

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2023.03.008

常见水稻病虫害胁迫对转 *cry1C* 基因抗虫水稻 Bt 蛋白表达量的影响

王欢^{1,2}, 曹征鸿^{2,3}, 叶恭银², 党聪^{2*}
¹上海农林职业技术学院, 上海 201699; ²浙江大学昆虫科学研究所, 水稻生物学国家重点实验室/
农业农村部作物病虫分子生物学重点实验室/浙江省作物病虫生物学重点实验室,
浙江 杭州 310058; ³鹰潭市林业局, 江西 鹰潭 335001

摘要:【目的】明确转 *Bt* 基因抗虫水稻在病虫害胁迫下对 Bt 蛋白表达量的影响。【方法】以 *Bt* 水稻 TIC-19(表达 Cry1C 蛋白)为研究对象,探究褐飞虱、白叶枯病等 6 种水稻常见病虫害胁迫下其体内 Bt 蛋白的表达量变化。【结果】褐飞虱取食引起 TIC-19 水稻叶片中 Bt 蛋白含量降低,而黑尾叶蝉取食显著降低了 TIC-19 水稻叶鞘中的 Bt 蛋白含量,白叶枯病侵染导致 *Bt* 水稻叶鞘中的 Bt 蛋白含量显著上升。二化螟、水稻普通矮缩病、稻瘟病的胁迫对转基因水稻 TIC-19 叶片和叶鞘中的 Bt 蛋白含量均无显著影响。【结论】病虫害胁迫因种类不同对 *Bt* 水稻中 Bt 蛋白表达量的影响有所不同。这将为 *Bt* 水稻的抗虫效果评价提供数据基础,同时为 *Bt* 水稻病虫害综合治理提供科学依据。

关键词: 水稻; 病虫害; 胁迫; Bt 蛋白; 表达量



开放科学标识码
(OSID 码)

Bt protein expression of transgenic *cry1C* rice under the stress of common rice pests and diseases

WANG Huan^{1,2}, CAO Zhenghong^{2,3}, YE Gongyin², DANG Cong^{2*}
¹Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology/
Ministry of Agricultural and Rural Affairs Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects/Key Laboratory
of Biology of Crop Pathogens and Insects of Zhejiang Province, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University,
Hangzhou, Zhejiang 310058, China; ³Forestry Bureau of Yingtan, Yingtan, Jiangxi 335001, China

Abstract: 【Aim】The effects of rice pest and disease stress on the Bt protein expression in insect resistant transgenic *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) rice need to be defined. 【Method】In this study, one *Bt* rice line, TIC-19 (expressing Cry1C protein), was used to investigate the changes of Bt protein expression in *Bt* rice under the stress of six common rice pests and diseases, such as brown planthopper, bacterial blight, and so on. 【Result】The results showed that the feeding of brown planthopper caused a decrease in Cry1C protein content in TIC-19 rice leaves, while the feeding of green rice leafhopper significantly reduced Cry1C protein content in TIC-19 rice sheaths, and bacterial blight infestation caused a significant increase in Cry1C protein content in TIC-19 rice sheaths. The stresses of rice stem borer, rice dwarf virus and rice blast had no significant effects on the Bt protein content in both leaves and sheaths in transgenic rice TIC-19. 【Conclusion】The Bt protein expression in *Bt* rice varied from the stress of different pest and disease species. These results will provide a data basis for the evaluation of the insect resistance effect of *Bt* rice, and also provide some scientific basis for the integrated pest and disease management on *Bt* rice.

Key words: rice; pests and diseases; stress; Bt protein; expression level

我国是世界上第一大水稻 *Oryza sativa* L.生产国,面对日趋严重的粮食危机,水稻的绿色高产稳

产对于我国粮食安全至关重要 (FAO *et al.*, 2022)。近年来, 由于虫源基数、种植制度、作物布局、气候变化、害虫抗药性等因素, 我国水稻病虫害发生呈上升趋势。转 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 基因抗虫水稻 (简称 *Bt* 水稻) 为水稻害虫防治提供了新的途径 (<https://www.natesc.org.cn/>)。我国在转基因抗虫水稻研究方面处于领先地位, 目前已经有一系列的 *Bt* 水稻相继问世 (Li *et al.*, 2016)。其中“华恢 1 号”水稻 (转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因) 已经先后 2 次拿到我国生物安全证书, 并且通过了美国食品和药品管理局的安全性评价咨询, 标志着 *Bt* 水稻商业化种植又迈出了重要的一步 (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=Biocon>)。 *Bt* 水稻抗虫效果评价是商业化种植的基础, 也是支撑 *Bt* 水稻在病虫害综合治理中重要性的科学依据。

转 *Bt* 基因植物的抗虫效果主要来源于其体内表达的 *Bt* 杀虫蛋白, 这类蛋白进入昆虫肠道后经蛋白酶水解成小肽, 结合到中肠上皮细胞膜的特异性受体上, 使细胞通透性发生变化, 进而引起害虫死亡 (Schnepf *et al.*, 1998)。然而, 多种因素可能影响 *Bt* 蛋白的表达, 进而影响其抗虫效果。 *Bt* 蛋白含量在转基因植物的不同生长季节及不同组织中有所不同, 张益文等 (2012) 发现 *Cry1Ac* 蛋白含量在抗虫棉生长过程中均呈动态下降趋势, 而根中下降的速率最快, 茎和叶片次之。非生物胁迫因素也可能影响 *Bt* 蛋白的表达水平; 姜周庚等 (2012) 的研究结果表明, 高温胁迫会显著降低抗虫棉铃壳中 *Bt* 蛋白表达量, 且随着温度水平的提高, 下降的幅度也更大; 张祥等 (2017) 发现干旱胁迫下, 供试抗虫棉铃壳中杀虫蛋白质含量下降; 低温、高盐等非生物胁迫因子均会显著影响转 *Bt* 基因抗虫棉及抗虫玉米中 *Bt* 蛋白的表达水平 (常丽娟等, 2020; Trtikova *et al.*, 2015)。

目前, 关于生物胁迫因子 (病害、虫害侵染等) 对转 *Bt* 基因作物中 *Bt* 蛋白表达的影响研究较少。本试验以 *Bt* 水稻 T1C-19 (表达 *Cry1C* 蛋白) 为研究对象, 探究水稻 6 种常见病虫害胁迫下其体内 *Bt* 蛋白的表达量变化, 以期以 *Bt* 水稻的抗虫效果评价提供数据基础, 也为 *Bt* 水稻病虫害综合治理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试水稻

试验所用 *Bt* 水稻品系为 T1C-19, 是采用农杆菌

介导法获得的表达 *cry1C* 基因的转基因水稻。转入的 *cry1C* 基因是以苏云金芽孢杆菌的野生型 *cry1Ca5* 基因为模板, 通过去除一些影响其在植物细胞表达的序列, 并且根据植物中的密码子偏好性来优化设计的, 由玉米 *Zea mays* L. 的 *ubiquitin* 启动子驱动, T1C-19 在田间和室内条件下对鳞翅目水稻害虫二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker)、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée 等都表现高抗 (Tang *et al.*, 2006)。对照是非转基因亲本明恢 63 (MH63)。所有供试水稻采用木村营养液室内培养 (Yoshida *et al.*, 1976)。

1.2 供试昆虫

试验所用的褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål、黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* Uhler 和二化螟均采自于浙江大学农场, 采回后在人工气候室内分别于感虫水稻品种 TN1 (Taichung Native 1, 国际标准水稻鉴定品种) 上连续饲养多代。室内饲养条件: 温度 (28 ± 1) °C, 光周期 (明: 暗) 14: 10, 相对湿度 (60 ± 5) %, 光照度 3500~4000 lx。

1.3 供试病害

试验所用的稻瘟病菌 *Pyricularia grisea* Cavara 为野生型 Guy11, 培养基为 CM 培养基。所用的白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Ishiyama 为 PX099 小种, 培养基为 NA 培养基。水稻普通矮缩病毒 (*Rice dwarf virus*, RDV) 由黑尾叶蝉传播。所用菌种与 80% 甘油按照 1: 1 混合后保存于 -70 °C 冰箱, 使用之前在相应平板上分别进行划线活化。

1.4 虫害胁迫试验

取 1 株苗龄 40 d 左右的 T1C-19 和 MH63 稻株于自制养虫笼 (高 36 cm, 直径 10 cm, 由 2 个保鲜盒组成, 将根茎分开) 中, 每笼接入饥饿处理 6 h 的褐飞虱 (或黑尾叶蝉) 3~4 龄若虫 10 头, 待褐飞虱 (或黑尾叶蝉) 取食 3 d 之后, 分别对每株水稻的叶片和叶鞘进行取样, 保存于 -70 °C 冰箱用于后续 *Bt* 蛋白含量检测。同样, 取 1 株苗龄 40 d 左右的 T1C-19 和 MH63 稻株于自制养虫笼中, 每笼接入饥饿处理 6 h 的二化螟 2~3 龄幼虫 10 头, 待二化螟取食 3 d 后, 取出水稻叶鞘中的二化螟幼虫, 分别取每株水稻的叶片和叶鞘进行检测。以未接虫的水稻作为对照, 每个处理 5 个重复。

1.5 病害胁迫试验

将稻瘟病菌株 Guy11 的孢子制成约每毫升 10^5 个的孢子悬浮液, 参考刘同宝 (2008) 的方法, 取 10

mL 孢子悬浮液用喷雾器喷洒到 1 株水稻植株上。喷雾完后,用黑色塑料袋将接种的水稻套住密封避光培养 36 h,其间多次喷水加湿。36 h 后去除塑料袋,正常培养。5 d 后,接病的植株叶片逐渐出现小病斑,2 周后病斑明显,出现典型的梭形病斑,取其中症状明显的水稻叶片及叶鞘用于 Bt 蛋白含量检测,以未接菌的水稻作为对照,每个处理 5 个重复。

将白叶枯病菌 PX099 菌液配成光密度 0.8~1.0 的细菌悬浮液,参考储昭晖(2006)的方法,用剪刀沾菌液后,剪水稻上部健康叶片叶尖 1~2 cm,每沾一次菌液剪 1~2 片叶,每株剪 5~6 片叶。接种完后,放置在温室中培养 10 d 左右,水稻叶片剪叶周围呈枯白色,15~20 d 症状明显,部分水稻叶片上部呈枯白色卷曲。取其中症状明显的水稻叶片及叶鞘用于 Bt 蛋白含量检测,以未接菌的水稻作为对照,每个处理 5 个重复。

取 4~5 叶期的 TIC-19 和 MH63 水稻各 15 株,移栽到密封接虫瓶中,每株水稻内接一头带毒的黑尾叶蝉若虫,取食 3 d 后,移栽到温室中培养,4 d 左右,水稻叶片中央叶脉周围会出现一连串透明的白点,即为水稻普通矮缩病症状。2 周后,取经过传毒的新鲜水稻叶片 0.1 g,采用 TRIZOL 法提取水稻叶片总 RNA,并用试剂盒 One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (北京全式金生物技术有限公司)反转录得到 cDNA,以 RDV 的 S8 片段设计引物(F: 5'-ATAGCTGGCGTTACGGCTAC-3'; R: 5'-AAACCGTCCACCTGACTACG-3')进行 PCR,将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,确认水稻植株是否带 RDV 病毒(王前进,2017)。取经过带毒验证的水稻植株的叶片及叶鞘,用于 Bt 蛋白含量

检测,以未传毒的水稻为对照,每个处理 5 个重复。

1.6 Bt 蛋白含量测定

采用酶联免疫试剂盒(ENVIROLOGIX)测定 Bt 蛋白的含量,各处理中用于 Bt 蛋白含量测定的水稻组织为 0.1 g (鲜质量)。参考 Dang *et al.*(2021)中的操作步骤,将取样的水稻组织液氮冷冻后,用组织研磨仪充分磨碎,加 1 mL 提取液振荡提取 2 h 后,15000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 5 min,取上清液按照 1:50 的体积比例稀释后进行检测。检测的具体步骤参照试剂盒的说明书进行,酶标仪采用 Varioskan Flash (Thermo Scientific, 美国)全波长多功能酶标仪,分别在波长 450 和 650 nm 测定相应光密度,根据标准曲线计算各样品中 Bt 蛋白的含量。

1.7 数据处理和统计分析

将测得的各样品 Bt 蛋白含量用 Excel 2010 进行数据处理,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,Student *t* 检验比较被病虫害侵染的水稻与未被侵染水稻中 Bt 蛋白含量的差异($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 水稻虫害胁迫对 Bt 蛋白含量的影响

相较于未被褐飞虱取食的 Bt 水稻(图 1A),叶片中 Bt 蛋白含量在褐飞虱取食后出现显著下降($t=-4.454, P=0.005$),而叶鞘中 Bt 蛋白含量在褐飞虱取食后没有出现显著变化($t=-1.679, P=0.202$)。对于另外一种刺吸式害虫黑尾叶蝉(图 1B),取食 TIC-19 后叶鞘中 Bt 蛋白含量发生显著下降($t=3.581, P=0.046$),而叶片中 Bt 蛋白含量与未被取食的水稻之间没有显著差异($t=1.050, P=0.797$)。二化螟取食 TIC-19 前后(图 1C),水稻叶鞘及叶片中 Bt 蛋白含量均没有发生显著变化。

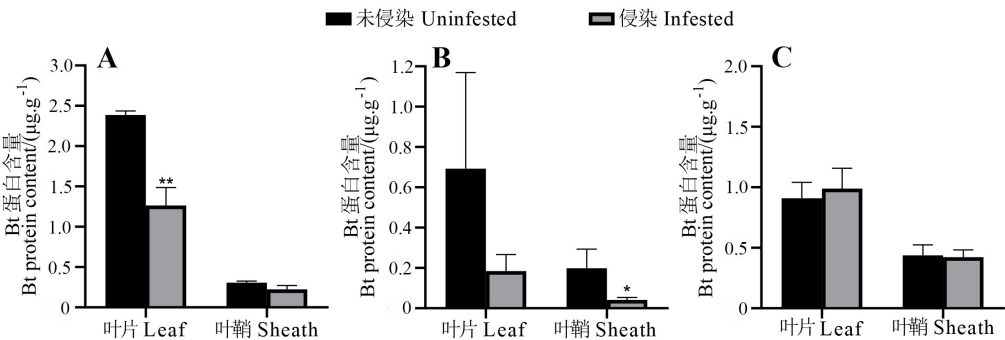


图 1 褐飞虱 (A)、黑尾叶蝉 (B)、二化螟 (C) 胁迫下 TIC-19 水稻叶片和叶鞘中 Bt 蛋白含量
Fig.1 Bt protein content in leaf and sheath of TIC-19 rice under the stress of *Nilaparvata lugens* (A), *Nephotettix cincticeps* (B), *Chilo suppressalis* (C)

* 表示差异显著 ($P<0.05$), ** 表示差异极显著 ($P<0.01$).
* indicated significant difference ($P<0.05$), ** indicated highly significant difference ($P<0.01$).

2.2 水稻病害胁迫对 Bt 蛋白含量的影响

对于水稻病害胁迫(图2),感染稻瘟病和健康转基因水稻 T1C-19 叶片和叶鞘中的 Bt 蛋白含量均没有显著差异(叶片: $t=2.079, P=0.066$;叶鞘: $t=-0.892, P=0.398$)。而白叶枯病菌侵染极显著促进了 T1C-19 水稻叶鞘中 Bt 蛋白含量的上升

($t=8.656, P=0.001$),并没有影响叶片中 Bt 蛋白含量($t=1.805, P=0.145$)。与未感染 RDV 的 T1C-19 水稻相比,感染了 RDV 的水稻叶片和叶鞘中的 Bt 蛋白含量均没发生显著变化(叶片: $t=1.579, P=0.165$;叶鞘: $t=-0.610, P=0.575$)。

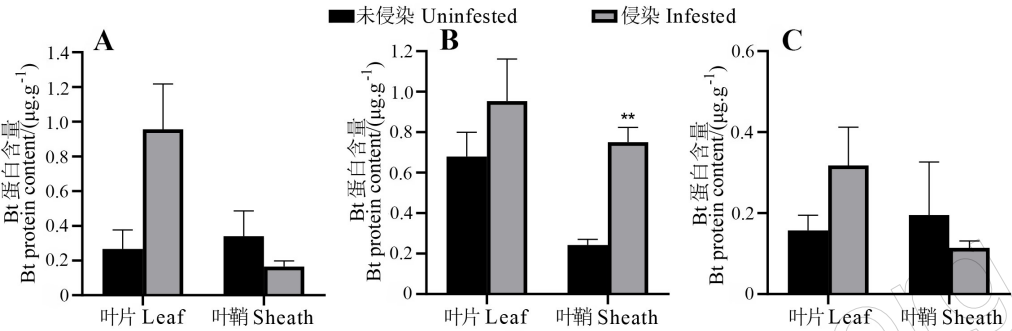


图2 稻瘟病菌(A)、白叶枯病菌(B)、水稻矮缩病毒(C)胁迫下 T1C-19 水稻叶片和叶鞘中 Bt 蛋白含量

Fig.2 Bt protein content in leaf and sheath of T1C-19 rice under the stress of rice blast (A), bacterial leaf blight (B), Rice dwarf virus (C)

** 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

** indicated highly significant difference ($P<0.01$).

3 讨论

转基因作物系培育出来之后,在自然条件下是否有预期的目标优良性状,需要对其进行抗性效率评价。对于抗虫作物,重点关注其对靶标害虫的抗虫效果。根据《农业转基因生物安全评价指南》的规定,抗虫转基因植物的功能效率评价需提供在室内和田间试验条件下,转基因植物对靶标生物的抗性生物测定报告、靶标生物在转基因材料及受体品种田间季节性发生危害情况和种群动态的试验数据与结论。目前,多种因素已被发现可能影响 Bt 作物体内 Bt 蛋白的表达,进而影响其抗虫效果。因此,开展生物因子或非生物因子对作物中 Bt 杀虫蛋白含量的影响是 Bt 作物抗虫效果评价的关键内容。

从病虫害胁迫的结果中可发现,病虫害胁迫因种类不同对 Bt 水稻中 Bt 蛋白表达量的影响不同。二化螟、水稻普通矮缩病、稻瘟病对转基因水稻 T1C-19 叶片和叶鞘中的 Bt 蛋白含量影响不明显;褐飞虱的取食会造成转基因水稻 T1C-19 叶片的 Bt 蛋白含量明显降低,而对叶鞘的 Bt 蛋白含量没有明显影响;黑尾叶蝉的取食会导致转基因水稻 T1C-19 叶鞘的 Bt 蛋白含量明显降低,而对叶片没有明显影响;转基因水稻 T1C-19 在感染白叶枯病后叶鞘内 Bt 蛋白含量会明显上升,而对叶片内 Bt 蛋白含量没有显著影响。研究表明,转 Bt 基因植物的

抗虫性与其体内表达的 Bt 蛋白含量呈正相关,即表达量越高,抗虫效果越好(华桦,2012)。当转基因作物体内的 Bt 蛋白含量在受到外界因素影响而变化时,作物的抗虫性也会随之发生变化,有可能给我们农业生产带来损失。转基因抗虫棉在实际生产上就有高温气候下不抗虫的现象,陈源等(2014)研究发现,38℃以上的高温会使抗虫棉棉蕾中 Bt 蛋白表达量显著降低,导致其抗虫效果大幅度降低。转基因抗虫水稻目前还没有在胁迫条件下不抗虫的报道,而本研究发现,褐飞虱、黑尾叶蝉和白叶枯病均会对转基因水稻 T1C-19 的 Bt 蛋白表达量产生影响,至于这种影响是否会导致 T1C-19 水稻对靶标害虫的抗性变化,还需要进一步研究,但在今后的研究和实际生产上要对这个问题予以重视。

对于褐飞虱、黑尾叶蝉取食和白叶枯病感染导致转基因水稻 T1C-19 体内 Bt 蛋白含量变化的原因,目前还不明确。姜周庚等(2012)研究发现,高温胁迫下 Bt 棉铃内 Bt 杀虫蛋白含量下降时,棉铃内可溶性蛋白含量也会下降,谷丙氨酸转氨酶活性降低,而游离氨基酸含量、蛋白酶和肽酶活性升高,因此,转基因抗虫棉 Bt 蛋白含量在高温胁迫下降低可能是因为高温减少蛋白质合成,促进蛋白质降解。张祥等(2017)研究发现,水分亏缺导致棉铃

壳 Bt 蛋白含量下降,而在转录水平 *Bt* 基因表达量未下降。这说明非生物胁迫导致转基因抗虫棉 Bt 蛋白含量下降的原因可能只涉及翻译水平的调控而不涉及转录水平的调控。而生物胁迫的影响可能更加复杂,因为病虫害的侵染会诱导植物的防御反应。水稻转录组学和蛋白组学分析发现,褐飞虱取食水稻后植物在基因表达和蛋白质调控层面发生了复杂的生物学变化,基因表达的变化主要与氧胁迫、伤害反应和信号途径有关 (Zhang *et al.*, 2004)。因此,病虫害等生物胁迫引起的转基因抗虫水稻 Bt 蛋白含量变化的原因,可能不仅仅和转基因水稻体内蛋白质合成、降解有关,还可能涉及植物防御应答引起的转录水平的调控。当然,对于生物和非生物因素导致转基因作物 Bt 蛋白含量变化的具体机制,还需要经过进一步的研究才能确定。

在转基因水稻和水稻害虫互作的研究中,研究者往往关注的是转基因水稻对害虫的影响,而甚少关注害虫对于转基因水稻的影响。但是,转基因水稻作为水稻害虫的食物来源,不仅害虫会因食料的变化受到影响,转基因水稻自身的生长发育也会受到害虫取食的影响,尤其是转基因水稻体内与抗虫性密切相关的 Bt 蛋白含量。本研究发现,转基因水稻 T1C-19 体内的 Bt 蛋白含量会因部分病虫害的胁迫而发生变化,这可能会导致转基因水稻的抗虫性发生变化。在实际田间环境中,*Bt* 水稻可能面临的胁迫将更加复杂,这些胁迫因素都有可能影响到 *Bt* 水稻的抗虫效果。因此,在进行 *Bt* 水稻的抗虫性评价时,需要充分考虑到外界生物及非生物因素互作所带来的影响。

参考文献

- 常丽娟,刘文娟,张富丽,王东,宋君, 2020. 非生物胁迫对转基因抗虫棉 Bt 蛋白表达量的影响. *西南农业学报*, 28(1): 2180-2183.
- 陈源,韩勇,王俊,花明明,顾超,李国生,张祥,陈德华, 2014. 高温对 *Bt* 棉盛蕾期蕾中 Bt 蛋白表达及氮代谢生理的影响. *应用生态学报*, 25(9): 2623-2628.
- 储昭晖, 2005. 水稻白叶枯病隐性抗病基因 *xa13* 的分离与鉴定. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学.
- 华桦, 2012. 转基因水稻中 Bt 蛋白的表达规律及生态适应性研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.
- 姜周庚,张延昭,冯梦诗,陈源,张祥,陈德华, 2012. 高温胁迫对盛铃期 *Bt* 棉棉铃中杀虫蛋白表达量及氮代谢的影响. *中国棉花*, 39(4): 13-16.
- 刘同宝, 2008. 稻瘟病菌细胞自噬相关基因 *MgATG4* 表达模式与功能分析. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.
- 王前进, 2017. 黑尾叶蝉-水稻矮缩病毒-水稻三者互作的生物学基础研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.
- 张祥,胡大鹏,李远,张丽雅,王剑,陈源,陈德华, 2017. 土壤水分亏缺对 *Bt* 棉铃壳杀虫蛋白表达的影响. *中国农业科学*, 50(4): 640-647.
- 张益文,王连荣,张连成,张军,籍新波,王进茂, 2012. 转基因抗虫棉 Bt 毒蛋白含量时空变化及土壤降解研究. *安徽农业科学*, 40(25): 12587-12590.
- DANG C, ZHOU X J, SUN C Y, WANG F, PENG Y F, YE G Y, 2021. Impacts of Bt rice on non-target organisms assessed by the hazard quotient (HQ). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207: 111214.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2022. *The state of food security and nutrition in the world 2022*. Rome: FAO.
- LI Y H, HALLERMAN E M, LIU Q S, WU K M, PENG Y F, 2016. The development and status of *Bt* rice in China. *Plant Biotechnology Journal*, 14(3): 839-848.
- 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 proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775-806.
- TRTIKOVA M, WIKMARK O G, ZEMP N, WIDMER A, HILBECK A, 2015. Transgene expression and Bt protein content in transgenic *Bt* maize (MON810) under optimal and stressful environmental conditions. *PLoS ONE*, 10(4): e0123011.
- 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 *cry1C* gene. *Molecular Breeding*, 18(1): 1-10.
- YOSHIDA S, FORNO D A, COCK J H, 1976. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. Manila: International Rice Research Institute.
- ZHANG F T, ZHU L L, HE G C, 2004. Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. *Journal of Plant Physiology*, 161(1): 53-62.