆虫间的相互作用关系相当复杂，寄主植物对昆虫行为的影响往往是多种因素共同作用的结果（Visser，1986），其中植物的株型、生育期等均可以对植食性昆虫的寄主定向及取食行为产生一定的影响（Smyth *et al.*，2003），因此具体的原因则需进一步研究确定。有关转基因水稻有利于玉米蚜的取食，是否能引起繁殖率的提高，从而导致在田间种群密度的增加，使其上升为主要害虫，也需要在田间更加深入的调查验证。

参考文献 (References)

Chen M, Shelton A, Ye GY, 2011. Insect-resistant genetically modified rice in China: from research to commercialization. *Annual Review of Entomology*, 56: 81–101.

Chen M, Ye GY, Hu C, Datta SK, 2003. Effects of transgenic Bt *indica* rice on the feeing and oviposition behavior of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 30(4): 365–370. [陈茂, 叶恭银, 胡萃, Datta SK, 2003. Bt 籼稻对褐飞虱取食、产卵行为的影响. 植物保护学报, 30(4): 365–370.]

Chen M, Ye GY, Yao HW, Hu C, Shu QY, 2004. Evaluation of the impact of insect-resistant transgenic rice on the feeding and oviposition behavior of its non-target insect, the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homptera: Delphacidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (2): 222–226. [陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 胡萃, 舒庆尧, 2004. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食与产卵行为影响的评价. 中国农业科学, 37(2): 222–226.]

Chen M, Zhao JZ, Ye GY, Fu Q, Shelton A, 2006. Impact of insect-resistant transgenic rice on target insect pests and non-target arthropods in China. *Insect Science*, 13(6): 409–420.

Faria CA, Wäckers FL, Pritchard J, Barrett DA, Turlings TC, 2007. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. *PLoS ONE*, 2: e600.

Hogervorst PAM, Wäckers FL, Romeis J, 2007. Detecting nutritional state and food source use in field-collected insects that synthesize honeydew oligosaccharides. *Functional Ecology*, 21(5): 936–946.

Kim YH, Hwang CE, Kim TS, Lee JH, Lee SH, 2012. Assessment of potential impacts due to unintentionally released Bt maize plants on non-target aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(3): 443–446.

Lawo NC, Wäckers FL, Romeis J, 2009. Indian Bt cotton varieties do not affect the performance of cotton aphids. *PLoS ONE*, 4: e4804.

Liu XD, Zhai BP, Zhang XX, Zong JM, 2005. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. *Ecological Entomology*, 30(3): 307–315.

Lumbierres B, Albajes R, Pons X, 2004. Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. *Ecological Entomology*, 29(3): 309–317.

Romeis J, Meissle M, 2011. Non-target risk assessment of Bt crops -

Cry protein uptake by aphids. *Journal of Applied Entomology*, 135(1/2): 1–6.

Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Castilla NP, Teng PS, 2000. Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. *Plant Disease*, 84(3): 357–369.

Shu QY, Ye GY, Cui HR, Xiang YB, Gao MW, 1998. Development of transgenic *Bacillus thuriengiensis* rice resistant to rice stem borers and leaf folders. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 24 (6): 579–580. [舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 项友斌, 高明尉, 1998. 转基因水稻“克螟稻”选育. 浙江农业大学学报, 24(6): 579–580.]

Smyth RR, Hoffmann MP, Shelton AM, 2003. Effects of host plant phenology on oviposition preference of *Crocidolomia pavonana* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 32(4): 756–764.

Tjallingii WF, 1988. Electrical recording of stylet penetration activities// Minks A, Harrewijn P (eds.). Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control. Amsterdam: Elsevier Science. 95–108.

Visser JH, 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31: 121–144.

Xiang YB, Liang ZQ, Gao MW, Shu QY, Ye GY, Cheng XY, Altosaar I, 1999. Agrobacterium-mediated transformation of insecticidal *Bacillus thuringiensis cryIA (b)* and *cryIA (c)* genes and their expression in rice. *Chinese Journal of Biotechnology*, 15(4): 494–500. [项友斌, 梁竹青, 高明尉, 舒庆尧, 叶恭银, 成雄鹰, I. Altosaar, 1999. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIA (b)*和 *cryIA (c)*在水稻中的遗传转化及蛋白表达. 生物工程学报, 15(4): 494–500.]

Yang H, Li JX, Guo SD, Chen XJ, Fan YL, 1989. Transgenic rice plants produced by direct uptake of δ-endotoxin protein gene from *Bacillus thuringenesis* into rice protoplasts. *Scientia Agricultura Sinica*, 22(6): 1–5. [杨虹, 李家新, 郭三堆, 陈学军, 范云六, 1989. 苏云金芽孢杆菌δ-内毒素基因导入水稻原生质体后获得转基因植株. 中国农业科学, 22(6): 1–5.]

Zhang JH, Guo JY, Xia JY, Wan FH, 2012. Long-term effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton on the non-target *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) maintained for multiple generations. *African Journal of Biotechnology*, 11(41): 9873–9880.

Zong, Y, Chen Z, Innes JB, Chen C, Wang Z, Wang H, 2007. Fire and flood management of coastal swamp enabled first rice paddy cultivation in east China. *Nature*, 449(7161): 459–462.