

贾莉莉,范李萍,李娟,等. 转 *Bt* 基因海岛棉分子检测及抗虫性鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):97-101.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.025

转 *Bt* 基因海岛棉分子检测及抗虫性鉴定

贾莉莉,范李萍,李娟,陈全家,张海燕,王希东,曲延英

(新疆农业大学,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:海岛棉作为新疆特有的资源,其优良的纤维品质和商业价值都是其他作物不可替代的,因此选育抗性优良的海岛棉新品系(品种)显得尤为重要。以海岛棉 K222、新海 25、新海 30 为受体,利用农杆菌介导技术导入目的基因 *Bt*,通过 PCR 检测、Southern 杂交、*Bt*-Cry1Ab/1Ac 试纸条检测、抗虫性鉴定等,随后又对转 *Bt* 基因海岛棉品系的纤维品质进行考察,发现目的基因 *Bt* 的导入对 9 个海岛棉品系的纤维品质有不同程度的影响。PCR 检测结果表明,9 个转 *Bt* 基因品系都含有目的基因,并且阳性率都在 90% 以上;由 Southern 杂交结果可看出,7 个转 *Bt* 基因品系出现了杂交条带,其中 3 个品系为单拷贝,3 个品系为双拷贝,1 个品系为三拷贝。用 *Bt*-Cry1Ab/1Ac 免疫试纸条检测转 *Bt* 基因品系及对照,发现转 *Bt* 基因品系的试纸条上出现 2 条紫红色条带,而对照的试纸条上只出现 1 条紫红色条带,K2-ZKC66 的阳性率达到 90%。抗虫性鉴定结果表明,转 *Bt* 基因品系的叶片受危害较轻,叶片较为完整,对照叶片受危害较重,叶片不完整,7 个转 *Bt* 基因抗虫棉品系校正死亡率都在 60% 以上。与对照相比,部分转 *Bt* 基因海岛棉品系上半部平均长度和长度整齐度显著降低,断裂比强度极显著降低,断裂伸长率极显著增加,短纤维率显著增加,成熟度极显著降低,马克隆值极显著增加。结果显示,7 个转 *Bt* 基因品系的目的基因已成功整合到海岛棉基因组中。与对照相比,转基因品系纤维品质差异显著。

关键词:转基因技术;海岛棉;;*Bt* 基因;抗虫性;纤维品质;生物育种

中图分类号: Q785;S562.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0097-05

转基因是一项新技术,转基因技术是一项新的产业。自 1983 年世界上第一例转基因植物烟草问世以来^[1],对转基因

作物的抗虫、抗除草剂、抗病及品质改良方面的研究与应用取得了巨大进展^[2-4]。1996—2014 年,全球转基因作物的种植面积从 170 万 hm^2 增至 1.815 亿 hm^2 ,增加了 100 多倍,转基因农作物成为全球推广种植最为迅速的作物,这也使转基因技术成为近代史上发展最快的作物改良技术。美国是全球转基因作物种植的第一大国,种植的转基因作物包括玉米、大豆、棉花、油菜、甜菜、紫苜蓿、木瓜和南瓜等,其中棉花、大豆和玉米种植面积较广。我国是世界上率先研究农业生物育种

收稿日期:2016-06-06

基金项目:国家转基因重大专项(编号:2014ZX08005-005-009)。

作者简介:贾莉莉(1991—),女,新疆阿克苏人,硕士研究生,主要从事棉花分子育种研究。E-mail:595851794@qq.com。

通信作者:曲延英,博士,教授,博士生导师,主要从事棉花遗传育种研究。E-mail:jxyq5322@126.com。

[11]孟飞,徐福寿,张莉丽. 几种杀菌剂防治草莓灰霉病的效果[J]. 安徽农业科学,2006,34(8):4658-4677.

[12]袁章虎,张小风,韩秀英. 灰霉菌抗药性研究进展[J]. 河北农业大学学报,1996,19(3):107-110,附 3.

[13]肖曲. 丁子香酚在番茄-土壤系统中的残留降解动态研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2005.

[14]黄家南. 灰霜特防治龙眼果实病害试验初报[J]. 广西热作科技,1999(4):20-22.

[15]黄家南. 灰霜特防治香蕉炭疽病试验初报[J]. 福建果树,2000(1):48.

[16]岑贞陆,黄思良,陈永宁,等. 灰霜特防治水稻细菌性条斑病试验[J]. 广西农业科学,2001(1):20-21.

[17]陈莉,戴荣彩,陈家梅,等. 丁子香酚在番茄和土壤中的残留动态[J]. 农药,2006,45(2):116-118.

[18]黄彰欣. 植物化学保护实验指导[M]. 北京:农业出版社,1993:57.

[19]Wadley F M. Experimental statistics in entomology [M]. Washington:Graduate School Press,1967:387.

[20]赵秀娟,王树桐,张凤巧,等. 草莓根腐病研究进展[J]. 中国农

学通报,2006,22(8):419-422.

[21]曹依静,孙共明. 设施草莓灰霉病发生规律与综合防治技术[J]. 果农之友,2014(12):30.

[22]黄启良,李凤敏,王敏. 40%啞霉胺悬浮剂防治黄瓜灰霉病药效试验[J]. 植物保护,2000,26(2):44-45.

[23]周明国,叶钟音,杭建胜,等. 对多菌灵具有抗性的草莓灰霉病菌菌株形成与分布研究[J]. 南京农业大学学报,1990,13(3):57-60.

[24]刘波,叶钟音,刘经芬,等. 对多菌灵、速克灵具多重抗性的灰霉病菌菌株性质的研究[J]. 南京农业大学学报,1993,16(3):50-54.

[25]纪明山,程根武,张益先,等. 灰霉病菌对多菌灵和乙霉威抗性研究[J]. 农业大学学报,1998,29(3):213-216.

[26]纪明山,祁之秋,王英姿,等. 番茄灰霉病菌对啞霉胺的抗性[J]. 植物保护学报,2003,30(4):396-400.

[27]张传清,张雅,魏方林,等. 设施蔬菜灰霉病菌对不同类型杀菌剂的抗性检测[J]. 农药学报,2006,8(3):245-249.

[28]王凌宇,廖晓兰,张亚. 草莓灰霉病的防治研究进展[J]. 湖南农业科学,2015(6):142-144.

的国家之一,转基因育种的面积也一直位居世界前列,棉花是我国主要的经济作物,在我国国民经济发展中具有举足轻重的地位^[5]。近年来,随着基因工程技术的不断发展,利用生物技术创新棉花种质资源和培育新品种是一条非常有效的途径,极大地推动了棉花遗传育种的发展^[6]。我国转基因抗虫棉作为生物育种创新成功的典范在国际上产生了深远的影响,将 *Bt* 基因转入到棉花中后,可以使棉花表达杀虫蛋白,从而能杀死目标害虫进而可以减少杀虫剂的使用^[7-9],抗虫棉的种植与推广在一定程度上降低了棉铃虫对棉花产量的影响,给棉花产业带来了巨大的经济效益。随着转 *Bt* 基因抗虫棉的长期种植,陆地棉抗虫性得到了很大提高^[10-13]。但是新疆特有的海岛棉转基因抗虫性研究却相对落后,至今仍未有转基因抗虫海岛棉品系的报道。本试验利用前期通过农杆菌介导获得的转基因海岛棉品系(品种)开展 PCR 检测及 Southern 杂交等室内分子检测,以及大田 *Bt* - Cry1Ab/1Ac 试纸条检测与室内抗虫性鉴定等,分析目的基因 *Bt* 转入受体及表达的情况,为培育新疆地区抗虫优良的海岛棉品种(品系)提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

本试验材料是由新疆农业大学生物技术重点实验室前期采用农杆菌介导法将外源基因 *Bt* 导入海岛棉 K222、新海 25 和新海 30,经过多代系统选育得到的高代转基因材料^[14-15]。目的基因 *Bt* 是由郭三堆研究员惠赠,现由新疆农业大学生物技术重点实验室保存,*Bt* 基因植物表达载体是由新疆农业大学生物技术重点实验室构建的。本试验所用的品种(品系)为海岛棉 K222(对照)及其转 *Bt* 基因的 7 个品系(K2 - ZKC31、K2 - ZKC37、K2 - ZKC53、K2 - ZKC58、K2 - ZKC65、K2 - ZKC66、K2 - ZKC70),新海 25(对照)及其转 *Bt* 基因的 XH25 - ZKC 和新海 30(对照)及其转 *Bt* 基因的 XH30 - ZKC。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 检测及 Southern 杂交 实验室内种植待检测样品,苗期取样,采用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)提取棉花基因组 DNA,PCR 扩增体系为 25 μ L,引物序列上游为 5' - CAACGGTTCCGCTC TTTCTG - 3',下游为 5' - CGTGGTTCTGCCCAAGGTAT - 3',扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;57 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 10 min,共 35 个循环。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,再用溴化乙锭染色 10 min,凝胶成像仪拍照。根据扩增条带的有无,可以初步判断转基因品系。

利用 Southern 杂交技术检测目的基因是否整合到棉花基因组中及其拷贝数。取 20 μ g DNA,用 *Hind* III 于 37 $^{\circ}$ C 酶切 6 h,35 V 电泳至弥散条带后转印于尼龙膜,按照 Roche 公司的 PCR DIG Probe Synthesis Kit 说明进行探针标记、杂交和显色处理。

1.2.2 *Bt* - Cry1Ab/1Ac 试纸条检测 *Bt* - Cry1Ab/1Ac 试纸条能快速、定性检测转基因植株中是否含有特异性的 *Bt* - Cry1Ab、*Bt* - Cry1Ac 蛋白。采用美国 Agdia 公司生产的免疫检测试纸条检测。首先采集 PCR 呈阳性植株叶片,按照试纸条检测说明书进行规范操作,若结果显示 2 条紫红色条

带,1 条为质控线,另 1 条为检测线则为阳性品系;若结果只有 1 条紫红色条带则为非转基因品系(品种);若试纸条未出现任何 1 条条带,则操作有误,应重新操作。根据是否出现 2 条紫红色条带,确定转基因材料的株数,计算阳性率。

1.2.3 棉铃虫饲喂检测 棉铃虫由中国科学院新疆生态与地理研究所惠赠,虫龄包括 2、3、4 龄。采集大小一致阳性植株的幼嫩叶片放入培养皿中,叶柄一端用浸湿的脱脂棉包裹,每张叶片接 5 头虫,用塑料膜包裹培养皿,放入室内培养。5 d 后观察叶片受危害情况,计算幼虫校正死亡率。

幼虫校正死亡率 = (处理幼虫死亡率 - 对照幼虫死亡率) / (1 - 对照幼虫死亡率) \times 100%。抗虫性评判标准:校正死亡率 > 90%,高抗;60% < 校正死亡率 \leq 90%,抗病;40% < 校正死亡率 \leq 60%,中抗;校正死亡率 \leq 40%,感病。

试验数据采用 Excel 和 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 转 *Bt* 基因品系的分子检测结果分析

2.1.1 PCR 检测结果分析 对转 *Bt* 基因品系及对照进行 DNA 提取,PCR 扩增,以非转基因品种 K222、新海 25 和新海 30 为阴性对照,以含有目的片段的质粒为阳性对照,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和拍照分析。由图 1、图 2 可以看出,样品均有特异性条带,且与阳性对照质粒条带大小一致,均在 400 bp 左右,而阴性对照没有扩增出目的条带,因此可初步判断目的基因存在于棉花中。

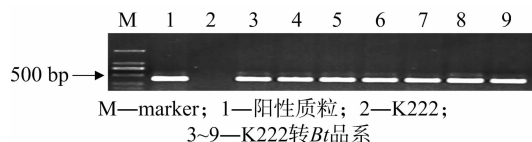


图1 转 *Bt* 基因品系 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测结果

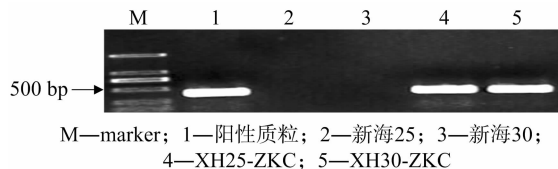
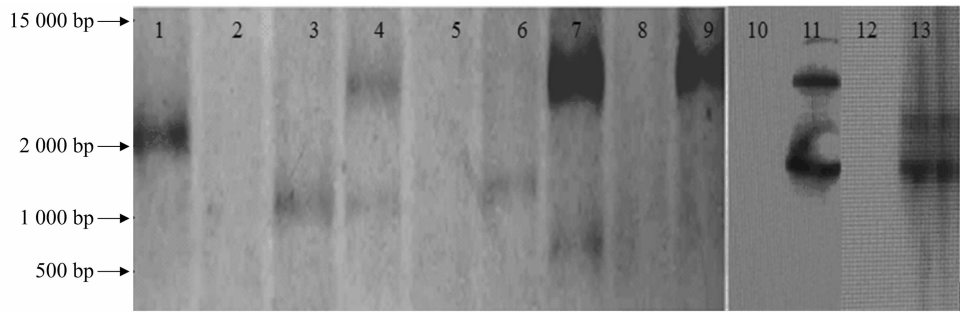


图2 转 *Bt* 基因品系 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.1.2 Southern 杂交结果分析 为进一步验证转 *Bt* 基因品系的目的基因是否整合到棉花基因组中以及拷贝数,分别对 PCR 检测得到的阳性植株进行 Southern Blotting 分析(图 3)。结果表明,在 9 个转基因品系中,7 个转基因品系出现了杂交带,阳性质粒出现了杂交带,阴性对照没有出现杂交带;3、4、6、7、9、11 和 13 泳道出现了杂交带,分别是 K2 - ZKC31、K2 - ZKC37、K2 - ZKC65、K2 - ZKC70、K2 - ZKC66、XH25 - ZKC 和 XH30 - ZKC,并且 4、7 和 13 显示为双拷贝,对应的品系名称分别是 K2 - ZKC37、K2 - ZKC70 和 XH30 - ZKC;3、6 和 9 显示为单拷贝,对应的品系分别是 K2 - ZKC31、K2 - ZKC65 和 K2 - ZKC66;11 (XH25 - ZKC) 显示为三拷贝;2、10 和 12 是阴性对照,都未出现杂交带,通过以上结果可以证明,7 个转基因品系的目的基因已经整合到海岛棉基因组中。

2.2 *Bt* - Cry1Ab/1Ac 试纸条检测结果分析

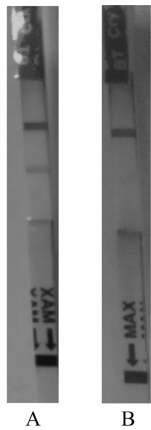
用 *Bt* 免疫试纸条检测转 *Bt* 基因品系,阳性结果在检测



1—阳性质粒；2—K222；3—K2-ZKC31；4—K2-ZKC37；5—K2-ZKC53；6—K2-ZKC65；7—K2-ZKC70；8—K2-ZKC58；9—K2-ZKC66；10—新海25；11—XH25-ZKC；12—新海30；13—XH30-ZKC

图3 转 *Bt* 基因品系 Southern blot 分析(*Hind* III 酶切)

试剂条上出现 2 条紫红色条带,1 条为检测线,另 1 条为质控线,阴性结果只含有 1 条紫红色质控线(图 4)。经过 *Bt* 免疫试纸条检测后,其中图 4-A 出现了 2 条紫红色的条带,为转 *Bt* 基因品系,图 4-B 只出现了 1 条紫红色条带,为非转 *Bt* 基因品系。由 *Bt* 免疫试纸条统计结果(表 1)可以看出, K2-ZKC66 的阳性率达到 90%,其他(除 K2-ZKC53 和 K2-ZKC58 以外)转 *Bt* 基因品系的阳性率略低,在 30%~60% 之间。



A—转 *Bt* 基因品系；B—非转 *Bt* 基因品系
图4 *Bt*-Cry1Ab/1Ac 试纸条检测结果

表 1 *Bt* 试纸条检测统计结果

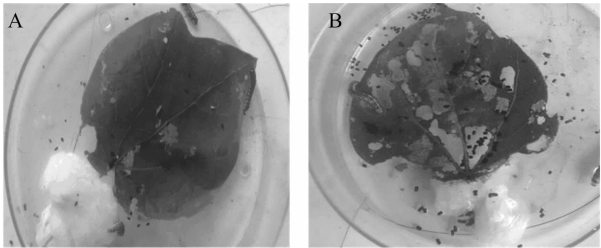
品系	阳性率 (%)	品系	阳性率 (%)
K2-ZKC31	60	K2-ZKC66	90
K2-ZKC37	40	K2-ZKC70	50
K2-ZKC53	—	XH-ZKC25	60
K2-ZKC58	—	XH-ZKC30	30
K2-ZKC65	50		

注:“—”表示未出现 2 条紫红色条带。

2.3 转 *Bt* 基因品系抗虫性检测结果分析

棉叶接虫 5 d 后,由图 5 可以看出,转基因抗虫棉叶片受棉铃虫危害较轻,整个叶片也较为完整,而对照组叶片受棉铃虫危害较重,整张叶片只剩下 1/3,说明抗虫棉能减缓棉铃虫对叶片的危害。由转 *Bt* 基因抗虫棉抗虫性鉴定结果(表 2)可看出,7 个转 *Bt* 基因抗虫棉品系幼虫校正死亡率都在 60% 以上,其中 K2-ZKC31、K2-ZKC66 和 K2-ZKC70 的棉铃虫幼虫校正死亡率在 80% 及其以上;XH25-ZKC 和 XH30-

ZKC 的幼虫校正死亡率相对较低,均为 66%。由幼虫校正死亡率可以得到转 *Bt* 基因海岛棉的抗性级别,除 K2-ZKC53 和 K2-ZKC58 外,其他转 *Bt* 基因品系抗性为抗。



A—转 *Bt* 基因品系；B—非转 *Bt* 基因品系
图5 转 *Bt* 基因品系棉铃虫抗性试验

表 2 转 *Bt* 基因品系抗虫性鉴定结果

品系(品种)	幼虫校正死亡率 (%)	抗性级别
K2-ZKC31	80	抗
K2-ZKC37	75	抗
K2-ZKC53	38	感
K2-ZKC58	35	感
K2-ZKC65	75	抗
K2-ZKC66	85	抗
K2-ZKC70	80	抗
XH25-ZKC	66	抗
XH30-ZKC	66	抗
K222	—	—
新海 25	—	—
新海 30	—	—

2.4 转基因品系纤维品质与对照比较分析

由表 3 可知,K2-ZKC37、K2-ZKC65 和 K2-ZKC66 的上半部平均长度、长度整齐度极显著低于对照,K2-ZKC70 的上半部平均长度、长度整齐度显著低于对照;K2-ZKC37、K2-ZKC65、K2-ZKC66 和 K2-ZKC70 的断裂比强度极显著低于对照;K2-ZKC37、K2-ZKC65、K2-ZKC66 的断裂伸长率极显著低于对照;K2-ZKC65、K2-ZKC66 和 K2-ZKC70 的短纤纤维率极显著高于对照,K2-ZKC37 的短纤维率显著高于对照;K2-ZKC37、K2-ZKC65、K2-ZKC66 成熟度极显著高于对照;K2-ZKC58 和 K2-ZKC70 的马克隆值极显著高于对照。XH25-ZKC 与 XH25、XH30-ZKC 与 XH30 的纤维品质无显著差异,都保持着原品系的性状,可以说明 *Bt* 基因导入 XH25 和 XH30,没有改变它们的纤维品质。

表 3 转基因品系(品种)与对照纤维品质比较结果

品系(品种)	上半部平均长度 (mm)	长度整齐度 (%)	断裂比强度 (cN/tex)	断裂伸长率 (%)	短纤维率 (%)	成熟度	马克隆值
K2 - ZKC31	34.27 ± 0.41	87.90 ± 1.15	42.13 ± 0.61	6.50 ± 0.40	3.10 ± 0.10	0.88 ± 0.00	4.79 ± 0.20
K2 - ZKC37	30.33 ± 2.97 **	85.73 ± 1.17 **	30.80 ± 4.69 **	8.17 ± 0.35 **	4.03 ± 0.83 *	0.86 ± 0.00 **	4.78 ± 0.17
K2 - ZKC53	37.07 ± 2.55	89.53 ± 1.59	44.10 ± 3.15	6.03 ± 0.29	2.97 ± 0.06	0.88 ± 0.00	4.56 ± 0.16
K2 - ZKC58	36.04 ± 0.57	88.77 ± 0.93	43.23 ± 1.90	6.53 ± 0.35	3.03 ± 0.06	0.88 ± 0.00	5.00 ± 0.28 **
K2 - ZKC65	29.22 ± 0.85 **	85.50 ± 0.69 **	27.43 ± 2.02 **	7.93 ± 0.72 **	5.40 ± 0.66 **	0.86 ± 0.00 **	4.56 ± 0.11
K2 - ZKC66	29.92 ± 1.67 **	84.93 ± 0.65 **	32.73 ± 1.06 **	8.63 ± 0.60 **	4.30 ± 0.26 **	0.85 ± 0.00 **	4.38 ± 0.03
K2 - ZKC70	31.50 ± 0.42 *	86.53 ± 0.74 *	31.00 ± 0.95 **	5.40 ± 0.50	4.43 ± 0.68 **	0.89 ± 0.00	5.08 ± 0.06 **
K222	35.13 ± 0.46	88.30 ± 0.30	41.97 ± 1.12	5.87 ± 0.11	3.00 ± 0.00	0.88 ± 0.00	4.55 ± 0.03
XH25 - ZKC	35.22 ± 1.55	89.17 ± 1.27	41.30 ± 2.72	5.90 ± 0.56	3.00 ± 0.00	0.88 ± 0.01	4.61 ± 0.16
XH25	35.38 ± 0.45	89.07 ± 0.45	43.50 ± 1.76	6.03 ± 0.21	3.00 ± 0.00	0.88 ± 0.00	4.71 ± 0.17
XH30 - ZKC	37.20 ± 0.57	88.77 ± 0.57	38.67 ± 2.08	6.03 ± 0.25	3.00 ± 0.00	0.87 ± 0.00	4.54 ± 0.03
XH30	37.24 ± 0.61	89.93 ± 0.61	39.60 ± 1.61	6.03 ± 0.32	3.00 ± 0.00	0.88 ± 0.00	4.62 ± 0.09

注：“*”“**”分别表示与对照相比在 0.05、0.01 水平上差异显著。

3 讨论

PCR 检测可以证明待测样品中是否含有目的条带,但因引物设计不合理以及目的基因在受体中重排等原因使 PCR 检测出现假阳性现象,所以还需要进一步进行 Southern 杂交检测,它是在 DNA 水平上检测目的基因是否整合到受体染色体上的技术。符家平等对转 *Bt* 基因苕麻 T₀ 和 T₁ 代分子检测,结果显示 PCR 检测呈阳性的 T₀ 和 T₁ 代植株做 Southern 杂交都得到了单一杂交条带,表明外源基因片段转入到受体中^[16]。本试验中,PCR 检测转 *Bt* 基因品系扩增出目的条带,可初步判断 *Bt* 基因转到了受体中,在进一步的 Southern 杂交检测中,7 个转基因品系得到杂交条带,可以证明这 7 个转基因品系的目的基因已经整合到海岛棉基因组中,已获得的杂交条带的拷贝数有单拷贝、双拷贝和三拷贝等 3 种,检测的转基因品系中三拷贝的有 1 个,仅占 14%,说明转基因品系的遗传稳定性较高。本研究所用转基因品系均是通过农杆菌介导法获得的,农杆菌介导过程中根癌农杆菌是以低拷贝数整合到棉花基因组中的,而质粒注射往往以多拷贝数整合到棉花基因组中^[17]。李琼等利用农杆菌喷雾和质粒注射处理后代植株,Southern 杂交得出农杆菌喷雾的平均单插入率高于质粒注射,农杆菌喷雾法也能转化后代并且稳定性较高^[18]。

Bt - Cry1Ab/1Ac 试纸条可以定性检测 *Bt* 毒蛋白。聂新辉等使用金标 Bt - Cry1Ab/1Ac 试纸条检测转 *Bt* 基因棉花,得出转 *Bt* 基因棉花的试纸条上出现 2 条紫红色条带,说明转 *Bt* 基因棉花中含有 Bt 毒蛋白^[19]。本试验中,K222 转 *Bt* 基因的部分品系以及 XH25 - ZKC 和 XH30 - ZKC 的试纸条检测结果出现了 2 条紫红色的条带,可以说明部分转基因品系中含有 *Bt* 毒蛋白。宁新民等用试纸条检测外源抗虫基因时,得出海岛棉检测线的清晰度比陆地棉低^[20],本试验结果与其有相似之处,这可能与外源基因转入量有关或者与海岛棉抗虫基因的蛋白质表达量有关^[21-23]。

抗虫性鉴定是在蛋白水平检测转 *Bt* 基因棉花。徐遥等所做棉铃虫的抗性试验报道得出 *Bt* 棉对棉铃虫有毒杀作用^[24-26]。本试验中,转基因品系叶片相对非转基因品系(品种)叶片较完整,危害较轻,说明转基因 *Bt* 棉能减缓棉铃虫对叶片的危害。李瑞奇等做转基因棉花抗虫性鉴定试验发现,3

代棉铃虫的校正死亡率和抗性都低于 2 代棉铃虫,并且随着棉株生育期的进展,棉株对棉铃虫的抗性明显降低^[27]。王峰等做抗虫性鉴定试验得出,在 2、3、4 龄,棉铃虫发生盛期,阳性植株叶片对棉铃虫校正死亡率依次降低,植株的抗虫性随着植株的生长表现降低的趋势^[28]。本试验幼虫校正死亡率大部分处于 60% ~ 85% 之间,抗性级别处于抗,原因可能与采取棉株叶片时间、棉铃虫的龄数有关。

将 *Bt* 基因导入棉花后,棉花农艺性状会发生一系列变化,其纤维品质是非常重要的农艺性状,纤维品质的优劣直接影响其经济价值和纺织工业。因为转 *Bt* 基因海岛棉研究较少,所以前人都是以陆地棉为受体研究 *Bt* 基因导入后农艺性状的变化^[29-30],得出 *Bt* 基因导入棉花后,长度下降,强度提高,伸长率下降,马克隆值升高^[31];转 *Bt* 基因品系中部分品种上半部平均长度、整齐度、断裂比强度、伸长率等高于非转基因品种^[32];转 *Bt* + *Scd* 基因导入对棉花纤维品质无显著影响^[33];转基因抗虫棉的绒长下降、比强度不同程度增加以及纤维增粗^[34]。其他目的基因导入陆地棉后,其纤维品质也发生不同程度的改变,转基因棉花绒长和比强度不同程度增加,马克隆值降低^[35];纤维长度及比强度下降、成熟度降低等^[36];转基因棉花纤维品质整体比受体显著提高^[37]。本研究将 *Bt* 基因导入海岛棉后,其纤维品质发生的改变,填补了 *Bt* 基因导入对海岛棉农艺性状研究的空白。在本研究中,与对照相比,部分转 *Bt* 基因海岛棉品系上半部平均长度和长度整齐度显著降低、断裂比强度极显著降低、断裂伸长率极显著增加、短纤维率显著增加、成熟度极显著降低和马克隆值极显著增加,但也有个别品系的纤维品质略高于对照。由于地区、材料以及数据处理之间的差异等造成转基因与对照之间纤维品质结果的不同,同一品种的不同株系间也会因性状分离使纤维品质表现出差异。

4 结论

以海岛棉 K222、新海 25、新海 30 为受体,利用农杆菌介导技术导入目的基因 *Bt*,通过 PCR 检测、Southern 杂交、Bt - Cry1Ab/1Ac 试纸条检测、抗虫性鉴定等,证明 *Bt* 基因已经整合到海岛棉基因组中并得到表达。与对照相比,部分转 *Bt* 基因海岛棉品系上半部平均长度和长度整齐度显著降低、

断裂比强度极显著降低、断裂伸长率极显著增加、短纤维率显著增加、成熟度极显著降低和马克隆值极显著增加,但也有个别品系的纤维品质略高于对照。

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] 姚方印, 朱常香, 李广贤, 等. *Bt* 水稻的抗虫性鉴定及转基因的遗传分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(2): 142–145.
- [3] 杨 君, 张 艳, 王伟巧, 等. 海岛棉 *GbHyPRP1* 克隆及其转基因拟南芥抗黄萎病验证[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 594–602.
- [4] 孟灵真, 陈全家, 杨 婷, 等. 抗除草剂 *bar* 基因植物表达载体的构建与抗性功能的检测[J]. 新疆农业大学学报, 2013, 36(4): 265–268.
- [5] 孙国清, 李雪源, 秦文斌, 等. 新疆转基因棉花育种研究现状[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 129–132.
- [6] 王根平, 杜文明, 夏兰琴. 植物安全转基因技术研究现状与展望[J]. 中国农业科学, 2014, 47(5): 823–843.
- [7] Romeis J, Meissle M, Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(1): 63–71.
- [8] Tabashnik B E, Sisterson M S, Ellsworth P C, et al. Suppressing resistance to *Bt* cotton with sterile insect releases[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(12): 1304–1307.
- [9] Cattaneo M G, Yafuso C, Schmidt C, et al. Farm – scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(20): 7571–7576.
- [10] Kruger M J, van Rensburg J B J, van den Berg J. Perspective on the development of stem borer resistance to *Bt* maize and refuge compliance at the vaalharts irrigation scheme in South Africa[J]. Crop Protection, 2009, 28(8): 684–689.
- [11] Tabashnik B E, van Rensburg J B J, Carrière Y. Field – evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data[J]. Journal of Economic Entomology, 2010, 102(6): 2011–2025.
- [12] Storer N P, Babcock J M, Schlenz M, et al. Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize; *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico[J]. Journal of Economic Entomology, 2010, 103(4): 1031–1038.
- [13] Bates S L, Zhao J Z, Roush R T, et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(1): 57–62.
- [14] 翁 琴. 海岛棉(*G. barbadense* L.) 茎尖再生体系的建立及农杆菌介导抗虫基因(*Bt*; *SAT1*) 转化研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- [15] 周丽容. 农杆菌介导转 *Bt* 基因海岛棉技术体系的建立及抗虫性鉴定[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2011.
- [16] 符家平, 汪 波, 刘立军, 等. 根癌农杆菌介导转 *Bt* 基因苕麻的获得及其抗虫鉴定[J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1771–1777.
- [17] 王景雪, 孙 毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展[J]. 生物技术通报, 1999, 1(1): 7–13.
- [18] 李 琼, 曲延英, 杨 婷, 等. 海岛棉两种转 *Bt* 基因方法的研究[J]. 棉花学报, 2012, 24(5): 393–398.
- [19] 聂新辉, 尤春源, 陈惠瑜, 等. 金标 *Bt* – *CryIAb*/Ac 试纸条定性检测转 *Bt* 基因棉花的方法研究[J]. 中国棉花, 2013, 40(1): 15–17.
- [20] 宁新民, 孔庆平, 阿里甫, 等. 新疆海岛棉抗虫转基因棉花的筛选及抗虫鉴定[C]//中国棉花学会 2009 年年会论文集. 北京, 2009.
- [21] 沈 平, 林克剑, 张永军, 等. 转 *Bt* 基因棉不同品种杀虫蛋白季节性表达及其对棉铃虫的控制作用[J]. 棉花学报, 2010, 22(5): 393–397.
- [22] 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.
- [23] 王冬梅, 李海强, 丁瑞丰, 等. 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[J]. 棉花学报, 2012, 24(1): 18–26.
- [24] 徐 遥, 丁瑞丰, 李号宾, 等. 转 *Bt* 基因棉花国抗 62 对棉铃虫生长发育的影响及田间抗虫效果[J]. 昆虫学报, 2008, 51(2): 222–226.
- [25] 汪 飞, 徐 静, 封红兵, 等. 新疆棉区转 *Bt* 基因棉对棉铃虫生物学的影响[J]. 昆虫知识, 2003, 40(2): 131–135.
- [26] 丁瑞丰, 李号宾, 刘 建, 等. 新疆南部棉区转 *Bt* 基因棉花对棉铃虫抗性的季节性变化规律[J]. 植物保护学报, 2012, 39(3): 193–199.
- [27] 李瑞奇, 马峙英, 王勤英, 等. 转 *Bt*/*CpTI* 基因棉花抗虫性鉴定与筛选[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 409–413.
- [28] 王 峰, 张秋平, 陈金湘, 等. *Bt* – *Cry5Aa* 基因转化棉花及其抗虫性鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 877–881.
- [29] 华鹤良, 陈 源, 张 祥, 等. *Bt* 基因导入对棉花叶片生长特征的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 53–55.
- [30] 安百伟, 赵 亮, 狄佳春, 等. 陆地棉 *Bt* 抗虫基因类型鉴定与染色体定位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 262–266.
- [31] 刘剑光, 肖松华, 狄佳春, 等. *Bt* 基因导入对棉花农艺性状的影响[J]. 中国棉花, 2003, 30(3): 15–17.
- [32] 刘 方, 王坤波, 宋国立, 等. 棉花转基因材料的获得及主要农艺性状变异分析[J]. 棉花学报, 2009, 21(1): 23–27.
- [33] 郭金英, 郭旺珍, 朱协飞, 等. 转 *Bt* + *Sck* 棉花的分子检测及其农艺性状分析[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(3): 16–20.
- [34] 吕淑平, 郭小平, 赵元明. 转基因抗虫棉 *Bt* 基因导入对受体材料农艺性状的影响[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 36–37.
- [35] 张燕红, 王冬梅, 周小云, 等. 转 *Susy* 基因对棉花农艺性状的影响[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(1): 61–65.
- [36] 连丽君, 吕素莲, 李汝忠, 等. 转 *BetA/als* 基因棉花材料的农艺性状考察[J]. 棉花学报, 2008, 20(6): 447–451.
- [37] 刘慧君, 简桂良, 邹亚飞. *GO* 基因导入对棉花农艺性状及抗病性的影响[J]. 分子植物育种, 2003, 1(5): 669–672.