

# 转基因抗虫性水稻恢复系选育及特性分析

高方远<sup>1 2 3</sup> 陆贤军<sup>2 3</sup> 何树林<sup>3 4</sup> 陈晓娟<sup>3 4</sup> 卢代华<sup>3 4</sup> 孙淑霞<sup>2 3</sup> 李治华<sup>2 3</sup>

刘光春<sup>2 3</sup> 张义正<sup>1</sup> 任光俊<sup>2 3,\*</sup>

(<sup>1</sup>四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610041; <sup>2</sup>四川省农业科学院 作物研究所, 四川 成都 610066; <sup>3</sup>四川省农业科学院 国家水稻区域技术创新中心, 四川 成都 610066; <sup>4</sup>四川省农业科学院 植物保护研究所, 四川 成都 610066; \* 通讯联系人, E-mail: rgj80@hotmail.com)

## Breeding and Characteristic Analysis of a Rice Restorer Line with *Bt* Resistance Gene

GAO Fang yuan<sup>1 2 3</sup>, LU Xian jun<sup>2 3</sup>, HE Shu lin<sup>3 4</sup>, CHEN Xiao juan<sup>3 4</sup>, LU Dai hua<sup>3 4</sup>, SUN Shu xia<sup>2 3</sup>, LI Zhi hua<sup>2 3</sup>, LIU Guang chun<sup>2 3</sup>, ZHANG Yi zheng<sup>1</sup>, REN Guang jun<sup>2 3,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; <sup>3</sup>Innovation Center of Rice Regional Technology, Ministry of Agriculture, Chengdu 610066, China; <sup>4</sup>Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; \* Corresponding author, E-mail: rgj80@hotmail.com)

**Abstract:** Bt5198, a new rice restorer line with *Bt* resistance gene, was developed from the cross and backcross of the elite restorer line Chenghui 177 with rice blast resistance and Bt Minghui 63, a *Bt* transgenic restorer line. The inbred lines were evaluated by using PCR amplification, test paper evaluation, insect resistance evaluation in greenhouse and paddy fields, nursery evaluation of rice blast resistance and pedigree selection of agronomic traits. Larval mortalities on Bt5198 and Bt Minghui 63 were both 100% when the eggs of the striped stemborer (SSB) were inoculated on rice culms in laboratory, and Bt5198 was highly resistant against SSB and the yellow stemborers (YSB) under field conditions. The F<sub>1</sub> hybrids derived from Bt5198 and four cytoplasmic male sterile lines were also highly resistant against SSB and YSB, and had a significant heterosis. Two year evaluation of rice blast resistance confirmed that the resistance levels to leaf blast and neck blast in Bt5198 were similar to those in Chenghui 177 and significantly higher than those in Bt Minghui 63. The ability of seed germination and pollen yield of Bt5198 were similar with Chenghui 177, suggesting that the introduction of *Bt* gene into the new restorer line had no significant influence on seed vigor and seed production yield. To identify the *Bt* gene, it is effective to combine test paper examination with the evaluation of insect resistance in laboratory and under field conditions.

**Key words:** hybrid rice; *Bt* gene; insect resistance; *Magnaporthe oryzae*; seed germination rate; pollen yield; restorer line

**摘要:** 将优质抗稻瘟病水稻恢复系成恢 177 与转基因水稻 Bt 明恢 63 杂交并回交 1 次, 采用 PCR 分析、试纸条检测、室内和田间人工接虫鉴定抗虫性, 并结合系谱法选择农艺性状, 病圃接种鉴定稻瘟病抗性, 育成具转基因抗虫性的水稻新恢复系 Bt5198。采用离体茎秆法接种二化螟卵块, 新恢复系 Bt5198 和 Bt 明恢 63 的幼虫死亡率均为 100%。在田间人工接虫条件下, 该恢复系对二化螟和三化螟均表现高抗, 与 4 个不育系配制的杂种 F<sub>1</sub> 仍保持良好的抗虫性, 且杂种优势明显。两年稻瘟病抗性鉴定结果表明, 新恢复系 Bt5198 的叶瘟和颈瘟抗性水平与成恢 177 相当, 明显优于 Bt 明恢 63。Bt5198 的种子发芽率和花粉量与成恢 177 相当, *Bt* 基因导入水稻恢复系不会对种子生活力和制种产量造成显著影响。在无选择标记基因的转基因后代中, 结合利用试纸条检测和室内、田间人工接虫鉴定是筛选 *Bt* 基因抗虫性的有效方法。

**关键词:** 杂交稻; *Bt* 基因; 抗虫性; 稻瘟病菌; 发芽率; 花粉量; 恢复系

中图分类号: Q943 .1; S435 .112<sup>+</sup> 1; S511 .034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2008)04-0353-06

鳞翅目昆虫是水稻产区的主要害虫, 仅二化螟 [ *Chilo suppressalis* (Walker) ]、三化螟 [ *Scirpophaga incertulas* (Walker) ] 等害虫在亚洲造成的稻谷损失就占总产的 10% 左右<sup>[1]</sup>。而广泛使用化学农药防治既增加了生产成本, 又污染了生态环境。

依靠遗传转化技术导入外源抗虫基因是目前控制水稻害虫的重要途径之一。已有较多研究将外源 *Bt* 基因导入籼稻或粳稻品种获得高抗螟虫的转基因水稻<sup>[2-5]</sup>。但有研究报道, 转基因当代植株及其自交衍生后代的农艺性状与原亲本相比普遍较差, 难以直接利用。而以转基因材料为供体, 与农艺性

状优良、优质、高产的籼稻或粳稻品种杂交, 是选育兼具优良农艺性状和抗虫特性新品系的有效途径<sup>[6-8]</sup>。

为此, 本研究以转基因水稻 Bt 明恢 63 为供体, 以优质抗稻瘟病籼稻恢复系成恢 177 为受体, 育成了具转基因抗虫性的抗稻瘟病新恢复系。同时对该恢复系的抗虫性、稻瘟病 ( *Magnaporthe oryzae* ) 抗

收稿日期: 2007-10-31; 修改稿收到日期: 2008-04-30。

基金项目: 国家转基因研究与产业化开发专项基金资助项目 (JY03-B-11)。

第一作者简介: 高方远 (1971-), 女, 副研究员。

性、所配组合的杂种优势以及种子发芽率、花粉量等特性进行了分析,旨在为转 *Bt* 基因抗虫水稻的育种利用提供科学依据和理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料构建

2001 年,以优质抗稻瘟病籼稻恢复系成恢 177<sup>[9]</sup> 为母本,以去选择标记的转基因恢复系 *Bt* 明恢 63<sup>[10]</sup> (华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供)为父本杂交,并以成恢 177 为母本回交一次后自交。采用系谱法选择综合农艺性状,试纸条跟踪检测 *Bt* 基因表达,病圃接种鉴定稻瘟病抗性。杂交后代种植在四川省农业科学院的温室内。

用 G46A 和金 23A 测交,初步鉴定成恢 177 与 *Bt* 明恢 63 杂交后代的单株配合力、恢复力和杂种  $F_1$  生育期。于 2006 年培育成功具转基因抗虫性的水稻新恢复系 *Bt*5198。用 4 个不育系 (G46A、中 9A、D62A 和川香 29A) 测定 *Bt*5198 的恢复力和产量杂种优势。

### 1.2 抗虫性鉴定

分别用 PCR 分析、试纸条检测、离体茎秆接种测定和田间接虫法鉴定水稻新恢复系 *Bt*5198 及其所配杂交组合的抗虫性。

#### 1.2.1 PCR 检测

水稻叶片 DNA 提取参照 Murray 等<sup>[11]</sup> 的方法,略作修改。*Bt* 基因检测参见 Tu 等<sup>[4]</sup> 方法,可扩增出 *Bt* 基因中的 1.83 kb 片段。正向引物为 BTF, 5'-TTCAGCCTCGAGTGTTGCAG-3'; 反向引物为 BTR, 5'-ATGGACAACAACACTGCAGG-3'。

#### 1.2.2 试纸条检测

取水稻叶片于 1.5 mL 离心管中研磨,并以蒸馏水抽提和稀释,将 BT-Cry1Ab/1Ac 金标免疫检测试纸条 (北京银土地生物技术有限公司) 插入样品液,3~5 min 后观察结果。在试纸条上出现 1 条检测线和 1 条质控线为阳性 (含 *Bt* 基因毒蛋白), 记为“+”; 仅出现 1 条质控线为阴性 (无 *Bt* 基因毒蛋白), 记为“-”。

#### 1.2.3 离体茎秆接种测定

二化螟卵块采自四川省成都地区稻田,待蚁螟孵化后供试验用。各供试材料随机取 5 株,剪取植株下部 6 cm 长茎秆,用细毛笔在每根茎秆上接 30 头二化螟蚁螟,置于加有 2 mm 清水的小玻管 (15 mm × 150 mm) 底部,管口滤纸密封。接虫后第 5 天剥查并记载幼虫死亡数和活虫数,计算幼虫死亡率。

### 1.2.4 田间接虫鉴定

二化螟和三化螟卵块分别采自四川省成都市和德阳市田间灯诱螟蛾。二化螟和三化螟抗虫性鉴定小区试验各设 6 个处理,重复 3 次,共计 36 个试验小区,小区随机排列,面积 1.5 m<sup>2</sup> (1.5 m × 1.0 m), 每小区种植 30 株水稻 (6 × 5), 接种 30 个卵块,每株接种 1 个卵块。二化螟试验小区于移栽返青后接种二化螟卵块,6 月下旬枯心稳定后全区调查枯心数。三化螟试验小区于 7 月中旬接种三化螟卵块,8 月中下旬白穗稳定后全区调查白穗数。分别计算枯心率和白穗率。

### 1.3 稻瘟病抗性鉴定

在水稻 4~5 叶期采用混合菌株喷雾接种,于分蘖中、后期,病圃叶瘟进入流行盛期后调查叶瘟,1 周后复查 1 次; 于稻谷黄熟期,颈瘟病情稳定后,调查颈瘟,1 周后复查 1 次。病情记载与评价标准按农作物品种审定规范《水稻抗主要病虫害评价标准》进行。

### 1.4 农艺性状调查

2006 年 4 月在四川省成都市播种新恢复系 *Bt*5198 及其所配杂交组合,以 优 838 作对照。田间采用随机区组排列,3 次重复,记录生育期,成熟时每个小区随机取 10 株调查株高、有效穗数、穗长、结实率、千粒重和单株产量。

### 1.5 发芽试验

采用室内发芽和直播苗床两种方法测定新恢复系 *Bt*5198 及对照成恢 177 的发芽率。

室内发芽试验: 每次选用 100 粒饱满成熟种子,浸种 48 h 后,35℃ 催芽过夜,置于垫有两层湿润滤纸的培养皿中,于室内适宜条件下培养,分别于催芽后 3 d 和 7 d 统计发芽率。每次试验重复 3 次。

直播试验: 取饱满成熟种子 100 粒,直播于苗床,10 d 后统计发芽率。每次试验重复 3 次。

### 1.6 花粉量比较试验

随机收取新恢复系 *Bt*5198 及对照成恢 177 的 50 个主穗穗头。用剪刀剪成 2~3 mm 片段。混合后从 200 朵花中随机采取 500 个花药,将花药置于装有 100 μL 1 mol/L 蔗糖溶液的离心管 (1.5 mL) 中。用镊子充分捣碎花药后,加入 900 μL 1 mol/L 的蔗糖溶液,使所有花粉释放至溶液中。用旋涡仪混合均匀后,从中吸取 100 μL 至另一离心管 (1.5 mL) 中,加入 900 μL 1 mol/L 的蔗糖溶液至 1000 μL。混合均匀后取样 5 μL 滴于载玻片上,并加入 5 μL I<sub>2</sub>-KI 染色,在 10 倍显微镜下统计花粉数,并根

据稀释倍数计算花粉量。所有测定均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 选育经过

成恢 177 系四川省农业科学院作物研究所培育的恢复系,聚合了多抗、高配合力、广适性中籼恢复系绵恢 502 (871028) 和美国广亲和高光效种质 Lemont 的亲缘<sup>[9]</sup>。父本 Bt 明恢 63 系 Tu 等<sup>[4]</sup>于 2000 年通过遗传转化将 *Bt* 基因导入明恢 63 中获得,已去除筛选标记基因<sup>[10]</sup>。利用 PCR 分析和试纸条检测 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 单株中的 *Bt* 基因,从 BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> 开始仅用试纸条检测 *Bt* 基因,并进行室内和田间人工接虫鉴定。从 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 起,着重选择株叶型优、抗倒力好、中迟熟、结实率高的单株或株系,在 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> 中进行稻瘟病抗性筛选。中高世代材料与 G46A、金 23A 等不育系测配,选育出集抗虫性、稻瘟病抗性和强恢复性为一体的优良恢复系 Bt5198。

### 2.2 抗虫恢复系特性分析

#### 2.2.1 抗虫性分析

##### 2.2.1.1 *Bt* 基因检测

用 PCR 方法检测 Bt 明恢 63、成恢 177、F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 及 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 单株中的 *Bt* 基因,并用试纸条检测 Bt 毒蛋白表达。结果表明 Bt 明恢 63 及杂种 F<sub>1</sub> 能扩增出 1.83 kb 片段,在试纸条上显示 2 条带,表现为阳性;成恢 177 没有扩增出 1.83 kb 条带,在试纸条上仅呈现 1 条带,表现为阴性(图 1 A、B)。

析结果进一步显示,在 48 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 单株中,阳性与阴性单株符合 1 : 1 分离比例;在 300 株 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 群体中阳性与阴性比为 219 : 81,符合 3 : 1 分离比例,表明外源 *Bt* 基因是一个单显性基因,遵循孟德尔分离规律。此外,所有检测单株的 PCR 结果与试纸条检测结果完全吻合。因试纸条检测较 PCR 分析更加方便快捷,自 BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> 起,仅采用试纸条追踪检测 *Bt* 基因。

#### 2.2.1.2 恢复系及配制组合的抗虫性分析

从 BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> 开始,在试纸条检测基础上,对各世代自交单株进行室内和田间人工接虫鉴定。选择在室内接虫试验中幼虫死亡率为 100%,且田间接虫后无枯心和白穗出现的单株进一步自交,结合配合力分析于 BC<sub>1</sub>F<sub>7</sub> 获得集抗虫性和高配合力为一体的优良恢复系 Bt5198。

2006 年采用离体茎秆接虫法测定 Bt 明恢 63、成恢 177、Bt5198 及其与 4 个不育系所配组合的抗虫性。结果显示,接虫 5 d 后在非转基因对照成恢 177 植株的茎秆里可见大量虫粪,虫体变大,活动能力强。而在 Bt 明恢 63、Bt5198 及其与 4 个不育系配制的杂种 F<sub>1</sub> 植株茎秆里面几乎见不到虫粪,幼虫死亡率为 100%(表 1)。表明在室内人工接虫条件下,Bt5198 及其所配组合对二化螟幼虫表现高抗,进一步推测 *Bt* 基因在纯合和杂合状态下均具有良好的抗虫性。

田间接虫鉴定结果表明,对照成恢 177 的枯心率和白穗率分别为 17.5% 和 18.2%,而 Bt 明恢 63、

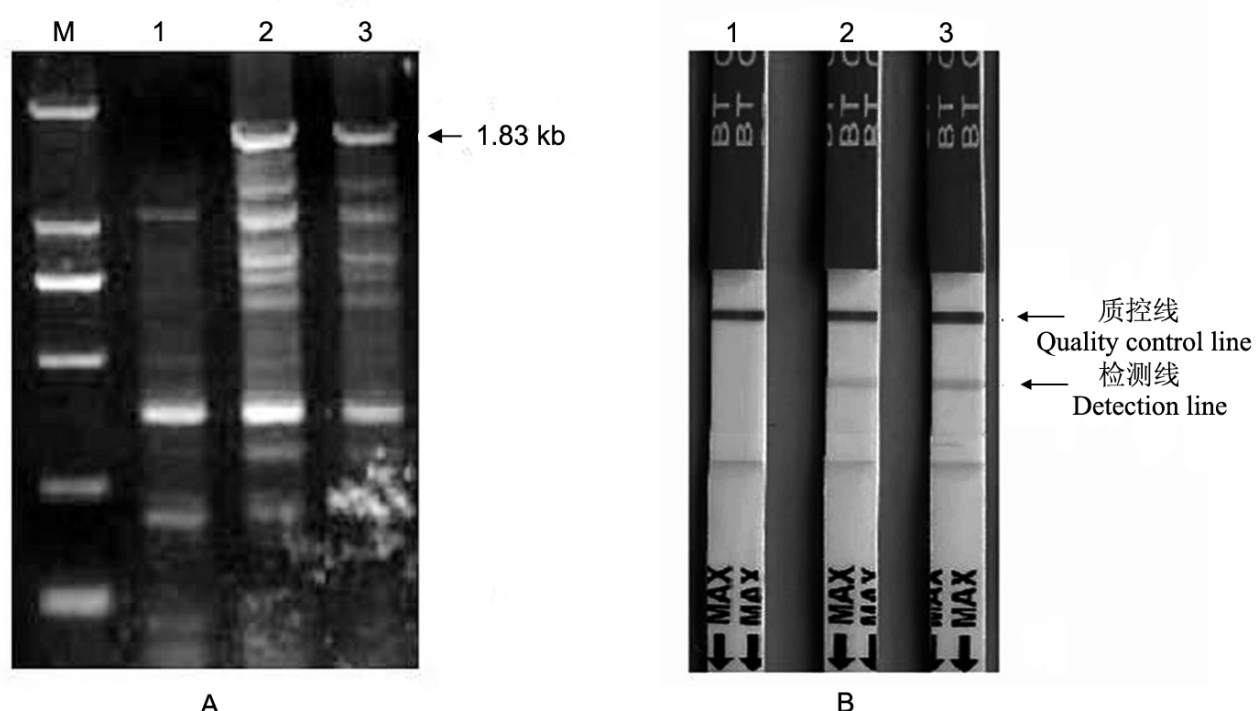


图 1 *Bt* 基因 PCR 分析(A)及试纸条检测(B)

Fig. 1. PCR analysis of total genomic DNA (A) and test paper examination of Bt protein(B).

M - DNA 分子量标准(DL2000); 1 - 成恢 177; 2 - Bt 明恢 63; 3 - F<sub>1</sub> (Bt 明恢 63/成恢 177)。

M, DNA marker ladder(DL2000); 1, Chenghui 177; 2, Bt Minghui 63; 3, F<sub>1</sub> (Bt Minghui 63/Chenghui 177)。

表 1 水稻新恢复系 Bt5198 及其所配组合对二化螟和三化螟的抗性

Table 1. Resistance reactions of the new rice restorer line Bt5198 and its hybrid combinations to *C. suppressalis* and *S. incertulas*.

材料 Material	试纸条检测 <sup>1)</sup> Test paper examination (+ - ) <sup>1)</sup>		幼虫死亡率 Dead larvae rate /%	枯心率 <sup>2)</sup> Percentage of dead hearts <sup>2)</sup> /%	白穗率 <sup>3)</sup> Percentage of white heads <sup>3)</sup> /%
	Bt 明恢 63 Bt Minghui 63	20	0	100	0.0 (11.6)
成恢 177 Chenghui 177	0	20	12	17.5 (10.5)	18.2 (9.4)
Bt5198	20	0	100	0.0 (11.6)	0.0 (9.4)
G46A/Bt5198	20	0	100	0.0 (10.5)	0.0 (9.2)
D62A/Bt5198	20	0	100	0.0 (9.8)	0.0 (9.2)
中 9A/Bt5198 Zhong 9A/Bt5198	20	0	100	0.0 (11.3)	1.2 (8.3)
川香 29A/Bt5198 Chuanxiang 29A/Bt5198	20	0	100	0.0 (10.9)	0.0 (9.3)

<sup>1)</sup> 20 个单株检测结果。<sup>2)</sup> 6 月 30 日调查分蘖数和枯心数。枯心率 = 枯心数/分蘖数 × 100% ; 括号中的数据为 3 次重复 90 个单株的平均分蘖数。<sup>3)</sup> 8 月 20 日调查有效穗数和白穗数。白穗率 = 白穗数/有效穗数 × 100% ; 括号中的数据为 3 次重复 90 个单株的平均有效穗数。

<sup>1)</sup> Test paper examination based on 20 individual plants. <sup>2)</sup> Number of rice tillers and dead hearts recorded on June 30. Percentage of dead hearts = No. of dead hearts / No. of tillers per plant × 100%. Data in brackets are the average number of tillers of 90 plants in three replications. <sup>3)</sup> Number of rice panicles and white heads recorded on August 20. Percentage of white heads = No. of white heads / No. of panicles per plant × 100%. Data in brackets are the average number of panicles of 90 plants in three replications.

Bt5198 及其所配大部分组合对二化螟和三化螟均具有很高的抗性, 枯心率和白穗率均为 0%, 仅中 9A/Bt5198 组合少量受害(表 1)。

### 2.2.2 稻瘟病抗性分析

对初步筛选抗虫性较好的后代材料(BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub>) , 以 Bt 明恢 63、成恢 177 为对照进行苗期混合菌种喷雾接种, 选择两年鉴定叶瘟和颈瘟均 4 级的株系进一步测定配合力, 于 BC<sub>1</sub>F<sub>7</sub> 获得集抗虫性和高配合力为一体的抗稻瘟病新恢复系 Bt5198。2005 年、2006 年对新恢复系的稻瘟病抗性鉴定结果表明, Bt5198 抗性水平与成恢 177 相当, 但明显优于 Bt 明恢 63(表 2)。

### 2.2.3 与不育系配制组合的优势表现

具转基因抗虫性的新恢复系 Bt5198 具有较强的恢复力。与 4 个不育系配制 F<sub>1</sub> 的结实率为 76.2% ~ 81.2%, 平均为 78.6%, 与对照 优 838 相似(表 3)。与不育系所配组合的平均单株产量等

表 2 水稻新恢复系 Bt5198 的稻瘟病抗性

Table 2 Resistance reactions of the new restorer line Bt5198 to *M. oryzae*.

材料 Material	叶瘟 Leaf blast /Grade		颈瘟 Neck blast /Grade	
	2005	2006	2005	2006
	Bt 明恢 63 Bt Minghui 63	9	9	9
成恢 177 Chenghui 177	4	3	3	2
Bt5198	2	3	3	3

于或高于对照, 表明 Bt 基因对恢复能力和杂种优势无不良影响。从播抽历期来看, Bt5198 与 G46A、中 9A 和 D62A 配制组合与同熟期对照 优 838 相当; 川香 29A/Bt5198 组合较 优 838 长 5.5 d, 在成都地区播种较晚, 灌浆结实期光温条件不足, 导致其增产幅度较小。该组合在长江中下游稻区种植有望获得高产。

表 3 水稻新恢复系 Bt5198 所配杂种 F<sub>1</sub> 的主要农艺性状Table 3. Major agronomic traits of the F<sub>1</sub> hybrids derived from the new restorer line Bt5198.

组合 Combination	每穴有效穗数 No. of panicles per hill	株高 Plant height/cm	穗长 Panicle length/cm	结实率 Seed setting rate/%	千粒重 1000 grain weight/g	单株产量 Yield per plant/g	播抽历期 Days from sowing to heading/d
G46A/Bt5198	9.2 ± 2.2	120.8 ± 2.5	25.6 ± 1.0	81.2 ± 2.5	27.9 ± 0.6	36.5 ± 2.7	118.7 ± 0.0
D62A/Bt5198	9.0 ± 1.9	118.5 ± 1.8	26.8 ± 0.8	77.5 ± 3.0	28.3 ± 0.4	34.3 ± 2.5	120.0 ± 0.5
中 9A/Bt5198 Zhong 9A/Bt5198	8.7 ± 1.5	122.5 ± 2.2	26.2 ± 0.7	79.5 ± 3.2	28.1 ± 0.6	33.6 ± 2.9	118.3 ± 0.0
川香 29A/Bt5198 Chuanxiang 29A/Bt5198	9.5 ± 1.8	121.2 ± 2.0	26.8 ± 0.4	76.2 ± 2.2	30.0 ± 0.5	32.7 ± 4.3	123.7 ± 0.0
优 838 you 838(CK)	8.4 ± 1.2	121.7 ± 2.2	26.8 ± 0.9	77.6 ± 2.1	30.2 ± 0.5	32.4 ± 3.0	118.2 ± 0.0

表4 水稻新恢复系 Bt5198 的发芽率

Table 4 . Germination rate of the new rice restorer line Bt5198 . %

材料 Material	室内发芽率 Germination rate indoor		直播发芽率 Germination rate after direct seeding
	3 d	7 d	
	成恢 177 Chenghui 177	96.3	97.7
Bt5198	95.3	95.7	87.9

## 2.2.4 其他特性分析

### 2.2.4.1 发芽率分析

发芽率是种子生活力的具体体现。在室内适宜条件下,新恢复系 Bt5198 培养 3 d 和 7 d 的发芽率分别达到 95.3% 和 95.7%,表明该恢复系种子生活力强,发芽整齐,与成恢 177 相当。在直播发芽方法试验中,Bt5198 的发芽率与成恢 177 也无显著差异(表 4)。由此可见,通过杂交转育导入 *Bt* 基因不会对种子生活力造成显著影响。

### 2.2.4.2 花粉量比较分析

恢复系花粉量的变化将直接影响杂交稻制种产量。本研究测定具转基因抗虫性的新恢复系 Bt5198 与对照植株的花粉量,结果显示 Bt5198 每个花药的平均花粉数为 1116.2 粒,与成恢 177 的花粉数(1121.2 粒)相当,进一步推测在杂交稻制种过程中,该恢复系的花粉量不会影响制种产量。

## 3 讨论

### 3.1 转 *Bt* 基因筛选鉴定方法

在转基因材料杂交和回交育种过程中,建立快速、简便的目的基因鉴定方法十分重要。PCR 分析、DNA 分子杂交和蛋白质免疫分析等技术能准确筛选抗虫植株,但技术要求高。有研究证明,检测与 *Bt* 基因紧密连锁和协同表达的标记基因可快速筛选转基因抗虫个体。目前普遍应用的标记基因有 *gus* 基因和潮霉素抗性基因 *hpt* 等<sup>[12-16]</sup>。本研究所用转基因水稻 Bt 明恢 63 中的标记基因已被敲除<sup>[10]</sup>,需要通过检测外源 *Bt* 基因本身特性获得抗虫单株。BT-Cry1Ab/1Ac 金标免疫检测试纸条系国家“十五”科技攻关项目研制的创新产品,可快速、定性检测植物样本中是否含特异性 Bt Cry1Ab 或 Bt Cry1Ac 蛋白,不需任何附加设备,3~5 min 可获得检测结果。本研究同时采用 PCR 方法和试纸条检测 F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 及 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 单株中的 *Bt* 基因,结果完全吻合。因此,在缺少试验设备的田间现场,试纸条检测是较为快速简便的方法。此外,室内和田间接

虫试验是检测 *Bt* 基因植株抗虫性最直接可靠的方法。本研究对试纸条检测确定为 *Bt* 基因阳性的植株进行室内及田间抗虫性鉴定,结果表明,经试纸条检测为阳性的植株大部分对螟虫为害表现高度抗性,极个别单株或株系也会出现田间部分受害的情况,推测与 Bt 蛋白含量较低有关,也可能为非 *Bt* 基因植株上的大龄幼虫迁移至 *Bt* 基因植株咬断茎秆所致。这有待进一步研究证实。

### 3.2 转基因水稻的抗虫稳定性

利用转基因技术将 *Bt* 基因导入水稻,其抗虫稳定性是人们关注的重要问题之一。有研究发现转 *Bt* 基因水稻的回交后代抗虫性有下降的趋势<sup>[17]</sup>。而较多研究则认为,外源 *Bt* 基因导入水稻可显著增强水稻对鳞翅目害虫的抗性,并能稳定传递给后代<sup>[14,18-19]</sup>。本研究室内和田间人工接虫试验表明,经 1 次回交、连续 7 代自交纯化和分子标记辅助选择获得具转基因抗虫性的新恢复系 Bt5198 对二化螟和三化螟具有高度抗性,所配制的杂交组合仍具有高的抗螟虫性,进一步证实本研究所获得的新恢复系抗虫性能稳定遗传。

### 3.3 利用转 *Bt* 基因水稻培育抗虫新恢复系

已有研究结果表明,在通过遗传转化获得转基因抗虫水稻基础上,借助分子标记辅助选择和回交育种手段可改良转 *Bt* 基因抗虫水稻中的一些不良性状,选育出既高抗螟虫又高产优质的水稻新品种或品系<sup>[6-8]</sup>。这样既减少了烦琐的遗传转化工作,又能为转基因抗虫育种提供更多优良的杂交稻亲本材料。本研究以 Bt 明恢 63 为供体,杂交转育生产上大面积推广应用的恢复系,获得对二化螟和三化螟均具有高度抗性的水稻新恢复系,其恢复力、种子生活力及花粉量与受体亲本成恢 177 无显著差异,可直接用于三系抗虫杂交稻组合的配制。

谢辞:感谢华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室为本研究提供了去选择标记的抗虫恢复系 Bt 明恢 63。

### 参考文献:

- [1] International Rice Research Institute . Bt Rice : Research and Policy . IRRI Information Series No 5 . Manila : International Rice Research Institute , 1996 .
- [2] 崔海瑞,舒庆尧,项友斌,等 . 生命科学探索与进展 : 转 *cry1 Ab* 基因水稻的田间表现 . 浙江 : 杭州大学出版社 , 1998 : 810-816 .
- [3] Fujimoto H , Itoh K , Yamamoto M , et al . Insect resistant rice

- generated by introduction of a modified endotoxin gene *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11 : 1151-1155 .
- [4] Tu J, Zhang G, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Nature/Biotechnology*, 2000, 18 : 1101-1104 .
- [5] 项友斌, 高明蔚, 梁竹青, 等. 农杆菌介导的苏云金杆菌杀虫基因 *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达. *生物工程学报*, 1999, 15(4) : 494-500 .
- [6] 沈圣泉, 吴殿星, 崔海瑞, 等. Bt 转基因抗虫粳稻品种选育中若干问题研究. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2003, 29(5) : 499-503 .
- [7] 沈圣泉, 吴殿星, 夏英武, 等. Bt 转基因抗虫恢复系选育及其杂种纯度快速鉴定. *农业生物技术学报*, 2004, 12(1) : 19-23 .
- [8] 沈圣泉, 舒庆尧, 包劲松, 等. 应用近等基因系研究 Bt 基因对水稻性状表现的影响. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2005, 31(3) : 283-287 .
- [9] 陆贤军, 任光俊, 李青茂, 等. 优质抗稻瘟病水稻恢复系成恢 177 的选育与利用. *杂交水稻*, 2007, 22(2) : 18-21 .
- [10] Tu J M, Datta K, Oliva N, et al. Site independently integrated transgenes in the elite restorer rice line Minghui 63 allow removal of a selectable marker from the gene of interest by self segregation. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1(3) : 155-165 .
- [11] Murray R A, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acid Res*, 1980, 8 : 4321-4325 .
- [12] Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, et al. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicides resistance gene as tracer marker. *Theor Appl Genet*, 2001, 103 : 1151-1159 .
- [13] 戎俊, 宋志平, 苏军, 等. Bt/CpTI 转基因稻及其非转基因亲本对照在间隔种植条件下的转基因漂移. *生物多样性*, 2006, 14(4) : 309-314 .
- [14] 王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. Bt 水稻“克螟稻”杂交后代中转基因的遗传表达及育种利用. *农业生物技术学报*, 2000, 8(1) : 89-94 .
- [15] 王忠华, 吴刚, 崔海瑞, 等. Bt 水稻中 *cry1 Ab* 基因的遗传分析. *遗传学报*, 2001, 28(9) : 846-851 .
- [16] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. GUS 组织化学染色法——一种快速筛选抗二化螟转 *cry1 Ab* 基因水稻的方法. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2000, 26(2) : 141-143 .
- [17] 李金军, 徐美玲, 富昊伟, 等. 转基因水稻在回交一代的抗虫性表现. *浙江农业科学*, 2000(6) : 267-268 .
- [18] Alam M F, Datta K, Abrigo E, et al. Transgenic insect resistant maintainer line (IR68899B) for improvement of hybrid rice. *Plant Cell Rep*, 1999, 18 : 572-575 .
- [19] Khurram B, Tayyab H, Tahira F, et al. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice. *Mol Breeding*, 2004, 13 : 301-312 .