

Bt 水稻的抗虫性鉴定及转基因的遗传分析

姚方印¹, 朱常香², 李广贤¹, 温孚江²

(¹ 山东省水稻研究所, 济宁 272077; ² 山东农业大学生命科学院, 泰安 271018)

摘要: 利用 Basta 抗性选择技术快速检测 Bt 转基因水稻及杂交后代群体单株。试验表明, 阳性单株在室内和田间有良好的抗螟虫性能; 在杂交后代中抗除草剂 *bar* 基因和目的基因 *cryIA(b)* 紧密连锁与协同表达; 外源基因在 F₂ 和 BC₁ 群体中遵循孟德尔分离规律; 应用杂交、回交育种方法将抗虫基因转育到推广品种中是可行的。本研究为进一步选育双价抗虫和抗除草剂水稻新品种奠定了基础。

关键词: Bt 转基因水稻; Basta; 抗螟虫性鉴定; 遗传分析

Identification of Bt Rice for Resistance to Stripe Stem Borer and Genetic Analysis of Transgenes

YAO Fang-yin¹, ZHU Chang-xiang², LI Guang-xian¹, WEN Fu-jiang²

(¹ Shandong Rice Research Institute, Jining 272077;

² College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: Resistance to Basta has been used to detect Bt transgenic rice and progenies of Bt transgenic rice crossed to rice varieties cultivated in the Huang Huai area. The results indicated that Basta positive plants were highly resistant to stripe stem borer (*Chilo suppressalis*) in the laboratory and field. *cryIA(b)* gene inherited and expressed together with the marker gene *bar*. Mendelian segregation of the marker gene *bar* was observed in F₂ and BC₁ progenies. This study implicates that it is possible to transfer *cryIA(b)* gene into other main cultivated varieties through crosses and back crosses.

Key words: Bt transgenic rice; Basta; Resistance stripe stem borer (*Chilo suppressalis*); Genetic analysis

水稻是重要的粮食作物。由于水稻本身没有足够的抗虫基因, 因而抗虫育种工作进展缓慢。Bt 毒蛋白基因是目前使用最广的基因, 用转基因的方法将 Bt 毒蛋白基因导入常规水稻, 可使水稻对螟虫抗性提高^[1~3]。转基因植物中的外源基因在自交 T₁ 代群体中一般遵循孟德尔分离规律^[4~6]。在转基因植株与常规品种的杂交后代中, 也能表现单显性基因方式遗传^[7,8]。

本课题组利用 PIG 基因枪法和农杆菌介导法成功地 Bt 毒蛋白基因 [*cryIA(b)*] 连同抗除草剂 *bar* 基因导入到黄淮稻区主栽品种中国 91 中^[4], 获得了 5 个稳定遗传的转基因水稻新品系, 于 2000 年进行了小范围田间试验, 田间结果表现了良好的抗

螟虫和抗除草剂性能。本研究在获得转 Bt 基因水稻的基础上, 利用 *bar* 基因(抗 Basta 除草剂) 与目的基因 *cryIA(b)* 紧密连锁的关系, 对 Bt 转基因水稻及与常规水稻品种杂交的后代单株进行了室内和田间抗螟虫鉴定, 证明了 Basta 阳性株与抗螟虫是高度一致的, 并对其 F₂ 和 BC₁ 杂交后代的外源基因进行了遗传分析。为利用标记基因进行辅助选择, 加速改良主栽品种的抗螟虫性奠定了可靠的基础。

1 材料与方法

1.1 亲本材料

转 Bt 基因的水稻中国 91 (基因表达盒含有 Actin 启动子, *cryIA(b)* 和 *bar* 基因)^[4], 现已稳定遗传

收稿日期: 2000-11-01

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项计划课题 (J99-B-018) 和山东省自然科学基金资助课题 (Y98D10058)

作者简介: 姚方印 (1967-), 男, 山东成武人, 副研究员, 硕士, 从事水稻遗传育种和细胞质雄性不育机理研究工作。温孚江为本文通讯作者,

Tel: 0538-8242632; E-mail: fjwen@sdau.edu.cn

传至第 7 代(T_6 代)。与抗虫水稻杂交的材料为黄淮稻区主栽品种圣稻 301, 豫粳 6 号, 镇稻 88, 盐粳 204。

1.2 杂交后代培育

在 8 月中下旬, 选取正处于开花期的稻穗, 用主栽品种为母本, 46 °C 温水去雄, 以转 Bt 基因水稻为父本进行杂交。在开花前对 F_1 代植株进行 Basta 抗性检测, 选用 Basta 阳性株作回交和自交留种。

1.3 Basta 抗性选择

用除草剂 Basta(有效成分 PPT), 浓度为 1 g/L, 涂在植株的叶片上, 1 周后统计抗性株及敏感株的数目。

1.4 转基因植株的室内抗虫鉴定

采取转基因和未转基因幼嫩水稻叶片饲喂水稻二化螟幼虫, 每个处理饲喂 20 头, 饲喂 3 d 后称重 1 次。

1.5 转基因植株的田间抗虫鉴定

大田在不用任何药剂防治螟虫的情况下, 调查稻纵卷叶螟危害情况和螟虫危害引起的白穗发生情

况。

2 结果与分析

2.1 转基因植株除草剂抗性鉴定

对转基因植株及杂交后代单株, 进行除草剂 Basta 抗性鉴定。PPT 浓度为 1 g/L, 单面涂叶片。5~6d 调查结果显示: 转 Bt 基因的中国 91 水稻(T_6)及与其杂交 F_1 均具有对 Basta 抗性。转基因植株叶片生长正常, 而未转基因植株叶片变黄, 干枯, 最后死亡。表明了与抗虫基因位于同一载体上的 *bar* 基因转育到水稻中并得到表达。

2.2 Bt 转基因植株的室内抗虫性鉴定

用未转基因的水稻中国 91、转 Bt[*cryIA(b)*]基因的水稻中国 91 及与豫粳 6 号、圣稻 301、镇稻 88、盐粳 204 杂交的 F_1 代材料的幼嫩叶片饲喂水稻二化螟。二化螟采自田间, 按虫大小分成 3 组, 分别饲喂水稻叶片, 每个处理接种 20 头, 每 3 d 换食、称重 1 次, 计算平均单虫重, 抗虫结果如表 1。

表 1 转基因水稻对二化螟的抗性室内测定

Table 1 Resistance of transgenic rice plants to stripe stem borer(*Chilo suppressalis*)

材料名称 ¹⁾ Materials	平均单头虫重 Average weight of each insect (mg)				死亡率 Mortality (%)
	原始虫重 Initial	饲喂 3d 3 days	饲喂 6d 6 days	饲喂 9d 9 days	
中国 91 Zhongguo91	3.1	5.2	13.7	38.5	10
	17.5	24.4	57.6	90.3	0
	35.2	43.1	86.7	109.4	0
豫粳 6 号/ Bt* Yujing6/ Bt*	4.6	-	-	-	100
	17.4	14.4	22.3	26.4	0
	30.6	29.4	39.6	41.2	0
圣稻 301/ Bt* Shengdao301/ Bt*	2.7	-	-	-	100
	13.6	12.6	15.8	14.1	0
	33.4	32.8	34.2	39.8	0
镇稻 88/ Bt* Zhendao88/ Bt*	3.2	-	-	-	100
	14.6	13.3	19.1	24.8	0
	34.6	32.7	41.5	42.7	0
盐粳 204/ Bt* Yanjing204/ Bt*	2.9	-	-	-	100
	12.8	11.6	14.3	15.1	0
	31.2	30.3	32.5	35.6	0
Bt*	2.8	-	-	-	100
	17.6	22.8	24.1	23.2	0
	31.3	28.0	40.4	40.9	0

¹⁾ Bt* 代表转 Bt 基因水稻中国 91。下同

Bt* showed Bt transgenic rice Zhongguo 91. The same as below

未转基因水稻饲喂水稻二化螟,二化螟长得又大又壮;转基因水稻饲喂水稻二化螟,低龄幼虫很快死亡,高龄幼虫虽能存活,但生长得非常缓慢且瘦弱。证明了转基因株系具有较强的抗虫性。

2.3 Bt 转基因植株的田间抗虫性鉴定

田间种植观察中国 91 转基因株系及与豫粳 6 号,圣稻 301,镇稻 88,盐粳 204 杂交的 F₁ 及 F₂ 代材料。6 月 10 日插秧,分单株插植,7 月 1 日涂 Basta,1 周后根据 Basta 抗性表现,挂牌标记阴阳性株。田间自插秧到收获未施任何农药。8 月 5 日为稻纵

卷叶螟大发生时期,转基因水稻几乎没有受到卷叶螟的危害,而对照和未转基因水稻严重地受到卷叶螟危害,水稻剑叶及倒二叶花白一片,最高田块植株受害率在 60%。

在 9 月 15 日调查稻穗的受害情况,由于受到螟虫的危害,对照品种中国 91 白穗率(死亡穗)达到 50%,而转基因水稻白穗率相当低,小于 1%。田间调查白穗率发生情况,结果如表 2。表明了 Basta 阳性株具有高抗螟虫的特性,同时也指明 bar 基因和目的基因 cryIA(b) 是协同表达的。

表 2 Bt 抗虫转基因水稻田间抗螟虫情况调查

Table 2 Field resistance of transgenic rice plants to stripe stem borer(*Chilo suppressalis*)

材料名称 ¹⁾ Materials	调查总穗数 No. of observed total spikelets	白穗数 No. of observed white spikelets	白穗率 Percentage of white spikelets (%)
中国 91(CK) Zhongguo91	3660	1840	50.27
Bt ⁺	3972	4	0.56
豫粳 6 号/ Bt ⁺ (F ₁) Yujing6/ Bt ⁺	356	1	0.28
圣稻 301/ Bt ⁺ (F ₁) Shengdao301/ Bt ⁺	321	1	0.31
镇稻 88/ Bt ⁺ (F ₁) Zhendao88/ Bt ⁺	298	0	0
盐粳 204/ Bt ⁺ (F ₁) Yanjing204/ Bt ⁺	361	1	0.28
豫粳 6 号/ Bt ⁺ (F ₂) Yujing6/ Bt ⁺	4120	2	0.05
圣稻 301/ Bt ⁺ (F ₂) Shengdao301/ Bt ⁺	3213	4	0.13
镇稻 88/ Bt ⁺ (F ₂) Zhendao88/ Bt ⁺	3428	5	0.15
盐粳 204/ Bt ⁺ (F ₂) Yanjing204/ Bt ⁺	3679	4	0.11

¹⁾ 调查的 F₁ 和 F₂ 植株为 Basta 阳性株
Basta positive plants were used in F₁ and F₂ experiments

2.4 转基因植株后代的遗传分析

利用黄淮稻区常规粳稻推广品种与转 Bt 基因的中国 91(T₆ 代) 杂交,在不同的分离世代群体中, Basta 抗性的阴阳性分离结果如表 3。根据卡方测

验的结果($\chi^2 < \chi^2$),在 BC₁ 分离群体中 Basta 的阴阳性分离比例按照 1: 1 分离,在 F₂ 分离群体中 Basta 阳性株与阴性株按 3: 1 分离。表明外源基因是一个单显性基因遵循孟德尔分离规律。

表 3 Bt 水稻杂交后代 Basta 阳性株与阴性株的分离比

Table 3 Segregation ratio of Basta positive and negative plants in the progenies of Bt rice crossed to rice varieties cultivated in huanghuai area

组合 Crosses	世代 Generations	抗性株数 No. of resistant plants	敏感株数 No. of susceptibility plants	期望比例 Ratio of expected segregation	χ^2
圣稻 301/ Bt ⁺	BC ₁	125	136	1: 1	0.445
Shangdao301/ Bt ⁺	F ₂	865	277	3: 1	0.332
豫粳 6/ Bt ⁺	BC ₁	153	148	1: 1	0.086
Yujing6/ Bt ⁺	F ₂	796	259	3: 1	0.115
镇稻 88/ Bt ⁺	BC ₁	96	90	1: 1	0.194
Zhendao88/ Bt ⁺	F ₂	981	320	3: 1	0.112
盐粳 204/ Bt ⁺	BC ₁	218	232	1: 1	0.436
Yanjing204/ Bt ⁺	F ₂	965	341	3: 1	0.859

df = 1, $\chi^2_{(0.05)} = 3.841$

3 讨论

利用 *bar* 基因(抗除草剂基因)和 Bt 基因[*cryIA* (b)] 紧密连锁的关系,在水稻生长期用 Basta 涂叶片,根据叶片是否变黄枯死而判定 Bt 基因是否存在,与其分子标记检测相比,是一种快速简便、高效的方法,为加快抗虫育种的选育奠定了可靠的基础。

外源基因在转基因水稻后代的遗传有的符合孟德尔单显性基因分离规律,有的则不符合孟德尔单显性基因分离规律^[9]。外源基因的遗传可能受基因在染色体 DNA 插入位点的影响。王忠华等^[7]报道 *Gus* 基因在 BC₁ 群体中按 1:1 分离,在粳粳交 F₂ 群体中按 3:1 分离。本研究所获得的 4 个杂交组合中, *bar* 基因的遗传分离也基本符合单显性基因遗传方式,没有发现不符合孟德尔遗传的群体,这有利于转基因水稻作为种质材料用于抗虫性状的转育。

由于水稻本身没有足够的抗虫基因,目前研究者利用人工合成或从其它生物中克隆的抗虫基因转化到水稻栽培品种中,提高品种的抗虫性。本课题组把抗虫基因和标志基因,连接到同一高效表达载体上,进行遗传转化,获得转基因材料已经稳定传递到第 7 代,在田间和室内测定,表现了高抗螟虫的效果,没有发现基因沉默的现象。因此在获得转 Bt 基因水稻的基础上与推广品种杂交,然后回交转育,并利用标记基因及分子标记进行辅助选择,加速改良主栽品种的抗螟虫性,为培育抗螟虫的推广品种奠定了可靠的基础。抗虫品种对害虫的影响是显著的、持久的,能增强化学防治和生物防治的效果,且

无污染,可以带来良好的经济效益和生态效益,有着广阔的推广前景。

References :

- [1] Cui H Z, et al. Construction of plant expression vector harboring two insecticidal genes and their expression in tobacco. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1998, 6(1) :7 - 14. (in Chinese)
崔洪志,等. 双价杀虫基因植物表达载体的构建及其在烟草中的表达. *农业生物技术学报*, 1998, 6(1) :7 - 14.
- [2] Wang Z H, et al. Resistance of progenies from crosses between Bt transgenic rice and conventional rice varieties to stripe stem borer *Chilo suppressalis*. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(3) : 310 - 314. (in Chinese)
王忠华,等. Bt 转基因水稻“克螟稻”杂交后代二化螟抗性研究初报. *作物学报*, 2000, 26(3) :310 - 314.
- [3] Dulmage H T. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In Burges HD (ed), *Microbial control of pests and plant Disease 1070 - 1980*, New York: Academic press, 1981 :193 - 222.
- [4] Zhu C X, et al. Production of insect-resistance rice plants transformed with *cryIA*(b) and *pinII* genes. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, 7(3) :259 - 266. (in Chinese)
朱常香,等. 用两个抗虫基因分别转化水稻及抗虫株系的获得. *农业生物技术学报*, 1999, 7(3) :259 - 266.
- [5] Casas A M, et al. Cereal transformation through particle bombardment. *Plant Breed Rev*, 1995, 13 :235 - 264.
- [6] Dillen W, et al. Agrobacterium mediated transformation of *Phaeolus acutifolius* A. Gray. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 94: 151 - 158.
- [7] Wang Z H, et al. Genetic analysis of transgenes in the progenies of Bt rice cross to conventional rice varieties. *Hereditas*, 2000, 22(5) :309 - 312. (in Chinese)
王忠华,等. Bt 水稻杂交育种中转基因的遗传分析. *遗传*, 2000, 22(5) :309 - 312.
- [8] Sachs E S, et al. Expression and segregation of genes encoding *cryIA* insecticidal proteins in cotton. *Crop Science*, 1998, 38(1) :1 - 11.
- [9] Peng J, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27:91 - 104.