应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(4):1098—1102

技术与方法

鉴定转 Bt 甘蔗抗条螟的方法*

劳方业[1] 翁丽星[2] 李奇伟[1] 陈勇生[1] 汪联辉[2] 陈健文[1]
陈仲华[1] 张 琼[1] 沈万宽[1] 陈海宁[1] 邓海华[1**]
(1. 广州甘蔗糖业研究所 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室 广州 510316;
2. 复旦大学生命科学学院微生物学和微生物工程系 上海 200433)

摘 要 通过采集蔗田条螟 *Proceras venosatus* Walker 的蛹,在室内可控条件下进行羽化、交配、产卵、孵化的方式获得虫源,并将初孵幼虫接于检疫温室桶栽的 13 个转 Bt 基因甘蔗品系的心叶上,7 d 后调查幼虫的生长死亡情况以及甘蔗受害程度。结果表明,综合幼虫的生长死亡情况和甘蔗受害程度二项指标,能更准确评价甘蔗的抗虫性,13 个转 Bt 基因甘蔗品系的抗虫性差异悬殊,从高抗到高感不等。该评价方法简单易行,结果准确可靠,可作为转 Bt 基因甘蔗抗虫性鉴定的一个主要方法。

关键词 转 Bt 甘蔗,条螟,抗虫性,鉴定方法

Method to identify insect resistance of Bt-transgenic sugarcane lines

LAO Fang-Ye[1] WENG Li-Xing[2] LI Qi-Wei[1] CHEN Yong-Sheng[1] WANG Lian-Hui[2]
CHEN Jian-Wen[1] CHEN Zhong-Hua[1] ZHANG Qiong[1] SHEN Wan-Kuan[1]
CHEN Hai-Ning[1] DENG Hai-Hua[1**]
(1. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou 510316, China; 2. Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract The relative resistance of 13 Bt-transgenic sugarcane lines to insect pests was investigated using plants planted in buckets in a quarantine greenhouse. Stem borer neonates *Proceras venosatus* Walker were obtained by collecting sugarcane borer pupae from cane fields and allowing these to undergo eclosion, mate, oviposit and hatch under controlled, indoor conditions. Newly hatched larvae were then inoculated into the leaf spindle of sugarcane plants. The growth and survival of larvae and the degree of plant damage was investigated 7 days after inoculation. The results show that two indicators, larval mortality and plant damage, provided the most accurate indication of the relative resistance of sugarcane varieties to insect browsing. The 13 transgenic sugarcane lines varied markedly in resistance to stem borers, some being highly resistant and others highly sensitive. This method is a simple and reliable way to compare the resistance of Bt-transgenic sugarcane lines to stem borer.

Key words Bt-transgenic sugarcane, *Proceras venosatus*, insect resistance, method for identification

甘蔗是重要的糖料作物和能源作物。螟虫对甘蔗生产的危害很大,据估计,因螟害造成甘蔗减产达 10% ~25%,重者可达 40% ~60%,同时还可导致糖分损失和诱发某些茎部病害(李奇伟,2000)。我国蔗区常见的甘蔗螟虫有二点螟、条螟、黄螟、大螟和白螟等。一直以来,喷施农药都

* 资助项目:广东省教育部产学研结合项目(2008B090500227)、广东省科技计划项目(2008B020200002)和现代农业产业技术体系建设专项资金资助。

** 通讯作者,E-mail: haihuadeng@126.com

收稿日期:2010-09-19,接受日期:2010-12-06

是防治甘蔗螟虫主要手段。但随着生物技术的飞速发展,这一情况有望得到根本改变。目前以 Bt 基因为代表的抗虫基因已成功导入到作物当中,并培育出优良的转 Bt 基因品种在生产上大面积推广种植。在我国最成功的例子——转 Bt 基因棉,据统计,2009 抗虫棉花种植面积约为 370 万 hm^2,占棉花总面积的 68%。转 Bt 基因甘蔗研究起步较慢,但近年来也有一定的进展,广州甘蔗糖业研究所与新加坡分子与细胞生物学研究院合作研究,在国内率先获得了一批表达量高、抗螟性好的转 Bt 甘蔗品系(Weng *et al.*,2006)。转 Bt 基因甘蔗材料初期虽然已经过 Bt 基因的分子检测(Weng *et al.*,2006),但其真实的抗虫性还必须得到鉴定。目前转 Bt 基因棉的抗虫性鉴定方法主要有:田间自然感虫、网室接虫、室内喂食等(陈道甫和华金平,2001;李长福等,2002)。但在甘蔗中尚未见到相关的抗虫性鉴定报道。本研究通过采集蔗田间的虫蛹,室内羽化、产卵、孵化方式获得虫源,并接种于检疫温室的转 Bt 甘蔗上,然后观察幼虫的生长死亡情况以及甘蔗受害程度,综合分析后制定出一套甘蔗抗虫鉴定方法。旨在为甘蔗抗虫品种材料筛选、甘蔗抗虫育种等研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　供试材料

转 Bt 基因甘蔗品系包括 Y 系列和 T 系列,其中 Y 系列有 Y1、Y2、Y3、Y4、Y5,其供体对照种为粤糖 79 - 177,T 系列有 T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8,其供体对照种为新台糖 16 号,供试材料共 15 份。桶(35 cm × 37 cm)栽于检疫温室内,每桶下种 4 个蔗芽,当株高达 1 ~ 1.5 m 时,作为抗虫鉴定材料。

1.2　供试虫源

在甘蔗条螟的二代蛹始盛初期(7 月 4 日—8 日),从广东省珠海市斗门县蔗区的蔗田中采集蛹或预蛹。将雌、雄蛹分别放入通风保湿的容器中,在室内羽化后将雌蛾放入纱笼,并配以足够的雄蛾让其交配。选择成功交配后的雌蛾,放入透明的塑料瓶内,每个瓶 1 头雌蛾,让其产卵。约 5 ~ 7 d 后,初孵化的一龄幼虫即为转 Bt 基因甘蔗抗虫试验虫源。

1.3　接虫

将刚孵化的生长健壮的幼虫用毛笔借幼虫吐丝轻轻接入到甘蔗的心叶上,每株甘蔗接 10 头幼虫,每个品系(种)接 4 桶蔗。如果 1 头雌蛾产生的幼虫不足于一批材料接虫,可用 2 ~ 3 头雌蛾产生的幼虫作混合虫源,但应将来自同一雌蛾的初孵幼虫平均分配到各株待测蔗株上。

1.4　调查及抗虫性评价

接虫第 2 天即可观察到心叶的受害症状,7 d 后调查幼虫的生存情况(包括取食痕迹、粪便的新鲜程度及幼虫的生长状态)和蔗株受害程度("花叶"及螟害节),并剖茎检查受条螟危害的茎节。根据幼虫死亡率、幼虫生长状态和甘蔗螟害程度等指标综合评价转 Bt 甘蔗的抗虫性,并根据抗性强弱进行分级。幼虫死亡率(%) = 调查死虫数目/(调查活虫数目 + 调查死虫数目) × 100。

2　结果与分析

2.1　幼虫生长表现

受 Bt 基因表达的毒蛋白影响,取食转 Bt 甘蔗的条螟幼虫主要表现为死亡、生长停滞或生长缓慢等,在不同抗性 Bt 品系上的幼虫生长状态差别很大(图 1)。调查结果显示,2 个对照品种(粤糖 79 - 177 和新台糖 16 号),接入的幼虫全部存活,生长正常;转基因品系中,9 个品系表现出较强的抗虫性,其中,Y2、Y3、Y4、T1、T2、T5 和 T6 7 个品系,接虫后第 7 天幼虫死亡率达 100%,而 T7 和 T8 稍差,幼虫死亡率分别达 83.3% 和 75%(表 1),但存活幼虫表现为生长停滞或生长缓慢。Y5、T3 和 T4 3 个品系的抗虫性较差,接种的幼虫没有死亡,只是出现较轻的生长迟缓现象。Y1 不抗虫,与对照基本没有差别。是否是基因沉默所致,还有待进一步研究。

2.2　植株受害症状

植株受害程度与幼虫的生长状态是紧密相关的。接种 7 d 后调查表明,Y2、T6 的心叶只有少量针点状取食痕迹,无穿孔,无粪屑等,表现了最强的抗虫能力。Y3、Y4、T1、T2 的心叶有少量食孔,也见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑,抗虫能力也相当强。T5、T7、T8 有心叶大量食孔食迹(花叶),少或无新鲜食迹和虫粪,幼虫仍在心叶叶片上取食,抗虫能力稍逊。Y5、T3、T4 花叶严重,1/3 以上幼

图 1　甘蔗条螟幼虫生长状况和蔗株受害程度

Fig. 1　Pictures of larvae growth and plant damage

注:(A)为中等抗性,幼虫明显滞育 Diapause larvae after eating moderate resistance plant;(B)为强抗性,幼虫少量取食后即死亡 Died larvae after eating a bit of high resistance plant;(C)为对照(非转基因)品种,幼虫生长正常 Normal larvae after eating untransformed plant;(D)为 7 d 虫龄的幼虫,左为对照蔗株的幼虫,右为转 Bt 蔗株的幼虫 Larvae growth in untransformed control(left) and transgenic line(right) 7 days after inoculation;(E)为蔗茎螟害节状况,左为转 Bt 蔗株,右为对照蔗株 Stem symptoms of transgenic line(left) and untransformed control(right).

虫已转入叶鞘部取食,抗虫能力较差。Y1 花叶严重,多数幼虫在叶鞘和蔗茎组织取食,有螟害节,植株受害程度与对照的粤糖 79 - 177、新台糖 16 号相同,没有抗虫能力(表 1)。接虫 15 d 后,对照和没有抗虫能力的品系,全部蔗株受害,枯心,长侧芽,而抗虫品系生长正常。

2.3　抗虫性评价

不管是从幼虫的生长情况或是从植株受害症状来看,抗虫性很强和完全没有抗虫能力的品系,很容易就能确定。但一些中间类型,只看单一指标都不太好评价,例如,有些蔗株中存活幼虫不多,但生长正常,蔗株的受害仍较严重,而有些蔗株存活的幼虫较多,但表现呆滞,取食量小,侵害性不强,蔗株受害程度较轻。因此,要准确评价转 Bt 基因甘蔗的抗虫性,应从幼虫的生长情况和植株受害症状程度来综合判断。从甘蔗条螟的生活习性以及试验实际情况分析,在接虫后第 7 天就可根据调查结果,将转 Bt 基因甘蔗品系分为 1 ~ 5 个等级(表 2)。根据 5 级分级标准,Y2、T6 2 个品系螟害级别为 1 级,表现高抗(HR);Y3、Y4、T1、T2 4 个品系螟害级别为 2 级,表现抗(R);T5;T7、T8 3 个品系螟害级别为 3 级,表现中抗(MR);Y5、T3、T4 3 个品系螟害级别为 4 级,表现感(S);Y1 品系螟害级别为 5 级,表现高感(HS);2 个对照种粤糖 79 - 177、新台糖 16 号螟害级别也为 5 级,表现高感(HS)(表 2)。

表 1　甘蔗条螟幼虫死亡率、蔗株受害症状及其抗螟类型

Table 1　The larval mortality, sugarcane damage and resistant type of plants

品种(系) Variety(Line)	幼虫死亡率(%) Larval mortality	蔗株受害症状 Sugarcane damage symptoms	抗螟类型 Resistant type
1	0	花叶严重,多数幼虫在叶鞘和蔗茎组织取食,有螟害节。	HS
Y2	100	心叶只有少量针点状取食痕迹,无穿孔,无粪屑。	HR
Y3	100	心叶少量食孔,见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑。	R
Y4	100	心叶少量食孔,见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑。	R
Y5	0	花叶严重,1/3 以上幼虫已转入叶鞘部取食。	S
粤糖 79 - 177 YT79 - 177	0	花叶严重,多数幼虫在叶鞘和蔗茎组织取食,有螟害节。	HS
T1	100	心叶少量食孔,见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑。	R
T2	100	心叶少量食孔,见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑。	R
T3	0	花叶严重,1/3 以上幼虫已转入叶鞘部取食。	S
T4	0	花叶严重,1/3 以上幼虫已转入叶鞘部取食。	S
T5	100	心叶有大量食孔食迹(花叶),少或无新鲜食迹和虫粪,幼虫仍在心叶叶片上取食。	MR
T6	100	心叶只有少量针点状取食痕迹,无穿孔,无粪屑。	HR
T7	83.3	心叶有大量食孔食迹(花叶),少或无新鲜食迹和虫粪,幼虫仍在心叶叶片上取食。	MR
T8	75.0	心叶有大量食孔食迹(花叶),少或无新鲜食迹和虫粪,幼虫仍在心叶叶片上取食。	MR
新台糖 16 号 ROC16	0	花叶严重,多数幼虫在叶鞘和蔗茎组织取食,有螟害节。	HS

注: HR: 高抗 High resistance; R: 抗 Resistance; MR: 中抗 Moderate resistance; S: 感 Sensitivity; HS: 高感 High sensitivity; 下同 The same below.

表 2　转 Bt 甘蔗对甘蔗条螟的抗性分级标准

Table 2　The grade of insect-resistance in sugarcane

螟害级别 Rating	幼虫生长及蔗株受害情况 Larvae growth and sugarcane damage symptoms	抗螟类型 Resistant type
1	蚁螟仅少量取食后即死亡,心叶只有少量针点状取食痕迹,无穿孔,无粪屑。	HR
2	蚁螟仅少量取食后即死亡,心叶少量食孔,见干粪屑,但无新鲜食迹和粪屑。	R
3	幼虫生长停滞或生长缓慢,食量小,仍在心叶叶片上取食,心叶大量食孔食迹(花叶),少或无新鲜食迹和虫粪。	MR
4	幼虫有较轻的生长迟缓现象,虫体或虫龄与对照的相近,1/3 以上幼虫已转入叶鞘部取食,花叶严重。	S
5	幼虫生长正常,取食正常,花叶严重,多数幼虫在叶鞘和蔗茎组织取食,有螟害节,蔗株受害程度与对照的相同。	HS

3　讨论

Bt 基因对鳞翅目、鞘翅目和双翅目等害虫有较好的抗性。条螟属于鳞翅目,而且在我国蔗区发生最普遍、为害最严重。条螟的食量大,为害症状出现快(7—8 月接虫后第 2 天即可在叶片上看到取食痕迹)且很明显。初孵幼虫首先在心叶上取食,造成"花叶",然后侵入到叶鞘中为害,一般 3 龄幼虫即侵害生长点和蔗茎,造成"枯心"和螟害节(轻工业部甘蔗糖业研究所和广东省农业科学院,1985)。这是本研究选择条螟作为代表性螟虫测试转 Bt 基因甘蔗品系抗虫性虫源的原因。

本方法以桶栽活体蔗株为材料,以甘蔗检疫温室为试验场所,有点类似转 Bt 基因抗虫棉的"网室接虫"鉴定法,但在气候控制、湿、温调控等方面更有优点。整套程序方法简单易行,结果准

确可靠。首先，通过采集条螟蛹在室内控制条件下进行羽化、产卵、孵化等，较好地解决了卵寄生天敌的影响，使虫源在数量和质量上有了根本保证。其次，每个试验只用同一雌蛾所产卵的初孵幼虫为虫源，或将 2～3 只雌蛾产生的初孵幼虫分别平均分配到每株待测蔗株，最大限度地减少试验虫源个体之间的差异，确保抗虫性鉴定结果的准确性。此外，试验周期短，在接虫后 7～10 d 可得到试验结果，并可排除田间天敌和特殊天气（如暴风雨）的影响，试验结果可靠。近年来这批转 Bt 基因甘蔗品系进行了多点的田间试验（作者未发表资料），结果显示，室内人工抗虫性鉴定结果与田间自然感染结果大体吻合。可见，本方法是经得起实践检验的，可作为转 Bt 基因对甘蔗条螟抗虫性评价的一个主要方法。但必须注意，不同季节进行试验时，试验的调查时间可能要做适当的调整，如在气温较低的季节进行试验时，试验周期应相对延长。

本研究的甘蔗抗虫性鉴定方法，可用于转 Bt 基因甘蔗品系的抗虫性检测，也可用于 Bt 甘蔗杂交后代材料的筛选（先经过分子鉴定）等，对快速优选抗虫材料很有帮助。但也必须看到，桶栽环境与大田还是有很大差异的，在桶栽条件下，甘蔗的抗虫性可以准确检测，而经济性状得不到充分表现。因此，要选育抗虫性强、经济性状好，有实用价值的优良甘蔗品系（种），最后还得经过大田试验。初步的田间试验发现，有的转 Bt 基因甘蔗品系抗虫性很强，但植株矮小，产量、糖分不高，不可能成为生产品种，作为种质用于有性杂交也有所欠缺。可见，本鉴定方法与田间试验有机地结合起来，可更好地提高甘蔗抗虫育种效率。另外，本研究提出的转 Bt 基因甘蔗对甘蔗条螟的抗性分级标准在国内尚属首次，有的地方可能还需要不断完善，从而更好地为甘蔗抗虫鉴定和抗虫育种工作服务。

参考文献（References）

陈道甫，华金平，2001. 转 Bt 基因棉育种与应用. 湖北农业科学，5：23—25.

李长福，吴振廷，沈基长，张玉翠，林华峰，2002. 转 Bt 基因棉的检测和抗虫性鉴定研究进展. 安徽农业科学，30（3）：346—349.

李奇伟主编，2000. 现代甘蔗改良技术. 广州：华南理工大学出版社. 249—259.

轻工业部甘蔗糖业研究所，广东省农业科学院主编，1985. 中国甘蔗栽培学. 北京：农业出版社. 366—367.

Weng LX, Deng HH, Xu JL, Li Q, Wang LH, Jiang ZD, Zhang HB, Li QW, Zhang LH, 2006. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. *Pest Management Science*, 62: 178—187.

应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(4):1103—1106

用青菜萝卜苗法室内大量饲养小菜蛾的方法*

林 坤** 杨敏丽*** 李建涛 剡根姣

(宁夏大学能源化工重点实验室 银川 750021)

摘 要 室内人工大量继代饲养小菜蛾 *Plutella xylostella* L.,是开展小菜蛾各种研究的基础。本文介绍用三月慢青菜萝卜苗法饲养小菜蛾的方法。在(24±1)℃、相对湿度60%~70%、光周期L:D=14:10条件下,小菜蛾能连续继代健康繁衍,卵的孵化率和蛹的羽化率可达90%以上。该方法简单实用,成本低,管理方便,可为室内生物测定工作提供发育基本一致的虫源。

关键词 小菜蛾,青菜萝卜苗,饲养方法,温度

Artificial rearing method of diamondback moth by green vegetable and white radish

LIN Kun** YANG Min-Li*** LI Jian-Tao YAN Gen-Jiao

(Key Laboratory of Energy Sources & Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract Artificial rearing of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L., has been the foundation of research on this species. When reared on green vegetables and white radish at a temperature of (24±1)℃, R. H. of 60%—70% and a photoperiod of L:D=14:10 hatching and the adult emergence rates can exceed 90%. This method is simple, practical and economical; a very convenient way to manage and supply insects for research.

Key words *Plutella xylostella*, green vegetable and white radish, rearing method, temperature

小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 属鳞翅目(Lepidoptera)菜蛾科(Plutellidae)。英文名:Diamondback moth;别名:菜蛾、方块蛾、小青虫、两头尖、吊丝虫(蒋明,2006)。它是一种世界性迁飞害虫,最早发源于地中海地区,寄主多达40种以上,主要危害甘蓝、紫甘蓝、青花菜、薹菜、芥菜、花椰菜、白菜、油菜、萝卜等十字花科植物(吴世昌,1993;吴青君等,2001)。

小菜蛾因其世代历期短、繁殖系数大、迁飞能力强、抗药性发展快以及抗逆能力强等特点成为实验室昆虫研究及生物农药毒力效价测试的标准虫种。1995年中国农业部发布了《中华人民共和国农业行业标准》,规定了小菜蛾作为苏云金芽孢杆菌(Bt)生物农药产品质量测试的标准虫种(顾宝根等,1995),并在全国强制实行以便与国际生物农药效价测定相接轨。随着人们对健康的关注和环保意识的深入,人们对"绿色食品"和"无公害食品"需求量日益增大。近几年,生物农药得到了迅猛发展,全世界年销售额突破1亿美元,并且以每年10%~20%的速度增长。在我国,生物农药正逐渐被人们所接受,生物农药的年产量约3万吨,这需要大量的小菜蛾虫源,以满足生物制剂效价的标准化测定(顾宝根等,1995;弓爱君等,2005)。所以,小菜蛾的饲养方法就成为目前科研单位和企业十分关注的问题。许多单位都想了解大量、廉价、简单易行饲养小菜蛾的方法。对小菜蛾饲养方法国内外有诸多报道,如柯礼道和方菊莲(1981)用发芽菜籽饲养小菜蛾;刘传秀等(1981)等用萝卜苗蛭石法;陈宗麒等(2001)等利用莲花白作为小菜蛾的饲料;杨峰山等(2004)等

* 资助项目:国家自然科学基金(20565003)、宁夏自然科学基金(NZ1013)。

**E-mail:linkun8@126.com

***通讯作者,E-mail:yml@nxu.edu.cn

收稿日期:2010-11-08,接受日期:2010-12-28