

转 GNA+SBTi 双价基因抗虫水稻的遗传分析及抗虫性研究^{*}

李桂英¹, 许新萍², 夏 嫿², 傅家谟¹, 盛国英¹

(1. 中国科学院广州地球化学研究所 // 有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640;
2. 中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了转 GNA+SBTi 双价基因籼稻的遗传规律及对褐飞虱和稻纵卷叶螟的抗虫实验。分子检测结果表明: 外源基因在 R2 代株系中发生了分离, 部分株系分离符合 3:1 或 15:1 的孟德尔遗传规律, 但也有分离比为 1:1 及其它不正常分离的株系存在。对这些株系的特别追踪发现这几种分离式样在 R3 代中出现交叉。对 R2 和 R3 代转基因植株进行抗虫实验, 结果表明分别有 83.3% 和 76.9% 的株系对褐飞虱的抗性较原种对照均有了显著的提高。78.6% 的 R2 代株系对稻纵卷叶螟的抗性比原种对照的抗性强, 且大部分 R3 代株系继续保持良好的抗稻纵卷叶螟的性质。获得了 9 个分子检测阳性率高且对褐飞虱和稻纵卷叶螟抗性增强的水稻株系。

关键词: 双价抗虫水稻; 遗传分析; 褐飞虱抗性; 稻纵卷叶螟抗性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 01-0125-02

利用基因工程技术进行作物抗虫已成为一种全新的育种途径^[1]。研究表明外源基因在许多转化体内能稳定整合, 正常表达, 并呈现孟德尔遗传, 也有一些由于外源基因整合的方式和拷贝数不同, 或者由于沉默、损伤或丢失等导致不规则的遗传方式^[2]。而且由于转基因植株表现出具有不同程度的抗虫性, 这给转基因株系的进一步利用带来了一定的困难。所以对于外源基因在转化体内的遗传方式及其抗虫性能的研究是非常重要的。然而, 目前关于水稻外源基因遗传方式的研究多数缺乏分子生物学证据。因此, 本文将分子检测与水稻大田抗虫实验相结合, 研究了外源基因在竹籼 B R2 和 R3 代植株中的遗传规律及转基因水稻的抗虫效果, 并试图筛选出抗虫级别高且整合单基因或同时整合有双基因的水稻纯系植株。

1 材料方法

1.1 植物材料 籼稻 *Oryza sativa* L. ssp. Indica Kato 竹籼 B 转化株系为本实验室提供, 受体基因组中整合有抗虫基因雪花莲外源凝集素 (GNA) 基因和大豆蛋白酶抑制剂 (SBTi) 基因, 以及标记基因新霉素磷酸转移酶 (hpt) 基因。

1.2 方法

(1) 分子检测: 参考 Doyle 等^[3] 的方法从水稻叶片组织提取基因组 DNA。点杂交及 Southern 杂交参照 Sambrook 等^[4] 的方法进行。PCR 扩增反应按试剂盒说明书进行。

(2) 转基因水稻抗虫性鉴定: 用群体筛选法进行抗褐稻虱的鉴定。对稻纵卷叶螟的抗性鉴定用张良佑等^[5] 的方法。

2 结果与讨论

利用 PCR 扩增、点杂交及 Southern 杂交等分子检测方法研究了基因枪导入竹籼 B 的外源基因 GNA 和 SBTi 在 R2 和 R3 代中的遗传方式。据 PCR/点杂交初步检测可知, 两种抗虫基因均已经整合到水稻基因组中, 并且能够稳定遗传到 R2 和 R3 代, 同时发生了分离, 通常分离比符合 3:1 或 15:1 孟德尔显性遗传分离, 但同时也发现部分株系分离情况比较复杂, 有的株系呈 1:1 分离, 有的阴性个体数远远大于阳性植株数。这种不正常分离比可能是由于外源基因在配子中的缺失, 仅由单个配子传递的结果。试验中, 我们特别追踪了这几种分离式样在 R3 代中的表现, 发现它们的分离方式竟出现了交叉, 即 3:1 分离的株系后代中除 3:1 分离外还有不正常的分离式样, 反之亦然, 在不正常的后代中亦有 3:1 分离的式样发生。Southern 杂交进一步鉴定表明上述抗虫基因以多拷贝形式插入水稻基因组上, 并已遗传至 R2 和 R3 代植株中 (图 1)。

另外, 共获得同时整合有 GNA 和 SBTi 基因的 R3 代转基因植株 120 株, 获得 2 个同时整合有 SBTi 和 GNA 基因的纯系植株。

为了检测转基因水稻植株的抗虫性, 本文直接将褐稻虱和稻纵卷叶螟释放到上述转基因植株上,

* 收稿日期: 2002-12-06

基金项目: 国家 863 高技术计划资助项目 (101-01-02-02)

作者简介: 李桂英 (1971 年生) 女, 实习研究员, 通讯联系人; 许新萍, E-mail: lixy1999@gig.ac.cn

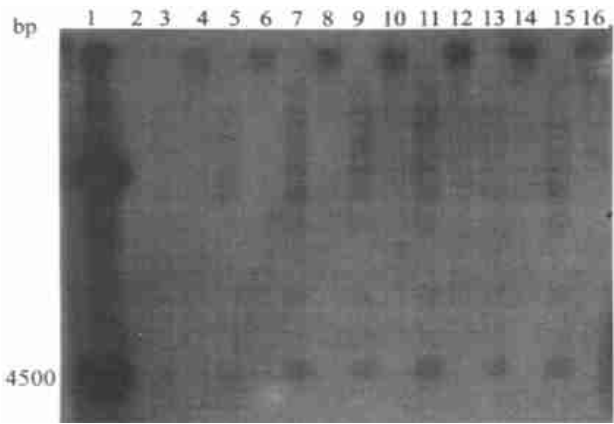


图 1 转 GNA 基因 R3 代植株的 Southern 杂交分析

Fig 1 Southern Blot of genomic DNA from transgenic plants (R3)

1: 质粒 pIP860/*Hind*III; 2: -CK/非酶切;
3, 5, 7, 9, 11, 13, 15: 样品/*Hind*III;
4, 6, 8, 10, 12, 14, 16: 样品/非酶切

并严格按照国际标准的鉴定方法进行抗虫性鉴定。结果表明: R2 和 R3 代转基因株系中, 分别有 83.3%和 76.9%的株系对褐飞虱的抗性都在 7 级以上。有 78.6%的 R2 代转基因株系对稻纵卷叶螟的抗性在 7 级以上, 尤其对抗性级别为 3 级以上植株后代 (R3 代) 进一步进行抗虫实验, 表明大部分株系继续保持良好的抗稻纵卷叶螟的性质。整个试验群体抗性系的抗虫性表现为类似泊松分布, 以具有中等抗性的系为最多。与前述的分子检测的结果相对比, 发现分子检测阳性率高的株系对褐飞虱或稻纵卷叶螟的抗性较高, 说明上述转基因植株已从外源基因中获得了抗虫性。并且在 R3 代获得了 9

个分子检测阳性率高, 且对褐飞虱和稻纵卷叶螟抗性均有增强的水稻株系 (表 1)。

表 1 R3 代转基因植株抗虫 试验情况

Tah 1 Resistance analysis of R3 progeny transgenic rice for rice brown planthopper and rice leafroller								%
系号	褐飞虱 抗性级别	稻纵卷叶螟抗性级别						
		0	1	3	5	7	9	
HZ2-3	7		0.8	5.4	34.9	36.4	22.5	
HZ4-1	7	1.4	0.7	9.9	43.3	35.5	9.2	
HZ5-1	7		4.8	12.9	33.9	43.6	4.8	
HZ5-2	7		10.2	15.4	46.2	28.2		
HZ6-1	5			14.3	14.3	57.1	14.3	
HZ7-4	5,7		9.7	22.6	42	19.3	6.4	
HZ8-1	0,7		7.6		30.8	30.8	30.8	
HZ8-2	7		8.7	32.6	28.3	30.4		
HZ10-1	7			13.8	32.3	27.7	26.2	

参考文献:

[1] 冯道荣, 许新萍, 邱国华, 等. 多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达[J] . 科学通报, 2000, 45(15): 1593.

[2] MAQBOOL S B, CHRISTOUI P. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability[J] . Molecular Breeding, 1999, 5: 471.

[3] DOYLE A. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J] . Focus, 1990, 12(1): 13.

[4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning[M] . Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989: 486.

[5] 张良佑, 吴洪基, 萧整玉, 等. 转基因水稻的抗虫性初探[J] . 华南农业大学学报, 1998, 19(2): 4.

Inheritance Analysis and Insects Resistance of Transgenic Rice Harboring GNA+SBTi Double Genes

LI Gui ying¹, XU Xin ping², XIA Qiang², FU Jia mo¹, SHENG Guo ying¹

(1.State Key Laboratory of Organic Geochemistry //

Guangzhou Institute of Geochemistry, CAS, Guangzhou 510640, China;

2. Biotechnology Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Molecular genetic analyses and insects resistance of transgenic rice plants were carried out. PCR/Dot blot/Southern blot analysis confirmed Mendelian segregation (3:1 or 15:1) of some transgenic lines in R2 progeny. However, some lines showed 1:1 and other aberrant segregation patterns. Farther studied showed that segregation patterns of R3 progeny were different from in the R2 progeny in the same line. Insect resistance test showed that 83.3% and 76.9% of the R2 and R3 progeny demonstrated enhancing insecticidal effect on rice planthopper, respectively. 78.6% of R2 progeny indicated enhancing insecticidal effect on rice leaffold, and R3 progeny also maintained Insect resistance effect. Also, 9 lines of transgenic plants, which had better resistance effect on both rice planthopper and rice leaffold than wild-type plants, were obtained.

Key words: transgenic rice harboring GNA+SBTi double genes; inheritance; resistance to rice planthopper; resistance to rice leaffold