

转基因抗虫白菜对菜青虫、小菜蛾抗性的研究

罗 晨¹, 王素琴¹, 张 帆¹, 刘 凡², 张芝利¹

(1. 北京市农林科学院植物保护与环境保护研究所, 北京 100089; 2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要: 对导入马铃薯蛋白酶抑制剂基因(*pin II*)的大白菜和菜心植株当代和自交后代进行了菜青虫(*Pieris rapae* L.)和小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)的抗性筛选。室内生物测定表明: 取食转基因植株的1, 2龄幼虫死亡率显著高于对照; 取食转基因T₁大白菜的菜青虫生长发育受到明显抑制, 转化株老叶对菜青虫幼虫的毒杀作用明显高于嫩叶; 取食转基因T₂大白菜和菜心不同转化株的小菜蛾生长发育受到不同程度的抑制, 转基因大白菜比菜心对小菜蛾有更好的抗虫效果, 取食转基因菜心2~24植株小菜蛾的幼虫死亡率最高达64%, 取食转基因大白菜2~6小菜蛾幼虫死亡率最高达90%; 取食转基因植株小菜蛾的化蛹率、蛹重和羽化率亦有不同程度的降低。

关键词: 白菜; 菜青虫; 小菜蛾; 害虫抗性; 马铃薯蛋白酶抑制剂基因

中图分类号: S332.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)04-0084-05

Studies on Resistance against Common Cabbage Worm (*Pieris rapae* Linnaeus) and Diamond Moth (*Plutella xylostella* Linnaeus) of Transgenic Insect-resistant Cabbage

LUO Chen¹, ZHANG Fan¹, LIU Fan², ZHANG Zhili¹

(1. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: *In vitro* leaf tests of T₁ and T₂ plants from *pin II*-transgenic Chinese cabbage and flowering Chinese cabbage for evaluating resistance to Common Cabbage Worm (*Pieris rapae* Linnaeus) and Diamond Moth (*Plutella xylostella* Linnaeus) larvae were made under laboratory condition. The results showed that larvae fed with transgenic leaf tissue had a higher mortality especially in 1st and 2nd instar. The test of common cabbage worm larvae fed with T₁ transgenic Chinese cabbage revealed that the developments were retarded, and the mortality of larvae fed with old leaves was significantly higher than that of larvae fed with young leaves. The test of diamond moth larvae fed with T₂ transgenic Chinese cabbage and flowering Chinese cabbage revealed that the developments were retarded in varying degree; The transgenic Chinese cabbage produced more effective insect-resistance than transgenic flowering Chinese cabbage, the mortality of larvae fed with flowering Chinese cabbage strain 2-24 was 64% and that of larvae fed with Chinese cabbage strain 2-6 was 90%; The weight of pupae, percent of pupation and percent of eclosion were lower than non-transgenic plants in different degree.

Key words: Cabbage; Common Cabbage Worm; Diamondback Moth; Insect-resistant; *Pin II*

在农业生产中, 十字花科的蔬菜品种多, 虫害危害大, 生产上通常采用药剂防治的方法控制害虫, 因害虫抗药性不断增强, 化学药剂用量也随之加大, 这

不仅增加了生产成本, 严重影响人类健康, 而且在杀虫的同时, 也会杀伤害虫天敌, 从而危及到多种生物资源, 破坏生态平衡。采用基因工程导入抗虫基因

收稿日期: 2004-12-10

基金项目: 北京市高技术实验室科研合同项目(953850100)

作者简介: 罗 晨(1970-), 女, 湖北荆门人, 博士, 副研究员, 主要从事害虫生物防治和昆虫分子生物学研究工作。

来提高作物的抗虫性, 目前已有不少成功报道^[1~3], 有的已经进入生产应用阶段。马铃薯蛋白酶抑制剂基因 (*pin II*) 抗虫谱广泛^[4], 对鳞翅目、鞘翅目和直翅目的许多昆虫都有毒性, 其作用位点是昆虫消化酶的活性中心——酶最保守的部位, 产生突变的可能性极小, 可基本上排除害虫通过突变产生抗性的可能性, 也不存在昆虫产生耐受性问题; 蛋白酶抑制剂在胃中的酸性条件下则被胃蛋白分解, 对人、畜无害。

大白菜和菜心是北京和全国普遍栽培的重要蔬菜品种, 其主要虫害为菜青虫、小菜蛾等鳞翅目昆虫。有关十字花科蔬菜转抗虫基因研究已有多篇报道^[5~7], 但有关转基因植株抗虫性鉴定工作中的害虫生活史少有系统研究。本实验用导入 *pin II* 基因的大白菜和菜心植株当代和自交后代对鳞翅目常见害虫——菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 和小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 进行了饲喂实验, 对转基因植株进行了抗虫性筛选, 对各龄期的幼虫死亡率、化蛹率和羽化率均进行了观察统计, 拟为抗虫育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

小菜蛾 (*P. xylostella* L.) 由中国农业大学昆虫系提供。菜青虫 (*P. rapae* L.) 采自北京市农林科学院试验基地。室内以萝卜苗饲养, 饲养条件为 25 °C, 70%~80% 的相对湿度。成虫羽化后, 放入密封网中, 采集虫卵, 以 6 h 内初孵幼虫作为试验虫源。

1.2 供试白菜

供试大白菜和菜心为导入 *pin II* 基因的栽培品种“北京 80 号”和“49”, 均为北京市农林科学院蔬菜

研究中心提供。试验植株为 T_1 转化植株和 T_2 独立转化株系。供试材料在温室内盆栽种植, 常规栽培管理, 待转化株长至 7~8 叶时, 进行饲虫试验。取转基因植株和对照植株相同部位叶片供试。供试叶片用 0.1% 的 NaClO 溶液浸泡 5 min 消毒, 然后用清水冲洗晾干备用。

1.3 转 *pin II* 基因白菜对菜青虫和小菜蛾抗性的室内生物测定

直径 9 cm 的双层培养皿内垫两层滤纸, 无菌水浸湿。将每次采摘的新鲜白菜叶分别放入培养皿中, 每皿接初孵菜青虫幼虫 5 头 (小菜蛾幼虫 8~11 头), 每处理重复 5 次, 以各自未转基因亲本白菜品种作为对照。接虫后双层培养皿封严, 防止幼虫逃逸和保持皿内湿度, 置于温度 25 °C, 光照周期 16: 8 (L:D) 的养虫室内。试验过程中每天更换新鲜干净的叶片。每日观察一次, 检查幼虫的存活数 (以毛笔轻轻触动虫体, 无任何反应者判为死亡), 观察记录幼虫的发育状况, 直到化蛹、羽化, 统计各龄期的死亡率。

1.4 分析方法

上述试验结果, 首先进行方差分析, 然后用 Duncan's 新复极差法检验处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 室内生物测定转 *pin II* 基因大白菜对菜青虫的毒杀效果

将转 *pin II* 基因大白菜 T_1 转化株混株取样饲养菜青虫幼虫, 以未转基因亲本为对照, 室内生物测定转基因大白菜对菜青虫幼虫的毒杀效果如图 1。

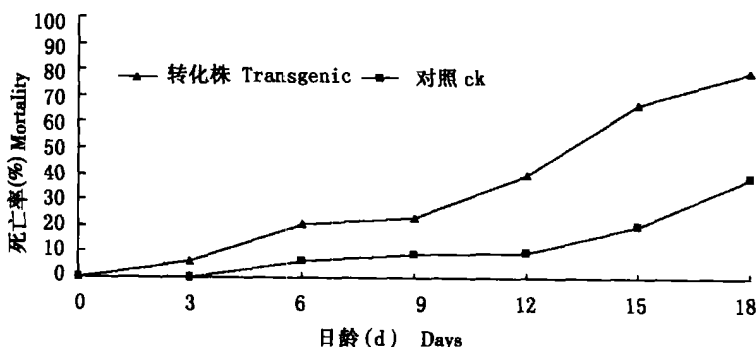


图 1 菜青虫幼虫取食转 *pin II* 基因白菜的死亡率

Fig 1 Larva mortality of *P. rapae* fed with transgenic Chinese cabbage during different incubation days

从图 1 可以看出, 菜青虫取食转基因植株的叶片与对照植株供试叶片, 刚开始二者的存活率没有显著差异, 但随着龄期的增大, 取食转基因叶片菜青虫的死亡率逐渐上升。取食转基因株的菜青虫幼虫在第 3, 6, 9, 12, 15 和 18 d 的死亡率分别为 6.66%, 20.32%, 23.32%, 39.90%, 66.66% 和 78.78%, 而对照株的死亡率分别为 0, 6.60%, 8.83%, 9.90%, 19.89%, 38.30%, 二者有显著差异 ($P < 0.01$)。此外, 取食转基因株的菜青虫到 12 d 时, 有 2 头幼虫保持在 2 龄虫态, 同时有 4 头保持在 3 龄虫态, 这些幼虫不能正常脱皮进入下一龄期而死亡, 而对照存活的幼虫已经全部进入 5 龄期。最后取食转基因植株叶片的幼虫化蛹率为 25.2%, 对照为 74.4%, 两者差异达到显著水平 ($P < 0.01$)。实验结果还表明, 蛹的羽化率和下一代雌雄比在取食转基因叶片和对照非转基因材料间没有显著差异。

室内生物测定表明(表 1), 转化株老叶对菜青虫幼虫的毒杀作用明显高于嫩叶, 取食转化株老叶的菜青虫幼虫 3 d 死亡率为 76.19%, 6 d 全部死亡; 而取食转化株嫩叶的菜青虫幼虫 3 d 死亡率为 9.51%, 6 d 死亡率为 19.04%, 分别都显著低于取食

表 2 转基因菜心对小菜蛾的抗虫活性

Tab 2 Insecticidal activity of transgenic flowering Cabbage to diamond moth								
处理 Treatments	死亡率(%) Mortality				蛹重(mg)	化蛹率(%)	羽化率(%)	总死亡率(%)
	1 龄	2 龄	3 龄	4 龄	Weight of	Percent of	Percent of	Total
	1 st instar	2 nd instar	3 rd instar	4 th instar	pupae	pupation	eclosion	mortality
2- 3	9.80	2.17	11.11	12.5	4.85±0.30a	87.50	71.43	49.02a
2- 11	13.73	22.73	2.33	11.9	4.82±0.28a	88.10	91.89	33.33b
2- 13	7.50	24.32	10.71	16.00	4.35±0.25b	84.00	66.67	52.00a
2- 24	12.00	20.45	14.29	10.00	4.93±0.99a	90.00	66.67	64.00a
对照 ck	4.00	2.08	2.13	4.35	5.15±0.28a	95.65	93.18	18.00b

注: 表中数据是平均值±标准差, 数据后有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 新复极差测验)
Note: The data in the table are presented as mean±SD and those followed by different letters differ significantly at $P < 0.05$ respectively

从表 2 可以看出, 转基因菜心离体叶片喂养的小菜蛾总的死亡率为 33.33% ~ 64.00%, 不同转化植株对小菜蛾有不同程度的毒杀效果, 用对照菜心喂养的小菜蛾总死亡率为 18.00%。除 2- 11 总死亡率(33.33%) 与对照(18.00%) 没有显著差异外 ($P > 0.05$), 其他 3 个处理均与对照有显著差异 ($P < 0.05$), 其中取食 2- 24 号植株的小菜蛾死亡率最高达 64%, 极显著高于对照的死亡率 ($P < 0.01$)。取食转基因菜心不同株系的小菜蛾幼虫各龄期的死亡率不尽相同, 其中取食 2- 13, 2- 24 号植株的幼虫各龄期和蛹期的死亡率显著高于对照各阶段的死亡率。取食转基因菜心小菜蛾的蛹较对照轻, 但差异

转化株老叶的死亡率 ($P < 0.01$)。对照老叶、嫩叶的菜青虫幼虫 3 d 死亡率为 14.28%, 0, 6 d 后死亡率为 19.04%, 4.75%, 明显低于取食转化株老叶、嫩叶的死亡率 ($P < 0.01$)。

表 1 菜青虫幼虫取食不同生长时期转 *pin* II 基因大白菜的死亡率

Tab 1 Larva Mortality of <i>P. rapae</i> fed with different age leaves of transgenic cabbage				
饲喂天数 Feeding days	死亡率(%) mortality			
	转化株老叶 Transgenic aged leaves	对照老叶 Control aged leaves	转化株嫩叶 Transgenic young leaves	对照嫩叶 Control young leaves
3	76.19	14.28	9.51	0.00
6	100.00	19.04	19.04	4.75

2.2 室内生物测定转 *pin* II 基因白菜对小菜蛾的毒杀效果

2.2.1 转 *pin* II 基因菜心对小菜蛾的毒杀效果
所用菜心是一种早熟的农家品种 49。从 T_1 转化株中选取 4 个独立转化株系, 经严格的套袋自交, 获得 T_2 群体作为试验材料。将转 *pin* II 基因菜心 T_2 转化株饲养小菜蛾幼虫, 以未转基因亲本为对照, 室内生物测定转基因菜心对小菜蛾幼虫的毒杀效果。

不明显; 其化蛹率低于对照, 但只有取食 2- 13 号植株与对照差异显著 ($P < 0.05$)。各处理的小菜蛾的羽化率除 2- 11 号株系外, 也显著低于对照。

另外, 实验中也记录了小菜蛾各龄的发育历期, 数据统计结果表明, 取食转基因菜心不同株系的小菜蛾的各龄发育历期与对照无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 转 *pin* II 基因大白菜对小菜蛾的毒杀效果
所用大白菜为 T_1 转化株经严格的套袋自交获得的 T_2 转化株。由表 3 可看出, 取食转基因大白菜小菜蛾的幼虫期在 7.83~ 10.94 d。其中, 取食 2- 12 植株的小菜蛾幼虫期(10.94 d) 与对照(8.50 d) 有显著的差异 ($P < 0.05$)。在试验过程中发现部分取食转基

因植株的小菜蛾 1, 2 龄幼虫生长发育不良, 呈僵化状态, 有的因此而死亡, 存活下来的龄期较对照长。少数小菜蛾在低龄时发育正常, 但在 3, 4 龄时出现发育慢、个体小, 有的甚至停止发育的现象, 乃至不能化蛹, 最后变黑褐色而死亡。

表 3 小菜蛾在大白菜上的发育历期

Tab 3 The development period of diamond moth reared transgenic Chinese cabbage						
处理	1 龄(d)	2 龄(d)	3 龄(d)	4 龄(d)	幼虫期(d)	蛹期(d)
Treatments	1 st . instar	2 nd . instar	3 rd . instar	4 th . instar	Period of larvae	Period of pupae
2-6	3. 02	2. 78	1. 43	2. 03	8. 70	4. 67
2-9	3. 07	2. 04	1. 29	2. 12	8. 79	3. 63
2-12	3. 40	2. 33	2. 00	4. 83	10. 94	3. 99
3-6	3. 00	2. 48	1. 31	1. 92	7. 83	4. 92
3-7	3. 00	2. 60	1. 48	1. 70	8. 67	3. 89
3-8	3. 00	2. 52	1. 45	1. 65	8. 62	3. 95
对照(ck)	3. 16	2. 07	1. 62	1. 60	8. 50	3. 45

表 4 转基因大白菜对小菜蛾的抗虫活性

Tab 4 Insecticidal activity of transgenic Chinese Cabbage to diamond moth								
处理	死亡率 Mortality(%)				蛹重	化蛹率	羽化率	总死亡率
	1 龄	2 龄	3 龄	4 龄				
	1 st . instar	2 nd . instar	3 rd . instar	4 th . instar				Total mortality(%)
2-6	52. 50	42. 11	0. 00	45. 45	3. 73±0. 25 d	54. 55	66. 67	90. 00
2-9	42. 50	17. 39	15. 79	25. 00	3. 64±0. 29 d	75. 00	58. 33	82. 50
2-12	47. 50	14. 29	11. 11	18. 75	3. 83±0. 30 d	81. 25	53. 85	82. 50
3-6	62. 50	40. 00	0. 00	22. 22	4. 84±0. 21 b	77. 78	71. 43	87. 50
3-7	14. 29	2. 78	2. 86	17. 65	4. 72±0. 39 bc	82. 35	71. 43	50. 00
3-8	55. 00	5. 56	0. 00	11. 76	4. 36±0. 30 c	88. 24	93. 33	75. 00
对照 (ck)	25. 00	6. 67	0. 00	3. 57	5. 24±0. 34 a	96. 43	96. 30	35. 00

注: 表中数据是平均值±标准差, 数据后有不同字母表示差异显著($P < 0. 05$, Duncan 新复极差测验)
Note: The data in the table are presented as mean±SD and those followed by different letters differ significantly at $P < 0. 05$ respectively

从表 4 可看出, 取食转基因大白菜的小菜蛾的总死亡率在 50. 00% ~ 90. 00%, 而对照的总死亡率为 35. 00%, 且死亡率主要集中在 1, 2 龄; 取食转基因大白菜的小菜蛾蛹质量分别为 3. 73, 3. 64, 3. 82, 4. 84, 4. 72, 4. 36 mg, 显著低于取食对照植株的蛹质量(5. 24 mg, $P < 0. 05$), 且各不同转化株也有显著差异; 取食转基因大白菜植株 2- 6, 2- 9, 3- 6 的小菜蛾化蛹率分别为 54. 55%, 75. 00%, 77. 78% 与对照(96. 46%) 差异显著($P < 0. 05$); 取食转基因大白菜小菜蛾的羽化率除 3- 8(93. 33%) 外, 其他均与对照(96. 30%) 有显著差异($P < 0. 05$)。

3 讨论

本试验通过用转基因菜心、大白菜人工喂养菜青虫、小菜蛾幼虫, 通过记录其发育历期、死亡虫数、化蛹率、蛹质量和羽化率等生物学参数, 观察转基因植株对两种常见害虫生长发育的影响, 以检测转马

铃薯蛋白酶抑制剂基因(*pin II*) 的菜心、大白菜各个品系的抗性情况。结果证明导入 *pin II* 基因的菜心、大白菜品系中, 部分品种对小菜蛾具有很强的抗性, 如菜心品系中的 2- 13, 大白菜中的 2- 6。两种品系相比较, 各抗虫生物学参数变化明显, 死亡率最高的取食大白菜 2- 6 的小菜蛾达 90. 00%。总体来说, 取食大白菜品系的小菜蛾死亡率远远高于取食菜心的, 且死亡集中在 1, 2 龄幼虫。同时也发现大白菜中的小菜蛾幼虫期、蛹期均比菜心品系中的长。分析实验结果可知, 转基因植株叶片的抗虫效果主要表现为抑虫效应。害虫取食转基因植株叶片后中毒反应比较缓慢, 但毒性具有累加效应, 尤其对幼虫具有极为明显的毒害作用。中毒的幼虫平均质量比较轻, 其生长发育受到不同程度的抑制, 在成虫时的死亡率约为取食非转基因叶片对照虫体的两倍, 且其存活成虫的化蛹率大大低于对照虫体。另外可能由于转化株的老叶积累的外源基因表达产物

—蛋白酶抑制剂较多,对菜青虫幼虫的毒杀作用更强。获得的转基因白菜对降低虫害,特别是降低害虫的种群繁衍速度具有一定的作用。获得 *pin II* 转基因白菜的这种对害虫生长、繁育具抑制作用的抗虫特性,虽然对当代取食害虫没有完全的致死作用及对植株的完全保护作用,但是另一方面,这样可以延缓害虫在种群内产生抗性的时间,使转化株在较长时间内具有抑虫能力^[8],对保护生态环境有一定效果。

近年来人们发现,几乎所有的转基因方法得到的转基因植株中,都有外源基因在整合进基因组后出现基因沉默现象^[9],转基因在受体植株中的表达水平很不稳定^[10]。本实验也发现部分转基因植株的抗性不明显,同一品系中植株的抗虫活性有很大的差异,这也验证了外源基因在转基因植株中的表达调控是一个十分复杂的问题^[11]。随着生物工程的迅速发展,抗虫转基因植物的研究虽已取得了很大的成果,但仍面临着许多的问题有待进一步研究解决。

本实验检测方法简单方便,对害虫的各生物学参数有一个较为完整的考察,作为初步检测蔬菜品系植株的抗性是可行的。但由于转基因植株的有限,未能进行活体植株的检测和田间的抗性实验,只能留待以后进一步研究。

参考文献:

- [1] 谢先芝. 抗虫转基因植物的研究进展及前景[J]. 生物工程进展, 1999, 19(6): 47– 51.
- [2] Brettel R I, Murray F R. DNA transfer and gene expression in transgenic cereals[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1995, 13: 315– 334.
- [3] 李庆军, 董艳桐, 施 冰. 植物抗虫基因的研究进展[J]. 林业科技, 2002, 27(2): 22– 25.
- [4] Duan Xiaolan, Li Xiaogang. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 494– 498.
- [5] 方宏筠, 李大力, 王关林, 等. 转豇豆胰蛋白酶抑制剂基因抗虫甘蓝植株的获得[J]. 植物学报, 1997, 39(10): 940– 945.
- [6] 毛慧珠, 唐 惕, 曹湘玲, 等. 抗虫转基因甘蓝及其后代的研究[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(4): 339– 347.
- [7] 林良斌, 官春云, 王国槐, 等. 转基因抗虫油菜对菜青虫抗性的研究[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(3): 203– 205.
- [8] Yeh K W, Lin M I, Tuan S J, *et al.* Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 696– 699.
- [9] Herve V. Transgene- induced gene silencing in plants [J]. The Plant Journal, 1997, 66: 197– 203.
- [10] 崔广荣. 植物转基因方法及特点和转基因沉默现象[J]. 安徽技术师范学院学报, 2003, 17(1): 37– 41.
- [11] Pau Jooykaas J, Rob A S. Agrobacterium and plants genetic engineering[J]. Plant Mol Biol, 1992, 19: 15– 38.