第 30 卷 第 4 期
2004 年 4 月 371～375 页

作 物 学 报
ACTA AGRONOMICA SINICA

Vol. 30, No. 4
pp. 371～375 Apr., 2004

水稻转 GNA 基因后代对褐飞虱的抗性研究

左示敏[1] 张 平[1] 祝树德[1] 陈宗祥[1] 田文忠[2] 朱 祯[2] 潘学彪[1,**]

([1] 扬州大学,江苏扬州 225009;[2] 中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101)

摘 要 利用改进的稻飞虱抗性鉴定技术和程序,对转 *GNA* 基因的水稻后代进行了连续世代(T_0～T_3)的抗性鉴定,获得 17 份优良抗性纯合系,其抗性多数介于抗虫对照(IR36)与各自受体亲本之间。方差分析结果表明,转基因材料 R507、R818 与各受体亲本间在稻飞虱抗性水平上存在极显著的差异。它们与抗性对照 IR36 之间也表现显著或极显著的差异。其中 3 个 R507 的抗性纯系(R507G-3-1、R507G-7-4、R507G-3-2)与 IR36 间无显著差异,根据其受害级别,R507G-3-1 被认为已达到抗的水平,其余 16 份抗性纯系均属于中抗水平。对 R507 转基因后代而言,同一转化子内不同纯系间的抗性水平无显著差异,而 R818 的转基因后代中,同一转化子内不同纯系间的抗性出现了显著或极显著的差异。R507 的各个转化子间以及 R818 各转化子间的抗性差异不显著。

关键词 *GNA* 基因;水稻;褐飞虱;抗性鉴定;抗性表现

中图分类号: S511

Resistance to Brown Planthopper in Progenies of GNA Transgenic Rice

ZUO Shi-Min[1], ZHANG Ping[1], ZHU Shu-De[1], CHEN Zong-Xiang[1], TIAN Wen-Zhong[2], ZHU Zhen[2], PANG Xue-Biao[1,*]

([1] *Yangzhou University, Yangzhou* 225009, *Jiangsu*; [2] *Instiute of Genetics and Developed Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, *China*)

Abstract Using improved technique and evaluation procedure, we identified the resistance of *GNA* transgenic rice to Rice Brown Planthopper in successive generations from T_0 to T_3 and screened out 17 purified lines that the resistant levels of them were mostly between resistant control (IR36) and respective original variety (R507 and R818). The results of variance analysis indicated that there were very significant differences of resistant levels between transgenic rice and respective original varieties. All purified lines except three of them (R507G-3-1, 507G-7-4, 507G-3-2) presented very significant difference with resistant control. Based on damaged scale of rice, R507G-3-1 reached the resistant standard, the two others (507G-7-4, 507G-3-2) belonged to the middle resistant level. As far as progenies of transgenic rice R507 were concerned, there was no significant difference in resistant level among different purified lines from the same callous, while the converse result was found in transgenic rice R818. No significant difference was found among different purified lines from different calli of R507 and R818.

Key words *GNA*; Rice; Brown planthopper; Resistant evaluation; Resistant expression

褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Sta1)在我国及许多亚洲国家是水稻生产的主要害虫之一,其危害主要表现在刺吸植株基部茎叶组织的汁液、消耗稻株养分,从而使受害植株谷粒不饱满,千粒重降低,秕谷率增加;此外褐飞虱还是多种病毒病的传播媒介。虽然化学药剂和常规选育抗性品种可以有效地控制其发生,但化学药剂所带来的负面影响和常规选育的低效率等问题却不容忽视。近几年发展起来的分子生物学技术,已使向目标作物中引入特定的外源基因,并在短期内培育出具有目标性状的品种(系)成为现实。

雪花莲凝集素(GNA)具有较强的抗虫性[1,2],尤其是对具刺吸式口器的吸汁性害虫,如褐飞虱、蚜虫、叶蝉等同翅目害虫。其抗虫机理被推测为外源植物凝集素与害虫肠道围食膜上的特定糖蛋白结合,影响营养的吸收,并可能诱发消化道病变,从而杀灭虫害[4]。但该类基因对人及哺乳动物无毒性,因此可用于遗传工程来培育抗性品种(系)。目前该类基因已被导入多种作物并得到表达,对蚜虫、褐飞虱具有一定的抗性[2,5～9]。在水稻上,已获得多份抗

*基金项目:国家计委项目和江苏省自然科学基金项目资助。

作者简介:左示敏(1980 -),男,江苏宿迁人,在读硕士,专业方向:水稻多抗性分子育种。

*通讯作者:潘学彪。E-mail: panxb@pub.yz.jsinfo.net

Received(收稿日期):2002-11-14, Accepted(接受日期):2003-01-22.

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

褐飞虱的转 *GNA* 基因的水稻优良纯合系[2,5,6],但有关抗性鉴定和选育过程的报道较少,且方法也不一致。为了适应对转基因后代的连续抗性鉴定和高效选育,我们改进了稻飞虱抗性鉴定技术和程序,对转 *GNA* 基因的水稻后代进行了连续世代的抗性鉴定,在 T_2 代即可较准确地选到抗性纯合系,本文对这一研究结果进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料来源

扬州大学提供水稻优良恢复系 R818 和 R507,中国科学院遗传与发育生物学研究所采用基因枪转化法以成熟胚愈伤组织为转化受体将 *GNA* 基因导入上述品种。经 PCR 检测为阳性的 21 个转化子(T_0 代)由扬州大学进行连续世代的田间褐飞虱抗性鉴定。

感虫对照为台中本地 1 号(TN1),抗虫对照为 IR36,亲本对照为 R818、R507。

1.2 试验设计

1.2.1 褐飞虱的繁殖

4 月中旬从海南捕捉不同虫龄的褐飞虱若虫带回扬州,投放于玻璃温室内种植了感虫稻苗的水泥池中,用防虫网覆盖。5 月下旬同法露天秧池扩繁,增加若虫数量。

1.2.2 接虫鉴定

1.2.2.1 试验设计

①T_0 代,将各转化子(21 个)连同亲本和抗、感虫对照,以株为单位栽于盆钵中。罩上防虫网。每钵接种 2～3 龄褐稻虱若虫 5 头,并及时补虫以保持一定量活虫。将初步鉴定表现有抗性的单株移栽于大田,分别收获各转化子(17 个)的自交种。

②T_1 代,将 17 个 T_0 代自交种在海南分别以小区形式种植,不治虫。适逢当年春季海南稻飞虱暴发,无抗性或抗性较弱的株系被淘汰。在表现有抗性且农艺性状较为一致的小区(8 区)中,每区选择抗性最好的单株 8～10 株。

③T_2 代,将 66 个 T_1 代自交种,采用同一受体亲本的转基因材料与其亲本(2 个小区)一起,随机种植。抗、感对照各 4 小区均衡分布于各材料中。表型抗性不分离的株系按小区收获,抗性分离小区适量收获部分抗性单株。

④T_3 代,共 32 个株系(其中有 18 个为拟纯合株系,另 14 个为选育的抗性单株种植成的株系),与 T_2 代同样的试验设计种植。

1.2.2.2 播种及间苗 在大部分褐飞虱刚进入产卵期时,供试材料按株系播种于秧田,以确保秧苗二叶一心期时有足够多的 2～3 龄若虫供接种使用。稻苗二叶期时,进行间苗,各小区均保留大小一致的 17 株苗,同时拔除秧板上的杂草。

1.2.2.3 秧田接虫 用特制的吸管装置(图 1)采集 2～3 龄的褐飞虱若虫,每小区均匀投放 100 头左右。接虫后,秧板用防虫网封盖。之后的 4 d 内,每天检查各小区虫量,发现不足及时补充,保持虫量为 100 头左右。

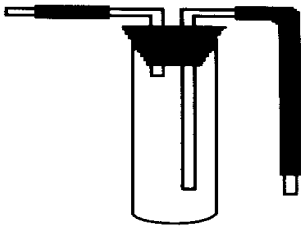

图 1 用于采集褐飞虱的试管

Fig. 1 Test-tube for collecting rice planthopper

1.2.3 抗性调查

1.2.3.1 调查时期和方法 感虫对照品种受害达 7 级以上时开始调查各小区的受害情况。以各单株受害级别的平均数和区内标准差表示株系的受害级别及纯合情况。

1.2.3.2 分级标准 以往采用的标准[10],如国际水稻所的标准评级系统(SES),是针对稳定的纯合群体进行评价的。由于本试验鉴定对象为转基因后的分离世代群体,上述评价体系不适用。分离世代的鉴定必须以单株为单位,根据小区内各个单株的抗性表现来评价转基因株系抗性的纯合程度和抗性水平,进而选择抗性较好的优良纯合系。因此,结合本试验的目的及实际危害情况,参照国际水稻所的标准评级系统(SES)制定了以单株为单位的 0～9 级抗性分级标准。

0 级:无被害状

1 级:第 1 叶一半以下发黄,

2 级:第 1 叶大部分发黄,

3 级:第 2 叶部分发黄,

4 级:第 2 叶大部分发黄,

5 级:第 3 叶部分发黄,

6 级:第 3 叶大部分发黄,

7 级:第 4 叶部分发黄,

8 级:第 4 叶大部分发黄,

9 级:第 5 叶发黄乃致整株枯死。

1.2.3.3 抗性水平的判定 抗性水平采用常规

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

育种学上的分类标准,具体如下(数字表示受害级别):

[0～1]:高抗;[1～3]:抗;[3～5]:中抗;[5～7]:中感;[7～8]:感;[8～9]:高感。

2　结果与分析

2.1　接虫效果分析

对 T_2 代中随机设立的抗虫和感虫对照分别进行多重比较(*PLSD*),所得平均数及比较结果列于表 1。从表 1 可知,随机种植于不同位置的抗虫对照间及感虫对照间在受害级别上没有显著差异,可以认为进行鉴定的不同小区间在受害级别上出现的差异是由于各小区材料本身的遗传特点造成的,受小环境等的影响较小。另外,抗、感虫对照间在受害级别上存在极显著差异,*F* 值为 565.0935,抗性对照的平均危害级别为 2.70,属于抗性品种,感虫对照的平均危害级别为 7.80,属于感虫品种。以上结果说明本试验能真实地反应材料的抗性水平,可以用此法选择目标株系。

表 1　抗虫对照间及感虫对照间不同小区结果的多重比较

Table 1　Multiple comparisons among different plots of resistant and susceptible controls

感虫对照 Susceptible control	受害级别 Damage scale	5%	1%	抗虫对照 Resistant control	受害级别 Damage scale	5%	1%
2	7.53	a	A	4	3.15	a	A
1	7.67	a	A	1	2.81	a	A
3	8	a	A	2	2.47	a	A
4	8	a	A	3	2.36	a	A

Notes: $PLSD_{0.01}=1.050$, $PLSD_{0.05}=0.63$; $PLSD_{0.01}=1.381$, $PLSD_{0.05}=0.83$.

2.2　各个世代的抗性鉴定

2.2.1　T_0、T_1 代的抗性鉴定

对 21 个(T_0 代)转化子采用盆钵接虫鉴定。依据抗、感虫对照的受害情况判断转基因材料的抗性,初步鉴定结果表明有 17 个转化子对褐飞虱表现为抗,其余表现为感。表现为抗的单株移栽于大田并分别收获各转化子的自交种(T_1 代)。各 T_1 代种子在当年的南繁过程中恰逢褐飞虱大发生,自然鉴定结果表明有 12 区表现有抗性,4 区表现不抗,1 区表现抗性较差。从抗性表现较好且农艺性状较为一致的小区(8 区)中分别选择抗性最好的单株 8～10 株,共 66 株。比较 T_0 代与 T_1 代的鉴定结果,发现在 T_0 代鉴定中表现为抗的 5 个转化子在 T_1 代自然鉴定下表现不理想。作者分析认为,在进行 T_0 代鉴定时,由于各转化植株的苗龄大小不一,很难用统一的标准来判断抗感植株,使得鉴定结果不太可靠;其次也有可能是在分化时产生的嵌合或是来源于同一块愈伤组织的小苗并非是真正意义上的同一转化子,因此,经分子检测为阳性的 T_0 代单株并不能代表全部 T_0 代植株,这样就使得某些转化子的 T_1 代株系中存在较多的阴性植株,进而使整个株系表现无抗性或抗性较差。

2.2.2　T_2、T_3 代的抗性鉴定

对选育的 66 个抗性单株所形成的 T_2 代株系采用改进的鉴定方法进行抗虫性鉴定。根据各单株受害级别计算出各转基因株系(T_2 代)的受害级别及标准差,以此结果作图 2、图 3。

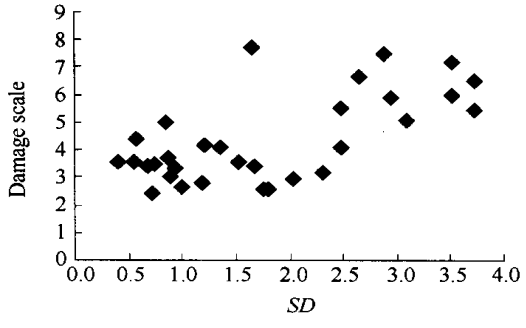

图 2　R507 G 的 T_2 代抗性分布

Fig. 2　The distribution of resistance to planthopper in T_2 population of R507 G

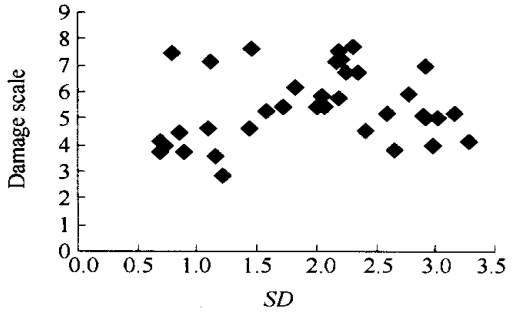

图 3　R818 G 的 T_2 代抗性分布

Fig. 3　The distribution of resistance to planthopper in T_2 population of R818 G

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

从图 2、图 3 可知,各株系间及株系内在对褐飞虱的抗性上仍存在较大的分离。实验选育了 18 个(R507G 为 10 区,R818G 为 8 区)系内标准差较小且平均抗性级别 ≤5 级的株系为拟纯合株系和 14 个抗性单株。对选育出的 18 个拟纯合株系及 14 个抗性单株形成的株系采用与 T_2 代相同的鉴定方法进行 T_3 代抗性鉴定,从 T_3 代的鉴定结果看,除了 R818G 中有一个小区外(危害级别为 5.11,标准差为 2.42),所选的拟纯合株系 R507G 及 R818G 的受害级别分别介于 2.88～3.53、3.00～4.12 之间,标准差分别介于 0.56～1.20、0.56～0.79 之间,没有出现变异较大的株系,说明所选的绝大部分拟纯合株系已达纯合(共 17 份);14 个 T_3 代株系的鉴定结果中,有 2 个株系的标准差大于 1.5,其余表现较为一致,但有待进一步验证。比较 T_2、T_3 代的鉴定结果,认为采用改进的抗性鉴定方法,可以有效地进行优良抗性纯合系的选育。

2.3 GNA 转基因纯合系的抗性分析

对选育的 17 份优良纯合系材料分别与抗性对照 IR36 及各受体亲本间进行方差分析,结果列于表 2。从表 2 可知:转基因材料 R507G、R818G 与其对应受体亲本 R507、R818 间均存在极显著差异,说明 *GNA* 转基因水稻材料在对褐飞虱的抑止性上较原始亲本有了极显著的提高,即 *GNA* 对褐飞虱确有抗性,这与前人的研究结果一致[1,2,5,6];转基因材料 R507G、R818G 与抗性对照 IR36 间存在显著和极显著的差异,说明 *GNA* 转基因水稻在对褐飞虱的抗性上与田间自然选育的抗性品种间还存在一定差异。

表 2 不同受体亲本的转基因纯系与抗性对照间及各自受体亲本间的方差分析

Table 2 Variance analysis of different purified lines with resistant control and respective original cultivar

差异源 Source of variation	平方和 *SS*	自由度 *df*	均方 *MS*	*F* 值 *F* value
(R507G 与 IR36)				
组间 External group	22.27	10	2.2267	2.9376 *
组内 Internal group	133.41	176	0.758	
总计 Total	155.68	186		
(R507G 与 R507)				
组间 External group	157.78	10	15.78	20.7227 **
组内 Internal group	134	176	0.7614	
总计 Total	291.78	186		
(R818G 与 R818)				
组间 External group	177.85	7	25.4076	50.7219 **
组内 Internal group	64.12	128	0.5009	
总计 Total	241.97	135		
(R818G 与 IR36)				
组间 External group	39.06	7	5.5798	11.927 **
组内 Internal group	59.88	128	0.4678	
总计 Total	98.94	135		

对选育的不同纯系(包括同一转化子内的)与抗性对照 IR36 间进行多重比较,结果列于表 3,表明各转基因纯系与抗性对照 IR36 间均存在显著差异,但 507G-3-1、507G-7-4、507G-3-2 三个纯系的受害级别与 IR36 间没有极显著差异。结合抗性分类标准,将 507G-3-1 列为抗的一类,受害级别为 2.88,另两个纯系归属中抗,但抗性水平几乎接近抗的标准,其他 15 个纯系材料均属中抗水平。此外从表 3 还可知,来自同一转化子 R507G 的不同株系间无显著差异,如 507G-3-1～507G-3-4 间及 507G-7-1～507G-7-4 间;相反,来自同一转化子 R818G 的不同株系间则出现了显著和极显著差异(814G-2-1～814G-2-6 间)。

表 3 GNA 转基因水稻的不同纯合系与抗性对照间的多重比较

Table 3 Multiple comparisons of different purified lines of GNA transgenic rice with resistant control

材料 Material	平均值 Mean	5 %	1 %	材料 Material	平均值 Mean	5 %	1 %
R507G-11-1	3.53	a	A	R818G-2-6	4.12	a	A
R507G-16-1	3.47	ab	A	R818G-2-2	3.82	ab	AB
R507G-3-3	3.41	ab	A	R818G-2-4	3.76	ab	AB
R507G-7-2	3.41	ab	A	R818G-2-1	3.65	bc	AB
R507G-7-3	3.41	ab	A	R818G-6-1	3.41	bcd	BC
R507G-7-1	3.35	ab	A	R818G-2-3	3.24	cd	BC
R507G-3-4	3.29	ab	A	R818G-2-5	3	d	C
R507G-3-2	3.06	ab	AB	IR36	2.29	e	D
R507G-7-4	3.06	ab	AB				
R507G-3-1	2.88	b	AB				
IR36	2.29	c	B				

Notes: $PLSD_{0.05}$ of R507 = 0.5853, $PLSD_{0.01}$ of R507 = 0.7692; $PLSD_{0.05}$ of R818 = 0.4598, $PLSD_{0.01}$ of R818 = 0.06043.

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

3　讨论

3.1　转基因水稻的抗性鉴定

对转基因水稻后代进行有效的鉴定选育,是转基因育种过程中不可缺少的环节。结合本实验的研究结果,作者认为,在不同世代,抗病虫害转基因水稻的抗性鉴定方法应有所不同。T_0 代转基因植株由于苗龄大小不一且无重复,较难采用统一的抗性鉴定标准,准确性不高,如本实验中鉴定为抗的 17 个 T_0 代转化子在 T_1 代自然鉴定下只有 12 区表现有抗性,因此,对 T_0 代可以只进行分子鉴定而不必强调进行抗性鉴定;各 T_1 代株系,由于处在分离世代且群体相对较大,有必要进行抗性鉴定并结合各区的农艺性状选取抗性符合要求的单株,以免加大后继世代的鉴定工作量;经选育的 T_2 代株系在理论上已有较大部分是纯合的了,故一定数量的系内单株已可以代表整个株系的特征,所以可采用小群体抗性鉴定方法进行纯系选育;对于 T_2 代选育出的拟纯合系有必要追加一代即 T_3 代来验证,可采用与上一代相同的鉴定方法。

3.2　田间抗性鉴定的规模和准确性是高效鉴定选育的关键

对转基因材料的 T_2、T_3 代,本实验以每区 17 株苗为接虫群体,均匀接虫 100 头左右,接虫后 4 d 内保持每区的虫量不变,正常灌溉,使得水稻和褐飞虱在接近自然的条件下共存。从选育结果看:T_2 代选育出 18 份拟纯合系,经过 T_3 代鉴定后,认为其中 17 份已达纯合,成功率达 94.4 %;T_2 代中选育出的 14 个抗性单株所形成的 T_3 代株系,对应的 T_3 代鉴定结果也表现较好;17 份纯系材料所表达的抗性水平在两代(T_2、T_3 代)间表现也较为稳定。说明采用此种鉴定规模和接虫数量已能高效地选出抗性纯合株系,并能较为准确地预测 *GNA* 转基因水稻在实际应用过程中所能达到的抗性水平。此外,褐飞虱的繁殖速度很快,本实验在繁殖过程中发现一般经过 1 代即可有大量的 2～3 龄幼虫,故在以后的鉴定设计中可以同时播入多个重复,便于增加鉴定的准确性。值得一提的是,苗龄与虫龄应适期对应,即保证苗龄到 2 叶期时虫龄大多也在 2～3 龄期,否则也会影响鉴定结果的准确性。

3.3　转基因水稻材料的抗性分析

本文将 17 份转 *GNA* 水稻纯系材料与褐飞虱抗性对照 IR36 间进行多重比较,发现转基因材料与 IR36 间均存在显著差异,只有一份材料被认为达到抗的水平,其余皆为中抗水平。这可能是由于不同转化子外源基因插入的位置不同所致;当然还有另一种可能性,即 *GNA* 基因所能提供的抗性水平低于 IR36 本身的抗性水平。对于选育的 R818G 材料中,来自同一转化子内的不同纯系间在抗性水平上也存在显著甚至极显著的差异,据初步分析可能是由于组培过程中的变异,经过 2 代的纯合后,该变异可能会影响植株本身防卫体系的表达,其机理有待进一步研究。

致　谢:本实验是在朱红霞、戴留春、赵海华、毕昌、纪玉兰等多位同学的共同协助下完成的,在此一并表示感谢!

References

[1] Rao K V, Keerti S Rathure, *et al*. Expression of snowdrop lectin(*GNA*) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 1998, **15**(4):469—477

[2] Sun X-F(孙小芬), Tang K-X(唐克轩), Wan B-L(万丙良), Qi H-X(戚华雄), Lu X-G(卢兴桂). Transgenic rice pure lines expressing *GNA* resistant to brown planthopper. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2001, **46**(13):1108—1113

[3] Qi H-X(戚华雄), Chen Z-J(陈志军), Wan B-L(万丙良), L ü L(吕亮), Tang K-X(唐克轩). Application studies on the transgenic rice which resistance to brown plant hopper. *Hubei Agriculture Sciences*(湖北农业科学), 2001, (3):7—8

[4] Xie X-Z(谢先芝). Advances and prospects of research on insect-resistant transgenic plants. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 1999, **19**(6):47—52

[5] Tang K-X(唐克轩), Sun X-F(孙小芬), Yao J-H(姚剑虹). Studies on resistance to brown planthopper in transgenic rice pure lines. *Journal of Fudan University*(Natural Science)[复旦学报(自然科学版)], 2000, **39**(4):436—440

[6] Tang K-X(唐克轩), Wan B-L(万丙良), Sun X-F(孙小芬). *GNA* confers resistance to rice brown planthopper in transgenic rice pure lines by both bioassay and feeding test. *Journal of Fudan University*(Natural Science)[复旦学报(自然科学版)], 2001, **40**(1):108—116

[7] Wu G-Y(吴昌银), Ye Z-B(叶志彪), Li H-X(李汉霞), Tang K-X(唐克轩). Genetic transformation of tomato with snowdrop lectin gene(*GNA*). *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2000, **42**(7):719—723

[8] Wang Z-B(王志斌), Guo S-D(郭三堆). Double genes(*cryIA*/*GNA*) in transgenic tabacum convers resistance to *Heliothis armigera* and *Myzus persicae*. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 1999, **44**(19):2068—2075

[9] Guo W-J(郭文俊), Li Y(李瑶), Tang K-X(唐克轩), Dong Z(董铮), Ye M-M(叶明鸣), Shen D-L(沈大棱). Preliminary study of the introduction and expression of *GNA* gene in lettuce(*L. sativa*). *Journal of Fudan University*(Natural Science)[复旦学报(自然科学版)], 1998, **37**(4):564—568

[10] Yu X-P(俞晓平), Wu G-R(巫国瑞), Tao L-Y(陶林勇). Evaluation of screening technique in resistance to rice planthopper in rice cultivar. *KUNCHONG ZHISHI*(昆虫知识), 1991, (1):59—62

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.