人工饲料、转 Bt 水稻及其亲本稻苗饲养下二化螟种群适合度的比较研究*

徐艳博[1] 王孟伦[2] 韩兰芝[3] 陈法军[1]**

(1. 南京农业大学植物保护学院昆虫系 昆虫信息生态研究室 南京 210095; 2. 南京农业大学食品科技学院 南京 210095;3. 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193)

摘 要 以人工饲料、转 Bt 水稻"克螟稻"(*cry1Ab* 纯和基因型)及其对照亲本"秀水 11"稻苗为供试寄主植物开展二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker)1~5 龄幼虫的室内饲养试验,以明确不同龄期二化螟种群的生活史参数。试验结果表明:二化螟在低龄时死亡率最高。克螟稻对二化螟各个龄期表现出高抗性,其各个龄期在克螟稻上均不能化蛹,随着龄期的增加二化螟的耐受性增强。以秀水 11 和人工饲料饲养二化螟对其蛹期、成虫期、单雌产卵量、羽化率的影响无显著性差异,以人工饲料饲养的二化螟蛹重显著高于以秀水 11 饲养的二化螟的蛹重,蛹重与人工饲料饲养时间呈正相关。与秀水 11 幼苗相比,人工饲料饲养下有利于二化螟雌虫的分化。

关键词 二化螟,人工饲料,转 Bt 水稻,常规水稻,生活史参数

The suitability of *Chilo suppressalis* reared on artificial diet, seedings of transgenic Bt rice and nontransgenic rice

XU Yan-Bo[1] WANG Meng-Lun[2] HAN Lan-Zhi[3] CHEN Fa-Jun[1]**

(1. Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The effect of rearing of the 1st to 5th instar larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker), on artificial diet, seedlings of transgenic Bt rice with pure *cry1Ab* (cv. KMD), and the parent line nontransgenic rice (cv. XSD11), were assessed and compared. The results showed that the nymphs at lower instar stages had high mortality. Moreover, transgenic Bt rice was highly resistant to all instar larvae, especially the younger instar individuals. Moreover, there were no significant differences in the duration of the pupal or adult stages, fecundity and molting rates of larvae reared on XSD11 and the artificial feed. Furthermore, the pupal weight as larvae fed on the artificial diet was significantly higher than that as fed on nontransgenic rice, and larvae fed the artificial diet displayed a positive relationship between pupal weight and rearing time. Compared to nontransgenic rice, artificial feeds were more beneficial and advantageous for the differentiation of *C. suppressalis* females.

Key words *Chilo suppressalis*, artificial feed, transgenic bt rice, nontrsansgenic rice, life-history indexes

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 是我国水稻上的常发性害虫,属鳞翅目,螟蛾科,广泛分布于亚洲温带和亚热带稻区。国内分布北起黑龙江,南抵海南省,东自台湾,西至新疆的昌吉和乌鲁木齐,但以长江流域及以南各省的丘陵山区发生较重。寄主除水稻外,还有茭白、野茭白、玉米、甘蔗、稗草、游草等禾本科植物,早春越冬幼虫还能为害麦苗、蚕豆、油菜、绿肥等。为害水稻形成

* 资助项目:国家基础发展规划"973"项目(2010CB126200)、国家公益性行业(农业)科研专项项目(200903051)、转基因生物新品种培育重大专项课题(2011ZX08012-005 和 2012ZX08011002)、国家自然科学基金(31272051)和教育部霍英东基金"全球气候变化下转 Bt 作物氮肥优化管理及其害虫控制技术研究"(122033)。

**通讯作者,E-mail: fajunchen@njau.edu.cn

收稿日期:2012-01-04,接受日期:2012-02-17

枯鞘、枯心、白穗、枯孕穗和虫伤株等症状(丁锦华和苏建亚,2002)。我国每年因为二化螟危害的受害面积约达 1 000 万 hm^2。近年来,由于种植结构调整和耕作制度改变,以及品种更替和抗药性上升等原因,二化螟种群数量呈回升趋势(何忠全等,2004)。水稻品种对二化螟的抗性或感性程度直接影响该种群的消长,培育和栽培抗虫品种是控制水稻害虫最经济、最有效的途径。而转基因抗虫技术就是培育水稻抗性品种的一条快速、有效,且目的性强的前沿育种技术(李向辉和朱祯,1998)。

目前,世界范围内已成功培育出多个转基因水稻抗虫品种(系)(Fujimoto *et al.*,l993; Cannon, 2000; Shu *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001a, 2001b; 韩兰芝等,2006)。克螟稻(KMD)系用农杆菌介导法将 *Cry1Ab* 导入粳稻品种秀水 11(XSD11),经多代选育而成,并对二化螟等鳞翅目害虫具有很强的抗性(舒晓庆等,1998)。寄主水稻是二化螟生长发育的重要影响因子,对其生长发育、存活和繁殖等均有重要影响。田间自然条件下的抗性调查表明:克螟稻对二化螟具有极强的抗性,二化螟初孵幼虫致死率可达 100%(吴刚等,2001)。但不同龄期二化螟幼虫是否会对转 Bt 水稻及其对照亲本的适应性表现差异,这直接影响到生产中二化螟种群危害程度预测的准确性。本研究以成熟的人工饲料饲养下的二化螟室内种群为供试虫源,利用转 Bt 水稻"克螟稻"及其对照亲本"秀水 11"分别饲养 1 ~5 龄二化螟幼虫,以评价不同龄期二化螟试验种群的生活史参数,为转 Bt 水稻的靶标抗虫性和大田二化螟种群消长模型提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试二化螟

本试验所需供试二化螟为实验室种群,由南京农业大学植保学院昆虫分子实验室提供,室内用人工饲料(韩兰芝等, 2006)连续饲养 2 代,供实验接种用。

1.2 实验方法

将室内饲养过程中收集的二化螟卵块放置于垫有湿润定性滤纸的培养皿中。按 1.2.1 和 1.2.2 方法进行饲养和繁殖。

1.2.1 人工饲料饲养法 以透明塑料保鲜盒(20 cm × 10 cm × 8 cm)作为养虫工具,洗净、消毒并晾干,备用。由于二化螟幼虫饲养密度对其生长发育无显著影响,参考尚稚珍等(1979)方法。把制备好的人工饲料切成约厚 0.2 mm、长 30 mm、宽 15 mm 的长方体放在养虫瓶的底部铺满为宜。每瓶接入 200 头初孵幼虫,用黑布封口,放置在温度 28 ℃,光周期 L: D = 16: 8,湿度 85% 的光照培养箱中。待发育到 3 ~4 龄时转入提前消毒晾干的指型管内,每管接入 3 ~4 头,管内放一块约 20 mm 高底面积与指型管相似的人工饲料,并用灭菌棉塞封口。把变黑即将羽化的蛹放在产卵笼(35 cm × 35 cm × 50 cm)中,其中放置 2 ~3 盆 45 d 日龄的稻苗供二化螟栖息和产卵,并饲以 10% 的蜂蜜水,每 1 ~2 d 收集卵块一次。

1.2.2 稻芽饲养法 取精选的秀水 11 和克螟稻新稻种,30℃下清水浸泡 24 h,再于 28℃下催芽 48 h,浸种和催芽过程中换水 2 ~3 次,以保证有充足的氧气和水分,待稻芽长到 2 ~3 cm 时备用。把同一天孵化的二化螟初孵幼虫分别接到秀水 11 和克螟稻上,每处理 5 个重复,每重复接入 50 头初孵幼虫。此外,用人工饲料把二化螟分别饲养至 1 龄、2 龄、3 龄、4 龄、5 龄,再将不同龄期的二化螟幼虫分别接到转 Bt 水稻及其对照亲本上,每处理 5 个重复,2、3 龄处理每重复接入 30 头,4 龄处理接入 20 头,5 龄处理接入 15 头(以减小实验误差)。5 d 更换一次新鲜稻苗,饲养至化蛹。所有稻苗更换过程都均为装有新旧稻苗瓶口对接,瓶口的对接处和老稻苗瓶底上用黑布包裹,用黑暗和光照使幼虫自然转移,以防人工转移操作过程对幼虫的机械损伤。

1.3 定时观察

每天间隔 8 h 观察各个处理中各重复二化螟幼虫的发育进度,直至化蛹或死亡,记录存活率、蛹重、蛹期、成虫期、产卵量、孵化率等指标。

1.4 统计分析

用 SAS 6.12 统计软件进行试验数据的统计分析。调查期间,不同龄期二化螟幼虫累计存活时间和累计存活率均采用成对 t 检验(Group-Paired t test)进行统计分析($P < 0.05$)。此外,各处理蛹重、蛹期、成虫期、卵期、孵化率、单雌产卵量、存活率、羽化率和雌雄性比等均采用 LSD-Test ($P < 0.05$)。统计分析前对绝对值数据进行对数

转换,对百分比数据进行反正弦平方根转化,以符合正态分布假设。

2　结果与分析

2.1　转 Bt 水稻及其对照亲本饲养下各龄期幼虫累计存活时间比较

图 1 表明:转 Bt 水稻幼苗饲养下,二化螟幼虫的累计存活时间随龄期增加而延长;亲本对照上二化螟各龄期累计存活时间则无此趋势,其中,2 龄幼虫的累计存活时间最长,4 龄次之,1 龄的累计存活时间最短。二化螟各龄期幼虫在转 Bt 水稻上的累计存活时间均存在显著性差异($P < 0.05$,图 1);而在对照亲本上,除 3 龄、4 龄幼虫外其他龄期处理间均存在显著性差异($P < 0.05$,图 1);同时,与对照亲本水稻相比,转 Bt 水稻饲养下,除 5 龄幼虫外其余各龄期幼虫累计存活时间均显著降低,降幅高达 43.9% ~81.4%($P < 0.05$,图 1),而 5 龄幼虫累计存活时间显著延长了 84.8%($P < 0.05$,图 1)。

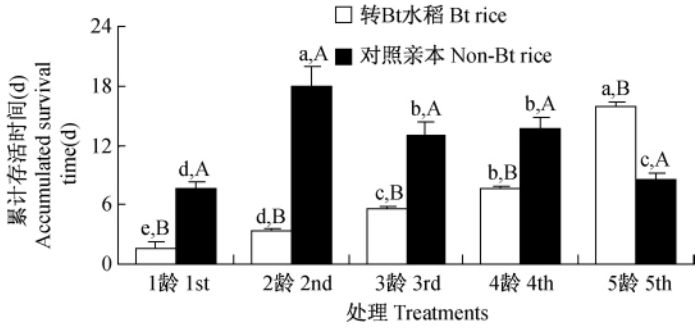

图 1　转 Bt 水稻及其对照亲本饲养下不同龄期二化螟幼虫累计存活时间(d)

Fig. 1　The accumulated survival time of different instar larvae of stem borer, *Chilo suppressalis* reared on transgenic Bt rice (cv. Kemingdao) and the parental control nontransgenic rice (cv. Xiushui-11)

不同小写字母和不同大写字母分别表示同一水稻处理不同龄期饲养下,以及同一龄期转 Bt 水稻及其对照亲本饲养下幼虫累计存活时间差异显著(LSD 检验,$P < 0.05$)。

Histograms with different lowercase and uppercase letters indicate significant difference between different larval instars as reared on same rice cultivar, and between Bt rice and non-Bt rice for same larval instar, by LSD test at 0.05 level, respectively.

2.2　转 Bt 水稻及其对照亲本饲养下二化螟幼虫各龄期平均累积存活率曲线差异分析

由图 2(A)可知:转 Bt 水稻幼苗饲养下,二化螟各龄期均不能化蛹。低龄幼虫饲养初期死亡率较高,尤以初孵龄幼虫最为明显,2 d 内累计死亡率高达 100%,而高龄幼虫初期死亡率相对较低,且以 5 龄幼虫最为明显。图 2(B)表明:常规对照稻苗饲养下,低龄幼虫的累计存活率快速降低,发育至高龄时趋于平缓;低龄时死亡率较高,随着龄期的增加死亡率逐渐减低。统计分析表明,转 Bt 水稻及其对照亲本稻苗饲养下,不同龄期饲养处理间幼虫累计存活率差异均达显著水平($P < 0.05$);与对照亲本水稻相比,转 Bt 水稻饲养下 1 ~5 龄幼虫的累计存活率均显著增加($P < 0.05$,图 2)。

2.3　常规水稻饲养和人工饲料饲养下二化螟生活史参数研究

从表 1 可以看出:秀水 11 稻苗和人工饲料饲养的二化螟在蛹期、成虫期、羽化率之间无显著性差异,秀水 11 稻苗饲养不同龄期的二化螟在蛹期、成虫期、单雌产卵量和羽化率之间无显著差异($P < 0.05$,表 1)。人工饲料饲养的二化螟蛹重高达 0.0593 g,显著高于秀水 11 稻苗饲养的不同龄期处理的二化螟的蛹重($P < 0.05$,表 1),且二化螟的蛹重随着人工饲料饲养时间长短而变化,蛹重与人工饲料饲养时间呈正相关。同时,从表 1 中也可以看出人工饲料饲养的二化螟雌雄性比为 1.51,显著高于以秀水 11 稻苗饲养的二化螟各个龄期中雌雄性比的最大值 0.78($P < 0.05$,表 1),与秀水 11 幼苗相比,人工饲料有利于二化螟雌虫的分化。

表 1　常规水稻饲养不同龄期二化螟的生命参数

Table 1　The life history parameters of different instar larvae of *Chilo suppressalis* reared on nontransgenic rice

生命参数 Life indexes	不同龄期处理 The treatments of different instars					人工饲料饲养 Artificial diets
	1 龄 1st instar	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar	
蛹重 Pupal weight (g)	0.0433 ± 0.0004d	0.0460 ± 0.0006c	0.0466 ± 0.0005c	0.0486 ± 0.0003b	0.0486 ± 0.0004b	0.0593 ± 0.0059a
蛹期 Pupal stage (d)	6.61 ± 0.08a	6.54 ± 0.06a	6.48 ± 0.05a	6.50 ± 0.02a	6.50 ± 0.09a	6.53 ± 0.10a
成虫期 Adult stage (d)	3.71 ± 0.19a	3.72 ± 0.21a	3.82 ± 0.11a	3.97 ± 0.20a	3.99 ± 0.32a	4.01 ± 0.28a
卵期 Egg stage (d)	4.96 ± 0.15a	4.59 ± 0.15b	4.87 ± 0.14ab	4.73 ± 0.06ab	4 .73 ± 0.24ab	4.94 ± 0.11a
孵化率 Hatching rate (%)	87.98 ± 1.46ab	87.32 ± 0.75ab	83.22 ± 5.29b	84.02 ± 2.37ab	88.48 ± 1.03a	89.37 ± 0.85a
每雌产卵(粒) Eggs per female (heads)	147.40 ± 16.07b	152.78 ± 7.50b	155.61 ± 10.19b	158.55 ± 9.19b	155.71 ± 16.36b	237.88 ± 11.91a
存活率 Survival rate (%)	14.00 ± 1.10c	60.00 ± 5.08b	62.84 ± 8.25b	71.00 ± 4.00b	86.67 ± 5.58a	84.67 ± 2.29a
羽化率 Hatching rate (%)	97.78 ± 2.22a	97.50 ± 2.24a	97.08 ± 3.79a	98.75 ± 1.25a	96.91 ± 3.15a	97.01 ± 1.43a
雌雄性比 Sex ratio (females vs. males)	0.33 ± 0.07d	0.49 ± 0.07cd	0.78 ± 0.19b	0.61 ± 0.04bc	0.70 ± 0.18bc	1.51 ± 0.12a

注:同行数据后标有不同小写字母表示不同龄期饲养处理间差异显著(LSD 检验,$P<0.05$)。

Data followed by different lowercase letters in the same row indicate significant difference between different larval instars as reared on nontransgenic rice by LSD-test at 0.05 level.

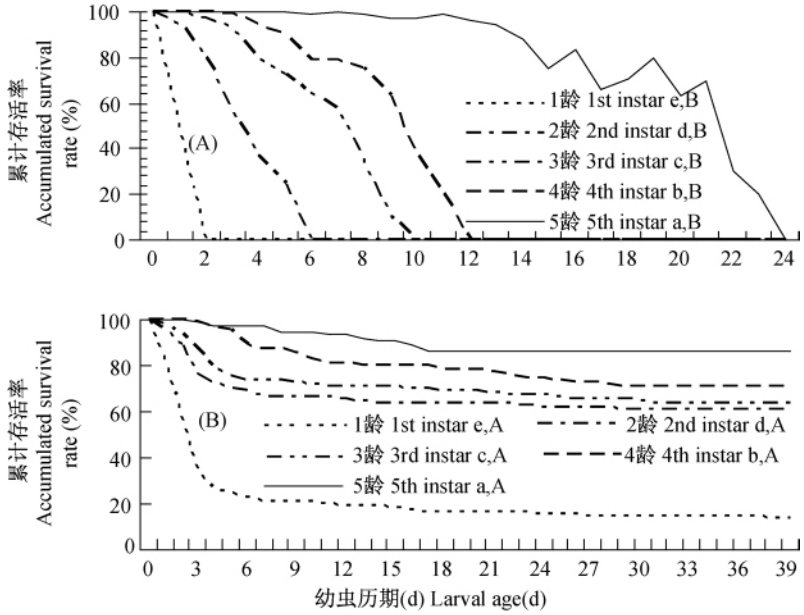

图 2　转 Bt 水稻(A)及其对照亲本(B)饲养下不同龄期二化螟幼虫累计存活率(%)

Fig. 2　The accumulated survival rates (%) of different instar larvae of stem borer, *Chilo suppressalis* reared on transgenic Bt rice (A) and the parental control nontransgenic rice (B)

不同小写字母和不同大写字母分别表示同一水稻处理不同龄期饲养下,以及同一龄期转 Bt 水稻及其对照亲本饲养下幼虫累计存活率差异显著(群体成对 t 检验,$P < 0.05$)。

Histograms with different lowercase and uppercase letters indicate significant differences between different larval instars as reared on same rice cultivar, and between Bt rice and non-Bt rice for same larval instar, by Group-paired t-test at 0.05 level.

3　讨论

二化螟幼虫低龄时的死亡率在整个生活史中是最高的,与寄主植物无关,随着龄期的增加二化螟幼虫对寄主的适应性也相应的增强。克螟稻对二化螟各个龄期都表现出高抗性,二化螟的各个龄期在室内恒温恒湿条件下以克螟稻幼苗饲养均不能化蛹。以人工饲料和秀水 11 饲养二化螟对它的蛹期、成虫期、羽化率的影响无显著性差异,以人工饲料饲养的二化螟蛹重和雌雄性比显著高于以秀水 11 饲养的二化螟的蛹重和雌雄性比,且蛹重与人工饲料饲养时间呈正相关。

二化螟的性比和蛹重是繁殖力的重要指标(孟凤霞等,2003),由于饲养方法不同,蛹重和性比都存在显著差异,人工饲料有利于二化螟雌虫的分化更适合室内饲养。实验中以转 Bt 水稻幼苗饲养初孵二化螟死亡率为 100%,与吴刚等(2001)做的克螟稻室内生物测定和大田实验对二化螟的初孵幼虫的致死率可达 100% 实验结果相一致。克螟稻中所含的 Cry1Ab 蛋白含量表现为根中含量相对较低,茎、叶及叶鞘中 CrylAb 蛋白含量相对较高。稻苗饲养二化螟幼虫,幼虫主要取食的是稻根,室内条件下 CrylAb 蛋白含量较低的稻苗的稻根表现出高抗性则茎、叶及叶鞘对二化螟抗性更强,这对防治二化螟害虫具有积极的意义。

本实验通过室内饲养试验系统研究了克螟稻对二化螟各个龄期的抗性,下一步要做的就是田间测定克螟稻对二化螟各个龄期的抗性,从而进一步了解克螟稻的抗虫特性。通过抗性效率评价、耐受性比较、抗性演化趋势分析及早期抗性检测技术的建立等多种手段,建立二化螟的种群动态演替预警预测模型,系统评价 *cry1Ab* 抗虫水稻农田生态系统中二化螟种群地位演替的生态风险;同时,研制种群演替风险评价的新方法新技术和新标准,为提高我国转基因抗虫水稻的可持续应用和健康发展及生物安全保障能力提供科技支撑。

参考文献(References)

Cannon RJC, 2000. Bt transgenic crops: Risks and benefits. *Integrat. Pest Manag. Rev.*, 5 (3): 151—173.

Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyozuka J, Shimamoto K, 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotechnol.*, 11 (10): 1151—1155.

Shu QY, Ye GY, Cui HR, Cheng XY, Xiang YB, Wu DX, Gao MW, Xia YW, Sardana R, 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breed.*, 6 (4): 433—439.

Ye GY, Shu QY, Yao HW, Cui HR, Cheng XY, Hu C, Xia YW, Gao MW, Altosaar I, 2001a. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *J. Econ. Entomol.*, 94 (1): 271—276.

Ye GY, Tu JM, Hu C, Datta K, Datta SK, 2001b. Transgenic IR72 with fused Bt gene *cry1Ab/cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions. *Plant Biotechnol.*, 18 (2): 125—133.

丁锦华，苏建亚，2002. 农业昆虫学南方本. 北京：中国农业出版社. 150—151.

韩兰芝，吴孔明，彭于发，吴孔明，林克剑，刘玉娣，2006. 转基因抗虫水稻生态安全性研究进展. 应用与环境生物学报，12 (3): 431—436.

何忠全，毛建辉，张志涛，禹盛苗，范永坚，俞晓平，黄炳超，陈其志，2004. 我国近年水稻重大病虫害可持续控制技术研究重要进展——非化学控害技术研究. 植物保护，30 (2): 23—27.

李向辉，朱祯，1998. 生物途径控制虫害. 科学通报，43 (19): 2025—2034.

孟凤霞，吴孔明，高希武，2003. 利用茭白、荸荠及水稻饲养二化螟的技术研究. 昆虫知识，40 (5): 469—472.

尚稚珍，王银淑，邹永华，1979. 二化螟饲养方法的研究. 昆虫学报，22 (2): 164—167.

舒晓庆，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.

吴刚，崔海瑞，舒庆尧，夏英武，高明尉，Altosaar I，2001. *cry1Ab* 范围在转基因“克螟稻”后代中的遗传稳定性及表达. 中国农业科学，34 (5): 496—501.