

外源 Bt 杀虫蛋白和棉花主要抗虫萜烯类物质 互作关系研究

张永军,杨 舰,郭予元,吴孔明

(中国农业科学院植物保护研究所,北京 100094)

摘要:利用高效液相色谱(HPLC)技术比较了不同生长时期转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同器官中抗虫萜烯类物质含量的差异。显著性分析发现,外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花原有的棉酚、总杀实夜蛾素及总抗虫萜烯类合成量不存在不利的影 响。以棉酚作为萜烯类物质代表物,在饲料中进行了棉铃虫幼虫对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应试验。结果表明,棉酚对棉铃虫幼虫的抗虫作用达到极显著水平,棉酚和 Bt 杀虫蛋白之间没有交互作用,表明饲料中棉酚和 Bt 杀虫蛋白对棉铃虫的抗虫作用是相加的。

关键词:Bt 杀虫蛋白;抗虫萜烯类化合物;互作关系

Study on the Interactions Between Exogenous Bt-ICP and Cotton Terpenoids Chemicals

ZHANG Yongjun, YANG Jian, GUO Yuyuan, WU Kongming

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: The contents of terpenoids chemicals in Bt transgenic cotton and their parental varieties were analyzed by HPLC method. Statistical analysis of variance showed that Bt-ICP expression has no negative effect on synthesis of gossypol, total heliocide and total resistant terpenoids. The results of the combined dosage test of Bt-ICP and gossypol in vitro showed that there was no interaction between gossypol and Bt-ICP on the mortality of cotton bollworm larvae. This means the actions of Bt-ICP and gossypol on cotton bollworm are additive. Therefore, it is advantageous to combine Bt-ICP with cotton terpenoids chemicals in controlling cotton bollworm.

Key words: Bt-ICP; Terpenoids chemicals; Interaction

棉花抗虫萜烯类化合物(包括棉酚、半棉酚酮、杀实夜蛾素 H₁、H₂、H₃、H₄ 以及甲氧基半棉酚酮等)广泛存在于棉花各种组织器官中的色素腺内,是棉花中除缩合单宁—黄酮类化合物之外又一类重要的抗生次生物质。国内外自 20 世纪 60 年代起就开始了棉花抗虫萜烯类化合物种类和抗虫性能的研究。棉酚等对烟芽夜蛾、棉铃虫和红铃虫以及红蜘蛛具有毒性^[1~5]。杀实夜蛾素和半棉酚酮对烟芽夜蛾等棉花害虫具有不同程度的抗生作用^[6,7]。80 年代后期,利用生物技术成功培育出转 Bt 基因棉花,在防治棉铃虫为害方面发挥了巨大作用。为了充分发

挥转 Bt 基因棉花的抗虫优势,协调利用外源 Bt 杀虫资源和棉花内源抗虫萜烯类物质成为一个急待解决的课题。Sachs^[8]研究报道指出,抗虫萜烯类物质含量高的转 Bt 基因抗虫棉花品系,对烟芽夜蛾的抗虫性能明显高于不含或抗虫萜烯类物质含量低的转 Bt 基因抗虫棉花。Garry^[9]发现抗虫萜烯类化合物能够增加 Bt 杀虫蛋白的功效。但是,外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花原有抗虫萜烯类物质的代谢积累有无影响和有什么影响目前尚未见报道,这不利于正确选择抗虫基因材料和有效利用 Bt 棉的抗虫优势。为此,作者采用高效液相色谱法比较了不同生长时

收稿日期:2000-11-02

基金项目:国家自然科学基金(39770498)和国家重点基础研究发展规划项目(G2f000016208)

作者简介:张永军(1970-),男,河北张家口人,博士,主要从事植物抗虫及害虫与寄主植物的关系方面的研究。Tel: 010-62815929; E-mail: li-oni zhang@hotmail.com

期转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同器官中抗虫萜烯类物质含量的差异,并以棉酚作为萜烯类物质代表物,在饲料中进行了棉铃虫幼虫对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应试验,初步弄清了外源 Bt 杀虫蛋白和棉花主要抗虫萜烯类物质的互作关系。

1 材料与方 法

1.1 供试棉花及处理方法

DP5415 新棉 33^B(DP5415 的转 Bt 基因棉花)由美国孟山都远东有限公司提供;泗棉 3 号、GK2(泗棉 3 号的转 Bt 基因棉花)由中国农业科学院生物技术研究所提供;中棉所 16、中棉所 30(中棉所 16 的转 Bt 基因棉花)由中国农业科学院棉花研究所提供。供试棉花在中国农业科学院植物保护研究所试验田种植,试验小区随机区组排列,生长期不使用任何农药,不打顶,不摘边心,其它为常规管理。

各个品种(系)的棉花在生长的 9 个时期:子叶期、三叶期、七叶期、幼蕾期、蕾期、花期、花铃期、铃期、吐絮期,分别取子叶、顶端初展开的嫩叶(顶叶)、小蕾(直径约 0.5~0.7cm)、花瓣、花心(含花药、花丝、子房)、花萼、苞叶、小铃(直径约 1.2cm),用液 N₂ 快速冷冻并在冷冻干燥机(-80℃)冻干,研成粉后过 0.177mm 孔径筛,-20℃冰箱保存备用。分别称取样品冻干粉 50mg 置于具塞离心管中,然后在离心管中加入 5ml 溶液 A(乙酸乙酯:正己烷=1:3)并封口,将离心管摇匀,放在 20℃摇床内 350 r/min 振荡 2h,提取液以 8 000 r/min 的速度离心 10min,取上清液转移到带盖小瓶中,常温减压浓缩,再用 N₂ 气吹干后用 5ml 溶液 B(异丙醇:乙腈:水:乙酸乙酯=35:21:39:5)定容,抽滤(过 0.45μm 滤膜)后在液相色谱仪上进样。

1.2 供试棉铃虫

敏感品系棉铃虫 1989 年采自河南禹州,在室内饲养 10 年一直未使用任何杀虫剂。

1.3 色谱分析条件

仪器:惠普 HP-1100 高效液相色谱仪(HPLC);色谱柱:ZORBAX RX-C18,规格为 4.6mm×250mm;流动相为乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈、水、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲酰胺、磷酸(16.7:4.6:12.1:20.2:37.4:3.8:5.1:0.1),等度洗脱;检测波长 272nm;流速 1.0ml/min;柱温 55℃;标准样品:棉酚(Sigma),其余萜烯类化合物标样由美国农业部南方实验室 Dr. Stipanovic 惠赠;进样量 20μl。棉花组织中的萜烯类物质采用外标法定量,以不同浓度各

标样的吸收值作出标准曲线,确定各棉花组织样品中萜烯类物质含量。

1.4 棉铃虫幼虫在饲料中对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应试验

将不同浓度的 Cry I AC Bt 杀虫毒蛋白(0, 0.002%, 0.004%, 0.008%, 0.012%)和不同浓度(W/W)的棉酚(0, 0.075%, 0.2%, 0.4%)均匀拌入人工饲料中,然后将初孵棉铃虫幼虫接入有饲料的养虫盒内(每组接虫 6 头,重复 4 次),并把养虫盒置于养虫室。5d 后检查死亡情况,用方差分析法处理结果。

2 结果与分析

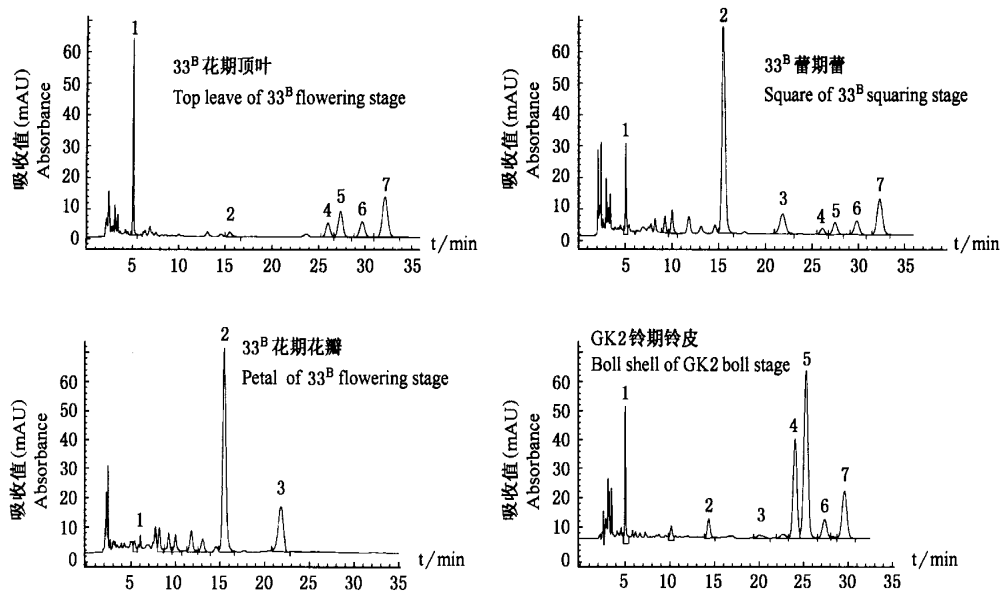
2.1 转 Bt 基因棉花组织中抗虫萜烯类化合物的 HPLC 分离效果

由图可以发现棉花组织中抗虫萜烯类化合物绝大多数能够用 HPLC 方法检测到并且得到比较好的分离,峰间保留时间差异明显。在本试验条件下半棉酚酮、甲氧基半棉酚酮、棉酚、杀实夜蛾素 H₄、H₁、H₃、H₂ 的保留时间分别是 5.08 min、15.54 min、23.80 min、26.12 min、27.47 min、29.81 min、32.28 min。

2.2 不同生长时期转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同器官中主要抗虫萜烯类物质含量的差异

以同一试验田不同小区种植的新棉 33^B、DP5415、GK2、泗棉 3 号、中棉所 30 和中棉所 16 为试验材料,用 HPLC 方法测定各个品种不同生育期、不同组织器官的棉酚、总杀实夜蛾素(包括杀实夜蛾素 H₁、H₂、H₃、H₄)和总抗虫萜烯类(包括棉酚、半棉酚酮、杀实夜蛾素 H₁、H₂、H₃、H₄ 以及甲氧基半棉酚酮等)的含量(表 1~3)。

应用 ANOVA 程序分别对 6 个棉花品种的棉酚、总杀实夜蛾素和总抗虫萜烯类含量数值进行成对样品的显著性方差测验。结果显示,不同生育期和不同组织器官之间的棉酚含量有极显著差异。33^B/DP5415($F=102.494 > F_{0.01}=2.41$),GK2/泗棉 3 号($F=383.114 > F_{0.01}=2.34$),中棉所 30/中棉所 16($F=700.160 > F_{0.01}=2.34$)。转 Bt 基因棉花 33^B($F=0.8845 < F_{0.05}=4.1830$)、GK2($F=0.0015 < F_{0.05}=4.1596$)和中棉所 30($F=0.3577 < F_{0.05}=4.1596$)的棉酚的含量与其对照亲本差异没有达到显著水平,说明外源 Bt 杀虫蛋白表达不会影响到棉花原有的棉酚合成代谢。



1. 半棉酚酮; 2. 甲氧基半棉酚酮; 3. 棉酚; 4. 杀实夜蛾素 H₄; 5. H₁; 6. H₃; 7. H₂; 其余未知 1. He migossypolone; 2. He migossypolone methyl ethers; 3. Gossypol; 4. Heliocide H₄; 5. Heliocide H₁; 6. Heliocide H₃; 7. Heliocide H₂; Others was not identified

图 棉花组织中萜烯类化合物液相色谱(HPLC)分离图谱

Fig. HPLC spectrogram of terpenoids chemicals in Bt transgenic cotton

表 1 转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同生长期各组织中棉酚含量

Table 1 Gossypol contents in different organs along the developmental process of 3 Bt transgenic cotton and their parental varieties (mg/g, DW)

组织器官 Tissues and organs	GK2	泗棉 3 号 Si mian 3	中棉所 30 CCRI 30	中棉所 16 CCRI 16	33 ^B	DP5415
子叶期子叶 Seed leaves of seedling stage	4.093	3.981	4.165	3.929	2.420	2.078
三叶期顶叶 Top leaves of three leaf stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
七叶期顶叶 Top leaves of seven leaf stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.560	0.543
幼蕾期顶叶 Top leaves of early squaring stage	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-
幼蕾期蕾 Squares of early squaring stage	0.411	0.399	0.476	0.476	-	-
蕾期顶叶 Top leaves of squaring stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
蕾期蕾 Squares of squaring stage	0.981	1.072	0.000	0.000	1.196	1.101
蕾期苞叶 Bract of squaring stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
花期顶叶 Top leaves of flowering stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.394	0.379
花期蕾 Square of flowering stage	1.349	1.283	0.527	0.703	1.002	0.994
花期花瓣 Petals of flowering stage	1.830	1.745	1.323	1.456	2.450	3.178
花期花心 Flower hearts of flowering stage	0.776	0.782	0.719	0.729	0.679	0.873
花期花萼 Calyx of flower stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
花期苞叶 Bracts of flowering stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.322	0.345
花铃期顶叶 Top leaves of flowering-boll stage	0.410	0.418	0.000	0.000	0.000	0.000
花铃期蕾 Squares of flowering-boll stage	1.250	1.528	0.647	0.647	1.184	1.551
花铃期花瓣 Petals of flowering-boll stage	2.226	2.030	1.977	1.895	2.330	2.449
花铃期花心 Flower hearts of flowering-boll stage	0.870	0.879	0.597	0.606	0.847	0.650
花铃期花萼 Calyx of flowering-boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.431	0.431
花铃期苞叶 Bracts of flowering-boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.355
花铃期铃 Bolls of flowering-boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
铃期顶叶 Top leaves of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
铃期蕾 Squares of boll stage	1.678	1.463	1.159	0.976	1.400	1.218
铃期花瓣 Petals of boll stage	2.43	2.75	2.604	2.600	3.039	3.340
铃期花心 Flower hearts of boll stage	1.155	1.198	1.047	0.996	1.829	1.901
铃期花萼 Petals of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
铃期苞叶 Bracts of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
铃期铃皮 Boll shell of boll stage	1.431	1.375	0.000	0.000	0.529	0.529
铃期铃心 Boll heart of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
吐絮期顶叶 Top leaves of boll opening stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
吐絮期铃皮 Boll shell of boll opening stage	1.156	1.163	0.000	0.000	0.478	0.470
吐絮期铃心 Boll heart of boll opening stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

- 表示未进行含量测定。下同 - Stands for none detection. The same as below

表 2 转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同生长时期各组织中总杀实夜蛾素含量

Table 2 Total heliocide contents in different organs along the developmental process of 3 Bt transgenic cotton and their parental varieties (mg/g , DW)

组织器官 Tissues and organs	GK2	泗棉 3 号 Simian3	中棉所 30 CCRI 30	中棉所 16 CCRI 16	33 ^B	DP5415
子叶期子叶 Seed leaves of seedling stage	-	-	-	-	0.000	0.000
三叶期顶叶 Top leaves of three leaf stage	2.340	2.287	2.019	1.736	1.745	2.473
七叶期顶叶 Top leaves of seven leaf stage	1.469	1.424	1.886	1.099	3.607	4.146
幼蕾期顶叶 Top leaves of early squaring stage	2.241	2.749	3.296	2.283	-	-
幼蕾期蕾 Squares of early squaring stage	2.383	2.482	2.157	1.619	-	-
蕾期顶叶 Top leaves of squaring stage	2.853	2.442	2.093	2.711	2.586	2.217
蕾期蕾 Squares of squaring stage	1.882	2.031	1.700	1.686	2.324	2.270
蕾期苞叶 Bract of squaring stage	1.815	1.786	1.995	1.718	2.134	1.856
花期顶叶 Top leaves of flowering stage	2.757	2.880	3.624	2.925	2.881	3.195
花期蕾 Square of flowering stage	1.449	2.017	1.749	1.572	1.695	1.639
花期花瓣 Petals of flowering stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
花期花心 Flower hearts of flowering stage	1.832	1.348	1.241	1.263	1.607	2.126
花期花萼 Calyx of flower stage	2.829	2.568	2.889	2.747	2.665	2.032
花期苞叶 Bracts of flowering stage	1.689	1.735	2.032	1.432	1.727	1.538
花铃期顶叶 Top leaves of flowering-boll stage	4.433	3.831	5.283	5.030	5.888	5.138
花铃期蕾 Squares of flowering-boll stage	2.297	1.986	2.109	1.812	3.290	3.680
花铃期花瓣 Petals of flowering-boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
花铃期花心 Flower hearts of flowering-boll stage	2.592	2.344	1.082	1.599	1.682	1.927
花铃期花萼 Calyx of flowering-boll stage	4.028	3.114	4.017	3.925	3.461	3.461
花铃期苞叶 Bracts of flowering-boll stage	2.330	2.888	2.212	1.919	2.538	2.375
花铃期铃 Bolls of flowering-boll stage	10.900	12.339	6.683	5.485	6.928	9.173
铃期顶叶 Top leaves of boll stage	3.132	3.330	4.722	4.056	3.593	5.043
铃期蕾 Squares of boll stage	2.495	2.957	2.326	2.208	1.805	2.266
铃期花瓣 Petals of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
铃期花心 Flower hearts of boll stage	4.052	2.149	1.183	1.842	1.113	1.692
铃期花萼 Petals of boll stage	4.644	3.994	5.269	5.406	6.229	6.260
铃期苞叶 Bracts of boll stage	2.227	2.406	2.679	2.066	2.478	2.408
铃期铃皮 Boll shell of boll stage	10.859	9.339	6.682	8.485	9.432	8.098
铃期铃心 Boll heart of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
吐絮期顶叶 Top leaves of boll opening stage	2.677	3.370	2.154	1.720	5.833	6.465
吐絮期铃皮 Boll shell of boll opening stage	17.183	13.072	7.261	8.273	7.815	6.924
吐絮期铃心 Boll heart of boll opening stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

不同生育期和不同组织器官之间的总杀实夜蛾素(包括 H₄、H₁、H₃、H₂)含量有极显著差异:33^B/DP5415($F = 14.9732 > F_{0.01} = 2.41$), GK2/泗棉 3 号($F = 50.827 > F_{0.01} = 2.34$), 中棉所 30/中棉所 16($F = 34.1301 > F_{0.01} = 2.34$)。转 Bt 基因棉花 33^B($F = 0.0029 < F_{0.05} = 4.1830$)、GK2($F = 2.0277 < F_{0.05} = 4.1596$)和中棉所 30($F = 3.0430 < F_{0.05} = 4.1596$)的总杀实夜蛾素的含量与其对照亲本没有显著差异,说明外源 Bt 杀虫蛋白表达基本上不会影响到棉花原有的总杀实夜蛾素合成代谢。

不同生育期和不同组织器官之间的总抗虫萜烯类含量有极显著差异:33^B/DP5415($F = 14.236 > F_{0.01} = 2.41$), GK2/泗棉 3 号($F = 108.0117 > F_{0.01} = 2.34$), 中棉所 30/中棉所 16($F = 24.7214 > F_{0.01} = 2.34$)。转 Bt 基因棉花 33^B($F = 0.2278 < F_{0.05} =$

4.1830)、GK2($F = 2.3306 < F_{0.05} = 4.1596$)和中棉所 30($F = 1.9297 < F_{0.05} = 4.1596$)的总抗虫萜烯类含量与其对照亲本没有显著差异,说明外源 Bt 杀虫蛋白表达总体上不会影响到棉花原有的总抗虫萜烯类物质合成代谢。

2.3 棉铃虫幼虫在饲料中对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应

把棉铃虫幼虫死亡率进行反正弦转换得到表 4,进行方差分析,结果显示,随着饲料中 Bt 杀虫蛋白浓度的增加棉铃虫幼虫死亡率显著上升,Bt 杀虫蛋白对棉铃虫幼虫的毒杀作用达到极显著水平($F = 31.18 > F_{0.01} = 3.68$);棉酚对棉铃虫幼虫的抗虫作用也达到极显著水平($F = 26.34 > F_{0.01} = 4.16$);但棉酚和 Bt 杀虫蛋白之间没有交互作用($F < 1$),即饲料中棉酚和 Bt 杀虫蛋白对棉铃虫仅为相加作用,而无增效作用。

表 3 转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同生长时期各组织中总抗虫萜烯类含量

Table 3 Total terpenoids chemicals contents in different organs along the developmental process of 3 Bt transgenic cotton and their parental varieties (mg/ g , DW)

组织器官 Tissues and organs	GK2	泗棉 3 号 Simian3	中棉所 30 CCRI 30	中棉所 16 CCRI 16	33 ^B	DP5415
子叶期子叶 Seed leaves of seedling stage	-	-	-	-	15.170	12.930
三叶期顶叶 Top leaves of three leaf stage	6.936	6.671	4.982	3.893	4.197	6.817
七叶期顶叶 Top leaves of seven leaf stage	3.540	2.801	3.669	3.177	10.965	14.080
幼蕾期顶叶 Top leaves of early squaring stage	12.299	13.012	9.664	8.109	-	-
幼蕾期蕾 Squares of early squaring stage	9.271	9.327	6.197	5.029	-	-
蕾期顶叶 Top leaves of squaring stage	10.085	10.391	4.697	6.503	6.091	5.646
蕾期蕾 Squares of squaring stage	9.372	9.519	6.696	6.446	11.085	11.775
蕾期苞叶 Bract of squaring stage	2.618	2.451	2.491	2.158	10.219	9.686
花期顶叶 Top leaves of flowering stage	10.625	9.266	7.434	5.434	9.659	8.657
花期蕾 Square of flowering stage	8.251	8.101	7.289	7.617	8.426	9.435
花期花瓣 Petals of flowering stage	4.364	3.243	4.471	3.681	8.368	8.837
花期花心 Flower hearts of flowering stage	7.875	5.364	3.973	4.813	5.054	7.864
花期花萼 Calyx of flower stage	5.264	4.368	4.001	3.686	3.886	3.235
花期苞叶 Bracts of flowering stage	2.466	2.100	2.451	1.721	2.721	2.417
花铃期顶叶 Top leaves of flowering boll stage	19.206	21.945	7.947	8.727	12.376	9.342
花铃期蕾 Squares of flowering boll stage	10.718	8.454	8.177	8.071	13.441	13.212
花铃期花瓣 Petals of flowering boll stage	3.465	3.833	3.280	3.449	4.134	3.580
花铃期花心 Flower hearts of flowering boll stage	9.232	8.606	4.751	5.589	7.282	9.487
花铃期花萼 Calyx of flowering boll stage	7.131	9.085	5.513	3.901	4.825	4.825
花铃期苞叶 Bracts of flowering boll stage	4.336	3.664	2.885	2.280	3.015	3.296
花铃期铃 Bolls of flowering boll stage	33.834	30.700	11.891	9.000	11.013	12.769
铃期顶叶 Top leaves of boll stage	5.486	5.187	6.239	5.679	9.087	10.813
铃期蕾 Squares of boll stage	9.244	9.866	10.635	9.695	11.616	12.303
铃期花瓣 Petals of boll stage	3.053	3.626	3.935	4.291	9.070	11.506
铃期花心 Flower hearts of boll stage	10.894	8.1811	6.079	7.488	10.584	11.951
铃期花萼 Petals of boll stage	6.480	5.275	7.024	7.783	8.504	8.519
铃期苞叶 Bracts of boll stage	3.688	3.615	3.469	2.407	3.299	3.229
铃期铃皮 Boll shell of boll stage	34.834	37.699	11.891	16.034	21.108	18.416
铃期铃心 Boll heart of boll stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
吐絮期顶叶 Top leaves of boll opening stage	5.471	5.313	2.762	2.016	12.039	14.138
吐絮期铃皮 Boll shell of boll opening stage	21.096	21.607	15.726	15.853	17.699	14.634
吐絮期铃心 Boll heart of boll opening stage	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 棉铃虫幼虫在饲料中对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应试验结果

Table 4 The effects of different dosage combinations of gossypol and Bt-ICP on the mortalities of cotton bollworm larvae

棉酚浓度 Concentration of gossypol (%)	Bt 蛋白浓度 Concentration of Bt-ICP (%)	4 次重复平均值 Average of 4 repetition
0	0	0
	0.002	35.30
	0.004	42.58
	0.008	47.80
	0.012	55.45
0.075	0	17.28
	0.002	40.15
	0.004	45.00
	0.008	49.85
	0.012	66.33
0.2	0	32.50
	0.002	61.48
	0.004	57.50
	0.008	66.33
	0.012	69.13
0.4	0	40.15
	0.002	66.33
	0.004	75.15
	0.008	77.95
	0.012	83.98

3 讨论

棉铃虫幼虫在饲料中对棉酚和 Bt 杀虫蛋白的复合剂量反应试验结果表明,棉酚和 Bt 杀虫蛋白之间没有交互作用,两者合用对棉铃虫幼虫的杀虫效果是相加的。原因可能有以下几方面:一方面棉酚等化合物的酚羟基远较棉花缩合单宁少,鞣化蛋白的功能不强,因而对 Bt 杀虫蛋白的负面影响较小;另一方面,棉酚在棉铃虫幼虫消化道内的靶受体不同于 Bt 杀虫蛋白,不会在幼虫消化道内干扰 Bt 杀虫蛋白充分与受体蛋白结合发挥作用^[10]。另外棉酚对棉铃虫幼虫生长的抑制作用也有利于 Bt 杀虫蛋白发挥作用。所以,棉酚等萜烯类抗虫物质可以和 Bt 杀虫剂协调应用来防治棉铃虫幼虫对棉花的为害。从高效液相色谱法测定结果可以看出转 Bt 基因棉花及其对照亲本不同生育期、不同组织器官的棉酚、总杀实夜蛾素和总抗虫萜烯类的含量差异均不显著,表明外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花原有的总杀实夜蛾素、棉酚及总抗虫萜烯类合成量不存在不利的影 响。将 Bt 杀虫蛋白基因转入抗虫萜烯

类物质含量高的棉花品系或者将转 Bt 基因棉花与富含抗虫萜烯类物质的棉花品种杂交,可能有利于发挥两者的协同抗虫作用,并且延缓棉铃虫的抗性发展。

棉花抗虫萜烯类的合成是棉花防御机制的重要组成部分。棉花的倍半萜环化酶,(+)- δ -杜松烯合成酶是棉花抗虫萜烯类生物合成的关键酶,Chen X Y 等^[11,12]克隆了(+)- δ -杜松烯合成酶 cDNA 和基因,并且发现在离体状态下(+)- δ -杜松烯合成酶在转录水平上被诱导子(elicitor)诱导,酶活力迅速提高,导致棉酚等抗虫萜烯类大量合成与积累。如果通过基因工程将控制抗虫萜烯类化合物生物合成的关键酶基因和 Bt 杀虫蛋白基因一同转入棉花或通过诱导手段提高转 Bt 基因棉花抗虫萜烯类化合物含量,对于合理有效利用 Bt 棉抗虫潜力将具有一定的实践意义。

References

- [1] Bottger G T, et al. Relation of gossypol content of content plants to insect resistance. *J. Econ. Entomology*, 1964, 57: 283 - 285.
- [2] Zhang J F, et al. Identification of cotton varieties resistant to carmine spider mite and exploration of resistance mechanism. *Acta Phytophyl. Sin.* 1993, 20(2): 155 - 161. (in Chinese) 张金发, 等. 棉花对朱砂叶螨抗性的鉴定和抗性机制研究. 植物保护学报, 1993, 20(2): 155 - 161.
- [3] Meisner J, et al. Gossypol inhibits protease and amylase activity of *Spodoptera littoralis* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 1978, 71: 5 - 8.
- [4] Mitchell E R, et al. Oviposition response of three *Heliothis* species to allelochemicals from cultivated and wild host plant. *J. Chem. Ecol.* 1990, 16(6): 1817 - 1826.
- [5] Wang C Z. Effects of gossypol and tannic acid on the growth and digestion physiology of cotton bollworm larvae. *Acta Phytophyl. Sin.* 1997, 24(1): 13 - 18. (in Chinese) 王琛柱. 棉酚和单宁酸对棉铃虫幼虫生长和消化生理的影响. 植物保护学报, 1997, 24(1): 13 - 18.
- [6] Stipanovic R D, et al. Heliocide H₃: An insecticidal terpenoid from cotton. *Phytochemistry*, 1977, 17: 151 - 152.
- [7] Stipanovic R D, et al. Heliocide H₁: A new insecticidal C₂₅ terpenoid from cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Agric. Food. Chem.* 1978, 26(1): 115 - 118.
- [8] Sachs E S, et al. Pyramiding cry I: A insecticidal protein and terpenoids in cotton to resist tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Environ. Entomol.* 1996, 25(6): 1257 - 1266.
- [9] Garry F, et al. Factors affecting the efficacy of Bt cotton. *The Australian Cotton grower*, 1999, 20(3): 28 - 30.
- [10] Muchleisen D P, et al. High - affinity juvenile hormone binding to fat body cytosolic proteins of the bollworm, *Heliothis zea*: characterization and interaction with allelochemicals and xenobiotics. *Pestic. Biochem. Physio.* 1990, 37: 64 - 73.
- [11] Chen X Y, et al. Cloning, expression and characterization of (+)- δ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 324(2): 255 - 266.
- [12] Chen X Y, et al. Cloning and heterologous expression of a second (+)- δ -cadinene synthase from *Gossypium arboreum*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59: 944 - 951.