



棉铃虫种群对 Bt 棉抗性等位基因频率分析

刘凤沂, 须志平, 沈晋良*

(南京农业大学农业部病虫害监测与治理重点开放实验室,
植物保护学院农药科学系, 南京 210095)

摘要:2005 年采用 F_1 和 F_2 代法估测了河北省邱县棉铃虫对 Bt 棉的抗性等位基因频率分别为 0.047(95%CI:0.015~0.079)和 0.015(95%CI:0.0067~0.0277)。该频率值较 1999 年的初始频率 0.0058 几乎上升近 10 个百分点,警示该地区棉铃虫种群抗性已明显上升趋势。

关键词:棉铃虫;Bt 棉; F_1 代法; F_2 代法;抗性频率

中图分类号: S435.622 中图分类号: A

文章编号:1002-7807(2008)06-0470-03

Analysis of Frequency of Resistance Allele to Bt Cotton in Field Cotton Bollworm Populations

LIU Feng-yi, XU Zhi-ping, SHEN Jin-liang *

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pest Insects, Ministry of Agriculture, Department of Pesticide Science, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using F_1 and F_2 screen methods, the frequencies of resistance allele to Bt cotton in field cotton bollworm population in Qixian County Hebei province in 2005, were estimated as 0.047 (95%CI: 0.002-0.091) for F_1 screen and 0.015 (95%CI: 0.0067-0.0277) with a detection probability 93.8% for F_2 screen, respectively, which almost increased about 10% than the frequency (0.0058) from 1999. The result cautioned that the resistance of *H. armigera* in this region had clearly increased from 1999 to 2005 and effective resistance management strategies need to be implemented as soon as possible.

Key words: cotton bollworm;Bt cotton; F_1 screen; F_2 screen; resistance frequency

在最近的 10 年内已发展了多种用于检测大田害虫种群对 Bt 抗性的方法,它们检测早期抗性的有效性很大程度上依赖于能否检测到稀少、隐性抗性基因的能力。由于棉铃虫对 Bt 毒素或 Bt 棉多数为不完全隐性抗性遗传,在田间低频率隐性抗性时单独使用传统的生物测定法(如剂量-反应法、区分剂量法)进行抗性检测是不够灵敏的。而 F_1 代法^[1]和 F_2 代法^[2]是目前检测田间隐性抗性基因最有效的方法。在本实验室,用 Bt 棉筛选室内棉铃虫 43 代后得到了对 Cry1Ac 毒素具有 1600 多倍的高抗品系 YCR^[3],随后继续筛选至 88 代抗性高

达 7000 多倍。抗性遗传分析结果表明该抗性品系是由主效基因控制的、常染色体隐性遗传^[4]。本文采用这两种方法估测河北省邱县 Bt 棉田棉铃虫种群对 Bt 棉的抗性等位基因频率,为制定 Bt 棉田棉铃虫抗性治理策略提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 F_1 代检测法

田间雄虫与 YCR 处女雌虫单对交配建立单雌系。收集每个单雌系的卵并将其初孵幼虫接入盆栽 5~8 叶期 Bt 棉株上,每盆检测一个单雌系。

收稿日期:2007-12-14

作者简介:刘凤沂(1968-),女,高级农艺师,博士,Liu-fy68@163.com; * 通讯作者:jlshen@njau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270889)

接虫后,每个钵钵用细孔纱网罩住,纱网底部四周用塑料胶带粘封在实验台面上,以防逃跑和交叉混杂。5 d 后检查各单雌系在棉株上的活虫数、龄期及体重。凡存活幼虫达到抗性个体发育标准(取食 Bt 棉 5 d 后生长发育达到 2 龄中期以上、体重 $\geq 0.8 \text{ mg}^{[5]}$)的单雌系被定义为潜在阳性。

F_2 代核查:经 F_1 代检测为抗性的存活幼虫单头饲养至化蛹。每个单雌系羽化的成虫与 YCR 品系进行单对回交,其 F_2 代初孵幼虫采用与 F_1 代相同方法进行核查。由于害虫抗性个体对 Bt 毒素的适合度代价削弱了其在 Bt 棉上生长发育的能力,YCR 室内筛选结果也显示在 Bt 棉上 5 d 的平均存活率为 50%。由此可知,假阳性单雌系的 F_2 代初孵幼虫在 Bt 棉上的存活率约为 25%,而非 50%;而真阳性单雌系的存活率约为 50%,而非 100%。因此将 F_2 代核查存活幼虫百分率高于 25%的单雌系确定为真阳性单雌系;反之,则为假阳性单雌系。

1.2 F_2 代检测法

采集的雌虫于塑料杯内单头饲养,收集每个单雌系的卵块并将其初孵幼虫(F_1)用人工饲料在培养皿中单头饲养至化蛹。同一单雌系的蛹收集后经温度调控使其同时羽化并群体交配,将每个单雌系的 F_2 初孵幼虫采用与 F_1 代法相同方法进行 F_2 代抗性检测。5 d 后检查存活幼虫的体重和龄期。凡有存活幼虫达到抗性标准的单雌系为潜在阳性。

F_4 代核查;保留所有 F_2 代检测为潜在阳性的单雌系并单独分开饲养至 F_4 代,再次采用 Bt 棉株进行抗性核查,方法同 F_2 代检测。若该单雌系的 F_4 代存活幼虫中仍有达到抗性标准的个体,那么该单雌系被鉴定为真阳性,结果根据公式计算抗性等位基因频率 $E(q)$ 和 95%置信限^[4]。

2 结果与分析

2.1 F_1 代法检测

田间采来的雄虫建立了 207 个单雌系,其中仅有 86 个单雌系产生了足够数量的卵供 F_1 代检测。每个单雌系在 Bt 棉植株上平均接(251.30 \pm 16.15)头初孵幼虫,处理 5 d 的结果表明:73 个单雌系有活虫(其它 13 个单雌系无活虫)。其中有 42 个单雌系的活虫达到抗性标准,均为潜在阳性。

42 个潜在阳性单雌系除 14 个单雌系因死亡或产无效卵而无法进行核查外,28 个单雌系的回交后代平均处理(184.46 \pm 10.95)头 F_2 代初孵幼虫,5 d 的结果表明:其中有 8 个单雌系经 F_2 代核查有达到抗性标准的活虫率在 25%以上,验证为真阳性。另外 20 个单雌系的 F_2 代活虫率低于该值,确定为假阳性。由于田间的父本为双倍体,计算 $E(q)$ 为 $8/(2 \times 86) \approx 4.7 \times 10^{-2}$,95%置信限为 0.015~0.079。

2.2 F_2 代法检测

共采集 337 个雌虫,最终有 131 个单雌系进行了 F_2 代抗性检测。平均每个单雌系有(314.01 \pm 8.95)个 F_2 代初孵幼虫在 Bt 棉植株上进行了抗性检测。检测结果表明,在 Bt 棉株上共有 50 个单雌系有存活幼虫,其中有 13 个单雌系含有达到抗性标准的活虫,为潜在阳性。

13 个潜在阳性单雌系中有 7 个进行了 F_4 代抗性验证,并且在 Bt 植株上检测到了达到抗性标准的活虫,为真阳性;其它 6 个单雌系由于昆虫病菌感染(病毒和微孢子虫)及饲料霉变等原因而未能进行 F_4 代验证。经计算 $E(q)$ 为 $(7+1)/[4 \times (131+2)] \approx 1.5 \times 10^{-2}$,95%置信限为 0.0067~0.0277。

3 讨论

本研究采用 F_1 和 F_2 代法在室内用 Bt 棉株检测田间棉铃虫对 Bt 棉的抗性等位基因频率。两种方法检测的结果基本一致,说明 F_1 代法可以应用于田间抗性检测。从理论上讲, F_1 和 F_2 代法检测的灵敏度分别为 1/2 和 1/16,即用 F_1 代法检测的频率应高于 F_2 代法,这与检测结果基本一致。两个频率值统计差异不显著(其频率的 95%置信区间重叠),这可能与 F_1 代法的核查检出率低有关: F_1 代法的核查真阳性的检出率仅为 32%,而 F_2 代法真阳性核查检出率为 100%;另外,在 F_1 代法中有 14 个单雌系因死亡或产生无效卵而无法进行核查;而 F_2 代法中仅 6 个单雌系由于病毒或细菌感染以及霉变饲料而未能进行验证。由此可见,两种方法所估测的频率值仍是偏低或保守的。

多种有效的方法相结合无疑会提高检测结果的可靠性,然而检测成本、检测的时效性在实际应用中需要考虑。 F_1 和 F_2 代法均能检测到田间稀少的、携带隐性抗性杂合子的个体,但 F_1 代法的

检测灵敏度高于 F_2 代法;对 F_2 代法来说,高成本和费时是主要限制因素。因此只要具备室内高抗品系,采用 F_1 代法更为有效、经济、实用。

田间棉铃虫对Bt棉的抗性在国内已有广泛研究。采用区分剂量法检测结果显示国内十多个地区田间棉铃虫种群对Bt棉保持敏感性;先初筛后复筛的 F_1 代法检测河南安阳和河北沧县两地种群抗性基因频率处于正常水平;检测河北安新和山东夏津两地种群结果表明主效非隐性抗性基因频率略有升高,且对Cry1Ac毒素的耐药性也有所上升;本研究采用 F_1 代法和 F_2 代法检测到邳县种群出现明显的抗性上升。这些不同的检测结果可能是由于不同的检测方法灵敏度不同,供试毒素的来源不同、不同地区Bt棉种植和害虫治理情况不同等原因造成。

1998年邳县开始商业化种植Bt棉,而早在1991年就开始使用Bt制剂防治棉铃虫,该虫对Bt制剂已经产生抗性,并研究表明:棉铃虫对Bt棉与Bt制剂存在交互抗性。1999年何丹军等检测到当地的抗性等位基因频率(0.0058)已高于庇护区策略要求的低初始频率($P < 10^{-3}$)。另一方面,当地没有采用有效的抗性治理策略。尽管认为豆类、花生、玉米等可作为棉铃虫的自然庇护区,然而研究表明:常规棉作为天然庇护区的效果最好,在当地自2001年起就没有种植非Bt棉作为庇护区;有研究认为分开种植的庇护区效果好于嵌入式种植模式,该地区自然庇护区作物不仅很少,而且种植模式随机。可见,该地区的“庇护区”可能不足以提供足够量的敏感个体来稀释田间抗性个体。此外,Bt棉品种繁多,部分农民自留种或从非正常渠道购种使得Bt棉的毒素表达量参差不齐,加上后期毒素表达量显著降低,为田间抗性进化提供了有利条件。

邳县棉铃虫抗性等位基因频率从1999年的0.0058上升到2005年的0.015~0.047,说明田间种群的抗性已开始处于明显上升阶段。来自当地植保部门田间调查资料也证实棉铃虫发生呈逐

年上升趋势。可见,在没有完善的田间抗性治理策略的地区,棉铃虫更易产生抗性,因此,当地需要建立有效的害虫抗性检(监)测和风险评估体系,同时制定和实施有效的抗性治理策略,延缓棉铃虫的抗性进化。

参考文献:

- [1] GOULD F, Anderson A, Jones A, et al. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 3519-3523.
- [2] ANDOW D A, Alstad D N, Pang Y H, et al. Using an F_2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European cornborer (Lepidoptera: Crambidae) [J]. J Econ Entomol, 1998, 91: 579-584.
- [3] MENG F, Shen J, Zhou W et al. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Pest manage Sci, 2004, 60: 167-172.
- [4] 周晓梅,沈晋良. 棉铃虫对转Cry1Ac基因棉的抗性遗传及 AFLP 标记研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 269-274.
ZHOU X M, Shen J L. Inheritance and AFLP marker of resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) to transgenic Cry1Ac cotton [J]. Cotton Sci, 2005, 17(5): 269-274.
- [5] 何丹军,沈晋良,周威君,等. 应用单雌系 F_2 代法检测棉铃虫对转Bt基因棉抗性等位基因的频率[J]. 棉花学报, 2001, 13(2): 105-108.
- [6] HE D J, Shen J L, Zhou W J, et al. Using F_2 Genetic Method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) [J]. Cotton Sci, 2001, 13(2): 105-108. ●