第 21 卷第 12 期
2001 年 12 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol. 21, No. 12
Dec., 2001

转 Bt 基因棉花及其受体品种主要挥发性物质的测定

张永军，徐 广，郭予元，吴孔明

（中国农业科学院植物保护研究所，北京 100094）

摘要：应用顶空进样气质联机系统（Headspace-GC-MS）测定了转 Bt 基因棉花及其对照亲本主要挥发性物质。结果表明棉花营养器官和繁殖器官的主要挥发性物质有差异，棉花植株现蕾期前，叶片中挥发性物质以 α-蒎烯为主，而现蕾后，蕾、花和铃中主要以 β-月桂烯为主。研究初步发现，外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花自身主要挥发性物质的合成不会造成不利影响。

关键词：转 Bt 基因棉花；挥发性它感物质；气质联机

Analysis of volatile components in transgenic Bt cotton and their parental varieties

ZHANG Yong-Jun, XU Guang, GUO Yu-Yuan, WU Kong-Ming (*Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing* 100094, *China*). ***Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(12): 2051～2056.**

Abstract: By using the headspace collection and GC-MS, the differences in composition and concentrations of volatile allelochemics between transgenic Bt cotton and their parental varieties during various developmental stages were compared and analyzed. The cotton varieties DP5415-NUCOTN33[b], Simian3-GK2 and CCRI16-CCRI30 of both the parental variety and Bt transgenic cotton, were planted in an experimental field of Institute of Plant Protection, CAAS. The following plant parts in cotyledon-, three-leaf-, seven-leaf-, squaring-, flowering- and boll-stage, respectively, were used for volatile collections: cotyledon, top tender leaf, small square, floral organ, small boll. The samples were analyzed with GC-MS.

HP6890 GC equipped with HP 5MS capillary column and HP5973 MS were used for chemical analysis. The carried gas was helium. The temperature program was as following: 40℃ was maintained for 1 min and then the temperature was increased at 20℃/min to 100℃ and maintained for 10 min. The temperature at both the entrance and detector was 250℃. Current velocity of carried gas in GC was 50 ml/min and the split ratio was 28∶1. The current velocity in column was 1.6ml/min. The source temperature of MS was 260℃.

The main volatile compounds in cotton organs collected during various developmental stages were detectable and well separated with GC. The following compounds were identified: in cotton leaf α-pinene, camphene, cyclohexene, β-pinene, β-myrcene, 1, 3-pentadiene-3-methyl, β-hellandrene, D-limonene, 3-carene and a trace of hexen-2-ol-1; in cotton square and flower — α-pinene, β-pinene, β-phellandrene; in addition to the similar volatile allelochemics contained in square and flower, the cotton boll contained 3-carene as well. The dominant compound in cotton leaf was α pinene (60%), and that in square, flower and boll was β-myrcene (80%). The results indicated that the components and ratios of

基金项目：国家自然科学基金（No. 39770498）和国家重点基础研究发展规划项目（No. G2000016208）资助项目

收稿日期：2000-08-13；**修订日期**：2001-05-17

作者简介：张永军（1970～），男，河北张家口人，博士，助理研究员。主要从事植物抗虫及害虫与寄主植物的关系方面的研究。

main volatile allelochemics in various parts of cotton are different, thus it can be inferred that the chemical roles of these parts in interactions among plant, insect pests and natural enemies are different.

The "t" test analysis indicated that the differences in main components and ratios of volatile allelochemics between transgenic Bt cotton and their parental varieties at different stages were negligible (all the t values $< t_{0.05}$), which suggested that the expression of Bt toxin protein in cotton had no effect on volatile profiles, and therefore there would be no potential effects on the interaction among plants, insect pests and natural enemies.

Key words: transgenic Bt cotton; volatile allelochemics; GC-MS

文章编号:1000-0933(2001)12-2051-06 **中图分类号**:S435.622.9 **文献标识码**:A

植物挥发性物质中不仅含有可以刺激植食性昆虫取食、产卵的信息物质，而且还含有引诱捕食性和寄生性天敌寻找寄主的信息物质。玉米释放的法尼烯对抱卵的欧洲玉米螟具有较强的吸引力[1]，而其释放的乙烯可延缓棉铃虫的产卵行为[2]。柠檬烯、香叶烯等可对某些昆虫起忌避或抗生作用[3]。丁红建[4]研究表明，棉铃虫取食、产卵所感知的来自寄主植物的化学信息至少由α-蒎烯、β-月桂烯，罗勒烯，柠檬烯等13种化合物组成，而且雌虫产卵和取食所依赖的化学信息间存在着一定的差异。外源Bt基因转入并且表达Bt杀虫蛋白对棉花主要挥发性物质的合成是否存在影响，是否对植物、害虫、天敌之间的化学信息传递存在潜在的作用，目前尚未见报道。本文应用顶空进样气质联用系统，初步测定了转Bt基因棉花及其受体品种不同生长时期各器官中主要挥发性物质的变化。

1 材料与方法

1.1 供试棉花及取样时期和部位

DP5415、新棉33B(DP5415的转Bt基因棉花)由美国孟山都远东有限公司提供；泗棉3号、GK2(泗棉3号的转Bt基因棉花)由中国农业科学院生物技术研究所提供；中棉所16、中棉所30(中棉所16的转Bt基因棉花)由中国农业科学院棉花研究所提供。供试棉花在中国农业科学院植物保护研究所试验田种植，试验小区随机区组排列，生长期不使用任何农药，不打顶，不摘边心，其它为常规管理。在棉花生长的6个时期：子叶期、三叶期、七叶期、蕾期、花期、铃期，分别取子叶、顶端初展开的嫩叶(顶叶)、小蕾(直径约0.5～0.7cm)、花器、小铃(直径约1.2cm)。将叶片(3片)、蕾(5个)、花(2个)、铃(3个)置于惠普hp顶空进样瓶中，加塞密封压紧。30℃水浴2h后放入惠普顶空进样系统进样测定。

1.2 主要仪器及分析条件

气相色谱仪惠普hp6890，质谱仪惠普hp5973，顶空进样器惠普hp7694E，hp6890工作站，载气为氦气。色谱条件：hp-5MS毛细管柱，柱温40℃保持1min，20℃/min升温至100℃保持10min；进样口温度和检测器温度均为250℃；GC载气总流速50ml/min，分流比28∶1；柱流速1.6ml/min；质谱源温度260℃。顶空进样系统条件：平衡温度43℃；阀环温度100℃；平衡时间20min；进样时间1min；进样量1ml；辅助载气压18.1 psi。

2 结果与分析

2.1 色谱分离检测效果

由GC色谱图1、图2可以看出各个时期棉花组织主要挥发性物质能够被检测出，并且得到较好的分离。通过质谱扫描，在惠普NBS75K.L谱库中检索选择匹配率在90%以上的化学结构式，并参考现有关于棉花挥发性物质的文献，发现棉花叶片中能够被本试验条件检测出的主要挥发性物质有：α蒎烯(α pinene)，莰烯(camphene)，环己烯(cyclohexene)，β-蒎烯(β- pinene)，β-月桂烯(β-myrcene)，3甲基-戊二烯(1,3-pentadiene,3-methyl)，β-水茴香烯(β-phellandrene)，D-柠檬烯(D-limonene)，3-蒈烯(3-carene)以及微量己烯-醇(Hexen-2-ol-1)等；棉蕾和花中主要有：α-蒎烯，β-蒎烯，β-月桂烯等；棉铃中除了含有和蕾、花相同的挥发性物质外，还含有3-蒈烯。在叶片中以α-蒎烯为主，约占主要挥发性它物质的60%，蕾、花和铃中以β-月桂烯为主，约占80%。可见，不同的组织器官主要挥发性物质成分所占比例有一定的差异，它

们在植物、害虫、天敌之间的化学信息传递亦会有区别。

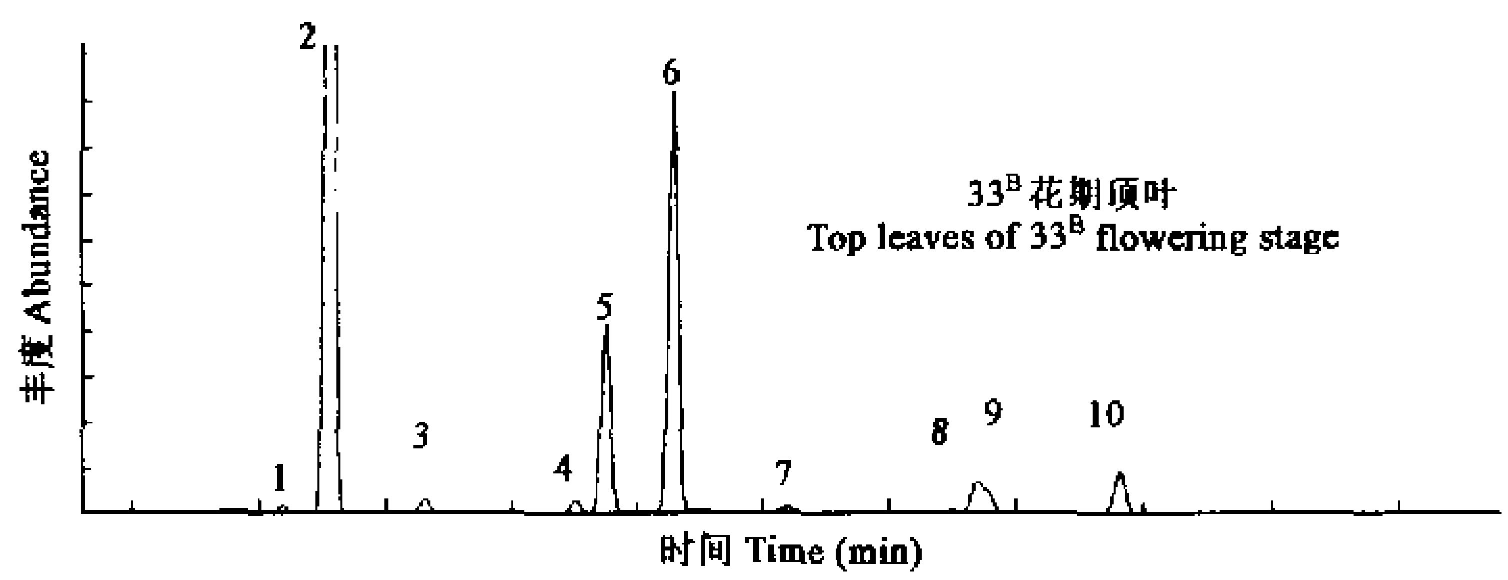

图 1　33^B 花期顶叶中主要挥发性化合物 GC 色谱图

Fig. 1　GC spectrogram of main volatile in 33^B top leaves of flowering stage

1. 甲叉环己烯(cyclohexene)，2. α-蒎烯(α-pinene)，3. 莰烯(camphene)，4. 环己烯(cyclohexene)，5. β-蒎烯(β-pinene)，6. β 月桂烯(β-myrcene)，7. 3-甲基 戊二烯(1, 3-pentadiene, 3-methyl-)，8. β 水茴香烯(β-phellandrene)，9. D-柠檬烯(D limonene)，10. 3-蒈烯(3-caren)

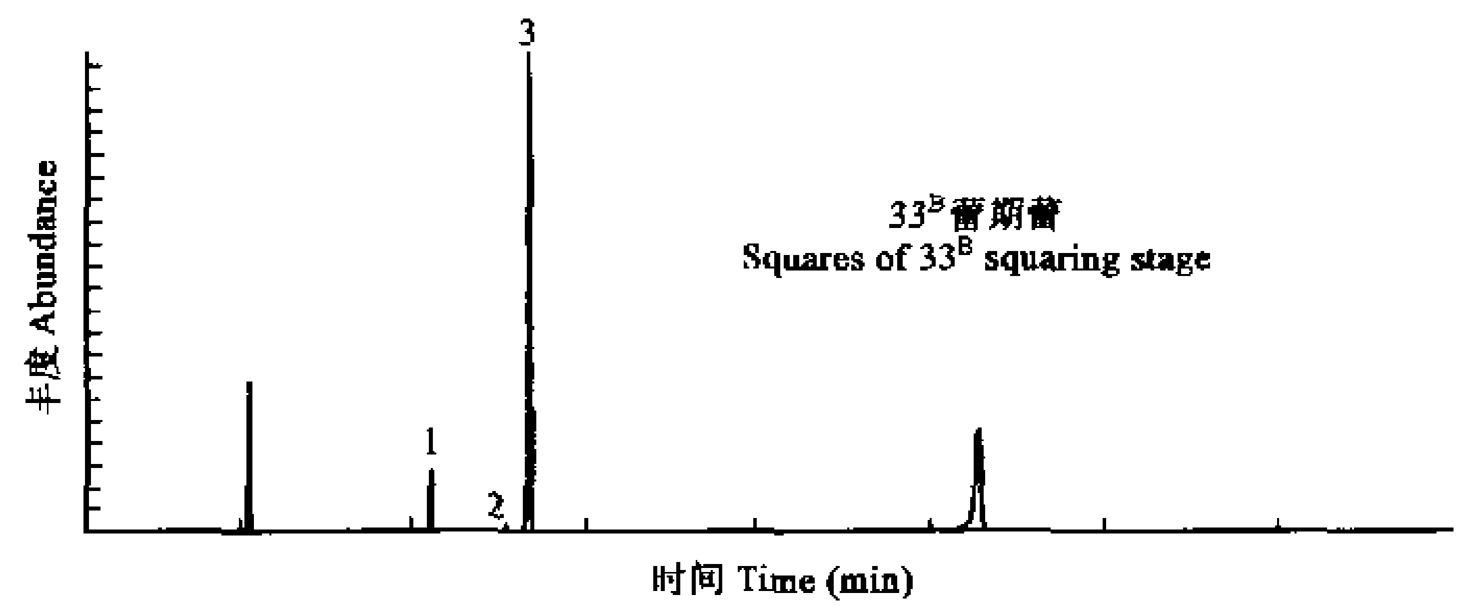

图 2　33^B 蕾期蕾中主要挥发性化合物 GC 色谱图

Fig. 2　GC spectrogram of main volatile of 33^B squares of squaring stage

1. α-蒎烯(α pinene)，2. β-蒎烯(β- pinene)，3. β-月桂烯(β-myrcene)(注：图 2 中其余峰为柱流失)

2.2　转Bt基因棉及其受体品种不同生长时期及器官主要挥发性物质的差异

将 GC MS 测定转 Bt 基因棉及其受体品种不同生长时期不同组织器官主要挥发性物质各成分比例数据列于表 1，运用 t 检验程序分别对表 1 的数据进行平均值的成对二样本分析(表 2)，结果表明供试转 Bt 基因棉花及其受体品种不同时期不同器官主要挥发性物质各成分比例没有显著差异(t 值均小于 $t_{0.05}$)，初步说明外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花自身主要挥发性物质的合成不会造成不利影响，对植物、害虫、天敌之间的化学信息传递不太可能存在潜在干扰作用。

3　讨论

本文应用顶空进样气质联用系统分析了转 Bt 基因棉花及其受体品种主要挥发性物质，不对棉花组织器官作溶剂淋洗萃取，排除了溶剂和非挥发化合物的干扰，灵敏度高，重现性比较好，保证采集到的挥发性物质代表了自然界农田生态系统的真实情况，对深入开展害虫与寄主间关系的研究，开发利用植物性引诱剂等具有重要的意义。

萜类化合物是植物的特异性气味组分，单萜类化合物主要吸引棉铃虫成虫取食和补充营养，倍半帖烯类化合物则有吸引棉铃虫成虫产卵的作用[7]。现蕾前期，叶片中以 α-蒎烯占主导地位，而现蕾后，蕾、花和铃中主要以 β-月桂烯为主，这种主成分比例的变化可能是造成棉铃虫成虫逐渐由麦田向棉田转移为害的原因之一。棉花挥发物质对棉花害虫及天敌的效应有待进一步展开研究。

本研究初步说明外源 Bt 杀虫蛋白表达对棉花自身主要挥发性物质的合成不会造成不利影响，对植物、害虫、天敌之间的化学信息传递不会存在潜在干扰作用。这与田间调查情况相符合。王武刚[illegible]报道转 Bt 基因棉花田块和普通对照棉田棉铃虫成虫落卵量没有明显差异。

表 1 转 Bt 基因棉及其受体品种不同时期及器官主要挥发性它感物质比例(%)

Table 1 Proportion of main volatile components in different organs during various developmental stages of transgenic Bt cotton and their parental varieties

时期与部位 Stage and organ	主要成分 Main components	33^B	DP5415	GK2	泗棉 3 号 Shi mian 3	中棉所 30 CCRI30	中棉所 16 CCRI16
子叶期子叶 Seed leaves of seedling stage	α-蒎烯 α-pinene	68.53	63.05	64.40	64.30	69.70	62.00
	莰烯 camphene	0.77	1.03	0.74	0.65	0.97	1.06
	环己烯 cyclohexene	0.00	0.43	0.29	0.35	0.49	1.18
	β-蒎烯 β-pinene	8.98	9.04	8.40	8.19	9.00	8.61
	β-月桂烯 β-myrcene	12.39	13.29	18.10	18.10	10.30	17.10
	3-甲基戊二烯 1,3 pentadiene,3-methyl	1.81	1.31	0.31	0.16	2.97	3.05
	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.46	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00
	D-柠檬烯 D-limonene	2.41	2.64	2.20	2.07	2.29	2.30
	3-蒈烯 3-caren	4.65	9.21	5.64	6.26	5.40	3.73
三叶期顶叶 Top leaves of three leaf stage	α-蒎烯 α-pinene	62.30	62.60	45.54	62.20	60.90	58.10
	莰烯 camphene	0.80	0.78	0.50	0.64	0.65	0.60
	环己烯 cyclohexene	0.64	0.58	0.39	0.49	0.45	0.41
	β-蒎烯 β-pinene	9.30	9.30	6.23	9.04	9.02	8.62
	β-月桂烯 β-myrcene	21.00	16.8	32.3	21.78	20.33	24.1
	3-甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3-methyl	0.41	0.35	0.15	0.19	0.20	0.17
	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	D-柠檬烯 D-limonene	2.90	2.90	2.08	2.50	2.60	1.72
	3-蒈烯 3-caren	5.60	6.80	2.80	3.05	5.90	5.18
七叶期顶叶 Top leaves of seven leaf stage	α-蒎烯 α-pinene	60.20	61.40	57.80	57.08	57.02	58.06
	莰烯 camphene	0.77	0.80	0.65	0.66	0.64	0.69
	环己烯 cyclohexene	0.69	0.58	0.59	0.53	0.52	0.62
	β-蒎烯 β-pinene	8.90	9.20	8.85	9.04	8.90	9.50
	β-月桂烯 β-myrcene	22.00	18.20	26.40	25.81	24.30	25.40
	3-甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3 methyl-	0.21	0.24	0.00	0.09	0.19	0.13
	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	D-柠檬烯 D-limonene	3.14	3.20	2.72	2.79	2.80	2.80
	3-蒈烯 3-caren	3.96	4.30	2.83	3.93	5.70	5.70

续表 1

时期与部位 Stage and organ	主要成分 Main components	33B	DP5415	GK2	泗棉 3 号 Shi mian 3	中棉所 30 CCRI30	中棉所 16 CCRI16
	α-蒎烯 α-pinene	58.20	59.10	56.90	57.72	54.70	50.57
蕾期顶叶	莰烯 camphene	0.88	0.65	0.54	0.55	0.58	0.52
Top leaves of	环己烯 cyclohexene	0.52	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00
squaring stage	β-蒎烯 β- pinene	7.90	8.30	7.32	7.60	7.50	6.91
	β-月桂烯 β-myrcene	22.19	19.20	21.57	22.96	23.15	26.06
	3-甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3 methyl	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
蕾期顶叶 Top leaves of	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
squaring stage	D 柠檬烯 D-limonene	2.32	2.40	1.93	2.10	2.10	2.01
	3-蒈烯 3 caren	8.00	9.9	8.8	9.04	11.49	13.88
蕾期蕾	α-蒎烯 α-pinene	8.70	7.70	6.10	4.98	4.72	5.30
Squares of	β-蒎烯 β pinene	1.50	1.21	1.10	1.30	0.65	0.70
squaring stage	β-月桂烯 β-myrcene	89.79	91.10	92.80	86.41	94.63	94.00
	α-蒎烯 α-pinene	63.75	65.4	52.86	55.6	60.60	55.18
	莰烯 camphene	0.88	0.66	0.84	0.90	0.00	0.00
	环己烯 cyclohexene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
花期顶叶	β-蒎烯 β- pinene	8.94	8.90	6.30	7.60	8.60	7.60
Top leaves of	β-月桂烯 β-myrcene	22.60	22.26	23.61	26.70	21.80	23.69
flowering stage	3 甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3-methyl	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	D-柠檬烯	0.47	0.40	2.70	3.10	3.55	2.83
D-limonene							
	3-蒈烯 3-caren	3.05	2.89	10.80	9.80	5.45	7.73
花期花	α-蒎烯 α-pinene	22.2	21.78	25.10	23.11	19.80	23.83
Flower of	β-蒎烯 β pinene	2.30	2.19	2.60	2.50	2.12	2.51
flowering stage	β-月桂烯 β-myrcene	75.51	76.03	65.80	69.33	73.12	74.54
	α-蒎烯 α-pinene	53.55	51.85	45.61	50.76	47.35	49.42
	莰烯 camphene	0.64	0.54	0.48	0.55	0.49	0.52
铃期顶叶	环己烯 cyclohexene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Top leaves of	β-蒎烯 β pinene	7.87	7.38	6.60	7.30	6.92	7.28
boll stage	β-月桂烯 β myrcene	22.40	22.62	25.96	26.06	27.10	28.11
	3-甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3-methyl	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	β-水茴香烯 β-phellandrene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	D-柠檬烯 D limonene	2.36	2.06	1.92	2.08	2.05	2.10
	3-蒈烯 3-caren	11.50	14.64	18.43	12.53	15.36	13.80
	α-蒎烯 α-pinene	9.66	15.54	10.62	13.30	15.70	14.81
铃期铃	β 蒎烯 β- pinene	1.13	1.67	1.02	1.47	1.62	1.70
boll of boll stage	β-月桂烯 β-myrcene	81.63	79.69	75.86	78.03	69.40	71.06
	3 蒈烯 3-caren	7.60	8.10	10.51	8.19	13.20	12.81

表中结果为 3 次重复平均值 Conclusions are average of 3 repetition in table

表 2 转 Bt 基因棉及其受体品种不同时期器官主要挥发物质比例差异的 t 检验

Table 2 Difference test of proportion of main volatile components in different organs during various developmental stages of transgenic Bt cotton and their parental varieties

主要成分 Main components	t			$t_{0.05}$
	33^B/ DP5415	GK2/泗棉3号 GK2/Shi mian 3	中棉所30/中棉所16 CCRI30/ CCRI16	
α-蒎烯 α-pinene	0.1437	0.09827	0.1467	1.8945
莰烯 camphene	0.2796	0.1691	0.3459	2.0150
环己烯 cyclohexene	0.3338	0.2484	0.1515	2.0150
β-蒎烯 β-pinene	0.2360	0.2328	0.2469	1.8945
β-月桂烯 β-myrcene	0.0716	0.2402	0.0073	2.0150
3-甲基戊二烯 1,3-pentadiene,3-methyl	0.01685	0.2646	0.4668	2.0150
β-水茴香烯 β phellandrene	0.1816	<<1	<<1	2.0150
D-柠檬烯 D-limonene	0.5000	0.0422	0.0848	2.0150
3-蒈烯 3-caren	0.0215	0.1601	0.4715	1.9432

参考文献

[1] Binder B F, *et al*. Chemically mediated ovipositional behaviour of the European corn borer. *J Chem. Ecol.*, 1995, **21**(9): 1327～1351.

[2] Raina A K, *et al*. Chemical signals from host and sexual behavior in a moth. *Science*, 1992, **255**: 592～594.

[3] Bruin J, *et al*. Do plant tap SOS signals from their infested neighbors. *Tree*, 1995, **10**(4): 167～170.

[4] 丁红建,郭予元,吴才宏. 棉铃虫蛾对寄主植物挥发性油的嗅觉电生理及行为反应. 昆虫学报, 1997, **40**(增刊): 1～6.

[5] 郭予元主编. 棉铃虫的研究. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[6] 王武刚. Bt 棉对主要棉虫发生的影响及防治对策. 植物保护, 1999, **25**(1): 3～5.

[7] 王武刚. 转基因 Bt 棉对棉铃虫的抗虫性表现及利用研究. 中国植物保护研究进展, 1996. 442～446.

[8] 食迈. 史密斯著, 冯明光译. 植物抗虫性的研究与利用. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1992.