

双价抗虫转基因大豆抗苜蓿夜蛾分析

杨向东, 郭东全, 包绍君, 赵桂兰, 康岭生, 钱雪燕, 尹爱萍, 邢国杰

(吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130124)

摘要 苜蓿夜蛾是影响我国大豆生产的重要食叶性害虫之一。在实验室和网室人工接虫条件下, 对已获得的遗传稳定的双价抗虫转基因大豆抗苜蓿夜蛾能力进行了分析。结果表明, 与对照非转基因大豆相比, 抗虫转基因大豆株系 T₅-150 和 T₅-195 的叶片损害程度明显减轻; 同时, 苜蓿夜蛾幼虫食叶量显著下降、存活天数缩短, 发育变慢, 蛹化数也显著降低。表明抗虫转基因大豆抗苜蓿夜蛾能力显著提高。

关键词 苜蓿夜蛾; 转基因大豆; 抗虫性

中图分类号 S565.103.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0969-03

RESISTANCE ANALYSIS OF THE BINARY INSECT-RESISTANT TRANSGENIC SOYBEAN TO *HE- LIOTHIS VIRIPLACA*

YANG Xiang-dong, GUO Dong-quan, BAO Shao-jun, ZHAO Gui-lan, KANG Ling-sheng, QIAN Xue-yan, YIN Ai-ping, XING Guo-jie

(Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130124)

Abstract *Heliothis virescens* is an important leaf-feeding insect for soybean. In this paper, resistance analysis of the stabilized binary insect-resistant transgenic soybean to *H. virescens* was conducted in vitro and in field conditions. The results showed that the insect-resistant transgenic lines T₅-150 and T₅-195 showed lower defoliation percentage than the non-transgenic ones. On the other hand, the *H. virescens* larvae feeding on the leaves of those two transgenic lines were characterized by less leaf consumption, greater larvae mortality, slower development, and less pupation ratio. Our results indicated that the resistance of the binary insect-resistant transgenic soybean to *H. virescens* was greatly enhanced.

Key words *Heliothis virescens*; Transgenic soybean; Insect resistance

苜蓿夜蛾 [*Heliothis virescens* (Hufnagel)] 属鳞翅目夜蛾科, 主要以幼虫蚕食大豆叶片, 或钻入豆荚蛀食危害, 造成大豆产量降低, 品质变劣, 是影响我国东北地区大豆生产的重要害虫之一^[1]。由于该害虫具有吐丝和卷叶的特性, 在生产上利用化学药剂

进行防治较为困难, 且长期使用化学药剂易造成环境污染, 并使害虫产生抗药性^[2-3], 因此, 抗虫品种的培育就成为一条较为有效的途径。在前期的研究中, 利用基因工程技术将双价抗虫基因 *Bt* 和 *CpTI* 导入大豆品种吉林 20 和吉林 27 中, 并获得稳定表

收稿日期: 2007-11-08
基金项目: 国家自然科学基金 (C02020504); 吉林省科技发展计划项目 (20050217-2, 20060204)
作者简介: 杨向东 (1976-), 男, 助研, 研究方向为大豆生物技术育种。Tel: 0431-87063044; E-mail: xdyang020918@126.com
通讯作者: 赵桂兰, 研究员。Tel: 0431-87063097; E-mail: zgl@cjaas.com

达,其抗大豆食心虫的能力也基本稳定。在对 T₄代转基因大豆材料抗食心虫能力进行网室接虫鉴定时,发现对照非转基因大豆叶片遭受苜蓿夜蛾危害较为严重,而转基因大豆危害较轻,二者危害程度差别较为明显。本研究在对试验条件进行严格控制的情况下,对 T₅代双价抗虫转基因大豆的抗苜蓿夜蛾能力进行了进一步的分析,以期为抗苜蓿夜蛾转基因大豆新品种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用材料为转 *Bt* 和 *CpTI* 基因抗虫大豆材料 T₅-150 和 T₅-195,两个转基因大豆材料均已衍生至 T₅代,其抗食心虫能力也基本稳定。对照材料为非转基因大豆受体品种吉林 20 和吉林 27。

1.2 转基因大豆抗苜蓿夜蛾鉴定

室内接虫鉴定:采用室内叶片饲喂的方法,于害虫发生盛期时到田间采集刚孵化的苜蓿夜蛾 3 日龄幼虫,同一区组内使用同一卵块上孵化的幼虫,按 1 头/皿的比例接入幼虫,每品系设 9 次重复。于大豆开花期采集大豆植株上健康、无病虫的展开叶片,并力求在同一部位以保证叶片鲜嫩程度的一致性。叶片采摘后,立即用封口袋装好,放入冰盒中带回实验室,然后投入培养皿中饲喂,叶片每天更换一次。对幼虫食叶量、增长量、幼虫存活天数等指标进行调查。

网室接虫鉴定:将供试鉴定材料(包括转基因株系及其对照品种吉林 20 和吉林 27)种植于吉林省农业科学院试验田的网室内,每棚面积 24 m²,随机区组设计,3 次重复。待大豆生长至开花前 20 d,将上述人工饲养的一龄苜蓿夜蛾幼虫置于大豆植株上部完全展开的叶片上,每株接虫 4 头,5d 后调查叶片危害程度。抗虫性分级标准如下:

- 1 级:受害面积 10% 以下(针状取食孔不连片);
- 2 级:受害面积 10% ~ 50% (受害面积部分成小片状分布);
- 3 级:受害面积 50% ~ 90% (受害面积有连片叶肉组织存在);
- 4 级:完全受损,受害面积在 90% 以上(受害面积无连片叶肉组织存在)。

1.3 数据处理

方差分析等采用 SAS8.02 软件进行。

2 结果与分析

2.1 室内接虫鉴定

分别用抗虫转基因大豆和对照非转基因大豆的叶片室内饲养苜蓿夜蛾 1 龄幼虫。结果表明,取食转基因大豆与非转基因大豆叶片的苜蓿夜蛾幼虫在食叶量、单虫体重变化、存活天数等指标上存在极显著差异($P < 0.01$) (表 1),但同一转基因材料的不同品系之间差异则不显著。与对照相比,在 1 龄幼虫从开始饲喂至蛹化过程中,取食转基因大豆叶片的幼虫生长发育明显受到抑制,表现为食叶量下降、存活天数缩短,发育变慢,蛹化率明显下降,有的幼虫甚至在未蛹化前就死亡(图 1)。室内接虫鉴定结果表明,与非转基因大豆相比,转基因大豆的抗苜蓿夜蛾能力显著提高。

表 1 转基因大豆材料抗苜蓿夜蛾室内鉴定

Table1 In vitro resistance analysis of the transgenic lines to <i>H. virescens</i>			
供试材料 Lines	食叶量 Leaf consumption per single larvae/g	单虫体重变化 Variation of single larva weight/g	幼虫存活天数 Survival time of larvae/d
吉林 20 Jilin 20	1.29 ± 0.43a *	0.12 ± 0.07a	8.00 ± 1.00a
T ₅ -150-19	0.07 ± 0.10b	0.01 ± 0.01b	3.33 ± 1.41b
T ₅ -150-51	0.09 ± 0.08b	0.01 ± 0.02b	3.00 ± 1.22b
吉林 27 Jilin 27	1.21 ± 0.35a	0.04 ± 0.05a	6.11 ± 1.92a
T ₅ -195-4	0.09 ± 0.08b	0.01 ± 0.03b	4.56 ± 1.01b
T ₅ -195-51	0.08 ± 0.10b	0.01 ± 0.02b	3.33 ± 1.58b

* 表示 9 次重复测定的平均值 ± 标准差;不同小写字母为差异达 1% 显著水准,下同。

* Means ± standard deviation from nine replicates;The figures with different letters indicate significance at 0.01 level,the same as below.

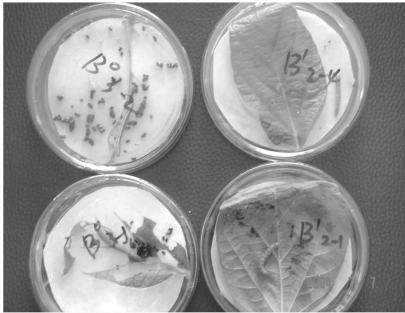


图 1 转基因抗虫材料室内抗虫鉴定

Fig.1 In vitro resistance analysis of the transgenic lines to *H. virescens* larvae

2.2 田间抗虫鉴定

利用网室人工接虫对抗虫转基因材料进行抗虫性鉴定,测定结果见表2。从表中可以看出,在网室人工接虫可控条件下,转基因大豆材料与对照品种之间抗虫性差异达极显著水平 ($F = 29.79 > P0.01$),但同一转基因大豆材料的不同品系间差异不显著 ($F = 1.56 < P0.05$)。转基因抗虫材料 T₅-195 和 T₅-150 的叶片受害程度较小,其叶面及损失率均低于 20%,抗苜蓿夜蛾能力分别达到 1 级和 2 级,而对照品种吉林 20 和吉林 27 的抗虫能力较弱,叶片受害程度较强,叶面积损失率为 90% 以上(图 2)。表明在田间可控条件下,转基因大豆材料抗苜蓿夜蛾的能力显著高于对照品种。



图2 转基因抗虫材料网室接虫鉴定
Fig.2 Resistance analysis of the transgenic lines to *H. virescens* larvae in field

3 讨论

在前期的研究中,作者利用大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生系统高效转化体系将携带有人工修饰的 *GFM CryIA* 杀虫基因和经过修饰的 *CpTI* 基因的双价抗虫载体 pGBI121S4ABC 转化到栽培大豆品种吉林 20 和吉林 27 中。PCR、Southern 杂交结果表明,目的基因已整合到受体大豆基因组中,且转基因植株 T₅-150、T₅-195 中均含有 1 个拷贝的外源基因。通过外源 Bt 蛋白和 *CpTI* 的过量表达及二

表2 转基因大豆株系抗苜蓿夜蛾网室接虫鉴定
Table 2 Resistance analysis of the transgenic lines to *H. virescens* in field

供试材料 Lines	幼虫存活天数 Survival time of larvae/d	蛹化率 Pupation ratio/%	叶片损害级别 Defoliation
吉林 20 Jilin 20	7.8b	90b	4
T ₅ -150-19	3.4a	10a	1
吉林 27 Jilin 27	5.9b	80b	4
T ₅ -195-4	3.9a	10a	2

者之间的相互作用,转基因植株集成了 Bt 蛋白的强杀虫能力和 *CpTI* 的宽抗虫谱特性,不仅有效提高了转基因大豆对大豆食心虫的能力,同时对大豆的另一种重要食叶性害虫苜蓿夜蛾也具有较强的抗性。转基因大豆对苜蓿夜蛾的抗性以抗生性为主,主要表现为幼虫取食量减少,幼虫体重变小,幼虫死亡率增加,幼虫历期延长,蛹重减少^[4]。转基因大豆对苜蓿夜蛾的抗性机制主要表现为叶片损失率较小,叶片危害程度降低。本实验室所获得的这两个抗虫转基因大豆株系已于 2007 年 3 月被农业部批准进入环境释放试验,目前正在进行环境风险评估研究工作。所获得的抗虫转基因大豆材料不仅可以作为育种亲本,通过常规育种技术培育抗虫大豆新品种,同时,也可以直接形成品种并在生产中加以利用,因此具有较大的应用价值。

参 考 文 献

[1] 慕卫,吴孔明,梁革梅,等. 苜蓿夜蛾人工饲养技术[J]. 农药学报,2002,4(1):93-96.
[2] Marcos K,Samuel G. Turnip seed. Ecology and management of soybean arthropods[J]. Annual Review Entomology,1987,32: 507-538.
[3] 慕卫,刘峰,赵德,等. 14 种杀虫剂对苜蓿夜蛾的毒力比较[J]. 植物保护学报,2004,31(3):333-334.
[4] 孙祖东,盖钧镒. 大豆对食叶性害虫抗性机制的研究[J]. 中国油料作物学报,1999,21(2): 60-64.