

新疆北部地区转 Bt 基因棉外源杀虫蛋白表达时空动态研究

王冬梅,李海强,丁瑞丰,汪飞,李号宾,徐遥,阿克旦·吾外士,刘建*

(新疆农业科学院植物保护研究所/农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室,乌鲁木齐 830091)

摘要: 为研究新疆北部地区转 Bt 基因棉外源杀虫蛋白时空表达规律,2009 年和 2010 年以中棉所 43、GK62、GK19 和 sGK321 等 4 个转 Bt 基因抗虫棉为试验材料,利用 ELISA 技术对其不同器官的 Bt 杀虫蛋白进行测定。结果表明:年度间不同转基因抗虫棉品种 Bt 杀虫蛋白时空变化趋势基本一致,只是 2 年的 Bt 杀虫蛋白表达量不同,有些品种年度间差异明显;Bt 杀虫蛋白含量因棉花器官的不同和棉花生育期的变化差异较大。各品种中 Bt 杀虫蛋白含量随棉花生育期的推进呈逐渐下降的趋势,以子叶期的子叶中的含量最高,子叶期、3 叶期和 7 叶期的顶叶中的 Bt 杀虫蛋白含量明显高于现蕾期、开花期、结铃期和吐絮期的顶叶、蕾、花瓣和幼铃;棉蕾在现蕾期的 Bt 杀虫蛋白含量高于开花期和结铃期;花瓣在开花期的 Bt 杀虫蛋白含量高于结铃期。在现蕾期,顶叶中的 Bt 杀虫蛋白高于棉蕾;在开花期,棉蕾中的 Bt 杀虫蛋白含量高于顶叶,后者又高于花瓣;在结铃期,嫩叶与棉蕾中的 Bt 杀虫蛋白含量高于花瓣与幼铃。研究结果说明转 Bt 基因棉花 Bt 杀虫蛋白的表达水平受棉花器官种类、棉花生育期、棉花品种和种植年份的影响。

关键词: 新疆;转 Bt 基因棉花;Bt 杀虫蛋白;时空动态;ELISA

中图分类号: S562.035.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2012)01-0018-09

Spatio-temporal Expression of Foreign Bt Insecticidal Protein in Transgenic Bt Cotton Varieties in Northern Xinjiang Province, China

WANG Dong-mei, LI Hai-qiang, DING Rui-feng, WANG Fei, LI Hao-bin, XU Yao, AHTAM Uwayis, LIU Jian*

(The Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crop in Northwestern Oasis, Ministry of Agriculture P. R. China, Urumqi 830091, China)

Abstract: To study the spatial and temporal expression of Bt insecticidal protein in transgenic Bt cotton planted in northern Xinjiang Province, Bt insecticidal protein levels in four transgenic Bt cotton varieties (CCRI 43, GK62, GK19, sGK321), were quantitatively tested and compared during different developmental periods in 2009 and 2010, using the ELISA method. Trends in the spatio-temporal expression of Bt insecticidal protein were basically consistent between 2009 and 2010, although the expression amount was different, and some varieties had significant differentiation. Bt insecticidal protein levels varied with organs and developmental periods. The Bt insecticidal protein content gradually decreased with cotton development. The Bt insecticidal protein content of the cotyledon was the highest, and levels in the tender leaves during the cotyledon period, the three-leaf period, and the seven-leaf period were higher than those in the tender leaves, squares, petals and young bolls during the squaring period, flowering period, bolling period, respectively. Bt insecticidal protein levels in squares during the squaring period were higher than those in the flowering period and bolling period, and the levels in petals during the flowering period were higher than those during the bolling period. In the squaring period, the tender leaves had more Bt insecticidal protein than the squares; but in the flowering period, the squares had more Bt insecticidal protein than the tender leaves or the petals. In the bolling period, Bt insecticidal protein levels in tender leaves and squares were higher than those in petals and young bolls. The expression level of Bt in-

收稿日期:2011-05-25

作者简介:王冬梅(1969-),女,硕士,副研究员,wdm872@sina.com;* 通讯作者,xjliujian1965@sina.com

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08011-002,2011ZX08012-004,2008ZX08011-002-03,2008ZX08012-004)

secticidal protein in transgenic Bt cotton can thus be influenced by the kind of organ, the developmental period, variety, and planting season.

Key words: Xinjiang Province; Bt cotton; Bt insecticidal protein; spatio-temporal expression; ELISA

20 世纪 70 年代 Bt δ -内毒素由比利时 Montagu 实验室首次转入烟草,揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕。1987 年 Vaeck 在世界上首次报道将 Bt 杀虫蛋白基因转入棉花^[1],我国于 1992 年首次在国内获得转 Bt 基因抗虫棉;之后,科学家们又将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)和 Bt 基因重组,成功地培育出转双价基因系列棉花,使我国的转基因棉花研究及推广应用开始进入快速发展阶段。国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA)2010 年发布的报告显示,2009 年全球转基因抗虫棉花总面积 1617 万 hm^2 ,占全球棉花播种面积的 49%。2009 年我国转 Bt 基因棉花面积达到 367.2 万 hm^2 ,占我国棉花种植面积的 68%。转基因抗虫棉的推广应用成为防治棉花害虫的关键措施之一,对有效控制棉铃虫和红铃虫的危害发挥了重要作用,对减少化学农药使用、保护利用棉田自然天敌起到了积极的作用^[2]。

对 Bt 杀虫蛋白表达量的研究,是转 Bt 基因作物研究领域一个重要的组成部分。许多学者应用免疫学和生物学的方法,对转 Bt 基因抗虫棉植株不同时期和不同部位各器官中 Bt 杀虫蛋白的含量进行测定,发现 Bt 杀虫蛋白随棉花的生长发育呈现出一定的时空动态^[3-18]。新疆气候、土壤等生态条件差异显著,转基因抗虫棉的种植和研究晚于内地棉区,抗虫棉杀虫蛋白的时空表达研究鲜有报道。本文则借助 ELISA 技术通过 2 年对 4 个转基因抗虫棉不同器官不同生育期 Bt 杀虫蛋白表达进行了系统的研究,以探讨在新疆棉区内不同品种和不同年度间 Bt 杀虫蛋白时空表达是否存在差异。

1 材料与方法

1.1 材料来源

转单价基因(*Cry1Ac*)抗虫棉 GK19、中棉所 43 和转双价基因(*Cry1Ac*+*CpTI*)抗虫棉 sGK321 由中国农业科学院棉花研究所提供,转单价基因(*Cry1Ac*)抗虫棉 GK62 由新疆农业科学院经济作物研究所提供。

1.2 棉花种植与管理方法

于 2009 年和 2010 年将抗虫棉种植于位于乌鲁木齐市的新疆农业科学院安宁渠综合试验场,每品种种植 30 m^2 ,播种日期为每年 4 月 20—25 日,与当地棉花播种期相同。整个棉花生长期不施用化学农药,不打顶,不摘边心。种植密度、水肥、缩节胺化控等管理采用当地常规管理技术。

1.3 取样方法

分别在棉花生长的子叶期、3 叶期、7 叶期、现蕾期、开花期、结铃期、吐絮期等几个生育期进行采样,分别采摘子叶、主茎顶端初展的叶片(顶部第 2 叶)、大小一致的棉蕾(直径约 0.5~0.7 cm)、未授粉的花瓣和幼铃(直径约 1.2 cm),每器官随机采 20 个。将所有样品在低温条件下带回室内于冰箱中保存($-20\text{ }^\circ\text{C}$)。

1.4 Bt 杀虫蛋白含量 ELISA 检测

选用美国 EnviroLogix 公司 Cry1Ab/Cry1Ac 的 ELISA 定量检测试剂盒(AP003,检测极限为 $0.1\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)进行 Bt 杀虫蛋白含量检测。将每次所取的各种器官样品随机分成 3 份,作为 3 个重复,分别检测。所有样品的吸光值均由酶标仪(MK3)读取,波长为 450 nm。每次检测均用 Cry1A 蛋白标样制作 Bt 杀虫蛋白浓度和吸光值关系的标准曲线,根据标准曲线求出样品中的 Bt 杀虫蛋白含量,换算成鲜质量每克杀虫蛋白含量,用 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。用方差分析和 Duncan 多重比较进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 转基因抗虫棉品种不同年度间 Bt 杀虫蛋白含量比较

从表 1 可以看出,2 年中同一生育期同种器官,Bt 杀虫蛋白的含量在品种间一般都有显著差异。例如,子叶期子叶中的 Bt 杀虫蛋白含量,在 2009 年 GK62 和 sGK321 明显高于中棉所 43 和 GK19,在 2010 年 sGK321 明显高于其它 3 个品种;蕾期顶叶中的 Bt 杀虫蛋白含量,在 2009 年

中棉所 43 明显高于 GK62, 在 2010 年 sGK321 明显高于其它 3 个品种, 中棉所 43 明显高于 GK19。

从表 1 还可以看出, 同一生育期同种器官中的 Bt 杀虫蛋白含量在年度之间也不相同, 许多情况下达到差异显著水平。例如, 2010 年中棉所

43、GK19 和 sGK321 在子叶期子叶中的 Bt 杀虫蛋白含量均明显高于 2009 年; 4 个品种在 3 叶期顶叶中的 Bt 杀虫蛋白含量均表现为 2010 年明显高于 2009 年; sGK321 在蕾期棉蕾中的 Bt 杀虫蛋白含量也表现为 2010 年明显高于 2009 年。

表 1 转基因抗虫棉花各生育期不同组织器官中 Bt 杀虫蛋白含量测定

Table 1 Bt insecticidal protein content in different transgenic cotton varieties $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$

生育期 Developmental stage	器官 Organ	年份 Year	转基因抗虫棉花品种 Transgenic cotton varieties				
			中棉所 43 CCRI43	GK62	GK19	sGK321	
子叶期 Cotyledon period	子叶 Cotyledon	2009	1067.25±111.319Bb	2259.25±236.161Aa	1010.69±381.864Bb	2532.83±22.588Ba	
		2010	1770.18±139.072Ac	2279.72±87.463Abc	3319.334±17.709Ab	4696.36±670.611Aa	
3 叶期 Three-leaf period	顶叶 Tender leaf	2009	898.17±129.731Bb	506.87±52.804Bc	325.03±75.345Bc	1506.69±42.921Ba	
		2010	1888.52±48.988Ab	2111.50±43.331Ab	1686.07±331.500Ab	3506.13±142.140Aa	
7 叶期 Seven-leaf period	顶叶 Tender leaf	2009	1079.69±102.823Aa	898.17±79.108Aa	746.75±105.496Aa	984.22±367.833Aa	
		2010	338.39±5.445Bb	1293.89±84.079Aab	484.11±3444.247Ab	2283.63±463.734Aa	
现蕾期 Squaring period	顶叶 Tender leaf	2009	407.59±56.286Ba	124.02±24.815Ab	213.69±97.726Aab	329.19±97.726Bab	
		2010	1016.14±17.136Ab	601.47±219.665Abc	340.67±35.722Ac	1813.21±108.571Aa	
	棉蕾 Square	2009	315.27±9.378Aab	115.81±30.874Ab	678.54±208.628Aa	181.44±101.047Bb	
		2010	551.89±104.315Aa	333.89±126.054Aab	473.51±156.729Aa	633.19±61.217Aa	
开花期 Flowering period	顶叶 Tender leaf	2009	225.87±55.016Aa	146.05±37.805Ab	105.71±1.739Ab	89.01±8.189Bb	
		2010	123.04±7.821Ba	191.12±43.119Aa	119.07±11.839Aa	189.88±37.523Aa	
	棉蕾 Square	2009	264.31±38.642Aa	446.48±75.960Aa	302.10±116.620Aa	292.55±41.721Aa	
		2010	179.56±174.395Aa	238.39±58.932Ab	394.73±48.287Ac	193.15±29.864Aa	
	花瓣 Petal	2009	57.73±3.241Aa	39.98±9.933Ba	58.85±8.753Ba	57.93±13.987Ba	
		2010	40.69±5.112Ba	52.72±3.226Aa	121.63±9.735Aa	123.65±59.241Aa	
结铃期 Bolling period	顶叶 Tender leaf	2009	275.33±121.698Aa	182.84±36.890Aa	262.69±183.749Aa	344.08±21.164Aa	
		2010	105.65±3.677Aa	97.20±3.258Ab	94.22±1.242Ab	108.14±1.629Ba	
	棉蕾 Square	2009	233.95±54.186Aa	138.01±38.705Aa	101.83±56.642Aa	79.53±41.686Aa	
		2010	162.01±66.489Aa	200.76±47.788Aa	136.23±5.822Ab	111.48±5.527Aab	
	花瓣 Petal	2009	45.85±3.124Aa	46.54±5.212Aa	41.64±3.428Aa	36.47±11.849Ba	
		2010	35.24±4.072Ab	18.62±10.945Ac	21.94±3.823Bc	101.48±14.293Aa	
棉铃 Boll	2009	79.01±6.818Aa	62.19±4.064Ab	42.06±4.519Ac	50.43±2.714Ac		
	2010	5.98±2.191Ba	11.72±1.792Ba	7.12±3.766Ba	24.23±11.695Aa		
吐絮期 Boll-opening period	顶叶 Tender leaf	2009	228.34±77.240Aa	210.76±125.470Aa	346.55±86.841Aa	361.61±181.875Aa	
		2010	274.84±66.375Aa	210.99±91.246Aa	116.58±18.907Aa	262.67±119.576Aa	

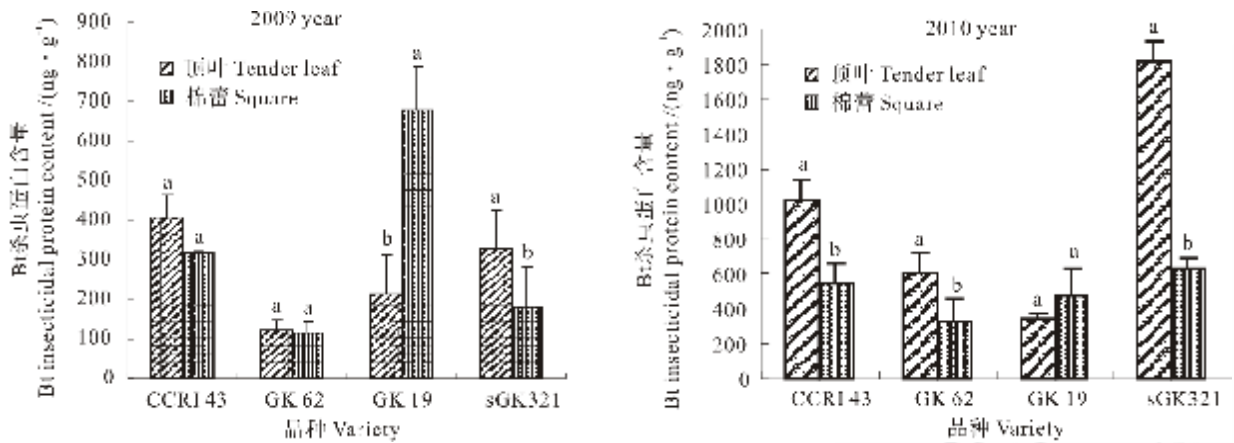
注: 数据为平均值±标准误; 数据后的字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 其中大写字母为某品种某一生育期同一种器官年度间的差异, 小写字母为某一生育期同一种器官品种间的差异。

Notes: The data are mean±SE. The data in the same line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$), capital letter means the yearly difference among same variety, period and organ, lowercase letter means the difference of variety between same period and organ.

2.2 同一生育期不同器官 Bt 杀虫蛋白变化比较

2.2.1 现蕾期顶叶和棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量比较。在现蕾期, 2 年中中棉所 43、GK62 和 sGK321

均表现为顶叶高于棉蕾, 2010 年 3 个品种顶叶与棉蕾间的差异都达到显著水平; 但 GK19 则与此相反, 表现为顶叶低于棉蕾(图 1)。



注:小写字母表示同一品种不同器官在 0.05 水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different organs with the same variety at 0.05 level.

图 1 不同品种现蕾期顶叶和棉蕾 Bt 杀虫蛋白含量比较

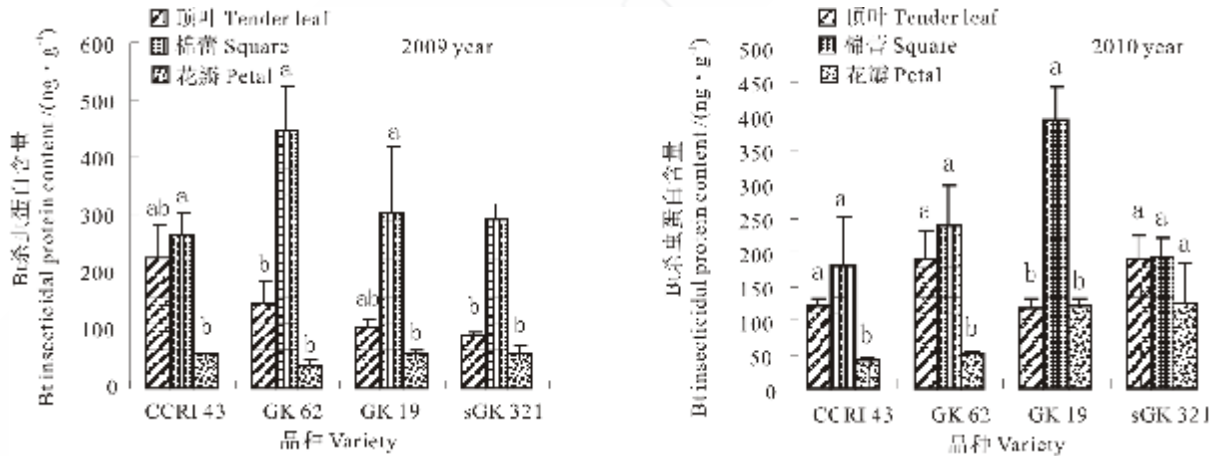
Fig. 1 The comparison of Bt insecticidal protein content in tender leaf and square of different varieties in the squaring period

2009 年、2010 年中棉所 43、GK62 和 sGK321 这 3 个品种顶叶中 Bt 杀虫蛋白含量的平均值分别为 215.20 ng · g⁻¹、857.71 ng · g⁻¹。与顶叶相比,这 3 个品种棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别降低了 28.8%和 55.7%。

2009 年、2010 年 GK19 的顶叶 Bt 杀虫蛋白含量分别为 213.69 ng · g⁻¹、340.67 ng · g⁻¹。和顶叶

相比,棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量分别增加了 217.5%和 39.0%。

2.2.2 开花期顶叶、棉蕾和花瓣中 Bt 杀虫蛋白含量比较。2 年中开花期顶叶、棉蕾和花瓣的 Bt 杀虫蛋白变化趋势基本一致,4 个品种基本都表现为棉蕾中含量最高,其次为顶叶,而花瓣中含量最低(图 2)。



注:小写字母表示同一品种不同器官在 0.05 水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different organs with the same variety at 0.05 level.

图 2 不同品种在开花期顶叶、棉蕾和花瓣 Bt 杀虫蛋白含量比较

Fig. 2 The comparison of Bt insecticidal protein content in tender leaf, square and petal of different varieties in the flowering period

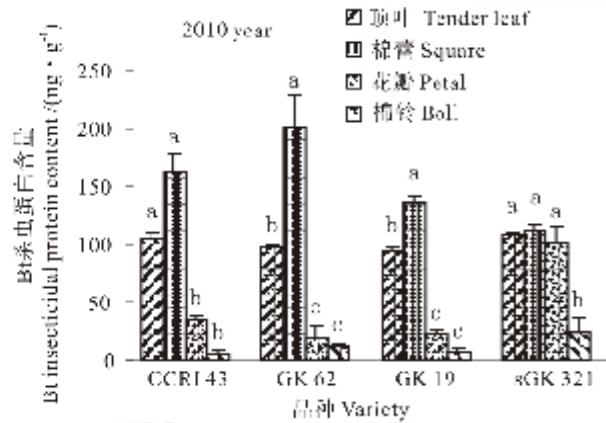
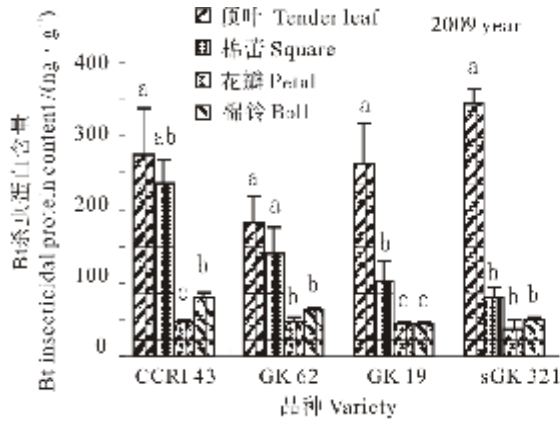
2009 年、2010 年 4 个品种顶叶的 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 141.66 ng · g⁻¹、155.77 ng · g⁻¹。与顶叶相比,棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别增加了 130.4%和 61.4%,花瓣中 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别减少了 62.2%和 45.6%。

2.2.3 结铃期顶叶、棉蕾、花瓣和幼铃中 Bt 杀虫蛋白含量比较。2 年中结铃期各器官中的 Bt 杀虫蛋白含量基本表现为顶叶和棉蕾高于花瓣和幼铃。顶叶和棉蕾中的 Bt 杀虫蛋白含量在 2 年中表现相反,2009 年为顶叶高于棉蕾,2010 年则为

棉蕾高于顶叶(图3)。

2009年4个品种顶叶的Bt杀虫蛋白含量平均值为266.23 ng·g⁻¹; 和其相比,4个品种棉蕾的平均值降低了48.0%,花瓣平均值降低了83.9%,

棉铃平均值降低了78.1%。2010年4个品种顶叶的Bt杀虫蛋白含量平均值为101.3 ng·g⁻¹; 和其相比,4个品种棉蕾的平均值增加了50.7%,花瓣平均值降低了56.3%,棉铃平均值降低了87.9%。



注:小写字母表示同一品种不同器官在0.05水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different organs with the same variety at 0.05 level.

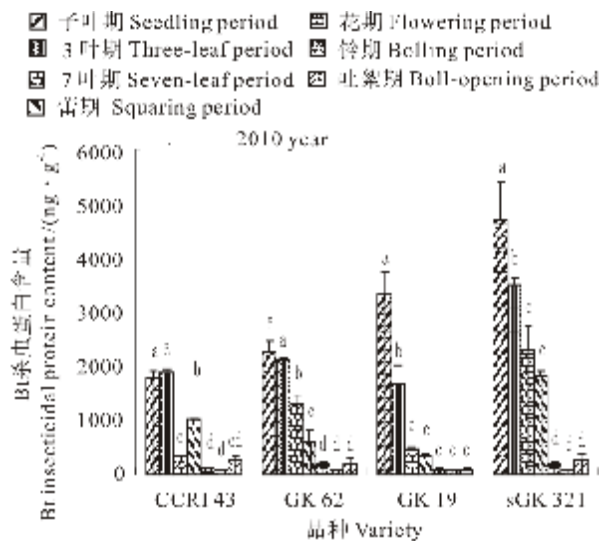
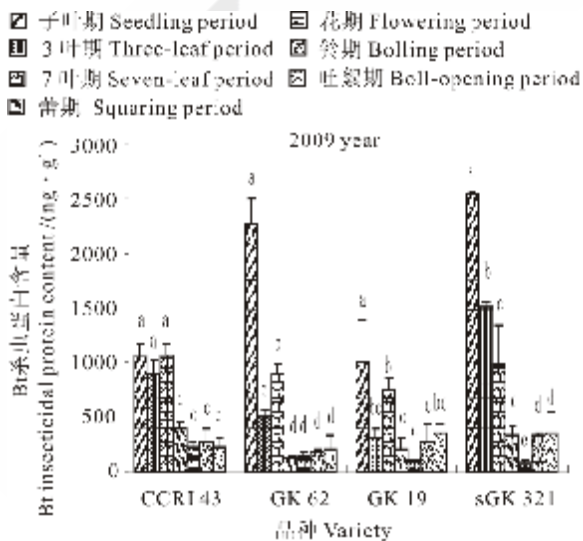
图3 不同品种在结铃期顶叶、棉蕾、花瓣和幼铃中Bt杀虫蛋白含量比较

Fig. 3 The comparison of Bt insecticidal protein content in tender leaf, square, petal and boll of different varieties in the bolling period

2.3 不同生育期同种器官Bt杀虫蛋白变化比较

2.3.1 各生育期的顶部叶片中Bt杀虫蛋白含量比较。2年中4个品种顶叶中的Bt杀虫蛋白含量大体上均以子叶期的最高,之后随着生育期的推进逐渐降低,营养生长阶段的Bt杀虫蛋白表达高于生殖生长阶段。但同一年度品种之间的表现并不完全相同,例如,2009年,sGK321、GK19和GK62从3叶期开始即表现为快速下降的趋

势,而中棉所43从现蕾期才开始快速下降。同一品种在年度间的表现也不完全相同。例如,中棉所43,2009年从现蕾期快速下降,而在2010年则从7叶期就开始下降;GK62在2009年从3叶期快速下降,7叶期又略有明显回升,在2010年,子叶期和3叶期含量相近,到7叶期才明显下降(图4)。



注:小写字母表示同一品种不同时期在0.05水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different developmental stages with the same variety at 0.05 level.

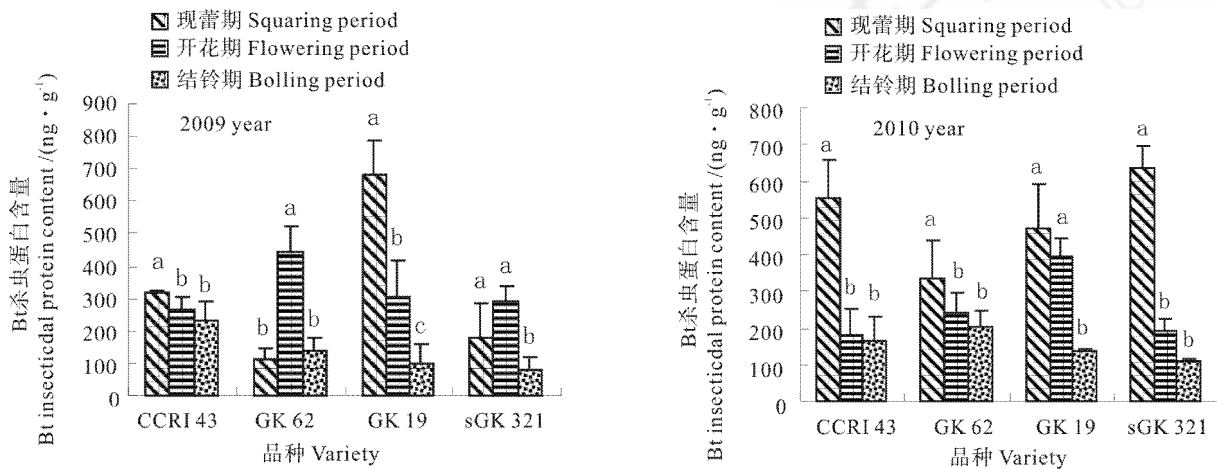
图4 不同生育期的顶叶中Bt杀虫蛋白含量比较

Fig. 4 The comparison of Bt insecticidal protein content in tender leaf in different developmental stages

2009 年 4 个品种子叶期的子叶 Bt 杀虫蛋白含量平均为 $1717.51 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 从 3 叶期到吐絮期的顶叶 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 $809.19 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $927.20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $268.62 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $141.66 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $266.23 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $286.81 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 分别比子叶下降 52.9%、46.0%、84.4%、91.8%、84.5% 和 83.3%。2010 年 4 个品种子叶期的子叶 Bt 杀虫蛋白含量平均为 $3016.39 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 从 3 叶期到吐絮期的顶叶 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 $2298.05 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $1100.01 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $942.88 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $155.77 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $101.30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $216.27 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 分别比子叶下降 23.8%、

63.5%、68.7%、94.8%、96.6% 和 92.8%。

2.3.2 各生育期的棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量比较。 2 年中中棉所 43 和 GK19 棉蕾中的 Bt 杀虫蛋白含量变化趋势一致, 基本上都是现蕾期最高, 开花期次之, 结铃期最低; 而 GK62 棉蕾 Bt 杀虫蛋白含量在 2 年中的趋势相反, 在 2009 表现为开花期 > 结铃期 > 现蕾期, 在 2010 年表现为现蕾期 > 开花期 > 结铃期; sGK321 在 2009 年表现为开花期 > 现蕾期 > 结铃期, 2010 年表现为现蕾期 > 开花期 > 结铃期(图 5)。



注:小写字母表示同一品种不同时期在 0.05 水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different developmental stages with the same variety at 0.05 level.

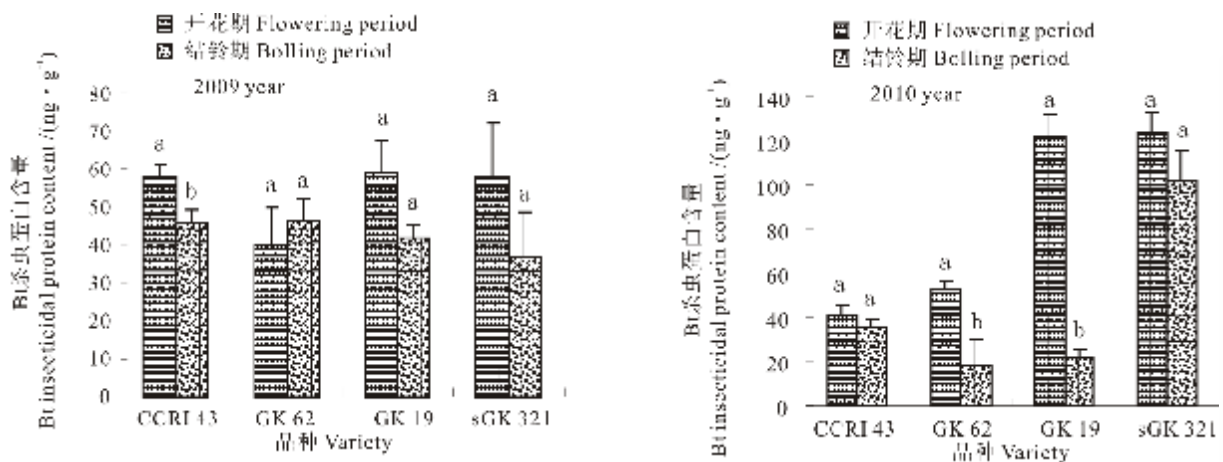
图 5 不同生育期的棉蕾中 Bt 杀虫蛋白含量比较

Fig. 5 The comparison of Bt insecticidal protein content in squares in different developmental stages

2009 年中棉所 43 和 GK19 棉蕾在现蕾期、开花期、结铃期的 Bt 杀虫蛋白含量的平均值分别为 $369.87 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $337.63 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $157.93 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和现蕾期相比, 开花期和结铃期的棉蕾分别低 8.72% 和 57.30%; GK62 棉蕾在 3 个时期的 Bt 杀虫蛋白含量分别为 $115.81 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $446.48 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $138.01 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和现蕾期相比, 开花期和结铃期的棉蕾分别高 285.8% 和 19.2%; sGK321 棉蕾在 3 个时期的 Bt 杀虫蛋白含量分别为 $181.44 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $292.55 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $79.53 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和现蕾期相比, 开花期的棉蕾增加了 61.23%, 结铃期的棉蕾减少了 56.17%。2010 年 4 个品种的棉蕾在 3 个时期的 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 $498.12 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $251.46 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $152.62 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和现蕾期相比, 开花期和结铃期的棉蕾分别低 49.5% 和 69.4%。

2.3.3 各生育期的花瓣中 Bt 杀虫蛋白含量比较。 从图 6 可以看出, 在 2009 年和 2010 年, 4 个品种花瓣中 Bt 杀虫蛋白含量基本都是开花期高于结铃期, 但同一品种在年度间的表现又不尽相同。例如, 中棉所 43, 2009 年开花期明显高于结铃期, 2010 年却为开花期略高于结铃期, 差异不显著; GK62, 2009 年开花期与结铃期差异不显著, 前者略低, 而 2010 年开花期明显高于结铃期(图 6)。

2009 年 3 个品种的花瓣在开花期和结铃期的 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 $58.17 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $41.32 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和开花期相比, 结铃期低 28.9%; GK62 的花瓣在 2 个时期的 Bt 杀虫蛋白含量分别为 $39.98 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $46.54 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和开花期相比, 结铃期高 16.4%。2010 年 4 个品种的花瓣在 2 个



注:小写字母表示同一品种不同时期在 0.05 水平上的差异。

Note: lowercase letter means the difference among different developmental stage with the same variety at 0.05 level.

图 6 不同生育期的花瓣中 Bt 杀虫蛋白含量比较

Fig. 6 The comparison of Bt insecticidal protein content in petal in different developmental stages

时期的 Bt 杀虫蛋白含量平均值分别为 $84.67 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $44.32 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 和开花期相比, 结铃期低 47.7%。

3 讨论

通过本文在新疆 2 年的研究结果表明, 转基因抗虫棉花各器官中 Bt 杀虫蛋白含量总体趋势是随棉花生育期的推进逐渐下降, 棉花顶叶等营养器官的 Bt 杀虫蛋白高于棉蕾、花和棉铃等生殖器官, 并且棉花生长前期的营养阶段各器官的 Bt 杀虫蛋白高于后期的生殖生长阶段, 与束春娥等^[9]、赵建周等^[5]、赵奎军等^[6]、芮昌辉等^[7]、王保民等^[8]、张俊等^[9]、孙伟等^[10]和邢朝柱等^[11]研究结果基本一致, 和陈松等^[4]部分结论一致, 与张桂芬等^[14]研究结论相反。其中, GK19 在蕾期以及 4 个品种在花期的不同器官的 Bt 杀虫蛋白含量从高到低依次为幼铃、蕾、嫩叶和花, 与董双林等^[12]观点相符; 2010 年在铃期测定 4 个品种的 Bt 杀虫蛋白含量依次为幼蕾、顶叶、花和幼铃, 与李汝忠等^[13]的观点吻合。并且, 不同转基因抗虫棉品种年度间 Bt 杀虫蛋白时空变化趋势基本一致, 只是 2 年的 Bt 杀虫蛋白表达量不同, 有些品种有明显的差异。

上述结果的出现可能与每年的气候条件、棉花的生长发育状况和品种特性有关。国内外许多文献报道, 影响转基因抗虫棉中杀虫蛋白表达的因素很多, 可能与转基因抗虫棉 mRNA 的表达、

棉花的生长发育状况、棉田环境因素等有关^[11,19-24]; 王家宝等^[25]研究表明, 花铃期田间干旱或渍涝, 均可显著降低转基因抗虫棉不同器官 Bt 杀虫蛋白含量; 高温处理后可使 Bt 杀虫基因在生长发育期中的沉默时间提前导致 Bt 杀虫蛋白含量急剧降低^[26]; 李云河等^[27]研究结果表明 Bt 杀虫蛋白在不同温度、湿度及光照条件下降解趋势差异明显; 极度干旱、盐碱地和极端环境条件也会影响 Bt 杀虫蛋白表达^[28]; 此外, 品种本身抗虫水平和环境生态条件的综合作用同样可以影响 Bt 杀虫蛋白的表达量, 进而引起时空动态上的差异^[29-30]。

在新疆北部棉区棉铃虫一年发生 3 代, 一代幼虫主要在 6 月中下旬, 二代幼虫主要在 7 月中下旬, 三代幼虫在 8 月中旬, 其中二代棉铃虫幼虫危害最重, 三代棉铃虫幼虫主要蛀铃, 对秋桃的产量形成影响较大。然而, 只有应用 Bt 杀虫蛋白高表达的转基因抗虫棉, 才能起到有效的杀虫效果。但国内外许多研究及本文的结论均表明, 转基因抗虫棉在棉花整个生育期 Bt 杀虫蛋白并不是一直处于高表达水平。当转基因抗虫棉花受到三代棉铃虫幼虫危害时, Bt 杀虫蛋白含量却在逐渐下降, 这使转基因抗虫棉的有效利用面临着极大挑战。

因此, 只有通过加强棉田综合管理, 协调气候、土壤性质、温湿度等因素, 才能使转基因抗虫棉在新疆田间高效、稳定表达 Bt 杀虫蛋白, 同时

对三代棉铃虫辅以药剂防治来有效防治棉铃虫,使转基因抗虫棉得以持续利用。

参考文献:

- [1] VAECK M, Reynaerts A, Höfte H, et al. Transgenic plants protected from insect attack[J]. Nature, 1987, 328(6125): 33-37.
- [2] WU Kong-ming, Mu Wei, Liang Ge-mei, et al. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China[J]. Pest Management Science, 2005, 61(5): 491-498.
- [3] 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(3): 131-135.
- 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]. Acta Gossypic Sinica, 1998, 10(3): 131-135.
- [4] 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]. Acta Gossypic Sinica, 2000, 12(4): 189-193.
- [5] 赵建周, 赵奎军, 卢美光, 等. 华北地区棉铃虫与转 Bt 杀虫蛋白基因棉花间的互作研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(5): 1-6.
- ZHAO Jian-zhou, Zhao Kui-jun, Lu Mei-guang, et al. Interactions between *Helicoverpa armigera* and transgenic Bt cotton in north China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(5): 1-6.
- [6] 赵奎军, 赵建周, 范贤林. 我国转 Bt 抗虫基因棉杀虫活性的时间与空间动态分析[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(1): 49-52.
- ZHAO Kui-jun, Zhao Jian-zhou, Fan Xian-lin. Temporal and spatial dynamics of transgenic Bt cotton toxins to cotton bollworm in north China[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2000, 8(1): 49-52.
- [7] 芮昌辉, 范贤林, 董丰收, 等. 不同转基因抗虫棉对棉铃虫抗虫性的时空动态[J]. 昆虫学报, 2002, 45(5): 567-570.
- RUI Chang-hui, Fan Xian-lin, Dong Feng-shou, et al. Temporal and spatial dynamics of the resistance of transgenic cotton cultivars to *Helicoverpa armigera* (Hübner)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2002, 45(5): 567-570.
- [8] 王保民, 李召虎, 李斌, 等. 转 Bt 抗虫棉各器官毒蛋白的含量及表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 215-219.
- WANG Bao-min, Li Zhao-hu, Li Bin, et al. Content and expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in transgenic cotton[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2002, 3: 215-219.
- [9] 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.
- [10] 孙伟, 曹玉洪. 转 Bt 基因抗虫棉 Bt 毒蛋白表达量的时空变化[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 202-203.
- SUN Wei, Cao Yu-hong. Study on the temporal and spatial expression of Bt toxin protein of Bt transgenic cotton[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2005, 33(2): 202-203.
- [11] 邢朝柱, 靖深蓉, 崔学芬, 等. 转 Bt 基因棉杀虫蛋白含量时空分布及对棉铃虫产生抗性的影响[J]. 棉花学报, 2001, 13(1): 11-15.
- XING Chao-zhu, Jing Shen-rong, Cui Xue-fen, et al. The Spatial-temporal distribution of Bt(*Bacillus thuringiensis*)insecticidal protein and the effect of transgenic Bt cotton on bollworm resistance[J]. Cotton Science, 2001, 13(1): 11-15.
- [12] 董双林, 文绍贵, 王月恒. 转 Bt 基因棉对棉铃虫存活、生长及为害的影响[J]. 棉花学报, 1997, 239(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]. Acta Gossypii Sinica, 1997, 9(4): 176-182.
- [13] 李汝忠, 沈法富, 王宗文, 等. 转 Bt 基因抗虫棉 Bt 基因表达的时空动态[J]. 山东农业科学, 2002(2): 7-9.
- LI Ru-zhong, Shen Fa-fu, Wang Zong-wen et al. Temporal and spatial dynamics of Bt gene expression in Bt transgenic cotton[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2002(2): 7-9.
- [14] 张桂芬, 万方浩, 郭建英, 等. Bt 毒蛋白在转 Bt 基因棉中的表达及其在害虫一天敌间的转移[J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 334-341.
- ZHANG Gui-fen, Wan Fang-hao, Guo Jian-ying, et al. Expression of Bt toxin in transgenic Bt cotton and its transmission through pests *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii* to natural enemy *Propylaea japonica* in cotton plots[J]. Acta Entomologica Sinica, 2004, 47(3): 334-341.
- [15] 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 spatial-temporal expression of the content of Bt insecticidal protein and the resistance of Bt transgenic cotton to cotton bollworm[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2001, 28(1): 1-6.
- [16] 崔金杰, 夏敬源, 马丽华, 等. 转双价基因抗虫棉对棉铃虫的抗虫性及时空动态[J]. 棉花学报, 2002, 14(6): 323-329.
- CUI Jin-jie, Xia Jing-yuan, Ma Li-hua, et al. Studies on the efficacy dynamic of the transgenic CryIAc plus CpTI cotton (ZGK9712) to cotton bollworm[J]. Cotton Science, 2002, 14(6):

- 323-329.
- [17] OLSEN K M, Daly J C. Plant toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2000, 93(4): 1293-1299.
- [18] 张香荣, 贝丽霞, 罗晓丽, 等. 抗虫棉晋棉 38 的抗虫基因在不同生育期各器官中的表达[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(2): 34-38.
ZHANG Xiang-rong, Bei Li-xia, Luo Xiao-li, et al. Expression of *Cry1Ac* gene in various organs of transgenic cotton cv. Jinmian 38 during growth period [J]. *Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*, 2006, 18(2): 34-38.
- [19] ADAMCZYK J J J, Adams L C, Hardee D D. Field efficacy and season expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2001a, 94(6): 1589-15932.
- [20] ADAMCZYK J J J, Hardee D D, Adams L C, et al. Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of *Cry1A (c)* delta-endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2001b, 94 (1): 284-290.
- [21] ADAMCZYK J J J, Sumerford D V. Potential factors impacting season expression of *Cry1Ac* in 13 commercial varieties of Bollgard cotton[J]. *Journal of Insect Science*, 2001c, 13(1): 1-6.
- [22] GREENPLATE J T. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein *Cry1Ac* over time in Bollgard cotton fruit and terminals [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1999, 92 (6): 1377-1383.
- [23] GORE J, Leonard B R, Adamczyk J J. Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) survival on "Bollgard" and "Bollgard II" cotton flower bud and flower components[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2001, 94 (6): 1445-1451.
- [24] 孟凤霞, 沈晋良, 褚姝频. Bt 棉叶对棉铃虫抗虫性的时空变化及气象因素的影响[J]. 昆虫学报, 2003, 46(3): 299-304.
MENG Feng-xia, Shen Jin-liang, Chu Shu-pin. Temporal-spatial variation in efficacy of Bt cotton leaves against *Helicoverpa armigera* (Hübner) and effect of weather conditions[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2003, 46(3): 299-304.
- [25] 王家宝, 王留明, 沈法富, 等. 环境因素对转 Bt 基因棉 Bt 杀虫蛋白表达量的影响[J]. 山东农业科学, 2000(6): 4-6.
WANG Jia-bao, Wang Liu-ming, Shen Fa-fu, et al. Effect of environment elements on Bt-protein content in transgenic Bt cotton[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2000(6): 4-6.
- [26] 夏兰芹, 郭三堆. 高温对转基因抗虫棉中 Bt 杀虫基因表达的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1733-1737.
XIA Lan-qin, Guo San-dui. The expression of Bt toxin gene under different thermal treatments[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(1): 1733-1737.
- [27] 李云河, 张永军, 吴孔明, 等. 转 Bt-*Cry1Ac* 基因棉花叶片中杀虫蛋白在环境中的降解动态[J]. 中国农业科学, 2005, 38(4): 714-718.
LI Yun-he, Zhang Yong-jun, Wu Kong-ming, et al. Degradation dynamics of *Cry1Ac* insecticidal protein in leaves of Bt cotton under different environments [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(4): 714-718.
- [28] ROCHESTER I J. Effect of genotype, edaphic, environmental conditions, and agronomic practices on *Cry1Ac* protein expression in transgenic cotton[J]. *Journal of Cotton Science*, 2006, 10: 252-262.
- [29] SACHS E S, Benedict J H, Stelly D M, et al. Expression and segregation of genes encoding *cry1A* insecticidal proteins in cotton[J]. *Crop Science*, 1998, 38(1): 1-11.
- [30] 张少燕, 谢宝瑜. 转基因棉花成毒蛋白的表达及其生态学效应[J]. 昆虫知识, 2002, 39(5): 328-335.
ZHANG Shao-yan, Xie Bao-yu. Expression of Bt toxic protein in transgenic cotton and its ecological effects[J]. *Entomological Knowledge*, 2002, 39(5): 328-335. ●