

转*cry1Ab/vip3H*基因水稻对非靶标害虫褐飞虱 连续多代生长发育与繁殖的影响

陈洋¹, 田俊策¹, 彭于发², 郭予元², 叶恭银^{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/农业部作物病虫害分子生物学重点开放实验室, 杭州 310029;

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: 实验室条件下, 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 生长发育与繁殖的继代效应评价结果表明, 不论是在苗期或是成株期, 在各水稻品种上连续饲喂褐飞虱 4 代后, 该虫各代的生长发育和繁殖参数都没有受到水稻品种的显著影响, 即不论是在第 1 代、第 2 代还是第 4 代, 取食 G6H1 与取食其非转基因亲本 Xiushui 110 相比, 褐飞虱若虫的发育时间、成虫寿命和产卵量都没有显著差异。同时, 2008 年和 2009 年的田间调查结果表明, G6H1 和 Xiushui 110 稻田间褐飞虱的若虫、成虫和成若虫总密度均无显著差异。

关键词: *cry1Ab/vip3H* 基因; 转基因水稻; 褐飞虱; 安全性评价

中图分类号: S435.112.3; S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2011)04-0490-08

Multi-generation Effects of Transgenic *cry1Ab/vip3H* Rice G6H1 on Development and Reproduction of the Non-target Pest, *Nilaparvata lugens* (Stål)

CHEN Yang¹, TIAN Jun-ce¹, PENG Yu-fa², GUO Yu-yuan², YE Gong-yin^{1*}

(1. Institute of Insect Sciences, State Key Laboratory of Rice Biology, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Zhejiang University, Hangzhou 310029; 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: Multi-generation effects of transgenic *cry1Ab/vip3H* rice G6H1 on development and reproduction of the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*, were evaluated under laboratory and field conditions. The laboratory results indicated that development and reproduction of the BPH were not affected by rice type, either in the rice seedling stage or the rice adult stage. Compared with BPH fed on non-transgenic parental rice Xiushui 110, nymph development, adult longevity and reproduction of BPH showed no significant difference in the 1st, 2nd and 4th generations, when BPH fed on G6H1, respectively. Field results of dynamics of BPH population showed that there was no significant difference in the average density of nymphs, adults or both between Xiushui 110 and G6H1 rice fields both in 2008 and 2009.

Key words: *cry1Ab/vip3H* gene; transgenic rice; *Nilaparvata lugens*; safety assessment

水稻是世界上最为重要的粮食作物之一, 在水稻生产过程中易受各种病虫害的严重侵袭, 常导致水稻减产。与其它水稻害虫相比, 螟虫造成的危害最高^[1], 年经济损失约 65 亿元人民币^[2]。为了有效控制这些水稻害虫的为害, 长期以来因未挖掘到天然抗螟虫的水稻种质资源而主要依靠化学农药进行防治, 但这却造成了日益严重的农药残留和环境污染等负面结果。随着基因工程技术的发展, 水稻抗螟虫成为可能。迄

收稿日期: 2011-01-04

基金项目: 国家重大基础研究发展计划(973)(2007CB109202); 国家转基因生物培育重大专项(2008ZX08011-01)

作者简介: 陈洋(1982-), 女, 博士, E-mail: chenyang-82@163.com; *通讯作者, E-mail: chu@zju.edu.cn。

今, 已成功培育并获得了多个含有 *Bt-cry* 单基因的抗鳞翅目害虫的水稻抗性品系^[3]。而出于靶标害虫抗性治理的考虑, 多基因复合性状的转基因水稻已成为未来发展的趋势^[4]。营养期杀虫蛋白 (Vips) 是 *Bt* 营养期的一种与 *Cry* 蛋白具有不同杀虫机制的非晶体状胞外杀虫蛋白^[5], 对鳞翅目昆虫也具有很广的杀虫谱^[6], 被认为是除 *Cry* 蛋白外进行转基因水稻抗螟虫研究中杀虫蛋白源的另外一个选择^[7]。目前, 这种新型的复合性状转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻已研制成功, 并对二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 和大螟 *Sesamia inferens* (Walker) 表现出良好的抗虫性^[8]。

转基因抗虫作物对非靶标害虫的影响是转基因抗虫作物安全性评价的重要内容之一^[9]。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 是温带和热带水稻田间最主要的害虫之一, 该虫取食水稻茎秆的韧皮部^[10], 造成叶片枯萎和稻穗变白形成“枯心”^[11], 易暴发成灾^[12], 因此是转 *Bt* 基因水稻种植过程中需要重点检测的非靶标对象。目前, 关于转基因水稻对褐飞虱生物学特性影响的研究虽然有所开展, 如 Bernal 等^[13]研究表明转 *cry1Ab* 基因水稻和转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因水稻对褐飞虱的发育历期、存活率和成虫体重都没有显著影响, 但研究结果仅限于 1 代。然而在田间该虫在江浙一带每年发生 4 代^[14], 1 代的结果不能完整地模拟田间的情况。为了更为全面地评价转基因水稻对褐飞虱的影响, 本文在试验室条件下, 研究转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 对褐飞虱连续多代生长发育和繁殖特性的影响, 并进一步结合该虫在稻田间的种群动态变化, 较为全面系统地评价该水稻材料的环境释放对褐飞虱的生态安全性, 旨在探索一套转基因水稻对非靶标生物褐飞虱持续评价的有效体系。

1 材料与方法

1.1 供试水稻

供试转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻为处于 R_1 代的粳稻纯合品系 G6H1。该品系源于独立的含有 *cry1Ab/vip3H* 基因和玉米 *Ubiquitin* 启动子的 R_0 代转化株, 同时还转有 1 个高抗草甘膦的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) 基因^[7], 其非转基因亲本对照品种为 Xiushui 110。供试水稻材料一部分置于大试管 (直径 3cm, 高 25cm) 内采用营养液培养^[15], 试管置于控温控光的人工气候箱内 [温度 (28±1) °C、RH75%±5%、光周期 14L:10D、光强度 12000~14000lx]。20 日龄时, 采用 10% 草甘膦水剂喷施于稻苗上, 去除可能存在的非转基因杂稻。并于 30 日龄 3 叶期时选择同等粗细大小的稻株供试验用。另一部分水稻材料播种并移栽于无虫网室内, 于成株期选取不同阶段的稻株供试验用。

1.2 供试昆虫

褐飞虱采自杭州水稻田间。随后将其在本试验室杂交水稻 (中浙优 1 号) 上连续饲养繁殖, 选育的同步化后代作为供试原始代褐飞虱的实验种群。在试验中, 将该实验种群置于控温控光的人工气候培养箱内进行继代饲养繁殖 [温度 (28±1) °C、RH70%±5%、光周期 14L:10D、光强度 3500~4000lx]。

1.3 田间种植和小区设计

于 2008 年和 2009 年在浙江省杭州市 (120.12° E, 30.13° N) 浙江大学试验农场进行 G6H1 及其对照 Xiushui 110 品系的田间试验。G6H1 和 Xiushui 110 的播种时间分别为 2008 年 7 月 2 日和 2009 年 6 月 18 日, 分别于 2008 年 8 月 2 日和 2009 年 7 月 18 日进行移栽。试验田块由面积相等的 6 个小区组成, 包含 2 个处理 (即 *Bt* 水稻和非 *Bt* 水稻田), 每处理 3 个重复, 小区按完全随机设计。各小区面积约为 20m×35m, 小区间均以 1 条宽约 50cm 的田埂隔开, 整个试验田的四周均种植 5 行非转基因对照水稻为保护行。稻苗单本手工移栽。试验区内稻田的水肥管理同其它正常水稻田, 整个生长期不喷洒任何农药。

1.4 室内条件下转基因水稻对褐飞虱生长发育和继代繁殖的影响

1.4.1 苗期水稻 将 G6H1 和 Xiushui 110 的产卵苗各 30 株分别放入大玻璃试管中水培, 每玻璃试管接入怀卵褐飞虱 1 头, 用纱布封口后放入智能人工气候箱。3d 后, 将褐飞虱吸出。卵孵化后, 于 12h 内选取初孵若虫备用。

将 30 日苗龄的供试 G6H1 和 Xiushui 110 水稻植株分别移入装有适量培养液的大玻璃试管中。每玻璃管移入 3 株稻株, 并接入初孵若虫 10 头, 每个品种重复 8 次。所有试管均置于智能人工气候箱内。每天

观察并记录若虫羽化时间,必要时更换新鲜的稻株和培养液。待成虫羽化后,选择雌雄配对,并将配对的褐飞虱成虫接入放置有2株稻苗的大玻璃试管内让其产卵,每天观察并记录成虫的死亡时间,同时每隔7d换苗并及时更新营养液。检查换下的带卵稻苗,部分稻苗放在解剖镜下观察并记录其上卵的数量;部分稻苗待其上的卵孵化后,选取12h内初孵若虫以与第1代相同的饲养方法连续饲养到第4代,并对第2代和第4代的褐飞虱的发育历期、繁殖力和成虫寿命进行观测和统计。

1.4.2 成株期水稻 将无虫网室内60日龄的分蘖期的G6H1和Xiushui 110水稻植株各10株分别移入塑料盆中。每个塑料盆用聚乙烯薄膜笼罩(直径15cm,高50cm;下同)套住,随后在笼罩的开口处接入怀卵褐飞虱10头,最后用纱布封口后置于人工气候培养箱内待褐飞虱产卵。3d后,将褐飞虱吸出。待卵孵化后,选取12h内初孵若虫备用。

将60日龄的分蘖期的G6H1和Xiushui 110单株稻株从无虫网室内移入塑料盆中,罩于聚乙烯薄膜笼罩内,接入初孵若虫10头后置于人工气候培养箱内,每个品种重复8次。每天观察并记录若虫羽化时间并及时更新营养液。待成虫羽化后,选择雌雄配对,配对的褐飞虱成虫接入单株盆栽的稻株上产卵,每隔7d换苗,直至成虫死亡。记录成虫死亡时间。换下的带卵稻苗,部分放在解剖镜下观察并记录其上卵的数量;部分待其上的卵孵化后,选取12h内初孵若虫以和第1代相同的饲养方法饲养至第4代,并对第2代和第4代的褐飞虱的发育历期、繁殖力和成虫寿命进行观测和统计;为模拟田间情况,第2代使用60日龄的抽穗期稻株,第3代和第4代使用75日龄的孕穗期稻株。

1.5 褐飞虱田间种群调查

分别在2008年8月19日—10月9日和2009年8月15日—10月15日两个时间段,采用修改后的文献[16]的方法进行褐飞虱田间种群调查。方法简述如下:将白色瓷盆(36cm×46cm×3.5cm)放置于水稻根底部倾斜45度,迅速拍打稻株4~5s(大约13~15下),然后统计落入白色瓷盆中褐飞虱的数量。在调查期间,每隔10d调查1次,每季度各调查6次,每次于各小区内随机抽取10株调查。

1.6 数据统计分析

试验数据采用DPS系统软件进行方差分析(ANOVA)^[17]。在转基因水稻和非转基因水稻上连续饲养4代褐飞虱的生长发育历期、成虫寿命和繁殖力的数据采用双因素方差分析并采用Tukey测验法进行多重比较。同时对在这两种水稻品系上饲养的同一代别褐飞虱的各个参数进行*t*测验。田间调查数据采用重复测量方差分析并采用Tukey测验法进行多重比较。所有显著水平均为 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱若虫的发育历期不受水稻品种、代别及水稻品种与代别互作的影响(表1)。与取食非转基因水稻Xiushui 110相比,取食G6H1水稻褐飞虱若虫的发育时间没有显著差异(第1代: $t_{\text{雌虫}}=0.386, df=68, P=0.701; t_{\text{雄虫}}=1.488, df=65, P=0.1415; t_{\text{全部}}=0.880, df=135, P=0.380$;第2代: $t_{\text{雌虫}}=1.694, df=66, P=0.095; t_{\text{雄虫}}=1.223, df=65, P=0.226; t_{\text{全部}}=1.862, df=124.9, P=0.065$;第4代: $t_{\text{雌虫}}=0.397, df=70.9, P=0.692; t_{\text{雄虫}}=1.683, df=74, P=0.097; t_{\text{全部}}=0.884, df=156, P=0.378$) (表1)。

褐飞虱成虫的寿命不受水稻品种、代别及水稻品种与代别互作的影响。*t*测验结果显示转基因水稻G6H1与非转基因水稻Xiushui 110间各代褐飞虱成虫寿命没有显著差异(表1);雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命在两种水稻间也均无显著性差异(第1代: $t_{\text{雌虫}}=0.291, df=56.1, P=0.772; t_{\text{雄虫}}=0.737, df=63, P=0.464; t_{\text{全部}}=0.276, df=122.3, P=0.783$;第2代: $t_{\text{雌虫}}=1.138, df=60, P=0.260; t_{\text{雄虫}}=1.243, df=59, P=0.219; t_{\text{全部}}=1.649, df=121, P=0.102$;第4代: $t_{\text{雌虫}}=0.579, df=63, P=0.565; t_{\text{雄虫}}=0.453, df=64, P=0.652; t_{\text{全部}}=0.733, df=121, P=0.465$)。

褐飞虱的产卵量受到代别的显著影响,但没有受到水稻品种和水稻品种与代别互作的显著影响(表1)。在每1代中,*t*测验分析结果表明,与取食非转基因水稻Xiushui 110相比,取食G6H1的褐飞虱的产卵量

差异不显著 (表 1) (第 1 代: $t=0.476, df=63, P=0.636$; 第 2 代: $t=0.518, df=56, P=0.607$; 第 4 代: $t=0.130, df=62, P=0.897$)。

表 1 取食转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 和对照 Xiushui 110 苗期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学参数的影响

Table 1 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on seedling stage of transgenic *cry1Ab/vip3H* rice (G6H1) and non-transgenic rice control (Xiushui 110) plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

世代 Generation	品系 Genotypes	若虫发育历期 (d) ^a Nymph developmental duration			成虫寿命 (d) ^b Adult longevity			每雌产卵量 (粒) ^c Number of eggs laid by per female
		雄虫 Male	雌虫 Female	雌雄总量 Total	雄虫 Male	雌虫 Female	雌雄总量 Total	
第 1 代 1 st	G6H1	13.0±0.2 a (n=35)	13.8±0.1 a (n=35)	13.4±0.1 a (n=70)	17.5±1.5 a (n=35)	16.1±1.2 a (n=35)	16.9±0.9 a (n=70)	253.7±23.0 b (n=35)
	Xiushui 110	13.1±0.2 a (n=35)	14.1±0.1 a (n=32)	13.6±0.1 a (n=67)	17.1±0.9 a (n=31)	17.4±1.0 a (n=30)	17.3±0.7 a (n=61)	275.7±26.4 b (n=30)
第 2 代 2 nd	G6H1	13.2±0.2 a (n=33)	13.9±0.1 a (n=35)	13.6±0.1 a (n=68)	18.0±1.3 a (n=30)	17.0±0.9 a (n=30)	17.5±1.0 a (n=60)	330.8±17.5 ab (n=28)
	Xiushui 110	13.7±0.2 a (n=35)	14.1±0.2 a (n=32)	13.9±0.1 a (n=67)	20.1±1.3 a (n=32)	18.4±1.1 a (n=31)	19.2±0.8 a (n=63)	324.4±18.4 ab (n=30)
第 4 代 4 th	G6H1	13.3±0.2 a (n=40)	14.0±0.2 a (n=36)	13.6±0.1 a (n=76)	18.2±1.8 a (n=31)	18.0±1.4 a (n=32)	18.1±1.1 a (n=63)	397.7±36.3 a (n=30)
	Xiushui 110	13.3±0.2 a (n=40)	14.2±0.2 a (n=40)	13.8±0.1 a (n=80)	18.2±1.3 a (n=34)	18.5±1.2 a (n=34)	18.4±1.0 a (n=68)	591.4±31.9 a (n=34)

注: ^a 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}}=0.94, df=1,218, P=0.334$; $F_{\text{代别}}=2.30, df=2,218, P=0.103$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=1.22, df=2,218, P=0.297$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}}=5.68, df=1,210, P=0.018$; $F_{\text{代别}}=1.24, df=2,210, P=0.292$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.20, df=2,210, P=0.821$; 雌雄总量, $F_{\text{水稻品种}}=4.08, df=1,429, P=0.044$; $F_{\text{代别}}=2.41, df=2,429, P=0.091$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.21, df=2,429, P=0.811$ 。

^b 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}}=0.71, df=1,193, P=0.402$; $F_{\text{代别}}=0.94, df=2,193, P=0.392$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.46, df=2,193, P=0.631$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}}=1.80, df=1,194, P=0.182$; $F_{\text{代别}}=1.40, df=2,194, P=0.250$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.08, df=2,194, P=0.924$; 雌雄总量, $F_{\text{水稻品种}}=2.21, df=1,388, P=0.138$; $F_{\text{代别}}=2.11, df=2,388, P=0.123$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.38, df=2,388, P=0.685$ 。

^c 双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}}=0.12, df=1,185, P=0.729$; $F_{\text{代别}}=12.74, df=2,185, P<0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}}=0.11, df=2,185, P=0.899$ 。

表中数据为平均数±标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 G6H1 和 Xiushui 110 相同代别相同生物学参数之间进行 t 测验分析差异达显著水平。

Note: ^a Two-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}}=0.94, df=1,218, P=0.334$; $F_{\text{generation}}=2.30, df=2,218, P=0.103$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=1.22, df=2,218, P=0.297$; for the females, $F_{\text{rice type}}=5.68, df=1,210, P=0.018$; $F_{\text{generation}}=1.24, df=2,210, P=0.292$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.20, df=2,210, P=0.821$; for the total, $F_{\text{rice type}}=4.08, df=1,429, P=0.044$; $F_{\text{generation}}=2.41, df=2,429, P=0.091$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.21, df=2,429, P=0.811$ 。

^b Two-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}}=0.71, df=1,193, P=0.402$; $F_{\text{generation}}=0.94, df=2,193, P=0.392$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.46, df=2,193, P=0.631$; for the females, $F_{\text{rice type}}=1.80, df=1,194, P=0.182$; $F_{\text{generation}}=1.40, df=2,194, P=0.250$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.08, df=2,194, P=0.924$; for the total, $F_{\text{rice type}}=2.21, df=1,388, P=0.138$; $F_{\text{generation}}=2.11, df=2,388, P=0.123$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.38, df=2,388, P=0.685$ 。

^c Two-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}}=0.12, df=1,185, P=0.729$; $F_{\text{generation}}=12.74, df=2,185, P<0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}}=0.11, df=2,185, P=0.899$ 。

Data are represented as means±SE. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between G6H1 and Xiushui 110 according to t -test.

2.2 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱若虫的发育历期受代别的显著影响, 但不受水稻品种和水稻品种与代别互作的影响 (表 2)。与取食非转基因水稻 Xiushui 110 相比, 取食 G6H1 水稻褐飞虱若虫的发育时间没有显著差异 (表 2) (第 1 代: $t_{\text{雄虫}}=0.147, df=62, P=0.884$; $t_{\text{雌虫}}=0.484, df=60, P=0.630$; $t_{\text{全部}}=0.365, df=124, P=0.716$; 第 2 代: $t_{\text{雄虫}}=0.237, df=62, P=0.813$; $t_{\text{雌虫}}=1.168, df=62, P=0.247$; $t_{\text{全部}}=0.903, df=126, P=0.368$; 第 4 代: $t_{\text{雄虫}}=0.891, df=64, P=0.376$; $t_{\text{雌虫}}=0.516, df=58.5, P=0.608$; $t_{\text{全部}}=0.237, df=132, P=0.813$)。

褐飞虱成虫的寿命不受水稻品种、代别及水稻品种与代别互作的影响。 t 测验结果表明, 各代褐飞虱成虫寿命在转基因水稻和非转基因水稻间均无显著差异 (表 2); 同样, 在两种水稻上饲养的褐飞虱的雄

虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命也均无显著性差异（第1代： $t_{雄虫}=0.761, df=58, P=0.450; t_{雌虫}=0.768, df=58, P=0.446; t_{全部}=0.123, df=118, P=0.903$ ；第2代： $t_{雄虫}=0.240, df=62, P=0.811; t_{雌虫}=0.131, df=62, P=0.896; t_{全部}=0.270, df=126, P=0.788$ ；第4代： $t_{雄虫}=0.294, df=64, P=0.770; t_{雌虫}=0.095, df=66, P=0.925; t_{全部}=0.174, df=132, P=0.862$ ）。

褐飞虱产卵量受到代别的显著影响，但未受到水稻品种和水稻品种与代别互作的显著影响(表2)。t 测验分析结果表明，取食 G6H1 的褐飞虱与取食 Xiushui 110 的相比，各代产卵量均差异不显著(表2) (第1代： $t=0.520, df=45.9, P=0.606$ ；第2代： $t=0.604, df=62, P=0.548$ ；第4代： $t=0.463, df=66, P=0.645$)。

表2 取食转 cry1Ab/vip3H 基因水稻 G6H1 和对照 Xiushui 110 成株期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学参数的影响

Table 2 Biological parameters of *N. lugens* fed on adult stage of transgenic cry1Ab/vip3H rice (G6H1) and non-transgenic rice control (Xiushui 110) plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

世代 Generation	品系 Genotypes	若虫发育历期 (d) ^a Nymph developmental duration			成虫寿命 (d) ^b Adult longevity			每雌产卵量 (粒) ^c Number of eggs laid by per female
		雄虫 Male	雌虫 Female	雌雄总量 Total	雄虫 Male	雌虫 Female	雌雄总量 Total	
		第1代 1 st	G6H1	13.2±0.1 a (n=32)	14.2±0.1 a (n=31)	13.7±0.1 a (n=63)	18.7±1.3 a (n=30)	
	Xiushui 110	13.2±0.2 a (n=32)	14.3±0.1 a (n=31)	13.7±0.1 a (n=63)	17.5±0.9 a (n=30)	17.8±1.3 a (n=30)	17.7±0.8 a (n=60)	268.1±26.4 bc (n=30)
第2代 2 nd	G6H1	13.8±0.2 a (n=32)	14.3±0.2 a (n=32)	14.0±0.1 a (n=64)	19.1±1.2 a (n=32)	18.5±1.1 a (n=32)	18.8±0.8 a (n=64)	336.7±19.7 b (n=32)
	Xiushui 110	13.7±0.2 a (n=32)	14.0±0.1 a (n=32)	13.9±0.1 a (n=64)	19.5±1.2 a (n=32)	18.7±0.9 a (n=32)	19.1±0.7 a (n=64)	317.6±24.7 bc (n=32)
第4代 4 th	G6H1	13.2±0.2 a (n=33)	14.1±0.1 a (n=34)	13.6±0.1 a (n=67)	20.5±1.3 a (n=33)	18.2±1.2 a (n=34)	19.3±0.9 a (n=67)	428.4±30.3 a (n=34)
	Xiushui 110	13.0±0.2 a (n=33)	14.2±0.2 a (n=34)	13.6±0.2 a (n=67)	19.9±1.6 a (n=33)	18.4±1.0 a (n=34)	19.1±1.0 a (n=67)	449.9±35.3 a (n=34)

注：^a 双因素方差分析：雄虫， $F_{水稻品种}=0.35, df=1,193, P=0.558; F_{代别}=8.39, df=2,193, P<0.001$ ；雌虫， $F_{水稻品种 \times 代别}=0.27, df=2,193, P=0.767; F_{水稻品种}=0.03, df=1,193, P=0.868; F_{代别}=0.26, df=2,193, P=0.768; F_{水稻品种 \times 代别}=1.06, df=2,193, P=0.348$ ；雌雄总量， $F_{水稻品种}=0.17, df=1,387, P=0.684; F_{代别}=2.81, df=2,387, P=0.062; F_{水稻品种 \times 代别}=0.48, df=2,387, P=0.619$ 。

^b 双因素方差分析：雄虫， $F_{水稻品种}=0.19, df=1,189, P=0.661; F_{代别}=1.35, df=2,189, P=0.261; F_{水稻品种 \times 代别}=0.19, df=2,189, P=0.823$ ；雌虫， $F_{水稻品种}=0.41, df=1,191, P=0.524; F_{代别}=1.05, df=2,191, P=0.354; F_{水稻品种 \times 代别}=0.21, df=2,191, P=0.814$ ；雌雄总量， $F_{水稻品种}=0.01, df=1,381, P=0.915; F_{代别}=2.05, df=2,381, P=0.118; F_{水稻品种 \times 代别}=0.05, df=2,381, P=0.950$ 。

^c 双因素方差分析： $F_{水稻品种}=0.08, df=1,191, P=0.780; F_{代别}=23.23, df=2,191, P<0.001; F_{水稻品种 \times 代别}=0.34, df=2,191, P=0.710$ 。

表中数据为平均数±标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明，同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中，*代表了 G6H1 和 Xiushui 110 相同代别相同生物学参数之间进行 t 测验分析差异达显著水平。

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{rice\ type}=0.35, df=1,193, P=0.558; F_{generation}=8.39, df=2,193, P<0.001; F_{rice\ type*generation}=0.27, df=2,193, P=0.767$; for the females, $F_{rice\ type}=0.03, df=1,193, P=0.868; F_{generation}=0.26, df=2,193, P=0.768; F_{rice\ type*generation}=1.06, df=2,193, P=0.348$; for the total, $F_{rice\ type}=0.17, df=1,387, P=0.684; F_{generation}=2.81, df=2,387, P=0.062; F_{rice\ type*generation}=0.48, df=2,387, P=0.619$ 。

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{rice\ type}=0.19, df=1,189, P=0.661; F_{generation}=1.35, df=2,189, P=0.261; F_{rice\ type*generation}=0.19, df=2,189, P=0.823$; for the females, $F_{rice\ type}=0.41, df=1,191, P=0.524; F_{generation}=1.05, df=2,191, P=0.354; F_{rice\ type*generation}=0.21, df=2,191, P=0.814$; for the total, $F_{rice\ type}=0.01, df=1,381, P=0.915; F_{generation}=2.05, df=2,381, P=0.118; F_{rice\ type*generation}=0.05, df=2,381, P=0.950$ 。

^cTwo-factor ANOVA: $F_{rice\ type}=0.08, df=1,191, P=0.780; F_{generation}=23.23, df=2,191, P<0.001; F_{rice\ type*generation}=0.34, df=2,191, P=0.710$ 。

Data are represented as means±SE. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between G6H1 and Xiushui 110 according to t-test.

2.3 褐飞虱田间种群动态

2008 年褐飞虱田间种群动态调查结果表明，若虫数量受到取样时间 ($F=7.52, df=5,20; P<0.001$)

和水稻品种与取样时间互作 ($F=5.47$, $df=5,20$; $P=0.003$) 的显著影响, 但没有受到水稻品种 ($F=4.45$, $df=1,4$; $P=0.103$) 的影响; 成虫的数量受到取样时间 ($F=17.96$, $df=5,20$; $P<0.001$) 和水稻品种与取样时间互作 ($F=8.48$, $df=5,20$; $P<0.001$) 的显著影响, 但是没有受到水稻品种 ($F=5.23$, $df=1,4$; $P=0.084$) 的显著影响; 成虫和若虫的总数量受到取样时间 ($F=13.82$, $df=5,20$; $P<0.001$) 和水稻品种和取样时间互作 ($F=8.66$, $df=5,20$; $P<0.001$) 的显著影响, 但是没有受到水稻品种 ($F=6.49$, $df=1,4$; $P=0.064$) 的显著影响。另外, G6H1 和 Xiushui 110 田间若虫数量除了 9 月 19 日外, 其余 5 个取样时间点的数量没有显著差异, 成虫数量在 8 月 29 日和 9 月 19 日两个取样时间存在显著差异, 其余取样时间没有显著差异, 若虫和成虫总量只在 9 月 19 日存在显著差异, 其余取样时间差异不显著 (图 1)。

2009 年褐飞虱田间种群动态调查结果表明, 若虫数量受到取样时间 ($F=18.67$, $df=5,20$; $p<0.001$) 的显著影响, 但没有受到水稻品种 ($F=0.15$, $df=1,4$; $P=0.718$) 和水稻品种与取样时间互作 ($F=0.88$, $df=5,20$; $p=0.511$) 的显著影响; 成虫数量受到取样时间 ($F=46.16$, $df=5,20$; $P<0.001$) 的显著影响, 但未受到水稻品种 ($F=0.21$, $df=1,4$; $P=0.673$) 和水稻品种与取样时间互作 ($F=1.30$, $df=5,20$; $P=0.304$) 的显著影响; 成虫和若虫的总量受到取样时间 ($F=20.79$, $df=5,20$; $P<0.001$) 的显著影响, 但未受到水稻品种 ($F=0.21$, $df=1,4$; $P=0.673$) 和水稻品种和取样时间互作 ($F=0.88$, $df=5,20$; $P=0.511$) 的显著影响。G6H1 和 Xiushui 110 田间若虫数量、成虫数量及若虫和成虫总量在各个取样时期都没有显著差异 (图 2)。

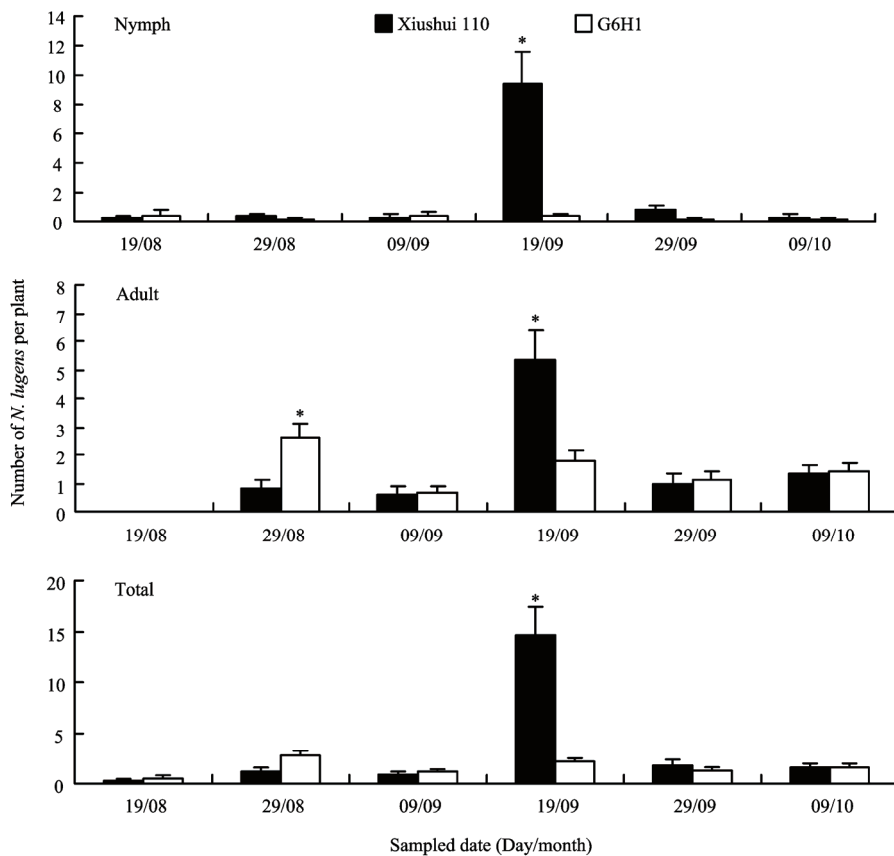


图 1 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 和对照 Xiushui 110 稻田的褐飞虱种群动态 (2008 年)

Fig. 1 Population dynamic of *N. lugens* in the fields of transgenic *cry1Ab/vip3H* rice (G6H1) and non-transgenic rice control (Xiushui 110) in 2008

注: *表示在同一取样时间点, 经重复测量方差分析并经 Tukey 测验法进行多重比较, 转基因水稻和非转基因水稻之间褐飞虱种群密度差异显著 ($P<0.05$)。*There is significant difference in population of *N. lugens* between transgenic and non-transgenic rice fields on the same sampling date, based on repeated measures analysis of variance and Tukey's multiple-range test ($P<0.05$).

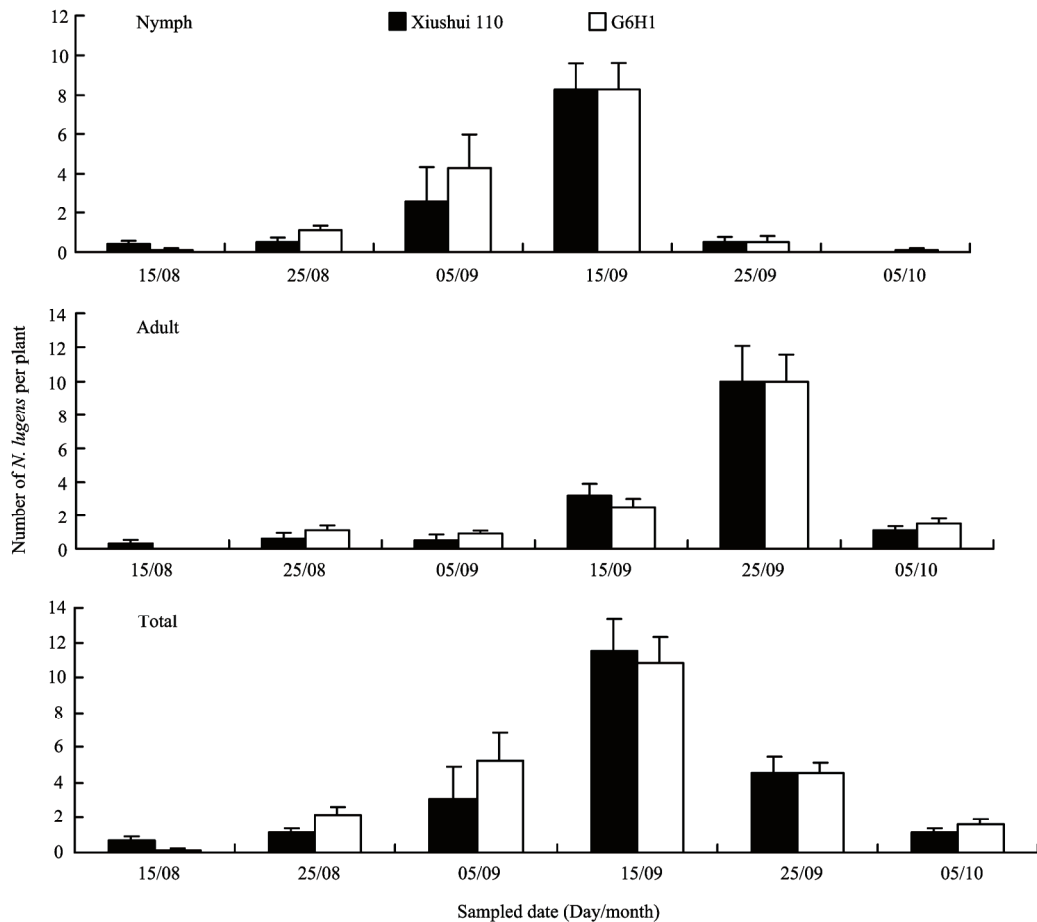


图 2 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 和对照 Xiushui 110 稻田的褐飞虱种群动态 (2009 年)

Fig. 2 Population dynamic of *N. lugens* in the field of transgenic *cry1Ab/vip3H* rice (G6H1) and non-transgenic rice control (Xiushui 110) in 2009

3 讨论

研究表明, 与其亲本对照非转基因水稻 Xiushui 110 相比, G6H1 的 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱第 1 代、第 2 代和第 4 代若虫的生长发育时间、成虫寿命和产卵量没有显著差异。相关研究表明, 采用 ELISA 方法可在取食 *cry1Ab* 水稻的褐飞虱体内检测到外源 Cry1Ab 蛋白, 但 Bt 水稻对其适合度没有负面影响^[13,18], 同时 *cry1Ab* 水稻和 SCK 水稻对褐飞虱的取食和产卵选择也没有显著的不利影响^[19]。另外, 尽管研究表明, 白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváh) 在 *cry1Ab* 水稻上发育历期延长了 1~2d, 但该水稻对其产卵行为无显著影响^[20]。因此, 由本研究结果与前人结果综合分析可知, 通常在室内条件下转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对褐飞虱等非靶标同翅目昆虫没有直接的毒性反应。

连续 2 年的褐飞虱田间种群调查结果分析表明, G6H1 与 Xiushui 110 稻田间的褐飞虱种群数量没有显著差异。这进一步验证了我们室内的研究结果, 既转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对褐飞虱等非靶标同翅目害虫无直接的不利影响。相关研究也与本文的研究结论相一致。Chen 等^[21]两年的调查结果显示, 转 *cry1Ab+cry1Ac* 融合基因水稻对稻田飞虱和叶蝉的种群动态无不利影响。而 Liu 等^[22]研究发现, 尽管移栽后转 *cry1Ac/SCK* 双基因水稻各品系系 MSA、MSB 和 MSA4 间白背飞虱和褐飞虱种群数量有一定的差异, 但与其对照相比均无显著差异, 因此种植 MSA、MSB 和 MSA4 后不会引起稻田关键非靶标水稻害虫数量的明显上升。在菲律宾, Bt 制剂处理的稻田中的飞虱和叶蝉的种群动态与对照相比也未发现显著差异^[23]。刘志诚等^[24]和 Li 等^[25]调查结果表明, 转 *cry1Ab* 基因水稻和转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因水稻对稻田节肢动物功能团组成及优势度、各功能团内科组成及优势度分布、功能团内个体数量的时间动态、群落参数及时间动态都没有显著影响, 本文也进一步证实了这一研究结果。目前关于转 *vip* 基因作物安全性评价的研究较少, 仅

在转 *vip3A* 基因棉花上有 1 例正式报道, 与对照相比, 转基因棉花上烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 的数量较多, 然而该差异由转基因棉花与对照叶片上的绒毛差异所致, 而非植物外源蛋白的毒性所致^[26]。

总之, 结合室内连续多代的生物学指标评价和室外连续 2 年的调查结果综合分析表明, 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对褐飞虱没有产生显著的不利影响。

参 考 文 献

- [1] Savary S, Willocquet L, Elazegui F A, *et al.* Rice pest constraints in tropical Asia: Quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations[J]. *Plant Disease*, 2000, 84: 357-369.
- [2] 黄诚华, 姚洪渭, 叶恭银, 等. 浙江省二化螟不同种群和大螟对三唑磷的敏感性研究[J]. *农药学报*, 2005, 7: 323-328.
- [3] Cohen M B, Chen M, Bentur J S, *et al.* Bt rice in Asia: potential benefits, impact, and sustainability [A]. In: Romeis J, Shelton A M, Kennedy G G, eds. *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*[C]. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2009. 223-248.
- [4] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009[M]. Ithaca, NY: ISAAA Breif No. 41. ISAAA, 2009.
- [5] Estruch J J, Warren G W, Mullins M A, *et al.* Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 5389-5394.
- [6] Rang C, Gil P, Neisner N, *et al.* Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6276-6281.
- [7] Fang J, Xu X L, Wang P, *et al.* Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 956-961.
- [8] Chen Y, Tian J C, Shen Z C, *et al.* Transgenic rice plants expressing a fused protein of Cry1Ab/Vip3H has resistance to rice stem borers under laboratory and field conditions[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2010, 103: 1444-1453.
- [9] Romeis J, Bartsch D, Bigler F, *et al.* Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26: 203-208.
- [10] Sogawa K. The rice brown planthopper-feeding physiology and host plant interactions[J]. *Annual Review of Entomology*, 1982, 27: 49-73.
- [11] Bae S H, Pathak M D. Life history of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and susceptibility of rice varieties to its attacks[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1970, 63: 149-155 (157).
- [12] 程家安, 祝增荣. 2005 年长江流域稻区褐飞虱暴发成灾原因分析[J]. *植物保护*, 2006, 32: 1-4.
- [13] Bernal C C, Aguda R M, Cohen M B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2002, 102: 21-28.
- [14] 程暇年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱研究与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [15] Yoshida S. Routine procedure for growing rice plants in culture solution[A]. In: Yoshida S, Forno D A, Cock J H, eds. *Laboratory manual for physiological studies of rice*[M]. Los Baños, Philippines: The International Rice Research Institute, 1976, 61-66.
- [16] Joost P H, Riley D G. Sampling techniques for thrips (Thysanoptera: Thripidae) in preflowering tomato[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2004, 97: 1450-1454.
- [17] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] Bai Y Y, Jiang M X, Cheng J A, *et al.* Effects of Cry1Ab toxin on *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) through its prey, *Nilaparvata lugens* stål (Homoptera: Delphacidae), feeding on transgenic Bt rice[J]. *Environmental Entomology*, 2006, 35: 1130-1136.
- [19] 陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 等. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食和产卵行为影响的评价[J]. *中国农业科学*, 2004, 37: 222-226.
- [20] 谭红, 叶恭银, 沈志成, 等. 转 *cry1Ab* 基因抗虫水稻对非靶标害虫白背飞虱发育与繁殖的影响[J]. *植物保护学报*, 2006, 33: 251-256.
- [21] Chen M, Ye G Y, Liu Z C, *et al.* Field assessment of the effects of transgenic rice expressing a fused gene of *cry1Ab* and *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on nontarget planthopper and leafhopper populations[J]. *Environmental Entomology*, 2006, 35: 127-134.
- [22] Liu Y F, He L, Wang Q, *et al.* Effects of and ecological safety insect-resistant *cry1Ac/sck* transgenic rice on key non-target pests in paddy fields[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40: 1181-1189.
- [23] Schoenly K G, Cohen M B, Barrion A T, *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice[J]. *Environmental Biosafety Research*, 2003, 2: 181-206.
- [24] 刘志诚, 叶恭银, 胡萃. 抗虫转基因水稻和化学杀虫剂对稻田节肢动物群落的影响[J]. *应用生态学报*, 2004, 15: 2309-2314.
- [25] Li F F, Ye G Y, Wu Q, *et al.* Arthropod abundance and diversity in Bt and non-Bt rice fields[J]. *Environmental Entomology*, 2007, 36: 646-654.
- [26] Whitehouse M E A, Wilson L J, Constable G A. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2007, 58: 273-285.