

Bt 水稻“克螟稻”对二化螟抗性的遗传分析

王忠华¹,舒庆尧¹,叶恭银²,崔海瑞¹,夏英武¹

(¹浙江大学原子核农业科学研究所,杭州 310029;²浙江大学植物保护系,杭州 310029)

摘要:室内离体叶片快速检测法结果发现,KMD1 和 KMD2 两个转 Bt 杀虫基因纯合品系与常规感虫水稻品种杂交 F₁ 群体人工接虫 2d 后的幼虫死亡率高达 100%,表明这两个品系的抗虫性由显性基因控制。田间调查结果发现,KMD1 和 KMD2 与常规感虫粳稻品种杂交 F₂ 群体中抗虫株与感虫株的分离比符合 3:1,BC₁ 群体中抗虫株与感虫株的分离比符合 1:1,表明这些纯合品系的抗虫性由一对显性核主基因控制。

关键词:转 Bt 杀虫基因水稻;抗虫性;二化螟;遗传

Genetic Analysis of Resistance of Bt Rice to Stripe Stem Borer (*Chilo suppressalis*)

WANG Zhong-hua¹, SHU Qing-yao¹, YE Gong-yin², CUI Hai-rui¹, XIA Ying-wu¹

(¹Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029;

²Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: It was found that newly hatched SSB larvae died 100.0% on the second days after being fed on leaf tissues of F₁ population derived from the crosses between KMD1, KMD2 and conventional rice varieties by using cut leaf feeding method. This indicated that the resistance of Bt rice to SSB is conditioned by a dominant gene. Field evaluation demonstrated that Mendelian segregation for resistance to SSB in F₂ and BC₁ progenies from the crosses of Bt transgenic rice KMD1 or KMD2 with conventional rice varieties. This demonstrated that the resistance of Bt rice to SSB is conditioned by a major dominant gene.

Key words: Bt transgenic rice; Resistance; Stripe stem borer; Inheritance

二化螟(*Chilo suppressalis*)是危害水稻的主要害虫之一。近年来,由于二化螟等鳞翅目害虫的危害,世界粮食生产遭受巨大损失。据报道,仅二化螟、三化螟等鳞翅目害虫在亚洲造成的稻谷损失大约占总产的 10%左右^[1]。培育对二化螟等鳞翅目害虫具有内在抗性的抗虫水稻具有十分重要的意义。目前,国内外已有不少获得抗虫转基因植株的报道^[2~9]。本课题组与加拿大渥太华大学合作利用农杆菌介导法成功地将密码子经过优化的 Bt 杀虫基因 *cry1Ab* 导入了多个水稻品种^[10],并从粳稻秀水 11 的转基因后代中获得了遗传稳定且对二化螟等鳞翅目害虫表现高抗的 Bt 转基因纯合抗虫水稻“克螟稻”品系 KMD1 和 KMD2 等^[11~14]。本文

报道了这两个品系对二化螟抗性的遗传方式。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验转 Bt 基因“克螟稻”品系由晚粳稻品种秀水 11 的 2 个 R₀ 转基因植株培育而成,其遗传转化和纯系培育过程见相关报道^[10~13]。克螟稻中含与 *cry1Ab* 串联排列的、*gus*(编码 β-葡糖苷酸酶)和 *hpt*(编码潮霉素磷酸转移酶)等基因^[10~13]。1997 年用于杂交时,2 份克螟稻材料尚处于较低世代,其中克螟稻 1 号(简称 KMD1)R₀ 时编号 TR30,杂交时为 R₃ 代 Bt 杀虫基因纯合株系,定型后简称 KMD1;克螟稻 2 号(简称 KMD2)R₀ 时编号 GS5,

收稿日期:2000-04-21

基金项目:浙江省科委“九五”重大项目(991102004-002)、美国洛氏基金资助项目(RF97001#556)和国家植物转基因专项(J2000B-009)

作者简介:王忠华(1972-),男,浙江开化人,现为浙江大学生物物理学博士生,主要从事水稻生物技术育种。Tel: 0571-86971405,86986176;

Fax: 0571-86971202; E-mail: zhonghuawang@hotmail.com

杂交时为 R₂ 代 Bt 杀虫基因纯合株系, 定型后简称 KMD2。

与“克螟稻”杂交的感虫常规水稻品种或品系有早籼稻浙辐 504、浙辐 123、嘉早 935; 晚粳稻品种或品系秀水 63、丙 9402、丙 9331; 籼型杂交稻保持系龙特甫 B、II32B; 籼型恢复系明恢 77、密阳 46。

1.2 杂交后代培育

杂交时, 选取正处于开花期的感虫品种稻穗, 用 44℃ 温水去雄, 再用克螟稻花粉授粉。回交时, 由于多数籼粳交 F₁ 代为高度不育, 因此用作母本, 感虫品种用作父本。

1.3 抗虫性测试

二化螟抗性鉴定分室内测定和田间抗性调查 2 种。室内测定采用由笔者建立的离体叶片速测法^[15,16], 即在分蘖盛期剪取 3~4cm 长的叶片, 放入小试管, 在叶片两端各用一小片浸有 100μl/L 苯腈咪唑的滤纸, 以保持叶片新鲜。试管用脱脂棉花塞口, 以利气体交换。每个试管接 3~5 头二化螟初孵幼虫, 3 个重复。接虫后第 2 天和第 4 天检查食叶

面积和幼虫死亡率。

田间抗性调查是在不喷防治鳞翅目害虫的农药的田块, 于分蘖盛期通过考察稻苗是否出现枯心来评价“克螟稻”杂交后代植株对二化螟的抗性, 试验于 1998 年在浙江大学实验农场完成。

2 结果与分析

2.1 杂种 F₁ 群体

分蘖盛期采用叶片离体快速测定法检测 KMD1、KMD2 与浙辐 504、秀水 63、II32B、明恢 77 等品种杂交 F₁ 群体的二化螟抗性, 结果表明所有转基因抗虫水稻品系与常规感虫品种杂交的 F₁ 植株的抗性与 Bt 水稻处于同一水平(表 1)。第 2 天的幼虫死亡率均达到 100.0%, 接虫 4d 后每只初孵二化螟幼虫的平均食叶面积小于 0.25mm², 而常规感虫品种植株接虫 4d 后最高幼虫死亡率仅为 11.1%, 每只初孵二化螟幼虫的平均食叶面积大于 9.30mm²。此结果说明该品系的抗虫性为显性遗传。

表 1 克螟稻 KMD1、KMD2 与常规水稻品种杂种 F₁ 植株叶片对二化螟初孵幼虫的毒性

Table 1 Leaf tissue toxicity of F₁ plants between KMD1, KMD2 and conventional rice varieties to newly hatched larvae of striped stem borer (*Chilo suppressalis*)

材 料 ¹⁾ Materials	检测数 No. of tested plants	食叶面积 Leaf tissue area consumed (mm ² /larva)		幼虫死亡率 Larvae mortality (%)		田间抗虫株 No. of field resistant plants
		2d	4d	2d	4d	
ZF504 (Indica rice)	15	3.67 ± 0.24	12.67 ± 1.18	0.0	0.0	0
ZF504/KMD1 F ₁	30	0.17 ± 0.07	0.17 ± 0.07	100.0	100.0	30
ZF504/KMD2 F ₁	30	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.08	100.0	100.0	30
XS63 ^b (Japonica rice)	15	4.61 ± 1.02	10.00 ± 1.69	0.0	11.1	0
XS63/KMD1 F ₁	30	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09	100.0	100.0	30
XS63/KMD2 F ₁	30	0.16 ± 0.07	0.16 ± 0.07	100.0	100.0	30
II 32B Maintainer line of indica rice	15	5.24 ± 1.60	9.37 ± 2.23	0.0	11.1	0
II 32B / KMD1 F ₁	30	0.14 ± 0.07	0.14 ± 0.07	100.0	100.0	30
II 32B / KMD2 F ₁	30	0.18 ± 0.09	0.18 ± 0.09	100.0	100.0	30
MH77 Restorer line of indica rice	15	5.72 ± 0.69	10.39 ± 1.27	0.0	0.0	0
MH77 / KMD1 F ₁	30	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.06	100.0	100.0	30
MH77 / KMD2 F ₁	30	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.05	100.0	100.0	30
KMD1 (Bt transgenic japonica rice)	30	0.21 ± 0.10	0.21 ± 0.10	100.0	100.0	30
KMD2 (Bt transgenic japonica rice)	30	0.19 ± 0.09	0.19 ± 0.09	100.0	100.0	30

¹⁾ZF504: 浙辐 504 Zhefu504; XS63: 秀水 63 Xiushui63; MH77: 明恢 77 Minghui77

2.2 杂交 F₂ 群体

KMD1, KMD2 与 5 个常规感虫水稻品种杂交的 F₂ 群体二化螟抗性的田间调查结果发现, 粳粳交

F₂ 群体中抗虫株与感虫株的分离比符合 3:1, 该结果说明, KMD1 和 KMD2 对二化螟的抗性由一对显性主基因控制(表 2), 这与笔者对杂交后代群体中

转基因的遗传分析情况一致^[17]。我们也发现籼粳交 F₂ 群体中抗虫株与感虫株的分离比不符合 3:1, 这可能与籼粳亚种间杂交不亲和性导致转基因植株的花粉授粉竞争力降低有关。

表 2 KMD1, KMD2 与常规水稻品种杂交 F₂ 代群体的二化螟抗性分离¹⁾

Table 2 Segregation for resistance and non-resistance to striped stem borer (*Chilo suppressalis*) in F₂ populations derived from the crosses between KMD1, KMD2 and conventional rice varieties

组合 Combination	调查数 No. of observed plants	抗虫株数 No. of resistant plants	感虫株数 No. of susceptible plants	分离比 Segregation ratio	$\chi^2(3:1)$
ZF504(Indica rice) / KMD1	166	92	74	1.24:1	32.899**
ZF123(Indica rice) / KMD1	132	88	44	2:1	4.455**
JZ935(Indica rice) / KMD1	140	94	46	2.04:1	4.200**
XS63(Japonica rice) / KMD1	190	133	57	2.33:1	2.273
B9331(Japonica rice) / KMD1	60	46	14	3.29:1	0.0213
ZF504(Indica rice) / KMD2	129	77	52	1.48:1	15.320**
ZF123(Indica rice) / KMD2	137	83	54	1.54:1	14.425**
JZ935(Indica rice) / KMD2	133	67	66	1.01:1	44.333**
XS63(Japonica rice) / KMD2	143	106	37	2.86:1	0.0207
B9402(Japonica rice) / KMD2	185	137	48	2.85:1	0.0451

¹⁾ZF504: 浙辐 504 Zhefu504; ZF123: 浙辐 123 Zhefu123; JZ935: 嘉早 935 Jiazao935; B9402: 丙 9402 Bing9402; XS63: 秀水 63 Xiushui63; B9331: 丙 9331 Bing9331

$\chi^2_{(0.05)} = 3.84$; **: 不符合 3:1 分离 Not fit the ratio 3:1

2.3 BC₁ 群体

KMD1, KMD2 与 5 个常规感虫水稻品种杂交的 BC₁(回交 F₁ 代)群体二化螟抗性的田间调查发现, BC₁ 群体中抗虫株与感虫株的分离比符合

1:1, 该结果进一步说明, KMD1 与 KMD2 对二化螟的抗性由一对核显性主基因控制(表 3), 这与笔者对杂交后代群体中转基因的遗传分析情况一致^[17]。

表 3 KMD1, KMD2 与常规水稻品种杂交 BC₁ 代(回交 F₁ 代)群体的二化螟抗性分离¹⁾

Table 3 Segregation for resistance and non-resistance to striped stem borer (*Chilo suppressalis*) in BC₁(backcross F₁) populations derived from the crosses between KMD1, KMD2 and conventional rice varieties

组合 Combination	调查株数 No. of observed plants	抗虫株数 No. of resistant plants	感虫株数 No. of susceptible plants	分离比 Segregation ratio	$\chi^2(1:1)$
ZF504 / KMD1 // ZF504	116	56	60	0.93:1	0.038
ZF123 / KMD1 // ZF123	6	3	3	1:1	0.166
JZ935 / KMD1 // JZ935	23	11	12	0.92:1	0.000
LTH / KMD1 // LTH	41	21	20	1.05:1	0.000
MY46 / KMD1 // MY46	43	21	22	0.95:1	0.000
ZF504 / KMD2 // ZF504	112	56	56	1:1	0.009
JZ935 / KMD2 // JZ935	17	8	9	0.89:1	0.000
LTH / KMD2 // LTH	47	19	27	0.70:1	1.065

¹⁾ZF504: 浙辐 504 Zhefu504; ZF123: 浙辐 123 Zhefu123; JZ935: 嘉早 935 Jiazao935; LTH: 龙特甫 B Lon-Te-Fu B; MY46: 密阳 46 Miyang46
 $\chi^2_{(0.05)} = 3.84$

3 讨论

在抗虫性的遗传研究中, 正确地划分抗虫植株与感虫植株的标准十分重要。唐灿明等在 Bt 转基因

因抗虫棉品系山西 94-24、中心 94、R19 棉铃虫抗性的遗传研究中采用各叶片处理 5d 后存活幼虫的虫龄和叶片受害程度作为划分分离群体中抗虫植株与感虫植株的标准^[18,19]。这种标准对于研究整个群

体的抗虫水平有一定的参考价值,但对于每个单株而言却有很大的局限性,同一植株上各次重复幼虫死亡率波动幅度较大。本研究于分蘖盛期采用室内离体叶片人工接虫处理 2d 后的幼虫死亡率和田间自然状况下植株有无枯心作为划分分离群体中抗虫植株与感虫植株的标准。从本试验的结果来看,两者具有很好的统一性,这与 KMD1、KMD2 两份材料的高抗二化螟性有关。同时也进一步证明这些品系在水稻抗虫育种中具有重大的应用价值。

KMD1 和 KMD2 的二化螟抗性以单基因显性方式遗传,这对育种过程中利用这些抗虫资源是极为有利的。通过杂交、回交等常规育种手段可以比较容易地将 Bt 抗虫基因转育到其它高产、优质、抗病的水稻品种中,从而培育出对二化螟等鳞翅目害虫具有良好内在抗性的优良品种,为水稻害虫的综合防治提供更为有效的新途径。

致谢:加拿大渥太华大学生物化学、微生物和免疫学系 Illimar Altosaar 教授、成雄鹰博士提供 Bt 基因构建,本校核农所高明尉教授为本文的修改付出了不少心血,在此一并致谢!

References:

- [1] International Rice Research Institute(IRRI). Bt rice: Research and policy, IRRI Information Series No. 5 Manila(Philippines), IRRI. 1996.
- [2] Xie D X, et al. Obtaining transgenic rice plants by introducing *Bacillus thuringiensis* insecticidal gene into rice variety Zhonghua 11. *Science in China (Series B)*, 1991, 21(8):830 - 834. (in Chinese)
谢道昕,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. *中国科学(B辑)*, 1991, (8): 830 - 834.
- [3] Fujimoto H, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11(10):1151 - 1155.
- [4] Wunn J, et al. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biotechnology*, 1996, 14(2):171 - 176.
- [5] Ghareyazie B, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIAb* gene. *Molecular Breeding*, 1997, (3):401 - 414.
- [6] Wu C, et al. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIAb* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, 1997, (17):129 - 132.
- [7] Nayak, et al. Transgenic elite indica rice plants expressing *CryIAc* δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:2111 - 2116.
- [8] Cheng X, et al. Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic *cryIAb* and *cryIAc* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95:2767 - 2772.
- [9] Maqbool S B, et al. Multiple trait of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Molecular Breeding*, 1999, 5:471 - 480.
- [10] Xiang Y B, et al. Agrobacterium-mediated transformation of insecticidal *Bacillus thuringiensis cryIAb* and *cryIAc* genes and their expression in rice. *Chinese J. Biotechnology*, 1999, 15(4): 494 - 500. (in Chinese)
项友斌,等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIAb* 和 *cryIAc* 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.
- [11] Cui H R, et al. Field Performances of transgenic rice with a *cryIAb* gene. Zhu M Q and Li Y (eds). *Exploration and Investigation on Life Sciences*, Hangzhou: Hangzhou University Press, 1998:810 - 815. (in Chinese)
崔海瑞,等. 转 *cryIAb* 基因水稻的田间表现. 朱睦元和李亚南主编. *生命科学探索和进展*. 杭州: 杭州大学出版社, 1998:810 - 815.
- [12] Shu Q Y, et al. Development of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice resistant to rice stem borers and leaf folder. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1998, 24(6): 579 - 580. (in Chinese)
舒庆亮,等. Bt 转基因水稻“克螟稻”的选育. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(6):579 - 580.
- [13] Shu Q, et al. Transgenic rice plants with a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding*, 2000, 6:433 - 439.
- [14] Wu G, et al. Inheritance, expression and silencing of *cryIAb* gene in transgenic rice. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2000, 8(3):253 - 256. (in Chinese)
吴刚,等. *cryIAb* 基因在转基因“克螟稻”后代中的遗传稳定性及表达. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3):253 - 256.
- [15] Ye G Y, et al. The application of detache-leaf bioassay for evaluating the resistance of Bt transgenic rice to stem borers. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2000, 27(1):1 - 6. (in Chinese)
叶恭银,等. 转苏云金杆菌毒蛋白基因水稻抗螟性的离体叶片测定法. *植物保护学报*, 2000, 27(1):1 - 6.
- [16] Ye G Y, et al. A leaf-section bioassay for evaluating rice stem borer resistance in transgenic rice containing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Bulletin of Entomological Research*, 2000, 90:179 - 182.
- [17] Wang Z H, et al. Genetic analysis of transgenes in the progenies of Bt rice crossed 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.
- [18] Tang C M, et al. Inheritance and resistance of transgenic Bt cotton line R19 to *Helicoverpa armigera*. *J. of Agri. Biotechnology*, 1997, 5(2):194 - 200. (in Chinese)
唐灿明,等. 转 Bt 基因抗虫棉 R19 品系的棉铃虫抗性表现及抗性遗传研究. *农业生物技术学报*, 1997, 5(2):194 - 200.
- [19] Tang C M, et al. Genetic analysis of Resistance of three type Bt transgenic cotton to *Helicoverpa armigera* in China. *Chinese Bulletin of Science*, 1999, 44(19):2064 - 2068. (in Chinese)
唐灿明,等. 我国现有的 3 类转 Bt 基因抗虫棉品系棉铃虫抗性的遗传分析. *科学通报*, 1999, 44(19):2064 - 2068.