

转双基因抗虫烟草对烟夜蛾和小地老虎幼虫的抗性

罗梅浩 杨铁钊 丁永乐 段增强

(河南农业大学, 郑州 450002)

韩军霞

(河南新郑卷烟厂, 新郑)

摘要 以栽培品种 NC89 为对照, 通过室内饲养和组织切片, 系统研究了转双基因 (Bt、CpTI) 抗虫烟草对烟夜蛾和小地老虎幼虫的抗性表现。结果表明, 转双基因抗虫烟草对烟夜蛾幼虫具有稳定的杀虫作用, 取食后 2~3d 死亡, 死亡率达 100%, 不同龄期间表现一致; 对小地老虎幼虫具有一定的杀虫作用, 其抗性随龄期的增加而减弱, 1 龄死亡率为 48%, 2 龄为 28%, 3 龄以后死亡率为 0, 但对各龄幼虫的生长发育均具有明显的抑制作用。组织切片观察表明, 烟夜蛾幼虫取食抗虫烟草后, 引起中肠肠壁细胞端部的微绒毛全部溶解, 大部分肠壁细胞完全崩溃; 而小地老虎幼虫取食抗虫烟草后, 中肠肠壁细胞端部的微绒毛溶解, 但肠壁细胞崩溃不明显, 只引起细胞体缩短, 细胞层变薄。

关键词 转基因烟草, 抗性, 烟夜蛾, 小地老虎

烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 和小地老虎 *Agrotis ypsilon* 是烟田重要害虫。小地老虎幼虫为害移栽至团棵期的烟苗, 造成缺苗断垄。烟夜蛾幼虫取食烟草心芽及顶部嫩叶, 造成叶片孔洞或缺刻, 严重时可将整片叶片食光, 导致烟叶产量和品质下降。

自 1987 年 Vaeck 等首次报道了转 Bt 基因的烟草抗烟草夜蛾昆虫^[1]后, 抗虫基因工程研究为作物抗虫性的提高开辟了一条新的途径。目前, 国际上用于抗虫基因工程育种的主要抗虫基因有两个: 一是来源于苏云金杆菌的 Bt δ -内毒素基因, 一是来源于豇豆等作物的胰蛋白酶抑制剂 CpTI 基因。作者等与中国农科院生物技术研究中心联合, 将 Bt δ -内毒素基因和胰蛋白酶抑制剂基因同时转入烤烟栽培品种 NC89 中, 经过连续多代的分离筛选, 培育出抗虫 931 转双基因纯合系。本试验系统鉴定了该品系对烟夜蛾和小地老虎幼虫的抗性水平, 以证实转双基因抗虫烟草的实用价值和抗性表现。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试烟草材料为转双基因抗虫 931 品系和普通栽培品种 NC89 的嫩叶。烟夜蛾幼虫由采自郟县烟草研究所烟田的新鲜卵粒孵化而来。小地老虎幼虫由黑光灯诱

捕的越冬代成虫所产的卵粒孵化而来。

1.2 试验方法 将采回的新鲜卵粒置于底部铺有湿润滤纸的直径 12cm 培养皿中饲养。试验分别取 1、2、3、4、5 龄行动活泼、生长发育正常的两种幼虫各 50 头,1 皿 1 头,并分为 2 组,每组 25 头,皿内分别放入 NC89 和抗虫 931 品系的嫩叶饲喂。试验过程中记载饲喂始期和终止期幼虫的体长、体宽、体重。饲喂过程中幼虫的活动情况和死亡时间。在饲喂过程中,取不同龄期用抗虫 931 和 NC89 烟叶饲喂的幼虫各 5 头,以汪世泽(1993)^[2]的方法,先用乙醚麻醉,然后马上解剖,取出中肠,用布安氏液固定、脱水、包埋、切片、染色,制成玻片,在光学显微镜下观察抗虫 931 对幼虫中肠组织结构的影响。

2 结果与分析

2.1 抗虫 931 对两种幼虫死亡率的影响

抗虫 931 对两种幼虫死亡率的影响见表 1。由表 1 可知,抗虫 931 对烟夜蛾幼虫具有稳定的杀虫作用,取食后 2~3d 死亡,死亡率达 100%,且不同龄期间表现一致。抗虫 931 对小地老虎幼虫具有一定的杀虫作用,其抗性随龄期的增加而减弱,1 龄幼虫死亡率为 48%,2 龄幼虫死亡率为 28%,3 龄以后死亡率为 0。

表 1 抗虫 931 对烟夜蛾和小地老虎幼虫死亡率的影响

龄期	处理	接虫日期(月·日)		饲养数量(头)		死亡时间(d)		死亡数量(头)		死亡率(%)	
		烟夜蛾	小地老虎	烟夜蛾	小地老虎	烟夜蛾	小地老虎	烟夜蛾	小地老虎	烟夜蛾	小地老虎
1	NC89	6.20	5.15	25	25	—	—	—	—	0	0
	抗 931	6.20	5.15	25	25	2~3	3~7	25	12	100	48
2	NC89	6.20	5.20	25	25	—	—	—	—	0	0
	抗 931	6.20	5.20	25	25	2~3	5~8	25	7	100	28
3	NC89	6.25	5.20	25	25	—	—	—	—	0	0
	抗 931	6.25	5.20	25	25	2~3	—	25	—	100	0
4	NC89	6.28	5.26	25	25	—	—	—	—	0	0
	抗 931	6.28	5.26	25	25	2~3	—	25	—	100	0
5	NC89	6.28	6.1	25	25	—	—	—	—	0	0
	抗 931	6.28	6.1	25	25	2~3	—	25	—	100	0

2.2 抗虫 931 对两种幼虫生长发育的影响

两种类型烟叶饲喂烟夜蛾幼虫的结果见表 2。由表 2 可知,取食抗虫 931 烟叶的各龄幼虫死亡时体长比接虫时缩短 23.3%~42.7%,平均缩短 30.8%;体宽比接虫时减少 3.3%~33.3%,平均减少 19.1%;体重比接虫时减少 32.3%~43.2%,平均减少 37.8%。而对照 NC89 品种烟叶饲喂的烟夜蛾幼虫生长发育正常,体长、体宽、体重均有明显增加。用抗虫 931 烟叶饲喂的烟夜蛾幼虫死亡时,之所以体长缩短,体宽变窄,体重下降,其主要原因是当幼虫取食后并非马上中毒死亡,而是在取食后第 1d 活动加剧,而后活动由强变弱,体色变暗,后 2d 内停止取食,虫体活动继续消耗能量和失去大量水分所致。

抗虫 931 对小地老虎幼虫生长发育的影响见表 3。由表 3 可知,转双基因抗虫 931 对各龄幼虫的生长发育均具有明显的抑制作用,虽然体长、体宽、体重都有不同程度的增加,但增加速度缓慢,增值率均低于取食 NC89 烟叶的幼虫。取食抗虫 931 烟叶的幼虫体长比

表 2 抗虫 931 对烟夜蛾幼虫生长发育的影响

项 目	1 龄		2 龄		3 龄		4 龄		5 龄	
	抗 931	NC89	抗 931	NC89	抗 931	NC89	抗 931	NC89	抗 931	NC89
接虫日期(月·日)	7.24	7.24	7.24	7.24	7.25	7.25	7.27	7.27	8.3	8.3
接虫体长(mm)	3.0	3.2	5.2	5.3	7.5	5.1	11.7	10.6	21.6	19.0
死虫体长(mm)	2.3	5.8	3.5	7.4	4.3	7.5	8.6	15.9	15.4	21.6
体长增值(mm)	-0.7	2.6	-1.7	2.1	-3.2	2.4	-3.1	5.3	-6.2	2.6
增值率(%)	-23.3	81.3	-32.7	39.6	-42.7	47.1	-26.5	50.0	-28.7	13.7
接虫体宽(mm)	0.5	0.5	0.9	0.8	1.2	0.8	1.8	1.8	3.1	3.0
死虫体宽(mm)	0.4	1.0	0.6	1.3	0.8	1.2	1.7	2.3	3.0	4.2
体宽增值(mm)	-0.1	0.5	-0.3	0.5	-0.4	0.4	-0.1	0.5	-0.1	1.2
增值率(%)	-20.0	100.0	-33.3	62.5	-33.3	50.0	-5.6	27.8	-3.3	40.0
接虫体重(mg)							20.6	24.0	122.3	115.2
死虫体重(mg)							11.7	57.2	82.8	226.7
体重增值(mg)							-8.9	33.2	-39.5	111.5
增值率(%)							-43.2	138.3	-32.3	96.8

表 3 抗虫 931 对小地老虎幼虫生长发育的影响

项 目	1 龄		2 龄		3 龄		4 龄	
	抗 931	NC89	抗 931	NC89	抗 931	NC89	抗 931	NC89
接虫日期(月·日)	5.15	5.15	5.20	5.20	5.20	5.20	5.26	5.26
处理日期(月·日)	5.21	5.21	5.26	5.26	5.26	5.26	6.1	6.1
接虫体长(mm)	2.6	2.6	4.7	4.7	8.0	7.7	13.1	13.5
处理体长(mm)	2.7	7.4	7.4	11.7	14.5	18.7	22.4	25.3
体长增值(mm)	0.1	4.8	2.7	7.0	6.5	11.0	9.3	11.8
增值率(%)	3.9	184.6	57.5	148.9	81.3	142.9	71.0	87.4
接虫体宽(mm)	0.4	0.4	0.8	0.8	1.3	1.3	1.8	1.8
处理体宽(mm)	0.6	1.0	1.3	1.8	2.2	2.8	2.8	3.1
体宽增值(mm)	0.2	0.6	0.5	1.0	0.9	1.5	1.0	1.3
增值率(%)	50.0	150.0	62.5	125.0	69.2	115.4	55.6	72.2
接虫体重(mg)							25.2	25.0
处理体重(mg)							138.7	140.4
体重增值(mg)							113.5	115.4
增值率(%)							450.4	461.6

接虫时增加 3.9%~81.3%, 平均增加 53.4%; 而取食 NC89 烟叶的幼虫体长比接虫时增加 87.4%~184.6%, 平均增加 141.0%。体宽、体重也有类似结果。从表 3 还可看出, 随小地老虎幼虫龄期的增大, 抗虫 931 对其的抑制作用在减弱, 因此导致前期增长缓慢, 后期增长则较快。取食抗虫 931 与取食 NC89 烟叶的 1 龄幼虫体长增值率差值为 180.7%, 2 龄为 91.4%, 3 龄为 61.6%, 4 龄为 16.4%。体宽亦有类似趋势。

2.3 抗虫 931 对两种幼虫中肠组织结构的影响

2.3.1 抗虫 931 对烟夜蛾幼虫中肠组织结构的影响(图 1):从图 1 可以看出, 取食普通栽培品种 NC89 烟叶的幼虫中肠肠壁细胞排列紧密, 端部的微绒毛发达; 而取食转双基因

抗虫 931 烟叶的幼虫中肠肠壁细胞端部的微绒毛完全溶解消失,大部分肠壁细胞完全崩溃。

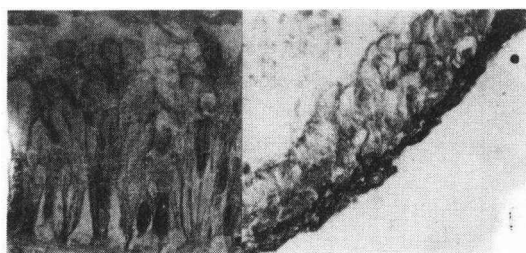


图 1 烟夜蛾 5 龄幼虫中肠组织切片(10×40 倍)

注:左:饲喂 NC89 烟叶的幼虫,右:饲喂抗虫 931 烟叶的幼虫。

2.3.2 抗虫 931 对小地老虎幼虫中肠组织结构的影响(图 2):从图 2 可以看出,NC89 烟叶饲喂的小地老虎幼虫中肠肠壁细胞排列紧密,端部的微绒毛长而密(图 2a);抗虫 931 烟叶饲喂的小地老虎 1 龄幼虫中肠肠壁细胞端部的微绒毛完全溶解,细胞体缩短,细胞层变薄(图 2b);抗虫 931 烟叶饲喂的小地老虎 3 龄幼虫中肠肠壁细胞端部的微绒毛部分溶解,细胞排列显得疏松(图 2d);抗虫 931 烟叶饲喂的小地老虎 2 龄幼虫中肠肠壁细胞的损伤情况介于 1 龄和 3 龄之间(图 2c)。比较不同龄期小地老虎幼虫中肠组织切片可以看出,随龄期的增加,抗虫 931 烟叶对中肠组织结构的损伤能力降低。

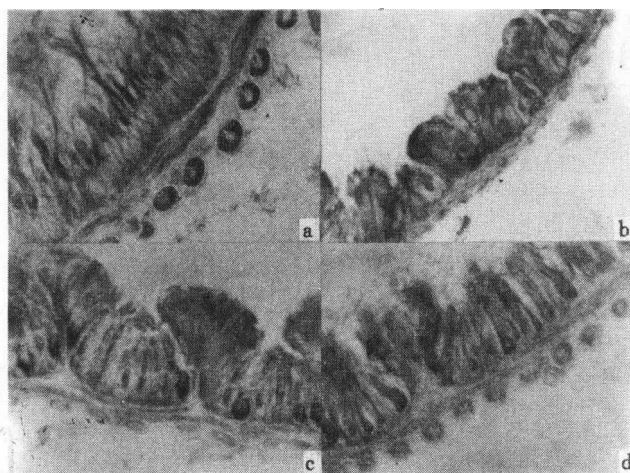


图 2 小地老虎幼虫中肠组织切片(10×40 倍)

注:a 为饲喂 NC89 烟叶的 2 龄幼虫,b、c、d 分别为饲喂抗虫 931 烟叶的 1、2、3 龄幼虫。

2.3.3 抗虫 931 对两种幼虫的毒性:对照烟夜蛾和小地老虎两种幼虫的中肠组织切片还可看出,转双基因抗虫 931 对这两种幼虫的毒性存在着明显差异,取食抗虫烟叶后,烟夜蛾幼虫中肠组织结构的损伤程度大于小地老虎。

3 讨论

3.1 中肠是昆虫食物消化和吸收的主要场所,中肠肠壁细胞行分泌和消化功能,肠壁细胞顶端分化出的微绒毛,扩大了中肠的消化和吸收面积。同时转入 Bt 基因和 CpTI 基因的抗虫 931 烟叶进入中肠后,Bt δ -内毒素晶体蛋白在肠液碱性条件下降解成毒性多肽,破坏了肠壁细胞的结构,胰蛋白酶抑制剂降低了昆虫消化道内胰蛋白酶的活性。赵荣敏(1995)^[3]研究报道,取食转 Bt 基因烟草的烟夜蛾幼虫死亡率为 80%,取食转 CpTI 基因烟草的烟夜蛾幼虫死亡率为 20%。而取食转 Bt 基因和 CpTI 基因烟草的烟夜蛾幼虫全部死亡,这可能是两个基因累加作用的结果。

3.2 烟夜蛾和小地老虎同属鳞翅目夜蛾科昆虫,对转双基因抗虫 931 烟草的反应却不一致。抗虫 931 对烟夜蛾幼虫的抗性是 100%,而对小地老虎幼虫的抗性却不足 100%,体长、体宽、体重等生长发育变化也不一致。为此,作者对这两种幼虫取食抗虫 931 后中肠组织结构的变化进行了比较,发现两个基因的产物对中肠的破坏程度也不同,对小地老虎的破坏程度不如烟夜蛾严重,具体原因有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Vaecck M et al. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 1987, 328:33-37
- 2 汪世泽. 昆虫研究法. 北京:农业出版社,1993
- 3 赵荣敏,等. 获得转双基因烟草. 生物工程学报,1995,11(1):1-5

ON THE RESISTANCE OF Bt AND CpTI DUALY TRANSGENIC TOBACCO TO LARVAE OF ORIENTAL TOBACCO BUDWORM AND BLACK CUTWORM

Luo Meihao Yang Tiezhao Ding Yongle Duan Zengqiang

(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Han Junxia

(Xinzheng Cigarette Factory, Henan Province, Xinzheng)

Abstract Bio-assays and tissue section examinations were conducted for determining the resistance of '931', a Bt and CpTI dually transgenic tobacco line, to oriental tobacco budworm (OTB) *Helicoverpa assulta* Guenée and black cutworm (BC) *Agrotis ypsilon* (Rottemberg). The results showed that after fed on '931' for 2-3 days, the mortalities of OTB in all of the larval instarts were up to 100%, while those of BC in 1st and 2nd instars were 48% and 28% respectively, and no death occurred in the rest larval stages older than 2nd instar, but their villi on midgut epithelium in larval survivals were dissolved, and most of the epithelium cells collapsed; whilst in the midgut of BC larvae after fed on '931', the villi were dissolved, the epithelium cell was shortened and cell wall became thinner, but the collapse of cell was negligible.

Key words Bt and CpTI dually transgenic tobacco, resistance, oriental tobacco budworm, black cutworm