

Bt 蛋白在水稻不同遗传背景下的含量及 对抗虫性的影响

杨 宙¹ 吕再萍² 黄仁良¹ 曹丰生¹ 罗世友^{1*}

(1. 江西省农业科学院水稻研究所, 水稻国家工程实验室(南昌), 南昌 330200;

2. 江西鼎中科技有限公司, 南昌 330029)

摘要: 为明确 *Bt* 基因在水稻杂交转育过程中抗虫作用的稳定性, 以分别转入 *cry1C* 和 *cry2A* 基因的抗虫水稻品系 T1C-19 和 T2A-1 为供体亲本, 与 10 个恢复系杂交并回交, 筛选 BC₁F₃ 代转基因纯合株系, 用 ELISA 法测定水稻叶片和茎秆中 Bt 蛋白含量。结果表明, 4 个转 *cry1C* 株系和 5 个转 *cry2A* 株系叶片和茎秆的蛋白含量显著低于亲本, 且降低了 16.62%~62.03%; 相同遗传背景下, 叶片和茎秆中的 Bt 蛋白含量之间呈显著正相关; 在室内转 *cry1C* 株系和转 *cry2A* 株系上二化螟幼虫的校正死亡率分别为 62.50%~95.83% 和 37.50%~83.33%, 其中在 *cry2A* 株系上的校正死亡率与茎秆中的 Cry2A 蛋白含量呈极显著正相关; 在田间自然发虫条件下, 纯合株系的单株卷叶数和枯心率最高仅为 3.97 和 9.37%, 受害程度与相应组织中 Bt 蛋白含量之间存在相关性。表明 Bt 蛋白含量会受到水稻遗传背景的影响, 但杂交后代株系在田间仍能表现出很好的抗性。

关键词: Bt 蛋白; 转基因水稻; 遗传背景; 抗虫性

Content of Bt protein in different backgrounds of rice and its effect on insect resistance

Yang Zhou¹ Lü Zaiping² Huang Renliang¹ Cao Fengsheng¹ Luo Shiyu^{1*}

(1. Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Laboratory for Rice (Nanchang), Nanchang 330200, Jiangxi Province, China; 2. Jiangxi Dingzhong Technology Corporation Limited,

Nanchang 330029, Jiangxi Province, China)

Abstract: To clarify the stability of *Bt* gene in rice hybridization breeding, two insect-resistant rice lines, T1C-19 and T2A-1 generated by introduction of *cry1C* and *cry2A* were used as donor parents and transferred into ten restorer lines through hybridization and backcrossing. BC₁F₃ homozygous lines were selected. The amounts of Bt protein in leaves and stems of these homozygous lines were measured by ELISA. The results showed that the concentrations of Bt protein in four *cry1C* lines and five *cry2A* lines were much lower than that in the corresponding donor parents. The concentration decreased by 16.62%–62.03%. The concentration of Bt protein in leaf was significantly correlated with Bt protein in stem under the same background. The corrected mortality rates of *Chilo suppressalis* larvae caused by *cry1C* and *cry2A* lines were 62.50%–95.83% and 37.50%–83.33%, respectively. The corrected mortality rates caused by *cry2A* lines were significantly correlated with the concentration of Cry2A protein in stem. The number of folded leaves per plant and dead heart rate in homozygous lines were 3.97 and 9.37%, respectively. The extent of damage was correlated with the concentration of Bt protein. The results indicat-

基金项目: 国家自然科学基金(31460493), 国家农业部重大专项(2016ZX08001001), 江西省对外科技合作计划(20151BDH80051)

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: luo.s.y@sohu.com

收稿日期: 2016-01-26

ed that the concentration of Bt protein was influenced by the background of rice, but all hybrid progenies showed high toxicity to stem borers and leaf folders in the field.

Key words: Bt protein; transgenic rice; background; insect resistance

目前,水稻上的害虫已有200多种,其中二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Scirpophaga incertulas* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等鳞翅目害虫为害严重(Chen et al., 2011; 杨亚军等, 2015)。上世纪末,二化螟和三化螟每年给我国水稻生产带来经济损失达115亿元左右(盛承发等, 2003),本世纪以来,稻纵卷叶螟每年造成我国粮食损失平均约76万t,影响的种植面积多次超过2 000万hm²(杨亚军等, 2015)。近年来,随着水稻品种和耕作制度的变化,更利于螟虫的发生与为害,寻找有效的防治方法势在必行。

通过转基因方法,将苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 基因导入水稻中能对鳞翅目害虫起到很好的防治作用(Fujimoto et al., 1993)。至今已有多种Bt基因被导入水稻,筛选获得在室内和田间都有抗性的转基因株系(Nayak et al., 1997; Tu et al., 2000)。T1C-19和T2A-1是2个被广泛应用的Bt水稻品系,其表达的蛋白杀虫活性高,在各种组织器官和生育时期都能发挥抗性(Yang et al., 2011; Wang et al., 2016),且不受水稻种植方式的影响(Yang et al., 2015)。关于转Bt作物的安全性评价报道较多,Liu et al. (2015)和Lu et al. (2015)分别研究发现,Bt水稻对田间节肢动物群落、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和二化螟绒茧蜂 *Cotesia chilonis* 没有产生不良影响;郭井菲等(2014)与刘杰和陈建(2015)分别报道Bt玉米和Bt棉对田间节肢动物群落或地面蜘蛛群落无显著影响,均证实这些Bt作物的生态安全性。Bt作物可以大幅降低农药用量和人工成本,对农业的可持续发展具有重要意义。目前,Bt玉米和Bt棉花已经实现了商业化种植,在我国也有Bt水稻品系通过了转基因生物安全性评价,但是由于消费者认知和接受程度不足等原因,影响了商业化进程(Li et al., 2016)。

原始的转基因水稻植株产量性状和稻米品质与成熟品种之间有一定的差距,可以作为亲本,通过杂交转育进行改良后应用于生产。在杂交转育的过程中,应选择能稳定遗传和表达Bt基因的植株,从而达到理想的抗虫效果。Bt基因在植物中的表达水平受很多因素影响,如Bt基因表达元件、受体的遗传背景和发育阶段等(卢美贞等, 2005)。水稻进行

杂交转育后,Bt基因所处的遗传背景会发生改变,不一定能维持原有的表达水平(杨宙等, 2014)。耿军义等(2003)报道Bt基因在陆地棉不同遗传背景下的表达程度存在差异,且对抗虫性有显著影响;王冬妍等(2004)研究发现 *cry1Ab* 基因在不同玉米品种间的表达量也存在一定差异,且各组织中的Bt蛋白含量与取食的幼虫死亡率呈显著正相关。因此,要对作物转育后代的Bt蛋白含量进行检测,以避免因杀虫蛋白积累量降低而对抗虫效果造成影响。

目前,对影响Bt基因表达因素的研究大多集中于水稻组织器官、发育阶段(Yang et al., 2011; Wang et al., 2016)和世代(Wu et al., 2002),而遗传背景的相关报道较少。因此,本研究以Bt水稻品系T1C-19和T2A-1为亲本,与多个育种材料杂交和回交,筛选纯合株系,然后测定Bt蛋白在不同水稻遗传背景下的含量,并评价纯合株系的室内和田间抗虫性,分析蛋白含量变化对抗性的影响,以期Bt基因在水稻抗虫育种中的应用提供指导和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻:供体亲本是Bt转基因品系T1C-19(Tang et al., 2006)和T2A-1(Chen et al., 2005),由华中农业大学林拥军教授提供,这2个品系是以 *bar* 基因为选择标记基因,分别将人工合成的Bt基因 *cry1C* 和 *cry2A* 导入籼稻品种明恢63后得到,具有优良抗虫性和稳定遗传性。10个杂交母本是籼稻材料,其中广恢998、先恢207、R163、R288、R451是5个国内育成的籼型恢复系,由本实验室引进并保存;其它5个材料是本实验室通过杂交配制的育种材料,已自交选育至F₇代,农艺性状稳定,代号分别为G012、G112、G553、G796和G995,其中G012和G112均由籼稻杂交获得,G553带有部分粳稻遗传背景,G796和G995带有部分野生稻遗传背景,以上10个母本材料对鳞翅目水稻害虫均无明显抗性。明恢63由本实验室引进并保存,被用作抗性试验的敏感对照。

供试昆虫:二化螟卵块采集于江西省南昌市广福镇的水稻田中,用明恢63水稻幼苗饲养,取1龄幼虫备用。

试剂及仪器:10% Basta溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;Bt蛋白酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒 AP005、AP007,美国 EnviroLogix 公司;SH1000 型酶标仪,法国 BioMerieux 公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻杂交及筛选

利用人工去雄的方法进行水稻杂交,用 300 mg/L 的 Basta 涂抹叶片来检测各个世代的转基因阳性单株(Thompson et al., 1987)。用 F_1 代单株作父本回交 1 次, BC_1F_1 开始自交加代。 BC_1F_3 代苗期喷洒 300 mg/L 的 Basta, 筛选转基因纯合株系。将最终筛选到的转 *cry1C* 纯合株系分别命名为 GH998/1C(广恢 998/1C)、XH207/1C(先恢 207/1C)、R163/1C、R288/1C、R451/1C、G012/1C、G112/1C、G553/1C、G796/1C 和 G995/1C, 转 *cry2A* 纯合株系分别命名为 GH998/2A(广恢 998/2A)、XH207/2A(先恢 207/2A)、R163/2A、R288/2A、R451/2A、G012/2A、G112/2A、G553/2A、G796/2A 和 G995/2A, 用于 Bt 蛋白含量测定及后续室内和田间抗虫性试验。

1.2.2 Bt 蛋白含量测定

在江西省农业科学院的转基因试验基地大田中种植供试水稻材料,供体亲本 T1C-19 和 T2A-1 以及各纯合株系分别栽种 50 个单株,常规条件栽培。每个株系选择 4 个正常单株作为 4 次重复,取分蘖期的叶片和拔节期的茎秆(Yang et al., 2011)。每个样品称取约 20 mg 新鲜组织,在 0.5 mL 抽提液中研磨均匀,常温静置 30 min 后取上清液。转 *cry1C* 株系叶片稀释 20 倍,茎秆上清液不稀释;转 *cry2A* 株系叶片和茎秆上清液分别稀释 500 倍和 40 倍作为样品备测。

按照 Bt 蛋白酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒 AP005、AP007 说明书分别测定 Cry1C 和 Cry2A 蛋白含量。向反应孔中加入 100 μ L 样品, 30 r/min 振荡 15 min, 再加入 100 μ L 对应的酶标抗体, 30 r/min 振荡 1 h, 倒去反应液。每个孔中加入 300 μ L 洗脱液, 60 r/min 振荡 1 min, 倒去洗脱液, 重复洗脱 2 次; 每个孔中加入 100 μ L 底物, 避光条件下 30 r/min 振荡 30 min, 再加入 100 μ L 反应终止液, 立即用酶标仪读取 450 nm 波长下吸光度。在标准曲线上读出样品蛋白浓度, 计算蛋白含量, 蛋白含量=样品蛋白浓度 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 抽提液重量/组织鲜重。

1.2.3 纯合株系室内抗虫性鉴定

室内抗虫性鉴定的水稻材料包括明恢 63、供体亲本 T1C-19 和 T2A-1 以及纯合株系。取抽穗期水稻茎秆, 切成约 17 cm 的茎段, 放入玻璃试管, 每个

试管内放 4 段, 接入 10 头初孵 1 龄二化螟幼虫, 用棉塞封口。每个株系测试 3 管, 放入温度为 28 $^{\circ}$ C、相对湿度为 80% 的光照培养箱中, 8 d 后剥开茎秆统计幼虫的死亡数, 计算校正死亡率。死亡率=死亡虫数/供试虫数 $\times$ 100%, 校正死亡率=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率) $\times$ 100%。

1.2.4 纯合株系田间抗虫性评价

田间抗虫性评价试验于 2015 年在江西省农业科学院的转基因试验基地进行。水稻在 5 月底播种, 6 月底移栽。根据所转入的 *Bt* 基因不同分为 2 组, 分开进行小区试验, 每组 12 个水稻材料。转 *cry1C* 组的水稻材料为明恢 63、T1C-19、GH998/1C、XH207/1C、R163/1C、R288/1C、R451/1C、G012/1C、G112/1C、G553/1C、G796/1C 和 G995/1C; 转 *cry2A* 组的水稻材料为明恢 63、T2A-1、GH998/2A、XH207/2A、R163/2A、R288/2A、R451/2A、G012/2A、G112/2A、G553/2A、G796/2A 和 G995/2A。每个小区种植 1 种材料, 每小区种植 2 行, 每行 10 个单株。小区内的水稻株距 16.7 cm, 行距 20.0 cm, 小区间距 40.0 cm, 每组 12 个材料随机排列, 重复 3 次。采用常规的水肥管理, 不喷洒化学杀虫剂, 自然诱杀害虫。在水稻齐穗期调查单株的分蘖数、卷叶数和枯心数, 计算枯心率, 枯心率=枯心数/分蘖数 $\times$ 100%。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 对叶片与茎秆中蛋白含量进行相关性分析, 采用 *t* 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 水稻叶片和茎秆中的 Bt 蛋白含量

供体亲本 T1C-19 叶片中 Cry1C 蛋白含量为 4.82 μ g/g FW, 各纯合株系叶片中为 1.83~5.62 μ g/g FW, 其中 R451/1C、G012/1C、G796/1C 和 G995/1C 株系与供体亲本相比显著降低, G796/1C 中的含量最低, 比亲本降低了 62.03%; XH207/1C 和 R288/1C 株系中 Cry1C 蛋白积累量超过了供体亲本, 但无显著差异。T1C-19 茎秆中 Cry1C 含量为 0.37 μ g/g FW, 各纯合株系茎秆中为 0.15~0.41 μ g/g FW, 其中 8 个株系与供体亲本相比显著降低, 下降了 16.62%~60.32%; R288/1C 株系茎秆中 Cry1C 蛋白积累量超过了供体亲本, 但无显著差异(表 1)。水稻叶片与茎秆的 Cry1C 蛋白含量之间呈显著正相关, 相关系数为 0.615。

供体亲本 T2A-1 叶片中 Cry2A 蛋白含量为

55.25 $\mu\text{g/g}$ FW, 各纯合株系叶片中的含量为 26.00~61.53 $\mu\text{g/g}$ FW, 其中 R451/2A、G012/2A、G553/2A、G796/2A 和 G995/2A 株系与供体亲本相比降低了 20.45%~52.94%; GH998/2A、XH207/2A 和 R288/2A 株系中 Cry2A 蛋白积累量超过了供体亲本, 但无显著差异。T2A-1 茎秆中 Cry2A 含量为 4.11 $\mu\text{g/g}$ FW,

各纯合株系叶片中的含量为 2.36~4.80 $\mu\text{g/g}$ FW, 其中 6 个株系与供体亲本相比显著降低, 下降了 22.38%~42.58%。XH207/2A 和 G112/2A 株系茎秆中 Cry2A 蛋白积累量超过了供体亲本, 但无显著差异(表 1)。水稻叶片与茎秆的 Cry2A 蛋白含量之间呈极显著正相关, 相关系数为 0.760。

表 1 水稻转基因亲本和纯合株系叶片和茎秆中的 Bt 蛋白含量

Table 1 Concentration of Bt proteins in leaves and stems of transgenic parents and homozygous lines of rice $\mu\text{g/g}$ FW

株系 Line	Cry1C 蛋白 Cry1C protein		株系 Line	Cry2A 蛋白 Cry2A protein	
	叶片 Leaf	茎秆 Stem		叶片 Leaf	茎秆 Stem
T1C-19	4.82±0.68	0.37±0.02	T2A-1	55.25±9.27	4.11±0.31
GH998/1C	4.97±1.06	0.25±0.03**	GH998/2A	59.08±7.52	3.51±0.56
XH207/1C	5.38±0.39	0.36±0.04	XH207/2A	61.53±8.17	4.28±0.53
R163/1C	4.51±0.73	0.21±0.05**	R163/2A	55.88±8.18	3.02±0.73*
R288/1C	5.62±0.62	0.41±0.04	R288/2A	58.10±10.29	4.03±0.59
R451/1C	3.85±0.20*	0.22±0.05**	R451/2A	26.00±4.90**	2.53±0.20**
G012/1C	3.76±0.47*	0.22±0.04**	G012/2A	39.93±4.90*	3.19±0.14**
G112/1C	4.24±1.05	0.31±0.04*	G112/2A	50.43±8.52	4.80±0.68
G553/1C	4.91±0.67	0.15±0.03**	G553/2A	43.95±6.20*	3.18±0.37**
G796/1C	1.83±0.35**	0.16±0.03**	G796/2A	32.35±4.97**	2.81±0.22**
G995/1C	2.60±0.42**	0.22±0.05**	G995/2A	28.38±4.54**	2.36±0.48**

表中数据为平均数±标准差。*、**表示经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test, respectively.

2.2 纯合株系在室内对二化螟的抗性

室内抗虫性鉴定结果显示, 明恢 63 对二化螟抗性影响最小, 二化螟幼虫存活率达到 80.00%, 死亡率仅为 20.00%。在转 *cry1C* 株系上二化螟幼虫存活率为 3.33%~30.00%, 在转 *cry2A* 株系中二化螟幼虫存活率为 13.33%~46.67%。T1C-19 上幼虫校正死亡率为 83.33%, 纯合株系上为 62.50%~95.83%, 只有 G796/1C 株系上幼虫校正死亡率与供体亲本相比显著降低, 为 62.50%, XH207/1C、R288/1C、G012/1C 和 G112/1C 这 4 个株系上幼虫校正死亡率超过 90%, 但与供体亲本无显著差异。T2A-1 上幼虫校正死亡率为 66.67%, 纯合株系上为 37.50%~83.33%, 与供体亲本相比, XH207/2A 株系上幼虫校正死亡率显著升高, 达到 83.33%, R451/2A、G796/2A 和 G995/2A 这 3 个株系上幼虫死亡率低于 50.00%, 显著低于亲本(图 1)。

转 *cry1C* 株系上二化螟幼虫的校正死亡率均高于转 *cry2A* 株系, 各株系上二化螟幼虫的校正死亡率与其茎秆中 Cry1C 蛋白含量的相关系数为 0.581, 无显著相关性; 与其茎秆中 Cry2A 蛋白含量的相关系数为 0.832, 呈极显著正相关, 表明 Cry2A 蛋白含

量变化对水稻室内抗性产生了影响。

明恢 63 上二化螟幼虫不仅存活数量多, 而且都正常发育至 2 龄或 3 龄, 体型较大, 活动能力很强, 茎秆被啃食严重, 产生大量虫粪(图 2-a); 转基因亲本和部分纯合株系上二化螟幼虫存活数量少, 体型很小, 活动能力也弱。茎秆受害较轻, 仅在茎节的部位产生一点虫粪, 表现高度抗性(图 2-b); Bt 蛋白含量显著降低的株系中, 存活幼虫数量较多, 但是发育参差不齐, 体型大小和活动能力也各异。茎节部分和内壁表层受到一定程度的为害, 产生一些虫粪, 表现出中度抗性(图 2-c)。

2.3 纯合株系在田间对二化螟的抗性

在转 *cry1C* 区组内, 明恢 63 单株卷叶数为 6.23, 枯心率为 17.55%, 而 T1C-19 及大部分纯合株系都没有出现卷叶, 枯心也基本未出现, G796/1C 和 G995/1C 株系出现了一些卷叶和枯心, R163/1C、G012/1C 和 G553/1C 株系还出现了极少的枯心。G995/1C 纯合株系的单株卷叶数和枯心率最高, 分别为 0.60 和 1.90%。在转 *cry2A* 区组内, 明恢 63 单株卷叶数为 7.20, 枯心率为 23.21%, T2A-1 及纯合株系单株卷叶数为 1.77~3.97, 枯心率为 3.37%~9.37%,

极显著低于明恢 63, GH998/2A、XH207/2A、R163/2A 和 R288/2A 株系的卷叶数和枯心率与 T2A-1 相近,其它 6 个株系的单株卷叶数显著增加(表 2)。

转 *cry2A* 株系的单株卷叶数和枯心率均高于 *cry1C* 株系。与明恢 63 相比,所有转基因株系都对鳞翅目害虫表现出较好的抗性。将 Bt 蛋白含量与

田间抗性结合分析,转 *cry1C* 株系叶片蛋白含量与单株卷叶数、茎秆蛋白含量与枯心率、转 *cry2A* 株系叶片蛋白含量与单株卷叶数、茎秆蛋白含量与枯心率之间的相关系数分别为-0.817、-0.719、-0.841 和-0.832,呈极显著、显著、极显著和极显著负相关,表明 Bt 蛋白含量对水稻田间抗性有明显影响。

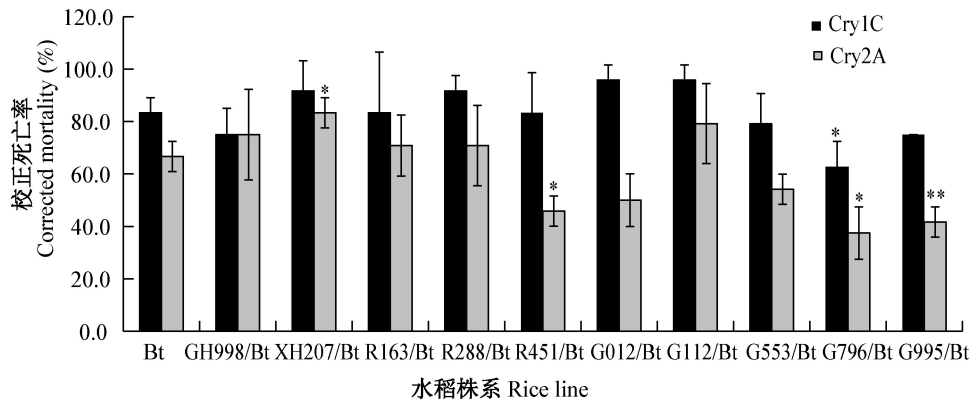


图 1 二化螟幼虫在室内对不同水稻株系的校正死亡率

Fig. 1 Corrected mortality of first-instar striped stem borers on different transgenic parents and homozygous lines of rice

Bt: 供体亲本 T1C-19 和 T2A-1; GH998/Bt: 广恢 998/Bt; XH207/Bt: 先恢 207/Bt. 图中数据为平均数±标准差。*、**表示数据经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Bt: Donor parents T1C-19 and T2A-1; GH998/Bt: Guanghui 998/Bt; XH207/Bt: Xianhui 207/Bt. Data are mean±SD. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test, respectively.

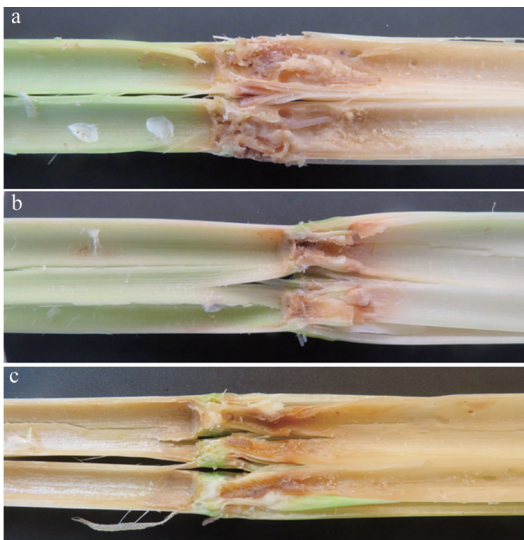


图 2 水稻纯合株系在室内对 1 龄二化螟的抗性

Fig. 2 Resistance of homozygous lines of rice against first-instar striped stem borers in the laboratory

a: 明恢 63; b: XH207/1C (先恢 207/1C); c: G796/2A.
a: Minghui 63; b: XH207/1C (Xianhui 207/1C); c: G796/2A.

3 讨论

目前,关于水稻遗传背景影响外源转基因表达

的报道较少,主要集中在对水稻内源数量性状位点的效应上。在本研究中同一 *Bt* 基因在各株系中的整合位点相同,且选取相同发育阶段同一部位进行蛋白含量测定,结果表明,2 种 Bt 蛋白在部分杂交后代株系叶片和茎秆中的积累量存在不同程度的下降,说明 Bt 蛋白在各株系中含量不同可能是由水稻遗传背景差异引起的。母本 G553、G796 和 G995 是籼稻材料,但分别带有粳稻或野生稻的遗传背景,而且它们的杂交后代中 Cry1Ab/Ac、Cry1C 和 Cry2A 等 Bt 蛋白含量都有较大幅度的降低(杨宙等, 2014),推测水稻父本和母本遗传背景差异较大可能不利于 *Bt* 基因高效表达。

在室内鉴定中,多个纯合株系茎秆中的 Cry1C 蛋白含量显著降低,但没有明显影响水稻的室内抗虫性,低浓度的 Cry1C 蛋白也能起到很好的防护作用,证实了 Cry1C 蛋白对鳞翅目昆虫具有较强的毒性。本试验结果显示,转 *cry1C* 株系中二化螟幼虫的校正死亡率高于转 *cry2A* 株系,表明 Cry1C 蛋白对二化螟毒性较强,这与 Donovan et al. (1998) 和张广林等(2007)等研究结果相似,而且 Cry2A 蛋白含量与幼虫校正死亡率之间呈显著正相关。本研究以

幼虫校正死亡率作为衡量室内抗性的标准,对于转 *cry2A* 株系比较有效,但是没能反映出转 *cry1C* 株系之间抗性的微小差异。若深入评价 Bt 水稻室内抗

性,还需在统计幼虫校正死亡率的同时,调查存活幼虫虫体的大小、龄期、活动能力以及茎秆受害程度,综合分析 Bt 蛋白对幼虫生长发育的影响。

表2 水稻转基因亲本和纯合株系在田间的抗虫性

Table 2 Insect resistance of transgenic parents and homozygous lines of rice in the field

株系 Line	<i>cry1C</i>		株系 Line	<i>cry2A</i>	
	单株卷叶数 No. of folded leaves per plant	枯心率 Dead heart rate (%)		单株卷叶数 No. of folded leaves per plant	枯心率 Dead heart rate (%)
T1C-19	0.00±0.00	0.00±0.00	T2A-1	1.90±0.20	3.69±0.59
GH998/1C	0.00±0.00	0.00±0.00	GH998/2A	2.03±0.32	4.55±0.71
XH207/1C	0.00±0.00	0.00±0.00	XH207/2A	1.77±0.25	4.04±1.27
R163/1C	0.00±0.00	1.60±0.32**	R163/2A	2.20±0.30	5.43±0.51
R288/1C	0.00±0.00	0.00±0.00	R288/2A	1.87±0.32	3.54±0.50
R451/1C	0.00±0.00	0.00±0.00	R451/2A	3.97±0.58**	8.83±0.66**
G012/1C	0.00±0.00	1.24±0.32**	G012/2A	2.83±0.38**	6.71±1.51**
G112/1C	0.00±0.00	0.00±0.00	G112/2A	2.70±0.30**	3.37±0.68
G553/1C	0.00±0.00	1.59±0.59**	G553/2A	2.57±0.21*	4.49±0.74
G796/1C	0.43±0.06**	1.12±0.13**	G796/2A	2.93±0.29**	9.37±0.83**
G995/1C	0.60±0.10**	1.90±0.28**	G995/2A	2.50±0.10*	7.25±0.73**

表中数据为平均数±标准差。*、**表示数据经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test, respectively.

室内抗性鉴定中的二化螟幼虫在转 *cry1C* 和 *cry2A* 株系水稻茎秆上的存活率分别为 3.33%~30.00% 和 13.33%~46.67%。而田间自然诱发环境下,对 Bt 水稻枯心剥查所得的二化螟活虫很少,部分株系没有枯心,可能是由田间条件明显不同于室内所造成的。在水稻抗性育种中,室内抗性结果也是鉴定水稻抗虫性的重要依据,可用于初步筛选具有一定抗性的株系,水稻抗虫性的室内与田间评价需结合使用以达到理想的抗性鉴定效果。

田间试验中,所有转 *cry2A* 株系都有一定数量的卷叶和枯心,并与受害部位的 Cry2A 蛋白含量极显著相关,较好地反映了 Cry2A 蛋白积累量与田间抗虫性的关系。转 *cry2A* 株系出现的虫害症状相对于转 *cry1C* 株系较严重,而仍比明恢 63 轻微,说明 *cry2A* 基因对鳞翅目害虫起到了很好的防护作用。遗传背景不同的水稻材料在田间对鳞翅目害虫的抗性存在差异,可能是由于它们不同的外部形态特征(方继朝等,2002;秦文婧等,2015)。本研究未能比较各水稻材料在转入 *Bt* 基因前后的抗性差异,但在育种实践中还需重视遗传背景本身的抗虫作用,应选用本身抗性较好的水稻材料作为转育亲本。

参 考 文 献 (References)

- Chen H, Tang W, Xu CG, Li XH, Lin YJ, Zhang QF. 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against Lepidopteran rice pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7): 1330–1337
- Chen M, Shelton A, Ye GY. 2011. Insect-resistant genetically modified rice in China: from research to commercialization. *Annual Review of Entomology*, 56(1): 81–101
- Donovan WP, Dankocsik CC, Gilbert MP, Gawron-Burke MC, Groat RG, Carlton BC. 1988. Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(1): 561–567
- Fang JC, Guo HF, Cheng XN, Du ZW. 2002. Mechanism of rice varietal resistance differences to the yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 91–95 (in Chinese) [方继朝, 郭慧芳, 程遐年, 杜正文. 2002. 不同水稻品种对三化螟抗性差异的机理. *昆虫学报*, 45(1): 91–95]
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyoizuka J, Shimamoto K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology*, 11(10): 1151–1155
- Geng JY, Zhang XY, Wang ZX, Cui RM, Yan FJ, Meng CF, Jia JH. 2003. Study on *Bt* gene expression in the different transgenic *Bt* upland cotton. *Cotton Science*, 15(1): 8–12 (in Chinese) [耿军义, 张香云, 王兆晓, 崔瑞敏, 闫芳教, 孟春风, 贾记豪. 2003. *Bt*

- 基因在不同陆地棉基因型的表达研究. 棉花学报, 15(1): 8–12]
- Guo JF, Zhang C, Yuan ZH, He KL, Wang ZY. 2014. Impacts of transgenic corn with *cryIIe* gene on arthropod biodiversity in the fields. Journal of Plant Protection, 41(4): 482–489 (in Chinese) [郭井菲, 张聪, 袁志华, 何康来, 王振营. 转 *cryIIe* 基因抗虫玉米对田间节肢动物群落多样性的影响. 植物保护学报, 41(4): 482–489]
- Li YH, Hallerman EM, Liu QS, Wu KM, Peng YF. 2016. The development and status of Bt rice in China. Plant Biotechnology Journal, 14(3): 839–848
- Liu J, Chen J. 2015. Effects of transgenic Bt cotton on ground-dwelling spider assemblages by pitfall traps. Journal of Plant Protection, 42(1): 59–65 (in Chinese) [刘杰, 陈建. 2015. 陷阱法调查转 Bt 棉对棉田地面蜘蛛群落的影响. 植物保护学报, 42(1): 59–65]
- Liu QS, Romeis J, Yu HL, Zhang YJ, Li YH, Peng YF. 2015. Bt rice does not disrupt the host searching behavior of the parasitoid *Cotesia chilonis*. Scientific Reports, 5: 15295
- Lu MZ, Cui HR, Yao YL, Xin Y. 2005. Factors affecting expression of *Bacillus thuringiensis* genes in transgenic plants. Chinese Journal of Cell Biology, 27(5): 509–513 (in Chinese) [卢美贞, 崔海瑞, 姚艳玲, 忻雅. 2005. 影响苏云金芽孢杆菌基因在转基因植物中表达的因素. 细胞生物学杂志, 27(5): 509–513]
- Lu ZB, Liu YE, Han NS, Tian JC, Peng YF, Hu C, Guo YY, Ye GY. 2015. Transgenic *cryIC* or *cry2A* rice has no adverse impacts on the life-table parameters and population dynamics of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Pest Management Science, 71(7): 937–945
- Nayak P, Basu D, Das S, Basu A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAC delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(6): 2111–2116
- Qin WJ, Huang SJ, Huang JH, Chen HF, Chen Q, Qin HG. 2015. Resistance of rice varieties to the stripe stem borer *Chilo suppressalis*. Chinese Journal of Applied Entomology, 52(3): 721–727 (in Chinese) [秦文婧, 黄水金, 黄建华, 陈洪凡, 陈琼, 秦厚国. 2015. 抗二化螟的水稻品种筛选. 应用昆虫学报, 52(3): 721–727]
- Sheng CF, Wang HT, Gao LD, Xuan WJ. 2003. Current outbreak, yield loss estimation and controlling countermeasures of paddy rice borer in China. Plant Protection, 29(1): 37–39 (in Chinese) [盛承发, 王红托, 高留德, 宣维健. 2003. 我国水稻螟虫大发生现状、损失估计及防治对策. 植物保护, 29(1): 37–39]
- Tang W, Chen H, Xu CG, Li XH, Lin YJ, Zhang QF. 2006. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cryIC** gene. Molecular Breeding, 18(1): 1–10
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO Journal, 6(9): 2519–2523
- Tu JM, Zhang GA, Datta K, Xu CG, He YQ, Zhang QF, Khush GS, Datta SK. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Nature Biotechnology, 18(10): 1101–1104
- Wang DY, Wang ZY, He KL, Cong B, Bai SX, Wen LP. 2004. Temporal and spatial expression of Cry1Ab toxin in transgenic Bt corn and its effects on Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). Scientia Agricultura Sinica, 37(8): 1155–1159 (in Chinese) [王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌, 白树雄, 文丽萍. 2004. 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. 中国农业科学, 37(8): 1155–1159]
- Wang YN, Ke KQ, Li YH, Han LZ, Liu YM, Hua HX, Peng YF. 2016. Comparison of three transgenic Bt rice lines for insecticidal protein expression and resistance against a target pest, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insect Science, 23(1): 78–87
- Wu G, Cui HR, Ye GY, Xia YW, Sardana R, Cheng XC, Li YH, Alto-saar I, Shu QY. 2002. Inheritance and expression of the *cryIAb* gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. Theoretical and Applied Genetics, 104(4): 727–734
- Yang YJ, Han HL, Xu HX, Zheng XS, Tian JC, Wang GY, Lin YJ, Lu ZX. 2015. Effectiveness in the field of Bt rice lines against target pests under various cultural regimes. Entomologia Experimentalis et Applicata, 156(3): 211–219
- Yang YJ, Xu HX, Zheng XS, Tian JC, Lu YH, Lü ZX. 2015. Progresses in management technology of rice leafhoppers in China. Journal of Plant Protection, 42(5): 691–701 (in Chinese) [杨亚军, 徐红星, 郑许松, 田俊策, 鲁艳辉, 吕仲贤. 2015. 中国水稻纵卷叶螟防控技术进展. 植物保护学报, 42(5): 691–701]
- Yang Z, Chen H, Tang W, Hua HX, Lin YJ. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. Pest Management Science, 67(4): 414–422
- Yang Z, Kang MH, Liu JH, Pei DL, Zhang BJ, Zhang XN, Cao FS. 2014. Expression and effect of *cryIAb/Ac* gene in hybrid progenies of transgenic and conventional rice. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 36(5): 990–995 (in Chinese) [杨宙, 康美花, 刘建华, 裴冬莲, 张标金, 张晓宁, 曹丰生. 2014. 抗虫基因 *cryIAb/Ac* 在水稻杂交转育后代中的表达效应. 江西农业大学学报, 36(5): 990–995]
- Zhang GL, Han CX, Yao HW, Ye GY. 2007. Susceptibility of rice lepidopterans to four insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. Plant Protection, 33(6): 78–80 (in Chinese) [张广林, 韩成香, 姚洪渭, 叶恭银. 2007. 水稻螟虫对 4 种 Bt 杀虫蛋白的敏感性测定. 植物保护, 33(6): 78–80]

(责任编辑:王璇)