

转 Bt 基因棉不同品种杀虫蛋白季节性表达及其对棉铃虫的控制作用

沈平^{1,2}, 林克剑², 张永军^{2*}, 吴孔明², 郭予元²

(1. 农业部科技发展中心, 北京 100026; 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: 实验室条件下研究了不同品种转 Bt 基因棉花对棉铃虫抗性的差异、不同生育期棉花抗虫性的变化及 Bt 毒蛋白季节性表达。结果显示, 不同品种转 Bt 基因棉在不同发育阶段, 其棉叶均有阻止棉铃虫取食的作用, 表现了明显的抗性, 但其抗性强弱存在明显差异。DP 99B 抗性表现最好, Hanza154 抗性相对较差, 6 d 平均校正死亡率分别为 89.23% 和 75.91%。转基因棉不同品种对棉铃虫的抗性在时间上呈现动态变化, 以植株发育阶段划分, 表现为蕾期 > 盛花期 > 花铃期 > 铃期。ELISA 测定结果表明, Bt 毒蛋白在转基因棉不同器官中的含量差异显著, 叶片中 Bt 毒蛋白的表达量显著大于其它组织器官。随着棉花生长发育的推进, 叶片(鲜重)中 Bt 毒蛋白含量则明显降低, 表现为七叶期 > 三叶期 > 蕾期 > 铃期 > 花铃期。

关键词: 转基因棉; Bt 毒蛋白; 抗性; ELISA

中图分类号: S435.622 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2010)05-0393-05

Seasonal Expression of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Protein and the Control to Cotton Bollworm in Different Varieties of Transgenic Cotton

SHEN Ping^{1,2}, LIN Ke-jian², ZHANG Yong-jun^{2*}, WU Kong-ming², GUO Yu-yuan²

(1. Technology and Development Center of MOA, Beijing 100026, China; 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: The difference for resistant effects to bollworm, the dynamic of resistance and the content of Bt toxin protein in different organs during developmental stages of different varieties of Bt transgenic cotton were explored in laboratory. The results showed that there were significant differences for resistance to cotton bollworm during every growing stage of all varieties; DP 99B has the highest resistance to cotton bollworm, while Hanza 154 has the lowest, and their average corrected mortality to cotton bollworm were 89.23% and 75.91%, respectively. The resistance to cotton bollworm of cotton plants in each growing stage was presented in the following order, budding stage > flowering stage > flowering-boll stage > boll stage. The results of ELISA showed that Bt toxin protein could be detected in all organs of transgenic cotton, but its content varied significantly among organs along the developmental stages. There were significant differences of Bt toxin protein content among the functional leaves in different stages, the order of the content was: seven-leave stage > three-leave stage > budding stage > boll stage > flowering-boll stage.

Key words: transgenic cotton; Bt toxin protein; dynamic of resistance; ELISA

利用基因工程技术转入棉花中的 Bt 基因, 可以在棉花各组织器官中高效表达对鳞翅目害虫具有高效毒杀作用的 Bt 蛋白。室内生物测定结果表明^[1-2], 多数转 Bt 基因抗虫棉旺盛生长的器官对 3 龄以下幼虫的毒杀致死率在 90% 以上, 并能够严重抑制大龄幼虫的生长发育^[3]。转 Bt 基

因抗虫棉在大田表现抗虫性是由于其组织中 Bt 毒蛋白的高效表达, 其在叶片中表达量一般为总可溶性蛋白质的 0.105%~0.110%, 而且 Bt 毒蛋白含量的高低直接关系到转基因抗虫棉品种抗虫性的强弱^[4]。有报道指出, 转 Bt 基因棉花对棉铃虫的抗性随棉株器官、棉花生育期的变化而变

收稿日期: 2010-01-03 作者简介: 沈平(1966-), 女, 副研究员; * 通讯作者, yjzhang@ippcaas.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(No.2007CB0902); 国家科技支撑计划项目(2006BAD08A07)

化。棉株营养器官的抗虫性较强,花、蕾等生殖器官的抗虫性较弱;棉花生育前期的抗虫性较生育后期强^[5-6]。在棉花抗虫基因工程研究中,转基因植株的鉴定以及后代抗虫性的追踪检测,一般采用报告基因检测、Southern 杂交、Northern 杂交、PCR 扩增产物以及抗虫性测定等,而与抗虫性直接相关的 Bt 毒蛋白含量测定和 Bt 基因在棉株各个器官中的表达及其与棉花生长发育相关动态关系少有报道^[7-8]。本文采用用 ELISA 方法对转 Bt 基因棉花叶片、花、蕾及铃等器官中的 Bt 毒蛋白含量进行了测定,解析了 Bt 毒蛋白含量与品种抗虫性的关系,旨在蛋白水平上阐明 Bt 基因在棉株内表达的时空变化规律及其与抗虫性动态变化的内在联系。

1 材料和方法

1.1 供试棉花品种

转 Bt 基因棉花 DP 410B、DP 99B、DP 37B、DP 35B、Hanza 154 和 NC 20B 由孟山都远东有限公司提供,对照常规棉花品种为中棉所 12。

1.2 供鉴定用的棉铃虫

孵化后在人工饲料上饲养 1~2 d 的 1 龄幼虫。

1.3 试验设计与调查方法

1.3.1 抗虫测定。采样:分别在田间棉铃虫 2 代(6 月 25 日)、3 代(7 月 26 日)和 4 代(8 月 30 日)的发生高峰期采摘供试转基因棉株顶部倒数第 2 片展开叶,每品种随机取 30 株。另在棉花不同生育期,即三叶期、七叶期、蕾期、花期、花铃期和铃期,取顶端倒数第二片展开叶,每品种随机取 30 株,每株样本单独装入密封袋;同时,在蕾期、花期和铃期每个品种分别取 10 个蕾、花和铃,做好标记后液氮速冻并置于-80℃冰箱备用,测定毒蛋白含量。

塑料盒集体饲虫:将供试棉叶放在圆形带盖塑料盒内(直径 5 cm;高 3 cm),每盒接 1 龄幼虫 6 头,重复 4 次。接虫后将小盒盖密封严,防止幼虫逃逸并保持盒内湿度。

鉴定结果调查:检查 2 次,分别在接虫后第 3 天和第 6 天进行,调查记录幼虫死亡虫数和活虫数,计算死亡率和校正死亡率。

1.3.2 毒蛋白测定。取棉叶样品 0.2 g 置于预冷的研钵中匀浆,加入 1 倍 Bt 蛋白提取缓冲液 1000 μL 充分混匀,移至 2 mL 离心管中,4℃、10000 r·min⁻¹ 离心 4 min 取上清液。取 1 倍 Bt 蛋白提取缓冲液 900 μL 于 2 mL 离心管中,加入 100 μL 上清液,混匀,即为样品稀释液备用。按照 Cry1Ab/Cry1Ac Plate Kit ELISA 试剂盒(ENVIROLOGIX Inc, USA) 操作说明书进行 Bt 蛋白含量检测。

1.4 鉴定结果计算与数据分析

幼虫校正死亡率(%)=

$$\frac{\text{处理死亡率}-\text{对照组死亡率}}{1-\text{对照组死亡率}} \times 100.$$

上述所有试验结果均采用 SAS 9.0 中文版统计软件进行数据分析,并用邓肯氏方差分析及 t 测验检验显著性。

2 结果与分析

2.1 转基因棉不同品种抗棉铃虫室内生测试验

在 2 代棉铃虫发生高峰期,转基因棉不同品种对棉铃虫的抗性表现不一致(表 1),抗虫效果最好的是 DP 99B,3 d 和 6 d 的校正死亡率分别为 80.57% 和 90.76%;抗虫效果最差的是 Hanza 154,3 d 和 6 d 的校正死亡率分别为 39.65% 和 78.37%。在 3 代棉铃虫发生高峰期抗虫性最好的是 DP 99B,3 d 和 6 d 的校正死亡率分别为 63.94% 和 90.36%。在 4 代棉铃虫发生高峰期抗虫

表 1 转基因棉不同品种倒 2 叶室内抗棉铃虫生测结果
Table 1 The corrected mortality of cotton bollworm fed on the second leaf from different Bt transgenic cotton varieties in laboratory

品种	平均校正死亡率/%	
	3 d	6 d
DP35B	56.69±1.19 a	81.44±1.28 ab
DP37B	60.87±2.42 a	85.35±0.95 ab
DP99B	68.69±5.98 a	89.23±1.34 a
DP410B	58.22±4.04 a	79.53±3.82 ab
NC20B	57.87±0.5 4a	83.02±2.30 ab
Hanza154	53.68±7.36 a	75.91±4.53 b
中棉所 12	17.24±1.26 b	18.69±0.12 c

注:数据为 2~4 代棉铃虫发生高峰期各品种的校正死亡率平均值±标准误;同列中具有相同字母的表示在 5% 水平差异不显著;下同。

性最好的仍是 DP 99B, 6 d 的校正死亡率达到 86.56%, 最差的是 DP 410B, 6 d 的校正死亡率为 71.98%。将 2, 3, 4 代棉铃虫发生高峰期的校正死亡率进行平均, 平均后 6 个品种间 3 d 校正死亡率差异均不显著, 6 d 的校正死亡率除 DP 99B 与 Hanza 154 外, 其它品种间差异均不显著(表 1)。抗虫效果最好的是 DP 99B, 6 d 的校正死亡率达到 89.23%, 最差的是 Hanza 154, 但 6 d 的校正死亡率也达到了 75.91%。

2.2 转基因棉不同品种不同器官的 Bt 毒蛋白含量测定

转 Bt 基因棉花不同品种对棉铃虫的抗性强弱不一定完全相同。除棉株外部形态性状差异和

内源次生代谢物质含量可能不同外, 对棉铃虫的抗性主要取决于棉株不同发育时期各器官的 Bt 蛋白合成量, 即 Bt 基因的表达效率。用 ELISA 技术测定以上 6 个品种不同器官的 Bt 蛋白含量, 结果表明(表 2), 6 个应试品种不同器官的 Bt 蛋白含量差异也较明显, NC 20B、DP 35B、DP 37B、DP 99B 的叶、蕾、花和铃中的 Bt 蛋白含量总体上高于其它品种。结合室内抗棉铃虫生测结果分析可知, 棉株中 Bt 毒蛋白的表达量与棉株的抗性密切相关。另外, 不同抗虫棉前期抗虫效果好于后期, 也与棉株前期 Bt 毒蛋白含量总体高于后期有一定关系(表 2)。

表 2 转 Bt 基因棉不同品种不同组织杀虫蛋白表达量

Table 2 The Bt-protein contents in different organs from different Bt transgenic cotton varieties

品种	不同器官毒蛋白含量/(ng·g ⁻¹)			
	叶	蕾	花	铃
DP 35B	1057.02±25.52a	662.32±48.02abc	870.68±99.9a	444.89±75.76a
DP 37B	1014.71±46.52a	795.91±72.34ab	719.73±8.95ab	395.45±31.53a
DP 99B	860.14±5.47b	648.83±204.79abc	719.21±33.14ab	273.74±40.17ab
DP 410B	722.37±17.87c	444.73±33.19bc	359.62±40.13c	147.38±29.51b
NC 20B	1003.81±43.87a	889.91±45.36a	821.15±34.6a	416.13±20.48a
Hanza 154	734.26±13.94c	381.66±52.66c	510.81±118.71bc	312.86±114.25ab

2.3 转基因棉不同品种对棉铃虫抗性的时间动态

对不同生育阶段棉株顶部平展倒 2 叶室内抗性测定结果(表 3)表明, 抗虫棉不同品种在不同发育阶段, 其棉叶均有阻止棉铃虫取食的作用, 表达了明显的抗性, 但其抗性强弱存在明显差异, 且在不同发育阶段抗性表现也有差异。除 NC 20B 外, 各材料对棉铃虫初孵幼虫的校正死

亡率在蕾期最高; 校正死亡率最低的时期因材料而异, 其中 Hanza 154 在盛花期最低, NC 20B 在花铃期最低, 而其它品种均是在铃期最低。除了 NC 20B 和 Hanza 154 外, 所有品种均是在前中期抗性表现比较平稳, 到后期则波动幅度较大。不同品种对棉铃虫的抗性在时间上呈现动态变化, 以植株发育阶段划分, 表现为蕾期 > 盛花期 > 花铃期 > 铃期。

表 3 转基因棉不同品种各生育期棉株倒 2 叶抗棉铃虫生测结果

Table 3 The corrected mortality of cotton bollworm fed on the second leaf from bottom of different Bt transgenic cotton varieties in every developmental stages

品种	平均校正死亡率/%			
	蕾期	盛花期	花铃期	铃期
DP 35B	86.21±3.24 ab	84.14±3.74 ab	84.01±2.84 ab	77.40±4.43 ab
DP 37B	88.15±3.26 ab	85.62±3.06 ab	86.83±2.75 ab	81.30±2.60 a
DP 99B	90.91±2.78 a	90.76±2.34 a	90.36±2.18 a	84.68±2.78 a
DP 410B	85.24±3.11 ab	84.25±2.98 ab	82.37±3.24 ab	68.05±5.25 b
NC 20B	80.11±4.62 b	78.43±5.15 b	78.36±3.60 b	82.86±3.02 a
Hanza 154	87.05±3.62 c	67.13±4.43 c	85.65±2.65 ab	79.74±4.29 a
中棉所 12	16.22±5.10 d	18.87±4.36 d	18.52±4.31 c	18.98±2.60 c

2.4 转基因棉不同品种 Bt 毒蛋白的时间动态

对苗期(三叶期:6月7日;七叶期:6月16日)、蕾期(7月7日)、花铃期(8月9日)和铃期(9月4日)棉花叶片中 Bt 毒蛋白含量进行了测定。结果发现,随着棉花生长发育的推进,叶片中 Bt 毒素蛋白含量(以鲜重计)明显降低(图 1)。从图 1 可看出,不同发育阶段其 Bt 含量变化较大,不同品种在同一时期的 Bt 毒蛋白含量不同。除

DP 35B 外,其余材料的 Bt 毒蛋白含量均在七叶期达到最高,花铃期最低。以上 6 个转基因棉品种的 Bt 毒蛋白含量呈现时间动态变化,即七叶期>三叶期>蕾期>铃期>花铃期,这与它们的抗性呈时间动态变化规律基本吻合。但铃期 Bt 毒蛋白含量低,而校正死亡率却高,可能与叶片组织老化,棉铃虫不喜取食有关。

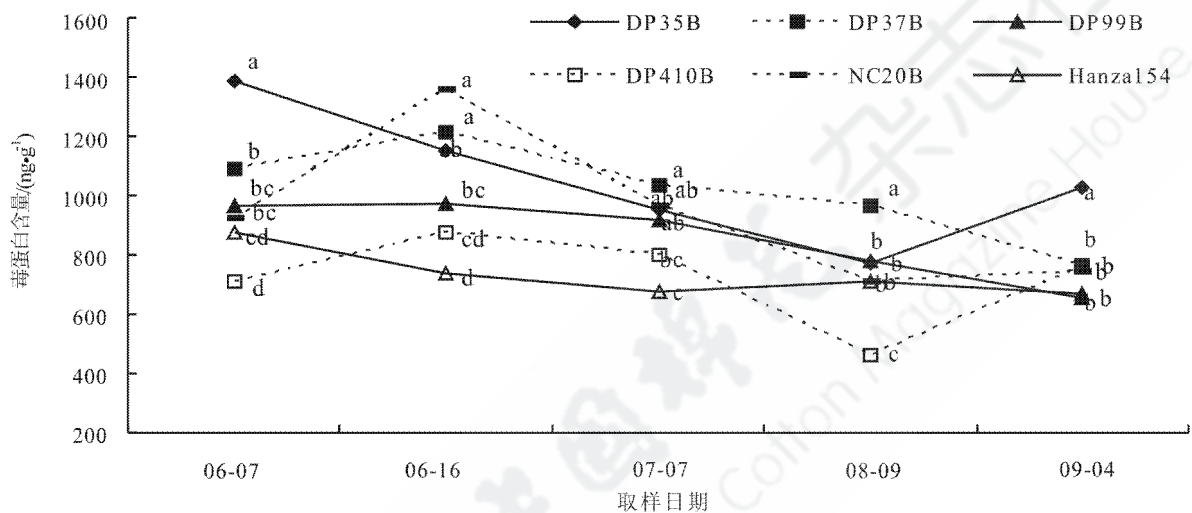


图 1 转基因棉不同品种 Bt 毒蛋白的季节性表达

Fig. 1 Seasonal expression of Bt-protein in different Bt transgenic cotton varieties

3 讨论

随着基因工程技术的发展,棉花转 Bt 基因抗虫品系研发日趋成熟、稳定,越来越显示了其在棉铃虫防治上的优势。转基因棉严重影响棉铃虫的生长发育及生存率,进而控制棉铃虫对棉花的危害。但转基因棉不同品种的抗虫性是有差异的,通过对 DP 37B 等 6 个转基因棉花品种室内生测及 Bt 毒蛋白含量的测定结果来看,导致不同品种抗虫性差异的主要原因是 Bt 毒蛋白在不同棉花品种、不同组织器官和不同生育期表达不一致所造成的。

本试验对苗期(三叶期和七叶期)、蕾期、花铃期和铃期棉花叶片中 Bt 毒素蛋白含量进行了测定。结果发现,随着棉花生长发育的推进,叶片中 Bt 毒素蛋白含量则明显降低,在花铃期达到最低,仅为 $464 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (DP 410B)。董双林等^[9]推测,随着棉花生育期的推进,棉株衰老可钝化 Bt 杀虫基因,使其表达量降低;或因单宁物质含量增高并与杀虫蛋白相互作用而使毒蛋白失去活

性。崔金杰等^[10]认为,棉株生长后期营养生长与生殖生长并存会导致棉花负担过重,影响了 Bt 基因的表达,并认为不良环境也可能影响 Bt 基因表达。棉花蕾、铃发育对氮素营养的需求量增加,尤其是进入花铃期,棉铃发育需要大量的蛋白质和光合产物,功能叶中的光合产物及其它养料多数运往蕾、铃等生殖器官^[11],此时叶片中可溶性蛋白质含量比营养生长期明显下降。受蕾、铃发育的影响,叶片中 Bt 毒蛋白的合成可能会减弱,导致生殖生长后期叶片中 Bt 毒蛋白含量显著低于营养生长期。因此,后期 Bt 毒蛋白含量的降低直接导致了抗虫棉生长发育后期抗棉铃虫性较前期下降。

根据对棉花不同器官(叶、蕾、花和铃)中 Bt 毒蛋白含量的测定结果,表明转基因抗虫棉对棉铃虫抗虫性呈现出空间动态变化,测定结果是叶>花>蕾>铃。其根本原因可能是 Bt 基因表达强度在不同器官中存在差异,导致 Bt 毒蛋白在不同器官中的含量分布显著不同。而棉花生育

后期 Bt 基因表达强度较生育前期明显减弱,则是造成转基因抗虫棉在生育后期对棉铃虫抗性普遍下降的原因之一。因此,在生产上 Bt 棉生育后期的棉铃虫防治不容忽视^[12]。此外,如何调控 Bt 基因在花、蕾等生殖器官中的表达强度以及提高其在棉花生育后期的表达效率,是转基因抗虫棉研发所面临的重要课题。

参考文献:

- [1] 董双林,文绍贵,王月恒. 转 Bt 基因棉对棉铃虫存活、生长及其危害的影响[J]. 棉花学报,1997,9(4):176-182.
DONG Shuang-lin, Wen Shao-gui, Wang Yue-heng. Effects of Bt transgenic cotton on *Helicoverpa armigera* survival, growth and its damage on cotton[J]. Cotton Science, 1997, 9(4): 176-182.
- [2] 张永军,吴孔明,郭予元. 转 Bt 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及对棉铃虫的毒杀效果[J]. 植物保护学报,2001,28(1):1-6.
ZHANG Yong-jun, Wu Kong-ming, Guo Yu-yuan. On the spatio-temporal expression of the contents of Bt insecticidal protein and the resistance of Bt transgenic cotton to cotton bollworm[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2001, 28(1): 1-6.
- [3] 张俊,郭香墨,马丽华. 不同转基因棉的抗虫性与 Bt 毒蛋白含量关系研究[J]. 棉花学报,2002,14(3):158-161.
ZHANG Jun, Guo Xiang-mo, Ma Li-hua. Study on effects of different foreign Bt and Bt+CpTI insect-resistant genes on bollworm resistance in upland cotton (*G. hirsutum* L.)[J]. Cotton Science, 2002, 14(3): 158-161.
- [4] PERLAK F J, Deaton R W, Armstrong T A. Insect resistant cotton plants[J]. Nature Biotechnology, 1990, 8: 939-943.
- [5] 束春娥,孙洪武,孙以文,等. 转基因棉 Bt 毒性表达的时空动态及对棉铃虫生存、繁殖的影响[J]. 棉花学报,1998,10(1):301-306.
SHU Chun-e, Sun Hong-wu, Sun Yi-wen, et al. Toxic response of cotton bollworm to various parts of Bt-transgenic cotton in different growing stages[J]. Cotton Science, 1998, 10(1): 301-306.
- [6] 崔金杰,夏敬源. 转 Bt 基因棉对棉铃虫抗性的时空动态[J]. 棉花学报,1999,11(3):141-146.
CUI Jin-jie, Xia Jing-yuan. Studies on the resistance dynamic of the Bt transgenic cotton on cotton bollworm[J]. Cotton Science, 1999, 11(3):141-146.
- [7] 陈松,吴敬音,何小兰,等. 转基因抗虫棉组织中 Bt 毒蛋白表达量的 ELISA 测定[J]. 江苏农业学报,1997,13(3):154-156.
CHEN Song, Wu Jing-yin, He Xiao-lan, et al. Quantification using ELISA of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein expressed in the tissue of transgenic insect resistant cotton [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1997, 13(3): 154-156.
- [8] 肖松华,刘剑光,狄佳春,等. 转基因抗虫棉 Bt 毒蛋白表达量的传递方式研究[J]. 棉花学报,2002,14(5):295-299.
XIAO Song-hua, Liu Jian-guang, Di Jia-chun, et al. The transmitting type of Bt toxin protein expression in transgenic bollworm-resistant cotton[J]. Cotton Science, 2002, 14(5): 295-299.
- [9] 董双林,马丽华,夏敬源. 棉铃虫幼虫对转基因棉的行为学反应研究[J]. 植物保护学报,1997,24(4):373-374.
DONG Shuang-lin, Ma Li-hua, Xia Jing-yuan. A primary study on behavioral response of cotton bollworm to transgenic Bt cotton[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 1997, 24(4): 373-374.
- [10] 崔金杰,夏敬源. 转 Bt 基因棉对棉铃虫低龄幼虫取食行为的影响[J]. 河南职业技术学院学报,1998,26(1):9-11.
CUI Jin-jie, Xia Jing-yuan. Effects of transgenic Bt cotton on feeding behavior of cotton bollworm larvae[J]. Journal of Henan Vocation Technical Teachers College, 1998, 26(1): 9-11.
- [11] 陈松,吴敬音,周宝良,等. 转 Bt 基因棉 Bt 毒蛋白表达量的时空变化[J]. 棉花学报,2000,12(4):189-193.
CHEN Song, Wu Jing-yin, Zhou Bao-liang, et al. On the temporal and spatial expressions of Bt toxin protein in Bt transgenic cotton[J]. Cotton Science, 2000, 12(4): 189-193.
- [12] 周桂生,周福才,谢义明,等. 温度胁迫对转 Bt 基因抗虫棉毒蛋白的表达和棉铃虫死亡率的影响[J]. 棉花学报,2009,21(4):302-306.
ZHOU Gui-sheng, Zhou Fu-cai, Xie Yi-ming, et al. Effects of temperature stress on Bt insecticidal protein expression in Bt transgenic cotton leaves and on the death rate of cotton bollworm[J]. Cotton Science, 2009,21(4): 302-306. ●