

# 不同启动子驱动下马铃薯蛋白酶抑制剂 *Pin II* 转基因水稻的遗传、表达和对粘虫抗性分析

武 亮, 卜庆云, 周 明, 杨世湖, 万建民

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏省植物基因工程研究中心, 南京 210095)

**摘要:**以不同启动子驱动的马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因 (*Pin II*-2x, *Pin II*-4x) 转基因水稻为材料, 经潮霉素抗性、PCR 和 Southern blot 等检测对转基因水稻后代进行了遗传分析。结果显示: 外源基因在 68.4% 的转基因植株中符合孟德尔遗传模式, 单拷贝植株率为 63.6%。转基因植株后代的 *Pin II* 蛋白活性测定结果表明: Act1 和 Ubi 驱动的 *Pin II*-2x 转基因水稻植株中, 每克鲜叶片的 *Pin II* 蛋白含量为 160  $\mu\text{g}$  和 176  $\mu\text{g}$ , 而由 PIN5' 驱动的 *Pin II*-4x 为 104  $\mu\text{g}$ , 对照水稻仅为 20  $\mu\text{g}$ 。Act1 和 Ubi 驱动的 *Pin II* 表达产物对胰蛋白酶活性抑制程度分别达到 37.7% 和 43.1%, 明显高于 *Pin II* 自身启动子 PIN5' (29.2%)。叶片饲养粘虫幼虫的实验表明: 转基因植株叶片对粘虫有抗性, 但抗性达不到显著水平, 且启动子效率、*Pin II* 表达量与抗粘虫性之间也没有相关性。

**关键词:** 马铃薯蛋白酶抑制剂 II; 遗传; 活性; 粘虫

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)03-0261-07

## Inheritance, Expression and Armyworm Resistance of Protease Inhibitor II Gene (*Pin II*) Driven by Different Promoters in Transgenic Rice

WU Liang, BU Qing-Yun, ZHOU Ming, YANG Shi-Hu, WAN Jian-Min

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement,

Jiangsu Plant Gene Engineering Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The inheritance of rice lines transformed by protease inhibitor II gene under control of different promoters was investigated by analysis of hygromycin resistance, PCR and Southern blot. For segregation patterns of foreign gene, 68.4% of the transgenic rice plants were conformed to a Mendelian ratio and in which the rate of transgenic plants with single copy was 63.6%. Quantitative analysis of *Pin II* protein expressed in transgenic rice plants showed that *Pin II* protein in fresh leaves was 160  $\mu\text{g/g}$  for Act-*Pin II*-2x, 176  $\mu\text{g/g}$  for Ubi-*Pin II*-2x, and 104  $\mu\text{g/g}$  for PIN5'-*Pin II*-4x separately while in control rice plants was only 20  $\mu\text{g/g}$ . The inhibitory activity against trypsin of *Pin II* gene driven by Act1 and Ubi promoter reached 37.7% and 43.1%, much higher than that driven by PIN5' (29.2%). Bioassay for insect resistance to armyworm (*Pseudaletia separata* Walker) revealed that transgenic plants had increased their resistance to the pest but there was not significantly different from controls, and also there was no correlation between insect resistance to armyworm and quantity of *Pin II* protein as well as promoters in transgenic

收稿日期: 2005-08-22; 修回日期: 2005-11-02

基金项目: 江苏省(编号: BG2001305)长江学者和创新团队发展计划; [Supported by Jiangsu (No. BG2001305) & PCSIRT]

作者简介: 武 亮 (1981—), 男, 山西大同人, 硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程

通讯作者: 杨世湖, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: yangsh409@yahoo.com.cn; Tel: 025-84396516

致 谢: 本研究中 pTW-a 质粒(含 *Pin II*-4x)由美国康乃尔大学 Wu Ray 教授惠赠; 纯马铃薯蛋白酶抑制剂由美国华盛顿大学 Clarence A. Ryan 教授惠赠; 粘虫虫卵由中国农业科学院植保所江幸福先生提供; 本校程退休年龄对抗虫性鉴定给予技术指导, 在此一并表示感谢。

rice.

**Key words:** potato protease inhibitor II; inheritance; activity; *Pseudaletia separata* Walker

蛋白酶抑制剂是一类广泛存在于植物中的蛋白质。目前,自然界共发现 4 大类蛋白酶抑制剂:丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂通过抑制昆虫肠道内消化酶活性,使昆虫产生厌食反应,从而达到抗虫的目的<sup>[1]</sup>。马铃薯蛋白酶抑制剂 Pin II 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族,可以同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性,因而对害虫产生广谱和稳定抗性<sup>[2]</sup>。

马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的转化研究较多:1989 年就有报道转 *Pin II* 基因烟草对天蛾生长具有明显的抑制效应<sup>[3]</sup>;1996 年首次得到转基因水稻, T<sub>4</sub> 代植株对大螟具有良好的抗性<sup>[4]</sup>;随后国内外关于 *Pin II* 基因对其他作物的转化报道陆续增多,包括转双价基因和多价基因<sup>[5]</sup>等,对多种作物害虫都表现出不同程度的抗性。

前人的 *Pin II* 转基因水稻抗虫鉴定大都是以二化螟、三化螟、大螟、稻纵卷叶螟等作为研究对象,而对水稻、玉米、小麦等农作物都有严重危害的粘虫 (*Pseudaletia separata* Walker) 尚未见报道。本实验室首次从二倍体马铃薯种中克隆了有自主知识产权的新的 *Pin II* 基因 (*Pin II*-2x)<sup>[6]</sup>,构建了包含 Act1、Ubi 驱动的 *Pin II*-2x 和 *Pin II*-4x 自身启动子 PIN5'<sup>[7]</sup>驱动的 *Pin II*-4x 二元载体,并转化了 3 个不同的水稻栽培品种,前期研究表明转基因水稻当代对二化螟具有良好的抗性(资料待发表)。本研究对这些转基因水稻后代植株进行遗传和表达分析并鉴定其对粘虫的抗性,从而为利用 *Pin II* 基因改良作物抗虫性提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

组成型启动子 Act1、Ubi 驱动的 *Pin II*-2x (cDNA)和诱导型 *Pin II*-4x 自身启动子 PIN5'驱动的 *Pin II*-4x (DNA)转基因水稻秀水 63、合江 19、日本晴,共 19 株独立转化体。转基因材料各世代均种植于南京农业大学卫岗实验站。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt* 在转基因后代的分离

从转基因 T<sub>1</sub> 代和对照植株中随机选取 120 粒饱满种子,表面灭菌后 100 粒放入含有 50 mg/L 潮霉素的培养皿中,10 d 后统计各自发芽数,另 20 粒测定水中发芽率以校正潮霉素中发芽数。

将水中发芽成苗的转基因后代截取 1 cm 长叶片,放入加有 50 mg/L 潮霉素的 50 孔板中,验证 *hpt* 在转基因后代的分离情况<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.2 转基因植株后代的 PCR 分析

用 SDS 法微量提取植物 DNA,采用 20 μL PCR 反应体系,1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

*Pin II* 检测引物: F 5' CCGAAGCTTGCATGGCTGT-TCACAGGAAGTT 3'; R 5' GC-CTCTAGATGG ACAAGTCTAGGG-TCACATTGC 3'。

PCR 程序: 95°C 5 min, 94°C 40 s, 55°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 72°C 7 min。

*hpt* 检测引物: F 5' ACACAGCCATCGGTCCAGAC 3'; R 5' ATCTTAGCCAGACGAGCGGG 3'。

PCR 程序: 95°C 5 min, 94°C 40 s, 52°C 40 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 72°C 7 min。

#### 1.2.3 转基因植株的 Southern blot 检测

经过潮霉素筛选且 PCR 鉴定为阳性的 T<sub>1</sub> 代转基因植株用 CTAB 法提取 DNA, 20 μg 样品用质粒中具有单切点的限制性内切酶进行酶切过夜,电泳和转膜<sup>[9]</sup>后与地高辛标记的 *Pin II*-2X (cDNA) 探针杂交过夜,显色照相后用 N,N-二甲基甲酰胺洗膜后重新与 *hpt* 探针杂交,杂交及洗膜方法均按照 Roche 公司 DIG High Primer Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒 (No. 1745832) 说明书进行。

#### 1.2.4 *Pin II* 表达产物的活性分析

对 T<sub>1</sub> 代转基因植株提取叶片可溶性蛋白,方法在 Johnson 等<sup>[3]</sup>基础上稍做修改,具体步骤为:取 1.0 g 植株叶片,加入 1 mL 提取液 (0.1 mmol/L Tris-HCl pH7.0; 0.5 mol/L 蔗糖; 0.1% 抗坏血酸; 0.1% 半胱氨酸)及少量石英砂冰上研磨,所得产物 12 000 g 离心 10 min,去沉淀后上清 12 000 g 再离心 10 min。按照 Bradford 方法<sup>[10]</sup>测定可溶性蛋白

浓度。*Pin II* 抑制活性测定参照张龙翔等<sup>[11]</sup>进行:底物 BAEE (Na-benzoyl-L-arginine ethyl ester)用磷酸缓冲液溶解至 0.025 mmol/L,胰蛋白酶用 1.0 mmol/L HCl 溶解至 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,将 10  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶和 50  $\mu\text{L}$  可溶性蛋白反应 30 min 后,从中吸取 30  $\mu\text{L}$ ,与 2.8 mL BAEE 和 170  $\mu\text{L}$  1.0 mmol/L HCl 混合并立即在分光光度计 253 nm 下测定吸光度值,每隔 10 s 读一次数,共 5 min,重复 3 次取平均值。首先以底物和胰蛋白酶反应后的吸光度值作标准曲线,对照和转基因植株的吸光度值按标准曲线计算后作为对照值和样品值,根据公式[*Pin II* 对胰蛋白酶活性抑制程度 = (对照值 - 样品值)/对照值  $\times$  100%]计算 *Pin II* 对胰蛋白酶活性抑制程度,然后以纯马铃薯蛋白酶抑制剂做参照,推算转基因水稻叶片中的蛋白酶抑制剂含量。

#### 1.2.5 转基因植株后代对粘虫的抗性分析

粘虫虫卵引自中国农业科学院植物保护研究所,在室温 24 $^{\circ}\text{C}$ ,空气湿度 80%,光周期 16 h/8 h 条

件下孵化,幼虫采用玉米叶片人工饲养,繁殖 2 代后进行抗虫性鉴定。

方法一:以初孵粘虫为材料,将转基因和对照水稻秀水 63 植株幼嫩叶片置于培养皿中(事先放入潮湿滤纸以保湿),每皿接入 5 头初孵幼虫,每天更换新鲜叶片,称量虫重并统计死亡头数,重复 3 次。

方法二:以玉米叶片饲养 6 d 后的粘虫幼虫为材料,将转基因及对照水稻秀水 63 植株幼嫩叶片置于培养皿中,每皿接入 3 头幼虫,每天称量虫重,记录虫龄和历期天数,待化蛹后称量蛹重,重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 *hpt* 在转基因水稻后代的遗传

通过鉴定  $T_0$  代转基因植株种子和  $T_1$  代植株叶片对潮霉素的抗性来研究 *hpt* 的遗传。19 株材料中符合 3:1 分离比例的有 13 株,占 68.4%。说明外源基因大部分以单位点整合入水稻基因组(表 1)。

表 1 转基因水稻后代潮霉素抗性遗传分离情况

Table 1 Segregation of hygromycin resistance in  $T_1$  generation of transgenic plants

株系 Lines	<i>hyg</i> <sup>+</sup>	发芽率	矫正 <i>hyg</i> <sup>+</sup> 数	预期分离比	$\chi^2$	<i>P</i>
		Germination rate	Rectified <i>hyg</i> <sup>+</sup> number	Segregation ratio		
X-A-2	64	85%	75.29	3:1	0.002	>95%
X-A-5	58	90%	64.44	—	—	—
X-A-16	71	90%	78.89	3:1	0.613	>25%
X-A-17	59	75%	78.67	3:1	0.535	>25%
X-U-2	69	80%	86.25	—	—	—
X-U-5	59	90%	65.56	—	—	—
X-P-1	64	90%	71.11	3:1	0.613	>25%
X-P-4	61	90%	67.78	3:1	2.410	>10%
X-P-8	72	90%	80.00	3:1	1.080	>25%
H-A-1	78	85%	91.76	—	—	—
H-A-8	67	95%	70.53	3:1	0.842	>25%
H-A-12	66	90%	73.33	3:1	0.073	>75%
H-U-2	75	100%	75.00	3:1	0.000	>95%
H-P-3	59	80%	73.75	3:1	0.030	>75%
H-A-1	70	90%	77.78	3:1	0.277	>50%
H-A-2	45	95%	47.37	—	—	—
H-P-1	63	85%	74.12	3:1	0.008	>90%
H-P-2	76	80%	95.00	—	—	—
H-P-5	65	85%	76.47	3:1	0.050	>75%

X,H,N:转基因水稻秀水 63、合江 19 和日本晴;A,U:Act1,Ubi 驱动的 *Pin II* -2x; P:PIN5' 驱动的 *Pin II* -4x;后面的数字为独立的转基因植株。

X,H,N :transgenic Xiushui63,Hejiang19 and Nipponbare, respectively; A,U: *Pin II* -2x driven by Act1,Ubi promoter; P: *Pin II* -4x driven by PIN5' promoter; Last number represents independent transgenic plants.

## 2.2 转基因植株的 PCR 分析

对潮霉素具有抗性的  $T_1$  代转基因植株提取 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明:经过潮霉素实验筛选所获得的转基因植株均表现为 PCR 阳性,扩增片段与预期相符,用同一对 *Pin II* 引物,转 *Pin II*-

2x (cDNA) 植株扩增出 480 bp 片段,转 *Pin II*-4x (DNA) 植株扩增出 600 bp 片段;用 *hpt* 引物,两者均扩增出 590 bp 片段,而对照植株不能扩增出任何条带(图 1)。说明 *Pin II* 和 *hpt* 都已整合到水稻基因组中。

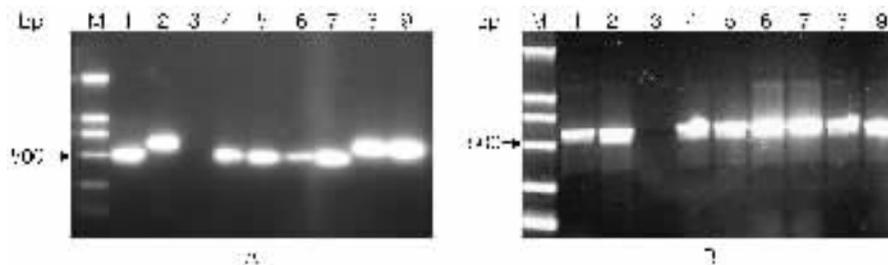


图 1 *Pin II* 转基因水稻  $T_1$  代植株 PCR 检测

A: *Pin II* 引物扩增结果; B: *hpt* 引物扩增结果。M:DL2000 Marker; 1:质粒 pNAR301; 2:质粒 pNAR303; 3:对照植株; 4:N-A-2; 5:X-A-5; 6:H-U-2; 7:N-U-2; 8:N-P-1; 9:H-P-3。

Fig. 1 PCR analysis of  $T_1$  transgenic plants

A: PCR amplification with *Pin II* primer. B: PCR amplification with *hpt* primer. M:DL2000 marker; 1:plasmid pNAR301; 2:plasmid pNAR303; 3: control plants; 4:N-A-2; 5:X-A-5; 6:H-U-2; 7:N-U-2; 8:N-P-1; 9:H-P-3.

## 2.3 转基因植株的 Southern blot 分析

以地高辛标记的 *Pin II*-2x (cDNA) 基因作为探针,与单酶切后的植物基因组 DNA 进行杂交,发现其中单拷贝 12 株,占 63.2%;两拷贝 4 株,占 21.0%;3

及 3 个以上拷贝 3 株,占 15.8%。洗膜后用 *hpt* 探针重新杂交,前后两探针杂交谱带位置稍有变化,但类型相似,说明转基因后代植株中没有出现基因重排现象(图 2)。

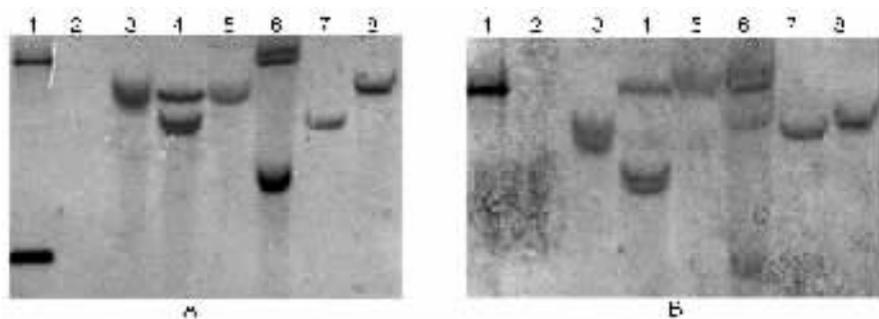


图 2 转基因  $T_1$  代植株 Southern blot 检测

A: *Pin II*-2x (cDNA) 探针杂交结果; B: *hpt* 探针杂交结果。1:质粒 pNAR301; 2:对照植株; 3:X-A-2; 4:X-A-5; 5:X-U-1; 6:X-U-2; 7:X-P-4; 8:N-P-1。

Fig. 2 Southern blot analysis for  $T_1$  transgenic plants

A: Hybridization with *Pin II*-2x (cDNA) probe; B: Hybridization with *hpt* probe. 1: plasmid pNAR301; 2: control plants; 3:X-A-2; 4:X-A-5; 5:X-U-1; 6:X-U-2; 7:X-P-4; 8:N-P-1.

## 2.4 *Pin II* 表达产物的活性分析

我们对每个启动子类型的  $T_1$  代转基因植株在分蘖期取样提取叶片可溶性蛋白,测定 *Pin II* 对胰蛋白酶活性的抑制程度。*PIN5'* 驱动的 *Pin II*-4x 转基因植株叶片在伤害诱导 24 h 后取样<sup>[4]</sup>。结果显示组成型强启动子 *Act1* 和 *Ubi* 驱动的 *Pin II* 表达量较高,

100  $\mu$ g 叶片可溶性蛋白对 5  $\mu$ g 胰蛋白酶活性抑制程度分别可以达到 37.7% 和 43.1%,而 *PIN5'* 驱动的 *Pin II* 抑制活性只有 29.2%,未转基因对照植株本身也具有一定的蛋白酶抑制剂,对胰蛋白酶活性有 5% 的抑制作用(图 3)。进一步以纯马铃薯蛋白酶抑制剂作为参照,估算出每克新鲜叶片 *Pin II* 含量:*Act1*

启动子驱动有 160  $\mu\text{g}$ , Ubi 启动子驱动有 176  $\mu\text{g}$ , PIN5' 启动子驱动有 104  $\mu\text{g}$ , 而水稻本身蛋白酶抑制剂只有 20  $\mu\text{g}$ (图 4)。

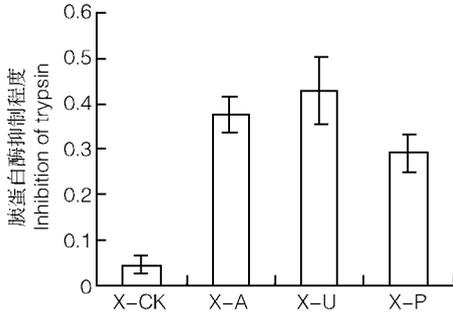


图 3 对照和转基因植株叶片 100  $\mu\text{g}$  可溶性蛋白 Pin II 对 5  $\mu\text{g}$  胰蛋白酶活性的抑制程度

X-CK 是对照植株; 其余是 Act1, Ubi 驱动的 Pin II -2x 和 PIN5' 驱动的 Pin II -4x 转基因水稻。

### Fig. 3 Inhibition of 5 $\mu\text{g}$ trypsin by 100 $\mu\text{g}$ leaf soluble protein in control and transgenic plants

X-CK was control plant and others were transgenic plants containing Pin II -2x driven by Act1, Ubi and Pin II -4x driven by PIN5' promoter, separately.

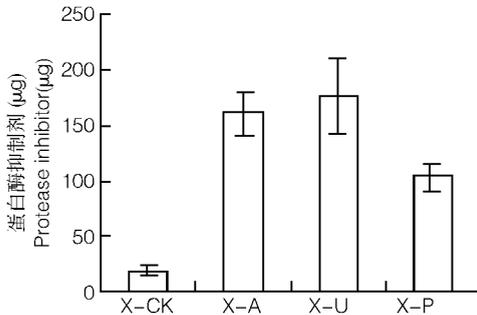


图 4 对照和转基因植株每克新鲜叶片的蛋白酶抑制剂含量( $\mu\text{g}$ )

X-CK 是对照植株; 其余是 Act1, Ubi 驱动的 Pin II -2x 和 PIN5' 驱动的 Pin II -4x 转基因水稻。

### Fig. 4 The content of protease inhibitor in control and transgenic per-gram leaves

X-CK was control plant and others were transgenic plants containing Pin II -2x driven by Act1, Ubi and Pin II -4x driven by PIN5' promoter, separately.

## 2.5 转基因后代植株的粘虫抗性分析

将 T<sub>1</sub> 代转基因植株幼嫩叶片接 5 头初孵粘虫, 一起放入直径为 9 cm 的培养皿中, 每天更换新鲜叶片, 同时以未转基因植株作为对照, 5 d 内连续每天统计死亡头数并称量虫重, 发现粘虫死亡率在对照和

转基因植株之间没有表现出显著差异, 说明马铃薯蛋白酶抑制剂不能提高粘虫幼虫死亡率。以转基因植株叶片为食的粘虫体重略小于对照植株(图 5, 图 6), 但转基因植株无论使用何种启动子驱动 Pin II -2x 和 Pin II -4x, 都不能使粘虫体重下降达到显著水平。

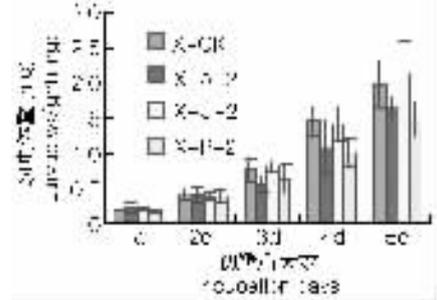


图 5 粘虫初孵幼虫在取食对照和转基因植株叶片 5 天内体重的变化

X-CK: 未转基因植株; X-A-2: Act1-Pin II -2x 植株; X-U-2: Ubi-Pin II -2x 植株; X-P-8: PIN5'-Pin II -4x 植株。

### Fig. 5 Changes in weight of *Pseudaletia separata* Walker in five days on a diet of control or transgenic leaves

X-CK: control plants; X-A-2: transgenic plants with Act1-Pin II -2x; X-U-2: transgenic plants with Ubi-Pin II -2x; X-P-8: transgenic plants with PIN5'-Pin II -4x.

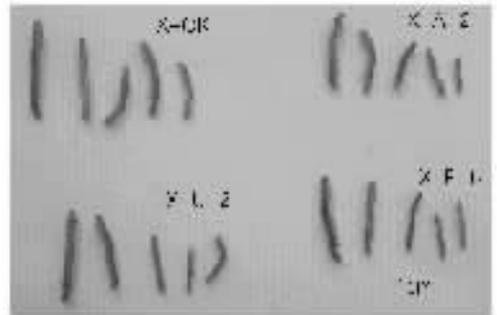


图 6 粘虫初孵幼虫在取食对照和转基因植株叶片 5 天后的发育情况

X-CK: 未转基因植株; X-A-2: Act1-Pin II -2x 植株; X-U-2: Ubi-Pin II -2x 植株; X-P-8: PIN5'-Pin II -4x 植株。

### Fig. 6 Morphology of *Pseudaletia separata* Walker five days after reared on control or transgenic leaves

X-CK: control plants; X-A-2: transgenic plants with Act1-Pin II -2x; X-U-2: transgenic plants with Ubi-Pin II -2x; X-P-8: transgenic plants with PIN5'-Pin II -4x.

我们也选择了虫龄较大幼虫进行抗性鉴定, 先用玉米叶片喂养初孵粘虫, 6 d 后选择虫龄和体形大小相似的幼虫, 用转基因植株叶片饲养于培养皿内, 每

处理接 3 头,同时以未转基因植株作为对照。每天称量虫重,观察龄期,并待化蛹后称量蛹重。发现幼虫在取食转基因叶片 3 d 后体重增加略小于对照植株,但再过几天后和对照植株饲养的生长速度相同或更高。以自初孵至化蛹之间的天数记为幼虫历期,发现 Act1、Ubi 和 PIN5' 驱动的 Pin II 可分别使粘虫幼虫历期延长 4 d、2 d 和 4 d(表 2),但在幼虫最大体重、蛹重等指标上与对照植株饲养的差别没有达到显著差异标准。由此看来,组成型强启动子虽然可以提高 Pin II 基因的表达量,但并不一定能增强粘虫抗性效果。

表 2 取食对照和转基因植株叶片的粘虫幼虫历期天数  
Table 2 Duration of *Pseudaletia separata* Walker larvae on a diet of control or transgenic leaves

秀水 63 Xiushui63 CK	X-A-2	X-U-2	X-P-8
23.2+1.83(d)	27.4+2.05(d)	25.1+2.01(d)	27.6+4.18(d)

### 3 讨论

虽然通过多种方法得到水稻转基因植株已不是什么难题,但外源基因的遗传稳定性仍受到很大的关注。我们得到的 Pin II 转基因植株中,外源基因大都以孟德尔方式稳定遗传,其中分离异常的可能和转基因植株的配子活力、遗传组成和生理状态有关<sup>[12]</sup>。综合转基因植株对潮霉素的抗性分离比例、PCR 扩增和 Southern blot 等实验结果证明外源基因大部分以单拷贝方式插入植物基因组,也有多拷贝情况出现,但尚未检测出基因的重排现象,说明外源基因一旦整合入基因组,就可以与植物本身基因一样稳定存在<sup>[13]</sup>。

我们在每个启动子类型中选取了几个代表性转基因植株,测定了 Pin II 对胰蛋白酶的抑制活性。与 Pin II 自身启动子 PIN5' 相比,组成型启动子 Act1 和 Ubi 可以明显提高 Pin II 的表达量,对胰蛋白酶活性的抑制程度较高。水稻植株本身也具有一定的蛋白酶抑制活性,但含量和效价与转基因植株相比均处于较低水平。

粘虫 (*Pseudaletia separata* Walker) 是危害多种农作物的鳞翅目暴发性害虫,且具有迁飞习性,严重时把作物吃成“光杆”,因此以粘虫来鉴定转基因植株的抗虫性是十分有意义的。本实验表明,Pin II 可能

对粘虫具有一定的抗虫性,但不能使其致死,而且对其幼虫生长的抑制程度并不显著,抗虫效果与基因是否由强弱启动子驱动也不存在相关性,推测其原因可能是:第一、粘虫不同于其它鳞翅目害虫,虽然 Pin II 对一些鳞翅目害虫有较好抗性,但二化螟等属螟蛾科,而粘虫属夜蛾科,由此可能造成 Pin II 的抗性不同,另有研究表明 Bt 毒素转基因玉米对粘虫也表现出较低的抗性<sup>[14]</sup>,与本文报道类似;第二、粘虫可能对 Pin II 有较强的适应性,虽然马铃薯蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶活性抑制程度较高,但昆虫可能已经通过各种方式产生了适应性,如分泌更多的胰蛋白酶补偿<sup>[15]</sup>或合成新的对原有蛋白酶抑制剂不敏感的蛋白酶<sup>[16]</sup>。有些昆虫的肠蛋白酶通过降解抑制剂来减小抗性作用,虽然蛋白酶抑制剂具有多个活性中心,但昆虫肠道的蛋白酶也具有多个作用位点,植物和昆虫在长期进化过程中形成了抗性与适应性的共演化关系<sup>[17]</sup>。但是,在实验中我们发现粘虫在取食 Pin II 转基因水稻叶片后每个生育期可以推迟 2~4 d,这可能会较长时间吸引害虫天敌<sup>[18]</sup>来减轻田间危害。

Pin II 究竟在生产上对哪些农业害虫具有抗性和具有多大的利用价值还需更多的实验证明。我们正在进行转基因水稻单株对多种害虫的抗性鉴定,希望可以选出高抗虫性株系应用于田间。

### 参考文献(References):

- [1] Ryan Clarence A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 1990, 28: 425~449.
- [2] Barta E, Pintar A, Pongor S N. Repeats with variations: Accelerated evolution of the Pin2 family of proteinase inhibitors. *Trends Genet*, 2002, 18: 600~603.
- [3] Johnson R, Narvaez J, Gynheung A, Ryan C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9871~9875.
- [4] Duan X, Li X, Xue Q, Abo-el-Saad M, Wu R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 494~498.
- [5] FENG Dao-Rong, XU Xin-Ping, QIU Guo-Hua, LI Bao-Jian. Inheritance and Expression of several resistance genes to diseases and pests in rice. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45 (15): 1593~1599.  
冯道荣, 许新萍, 邱国华, 李宝健. 多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达. *科学通报*, 2000, 45 (15): 1593~1599.
- [6] BU Qing-Yun, WU Liang, YANG Shi-Hu, WAN Jian-Min. Cloning,

characterization and expression vector construction of potato protease-inhibitor II gene (*PIN II-2x*) from diploid potato (*Solanum phureja*). *Hereditas* (Beijing), 2005, 3: 417~422.

卜庆云, 武亮, 杨世湖, 万建民. 二倍体马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的克隆、序列分析及表达载体的构建. *遗传*, 2005, 3: 417~422.

- [7] Xu D, Mcelroy D, Robert W, Wu R. Systemic induction of a potato pin2 promoter by wounding, methyl jasmonate, and abscisic acid in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22: 573~588.
- [8] LIU Qiao-Quan, CHEN Xiu-Hua, WANG Xing-Wen, PENG Ling-Tao, GU Ming-Hong. A rapid simple method of assaying hygromycin resistance in transgenic rice plants. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, 9(3): 264.  
刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 彭凌涛, 顾铭洪. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 264.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (Second Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254.
- [11] ZHANG Long-Xiang, ZHANG Ting-Fang, LI Ling-Yuan. *Biochemistry Experiment Technology*. Beijing: Higher Education Press, 1981.  
张龙翔, 张庭芳, 李令媛. *生化实验方法和技术*. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [12] TANG Zuo-Shun, WANG Xiang-Kun, LI Liang-Cai, TIAN Wen-

Zhong. Stable inheritance of *hpt* gene in transgenic rice plants mediated by biolistic bombardment. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(1): 26~33.

唐祚舜, 王象坤, 李良才, 田文忠. 基因枪法转基因水稻中 *hpt* 基因稳定遗传. *遗传学报*, 2000, 27(1): 26~33.

- [13] Cheng X, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I. Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA* (b) and *cryIA* (c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2767~2772.
- [14] YUAN Gui-Ling, DENG Shu-Dong, ZHANG Qing-Wen, XU Huan-Li, CAI Qing-Nian. The resistance of Bt corn (MG95) to *Pseudaletia separata*. *Entomological Knowledge*, 2004, 41(5): 422~426.  
员桂玲, 邓曙东, 张青文, 徐环李, 蔡青年. Bt 玉米 (MG95) 对粘虫的抗性和拒食作用. *昆虫知识*, 2004, 41(5): 422~426.
- [15] Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larvae *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 1986, 32: 673~680.
- [16] Jongsma M A. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut protease of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8041~8045.
- [17] Jongsma M A, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol*, 1997, 43: 885~895.
- [18] Zavala J A, Patankar A G, Gase K, Hui D, Baldwin I T. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defense. *Plant Physiology*, 2004, 134, 1181~1190.