

转 *Bt* 基因欧洲黑杨抗虫稳定性 及其对天敌昆虫的影响*

胡建军¹, 李淑梅¹, 卢孟柱^{1*}, 李继祥², 李开花², 孙雪芹², 赵自玉²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 2 新疆玛纳斯平原林场, 新疆 玛纳斯 832206)

摘要: 1997—2001年, 对新疆玛纳斯平原林场的转 *Bt* 基因欧洲黑杨试验林进行了食叶害虫(杨尺蠖)和杨梦尼夜蛾危害调查, 转基因试验林叶片平均损失率均低于 10%, 试验林地虫口密度由 1997 年的 18 头·m⁻² 降低到 2001 年的 8 头·m⁻², 而对照林地虫口密度却呈上升趋势。2005 年, 位于北京怀柔的转 *Bt* 基因欧洲黑杨试验林受杨尺蠖危害, 叶片损失率不超过 20%, 而当地其它杨树林叶片损失率高达 90%。在转 *Bt* 基因欧洲黑杨林(新疆玛纳斯)中, 寄生靶标害虫的天敌种类、数量和寄生率均高于对照林, 对从试验林中采集的靶标昆虫的蛹进行接种试验, 与对照相比, 寄生蜂出蜂率和数量均无明显差异, 寄生蜂也无异常, 说明转 *Bt* 基因欧洲黑杨未对天敌昆虫产生明显不利影响。

关键词: 欧洲黑杨; *Bt* 基因; 抗虫稳定性; 天敌昆虫; 生物安全

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Stability of Insect-resistance of *Bt* Transformed *Populus nigra* Plantation and Its Effects on the Natural Enemies of Insects

HU Jian-jun¹, LI Shu-mei¹, LU Meng-zhu¹, LI Ji-xiang², LI Kai-hua², SUN Xue-qin², ZHAO Zi-yu²

(1 Research Institute of Forestry CAF Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation State Forestry Administration Beijing 100091, China 2 Manasi Plain Forest Station Manasi 832206, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract The damage caused by *Apocheim ia cinerarius* Erschoff and *Orthosia incerta* Hufnager in *Bt* transformed *Populus nigra* plantation located in Manasi Plain Forest Station, Xinjiang Uygur Autonomous Region was investigated during 1997–2001. The leaf loss was less than 10% and the larvae density in the soil decreased from 18 heads·m⁻² in 1997 to 8 heads·m⁻² in 2001, but the larvae density increased in the non-transgenic plantation. In 2005, the leaf loss caused by *Apocheim ia cinerarius* Erschoff in *Bt* transformed plantation in Huairou of Beijing was less than 20%, but it was 90% in non-transgenic poplar plantation. This indicated that the insect-resistance of transgenic poplar was stable and can reduce the larvae density effectively in the field for many years. The variety number and parasitic ratio of the natural enemies of insects in the transgenic poplar plantation (Manasi) were more than those in the non-transgenic poplar plantations. The result of the inoculation of the insect pupae collected from transgenic poplar plantation, nearby poplar plantation and the control plantation with the wasp (*Chouioia cunea* Yang) showed that there was no significant difference of the wasp eclosion rate and number between them. It can be concluded that up to now there is no significant negative effect of transgenic poplar on the natural enemies of insects.

收稿日期: 2005-12-14 修回日期: 2007-06-16

基金项目: 国家转基因专项 (J2002-B-003)

作者简介: 胡建军 (1969—), 男, 博士, 副研究员。

* 本研究得到韩一凡研究员、李广武先生、杨忠岐教授的指导和帮助, 在此深表感谢!

** 通讯作者

Key words *Populus nigra*; *Bt* gene; insect resistance; nature enemy; biosafety

苏云金芽孢杆菌毒蛋白 (*Bacillus thuringiensis* Berliner, *Bt*) 基因是目前植物基因工程应用最广泛的杀虫基因, 转基因抗虫植物的种植引起了人们对生态环境安全性问题的关注, 而其中转基因抗虫植物对农业生态系统中非靶标生物的影响是生态风险评价的重要内容之一^[1]。转基因抗虫植物可能通过降低靶标害虫的种群数量而使其天敌尤其是寄生性天敌种群数量减少, 但是由于杀虫剂使用量和使用次数的减少又会促进非靶标害虫及其天敌种群的增加^[2, 3]。转基因抗虫植物的种植不仅要求对靶标害虫具有良好的控制作用, 还应该对天敌昆虫没有重要影响^[4]。尽管多数室内生物测定研究也表明以转 *Bt* 基因抗虫植物上的靶标害虫或非靶标害虫为食的捕食性天敌, 其个体发育、生殖、捕食行为等均未受到不良影响^[5], 但也有研究表明, 以此类害虫为猎物的捕食性昆虫和寄生性昆虫却受到了不良影响^[6, 7]。因此研究田间转基因抗虫植物和害虫、天敌之间的关系是其生态安全性评价的焦点之一。

自从 20 世纪 80 年代末林木转基因植株获得以来, 许多林木外源基因转化成功。在国外, 由于转基因林木生态环境安全性的原因, 转基因林木安全研究一直处于实验室或苗圃试验阶段。我国于 1993 年获得转 *Bt* 基因的欧洲黑杨 (*Populus nigra* L.) 植株^[8], 1994 年营造了田间试验林, 进入田间试验阶段。经田间抗虫评价, 转 *Bt* 基因欧洲黑杨在田间表现了明显的抗虫效果^[9, 10]。有关转基因农作物的生物安全研究较多, 但转基因林木生物安全研究较少, 林木转基因生物安全性主要包括转基因的稳定性、外源基因向天然群体的基因漂移及对非靶标生物的影响等, 其中转基因林木对靶标昆虫的抗虫稳定性和对非靶标生物的影响是重要研究内容, 转 *Bt* 基因欧洲黑杨进入田间试验已 10 多年, 商业化种植也有 5 a 对靶标昆虫抗性是否发生变化以及对非靶标昆虫的影响如何都是大家比较关注的问题, 因此本文在转基因欧洲黑杨的抗虫稳定性的研究基础上, 开展了其对非靶标昆虫影响的研究。

1 材料和方法

1.1 试验地概况

转 *Bt* 基因欧洲黑杨试验林 (由韩一凡研究员提

供材料并设计) 位于新疆维吾尔自治区玛纳斯平原林场, 43°13' N, 86°37' E, 海拔 470 m, 土壤为沙壤土。该试验林建于 1994 年春季, 面积 1 hm², 共有 17 个系号参试, 其中包括 14 个转基因系号和 3 个非转基因系号 (健杨 (*P. × euramerica* cv. 'Robusta') 对照 1, 欧洲黑杨对照 2 和对照 3), 单株小区, 随机排列, 6 个区组。东边相邻的杨树林为西 + 加杨 (无性杂种, 引自原苏联, 是将加拿大杨 (*P. × canadensis* (Dode) Guineir) 嫁接到西伯利亚杨 (*P. suaveolens* Fisch) 上得到的), 同建于 1994 年春季。健杨对照林与试验林相距 3 km, 面积 1 hm², 建于 1990 年。1997—2001 年发生并造成损失的害虫为杨尺蠖 (*Apocheim ia cinerarius* Erschoff) 和杨梦尼夜蛾 (*Orthosia incerta* Hufnager), 它们在当地 1 年发生 1 代, 以幼虫取食杨树叶片造成危害, 5 月中旬下树在土中或枯叶下表土层中化蛹。

转基因欧洲黑杨纯林及其与中林 46 杨 (*P. euramerica* cv. 'Zhonglin46') 混交试验林, 种植于 2001 年 4 月初。转基因欧洲黑杨与中林 46 杨混交试验林按 1: 1 种植, 行间混植, 株行距 4 m × 6 m, 灌溉采取地下渗灌系统。2005 年 4 月下旬, 对该试验林和周边的杨树对照林进行了虫害调查。

1.2 虫害及天敌昆虫调查

1997 年和 2001 年在食叶害虫危害期, 采用从树上取叶调查和目测的方法调查转 *Bt* 基因试验林和对照林叶片损失率^[9]。田间调查选择在食叶害虫幼虫全部下树, 尚未全部化蛹时进行。在林地内采取 5 点取样与随机大量挖蛹相结合的方法, 分别统计健康虫蛹、寄生蝇、寄生蜂和其它天敌昆虫数量, 根据各个取样点的统计值计算每个林地的平均值, 然后将材料带回室内继续饲养并鉴定。

1.3 人工接种天敌昆虫试验

接种的天敌昆虫为美国白蛾优势寄生性天敌周氏啮小蜂 (*Chouioia cunea* Yang), 引自天津市园林绿化研究所。把采回室内的杨尺蠖和杨梦尼夜蛾活蛹 2 头分别装入直径 0.12 cm × 12.5 cm 玻璃指形管中, 每管再接蜂 4~8 头, 然后用脱脂棉塞紧口, 置于室内常温下观察出蜂情况, 记录出蜂时间和出蜂量, 调查雌雄蜂比例等。2001

年 5 月 25 日接种。

2 结果与分析

2.1 转 *Bt* 基因欧洲黑杨抗虫稳定性

虫害调查结果见表 1, 在 1997 年和 2001 年, 转基因欧洲黑杨试验林中植株叶片损失率分别为

表 1 不同年份转 *Bt* 基因欧洲黑杨试验林和对照林叶片损失率和土壤中虫蛹数

| 林分 | 无性系 | 平均叶片损失率 % | | 土壤中的虫蛹数 / (头 · m ⁻²) | |
|-------------------|-------------------|-----------|--------|----------------------------------|--------|
| | | 1997 年 | 2001 年 | 1997 年 | 2001 年 |
| 转 <i>Bt</i> 基因试验林 | 健杨 (对照 1) | 15 | 13 | | |
| | 欧洲黑杨 (对照 2) | 11 | 9 | | |
| | 欧洲黑杨 (对照 3) | 7 | 8 | 18 | 8 |
| | 非转 <i>Bt</i> 基因平均 | 11 | 10 | | |
| | 转 <i>Bt</i> 基因平均 | 10 | < 10 | | |
| 非转基因林分 (对照) | 健杨 | 80 | 90 | 88 | 150 |
| | 欧洲黑杨 | 90 | 砍伐 | 73 | - |

对于土壤中的虫蛹数, 转基因试验林土壤虫蛹数由 1997 年的 18 头 · m⁻² 降低至 2001 年的 8 头 · m⁻²; 而对照健杨林地虫蛹数却由 1997 年的 88 头 · m⁻² 上升到 2001 年的 150 头 · m⁻²。这表明, 转 *Bt* 基因欧洲黑杨经过 4 a 生长, 抗虫性未发生变化, 具有稳定的抗虫性。

根据 2005 年的调查结果, 北京怀柔的转基因欧洲黑杨纯林及混交林仅有 20% 的叶片遭受杨尺蠖危害, 而当地其它杨树叶片有 90% 的叶片遭受危害, 进而说明转 *Bt* 基因杨树对靶标昆虫的抗虫性未降低, 较好控制了靶标昆虫的严重发生。

根据转基因试验林害虫化蛹及天敌调查结果 (表 2), 转基因试验林、相邻林和对照林林地的害虫化蛹时间分别为 5 月 14 日、13 日和 10 日, 与对照林地相比, 前 2 块林地害虫化蛹略微延迟 3~4 d, 化蛹率前 2 者仅均为 30%, 而对照林地几乎全部化蛹 (95%), 这从另一方面说明, 转基因植株对害虫生长发育具有抑制作用, 延迟了化蛹时间, 降低了化蛹率。

表 2 转 *Bt* 基因欧洲黑杨林地及对照林地杨梦尼夜蛾化蛹情况

| 项目 | 转 <i>Bt</i> 基因欧洲黑杨林 | 相邻杨树林 | 对照健杨林 |
|---------------------|---------------------|---------|---------|
| 杨梦尼夜蛾下树化蛹末期 (月 - 日) | 05 - 14 | 05 - 13 | 05 - 10 |
| 5 月 16 日幼虫化蛹率 % | 30 | 30 | 95 |

2.2 转 *Bt* 基因试验林天敌昆虫分布情况

从表 3 看出, 在转 *Bt* 基因试验林地有 7 种天敌

10% 和小于 10%, 非转基因植株叶片平均损失率分别为 11% 和 10%; 而对照非转基因健杨林分却由 80% 增长到 90%, 欧洲黑杨林分由于食叶害虫多年持续危害, 1997 年以后每年叶片损失率超过 90% 而枯死, 于 2001 年砍伐。

昆虫, 分别为 2 种寄生蝇 (Tachinidae)、2 种寄生蜂 (Ichneumonidae)、2 种步甲 (Carabidae) 成虫、其它 1 种, 其中寄生蝇对害虫与蛹幼虫寄生率达 43%, 2 种寄生蜂的寄生率为 10%。在相邻林地, 天敌昆虫种类无明显差异, 而同一林场范围内 3 km 处的健杨林地, 却有显著差异, 在林中只发现 1 种步甲幼虫, 密度很大, 达 20 头 · m⁻² 以上, 未发现其它天敌如寄生蝇和寄生蜂。这说明, 转 *Bt* 基因试验林天敌昆虫种类和数量均丰富, 转 *Bt* 基因杨树对天敌昆虫种类未产生任何不利影响, 但数量上的差异尚需研究。

表 3 转 *Bt* 基因欧洲黑杨林、相邻杨树林和对照林天敌昆虫种类

| 试验林 | 天敌昆虫种类 | 寄生率 % | 数量 / (头 · m ⁻²) |
|----------|--------|-------|-----------------------------|
| 转基因欧洲黑杨林 | 寄生蝇 | 43 | - |
| | 寄生蜂 | 10 | - |
| | 步甲成虫 | - | 1.0 |
| 对照林 | 其它 | - | - |
| | 步甲幼虫 | - | 20 |

注: 相邻杨树林的天敌昆虫、种类、寄生率、数量与转基因欧洲黑杨林相同。

2.3 人工接种天敌昆虫试验结果

从表 4 看出, 对 3 块林地采集的虫蛹接种时间均为 5 月 25 日, 出蜂时间均在 6 月 11 至 12 日; 在对照林地所采的蛹个体虽然较转基因林地和相邻林地的蛹略小, 但接蜂后出蜂率与转基因林地及相邻林地相同, 均为 100%, 而对照, 转基因、相邻 3 林地的出蜂量分别为 493、551 和 539 头, 均无明显差异, 寄生蜂本身也未见异常。雄蜂比例由大到小为转基因

因林地 > 相邻林地 > 对照 (8.5% > 6.4% > 6.1%)。以上结果说明转 *Bt* 基因欧洲黑杨未对寄生天敌产生任何不利影响。

表 4 不同林地取食转 *Bt* 基因欧洲黑杨杨梦尼夜蛾蛹接种周氏啮小蜂后的出蜂情况

| 项目 | 转基因林地 | 相邻林地 | 对照健杨林地 |
|------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| 接蜂时间 - 出蜂时间 / (月·日) | 05-25~6-11~12 | 05-25~06-11~12 | 05-25~06-11~12 |
| 接蜂蛹大小 / (mm × mm) | 6.63 × 19.39 | 6.68 × 19.22 | 6.04 × 18.29 |
| 接蜂蛹数 / 头 | 80 | 36 | 100 |
| 出蜂率 / % | 100 | 100 | 100 |
| 出蜂量 / (头 · 蛹 ⁻¹) | 551 | 539 | 493 |
| 雄峰比例 / % | 8.5 | 6.4 | 6.1 |

3 结论与讨论

转 *Bt* 基因欧洲黑杨是世界上已商品化的林木基因工程树种^[11], 对于转 *Bt* 基因树种的安全性评价有重要参考价值。在以前的田间试验中, 已证明转基因欧洲黑杨对靶标害虫有一定的控制作用^[9, 10], 以靶标害虫为寄主的天敌, 势必受到 *Bt* 毒蛋白的直接或间接影响。本研究野外林地调查结果显示, 转基因杨树林中的杨梦尼夜蛾比对照林中的下树化蛹较晚, 天敌昆虫种类和数量丰富, 这可能与杨梦尼夜蛾幼虫取食转基因欧洲黑杨叶片后, 存活幼虫的生活力降低, 延长了幼虫的发育期, 使之更容易受到寄生蝇和寄生蜂的攻击, 也表明了转基因植株对天敌在控制害虫方面具有增效作用。

转 *Bt* 基因试验林于 1994 年种植, 经过 7 a 的时间, 杨树体内转 *Bt* 基因是否仍然存在并且表达如何, 均是大家普遍关心的问题。经过多次分子生物学测定, 证明 *Bt* 基因仍然存在转于转基因植株中, 未发现外源基因丢失现象^[12-14], 连续多年的抗虫性调查结果也表明, 转 *Bt* 基因杨树抗虫效果明显, *Bt* 基因能够稳定表达, 未发现害虫对转基因植株产生耐受性。

转基因植株的 *Bt* 毒蛋白的表达能否直接影响到靶标害虫和天敌的相互关系一直受到人们的关注。当转基因抗虫杨树处于高抗水平时, 可能会减少杨梦尼夜蛾的死亡率或缩短死亡时间, 会对其寄生性天敌不利。一方面是因为寄主种群下降而导致天敌种群也下降; 另一方面是寄生性天敌尚未羽化

前就因寄主死亡而不能存活。总之, 由于对林地的调查仅为 1 年的结果, 还不能回答为什么对照林里没有寄生蝇和寄生蜂, 试验林捕食性天敌只有步甲成虫, 而对照林只有步甲幼虫, 数量又如此悬殊等问题。在转基因杨树林生态系中, 害虫、天敌昆虫的特性和相互关系是很复杂的, 如何深入了解自然存在的天敌昆虫的生活习性, 发挥其协同控害作用还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 李保平, 孟玲, 万方浩. 转基因抗虫植物对天敌昆虫的影响 [J]. 中国生物防治, 2002, 18 (3): 97~105
- [2] 崔金杰, 夏敬源. 转 *Bt* 基因棉对天敌种群动态的影响 [J]. 棉花学报, 1999, 11 (2): 84~91
- [3] 崔金杰, 夏敬源. 转 *Bt* 基因棉对昆虫群落结构与组成的影响 [J]. 河南农业大学学报, 1999, 33 (4): 342~345
- [4] Recheigl J E, Recheigl N A. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests [M]. London: Lewis Publishers, 1999: 211~241
- [5] 束春娥, 柏立新, 张龙娃, 等. 转基因抗虫棉 GK22 对棉田天敌种群消长的影响 [J]. 江苏农业科学, 2002 (6): 41~43
- [6] 姜永厚, 傅强, 程家安, 等. 转 *Bt* 基因水稻表达的毒蛋白 CryIAb 在害虫及其捕食者体内的积累动态 [J]. 昆虫学报, 2004, 47 (4): 454~460
- [7] 杨益众, 余月书, 任璐, 等. 转基因棉花对棉铃虫天敌寄生率的影响 [J]. 昆虫知识, 2001, 38 (6): 435~437
- [8] 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育 [J]. 生物工程学报, 1993, 9 (4): 291~297
- [9] 胡建军, 刘庆一, 王克胜, 等. 欧洲黑杨转 *Bt* 基因植株大田抗性测定 [J]. 林业科学研究, 1999, 12 (3): 202~205
- [10] Hu J J, Tian Y C, Han Y F, et al. Field evaluation of insect resistant transgenic *Populus nigra* trees [J]. Euphytica, 2001, 121 (2): 123~127
- [11] 卢孟柱, 胡建军. 我国转基因杨树的研究及应用现状 [J]. 林业科技开发, 2006, 20 (6): 1~4
- [12] 胡建军, 张蕴哲, 卢孟柱, 等. 欧洲黑杨转基因稳定性及对土壤微生物的影响 [J]. 林业科学, 2004, 40 (5): 106~110
- [13] Sala F, Castiglione S, Hu J J, et al. Field and molecular evaluation of insect resistant transgenic poplar (*Populus nigra* L.) trees [A]. In: Arenchia A D. Plant Genetic Engineering Towards the Third Millennium [C]. New York: Elsevier Science, 2000: 137~142
- [14] Wang G J, Stefano C, Chen Y, et al. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis [J]. Transgenic Research, 1996, 5: 289~301