

研究论文

Research Article

利用分子标记辅助选择培育和评价三种 *Bt* 基因(*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)抗虫水稻

刘鑫[✉], 杨宙[✉], 高冠军[✉], 林拥军[✉], 朱雪萍[✉], 余建友[✉], 何予卿[✉]

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 国家植物基因研究中心, 武汉, 430070

✉ 通讯作者: yqhe@mail.hzau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010年, 第8卷, 第2篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0002

收稿日期: 2010年5月14日

接受日期: 2010年6月12日

发表日期: 2010年9月26日

这是一篇开放获取的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

本文首次发表在《Molecular Plant Breeding》Online 期刊上。本文是依据《Creative Commons Attribution License》协议, 用中文再次发表与传播, 如果读者对中文含义有歧义的话, 请以英文原文为准。如果任何人要引用本研究内容, 建议的引用格式如下:

Liu et al 2010, Development of *Bt* Rice by Molecular Marker-assisted Selection and Assays for Insect-Resistance, Molecular Plant Breeding (Online) Vol.1 No.2 (doi: 10.5376/mpb.2010.01.0002)

摘要 水稻种质 9311 和辐恢 838 分别是中国两系杂交水稻和三系杂交水稻的优良的亲本材料。水稻螟虫等鳞翅目虫害使中国水稻(含杂交水稻)严重减产。本研究利用分子标记辅助选择, 并结合田间涂抹除草剂等抗虫鉴定, 将三种 *Bt* 基因(*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)分别导入 9311 和辐恢 838 中, 培育出 9311 和辐恢 838 遗传背景相似且带有不同抗螟虫基因的水稻新品系。同时, 对新材料进行田间抗虫鉴定与农艺性状考察。结果表明, 与对照相比, 培育的新材料对稻纵卷叶螟具有良好的抗性, 并且农艺性状表现良好。

关键词 水稻; *Bt* 基因(*cry1Ac*、*cry1C**和 *cry2A**); 抗虫鉴定; 分子标记辅助选择

Development of *Bt* Rice by Molecular Marker-assisted Selection and Assays for Insect-Resistance

Xin Liu[✉], Zhou Yang[✉], Guanjun Gao[✉], Yongjun Lin[✉], Xueping Zhu[✉], Jianyou Yu[✉], Yuqing He[✉]

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, National Center of Plant Gene Research, Wuhan, 430070

✉ Corresponding author, yqhe@mail.hzau.edu.cn; ✉ Authors

This article was first published in Molecular Plant Breeding, and was distributed in Chinese under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Abstract Rice germplasm 9311 and Fuhui 838 are both elite parent lines, particular for two and three-line indica hybrid rice in China, respectively. Two kinds of major lepidopteran pests in rice production, stemborers and leafrollers, cause severe yield loss in the most rice-producing countries. *Bt* toxic protein which are expressed by *cry1Ac*, *cry1C** and *cry2A** should be the most available methods to decrease the damage by these lepidopterans. To improve the rice resistance to insects, three *Bt* genes, i.e. *cry1Ac*, *cry1C** and *cry2A**, were introgressed to 9311 and Fuhui 838 from the donor parents, that are Minghui63 (*cry1C**), Minghui63 (*cry2A**), Minghui63 (*cry1Ac*) respectively by molecular marker-assisted selection. The results showed that the improved lines got greatly resistance to the pests, and acquired good results of the agronomic traits. The improved lines would not only have potential application value but also can be used as bridge materials in rice transgenic breeding.

Keywords Rice (*Oryza sativa* L.); *Bt* Gene (*cry1Ac*, *cry1C** and *cry2A**); Assays for insect-resistant; Marker-assisted selection

水稻种质 9311 和辐恢 838 分别是非常优良的两系和三系杂交稻的亲本材料, 配合力优势明显。但是其配合出的优良杂交稻容易被日益加重的虫害所影响, 特别是鳞翅目螟虫类等, 一直影响水稻的产量和品质。近几年, 虫害威胁程度逐年升高。转基因抗虫技术是近些年兴起的一种新的害虫防治技

术。这种转基因作物可以表达一种细菌苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 *Bt*)来源的杀虫蛋白。该杀虫蛋白经过害虫胃肠道的特殊酶水解后, 专一的与鳞翅目等害虫胃肠道的受体位点进行识别与结合(Hofmann et al., 1988a; Hofmann et al. 1988b; van Rie et al., 1989; van Rie et al., 1990)。毒性蛋白与受体

结合以后, 毒性蛋白的部分结构在受体的帮助下插入细胞膜中, 并在细胞膜上形成孔道, 有研究已经提出一些形成孔道的模型。(Knowles, 1994; Schwartz et al., 1997; Gazit et al., 1998; Schnepf et al., 1998)。最终导致害虫胃肠道穿孔, 杀死害虫。

晶体蛋白基因家族(crystal protein gene, 简写 Cry)属 Bt 毒性蛋白的一类, 应用非常广泛。本试验利用的三种 Bt 基因(*cryIAC*, *cryIC**和 *cry2A**)的杀虫性及安全性评价前人已做过相关报道, 对鳞翅目害虫具有极佳的毒杀性。经研究表明, 以上所有的三种转基因 Bt 水稻的茎秆均可以在 5 天内完全杀死接种的一龄三化螟(Tang 等, 2006; Chen 等, 2005)。*CryIAC* 作为第一代 Bt 杀虫基因, 其杀虫性已广泛接受认可。转 *CryIAC* 家系的叶片 *CryIAC* 蛋白含量为 $11.09 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ 鲜叶重(陈浩, 2005) *CryIAC* 蛋白占叶片总可溶蛋白的 0.02%。*Cry2A**和 *CryIC**为第二代 Bt 杀虫基因, *Cry2A** 毒性蛋白的含量为 $84.94 \pm 2.34 \mu\text{g/g} \sim 138.75 \pm 4.32 \mu\text{g/g}$ 鲜叶重, *Cry2A** 家系叶片中 *Cry2A** 蛋白占叶片总可溶蛋白的 0.22%~0.32% (Chen 等, 2005)。*CryIC** 蛋白的含量虽较少为(Tang 等, 2006) $1.46 \mu\text{g/g}$ 鲜叶重, 但由于其靶向性强, 因此同样对鳞翅目害虫有极强的杀伤能力。作为第二代 Bt 杀虫基因, 这两种 Bt 杀虫基因表达毒蛋白量具有更好的靶向性, 能够更加特异的结合靶位点, 在不给植株带来过高的负担的同时, 又能高效的杀死鳞翅目害虫, 达到了非常理想的效果。Bt 毒蛋白表达的专一性极高, 只在水稻叶片和茎秆中有高量表达, 而在种子中几乎不表达, 用 Real-time 等方法均检测不到毒性蛋白的表达, 因此, 以上三种 Bt 基因可以安全应用。

利用 Bt 毒蛋白可以有效地杀死危害水稻的鳞翅目等害虫, 减轻其对水稻的危害。目前, Bt 毒蛋白作为一种生物杀虫剂在农业上已经使用了 60 多年, 同时, Bt 作物在农业上的使用可以大幅度的减少杀虫剂的使用量, 这不仅直接降低了种植者的种植成本, 而且对保护人类的健康和生态环境都有积极的意义。

在上世纪 50 年代, Bt 杀虫剂逐渐开始在美国兴起(Martin 和 Travers, 1989)。至 1995 年, 有 182 种 Bt 制剂在美国环保署(US Environmental Protection Agency, EPA)注册。1987 年, 公开报道获得了第一批 Bt 转基因植物(Barton et al., 1987; Fischhoff et al., 1987; Vaeck et al., 1987)。1995 年, 转 Bt 作物首次在美国和加拿大实现了商品化。2004 年, 全球 Bt 作物的种植面积达到了 2240 万公顷(James, 2004)。华中农业大学于 2009 年 11 月份获得转 *cryIAb/c* 基因华恢 1 号和 Bt 汕优 63 的安全证书。

本试验利用分子标记辅助选择将三种 Bt 基因(*cryIAC*, *cryIC**, *cryIC**)导入到 9311 和辐恢 838 中, 为即将到来的转 Bt 基因抗虫品种商品化应用提供材料资源和理论依据。

1 结果与分析

1.1 分子标记辅助选择筛选阳性纯合家系

由于设计的 Bt 基因引物为显性标记, 因此筛选纯合家系则要通过田间涂抹除草剂观察与分子标记辅助选择结合来验证。纯合家系既要满足家系内 24 株在田间除草剂表现为抗性, 又要保证家系内 24 株 PCR 产物经琼脂糖电泳后均有阳性条带。每个 Bt 基因(*cryIAC*, *cryIC**和 *cry2A**)均筛选到超过 2 个家系的纯合家系。部分筛选阳性纯合家系图片如图 1。

1.2 田间抗虫性结果

研究结果显示, 在 2009 年田间发虫不重的情况下, 稻纵卷叶螟对对照 9311 和辐恢 838 的危害较轻, 卷叶率均为 10% (表 1), 而三种 Bt 基因(*cryIAC*, *cryIC**和 *cry2A**)分别在 9311 和辐恢 838 背景下对稻纵卷叶螟均表现出较高的抗性, 除了 9311 (*cry2A**)家系出现个别叶片被取食情况, 其余所有 Bt 基因家系均无受损叶片出现, 特别是辐恢 838 的各个转基因家系如辐恢 838 (LX111), 辐恢 838 (LX83), 辐恢 838 (LX124)均表现出对稻纵卷叶螟完全抗性, 无被取食的情况。结果与 Tang 等(2006)和 Chen 等(2005)的研究结果表现基本一致。

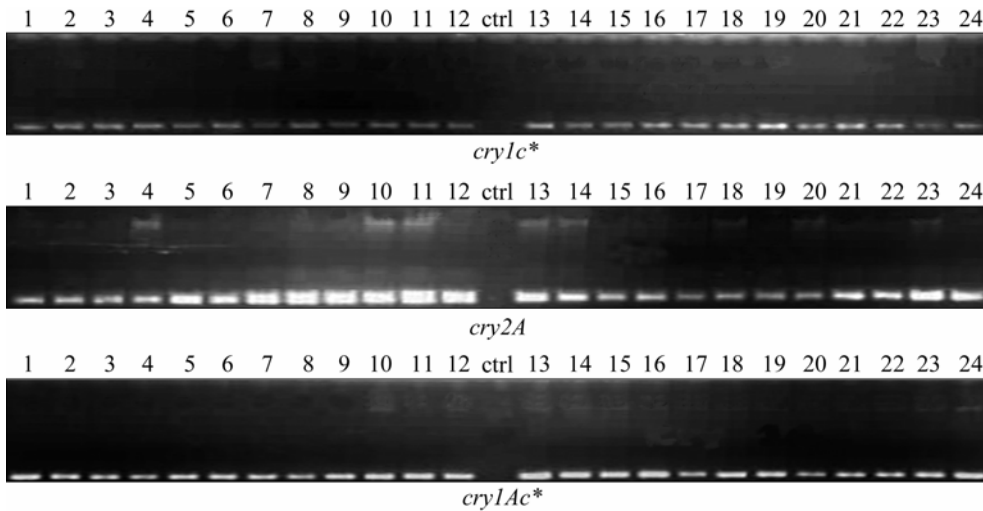


图 1 PCR 检测 *cryIC**, *cry2A* 和 *cryIAC** 基因纯合家系的结果

注: 1~24: 家系内的 24 个单株, ctrl 为阴性对照

Figure 1 PCR detection results of *cryIC**, *cry2A* and *cryIAC** homozygous lines

Note: 1~24: 24 homozygous individuals and the control (ctrl) was in the middle

表 1 各个材料在大田自然发虫情况

Table 1 The damage investigation of leaf folders in the different lines

材料背景名称 Names of progenies	基因型 Genotype	不同危害级别卷叶片数 Different folded leaves					单株总叶数 Numbers of leaves/ Plants	卷叶百分比(% Folded leaves (%)
		无 None	1-3	3-5	5-8	全部 Full		
9311	无 None				√		70	10
9311(LX21)	1Ac	√					70	0
9311(LX7)	1C*	√					70	0
9311(LX64)	2A*		√				70	1.5
辐恢 838 Fuhui 838	无 None			√			50	10
辐恢 838 (LX111) Fuhui838 (LX111)	1Ac	√					50	0
辐恢 838 (LX83) Fuhui (LX83)	1C*	√					50	0
辐恢 838 (LX124) Fuhui 838 (LX124)	2A*	√					50	0

注: √ 代表受损叶片

Note: √ means that the damaged leaves

1.3 农艺性状考察结果

由表 2 可以看出, 含有 *Bt* 基因(*cryIAC*, *cryIC** 和 *cry2A**)的各个品系农艺性状均表现良好, 很多家系在单株实粒数、单株产量等农艺性状上较对照有明显提升, 如 LX83 (辐恢 838/1C*)家系在单株实粒数、单株产量和每穗实粒数均较对照有显著提升。

2 讨论

本试验通过分子标记辅助选择及田间抗虫鉴定, 将 *Bt* 基因(*cryIAC*, *cryIC**和 *cry2A**)导入到以上两个品种中, 转育出具有抗虫性的抗虫新品系。

从田间抗虫鉴定的情况看, 转育后得到的各基因型品系对螟虫具有极高的抗性, 可以看到,

cry1Ac、*cry1C**基因表现出对螟虫特别是稻纵卷叶螟完全的抗性, 其中, *cry2A**基因对螟虫特别是稻纵卷叶螟表现出较强的抗性, 有个别叶片遭到损害, 这个结果与前人(Chen 等, 2005)发表的结果相一致。

从农艺性状考察的结果看, 转 *Bt* 基因(*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)的各个家系各个农艺性状与原始 9311 和辐恢 838 基本没有差异, 同时在大田自然发虫的情况下, 大部分转 *Bt* 基因(*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)家系比对照在各个农艺性状上都有优势, 但是, 有个别性状和个别转 *Bt* 基因家系比对照没有体现出明显的优势。一方面, 由于武汉 2009 年螟虫和稻纵卷叶螟等害虫发虫并不是很严重; 另一方面, 由于螟虫和稻纵卷叶螟等害虫发虫主要出现在抽穗期以后, 因此它们对水稻的危害适当的减轻。以上两个因素可能是个别转 *Bt* 基因家系比对照没有体现出明显优势的原因。

本研究的目的在于对本重点实验室设计合成的三个 *Bt* 基因(*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)进行转育并评价其表现; 分子标记辅选择进行辅助育种, 可大大提高育种的效率, 同时华中农业大学于 2009-11 获得转 *Bt* 基因华恢 1 号和 *Bt* 汕优 63 安全证书, 此安全证书批准的 *Bt* 为第一代 *Bt* 基因(*cry1Ab/c*), 本研究也是建立在此基础上, 同时利用本实验室合成的第二代 *Bt* 基因(*cry1C**和 *cry2A**)进行转育, 为即将到来的 *Bt* 基因商品化应用提供后备资源; 绿色超级稻是张启发在 2009 年提出的水稻战略设想(Zhang, 2009), 归纳起来为在不断提高产量和品质的基础之上, 实现基本不打农药, 大量少施化肥和抗旱节水的目标。本研究的目的是绿色超级稻实施策略的第一步, 即通过转基因的技术, 借助分子标记辅助选择, 利用外缘基因实现水稻获得对危害其生长发育及产量的害虫抗性。

3 材料与方法

3.1 供试材料

本试验研究的水稻材料为(1)供体亲本为本重点实验室已构建好的 *Bt* 材料明恢 63 (*cry1Ac*)、明恢 63 (*cry1C**)和明恢 63 (*cry2A**) (Tang 等, 2006; Chen 等, 2005)。(2)受体亲本为我国杂交水稻两系和三系优良亲本材料 9311 和辐恢 838, 分别引自江苏

里下河地区农业科学研究所和四川省原子核应用技术研究所。

3.2 分子标记辅助回交的技术路线

利用本实验室已有的转 *Bt* 材料明恢 63 (*cry1Ac*)、明恢 63 (*cry1C**)和明恢 63 (*cry2A**)作为供体亲本, 以 9311 和辐恢 838 分别作为受体亲本, 通过杂交并以受体亲本作为轮回亲本进行三代的回交, 获得背景与轮回亲本一致的转 *Bt* 基因家系, 最后通过自交一代来获得纯合转 *Bt* 基因家系。

3.3 田间种植

将回交三代, 自交一代的转 *Bt* (*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)基因的家系随机种植, 每个家系种植 24 株, 对照亲本同样随机种植于转 *Bt* 基因家系中, 共计 80 个转 *Bt* 基因家系。单株之间间隔为 16.5 cm×19.8 cm, 家系之间间隔为 39.6 cm。

3.4 分子标记

检测用到的不同 *Bt* 基因引物序列与 Tang 等(2006)和 Chen 等(2005)文献中利用的引物序列一致, 退火温度统一为 57℃, *Bt* 基因引物序列设计为显性标记, 只能鉴定阳性植株。

3.5 PCR 分子标记检测及琼脂糖凝胶电泳检测

水稻叶片总 DNA 的提取方法采用 CTAB 法(Murray and Thompson, 1980)。

PCR 反应程序: 第 1 步 94℃ 4 min 变性, 第 2 步 94℃ 50 s 变性, 第 3 步 57℃ 50 s 退火, 第 4 步 72℃ 55 s 延伸, 第 5 步 72℃ 7 min 延伸, 第 6 步 25℃ 1 min 终止冷却, 第 2 步到第 5 步共 32 个循环。利用 3%的琼脂糖凝胶电泳检测(250V, 30 min)。

3.6 田间抗虫鉴定及农艺性状考察

抗虫鉴定: 抽穗期, 对所有转基因家系及亲本对照进行自然发虫的虫害(稻纵卷叶螟)考察, 每个家系观察所有的 24 株, 对虫害情况进行记录。

农艺性状考察: 随机选取各个转 *Bt* (*cry1Ac*, *cry1C**和 *cry2A**)基因家系, 每个基因型选取两个纯合家系, 每个纯合家系随机选取 5 株进行考种。

作者贡献

刘鑫是本研究的实验设计、执行以及稿件编写的主要执行人。杨宙参与构建供体亲本材料: Bt 材料明恢 63 (*cryIAC*)、明恢 63 (*cryIC**)和明恢 63 (*cry2A**)。高冠军执行田间管理工作。林拥军是 *cryIC**和 *cry2A* 基因的专利所有人。朱雪萍和余建友参与标记选择工作。何予卿是项目的构思者及负责

人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金, 科技部 863 计划和植物转基因专项共同资助。

参考文献

- Barton K.A., Whiteley H.R., Yang N.S., 1987, *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects, *Plant Physiol.*, 85: 1103-1109
- Chen H., Tang W., Xu C.G., Li X.H., Lin Y.J., Zhang Q., 2005, Transgenic *indica* rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against rice lepidopteran pests, *Theor. Appl. Genet.*, 111: 1330-1337
- Fischhoff D.A., Bowdish K.S., Perlak F.J., Marrone P.G., McCoormick S.M., Niedermeyer J.G., Dean D.A., Kusano K.K., Mayer E.J., Rochester D.E., Rogers S.G., Fraley R.T., 1987, Insect tolerant transgenic tomato plants, *BioTechnology*, 5: 807-813
- Gazit E., la Rocca P., Sansom M.S.P., Shai Y., 1998, The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12289-12294
- Hofmann C., Luthy P., Hutter R., Pliska V., 1988b, Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*), *Eur. J. Biochem.*, 173: 85-91
- Hofmann C., Vanderbruggen H., Hofte H., Van Rie J., Jansens S., Van Mellaert H., 1988a, Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in brush-border membrane of target insect midguts, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 7844-7848
- James C., 2005, Global status of commercialized biotech/GM Crops: ISAAA
- Knowles B.H., 1994, Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins, *Adv Insect Physiol*, 24: 275-308
- Martin P.A.W., Travers T.S., 1989, Worldwide abundance and distribution of BT isolates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2437-2442
- Murray M.G., Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic. Acids. Res.*, 8: 4321-4325
- Schwartz J.L., Juteau M., Grochulski P., Cygler M., Prefontaine G., Brousseau R., Masson L., 1997, Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecules of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering, *FEBS Lett.*, 410: 397-402
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H., 1998, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein, *Microbial Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., Beukeleer M.D., Dean C., Zabeau M., Montagu M.V., Leemans J., 1987, Transgenic plants protected from insect attack, *Nature*, 328: 33-37
- Van Rie J., Jansens S., Hofte H., Degheele D., Van Mellaert H., 1989, Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects, *Eur. J. Biochem.*, 186: 239-247
- Van Rie J., McGaughey W.H., Johnson D.E., Barnett B.D., Van Mellaert H., 1990, Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, *Science*, 247: 72-74
- Tang W., Chen H., Xu C.G., Li X.H., Lin Y.J., Zhang Q.F., 2006, Development of insect-resistant transgenic *indica* rice with a synthetic *cryIC** gene, *Mol. Breeding*, 13: 301-312
- Zhang Q.F., 2007, Strategies for developing Green Super Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 104: 16402-16409

表 2 田间各个农艺性状考察情况

Table 2 Comparison of agronomic traits of the different lines under field conditions (Wuhan 2009, China)

编号 Names	株高(cm) Plant height (cm)	抽穗期(天) Heading stages (d)	有效穗数(个) Tillers/plant	单株实粒(粒) Grains/Plant	千粒重(g) 1 000 grain weight (g)	单株产量(g) Yield/plant (g)	结实率(%) Spikelet fertility (%)	每穗实粒数(个) Grains/Tillers
辐恢 838 (对照) Fuhui838 (Control)	109.0±1.5	94	9	612.2±145.9	35.0±0.6	21.5±5.3	71.8±3.0	67.3±9.7
LX83 (辐恢 838/1C*) LX83 (Fuhui838/1C*)	110.5±1.3	92	9	796.3±143.2*	34.4±1.0	27.2±4.1*	72.4±12.1	88.8±16.5*
LX124 (辐恢 838/2A*) LX124 (Fuhui838/2A*)	107.3±1.2	94	9	627.8±52.5	36.3±1.7	22.2±2.8	71.0±5.0	69.9±5.4
LX111 (辐恢 838/1Ac) LX111 (Fuhui838/1Ac)	112.7±1.1	95	9	679.3±106.7	35.0±0.5	23.8±4.0	65.1±0.4	74.8±15.1
9311 (对照) 9311 (Control)	115.1±1.4	97	10	1255.5±229.8	28.1±0.9	35.2±5.3	74.4±3.5	135.3±40
LX7 (9311/1C*)	113.3±1.5	98	9	1370.0±180.5	30.7±0.7	42.0±5.1	84.7±3.8	152.7±19.9
LX64 (9311/2A*)	115.7±1.9	96	10	1260.0±311.5	29.0±0.9	36.4±8.1	85.6±5.7	128.2±19.6
LX21 (9311/1Ac*)	114.6±1.0	98	8	1176.0±224.3	28.7±1.9	34.0±8.5	86.1±4.1	147.8±10.7

注: *表示 5%显著水平, ** 表示 1%显著水平

Note: * means 0.05 probability level, ** means 0.01 probability level