

应用 B.t. 和 SBTi 基因提高水稻抗虫性的研究

卫剑文^{1*} 许新萍¹ 陈金婷¹ 张良佑² 范云六³ 李宝健¹

¹ (中山大学生物工程中心 广州 510275)

² (华南农业大学植保系 广州 510243)

³ (中国农业科学院生物技术中心分子生物学室 北京 100081)

摘 要 利用基因枪法将单个 B.t. 基因或与 SBTi 基因一起导入到两个华南地区优良籼稻品种中, 获得 21 个转 B.t. 单基因的植株系 4 个转 B.t. 和 SBTi 双基因的植株系。对 R₁ 代植株的分子杂交和遗传分析表明, 3 个转双基因系中多个拷贝的 B.t. 和 SBTi 基因均是整合在植株基因组同一染色体上相同或相近位点。Northern blot 证明在 R₂ 代转基因植株中 B.t. 基因稳定表达。对稻纵卷叶螟的抗性实验表明, 转 B.t. 单基因或 B.t. 和 SBTi 双基因的转基因植株均较原种对照有更强的抗性, 而转双基因植株较转单基因植株又有更强的抗性。

关键词 B.t. 基因, SBTi 基因, 基因枪转化, 转基因水稻植株, 抗虫试验

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)05-0603-06

近年来, 人们已利用从微生物和植物中克隆的一些抗虫基因提高了水稻对某一昆虫的抗性^[1~3]。无疑, B.t. 毒蛋白基因是目前水稻抗虫基因工程中应用最为广泛也最为成功的一类抗虫基因, 已分离出的众多的 B.t. 毒蛋白基因, 抗虫谱几乎覆盖了所有鳞翅目害虫, 但每一种 B.t. 毒蛋白基因的抗虫谱却十分有限, 昆虫易对 B.t. 毒蛋白产生耐受性^[4]。

植物蛋白酶抑制剂(Proteinase Inhibitor, PI)是另一类作用机制不同于 B.t. 毒蛋白的抗虫蛋白。与 B.t. 毒蛋白相比, 蛋白酶抑制剂的抗虫谱广, 昆虫产生突变的可能性极少^[5]。然而蛋白酶抑制剂抗虫毒性比 B.t. 毒蛋白低(蛋白酶抑制剂的作用浓度为微克级, 而 B.t. 则为纳克级)。理论上讲, 两类基因联合使用不但可以扩大抗虫谱且可以减少昆虫产生耐受性。赵荣敏等^[6]证明共表达 B.t. 毒蛋白基因和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(CPTi)的烟草转基因植株较表达其中任何一种单基因的烟草植株对棉铃虫幼虫有更强的毒杀作用。经室内棉铃虫 18 代汰选实验表明, 转双基因(B.t. + CpTI)抗虫烟草可以显著延缓棉铃虫的抗性形成^[7]。

本研究将 B.t. 毒蛋白基因 *CryI(c)* 单独或与大豆胰蛋白酶抑制剂基因(SBTi)一起导入籼稻品

种中, 获得对稻纵卷叶螟抗性增强的转单、双抗虫基因的水稻植株。

1 材料与方法

1.1 植物材料

籼稻(*Oryza sativa* L. ssp. Indica Kato)竹籼 B 的成熟种子由湛江海洋大学农学系提供, 穗优占的成熟种子由广州市农科所提供。

1.2 质粒

由图 1, 质粒 pIP801(5kb)含 SBTi 基因, 由美国 Cornell 大学吴瑞教授提供。质粒 pFWZ16(9kb)含 B.t. 基因、*bar* 基因, 由中国农业科学院生物技术中心范云六教授提供。

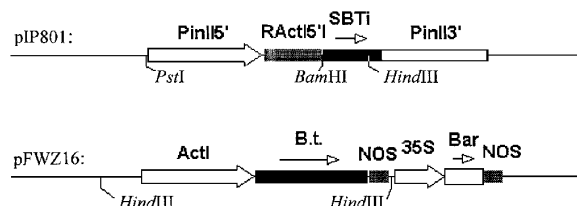


图 1 质粒结构简图

Fig.1 The construction of the plasmids

收稿日期: 1999-12-21, 修回日期: 2000-06-16。

基金项目: 华南生物技术研究中心重点项目(950897)。

* 现在中山大学生物化学系工作。

1.3 水稻转化及转化植株的再生

水稻转化具体方法参照许新萍等^[8]进行,将含有 B. t. 基因的质粒 pFWZ16 单独或与含有 SBTi 基因的质粒 pIP801 按照 1:1 的摩尔比混合包裹于金粉上,并轰击到竹籼 B、穗优占的胚性愈伤组织中,经过 Basta 的抗性筛选和再生培养,得到的抗性小苗用于分子检测和昆虫抗性检测。

1.4 转基因植株及后代的 Basta 抗性鉴定

1.4.1 R₀ 代转基因植株 Basta 抗性鉴定 待转基因植株长至分蘖期,每株选一个分蘖的顶上第一片完全叶由叶尖往下均匀涂布浓度为 0.01% 的 Basta,每天涂 1 次,连续涂 2 d 4 d 后观察叶片情况,并与未转化植株叶片作比较。

1.4.2 后代植株 Basta 抗性鉴定 将 R₀ 及 R₁ 代转基因植株种子均匀播种于营养土中,待小植株长至 3 叶期,对整株植株喷施上述 Basta 溶液,每天喷 1 次,连续喷 3 d 1 周后进行观察。

1.5 Southern 杂交

按照 Doly 等方法从水稻叶片提取基因组 DNA^[9]。取 10 μg 基因组 DNA 用相应的酶(见文中图)进行充分酶切后,在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,变性中和后将 DNA 转移至带正电荷的尼龙膜上,分子杂交按 Sambrook 等^[10]方法进行。以³²P 标记的 B. t. 基因片段(1.8kb)以及质粒 pIP801 的 HindⅢ + BamHI 片段(约 0.5kb)分别作为检测 B. t.、SBTi 基因的探针。

1.6 Northern 杂交

具体方法参照冯道荣等^[11]进行。20 μg 植物总 RNA 在 1.2% 的甲醛凝胶变性电泳上进行电泳,1~2 h 后,变性中和用真空转移仪转移到尼龙膜(Hybond H⁺,Phamacia)上,用相应的 DNA 探针进行杂交。

1.7 转基因水稻植株的抗虫试验

试验虫种为稻纵卷叶螟。对照品种为未转化的原种竹籼 B 和穗优占,抗性品种为 Ptb33(Rck),感虫品种为 TN1(Sck)。待小植株成苗后,取两片健康的叶片置于试管中,接入 10 头稻纵卷叶螟 2 龄若虫,每当叶片变黄,以同株或来源于同一母株的新鲜叶片更换(本实验中一组虫子均须取多株植株的叶子),保持管中叶片“恒生”。当感虫对照组稻纵卷叶螟大量化蛹时,对各组虫子的死亡率和平均蛹体重进行统计。每个编号的植株做 3 组重复。

2 结果与分析

2.1 水稻转化植株的获得

用基因枪法将质粒 pFWZ16 单独或与质粒 pIP801 共同导入到水稻胚性愈伤组织中,经过分别加有 2 mg/L Basta 和 4 mg/L Basta 的 MB 培养基两次筛选共再生出 25 个独立的抗性植株系。转化结果见表 1。由表可见,竹籼 B 转化频率最高为 6.8%,穗优占为 1.9%。

2.2 获得共整合有两个抗虫基因的水稻转基因植株

待转化植株长至 20 cm 左右,分别以 B. t. 基因和 SBTi 基因编码序列作为探针,对转 B. t. 和 SBTi 双基因的再生植株,进行点杂交分析。结果表明穗优占的 3 个再生植株系所选的 34 株植株均与 B. t. 探针杂交呈阳性信号,B. t. 基因的导入率为 100%,而对于 SBTi 基因则只有 1 个系 1 株植株呈现阳性信号,导入率为 33.3%;竹籼 B 的 8 个再生植株系所选的 34 株植株 B. t. 基因的导入率为 100%,而对于 SBTi 基因则有 3 个系 10 株植株呈现阳性信号,导入率为 37.5%。

上述 4 个 B. t. 和 SBTi 基因点杂交均呈阳性的转基因系植株,进行的 Southern blot 分析结果见图 2。SBTi 基因的检测选用 HindⅢ + Pst I 双酶切植

表 1 基因枪转化水稻胚性愈伤组织的实验结果

Table 1 Transformation results of rice embryogenic calli by biolistics

Rice genotype	Foreign genes transformed	The number of calli bombarded	The number of resistant calli	The number of resistant plant lines	Transformation rate(%) [*]
Zhuxian B	B. t.	121	23	8	6.6
	B. t. + SBTi	118	20	8	6.8
Suiyouzhan	B. t.	361	18	6	1.7
	B. t. + SBTi	160	8	3	1.9

^{*} Transformation rate(%) = The number of resistant calli/The number of calli bombarded × 100%

物 DNA ,以 0.2 ng pIP801/*Hind*Ⅲ + *Pst*I 作为对照 ,B. t. 基因的检测选用 *Hind*Ⅲ 酶切植物 DNA ,以 0.2 ng pFWZ16/*Hind*Ⅲ 为正对照。如图 2A ,B 所示 4 个转化植株 DNA 的未酶切样品(第 4 ,6 ,8 ,10 道)与两个探针杂交时均在高分子量 DNA 区出现阳性信号 ,没有小分子量杂交带的出现 ;酶切样品(第 5 ,7 ,9 ,11 道)出现与质粒正对照位置一致的杂交带(pIP801 约 2.0kb ,pFWZ16 约 4.5kb) ,但杂交

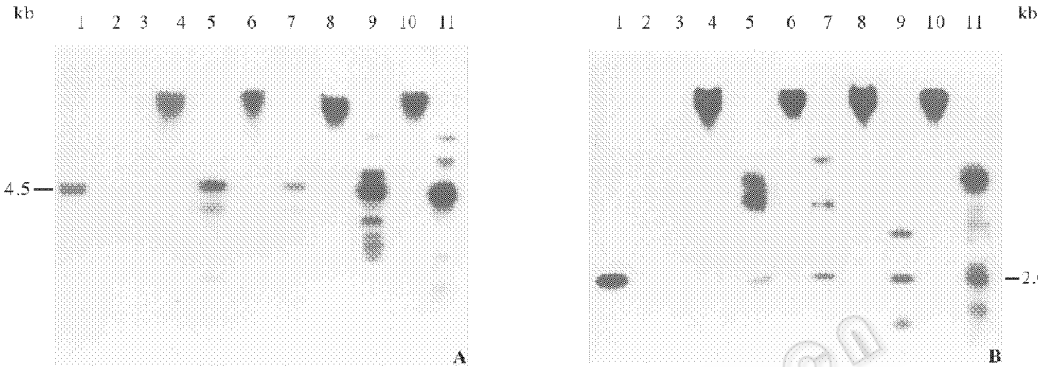


图 2 转 B. t. + SBTi 双基因植株的 Southern blot 分析

Fig.2 Southern blot analysis for genomic DNA of transgenic rice plants containing B. t. and SBTi genes

(A) Blot with B. t. gene probe

1. pFWZ16/*Hind*Ⅲ ; 2. CK Uncut ; 3. CK/*Hind*Ⅲ ; 4. WS7-1 Uncut ; 5. WS7-1/*Hind*Ⅲ ; 6. WZ9-1 Uncut ; 7. WZ9-1/*Hind*Ⅲ ; 8. WZ11-1 Uncut ; 9. WZ11-1/*Hind*Ⅲ ; 10. WZ12-3 Uncut ; 11. WZ12-3/*Hind*Ⅲ

(B) Blot with SBTi gene probe

1. pIP801/*Hind*Ⅲ + *Pst*I ; 2. CK Uncut ; 3. CK/*Hind*Ⅲ + *Pst*I ; 4. WS7-1 Uncut ; 5. WS7-1/*Hind*Ⅲ + *Pst*I ; 6. WZ9-1 Uncut ; 7. WZ9-1/*Hind*Ⅲ + *Pst*I ; 8. WZ11-1 Uncut ; 9. WZ11-1/*Hind*Ⅲ + *Pst*I ; 10. WZ12-3 Uncut ; 11. WZ12-3/*Hind*Ⅲ + *Pst*I

待上述点杂交阳性植株长至分蘖期 ,用 0.01% 的 Basta 对叶片进行涂布试验。1 周后 ,大部分转基因植株叶片涂布区并无显著损伤 ,叶片生长正常 ,而对照植株涂布区颜色泛黄 ,渐渐整个叶片枯死(图片未显示) 。说明 *bar* 基因在这些转基因植株中得到了表达。因 B. t. 基因是与 *bar* 基因串联在同一载体上 ,推测 B. t. 基因也可能获得了表达。

2.3 R1 代植株的遗传分析和生物学分析

从上述共整合有 B. t. 和 SBTi 双抗虫基因的 4 个转基因植株系中分别选出 1 株 R0 代植株来分析它们在后代中的遗传传递规律。由表 2 可见 ,4 株植株中两个抗虫基因在后代分离比接近于 3:1 ,均符合孟德尔分离规律。说明它们各自的一至多个拷贝都是串联整合在植株基因组同一染色体的相同或相近位点。而且在植株 WZ9-1 ,WZ11-1 ,WS7-1 中凡是 B. t. + 的植株也是 SBTi+ 的植株 ,表明在这 3 株植株中外源多个拷贝的 B. t. 和 SBTi 基因都是整合在同一染色体上相同或相近位点。而在 WZ12-3

模式并不相同。未转化植株 DNA 酶切(第 3 道)和未酶切(第 2 道)样品对两种探针均没有杂交信号。表明 B. t. 基因和 SBTi 基因都整合到这 4 株转化植株的基因组中 ,而且它们分别来自不同的转化事件。对转单个 B. t. 基因的转基因植株进行的 Southern blot 分析结果 ,表明本研究获得了 14 个转 B. t. 单基因的转基因植株系。因篇幅限制在此不作具体推导。

中不是所有的 B. t. + 的植株都是 SBTi+ 的植株 ,也就是说在 WZ12-3 中不是所有拷贝的 B. t. 基因与 SBTi 基因都是整合在同一染色体上相同或相近位点。

表 2 转 B. t. + SBTi 双基因植株的遗传分析

Table 2 R ₁ inheritance of the B. t. and SBTi transgenes			
R ₀ Transgenic line	B. t. + / B. t. -	SBTi+ / SBTi-	The number of B. t. + and SBTi+
WZ9-1	14 ⁺ /6 ⁻	14 ⁺ /6 ⁻	14
WZ11-1	15 ⁺ /7 ⁻	15 ⁺ /7 ⁻	15
WZ12-3	14 ⁺ /6 ⁻	14 ⁺ /6 ⁻	8
WS7-1	14 ⁺ /6 ⁻	14 ⁺ /6 ⁻	14

对其它大部分转基因植株种子在苗期进行 0.01% Basta 溶液的喷施试验。结果表明大部分转基因植株在 R1 代的分离比符合孟德尔 3:1 的分离规律(结果未显示) ,说明 *bar* 基因已遗传至大部分

后代植株并得到表达。

2.4 R₁ 代转基因植株对稻纵卷叶螟的抗性

对 8 株 R₀ 植株的 R₁ 代植株进行了稻纵卷叶螟的抗性试验。试验统计结果见表 3 ,所有被测转基因植株对稻纵卷叶螟的死亡率为 26.7% ~60.0% ,

均显著高于原种对照(3.30%)和感虫对照(0.00%)。且转基因植株虫蛹平均体重只有原种对照的 60.7% ~86.3%。说明转单个 B. t. 基因或 B. t. + SBTi 双基因植株对稻纵卷叶螟的抗性较原种对照有了提高。

表 3 R₁ 代转基因植株对稻纵卷叶螟的抗性
Table 3 Bioassay of R₁ transgenic rice plants against leafroller(*Cnaphalocrisis medinalis*)

Sample	Total(No.)	Mortality		Pupa average weight	
		(No.)	(%)	(mg)	(%)
TNI(Sck)	30	0	0.00	23.43	
Zhuxian B	30	1	3.30	22.73	100
WZ4-1	30	14	46.7	17.65	77.65
WZ7-4	30	13	43.3	15.75	69.29
WZ11-1 *	30	18	60.0	13.5	59.39
WZ12-3 *	30	12	40.0	16.5	72.59
WZ14-3 *	30	17	56.7	13.8	60.71
WZ15-2 *	30	8	26.7	18.0	79.19
Suiyouzhan	30	1	3.30	22.56	100
WS1-8	30	11	36.7	19.47	86.3
WS7-1 *	30	13	33.3	15.0	66.49
Ptb33(Rck)	30	22	73.3	12.55	55.63

* Indicating those transgenic rice plants containing B. t. and SBTi genes and the others indicating the transgenic rice plants containing single B. t. transgene.

2.5 转基因纯系植株的获得

R₂ 代植株在苗期经过 0.01% Basta 抗性筛选后 ,发现有来自 20 株 R₁ 代的各自 30 株 R₂ 代植株均表现出对 Basta 的抗性。说明这些 R₁ 代植株有可能是转基因纯系植株。对这些植株的各 30 株后代进行 B. t. 基因和 SBTi 基因的点杂交分析。结果表明有 9 株 R₁ 代的 30 株 R₂ 植株均含有 B. t. 基因和 SBTi 基因 ,8 株 R₁ 代的 30 株 R₂ 植株仅含有 B. t. 基因(图片未显示)。说明我们得到了 9 株转 B. t. 和 SBTi 双基因的 R₁ 代转基因纯系植株 ,8 株转 B. t. 单基因的纯系植株。且 *bar* 基因在这些植株中也获得了表达。

对这些植株进一步作了 B. t. 基因的 Northern blot 分析 结果(图 3)表明 B. t. 基因在这些纯系植株的后代中获得了表达 ,且不同植株之间表达量存在差异。其中植株 WZ16-2-1-1 中 B. t. 表达量最高。

2.6 转基因纯系植株的抗虫结果

待上述 R₂ 代纯系植株长到成苗期进行了稻

纵卷叶螟的抗性试验。实验统计结果见表 4 ,R₂ 代纯系植株对稻纵卷叶螟的死亡率为 73.3% ~ 93.3% ,均显著高于原种对照(0.00%)和感虫对照(0.00%)。而转 B. t. + SBTi 双基因的纯系植株对稻纵卷叶螟的死亡率为 83.3% ~93.3% ,高于转 B. t. 单基因的纯系植株(73.3% ~83.3%)。表明转 B. t. + SBTi 双基因的转基因植株较转 B. t. 单基因

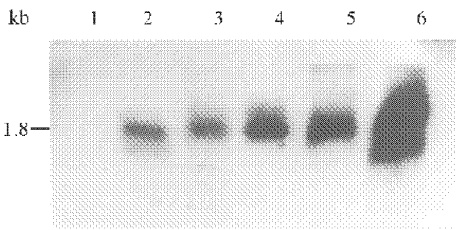


图 3 R₂ 转基因纯系植株中 B. t. 基因的 Northern blot 分析结果

Fig.3 Northern blot analysis of R₂ transgenic rice plants for B. t. gene
1. Non-transformed plants ; 2. WZ1-2-4-1 ; 3. 4-1-2-2 ;
4. WZ9-1-2-1 ; 5. 12-3-1-1 ; 6. WZ16-2-1-1

的植株对稻纵卷叶螟有更强的抗性。其中编号为 WZ9-1-2、WZ10-1-2、WZ11-1-6、WZ12-3-1、WS7-1-9 及 WS8-1-17 的转双基因株系表现出与抗虫对照相同甚至更高的抗性水平。

表 4 R₂ 代转基因植株对稻纵卷叶螟的抗性
Table 4 Bioassay of transgenic rice plants against(*Cnaphalocris medinalis*)

Sample	Total(No.)	Mortality		Pupa average weight	
		(No.)	(%)	(mg)	(%)
TNI(Sck)	30	0	0.00	19.43	
Zhuxian B	30	0	0.00	18.35	100
WZ1-2-4	30	22	73.3	16.26	88.6
WZ2-1-3	30	23	76.7	15.70	85.6
WZ4-1-2	30	24	80.0	15.10	82.3
WZ6-1-3	30	24	80.0	18.18	99.1
WZ7-4-2	30	25	83.3	13.10	71.4
WZ8-3-2	30	24	80.0	17.98	98.0
WZ9-1-2 *	30	26	86.7	14.40	78.5
WZ10-1-2 *	30	26	86.7	14.75	80.4
WZ11-1-6 *	30	28	93.3	12.20	66.5
WZ12-3-1 *	30	27	90.0	13.93	75.9
WZ14-3-1 *	30	25	83.3	15.62	85.1
WZ15-2-2 *	30	25	83.3	16.33	89.0
WZ16-2-1 *	30	25	83.3	15.50	84.5
Suiyouzhan	30	0	0	18.16	100
WS1-8-7	30	25	83.3	13.34	73.4
WS2-1-1	30	24	80.0	12.70	69.9
WS7-1-9 *	30	27	90.0	13.00	69.8
WS8-1-17 *	30	26	86.7	13.23	72.8
Ptb33(Rck)	30	26	86.7	12.69	

* Indicating those transgenic rice plants containing B. t. and SBTi genes and the others indicating the transgenic rice plants containing single B. t. transgene.

3 讨 论

本研究将单个 B. t. 基因或与 SBTi 基因一起共同导入到了两个华南地区优良籼稻品种中,获得了 21 个转 B. t. 单基因的 R₀ 代转基因植株系,4 个转 B. t. 和 SBTi 双基因的 R₀ 代转基因植株系。位于不同载体上的 B. t. 和 SBTi 基因共同导入频率为 33.3%(穗优占)和 37.5%(竹籼 B),这与 Christou 等报道的位于不同载体上的两个基因共同导入频率接近于 30%的报道基本一致^[12]。且证明其中 3 个转双基因系中多个拷贝的 B. t. 和 SBTi 基因是整合在转基因植株基因组同一染色体上相同或相近位点上,在后代表现为紧密连锁。至此,本研究共筛选到

8 株转 B. t. 单基因的纯系植株,9 株转 B. t. 和 SBTi 双基因的纯系植株。

转 B. t. 单基因的纯系植株对稻纵卷叶螟的抗性均较原种对照有了明显提高,这是我国首次在水稻中证明了 B. t. 基因对稻纵卷叶螟的抗性作用,而稻纵卷叶螟是危害我国水稻生产的主要害虫之一。再转 B. t. 和 SBTi 双基因的植株较转 B. t. 单基因的植株对稻纵卷叶螟又有更强的抗性。证明了 B. t. 和 SBTi 双基因的协同杀虫作用。植物蛋白酶抑制剂基因抗虫谱较广,昆虫不易产生耐受性。赵建周等^[7]就室内 18 代的汰选实验结果表明棉铃虫对转单 B. t. 基因抗虫烟草存在较高的抗性风险,而转 B. t. 和 SBTi 双基因抗虫烟草在相似汰选条件下可

以显著延缓棉铃虫的抗性发展。由此可以预测我们转 B. t. 和 SBTi 双基因的植株不但有很好的抗虫效果,而且不易使昆虫产生抗性。且有 6 株转 B. t. 和

SBTi 双基因的纯系植株对稻纵卷叶螟的抗性达到与抗性对照相等水平甚至超过抗性对照。将它们培育成抗性品系的工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Fujimoto H ,Ltoh K ,Yamamoto M *et al.* *Bio/Technology* ,1993 ,**11** :1151~1155
- [2] Wunn J ,Kioti A ,Burkhardt P K *et al.* *Bio/Technology* ,1996 ,**14** :171~176
- [3] XU D ,XUE Q ,Mcclroy D *et al.* *Mol Breed* ,1996 ,**2** :167~173
- [4] McGaughey W H ,Whalon M E. *Science* ,1992 ,**258** :1451~1455
- [5] Ryan C A. *Annu Rev Plant Phytopath* ,1990 ,**28** :173~196
- [6] 赵荣敏 ,范云六 ,石西平等. *生物工程学报* ,1995 ,**11**(1) :1~5
- [7] 赵建周 ,范云六 ,范贤林等. *科学通报* ,1999 ,**44**(15) :1535~1638
- [8] 许新萍 ,卫剑文 ,范云六等. *遗传学报* ,1999 ,**26**(3) :219~227
- [9] Doyle A. *Focus* ,1990 ,**12**(1) :13~15.
- [10] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* ,2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [11] 冯道荣 ,许新萍 ,卫剑文等. *植物学报* ,1999 ,**11** :1126~1131
- [12] Christou P ,Swain W F. *TAG* ,1990 ,**79** :337~341

Research on Improving Rice Resistance to the Pest by B. t. and SBTi Genes

WEI Jian-Wen¹ XU Xin-Ping¹ CHEN Jin-Ting¹ ZHANG Liang-You² FAN Yun-Liu³ Li Bao-Jian¹

¹(Biotechnology Research Center ,Zhongshan University ,Guangzhou 510275)

²(Department of plant protection ,Huanan Agricultural University ,Guangzhou 510243)

³(Molecular Biology Laboratory ,Biotechnology Research Center ,The Chinese Agricultural of Science ,Beijing 100081)

Abstract B. t. gene alone or and SBTi gene together were introduced into two elite indica rice varieties grown in South China by bombardment. And 21 independent transgenic lines containing B. t. gene and 4 independent transgenic lines containing B. t. gene and SBTi gene were obtained. Molecular and genetics analysis for R₁ plants showed integration of multiple transgenes occurred at one genetic locus. Northern blot result proved B. t. gene expressed in R₂ transgenic plants stably. Bioassays using R₂ transgenic plants with leafhopper (*Cnaphalocrosis medinalis*), indicated that transgenic rice plants are more resistant to the pest than untransformed control plants. And those transgenic plants containing B. t. and SBTi genes showed more resistance compared with those plants containing B. t. gene.

Key words B. t. gene , SBTi gene , Transformation , Transgenic rice , Insect resistance assay