

转 *Cry1A.401* 基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 对亚洲玉米螟的抗性研究

王云鹤^{1,2}, 武奉慈³, 谢树章⁴, 翁建峰²,
宋新元³, 杨小艳⁴, 李新海¹

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 三亚 572024;
3. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 4. 重庆市农业科学院, 重庆 401329)

摘要: 采用农杆菌介导法获得转 *Cry1A.401* 基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303, 通过多代回交与自交获得 BC₄F₁、BC₄F₂ 和 BC₄F₃ 世代的转基因玉米材料。利用 qRT-PCR 和 ELISA 方法明确转基因抗虫玉米叶片、花丝和子粒均有 *Cry1A.401* 基因表达, 不同世代间目的基因表达量无显著差异。田间接虫鉴定结果表明, CM8302 和 CM8303 三个世代心叶期和吐丝期的抗性等级均为 1 级, 抗性水平为高抗。室内生测结果表明, 亚洲玉米螟幼虫取食 CM8302 心叶、花丝和子粒第 6 天存活率分别为 0、4.0% 和 4.0%; 取食 CM8303 心叶、花丝和子粒第 6 天存活率分别为 0、4.0% 和 2.0%。分析显示转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的心叶、花丝和子粒均具有显著杀虫效果且遗传稳定。

关键词: 转基因玉米; 亚洲玉米螟; 抗性; 遗传稳定性

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Evaluation of Resistance of Transgenic *Cry1A.401* Maize CM8302 and CM8303 to the *Ostrinia furnacalis*

WANG Yun-he^{1,2}, WU Feng-ci³, XIE Shu-zhang⁴, WENG Jian-feng²,
SONG Xin-yuan³, YANG Xiao-yan⁴, LI Xin-hai¹

(1. Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;
2. National Nanfan Research Institute(Sanya), Sanya 572024;
3. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;
4. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China)

Abstract: Through the utilization of agrobacterium mediated method and new insect-resistant gene *Cry1A.401*, transgenic insect resistant maize CM8302 and CM8303 were developed. Three generations of transgenic materials, BC₄F₁, BC₄F₂ and BC₄F₃ were obtained through backcross screening. The methods of qRT-PCR and ELISA were used to determine that *Cry1A.401* gene was expressed in the heartleaves, silks, and grains, and no significant difference in the expression amount of the target gene among three generations. Field test results with insect-artificial inoculation showed that the resistance level of CM8302 and CM8303 at the heart leaf and the silking stage was high. The results of laboratory bioassay showed that the survival rates of *Ostrinia furnacalis* larvae on the 6th day after feeding CM8302 and CM8303 heartleaves, silks and grains were 0, 4.0% and 4.0%, and 0, 4.0% and 2.0% respectively. In conclusion, the heartleaves, silks, and grains of transgenic insect-resistant maize CM8302 and CM8303 have significant insecticidal effects and are genetically stable.

Key words: Transgenic maize; *Ostrinia furnacalis*; Insect resistance; Genetic stability

录用日期: 2023-01-29

基金项目: 三亚崖州湾科技城管理局 2020 年度科技计划项目(SKJC-2020-02-005)、重庆市农业科学院绩效激励引导专项项目(cqaas2021jxjl24)

作者简介: 王云鹤(1997-), 女, 河北承德人, 硕士, 主要从事玉米遗传育种研究。Tel: 18395772187

E-mail: wangyunhe0920@163.com

李新海和杨小艳为本文通信作者。E-mail: lixinhai@caas.cn E-mail: yangxiaoyan6600@126.com

亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)属鳞翅目螟蛾科秆野螟属,在玉米生长过程中危害严重,可导致减产30%以上^[1-3]。亚洲玉米螟属于全生育期危害害虫,其初孵幼虫在心叶期取食叶片,后危害未抽穗的雄穗,通过蛀茎取食花丝和雌穗^[4]。也有研究发现,亚洲玉米螟危害雌穗和茎秆,其对雌穗的危害造成的产量损失更大^[5]。

化学防治是针对病虫害的传统防治措施,其特点是见效快、易操作和广适应^[6]。防治亚洲玉米螟的农药杀虫剂有多种^[7],过度使用农药带来了许多不利影响,如农药残留、环境污染、害虫产生抗药性等^[8]。20世纪90年代开始研究利用转基因抗虫玉米防治玉米螟等害虫^[9],1996年美国批准转基因抗虫玉米 Bt176 商业化种植,自此转基因抗虫玉米得到广泛应用。

据国际农业生物技术应用服务组织(International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications, ISAAA)统计,截止到2022年12月,现有抗鳞翅目害虫的玉米转化事件181个,分别含有 *CryIAb*、*Vip3a*、*CryIAc*、*CryIFa2*、*CryIF*、*Vip3Aa20*、*CryIA.105* 和 *Cry2Ab2* 等1个或多个基因^[10-14]。随着转基因作物的广泛种植,抗性和交互抗性的产生是不可回避的环境安全性问题之一。因此,提高目的基因蛋白表达,将杀虫机制不同的 *Bt* 基因转入同一植株以延缓昆虫抗性产生是转基因抗虫作物研发的趋势^[15-18]。由于不同作物生产需要,复合性状转基因作物的发展和成为转基因育种的重要目标^[19]。前期根据植物偏好性将优化后的 *CryIAb* 第一、第二功能结构域与 *CryIF* 第三功能结构域和 *CryIAc* 片段进行融合改造,形成抗虫融合基因 *CryIA.401*(专利号 ZL201210049212.X)。利用农杆菌介导法将该基因导入受体获得转基因玉米 CM8302 和 CM8303,通过与玉米自交系四144多代回交、自交筛选得到 BC₄F₁、BC₄F₂ 和 BC₄F₃ 共3个世代材料。本研究采用 qRT-PCR 技术和 ELISA 方法,明确不同世代材料不同组织器官中 *CryIA.401* 基因表达量和 *CryIA.401* 蛋白表达量,通过田间接虫和室内生测试验鉴定 CM8302 和 CM8303 对亚洲玉米螟的抗虫效率,为抗虫育种提供新材料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

转 *CryIA.401* 基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 与玉米自交系四144回交4代后连续自交得到的 BC₄F₁、BC₄F₂ 和 BC₄F₃ 转基因材料以及常规对照玉米

自交系四144。以上材料由中国农业科学院作物科学研究所优质抗逆玉米育种创新研究组提供。亚洲玉米螟由吉林省农业科学院农业生物技术研究植物环境安全研究与应用团队提供。

田间试验在吉林省公主岭市吉林省农业科学院转基因植物环境安全评价基地进行。该基地周围建有高墙,墙外有防护林带,能够满足转基因材料种植的隔离条件。

1.2 试验方法

1.2.1 基因表达量测定

利用 RNA 提取试剂盒(购自诺唯赞公司)、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒(购自 TIAN-GEN 公司)进行 RNA 提取、纯化、cDNA 合成和 qRT-PCR 表达分析。检测组织为心叶期内层未展开心叶、吐丝期苞叶内花丝和灌浆末期子粒及受体对照相应的组织。*CryIA.401* 基因的上、下游引物分别为 GGAAAGTGTGGAGAGCCGAA 和 GATGCCAATGATGGGCACAC;内参基因 *GAPDH* 的上、下游引物分别为 CATCACCACGGACTACAT 和 GACTCCACGACATACTCA。

1.2.2 *CryIA.401* 蛋白表达量检测

采用 ELISA 方法分别检测3个世代材料和对照玉米心叶期内层未展开心叶(V6时期)、吐丝期苞叶内花丝和灌浆末期子粒的 *CryIA.401* 蛋白表达情况。采用 Bt *CryIAb/Ac* ELISA 检测试剂盒(购自上海佑隆公司),检测为阳性的3个世代转基因玉米 CM8302 和 CM8303 及对照玉米自交系四144的不同组织置于液氮中研磨,依据说明书操作和绘制标准曲线。利用植物蛋白提取试剂盒(购自北京康为世纪)对不同组织植物总可溶性蛋白进行提取,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(购自北京索莱宝公司)说明书进行测定操作。

1.2.3 转基因玉米对亚洲玉米螟抗性鉴定

1.2.3.1 田间接虫试验鉴定

采用随机区组设计,两个材料各世代3次重复,小区面积为 30 m²(5 m×6 m),行距 60 cm,株距 25 cm,常规栽培管理,全生育期不喷施杀虫剂。接虫试验小区之间有 2 m 的间隔,避免害虫在不同小区间的扩散。

心叶期接虫鉴定:在玉米生长至心叶期(小喇叭口期,玉米植株生长至6叶期)进行人工接虫。将亚洲玉米螟初孵幼虫接至玉米植株小喇叭口中,接虫 14 d 后,逐株调查玉米植株中上部叶片被亚洲玉米螟取食情况(叶片虫孔直径大小和数量)。依据 NY/T 1248.5-2006 的9级分级标准划分食叶级别,逐株

记载亚洲玉米螟食叶级别,通过“平均食叶级别= Σ (食叶级别 \times 该级别植株数)/调查总株数”,计算亚洲玉米螟对每个小区鉴定材料叶片危害程度(食叶级别)的平均值。根据食叶级别平均值,依据 NY/T 1248.5-2006 的虫害级别划分标准和抗性评价标准,评价供试材料心叶期的抗性水平。

吐丝期接虫鉴定:在吐丝期进行人工接虫。将亚洲玉米螟初孵幼虫接至玉米花丝丛外,在收获前调查雌穗被害程度与植株被害情况。根据雌穗被害情况(花丝被害情况、虫龄、穗尖被害长度和隧道长度)与秸秆被害情况(单株蛀孔数量、单株存活幼虫数量、单株隧道个数和单株隧道长度),判定转基因抗虫玉米穗期对亚洲玉米螟的抗性水平。抗性水平划分依据采用农业部 953 号公告-10.1-2007 的 5 级分级标准。

1.2.3.2 室内生测试验鉴定

离体生测试验:心叶期取生长至 6 叶期未展开的幼嫩心叶,吐丝期取未授粉苞叶内花丝,灌浆期取子粒,分别进行室内离体生测试验。将不同组织放入养虫盒中,每盒接入 10 头初孵幼虫,每盒为 1 个重复,每个处理 5 次重复。放置在温度 28℃、光周期 16 h:8 h(L:D)、相对湿度 70%~80%RH 的人工气候培养箱中培养,隔天更换相同来源的新鲜组织,并记录死亡幼虫数。实验设有生物学重复,即不同时间重复上述测定。死亡率计算公式:死亡率=(供试玉米第 n 天试虫死亡数量/试虫总数量) \times 100%。根据饲喂第 6 天取食转基因抗虫玉米及非转基因对照玉米的心叶、花丝和子粒的幼虫死亡率,判定转基因玉米 CM8302 和 CM8303 的离体生测抗性水平,判定标准见表 1。

表 1 抗性水平判定标准(幼虫死亡率)

Table 1 Determination criteria of resistance level (larval mortality)

亚洲玉米螟幼虫死亡率(%) Mortality of <i>Ostrinia furnacalis</i> larvae	抗性水平 Resistant level
$Y \geq 95$	高抗
$95 > Y \geq 85$	抗
$85 > Y \geq 70$	中抗
$70 > Y \geq 50$	感
$Y < 50$	高感

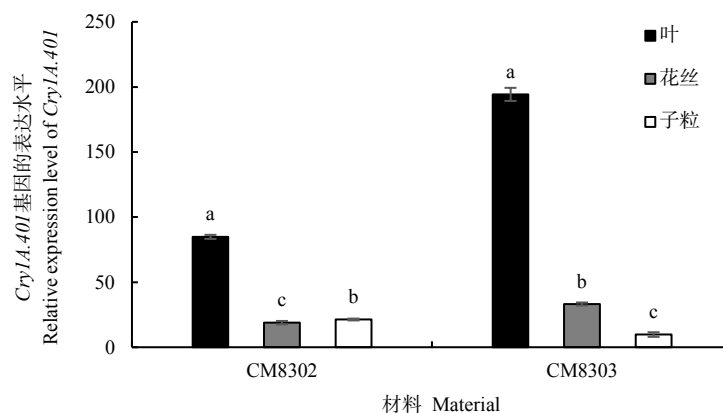
1.3 数据处理与分析

采用 excel 软件对数据进行初步整理,利用 SPSS 对调查数据进行方差分析和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *Cry1A.401* 基因表达量

通过对转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 心叶期内层未展开心叶、吐丝期苞叶内花丝和灌浆末期子粒中 *Cry1A.401* 基因的表达量进行检测(表 2),发现在各组织中均能检测到目的基因表达,在同一材料的 3 个世代中表达稳定,无显著差异($P > 0.05$)。对各组织的基因表达量进行分析(图 1),发现转基因抗虫玉米 CM8302 中 *Cry1A.401* 基因的相对表达量为心叶>子粒>花丝;转基因抗虫玉米 CM8303 中 *Cry1A.401* 基因的相对表达量为心叶>花丝>子粒。经过单因素方差分析发现,转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 各组织间存在显著差异($P < 0.05$),两个材料均为心叶的目的基因相对表达量最高。



注:同一材料中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: different letters were significantly different in the same material ($P < 0.05$).

图 1 CM8302 和 CM8303 不同组织中 *Cry1A.401* 基因表达水平

Fig.1 Expression of *Cry1A.401* gene in different tissues of CM8302 and CM8303

表2 转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 不同组织 *Cry1A.401* 基因表达量Table 2 Expression of *Cry1A.401* gene in different tissues of transgenic insect resistant maize CM8302 and CM8303

材料 Material	组织 Tissue	<i>Cry1A.401</i> 基因相对表达量 Relative expression level of <i>Cry1A.401</i>		
		BC ₄ F ₁	BC ₄ F ₂	BC ₄ F ₃
CM8302	心叶	84.83±0.70 a	86.39±2.22 a	84.81±0.90 a
	花丝	18.50±0.67 a	18.28±1.20 a	18.88±0.76 a
	子粒	21.00±1.17 a	22.02±1.66 a	21.31±0.40 a
CM8303	心叶	193.12±1.65 a	193.34±3.14 a	194.29±2.90 a
	花丝	34.58±0.23 a	33.80±0.85 a	33.23±0.67 a
	子粒	9.97±0.98 a	9.06±0.54 a	9.76±1.03 a

注:表中数据为平均值±标准误。同行中字母不同表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Mean ± SE, different letters within the line were significantly different ($P<0.05$). The same below.

2.2 *Cry1A.401* 蛋白表达量

采用 ELISA 方法在转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的不同组织中均能检测到 *Cry1A.401* 蛋白表达(表3),且在同一个材料3个世代间蛋白表达稳

定($P<0.05$)。在 CM8302 和 CM8303 的3个世代材料中,*Cry1A.401* 蛋白占植物鲜重的比重均为心叶>子粒>花丝,各组织 *Cry1A.401* 蛋白占可溶性蛋白的比重均为子粒>心叶>花丝。

表3 转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的3个世代不同组织 *Cry1A.401* 蛋白的表达水平Table 3 Expression levels of *Cry1A.401* proteins in different tissues among three generations of transgenic insect resistant maize CM8302 and CM8303

材料 Material	组织 Tissue	世代 Generation		
		BC ₄ F ₁	BC ₄ F ₂	BC ₄ F ₃
Cry1A.401 蛋白占植物鲜重的比重(ng/g)				
CM8302	心叶	4175.38±85.95 a	3969.88±107.97 a	4036.10±69.97 a
	花丝	1425.90±36.37 a	1425.90±46.18 a	1459.50±24.53 a
	子粒	2116.29±33.68 a	2293.33±31.90 a	2302.96±69.54 a
CM8303	心叶	3451.57±49.76 a	3440.15±19.77 a	3501.80±42.78 a
	花丝	1739.46±36.15 a	1685.33±19.66 a	1731.06±15.28 a
	子粒	2205.77±32.33 a	2258.70±25.07 a	2181.72±22.55 a
Cry1A.401 蛋白占可溶性蛋白的比重(ng/mg)				
CM8302	心叶	96.89±2.38 a	91.11±2.10 a	93.96±3.34 a
	花丝	24.97±0.59 a	25.27±1.00 a	26.05±0.67 a
	子粒	98.56±1.88 a	108.03±1.08 a	109.03±4.45 a
CM8303	心叶	67.83±2.13 a	68.79±0.99 a	69.79±1.50 a
	花丝	42.51±1.20 a	40.61±0.52 a	42.92±1.15 a
	子粒	134.30±1.21 a	138.95±1.89 a	133.20±1.38 a

2.3 亚洲玉米螟的抗性鉴定

2.3.1 田间接虫鉴定

心叶期接虫后 14 d, 调查玉米叶片被亚洲玉米螟危害的食叶级别。以心叶期食叶级别平均值为参数, 评价玉米叶片的抗性水平。由表4可知, 转基因玉米 CM8302 和 CM8303 的 BC₄F₁、BC₄F₂ 和 BC₄F₃ 世代叶片的抗性水平均为高抗, 说明其对靶标害虫亚洲玉米螟有很好的控制作用, 抗性水平在3个世代间

保持稳定。CM8302 和 CM8303 叶片的食叶级别和危害级别均显著低于非转基因对照玉米自交系四144 ($P<0.05$)。

剖秆调查玉米秸秆被亚洲玉米螟危害情况, 以单株蛀孔数量、单株存活幼虫数量、单株隧道个数和单株隧道长度(cm)为参数, 评价玉米秸秆的受害情况; 剖穗调查玉米雌穗被亚洲玉米螟危害情况, 以花丝被害情况、虫龄、穗尖被害长度和隧道长度为参

数,评价玉米雌穗的抗性水平。由表5可知,对照玉米自交系四144的雌穗被害级别为5.8级,抗性水平为感;转基因抗虫玉米CM8302和CM8303的BC₄F₁、BC₄F₂和BC₄F₃这3个世代材料雌穗危害级别均为1级,抗性水平为高抗。转基因抗虫玉米的单株蛀孔数、单株活虫数、单株隧道个数和单株隧道长

度与非转基因玉米对照玉米自交系四144间存在显著差异($P<0.05$)。综合分析玉米茎秆和雌穗的危害情况,转基因抗虫玉米CM8302和CM8303的3个世代材料对亚洲玉米螟的抗性均达到高抗水平,且抗虫效率稳定。

表4 心叶期转基因抗虫玉米与非转基因玉米四144的亚洲玉米螟危害级别和抗性水平

Table 4 Damage ratings and resistant levels of transgenic insect resistant maize and non-transgenic Si 144 against *Ostrinia furnacalis* at heart leaf stage

材料 Material	食叶级别 Leaf feeding rating	危害级别 Damage level	抗性水平 Resistant level
CM8302(BC ₄ F ₁)	1.05±0.04 a	1 a	高抗
CM8302(BC ₄ F ₂)	1.00±0.00 a	1 a	高抗
CM8302(BC ₄ F ₃)	1.08±0.04 a	1 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₁)	1.15±0.03 a	1 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₂)	1.12±0.04 a	1 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₃)	1.14±0.05 a	1 a	高抗
四144	7.80±0.08 b	7 b	感

表5 吐丝期转基因抗虫玉米与非转基因玉米对照四144的危害级别和抗性水平

Table 5 Damage ratings and resistant levels of transgenic insect resistant maize and non-transgenic Si 144 against *Ostrinia furnacalis* at silking stage

材料 Material	单株活虫数(头) Living larva per plant	单株蛀孔数(个) No. of stalk cavities per plant	单株隧道长度(cm) Mean tunnel length / plant	单株隧道个数(个) No. of tunnels per plant	雌穗被害级别 Mean damage rating scales	抗性水平 Resistant level
CM8302(BC ₄ F ₁)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
CM8302(BC ₄ F ₂)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
CM8302(BC ₄ F ₃)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₁)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₂)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
CM8303(BC ₄ F ₃)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1.0±0.00 a	高抗
四144	0.39±0.12 b	1.39±0.20 b	3.80±0.40 b	1.44±0.17 b	5.8±0.09 b	感

2.3.2 室内生测鉴定

表6 转基因抗虫玉米CM8302不同组织对亚洲玉米螟幼虫的杀虫效果

Table 6 Efficacy of different tissues of transgenic insect resistant maize CM8302 against the *Ostrinia furnacalis* neonates

组织 Tissue	取食时间(d) Feeding time	亚洲玉米螟幼虫存活率(%) Survival rate of <i>Ostrinia furnacalis</i> larvae			
		四144(CK)	CM8302(BC ₄ F ₁)	CM8302(BC ₄ F ₂)	CM8302(BC ₄ F ₃)
心叶	2	100.00±0.00 a	74.00±4.47 b	68.00±7.35 b	56.00±6.00 b
	4	98.00±2.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
	6	98.00±2.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
花丝	2	96.00±4.00 a	62.00±6.32 b	74.00±4.00 b	74.00±2.45 b
	4	94.00±4.00 a	42.00±3.65 b	38.00±4.90 b	40.00±4.47 b
	6	94.00±4.00 a	4.00±2.58 b	4.00±2.45 b	4.00±2.45 b
子粒	2	98.00±2.00 a	52.00±4.28 b	52.00±10.20 b	48.00±5.83 b
	4	98.00±2.00 a	30.00±6.71 b	32.00±4.90 b	30.00±4.47 b
	6	94.00±2.45 a	4.00±2.58 b	4.00±2.45 b	4.00±2.45 b

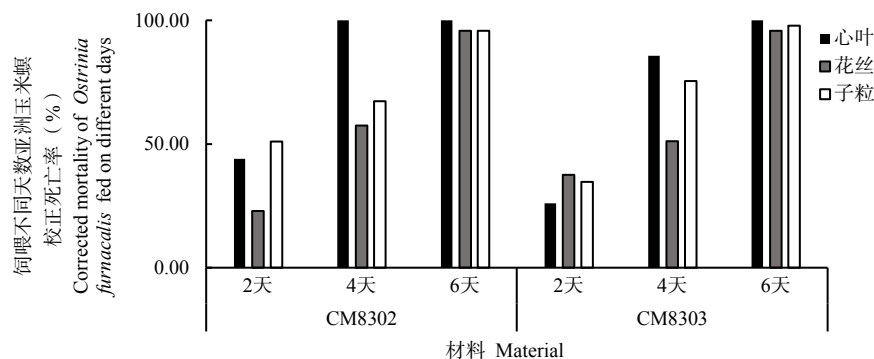
调查取食 CM8302 和 CM8303 心叶、花丝和子粒第 2、4、6 天的亚洲玉米螟幼虫存活率(表 6、表 7), 结果表明, 取食转基因材料 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代不同组织的亚洲玉米螟存活率均低于取食非转基因玉米对照四 144 的亚洲玉米螟存活率, 且存在显著性差异。在两个转基因玉米 3 个世代材料中, 不同组织对亚洲玉米螟均有较好的杀虫效果, 且杀虫效率稳定。分析不同组织饲喂不同天数后亚洲玉米螟的校正死亡率(图 2), 发现饲喂第 6 天, 转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 不同组织的亚洲玉米螟

校正死亡率均达到 95% 以上, 其中, 心叶达到 100%。通过 CORREL 函数对取食不同组织第 6 天的亚洲玉米螟死亡率与 *Cry1A.401* 蛋白含量进行相关分析, 发现转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 饲喂第 6 天的亚洲玉米螟死亡率与蛋白含量的相关系数分别为 0.952 7 和 0.969 7。结果表明, 两个材料心叶、花丝和子粒的杀虫效果与组织中 *Cry1A.401* 的蛋白含量存在显著正相关, 组织中 *Cry1A.401* 蛋白含量越高, 杀虫效果越好。

表 7 转基因抗虫玉米 CM8303 不同组织对亚洲玉米螟幼虫的杀虫效果

Table 7 Efficacy of different tissues of transgenic insect resistant maize CM8302 against the *Ostrinia furnacalis* neonates

组 织 Tissue	取食时间(d) Feeding time/d	亚洲玉米螟幼虫存活率(%) Survival rate of <i>Ostrinia furnacalis</i> larvae			
		四 144(CK)	CM8303(BC ₁ F ₁)	CM8303(BC ₂ F ₂)	CM8303(BC ₃ F ₃)
心叶	2	100.00±0.00 a	66.00±4.00 b	68.00±5.83 b	74.00±4.00 b
	4	98.00±2.00 a	10.00±6.32 b	0.00±0.00 b	14.00±2.45 b
	6	98.00±2.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
花丝	2	96.00±4.00 a	72.00±2.00 b	72.00±2.00 b	60.00±7.07 b
	4	94.00±4.00 a	36.00±6.00 b	44.00±4.00 b	46.00±4.00 b
	6	94.00±4.00 a	4.00±2.45 b	4.00±2.45 b	4.00±2.45 b
子粒	2	98.00±2.00 a	54.00±2.45 bc	42.00±4.90 c	64.00±4.00 b
	4	98.00±2.00 a	30.00±3.16 b	8.00±3.74 c	24.00±2.45 b
	6	94.00±2.45 a	2.00±2.00 b	2.00±2.00 b	2.00±2.00 b



注:校正死亡率=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率)×100%。

Note: Corrected mortality=(treatment mortality-control mortality)/(1-control mortality)×100%.

图 2 不同组织饲喂不同天数亚洲玉米螟校正死亡率

Fig.2 Corrected mortality of *Ostrinia furnacalis* fed with different tissues for different days

3 结论与讨论

本研究采用 qRT-PCR 和 ELISA 方法, 明确在转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代材料的心叶、花丝和子粒中均能检测到 *Cry1A.401* 基因表达, 不同组织间表达量存在显著差异, 不同世代间稳定。亚洲玉米螟的田间和室内生测试验结果证

明, 转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代心叶期和吐丝期的抗性等级均为 1 级, 抗性水平为高抗。两个材料的心叶、花丝和子粒均对亚洲玉米螟具有显著的杀虫效果, 杀虫效果和各组织中 *Cry1A.401* 蛋白含量呈显著正相关。转 *Cry1A.401* 基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 可为转基因抗虫玉米育种提供新种质。

根据 ISAAA's GM Approval Database(<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>) 数据显示, 现有 71 个国家批准了转基因作物进行食用、饲用或者种植。转基因作物外源基因在受体植株中能否稳定遗传和高效表达是研究的重点, 其对转基因作物的商业化应用具有重要意义^[20]。

在转基因作物研究中, 获得稳定遗传的株系对育种应用十分重要。明确外源基因表达稳定性的常用方法是实时荧光定量 PCR、Western Blot、ELISA 分析和胶体金试纸条检测等^[21, 22]。张爽^[23]等采用 qRT-PCR 和 ELISA 方法发现, 转 *Cry1Ab-ma* 基因玉米 CM8101 的 3 个世代不同组织的 *Cry1Ab-ma* 基因表达量在各组织间存在显著差异, 相同组织在不同世代间稳定遗传, 其中叶片中 *Cry1Ab-ma* 蛋白表达量最高。李圣彦^[24]等对连续 5 代回交郑 58 并自交 1 代和 2 代的转基因玉米 2HVB5Cry2Ah-*vp* 蛋白含量测定, 表明同一组织不同世代间蛋白表达量差异不显著, 而不同组织间存在显著差异, 在叶片中的蛋白表达量较高。本研究通过 qRT-PCR 和 ELISA 方法对转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代的心叶、花丝和子粒 *Cry1A.401* 基因表达量进行检测, 发现目的基因和蛋白表达量在不同组织中存在显著差异, 在各世代间保持稳定, 且心叶中 *Cry1A.401* 基因表达量最高。

亚洲玉米螟的抗性是转 *Bt* 基因抗虫玉米的重要评价指标, 一般通过田间接虫和室内生测试验进行研究。于志晶^[25]等对转 *Cry1Ac* 基因水稻进行研究, 发现抗虫性与 *Cry1Ac* 蛋白含量成正比, 当蛋白含量超过 0.1% 时, 抗虫性表现良好。戴军^[26]将 *cry1Ah* 基因导入玉米综 31 中, 转基因植株的田间接虫鉴定表明其对亚洲玉米螟高抗, 心叶进行室内生测试验发现第 3 天亚洲玉米螟的死亡率为 100%。王冬妍^[27]等通过室内生测, 发现取食 Mon810 心叶、花丝和子粒第 3 天幼虫死亡率分别为 100%、78.1% 和 85.9%; 取食 Bt11 心叶、花丝和子粒第 3 天幼虫死亡率为 100%、91.4% 和 83.2%。两个 *Bt* 玉米各组织对亚洲玉米螟初孵幼虫具有很好的杀虫效果, 且心叶、苞叶、雌穗尖和子粒中 *Bt* 蛋白表达量和取食的幼虫死亡率呈显著正相关。王江^[28]等通过田间接虫试验证明, 转 *Cry1Ab/Cry2Aj* 和 *G10evo-epsps* 基因玉米“双抗 12-5”相比其非转基因玉米对照在全生育期均对亚洲玉米螟具有良好抗性, 达到高抗水平; 室内生测发现, 亚洲玉米螟幼虫取食玉米“双抗 12-5”心叶、花丝和子粒组织 7 d 后存活率分别为 4.0%、4.0% 和 12.0%。史晓利^[29]等通过室内生测发现转

Cry1Ab 基因玉米 G03-2396 和 G03-2739 心叶饲喂亚洲玉米螟的幼虫第 6 天存活率分别为 0 和 3.0%; 雌穗饲喂亚洲玉米螟的幼虫第 6 天存活率分别为 86.7% 和 80%, 杀虫效率和组织内 *Bt* 蛋白含量呈正相关。本研究中田间接虫试验证明, 转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代叶片危害级别为 1 级, 雌穗被害级别为 1 级, 在全生育期都对亚洲玉米螟具有很好的抗性, 达到高抗水平, 且遗传稳定。室内生测试验发现, 亚洲玉米螟幼虫取食转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 的 3 个世代心叶、花丝和子粒各组织第 6 天亚洲玉米螟存活率分别为 0、4.0%、4.0% 及 0、4.0%、2.0%; 杀虫效果与转基因玉米 Mon810 和 Bt11 无差别, 优于转基因玉米“双抗 12-5”和转 *Cry1Ab* 基因玉米的 G03-2396 和 G03-2739。转基因抗虫玉米 CM8302 和 CM8303 含有草铵膦抗性 *bar* 基因, 可为培育转基因抗虫耐除草剂玉米提供新种质。

参考文献:

- 刘 臣, 陈 琳, 王冰洁, 等. 四种 *Bt* 蛋白对六种重要鳞翅目害虫的杀虫活性评价[J]. 中国生物防治学报, 2017(6): 774-779.
LIU C, CHEN L, WANG B J, et al. Evaluation of insecticidal activity of four *Bt* proteins against six important Lepidopteran pests[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017(6): 774-779. (in Chinese)
- 张洪刚, 鲁 新, 何康来, 等. 亚洲玉米螟抗寒及低温生存对策[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 398-402.
ZHANG H G, LU X, HE K L, et al. Strategies for cold resistance and low temperature survival of Asian corn borer[J]. Journal of Plant Protection, 2010, 37(5): 398-402. (in Chinese)
- 苏延宾. 玉米螟危害的特点及综合防治措施[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(12): 124-125.
SU Y B. Harm characteristics and integrated control measures of corn borer[J]. Anhui Agronomy Bulletin, 2009, 15(12): 124-125. (in Chinese)
- 李妍颖, 李梅梅, 杨 琪, 等. 亚洲玉米螟危害对玉米产量的影响与防治指标研究[J]. 植物保护, 2022, 48(1): 82-89.
LI Y Y, LI M M, YANG Q, et al. Effect of Asian corn borer on corn yield and control index[J]. Plant Protection, 2022, 48(1): 82-89. (in Chinese)
- 李妍颖, 何柯杭, 房爱省, 等. 不同玉米品种对玉米主要病虫害的抗性及大喇叭口期喷药对大斑病的田间防效[J]. 西北农业学报, 2019, 28(8): 1344-1350.
LI Y Y, HE K H, FANG A S, et al. Resistance of different maize varieties to main diseases and insect pests of maize and field control effect of spraying pesticide on big leaf spot[J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2019, 28(8): 1344-1350. (in Chinese)
- 刘在军. 化学药剂防治玉米病毒病田间价值研究[J]. 农业开发与装备, 2018(4): 51, 58.
LIU Z J. Study on the field value of chemicals in controlling corn virus diseases[J]. Agricultural Development and Equipment, 2018(4): 51, 58. (in Chinese)

- [7] 陈照亮. 如何科学使用化学药剂[N]. 中国花卉报, 2018-05-03.
- [8] 吴兰花, 郑丽霞. 玉米害虫的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(3): 53-58.
WU L H, ZHENG L X. Research progress of corn pests[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46 (3): 53-58. (in Chinese)
- [9] 张利娟, 高雪珂, 雒珺瑜, 等. 澳大利亚抗虫棉抗性风险治理策略[J]. 中国棉花, 2018, 45(3): 3-6, 43.
ZHANG L J, GAO X K, LUO J Y, et al. Risk management strategy of insect-resistant cotton resistance in Australia[J]. Chinese Cotton, 2018, 45(3): 3-6, 43. (in Chinese)
- [10] 岳同卿, 郎志宏, 王延锋, 等. 转 Bt *cryIAh* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 638-644.
YUE T Q, LANG Z H, WANG Y F, et al. Acquisition and genetic stability analysis of transgenic Bt *cryIAh* insect-resistant maize[J]. Acta Agri-Biotechnology, 2010, 18(4): 638-644. (in Chinese)
- [11] 康领生, 姜志磊, 刘洋, 等. 转基因玉米 SW12-859 的抗螟性及农艺性状评价[J]. 玉米科学, 2017, 25(5): 45-48.
KANG L S, JIANG Z L, LIU Y, et al. Evaluation of borer resistance and agronomic traits of transgenic maize SW12-859[J]. Journal of Maize Sciences, 2017, 25(5): 45-48. (in Chinese)
- [12] ARMSTRONG C L. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*[J]. Crop Science, 1995, 35(2): 550-557.
- [13] 王培, 何康来, 王振营, 等. 转 *CryIAc* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 395-400.
WANG P, HE K L, WANG Z Y, et al. Evaluation of resistance of transgenic *CryIAc* maize to Asian corn borer[J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(5): 395-400. (in Chinese)
- [14] 李国平, 刘冰, 黄建荣, 等. 转聚合 *cryIA.105*、*cry2Ab2* 和 *cp4epsps* 基因抗虫耐除草剂玉米的田间抗性评价[J]. 植物保护, 2019, 45(1): 142-147.
LI G P, LIU B, HUANG J R, et al. Field resistance evaluation of transgenic *cryIA.105 cry2Ab2* and *cp4epsps* maize with insect resistance and herbicide resistance[J]. Plant Protection, 2019, 45(1): 142-147. (in Chinese)
- [15] MANYANGARIRWA W, TURNBULL M, MCCUTCHEON G, et al. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: how sustainable is this strategy?[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(10): 781-785.
- [16] 王月琴, 何康来, 王振营. 靶标害虫对 Bt 玉米的抗性发展和治理策略[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(1): 12-23.
WANG Y Q, HE K L, WANG Z Y. Resistance development and control strategies of target pests to Bt maize[J]. Acta Applied Entomology, 2019, 56 (1): 12-23. (in Chinese)
- [17] 张永军, 吴孔明, 彭于发, 等. 转抗虫基因植物生态安全性研究进展[J]. 昆虫知识, 2002, 39(5): 321-327.
ZHANG Y J, WU K M, PENG Y F, et al. Advances in ecological safety of transgenic plants[J]. Insect Knowledge, 2002, 39(5): 321-327. (in Chinese)
- [18] GUOPING LI, HONGQIANG FENG, TINGJIE JI, et al. What type of Bt corn is suitable for a region with diverse lepidopteran pests: A laboratory evaluation[J]. GM Crops Food. 2021, 12(1): 115-124.
- [19] 王旭静, 张欣, 刘培磊, 等. 复合性状转基因植物的应用现状与安全评价[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(4): 18-23.
WANG X J, ZHANG X, LIU P L, et al. Application status and safety evaluation of transgenic plants with compound traits[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2016, 36(4): 18-23. (in Chinese)
- [20] CZERNILOFSKY A P, HAIN R, HERRERA E L, et al. Fate of selectable marker DNA integrated into the genome of *Nicotiana tabacum*[J]. DNA(Mary Ann Liebert, Inc.), 1986, 5(2): 101-113.
- [21] SUN H, LANG Z H, ZHU L, et al. Acquiring transgenic tobacco plants with insect resistance and glyphosate tolerance by fusion gene transformation[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(10): 1877-1887.
- [22] ANDRÁS SZÉKÁCS, LAUBER E, ESZTER TAKÁCS, et al. Detection of *CryIAb* toxin in the leaves of MON810 transgenic maize[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(6): 2203-2211.
- [23] 张爽, 鲁鑫, 张嘉月, 等. 转 *CryIAb-Ma* 基因玉米 CM8101 对亚洲玉米螟抗性研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(1): 59-64.
ZHANG S, LU X, ZHANG J Y, et al. Study on resistance of transgenic corn CM8101 with *CryIAb-Ma* gene to Asian corn borer[J]. Journal of Maize Sciences, 2020, 28(1): 59-64. (in Chinese)
- [24] 李圣彦, 李香银, 李鹏程, 等. 转基因玉米 2HVB5 的性状鉴定及遗传稳定性分析[J/OL]. 生物技术通报: 1-10. [2022-12-29].
- [25] YU Z J, CAI Q A, LIU X F, et al. Expression of Bt protein in transgenic pest-resistant rice[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(3): 489-491.
- [26] 戴军, 李秀影, 朱莉, 等. 转 Bt *CryIAh* 基因抗虫玉米的分子检测及农艺性状分析[J]. 生物技术通报, 2014(5): 62-68.
DAI J, LI X Y, ZHU L, et al. Molecular detection and agronomic character analysis of transgenic Bt *CryIAh* insect-resistant maize [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(5): 62-68. (in Chinese)
- [27] 王冬妍, 王振营, 何康来, 等. Bt 玉米杀虫蛋白含量的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果[J]. 中国农业科学, 2004(8): 1155-1159.
WANG D Y, WANG Z Y, HE K L, et al. Temporal and spatial expression of insecticidal protein content in Bt maize and its insecticidal effect on Asian corn borer[J]. Chinese Journal of Agricultural Sciences, 2004(8): 1155-1159. (in Chinese)
- [28] 王江, 武奉慈, 刘新颖, 等. 转基因抗虫耐除草剂复合性状玉米‘双抗 12-5’对亚洲玉米螟的抗性以及对草甘膦的耐受性研究[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 45-50.
WANG J, WU F C, LIU X Y, et al. Study on the resistance of transgenic maize ‘Shuangkang 12-5’ to Asian corn borer and glyphosate [J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 45-50. (in Chinese)
- [29] 史晓利, 杨益众, 蔡建华, 等. Bt 毒蛋白在转基因抗虫玉米中的表达及在亚洲玉米螟中的转移积累[J]. 应用生态学报, 2009, 11(20): 2773-2777.
SHI X L, YANG Y Z, CAI J H, et al. Expression of Bt toxin protein in transgenic insect-resistant maize and its transfer and accumulation in Asian corn borer[J]. Acta Applied Ecology, 2009, 11(20): 2773-2777. (in Chinese)

(责任编辑:姜媛媛)