

转基因水稻的抗虫性初探^{*}

张良佑¹ 吴洪基² 萧整玉¹ 许新萍² 胡明² 李宝健²

(1 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2 中山大学生物工程研究中心)

摘要 用基因枪技术将雪花莲外源凝集素基因和大豆胰蛋白酶抑制剂基因, 分别转化到水稻的胚性愈伤组织, 经过筛选再生分别得到转基因 I 和转基因 II 植株. 采用生物测定方法, 并按照国际标准鉴定方法, 将上述转基因稻株对褐稻虱、稻纵卷叶螟和三化螟进行了抗虫性鉴定, 结果表明: (1) 测试的转基因 I 稻株中, 对褐稻虱表现抗性的占测定总数的 26.7%; (2) 测试的转基因 II 稻株中, 对稻纵卷叶螟和三化螟表现抗性的, 分别占测定总数的 30.18% 和 1.5%; (3) 上述转基因稻株与原种(台北 309)及感虫对照种(TN₁ 或 Rexoro)对比, 后者皆表现高感或感虫, 而前者均表现出具有不同程度的抗虫性, 还出现了不少高抗的株系, 说明转基因稻株已从外源基因中获得了抗虫性, 该研究已成功地进行了抗虫稻株的基因转化.

关键词 转基因水稻; 抗虫性; 基因转化

中图分类号 S 433.1

现代分子生物学特别是植物基因工程的迅速发展, 为防治虫害提供了一条新的途径. 使用基因工程手段, 将抗虫基因引入到农作物的细胞中, 并使其在寄主细胞内得到遗传和表达, 从而形成抗虫新品系. 它与传统的害虫防治方法相比, 不仅具有选择性强、使用安全、投资少、见效快的优点, 而且对于植物的保护作用具有连续性和全面性. 周兆澜等(1994)报导, 雪花莲外源凝集素(Galanthus nivalis Agglutinin, GNA)以及麦胚凝集素对稻褐飞虱有毒性作用, GNA 还能抑制桃蚜的生长. Hilder 等(1987)报导了豇豆胰蛋白酶抑制剂(Cowpea Trypsin Inhibitor, CpTI)转基因烟草植株对烟芽夜蛾的抑制效果. 刘春明等(1992)分离克隆了豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因并把它转入烟草中, 获得了抗棉铃虫转基因烟草. 而抗虫转基因的水稻, 尚少见详细的研究报导. 近年来, 经华南生物科学与研究中心(以下简称“华南中心”)组织, 由中山大学李宝健教授牵头, 华南农业大学、中国科学院华南植物研究所、广东省农业科学院参加, 组成多学科的科技队伍, 对“应用基因工程培育抗虫水稻新品种”的研究进行联合攻关. 开展工作 1 年多以来取得了很大的进展, 已完成了载体构建和基因转化, 获得了含抗虫基因的当代(R₀)及第一代(R₁)转基因水稻植株. 我们将这些转基因稻株对褐稻虱、稻纵卷叶螟和三化螟进行了抗虫性鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试水稻 转基因水稻和原种(台北 309)由中山大学生物工程研究中心植物基因工程研究室提供.

1997-07-21 收稿 张良佑, 男, 58 岁, 副教授

^{*} 广东省“九·五”重点科技攻关资助项目

对照品种包括抗性对照种 M udgo (抗褐稻虱), PTB₃₃、TKM₆ (抗稻纵卷叶螟), IR₃₆ (抗三化螟), 感虫对照种 TN₁ (对褐稻虱和稻纵卷叶螟敏感) 和 Rexoro (对三化螟敏感) 由华南农业大学抗虫性研究组从 IRRI 引进.

1.1.2 供试虫源 褐稻虱由华南农业大学抗虫性研究组从广州郊区稻田采集, 在养虫室内用感虫品种饲养多代的生物型 I .

稻纵卷叶螟是从华南农业大学实验农场田间采集的卷叶苞, 在室内饲养至成虫供试.

三化螟是从华南农业大学实验农场田间采集的卵块, 带回室内贮存在冰箱中备用.

1.2 方法

1.2.1 转基因水稻的获得 转基因水稻由中山大学生物工程研究中心植物基因工程研究室用基因枪技术将雪花莲外源凝集素 (GNA) 基因和大豆胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Trypsin Inhibitor) 基因 (两个基因均由美国康奈尔大学吴瑞教授赠送), 分别转化到水稻品种台北 309 的胚性愈伤组织, 经过筛选再生得到转基因植株.

1.2.2 抗虫性鉴定 转基因水稻的抗虫性鉴定, 由华南农业大学抗虫性研究组将供试稻株 (包括转基因植株、原种和抗、感对照品种) 种植在网室的水泥池中, 每品种 (株系) 1 行 3 ~ 5 丛, 随机排列, 每隔 5 行插抗、感品种各 1 行, 设 3 次重复. 然后用尼龙纱笼罩住水泥池, 以防其它害虫侵入. 待测.

(1) 对褐稻虱的抗性鉴定: 用群体筛选法 (吴荣宗等, 1984) 进行抗褐稻虱的鉴定, 即当秧龄为 4、5 片叶时, 平均每苗接入褐稻虱 2 ~ 3 龄若虫 5 ~ 6 头, 当感虫对照品种的植株全部死亡时, 评定供试材料死苗百分率, 由死苗率 (%) 折算成抗性级别 (见表 1).

(2) 对稻纵卷叶螟的抗性鉴定: 要求当水稻分蘖盛期正处于螟蛾盛发期, 每池接入刚羽化的成虫 40 ~ 50 对, 并在笼内四周挂上体积分数为 20% 蜜糖液作为成虫补充营养. 接蛾后 2 周进行评级, 当感虫对照的植株至少有 60% 的叶片被害时, 才认为鉴定有效. 评级方法是: 根据叶片的受害程度确定受害等级 (0 ~ 3 级, 即叶片没有受害为 0 级; 叶片最多 1/3 受害为 1 级, 叶片 1/3 ~ 1/2 受害为 2 级; 叶片超过 1/2 受害为 3 级), 计算损害级别; 再根据感虫对照种的损害级别换算成校正损害级别. 然后将校正损害级别换算成抗性级别 (见表 1).

损害级别 (%) = $\left[\frac{1 \text{ 级叶片数} \times 100}{\text{观察叶片总数}} + \frac{2 \text{ 级叶片数} \times 100}{\text{观察叶片总数}} + \frac{3 \text{ 级叶片数} \times 100}{\text{观察叶片总数}} \right] / 6,$

校正损害级别 (%) = (供试材料的损害级别 / 感虫对照种的损害级别) × 100.

(3) 对三化螟的抗性鉴定: 鉴定时间要求在秧苗移植后 2 ~ 3 周内, 正是螟蛾的盛发高峰期, 以便能获得大量的卵块. 采回带叶的卵块放入底部有湿棉花的瓶内, 贮存在冰箱 (8 ~ 10℃) 中备用. 秧苗移植后 3 周左右, 将卵块从冰箱移出置于养虫室室内, 待孵化后用毛笔将初孵幼虫小心挑在供试品种的新叶或叶耳上, 每丛接幼虫 10 头. 接虫后 2 和 4 周, 分别计算枯心率和校正枯心率. 根据校正枯心率进行评级 (见表 1).

枯心率 (%) = (枯心苗数 / 观察的总苗数) × 100,

校正枯心率 (%) = (鉴定品种的枯心率 / 相邻感虫对照种的平均枯心率) × 100.

表 1 评级标准

抗性级别 ¹⁾	死苗率 ²⁾ (%)	校正损害级别 ³⁾ (%)	校正枯心率 ⁴⁾ (%)
0	0	0	0
1	1~2	1~10	1~10
3	3~25	11~30	11~30
5	26~50	31~50	31~50
7	51~80	51~75	51~80
9	81~100	> 75	81~100

1) 抗性级别中的 0~1 级为高抗; 3 级为抗; 5 级为中抗; 7 级为感虫; 9 级为高感; 2)、3)和 4)分别为褐稻虱、稻纵卷叶螟和三化螟的评级标准

2 结果分析

在测试了转基因 I (即含雪花莲外源凝集素基因)的 135 个转基因株系中(见表 2),对褐稻虱表现高抗(1 级)的有 5 个,占测定总数的 3.7%;表现抗(3 级)的有 12 个,占测定总数的 8.9%,表现中抗(5 级)的有 19 个,占测定总数的 14.1%,即对褐稻虱表现抗性(中抗以上的)的共 36 个株系,占测定总数的 26.7%,显示出转基因 I 当代(R₀)植株对褐稻虱表现抗性的有 26.7%.

表 2 转基因水稻的抗虫性鉴定结果¹⁾

害虫名称	品种或株系	鉴定总数	平均抗性级别					抗虫植株 (%)
			1	3	5	7	9	
褐稻虱 (BPH)	转 基 因 I ²⁾	135	5	12	19	35	64	26.70
			(3.7)	(8.9)	(14.1)	(25.9)	(47.4)	
	台 北 309 (O—CK)	6	0	0	0	0	6	
							(100)	
	TN ₁ (S—CK)	6	0	0	0	0	6	
稻纵卷叶螟 (RCW)							(100)	
	Mudgo (R—CK)	6	6	0	0	0	0	
			(100)					
	转 基 因 II ²⁾	53	0	6	10	18	19	30.18
				(11.32)	(18.87)	(33.96)	(35.85)	
三化螟 (YRB)	台 北 309 (O—CK)	6	0	0	0	0	6	
							(100)	
	TN ₁ (S—CK)	6	0	0	0	0	6	
							(100)	
	TKM ₆ (R—CK)	6	0	6	0	0	0	
				(100)				
	PTB ₃₃ (R—CK)	6	6	0	0	0	0	
			(100)					
	转 基 因 II ²⁾	133	0	1	1	12	119	1.5
				(0.75)	(0.75)	(9.03)	(89.47)	
	台 北 309 (O—CK)	6	0	0	0	1	5	
						(16.66)	(83.34)	
	Rexoro (S—CK)	6	0	0	0	0	6	
							(100)	
	IR ₃₆ (R—CK)	6	1	5	0	0	0	
			(16.66)	(83.34)				

1) 括号内的数字表示占鉴定总数的百分率; 2) 转基因 I 为含雪花莲(外源)凝集素基因的转基因当代(R₀)植株; 转基因 II 为含大豆胰蛋白酶抑制剂基因的转基因当代(R₀)植株

在测试了转基因 II (即含大豆胰蛋白酶抑制剂基因) 的 53 个转基因株系中, 对稻纵卷叶螟表现抗级(3 级)和中抗(5 级)的各有 6 和 10 个, 分别占测定总数的 11.32% 和 18.87%, 显示出转基因 II 当代(R_0)植株对稻纵卷叶螟表现抗性的高达 30.18%。

在测试了转基因 II 的 133 个转基因株系中, 对三化螟表现抗级(3 级)和中抗(5 级)的各有 1 个株系, 各占测定总数的 0.75%, 其余的 131 个株系均对三化螟表现感虫或高感, 显示出供试的转基因 II 当代(R_0)仅有为 1.5% 的植株对三化螟表现抗虫性。

上述转基因(I 和 II)植株与原种(台北 309)及感虫对照种(TN₁ 或 Rexoro)对比, 后者均表现高感(9 级)或中感(7 级), 而前者均表现出具有不同程度的抗虫性, 还出现了不少高抗的株系, 说明上述转基因稻株已从外源基因中获得了抗虫性, 证实本项研究已成功地进行了抗虫稻株的基因转化。

3 讨论与结论

近几年来, 基因枪法应用于水稻的转化, 取得了进展。Christou 等(1991)以水稻的幼胚为材料获得了成功; Cao 等(1992)用这一方法以水稻的悬浮液细胞为受体, 将 BAR 基因转入水稻; 郑宏红等(1996)用基因枪将带有 HTP 基因的粒子轰击其盾片, 经过筛选及植株再生, 获得了转基因植株, 再经 PCR 扩增反应及 Southern 杂交法的鉴定, 证明了外源基因已整合入水稻的基因组。本文采用的转基因水稻是由中山大学植物基因工程研究室用基因枪技术将雪花莲外源凝集素基因和大豆胰蛋白酶抑制剂基因, 分别转化到水稻品种台北 309 的胚性愈伤组织, 经过筛选再生获得转基因 I 和转基因 II 植株(待发表)。用生物测定的方法, 直接将水稻害虫(褐稻虱、稻纵卷叶螟和三化螟)释放到上述转基因植株上, 并严格按照国际标准的鉴定方法进行了抗虫性鉴定。结果表明: 雪花莲外源凝集素(GNA)转基因水稻当代植株对褐稻虱的抗虫植株达到 26.7%; 大豆胰蛋白酶抑制剂转基因水稻当代植株对稻纵卷叶螟的抗虫植株高达 30.18%; 对三化螟的抗虫植株为 1.5%; 但未经转化的原种(台北 309)却不具抗性, 对上述害虫表现高感或感虫, 而转基因植株则表现出具有不同程度的抗虫性, 还出现了不少高抗株系, 说明上述转基因植株已从外源基因中获得了抗虫性, 证实本研究已成功地进行了抗虫稻株的基因转化。至于把抗虫基因转化到大规模推广的栽培稻中, 则有待于今后进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 刘春明, 朱 祯, 周兆澜, 等. 1992. 豇豆胰蛋白酶抑制剂抗虫转基因烟草的获得. 科学通报, 18: 1694~1697
- 刘春明, 朱 祯, 周兆澜, 等. 1993. 豇豆胰蛋白酶抑制剂 cDNA 在大肠杆菌中的克隆与表达. 生物工程学报, 9(2): 152~157
- 朱新生, 朱玉贤. 1977. 抗虫植物基因工程研究进展. 植物学报, 39(3): 282~288
- 吴荣宗, 张良佑, 邱细广. 1984. 水稻品种抗褐稻虱筛选方法的研究. 植物保护学报, 11(3): 145~153
- 郑宏红, 何锬洁, 戴顺洪, 等. 1996. 提高水稻基因枪转化效率的研究. 生物工程学报, 12(增刊): 111~115
- 周兆澜, 朱 祯. 1994. 植物基因工程研究进展. 生物工程进展, 14(4): 18~24
- Cao Jun, Duan Xiaolan, McElroy D et al. 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Reports, 11: 586~591

(下转第 19 页)

supported by an oviposition bioassay experiment ($n=5$) which was conducted with the glucosinolates extracts from the seeds of *Brassica parachinensis* at seven serial diluted concentrations at a range from 10% to 0.001%. The linear regression relationship between the number of eggs laid and the concentration of glucosinolates was highly significant ($r=0.9116$, $P<0.01$). The results of the non-choice and its glucosinolates all accelerated DBM oviposition and increased the number of eggs laid. The results in these experiments demonstrated that glucosinolates played on attractive and stimulant for DBM oviposition, and played an important role in host-plant selection.

Key words *Plutella xylostella* (L.); glucosinolate; oviposition preference

(上接第 7 页)

Christou P, Ford T L, Kofron M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio-Technology*, 9(10): 957~962

Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E, et al. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160~163

PRELIMINARY STUDIES ON THE INSECT RESISTANCE OF TRANSGENIC RICE

Zhang Liangyou¹ Wu Hongji¹ Xiao Zhengyu¹ Xu Xinping² Hu Ming² Li Baojian²

(¹ College of Natural Resources & Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642

² Biotechnology Research Center of Zhongshan Univ.)

Abstract

With the particle gun, the gene of *GaInathus nivalis* agglutinin (GNA) and gene of soybean Trypsin Inhibitor were introduced into the calli of the rice Taibei 309, respectively. After screening for resistant activity and plant regeneration, transgenic plants I and II were obtained respectively. According to the international standard, bioassays showed that both transgenic plants I and II had insect-resistant activity. Of which, the rate of insect-resistant plants of the transgenic plant I to the brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stal) was 26.7%, and that of the transgenic plant II to the rice case worm (*Cnaphalocrocis medinalis* Guenee) and the yellow rice borer [*Scirpophaga incertulus* (Walker)] were 30.18% and 1.5%, respectively.

Key words transgenic; resistance-insect; gene conversion