

转 *Bt*+*Sck* 基因双价抗虫棉的抗虫性及遗传分析

郭金英, 朱协飞, 郭旺珍, 张天真*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要:对通过花粉管通道注射获得的转 *Bt*+*Sck* 双价基因抗虫棉纯系 312-5T₂ 和 332-2T₂ 进行了生物抗虫性测定, 转基因纯系对棉铃虫的抗性显著高于非抗虫对照苏棉 16 和抗虫对照品种 sGK321, 与抗虫对照 R19 抗虫性相当。遗传分析表明, 转 *Bt*+*Sck* 双价基因抗虫棉的抗性基因符合一对显性基因的分离规律。对转 *Bt*+*Sck* 双价基因抗虫棉与 R19 及 sGK321 的杂交 F₁ 进行了抗虫性测定, 所有的 F₁ 植株都表现出与转 *Bt*+*Sck* 基因纯系亲本一致的抗虫性。转 *Bt*+*Sck* 双价基因抗虫棉纯系 312-5T₂ 和 332-2T₂ 等位性测验证明: 312-5T₂ 与 R19、sGK321 的抗虫基因整合位点不连锁, 表现为 15:1 的自由组合比例; 而 332-2T₂ 与 R19 中抗虫基因的整合位点表现连锁, 与 sGK321 的抗虫基因表现自由组合。这为培育新的双价抗虫棉品种(系)提供了优良的育种材料。

关键词: *Bt*+*Sck* 双价抗虫棉; 抗虫性; 遗传分析

中图分类号: S562.034 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)02-0088-05

Inheritance Analysis and Resistance of the Transgenic Cotton Harboring *Bt*+*Sck* Double Genes to *Helicoverpa armigera*

GUO Jin-ying, ZHU Xie-fei, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen*

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: At present, scientists are engaged in engineering plants with two or more resistant genes in order to delay and prevent the adaptation in pest species, prolong the usage of life span of transgenic plants and broaden resistant spectrum. Thus, the *Bt* and *Sck*(modified *CpTI* gene) gene, driven by CaMV35S promoter and CLCuV promoter (PRPB), respectively, were transformed into the cotton genome (Sumian 16) by pollen-tube pathway-mediated method in our lab. Five transgenic cotton plants (T₀) were obtained by Kanamycin screening. The results of PCR and Southern hybridization indicated that the exogenous genes were stably integrated into cotton genome. Laboratory bioassays showed that the mortality of bollworm larvae (*Helicoverpa armigera*) accounted for more than 90% at peak flowering and boll developing stage after 5 d fed with new expanded leaves on main stem nodes of the two transgenic plants, 312-5 and 332-2, which had higher efficiency against neonate larvae than bivalent transgenic cotton sGK321 (unpublished data). The homologous lines (312-5 T₂ and 332-2 T₂) were obtained in the second generation progeny plants (T₂) from the self-fertilized transformed parent tested by Kanamycin resistance and bollworm bioassays. In the present work, these two transgenic homologous lines showed high efficiency to bollworm by insect bioassays. The insect-resistant and susceptible plants were segregated out in F₂ populations produced between homologous transgenic lines (312-5 T₂, 332-2 T₂) and three cultivars (Sumian16, R19 and sGK321). The plants with three and

收稿日期: 2006-08-14 作者简介: 郭金英(1976-), 女, 博士研究生; *, 通讯作者, cotton@njau.edu.cn

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT0432)

four in leaf damage index and 3rd instar larvae survival were classed as the susceptible and those of one and two in leaf damage index and no 3rd instar larvae survival as the resistant after 5d feeding in laboratory bioassays. According to this standard, segregation of resistant and susceptible plants fits 3 : 1 ratio in F_2 populations crossed among the two homologous transgenic lines and Sumian 16, respectively. This result indicated that the resistance of homologous transgenic lines to *Helicoverpa armigera* was controlled by one pair of dominant genes. The populations of $(312-5T_2 \times sGK321) F_1$, $(332-2T_2 \times sGK321) F_1$, $(312-5T_2 \times R19) F_1$ and $(332-2T_2 \times R19) F_1$ had the same resistant level to bollworm as their parents. It meant that in heterozygous status, there was no co-suppression phenomenon which caused gene silence and resistance decrease. Additionally, there were 112 vs. 12 and 187 vs. 20 resistant and susceptible plants segregated out respectively for $(312-5T_2 \times sGK321) F_2$ and $(332-2T_2 \times sGK321) F_2$. These values closely fit 15 : 1 segregation ratio. These results showed independent inheritance or different chromosome insertion of *Bt* genes for transgenic homologous lines and sGK321 strains. Segregation of resistant and susceptible plants also fit 15 : 1 ratio in $(312-5T_2 \times R19) F_2$ population, indicating independent inheritance or different chromosome insertion of *Bt* genes for 312-5 T_2 and R19. In the population of $(332-2T_2 \times R19) F_2$, all the plants were resistant to bollworm, implying linkage inheritance or the same chromosome insertion of *Bt* genes for 332-2 T_2 and R19. So the two homozygous transgenic lines (312-5 T_2 and 332-2 T_2) were valuable to develop new transgenic cotton varieties with high efficiency against cotton bollworm.

Key words: transgenic cotton harboring *Bt*+*Sck* double genes; insect-resistance; inheritance analysis

转 *Bt* 基因抗虫棉的大面积推广种植带来了巨大的经济效益和社会效益,但害虫对转 *Bt* 单基因抗虫棉的抗性构成了对这一类抗虫棉进一步应用的潜在威胁^[1-4]。将作用机理不同的两种抗虫基因转入作物体内是延缓害虫对 *Bt* 基因产生抗性的途径之一^[4-5]。豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)属丝氨酸蛋白酶抑制剂类型,由于抗虫谱广、安全性高,害虫不易产生耐受性等优点而广泛用于抗虫基因工程。中国科学院遗传和发育生物研究所朱祯实验室通过对 *CpTI* 基因进行修饰得到 *Sck* 基因,即在 *CpTI* 基因的 5' 端添加信号肽 SKTI 编码序列和 3' 端添加内质网滞留信号 KEDL 编码序列,提高了 CpTI 蛋白在内质网的积累量,并且使其免于被胞浆内的蛋白酶分解,从而提高外源蛋白在细胞内的积累。因此,将 *Sck* 基因和 *Bt* 基因这两种抗虫机理不同的抗虫基因联合,既赋予转基因植株更好的抗虫性,又能延缓害虫产生耐受性。南京农业大学棉花所通过花粉管通道法将 *Bt*+*Sck* 双价基因导入陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 苏棉 16 中,并对获得的转化植株进行了卡那霉素抗性筛选、分子杂交验证及抗虫测定,通过两代自交,在 T_2 代获得了转基因纯系(另文发表)。本研究对 312-5 T_2 和 332-2 T_2 纯系进行了室内抗虫性测定,并对其抗性进行了遗传

分析,以及与 R19、sGK321 的等位性测验,目的是获得与现有抗虫棉的抗虫基因非等位的、抗虫效果显著、遗传符合一对显性基因分离规律的转 *Bt*+*Sck* 基因纯系,从而为双价抗虫棉新品种的选育及其在生产上的利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

312-5 T_2 及 332-2 T_2 分别为通过花粉管通道法转化苏棉 16 号获得的转 *Bt*+*Sck* 双价抗虫基因棉花自交二代的纯合株系。

R19、转 *Bt*+*CpTI* 双价抗虫棉 sGK321。R19 是中国农科院棉花研究所通过生物技术和常规育种相结合的手段培育出的转 *Bt* 基因抗虫棉品系^[6]。转 *Bt*+*CpTI* 双价抗虫棉(sGK321)是由中国农业科学院生物技术中心构建的 *Bt*+*CpTI* 双价抗虫基因表达载体,由江苏省农业科学院经作所通过花粉管通道法导入陆地棉所得的抗虫棉品系^[7]。这些材料引入后,通过南京农业大学棉花研究所建立的棉铃虫室内生物测试、卡那霉素沾叶法和 *Bt* 基因的 PCR 扩增相结合的分子育种体系进行单株自交选择和后代株系鉴定,通过系统选育而培育成抗虫稳定的纯合品系^[8-9]。上述材料均由南京农业大学棉花研究所保存和

提供。

棉铃虫(*H. armagera*)初孵幼虫由江苏省农业科学院植物保护研究所提供。

1.2 室内抗虫性测定

在棉花生长的开花期,测定转 *Bt+Sck* 基因纯系及 R19、sGK321 的主茎嫩叶(倒数第 2 或者 3 片平展叶)对棉铃虫初孵幼虫的抗性,每材料测定 15 株。棉铃虫的死亡率、龄期、叶片受害级别和抗、感虫划分标准按以下方法进行。

将采摘的叶片用浸湿的脱脂棉包住叶柄,每张叶片置于一个一次性塑料杯中,每叶接 5~8 头棉铃虫初孵幼虫,用保鲜膜覆盖杯口,用橡皮筋扎紧,放在 27 ℃,每天照光 14 h 的条件下饲养,约一周后调查棉叶上存活的幼虫数、存活幼虫虫龄及叶片危害级别。根据存活幼虫数和存活幼虫虫龄统计棉铃虫的死亡率和三龄幼虫占存活幼虫的百分比。

棉铃虫对叶片的危害级别分为 5 个等级:0 级,无危害或有零星不相连的取食孔;1 级,受害面积在 10% 以下,针状取食孔不相连;2 级,受害面积 10%~50%,受害部分成小片状分布;3 级,受害面积 50%~90%,有连片的叶肉组织存在;4 级,受害面积超过 90%,无连片的叶肉组织。

根据唐灿明的报道,抗感虫划分标准如下,将叶片危害级别为 3~4 级,且有 3 龄幼虫出现的植株划分为感虫植株。而将叶片危害级别为 1~2 级,无 3 龄幼虫出现的植株划分为抗虫植株。

1.3 转 *Bt+Sck* 基因棉花抗性基因的遗传分析及等位性测验

2005 年夏天在南京农业大学江浦农场用苏棉 16 号、R19 和 sGK321 分别与 312-5T₂ 及 332-2T₂ 杂交获得 F₁,于 2005 年冬季在海南南繁加代,每组合种植 2~4 行;各 F₁ 组合自交得到 F₂,2006 年进行苗期卡那霉素抗性鉴定,4 月 5 日同时将 F₁、F₂ 及亲本材料的种子在南京农业大学江浦实验农场棉花育种试验基地营养钵育苗,单粒播种,地膜覆盖。在幼苗有 5~6 片真叶时,用棉铃虫初孵幼虫进行室内生物测定,统计抗虫和感虫的棉苗数目。运用卡方测验检测 F₂ 的抗虫和感虫植株的分离比例。

2 结果与分析

2.1 转 *Bt+Sck* 双价基因棉花与 R19、sGK321 抗虫性

对转 *Bt+Sck* 双价基因棉花 312-5 T₂、332-2 T₂ 与两个已有的转基因抗虫棉花品系 R19、sGK321 在开花期进行的棉铃虫抗性检测表明,所有的抗虫棉的棉铃虫死亡率平均都在 90% 以上,没有出现 3 龄幼虫,叶片危害级别都没有超过 2 级,表现出很好的抗棉铃虫效果;而对照苏棉 16 号中棉铃虫幼虫死亡率在 10% 以下,93.3% 的存活幼虫为 3 龄幼虫,叶片危害级别为 3 或 4 级。同时还可以看出,转 *Bt+Sck* 双价基因棉花的抗虫性与 R19 相当,但显著高于 sGK321 ($P < 0.05$),前者的幼虫死亡率为 100%,而后者的幼虫死亡率为 90% 左右(表 1)。

表 1 转 *Bt+Sck* 双价抗虫棉与 R19、sGK321 对棉铃虫的抗性

Table 1 Evaluation on insect resistant of *Bt+Sck* transgenic cotton, R19 and sGK321 cotton lines

株系	幼虫死亡率/%	3 龄幼虫/活虫数	叶片危害级别
(312-5T ₂ × R19)F ₁	100a	0B	0C
(312-5T ₂ × sGK321)F ₁	100a	0B	0.7 ± 0.3B
(332-2T ₂ × R19)F ₁	96.0 ± 8.9a	0B	0.6 ± 0.5B
(332-2T ₂ × sGK321)F ₁	100a	0B	0.5 ± 0.7B
312-5T ₂	100a	0B	0.7 ± 0.3B
332-2T ₂	100a	0B	0.3 ± 0.6B
R19	100a	0B	1B
sGK321	90.0 ± 24.5b	0B	0.5 ± 0.5B
苏棉 16	6.7 ± 10.3c	93.3 ± 10.3A	3.5 ± 0.7A

注:数字后小写字母表示显著性差异水平($P < 0.05$),大写字母表示极显著性差异水平($P < 0.01$),下同。

2.2 转 *Bt+Sck* 双价基因棉花抗虫基因的遗传分析

卡那霉素抗性及室内抗虫性测定表明,312-

5T₂ 与 332-2T₂ 两个转 *Bt+Sck* 基因纯系与原始受体苏棉 16 杂交 F₁ 群体中均是抗性植株;在 F₂ 杂交群体中抗性植株与敏感植株的比例均符合

3 : 1, 因而可以推断 312-5T₂ 与 332-2T₂ 两个转基因纯系的抗性基因符合一对显性基因的孟德尔遗传规律(表 2)。

表 2 转 *Bt+Sck* 双价基因棉花与原始受体苏棉 16 杂交组合的抗性分离

Table 2 Segregation of resistance in population of *Bt+Sck* transgenic cotton crossed with Sumian 16

组合	抗虫株	感虫株	理论比例	χ^2	概率
(312-5T ₂ × S16)F ₁	28	0	/	/	/
(312-5T ₂ × S16)F ₂	103	30	3 : 1	0.30	0.50~0.75
(332-2T ₂ × S16)F ₁	35	0	/	/	/
(332-2T ₂ × S16)F ₂	132	50	3 : 1	0.47	0.25~0.50

$\chi_{c,0.05}^2 = 3.84$ 。

2.3 转 *Bt+Sck* 双价基因棉花与 R19、sGK321 的等位性测验

卡那霉素抗性筛选及棉铃虫室内生物检测结果表明,转 *Bt+Sck* 双价基因棉花 312-5T₂、332-2T₂ 与 R19、sGK321 两个已有的转基因抗虫棉花品系杂交种 F₁ 群体均表现出显著的抗虫性,没有表现分离,抗性水平与两个转 *Bt+Sck* 基因抗虫棉亲本 312-5T₂、332-2T₂ 一致(表 1)。从转基因抗虫棉之间的杂交种 F₁ 高抗棉铃虫特性表明,这些抗虫基因在杂合状态下,并没有产生共抑制现象而导致对棉铃虫抗性的下降。转 *Bt+Sck* 双价基因棉花与 R19、sGK321 两个转基因抗虫棉纯

合品系杂种 F₂ 群体中,312-5T₂ 与 R19、sGK321 的 F₂ 群体中的抗虫与感虫植株分离比都符合 15 : 1(表 3),因而可以推断 312-5T₂ 的抗虫基因与这两个转基因抗虫棉品系的抗虫基因可能整合在不同的染色体上。在 332-2T₂ 与 R19 的杂交 F₂ 群体中,没有出现感虫植株;而在 332-2T₂ 与 sGK321 杂交的 F₂ 群体中抗虫与感虫植株分离比符合 15 : 1,初步推断 332-2T₂ 的抗虫基因与 R19 转基因抗虫棉品系的抗虫基因可能整合在相同染色体的同一位点上,与 sGK321 转基因抗虫棉品系的抗虫基因可能整合在不同染色体上。

表 3 转 *Bt+Sck* 双价基因棉花与 R19、sGK321 杂种群体对棉铃虫的抗性分离

Table 3 Segregation of bollworm resistance in the population of *Bt+Sck* transgenic cotton crossed with R19 and sGK321 cotton lines

组合	抗虫株	感虫株	理论比例	χ^2	概率
(312-5T ₂ × R19)F ₁	35	0	/	/	/
(312-5T ₂ × R19)F ₂	190	10	15 : 1	0.34	0.50~0.75
(312-5T ₂ × sGK321)F ₁	40	0	/	/	/
(312-5T ₂ × sGK321)F ₂	112	12	15 : 1	1.93	0.10~0.25
(332-2T ₂ × R19)F ₁	32	0	/	/	/
(332-2T ₂ × R19)F ₂	148	0	/	/	/
(332-2T ₂ × sGK321)F ₁	48	0	/	/	/
(332-2T ₂ × sGK321)F ₂	187	20	15 : 1	3.55	0.05~0.10

注: $\chi_{c,0.05}^2 = 3.84$ 。

3 小结与讨论

研究对转 *Bt+Sck* 基因 T₂ 代纯系与原始受体苏棉 16 号的 F₂ 群体采用卡那霉素沾叶法及室内棉铃虫生物测试进行抗、感植株鉴定表明,抗性基因符合 3 : 1 的分离比,遵循单个显性基因的遗传规律。本研究所用的转 *Bt+Sck* 基因材料都表现为单基因的遗传,可能与抗虫转化植株的生物测定筛选方法选择强度大有关,那些不能正常表达或表达相对较低的转化体由于被棉铃虫取食而

淘汰,而表达水平较高,单拷贝的整合的植株通常得以保留下来,从而表现单拷贝的遗传^[10]。唐灿明等^[11]采用生物测定的方法对我国通过不同转化方法获得的 3 类转 *Bt* 基因抗虫棉品系研究表明,它们对棉铃虫的抗性各由一对显性主基因控制。如果多个不同的外源基因整合在受体的同一或相近位点,它们往往呈完全连锁状态,也表现出单基因的遗传分离规律^[12-13]。对于位于同一表达载体上的多个外源基因,许多研究表明它们在遗传转化时倾向于整合在受体基因组的同一个位点

上,并在转基因植株后代中是共分离的^[14-15]。对花粉管通道法转化获得的转 *Bt*+*CpTI* 双价抗虫棉的研究表明,它对棉铃虫的抗性表现为单个显性基因的遗传分离规律^[15]。

对转 *Bt* + *Sck* 基因 T_2 代纯系与 R19、sGK321 进行等位性测验,(312-5 T_2 ×R19) F_2 群体中的抗虫株为 190 株,感虫株为 10 株,分离比例为 19:1,经 $\chi^2(15:1)$ 适合性测验表明:312-5 T_2 株系的抗虫基因与 R19 的抗虫基因符合两对基因的遗传规律,从而推断两者的抗虫基因也是非等位的;(312-5 T_2 ×sGK321) F_2 群体中的抗虫株为 112 株,感虫株为 12 株,经 $\chi^2(15:1)$ 适合性测验表明:312-5 T_2 株系的抗虫基因与 sGK321 的抗虫基因符合两对基因的遗传规律,两者的抗虫基因是非等位的。(332-2 T_2 ×R19) F_2 群体中没有出现感虫棉株,说明 332-2 T_2 株系的抗虫基因与 R19 的抗虫基因是连锁遗传的;而(332-2 T_2 ×sGK321) F_2 群体中抗虫株为 187 株,感虫株为 20 株,经 $\chi^2(15:1)$ 适合性测验表明:332-2 T_2 株系的抗虫基因与 sGK321 的抗虫基因符合两对基因的遗传规律,从而推断两者的抗虫基因是非等位的。在抗性遗传的卡方测验中,其实际概率与理论概率均有较明显差异,这可能与检测的群体大小、检测时的环境因素以及棉花自身的生长发育状况等有关。

对棉铃虫的室内生物测定结果表明,转 *Bt*+*Sck* 双价基因棉花 T_2 纯系的棉铃虫死亡率平均都在 90%以上,没有出现 3 龄幼虫,叶片危害级别都没有超过 2 级,表现出很好的抗棉铃虫效果;田间调查也发现对棉铃虫有显著抗性,为抗虫棉育种提供了一份很好的材料,目前正在利用该纯系培育新的双价抗虫棉品种。

参考文献:

- [1] 文学,张宝红. 转基因抗虫棉研究现状与展望[J]. 农业生物技术学报,2000,8(2): 194-199.
- [2] 孙雷心. 全球转基因作物商品化情况[J]. 生物技术通报,2000,(1): 45-46.
- [4] LIU Y B. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis* [J]. Proc R Soc Lond B, 1997, 264: 605-610.
- [5] 范贤林,赵建国,范云六. 转 *Bt* 基因植物对不同抗性棉铃虫的生长抑制作用[J]. 植物保护,2000, 26(2): 3-5.
- [6] 夏敬源,崔金杰,马丽华,等. 转 *Bt* 基因抗虫棉花在害虫综合治理中的作用研究初探[J]. 棉花学报, 1999,11(2): 57-64.
- [7] 郭三堆,崔洪志,夏兰芹,等. 双价转基因棉花研究[J]. 中国农业科学,1999,32(3): 1-7.
- [8] 孙敬. 转 *Bt* 基因抗虫棉棉铃虫抗性的表现特性及其遗传研究[D]. 南京农业大学,1999.
- [9] 袁小玲,唐灿明,张天真. 转 *Bt*+*CpTI* 双价基因抗虫棉棉铃虫抗性的遗传分析[J]. 棉花学报,2001, 13(6): 342-345.
- [10] 王守才,王国英,戴景瑞. 关于高等植物转基因遗传问题的讨论[J]. 生物工程进展,2000,20(4): 64-66.
- [11] 唐灿明,孙敬,朱协飞,等. 我国现有的 3 类转 *Bt* 基因抗虫棉品系棉铃虫抗性的遗传分析[J]. 科学通报,1999,44(19): 2064-2067.
- [12] CHRISTOU P, Swain W F, Yang N S, et al. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 7500-7504.
- [13] PENG J, Wen F J, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 91-104.
- [14] SPENCER T M, O'Brien J V, Star W G, et al. Segregation of transgenes in maize[J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 201-210.
- [15] 冯道荣,许新萍,邱国华,等. 多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达[J]. 科学通报,2000,45(15): 1593-1599.
- [16] 袁小玲,唐灿明,张天真. 转 *Bt*+*CpTI* 双价基因抗虫棉棉铃虫抗性的遗传分析[J]. 棉花学报,2001, 13(6): 342-345. ●