

# 采用饲喂法和微注射法评价Cry2Aa蛋白对二化螟盘绒茧蜂的安全性



董欣鑫 李梦雨 马伟华 蔡万伦 华红霞\*

(华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

**摘要:** 为评价转Cry2Aa基因水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂*Cotesia chilonis*的安全性,采用饲喂法和微注射法综合评价转Cry2Aa基因水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂的影响。结果表明,寄生饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1的二化螟*Chilo suppressalis*后,二化螟盘绒茧蜂体内未检出Cry2Aa蛋白,其每茧块茧数、茧长、雄成虫寿命和雌雄比分别为20.00个、2.58 mm、2.34 d和3.10,均显著小于对照,而卵及幼虫的总历期、蛹期、雌成虫寿命、茧质量和成虫质量均与对照差异不显著;寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后,除卵及幼虫的总历期和蛹期外,二化螟盘绒茧蜂其他生命表参数和体内过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活力均与阳性对照之间差异显著;寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后,二化螟盘绒茧蜂所有生命表参数及体内POD、SOD和GR活力均与阴性对照之间无显著差异。表明饲喂法中转Cry2Aa基因水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂产生的影响是由寄主介导效应引起的,而非Cry2Aa蛋白本身,因此转Cry2Aa基因水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂安全。

**关键词:** 转Cry2Aa基因水稻; 寄主介导效应; 生命表参数; 二化螟盘绒茧蜂; 二化螟

## Safety evaluation of Cry2Aa protein on *Cotesia chilonis* using feeding and micro-injection methods

Dong Xinxin Li Mengyu Ma Weihua Cai Wanlun Hua Hongxia\*

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China)

**Abstract:** To evaluate the safety of transgenic Cry2Aa rice T2A-1 on the parasitoid wasp *Cotesia chilonis*, a comprehensive assessment was conducted using feeding and microinjection methods. The results revealed that no detectable Cry2Aa protein was found in parasitoid wasps in the rice stem borers *Chilo suppressalis* fed on transgenic Cry2Aa rice T2A-1. The number of cocoons, cocoon length, male adult lifespan, and sex ratio of *C. chilonis* fed on T2A-1 rice were significantly lower than those of the control group, with values of 20.00, 2.58 mm, 2.34 d, and 3.10, respectively. However, the total developmental duration for eggs and larvae, the pupal period, female adult lifespan, cocoon weight, and adult weight showed no significant differences from control group. In the case of microinjection of Cry2Aa protein into the rice stem borers, there were significant differences in most life table parameters (except the total developmental duration of egg and larva, and the pupal period), as well as the activities of peroxidase, superoxide dismutase, and glutathione reductase enzymes compared to the positive control. However, there were no significant differences in all life table parameters and enzyme activities when compared to the negative control. These results indicated that the observed effects in the feeding method

基金项目: 农业农村部农业生物育种重大专项科技创新2030(2023ZD04062)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: huahongxia@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2023-02-22

were mediated by the host-induced effects rather than the Cry2Aa protein itself, suggesting the safety of transgenic *Cry2Aa* rice T2A-1 on the parasitoid wasp *C. chilonis*.

**Key words:** transgenic *Cry2Aa* rice; host mediated effect; life-table parameter; *Cotesia chilonis*; *Chilo suppressalis*

转基因抗虫作物是指通过转基因技术将抗虫基因导入作物使其具备抗虫特性的作物,转基因抗虫作物具有抵御靶标害虫为害、减少化学杀虫剂的使用、降低生产成本和改善农业环境等诸多优点,因此具有显著的农业效益、环境效益和社会效益(Gould et al., 2016)。目前,已有多种杀虫蛋白基因被导入作物基因组中(Malone et al., 2008; 李国平和吴孔明, 2022),如苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)表达的杀虫蛋白(Knowles & Dow, 1993; 李梦桃等, 2020; 武奉慈等, 2020)、蛋白酶抑制剂(Hilder et al., 1987)、植物凝集素(朱玉等, 1997; 路子显等, 2002)以及来源于动物体内的毒素基因(蒋红等, 1995)等,其中转Bt基因抗虫作物最常见。*Cry2Aa*是Bt产生的一种杀虫蛋白,T2A-1水稻可表达*Cry2Aa*蛋白,对水稻鳞翅目害虫有很高的抗性(Chen et al., 2005)。在稻田生态系统中,T2A-1水稻所表达的*Cry2Aa*蛋白可通过水稻-二化螟 *Chilo suppressalis*-二化螟盘绒茧蜂 *Cotesia chilonis* 食物链传递给寄生性天敌二化螟盘绒茧蜂。因此,评估*Cry2Aa*蛋白对二化螟盘绒茧蜂的安全性具有重要意义。

目前,评价Bt杀虫蛋白对寄生性天敌安全性的方法主要有食物链传导法和饲料拌毒法(Tier-1体系)2种。食物链传导法通过Bt作物-宿主昆虫-天敌食物链将Bt杀虫蛋白传递给寄生性天敌,如Han et al. (2015a)通过转*Cry2Aa*基因水稻-褐飞虱 *Nilaparvata lugens*-稻识纓小蜂 *Anagrus nilaparvatae*三级营养食物链发现,*Cry2Aa*蛋白对稻虱纓小蜂的发育历期、存活率、寿命和生殖力无负面影响; Tian et al. (2017)通过转*Cry2A*和*Cry1C*基因水稻-褐飞虱-黄腿双距螯蜂 *Gonatopus flavifemur* 三级营养食物链发现,*Cry2A*和*Cry1C*蛋白对黄腿双距螯蜂的发育历期、产卵量、寿命和存活率无负面影响; 姜永厚(2004)通过转*Cry2Ab*基因水稻-二化螟-二化螟盘绒茧蜂三级营养食物链发现,*Cry2Ab*蛋白对二化螟盘绒茧蜂的发育历期、结茧率和寄生率有负面影响。但食物链传导法无法保障宿主血淋巴中Bt蛋白的含量,进而不能准确评估Bt作物对内寄生天敌幼虫的安全性。饲料拌毒法(Romeis et al.,

2008; Li et al., 2014)是将高浓度Bt杀虫蛋白直接饲喂给寄生性天敌。用含有*Cry2Aa*蛋白的蜂蜜水直接饲喂稻虱纓小蜂成虫后,其寿命和产卵量等生命表参数未受到影响(Han et al., 2015b);用含有高浓度*Cry1Ac*蛋白的蜂蜜水饲喂腰带长体茧蜂 *Macrocentrus cingulum* 后,其寿命及产卵量未受到影响(Wang et al., 2017)。但饲料拌毒法不能用于内寄生天敌幼虫的安全性评价。因此,利用微注射法将特定浓度的Bt蛋白注射到寄生性天敌宿主体内,有可能弥补这2种评价方法的不足。

即使Bt杀虫蛋白和受试昆虫相同,采用不同的暴露方法则得到的安全性评价结果也可能不同。如Liu et al.(2005)发现寄生用含*Cry1Ac*蛋白饲料饲喂的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 后,中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 的化蛹率和蛹重均降低,生长速率减慢,但用含有高浓度*Cry1Ac*蛋白的蜂蜜溶液直接饲喂中红侧沟茧蜂后,对其化蛹率、蛹重和生长速率均无负面影响。产生这种差异的主要原因是寄主介导效应,即靶标害虫取食含有Bt蛋白的食物后,其生长发育受到影响,营养物质含量降低,进而影响寄生性天敌的生长发育(Naranjo, 2005; Lövei et al., 2009)。因此,在转Bt作物对寄生性天敌安全性评价中也应避免寄主介导效应对评价结果的影响。为提高转Bt抗虫作物对寄生性天敌安全性评价的准确性,本研究同时采用饲喂法和微注射法综合评价转*Cry2Aa*基因水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂的安全性,以期为转*Cry2Aa*基因水稻的安全性评价提供数据支撑,同时为其他寄生性天敌的安全性评价提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试水稻:转*Cry2Aa*基因水稻T2A-1(Chen et al., 2005)和受体水稻明恢63(Minghui 63, MH63)均由华中农业大学生命科学技术学院林拥军教授提供,将其种植到华中农业大学转基因试验基地(30°28'14" N, 114°21'20" E)的花盆中,花盆高20 cm、直径15 cm,待其生长到分蘖期供试。

供试昆虫:2021年自湖北省监利市水稻田中采

集二化螟老熟幼虫和二化螟盘绒茧蜂羽化成虫,前者于养虫室内用人工饲料(Han et al., 2012)继代饲养,取4龄幼虫供试,后者于人工气候箱中继代饲养,取12 h内羽化雌雄成虫供试,两种昆虫均于温度(26±1)℃、相对湿度(70±5)%和光周期16 L:8 D下饲养。

试剂和仪器:活化Cry2Aa蛋白,北京乐士宁科技有限公司;雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA),美国Sigma-Aldrich公司;无蛋白酶牛血清蛋白(bull serum albumin, BSA),大连美仑生物技术有限公司;Cry2Aa蛋白检测试剂盒,美国EnviroLogix公司;过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活力测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。SZX10奥林巴斯显微镜,日本Olympus公司;FA2204B电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 水稻中Cry2Aa蛋白含量的测定

取分蘖期转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘,剪成3 cm长的叶段,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤表面后吸干水分并称重,取0.1 g样品,加入1 mL Cry2Aa蛋白检测试剂盒的提取缓冲液研磨,于12 000 r/min离心2 min,取上清液用Cry2Aa蛋白检测试剂盒测定Cry2Aa蛋白含量,以等量MH63叶鞘处理作为对照,每个处理设3个重复。

### 1.2.2 田间Cry2Aa蛋白对茧蜂的实际暴露量

取二化螟4龄幼虫饥饿处理12 h,置于直径2 cm、高25 cm的玻璃管中,并放置长10 cm的转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘供其取食,3 d后收集试虫,于冰上剪破臀足,用毛细管吸取血淋巴,以取食MH63叶鞘的二化螟为对照。每头试虫可获得的血淋巴较少,因此每2头试虫的血淋巴为1个重复,共3个重复。每个重复取2 μL血淋巴,用Cry2Aa蛋白检测试剂盒的提取缓冲液将其稀释至100 μL,再按照试剂盒说明书检测其Cry2Aa蛋白含量,将测得的二化螟血淋巴中Cry2Aa蛋白浓度作为田间Cry2Aa蛋白对二化螟盘绒茧蜂的实际暴露量。

### 1.2.3 饲喂法后茧蜂内Cry2Aa蛋白含量测定

取1头饥饿12 h的二化螟4龄幼虫和1对12 h内羽化的二化螟盘绒茧蜂雌雄成虫同时接入到直径2 cm、高25 cm的玻璃管中,以确保二化螟盘绒茧蜂成功交配并寄生。每天用长10 cm的水稻叶鞘饲喂二化螟幼虫,在第1、3、6和9天用转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘饲喂,其余时间用水稻MH63叶鞘饲喂,饲喂12 d后解剖二化螟幼虫,收集二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫20 mg,用提取缓冲液充分研磨并稀释至100 μL,用Cry2Aa蛋白检测试剂盒测定其Cry2Aa蛋白含量,共3个重复。

鞘饲喂二化螟幼虫,在第1、3、6和9天用转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘饲喂,其余时间用水稻MH63叶鞘饲喂,饲喂12 d后解剖二化螟幼虫,收集二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫20 mg,用提取缓冲液充分研磨并稀释至100 μL,用Cry2Aa蛋白检测试剂盒测定其Cry2Aa蛋白含量,共3个重复。

### 1.2.4 饲喂法后二化螟盘绒茧蜂生命表参数的测定

将1头饥饿12 h的二化螟4龄幼虫和1对12 h内羽化的二化螟盘绒茧蜂雌雄成虫同时接入到直径2 cm、高25 cm的试管中,以确保二化螟盘绒茧蜂成功交配并寄生。每天用10 cm长的水稻叶鞘饲喂二化螟幼虫,共饲喂12 d,其中处理组在第1、3、6和9天用转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘饲喂,其余时间用MH63叶鞘饲喂;对照组12 d均用MH63叶鞘饲喂。每日观察二化螟盘绒茧蜂卵及幼虫的总历期、蛹期、雌成虫寿命、雄成虫寿命、每茧块茧数、茧长、茧重、成虫质量和雌雄比等生命表参数。卵及幼虫的总历期:从二化螟盘绒茧蜂产卵至二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫啮出的总天数,每个处理50头二化螟;蛹期:二化螟盘绒茧蜂啮出结茧化蛹至羽化的总天数,每个处理100头二化螟盘绒茧蜂;每茧块茧数:1头二化螟体内啮出的二化螟盘绒茧蜂结茧所形成茧块中的茧数,每个处理40头二化螟;茧长:将茧从茧块中单个剥出,用奥林巴斯显微镜测量茧长度,每个处理40个茧;茧重:50个茧为1个重复,使用分析天平称量这50个茧的总质量,每个处理4个重复;雌成虫寿命:二化螟盘绒茧蜂雌成虫羽化至死亡的总天数,每个处理40头;雄成虫寿命:二化螟盘绒茧蜂雄成虫羽化至死亡的总天数,每个处理40头;成虫质量:50个初羽化雌成虫为1个重复,用分析天平称量这50个雌成虫的总质量,每个处理4个重复;雌雄比:10个茧块为1组,羽化成虫中雌成虫与雄成虫的比值,每个处理3个重复。

### 1.2.5 微注射法后二化螟体内Cry2Aa蛋白的降解速率

二化螟幼虫血淋巴内注入高浓度Cry2Aa蛋白后,其可能被逐渐降解,然而按照Tier-1体系的要求,二化螟盘绒茧蜂幼虫需在试验期间始终暴露于10倍以上Cry2Aa蛋白实际暴露量的环境中,因此,需要监测注射Cry2Aa蛋白后二化螟幼虫体内Cry2Aa蛋白的降解速率。

用蒸馏水将活化Cry2Aa纯化蛋白配制成浓度为3.2 ng/nL的溶液,取2 000 nL注射到二化螟4龄幼虫血淋巴中,将其置于直径2 cm、高25 cm的玻璃

管中,每天用长10 cm的MH63水稻叶鞘饲喂,同时接入1对12 h内初羽化的二化螟盘绒茧蜂雌雄成虫,即被寄生处理,以不接入二化螟盘绒茧蜂为对照,即未被寄生处理。注射后1~5 d分别取2个处理的二化螟幼虫置于冰上,剪破其臀足,用毛细管吸取血淋巴,每2头试虫的血淋巴为1个重复,每个处理重复3次。每个重复取2  $\mu$ L血淋巴,用Cry2Aa蛋白检测试剂盒提取缓冲液将其稀释至100  $\mu$ L,按照试剂盒说明书测定Cry2Aa蛋白含量。

#### 1.2.6 微注射法后茧蜂内Cry2Aa蛋白含量测定

取2 000 nL浓度为3.2 ng/nL的Cry2Aa蛋白溶液,将其注射到二化螟4龄幼虫的血淋巴中,将其置于直径2 cm、高25 cm的玻璃试管中,同时接入1对12 h内羽化的二化螟盘绒茧蜂雌雄成虫,每天用长10 cm的MH63叶鞘饲喂,饲喂12 d后解剖二化螟幼虫,收集20 mg二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫,用Cry2Aa蛋白检测试剂盒中提取缓冲液充分研磨并稀释至100  $\mu$ L,按照试剂盒说明书检测Cry2Aa蛋白含量,每个处理3次重复。取二化螟盘绒茧蜂啮出之后1 d的蛹20 mg以及羽化后1 d的成虫各20 mg,分别使用Cry2Aa蛋白检测试剂盒中提取缓冲液充分研磨并稀释至100  $\mu$ L,按照试剂盒说明书检测Cry2Aa蛋白含量,每个处理重复3次。

#### 1.2.7 微注射法后二化螟盘绒茧蜂生命表参数的测定

取浓度为3.2 ng/nL的Cry2Aa蛋白溶液、GNA溶液(阳性对照)和BSA溶液(阴性对照)各2 000 nL分别注射到二化螟4龄幼虫血淋巴内,每个处理4个重复,每个重复20头试虫。将各处理二化螟幼虫分别置于直径2 cm、高25 cm的玻璃试管中,同时接入1对12 h内羽化的二化螟盘绒茧蜂雌雄成虫,每天用长10 cm的MH63叶鞘饲喂,共饲喂12 d。待二化螟盘绒茧蜂啮出后,观察并记录二化螟盘绒茧蜂卵及幼虫的总历期、蛹期、茧质量、雌成虫寿命、雄成虫寿命、成虫质量和雌雄比等生命表参数,方法同1.2.4。

此外,在饲喂第12天取二化螟幼虫进行解剖,收集二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫,每个处理取20 mg样品,将其与生理盐水按照质量体积比1:9混匀,制成样品匀浆液,冰上研磨后于4 °C、2 500 r/min条件下离心10 min,每个处理取100  $\mu$ L上清液,按照POD、SOD和GR活力测定试剂盒说明书测定活力。

#### 1.3 数据分析

使用SPSS 26.0软件对试验数据进行统计分析。饲喂法处理后的生命表参数采用U检验法进行差异

显著性检验,寄生和未被寄生的二化螟盘绒茧蜂体内Cry2Aa蛋白含量之间采用t检验法进行差异显著性检验,其他均采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 各级食物链中Cry2Aa蛋白的含量

水稻MH63叶鞘内未检出Cry2Aa蛋白,转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘内Cry2Aa蛋白含量为992.50 ng/g。饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘的二化螟血淋巴内Cry2Aa蛋白含量为250.21 ng/g,与转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘内Cry2Aa蛋白含量差异显著( $F=181.3, P<0.001$ ),而二化螟盘绒茧蜂体内未检测到Cry2Aa蛋白。

### 2.2 田间Cry2Aa蛋白对茧蜂的实际暴露量

饲喂水稻MH63叶鞘3 d后,二化螟4龄幼虫血淋巴中未检测到Cry2Aa蛋白,而饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1叶鞘3 d后,二化螟4龄幼虫血淋巴中Cry2Aa蛋白含量为250.21 ng/g,表明田间二化螟盘绒茧蜂有通过寄主接触Cry2Aa蛋白的风险,250.21 ng/g可作为田间Cry2Aa蛋白对二化螟盘绒茧蜂的实际暴露量。

### 2.3 饲喂法后二化螟盘绒茧蜂的生命表参数

寄生饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1的二化螟后,二化螟盘绒茧蜂的每茧块茧数为20.00个,茧长为2.58 mm,雄成虫寿命为2.34 d,雌雄比为3.10,均显著低于对照( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1后,二化螟盘绒茧蜂的卵及幼虫的总历期为11.90 d,蛹期为7.20 d,雌成虫寿命为2.50 d,茧质量为5.13 mg,成虫质量为3.25 mg,与对照差异不显著(表1)。

### 2.4 微注射法后二化螟体内Cry2Aa蛋白的降解速率

注射Cry2Aa蛋白溶液1~5 d后,被二化螟盘绒茧蜂寄生和未被二化螟盘绒茧蜂寄生的二化螟幼虫血淋巴中Cry2Aa蛋白含量均差异不显著(图1)。随注射时间延长,被寄生和未被寄生的二化螟幼虫血淋巴中Cry2Aa蛋白含量逐渐下降,注射后第4天,血淋巴中Cry2Aa蛋白含量仍保持在2 502.1 ng/g(10倍实际暴露量)以上,但注射后第5天,血淋巴中Cry2Aa蛋白含量均低于2 502.1 ng/g(图1)。因此,为保证整个试验过程中二化螟盘绒茧蜂幼虫始终暴露于高于10倍实际暴露量的Cry2Aa蛋白环境中,二化螟幼虫需每4 d补充注射1次Cry2Aa蛋白溶液,浓度和注射量同第1次注射。

## 2.5 微注射法后二化螟盘绒茧蜂内Cry2Aa蛋白含量

寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后,二化螟盘绒茧蜂老熟幼虫、蛹和成虫体内的Cry2Aa蛋白含量

分别为115.38、27.67和9.01 ng/g,三者之间差异显著( $P<0.05$ ,图2)。

表1 寄生饲喂T2A-1水稻的二化螟后二化螟盘绒茧蜂的生命表参数

Table 1 Life-table parameters of *Cotesia chilonis* parasitizing *Chilo suppressalis* fed on T2A-1

生命表参数 Life-table parameter	饲喂转Cry2Aa基因水稻T2A-1 Fed on transgenic Cry2Aa rice T2A-1	饲喂受体水稻MH63 Fed on MH63 rice (CK)
卵及幼虫的总历时 Egg-larval developmental duration/d	11.90±0.45 ns	11.85±0.59
蛹期 Pupal period/d	7.20±0.61 ns	7.26±0.62
雄成虫寿命 Longevity of male adult/d	2.34±0.20*	2.85±0.30
雌成虫寿命 Longevity of female adult/d	2.50±0.20 ns	2.76±0.17
每茧块茧数 Cocoon number per piece	20.00±2.79**	25.20±3.65
茧长 Cocoon length/mm	2.58±0.18*	2.85±0.17
茧质量 Cocoon mass/mg	5.13±0.13 ns	5.27±0.08
成虫质量 Adult mass/mg	3.25±0.10 ns	3.31±0.10
雌雄比 Sex ratio of female to male	3.10±0.79**	3.59±1.07

表中数据为平均数±标准误。\*, \*\*表示处理与对照之间经U检验法检验差异显著( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )；ns表示处理与对照之间差异不显著。Data in the table are mean±SE. \* or \*\* indicates significant difference between treatment and CK by U-test ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); ns indicates no significant difference between treatment and CK.

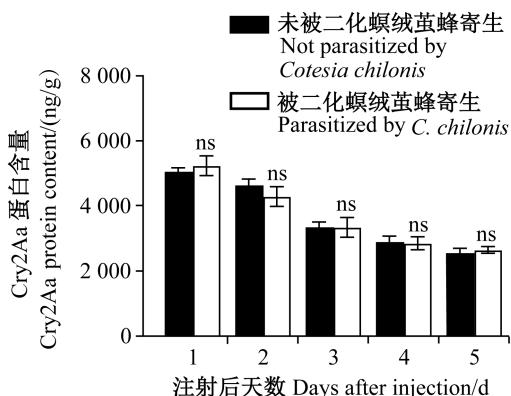


图1 微注射Cry2Aa蛋白后二化螟血淋巴中Cry2Aa蛋白的含量

Fig. 1 Contents of Cry2Aa protein in the hemolymph of *Chilo suppressalis* after microinjection of Cry2Aa protein

图中数据为平均数±标准误。ns表示同时间下2个处理之间经t检验法检验差异不显著。Data are mean±SE. ns indicates no significant difference between two treatments at the same time based on a t test.

## 2.6 微注射法后二化螟盘绒茧蜂的生命表参数

寄生微注射GNA(阳性对照)的二化螟后,二化螟盘绒茧蜂雌成虫寿命、雄成虫寿命、茧质量和成虫质量均较阴性对照和微注射Cry2Aa蛋白溶液处理显著下降( $P<0.05$ )。寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后,除卵及幼虫的总历时和蛹期外,二化螟盘绒

茧蜂其他生命表参数和体内POD、SOD和GR活力与阳性对照之间均差异显著( $P<0.05$ )；而二化螟盘绒茧蜂所有生命表参数及体内POD、SOD和GR活力与阴性对照之间均无显著差异(表2),表明寄主体内高剂量的Cry2Aa蛋白对二化螟盘绒茧蜂各生命表参数和POD、SOD和GR活力无显著影响。

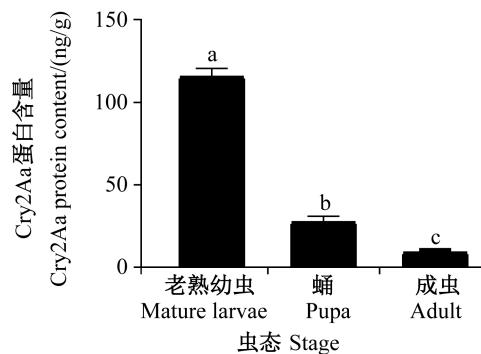


图2 寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后二化螟盘绒茧蜂体内Cry2Aa蛋白的含量

Fig. 2 Contents of Cry2Aa protein in *Cotesia chilonis* parasitizing *Chilo suppressalis* microinjected with Cry2Aa protein

图中数据为平均数±标准误。柱上不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ )。

表2 寄生微注射Cry2Aa蛋白的二化螟后二化螟盘绒茧蜂的生命表参数和酶活力  
Table 2 Life-table parameters and enzyme activities of *Cotesia chilonis* parasitizing *Chilo suppressalis*  
microinjection with Cry2Aa protein

生命表参数 Life-table parameter	微注射Cry2Aa蛋白 Microinjection with Cry2Aa protein	微注射BSA(阴性对照) Microinjection with BSA (negative control)	微注射GNA(阳性对照) Microinjection with GNA (positive control)
卵及幼虫的总历期 Egg-larval developmental duration/d	12.00±0.06 a	11.92±0.26 a	12.02±0.15 a
蛹期 Pupal period/d	7.11±0.10 a	7.16±0.09 a	7.21±0.17 a
雄成虫寿命 Longevity of male adult/d	2.38±0.10 a	2.65±0.10 a	1.37±0.12 b
雌成虫寿命 Longevity of female adult/d	2.81±0.05 a	2.76±0.17 a	1.21±0.08 b
茧质量 Cocoon mass/mg	5.43±0.14 a	5.27±0.08 a	4.06±0.13 b
成虫质量 Adult mass/mg	3.26±0.36 a	3.41±0.26 a	2.49±0.20 b
雌雄比 Sex ratio of female to male	3.02±0.16 b	3.23±0.31 b	3.75±0.25 a
过氧化物酶活力 POD activity/(U/mg)	1.27±0.03 b	1.28±0.03 b	2.77±0.05 a
超氧化物歧化酶活力 SOD activity/(U/mg)	127.78±5.69 b	132.48±5.17 b	183.38±8.47 a
谷胱甘肽还原酶活力 GR activity/(U/mg)	15.25±0.75 b	14.71±1.52 b	21.90±1.21 a

BSA: 牛血清蛋白; GNA: 雪花莲凝集素。表中数据为平均数±标准误。同行不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。BSA: Bull serum albumin; GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin. Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same row indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

本研究结果显示,取食转Cry2Aa基因水稻T2A-1后二化螟幼虫血淋巴内可检测到Cry2Aa蛋白,表明在田间寄生二化螟的二化螟盘绒茧蜂存在暴露于Cry2Aa蛋白的风险。因此,评估Cry2Aa蛋白对二化螟盘绒茧蜂的安全性是非常必要的。本研究发现寄生取食转Cry2Aa基因水稻T2A-1的二化螟幼虫后,二化螟盘绒茧蜂的茧长、雄成虫寿命、每茧块茧数和雌雄比较对照显著降低。姜永厚等(2004)研究结果表明,在取食转Cry1Ab基因水稻的二化螟幼虫内寄生时,二化螟盘绒茧蜂的寄生率、茧数及雄成虫寿命均小于寄生取食非转基因水稻二化螟幼虫;Baur & Boethl(2003)发现在取食转Cry1Ac基因棉花的大豆裸纹夜蛾*Chrysodeixis includens*幼虫内寄生时,多胚跳小蜂*Copidosoma floridanum*的发育历期、生殖力和寿命均较寄生取食非转基因棉花的大豆裸纹夜蛾显著下降;Walker et al.(2007)研究结果表明在取食含Cry1Ac人工饲料的甘饴丛枝尺蛾*Pseudocoremia suavis*幼虫内寄生时,斑痣悬茧蜂*Meteorus pulchricornis*的发育历期较寄生取食普通人工饲料的甘饴丛枝尺蛾的斑痣悬茧蜂显著增长,存活率则降低,与本研究结果一致,表明基于饲喂法即转Bt植物-靶标害虫-寄生性天敌食物链易于得出转Bt植物对寄生性天敌有害的影响结论,然

而,这种方法容易忽略Cry蛋白对天敌寄主害虫生长发育的影响。

Cry蛋白被其靶标昆虫摄取后,可引起靶标昆虫肠上皮膜穿孔和渗透休克,进而导致其细胞裂解死亡(Bravo et al., 2004; Jurat-Fuentes & Adang, 2006),之后Cry蛋白可穿过中肠并扩散到血淋巴中(Raymond et al., 2010),因此导致在血淋巴中寄生的天敌昆虫面临暴露于Cry蛋白的风险。本研究结果显示二化螟取食转Cry2Aa基因水稻T2A-1后,其血淋巴内可检测到Cry2Aa蛋白。寄主对Cry蛋白的敏感性可导致其自身营养质量降低,进而影响寄生性天敌的生长发育,因此在寄生性天敌的安全性评估试验中必须避免寄主介导效应的影响。如Schuler et al.(2004)通过转Cry1Ac基因油菜-抗Cry1Ac小菜蛾*Plutella xylostella*品系-菜蛾盘绒茧蜂*Cotesia vestalis*食物链发现,通过食物链传递的Cry1Ac蛋白对菜蛾盘绒茧蜂无影响;Wang et al.(2017)用亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*抗Cry1Ac品系作为寄主饲喂腰带长体茧蜂*Macrocentrus cingulum*,发现亚洲玉米螟取食含Cry1Ac人工饲料后,腰带长体茧蜂的生命表参数无显著变化。虽然利用抗Cry蛋白昆虫种群可显著避免寄主介导效应,但是抗Cry蛋白的昆虫种群不易获得。对于寄生蜂成虫,可以利用其补充取食的特点将高浓度Cry蛋白加入到其补充取食的食物中。如吴研等(2008)将转

*Cry1Ab*基因玉米花粉与水混合后饲喂亚洲玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostriniae*,发现亚洲玉米螟赤眼蜂的寿命及生殖力与取食普通玉米花粉的亚洲玉米螟赤眼蜂无显著差异;Han et al.(2015b)用含有Cry2Aa蛋白的蜂蜜水饲喂稻虱缨小蜂 *Anagrus nilaparvatae*成虫,其寿命和产卵量等生命表参数与取食普通蜂蜜水的喂稻虱缨小蜂无显著差异,但是这种方法不适合内寄生蜂幼虫。Wang WJ et al.(2020)和Wang ZJ et al.(2020)采用微注射法分别将Cry1C和Cry2Aa蛋白注射到印度谷螟 *Plodia interpunctella*血淋巴中,并让麦蛾柔茧蜂 *Habrobracon hebetor*寄生,发现取食Cry1C和Cry2Aa蛋白的麦蛾柔茧蜂的生命表参数与未取食毒蛋白的麦蛾柔茧蜂的生命表参数无显著差异。本研究采用微注射法将Cry蛋白注射到二化螟幼虫血淋巴中,进而将Cry蛋白传递给寄生蜂,这种方法同样可规避寄主介导效应,而且易于控制二化螟血淋巴中Cry蛋白的含量,保证在试验过程中被评估生物暴露于实际暴露量10倍以上的剂量,相较于培育寄主抗性品系,该方法更便于准确评估Cry蛋白对内寄生性天敌的安全性。

为满足Tier-1体系对暴露剂量的要求,本研究在维持二化螟幼虫较高存活率的前提下,尽可能提高注射量(2 000 nL)和Cry2Aa蛋白溶液的浓度。尽管如此,由于Cry2Aa蛋白在二化螟血淋巴内存在降解的问题,注射后第5天其含量已低于10倍实际暴露量,因此在二化螟体内必须补充注射Cry2Aa蛋白溶液。被二化螟盘绒茧蜂寄生后,二化螟幼虫会停止发育,但生理活动没有停止,二化螟幼虫依然保持较高的代谢水平(杭三保等,1989),所以注射高剂量的Cry2Aa蛋白后,二化螟幼虫体内的Cry2Aa蛋白可被不断降解,且被二化螟盘绒茧蜂寄生的和未被二化螟盘绒茧蜂寄生的二化螟体内Cry2Aa蛋白降解速率无显著差异;但Wang WJ et al.(2020)和Wang ZJ et al.(2020)分别将Cry1C和Cry2Aa蛋白微注射到印度谷螟幼虫体内后,被麦蛾柔茧蜂寄生的印度谷螟幼虫血淋巴中Cry1C和Cry2Aa蛋白降解速率低于未被麦蛾柔茧蜂寄生的,这可能是因为麦蛾柔茧蜂为外寄生天敌,其雌成虫在产卵的同时麻痹寄主,使印度谷螟幼虫的生理活动降到较低的水平,进而造成Cry1C和Cry2Aa蛋白降解速率下降。此外,在Tier-1体系中同时设置微注射BSA和微注射GNA处理有利于进一步提高以寄主血淋巴为载体的试验体系的准确性。

综上所述,本研究结合饲喂法和微注射法的试验结果发现,抗虫水稻T2A-1对二化螟盘绒茧蜂无显著影响。本研究使用的方法有较高的准确性,避免了培育抗性种群这一复杂的过程,但微注射过程仍较繁琐,需进一步简化试验过程。本研究结果不仅拓宽了Cry2Aa蛋白的环境风险评估范围,也为内寄生性非靶标生物的生态风险评估提供了较可靠的研究体系。

## 参 考 文 献 (References)

- Baur ME, Boethel DJ. 2003. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A (C) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biological Control*, 26(3): 325–332
- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1667(1): 38–46
- Chen H, Tang W, Xu CG, Li XH, Lin YJ, Zhang QF. 2005. Transgenic *indica* rice plants harboring a synthetic *cry2A\** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7): 1330–1337
- Gould F, Amasino RM, Brossard D, Buell CR, Dixon RA, Falck-Zepeda JB, Gallo MA, Giller K, Glenna LL, Griffin TS, et al. 2016. Genetically engineered crops: experiences and prospects. Washington DC: National Academies Press
- Han Y, Chen J, Wang H, Zhao J, He YP, Hua HX. 2015a. Prey-mediated effects of transgenic *cry2Aa* rice on the spider *Hylaphantes graminicola*, a generalist predator of *Nilaparvata lugens*. *BioControl*, 60(2): 251–261
- Han Y, Wang H, Chen J, Cai WL, Hua HX. 2015b. No impact of transgenic *cry2Aa* rice on *Anagrus nilaparvatae*, an egg parasitoid of *Nilaparvata lugens*, in laboratory tests. *Biological Control*, 82: 46–51
- Han L, Li S, Liu P, Peng Y, Hou M. 2012. New artificial diet for continuous rearing of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 105: 253–258
- Hang SB, Huang DL, Wu DZ. 1989. Studies on food consumption and development of *Chilo suppressalis* parasitised by *Apanteles chilonis*. *Journal of Yangzhou University*, 10(3): 33–36 (in Chinese)  
[杭三保, 黄东林, 吴达璋. 1989. 二化螟盘绒茧蜂对寄主二化螟幼虫取食量和生长发育的影响. 江苏农学院学报, 10(3): 33–36]
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160–163
- Jiang H, Zhu YX, Wang YP, Wang ZP, Chen ZL. 1995. Synthesis of the spider insecticidal gene and construction of the plasmid expressing in plant. *Journal of Integrative Plant Biology*, 37(4): 321–

- 325 (in Chinese) [蒋红, 朱玉贤, 王雅平, 王泽平, 陈章良. 1995. 蜘蛛杀虫肽基因的合成及其在植物中表达质粒的构建. 植物学报, 37(4): 321–325]
- Jiang YH, Fu Q, Cheng JA, Ye GY, Bai YY, Zhang ZT. 2004. Effects of transgenic Bt rice on the biological characteristics of *Apanteles chilonis* (Munakata) (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 47(1): 124–129 (in Chinese) [姜永厚, 傅强, 程家安, 叶恭银, 白耀羽, 张志涛. 2004. 转Bt基因水稻对二化螟绒茧蜂生物学特性的影响. 昆虫学报, 47(1): 124–129]
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3): 166–171
- Knowles BH, Dow JAT. 1993. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, 15(7): 469–476
- Li GP, Wu KM. 2022. Commercial strategy of transgenic insect-resistant maize in China. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 17–32 (in Chinese) [李国平, 吴孔明. 2022. 中国转基因抗虫玉米的商业化策略. 植物保护学报, 49(1): 17–32]
- Li MT, Li SY, Wang H, Zhang J, Cang J, Lang ZH. 2020. Identification of insect resistance in the transgenic maize harboring *cry2Ah-vp* gene. *Journal of Plant Protection*, 47(1): 74–83 (in Chinese) [李梦桃, 李圣彦, 汪海, 张杰, 苍晶, 郎志宏. 2020. 转*cry2Ah-vp*基因玉米的抗虫性鉴定. 植物保护学报, 47(1): 74–83]
- Li YH, Hu L, Romeis J, Wang YN, Han LZ, Chen XP, Peng YF. 2014. Use of an artificial diet system to study the toxicity of gut-active insecticidal compounds on larvae of the green lacewing *Chrysoperla sinica*. *Biological Control*, 69: 45–51
- Liu XX, Zhang QW, Zhao JZ, Cai QN, Xu HL, Li JC. 2005. Effects of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* on *Microplitis mediator*, a parasitoid of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114: 205–213
- Lövei GL, Andow DA, Arpaia S. 2009. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. *Environmental Entomology*, 38(2): 293–306
- Lu ZX, Chang TJ, Zhu Z. 2002. Plant lectins and their application on plant gene engineerings. *China Biotechnology*, 22(2): 3–9 (in Chinese) [路子显, 常团结, 朱祯. 2002. 植物外源凝集素及其在植物基因工程中的应用. 中国生物工程杂志, 22(2): 3–9]
- Malone LA, Gatehouse AMR, Barratt BIP. 2008. Beyond Bt: alternative strategies for insect-resistant genetically modified crops. // Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Dordrecht: Springer, pp. 357–417
- Naranjo SE. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the function of the natural enemy community. *Environmental Entomology*, 34(5): 1211–1223
- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5): 189–194
- Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MMC, Hartley SE, Hellmich RL, Huesing JE, Jepson PC, Layton R, et al. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26: 203–208
- Schuler TH, Denholm I, Clark SJ, Stewart CN, Poppy GM. 2004. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Physiology*, 50(5): 435–443
- Tian JC, Romeis J, Liu K, Zhang FC, Zheng XS, Xu HX, Chen GH, He XC, Lu ZX. 2017. Assessing the effects of Cry1C rice and Cry2A rice to *Pseudogonatopus flavifemur*, a parasitoid of rice planthoppers. *Scientific Reports*, 7: 7838
- Walker GP, Cameron PJ, MacDonald FM, Madhusudhan VV, Wallace AR. 2007. Impacts of *Bacillus thuringiensis* toxins on parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 40(1): 142–151
- Wang WJ, Cai WL, Wang ZJ, Zhao J, Hua HX. 2020. A new method for evaluating the effects of insecticidal proteins expressed by transgenic plants on ectoparasitoid of target pest. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(24): 29983–29992
- Wang ZJ, Cai WL, Wang WJ, Zhao J, Li YF, Zou YL, Elgizawy KK, Hua HX. 2020. Assessing the effects of Cry2Aa protein on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194: 110380
- Wang ZX, Li YH, He KL, Bai SX, Zhang TT, Cai WZ, Wang ZY. 2017. Does Bt maize expressing Cry1Ac protein have adverse effects on the parasitoid *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae)? *Insect Science*, 24(4): 599–612
- Wu FC, Weng JF, Li XH, Yin JQ, Song XY. 2020. Resistance of transgenic maize CM8101 with *Cry1Ab-ma* gene against the 1st and 2nd instar larvae of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Plant Protection*, 47(4): 815–821 (in Chinese) [武奉慈, 翁建峰, 李新海, 尹俊琦, 宋新元. 2020. 转*Cry1Ab-ma*基因玉米CM8101对草地贪夜蛾1龄和2龄幼虫的抗性. 植物保护学报, 47(4): 815–821]
- Wu Y, Wang ZY, He KL, Bai SX, Zhao CS. 2008. Effect of transgenic Bt corn (Event Bt11) pollen expressing Cry1Ab toxin on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in the laboratory. *Acta Entomologica Sinica*, 51(2): 227–233 (in Chinese) [吴研, 王振营, 何康来, 白树雄, 赵长山. 2008. 转Bt基因玉米Bt11花粉对玉米螟赤眼蜂繁殖和存活的影响. 昆虫学报, 51(2): 227–233]
- Zhu Y, Wu Q, Gao YF, Xu HL, Liu CM, Zhou ZL, Zhu Z, Li XH. 1997. Cloning and sequencing of snowdrop lectin cdna and construction of plant expression vector. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(4): 27–34 (in Chinese) [朱玉, 吴茜, 高越峰, 徐鸿林, 刘春明, 周兆斓, 朱祯, 李向辉. 1997. 雪花莲外源凝集素基因的克隆、序列分析和植物表达载体的构建. 农业生物技术学报, 4(4): 27–34]

(责任编辑:张俊芳)