

转双基因烟草对棉铃虫的杀虫活性评价*

范贤林¹ 石西平² 赵建周¹ 赵荣敏² 范云六²

¹ (中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

² (中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

摘 要 以含 Bt 杀虫蛋白基因(单基因)烟草和常规烟草为对照,系统测定了含 Bt 与豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)蛋白基因(双基因)的抗虫烟草对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)不同龄期幼虫的杀虫活性。结果表明:1~3 龄幼虫取食转双基因烟草 3d 后死亡率为 80.5%~99.3%,取食 6d 后死亡率达 100%,均显著高于转单基因烟草。2 龄幼虫取食转基因烟草 3d 后转至正常饲料,转双基因烟草对幼虫死亡率、存活虫体重、化蛹率和化蛹时间等生长发育的影响,均显著高于转单基因烟草。

关键词 转基因烟草 棉铃虫 Bt CpTI

分类号 Q943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0006-10

近年来植物抗虫基因工程的研究发展迅速,其中已获得的转苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫蛋白(ICP)基因的植物已达 40 余种^[1],转 Bt ICP 基因的棉花(Bt 棉)1996 年开始在美国推广应用^[2],1998 年开始在我国推广应用,在棉花害虫综合防治方面可发挥重要作用^[3]。然而 Bt 棉在美国和澳大利亚商业化应用的初期,均出现大面积防效降低的问题^[2,4]。此外,害虫对 Bt ICP 的抗性发展将对转基因作物的可持续应用构成严重威胁^[5]。国内外关于转 Bt ICP 基因烟草^[6]、马铃薯^[7]、棉花^[8,9]等作物的杀虫活性和田间效果的研究,均采用转单一 Bt ICP 基因材料。将作用机理或作用位点不同的两种抗虫基因转入作物体内,是延缓害虫对 Bt ICP 产生抗性的重要途径^[5,10];中国农业科学院生物技术研究中心采用共转化方法,获得了含有 Bt 和豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因的转双基因抗虫烟草纯合品系^[11],但对转双基因烟草杀虫活性的系统研究尚未见报道。本文报道了转双基因烟草对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)不同龄期幼虫的杀虫活性和对生长发育后效应的研究结果。

1 材料与方法

1.1 供试烟草品系

转双基因烟草纯合品系“抗虫 931”、转 Bt ICP 单基因烟草及其亲本对照(常规烟)“NC89”,由中国农业科学院生物技术研究中心提供,对转双基因烟草植株的 PCR-Southern 杂交验证结果见赵荣敏等^[11]。供试烟草每品系 20~30 株,在温室盆栽种植,常规栽

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39500100)。

收稿日期:1997-09-24,修回日期:1998-08-11。

培管理,取植株中部叶片供试。

1.2 供试棉铃虫

1996年6月下旬从河北、河南和山东省的共6个县市采集棉铃虫成虫,在室内分别饲养两代后将其混合饲养形成混合种群,供试棉铃虫幼虫为混合种群7~10代,处理之前用人工饲料饲养;人工饲养方法参照魏岑等^[12]。

1.3 测定方法

1.3.1 转基因烟草对棉铃虫的杀虫活性测定: 试验设转基因烟草、转单基因烟草、常规烟草和人工饲料4种处理,将供试烟叶用0.1%的NaOCl溶液浸泡5min消毒,然后用清水冲洗晾干。用于处理1、2龄幼虫的烟叶放入直径为1.5cm、深1.7cm的24孔试验盒内,每孔接幼虫1头,每处理重复3次,每重复1龄幼虫48头、2龄幼虫24头。用于处理3~5龄幼虫的烟叶放入直径为2.5cm、深2.0cm的10孔试验盒中,每孔接幼虫1头,每处理重复3次,每重复20头,接虫前称重。接虫后置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照16h的培养箱中,处理1、2龄幼虫1~4d后每天检查死亡率,处理3~5龄幼虫3d和6d后检查死亡率,并测定存活幼虫体重,更换新鲜烟叶。幼虫化蛹后称蛹重并统计化蛹率。

1.3.2 转基因烟草对棉铃虫生长发育的效应测定: 试验所设4种处理同1.3.1。用人工饲料将棉铃虫饲养至2龄并称重后,接入分别放有转单、双基因烟、常规烟和人工饲料的24孔试验盒内,每处理重复3次,每重复120头。处理3d后将存活幼虫取出并称重,然后移至10孔试验盒中用人工饲料单头饲养,待其化蛹后测定化蛹率和蛹重。将蛹移入指形管中,待其羽化后计算蛹的历期和羽化率。成虫羽化后,在每个1000mL烧杯中放入1头雌虫和2头雄成虫饲养,以5%的蜜糖水补充营养,每天分别检查单雌产卵量。

1.3.3 统计分析方法: 对不同处理间各项平均数的差异显著性比较均采用HSD测验。

2 结果与分析

2.1 转双基因烟草对棉铃虫不同龄期幼虫的杀虫活性

测定结果表明,用转双基因烟草分别处理棉铃虫1~3龄幼虫3d,幼虫死亡率为80.5%~99.3%,处理6d后其死亡率达100%,均显著高于转单基因烟草;1~4龄幼虫分别连续取食双基因烟后均不能化蛹,而4龄幼虫连续取食单基因烟后均可部分化蛹(表1~2)。棉铃虫

表1 转基因烟草处理棉铃虫1~2龄幼虫不同天数的杀虫活性比较

Table 1 Insecticidal activity of transgenic tobacco on *Helicoverpa armigera* larvae starting at instar 1 or 2

| Instar | Treatment | Mortality (\pm SEM) in days after treatment/% ^[1] | | | |
|--------|-----------------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | | 1d | 2d | 3d | 4d |
| 1 | Bt and CpTI genes | 20.1 \pm 2.5a | 93.8 \pm 2.1a | 99.3 \pm 0.7a | 100 a |
| | Bt gene | 7.7 \pm 4.5b | 83.4 \pm 2.1b | 88.2 \pm 0.7b | 98.6 \pm 0.7ab |
| | Nontransgenic control | 2.1 \pm 1.2b | 43.1 \pm 1.8c | 67.4 \pm 0.7c | 92.4 \pm 1.8b |
| | Artificial diet | 1.4 \pm 1.4b | 4.2 \pm 4.2d | 4.2 \pm 4.2d | 4.2 \pm 4.2c |
| 2 | Bt and CpTI genes | 0 a | 36.1 \pm 10.0a | 83.3 \pm 4.8a | 100 a |
| | Bt gene | 0 a | 22.2 \pm 7.4ab | 55.6 \pm 5.6b | 91.7 \pm 4.8a |
| | Nontransgenic control | 2.8 \pm 2.8a | 13.9 \pm 2.8bc | 27.8 \pm 11.1c | 44.4 \pm 10.0b |
| | Artificial diet | 0 a | 0 c | 2.8 \pm 2.8d | 5.6 \pm 5.6c |

^[1] Means (\pm SEM) in the same column of same instar fed by different letters are significantly different ($\alpha=0.05$) based on HSD test.

表 2 转基因烟草对棉铃虫 3~5 龄幼虫的杀虫活性测定

Table 2 Insecticidal activity of transgenic tobacco on *H. armigera* larvae starting at instar 3 4 or 5

| Instar | Treatment | Mortality \pm SEM/% ^[1] | | Effects on pupae ^[1] | |
|--------|-----------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | 3d | 6d | To pupae/% | Weight/mg |
| 3 | Bt and CpTI genes | 80.5 \pm 2.8a | 100 a | 0 c | — |
| | Bt gene | 50.0 \pm 8.3b | 86.1 \pm 2.8a | 0 c | — |
| | Nontransgenic control | 22.2 \pm 2.8c | 66.6 \pm 8.3b | 22.2 \pm 2.7b | — |
| | Artificial diet | 16.7 \pm 4.8c | 16.7 \pm 4.8c | 80.6 \pm 7.3a | — |
| 4 | Bt and CpTI genes | 14.7 \pm 5.6a | 80.0 \pm 8.1a | 0 c | — |
| | Bt gene | 15.7 \pm 4.1a | 45.0 \pm 0.6b | 7.5 \pm 2.5c | 113.3 \pm 11.5c |
| | Nontransgenic control | 15.0 \pm 6.4a | 24.2 \pm 2.5bc | 32.5 \pm 2.5b | 169.6 \pm 8.5b |
| | Artificial diet | 0 b | 6.7 \pm 3.3c | 90.0 \pm 5.7a | 362.1 \pm 11.8a |
| 5 | Bt and CpTI genes | 6.0 \pm 4.0a | 26.7 \pm 3.3a | 27.5 \pm 7.5c | 132.0 \pm 9.8c |
| | Bt gene | 4.0 \pm 4.0a | 23.3 \pm 3.3a | 32.0 \pm 9.7c | 135.6 \pm 6.2c |
| | Nontransgenic control | 5.0 \pm 4.0a | 6.7 \pm 6.7b | 57.5 \pm 2.5b | 200.8 \pm 11.7b |
| | Artificial diet | 4.0 \pm 5.0a | 5.0 \pm 5.0b | 93.3 \pm 6.7a | 355.0 \pm 8.5a |

^[1] Same as Table 1.

幼虫取食转基因烟草后的蛹重均显著低于取食常规烟处理,化蛹时间也显著延长(图 1)。

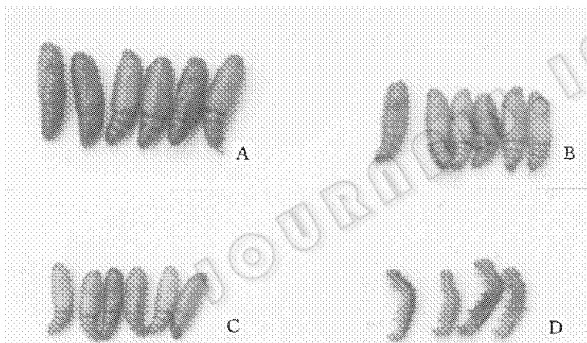


图 1 4 龄幼虫连续取食不同烟草或饲料后的化蛹情况比较

Fig. 1 Comparison of pupation of fourth instar *H. armigera* in different treatments

A. Artificial diet B. Nontransgenic tobacco control C. Transgenic tobacco with Bt insecticidal protein gene alone D. transgenic tobacco with Bt and CpTI protein genes

从表 1 还可看出,用同种转基因烟草处理不同龄期的幼虫,其杀虫活性随着龄期的增大而明显降低;此外,1 龄幼虫取食常规烟后的死亡率也较高,其中取食 2、3、4d 后的死亡率分别为 43.1%、67.4% 和 92.4%,而同期取食人工饲料的对照死亡率仅为 4.2%,两种处理间均差异显著,表明常规烟叶片对棉铃虫 1 龄幼虫也具有显著的致死作用,因此不宜用 1 龄幼虫进行转基因烟草杀虫活性的评价。

2.2 转双基因烟草对棉铃虫生长发育的影响

用不同烟草分别处理棉铃虫 2 龄幼虫 3d 后转至正常饲料饲养,结果表明(表 3)转双基因烟对幼虫死亡率、存活幼虫体重、幼虫历期及总化蛹率的影响均显著高于转单基因烟;与常规烟相比,转单、双基因烟处理 3d 后可使存活幼虫化蛹以及蛹羽化的时间显著推迟,其中转双基因烟使化蛹推迟的作用显著高于单基因烟。不同处理间的存活幼虫化蛹率、平均蛹重、蛹羽化率和成虫单雌产卵量均差异不显著。

3 讨 论

本研究采用含有 Bt 和 CpTI 基因的转双基因烟草纯系,证明转双基因烟草对棉铃

表 3 转基因烟草对棉铃虫生长发育的影响

Table 3 Effects of transgenic tobacco on survival and development of *H. armigera* after treatment on second instar larvae for three days

| Items | Treatments (mean \pm SEM) ^[1] | | | |
|-------------------------------------|--|-------------------|------------------|------------------|
| | Bt and CpTI genes | Bt gene | Control | Artificial diet |
| Initial weight/mg | 3.64 \pm 0.2a | 3.67 \pm 0.2a | 3.48 \pm 0.8a | 3.39 \pm 0.1a |
| Mortality after 3d/% | 74.3 \pm 7.3a | 53.0 \pm 9.5b | 9.0 \pm 4.7c | 2.7 \pm 2.3c |
| Weight(wt) of survived larvae : | | | | |
| Larval wt/mg | 1.60 \pm 0.2d | 3.50 \pm 0.3c | 26.0 \pm 2.2b | 55.5 \pm 4.4a |
| Wt/initial wt | 0.44 | 0.95 | 7.47 | 16.37 |
| Days to pupation of survived larvae | 14.3 \pm 0.3a | 12.3 \pm 0.3b | 9.0 \pm 0.5c | 7.3 \pm 0.2d |
| Treated larvae to pupation/% | 8.6 \pm 1.2c | 25.3 \pm 6.0b | 63.1 \pm 3.5a | 65.7 \pm 5.2a |
| Survived larvae to pupation/% | 69.0 \pm 7.9a | 66.5 \pm 5.8a | 68.6 \pm 3.9a | 66.9 \pm 5.8a |
| Pupal weights/mg | 328.3 \pm 10.9a | 320.9 \pm 13.6a | 309.3 \pm 8.2a | 315.6 \pm 9.4a |
| Pupae to adults/% | 41.6 \pm 9.4a | 47.8 \pm 12.9a | 35.3 \pm 3.3a | 45.7 \pm 5.9a |
| Duration of pupae/d | 10.0 \pm 0 a | 10.0 \pm 0 a | 9.3 \pm 0.3b | 9.0 \pm 0 b |
| Eggs laid per female | 1515 \pm 142a | 1559 \pm 253a | 1638 \pm 430a | 1598 \pm 129a |

^[1] Within a line mean(\pm SEM) followed by different letters are significantly different ($\alpha=0.05$) based on HSD.

虫 1~3 龄幼虫的杀虫活性和短期处理后的后效应均显著高于转单一 Bt ICP 基因烟草。MacIntosh 等(1990)经植物体外混用方法曾证明 CpTI、南瓜胰蛋白酶抑制剂(CMTI)和大豆的两种蛋白酶抑制剂均可显著增强 Bt ICP 对烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 的杀虫活性,在转基因烟草中表达的 CMTI 可增强 Bt ICP 对烟芽夜蛾体重的抑制作用^[13],本研究所得结果与该文趋势一致。

CpTI 的抗虫谱较广^[14],由于其来源、抗虫机理和对昆虫的作用位点均与 Bt 不同,转 Bt 和 CpTI 双基因的作物不仅能提高杀虫活性,而且从理论上推测还具有延缓害虫抗性发展的作用。我们以本项研究的结果为基础确定了抗性汰选的有关参数,进行了棉铃虫对转单、双基因烟草抗性风险的比较研究,通过连续 11 代的室内抗性汰选实验证明,转双基因烟草可显著延缓害虫的抗性发展速度^[15]。以烟草作为模式植物的研究结果,对于我国正在开展的转双基因棉花等也具有参考价值。因此,转 Bt 和 CpTI 双基因抗虫作物可望在今后的害虫综合治理和抗药性治理中发挥重要作用。

致 谢 西北农业大学植保系实习生谢飞舟参加部分工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛,孙明,陈亚华等. 农业生物技术学报,1995,3:100~109.
- [2] J. Kaiser. *Science*,1996,223:423.
- [3] 赵建周,卢美光. 中国植物保护研究进展,北京:中国科学技术出版社,1996,pp.447~450.
- [4] N. Forrester. *The Australian Cotton Growers*,1997(1):23.
- [5] W. H. McGaughen, M. E. Whalon. *Science*,1992,258:1451~1455.
- [6] G. W. Warren, N. B. Carozzi, N. Desal et al. © 中国科学出版社,1992,85:1651-1659. <http://journals.im.ac.cn>

- [7] F. J. Perlak ,T. B. Stone ,Y. M. Muskopf *et al.* *Plant Mol. Biol.* ,1993 **22** :313~321.
- [8] J. L. Halcomb J. H. Benedict D. R. Ring. *Environ Entomol.* ,1996 **25** :250~255.
- [9] 王武刚 ,姜永幸 ,杨雪梅等 . 中国农业科学 ,1997 **30** (1) :7~12.
- [10] F. J. Perlak ,D. A. Fishhoff ,In :Leo L (ed.) *Advanced Engineered Pesticides* ,Marcel Dekker Inc ,New York ,1994 , pp. 199~211.
- [11] 赵荣敏 ,范云六 ,石西平等 . 生物工程学报 ,1995 **11** :1~5.
- [12] 魏 岑 ,赵永巧 ,范贤林等 . 中国农业科学 ,1992 **25** (6) :9~14.
- [13] S. C. MacIntosh G. M. Kishore F. J. Perlak *et al.* *J. Agric. Food Chem.* ,1990 **38** :1145~1152.
- [14] V. A. Hilder A. M. R. Gatehouse D. Boulter. *Pestic Sci* ,1989 **27** :165~171.
- [15] Zhao J. Z. , Fan X. , Shi X. P. *et al.* *Resistant Pest Management* ,1997 **9** (2) :19~21.

Insecticidal Activity of Transgenic Tobacco Plants Expressing Both Bt and CpTI Genes on *Helicoverpa armigera* *

Fan Xianlin¹ Shi Xiping² Zhao Jianzhou¹ Zhao Rongmin² Fan Yunliu²

¹ *Institute of Plant Protection ,The Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100094*)

² *Biotechnology Research Center ,The Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081*)

Abstract Transgenic tobacco line Kangchong 931 expressing both *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal protein and cowpea trypsin inhibitor (CpTI) genes was used for evaluating the insecticidal activity on *Helicoverpa armigera* compared with transgenic tobacco with Bt insecticidal protein gene alone. Mortality of first to third instar larvae fed on transgenic two genes tobacco for three days was significantly higher than that fed on transgenic Bt tobacco. First to fourth instar larvae fed on transgenic two genes tobacco continuously could not survived until pupation. Second instar larvae were fed on transgenic tobacco plants for three days and then were transferred into artificial diet. The efficacy of transgenic two genes tobacco on weight of survived larvae ,percentage of pupation ,and time to pupation were significantly higher than that of transgenic tobacco with Bt insecticidal protein gene alone. The significance and potential of transgenic two genes crops on the delay of insect resistance to transgenic Bt crops were also discussed.

Key words Transgenic tobacco ,Bt ,CpTI ,*Helicoverpa armigera*

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39500100).