

分类号: Q965; Q7

单位代码: 10335

密 级: _____

学 号: 10716071

浙江大学

博 士 学 位 论 文



转 *cry1Ab/vip3H* 水稻抗螟性的鉴定及三类不同转基因

水稻对其非靶标生物褐飞虱影响的评价

**Resistance evaluation of transgenic Cry1Ab/Vip3H rice
against stem borers and impact evaluation of three types
of transgenic rice on their non-target organism brown
planthopper**

申请人姓名: 陈 洋

指导教师: 郭予元 教授
叶恭银 教授

专业名称: 农业昆虫与害虫防治

研究方向: 转基因植物安全性评价

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二零一零年七月三日



转 cry1Ab/vip3H 水稻抗螟性的鉴定及三类不同转基因
水稻对其非靶标生物褐飞虱影响的评价



论文作者签名: _____

指导教师签名: _____

论文评阅人: _____ 隐名评阅

答辩委员会主席: 彭于发 教授 中国农业科学院植物保护研究所

委员 1: 韩召军 教授 南京农业大学植物保护学院

委员 2: 俞晓平 教授 中国计量学院生命科学学院

委员 3: 胡 萃 教授 浙江大学农业与生物技术学院

委员 4: 陈学新 教授 浙江大学农业与生物技术学院

委员 5: 沈志成 教授 浙江大学农业与生物技术学院

委员 6: 叶恭银 教授 浙江大学农业与生物技术学院

答辩日期: 2010 年 9 月

**Resistance evaluation of transgenic Cry1Ab/Vip3H rice
against stem borers and impact evaluation of three types
of transgenic rice on their non-target organism brown
planthopper**



Author's signature: _____

Supervisor's signature: _____

Examining Committee Chairperson:

Prof. Yufa Peng Chinese Academy of Agricultural Sciences

Examining Committee Members:

Prof. Zhaojun Han Nanjing Agriculture University

Prof. Xuexin Chen Zhejiang University

Prof. Xiaoping Yu China Jiliang University

Prof. Zhicheng Shen Zhejiang University

Prof. Cui Hu Zhejiang University

Prof. Gongyin Ye Zhejiang University

Data of oral defence: September, 2010

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得浙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 导师签名：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

本研究承蒙

国家重大基础研究发展计划 (973)

(编号: 2007CB109202)

国家转基因生物培育重大专项

(编号: 2008ZX08011-01)

资助

This project was supported by the
National Basic Research Program of China (No.
2007CB109202) and Special Research Program for
Transgenic Organisms from the Ministry of
Agriculture of China for Transgenic Research (No.
2008ZX08011-01)

致谢

时间给予我们的不仅仅是成长的必须经历，还有那些在成长过程中收获的酸甜和苦辣。三年的时间，从最初的张望和等待，到中间的坚持与努力，到最后的收获与对未来的憧憬，留下了那些是任由时间也抹不去的印记。在论文即将完成之际，向那些在这人生中短短却又精彩的三年中给予过我无私的帮助和那些共同见证了我成长的人说一声谢谢。

首先，我要感谢我的导师郭予元教授和叶恭银教授。从北京到杭州，从北方方向南方迁徙的我，带着迷茫、带着期待和恐慌。感谢郭予元教授和叶恭银教授在最初生活上的关注与帮助，让我更快的适应了新的环境和新的挑战。博士论文的选题、设计及实验开展的各个环节也凝聚着导师们的心血和汗水。在这个过程中，我看到到的不仅是郭予元教授的博学和多才与叶恭银教授的严谨和思维和活跃，也感受郭予元教授对学生的包容与理解和叶恭银教授的大气与宽容。科研的道理上不见得是满目荆棘却也是要脚踏实地，感谢两位导师用他们渊博的学识、敏捷的思路和勤奋忘我的工作精神感染着我，让我可以有前进的目标和动力。感谢两位导师在生活上对我的帮助，让我在除了做试验之余，也体会到和做事一样重要的做人的原则，让我受益终生。在此，谨再次向两位导师表示衷心的感谢。

本研究组的胡萃教授德高望重、博学多才、治学严谨、为人谦和，特别是胡萃教授的语言艺术让我感受到真正的学者风范。我还要感谢本所何俊华教授、程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、沈志成教授、施祖华教授、娄永根教授、莫建初教授、蒋明星教授、祝增荣研究员、唐启义研究员、余虹副教授、时敏副教授、鲍艳原副教授和刘银泉副教授等的授业解惑、关心指导。从他们身上我感受到浙大昆虫所是一个团结奋进、成绩卓然、科研氛围浓厚的团队，这使我认识到了团队的重要性并分享到团队间共有的快乐。

感谢中国农业科学院植物保护研究所的彭于发研究员对我试验和生活上的引导、关注和无私的帮助，彭老师看待问题的大局观是我以后学习的榜样，同时彭老师尚知天文下知地理渊博的学识是为我所羡慕和景仰。感谢中国农业科学院植物保护所的吴孔明研究员、张永军研究员、梁革梅研究员对我在

这三年中的关爱，不胜感激。感谢中国农业科学院植物保护研究所的林克剑副研究员、韩兰芝副研究员、陆宴辉博士和博士生陆琼对我的关心和帮助。感谢扬州大学的苏宏华博士、华中农业大学的陈利珍博士对我的关心和帮助。感谢这些远在全国各地的师长和兄弟姐妹对我的关注和关爱，谢谢你们在我迷茫和艰难的时候无条件的为我伸出援助之手。

感谢本实验室博士生方琦、田俊策、郭建洋、慎小晶、王磊、常雪；硕士生李兆亮、梁莉、李艳敏、祖风、李秀花、吴顺凡、朱洋铿、王伟、王飞、郭燕、孙方达，已毕业的博士朱家颖、王欢、张倩倩、吴玛莉、石宇，硕士生高秀云、韩成香、吴珏婧在平时的科研及日常生活中都给予过的关心和帮助。同时方琦师兄对科研的热情、田俊策待人待事的细致、郭建洋做人做事的大气、慎小晶师姐的麻利细心、王磊的踏实肯干、硕士战友及现任师妹常雪的知书达理、师弟李兆亮的无限配合、师妹梁莉的幽默和热情、师妹李艳敏的谦虚谨慎、师妹李秀花的善解人意、师弟吴顺凡的不懈坚持、师弟朱洋铿的智慧和敏捷、师弟王伟的任劳任怨、师弟王飞的诚恳都值得我在日后的学习与生活中学习。

感谢实习生吉林农业大学的王丹丹、湖南农业大学的朱宇，你们的青春与活力深深地感染着我。

感谢张郡和吕冬兰女士对我生活的关心和帮助。

感谢蔡晓明博士在试验上的支持和生活中的忍让与理解。

我要特别感谢我的母亲和家人对我始终如一的坚定的理解、支持，是你们给了我前进的动力，也让我感受到了最大公无私的爱。

最后，再次感谢所有给予我帮助、爱护的老师、亲人、同学和朋友。同时向参加论文评阅及答辩委员会的各位专家、教授致以诚挚的谢意！

陈洋

2010年5月于

华家池畔

摘要

水稻是世界上最为重要的粮食作物之一,随着科学技术的发展,已有抗虫、抗病、抗除草剂和改良品质等方面的基因应用于水稻中,转基因水稻的生态安全性研究成为人们关注的焦点。转基因植物的生态安全性评价主要包括了对非靶标生物的影响、对天敌的影响和对靶标害虫的抗性治理。本文主要以三类转基因水稻和水稻重要害虫褐飞虱为研究对象,对三类转基因水稻对其非靶标生物褐飞虱的生长发育和繁殖的继代效应影响进行了评价,并对其机理进行了初步分析,主要结果如下:

1 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻抗螟虫性

转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1、G6H2、G6H3、G6H4、G6H5 和 G6H6 对二化螟和大螟的室内生测结果表明,取食转 *cry1Ab/vip3H* 水稻的二化螟和大螟在 48 h 和 96 h 的死亡率要显著高于取食对照非转基因水稻 Xiushui 110, 48 h 和 96 h 取食面积也显著低于对照,并且在 168 h 时死亡率达到 100%。2008 年和 2009 年田间调查结果表明: G6H1、G6H2、G6H3、G6H4、G6H5 和 G6H6 在田间都表现出很高的抗性,其中 G6H4 和 G6H5 被螟虫的为害率不到 5%。Western blot 结果表明 Cry1Ab/Vip3H 蛋白在水稻植株中是融合表达,通过对 Cry1Ab 蛋白的含量测定来衡量 Cry1Ab/Vip3H 蛋白在水稻不同时期的表达量,蛋白含量在各个时期在 6 个转基因水稻品种中不同时期的表达量相对稳定,无明显规律。TOPSIS 分析表明: G6H1 在田间和实验室内对螟虫的抗性最好。

2 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 对褐飞虱生物学影响

G6H1 对褐飞虱生长发育与繁殖的继代效应评价结果表明,不论是在苗期和成株期,褐飞虱的若虫生长发育和产卵量都不受水稻品种的影响,即取食 G6H1 与取食其非转基因亲本 Xiushui 110 相比,褐飞虱的生长发育和繁殖没有受到影响。田间调查也表明,在 G6H1 田间和 Xiushui 110 田间的褐飞虱的若虫、成虫和成虫若虫总密度没有显著差异。

3 转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 对褐飞虱生物学影响

在苗期,取食转 *cry1Ab* 基因粳稻(KMD2)与其亲本非转基因水稻(Xiushui 11)的褐飞虱相比,其若虫发育时间受到水稻类型和代别的显著影响;成虫寿命受到代别和水稻类型与代别互作的显著影响;产卵量受到水稻类型和代

别的显著影响。在成株期, 褐飞虱若虫发育时间受到水稻类型和水稻类型与代别互作的影响; 产卵量受到水稻类型和代别的显著影响。 t 测验结果表明不论是苗期还是成株期, 取食 KMD2 褐飞虱的若虫生长发育显著延迟, 并且产卵量显著下降, 这就表明 KMD2 抑制了褐飞虱的生长发育和繁殖。2008 和 2009 年田间调查结果表明, KMD2 田间褐飞虱的种群数量始终要低于 Xiushui 11, 并且若虫密度和成虫若虫总密度在 2008 年三个取样时间和 2009 年 4 个取样时间达到显著差异。KMD2 田间植株在拔节期、抽穗期、孕穗期和成熟期的褐飞虱分蘖为害率显著低于 Xiushui 11; 卵块数在成熟期要显著的低; 卵数在抽穗期、孕穗期和成熟期均显著低。褐飞虱在田间 KMD2 植株上的平均产卵位置大致上随着时间的推移而升高 (除了分蘖期), 而在 Xiushui 11 植株上的平均产卵位置也随着水稻的生长而升高, 并且褐飞虱在 KMD2 和 Xiushui 11 上的平均产卵位置存在显著差异。在分蘖期、拔节期、抽穗期和灌浆期, 在 KMD2 上褐飞虱卵的位置要比其在 Xiushui 11 上的高, 其中在分蘖期抽穗期和灌浆期达到显著水平。

4 转纤维素酶基因水稻 KMD2 对褐飞虱生物学影响

对转纤维素酶基因水稻 Z8-1、Z8-4、Z9-1、Z9-2、CBD-1 或 CBD-3 进行褐飞虱集团鉴定法进行抗鉴定发现, 不论是苗期和成株期它们都对褐飞虱表现出易感性, 且 Z9-2 最为明显一些。与敏感品系 TN1 相比, Z9-2 其体内的纤维素酶活性要高一些, 而其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 体内的酶活性要低一些。转纤维素酶基因水稻 Z9-2 与其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 相比, 在苗期, 褐飞虱若虫发育没有受到水稻类型、代别和水稻类型与代别互作的显著影响, 产卵量受到代别的显著影响; 在成株期, 除了褐飞虱雄若虫受到代别的显著影响外, 雌若虫和总若虫发育时间、成虫寿命都没有受到水稻类型、代别和稻类型与代别互作的影响; 产卵量受到代别的显著影响。2008 年和 2009 年对 Z9-2 和 Xiushui 11 田间褐飞虱种群密度进行了调查, 结果表明, 在 2008 年, 褐飞虱的若虫数量和成虫若虫总数量受到水稻品种的显著影响, Z9-2 田间的褐飞虱数量要高于 Xiushui 11 田间褐飞虱的数量, 并且在其中 3 个取样时间达到显著差异; 在 2009 年, 褐飞虱的若虫数量和成虫若虫总数量受到取样时间的显著影响, Z9-2 田间的褐飞虱数量要高于 Xiushui 11 田间褐飞虱的数量, 并且在其中 1 个取样时间达到显著差异。

5 KMD2 与 Xiushui 11 及其褐飞虱诱导后基因表达差异

利用基因芯片技术对转 *cry1Ab* 基因水稻 (KMD2) 与其亲本非转基因水稻 (Xiushui 11) 及其褐飞虱诱导后基因表达谱进行了初步的分析。KMD2 与 Xiushui 11 相比, 有 324 个基因探针的 mRNA 水平发生了变化, 表达量上调的水稻基因有 177 个, 下调的探针有 147 个。KEGG Pathway 分析表明, 这 324 个差异基因参与到 18 条途径中, 并且 Go Ontology 分析表明, 这 324 个差异基因最相关的 5 个生物过程: 氨基酸及其衍生物的代谢、类脂化合物代谢、光合作用、次生代谢和内源性胁迫反应。褐飞虱诱导后的 KMD2 与褐飞虱诱导后的 Xiushui11 相比, 有 317 个基因探针的 mRNA 水平发生了变化, 表达量上调的水稻基因有 124 个, 下调的探针有 193 个。KEGG Pathway 分析表明, 这 317 个差异基因参与到 31 条途径中, 并且 Go Ontology 分析表明与 317 个差异基因最相关得 7 个生物过程是非生物胁迫反应、碳水化合物代谢、氨基酸及其衍生物的代谢、根瘤发生与形成和 UTP (糖合成)、GTP (蛋白合成) 和 CTP (磷脂合成)。

关键词 *cry1Ab* 基因水稻, *cry1Ab/vip3H* 基因水稻, 纤维素酶基因水稻, 褐飞虱, 安全性评价, 基因芯片

Abstract

Rice is the one of the most important food resource in the world. With the rapid development of technology, we have obtained the transgenic rice with insect resistance, disease resistance, herbicides resistance and/or quality improved characteristic, and more and more people focus on the ecological safety assessment of transgenic rice. The ecological safety assessments of transgenic plant mainly include the effect on non-target pests, the effect on natural nememies and the resistance management. The effects of three transgenic rices on the rice secondary pest the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* stål, were evaluated, and the mechanism was primary analysis. The results are as follows:

1 Resistance of transgenic *cry1Ab/vip3H* gene rice to stem borers

Bioassay result indicated that the transgenic *cry1Ab/vip3H* rice lines G6H1, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 and G6H6 showed high resistance to stem borers including striped stem borer (SSB), *Chilo suppressalis* (Walker) and purplish stem borer (PSB), *Sesamia inferens* (Walker). After 48 h and 96 h ingestion, the mortality of SSB and PSB that fed on six transgenic rice lines was significantly higher than that fed on its non-transgenic parental line Xiushui 110, and the cumulate feeding area was significantly lower. After 168 h ingestion, the mortality of SSB and PSB that fed on six transgenic rice lines arrived 100%. In 2008 and 2009, when the field test was conducted under natural infestation, the G6H1, G6H2, G6H3 and G6H6 were highly resistant to SSB and PSB, and were completely undamaged on all sample dates. For the transgenic lines G6H4 and G6H5, their plants were undamaged before the sample date of 8 September, while were encountered to a few damage with less than 4% of plants and 0.5% of tillers. The Western blot analysis confirmed the presence of the Cry1Ab and Vip3H fusion protein in the six transgenic rice lines. The Cry1Ab protein was assayed to estimate the concentration of the fusion protein of Cry1Ab/Vip3H expressed in transgenic rice plants. In the flag leaves and main stems for each transgenic line, the level of Cry1Ab protein significantly changed with rice developmental stages. It is estimated that G6H1 showed best resistance to stem borers according TOPSIS analysis.

2 Effect of transgenic *cry1Ab/vip3H* rice G6H1 on *N. lugens*

The nymph developmental duration and reproduction was not affected by rice type for 1st, 2nd and 4th generation neither in seedling or adult stage. Compared with

fed on Xiushui 110, the nymph duration, adult longevity and egg production of BPH that fed on G6H1 showed no significant difference. And the field investigation showed that the average density of nymph, adult and total of nymph and adult were similar between the G6H1 and Xiushui 110.

3 Effect of transgenic *cry1Ab* rice KMD2 on *N. lugens*

At seedling stage, the nymph duration of BPH feeding on transgenic *cry1Ab* rice KMD2 and its nontransgenic parental rice Xiushui 11 was significantly affected by rice type and generation; adult longevity was significantly affected by generation and rice type with generation interaction; egg production was affected by rice type and generation. At adult stage, the nymph duration of BPH was affected by rice type and rice type with generation interaction; egg production was affected by rice type and generation. *t*-test result indicated that the nymph duration was significantly prolonged and the egg production was significantly reduced when the BPH fed on the KMD2 at both seedling and adult stage. This result revealed that the KMD2 suppress the development and reproduction of the BPH. The field investigation indicated that the average density of BPH in the KMD2 paddy was lower than that in Xiushui 11 paddy at all the sample times in 2008 and 2009. The average density of nymph and total of nymph and adult showed significantly difference between KMD2 and Xiushui 11 paddy both in three sample times in 2008 and four sample times in 2009. By comparison with the non-Bt rice, both percentage of tillers with eggs and number of eggs per tiller in the Bt rice were significantly lower from jointing to mature stage for the former and from heading to mature stage for the later. The relative height of oviposition on the Bt rice was significantly higher than that on the non-Bt rice at the tillering, heading and filling stage of rice, while was significantly lower than that on the non-Bt rice at the mature stage of rice.

4 Effect of transgenic cellulase rice on *N. lugens*

Resistance of transgenic cellulase rice lines (Z8-1、Z8-4、Z9-1、Z9-2、CBD-1 and CBD-3) to BPH was evaluated using the Modified Seedbox Screening Technique (MSST). All of the transgenic lines showed sensitive to BPH both at seedling and adult stage, and the Z9-2 was the most sensitive variety among the six varieties. Compared with the accepted rice variety that sensitive to BPH, the activity of cellulase in Z9-2 was higher, and its non-transgenic rice line Xiushui 11 was lower. At seedling stage, the egg production of BPH feeding on transgenic rice Z9-2 and its

non-transgenic parental rice Xiushui 11 was significantly affected by generation and nymph developmental duration and adult longevity was not affected by rice type, generation and rice type with generation interaction. At adult stage, the male nymph duration and egg production of BPH were significantly affected by generation. The field investigation indicated that the average density of BPH in the Z9-2 paddy was higher than that in Xiushui 11 paddy at most sample times in 2008 and 2009. In 2008, the average density of nymph and total of nymph and adult was affected by rice type, and Z9-2 showed significantly higher population at three sample times. In 2009, the average density of BPH was affected by the sample time. And the average density of nymph in Z9-2 paddy was higher than that in Xiushui 11 paddy at one sample time.

4 The gene expression profiling of KMD2 and Xiushui 11, BPH induced KMD2 and BPH induced Xiushui 11

The gene expression profiling of KMD2, Xiushui 11, BPH induced KMD2 and BPH induced Xiushui 11 were performed using gene chip method. Compared with its non-transgenic parental rice Xiushui 11, transcriptional levels of 324 genes in KMD2 were different, in which the numbers of upregulated and downregulated genes were 177 and 147 respectively. KEGG Pathway analysis indicated that the 324 genes were involved in 18 pathways. And Go Ontology analysis showed that the most five correlative biological processes were amino acid and derivative metabolism, lipid metabolism, photosynthesis, secondary metabolism and response to endogenous stimulus. Compared with its BPH induced Xiushui 11, transcriptional levels of 317 genes in BPH induced KMD2 were different, in which the numbers of upregulated and downregulated genes were 124 and 193 respectively. KEGG Pathway analysis indicated that the 317 genes were involved in 31 pathways. And Go Ontology analysis showed that the most seven correlative biological processes were response to abiotic stimulus, carbohydrate metabolism, amino acid and derivative metabolism, nodulation, UTP biosynthesis, CTP biosynthesis and GTP biosynthesis.

Keywords: *cry1Ab* rice, *cry1Ab/vip3H* rice, transgenic cellulase rice, *Nilaparvata lugens*, safety assessment, gene chip

目录

致谢	1
摘要	I
Abstract	IV
目录	VII
前言	1
第一部分 文献综述	3
第一章 转基因水稻及其安全性研究进展	4
1.1 转 <i>Bt</i> 基因水稻及其生态安全性研究进展	5
1.1.1 <i>Bt</i> 水稻的研究概况	5
1.1.2 <i>Bt</i> 水稻对非靶标的影响	7
1.1.3 基因漂移	9
1.1.4 <i>Bt</i> 水稻抗性管理	11
1.1.5 <i>Bt</i> 水稻的食品安全	12
1.1.6 <i>Bt</i> 水稻对农户害虫治理的影响	13
1.1.7 结语	14
1.2 转纤维素酶基因植物的生态安全性	15
1.2.1 纤维质生物能源作物	15
1.2.2 转纤维素酶基因植物概况	15
1.2.3 转纤维素酶基因植物的安全性	16
第二章 植物对植食性昆虫的防御机制	17
2.1 昆虫取食诱导的植物防御反应	17
2.2 植物直接防御的类别	17
2.2.1 限制食物供给	18
2.2.2 降低营养价值	19
2.2.3 破坏物理结构	20
2.2.4 抑制化学通路	20
2.3 植物直接防御的化学特征	21
2.3.1 植物次生代谢产物	21
2.3.2 昆虫消化酶的抑制剂	22
2.3.3 蛋白酶	22
2.3.4 凝集素	23

2.3.5 氨基酸脱氨酶	23
2.3.6 多酚氧化酶	24
2.3.6 其他蛋白	24
2.4 基因芯片在当前领域的应用前景	25
第二部分 研究内容	27
第三章 转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻抗螟性鉴定及其对褐飞虱生物学影响	28
3.1 材料与方法	29
3.1.1 供试水稻	29
3.1.2 供试昆虫	30
3.1.3 田间种植和小区设计	30
3.1.4 转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻抗螟虫离体测定	30
3.1.6 田间转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻抗螟虫的性状表现	31
3.1.7 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	31
3.1.8 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	32
3.1.9 褐飞虱田间种群调查	32
3.2 数据统计分析	33
3.3 结果与分析	33
3.3.1 转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻对螟虫的抗虫性	33
3.3.2 转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻各个时期蛋白表达量测定	34
3.3.3 田间转 <i>cry1Ab/vip3H</i> 基因水稻的抗螟虫性表现	39
3.3.4 转基因水稻对二化螟和大螟抗虫性的排序	41
3.3.5 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	42
3.3.6 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	43
3.3.7 褐飞虱田间种群动态	44
3.4 小结	50
第四章 转 <i>cry1Ab</i> 基因水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代效应评价	54
4.1 材料与方法	55
4.1.1 供试水稻	55
4.1.2 供试昆虫	55
4.1.3 田间种植和小区设计	55
4.1.4 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	56
4.1.5 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	56
4.1.6 褐飞虱田间种群调查	56
4.1.7 褐飞虱田间产卵量调查	56

4.2 数据统计分析.....	57
4.3 结果与分析.....	57
4.3.1 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	57
4.3.2 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响.....	58
4.3.3 褐飞虱田间种群动态	59
4.3.4 水稻田间褐飞虱产卵量调查.....	65
4.4 小结	68
第五章 转纤维素酶基因水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代效应评价	70
5.1 材料与方法.....	71
5.1.1 供试水稻	71
5.1.2 供试昆虫	71
5.1.3 田间种植和小区设计	71
5.1.4 水稻苗期对褐飞虱的抗性鉴定	72
5.1.5 水稻成株期对褐飞虱的抗性鉴定	72
5.1.6 酶活力测定	73
5.1.7 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	73
5.1.8 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响.....	74
5.1.9 褐飞虱田间种群调查	74
5.2 数据统计分析	74
5.3 结果与分析	75
5.3.1 水稻对褐飞虱的抗性反应.....	75
5.3.2 酶活力测定	75
5.3.3 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响	76
5.3.4 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响.....	77
5.3.5 褐飞虱田间种群动态	78
5.4 小结	84
第六章 转 <i>cry1Ab</i> 水稻与亲本水稻及其褐飞虱诱导后基因表达谱分析	86
6.1 试验材料	87
6.1.1 供试水稻	87
6.1.2 供试昆虫	87
6.1.3 水稻处理	87
6.1.4 水稻总RNA 的提取.....	87
6.1.5 基因芯片	88
6.2 结果与分析	88

6.2.1 总基因变化幅度	88
6.2.3 KEGG Pathway分析	91
6.2.4 Go Ontology分析	94
6.4 小结	100
第七章 总讨论	103
参考文献	110

前言

转基因技术是利用重组 DNA 技术将优良目的基因导入受体细胞,并在其中表达,从而使受体生物获得新的目标性状,这一技术是现代生物技术研究领域的重要成果之一。目前已有抗虫,抗病,抗除草剂和改良品质等方面的基因用于转基因植物中。自 1983,比利时和美国的科研人员分别将杀虫蛋白基因转入烟草和番茄以来,先后获得了棉花、玉米、马铃薯、烟草、水稻、番茄等 40 多种转基因植物,我国也先后获得了转基因烟草、甘蓝、棉花、玉米和水稻等重要作物(黄大昉, 2001)。转基因作物自 1996 年在美国商业化种植以来,截止到 2010 年,种植转基因植物的国家数量飙升到 25 个,全球转基因棉花、大豆、玉米和其它作物播种面积达 1.25 亿公顷,美国、阿根廷、巴西、印度、加拿大、中国、巴拉圭、南非、乌拉圭和玻利维亚等国转基因作物的总种植面积超过 1240 万公顷,复合性状成为转基因作物的重要特性(James 2010)。

水稻是世界主要的粮食作物之一,地球上近 30 亿人口的主要食物来源。在水稻的生产过程中由于各种病虫害、不良气候与环境的影响,严重制约了水稻的高产、稳产。随着转基因技术的兴起,转基因水稻的研究也成为了各国转基因技术研究的热点。1988 年第一批转基因水稻问世之后,越来越多的研究者利用转基因技术对传统的水稻进行改良,成功地获得了许多具有高产、抗性、营养乃至药用价值的转基因水稻。目前,转基因水稻主要分为:转基因抗虫水稻、转基因抗病水稻、转基因抗除草剂水稻、转基因抗旱水稻、转基因营养高效利用水稻、转基因高产水稻和转基因优质水稻。同时,转基因水稻也朝着复合形状的方向前行。自 2004 年,我国一些转基因水稻品种开始进行田间安全性评价,为转基因水稻商业化奠定基础,转基因水稻取得巨大进步的同时,其种植的生态安全性日益成为人们关注的焦点。其中,转基因水稻的种植是否会引起非靶标害虫的再猖獗是近几年研究工作的热点。

褐飞虱是亚洲地区一种远距离迁飞性水稻害虫,也是中国长江流域及华南和西南广大稻区水稻上的重要害虫。自 1980 年以来,褐飞虱在我国每年发生面积约占全国水稻面积的 50%。由于栽培制度的改变,农药化肥的滥施与偏施改善了褐飞虱发生的生态条件,促使其爆发成灾。而转基因水稻是否会引起褐飞虱的爆

发仍是目前研究的焦点热点。褐飞虱在江浙地区年发生 4 代，并且世代重叠，这就需要建立一套可以进行持续评价的体系来降低其风险评价的片面性。

同时，外源基因被插入到植物中后，可能会对植物的理化性质产生影响，进而对其非靶标昆虫产生间接的影响。所以对外源基因的插入导致亲本与转基因作物基因表达谱的差异研究在探索外源基因插入导致的非预期效应奠定了一定的基础。同时对非靶标昆虫诱导取食后的转基因植物与其亲本之间进行基因表达谱差异分析在探索植物与昆虫之间的相互作用中奠定了一定的基础。

第一部分 文献综述

第一章 转基因水稻及其安全性研究进展

水稻是世界上最为重要的粮食作物之一,超过 50%的世界人口(或是超过 30 亿人)在日常生活中都以稻米为食(FAO 2008)。随着世界人口的不断增长,人类对食物的需求也越来越大。以当前的人口增长速度,到 2030 年水稻产量将产生 40 %的缺口(Khush 2005)。我国是世界上最大的稻米生产国和消费国,稻作面积和稻谷总产量分别占全世界的 23%和 37%。水稻是我国第一大粮食作物,也是单产水平最高的粮食作物,其常年播种面积约占全国粮食作物总面积的 30%,产量约占粮食总产量的 40%。然而,水稻病虫尤其是害虫如水稻螟虫(三化螟 *Scirpophaga incertulas*、二化螟 *Chilo suppressalis* 和大螟 *Sesamia inferens*)等的发生严重影响了水稻优质高产和稳产,限制了水稻增产潜能,是严重威胁水稻安全生产的主要自然灾害之一。据估算,全球每年因水稻螟虫为害而造成的产量损失可达 100 亿公斤。为了有效控制水稻害虫的为害,长期以来因未挖掘到天然抗螟虫的稻质资源而主要依靠化学农药,其后果是日益严重的农药残留与环境污染,危害公众健康。

随着转基因技术的问世与发展,为高效、稳定地控制水稻螟虫的为害,国内有多个研究组培育获得了高抗的抗虫转 Bt 基因水稻(*Bt* 水稻)(High et al. 2004, Chen et al. 2006a, Cohen et al. 2008),有的已进入生产性试验阶段,显示了良好的抗虫效果和丰产性。就 *Bt* 水稻产业化应用后所带来的潜在效应分析得知,种植 *Bt* 水稻后,预计农药使用量减少 80%,农药费用开支节约 87%,产量增加 6~9%,而且可避免农药对农民健康的负面影响(Huang et al. 2005, 2008),也将为中国 1.1 亿水稻种植户带来预期每年 40 亿美元的收益(James 2009)。

虽然 *Bt* 水稻有诸多优点,但它也存在潜在的生态风险,如害虫抗性的产生、基因飘移和沉默、影响生物多样性和对非靶标生物的影响等。

1.1 转 Bt 基因水稻及其生态安全性研究进展

1.1.1 Bt 水稻的研究概况

随着在 1993 年第一例转 Bt 基因水稻研制成功以来(Fujimoto et al. 1993), 越来越多的转 Bt 基因水稻被成功转化(High et al. 2004, Chen et al. 2006a, Cohen et al. 2008)。由不同启动子启动, 表达 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ab/Cry1Ac、Cry1B、Cry1C 和 Cry2A 蛋白以及同时表达 Cry1c 和 Cry2A 蛋白的转基因水稻都对水稻螟虫、稻纵卷叶螟和其它取食水稻的鳞翅目害虫都表现出了抗性(表 1.1)。

表 1.1 已获得的转 Bt 基因水稻

Table 1.1 Transgenic Bt rice have been successfully transformed

Transgene	Promoter	Cultivar	References
<i>cry1Ab</i>	叶绿素 a/b 蛋白	Nippobare	Fujimoto et al. 1993
<i>cry1Ab</i>	CaMV35S	IR58	Wünn et al. 1996
<i>cry1Ab</i>	PEPC	Tarom molaïi	Ghareyazie et al. 1997
<i>cry1Ab, cry1Ac</i>	Ubiquitin	IR64	Nayak et al. 1997
<i>cry1Ab</i>	CaMV35S	Taipei-309	Wu et al., 1997
<i>cry1Ab</i>	CaMV35S	Vaidehi, TCA-48	Alam et al, 1998
<i>cry1Ac</i>	Ubiquitin	Kaybonnet, Nipponbare, Zhong8215, 93VA, ZAU16, 91RM, T8340, Pin92-825, T90502 IR72, IR64, CBII, Taipai-309, IR68899B, Vaideh, MH-63-63, IR51500-AC11, IRRI-npt	Cheng et al. 1998
<i>cry1Ab</i>			
<i>cry1Ab</i>			
<i>cry1Ab</i>			
<i>cry1Ab</i>	CaMV35S, Actin-1,pith tissue-specific, PEPC		Datta et al. 1998
<i>cry2A</i>	CaMV35S	Basmati 370, M 7	Maqbool et al 1998
<i>cry1Ab</i>	CaMV35S	IR68899B	Alam et al. 1999
<i>cry1B</i>	Ubiquitin	Ariete, Senia	Breitler et al. 2000
<i>cry1Ab/cry1Ac</i>	Actin	CMS restorer Minhui	Tu et al. 2000

Transgene	Promoter	Cultivar	References
		63, Shanyou 63	
<i>cry1Ab</i>	Ubiquitin	KMD1,KMD2	Shu et al. 2000
<i>cry1B</i>	Maize proteinase inhibitor	Ariete,	Breitler et al. 2001
<i>cry1Ac, cry2A</i> Snowdrop lectin gene	Ubiquitin, CaMV35S	M 7, Basmati 370	Maqbool et al. 2001
<i>cry1Ac</i> <i>cry1Ab</i>	Ubiquitin	Basmati 370	Ahmad et al. 2002
<i>cry1Ab</i>	Pollen-specific, Ubiquitin, PEPC	Basmati 370	Husnain et al. 2002
<i>cry1Ac</i>	Ubiquitin	IR64, Pusa Basmati-1, Karnal Local	Khanna and Raina 2002
<i>cry1Ac</i>	Ubiquitin	Elite Eyi 105, Bengal	Loc et al., 2002
<i>cry1Ac, cry2A</i>	Ubiquitin CaMV35S	Basmati 370	Bashir et al. 2005
<i>cry2A</i>	Ubiquitin CaMV35S	Minghui 63	Chen et al. 2005(2005b)
<i>cry1Ab-1B</i>	Actin	Pusa Basmati 1	Ho et al. 2006
<i>cry1A/cry1Ac</i>	CaMV35S	Tainung 67	
<i>cry1Ab</i>	Ubiquitin CaMV35S	P - I ,P - II , P-III	Kim et al. 2008

Bt 水稻的田间实验首先在 1998 的中国开展(Shu et al. 2000, Tu et al. 2000, Ye et al. 2001b, Ye et al. 2001a), 随后有几个 *Bt* 水稻品系进行了更大规模的田间试验(Chen et al. 2006a, Wang and Johnston 2007)。*Bt* 水稻的田间实验在巴基斯坦(Bashir et al. 2005, Mahmood-ur-Rahman et al. 2007)、西班牙(Breitler et al. 2004)、伊朗(James 2005)和印度(Bunsha 2006)也有开展。田间实验表明, *Bt* 水稻对靶标害虫具有很高的抗性。在中国开展的大田实验还表明和传统的水稻相比, *Bt* 水稻在减少杀虫剂使用的同时还能提高 6~9% 的产量(Huang et al. 2005)。

目前在美国已有 3 种抗除草剂(草甘膦)水稻允许商业化, 而 *Bt* 水稻还未在任一个国家商业化。在 2005, 伊朗曾种植了 4000 公顷的 *Bt* 水稻用以种子的繁殖, 但政府未允许其商业化(James 2005)。2009 年 11 月 27 日, 中国正式授予 2 种 *Bt* 水稻生物安全证书, 允许其在湖北省 5 年的生产性试验。这被誉为具有

里程碑意义的举措(James 2009)可能会使中国成为第一个允许 *Bt* 水稻商业化的国家。

1.1.2 *Bt* 水稻对非靶标的影响

在亚洲,上世纪 70 年代因为化学杀虫剂的引入,导致对稻田害虫的捕食者及寄生者种群带来了灾难性的影响,导致了次要害虫的大爆发,如褐飞虱(Matteson 2000)。通过研究,人们明白了次要害虫的爆发主要源自对害虫有着的重要控制作用的复杂的天敌系统被过量施用的杀虫剂完全破坏了,生物控制的重要性从此被提上议程。根据生物控制对于水稻产量的重要性以及先前对新控害技术(广谱性杀虫剂)的引入所得到的经验,在 *Bt* 水稻释放之前必须对它的生态学影响进行系统的研究。目前,许多 *Bt* 水稻对靶标植食者、捕食者、寄生蜂和土栖生物(Chen et al. 2006a)以及微生物(吴伟祥等, 2003; 徐晓宇等, 2004)开展了室内和田间的研究,有些进行了多点多年的研究。总体说来, *Bt* 水稻未对非靶标生物的产生负面影响(Chen et al. 2006a),这与其他 *Bt* 作物的研究结果相一致(Romeis et al. 2006)。

1.1.2.1 天敌

和预期的一样,当以对 *Bt* 敏感的亚致死的昆虫为寄主时, *Bt* 水稻对天敌有些负面影响。姜永厚等(2004)报道当二化螟绒茧蜂以取食转 *cry1Ab* 基因水稻的二化螟为寄主时茧长、结茧率和寄生率都要显著低于对照。而以转 *sck + cry1Ab* 基因水稻为食的二化螟为寄主时,二化螟绒茧蜂的寄生率要显著低于对照,且蜂、蛹期显著长于对照。但对捕食性天敌的研究发现 *Bt* 水稻未表现出负面影响。Bernal et al. (2002)发现在黑肩绿盲蝽取食在 *Bt* 水稻上饲养的褐飞虱后没有不利的影响。相似的,当中华草蛉和龟纹瓢虫取食 *Bt* 水稻花粉后无显著影响(Bai et al. 2006; 白耀宇, 2005b)。而中华草蛉以在 *Bt* 水稻上饲养的褐飞虱为食时也无负面影响。目前对稻田蜘蛛拟水狼蛛和食虫沟瘤蛛的生长、存活和繁殖研究表明 *Bt* 水稻未对它们造成显著影响。大田情况下, (Schoenly et al. 2003)报道在喷洒 *Bt* 制剂的稻田的寄生蜂和蜘蛛的种群数量未产生负面影响。*Bt* 稻田的表现与使用 *Bt* 制剂的稻田相似。刘志诚等(2002)研究发现 *Bt* 稻田和对照稻田的 5 种蜘蛛在种群动态上没有显著不同。黑肩绿盲蝽的种群动态在 2 年的大田研究也发

现 Bt 稻田对其种群动态未产生显著影响。多年的研究结果表明 Bt 稻田中的寄生蜂和捕食者的物种丰富度、多样性、均匀度和优势度与对照相比都十分相似, Bt 水稻对天敌的种群没有显著的负面影响(刘志诚等, 2003, 2004; Li et al. 2007; 田俊策等, 2008)。

1.1.2.2 非靶标植食者

20 世纪 70 年代由于广谱性杀虫剂的使用造成飞虱大爆发, 目前我国仍年年为害, 还有日趋严重的趋势。因此 Bt 水稻对非靶标植食者的研究主要集中在褐飞虱、白背飞虱、黑尾叶蝉和二点黑尾叶蝉。Bernal et al. (2002) 和 Bai et al. (2006) 报道通过 ELISA 在褐飞虱体内检测到了 Bt 蛋白, 但 Bt 水稻对它的适合度没有负面影响。谭红等 (2006a) 研究表明虽然白背飞虱在 Bt 水稻上发育历期延长了 1-2 天, 但对产卵行为没有显著的影响。褐飞虱与黑尾叶蝉对 Bt 水稻和对照水稻的取食和产卵选择上也没有显著的差异(陈茂等, 2005)。而稻蓟马 (*Stenchaetothrips biformis* (Bagnall)) 在 6 种 Bt 水稻上的发育与对照相比都受到抑制, 而且产卵前期显著延长, 日产卵量和总产卵量显著下降(Akhtar et al. 2010)。

田间的调查结果与室内的实验结果一致。在中国开展的为期 2 年的对 2 种 Bt 水稻品种稻田内飞虱和叶蝉种群的调查结果显示在 Bt 和非 Bt 稻田间飞虱和叶蝉的种群动态无显著差异(Chen et al. 2006b)。在菲律宾, Bt 制剂处理的稻田中的飞虱和叶蝉的种群动态与对照间也未发现显著差异((Schoenly et al. 2003)。Akhtar et al. (2010) 通过塑料袋取样法和拍盆法系统调查了 6 种 Bt 水稻稻田中稻蓟马的种群密度, 结果表明 Bt 稻田的稻蓟马的种群密度要显著低于对照或是与之相似, 说明 Bt 水稻的引入不但不会引起稻蓟马的爆发反而有一定的抑制作用。

1.1.2.3 土栖生物

土栖的降解者如弹尾虫在稻田生态系统中扮演了十分重要的角色, 它们能够影响土壤的结构、营养的矿化以及土壤微生物的活力和组成(Brussaard 1998, Haimi 2000)。白耀宇等 (2005) 在室内以 Bt 水稻 (KMD1 和 KMD2) 的腐烂茎叶为食的灰橄榄长角跳虫 (*Entomobrya griseoolivata*) 中检测到了微量的 Cry1Ab 杀虫蛋白, 但田间调查结构表明灰橄榄长角跳虫和钩圆跳虫 (*Bourletiella christianseni*) 的 Bt 稻田的密度要显著高于其对照。同时有研究报道灰橄榄长角跳虫和钩圆跳虫 2 种弹尾虫在水稻灌浆期采用吸虫器法在稻田落叶层中采集到,

其中灰橄榄长角跳虫在 *Bt* 稻田中的种群密度显著高于对照稻田；而在水稻收割后休田期采用网袋法采集到灰橄榄长角跳虫、钩圆跳虫、球角跳虫 (*Hypogastrura matura*) 和等节跳虫 (*Isotoma monochaeta*) 等 4 种弹尾虫, 其中 *Bt* 水稻稻田中的灰橄榄长角跳虫和球角跳虫的种群密度显著高于对照稻田 (白耀宇等 2006)。4 年的 2 地的水稻休田期调查结果显示尽管弹尾虫的丰富度在年份和地域之间经常变化, 但 *Bt* 稻田和对照稻田之间没有显著差异 (Smith et al. 2010)。2 年的大田试验也表明, 弹尾目的 3 个科 (Scatopsidae、Sminthuridae 和 Tomoceridae) 以及腐生性双翅目的 5 个科 (Ceratopogonidae、Mycetophilidae、Phoridae、Psychodidae 和 Scatopsidae) 昆虫的种群数量在 *Bt* 水稻和对照之间十分相似 (刘志诚等, 2003)。

1.1.3 基因漂移

水稻有两倍体和四倍体, 包括了 10 种不同的基因组类型 (AA、BB、CC、BBCC、CCDD、EE、FF、GG、JJHH 和 JJKK) (Ge et al. 1999)。不同基因组类型的水稻之间具有明显的生殖隔离现象。亚洲的栽培水稻 (*O. saliva*) 属于 AA 型, 起源于南亚及东南亚, 是目前在世界上种植范围最广的水稻种, 同时也是转基因水稻的主要应用种。Naredo 的研究表明 AA 型水稻种之间具有很高的性亲和性, 种间杂交的 F1 代在减数分裂时能完全互补配对并且具有较多花粉和花序 (Lu et al. 1997, Naredo et al. 1997)。这就表明, 转基因水稻的基因可能通过花粉的种内和种间的杂交逃逸出来, 并持续存在于杂交的水稻中。因此, 栽培水稻与 AA 型水稻之间的基因漂移评价必须更为严格谨慎。

通常情况下, 栽培水稻的自花授粉率非常高, 与临近的水稻之间发生异花授粉的几率非常低, 一般不到 1%。Rong et al. (2007) 在对二百一十多万粒水稻种子分析的基础上得出随着距离的增加基因漂移几率显著下降的结论, 其中在 0.2m 的情况下, 约为 0.028%; 在 6.2m 时为小于 0.01%; 而在 10.2m 时仅为 0.0021%。在意大利的实验表明转抗除草剂的转基因水稻向邻近的非转基因水稻发生基因漂移的几率为 0.05-0.53% (Messeguer et al. 2001)。同时, 在中国的实验也表明, 无论在田间间隔种植的条件下, 还是在密闭的空间内, 转抗虫基因的转基因水稻向邻近的非转基因水稻发生基因漂移的几率都很低, 均未超过 1%。其中, 田间间隔种植条件下为 0.275-0.832%, 而在密闭的空间里为 0.05-0.79% (Rong et al.

2005)。

杂稻(红稻, *O. sativa f. spontanea*)在大部分的水稻生产国都有分布,与栽培的水稻属于同一个生物种,具有相同的遗传背景。2003年, Gealy et al.(2003)回顾了之前的从栽培水稻向杂稻的基因漂移的研究,指出栽培水稻和杂稻的杂交率为0.01-1%,而且基因既可以从栽培水稻向杂稻漂移,也可以从杂稻向栽培水稻漂移。在中国和韩国两种栽培方式下,栽培水稻向杂稻基因漂移的几率并没有显著的变化,约为0.011-0.046%(Chen et al. 2004b)。在意大利,这种基因漂移的平均几率为 $0.036 \pm 0.006\%$ (Messeguer et al. 2004)。在美国,研究结果表明实验用的2种不同的水稻品种向杂稻的基因漂移几率具有显著差异,不过平均几率都较低,分别为0.003%和0.008%。基因漂移主要发生在1m的间距,不过远至6m处也有发现,大概每公顷能产生170颗的杂交杂稻(Gealy et al. 2006)。Zhang et al.(2006)通过3年的研究也得到了和上述类似的结果,不过他们观察到有一个实验田块发生了较高的基因漂移,高达3.2%。同时, Langevin et al.(1990)研究发现,杂合杂稻比杂稻母本更具有活力,而且不到两年的时间,转入的等位基因在整个杂稻群体中就占了52%。而最近的研究发现,虽然杂交杂稻从母本继承了很多特征,但很多杂交杂稻的后代成熟期延后致使扬花期与母本不一致(Zhang et al. 2003, Gealy et al. 2006, Shivrain et al. 2006),这将影响到转入基因在整个杂稻群体中的保持。

野稻(*O. rufipogon*)系终年生长的植物,作为一个重要的自然种质资源它已经被广泛的研究。Song et al.(2006)通过SSR指纹图谱技术证明在自然条件下野稻通过基因漂移接收了栽培水稻的基因。同时,已经有研究发现,栽培水稻向野稻的发生基因漂移的几率要大大高于向杂稻发生基因漂移的几率,在0-1m处甚至高达11-18%(Song et al. 2003, Chen et al. 2004b, Wang et al. 2006)。而Song et al.(2004a)通过对花粉的研究发现在2.52m/s的平均风速下,花粉的传播距离为38.4m,而在10m/s的风速下,花粉可以传播至110m处。虽然栽培水稻向野稻发生基因漂移的几率较高,不过外来基因的保持还与杂合稻的生存及产量相关。在其中的一个例子中,杂合野稻的 F_1 后代与它的母本相比苗期的生活力、花粉产量及种子产量都为最低(Song et al. 2004b)。

1.1.4 Bt 水稻抗性管理

与传统杀虫剂相比 *Bt* 作物能更安全有效的控制靶标害虫, 它带来了巨大的经济和生态效益。因此, *Bt* 作物的抗性管理一直以来都受到科研工作者和政府法规制定机关的关注。虽然目前在自然条件下还未有昆虫对 *Bt* 作物产生抗性, 但以有报道表明小菜蛾 (*Plutella xylostella*) (Shelton et al. 1993) 在田间以及粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) (Kain et al. 2004) 在商业化的大棚里对 *Bt* 蛋白产生了抗性, 因此昆虫也有对 *Bt* 作物产生抗性的可能。预先的昆虫抗性管理策略将是 *Bt* 作物可以持续发展的关键(High et al. 2004), 这些策略包括高剂量/避难所、多基因和时间或空间特异表达杀虫蛋白。在这些策略中, 只有高剂量/避难所已在一些发达国家如美国、澳大利亚和加拿大应用。在这些国家, *Bt* 作物 (*Bt* 棉花和 *Bt* 玉米) 种植者在种植 *Bt* 作物的同时需要保持足够大面积的非 *Bt* 作物做为庇护所以延缓 *Bt* 抗性昆虫的产生。在中国, 虽然种植了大量的 *Bt* 棉花但未设置庇护所。这是因为棉花在中国由成千上万的小农户种植, 要求农户自行设置或是强迫设置庇护所都是不可行的。幸运的是, *Bt* 棉花的最主要害虫棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 是多食性的, 因此像非 *Bt* 作物的大豆和花生就可以执行庇护所的功能(Wu and Guo 2005)。

水稻生产的特殊性使它在 *Bt* 水稻抗性管理上面临独一无二的挑战。这些挑战包括很难为最主要的靶标害虫(三化螟和二化螟)建立足够的庇护所以及明确螟虫可以持续的暴露在高剂量的杀虫蛋白下。这是因为和棉花一样, 水稻在亚洲也是由成千上万的小农户种植致使在田间设置庇护所不可能实施。而与 *Bt* 棉花的主要靶标害虫棉铃虫不同, *Bt* 水稻的主要靶标害虫三化螟或二化螟除了水稻外没有其他可供选择的野生或栽培寄主植物。虽然有报道说可供二化螟选择的寄主有 6 个科 41 种植物, 但进一步研究发现在田间只有 9 种植物可作为二化螟的寄主且没有具体的数据(Cuong and Cohen 2002)。只有一篇文献具体描述了一种在中国和日本的稻田生产区常见的可供二化螟选择的寄主茭白 (*Zizania latifolia*), 它有时野生但也经常被做为蔬菜种植(Hachiya 1981)。但是有证据表明水稻种群和茭白种群的二化螟之间存在生殖隔离(Konno and Tanaka 1996), 这将大大降低茭白作为避难所的应用价值。因此最有可能作为庇护所的就是当 *Bt* 水稻商业化后仍选择种植非 *Bt* 水稻的田块。高剂量的定义是杀虫蛋白含量的水平

可以基本杀死含抗性基因和敏感基因的杂合体。抗性杂合体的高死亡率加上庇护所的合理设置可以大大延缓抗性纯合体产生的频率。但是, *Bt* 水稻的杀虫蛋白表达量要大大低于 *Bt* 玉米, 虽然 *Bt* 水稻目前可以有效地控制靶标害虫但还未达到高剂量的标准。因此, Cohen et al. (2000) 建议出于昆虫抗性管理的考虑, 单基因的水稻不宜释放。

理论模型和大棚试验表明, 当 *Bt* 作物中含有两种不同杀虫机制的杀虫蛋白基因时, 即使在混合镶嵌种植而且更小的庇护所的情况下, 与单基因的 *Bt* 作物相比可以更有效地延缓抗性昆虫的产生(Zhao et al. 2003, Zhao et al. 2005)。目前已有融合 *CpTI* 和 *cry1Ac* 基因的 *Bt* 水稻品种问世(赵红盈等, 2004), 而表达 *Cry2A* 蛋白的 *Bt* 水稻的成功研制也表明了同时拥有 *cry1A* 和 *cry2A* 基因水稻在不久的将来也会成为现实(Chen et al. 2005b)。未来的研究目标将是发掘更多的新的杀虫蛋白基因, 测试不同的基因组合, 发展出更高 *Bt* 蛋白表达量的多基因 *Bt* 水稻然后进行田间靶标害虫抗性种群产生频率的检测。这也是未来 *Bt* 水稻的预先昆虫抗性管理策略的研究方向。

1.1.5 *Bt* 水稻的食品安全

苏云金芽胞杆菌作为生物农药已经有 100 多年的历史(Nester et al. 2002), 至今还未发现 *Bt* 杀虫剂对哺乳动物因口服而造成急性、亚急性和慢性毒性(Betz et al. 2000, Siegel 2001)。美国环境保护局至今还未发现已经注册的转基因作物对人体有毒害或致敏作用(Mendelsohn et al. 2003)。而中国对已批准商业化的转基因植物(包括棉花、番木瓜、蕃茄、甜椒和矮牵牛)以及已批准进口用于加工原料的转基因植物(包括棉花、大豆、玉米和油菜)的食品安全型评价发现与受体对照食品同样安全(付仲文等, 2009)。对重组DNA和蛋白质的降解研究发现, 消化道只能检测到痕量的重组DNA和蛋白质(Beever et al. 2003)。对取食转基因玉米 MON 810 (Monsanto, <http://www.monsanto.com>) 的玉米螟喂食鸡后对鸡胸肉样品进行了分析, 未发现含有任何重组DNA或 *Cry1Ab* 蛋白在鸡胸肉中残留(Jennings et al. 2003, Reuter and Aulrich 2003)。另一项研究中表明在食用 *Bt* 玉米的猪体内在其组织样本中没有检测到重组或玉米特有的基因片段(Reuter and Aulrich 2003)。对饲喂 *Bt* 玉米的奶牛的研究中发现, 只有小片段的重组DNA片段

(<200bp) 存在于血淋巴中, 其它组织中并未发现重组DNA片段(Einspanier et al. 2001)。

用转 *cry1Ab* 基因的 *Bt* 水稻饲喂小鼠 90 天, 在高达 64 克水稻每千克小鼠体重的剂量下, 未发现对小鼠有任何不利的影响, 对转植酸酶 *appa* 基因水稻研究也得到类似的结果(Wang et al. 2002, Tsai et al. 2008)。在 *Bt* 水稻 KMD 和亲本对照 Xiushui 11 以及亲本 Jiaza 935 和转基因品系华池 B6(以 KMD 为赠体)之间, *Bt* 水稻和其亲本在主要营养成分(粗蛋白, 粗脂肪, 游离氨基酸, 总灰分和矿物元素)和理化性质方面没有显著差异。虽然在大米中可检测到含有少量的 *Cry1Ab* 蛋白, 但是在煮熟的米饭没检测到 *Bt* 蛋白(Wu et al. 2003)。更多的 *Bt* 水稻和表达抗凝素水稻的喂食实验还在进行中, 虽然已经明确表达抗凝素水稻对哺乳动物有毒性, 但喂食 *Bt* 水稻(KMD1)与喂食其亲本对照水稻(Xiushui 11)的动物的微生物指标没有变化(舒庆尧等, 未发表数据)。

1.1.6 *Bt* 水稻对农户害虫治理的影响

Bt 水稻的种植要获得更大的成功需要改变农户使用杀虫剂的态度。Huang et al.(2005)研究发现在中国与种植传统水稻的农户相比种植 *Bt* 水稻和 *CpTI* 水稻的农户可以获得更高的产量, 减少农药用量和获得更多的收益。如果在 *Bt* 水稻商业化后也是同样的结果, 那么 *Bt* 水稻将很快就会被农户所接受。但是, 为了能持续稳定的减少不必要的杀虫剂的使用, 更多的关于 *Bt* 水稻的信息需要告知种植农户。Huang et al. (2005) 对 *Bt* 水稻和传统水稻在不同的信息条件进行比较时未设置无效或空白对照。因此很难判定上述研究中农户减少杀虫剂的使用量是因为他们观察到了螟虫为害下降还是因为他们被告知种植的是 *Bt* 水稻从而已经预先决定减少农药的使用(Heong et al. 2005)。

Naik et al. (2005) 报道在印度的安得拉邦, 一些 *Bt* 棉花的种植者并没有完全意识到转基因技术带给他们的全部收益, 可能是因为错误的信息或缺乏培训使得他们并没有减少足够的杀虫剂使用量。如果 *Bt* 水稻商业化成为现实, 种植农户必须得到足够的培训并被告知无需为控制螟虫使用杀虫剂。*Bt* 水稻的应用是一个渐进学习的过程, 而通过邀请农户参加 *Bt* 水稻的实验可以促使他们了解 *Bt* 水稻的好处以及改变他们对杀虫剂使用的态度。在更多的农户参与评价实验后,

Bt 水稻的好处包括收益增加和杀虫剂使用量的减少可以通过媒体活动、种子繁育和其他渠道传播开。

大部分农户的杀虫剂使用的决策受到他们缺乏足够的虫害及其防治信息和害怕产量损失的影响。因此,为了农户从 *Bt* 水稻中获得全部的收益就必须改变他们杀虫剂使用的习惯。为对农户进行信息及技术支持将是获得释放后持续的成功关键。

1.1.7 结语

Bt 玉米和 *Bt* 棉花已取得巨大的成功,虽然 *Bt* 水稻同样是一次成功的创新的成功,它释放还面临着一些制约和挑战。初步的结果表明 *Bt* 水稻与生物防治和土壤的健康相兼容,但更大规模和长期的研究还需进行。*Bt* 玉米和 *Bt* 棉花的产品对人类健康的影响已开展了较多的研究,而 *Bt* 水稻食品安全的研究还开展的较少 (High et al. 2004)。*Bt* 水稻的抗性管理即不能像 *Bt* 棉花那样有可选择的寄主作为庇护所,也不可能像在一些国家的 *Bt* 棉花和 *Bt* 玉米那样设置足够大的田间庇护所。而且, *Bt* 水稻的杀虫蛋白含量还要低于其他的 *Bt* 作物。最后,虽然种植 *Bt* 水稻的农户可以减少杀虫剂的使用量和水稻产量的提高,但减少完全不必要的杀虫剂的使用量需要通过进一步的培训学习,而水稻产量的增加也没 *Bt* 棉花明显。

虽然还有各种制约,但初步的研究已表明 *Bt* 水稻能提高收益而且对环境和人类健康都没有影响,为什么没有国家释放 *Bt* 水稻呢?最主要的原因就是消费者的接受能力以及对国际贸易的影响。水稻不仅是亚洲最主要的食物,同时它也作为一种文化贯穿着整个亚洲,因此对于 *Bt* 水稻的释放会招致一些抵制也十分正常。而一些稻米出口国也在考虑进口国的市场接受能力,一旦 *Bt* 水稻释放, *Bt* 水稻和传统水稻就会混杂在一起,对于出口将带来巨大的风险。

就目前来说,表达维生素 A 的“黄金大米”由于它可以预防儿童失明很有可能成为第一个释放的转基因水稻 (Al-Babili and Beyer 2005)。如果黄金大米能成功被消费者和国际市场所接受,将十分有助于决定 *Bt* 水稻释放的时间。而中国农业部于 2009 对两种 *Bt* 水稻颁发了生物安全证书 (<http://www.stee.agri.gov.cn/biosafety/spxx/P020091127591594596689.pdf>),这也表

明了中国正在对 *Bt* 水稻进行进一步的生产性研究, 而我国很可能成为第一个 *Bt* 水稻的商业化国家。为此, 对 *Bt* 水稻进行深入、长期和系统的生态安全、抗性管理和食品安全的评价工作已刻不容缓。

1.2 转纤维素酶基因植物的生态安全性

1.2.1 纤维质生物能源作物

高昂的能源价格、能源进口的增加、考虑到石油的供给和对石油产生环境后果的认识, 驱使着我们把目光转移到了生物燃料上面。石油工业的利润不仅来自石化燃料, 而且还从石油衍生副产品如可用于其他烃类化合物的生产润滑剂和芳烃石化产品中获利。把石油产业的模式应用到纤维质生物能源产业上可能会提高利益率, 具体体现在高价值低容量的重组产物, 例如生物制药和纤维素能源作五中的高附加值的工业化学品。为了确认是否这种克选择的生物燃料替代石油后回有利益, 就有必要对这种生物燃料材料本身的生命周期和它的生产全过程直接和间接的投入和产出做出计算。

生物质能源之一就包括了纤维生物质作物。纤维质生物能源作物, 就是那些作物中的纤维素可以转换成生物燃料。伴随着纤维素生物燃料生产相关的两个主要支出包括前处理过程和微生物纤维素酶的成本费用。早期一代的生物能源作物的革新, 强调在植物生产生物加工所需的酶作为提高生产效率和经济效益的一个重要手段 (而不是使用微生物酶制剂) (Vogel and Jung 2001, Ragauskas et al. 2006)。例如, 在生物燃料生中, 多种作物已被设计出生产葡聚糖酶(Ziegler et al. 2000, Biswas et al. 2006, Hood et al. 2007)和漆酶(de Wilde et al. 2008)。

1.2.2 转纤维素酶基因植物概况

植物细胞壁可以由单个的纤维素酶降解, 纤维素酶与含有一系列酶的纤维素体协作也可对植物细胞壁进行降解。在植物体内表达纤维素酶和纤维素体可能会减少木质纤维素生物质在精炼厂糖化作用中所需要的细胞壁降解的成本。一些初

步的研究已经把嗜酸耐热菌 *Acidothermus cellulolyticus* 中的纤维素酶 E1 成功转入玉米(Biswas et al. 2006, Ransom et al. 2007, Chuansheng Mei 2008, Mei et al. 2009)、马铃薯(Dai et al. 2000a)、浮萍(Sun et al. 2007)和烟草(Dai et al. 2000b, Ziegler et al. 2000, Ziegelhoffer et al. 2009)。

此外, 最新的研究表明, 玉米整株植物中表达的纤维素生物质具有较高的转换效率(Mullet 2009)。研究人员表示, 对 E1 的靶目标非原生质体没有不利影响, 并且当植物组织研磨时纤维素酶有助于生物转化(Chaves et al. 2003)。这些差异是由于不同的亚细胞定位和不同的酶的激活机制所导致的。例如, 热激纤维素酶 E1 对植物生长在典型的环境温度下无不利影响(Vinocur and Altman 2005)。

1.2.3 转纤维素酶基因植物的安全性

在植物中表达纤维素酶或纤维素体表达的效果仍然是有争议的, 因为酶的消化能力是复杂的, 这个过程包括了酶在亚细胞内的定位、胞外蛋白糖基化, 有效的酶组合, 并需要为诱导表达以避免细胞壁过早消化。并且由于植物生产的转基因酶表现出在环境中稳定性的上升, 伴随着这个生物化学特性许多酶都有可能在自然环境中或是食物中出现。一旦这些酶打算进行环境释放, 那么这种可能性就越是应该引起人们的注意。从环境角度看, 没有一个权威的理由来预测酶的环境稳定性会对非靶标生物油影响, 而是它们可能会对重要的生态重要服务功能的间接影响, 如对营养循环和分解的见解影响。

水稻淀粉可以转换葡萄糖, 葡萄糖可以被通过与适当的酶或酶系统和微生物作用发酵从而转换成乙醇。水稻的叶片、谷壳和秸秆可以通过酶的水解和发酵过程最后转化成酒精。在此过程中, 耐高温酶将在生物燃料工业生产起重要作用, 特别是在淀粉液化, 糖化过程, 避免化学预处理, 生产淀粉糖最终使糖转化为乙醇的这一过程中起着重要的作用。而将纤维素酶基因转入到水稻中可以减少加工环节并降低在加工过程中使用生物酶的成本, 这样就有可能得到高效率低成本生物燃料。但是, 与此同时, 纤维素酶基因在水稻种得表达可能会改变水稻细胞壁的结构, 进而影响昆虫或病原菌对其的侵袭能力, 同时外缘基因的插入可能导致水稻植株的物理和化学特状的改变, 从而增加了其作为转基因作物的生态风险性。

第二章 植物对植食性昆虫的防御机制

2.1 昆虫取食诱导的植物防御反应

在植物与昆虫在长期的进化中,植物和昆虫形成了相互适应的机制。植物为了应对昆虫的袭击,植物形成了组成型防御(constitutive defenses)和诱导型防御(induced defenses)两种机制。组成型防御指植物中自然存在的、阻碍昆虫取食或病原菌侵染的物理和化学因子;而诱导型防御是由昆虫和病原菌诱导之后产生的防御(Mauricio et al., 1997)。当然,植物也有可能在受到昆虫或病原菌诱导后,有些组成型防御的水平会有所增加。诱导防御机制对植物的正常代谢耗费的少而且具有特异性,所以诱导防御机制一直是研究植物防御植食性昆虫的热点。

一般来讲,诱导防御包括三个步骤:监测、信号传导和防御信号的产生(Walling 2000, Kessler and Baldwin 2002, Ferry et al. 2004, Dangl and McDowell 2006)。在第一步中,植物的监测系统依靠对一些特异性信号的识别来检测出外缘侵染物的攻击。这些被检测出来的信号随后通过信号传导通路的传导最后诱导出一些防御化学物质(Wan et al. 2002, Hahlbrock et al. 2003, Kaloshian 2004)。在植物中已经发现存在有两种诱导型的防御,即:直接防御与间接防御。直接防御包括物理特征(如刺和毛)和化学特征(初生和次生代谢物),它们影响植食性昆虫的敏感性和行为表现,增加植物在环境中的适合度(Kessler and Baldwin 2002)。间接防御即指植物本身不影响昆虫的敏感性和行为表现,但是可以引诱植食性昆虫的天敌。天敌可以抑制植食性昆虫种群数量的发生因此降低了植食性昆虫对植物的危害。

2.2 植物直接防御的类别

植物间接防御从广义上来讲可以分为抗营养和毒性两个方面(Fig 2.1)(Chen

2008)。抗营养可以发生在昆虫取食之前或者之后,取食之前可以限制食物供应,取食之后可以减少昆虫摄入的营养价值。而毒性包括了植物的一些特异性的特征来对昆虫的取食造成物理上的损害和化学上的干扰。

2.2.1 限制食物供给

在取食之前,宿主植物通过一系列的机制来限制对昆虫的食物的供给来。这些机制包括了细胞壁增强、过敏反应、抗营养核杀虫物质的产生。

植物可以通过增厚细胞壁来提高昆虫刺探和取食机械的障碍以达到限制食物供给的目的,特别是对那些刺吸式口器的昆虫尤其有效(Goussain et al. 2005)。细胞壁的增厚也增加咀嚼式口器昆虫对植物的消化困难程度(Clissold et al. 2004)。许多增厚细胞的基因在植物遭到昆虫的袭击后上调了,这些基因包括果胶酯酶、棒曲毒素、纤维素合成酶和木葡聚糖内糖基转移酶(XTH)(Goggin 2007, Liu et al. 2007a)。过敏反应是植物对抗病原微生物的一种重要的抗性形式,过敏反应使被侵染位点的细胞快速死亡,这就组织了病原微生物的扩散,最终导致病原微生物致饥而死(Heath 2000)。过敏反应也是植物应对一些知识性昆虫的一种防御机制,特别是对那些具有固定取食位点的瘿虫类尤其有效(Fernandes and Negreiros 2001, Hoglund et al. 2005)。例如,过敏反应与水稻对稻瘿蚊 *Orseolia oryzae* 的抗性有关(Bentur and Kalode 1996)。宿主植物对昆虫的反操纵是对瘿虫抗营养策略的重要机制,同时也可以对那些通过调整局部环境获得营养的其它的植食性动物有效果(Danks 2002)。一些植物应对昆虫而合成和释放复杂的挥发性气体(VOCs)混合物,VOCs可以植食性动物的天敌,这就达到了间接防御的作用(Kessler and Baldwin 2002, Kost and Heil 2006)。但是,一些VOCs也是作为一些排斥剂来驱赶昆虫达到直接防御的效果。例如,烟草释放的植食性动物油到的挥发物表现出系统的时间上的变化,而且一些VOCs只在夜间释放。这些夜间的VOCs可以驱赶烟青虫 *Heliothis virescens* 雌成虫在被危害的植株上或者是附近未被危害的植株上产卵(De Moraes et al. 2001)。一些在昆虫取食之后产生的VOCs可以作为驱赶昆虫的直接防御物质,同时这些VOCs也可以吸引昆虫的天敌进行间接防御(Kessler and Baldwin 2001)。VOCs产生是被植食性昆虫的口腔分泌物诱导子所激活的(Truitt et al. 2004, Schmelz et al. 2006)。

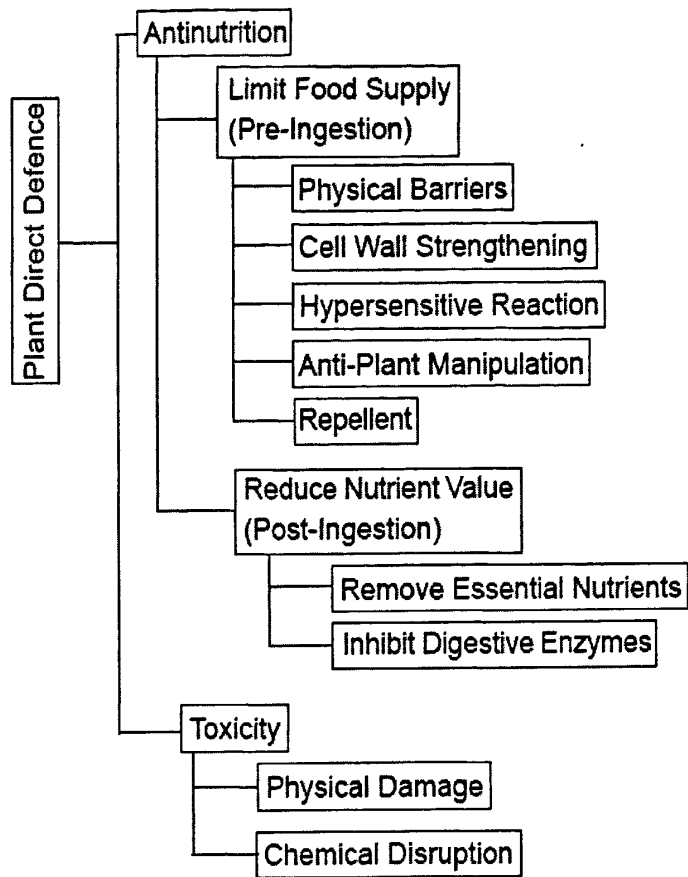


Fig 2.1 Categories of direct plant defense against insect herbivores

图 2.1 植食性昆虫诱导的植物直接防御分类

2.2.2 降低营养价值

在进入取食阶段之后，抗营养就是通过去除掉一些重要的营养物质或是抑制消化来降低昆虫取食的营养价值。许多植物的蛋白在被植食性昆虫射入体内后，在昆虫的肠道内还是很稳定的(Chen et al. 2007a)。一些蛋白酶在昆虫肠道内还保有活性，这就会破坏食物的营养或者被昆虫所利用。和人类一样，昆虫不能自行合成一些氨基酸，例如：精氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸，因此这些氨基酸必须从食物中获得。如果这些必要的氨基酸在昆虫的肠道内被植物的蛋白酶所破坏，那么昆虫的生长发育就会受到影响。许多氨基酸降解酶都是由昆虫取食所有到的，并且被昆虫摄入体内以后在昆虫的肠道内仍然有活性。例如精氨酸和酸酸脱氨酶，分别讲解仅感酸和苏氨酸，受昆虫取食强烈的诱导(Chen et al. 2004a,

Chen et al. 2005a), 这两个酶在昆虫肠道内保持活性, 通过消除必须的氨基酸精氨酸和苏氨酸来达到对昆虫的抗营养作用(Chen et al. 2007a)。天冬酰胺酶即降解其它氨基酸的酶在植物受到昆虫的攻击时会上调(Liu et al. 2007a)。

对植食性动物的消化酶的抑制作用也是降低营养价值的一种方式。经植食性昆虫的攻击, 植物产生各种蛋白抑制剂, 可以抑制昆虫的消化酶如淀粉酶和蛋白酶等(Green and Ryan 1972, Koiwa et al. 1997)。另外, 许多的植物此生代谢产物也对食物的消化起一定的作用, 也可能通过抑制昆虫的消化酶来达到降低营养价值的效果(Duffey and Stout 1996, Akhtar and Isman 2004), 对昆虫消化酶的抑制作用降低了摄取物质的营养, 因此抑制了昆虫的生长和发育。

2.2.3 破坏物理结构

除了抗营养作用之外, 职务还可以通过产生化学物质来进行防御, 这些化学物质可以导致昆虫的物理损伤。例如, 植物在收到昆虫的攻击后, 产生了过量的蛋白酶, 这些蛋白在进入昆虫肠道以后可以对昆虫的结构蛋白进行消化, 最后对植食性动物造成物理性伤害。一个很好的例子就是玉米里面的一个 33 kDa 的半胱氨酸蛋白酶(Pechan et al. 2002), 这个蛋白酶在昆虫的取食位点迅速的累积, 在进入昆虫肠道之后, 它对肠道的蛋白进行消化并破坏了毛虫的围食膜, 最后抑制了昆虫的生长发育。

2.2.4 抑制化学通路

同样, 防御化合物也可以引起植食性昆虫的化学损伤。昆虫的生长发育受到多种通路的调控, 这些通路包括激酶、磷酸酶和调控蛋白等。一些植物的化合物是昆虫调控蛋白等的抑制剂。例如, 一些次生代谢物被昆虫摄入后, 可以抑制激酶或磷酸酯酶的活性(Salunke et al. 2005)。这种对调控酶的抑制会引起昆虫的化学损伤, 最终导致昆虫的生长发育受阻最终死亡。

2.3 植物直接防御的化学特征

在植物和昆虫的相互作用中,植物对昆虫产生的防御性化合物一般被归为以下几类:植物次生代谢产物(PSMs),昆虫消化酶抑制即、蛋白酶、凝集素、氨基酸脱氨酶、多酚氧化酶和其它的防御蛋白。

2.3.1 植物次生代谢产物

植物次生代谢产物(PSMs)是那些在植物生长发育过程中不是必要存在的有机化合物,它们一般是在初级代谢产物的合成中形成的副产物。一些 PSMs 在植物体内执行一些生理功能,例如 N 的转运和储藏工具、紫外线防护剂和对传粉和携带动物的吸引。然而,PSMs 的最主要的功能是对病原微生物和植食性动物的化学防御(Bennett and Wallsgrove 1994, Theis and Lerda 2003, Mao et al. 2007)。大部分的 PSMs 对植食性昆虫都是有利的,除非那些植食性昆虫产生了解毒机制。就算是那些已经具有解毒能力的植食者,它们在解毒方面花费的力气也会导致其生长发育的成本增加。

其中的结构已经阐明的 PSM 总数约为 50 000 个,这很可能只是一个自然的所有现有的 PSM 的一小部分(De Luca and St Pierre 2000)。由于产生 PSMs 要付出代价,所以每种植物只产生少量的单是却是独特的代谢物质组合。例如,环羟肟酸是一种几乎完全只在谷类作物中产生(Niemeyer 1988),而皂角苷在双子叶植物种类广泛分布,但在大多数草种缺乏。另外,植物在受到植食者的攻击或者收到其他临近植物发出的警告后,可是释放出一些防御性的 PSMs (Baldwin et al. 2006)。尽管有大量文献的证明通过生物测定可以明确 PSM 潜在的防御功能,但是某一个特定的 PSMs 的防御功能还要通过大量的实验去证明。

防御性PSM属于三类:酚醛树脂类(如单宁酸、黄酮类、异荭草素、黄酮类、丙三醇和木质素),氮化合物(如白芥子硫苷、黑芥子硫苷酸钾、蜀黍苷、丁布,和环状氢氧氨酸)和萜类(如皂甙)。不同的PSM通过不同的机制抑制植食性的成长和发展。有些黄酮类化合物是调节酶抑制剂,如依赖钙的ATP酶(Salunke et al. 2005)。木质素和其他酚类化合物能增强细胞壁,因此可以抗营养(Schroeder et al.

2006)。一些酚醛树脂类和倍半萜烯类与其他一些挥发物一起可以起到驱赶一些产卵的植食者(De Moraes et al. 2001)。

2.3.2 昆虫消化酶的抑制剂

昆虫消化酶抑制剂在抗昆虫化合物的研究中最广泛。在昆虫消化系统中存在两种主要的消化酶：蛋白酶和淀粉酶。蛋白酶和淀粉酶的抑制剂在植物组织中分布广泛，特别是在种子中(Feng et al. 1991, Zavala et al. 2004)。消化酶抑制剂作为防御机制最早是被 Ryan 和他的搭档发现的(Green and Ryan 1972)。他们发现在马铃薯和番茄受到昆虫的攻击后，它们会迅速表达出蛋白酶抑制剂，并且这种现象是由一个系统信号所调节的，这个系统信号也可以被机械损伤所激活。从此开始了对消化酶抑制剂在植物防御中的作用的广泛研究(Ussuf et al. 2001)。已经得到的转蛋白酶和淀粉酶抑制剂的植物大部分都表现出对昆虫生长发育的抑制毒害作用。

2.3.3 蛋白酶

蛋白酶在植物防御中也参与对昆虫的防御。有一个很好的例子就是玉米种有一个 33 kDa 的半胱氨酸蛋白酶（类木瓜蛋白酶）。这个蛋白酶的在昆虫取食位点迅速积累，它是玉米对鳞翅目害虫抗性的一部分。这个 33 kDa 的蛋白酶在玉米愈伤组织过表达，表达产物用来进行饲喂昆虫，发现昆虫的生长发育受到抑制，抑制率达到 80%(Pechan et al. 2002)。这个酶的毒理是破坏毛虫的围食膜，进而削弱昆虫的消化系统。半胱氨酸蛋白酶在木瓜树里可能对植食性昆虫也发挥了重要作用(Konno et al. 2004)。木瓜叶在受到昆虫取食后会流露出乳胶，在乳胶中包含了各种半胱氨酸蛋白酶，包括木瓜蛋白酶，菠萝蛋白酶和无花果蛋白酶。鳞翅目幼虫在取食含有乳胶的无花果树的叶片时会死亡，但是把乳胶从这些叶子去除洗涤时或是半胱氨酸蛋白酶是被 E64（一种有效的半胱氨酸蛋白酶抑制剂）所灭活时在饲喂鳞翅目幼虫，鳞翅目幼虫不会死亡。在实验室条件下，将乳胶中含有的木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶或者是无花果蛋白酶分别加入到人工饲料里后饲喂家蚕，对家蚕都具有毒性。这些现象都表明蛋白酶是那些受到昆虫取食后取食位点分泌出来的果胶中防御体系的一个重要组成部分。

其他类型的蛋白酶也参与了植物防御植食性昆虫。一种异亮氨酸氨基肽酶在受到昆虫取食、病原菌危害和机械损伤都会强烈的上调(Pautot et al. 1993)。这种蛋白一旦被摄入到昆虫的肠道中,对昆虫消化酶表现出抗性(Chen et al. 2007a)。亮氨酸氨基肽酶精氨酸释放 N-末端的肽。精氨酸,一种昆虫的必需氨基酸,可以进一步通过精氨酸酶降解,同时精氨酸也是由昆虫取食所诱导产生的。因此,亮氨酸氨基肽酶可以与精氨酸酶和其他氨基酸分解酶配合通过消除基本氨基酸可能导致对植食性昆虫的不利影响。除了直接毒性,蛋白酶还参与了植物防御的许多信号传导过程(van der Hoorn and Jones 2004)。考虑到复杂的植物蛋白水解机制,在植物防御中各种蛋白酶的作用仍然在等待我们去发现。

2.3.4 凝集素

凝集素是一种变化多样的蛋白质,它可逆性结合到具体的单糖或寡糖,广泛分布于微生物,植物和动物组织(Komath et al. 2006)。凝集素纳入人工饲料已经证明可以降低几种昆虫的取食(Janzen et al. 1976, Shukle and Murdock 1983, Murdock et al. 1990, Powell 2001)。其中最广泛的研究,同时也许是对蚜虫的控制最有前途的化合物之一是雪花莲凝集素。有趣的是这种蛋白是基于它作用于刺吸式口器昆虫,而这些刺吸式口器昆虫是已知的 Bt 毒素的非靶标昆虫(Powell et al. 1993, Rahbe et al. 1995, Sauvion et al. 1996, Powell 2001)。在烟草中(Hilder et al. 1995, Yuan et al. 2001)、马铃薯中(Gatehouse et al. 1996)、水稻(Rao et al. 1998, Foissac et al. 2000, Sun et al. 2002)中已经看到转基因植物表达雪花莲凝集素对同翅目害虫表现出抗性。除了对吸食汁液类害虫起作用,雪花莲凝集素对鳞翅目昆虫(Fitches et al. 1997, Gatehouse et al. 1997, Fitches and Gatehouse 1998, Setamou et al. 2002, Setamou et al. 2003)也表现出一定的杀虫效果。凝集素对昆虫肠道蛋白酶具有抗性,并且能和肠蛋白能够形成具有高亲和力(类糖基化蛋白质)的复合物(Macedo et al. 2004)。

2.3.5 氨基酸脱氨酶

氨基酸脱氨酶是另一种在植物体内抗昆虫取食的抗营养蛋白。这些酶可以降低昆虫肠道中的游离氨基酸,去除草食动物的营养(Chen et al. 2005a)。两个了

解较多的氨基酸脱氨酶是精氨酸脱氨酶和苏氨酸脱氨酶,这两种脱氨酶都是可以由昆虫取食和机械损伤所诱导(Hildmann et al. 1992, Chen et al. 2004a),他们在昆虫肠道中都抵抗蛋白质的水解(Chen et al. 2007a)。过表达精氨酸酶的转基因番茄植株对烟草天蛾 *M. sexta* 幼虫具有一定的抗性(Chen et al. 2005a),而当野生烟草中的苏氨酸脱氨酶基因被抑制后,野生烟草对烟草天蛾的防御作用被削弱了(Kang et al. 2006)。

2.3.6 多酚氧化酶

多酚氧化酶(PPOs)是抗营养的酶,它催化多酚氧化成醌,通过与蛋白质和游离氨基酸的亲核支链来降低受伤植物的营养价值。对多酚氧化酶在植物体内对植食性昆虫的防御包括参与被昆虫袭击诱导得多酚氧化酶基因的转录,对多酚氧化酶参与植物对植食性昆虫防御的证据包括被昆虫袭击的多酚氧化酶基因的转录诱导(Constabel et al. 1995, Thipyapong and Steffens 1997, Haruta et al. 2001),人工饲料含多酚氧化酶被昆取食后,昆虫的生长受到抑制(Felton et al., 1992),并且被摄入后活性的 PPOs 在昆虫肠道内保持高度稳定(Chen et al. 2005a)。另外转过表达 PPO 的植物提高了植物对病原菌的抗性(Li and Steffens 2002),同样地抑制植物体内 PPO 基因的表达同时也增加了植物对病原菌的易感性(Thipyapong et al. 2004)。

2.3.6 其他蛋白

脂肪氧化酶参与植物激素的生物合成,如茉莉酸和植物源脂肪氧化酶的生物合成,同时也是防御相关基因的转录调节因子(Kessler et al. 2004)。脂肪氧化酶加入到人工饲料之后,也对昆虫表现出直接的毒性(Shukle and Murdock 1983, Felton et al. 1994)。尽管我们不知道他们是如何产生有毒代谢产物,但脂肪氧化酶可以产生的油脂过氧化物例如过氧化氢产物和醛是潜在的脂质过氧化反应物。这些反应物可以与与亲核氨基酸侧链的氨基酸反应,从而达到消除营养的作用(Felton et al. 1994)。

过氧化物酶对植食性昆虫的这种潜在的直接毒害作用通常也是它们的“消化减速”在起作用(Felton and Summers 1993, Duffey and Stout 1996)。过氧化物酶

产生的醌和其他过氧化产物可以与任何游离氨基酸或蛋白质侧链反应,从而减少了在草食动物的肠道摄入食物的营养价值。

2.4 基因芯片在当前领域的应用前景

所谓基因芯片(gene chip)也叫核酸芯片、DNA 芯片、DNA 微阵列(DNA microarray),是指采用原位合成(in situ synthesis)技术或微量点样技术,将数以百计或者数以万计的 DNA 探针固相支持物表面,从而产生二维 DNA 探针阵列,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号来实现对生物样品的快速、并行和高效的检测和分析。和传统的计算机芯片相同,即因芯片技术的核心思想同样是集成化,并且在制作上借鉴了很多源于前者的成熟技术。即因芯片技术的诞生与基因组和后基因组时代的要求相适应,以其本身所具有的革命性优势,作为一种强有力的分析工具在生命科学、医学及其相关学科中扮演了重要的角色。

早在基因芯片概念提出不久后,就有其应用于水稻研究的相关报道(Schena et al. 1995, Yazaki 2002)。2002 年,水稻基因组草图宣告完成(Yu et al. 2002)而后,随着对水稻的研究进入功能基因组学阶段,基因芯片的应用更加广泛而深入。

相对于目前用于检测基因表达水平的几种方法,如 RT-PCR、Northern、mRNA 差异显示等,基因表达谱芯片可通过平行检测众多基因表达模式进行功能分析,有助于全面了解植物在特殊处理、环境因子影响、发育阶段、病原菌感染何昆虫攻击后等条件下较为完整的基因表达情况。通过与样本对照,分析与特定事件相关的基因,进而确定相应基因的功能或多个基因间的协同作用。

直接参与植物防御植食性昆虫的因子通常是附加的,不同的植物与昆虫系统之间并不相同。通常是多种因子参与防御某一种昆虫,而且这种对这一种昆虫有效的主要因子很可能对于其他昆虫来说是次要的或者是根本没有效果的(Blau et al. 1978)。从另一个角度来讲,植物对昆虫的防御显然是与其他生物过程所相互联系的,在受到昆虫攻击后,许多基因和通路被激活,而这些基因或通路也参与了疾病或其他逆境的防御反应(Walling 2000)。植物对昆虫的防御系统是一种非常复杂的现象,其中涉及到的基因与通路也千差万别,所以用传统方法很难进行全面的分析。随着生物技术的发展,由于基因芯片上可以固定成千上万的探针,使

众多基因同时检测成为可能,不仅可以比较在不同条件下相同的基因组大量基因的转录水平差异,而且可以对比不同基因组中对应基因的转录水平差异。

第二部分 研究内容

第三章 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻抗螟性

鉴定及其对褐飞虱生物学影响

水稻在营养生殖期受到螟虫的危害会形成“枯心”，如果为害持续到生殖生长期就会形成“白穗”(Ye et al. 2001b)。水稻的枯心和白穗是由二化螟(SSB) *Chilo suppressalis* (Walker), 大螟(PSB) *Sesamia inferens* (Walker), 三化螟(YSB) *Scirpophaga incertulas* (Walker)的危害所引起的, 并且与其它的水稻害虫相比, 螟虫造成的危害是最高的(Savary et al. 2000)。基因工程技术的发展使水稻抗螟虫成为可能。目前, 得到了许多的含有 *Bt-cry* 基因的抗一种或多种鳞翅目害虫的水稻抗性品系(Cohen et al. 2008)。尽管如此, 大多数研究工作展示的是单 *cry* 基因包括 *cry1Aa* (Breitler et al. 2004)、*cry1Ab* (Ghareyazie et al. 1997, Shu et al. 2000, Ye et al. 2001b, Husnain et al. 2002)、*cry1Ac* (Bashir et al. 2004, Riaz et al. 2006, Chen et al. 2008b, Kim et al. 2009)、*cry1B* (Breitler et al. 2004)、*cry1C** (Tang et al. 2006, Ye et al. 2009)、*cry1Ca1* (Zaidi et al. 2009)、*cry2A* (Chen et al. 2005b)和 *cry9C* (Chen et al. 2008a)。大多数的品系都对螟虫或者其他的鳞翅目害虫表现出良好的抗性。就像其他的 *Bt* 作物一样, 毒素长期暴露给昆虫后可能会产生抗性(Gahan et al. 2001, Bravo and Soberon 2008)。

对于延迟昆虫抗性的产生有很多的方法(Hanur 2008)。一个是在表达 *Bt* 杀虫蛋白作物的周围种植不产毒素的植物即庇护所策略(Vacher et al. 2006), 另一个就是采取多基因策略(Bravo and Soberon 2008)。但是, 在亚洲国家特别是中国都是很小的农场, 所以不能推行庇护所的策略。因此 *Bt* 水稻的开发就朝着多基因的方向前进, 特别是多基因高剂量的毒素表达可以减少抗性的产生。许多含有融合蛋白的转基因水稻例如 *cry1Aa/cry1Ab* (Tu et al. 2000, Ye et al. 2001b, Ho et al. 2006)、*cry1Ab/cry1B* (Ho et al. 2006)、*cry1Ac/cry2A* (Breitler et al. 2004, Riaz et al. 2006)、*cry1Ac/CpTI* (Han et al. 2006, 2007) 都对鳞翅目的害虫具有一定的抗性。营养期杀虫蛋白(Vips)是在苏云金芽胞杆菌营养期中发现的一种非晶体状胞外

杀虫蛋白(Estruch et al. 1996)。Vip 蛋白对鳞翅目昆虫具有很广的杀虫谱(Rang et al. 2005), 并且他们的作用方式与 Cry 蛋白不同(Lee et al. 2003)。前人已经证明 Vip3A 和 Cry 杀虫蛋白之间的交互抗性很低(Lee et al. 2006, Jackson et al. 2007)。因此 Vips 被认为是除了 Cry 蛋白的另外一个选择, 可以用在抗虫植物的应用上(Fang et al. 2007)。一个表达 Vip3A 和 Cry1A 蛋白的玉米品系取代了原来的单基因或者两个 *cry* 基因的转基因玉米(Dively 2005), 并且有几种新的表达单 Vip3A 蛋白的棉花和表达 Vip3A 和 Cry1Ab 融合蛋白的棉花已有报道(Llewellyn et al. 2007, Whitehouse et al. 2007b, Adamczyk and Mahaffey 2008, Bommireddy and Leonard 2008)。因此, 有必要对 *cry1Ab/vip3H* 进行室内生物测定以及田间螟虫为害调查来确定其抗虫性效果。并且, 有必要进行 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对褐飞虱的生物学影响进行评价, 以确保新的转基因材料不会引起次要害虫的暴发。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试水稻

供试转 *cry1Ab/vip3H* 水稻为处于 R_1 代的粳稻纯合品系 G6H1。这个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有 *cry1Ab/vip3H* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子, 并且含有一个高抗曹甘麟的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) (Fang et al. 2007), 其非转基因亲本品种 Xiushui 110 为对照。供试水稻材料一部分于大试管(R:3 cm, L:25 cm)内采用营养液培养(附表 1), 放置于控温控光的智能人工气候箱内培养, 其培养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 (L:D) 14: 10h、光强度 12000~14000 Lux、湿度 $75 \pm 5\%$ (下同), 20 日龄时, 采用 10% 的草甘膦水剂喷施于稻苗上, 去除有可能存在的非转基因杂稻。后于 30 日龄三叶期时选择同等粗细大小的稻株供试验用。另一部分播种且移栽于无虫网室内, 成株期不同阶段的稻株供实验用。

3.1.2 供试昆虫

二化螟和大螟越冬幼虫均采自浙江大学农场稻田。在田间养虫室内待二种螟虫雌雄成虫羽化后,分别按一定比例置于放有 1 丛稻株和浸渍有 20% 蜂蜜水脱脂棉球的养虫笼中任其吸食、交配和产卵,每日定时收集卵块。卵块置室温下待孵化。蚁螟孵化后,参照尚稚珍等(1979),以水稻(浙辐 910)谷芽饲养 1-2 龄幼虫,2 龄后改用 3-5 天的种苗饲养。田间养虫室内连续饲养 2 代,第 3 代开始,及时收集卵块,待蚁螟孵化后供生测试验用。

褐飞虱采自杭州田间,在供试原始代褐飞虱取自本试验室在杂交水稻(中浙优 1 号)上连续饲养的实验种群。放置于控温控光的养虫室内继代饲养,其中饲养条件为:温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 (L:D) 14 h: 10 h、光强度 3500~4000 Lux、湿度 $70 \pm 5\%$ 。

3.1.3 田间种植和小区设计

G6H1 及其对照 Xiushui 110 品系的田间试验于 2008 年和 2009 年在浙江省杭州市 (120.12°E , 30.13°N) 浙江大学试验农场展开。播种时间为 2008 年 7 月 2 日和 2009 年 6 月 18 日,播种一个月后进行移栽,每个试验田块被分割成等大 6 个小区,2 个处理(即 Bt 水稻和非 Bt 水稻),3 个重复,各小区按随机区组设计。各小区面积约为 $20\text{ m} \times 35\text{ m}$,小区间均以一条宽约 50 cm 田埂隔开,整个试验田的四周均种植 5 行非转基因对照水稻为保护行。稻苗单本手工移栽,试验区内的水肥管理同其它正常水稻,但整个生长期不用任何农药处理。

3.1.4 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻抗螟虫离体测定

二化螟和大螟分别采用离体叶片合离体茎干法进行抗虫性测定。在水稻的苗期、分蘖期、抽穗期和灌浆期分别自各供试材料的 30 丛单本种植的稻株中随机取 2 个分蘖剪取 3-4 cm 长的叶片(倒一叶)1 片。然后将叶片移置小平底玻管($6.5 \times 1.5\text{ cm}$)内经 10% 的苯腈咪唑保鲜液浸渍过的滤纸片上,同时在叶片两端压上小滤纸片。每管分别接入 5 头蚁螟,管口塞紧脱脂棉花,自接入初孵若虫后第 2、4、7 天考查幼虫死亡率,测量二化螟第 2 天和第四天的累积取食叶面积。

3.1.5 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻各个时期蛋白表达量测定

3.1.5.1 Cry1Ab/Vip3H 融合蛋白免疫共沉淀

将转基因水稻和非转基因的植株进行取样,用液氮速冻以后,用 1M Tris-HCl 缓冲液也对组织进行研磨,然后采用 Bradford 法(Bradford 1976)进行总蛋白含量的测定,用牛血清白蛋白作为标准曲线。然后取 20 μg 的总蛋白进行 Western blot 分析。胶为 8% (m/v) SDS-PAGE, 然后进行转膜, 杂交, 显色。分别采用了两种一抗进行了杂交, 分别为兔抗 Bt Cry1Ab 抗体和兔抗 Bt Vip3 抗体, 检测时采用的是可以和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(Bio-Rad)(Datta et al. 1998)。

3.1.5.2 Cry1Ab/Vip3H 融合蛋白含量测定

在水稻的苗期、分蘖期、抽穗期和灌浆期进行采样, 分别采集主茎和主茎上的倒数第二片完全展开的叶片 15 株, 液氮速冻以后, 迅速转移至 -70°C 冰箱里冷藏, 待用。取 0.2g 叶片或茎干组织用液氮进行研磨, 用 1M Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)提取融合蛋白, 后采用一种检测 Bt-Cry1Ab/1Ac 蛋白的试剂盒(Envirologix Inc., Portland, ME, USA)进行定量测定。

3.1.6 田间转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻抗螟虫的性状表现

从 2008 年 8 月 18 日到 9 月 28 日和 2009 年 8 月 15 日到 9 月 25 日, 对转基因品种 G6H1 及其对照品种 Xiushui 110 进行了每隔 10 天一次的抽样调查。每隔小区随即抽取 10 株, 考察其总分蘖数、枯心白穗数, 若发现为害株则剖开稻秆察看是二化螟还是大螟危害。计算出植株为害率和分蘖为害率。植株为害率 = 带有枯心白穗的植株数 / 调查的总植株数 $\times 100\%$; 分蘖为害率 = 枯心白穗的分蘖数 / 调查的总植分蘖数 $\times 100\%$ 。

3.1.7 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将 G6H1 和 Xiushui 110 的产卵苗放入大玻璃试管中水培, 接入怀卵褐飞虱, 用纱布封口, 放入智能人工气候箱内培养。三天后, 将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后, 12 h 初孵若虫用于以下实验。

将选择好的供试 G6H1 和 Xiushui 110 30 日苗龄水稻苗分别移入装有适量培

养液的大玻璃试管中。每玻璃管移入 3 株稻株，接入初孵若虫 10 头，每个品种接 8 管，置智能人工气候箱内饲养。及时更换新鲜的稻株和培养液，并记录若虫羽化时间，羽化后的成虫进行雌雄配对，配对的褐飞虱成虫接与放置有两个稻苗的大玻璃试管内产卵，每隔 7 天换苗，直至成虫死亡。记录成虫死亡时间。换下的带卵稻苗一部分放在解剖镜下数出稻株上卵的数量，一部分待卵孵化，12 h 内初孵若虫接至新的 30 日龄稻苗上进行第二代的考察，第四代考察同上。

3.1.8 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将分蘖期 G6H1 和 Xiushui 110 苗从无虫网室内移入塑料盆中，罩于聚乙烯薄膜塑料笼罩（直径 15 cm，高 50 cm）内，接入怀卵褐飞虱，用纱布封口，放于养虫间内待褐飞虱产卵。三天后，将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后，12 h 初孵若虫用于以下实验。

将分蘖期 G6H1 和 Xiushui 110 单株稻株从无虫网室内移入塑料盆中，罩于聚乙烯薄膜塑料笼罩（直径 15 cm，高 50 cm）内，接入初孵若虫 10 头，每个品种接 8 盆，置智能人工气候箱内饲养。及时更换新鲜的稻株并记录若虫羽化时间，羽化后的成虫进行雌雄配对，配对的褐飞虱成虫接与放置于单株盆栽的稻株上产卵，每隔 7 天换苗，直至成虫死亡。记录成虫死亡时间。换下的带卵稻苗一部分放在解剖镜下数出稻株上卵的数量，一部分待卵孵化，12 h 内初孵若虫接至抽穗期稻株上进行第二代的考察，第四代即第三代产卵苗上孵化的 12 h 内初孵若虫接于孕穗期的稻株上，考察方法同上。

3.1.9 褐飞虱田间种群调查

从 2008 年 8 月 19 日到 10 月 9 日和 2009 年 8 月 15 日到 10 月 15 日，每隔 10 天进行田间褐飞虱田间种群数量调查，根据 Joost 和 Riley (2004) 的取样方法进行了稍微的改造。拿一个白色瓷盆(36 cm × 46 cm × 3.5 cm)放在水稻根底部倾斜 45 度，然后迅速的拍打稻株 4-5 秒（大约 13-15 下），使褐飞虱落在白糖瓷盆里面，然后统计白糖瓷盆里面褐飞虱的数量，然后把白糖瓷盆里面清理干净。每个小区随即抽取 10 株进行调查。

3.2 数据统计分析

试验数据用 DPS 系统软件进行方差分析(ANOVA)。苗期水稻和成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的影响并采用双因素方差分析并采用 Tukey 测验法进行多重比较。褐飞虱田间种群动态分析和褐飞虱田间产卵量分析采用重复测量方差分析方法。所有显著水平均为 $p = 0.05$ 。(抗性的分析方法要描述下, 还有 TOPSIS)

3.3 结果与分析

3.3.1 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对螟虫的抗虫性

3.3.1.1 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对二化螟的抗虫性

离体叶片测定方法表明取食转基因水稻 48 h 和 96 h 小时以后的二化螟在各个水稻时期的死亡率是不同的(表 4.1)。6 个品系上二化螟取食 48 h 后的死亡率范围分别是苗期 30.00 - 64.67%, 分蘖期 12.00 - 47.33%, 抽穗期 17.33 - 43.33% 和灌浆期 4.00 - 17.33%。96 h 以后分别是苗期 62.67 - 100%, 分蘖期 78.67 - 92.00%, 抽穗期 65.33 - 86.67%和灌浆期 48.00 - 93.33%。取食 168 h 以后, 二化螟的死亡率才达到 100%。

取食 48 h 和 96 h 后, 6 个转基因品种与其对照上二化螟累积取食叶面积相比, 其累积叶面积在苗期(48 h: $F = 28.80$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$; 96 h: $F = 40.84$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$)、分蘖期(48 h: $F = 14.66$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$; 96 h: $F = 18.09$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$)、抽穗期(48 h: $F = 18.63$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$; 96 h: $F = 32.93$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$) 和灌浆期(48 h: $F = 34.52$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$; 96 h: $F = 43.59$; $df = 6, 209$; $P < 0.001$) 显著的减少(表 3.1)。

3.3.1.2 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对大螟的抗虫性

与非转基因对照相比, 所有的转基因水稻品种都表现出显著的抗虫性。取食

48 h 和 96 h 后，取食轉基因水稻的大螟的死亡率在各個時期是不同的（表 3.2）。在取食非轉基因水稻 48 h 和 96 h 后，大螟的死亡率分別不到 1% 和 5%。取食轉基因水稻 48 h 后，其死亡率很低，苗期接近 20%，分蘗期接近 25%，抽穗期接近 15% 和灌漿期近 10%（表 3.2）。96 h 后，取食各個品種大螟的死亡率分別為：苗期 65.83 - 90.83%；分蘗期 65.33 - 100.00%；抽穗期 65.00 - 89.00% 和灌漿期 63.33 - 90.00%。所有大螟若蟲在取食轉基因水稻 168 h 后全部死亡（表 3.2）。

此外，在水稻的各個發育時期大螟的死亡率與二化螟的死亡率相比絕大時候是要低一些的（表 3.1 和表 3.2），這就表明大螟對轉基因水稻中表達的 *Cry1Ab/Vip3H* 蛋白的耐受性藥比二化螟強一些。

3.3.2 轉 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻各個時期蛋白表達量測定

3.3.2.1 *Cry1Ab/Vip3H* 融合蛋白 Western blot

Western blot 分析結果表明，轉 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻品系表達了一個 195 KDa 的融合蛋白，這個融合蛋白的條帶並沒有在非轉基因水稻中出現（圖 3.1）。兩種抗體即兔抗 Bt *Cry1Ab* 和兔抗 Bt *Vip3* 抗體都證實了 *cry1Ab/vip3H* 基因在 G6H1, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 和 G6H6 的融合表達（圖 3.1）。

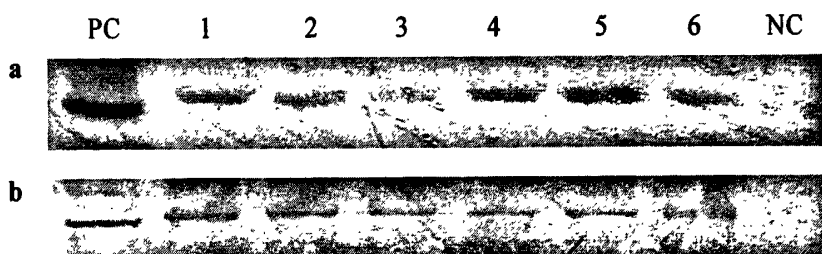


圖 3.1 轉基因水稻中 *Cry1Ab/Vip3H* 融合蛋白的 Western blot 分析。

Fig 3.1 Western blot analysis of a fused protein of *Cry1Ab/Vip3H* in six transgenic rice lines.

Note: Immunoblot showing nearly 195 kDa protein expected for a fused Bt gene both by *Cry1Ab* antibody (a) and *Vip3* antibody (b), which is absent in untransformed control (NC). PC: the fusion protein expressed in *Escherichia coli*; 1~6: G6H1, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 and G6H6; NC: untransformed control Xiushui 110.

注：Western blot 分析結果表明用 *Cry1Ab* 抗體 (a) 和 *Vip3* 抗體都可以檢測到一個 195KDa 的融合蛋白，這個蛋白在非轉基因親本對照 (NC) 中沒有檢測到。PC: *Escherichia* 中表達的融合蛋白；1~6: G6H1, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 and G6H6; NC: 非轉基因親本對照 Xiushui 110。

表 3.1 转 *Cry1Ab/Vip3H* 蛋白水稻不同发育时期对二化螟的抗虫性Table 3.1 Resistance evaluation of transgenic rice expressing *Cry1Ab/Vip3H* protein at different developmental stage against *C. suppressalis* neonate larvae

Developmental stage	Rice line	Cumulative feeding area		Mortality (%)		
		(mm ² /five larvae)				
		(mean $\pm$ SE)				
		48 h	96 h	48 h	96 h	168 h
Seedling stage	Xiushui 110	10.6 $\pm$ 1.7a	23.1 $\pm$ 2.3a	4.67	5.33	5.33
	G6H1	1.8 $\pm$ 0.5c	2.9 $\pm$ 0.8cd	66.00	87.33	100
	G6H2	4.9 $\pm$ 1.2b	7.8 $\pm$ 2.0b	40.00	64.67	100
	G6H3	0.2 $\pm$ 0.0c	0.2 $\pm$ 0.0d	64.67	95.33	100
	G6H4	4.0 $\pm$ 0.8b	6.1 $\pm$ 1.1bc	30.00	62.67	100
	G6H5	1.7 $\pm$ 0.4c	2.1 $\pm$ 0.4d	52.67	89.33	100
	G6H6	0.2 $\pm$ 0.0c	0.2 $\pm$ 0.0d	45.33	100.00	100
Tillering stage	Xiushui 110	6.3 $\pm$ 0.6a	11.4 $\pm$ 1.2a	0	1.33	1.33
	G6H1	1.7 $\pm$ 0.5c	2.9 $\pm$ 0.8bc	30.67	91.33	100
	G6H2	0.9 $\pm$ 0.4c	1.4 $\pm$ 0.6c	47.33	92.00	100
	G6H3	1.2 $\pm$ 0.6c	1.8 $\pm$ 0.8c	36.67	81.33	100
	G6H4	3.2 $\pm$ 0.9b	5.4 $\pm$ 1.4b	12.00	78.67	100
	G6H5	0.3 $\pm$ 0.2c	0.4 $\pm$ 0.3c	28.67	82.67	100
	G6H6	0.8 $\pm$ 0.3c	1.1 $\pm$ 0.5c	19.33	79.33	100
Heading stage	Xiushui 110	8.4 $\pm$ 1.2a	13.1 $\pm$ 1.1a	1.33	3.33	3.33
	G6H1	1.2 $\pm$ 0.6c	1.9 $\pm$ 1.0bc	29.33	78.67	100
	G6H2	0.2 $\pm$ 0.0c	0.3 $\pm$ 0.0c	43.33	85.33	100
	G6H3	1.0 $\pm$ 0.4c	1.7 $\pm$ 0.7bc	34.67	86.67	100
	G6H4	2.8 $\pm$ 1.0b	3.4 $\pm$ 1.1b	17.33	65.33	100
	G6H5	0.8 $\pm$ 0.3c	1.2 $\pm$ 0.5bc	25.33	85.33	100
	G6H6	0.4 $\pm$ 0.1c	0.7 $\pm$ 0.1c	17.33	80	100
Filling stage	Xiushui 110	8.1 $\pm$ 0.9a	15.0 $\pm$ 1.7a	0.67	2.00	2.00
	G6H1	1.5 $\pm$ 0.4c	2.4 $\pm$ 0.6bc	4.00	76.00	100
	G6H2	1.3 $\pm$ 0.3c	1.7 $\pm$ 0.4c	8.00	82.00	100
	G6H3	0.4 $\pm$ 0.1c	0.5 $\pm$ 0.1c	17.33	93.33	100
	G6H4	2.6 $\pm$ 0.4b	4.3 $\pm$ 0.6b	4.00	48.00	100
	G6H5	0.7 $\pm$ 0.1bc	1.0 $\pm$ 0.2c	12.00	84.00	100
	G6H6	0.8 $\pm$ 0.3bc	1.2 $\pm$ 0.5c	4.00	81.33	100

Note: At the same rice developmental stage, means within the same column followed by the same lowercase letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to one-way ANOVA and least significant difference (LSD) test. 注: 单因素方差分析 LSD 法表明同时期同列中具相同大小写字母示平均数间未达显著差异 ($p = 0.05$)。

表 3.2 转 Cry1Ab/Vip3H 蛋白水稻不同发育时期对大螟的抗虫性

Table 3.2 Resistance evaluation of transgenic rice expressing Cry1Ab/Vip3H protein at different developmental stages against *S. inferens* neonate larvae

Developmental stage	Rice line	Mortality (%)		
		48 h	96 h	168 h
Seedling stage	Xiushui 110	0.00	1.67	1.67
	G6H1	19.17	90.83	100
	G6H2	17.50	80.83	100
	G6H3	39.17	89.17	100
	G6H4	10.83	65.83	100
	G6H5	30.00	70.00	100
	G6H6	20.00	70.00	100
Tillering stage	Xiushui 110	0.67	4.67	4.67
	G6H1	24.67	90.33	100
	G6H2	28.67	84.67	100
	G6H3	24.33	65.33	100
	G6H4	23.33	85.33	100
	G6H5	26.33	87.67	100
	G6H6	32.00	100.00	100
Heading stage	Xiushui 110	0.67	4.67	4.67
	G6H1	21.00	89.00	100
	G6H2	14.17	83.33	100
	G6H3	18.33	66.67	100
	G6H4	12.50	80.83	100
	G6H5	13.33	79.17	100
	G6H6	11.67	65.00	100
Filling stage	Xiushui 110	0.00	1.33	1.33
	G6H1	10.00	90.00	100
	G6H2	3.33	90.00	100
	G6H3	3.33	63.33	100
	G6H4	3.33	63.33	100
	G6H5	6.67	76.67	100
	G6H6	10.00	63.33	100

Note: At the same rice developmental stage, means within the same column followed by the same lowercase letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to one-way ANOVA and least significant difference (LSD) test. 注：单因素方差分析 LSD 法表明同时期同列中具相同大小写字母示平均数间未达显著差异 ($p = 0.05$)。

3.3.2.2 *Cry1Ab/Vip3H* 融合蛋白在转基因水稻中的含量

正因为 *cry1Ab/vip3H* 基因在 G6H1, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 和 G6H6 中的融合表达, 所以用 *Cry1Ab* 蛋白的浓度来衡量 *Cry1Ab/Vip3H* 融合蛋白的浓度。在每个转基因水稻各个时期的茎杆和叶片内均可以检测到 *Cry1Ab* 蛋白。在每个转基因品种中叶片中 *Cry1Ab* 蛋白的含量因水稻的不同发育时期而不同, 除了 G6H6 外, 所有品种均在苗期达到最高值 (图 3.2)。从苗期到灌浆期, G6H1 中 *Cry1Ab* 蛋白占可溶性总蛋白含量的 0.007 到 0.027%, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 和 G6H6 中蛋白占可溶性总蛋白含量的比例分别为 0.001 到 0.034%, 0.010 到 0.037%, 0.006 到 0.023%, 0.009 到 0.038% 和 0.001 到 0.006%。并且在 6 个转基因品种之间全期 *Cry1Ab* 蛋白的平均含量存在显著差异 (表 3.3)。并且, 叶片中 *Cry1Ab* 所占比列的变异系数在 6 个品种中也不相同 (表 3.3)。其中 G6H2 的 *Cry1Ab* 的变异系数是最大的, 这就表明 *Cry1Ab* 蛋白在各个品种及其不同发育时期所占的比例的变化是最大的。基于 *Cry1Ab* 表达量的变异系数不同, 不同水稻品种各个发育时期的 *Cry1Ab* 表达量稳定性排序为: G6H4 > G6H1 > G6H6 > G6H3 > G6H5 > G6H2。

在每个转基因品种中茎杆中 *Cry1Ab* 蛋白的含量因水稻的不同发育时期而不同, 除了 G6H6 外, 所有品种均在苗期达到最高值 (图 3.2)。从苗期到灌浆期, G6H1 中 *Cry1Ab* 蛋白占可溶性总蛋白含量的 0.042 到 0.071%, G6H2, G6H3, G6H4, G6H5 和 G6H6 中蛋白占可溶性总蛋白含量的比例分别为 0.015 到 0.053%, 0.027 到 0.056%, 0.007 到 0.036%, 0.012 到 0.033% 和 0.006 到 0.019%。并且在 6 个转基因品种之间茎杆全期 *Cry1Ab* 蛋白的平均含量存在显著差异, G6H1 的表达量最高而 G6H6 的表达量最低 (表 3.3)。并且, 茎杆中 *Cry1Ab* 所占比列的变异系数在 6 个品种中也不相同 (表 3.3)。其中 G6H4 的 *Cry1Ab* 的变异系数是最大的, 这就表明 *Cry1Ab* 蛋白在各个品种及其不同发育时期所占的比例的变化是最大的。基于 *Cry1Ab* 表达量的变异系数不同, 不同水稻品种各个发育时期的 *Cry1Ab* 表达量稳定性排序为: G6H1 > G6H6 > G6H5 > G6H3 > G6H2 > G6H4。

此外, 取食转基因水稻不同发育时期 96 h 的二化螟死亡率与转基因水稻叶片中 *Cry1Ab* 蛋白含量不成线性相关 ($F = 0.0130$; $df = 1, 23$; $r = 0.0243$; $P = 0.9103$), 与此相似, 取食转基因水稻不同发育时期 96 h 的大螟死亡率与转基因水稻茎杆中 *Cry1Ab* 蛋白含量不成线性相关 ($F = 2.2802$; $df = 1, 23$; $r = 0.3066$; $P = 0.1451$)。

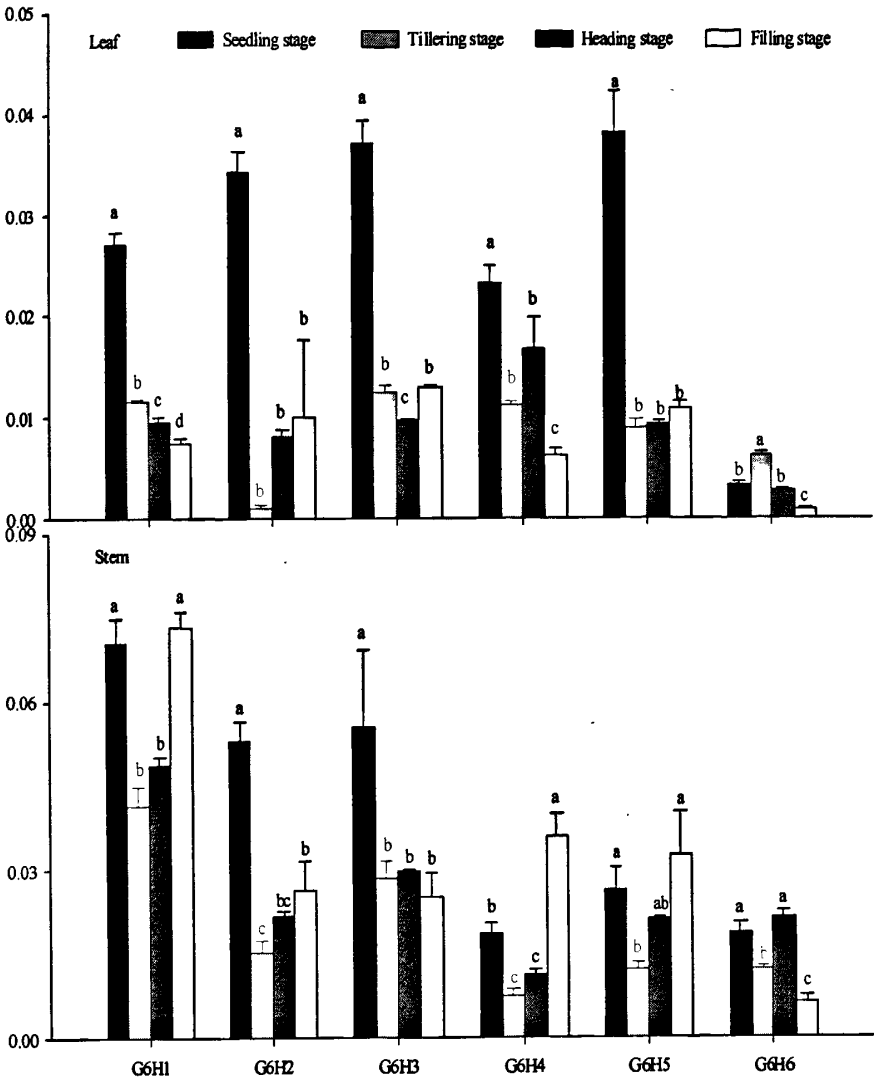


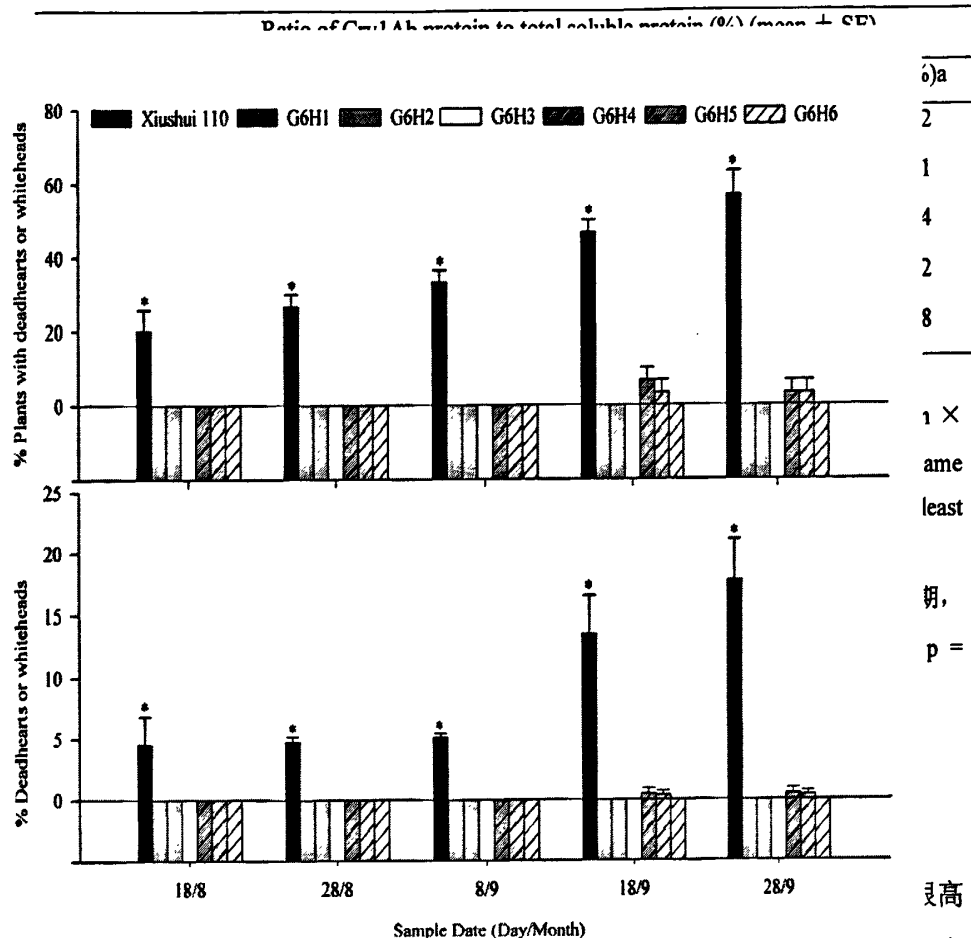
图 3.2 转基因水稻不同发育时期茎秆和叶片中 Cry1Ab 蛋白占可溶性总蛋白的比值
Fig 3.2.The ratio of Cry1Ab protein to total soluble protein in main stems and their flag leaves of six transgenic rice lines at different rice developmental stages.

Note: The data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 15).

注：所有数值均为平均值 $\pm$ 标准误（n = 15）

表 3.3 转基因水稻苗期到灌浆期茎秆和叶片中 Cry1Ab 蛋白占可溶性总蛋白比例的平均值
Table 3.3 The overall ratio of Cry1Ab protein to total soluble protein in main stems and their flag leaves of six transgenic rice lines from seedling to filling stage

Rice line	Ratio of Cry1Ab protein to total soluble protein (%) (mean $\pm$ SE)			
	Flag leaves	CV (%)a	Main stems	CV (%)a
G6H1	0.0138 $\pm$ 0.0010b	57.24	0.0585 $\pm$ 0.0019a	24.62



的抗性, 在所有的取样时间都没有发现危害状。在 9 月 8 日, G6H4 和 G6H5 有危害状, 但是为害植株率不到 4%, 为害分蘖率不到 0.5%。为害状是由于大螟取食引起的, 而不是二化螟所引起的。而其亲本对照超过 95% 是由于二化螟危害所引起的, 并且在每个取样时间都可观测到。在 9 月 28 日, 对照田为害率达到最高为 56.67% 植株和 17.78% 分蘖 (图 3.3)。转基因水稻和非转基因水稻之间带有白穗或枯心的植株 ($F = 415.04$; $df = 6, 14$; $P < 0.001$) 和白穗枯心率 ($F = 124.72$; $df = 6, 14$; $P < 0.001$) 都有显著的差异。同时, 对照田间的植株为害率 ($F = 6.81$; $df = 4, 14$; $P = 0.007$) 和分蘖危害率 ($F = 7.15$; $df = 4, 14$; $P = 0.006$) 在各个不同的发育时期也表现出显著的差异 (图 3.3)。但是, 6 个转基因水稻品种之间不存在显著差异。

在 2009 年 6 个转基因水稻品种对二化螟和大螟的抗性表现与其在 2008 年田间的表现相似, 只是 G6H3 在最后的两个取样时间有一些危害状 (图 3.4)。

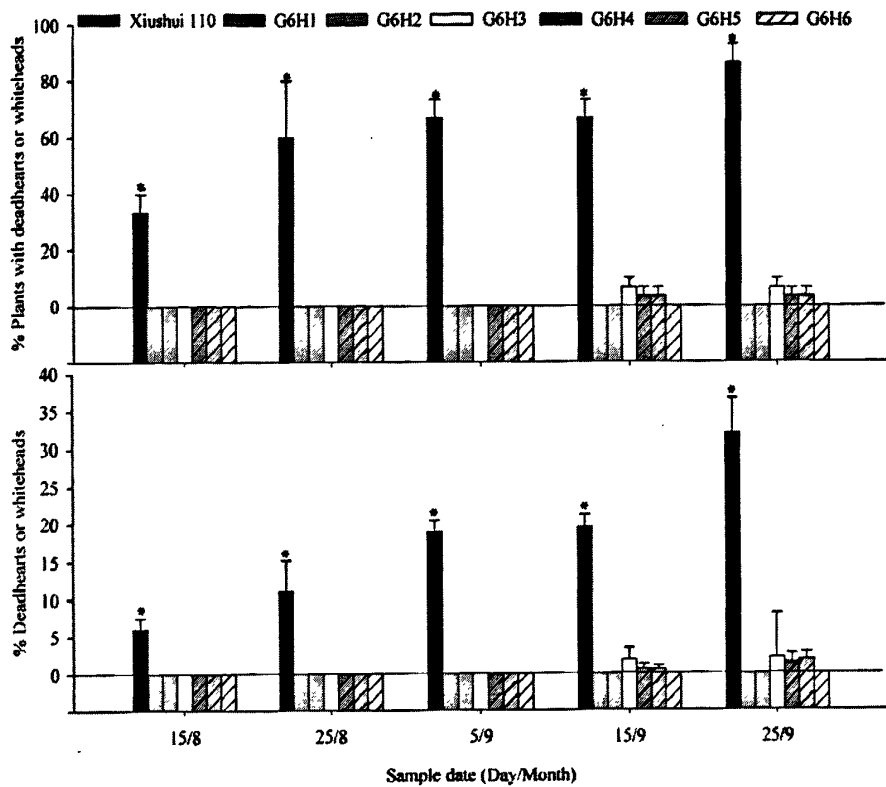


图 3.3 2008 年田间自然条件下二化螟和大螟对转基因水稻和其亲本非转基因对照的为害

Fig 3.3 *C. suppressalis* and *S. inferens* damage in six transgenic rice lines expressing Cry1Ab/Vip3H protein and one control line subjected to natural infestation in 2008.

Note: The data in all samples are expressed as mean $\pm$ SE ($n = 3$). Values followed by asterisk (*) represent significant differences ($P < 0.05$; repeated measures analysis of variance).

注：所有数据均为平均值 $\pm$ 标准误 ($n = 3$)。*表示达到显著差异 ($P < 0.05$; 重复测量方差分析)。

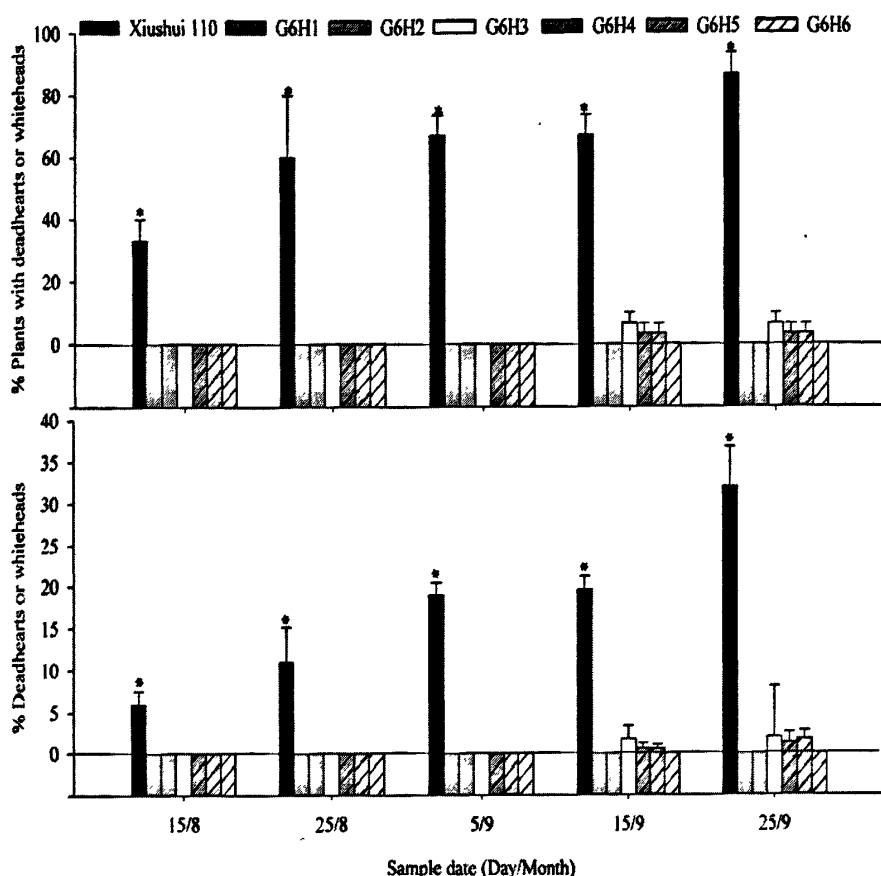


图 3.4 2009 年田间自然条件下二化螟和大螟对转基因水稻和其亲本非转基因对照的为害

Fig 3.4 *C. suppressalis* and *S. inferens* damage in six transgenic rice lines expressing *Cry1Ab/Vip3H* protein and one control line subjected to natural infestation in 2009.

Note: The data in all samples are expressed as mean $\pm$ SE ($n = 3$). Values followed by asterisk (*) represent significant differences ($P < 0.05$; repeated measures analysis of variance).

注：所有数据均为平均值 $\pm$ 标准误 ($n = 3$)。*表示达到显著差异 ($P < 0.05$; 重复测量方差分析)。

3.3.4 转基因水稻对二化螟和大螟抗虫性的排序

根据 TOPSIS 分析结果(表 3.4), 6 个转基因水稻品种对二化螟和大螟的抗性排序为: G6H6 > G6H2 > G6H1 > G6H3 > G6H5 > G6H4。

表 3.4 *Cry1Ab/Vip3H* 水稻对二化螟和大螟的抗虫性排序

Table 3.4 Resistance ranks of six transgenic rice lines expressing *Cry1Ab/Vip3H* protein against *C. suppressalis* and *S. inferens*

Rice line	D_i^+	D_i^-	C_i	Rank
G6H1	2.0462639	15274.442	0.9998661	3
G6H2	1.6742304	15274.442	0.9998904	2
G6H3	11546.613	9999.2147	0.4640905	4
G6H4	15274.438	0.1282718	8.398E-06	6
G6H5	15274.436	1.3966211	9.143E-05	5
G6H6	1.4901438	15274.442	0.9999025	1

Note: D_i^+ : distance of design from the ideal solution for the i th candidate line; D_i^- : distance of design from the negative solution for the i th candidate line; C_i : the relative closeness of the i th candidate line to the ideal solutions.

注: D_i^+ : 第 i 个评价对象与最优方案的距离; D_i^- : 第 i 个评价对象与最劣方案的距离; C_i : 第 i 个评价对象与最优方案的接近程度。

3.3.5 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的若虫历期不受水稻类型、代别及水稻类型和水稻类型与代别互作的影响(表 3.5)。与非转基因水稻 Xiushui 110 相比, 取食 G6H1 水稻褐飞虱若虫的发育时间没有显著差异(表 3.5)。(第一代: $t_{雄虫} = 0.386, df = 68, p = 0.701$; $t_{雌虫} = 1.488, df = 65, p = 0.1415$; $t_{全部} = 0.880, df = 135, p = 0.380$; 第二代: $t_{雄虫} = 1.694, df = 66, p = 0.095$; $t_{雌虫} = 1.223, df = 65, p = 0.226$; $t_{全部} = 1.862, df = 124.9, p = 0.065$; 第四代: $t_{雄虫} = 0.397, df = 70.9, p = 0.692$; $t_{雌虫} = 1.683, df = 74, p = 0.097$; $t_{全部} = 0.884, df = 156, p = 0.378$)。

褐飞虱成虫的寿命没有受到水稻品种、代别及水稻类别与代别互作的影响, 并且用 t 测验对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行比较也没有显著差异(表 3.5)。雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命在 G6H1 和 Xiushui 110 之间 t 测验没有显著性(第一代: $t_{雄虫} = 0.291, df = 56.1, p = 0.772$; $t_{雌虫} = 0.737, df = 63, p = 0.464$; $t_{全部} = 0.276, df = 122.3, p = 0.783$; 第二代: $t_{雄虫} = 1.138, df = 60, p = 0.260$; $t_{雌虫} = 1.243, df = 59, p = 0.219$; $t_{全部} = 1.649, df = 121, p = 0.102$; 第四代: $t_{雄虫} = 0.579, df = 63, p = 0.565$; $t_{雌虫} = 0.453, df = 64, p = 0.652$; $t_{全部} = 0.733, df = 121, p = 0.465$)。

褐飞虱的产卵量受到代别的显著影响,但是没有受到水稻类型和水稻类型与代别互作的显著影响(3.5)。在每一代中,取食 G6H1 的褐飞虱的产卵量与取食非转基因水稻 Xiushui 110 相比,产卵量进行 t 测验分析差异不显著(表 3.5)(第一代: $t = 0.476, df = 63, p = 0.636$; 第二代: $t = 0.518, df = 56, p = 0.607$; 第四代: $t = 0.130, df = 62, p = 0.897$)。

3.3.6 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的若虫历期受代别的显著影响,但是不受水稻类型及水稻类型和水稻类型与代别互作的影响(表 3.6)。与非转基因水稻 Xiushui 110 相比,取食 G6H1 水稻褐飞虱若虫的发育时间没有显著差异(表 3.6)。(第一代: $t_{\text{雌虫}} = 0.147, df = 62, p = 0.884$; $t_{\text{雄虫}} = 0.484, df = 60, p = 0.630$; $t_{\text{全部}} = 0.365, df = 124, p = 0.716$; 第二代: $t_{\text{雄虫}} = 0.237, df = 62, p = 0.813$; $t_{\text{雌虫}} = 1.168, df = 62, p = 0.247$; $t_{\text{全部}} = 0.903, df = 126, p = 0.368$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.891, df = 64, p = 0.376$; $t_{\text{雄虫}} = 0.516, df = 58.5, p = 0.608$; $t_{\text{全部}} = 0.237, df = 132, p = 0.813$)。

褐飞虱成虫的寿命没有受到水稻品种、代别及水稻类别与代别互作的影响,并且用 t 测验对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行比较也没有显著差异(表 3.6)。雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命在 G6H1 和 Xiushui 110 之间 t 测验没有显著性(第一代: $t_{\text{雌虫}} = 0.761, df = 58, p = 0.450$; $t_{\text{雄虫}} = 0.768, df = 58, p = 0.446$; $t_{\text{全部}} = 1.460, df = 118, p = 0.903$; 第二代: $t_{\text{雌虫}} = 0.240, df = 62, p = 0.811$; $t_{\text{雄虫}} = 0.131, df = 62, p = 0.896$; $t_{\text{全部}} = 0.270, df = 126, p = 0.788$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.294, df = 64, p = 0.770$; $t_{\text{雄虫}} = 0.095, df = 66, p = 0.924$; $t_{\text{全部}} = 0.174, df = 132, p = 0.862$)。

褐飞虱的产卵量受到代别的显著影响,但是没有受到水稻类型和水稻类型与代别互作的显著影响(3.6)。在每一代中,取食 G6H1 的褐飞虱的产卵量与取食非转基因水稻 Xiushui 110 相比,产卵量进行 t 测验分析差异不显著(表 3.6)(第一代: $t = 0.520, df = 45.9, p = 0.606$; 第二代: $t = 0.604, df = 62, p = 0.548$; 第四代: $t = 0.463, df = 66, p = 0.645$)。

3.3.7 褐飞虱田间种群动态

2008 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到取样时间($F = 7.52, df = 5, 30; p < 0.001$) 和水稻种类与取样时间互作($F = 5.47, df = 5, 30; p = 0.003$)的显著影响, 但是没有受到水稻种类($F = 4.45, df = 1, 4; p = 0.103$)的影响; 褐飞虱成虫的数量受到取样时间($F = 17.96, df = 5, 30; p < 0.001$)和水稻品种与取样时间互作($F = 8.48, df = 5, 30; p < 0.001$)的影响的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 5.23, df = 1, 4; p = 0.084$); 成虫和若虫的总数量受到取样时间($F = 13.82, df = 5, 20; p < 0.001$)和水稻品种和取样时间互作($F = 8.66, df = 5, 30; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 6.49, df = 1, 4; p = 0.064$)的影响。2008 年田间调查结果表明, G6H1 和 Xiushui 110 田间褐飞虱若虫数量除了在 9 月 19 日外, 其余 5 个取样时间点的数量没有差异(Fig 3.11 上部), 褐飞虱成虫数量在 8 月 29 日和 9 月 19 日两个取样时间存在显著差异, 其余取样时间没有差异 (Fig 3.5 中部), 褐飞虱若虫和成虫得总合只在 9 月 19 日存在显著差异, 其余取样时间不存在显著差异 (Fig 3.5 下部)。

2009 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到取样时间($F = 18.67, df = 5, 30; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻种类($F = 0.15, df = 1, 4; p = 0.718$) 和水稻种类与取样时间互作($F = 0.88, df = 5, 30; p = 0.511$)的影响; 褐飞虱成虫的数量受到取样时间($F = 46.16, df = 5, 30; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 0.21, df = 1, 4; p = 0.673$)和水稻品种与取样时间互作($F = 1.30, df = 5, 30; p = 0.304$)的影响; 成虫和若虫的总数量受到取样时间($F = 20.79, df = 5, 20; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 0.21, df = 1, 4; p = 0.673$) 和水稻品种和取样时间互作($F = 0.08, df = 5, 30; p = 0.511$)。G6H1 和 Xiushui 110 田间褐飞虱若虫数量、成虫数量及若虫和成虫数量的总合在各个取样时期都没有显著差异 (Fig 3.6)。

表 3.5 取食 G6H1 和 Xiushui 110 苗期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响
Table 3.5 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on seedling stage of G6H1 and Xiushui 110 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	G6H1	13.0±0.16 a (n = 35)	13.8±0.12 a (n = 35)	13.4±0.11 a (n = 70)	17.5±1.49 a (n = 35)	16.1±1.16 a (n = 35)	16.9±0.94 a (n = 70)	253.7±23.02 b (n = 35)
		13.1±0.16 a (n = 35)	14.1±0.10 a (n = 32)	13.6±0.11 a (n = 67)	17.1±0.94 a (n = 31)	17.4±1.02 a (n = 30)	17.3±0.71 a (n = 61)	275.7±26.45 b (n = 30)
	Xiushui 110	13.2±0.16 a (n = 33)	13.9±0.10 a (n = 35)	13.6±0.10 a (n = 68)	18.0±1.33 a (n = 30)	17.0±0.91 a (n = 30)	17.5±1.00 a (n = 60)	330.8±17.5 ab (n = 28)
		13.7±0.21 a (n = 35)	14.1±0.17 a (n = 32)	13.9±0.13 a (n = 67)	20.1±1.27 a (n = 32)	18.4±1.13 a (n = 31)	19.2±0.77 a (n = 63)	324.4±18.42 ab (n = 30)
2 nd	G6H1	13.3±0.21 a (n = 40)	14.0±0.18 a (n = 36)	13.6±0.14 a (n = 82)	18.2±1.77 a (n = 31)	18.0±1.35 a (n = 32)	18.1±1.10 a (n = 63)	397.7±36.3 a (n = 30)
		13.3±0.15 a (n = 40)	14.2±0.15 a (n = 40)	13.8±0.12 a (n = 80)	18.2±1.32 a (n = 34)	18.5±1.24 a (n = 34)	18.4±0.95 a (n = 68)	591.4±31.85 a (n = 34)
	Xiushui 110							
4 th	G6H1							
	Xiushui 110							

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.94$, $df = 1, 218$, $p = 0.334$; $F_{\text{generation}} = 2.30$, $df = 2, 218$, $p = 0.103$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.22$, $df = 2, 218$, $p = 0.297$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 5.68$, $df = 1, 210$, $p = 0.018$; $F_{\text{generation}} = 1.24$, $df = 2, 210$, $p = 0.292$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.20$, $df = 2, 210$, $p = 0.821$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 4.08$, $df = 1, 429$, $p = 0.044$; $F_{\text{generation}} = 2.41$, $df = 2, 429$, $p = 0.091$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.21$, $df = 2, 429$, $p = 0.811$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.71$, $df = 1, 193$, $p = 0.402$; $F_{\text{generation}} = 0.94$, $df = 2, 193$, $p = 0.392$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.46$, $df = 2, 193$, $p = 0.631$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 1.80$, $df = 1, 194$, $p = 0.182$; $F_{\text{generation}} = 1.40$, $df = 2, 194$, $p = 0.250$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.08$, $df = 2, 194$, $p = 0.924$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 2.21$, $df = 1, 388$, $p = 0.138$; $F_{\text{generation}} = 2.11$, $df = 2, 388$, $p = 0.123$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.38$, $df = 2, 388$, $p = 0.685$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 0.12$, $df = 1, 185$, $p = 0.729$; $F_{\text{generation}} = 12.74$, $df = 2, 185$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.11$, $df = 2, 185$, $p = 0.899$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between G6H1 and Xiushui 110 according to *t*-test.

注: ^a双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.94$, $df = 1, 218$, $p = 0.334$; $F_{\text{代别}} = 2.30$, $df = 2, 218$, $p = 0.103$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.22$, $df = 2, 218$, $p = 0.297$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 5.68$, $df = 1, 210$, $p = 0.018$; $F_{\text{代别}} = 1.24$, $df = 2, 210$, $p = 0.292$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.20$, $df = 2, 210$, $p = 0.821$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 4.08$, $df = 1, 429$, $p = 0.044$; $F_{\text{代别}} = 2.41$, $df = 2, 429$, $p = 0.091$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.21$, $df = 2, 429$, $p = 0.811$.

^b双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 0.71$, $df = 1, 193$, $p = 0.402$; $F_{\text{代别}} = 0.94$, $df = 2, 193$, $p = 0.392$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.46$, $df = 2, 193$, $p = 0.631$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 1.80$, $df = 1, 194$, $p = 0.182$; $F_{\text{代别}} = 1.40$, $df = 2, 194$, $p = 0.250$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.08$, $df = 2, 194$, $p = 0.924$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 2.21$, $df = 1, 388$, $p = 0.138$; $F_{\text{代别}} = 2.11$, $df = 2, 388$, $p = 0.123$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.38$, $df = 2, 388$, $p = 0.685$.

^c双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 0.12$, $df = 1, 185$, $p = 0.729$; $F_{\text{代别}} = 12.74$, $df = 2, 185$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.11$, $df = 2, 185$, $p = 0.899$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 G6H1 和 Xiushui 110 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

表 3.6 取食 G6H1 和 Xiushui 110 成株期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响

Table 3.6 Biological parameters of *Nilaparvata lugens* fed on adult stage of G6H1 and Xiushui 110 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	G6H1	13.2±0.14 a (n = 32)	14.2±0.14 a (n = 31)	13.7±0.12 a (n = 63)	18.7±1.26 a (n = 30)	16.3±1.39 a (n = 35)	17.5±0.94 a (n = 65)	252.3±15.00 bc (n = 30)
		13.2±0.16 a (n = 32)	14.3±0.14 a (n = 31)	13.7±0.13 a (n = 63)	17.5±0.87 a (n = 30)	17.8±1.31 a (n = 30)	17.7±0.78 a (n = 60)	268.1±26.43 bc (n = 30)
	Xiushui 110	13.8±0.18 a (n = 32)	14.3±0.17 a (n = 32)	14.0±0.13 a (n = 64)	19.1±1.19 a (n = 32)	18.5±1.13 a (n = 32)	18.8±0.81 a (n = 64)	336.7±19.66 b (n = 32)
		13.7±0.19 a (n = 32)	14.0±0.13 a (n = 32)	13.9±0.14 a (n = 64)	19.5±1.21 a (n = 32)	18.7±0.88 a (n = 32)	19.1±0.74 a (n = 64)	317.6±24.71 bc (n = 32)
2 nd	G6H1	13.2±0.17 a (n = 33)	14.1±0.13 a (n = 34)	13.6±0.12 a (n = 67)	20.5±1.28 a (n = 33)	18.2±1.15 a (n = 34)	19.3±0.86 a (n = 67)	428.4±30.31 a (n = 34)
		13.0±0.17 a (n = 33)	14.2±0.19 a (n = 34)	13.6±0.15 a (n = 67)	19.9±1.62 a (n = 33)	18.4±1.03 a (n = 34)	19.1±0.95 a (n = 67)	449.9±35.34 a (n = 34)
	Xiushui 110	13.2±0.17 a (n = 33)	14.1±0.13 a (n = 34)	13.6±0.12 a (n = 67)	20.5±1.28 a (n = 33)	18.2±1.15 a (n = 34)	19.3±0.86 a (n = 67)	428.4±30.31 a (n = 34)
		13.0±0.17 a (n = 33)	14.2±0.19 a (n = 34)	13.6±0.15 a (n = 67)	19.9±1.62 a (n = 33)	18.4±1.03 a (n = 34)	19.1±0.95 a (n = 67)	449.9±35.34 a (n = 34)
4 th	G6H1	13.2±0.17 a (n = 33)	14.1±0.13 a (n = 34)	13.6±0.12 a (n = 67)	20.5±1.28 a (n = 33)	18.2±1.15 a (n = 34)	19.3±0.86 a (n = 67)	428.4±30.31 a (n = 34)
		13.0±0.17 a (n = 33)	14.2±0.19 a (n = 34)	13.6±0.15 a (n = 67)	19.9±1.62 a (n = 33)	18.4±1.03 a (n = 34)	19.1±0.95 a (n = 67)	449.9±35.34 a (n = 34)
	Xiushui 110	13.2±0.17 a (n = 33)	14.1±0.13 a (n = 34)	13.6±0.12 a (n = 67)	20.5±1.28 a (n = 33)	18.2±1.15 a (n = 34)	19.3±0.86 a (n = 67)	428.4±30.31 a (n = 34)
		13.0±0.17 a (n = 33)	14.2±0.19 a (n = 34)	13.6±0.15 a (n = 67)	19.9±1.62 a (n = 33)	18.4±1.03 a (n = 34)	19.1±0.95 a (n = 67)	449.9±35.34 a (n = 34)

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.35$, $df = 1, 193$, $p = 0.558$; $F_{\text{generation}} = 8.39$, $df = 2, 193$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.27$, $df = 2, 193$, $p = 0.767$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 0.03$, $df = 1, 193$, $p = 0.868$; $F_{\text{generation}} = 0.26$, $df = 2, 193$, $p = 0.768$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.06$, $df = 2, 193$, $p = 0.348$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 0.17$, $df = 1, 387$, $p = 0.684$; $F_{\text{generation}} = 2.81$, $df = 2, 387$, $p = 0.062$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.48$, $df = 2, 387$, $p = 0.619$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.19$, $df = 1, 189$, $p = 0.661$; $F_{\text{generation}} = 1.35$, $df = 2, 189$, $p = 0.261$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.19$, $df = 2, 189$, $p = 0.823$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 0.41$, $df = 1, 191$, $p = 0.524$; $F_{\text{generation}} = 1.05$, $df = 2, 191$, $p = 0.354$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.21$, $df = 2, 191$, $p = 0.814$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 0.01$, $df = 1, 381$, $p = 0.915$; $F_{\text{generation}} = 2.05$, $df = 2, 381$, $p = 0.118$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.05$, $df = 2, 381$, $p = 0.950$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 0.08$, $df = 1, 191$, $p = 0.780$; $F_{\text{generation}} = 23.23$, $df = 2, 191$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.34$, $df = 2, 191$, $p = 0.710$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between G6H1 and Xiushui 110 according to *t*-test.

注: ^a 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.35$, $df = 1, 193$, $p = 0.558$; $F_{\text{代别}} = 8.39$, $df = 2, 193$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.27$, $df = 2, 193$, $p = 0.767$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 0.03$, $df = 1, 193$, $p = 0.868$; $F_{\text{代别}} = 0.26$, $df = 2, 193$, $p = 0.768$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.06$, $df = 2, 193$, $p = 0.348$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 0.17$, $df = 1, 387$, $p = 0.684$; $F_{\text{代别}} = 2.81$, $df = 2, 387$, $p = 0.062$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.48$, $df = 2, 387$, $p = 0.619$.

^b 双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 0.19$, $df = 1, 189$, $p = 0.661$; $F_{\text{代别}} = 1.35$, $df = 2, 189$, $p = 0.261$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.19$, $df = 2, 189$, $p = 0.823$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 0.41$, $df = 1, 191$, $p = 0.524$; $F_{\text{代别}} = 1.05$, $df = 2, 191$, $p = 0.354$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.21$, $df = 2, 191$, $p = 0.814$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 0.01$, $df = 1, 381$, $p = 0.915$; $F_{\text{代别}} = 2.05$, $df = 2, 381$, $p = 0.118$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.05$, $df = 2, 381$, $p = 0.950$.

^c 双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 0.08$, $df = 1, 191$, $p = 0.780$; $F_{\text{代别}} = 23.23$, $df = 2, 191$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.34$, $df = 2, 191$, $p = 0.710$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 G6H1 和 Xiushui 110 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

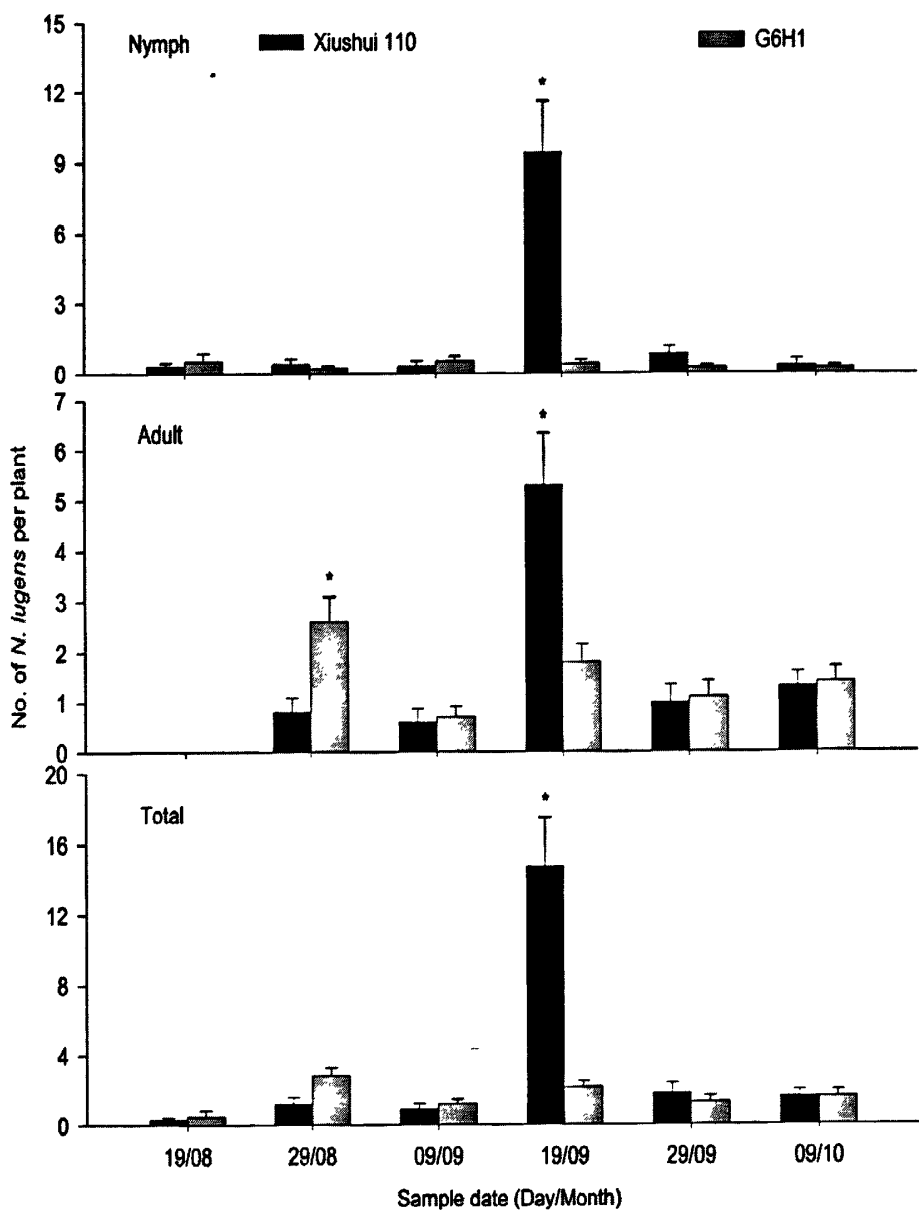


图 3.5 2008 年褐飞虱田间种群动态

Fig 3.5 The population dynamic of *N. lugens* in G6H1 and Xiushui 110 in field in 2008

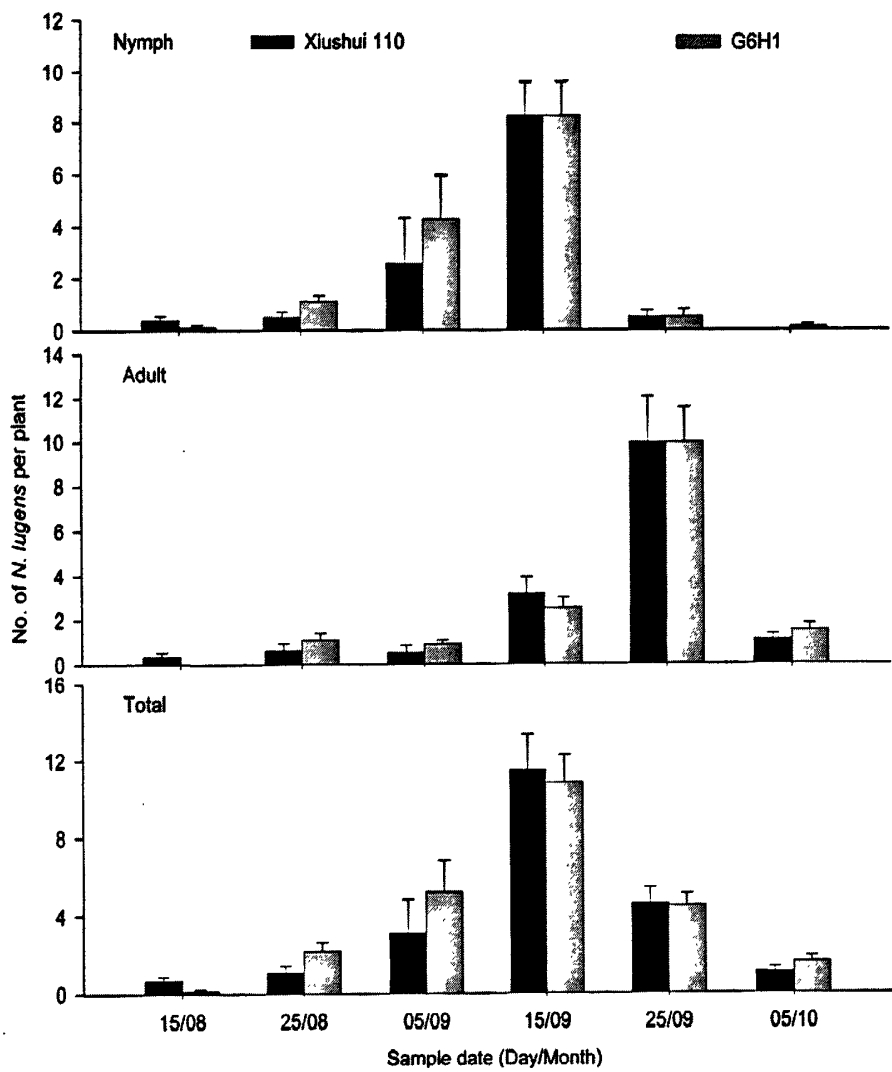


图 3.6 2009 年褐飞虱田间种群动态

Fig 3.6 The population dynamic of *N. lugens* in G6H1 and Xiushui 110 in field in 2009

3.4 小结

本研究表明所有的 6 个转 *cry1Ab/Vip3H* 基因水稻品种与其非转基因亲本对照 Xiushui 110 相比都对 SSB 和 PSB 都表现出良好的抗性 (表 3.1 和 3.2; 图 3.3 和 3.4)。上述结果与单 *cry* 基因水稻对螟虫的抗性相似(Ghareyazie et al. 1997, Shu et al. 2000, Ye et al. 2001b, Husnain et al. 2002, Breitler et al. 2004, Chen et al. 2005b,

Chen et al. 2008a, Zaidi et al. 2009), 也与那些含有两个 *cry* 基因的水稻品种表现相似的抗虫性(Tu et al. 2000, Ye et al. 2000, Bashir et al. 2004, Ho et al. 2006, Riaz et al. 2006)。已有研究表明一个 *cry1Ac* 与 *CpTI* 融合表达的水稻在实验室条件下田间自然发生情况下对多种水稻害虫表现出了抗性(Han et al. 2006, 2007)。两年的田间试验结果表明 G6H1, G6H2, 和 G6H6 表现出对 SSB 和 PSB 稳定的抗虫性, 在水稻的整个发育时期都没有受到危害。同时 G6H1, G6G2 和 G6H6 比那些含有单基因 *cry1Aa* (或者 *cry1B*) (Breitler et al. 2004, Chen et al. 2005b), *cry1Ac* (或者 *cry2A* 和 *cry9C*) (Chen et al. 2005b, Chen et al. 2008c), *cry1C** (Ye et al. 2009) 和 *cry1Ab/cry1Ac* 融合基因(Tu et al. 2000, Ye et al. 2001b)、*cry1Ac/CpTI* 融合基因(Han et al. 2006)表现出更好的抗虫性, 因为上述材料都或多或少的被 SSB 危害。所以 G6H1, G6H2 和 G6H6 可以被看作是替代但基因的抗虫转基因商业化水稻, 并且根据田间调查和试验室生物测定结果进行 TOPSIS 分析, G6H6 在这三者之中是最好的。

取食转基因水稻的 96 小时的 PSB 死亡率要比相同条件下 SSB 的死亡率要低(表 3.1 和 3.2), 并且在水稻生长后期对 G6H3、G6H4 和 G6H5 造成了轻微的危害(图 3.3 和 3.4)。因此, 这些表明 PSB 对 *Cry1Ab/Vip3H* 蛋白的耐受性要好高一些并且 *Vip3A/Cry1Ab* 蛋白的杀虫效果具有种特异性。这个结果与前人研究结果相似, 即转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因水稻 TT9-3 和 TT9-4 也会被螟虫轻度危害, 而这种危害是由 PSB 引起的(Ye et al. 2001b)。类似的, *Vip3A* 和 *Cry1Ab* 蛋白对鳞翅目昆虫的杀虫效果是因种而异的。表达 *Vip3A* 蛋白的转基因棉花对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 和甜菜夜蛾 *S. exigua* 的杀虫效果要比 *Cry1Ab* 棉花要高一些, 而对烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (F.) 的效果要比 *Cry1Ab* 棉花差一些, 并且 *Cry1Ab/Vip3A* 棉花对上述三种夜蛾表现出相似的抗虫性(Adamczyk and Mahaffey 2008)。因此, 要研发一个整个生长周期对鳞翅目昆虫表现出抗性的广谱抗虫转基因水稻, 就要考虑到鳞翅目昆虫(例如 SSB、PSB、YSB 和稻纵卷叶螟等)对不同的 *Cry* 蛋白或者 *Vip* 蛋白的敏感度不同, 这就需要 *Cry/Vip* 蛋白的分别融合表达或双基因融合表达来获得对鳞翅目昆虫更好的控制作用。

6 个转基因品种中茎秆和叶片中的 *Cry1Ab* 蛋白从苗期到成株期含量是变化的并且表现出显著的不同(图 3.2)。这一结果是类似于以前的报告中大多数具有

相似结果的 Bt 外源蛋白的浓度通常在不同的转基因植物品系中存在很大的差异 (Breitler et al. 2000, Mabqool et al. 2001, Husnain et al. 2002, Ramesh et al. 2004, Chen et al. 2008)。本试验结果表明 *Cry1Ab* 蛋白在主茎和叶片中的含量在同一个转基因水稻品种的不同发育时期也是存在显著差异的, 并且在大多数时候灌浆期的蛋白含量最低 (图 3.2)。这个结果也与 *Cry1Ab* (Wu et al. 2001) 和 *Cry1C** (Ye et al. 2009) 蛋白在转基因水稻中时间变化动态相似。而转基因水稻对 SSB 和 PSB 的抗虫性 *Cry1Ab* 蛋白在水稻的主茎杆和叶片中的含量没有显著的相关性。这种现象也发生在 *Cry9C* 水稻品系中 (Chen et al. 2008a)。尽管 *Cry1Ab* 在 G6H6zhong 的表达量是最低的, 并且显著的低于其他品种, 但是它却比 G6H3、G6H4 和 G6H5 的抗虫性要好, 在田间的表现尤为出色一些。所以这就表明 G6H6 中 *Cry1Ab/Vip3H* 蛋白的表达量足够到对 SSB 和 PSB 表现出良好的抗虫性, 而 G6H6 的这种较好的抗虫效果可能归结于 *Cry1Ab/Vip3H* 蛋白在水稻各个时期的表达稳定性相关。而为什么高的表达量反而没有起到好的抗虫效果值得进一步研究。

在实验室条件下, 与其非转基因亲本水稻 Xiushui 110 相比, 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 的 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱连续四代的若虫的生长发育和产卵量没有显著影响, 并且田间褐飞虱连续两年的调查表明, G6H1 田间的褐飞虱种群数量与 Xiushui 110 田间的褐飞虱种群数量没有显著差异。G6H1 对褐飞虱的生物学特性的影响与之前的转双价的 Bt 水稻的对褐飞虱的影响有一些不同。转 *cry1Ab+cry1Ac* 融合基因的 Bt 水稻对非靶标植食性昆虫, 尤其是优势类群或种类的总数量和密度有时会呈现一定的负面或正面效应 (刘志诚, 2003)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 在取食和产卵时对转 *cry1Ac/CpTI* 抗虫水稻无明显选择性, 但白背飞虱若虫和成虫均明显趋向转基因水稻 (傅强, 2003)。这可能是由于不同类型的基因融合表达对水稻本身的影响不同所引起的。就种群动态来讲。转 *cry1Ac/sck* 双基因抗虫水稻系 MSA、MSB、MSA4 移栽后, 对白背飞虱和褐飞虱种群数量的影响有一定的差异, 但与它们的对照均没有显著差异, 并且没有引起稻田叶蝉数量的明显变化, 表明, MSA、MSB 和 MSA4 不会引起关键非靶标水稻害虫数量的明显上升 (Liu et al. 2007b)。已有研究表明转 *vip* 基因棉花与非转基因棉花相比, 其田间的节肢动物的多样性与丰富度没有差异, 但 *Vip* 棉花上的白粉虱的数量比较多一些, 这可能是因为转基因棉花与非转基因棉花的叶片上的

绒毛差异所导致的(Whitehouse et al. 2007b)。因此, 转不同杀虫机制的毒蛋白的单基因转基因作物或双基因融合作物对非靶标昆虫的影响不同, 需要进行个案分析以评价不同材料对不同植食性昆虫的安全性。

第四章 转 *cry1Ab* 基因水稻对褐飞虱生长 发育和繁殖的继代效应评价

转 Bt 基因抗虫水稻对二化螟、大螟及稻纵卷叶螟控制作用明显(Ye et al. 2001b, Han et al. 2006, 2007), 减少了化学农药的使用, 取得了一定的经济效益。但是转基因抗虫作物的外源基因的插入可能导致一些非预期的效应, 例如作物本身的物理性状、营养物质和非营养物质的变化, 这就存在一些潜在的生态风险。因此, 要尽量避免因种植转基因抗虫水稻而带来的生态风险的加重, 及时对转基因抗虫水稻对非靶标害虫的生长发育和繁殖等进行评价, 进一步筛选既高抗靶标害虫又具有一定的抗非靶标害虫地转基因抗虫水稻品系或品种是极其重要的。

褐飞虱是温带和热带水稻田间的重要害虫, 同时也是转 Bt 基因抗虫水稻田的非靶标害虫, 它取食水稻茎秆的韧皮部(Sogawa 1982), 造成叶片枯萎和稻穗变白形成“枯心”(Bae and Pathak 1970)。自上个世纪 80 年代起, 褐飞虱在我国稻田的危害面积年均 50%左右(程暇年等, 2003)。目前, 研究主要集中在: 褐飞虱在转基因水稻和非转基因水稻之间取食和产卵选择行为(陈茂等, 2003a; 陈茂等, 2003b; 陈茂等, 2004)、褐飞虱田间种群动态(Chen et al. 2006b, Chen et al. 2007b, Li et al. 2007)和 Bt 毒素在褐飞虱体内的残留(Bernal et al. 2002, Bai et al. 2006)。褐飞虱在浙江省年发生 4 代, 并且存在世代重叠现象(程暇年等, 2003), 而目前的研究中没有考虑到褐飞虱继代取食后造成的影响, 本章就转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 为材料, 在试验室条件下对其连续对代的生物学特性进行了研究, 并对其田间种群动态进行了调查。

4.1 材料与方法

4.1.1 供试水稻

供试转 *cry1Ab* 水稻为处于 R_{16} 代的粳稻纯合品系 KMD2。这个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子, 其非转基因亲本品种 Xiushui 11 为对照。供试水稻材料一部分于大试管(R: 3 cm, L: 25 cm)内采用营养液培养(附表 I), 放置于控温控光的智能人工气候箱内培养, 其培养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 (L: D) 14: 10h、光强度 12000~14000 Lux、湿度 $75 \pm 5\%$ (下同), 并于 30 日龄三叶期时选择同等粗细大小的稻株供试验用。另一部分播种且移栽于无虫网室内, 成株期不同阶段的稻株供实验用。

4.1.2 供试昆虫

褐飞虱采自杭州田间, 在供试原始代褐飞虱取自本试验室在杂交水稻(中浙优 1 号)上连续饲养的实验种群。放置于控温控光的养虫室内继代饲养, 其中饲养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 (L: D) 14 h: 10 h、光强度 3500~4000 Lux、湿度 $70 \pm 5\%$ 。

4.1.3 田间种植和小区设计

KMD2 及其对照 Xiushui 11 品系的田间试验于 2008 年和 2009 年在浙江省杭州市 (120.12°E , 30.13°N) 浙江大学农场展开。播种时间为 2008 年 7 月 2 日和 2009 年 6 月 18 日, 播种一个月后进行移栽, 每个试验田块被分割成等大 6 个小区, 2 个处理 (即 Bt 水稻和非 Bt 水稻), 3 个重复, 各小区按随机区组设计。各小区面积约为 $20\text{ m} \times 35\text{ m}$, 小区间均以一条宽约 50 cm 田埂隔开, 整个试验田的四周均种植 5 行非转基因对照水稻为保护行。稻苗单本手工移栽, 试验区内的水肥管理同其它正常水稻, 但整个生长期不用任何农药处理。

4.1.4 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将 KMD2 和 Xiushui 11 的产卵苗放入大玻璃试管中水培, 接入怀卵褐飞虱, 用纱布封口, 放入智能人工气候箱内培养。三天后, 将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后, 12 h 初孵若虫用于以下实验。

考察方法同 3.1.7。

4.1.5 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将分蘖期 KMD2 和 Xiushui 11 苗从无虫网室内移入塑料盆中, 罩于聚乙烯薄膜塑料笼罩 (直径 15 cm, 高 50 cm) 内, 接入怀卵褐飞虱, 用纱布封口, 放于养虫间内待褐飞虱产卵。三天后, 将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后, 12 h 初孵若虫用于以下实验。

考察方法同 3.1.8。

4.1.6 褐飞虱田间种群调查

从 2008 年 9 月 2 日和 2009 年 8 月 19 日起, 每隔 7 天进行田间褐飞虱田间种群数量调查, 调查方法同 3.1.9。

4.1.7 褐飞虱田间产卵量调查

2009 年, 在 KMD2 和 Xiushui 11 的分蘖期、拔节期、抽穗期、灌浆期和成熟期随机从小区抽取稻株 10 丛, 移回实验室, 在解剖镜下考察稻株的总分蘖数、每分蘖株高、含卵分蘖数、卵块的高度、每分蘖含卵块数、每卵块含卵数等。褐飞虱分蘖为害率 = 含卵分蘖数 / 总分蘖数 $\times 100\%$ 。; 卵块相对高度 = 卵块的高度 / 分蘖高度 $\times 100\%$ 。

4.2 数据统计分析

试验数据用 DPS (Tang and Feng, 2007) 系统软件进行方差分析(ANOVA)。苗期水稻和成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的影响采用双因素方差分析并采用 Tukey 测验法进行多重比较。褐飞虱田间种群动态分析和褐飞虱田间产卵量分析采用 ANOVA 重复测量方差分析方法。所有显著水平均为 $p = 0.05$ 。

4.3 结果与分析

4.3.1 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的雄虫和雌虫若虫发育历期受水稻类型和代别的影响,但是没有受到水稻类型与代别互作的影响(表 4.1)。与非转基因水稻 Xiushui 11 相比,取食 KMD2 水稻的 1 代和 2 代的褐飞虱若虫明显的延长了,但是第四代的却没有收到显著影响(表 4.2)。(第一代: $t_{雄虫} = 0.903$, $df = 67$, $p = 0.3696$; $t_{雌虫} = 2.9187$, $df = 54.3$, $p = 0.005$; $t_{全部} = 1.799$, $df = 131$, $p = 0.074$; 第二代: $t_{雄虫} = 0.583$, $df = 70$, $p = 0.562$; $t_{雌虫} = 0.503$, $df = 61$, $p = 0.612$; $t_{全部} = 0.627$, $df = 133$, $p = 0.5313$; 第四代: $t_{雄虫} = 2.534$, $df = 80$, $p = 0.027$; $t_{雌虫} = 2.517$, $df = 80$, $p = 0.014$; $t_{全部} = 2.826$, $df = 162$, $p = 0.053$)。

褐飞虱雌成虫和全部成虫的寿命受到代别和水稻类型与代别互作的影响,但是对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行 t 测验发现,除了第二代雌虫和全部成虫寿命有显著差异外,其余皆没有显著差异(表 4.2) (第一代: $t_{雄虫} = 0.974$, $df = 46.8$, $p = 0.335$; $t_{雌虫} = 0.339$, $df = 50.2$, $p = 0.736$; $t_{全部} = 0.447$, $df = 98.3$, $p = 0.656$; 第二代: $t_{雄虫} = 2.109$, $df = 65$, $p = 0.039$; $t_{雌虫} = 3.253$, $df = 51.2$, $p = 0.002$; $t_{全部} = 1.989$, $df = 120.5$, $p < 0.001$; 第四代: $t_{雄虫} = 0.425$, $df = 70$, $p = 0.672$; $t_{雌虫} = 0.798$, $df = 67.2$, $p = 0.428$; $t_{全部} = 0.838$, $df = 145$, $p = 0.403$)。

褐飞虱的产卵量受到水稻类型和代别的显著影响,但是没有受到水稻类型和代别互作的显著影响(表 4.2)与取食非转基因水稻 Xiushui 11 相比,在每一代

中, 取食 KMD2 的褐飞虱的产卵量显著减少, t 测验分析差异显著 (表 3.2) (第一代: $t = 0.897$, $df = 56$, $p = 0.373$; 第二代: $t = 1.202$, $df = 45.7$, $p = 0.235$; 第四代: $t = 2.154$, $df = 69$, $p = 0.035$)。

4.3.2 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的若虫历期 (除去雄虫) 受水稻类型和水稻类型与代别互作的影响, 但是没有受到代别的影响。与非转基因水稻 Xiushui 11 相比, 取食 KMD2 水稻的 1 代和 2 代的褐飞虱若虫明显的延长了, 但是第四代的却没有受到显著影响 (表 4.2)。(第一代: $t_{\text{雌虫}} = 5.695$, $df = 61$, $p < 0.001$; $t_{\text{雄虫}} = 4.067$, $df = 63$, $p < 0.001$; $t_{\text{全部}} = 5.997$, $df = 126$, $p < 0.001$; 第二代: $t_{\text{雄虫}} = 3.937$, $df = 68$, $p < 0.001$; $t_{\text{雌虫}} = 2.621$, $df = 60$, $p = 0.011$; $t_{\text{全部}} = 2.010$, $df = 130$, $p = 0.047$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.791$, $df = 68$, $p = 0.432$; $t_{\text{雄虫}} = 0.545$, $df = 81$, $p = 0.587$; $t_{\text{全部}} = 1.939$, $df = 132.8$, $p = 0.055$)。

褐飞虱成虫的寿命没有受到水稻品种、代别及水稻类别与代别互作的影响, 并且用 t 测验对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行比较也没有显著差异 (表 4.2)。雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命 (除了第二代) 在 KMD2 和 Xiushui 11 之间 t 测验没有显著性 (第一代: $t_{\text{雌虫}} = 1.373$, $df = 53.6$, $p = 0.176$; $t_{\text{雄虫}} = 0.377$, $df = 63$, $p = 0.708$; $t_{\text{全部}} = 0.6629$, $df = 120.4$, $p = 0.509$; 第二代: $t_{\text{雌虫}} = 1.194$, $df = 64$, $p = 0.237$; $t_{\text{雄虫}} = 1.696$, $df = 55.2$, $p = 0.096$; $t_{\text{全部}} = 1.989$, $df = 122.3$, $p = 0.049$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.123$, $df = 66$, $p = 0.903$; $t_{\text{雄虫}} = 0.209$, $df = 67$, $p = 0.835$; $t_{\text{全部}} = 0.233$, $df = 135$, $p = 0.817$)。

褐飞虱的产卵量受到水稻类型和代别的显著影响, 但是没有收到水稻类型和代别互作的显著影响 (表 4.2) 与取食非转基因水稻 Xiushui 11 相比, 取食转基因水稻 KMD2 的褐飞虱第 1 代、第二代和第 4 代的产卵量分别降低了 25.6%, 21.5% 和 29.6%。在每一代中, 取食 KMD2 的褐飞虱的产卵量与取食非转基因水稻 Xiushui 11 相比, 产卵量进行 t 测验分析差异显著 (表 4.2) (第一代: $t = 2.613$, $df = 47.3$, $p = 0.012$; 第二代: $t = 2.254$, $df = 58$, $p = 0.028$; 第四代: $t = 3.172$, $df = 66$, $p = 0.002$)。

4.3.3 褐飞虱田间种群动态

2008 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到水稻种类($F = 93.18, df = 1, 4; p < 0.001$)、取样时间($F = 29.96, df = 8, 32; p < 0.001$)和水稻种类与取样时间互作($F = 2.86, df = 8, 32; p = 0.016$)的影响; 褐飞虱成虫的数量受到取样时间($F = 22.59, df = 8, 32; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 0.37, df = 8, 32; p = 0.574$)和水稻品种与取样时间互作($F = 0.96, df = 1, 4; p = 0.487$)的影响; 成虫和若虫的总数量受到水稻品种($F = 171.84, df = 1, 4; p < 0.001$)、取样时间($F = 45.80, df = 8, 32; p < 0.001$)和水稻品种和取样时间互作($F = 3.26, df = 8, 32; p = 0.008$)的影响。KMD2 和 Xiushui 11 田间褐飞虱成虫数量在 9 个取样时间点的数量没有差异 (Fig 4.1 中部), 而在其中三个取样时间点 (10 月 14 日、10 月 21 日和 10 月 28 日) 褐飞虱若虫在 KMD2 田间的数量要比在 Xiushui 11 田间的数量要显著的降低 (Fig 4.7 中部), 并且褐飞虱成虫和若虫的总数在 KMD2 田间的数量在上述三个时间点要比在 Xiushui 11 田间的数量显著的低 (Fig 4.1 下部)。KMD2 田间的褐飞虱的数量一直在防治指标之下, 而 Xiushui 11 田间的褐飞虱数量在 10 月 14 和 10 月 21 日两个调查时间点是防治指标之上的 (Fig 4.1 下部)。

2009 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到水稻种类($F = 69.52, df = 1, 4; p = 0.001$)、取样时间($F = 138.32, df = 8, 32; p < 0.001$)和水稻种类与取样时间互作($F = 52.72, df = 8, 32; p < 0.001$)的影响; 褐飞虱成虫的数量受到取样时间($F = 11.06, df = 8, 32; p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 0.27, df = 1, 4; p = 0.634$)和水稻品种与取样时间互作($F = 0.29, df = 1, 4; p = 0.964$)的影响; 成虫和若虫的总数量受到水稻品种($F = 50.71, df = 1, 4; p = 0.002$)、取样时间($F = 92.20, df = 8, 32; p < 0.001$)和水稻品种和取样时间互作($F = 33.74, df = 8, 32; p = 0.008$)的影响。KMD2 和 Xiushui 11 田间褐飞虱成虫数量在 9 个取样时间点的数量没有差异 (Fig 4.2 中部), 而在其中四个取样时间点 (9 月 23 日、9 月 30 日、10 月 7 日和 10 月 14 日) 褐飞虱若虫在 KMD2 田间的数量要比在 Xiushui 11 田间的数量要显著的降低了 (Fig 4.2 中部), 并且褐飞虱成虫和若虫的总数在 KMD2 田间的数量在三个调查时间点 (9 月 23

表 4.1 取食 KMD2 和 Xiushui 11 苗期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响

Table 4.2 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on seedling stage of KMD2 and Xiushui 11 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	Bt	13.3±0.12 ab (n = 34)	14.7±0.12 b (*) (n = 32)	14.0±0.12 a (n = 66)	18.8±1.60 a (n = 30)	16.7±1.56 ab (n = 30)	17.8±1.12 ab (n = 60)	238.3±23.61 c (n = 29)
	non-Bt	13.1±0.13 a (n = 35)	14.3±0.08 b (n = 32)	13.6±0.11 a (n = 67)	17.0±0.93 a (n = 31)	17.3±1.03 ab (n = 30)	17.2±0.69 ab (n = 61)	270.6±27.13 bc (n = 29)
	Bt	13.8±0.16 b (n = 37)	14.6±0.16 ab (n = 31)	14.2±0.12 a (n = 68)	16.5±1.50 a (*) (n = 35)	13.5±1.30 b (*) (n = 31)	15.1±1.00 b (*) (n = 66)	304.5±27.84 b (n = 30)
2 nd	non-Bt	13.7±0.21 ab (n = 35)	14.5±0.16 ab (n = 32)	14.0±0.14 a (n = 67)	20.7±1.28 a (n = 32)	18.6±0.85 a (n = 31)	19.7±0.78 a (n = 632)	342.9±15.70 b (n = 30)
	Bt	13.7±0.12 ab (*) (n = 41)	14.9±0.13 ab (*) (n = 41)	14.3±0.11 a (*) (n = 82)	10.2±1.29 a (n = 37)	19.9±1.15 a (n = 38)	20.1±0.86 a (n = 75)	410.0±27.10 ab (*) (n = 37)
	non-Bt	13.2±0.15 ab (n = 41)	14.4±0.17 a (n = 41)	13.8±0.13 a (n = 82)	19.5±1.33 a (n = 35)	18.8±0.84 a (n = 37)	19.1±0.77 a (n = 72)	503.2±34.17 a (n = 34)

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 4.08$, $df = 1, 222$, $p = 0.045$; $F_{\text{generation}} = 6.13$, $df = 2, 222$, $p = 0.003$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.54$, $df = 2, 222$, $p = 0.584$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 9.16$, $df = 1, 208$, $p = 0.003$; $F_{\text{generation}} = 1.28$, $df = 2, 208$, $p = 0.282$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.01$, $df = 2, 208$, $p = 0.368$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 8.70$, $df = 1, 431$, $p = 0.003$; $F_{\text{generation}} = 3.38$, $df = 2, 431$, $p = 0.035$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.98$, $df = 2, 431$, $p = 0.377$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.23$, $df = 1, 199$, $p = 0.630$; $F_{\text{generation}} = 1.07$, $df = 2, 199$, $p = 0.346$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 2.81$, $df = 2, 199$, $p = 0.063$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 2.66$, $df = 1, 196$, $p = 0.105$; $F_{\text{generation}} = 4.75$, $df = 2, 196$, $p = 0.010$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 3.98$, $df = 2, 196$, $p = 0.020$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 1.92$, $df = 1, 396$, $p = 0.167$; $F_{\text{generation}} = 4.30$, $df = 2, 396$, $p = 0.014$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 6.10$, $df = 2, 396$, $p = 0.003$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 6.06$, $df = 1, 188$, $p = 0.015$; $F_{\text{generation}} = 29.79$, $df = 2, 188$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.81$, $df = 2, 188$, $p = 0.448$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between KMD2 and Xiushui 11 according to *t*-test.

注: ^a双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 4.08$, $df = 1, 222$, $p = 0.045$; $F_{\text{代别}} = 6.13$, $df = 2, 222$, $p = 0.003$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.54$, $df = 2, 222$, $p = 0.584$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}} = 9.16$, $df = 1, 208$, $p = 0.003$; $F_{\text{代别}} = 1.28$, $df = 2, 208$, $p = 0.282$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.01$, $df = 2, 208$, $p = 0.368$; 总和, $F_{\text{水稻品种}} = 8.70$, $df = 1, 431$, $p = 0.003$; $F_{\text{代别}} = 3.38$, $df = 2, 431$, $p = 0.035$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.98$, $df = 2, 431$, $p = 0.377$.

^b双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.23$, $df = 1, 199$, $p = 0.630$; $F_{\text{代别}} = 1.07$, $df = 2, 199$, $p = 0.346$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 2.81$, $df = 2, 199$, $p = 0.063$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}} = 2.66$, $df = 1, 196$, $p = 0.105$; $F_{\text{代别}} = 4.75$, $df = 2, 196$, $p = 0.010$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 3.98$, $df = 2, 196$, $p = 0.020$; 总和, $F_{\text{水稻品种}} = 1.92$, $df = 1, 396$, $p = 0.167$; $F_{\text{代别}} = 4.30$, $df = 2, 396$, $p = 0.014$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 6.10$, $df = 2, 396$, $p = 0.003$.

^c双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 6.06$, $df = 1, 188$, $p = 0.015$; $F_{\text{代别}} = 29.79$, $df = 2, 188$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.81$, $df = 2, 188$, $p = 0.448$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 KMD2 和 Xiushui 11 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

表 4.2 取食 KMD2 和 Xiushui 11 成株期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响

Table 4.2 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on adult stage of KMD2 and Xiushui 11 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	Bt	14.0±0.15 a (*) (n = 32)	14.7±0.11 a (*) (n = 34)	14.4±0.10 a (*) (n = 66)	18.8±1.41 a (n = 32)	16.3±1.39 a (n = 34)	17.5±0.99 a (n = 66)	245.7±17.21 c (*) (n = 30)
	non-Bt	12.9±0.13 c (n = 31)	14.0±0.13 cd (n = 31)	13.5±0.12 cd (n = 62)	16.7±0.85 a (n = 31)	17.0±1.80 a (n = 31)	16.2±1.04 a (n = 62)	330.4±27.47 bc (n = 29)
	Bt	13.8±0.14 a (*) (n = 38)	14.5±0.17 abcd (*) (n = 33)	14.1±0.12 ab (*) (n = 70)	16.8±1.50 a (n = 36)	16.1±1.24 a (n = 32)	16.5±0.98 a (*) (n = 68)	277.3±22.61 bc (*) (n = 30)
2 nd	non-Bt	13.4±0.17 bc (n = 32)	14.0±0.13 d (n = 33)	13.8±0.12 bcd (n = 66)	19.2±1.21 a (n = 30)	18.7±0.86 a (n = 32)	18.9±0.75 a (n = 62)	353.3±25.02 ab (n = 30)
	Bt	13.8±0.16 a (n = 37)	14.2±0.15 abcd (n = 41)	13.9±0.10 ab (n = 79)	19.4±1.21 a (n = 38)	18.1±1.06 a (n = 39)	18.8±0.80 a (n = 77)	336.7±26.12 bc (*) (n = 38)
	non-Bt	13.6±0.2 ab (n = 33)	14.0±0.17 bcd (n = 42)	13.6±0.14 d (n = 74)	19.7±1.74 a (n = 30)	18.4±1.17 a (n = 30)	19.1±1.04 a (n = 60)	478.0±37.66 a (n = 30)

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 30.52$, $df = 1, 202$, $p < 0.001$; $F_{\text{generation}} = 2.17$, $df = 2, 202$, $p = 0.117$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 4.31$, $df = 2, 202$, $p = 0.015$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 13.70$, $df = 1, 209$, $p < 0.001$; $F_{\text{generation}} = 1.63$, $df = 2, 209$, $p = 0.198$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 2.07$, $df = 2, 209$, $p = 0.129$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 33.79$, $df = 1, 412$, $p < 0.001$; $F_{\text{generation}} = 1.17$, $df = 2, 412$, $p = 0.311$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 3.22$, $df = 2, 412$, $p = 0.041$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.03$, $df = 1, 196$, $p = 0.870$; $F_{\text{generation}} = 1.13$, $df = 2, 196$, $p = 0.325$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.38$, $df = 2, 196$, $p = 0.253$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 1.64$, $df = 1, 197$, $p = 0.2022$; $F_{\text{generation}} = 0.90$, $df = 2, 197$, $p = 0.409$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.58$, $df = 2, 197$, $p = 0.562$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 0.92$, $df = 1, 394$, $p = 0.338$; $F_{\text{generation}} = 2.02$, $df = 2, 394$, $p = 0.134$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.69$, $df = 2, 394$, $p = 0.186$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 20.97$, $df = 1, 186$, $p < 0.001$; $F_{\text{generation}} = 9.55$, $df = 2, 186$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.90$, $df = 2, 186$, $p = 0.408$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between KMD2 and Xiushui 11 according to *t*-test.

注: ^a 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 30.52$, $df = 1, 202$, $p < 0.001$; $F_{\text{代别}} = 2.17$, $df = 2, 202$, $p = 0.117$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 4.31$, $df = 2, 202$, $p = 0.015$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}} = 13.70$, $df = 1, 209$, $p < 0.001$; $F_{\text{代别}} = 1.63$, $df = 2, 209$, $p = 0.198$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 2.07$, $df = 2, 209$, $p = 0.129$; 总和, $F_{\text{水稻品种}} = 33.79$, $df = 1, 412$, $p < 0.001$; $F_{\text{代别}} = 1.17$, $df = 2, 412$, $p = 0.311$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 3.22$, $df = 2, 412$, $p = 0.041$.

^b 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.03$, $df = 1, 196$, $p = 0.870$; $F_{\text{代别}} = 1.13$, $df = 2, 196$, $p = 0.325$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.38$, $df = 2, 196$, $p = 0.253$; 雌虫, $F_{\text{水稻品种}} = 1.64$, $df = 1, 197$, $p = 0.2022$; $F_{\text{代别}} = 0.90$, $df = 2, 197$, $p = 0.409$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.58$, $df = 2, 197$, $p = 0.562$; 总和, $F_{\text{水稻品种}} = 0.92$, $df = 1, 394$, $p = 0.338$; $F_{\text{代别}} = 2.02$, $df = 2, 394$, $p = 0.134$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.69$, $df = 2, 394$, $p = 0.186$.

^c 双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 20.97$, $df = 1, 186$, $p < 0.001$; $F_{\text{代别}} = 9.55$, $df = 2, 186$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.90$, $df = 2, 186$, $p = 0.408$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 KMD2 和 Xiushui 11 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

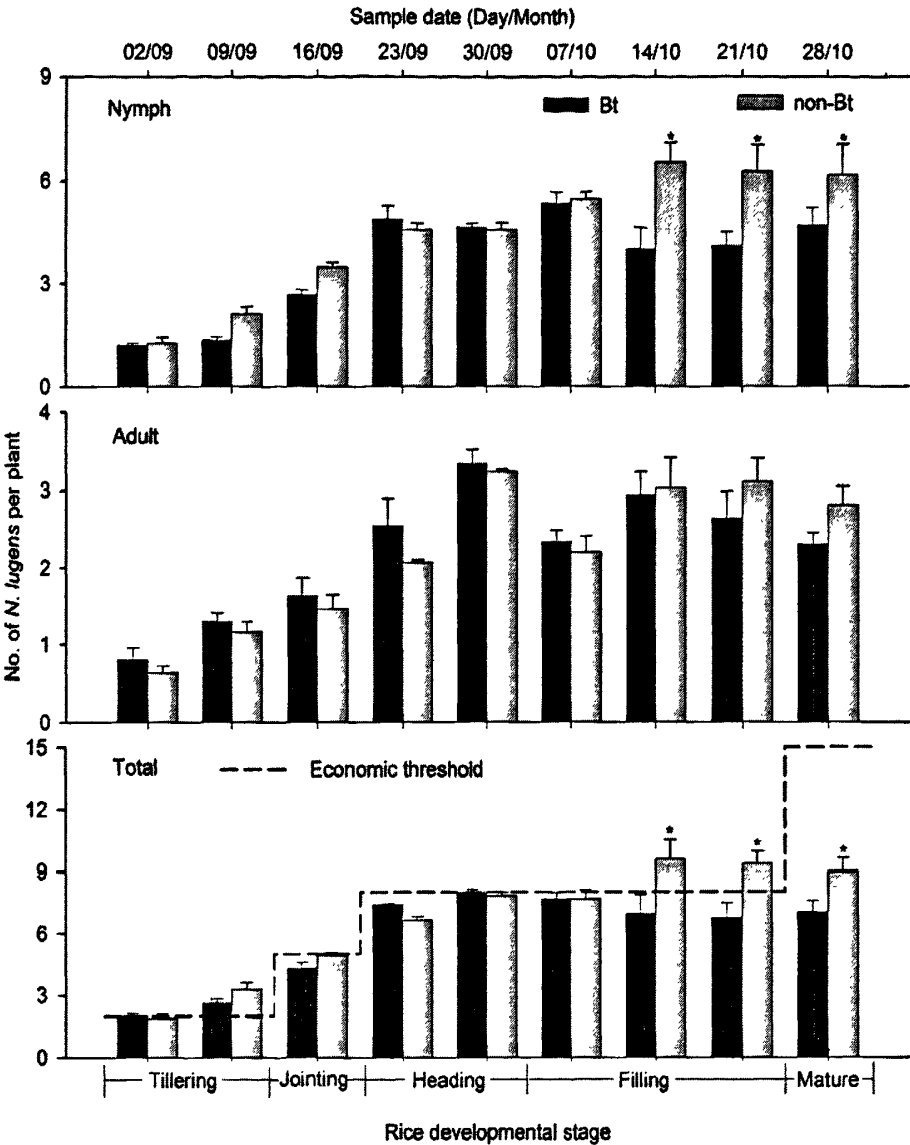


图 4.1: 2008 年褐飞虱田间种群动态

Fig 4.1 The population dynamic of *N. lugens* in KMD2 and Xiushui 11 in field in 2008

日、10 月 7 日和 10 月 14 日) 要比在 Xiushui 11 田间的数量显著的低 (Fig 4.2 下部)。KMD2 和 Xiushui 11 田间的褐飞虱的数量一直在防治指标之下 (Fig 4.2 下部)。

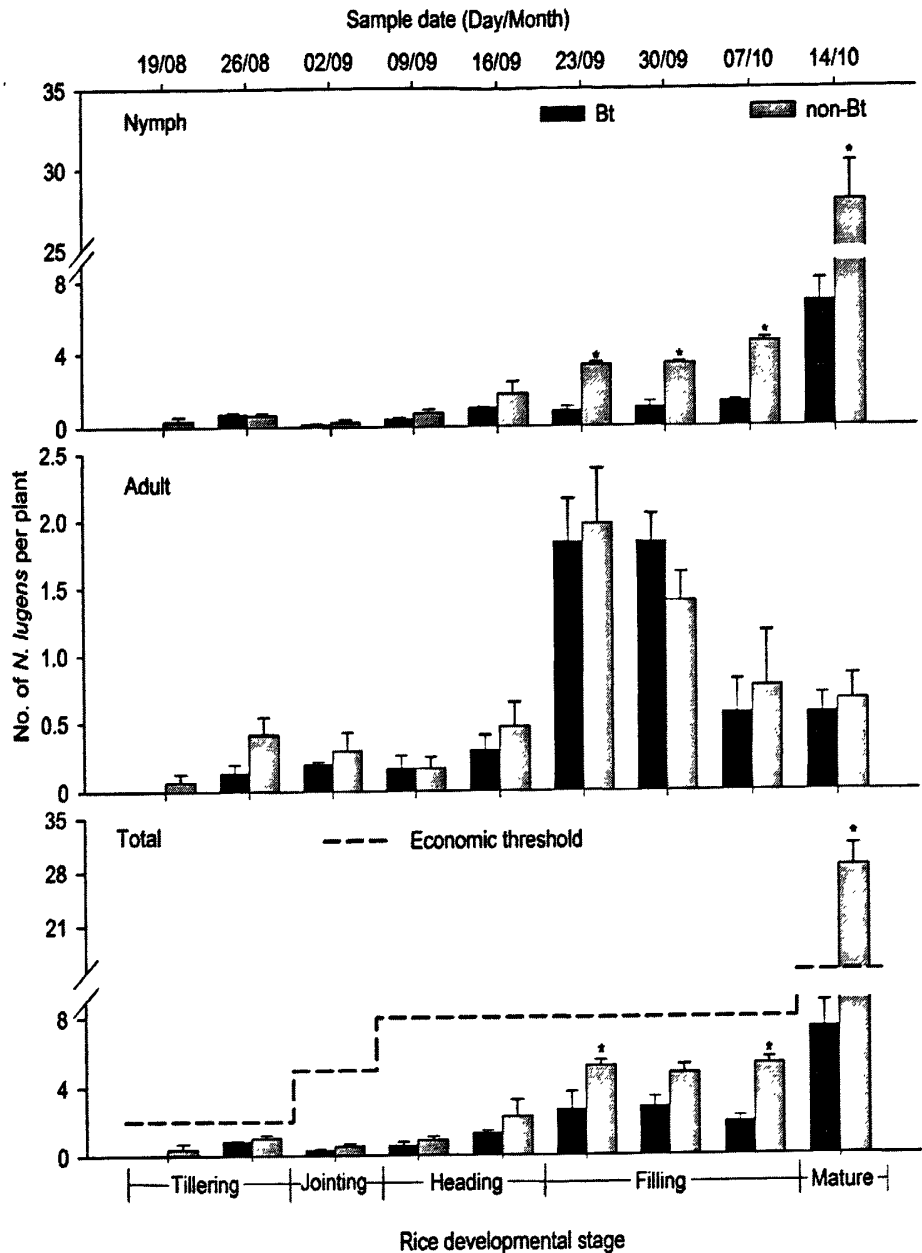


图 4.2: 2009 年褐飞虱田间种群动态

Fig 4.2 The population dynamic of *N. lugens* in KMD2 and Xiushui 11 in field in 2009

4.3.4 水稻田间褐飞虱产卵量调查

从图 4.2 中可以看出, KMD2 田间植株在拔节期、抽穗期、孕穗期和成熟期的分蘖为害率(产卵率会不会合适点)要比 Xiushui 11 田间的显著的降低, KMD2 植株上的卵块数在成熟期要显著的低于 Xiushui 11 上的, 并且 KMD2 植株上的

卵数在抽穗期、孕穗期和成熟期均显著低于对照田间的植株。

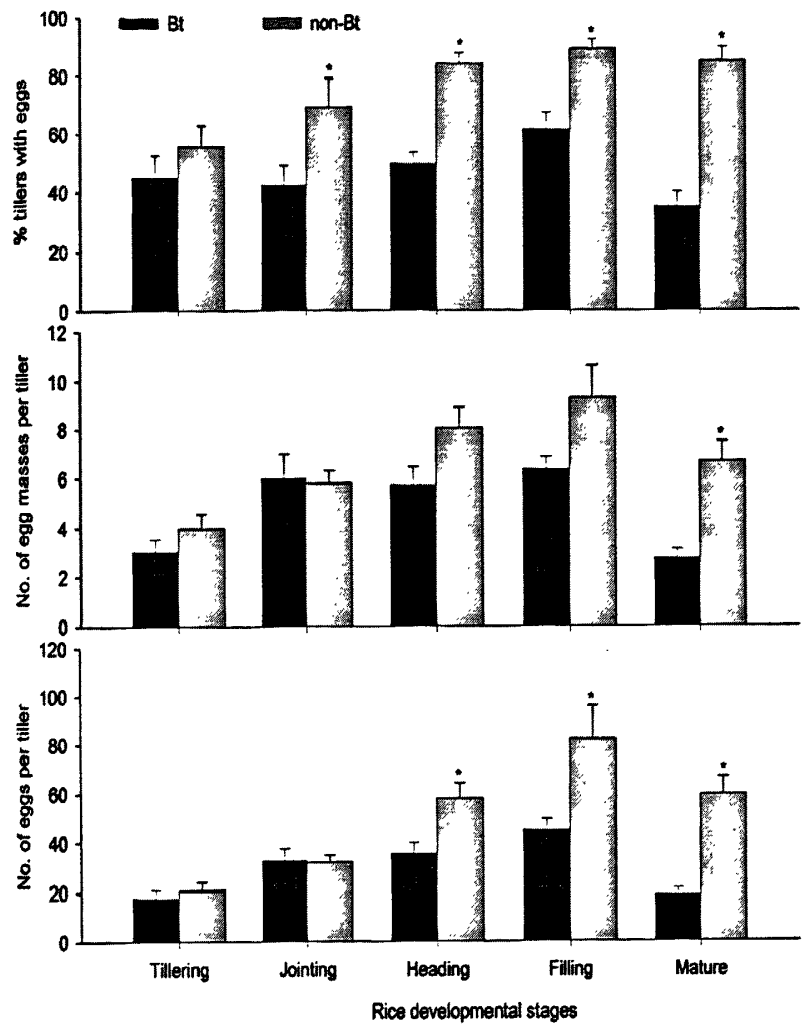


图 4.3: 褐飞虱田间在水稻不同发育时期的产卵量

Fig 4.3 The egg production of *N. lugens* in KMD2 and Xiushui 11 field at differential rice developmental stages

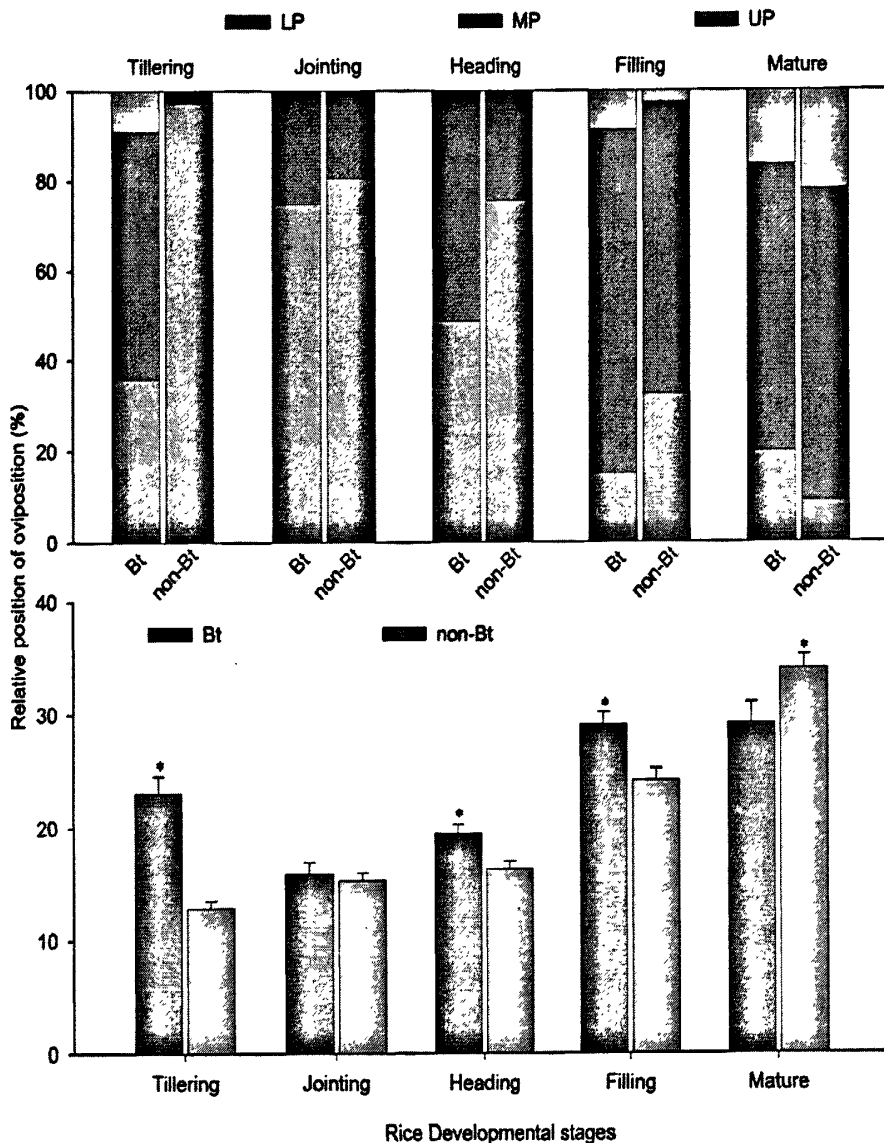


图 4.4: 2009 年褐飞虱田间在水稻不同发育时期的产卵相对位置

Fig 4.4 The relative position of *N. lugens* in KMD2 and Xiushui 11 field at different rice developmental stages

褐飞虱在田间 KMD2 植株上的平均产卵位置大致上随着时间的推移而升高（除了分蘖期），而在 Xiushui 11 植株上的平均产卵位置随着水稻的生长而升高（Fig 4.4 下部）。并且褐飞虱在 KMD2 和 Xiushui 11 上的平均产卵位置存在显著差异。在分蘖期、拔节期、抽穗期和灌浆期，在 KMD2 上褐飞虱卵的位置要比其在 Xiushui 11 上的高，其中分蘖期抽穗期和灌浆期达到显著差异。其中，在各植株上褐飞虱卵在下部（相对高度为 0 - 20.00%）、中部（相对高度为 20.01 - 40.00%）和上部（相对高度为 >40.01%）所占的比例也不尽相同（Fig 4.4 上部）。在 KMD2

下部的褐飞虱的卵在分蘖期、拔节期、抽穗期和灌浆期少于其在 Xiushui 11 上的, 而在 KMD2 上部的卵除了成熟期外, 其比例一直高于 Xiushui 11 上的 (Fig 4.4 上部)。

4.4 小结

本研究表明在实验室条件下, 与其非转基因亲本水稻 Xiushui 11 相比, 转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 的 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱连续四代的若虫的生长发育时间延长和产卵量下降, 并且田间褐飞虱连续两年的调查表明, KMD2 田间的褐飞虱种群数量要少于 Xiushui 11 田间的褐飞虱种群数量。已有研究表明白背飞虱雌成虫在 Xiushui 11、KMD1 和 KMD2 上的产卵前期无显著差异, 但是 KMD2 上的白背飞虱雌成虫寿命显著短于另两个品种上的; KMD1 和 KMD2 上白背飞虱的产卵期显著短于秀水 11 上的(周霞, 2006), 这就表明 KMD2 可能对飞虱类害虫有一定的控制作用。最新的报道也表明, 转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 和 KMD1 与其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 延长了稻蓟马的若虫发育历期并降低了产卵量(Akhtar et al. 2010)。

刺吸式口器昆虫靠吸食植物汁液为生, 与植物之间的关系紧密。已有研究报道 Vip 棉花上的白粉虱的数量比较多一些, 这可能是因为转基因棉花与非转基因棉花的叶片上的绒毛差异所导致的(Whitehouse et al. 2007b)。这就说明稻株叶鞘物理性状的地改变有可能与褐飞虱的生长发育与繁殖有关。本研究发现取食 KMD2 水稻的褐飞虱若虫的生长发育受到轻微的抑制, 就其内因可能与外源基因插入导致的代谢化合物不同所引起。同时, 田间 KMD2 稻株上分蘖期、拔节期、抽穗期、灌浆期和成熟期的含褐飞虱卵分蘖率、褐飞虱卵块数和总卵数都要比其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 田间的要少, 且褐飞虱卵块位置在除了成熟期以外也要比 Xiushui 11 田间稻株上的高一些。褐飞虱具有世代重叠现象, 其若虫发育时间的轻微改变不会导致其种群很大程度的变化, 同时田间褐飞虱成虫的数量在转基因水稻和非转基因田间没有差异, 而若虫数量的变化是导致褐飞虱田间种群数量的重要因素, 这就表明了其产卵量在种群发生重的重要作用。而外源基因的插入可能导致了水稻的物理结构发生改变, 进而导致了褐飞虱产卵位置的变化,

另一方面植物次生代谢物质的改变也可能影响褐飞虱的成虫时期的营养吸收,进而影响其产卵量。

对于转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD 对非靶标害虫褐飞虱的影响是抑制的,而对于其他材料和其他的非靶标害虫的影响应该因时、因地、因种的去逐一评价。

第五章 转纤维素酶基因水稻对褐飞虱生长

发育和繁殖的继代效应评价

如果可以在环境和经济的持续的谨慎评估下,生物能源就有可能成为取代现有的石油为来减少炭的排放量的一个选择(Sticklen 2009)。目前,在温带地区,如果关键的技术问题得到了解决,那么从木质纤维素物质获取生物燃料自然成为了最佳的选择。木质纤维物质原料可以从许多植物或者农作物林业和农业残留物获得(Sticklen 2007),这就为生物能源的来源物质提供了保障。因此,如果解决从纤维物质到酒精的转换成为了关键的技术问题,即在自然条件下,那些能转化为生物燃料的生物质的细胞壁的结构是很复杂的并且不容易降解的,这就意味着如何使那些木质纤维物质原料的细胞壁得到降解成为了关键。木质纤维素生物质的转化当前过程包括预处理即糖化(水解)和发酵(Ragauskas et al. 2006)。改进或者取代上述过程的关键就是提高转化效率并且降低生物燃料生产的成本。显然糖化和水解的费用降低就是生物燃料成本降低的关键。因此纤维素酶法转化木质素物质为可发酵糖类是关键一步,这个过程包括了三种不同的酶:葡聚糖内切酶(endo-1,4-b-glucanase, E.C.3.2.1.4)、葡聚糖外切酶(exo-cellobiohydrolase, E.C.3.2.1.91)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, E.C.3.2.21)(Tomme et al. 1995)。水稻淀粉可以转换葡萄糖糖,葡萄糖可以被通过与适当的酶或酶系统和微生物作用发酵从而转换成乙醇。水稻的叶片、谷壳和秸秆可以通过酶的水解和发酵过程最后转化成酒精。而将纤维素酶基因转入到水稻中可以减少加工环节并降低在加工过程中使用生物酶的成本,这样就有可能得到高效率低成本生物燃料。本文对得到的几种转纤维素酶基因水稻进行了对褐飞虱的生态安全性评价,为转纤维素酶基因水稻是否成为生物能源物质进行初步评估。

5.1 材料与方法

5.1.1 供试水稻

供试转 cellobiohydrolase (纤维二糖酶) 基因水稻为处于 R_1 代的粳稻纯合品系 Z9-1 和 Z9-2。这两个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有 Cellobiohydrolase 基因和水稻泛素(Ubiquitin-1)启动子, 并且含有 GFP 标记基因。供试转 endoglucanase (葡聚糖内切酶) 基因水稻为处于 R_1 代的粳稻纯合品系 Z8-1 和 Z8-4。这两个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有 endoglucanase 基因和水稻泛素(Ubiquitin-1)启动子, 并且含有 GFP 标记基因。供试转纤维素酶结合域(cellulose binding domain) 基因水稻为处于 R_1 代的粳稻纯合品系 CBD-1 和 CBD-3。这两个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有纤维素酶结合域基因和水稻泛素(Ubiquitin-1)启动子, 并且含有 GFP 标记基因。其非转基因亲本品种 Xiushui 11 为对照。供试水稻材料一部分于大试管(R: 3 cm, L: 25 cm)内采用营养液培养(附表 1), 放置于控温控光的智能人工气候箱内培养, 其培养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期(L:D) 14: 10h、光强度 12000~14000 Lux、湿度 $75\pm 5\%$ (下同), 后于 30 日龄三叶期时选择同等粗细大小的稻株供试验用。另一部分播种且移栽于无虫网室内, 成株期不同阶段的稻株供实验用。

5.1.2 供试昆虫

褐飞虱采自杭州田间, 在供试原始代褐飞虱取自本试验室在杂交水稻(中浙优 1 号)上连续饲养的实验种群。放置于控温控光的养虫室内继代饲养, 其中饲养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期(L:D) 14 h: 10 h、光强度 3500~4000 Lux、湿度 $70\pm 5\%$ 。

5.1.3 田间种植和小区设计

Z9-2 及其对照 Xiushui 11 品系的田间试验于 2008 年和 2009 年在浙江省杭州

市 (120.12°E , 30.13°N) 浙江大学试验农场展开。播种时间为 2008 年 7 月 2 日和 2009 年 6 月 18 日, 播种一个月后进行移栽, 每个试验田块被分割成等大 6 个小区, 2 个处理 (即 Z9-2 和非 Xiushui11), 3 个重复, 各小区按随机区组设计。各小区面积约为 $20\text{ m} \times 35\text{ m}$, 小区间均以一条宽约 50 cm 田埂隔开, 整个试验田的四周均种植 5 行非转基因对照水稻为保护行。稻苗单本手工移栽, 试验区内的水肥管理同其它正常水稻, 但整个生长期不用任何农药处理。

5.1.4 水稻苗期对褐飞虱的抗性鉴定

各水稻品种种子播于温室玻璃房的鉴定圃内 ($26.8^{\circ}\text{C} \pm 3.4^{\circ}\text{C}$), 每个鉴定圃 ($60\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 10\text{ cm}$) 设 3 个小区, 每个小区 10 个品种加 2 个对照 (TN1 为感虫对照, IR72 为抗虫对照)。每品种 1 行 10 株苗, 小区随机排列。2 叶 1 心期时平均每苗接入 1~2 龄褐飞虱若虫 8~10 头。当感虫品种 TN1 死苗率达 70% 时, 逐日记载各品种上的死苗数, 至 TN1 全部枯死时评定各品种受害等级 (表 5.1), 对于抗级为 1~5 级的抗性品种, 在 TN1 达 9 级后继续记载稻苗受害等级的变化动态, 参照陶林勇等 (1999) 的方法, 评定品种的持抗期 (durable resistance period) (表 5.2)。

5.1.5 水稻成株期对褐飞虱的抗性鉴定

对苗期筛选出的抗性品种和有望推广的部分苗期感虫品种进一步复筛。把复筛品种播种后移栽在水泥池中, 每品种 1 行 10 株 (行长 50 cm, 行距 10 cm, 株距 5 cm), 重复 3 次, 随机排列, 每隔 10 行种 1 行感虫品种 TN1。40 d 左右苗龄时每丛接当年田间采集繁殖的褐飞虱 2~3 龄若虫 3~4 头, 让其取食繁殖。待 TN1 受害 7 级时开始调查、记录各品种的受害等级, 每隔 3 d 调查 1 次, 根据稻株受害程度评定抗性等级。对于抗级为 1~5 级的抗性品种, 在 TN1 达 9 级后继续观察记载其受害等级的变化动态, 每 3 d 调查 1 次, 至 18 d 止。从 TN1 为 9 级后供试品种的抗级上升至 7~9 级时的前 3 d 止的时期为持抗期 (表 5.2)。

表 5.1 水稻品种抗褐飞虱鉴定评价标准

Table 5.1 Evaluation standard for resistance of varieties to the brownplanthopper.

抗性级别	死苗率	抗性水平
Grade	Dead plant s/ %	Resistance level
0	0.0	免疫 Immune
1	1.0~10.0	高抗 Highly resistant
3	10. 1~30.0	抗虫 Resistant
5	30. 1~50.0	中抗 Moderately resistant
7	50. 1~70.0	中感 Moderately sensitive
9	>70.1	感虫 Sensitive

5.1.6 酶活力测定

取 Z9-2 及其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 30 日龄新鲜叶片在缓冲液（50 mM 的醋酸钠 pH 值 5.5，100 mM 的 NaCl，10% v/v 甘油，0.5 mM 的乙二胺四乙酸，1 mM 的苯甲基磺酰氟，1 mg/l aprotinin 抑肽酶，1 mg/l leupeptin 亮肽素，1 mg/l 抑肽素）中研磨匀浆，每毫克样品加入 2 μl 研磨缓冲液进行充分研磨。15000 g 离心 5 min，取上清。冰浴 30 min 后，15000 g 再次离心 5 min。取上清液稀释适当浓度进行酶活力测定。反应液为 50 mM 醋酸钠 pH 5.5，100 mM NaCl，0.5 mM 4- methylumbelliferyl β -D-cellobioside (MUC) (Sigma)。MUC 被纤维素酶水解后产生 4-methylumbelliferone 为荧光产物。取出 96 孔板，每个孔加入 4 μl 的样品，假如 100 μl 反应液。96 空用保鲜膜覆盖后 65℃ 下孵育 30 min 加入 100 μl 终止液（0.15 M 氨基乙酸）终止反应。荧光信号采用酶标仪 (Bio-Tek, USA) (λ ex 360 nm, λ em 465 nm)进行检测。

5.1.7 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将 Z9-1 和 Xiushui 11 的产卵苗放入大玻璃试管中水培，接入怀卵褐飞虱，用纱布封口，放入智能人工气候箱内培养。三天后，将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后，12 h 初孵若虫用于以下实验。

考察方法同 3.1.7。

表 5.2 水稻品种对褐飞虱持抗期评价标准

Table 5.2 Evaluation standard for durable resistance of rice varieties to the brown planthopper.

级别		苗期	成株期
Grade		Seedling	Adult
无持抗期 (ND)	No durable resistance	0	0
短持抗期 (SD)	Short durable resistance	1~2	1~7
中持抗期 (MD)	Middle durable resistance	5~10	10~13
长持抗期 (LD)	Long durable resistance	≥11	≥16

5.1.8 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

将分蘖期 Z8-4 和 Xiushui 11 苗从无虫网室内移入塑料盆中，罩于聚乙烯薄膜塑料笼罩（直径 15 cm，高 50 cm）内，接入怀卵褐飞虱，用纱布封口，放于养虫间内待褐飞虱产卵。三天后，将产卵后的褐飞虱吸出。待卵孵化后，12 h 初孵若虫用于以下实验。

考察方法同 3.1.8。

5.1.9 褐飞虱田间种群调查

从 2008 年 8 月 19 日到 10 月 9 日和 2009 年 8 月 15 日到 10 月 15 日，每隔 10 天进行田间褐飞虱田间种群数量调查，调查方法同 3.1.9。

5.2 数据统计分析

试验数据用 DPS 系统软件进行方差分析(ANOVA)。苗期水稻和成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的影响采用双因素方差分析并采用 Tukey 测验法进行多重比较。褐飞虱田间种群动态分析采用重复测量方差分析方法。所有显著水平均为 $p = 0.05$ 。

5.3 结果与分析

5.3.1 水稻对褐飞虱的抗性反应

鉴定结果(表 5.3)表明,不论是 Z8-1、Z8-4、Z9-1、Z9-2、CBD-1 或 CBD-3 在苗期和成株期都表现出对褐飞虱的易感性。而其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 相对来说其抗性水平属于短抗中感品种。并且当感虫水稻品 TN1 苗期死亡率达到 70%, Z9-2 的苗死亡率达到 100%, Z8-1 和 Z8-4 的苗死亡率达到 80%, Z9-1、CBD-1 和 CBD-3 的苗死亡率达到 70%。鉴于 Z9-2 对褐飞虱的为害更为敏感一些,以下选取 Z9-2 为代表进行试验。

表 5.3 不同水稻品种苗期和成株期对褐飞虱的抗性比较

Table 5.3 Comparison for resistance of rice varieties at seedling and adult stages to *N. lugens*.

Variety	Seedling stage			Adult stage		
	Resistance	Durable	Durable	Resistance	Durable	Durable
	grade	resistance	resistance	grade	resistance	resistance
		Period / d	level		Period / d	level
IR72	1~3	≥7	MD	3~5	≥10	MD
TN1	9	0	ND	9	0	ND
Xiushui 11	5~7	2	SD	5~7	4	SD
Z8-1	9	0	ND	9	0	ND
Z8-4	9	0	ND	9	0	ND
Z9-1	9	0	ND	9	0	ND
Z9-2	9	0	ND	9	0	ND
CBD-1	9	0	ND	9	0	ND
CBD-3	9	0	ND	9	0	ND

5.3.2 酶活力测定

如图 5.1 所示, Z9-2 体内纤维素酶活性要比 TN1 的高, 并且, 其亲本非转基

因水稻 Xiushui 11 体内的酶活性要比 TN1 低一些。

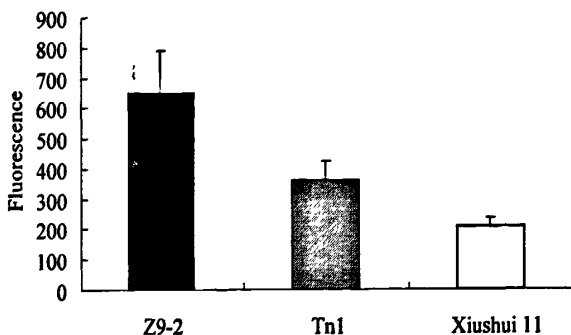


图 5.1 不同水稻品种体内荧光值

Fig 5.1 Fluorence in different rice varieties

5.3.3 苗期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的若虫历期不受水稻类型、代别及水稻类型和水稻类型与代别互作的影响(表 4.5)。与非转基因水稻 Xiushui 11 相比,取食 Z9-2 水稻褐飞虱若虫除了第一代和第二代的雌若虫有显著差异之外,其余的发育时间没有显著差异(表 4.5)。(第一代: $t_{\text{雌虫}} = 0.248, df = 67, p = 0.805$; $t_{\text{雌虫}} = 3.507, df = 44.8, p = 0.001$; $t_{\text{全部}} = 1.952, df = 131, p = 0.053$; 第二代: $t_{\text{雄虫}} = 0.337, df = 70, p = 0.737$; $t_{\text{雌虫}} = 2.53, df = 61, p = 0.014$; $t_{\text{全部}} = 1.824, df = 133, p = 0.070$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.396, df = 69.4, p = 0.694$; $t_{\text{雌虫}} = 0.997, df = 80, p = 0.322$; $t_{\text{全部}} = 0.876, df = 153.2, p = 0.382$)。

褐飞虱成虫的寿命没有受到水稻品种、代别及水稻类别与代别互作的影响,并且用 t 测验对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行比较也没有显著差异(表 4.5)。雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命在 Z9-2 和 Xiushui 11 之间 t 测验没有显著性差异(第一代: $t_{\text{雌虫}} = 0.745, df = 47.1, p = 0.460$; $t_{\text{雌虫}} = 0.241, df = 58, p = 0.810$; $t_{\text{全部}} = 0.395, df = 103.6, p = 0.694$; 第二代: $t_{\text{雌虫}} = 1.674, df = 64, p = 0.099$; $t_{\text{雌虫}} = 0.872, df = 60, p = 0.387$; $t_{\text{全部}} = 1.861, df = 126, p = 0.651$; 第四代: $t_{\text{雌虫}} = 0.800, df = 68, p = 0.4275$; $t_{\text{雌虫}} = 0.444, df = 72, p = 0.659$; $t_{\text{全部}} = 0.905, df = 142, p = 0.367$)。

褐飞虱的产卵量受到代别的显著影响,但是没有受到水稻类型和水稻类型与代别互作的显著影响(4.5)。在每一代中,取食 Z9-2 的褐飞虱的产卵量与取食非转基因水稻 Xiushui 11 相比,第一代的 Z9-2 的产卵量要比其对照 Xiushui 11

的显著增高,第二代和第四代的产卵量进行 t 测验分析差异不显著(表 4.5)(第一代: $t = 2.409, df = 56, p = 0.045$; 第二代: $t = 1.850, df = 48.7, p = 0.071$; 第四代: $t = 0.326, df = 52.8, p = 0.746$)。

5.3.4 成株期水稻对褐飞虱生长发育和繁殖的继代影响

褐飞虱的若虫历期除了雄虫的发育时间受代别的显著影响外,其他都不受水稻类型、代别及水稻类型和水稻类型与代别互作的影响(表 5.6)。与非转基因水稻 Xiushui 11 相比,取食 Z9-2 水稻褐飞虱若虫的发育时间没有显著差异(表 5.6)。

(第一代: $t_{雄虫} = 0.135, df = 61, p = 0.893$; $t_{雌虫} = 0.800, df = 60, p = 0.427$; $t_{全部} = 0.308, df = 123, p = 0.758$; 第二代: $t_{雄虫} = 0.141, df = 63, p = 0.888$; $t_{雌虫} = 0.241, df = 49.2, p = 0.811$; $t_{全部} = 0.231, df = 117.8, p = 0.817$; 第四代: $t_{雄虫} = 0.004, df = 63, p = 0.997$; $t_{雌虫} = 0.941, df = 65.9, p = 0.350$; $t_{全部} = 0.171, df = 139, p = 0.865$ 0.891, $df = 64, p = 0.376$; $t_{雌虫} = 0.516, df = 58.5, p = 0.608$; $t_{全部} = 0.237, df = 132, p = 0.813$)。

褐飞虱成虫的寿命没有受到水稻品种、代别及水稻类别与代别互作的影响,并且用 t 测验对转基因水稻和非转基因水稻之间每代褐飞虱成虫寿命进行比较也没有显著差异(表 5.6)。雄虫寿命、雌虫寿命和全部成虫的寿命除了第一代的雄虫寿命存在显著差异外,其他在 Z9-2 和 Xiushui 11 之间 t 测验没有显著差异(第一代: $t_{雄虫} = 2.303, df = 58, p = 0.025$; $t_{雌虫} = 0.059, df = 59, p = 0.953$; $t_{全部} = 1.533, df = 110.2, p = 0.128$; 第二代: $t_{雄虫} = 0.006, df = 60, p = 0.995$; $t_{雌虫} = 0.112, df = 62, p = 0.911$; $t_{全部} = 0.069, df = 124, p = 0.945$; 第四代: $t_{雄虫} = 0.616, df = 47.1, p = 0.541$; $t_{雌虫} = 1.591, df = 62, p = 0.117$; $t_{全部} = 4.430, df = 101.9, p = 0.156$)。

褐飞虱的产卵量受到代别的显著影响,但是没有受到水稻类型和水稻类型与代别互作的显著影响(5.6)。在每一代中,取食 Z9-2 的褐飞虱的产卵量与取食非转基因水稻 Xiushui 11 相比,第四代的产卵量显著的增加了,而第一代和第四代的产卵量进行 t 测验分析差异不显著(表 5.6)(第一代: $t = 0.613, df = 47.1, p = 0.543$; 第二代: $t = 1.213, df = 58, p = 0.230$; 第四代: $t = 2.193, df = 49, p = 0.033$)。

5.3.5 褐飞虱田间种群动态

2008 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到水稻种类($F = 78.10$, $df = 1, 4$; $p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到取样时间($F = 2.39$, $df = 5, 30$; $p = 0.075$)和水稻种类与取样时间互作($F = 0.61$, $df = 5, 30$; $p = 0.695$)的影响; 褐飞虱成虫的数量受到取样时间($F = 6.40$, $df = 5, 30$; $p = 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 4.15$, $df = 1, 4$; $p = 0.111$)和水稻品种与取样时间互作($F = 2.36$, $df = 5, 30$; $p = 0.077$)的影响; 成虫和若虫的总数量受到水稻品种($F = 53.68$, $df = 1, 4$; $p = 0.002$)和取样时间($F = 5.08$, $df = 5, 20$; $p = 0.004$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种和取样时间互作($F = 1.24$, $df = 5, 30$; $p = 0.327$)的影响。Z9-2 和 Xiushui 11 田间褐飞虱若虫数量在四个取样时间点 (8 月 29 日、9 月 19 日、9 月 29 日和 10 月 9 日) 存在显著差异 (Fig 5.2 上部), 成虫数量在两个取样时间点 (9 月 19 日和 9 月 29 日) 存在显著差异 (Fig 5.2 中部), 并且褐飞虱成虫和若虫的总数在 Z9-2 田间的数量在三个时间点 (9 月 9 日、9 月 19 日和 9 月 29 日) 要显著高于在 Xiushui 11 田间的数量 (Fig 5.2 下部)。

2009 年采用盘拍法对田间褐飞虱种群动态进行了调查, 调查结果表明, 褐飞虱的若虫数量受到取样时间 ($F = 13.64$, $df = 5, 30$; $p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻种类 ($F = 4.83$, $df = 1, 4$; $p = 0.093$)和水稻种类与取样时间互作($F = 1.57$, $df = 5, 30$; $p = 0.213$)的影响; 褐飞虱成虫的数量不受水稻品种($F = 0.28$, $df = 1, 4$; $p = 0.625$)、取样时间($F = 27.82$, $df = 5, 30$; $p < 0.001$)和水稻品种与取样时间互作($F = 0.37$, $df = 5, 30$; $p = 0.866$)的影响; 成虫和若虫的总数量受到取样时间($F = 26.45$, $df = 5, 20$; $p < 0.001$)的显著影响, 但是没有受到水稻品种($F = 3.84$, $df = 1, 4$; $p = 0.122$)和水稻品种和取样时间互作($F = 0.97$, $df = 5, 30$; $p = 0.460$)的影响。Z9-2 和 Xiushui 11 田间褐飞虱若虫数量除了在 9 月 19 日存在显著差异之外, 其余时间点都不存在显著差异 (Fig 5.3 上部), 成虫数量在各个时间点都不存显著差异 (Fig 5.3 中部), 并且褐飞虱成虫和若虫的总数在 Z9-2 田间的数量在 9 月 9 日要显著高于在 Xiushui 11 田间的数量 (Fig 5.3 下部)。

表 5.5 取食 Z9-2 和 Xiushui 11 苗期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响

Table 5.5 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on seedling stage of Z9-2 and Xiushui 11 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	Z9-2	13.0±0.17 a (n = 34)	13.6±0.16 b (n = 32)	13.3±0.12 b (n = 66)	18.4±1.58 a (n = 30)	16.9±1.30 a (n = 30)	17.7±1.02 a (n = 60)	354.8±27.53 c (n = 29)
		13.2±0.16 a (n = 35)	14.3±0.18 ab (n = 32)	13.6±0.11 ab (n = 67)	17.0±0.93 a (n = 31)	17.3±1.03 a (n = 30)	17.2±0.69 a (n = 61)	270.6±27.13 c (n = 29)
	Xiushui 11	13.6±0.17 a (n = 37)	13.9±0.18 ab (n = 31)	13.7±0.12 ab (n = 68)	17.7±1.27 a (n = 34)	17.5±0.98 a (n = 31)	17.6±0.80 a (n = 65)	395.7±23.84 c (n = 29)
		13.7±0.21 a (n = 35)	14.5±0.16 a (n = 32)	14.0±0.14 a (n = 67)	20.7±1.28 a (n = 32)	18.6±0.85 a (n = 31)	19.7±0.78 a (n = 63)	342.9±15.70 c (n = 30)
2 nd	Z9-2	13.1±0.10 a (n = 41)	14.2±0.14 ab (n = 41)	13.7±0.10 ab (n = 82)	20.8±1.09 a (n = 35)	19.4±1.00 a (n = 37)	20.1±0.73 a (n = 72)	516.1±19.61 a (n = 35)
		13.2±0.15 a (n = 41)	14.4±0.17 a (n = 41)	13.8±0.13 ab (n = 82)	19.5±1.33 a (n = 35)	18.8±0.84 a (n = 37)	19.1±0.77 a (n = 67)	503.2±34.17 ab (n = 34)
	Xiushui 11							
4 th	Z9-2							
	Xiushui 11							

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.31$, $df = 1, 222$, $p = 0.576$; $F_{\text{generation}} = 6.43$, $df = 2, 222$, $p = 0.002$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.01$, $df = 2, 222$, $p = 0.995$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 14.69$, $df = 1, 208$, $p < 0.001$; $F_{\text{generation}} = 2.65$, $df = 2, 208$, $p = 0.073$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.18$, $df = 2, 208$, $p = 0.308$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 7.20$, $df = 1, 431$, $p = 0.008$; $F_{\text{generation}} = 4.98$, $df = 2, 431$, $p = 0.007$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.40$, $df = 2, 431$, $p = 0.667$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.01$, $df = 1, 196$, $p = 0.930$; $F_{\text{generation}} = 1.86$, $df = 2, 196$, $p = 0.158$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 2.03$, $df = 2, 196$, $p = 0.134$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 0.15$, $df = 1, 195$, $p = 0.695$; $F_{\text{generation}} = 2.01$, $df = 2, 195$, $p = 0.137$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.38$, $df = 2, 195$, $p = 0.683$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 0.11$, $df = 1, 392$, $p = 0.746$; $F_{\text{generation}} = 3.75$, $df = 2, 392$, $p = 0.024$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 2.10$, $df = 2, 392$, $p = 0.124$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 3.19$, $df = 1, 185$, $p = 0.076$; $F_{\text{generation}} = 34.09$, $df = 2, 185$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.94$, $df = 2, 185$, $p = 0.392$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between Z9-2 and Xiushui 11 according to *t*-test.

注: ^a 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.31$, $df = 1, 222$, $p = 0.576$; $F_{\text{代别}} = 6.43$, $df = 2, 222$, $p = 0.002$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.01$, $df = 2, 222$, $p = 0.995$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 14.69$, $df = 1, 208$, $p < 0.001$; $F_{\text{代别}} = 2.65$, $df = 2, 208$, $p = 0.073$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.18$, $df = 2, 208$, $p = 0.308$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 7.20$, $df = 1, 431$, $p = 0.008$; $F_{\text{代别}} = 4.98$, $df = 2, 431$, $p = 0.007$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.40$, $df = 2, 431$, $p = 0.667$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{水稻品种}} = 0.01$, $df = 1, 196$, $p = 0.930$; $F_{\text{代别}} = 1.86$, $df = 2, 196$, $p = 0.158$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 2.03$, $df = 2, 196$, $p = 0.134$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 0.15$, $df = 1, 195$, $p = 0.695$; $F_{\text{代别}} = 2.01$, $df = 2, 195$, $p = 0.137$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.38$, $df = 2, 195$, $p = 0.683$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 0.11$, $df = 1, 392$, $p = 0.746$; $F_{\text{代别}} = 3.75$, $df = 2, 392$, $p = 0.024$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 2.10$, $df = 2, 392$, $p = 0.124$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{水稻品种}} = 3.19$, $df = 1, 185$, $p = 0.076$; $F_{\text{代别}} = 34.09$, $df = 2, 185$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.94$, $df = 2, 185$, $p = 0.392$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey 多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 Z9-2 和 Xiushui 11 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

表 5.6 取食 Z9-2 和 Xiushui 11 成株期稻株对褐飞虱第 1、2 和 4 代的生物学影响

Table 5.6 Biological parameters of *Nilaparvta lugens* fed on adult stage of Z9-2 and Xiushui 11 rice plants for 1st, 2nd and 4th generation under laboratory conditions

Generation	Genotypes	Nymph developmental duration (day) ^a			Adult longevity (day) ^b			No. of eggs laid by per female ^c
		Male	Female	Total	Male	Female	Total	
1 st	Z9-2	12.9±0.16 a (n = 32)	14.2±0.16 a (n = 31)	13.5±0.14 a (n = 63)	20.1±1.23 a (*) (n = 30)	17.2±1.36 ab (n = 30)	18.6±0.93 a (n = 60)	350.3±17.23 b (n = 29)
		12.8±0.13 a (n = 31)	14.0±0.12 a (n = 31)	13.5±0.12 a (n = 62)	16.6±0.87 a (n = 31)	17.1±1.10 a (n = 31)	16.9±0.70 a (n = 61)	330.4±27.47 b (n = 29)
	Z9-2	13.9±0.23 a (n = 32)	13.9±0.22 a (n = 32)	13.7±0.16 a (n = 64)	19.1±1.15 a (n = 32)	18.5±1.10 ab (n = 32)	18.8±0.79 a (n = 64)	391.9±19.71 b (n = 30)
		13.6±0.20 a (n = 32)	14.0±0.12 a (n = 31)	13.8±0.12 a (n = 64)	29.1±1.26 a (n = 30)	18.7±0.87 ab (n = 32)	18.9±0.75 a (n = 62)	353.3±25.02 b (n = 30)
2 nd	Z9-2	12.9±0.14 a (n = 33)	14.2±0.10 a (n = 34)	13.6±0.12 a (n = 67)	20.9±1.01 a (n = 33)	20.7±0.88 a (n = 34)	20.8±0.67 a (n = 67)	575.0±23.24 a (*) (n = 34)
		13.0±0.17 a (n = 32)	14.0±0.17 a (n = 42)	13.6±0.14 a (n = 74)	19.7±1.74 a (n = 30)	18.5±1.17 ab (n = 30)	19.1±1.04 a (n = 60)	477.9±37.66 a (n = 30)
	Xiushui 11							
4 th	Z9-2							
	Xiushui 11							

Note: ^aTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 0.03$, $df = 1, 192$, $p = 0.871$; $F_{\text{generation}} = 9.19$, $df = 2, 192$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.01$, $df = 2, 192$, $p = 0.992$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 0.54$, $df = 1, 200$, $p = 0.462$; $F_{\text{generation}} = 0.96$, $df = 2, 200$, $p = 0.384$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.37$, $df = 2, 200$, $p = 0.694$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 0.02$, $df = 1, 393$, $p = 0.903$; $F_{\text{generation}} = 2.41$, $df = 2, 393$, $p = 0.151$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.21$, $df = 2, 393$, $p = 0.924$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{rice type}} = 2.41$, $df = 1, 184$, $p = 0.121$; $F_{\text{generation}} = 1.31$, $df = 2, 184$, $p = 0.271$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 1.01$, $df = 2, 184$, $p = 0.366$; for the females, $F_{\text{rice type}} = 0.72$, $df = 1, 188$, $p = 0.398$; $F_{\text{generation}} = 2.53$, $df = 2, 188$, $p = 0.083$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.79$, $df = 2, 188$, $p = 0.458$; for the total, $F_{\text{rice type}} = 3.02$, $df = 1, 379$, $p = 0.083$; $F_{\text{generation}} = 3.64$, $df = 2, 379$, $p = 0.027$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 0.86$, $df = 2, 379$, $p = 0.424$.

^cTwo-factor ANOVA: $F_{\text{rice type}} = 3.18$, $df = 1, 183$, $p = 0.076$; $F_{\text{generation}} = 32.93$, $df = 2, 183$, $p < 0.001$; $F_{\text{rice type} \times \text{generation}} = 2.11$, $df = 2, 183$, $p = 0.125$.

Data are represented as means $\pm$ SEM. Values followed by different lowercase letters within the same column differ significantly according to two-factor ANOVA and Tukey's multiple-range test. Within the same column, the symbols in the parentheses indicate significant differences in the same parameter for the same generation between Z9-2 and Xiushui 11 according to *t*-test.

注: ^a 双因素方差分析: 雄虫, $F_{\text{水稻品种}} = 0.03$, $df = 1, 192$, $p = 0.871$; $F_{\text{代别}} = 9.19$, $df = 2, 192$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.01$, $df = 2, 192$, $p = 0.992$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 0.54$, $df = 1, 200$, $p = 0.462$; $F_{\text{代别}} = 0.96$, $df = 2, 200$, $p = 0.384$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.37$, $df = 2, 200$, $p = 0.694$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 0.02$, $df = 1, 393$, $p = 0.903$; $F_{\text{代别}} = 2.41$, $df = 2, 393$, $p = 0.151$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.21$, $df = 2, 393$, $p = 0.924$.

^bTwo-factor ANOVA: for the males, $F_{\text{水稻品种}} = 2.41$, $df = 1, 184$, $p = 0.121$; $F_{\text{代别}} = 1.31$, $df = 2, 184$, $p = 0.271$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 1.01$, $df = 2, 184$, $p = 0.366$; for the females, $F_{\text{水稻品种}} = 0.72$, $df = 1, 188$, $p = 0.398$; $F_{\text{代别}} = 2.53$, $df = 2, 188$, $p = 0.083$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.79$, $df = 2, 188$, $p = 0.458$; for the total, $F_{\text{水稻品种}} = 3.02$, $df = 1, 379$, $p = 0.083$; $F_{\text{代别}} = 3.64$, $df = 2, 379$, $p = 0.027$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 0.86$, $df = 2, 379$, $p = 0.424$.

^c 双因素方差分析: $F_{\text{水稻品种}} = 3.18$, $df = 1, 183$, $p = 0.076$; $F_{\text{代别}} = 32.93$, $df = 2, 183$, $p < 0.001$; $F_{\text{水稻品种} \times \text{代别}} = 2.11$, $df = 2, 183$, $p = 0.125$.

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。Tukey多重比较测验双因素方差分析表明, 同列中不同小写字母的数据间差异分别达显著。在同一列中, *代表了 Z9-2 和 Xiushui 11 相同代别相同生物学参数之间 进行 *t* 测验分析差异达显著水平。

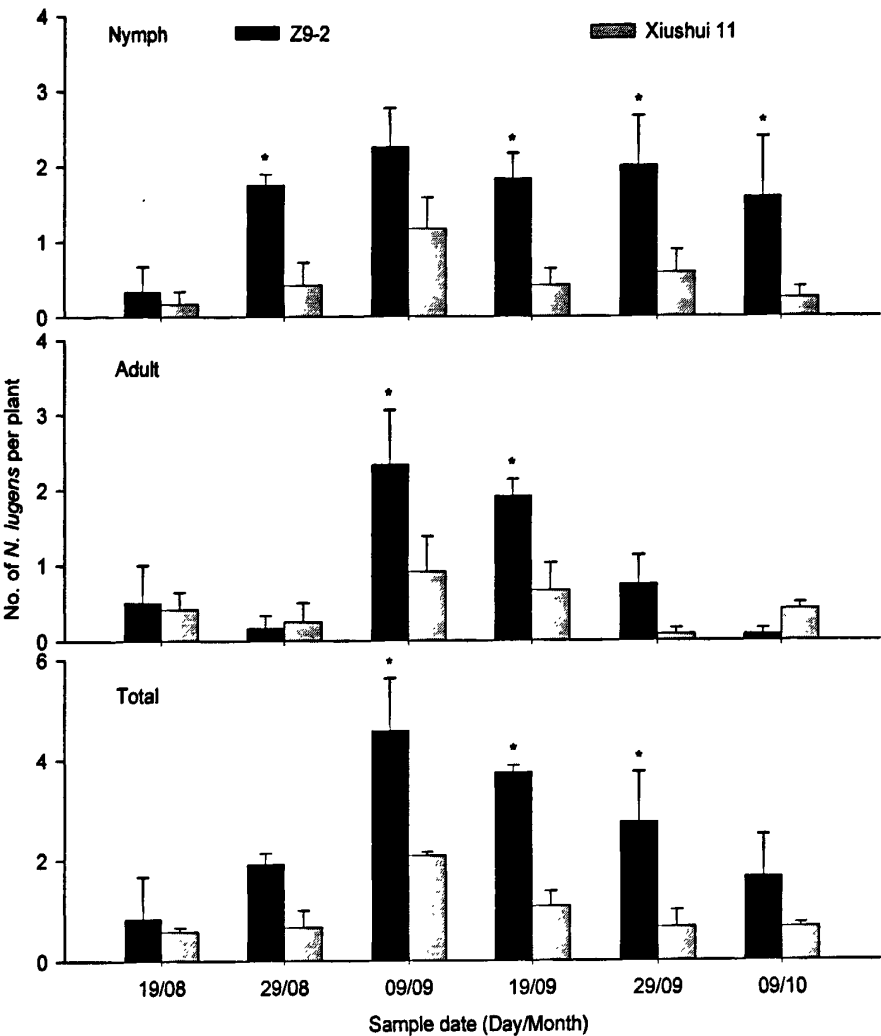


图 5.2 2008 年褐飞虱田间种群动态

Fig 5.2 The population dynamic of *N. lugens* in Z9-2 and Xiushui 11 in field in 2008

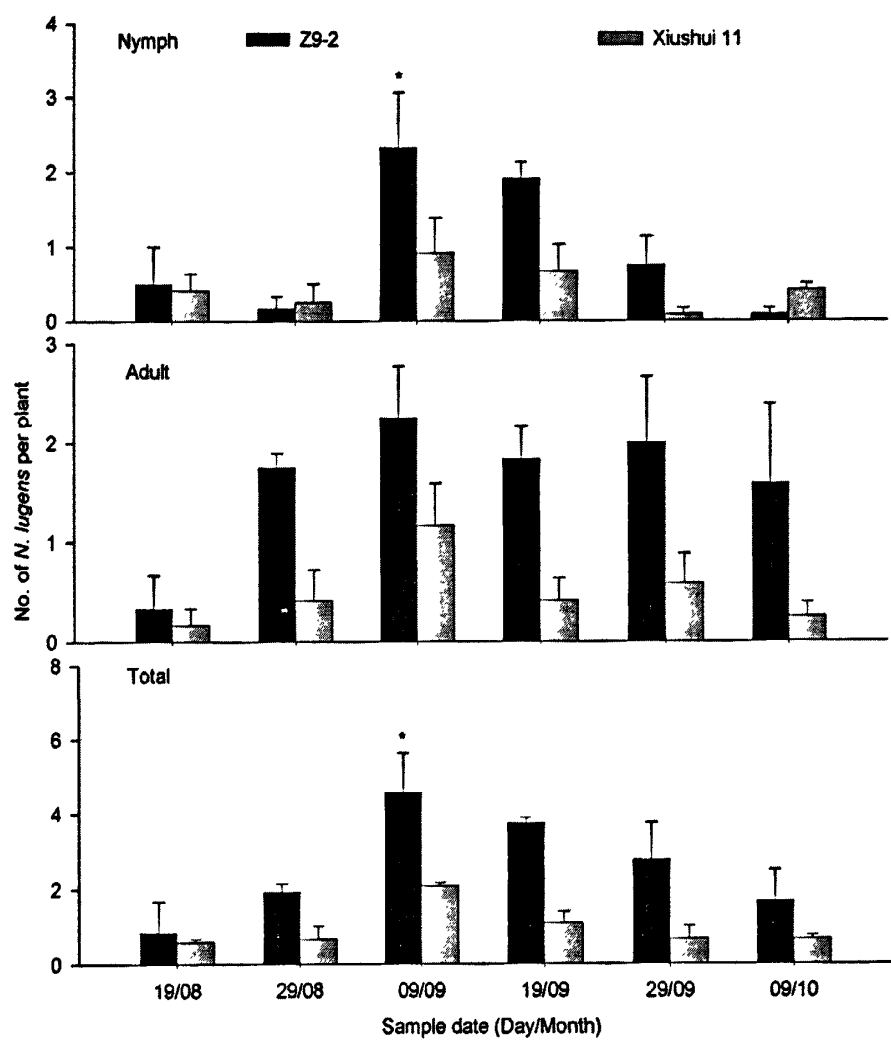


图 5.3 2009 年褐飞虱田间种群动态

Fig 5.3 The population dynamic of *N. lugens* in Z9-2 and Xiushui 11 in field in 2009

5.4 小结

本研究表明在实验室条件下，与其非转基因亲本水稻 Xiushui 11 相比，转纤维素酶基因水稻 Z9-2 的 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱连续四代的若虫的生长发育时间基本没有影响，但是产卵量有所上升，并且在第四时有显著差异。田间褐飞虱连续两年的调查表明，Z9-2 田间的褐飞虱种群数量要多于 Xiushui 11 田间的褐飞虱种群数量。

目前, 大部分的研究都集中在对转纤维素酶基因的植物的获得上。如: 已经成功获得在玉米内表达 *Acidothormus cellulolyticus* 内切纤维素酶素 E1, 这个导入的外源酶的靶标是植物叶片和秸秆内两个亚细胞单元: 内质网和茎线粒体, 并且, 这个玉米生产中的异源纤维素酶转化为可发酵糖生物燃料获得成功使用(Mei et al. 2009), 但就其生态风险的评估还未开始进行, 本文的研究结果表明转纤维素酶基因水稻 (Z8-1、Z8-4、Z9-1、Z9-2、CBD-1 和 CBD-3) 的苗期鉴定结果都表明他们要比公认的对褐飞虱敏感的水稻 TN1 还要敏感, 并且田间调查数据表明, 与其亲本转基因水稻相比, 转纤维素酶基因水稻田中的褐飞虱的数量始终要较高一些。本文第三章中转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 的褐飞虱生长发育与生殖的继代效应评价表明, KMD2 抑制了褐飞虱种群数量的增加, 而第四章中转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻对褐飞虱的生长发育与繁殖没有显著的影响。已有研究表明转基因棉花的种植伴随着化学农药的使用量有所降低, 使得一些刺吸式口器害虫的数量有所增加(Whitehouse et al. 2007a, Lu et al. 2008)。Vip 棉花上的白粉虱的数量比较多一些, 这可能是因为转基因棉花与非转基因棉花的叶片上的绒毛差异所导致的(Whitehouse et al. 2007b)。

Kaida 等人通过在南洋合欢细胞壁表达白杨纤维素酶对南洋合欢进行了改造, 南洋合欢内纤维素含量没有减少, 但造成了葡聚糖绑定到细胞壁的减少, 与野生型南洋合欢相比, 转基因南洋合欢中的糖化水平和酒精的产量都增加了(Kaida et al. 2009)。而过表达白杨纤维素酶的李子合欢的茎干的长度和宽度都有所增加, 并且叶片也变大。本文中表明转取食纤维素酶基因的褐飞虱的产卵量有所增加, 这就有可能是因为纤维素酶的导入一方面导致了水稻体内糖基化水平的提高, 这就可能增加了水稻体内的糖类化合物水平有利于褐飞虱的生长发育, 另一方面, 也可能是因为纤维素酶基因的导入使水稻茎干的组织发生变化从而更适合褐飞虱取食和产卵。褐飞虱靠吸取植物韧皮部筛管内植物汁液为食物来源, 不同的转基因材料对不同的或是相同的非靶标的生物的影响不尽相同, 因此对生态安全性的研究多数是在进行具体案件具体分析。因此, 不同转基因水稻品种与其亲本非转基因亲本水稻之间对褐飞虱的差异反应需要去逐一深入研究。

第六章 转 *cry1Ab* 水稻与亲本水稻及其褐

飞虱诱导后基因表达谱分析

Bt杀虫毒蛋白的发现及其应用有效地控制了鳞翅目昆虫的为害,减少了农业生产的损失。转 Bt 基因作物仍是世界和中国的第一种大规模种植的转基因作物,自一些转Bt基因作物开始商业化种植以来,转基因生物的生态风险问题如非靶标效应(Andow and Hilbeck 2004)等,就开始引起人们的关注,至今仍是关于转基因生物争论的焦点之一。经过基因修饰的作物对非靶标生物也有一定的影响。如种子休眠期的改变、种子萌发率的提高、对有害生物和逆境的耐受性以及作物具有的生长优势等。外源基因的插入可能会引起植物本身的物化性质的改变,究其根源,可能是基因表达谱差异所导致的转基因作物与其亲本非转基因作物之间的差异。这种表达基因的差异是千差万别的,传统的方法很难进行全面的分析。相对于目前用于检测基因表达水平的几种方法,如RT-PCR、Northern、mRNA差异显示等,基因表达谱芯片可通过平行检测众多基因表达模式进行功能分析,有助于全面了解植物在特殊处理、环境因子影响、发育阶段、病原菌感染何昆虫攻击后等条件下较为完整的基因表达情况。通过与样本对照,分析与特定事件相关的基因,进而确定相应基因的功能或多个基因间的协同作用。本章以转*cry1Ab*基因粳稻KMD2以及其亲本非转基因水稻Xiushui 11为材料,褐飞虱取食诱导后,采用基因芯片方法对上述材料进行了基因表达谱差异进行了初步的分析,以初步明确KMD2与其亲本非转基因水稻Xiushui 11之间本身固有的差异,以及对褐飞虱取食转基因水稻与其亲本产生的差异进行了初步的分析。

6.1 试验材料

6.1.1 供试水稻

供试转 *cry1Ab* 水稻为处于 R_{16} 代的粳稻纯合品系 KMD2。这个品系源于独立的 R_0 代转化株, 含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子, 其非转基因亲本品种 Xiushui 11 为对照。供试水稻材料一部分于大试管(R:3 cm, L:25 cm)内采用营养液培养(附表 I), 放置于控温控光的智能人工气候箱内培养, 其培养条件为: 温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期 (L: D) 14: 10 h、光强度 12000~14000 Lux、湿度 $75 \pm 5\%$ (下同), 并于 30 日龄三叶期时选择同等粗细大小的稻株进行 RNA 抽提。

6.1.2 供试昆虫

同 5.1.2。

6.1.3 水稻处理

水稻用自来水冲洗干净, 随机分成两组, 处理组和对照组。处理组每株水稻接 10 头 2-3 龄褐飞虱若虫, 72 h 取整株水稻, 以未处理水稻苗为对照组, 迅速除去褐飞虱若虫后, 将所取稻株液氮冷冻后, 置 -80°C 冰箱保存, 每组重复取 3 株水稻。

6.1.4 水稻总 RNA 的提取

A、水稻总 RNA 采用 Trizol 法提取, Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。

B、水稻组织在液氮中研磨, 取 100-150 mg 水稻组织粉末, 加入 1 ml Trizol, 充分混匀、室温放置 5 min, 使其充分裂解

C、12000g, 4°C 离心 10 min

D、弃沉淀, 转移上清液入新管, 加入 200 μl 氯仿, 用手振荡混匀, 室温放置 15 min

E、12000g, 4℃离心 15 min

F、上层水相转入 DEPC 处理过的离心管, 加入 500 μ l 异丙醇, 室温放置 10-30 min

G、12000g, 4℃离心 15min, 弃上清, RNA 沉于管底

H、加入 1ml 75%乙醇洗涤, 温和振荡, 悬浮沉淀, 7500g, 4℃离心 5 min

I、倒去乙醇, 留沉淀。将离心管倒放在纸上, 室温干燥 5-10 min

J、用 30-50 μ l DEPC 处理水溶液样品, 在 55-60℃温浴 5-10 min

K、12000g, 4℃离心 5 min, 若发现有沉淀, 则将上清液转入新离心管

6.1.5 基因芯片

本实验采用美国 Affymetrix 公司水稻全基因组 57 K GeneChip® Rice Genome Array。该芯片含有超过 59,000 个基因杂交探针, 几乎包含了水稻所有编码基因。由博奥公司进行检测和数据分析工作。

6.2 结果与分析

6.2.1 总基因变化幅度

6.2.1.1 KMD2 与 Xiushui 11 总基因变化幅度

转 *cry1Ab* 基因水稻 KMD2 与其亲本非转基因水稻相比, 有 324 个基因探针的 mRNA 水平发生了变化, 其中表达水平变化在 2-4 倍为 214 个, 占差异表达基因的 59.27%, 即大部分差异表达基因 mRNA 含量变化增加或降低了 2-4 倍; 基因表达变化在 4-8 倍的有 51 个, 占差异表达基因的 15.74%; 变化在 8 倍以上的基因共有 59, 占差异基因总数的 18.21%。324 差异基因中, 表达量上调的水稻基因有 177 个, 占差异基因总数的 54.63%; 下调的探针数量为 147 个, 占差异表达基因的 45.37% (表 6.1)。

表 6.1 与 Xiushui 11 相比 KMD2 基因变化幅度统计

Table 6.1 Compared with Xiushui 11, the number of KMD2 genes with different change levels

Log ratio	Up-regulated	Down-regulated	Total
1-2	110	104	214
2-3	34	17	51
3-4	13	12	25
4-5	10	7	17
5~	10	7	17
Total	177	147	324

注: Log ratio: KMD2 芯片探针信号值与对照 Xiushui 11 芯片该探针信号值的比值取以 2 为底的对数值, 即为上调或下调倍数的对数值; Up-regulated: 表达量上升的基因; Down-regulated: 表达量下调的基因。

6.2.1.2 褐飞虱诱导后 Xiushui 11 总基因变化幅度

褐飞虱诱导后的 Xiushui11 有 3834 个基因探针的 mRNA 水平发生了变化, 其中表达水平变化在 2-4 倍为 2772 个, 占差异表达基因的 72.30%, 即大部分差异表达基因 mRNA 含量变化增加或降低了 2-4 倍; 基因表达变化在 4-8 倍的有 692 个, 占差异表达基因的 18.05%; 变化在 8 倍以上的基因共有 370, 占差异基因总数的 9.65%。3834 差异基因中, 表达量上调的水稻基因有 1534 个, 占差异基因总数的 40.01%; 下调的探针数量为 2300 个, 占差异表达基因的 59.99%(表 6.2)。

表 6.2 褐飞虱取食诱导的 Xiushui 11 基因变化幅度统计

Table 6.2 The number of BPH regulated genes of Xiushui 11 with different change levels

Log ratio	Up-regulated	Down-regulated	Total
1-2	1216	1556	2772
2-3	234	458	692
3-4	63	168	231
4-5	18	73	91
5~	3	45	48
Total	1534	2300	3834

注: Log ratio: 褐飞虱取食处理的 Xiushui 11 芯片探针信号值与对照 Xiushui 11 芯片该探针信号值的比值取以 2 为底的对数值, 即为上调或下调倍数的对数值; Up-regulated: 表达量上升的基因; Down-regulated: 表达量下调的基因。

6.2.1.3 褐飞虱诱导后 KMD2 总基因变化幅度

褐飞虱诱导后的KMD2有3273个基因探针的mRNA 水平发生了变化,其中表达水平变化在2-4 倍为2435个,占差异表达基因的74.40%,即大部分差异表达基因mRNA 含量变化增加或降低了2-4 倍;基因表达变化在4-8 倍的有556个,占差异表达基因的16.98%;变化在8 倍以上的基因共有282,占差异基因总数的8.62%。3273 差异基因中,表达量上调的水稻基因有1269个,占差异基因总数的38.77%;下调的探针数量为2004个,占差异表达基因的61.23%(表6.3)。

表 6.3 褐飞虱取食诱导的KMD2基因变化幅度统计

Table 6.3 The number of BPH regulated genes of KMD2 with different change levels

Log ratio	Up-regulated	Down-regulated	Total
1-2	1064	1371	2435
2-3	164	392	556
3-4	33	136	169
4-5	7	78	85
5~	1	27	28
Total	1269	2004	3273

注: Log ratio: 褐飞虱取食处理的KMD2芯片探针信号值与对照Xiushui 11芯片该探针信号值的比值取以2为底的对数值,即为上调或下调倍数的对数值; Up-regulated: 表达量上升的基因; Down-regulated: 表达量下调的基因。

6.2.1.4 褐飞虱诱导后 KMD2 与 Xiushui 11 相比总基因变化幅度

褐飞虱诱导后的 KMD2 与褐飞虱诱导后的 Xiushui11 相比,有 317 个基因探针的 mRNA 水平发生了变化,其中表达水平变化在 2-4 倍为 200 个,占差异表达基因的63.09%,即大部分差异表达基因mRNA 含量变化增加或降低了2-4 倍;基因表达变化在 4-8 倍的有 50 个,占差异表达基因的 15.77%;变化在 8 倍以上的基因共有 67,占差异基因总数的 21.14%。317 差异基因中,表达量上调的水稻基因有 124 个,占差异基因总数的 39.12%;下调的探针数量为 193 个,占差异表达基因的 60.88%(表 6.4)。

表 6.4 褐飞虱取食诱导KMD2水稻与其亲本Xiushui 11相比基因变化幅度统计

Table 6.4 Compared Xiushui 11, the number of BPH regulated genes of KMD2 with different change levels

Log ratio	Up-regulated	Down-regulated	Total
1-2	66	134	200
2-3	23	27	50
3-4	13	13	26
4-5	12	7	19
5~	10	12	22
Total	124	193	317

注: Log ratio: 褐飞虱取食处理的 KMD2 芯片探针信号值与褐飞虱取食处理后对照 Xiushui 11 芯片该探针信号值的比值取以 2 为底的对数值, 即为上调或下调倍数的对数值; Up-regulated: 表达量上升的基因; Down-regulated: 表达量下调的基因。

6.2.3 KEGG Pathway 分析

6.2.3.1 KMD2 与 Xiushui 11 差异基因 KEGG pathway 分析

利用在线博奥生物分子功能注释系统 (CB-MAS) 对 KMD2 与 Xiushui 11 之间表达的差异基因进行了 KEGG Pathway 分析, 发现, 一共有 18 条通路存在差异 (表 6.5)。其中, 最可能相关的 5 条通路为: 苜降解途径、 γ - 六氯环己烷降解途径、柠檬烯和蒎烯降解途径、维生素 C 代谢途径和细胞色素 P450 与异源物质代谢 (表 6.5)。

KMD2 与 Xiushui 11 相比, 其基因在 18 条途径中, 有一些途径是都上调的, 例如: 细胞色素 P450 与异源物质代谢、1、2-甲基萘降解、胆汁酸合成、泛酸生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸合成和讲解、甘油脂代谢、脂肪酸代谢、蛋白质转运、酪氨酸代谢、苯基丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成、糖酵解/糖异生和核糖体途径; 并且有几条途径是既有上调的基因, 又有下调的基因, 如: 苜降解、 γ - 六氯环己烷降解、柠檬烯和蒎烯降解、维生素 C 代谢和苯丙烷合成途径; 但是不存在只有下调基因的途径 (表 6.5)。

6.2.3.2 褐飞虱诱导后 KMD2 与 Xiushui 11 差异基因 KEGG pathway 分析

利用在线博奥生物分子功能注释系统 (CB-MAS) 对褐飞虱诱导后的 KMD2 与 Xiushui 11 之间表达的差异基因进行了 KEGG Pathway 分析, 发现, 一共有 31 条通路存在差异 (表 6.6)。其中, 最可能相关的 5 条通路为: 苯丙烷合成、甲烷代谢、苯基丙氨酸代谢、链霉素合成和细胞色素 P450 与异源物质代谢 (表 6.6)。

KMD2 与 Xiushui 11 相比, 其基因在 18 条途径中, 有一些途径是都上调的, 例如: 链霉素代谢、泛酸生物合成、氮素代谢、尿素循环和氨基代谢、甘油脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、芬降解、磷酸戊糖途径、精氨酸和脯氨酸代谢、 γ -六氯环己烷降解、柠檬烯和蒎烯降解、谷氨酸脂代谢、维生素 C 代谢和淀粉蔗糖代谢; 有几条途径是既有上调的基因, 又有下调的基因, 如: 苯丙烷合成、甲烷代谢、苯基丙氨酸代谢和糖酵解/糖异生途径; 只有下调基因的途径包括: 细胞色素 P450 与异源物质代谢、1、2-甲基奈降解、胆汁酸合成、叶酸和成、甘油脂代谢、脂肪酸代谢、酪氨酸代谢、蛋白酶体、嘧啶和嘌呤代谢 (表 6.6)。

表 6.5 KMD2 与 Xiushui 11 差异基因 KEGG Pathway 分类

Table 6.5 Classification differential genes between KMD2 and Xiushui 11 by KEGG Pathway analysis

KEGG Pathway	No. of genes located in various Pathways	No. of up regulated genes	P value
Fluorene degradation	2	1	0.016
gamma-Hexachlorocyclohexane degradation	2	1	0.025
Limonene and pinene degradation	2	1	0.027
Ascorbate and aldarate metabolism	2	1	0.034
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	1	0.066
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	1	1	0.074
Bile acid biosynthesis	1	1	0.082
Phenylpropanoid biosynthesis	2	1	0.085
Pantothenate and CoA biosynthesis	2	2	0.109
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2	2	0.149
Glycerolipid metabolism	1	1	0.167
Fatty acid metabolism	1	1	0.171
Protein export	1	1	0.171
Tyrosine metabolism	1	1	0.178
Valine, leucine and isoleucine degradation	2	2	0.178

KEGG Pathway	No. of genes located in various Pathways	No. of up regulated genes	P value
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	2	2	0.192
Glycolysis / Gluconeogenesis	1	1	0.358
Ribosome	2	2	0.784

表6.6 褐飞虱诱导后KMD2与Xiushui 11相比其差异基因KEGG Pathway分类

Table 6.6 Classification differential genes between KMD2 and Xiushui 11 induced by BPH by KEGG Pathway analysis

KEGG Pathway	No. of genes located in various Pathways	No. of up regulated genes	P value
Phenylpropanoid biosynthesis	3	2	0.012
Methane metabolism	2	1	0.021
Phenylalanine metabolism	2	1	0.028
Streptomycin biosynthesis	1	1	0.053
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1	0	0.065
Glycolysis / Gluconeogenesis	2	1	0.071
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	1	0	0.073
Riboflavin metabolism	1	1	0.073
Bile acid biosynthesis	1	0	0.080
Folate biosynthesis	1	0	0.099
Pantothenate and CoA biosynthesis	1	1	0.107
Nitrogen metabolism	1	1	0.140
Urea cycle and metabolism of amino groups	1	1	0.140
Galactose metabolism	1	1	0.144
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1	1	0.148
Glycerolipid metabolism	1	0	0.165
Protein export	1	1	0.168
Fatty acid metabolism	1	0	0.168
Valine, leucine and isoleucine degradation	1	1	0.175
Fluorene degradation	1	1	0.175
Tyrosine metabolism	1	0	0.175

KEGG Pathway	No. of genes located in various Pathways	No. of up regulated genes	P value
Pentose phosphate pathway	1	1	0.182
Arginine and proline metabolism	1	1	0.209
gamma-Hexachlorocyclohexane degradation	1	1	0.216
Limonene and pinene degradation	1	1	0.222
Glutamate metabolism	1	1	0.229
Ascorbate and aldarate metabolism	1	1	0.250
Proteasome	1	0	0.254
Starch and sucrose metabolism	1	1	0.340
Pyrimidine metabolism	1	0	0.395
Purine metabolism	1	0	0.444

6.2.4 Go Ontology 分析

6.2.4.1 KMD2 与 Xiushui 11 差异基因 Go Ontology 分析

利用博奥生物分子功能注释系统 (CB-MAS) 对KMD2与Xiushui 11之间表达的差异基因进行了Go Ontology的分子功能 (molecular funciton) 和生物过程 (biological process)分析。KMD2与Xiushui 11之间差异表达基因与受体活性、转录因子活性、丝氨酸型内肽酶抑制因子活性、羧基裂合酶活性和水解酶活性等18项分子功能密切相关 (表6.7)。在39个生物过程中存在差异, 最相关的5个生物过程是: 氨基酸及其衍生物的代谢、类脂化合物代谢、光合作用、次生代谢和内源性胁迫反映 (表6.8)。Go Ontology的分子功能、生物过程和细胞组分各部分所占比例见图6.1。

表6. 7 KMD2与Xiushui 11之间差异基因的分子功能分类

Table 6.7 Molecular Function categories of differential genes between KMD2 and Xiushui 11

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Receptor activity	5	4	0.074
Transcription factor activity	15	6	0.082
Serine-type endopeptidase inhibitor activity	1	1	0.091

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Carboxy-lyase activity	1	1	0.096
Hydrolase activity	13	8	0.109
sugar porter activity	1	1	0.153
GTP binding	1	1	0.210
protein binding	12	8	0.304
translation factor activity, nucleic acid binding	1	1	0.331
Transporter activity	9	7	
RNA binding	2	2	0.602
Lipid binding	1	0	0.646
nucleotide binding	11	7	0.692
kinase activity	7	5	0.805
catalytic activity	33	22	0.875
structural molecule activity	3	2	0.879
transferase activity	11	4	0.917
signal transducer activity	1	1	0.983
DNA binding	6	2	0.986
binding	19	12	1.000
nucleic acid binding	4	3	1.000
Molecular-function	7	3	1.000

表 6.8 KMD2 与 Xiushui 11 之间生物过程的分子功能分类

Table 6.8 Biological process categories of differential genes between KMD2 and Xiushui 11

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Amino acid and derivative metabolism	20	14	0
Lipid metabolism	15	12	0
Photosynthesis	5	0	0
Secondary metabolism	8	6	0
Response to endogenous stimulus	27	18	0
Response to abiotic stimulus	20	11	0.002
Carbohydrate metabolism	12	6	0.003
Response to stress	20	12	0.006

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Biosynthesis	21	14	0.007
Nodulation	2	2	0.013
Electron transport	10	8	0.023
Response to wounding	1	1	0.024
Response to biotic stimulus	12	9	0.058
Protein targeting	1	1	0.070
Signal transduction	18	13	0.088
Catabolism	7	2	0.117
Cell death	3	2	0.120
Carbohydrate transport	1	1	0.159
Reproduction	4	3	0.168
Response to external stimulus	5	5	0.220
pollen-pistil interaction	1	1	0.250
Amino acid metabolism	1	1	0.347
Pollination	1	1	0.361
Protein modification	12	9	0.383
Transcription	7	1	0.415
Cell cycle	1	1	0.429
Response to extracellular stimulus	1	1	0.477
Flower development	1	0	0.817
DNA metabolism	2	1	0.901
post-embryonic development	1	1	0.902
Development	4	3	0.905
Cell organization and biogenesis	1	1	0.953
Transport	9	4	0.977
Secretory pathway	2	2	1.000
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	2	2	1.000
Cellular process	29	18	1.000
Biological_process	15	7	1.000
Metabolism	14	7	1.000
Physiological process	17	12	1.000

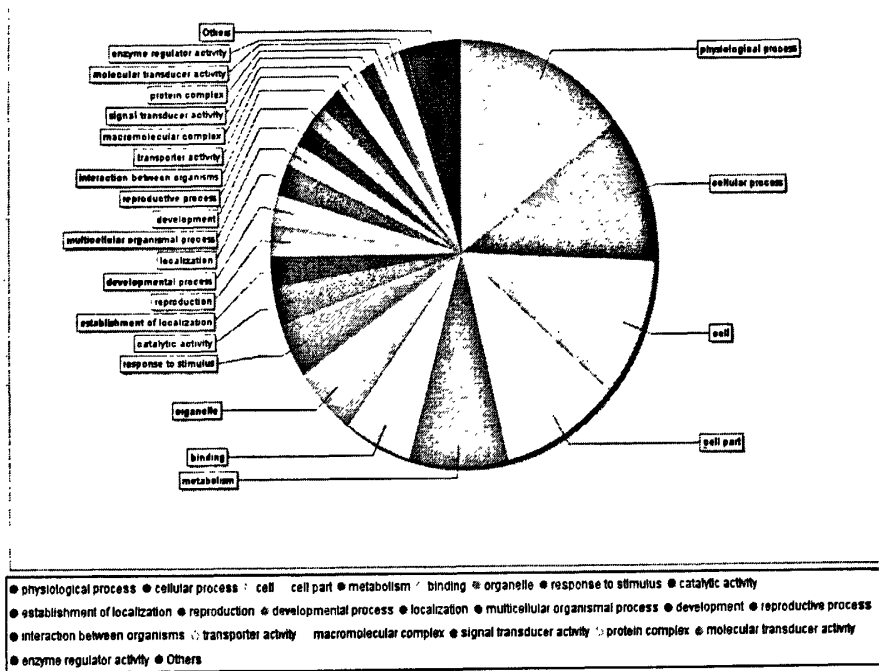


图6.2 Go Ontology对KMD2和Xiushui 11差异基因分类

Fig 6.1 Categories of differential genes between KMD2 and Xiushui 11 by Go Ontology

6.2.4.2 褐飞虱诱导后 KMD2 与 Xiushui 11 差异基因 Go Ontology 分析

利用博奥生物分子功能注释系统（CB-MAS）对褐飞虱诱导后KMD2与Xiushui 11之间表达的差异基因进行了Go Ontology的分子功能（molecular funciton）和生物过程(biological process)分析。褐飞虱诱导后，KMD2与Xiushui 11差异表达的基因，转录因子活性、核苷二磷酸激酶活性、过氧化物酶活性、翻译因子活性与核苷酸绑定、受体因子活性和核酸酶活性等密切相关（表6.9）。317个基因在38个生物过程中存在差异，最相关的5个生物过程是：非生物胁迫反应、碳水化合物代谢、氨基酸及其衍生物的代谢、根瘤发生与形成和UTP（糖合成）、GTP（蛋白合成）和CTP（磷脂合成）（表6.10）。Go Ontology的分子功能、生物过程和细胞组分各部分所占比例见图6.2。

表6.9 KMD2与Xiushui 11之间差异基因的分子功能分类

Table 6.9 Molecular Function categories of differential genes between KMD2 and Xiushui 11

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Transcription factor activity	17	10	0.011
nucleoside diphosphate kinase activity	1	0	0.013
peroxidase activity	1	1	0.257
translation factor activity, nucleic acid binding	1	1	0.300
receptor activity	2	1	0.376
Transporter activity	8	3	0.455
nuclease activity	1	1	0.552
Lipid binding	2	0	0.641
DNA binding	10	5	0.802
transferase activity	12	2	0.848
signal transducer activity	2	1	0.909
catalytic activity	31	10	0.928
protein binding	7	2	0.947
RNA binding	1	1	0.954
Hydrolase activity	4	2	0.958
ATP binding	1	0	0.966
structural molecule activity	2	0	0.973
nucleotide binding	7	3	0.992
kinase activity	4	2	0.994
Molecular-function	7	2	1.000
binding	10	3	1.000
nucleic acid binding	2	2	1.000

表6.10 褐飞虱诱导后KMD2与Xiushui 11之间生物过程的分子功能分类

Table 6.10 Biological process categories of differential genes induced by BPHbetween KMD2 and Xiushui 11

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Response to abiotic stimulus	14	6	0.008
Carbohydrate metabolism	11	2	0.009

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Amino acid and derivative metabolism	12	5	0.010
Nodulation	1	0	0.013
UTP biosynthesis	1	0	0.013
CTP biosynthesis	1	0	0.013
GTP biosynthesis	1	0	0.013
Catabolism	10	2	0.018
Secondary metabolism	3	2	0.044
Reproduction	4	2	0.06
Response to biotic stimulus	10	5	0.100
Response to stress	16	5	0.115
Biosynthesis	15	6	0.129
Oligopeptide transport	1	0	0.129
Response to external stimulus	4	1	0.134
Post-embryonic development	6	1	0
Lipid metabolism	8	4	0.211
Response to endogenous stimulus	18	7	0.246
Pollen-pistil interaction	1	1	0.247
Pollination	1	1	0.357
Transcription	7	3	0.401
Electron transport	3	2	0.442
Response to external stimulus	5	1	0.614
Cell death	1	0	0.695
Development	7	4	0.775
Cell organization and biogenesis	2	1	0.801
Signal transduction	11	6	0.832
Cell differentiation	1	1	0.860
DNA metabolism	2	1	0.896
secretory pathway	5	2	0.931
Transport	11	1	0.949
Protein modification	4	3	0.994
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	1	1	1.000
Biological_process	8	3	1.000

Go term	No. of genes changed	No. of up regulated genes	P value
Physiological process	12	7	1.000
Metabolism	12	4	1.000
Cellular process	18	8	1.000

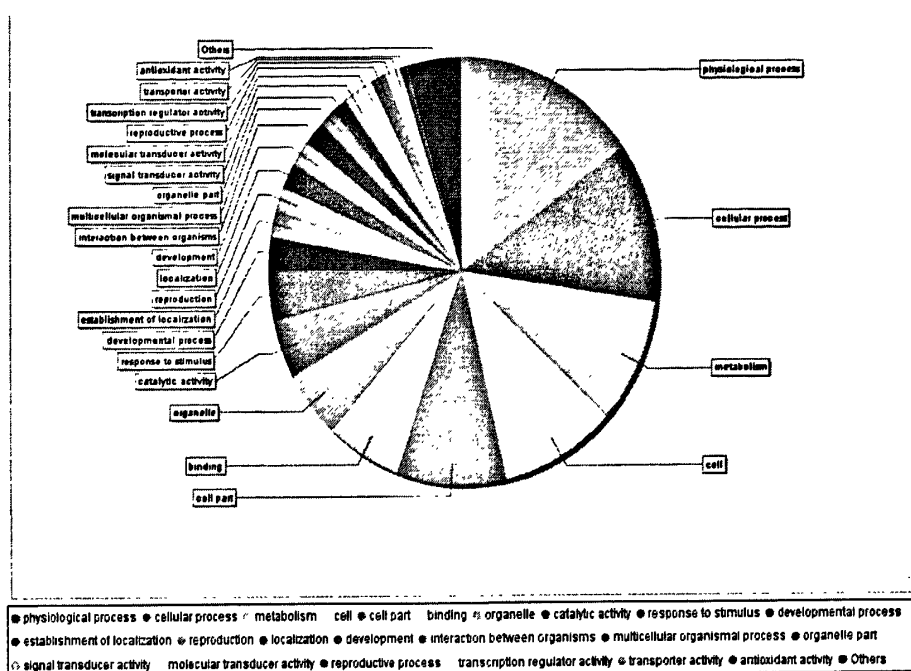


图6.2 Go Ontology对褐飞虱诱导的KMD2和Xiushui 11差异基因分类

Fig 6.2 Categories of differential genes induced by BPH between KMD2 and Xiushui 11 by Go Ontology

6.4 小结

本研究结果表明，转cry1Ab基因水稻KMD2与其亲本非转基因Xiushui 11水稻相比，有324个基因探针的mRNA水平发生了变化，上调基因为177个，下调基因为147个；褐飞虱诱导后的Xiushui11有3834个基因探针的mRNA 水平发生了变化，表达量上调的基因有1534个，下调的基因有2300个；褐飞虱诱导后的KMD2有3273个基因探针的mRNA 水平发生了变化，表达量上调的基因有1269个，下调的基因有2004个；褐飞虱诱导后的KMD2与褐飞虱诱导后的Xiushui11相比，有317个基因探针的mRNA 水平发生了变化，表达量上调的水稻基因有124个，下

调的基因为193个。

就转*cry1Ab*基因水稻KMD2与其亲本非转基因水稻Xiushui 11而言, Go生物过程分析表明其光合与光合作用相关的5个基因都是下调的, 同时, 碳水化合物代谢也存在显著差异(表6.8), 结合上述两点就外源基因*cry1Ab*的插入表明可能会对水稻本身对光的吸收与利用产生影响, 进一步对其积累有机物与能量产生影响, 最终导致KMD2与Xiushui 11之间生长发育的不同。已有研究表明: KMD1的稻苗较瘦小, 株型较矮, 叶片窄, 且分蘖极多, 对肥料的需求量是其亲本Xiushui 11的2倍以上, 尤其是对氮、钾肥的需求量大, 这就表明克螟稻的补偿能力较弱(谢家建, 2008)。同时, 氨基酸及其衍生物的代谢、类脂化合物代谢、次生代谢、内源性胁迫反应、非生物胁迫反应、压力反应和创伤反应在KMD2与Xiushui 11之间存在显著差异。

褐飞虱诱导后的KMD2与Xiushui 11相比, 最相关的差异生物过程是非生物胁迫反应, 这就与之前的研究结果相似, 即Zhang等(2004)采用108个基因的水稻cDNA 芯片研究了褐飞虱取食三叶期敏感水稻品种(明恢63)和抗性品种(B5) 72 h后的基因表达情况, B5在褐飞虱取食后有14个基因表达有差异; 感性品种明恢63有44个基因表达有差异, 研究表明褐飞虱诱导水稻产生抗性途径独立于茉莉酸途径而同非生物胁迫、病原物浸染、植物激素信号途径存在联系(Zhang et al. 2004)。许多生物和非生物胁迫能够诱导, 如与病原体有关或者和创伤诱导的蛋白质的表达。这表达产物可一保护植物及减少的外界压力所造成的损失 (Godoy et al. 2000, Baldwin et al. 2001, Moran and Thompson 2001)。同时发现与结瘤作用、UTP(糖合成)、CTP(磷脂合成)和GTP(蛋白质合成)相关的一个基因都下调了(表6.10), 其它的显著相关的生物过程还包括了对碳水化合物代谢、氨基酸及其衍生物的代谢、分解代谢和次级代谢。也有研究发现, 当褐飞虱取食敏感水稻品种之后, 那些与大分子降解和植物防御相关的基因上调, 而那些参与光和作用 and 细胞生长的基因是下调的(Cho et al. 2005)。

本文中第三章的研究结果表明, KMD2对褐飞虱的生长发育和繁殖有抑制作用, 并且在田间的表现也是抑制的。植物与植食性昆虫之间的相互作用关系是复杂的, 就KMD2与Xiushui 11来讲, *cry1Ab*基因的插入可能导致了KMD2与其亲本Xiushui 11之间在生长发育或是物理结构的差异表现。褐飞虱在LMD2上的产卵位置明显要高于Xiushui 11上的, 另有研究表明褐飞虱在抗性品系和敏感品系上的

取食位置是有差异的,即在敏感品系上的取食位置比抗性品系上的低一些(Zhang et al. 2004),这就表明水稻品种对褐飞虱的抗性程度与褐飞虱的取食与产卵位置有关,而产卵位置的变化可能是由于*cry1Ab*基因的插入导致了与光合作用和碳水化合物代谢相关基因的变化最终导致KMD2本身物理结构变化所致。褐飞虱取食KMD2与Xiushui 11后,许多基因的表达发生了变化,与根瘤作用相关的一个基因下调了,植物的根瘤作用是依靠根瘤菌来完成固氮作用,而前人的研究结果表明KMD1需要增施N肥才能满足其生长发育的需要(谢家健,2008),因此这个与根瘤相关的基因值得进一步去研究。其中还有一部分是涉及到次生代谢物质的变化。植物次生代谢物质是植物直接防御外来生物的重要组成部分,也是植物吸引天敌等间接防御的重要物质,因此,与之相关的2个上调基因和一个下调基因还需进一步研究。

第七章 总讨论

目前,转基因水稻主要分为转抗虫基因水稻、转抗病基因水稻、转抗除草剂基因水稻和转抗逆性基因水稻等。转基因水稻取得巨大进步的同时,转基因水稻的生态安全性引起了国内外各界的广泛关注。其中生态安全性评价主要包括了:对非靶标害虫的影响、对天敌昆虫的影响和靶标害虫抗性治理。而目前对非靶标害虫的影响主要集中在对非靶标害虫的生物学影响,非靶标害虫的种群动态和靶蛋白非靶标昆虫体内的积累与传递上。褐飞虱是亚洲水稻主产区的重要害虫,自19世纪80年代以来,褐飞虱在我国年发生面积约为全国水稻种植面积的50%左右。由于环境的变化、农药化肥的过度使用和栽培制度的改变,褐飞虱的发生有可能变得更为严重。转基因水稻的种植是否会引起褐飞虱的爆发一直是目前研究的焦点和热点。

1 转基因作物对非靶标刺吸式口器害虫的影响

在目前的转基因作物中,转Bt基因作物占了很大的比重,Bt作物的靶标害虫是鳞翅目昆虫。而蚜虫、叶蝉、飞虱、蓟马和叶螨等刺吸式口器则为Bt作物的非靶标害虫。它们靠吸食植物的汁液来吸取营养以完成其生长发育,与植物的之间的相互作用密切又复杂。本文研究结果表明,不论是在苗期或是成株期,转*cry1Ab*基因水稻KMD2对褐飞虱连续多代的生长发育和繁殖的评价结果是消极的,即KMD2延长了褐飞虱若虫的生长发育时间和降低了其产卵量。而转纤维素酶基因水稻Z9-2却刺激了褐飞虱的生长发育与繁殖。同时,转*cry1Ab/vip3H*基因水稻G6H1却对褐飞虱的生长发育与繁殖没有影响。

目前大部分实验室内关于Bt作物对于非靶标刺吸式口器害虫的生物学影响分为三种观点。第一种观点是认为Bt作物刺激了它们的生长发育。白背飞虱若虫和成虫均明显趋向转基因水稻(傅强,2003),这就有可能提高了白背飞虱在转基因水稻上的初始数量。一旦定殖后,Bt棉花缩短了棉蚜的若虫发育时间,致使其内禀增长率升高(Zhang et al. 2008);Bt玉米也提高了后代有翅的禾谷缢管蚜

的数量因此提高了 Bt 玉米上禾谷缢管蚜的虫口密度(Lumbierres et al. 2004, Pons et al. 2005, Faria et al. 2007); Bt 水稻对螟虫的控制有利于稻飞虱在 Bt 稻田中的生长繁殖(崔旭红, 2002)。第二种观点是认为 Bt 作物对非靶标刺吸式口器昆虫的生长发育没有影响。Bt 棉花对棉蚜 *A. gossypii* 的行为(Lawo et al. 2009)和定殖(Sujii et al. 2008)没有影响, 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 在取食和产卵时对转 *cry1Ac/CpTI* 抗虫水稻无明显选择性(傅强, 2003), 这些结果都表明非靶标昆虫在 Bt 作物上的初始种群数量是没有差别的。随后的试验证明了转 Bt 棉花对棉蚜 *A. gossypii* 的产卵前期、产卵期、寿命、存活曲线和日产卵量等没有显著差异(Ramirez-Romero et al. 2008, Sujii et al. 2008); Bt 水稻对褐飞虱的取食、生长发育和存活均无显著影响(Bernal et al. 2002), 并且对其产卵量也没有显著影响(傅强, 2003), 对白背飞虱雌成虫产卵前期也无显著差影响(周霞, 2006)。第三种观点则认为 Bt 作物对非靶标刺吸式口器害虫的生长发育与繁殖有一定的抑制作用。如: Bt 水稻对褐飞虱的取食是不利的(傅强, 2003); KMD2 上的白背飞虱雌成虫寿命显著短于 Xiushui 11 上的白背飞虱雌成虫寿命, 并且 KMD1 和 KMD2 上白背飞虱的产卵期显著短于 Xiushui 11 (周霞, 2006); 白背飞虱以转 *cry1Ab* 基因籼稻 B1 和 B6 及对照嘉早 935 为食时, 其雌雄若虫发育总历期均显著长于对照, 其中在 B1 上雌雄若虫历期分别延长了 1.3 和 1.5 天, B6 上雌雄若虫历期分别延长了 2.0 和 1.4 天(谭红, 2006b); Bt 水稻延长了稻蓟马 *Stenchaetothrips biformis* 的若虫发育时间、蛹发育时间和产卵前期, 并且缩短了产卵期、雌虫寿命和降低了产卵量(Akhtar et al. 2010)。

正因为转基因作物对非靶标刺吸式口器害虫的生物学影响不同, 所以, 非靶标刺吸式口器害虫在田间的种群动态也有不同的反映。本文研究结果表明, KMD2 田间的褐飞虱种群密度要低于其非转基因对照 Xiushui 11; G6H1 田间的褐飞虱种群密度要与其非转基因对照 Xiushui 110 没有差异; 而 Z9-2 田间的褐飞虱种群密度要高于其非转基因对照 Xiushui 11。前人的研究结果大多数都表明转基因作物对节肢动物群落没有影响(Volkmar and Freier 2003, Candolfi et al. 2004, Naranjo 2005, Torres and Ruberson 2005, Cattaneo et al. 2006, Sharma and Pampapathy 2006, Mellet and Schoeman 2007, Rose and Dively 2007, Torres and Ruberson 2007, Toschki et al. 2007, Higgins et al. 2009), 如 Bt 玉米对步甲和弹尾虫的多样性和均匀度没有显著影响(Priestley and Brownbridge 2009), 对花蝽、瓢虫

和植株的丰富度没有影响(de la Poza et al. 2005); Bt 水稻对跳甲的丰富度没有影响(Bai et al. 2010)。同时,一部分学者认为转基因作物对非靶标害虫的种群数量没有影响。如 Bt 水稻对白背飞虱(Chen et al. 2006b, Chen et al. 2007b)和叶蝉(Chen et al. 2006b, Liu et al. 2007b)的种群密度没有影响; Bt 玉米对叶蝉的数量没有影响(Pons et al. 2005)。也有人认为转基因作物的种植减少了化学农药的使用,这就使得一些刺吸式口器害虫的数量有所增加(Whitehouse et al. 2007a, Lu et al. 2008)。少数研究发现转基因作物田间的节肢动物种类减少(Naranjo 2005),并且其中某些物种的数量有减少的趋势(Candolfi et al. 2004)。

2 转基因水稻对褐飞虱生物学影响的机理

鉴于本文研究结果表明不同的转基因水稻对褐飞虱的生物学的的影响不同,因此对不同转基因水稻对褐飞虱生物学影响进行逐一分析。

与Xiushui 11相比, KMD2显著延迟了褐飞虱若虫的发育时间,并且显著降低了褐飞虱的产卵量。同时田间调查结果也表明, KMD2田间的褐飞虱若虫数量和成虫若虫总数量都低于Xiushui 11,并且在几个取样时间达到显著差异。这就表明KMD2会抑制褐飞虱的生长发育与繁殖。最新的报道也表明,转cry1Ab基因水稻KMD2和KMD1与其亲本非转基因水稻Xiushui 11延长了稻蓟马的若虫发育历期并降低了产卵量(Akhtar et al. 2010),我们的试验结果与此相似,这种抑制作用可能是由于外源基因的插入导致了水稻营养或者是化学物质的改变所引起的(Faria et al. 2007)。田间的实验结果表明褐飞虱在KMD2和Xiushui 11田间的成虫数量没有差异,褐飞虱种群数量在KMD2和Xiushui 11之间差异是由于褐飞虱若虫数量的差异所引起的。褐飞虱在浙江地区年发生约4代,世代重叠现象明显,结合试验室内对褐飞虱生长和发育连续多代评价的结果,这就表明褐飞虱在KMD2和Xiushui 11田间的种群数量关键是由产卵量决定的。田间对褐飞虱卵在KMD2和Xiushui 11稻株上的分布情况验证了这一观点。褐飞虱在田间KMD2稻株上分蘖期、拔节期、抽穗期、灌浆期和成熟期的含褐飞虱卵分蘖率、褐飞虱卵块数和总卵数都要比Xiushui 11的要少,且褐飞虱卵块在植株上的相对位置从分蘖期到灌浆期都要比Xiushui 11田间稻株上的高一些。本文结果与前人关于褐飞虱在抗性品系和敏感品系上的取食位置差异的研究相符,即在敏感品系上的取食位

置比抗性品系上的低一些(Zhang et al. 2004)。对KMD2和Xiushui 11的差异表达基因分析结果表明, KMD2与Xiushui 11稻株本身光合作用有差异, 碳水化合物代谢也存在显著差异, 这就表明外源基因*cry1Ab*的插入表明可能会对水稻本身对光的吸收与利用产生影响, 进一步对其积累有机物与能量产生影响, 最终导致KMD2与Xiushui 11之间生长发育的不同。已有研究表明: KMD1的稻苗较瘦小, 株型较矮, 叶片窄, 且分蘖极多, 对肥料的需求量是其亲本Xiushui 11的2倍以上, 尤其是对氮、钾肥的需求量大, 这就表明克螟稻的补偿能力较弱(谢家建, 2008)。这种外源基因插入导致稻株发生的变化可能是引起水稻植株对褐飞虱的生物学反映存在差异的原因之一。褐飞虱诱导后的KMD2与Xiushui 11相比, 最相关的差异生物过程是非生物胁迫反应, 这就与之前的研究结果相似, 即Zhang等(2004)采用108个基因的水稻cDNA 芯片研究了褐飞虱取食三叶期敏感水稻品种(明恢63)和抗性品种(B5) 72 h后的基因表达情况, B5在褐飞虱取食后有14个基因表达有差异; 感性品种明恢63有44个基因表达有差异, 研究表明褐飞虱诱导水稻产生抗性途径独立于茉莉酸途径而同非生物胁迫、病原物浸染、植物激素信号途径存在联系(Zhang et al. 2004)。

转纤维素酶基因水稻 Z9-2 与其非转基因亲本水稻 Xiushui 11 相比, 其 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱连续四代的若虫的生长发育时间基本没有影响, 但是产卵量有所上升, 并且在第四代时有显著差异。田间褐飞虱连续两年的调查表明, Z9-2 田间的褐飞虱种群数量要多于 Xiushui 11 田间的褐飞虱种群数量。并且转纤维素酶基因水稻(Z8-1、Z8-4、Z9-1、Z9-2、CBD-1 和 CBD-3)的苗期鉴定结果都表明他们要比公认的对褐飞虱敏感的水稻 TN1 还要敏感。目前已获得许多的转纤维素酶基因的植物材料。Kaida 等人通过在南洋合欢细胞壁表达白杨纤维素酶对南洋合欢进行了改造, 南洋合欢内纤维素含量没有减少, 但造成了葡聚糖绑定到细胞壁的减少, 与野生型南洋合欢相比, 转基因南洋合欢中的糖化水平和酒精的产量都增加了(Kaida et al. 2009)。而过表达白杨纤维素酶的水稻的茎干的长度和宽度都有所增加, 并且叶片也变大。本文中表明转取食纤维素酶基因的褐飞虱的产卵量有所增加, 这就有可能是因为纤维素酶的导入一方面导致了水稻体内糖基化水平的提高, 这就可能增加了水稻体内的糖类化合物水平有利于褐飞虱的生长发育, 另一方面, 也可能是因为纤维素酶基因的导入使水稻茎干的组织发生变化从而更适合褐飞虱取食和产卵。目前, 大部分的研究都集中在

对转纤维素酶基因的植物的获得上,但就其生态风险的评估还未开始进行。转纤维素酶基因水到的价值在于直接在植物体内合成纤维素酶,纤维素酶可以降低纤维素物质转化为生物燃料的成本,但转纤维素酶基因可能会导致褐飞虱的大发生,进而提高化学农药的使用,降低了节约成本的可能。

3 转 Bt 基因水稻品种的选育

目前得到的大都是转单个基因的 Bt 水稻(Shu et al. 2000, Ye et al. 2001b, Bashir et al. 2004, Riaz et al. 2006, Chen et al. 2008b, Kim et al. 2009),而毒素长期暴露给昆虫后可能会产生抗性(Gahan et al. 2001, Bravo and Soberon 2008),对于延迟昆虫抗性的产生有很多的方法(Hanur 2008)。一个是在表达 Bt 杀虫蛋白作物的周围种植不产毒素的植物即庇护所策略(Vacher et al. 2006),另一个就是采取多基因策略(Bravo and Soberon 2008)。随着科学技术的发展,复合性状已经成为转基因作物发展的一种趋势(James, 2009)。营养期杀虫蛋白(Vips)是在苏云金芽胞杆菌营养期中发现的一种非晶体状胞外杀虫蛋白(Estruch et al. 1996)。Vip 蛋白对鳞翅目昆虫具有很广的杀虫谱(Rang et al. 2005),并且他们的作用方式与 Cry 蛋白不同(Lee et al. 2003)。

本研究表明所有的 6 个转 *cry1Ab/Vip3H* 基因水稻品种与其非转基因亲本对照 Xiushui 110 相比都对 SSB 和 PSB 都表现出良好的抗性。但 6 个转基因品种中茎秆和叶片中的融合蛋白含量白从苗期到成株期含量是变化的并且表现出显著的不同。这一结果是与以前的报告结果相似,即 Bt 外源蛋白的浓度通常在不同的转基因植物品系中存在很大的差异(Breitler et al. 2000, Mabqool et al. 2001, Husnain et al. 2002, Ramesh et al. 2004, Chen et al. 2008)。Cry1Ab 蛋白在主茎和叶片中的含量在同一个转基因水稻品种的不同发育时期也是存在显著差异的,并且在大多数时候灌浆期的蛋白含量最低,这个结果也与 Cry1Ab(Wu et al. 2001)和 Cry1C*(Ye et al. 2009)蛋白在转基因水稻中时间变化动态相似。而转基因水稻对 SSB 和 PSB 的抗虫性与 Cry1Ab 蛋白在水稻的主茎秆和叶片中的含量没有显著的相关性。这种现象也发生在 Cry9C 水稻品系中(Chen et al. 2008a)。尽管 Cry1Ab 在 G6H6 中的表达量是最低的,并且显著的低于其他品种,但是它却比 G6H3、G6H4 和 G6H5 的抗虫性要好,在田间的表现尤为出色一些。所以这就表明 G6H6

中 Cry1Ab/Vip3H 蛋白的表达量足够到对 SSB 和 PSB 表现出良好的抗虫性, 而 G6H6 的这种较好的抗虫效果可能归结于 Cry1Ab/Vip3H 蛋白在水稻各个时期的表达稳定性相关。

进一步的研究表明, 与其非转基因亲本水稻 Xiushui 110 相比, 转 *cry1Ab/vip3H* 基因水稻 G6H1 的 30 日龄稻苗和成株期植株对褐飞虱连续四代的若虫的生长发育和产卵量没有显著影响, 并且田间褐飞虱连续两年的调查表明, G6H1 田间的褐飞虱种群数量与 Xiushui 110 田间的褐飞虱种群数量没有显著差异。综上所述, G6H1 对水稻螟虫的抗虫性最好的同时, 也不会导致其非靶标害虫褐飞虱的爆发, 所以在进行转 Bt 基因水稻品种的选育时, 既要兼顾对靶标害虫的抗虫性效果, 又要兼顾其对非靶标害虫的生态影响。

本文创新点

- 1 建立转基因水稻对褐飞虱连续多代的生物学影响评价体系
- 2 明确了 *cry1Ab* 基因 KMD2 与其亲本非转基因水稻 Xiushui 11 相比对褐飞虱生长发育和繁殖的抑制作用
- 3 利用基因芯片技术对 KMD2 和 Xiushui 11 及其褐飞虱诱导后基因表达差异进行了分析

不足之处及今后的研究方向

- 1 本文建立了转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱的生长发育和繁殖的多代的评价体系, 但是未对其他非靶标害虫如白背飞虱、灰飞虱和黑尾叶蝉等进行验证, 需要进一步对其他非靶标害虫进行研究。
- 2 利用基因芯片技术对 KMD2 和 Xiushui 11 及其褐飞虱诱导后基因表达差异进行了基本的分析, 得到的许多差异基因需要进一步验证。
- 3 本文中主要选取了三种不同类型的转基因水稻, 研究了其对褐飞虱的生物学影响, 应该选用更多的品种进行一对一分析, 以明确不同转基因水稻可能对非靶标生物产生的影响。在明确了 KMD2 对褐飞虱生长发育与繁殖的抑制作用和 KMD2 和 Xiushui 11 及其褐飞虱诱导后基因表达差异的基础上, 找出 KMD2 导致褐飞虱生长发育和繁殖受到抑制的主要因素。

附表 I

水稻水培营养液配方

储备液 1	NH_4NO_3 : 91.6 g/L; CaCl_2 : 88.6 g/L
储备液 2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 40.3 g/L; K_2SO_4 : 71.4 g/L
储备液 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 324 g/L
微量元素储备液	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.5 g/L; H_3BO_3 (硼酸): 0.934 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.031 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (七钼酸氨): 0.074 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.035g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 7.7g/L 柠檬酸(一水合物): 11.9g/L 以上试剂分别溶解, 然后加入 50mL 浓硫酸, 加蒸馏水至 1 升。
配方	储备液 1: 1.25ml/L; 储备液 2: 1.25ml/L; 储备液 3: 1.25ml/L; 微量元素储备液: 1ml/ L 用 NaOH 调 PH 值为 4.5-5.0, 不超过 6.0, 稍偏酸无碍。

参考文献

- 白耀宇, 蒋明星, 程家安. 2005. 转 Bt *cry1Ab* 基因水稻花粉对中华草蛉成虫产卵和寿命的影响. 植物保护学报, 32(3): 225-230.
- 白耀宇, 蒋明星, 程家安. 2005. Bt 稻 *Cry1Ab* 杀虫蛋白在水体中的残留和 Bt 稻田三类水生昆虫数量调查. 四川农业大学学报, 24(1): 25-28.
- 白耀宇, 蒋明星, 程家安, 王敦. 2006. 转 Bt *cry1Ab* 基因水稻对稻田弹尾虫种群数量的影响. 应用生态学报, 17(5): 903-906.
- 陈茂. 2005. 转抗虫、抗病毒水稻对非靶标生物的生态安全性评价. 浙江大学博士学位论文.
- 付仲文, 连庆, 李宁. 2009. 转基因植物食用安全性评价现状. 农业科技管理, 28: 24-27.
- 陈茂, Tu J. 2003a. Bt 水稻对飞虱和叶蝉及其卵寄生蜂扩散规律的影响. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 29(1): 29-33.
- 陈茂, 叶恭银, 胡萃, Datta SK. 2003b. Bt 籼稻对褐飞虱取食、产卵行为的影响. 植物保护学报, 30(4): 365-370.
- 陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 胡萃, 舒庆饶. 2004. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食与产卵行为影响的评价. 中国农业科学, 37(2): 222-226.
- 程暇年, 吴进才, 马飞. 2003. 褐飞虱研究与防治. 北京: 中国农业出版社.
- 崔红旭, 涂巨明. 2002. 转 Bt 基因水稻对稻飞虱及蜘蛛种群数量的影响. 华中农业大学学报, 21(4): 356-358.
- 黄大昉, 林敏. 2001. 农业微生物基因工程. 863 生物高科技丛书, 北京: 科学出版社, 4-9.
- 姜永厚, 傅强, 程家安. 2004. 转 Bt 基因水稻表达的毒蛋白 *Cry1Ab* 在害虫及其捕食者体内的积累动态. 昆虫学报, 47(4): 454-460.
- 傅强, 王锋, 李冬虎, 姚青, 赖凤香, 张志涛. 2003. 转基因抗虫水稻 MSA 和 MSB 对非靶标害虫褐飞虱和白背飞虱的影响. 昆虫学报, 46(6): 697-704.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃. 2002. 水稻对主要非靶标害虫和蜘蛛优势种田间种群动态的影响. 植物保护学报, 29(2): 138-144.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃. 2004. 抗虫转基因水稻和化学杀虫剂对稻田节肢动物群

- 落的影响. 应用生态学报, 15(12): 2309-2314.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃, Swapan K. Datt. 2003. 转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因籼稻对稻田节肢动物群落影响. 昆虫学报, 46 (4): 454-46.
- 尚稚珍. 1979. 二化螟饲养方法的研究. 昆虫学报, 1979, 22(3): 164-167.
- 谭红. 2006a. 转 *cry1Ab* 基因抗虫籼稻对非靶标害虫白背飞虱的安全性评价. 浙江大学硕士学位论文.
- 谭红, 叶恭银, 沈君辉, 彭于发, 胡萃. 2006b. 转 *cry1Ab* 基因抗虫籼稻对非靶标害虫白背飞虱发育与繁殖的影响. 植物保护学报, 33(3): 251-256.
- 陶林勇, 俞晓平. 1999. 水稻新品种(系)对褐飞虱持抗性的鉴定. 浙江农业学报, 11 (6): 315-320.
- 田俊策, 刘志诚, 姚洪渭, 叶恭银, 彭于发. 2008. 转 *cry1Ab* 基因水稻田寄生蜂亚群落结构及其优势类群数量动态的研究. 环境昆虫学报, 30(1): 1-7.
- 吴伟祥, 叶庆富, 闵航. 2003. 不同生长期转 Bt 基因水到秸秆还土对淹水土壤酶活性的影响. 生态学报, 23(11): 2353-2358.
- 徐晓宇, 叶庆富, 吴伟祥, 闵航. 2004. 转 Bt 基因“克螟稻”秸秆还田对稻田厌氧微生物种群和酶活性的影响. 植物营养与肥料科学报, 10(1): 63-67.
- 赵红盈, 张永军, 吴孔明, 赵奎军, 彭于发, 郭予元. 2004. 转 *cry1Ac / CpTI* 双价抗虫水稻 *Cry1Ac* 杀虫蛋白的表达特性及其对二化螟的毒杀效果. 农业生物技术学报 12: 76-69.
- 周霞, 程家案, 娄永根. 2006. 转 *cry1Ab* 基因水稻对非靶标昆虫白背飞虱种群增长的影响. 昆虫学报, 49(5): 786-791.
- Adamczyk, J. J., and J. S. Mahaffey. 2008. Efficacy of Vip3a and Cry1ab transgenic traits in cotton against various Lepidopteran pests. Florida Entomologist 91: 570-575.
- Ahmad, A., S. B. Maqbool, S. Riazuddin, and M. B. Sticklen. 2002. Expression of synthetic *cry1Ab* and *cry1Ac* genes in Basmati rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via Agrobacterium-mediated transformation for the control of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 38: 213-220.
- Akhtar, Y., and M. B. Isman. 2004. Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect

- species. *Journal of Applied Entomology* 128: 32-38.
- Akhtar, Z. R., J. C. Tian, Y. Chen, Q. Fang, C. Hu, M. Chen, Y. F. Peng, and G. Y. Ye. 2010. Impacts of six Bt rice lines on nontarget rice feeding thrips under laboratory and field conditions. *Environmental Entomology* 39: 715-726.
- Al-Babili, S., and P. Beyer. 2005. Golden Rice - five years on the road - five years to go? *Trends in Plant Science* 10: 565-573.
- Alam, M. F., K. Datta, E. Abrigo, A. Vasquez, D. Senadhira, and S. K. Datta. 1998. Production of transgenic deepwater indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A(b)*, gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Science* 135: 25-30.
- Alam, M. F., K. Datta, E. Abrigo, N. Oliva, J. Tu, S. S. Virmani, and S. K. Datta. 1999. Transgenic insect-resistant maintainer line (IR68899B) for improvement of hybrid rice. *Plant Cell Reports* 18: 572-575.
- Andow, D. A., and A. Hilbeck. 2004. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *Bioscience* 54: 637-649.
- Bae, S. H., and M. D. Pathak. 1970. Life history of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and susceptibility of rice varieties to its attacks. *Annals of the Entomological Society of America* 63: 149-&.
- Bai, Y. Y., M. X. Jiang, J. A. Cheng, and D. Wang. 2006. Effects of Cry1Ab toxin on *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) through its prey, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae), feeding on transgenic Bt rice. *Environmental Entomology* 35: 1130-1136.
- Bai, Y. Y., R. H. Yan, G. Y. Ye, F. N. Huang, and J. A. Cheng. 2010. Effects of transgenic rice expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein on ground-dwelling collembolan community in postharvest seasons. *Environmental Entomology* 39: 243-251.
- Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Kessler, and U. Schittko. 2001. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 351-358.
- Baldwin, I. T., R. Halitschke, A. Paschold, C. C. von Dahl, and C. A. Preston. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science* 311: 812-815.
- Bashir, K., T. Husnain, T. Fatima, Z. Latif, S. A. Mehdi, and S. Riazuddin. 2004. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice.

- Molecular Breeding 13: 301-312.
- Bashir, K., T. Husnain, T. Fatima, N. Riaz, R. Makhdoom, and S. Riazuddin. 2005. Novel indica basmati line (B-370) expressing two unrelated genes of *Bacillus thuringiensis* is highly resistant to two lepidopteran insects in the field. Crop Protection 24: 870-879.
- Beever, D. E., K. Glenn, and R. H. Phipps. 2003. A safety evaluation of genetically modified feedstuffs for livestock production; the fate of transgenic DNA and proteins. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 16: 764-772.
- Bennett, R. N., and R. M. Wallsgrove. 1994. Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. New Phytologist 127: 617-633.
- Bentur, J. S., and M. B. Kalode. 1996. Hypersensitive reaction and induced resistance in rice against the Asian rice gall midge *Orseolia oryzae*. Entomologia Experimentalis Et Applicata 78: 77-81.
- Bernal, C. C., R. M. Aguda, and M. B. Cohen. 2002. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. Entomologia Experimentalis Et Applicata 102: 21-28.
- Betz, F. S., B. G. Hammond, and R. L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 156-173.
- Biswas, G. C. G., C. Ransom, and M. Sticklen. 2006. Expression of biologically active *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in transgenic maize plants. Plant Science 171: 617-623.
- Blau, P. A., P. Feeny, L. Contardo, and D. S. Robson. 1978. Allylglucosinolate and herbivorous caterpillars - contrast in toxicity and tolerance. Science 200: 1296-1298.
- Bommireddy, P. L., and B. R. Leonard. 2008. Survivorship of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* on cotton plant structures expressing a *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein. Journal of Economic Entomology 101: 1244-1252.
- Bravo, A., and M. Soberon. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in Biotechnology 26: 573-579.
- Breitler, J. C., M. J. Cordero, M. Royer, D. Meynard, B. San Segundo, and E. Guiderdoni. 2001. The -689/+197 region of the maize protease inhibitor gene

- directs high level, wound-inducible expression of the *cry1B* gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. *Molecular Breeding* 7: 259-274.
- Breitler, J. C., V. Marfa, M. Royer, D. Meynard, J. M. Vassal, B. Vercambe, R. Frutos, J. Messeguer, R. Gabarra, and E. Guiderdoni. 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis cry1B* synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports* 19: 1195-1202.
- Breitler, J. C., J. M. Vassal, M. D. Catala, D. Meynard, V. Marfa, E. Mele, M. Royer, I. Murillo, B. San Segundo, E. Guiderdoni, and J. Messeguer. 2004. Bt rice harbouring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal* 2: 417-430.
- Brussaard, L. 1998. Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes. *Applied Soil Ecology* 9: 123-135.
- Bunsha, D. 2006. Crops on trail. <http://www.hinduonnet.com/fline/fl2323/stories/20061201003603000.htm>.
- Candolfi, M. P., K. Brown, C. Grimm, B. Reber, and H. Schmidli. 2004. A faunistic approach to assess potential side-effects of genetically modified Bt-corn on non-target arthropods under field conditions. *Biocontrol Science and Technology* 14: 129-170.
- Cattaneo, M. G., C. Yafuso, C. Schmidt, C. Y. Huang, M. Rahman, C. Olson, C. Ellers-Kirk, B. J. Orr, S. E. Marsh, L. Antilla, P. Dutilleu, and Y. Carriere. 2006. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7571-7576.
- Chaves, M. M., J. P. Maroco, and J. S. Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chen, H., E. Gonzales-Vigil, C. G. Wilkerson, and G. A. Howe. 2007a. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology* 143: 1954-1967.
- Chen, H., G. Mang, Q. F. Zhang, and Y. J. Lin. 2008a. Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines on mortality and feeding behavior of rice stem borers (Lepidoptera : Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 101: 182-189.

- Chen, H., B. C. McCaig, M. Melotto, S. Y. He, and G. A. Howe. 2004a. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *Journal of Biological Chemistry* 279: 45998-46007.
- Chen, H., C. G. Wilkerson, J. A. Kuchar, B. S. Phinney, and G. A. Howe. 2005a. Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 19237-19242.
- Chen, H., W. Tang, C. G. Xu, X. H. Li, Y. J. Lin, and Q. F. Zhang. 2005b. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1330-1337.
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh, and B. R. Lu. 2004b. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany* 93: 67-73.
- Chen, M., J. Z. Zhao, G. Y. Ye, Q. Fu, and A. M. Shelton. 2006a. Impact of insect-resistant transgenic rice on target insect pests and non-target arthropods in China. *Insect Science* 13: 409-420.
- Chen, M., J. Z. Zhao, A. M. Shelton, J. Cao, and E. D. Earle. 2008b. Impact of single-gene and dual-gene Bt broccoli on the herbivore *Pieris rapae* (Lepidoptera : Pieridae) and its pupal endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera : Pteromalidae). *Transgenic Research* 17: 545-555.
- Chen, M., J. Z. Zhao, H. L. Collins, E. D. Earle, J. Cao, and A. M. Shelton. 2008c. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *Plos One* 3: -.
- Chen, M., G. Y. Ye, Z. C. Liu, H. W. Yao, X. X. Chen, S. Z. Shen, C. Hu, and S. K. Datta. 2006b. Field assessment of the effects of transgenic rice expressing a fused gene of *cry1Ab* and *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on nontarget planthopper and leafhopper populations. *Environmental Entomology* 35: 127-134.
- Chen, M., Z. C. Liu, G. Y. Ye, Z. C. Shen, C. Hu, Y. F. Peng, I. Altosaar, and A. M. Shelton. 2007b. Impacts of transgenic *cry1Ab* rice on non-target planthoppers and their main predator *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae) - A case study of the compatibility of Bt rice with biological control. *Biological Control* 42: 242-250.

- Chen, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15: 101-114.
- Cheng, X. Y., R. Sardana, H. Kaplan, and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cry1A(b)* and *cry1A(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2767-2772.
- Cho, S. K., K. W. Jung, J. U. Jeung, K. H. Kang, K. S. Shim, M. K. You, K. S. Yoo, S. H. Ok, and J. S. Shin. 2005. Analysis of differentially expressed transcripts from planthopper-infested wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports* 24: 59-67.
- Chuansheng Mei, S.-H. P., Robab Sabzikar, Chunfang Qi, Callista Ransom, Mariam Sticklen. 2008. Green tissue-specific production of a microbial endo-cellulase in maize (*Zeamays* L.) endoplasmic-reticulum and mitochondria converts cellulose into fermentable sugars. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Clissold, F. J., G. D. Sanson, and J. Read. 2004. Indigestibility of plant cell wall by the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 112: 159-168.
- Cohen, I.R., 2000. *Tending Adam's Garden: Evolving the cognitive immune self*, Academic Press, London
- Cohen, M., M. Chen, J. S. Bentur, K. L. Heong, and G. Y. Ye. 2008. *Bt* rice in Asia: potential benefits, impact, and sustainability, pp. 223-248. In J. Romeis, A. M. Shelton, G. G. Kennedy (eds.), *Integration of insect-resistant GM crops within IPM programs*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Constabel, C. P., D. R. Bergey, and C. A. Ryan. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 407-411.
- Cuong, N.-L., and M. B. Cohen. 2002. Field survey and greenhouse evaluation of non-rice host plants of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), as refuges for resistance management of rice transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. *Bulletin of Entomological Research* 92: 265-268.

- Dai, Z. Y., B. S. Hooker, D. B. Anderson, and S. R. Thomas. 2000a. Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting. *Molecular Breeding* 6: 277-285.
- Dai, Z. Y., B. S. Hooker, D. B. Anderson, and S. R. Thomas. 2000b. Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Research* 9: 43-54.
- Dangl, J. L., and J. M. McDowell. 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8575-8576.
- Danks, H. V. 2002. Modification of adverse conditions by insects. *Oikos* 99: 10-24.
- Datta, K., A. Vasquez, J. Tu, L. Torrizo, M. F. Alam, N. Oliva, E. Abrigo, G. S. Khush, and S. K. Datta. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cry1A(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 20-30.
- de la Poza, M., X. Pons, G. P. Farinos, C. Lopez, F. Ortego, M. Eizaguirre, P. Castanera, and R. Albajes. 2005. Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24: 677-684.
- De Luca, V., and B. St Pierre. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science* 5: 168-173.
- De Moraes, C. M., M. C. Mescher, and J. H. Tumlinson. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410: 577-580.
- de Wilde, C., E. Uzan, Z. Y. Zhou, K. Kruus, M. Andberg, J. Buchert, E. Record, M. Asther, and A. Lomascolo. 2008. Transgenic rice as a novel production system for *Melanocarpus* and *Pycnoporus* laccases. *Transgenic Research* 17: 515-527.
- Dively, G. P. 2005. Impact of transgenic VIP3A×Cry1Ab Lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology* 34: 1267-1291.
- Duffey, S. S., and M. J. Stout. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32: 3-37.
- Einspanier, R., A. Klotz, J. Kraft, K. Aulrich, R. Poser, F. Schwagele, G. Jahreis,

- and G. Flachowsky. 2001. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *European Food Research and Technology* 212: 129-134.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5389-5394.
- Fang, J., X. L. Xu, P. Wang, J. Z. Zhao, A. M. Shelton, J. Cheng, M. G. Feng, and Z. C. Shen. 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 956-961.
- FAO. 2008. FAO and sustainable intensification of rice production for food security. <ftp://ext-ftp.fao.org/Radio/Scripts/2008/Rice-Prod.pdf>.
- Faria, C. A., F. L. Wackers, J. Pritchard, D. A. Barrett, and T. C. J. Turlings. 2007. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of Lepidopteran pests. *Plos One* 2: -.
- Felton, G. W., and C. B. Summers. 1993. Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1553-1568.
- Felton, G. W., J. L. Bi, C. B. Summers, A. J. Mueller, and S. S. Duffey. 1994. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology* 20: 651-666.
- Feng, G. H., M. S. Chen, K. J. Kramer, and G. R. Reeck. 1991. Alpha-amylase inhibitors from rice-fractionation and selectivity toward insect, mammalian, and bacterial alpha-amylases. *Cereal Chemistry* 68: 516-521.
- Fernandes, G. W., and D. Negreiros. 2001. The occurrence and effectiveness of hypersensitive reaction against galling herbivores across host taxa. *Ecological Entomology* 26: 46-55.
- Ferry, N., M. G. Edwards, J. A. Gatehouse, and A. M. R. Gatehouse. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 155-161.
- Fitches, E., and J. A. Gatehouse. 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *Journal of Insect*

- Physiology 44: 1213-1224.
- Fitches, E., A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology* 43: 727-739.
- Foissac, X., N. T. Loc, P. Christou, A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 2000. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *Journal of Insect Physiology* 46: 573-583.
- Fujimoto, H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. Kyojuka, and K. Shimamoto. 1993. Insect-resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus-thuringiensis*. *Bio-Technology* 11: 1151-1155.
- Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-860.
- Gatehouse, A. M. R., G. M. Davison, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton, E. P. J. Burgess, R. J. C. Gilbert, and J. A. Gatehouse. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: Growth room trials. *Molecular Breeding* 3: 49-63.
- Gatehouse, A. M. R., R. E. Down, K. S. Powell, N. Sauvion, Y. Rahbe, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton, and J. A. Gatehouse. 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 79: 295-307.
- Ge, S., T. Sang, B. R. Lu, and D. Y. Hong. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 14400-5.
- Gealy, D. R., D. H. Mitten, and J. N. Rutger. 2003. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O-sativa*): Implications for weed management. *Weed Technology* 17: 627-645.
- Gealy, D. R., W. G. Yan, and J. N. Rutger. 2006. Red rice (*Oryza sativa*) plant types affect growth, coloration, and flowering characteristics of first- and second-generation crosses with rice. *Weed Technology* 20: 839-852.
- Ghareyazie, B., F. Alinia, C. A. Menguito, L. G. Rubia, J. M. dePalma, E. A. Liwanag, M. B. Cohen, G. S. Khush, and J. Bennett. 1997. Enhanced

- resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cry1A(b)* gene. *Molecular Breeding* 3: 401-414.
- Godoy, A. V., A. S. Lazzaro, C. A. Casalongue, and B. San Segundo. 2000. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Science* 152: 123-134.
- Goggin, F. L. 2007. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 399-408.
- Goussain, M. M., E. Prado, and J. C. Moraes. 2005. Effect of silicon applied to wheat plants on the biology and probing behaviour of the greenbug *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 34: 807-813.
- Green, T. R., and C. A. Ryan. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves - possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-&.
- Hachiya, K. 1981. Notes on host plants of genus *Chilo* (Lepidoptera, Pyralidae) in Hokkaido. *Bulletin of the Hokkaido Prefecture Agricultural Experiment Station* 45: 47-52.
- Hahlbrock, K., P. Bednarek, I. Ciolkowski, B. Hamberger, A. Heise, H. Liedgens, E. Logemann, T. Nurnberger, E. Schmelzer, I. E. Somssich, and J. W. Tan. 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 14569-14576.
- Haimi, J. 2000. Decomposer animals and bioremediation of soils. *Environmental Pollution* 107: 233-238.
- Han, L. Z., K. M. Wu, Y. F. Peng, F. Wang, and Y. Y. Guo. 2006. Evaluation of transgenic rice expressing *Cry1Ac* and *CpTI* against *Chilo suppressalis* and intrapopulation variation in susceptibility to *Cry1Ac*. *Environmental Entomology* 35: 1453-1459.
- Han, L. Z., K. M. Wu, Y. F. Peng, F. Wang, and Y. Y. Guo. 2007. Efficacy of transgenic rice expressing *Cry1Ac* and *CpTI* against the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 71-79.
- Hanur, V. S. 2008. Bt resistance and monophagous pests: Handling with prudence. *Current Science* 95: 449-451.

- Haruta, M., I. T. Major, M. E. Christopher, J. J. Patton, and C. P. Constabel. 2001. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology* 46: 347-359.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Heong, K. L., Y. H. Chen, D. E. Johnson, G. C. Jahn, M. Hossain, and R. S. Hamilton. 2005. Debate over a GM rice trial in China. *Science* 310: 231-231.
- Higgins, L. S., J. Babcock, P. Neese, R. J. Layton, D. J. Moellenbeck, and N. Storer. 2009. Three-year field monitoring of Cry1F, Event DAS-empty set15empty set7-1, maize hybrids for nontarget arthropod effects. *Environmental Entomology* 38: 281-292.
- High, S. M., M. B. Cohen, Q. Y. Shu, and I. Altosaar. 2004. Achieving successful deployment of Bt rice. *Trends in Plant Science* 9: 286-292.
- Hilder, V. A., K. S. Powell, A. M. R. Gatehouse, J. A. Gatehouse, L. N. Gatehouse, Y. Shi, W. D. O. Hamilton, A. Merryweather, C. A. Newell, J. C. Timans, W. J. Peumans, E. Vandamme, and D. Boulter. 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research* 4: 18-25.
- Hildmann, T., M. Ebnet, H. Penacortes, J. J. Sanchezserrano, L. Willmitzer, and S. Prat. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170.
- Ho, N. H., N. Baisakh, N. Oliva, K. Datta, R. Frutos, and S. K. Datta. 2006. Translational fusion hybrid Bt genes confer resistance against yellow stem borer in transgenic elite Vietnamese rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Science* 46: 781-789.
- Hoglund, S., S. Larsson, and G. Wingsle. 2005. Both hypersensitive and non-hypersensitive responses are associated with resistance in *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Journal of Experimental Botany* 56: 3215-3222.
- Hood, E. E., R. Love, J. Lane, J. Bray, R. Clough, K. Pappu, C. Drees, K. R. Hood, S. Yoon, A. Ahmad, and J. A. Howard. 2007. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. *Plant Biotechnology Journal* 5: 709-719.

- Huang, J. K., R. F. Hu, S. Rozelle, and C. Pray. 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science* 308: 688-690.
- Huang, J. K., R. F. Hu, S. Rozelle, and C. Pray. 2008. Genetically modified rice, yields, and pesticides: Assessing farm-level productivity effects in China. *Economic Development and Cultural Change* 56: 241-263.
- Husnain, T., J. Asad, S. B. Maqbool, S. K. Datta, and S. Riazuddin. 2002. Variability in expression of insecticidal *cry1Ab* gene in Indica Basmati rice. *Euphytica* 128: 121-128.
- Jackson, R. E., M. A. Marcus, F. Gould, J. r. Bradley, and J. W. Van Duyn. 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. *Journal of Economic Entomology* 100: 180-186.
- James, C. 2005. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005. ISAAA Brief No. 34. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. 2010. 2009 ISAAA report on global status of Biotech/GM crops. <http://www.isaaa.org/>.
- Janzen, D. H., H. B. Juster, and I. E. Liener. 1976. Insecticidal action of phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192: 795-796.
- Jennings, J. C., L. D. Albee, D. C. Kolwyck, J. B. Surber, M. L. Taylor, G. F. Hartnell, R. P. Lirette, and K. C. Glenn. 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer Corn. *Poultry Science* 82: 371-380.
- Joost, P. H., and D. G. Riley. 2004. Sampling techniques for thrips (Thysanoptera: Thripidae) in preflowering tomato. *Journal of Economic Entomology* 97: 1450-1454.
- Kaida, R., T. Kaku, K. Baba, S. Hartati, E. Sudarmonowati, and T. Hayashi. 2009. Enhancement of saccharification by overexpression of poplar cellulase in sengon. *Journal of Wood Science* 55: 435-440.
- Kain, W. C., J. Z. Zhao, A. F. Janmaat, J. Myers, A. M. Shelton, and P. Wang. 2004. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal*

- of Economic Entomology 97: 2073-2078.
- Kaloshian, I. 2004. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2419-38.
- Kang, J. H., L. Wang, A. Giri, and I. T. Baldwin. 2006. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell* 18: 3303-20.
- Kessler, A., and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144.
- Kessler, A., and I. T. Baldwin. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328.
- Kessler, A., R. Halitschke, and I. T. Baldwin. 2004. Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* 305: 665-668.
- Khanna, H. K., and S. K. Raina. 2002. Elite indica transgenic rice plants expressing modified Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Transgenic Research* 11: 411-423.
- Khush, G. S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* 59: 1-6.
- Kim, S., C. Kim, W. Li, T. Kim, Y. Li, M. A. Zaidi, and I. Altosaar. 2008. Inheritance and field performance of transgenic Korean Bt rice lines resistant to rice yellow stem borer. *Euphytica* 164: 829-839.
- Kim, Y. T., K. S. Lee, M. J. Kim, and S. B. Kim. 2009. Impact of cry1Ac-carrying *Brassica rapa* subsp *pekinensis* on leaf bacterial community. *Journal of Microbiology* 47: 33-39.
- Koiwa, H., R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2: 379-384.
- Komath, S. S., M. Kavitha, and M. J. Swamy. 2006. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4: 973-988.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori, and K. Kohno. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal* 37: 370-378.
- Konno, Y., and F. Tanaka. 1996. Mating time of the rice-feeding and

- water-oat-feeding strains of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). Japanese of Journal of Applied Entomology and Zoology 40: 245-247.
- Kost, C., and M. Heil. 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. Journal of Ecology 94: 619-628.
- Mullet J. 2009. Traits and genes for plant drought tolerance. In Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry Volume 63. Edited by: Kriz AL, Larkins BA. Berlin: Springer: 55-64.
- Langevin, S. A., K. Clay, and J. B. Grace. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza-Sativa* L). Evolution 44: 1000-1008.
- Lawo, N. C., F. L. Wackers, and J. Romeis. 2009. Indian Bt cotton varieties do not affect the performance of cotton aphids. Plos One 4.
- Lee, M. K., P. Miles, and J. S. Chen. 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. Biochemical and Biophysical Research Communications 339: 1043-1047.
- Lee, M. K., F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J. S. Chen. 2003. Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. Applied and Environmental Microbiology 69: 4648-4657.
- Li, F. F., G. Y. Ye, Q. Wu, Y. F. Peng, and X. X. Chen. 2007. Arthropod abundance and diversity in Bt and non-Bt rice fields. Environmental Entomology 36: 646-654.
- Li, L., and J. C. Steffens. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215: 239-247.
- Liu, X., J. Bai, L. Huang, L. Zhu, X. Liu, N. Weng, J. C. Reese, M. Harris, J. J. Stuart, and M. S. Chen. 2007a. Gene expression of different wheat genotypes during attack by virulent and avirulent Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae. Journal of Chemical Ecology 33: 2171-2194.
- Liu, Y. F., L. He, Q. Wang, S. Q. Hu, W. H. Liu, and K. G. Chen. 2007b. Effects of and ecological safety insect-resistant Cry1Ac/sck transgenic rice on key non-target pests in paddy fields. Scientia Agricultura Sinica 40: 1181-1189.

- Llewellyn, D. J., C. L. Mares, and G. P. Fitt. 2007. Field performance and seasonal changes in the efficacy against *Helicoverpa armigera* (Hübner) of transgenic cotton expressing the insecticidal protein vip3A. *Agricultural and Forest Entomology* 9: 93-101.
- Loc, N. T., P. Tinjuangjun, A. M. R. Gatehouse, P. Christou, and J. A. Gatehouse. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding* 9: 231-244.
- Lu, B. R., M. E. B. Naredo, A. B. Juliano, and M. T. Jackson. 1997. Hybridization of AA genome rice species from Asia and Australia .2. Meiotic analysis of *Oryza meridionalis* and its hybrids. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 25-31.
- Lu, Y. H., F. Qiu, H. Q. Feng, H. B. Li, Z. C. Yang, K. A. G. Wyckhuys, and K. M. Wu. 2008. Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Protection* 27: 465-472.
- Lumbierres, B., R. Albajes, and X. Pons. 2004. Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. *Ecological Entomology* 29: 309-317.
- Macedo, M. L., M. M. de Castro, and M. G. Freire. 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 56: 84-96.
- Mahmood-ur-Rahman, H. Rashid, A. A. Shahid, K. Bashir, T. Husnain, and S. Riazuddin. 2007. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 240-251.
- Mao, J. Q., A. J. Burt, A. I. Ramputh, J. Simmonds, L. Cass, K. Hubbard, S. Miller, I. Altosaar, and J. T. Arnason. 2007. Diverted secondary metabolism and improved resistance to european corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in maize (*Zea mays* L.) transformed with wheat oxalate oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2582-2589.
- Maqbool, S. B., T. Husnain, S. Riazuddin, L. Masson, and P. Christou. 1998. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M 7 using the novel delta-endotoxin *cry2A*

- Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding* 4: 501-507.
- Maqbool, S. B., S. Riazuddin, N. T. Loc, A. M. R. Gatehouse, J. A. Gatehouse, and P. Christou. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breeding* 7: 85-93.
- Matteson, P. C. 2000. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. *Annual Review of Entomology* 45: 549-574.
- Mauricio, R., M. D. Rausher, and D. S. Burdick. 1997. Variation in the defense strategies of plants: are resistance and tolerance mutually exclusive? *Ecology* 78:1301-1311.
- Mei, C. S., S. H. Park, R. Sabzikar, C. F. Qi, C. Ransom, and M. Sticklen. 2009. Green tissue-specific production of a microbial endo-cellulase in maize (*Zea mays* L.) endoplasmic-reticulum and mitochondria converts cellulose into fermentable sugars. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84: 689-695.
- Mellet, M. A., and A. S. Schoeman. 2007. Effect of Bt-cotton on chrysopids, ladybird beetles and their prey: Aphids and whiteflies. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 554-562.
- Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis, and K. Matthews. 2003. Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology* 21: 1003-1009.
- Messeguer, J., V. Marfa, M. M. Catala, E. Guiderdoni, and E. Mele. 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding* 13: 103-112.
- Messeguer, J., C. Fogher, E. Guiderdoni, V. Marfa, M. M. Catala, G. Baldi, and E. Mele. 2001. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1151-1159.
- Moran, P. J., and G. A. Thompson. 2001. Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology* 125: 1074-1085.
- Murdock, L. L., J. E. Huesing, S. S. Nielsen, R. C. Pratt, and R. E. Shade. 1990. Biological effects of plant-lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29: 85-89.
- Naik, G., Qaim, M., Subramanian, A., & Zilberman, D. (2005). Bt cotton

- controversy: Some paradoxes explained. *Economic and Political Weekly*, April 9, 1514-1517.
- Naranjo, S. E. 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environmental Entomology* 34: 1193-1210.
- Naredo, M. E. B., A. B. Juliano, B. R. Lu, and M. T. Jackson. 1997. Hybridization of AA genome rice species from Asia and Australia .1. Crosses and development of hybrids. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 17-23.
- Nayak, P., D. Basu, S. Das, A. Basu, D. Ghosh, N. A. Ramakrishnan, M. Ghosh, and S. K. Sen. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 2111-2116.
- Nester, E., L. S. Thomashow, M. Metz, and M. Gordon. 2002. 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. *American Academy of Microbiology*, Washington, D. C.
- Niemeyer, H. M. 1988. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349-3358.
- Pautot, V., F. M. Holzer, B. Reisch, and L. L. Walling. 1993. Leucine aminopeptidase - an inducible component of the defense response in *lycopersicon-esculentum* (Tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9906-9910.
- Pechan, T., A. Cohen, W. P. Williams, and D. S. Luthe. 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13319-13323.
- Pons, X., B. Lumbierres, C. Lopez, and R. Albajes. 2005. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study. *European Journal of Entomology* 102: 73-79.
- Powell, K. S. 2001. Antimetabolic effects of plant lectins towards nymphal stages of the planthoppers *Tarophagous proserpina* and *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 99: 71-77.
- Powell, K. S., A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and J. A. Gatehouse. 1993. Antimetabolic effects of plant-lectins and plant and fungal enzymes on the

- nymphal stages of 2 important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix Cinciteps*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 66: 119-126.
- Priestley, A. L., and M. Brownbridge. 2009. Field trials to evaluate effects of Bt-transgenic silage corn expressing the Cry1Ab insecticidal toxin on non-target soil arthropods in northern New England, USA. *Transgenic Research* 18: 425-443.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, and T. Tschaplinski. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Rahbe, Y., N. Sauvion, G. Febvay, W. J. Peumans, and A. M. R. Gatehouse. 1995. Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon Pisum*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 76: 143-155.
- Ramirez-Romero, R., N. Desneux, J. Chaufaux, and L. Kaiser. 2008. Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 91: 110-115.
- Rang, C., P. Gil, N. Neisner, J. Van Rie, and R. Frutos. 2005. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6276-6281.
- Ransom, C., V. Balan, G. Biswas, B. Dale, E. Crockett, and M. Sticklen. 2007. Heterologous *Acidothermus cellulolyticus* 1,4-beta-endoglucanase E1 produced within the corn biomass converts corn stover into glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137: 207-219.
- Rao, K. V., K. S. Rathore, T. K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D. P. Bown, K. S. Powell, J. Spence, A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant Journal* 15: 469-477.
- Reuter, T., and K. Aulrich. 2003. Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies. *European Food Research and Technology* 216: 185-192.
- Riaz, N., T. Husnain, T. Fatima, R. Makhdoom, K. Bashir, L. Masson, I. Altosaar, and S. Riazuddin. 2006. Development of Indica Basmati rice harboring two

- insecticidal genes for sustainable resistance against lepidopteran insects. *South African Journal of Botany* 72: 217-223.
- Romeis, J., M. Meissle, and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.
- Rong, J., Z. P. Song, J. Su, H. Xia, B. R. Lu, and F. Wang. 2005. Low frequency of transgene flow from Bt/CpTI rice to its nontransgenic counterparts planted at close spacing. *New Phytologist* 168: 559-566.
- Rong, J., B. R. Lu, Z. P. Song, J. Su, A. A. Snow, X. S. Zhang, S. G. Sun, R. Chen, and F. Wang. 2007. Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytologist* 173: 346-353.
- Rose, R., and G. P. Dively. 2007. Effects of insecticide-treated and lepidopteran-active Bt transgenic sweet corn on the abundance and diversity of arthropods. *Environmental Entomology* 36: 1254-1268.
- Salunke, B. K., H. M. Kotkar, P. S. Mendki, S. M. Upasani, and V. L. Maheshwari. 2005. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection* 24: 888-893.
- Sauvion, N., Y. Rahbe, W. J. Peumans, E. J. M. VanDamme, J. A. Gatehouse, and A. M. R. Gatehouse. 1996. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 79: 285-293.
- Savary, S., L. Willocquet, F. A. Elazegui, N. P. Castilla, and P. S. Teng. 2000. Rice pest constraints in tropical Asia: Quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. *Plant Disease* 84: 357-369.
- Sayyed, A. H., G. Moores, N. Crickmore, and D. J. Wright. 2008. Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. *Pest Management Science* 64: 813-819.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schmelz, E. A., M. J. Carroll, S. LeClere, S. M. Phipps, J. Meredith, P. S. Chourey, H. T. Alborn, and P. E. A. Teal. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8894-8899.

- Schoenly, K. G., M. B. Cohen, A. T. Barrion, W. Zhang, B. Gaolach, and V. D. Viajante. 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. *Environ Biosafety Res* 2: 181-206.
- Schroeder, F. C., M. L. del Campo, J. B. Grant, D. B. Weibel, S. R. Smedley, K. L. Bolton, J. Meinwald, and T. Eisner. 2006. Pinoresinol: A lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 15497-15501.
- Setamou, M., J. S. Bernal, T. E. Mirkov, and J. C. Legaspi. 2003. Effects of snowdrop lectin on Mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae) life history parameters. *J Econ Entomol* 96: 950-6.
- Setamou, M., J. S. Bernal, J. C. Legaspi, T. E. Mirkov, and B. C. Legaspi, Jr. 2002. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. *J Econ Entomol* 95: 469-77.
- Sharma, H. C., and G. Pampapathy. 2006. Influence of transgenic cotton on the relative abundance and damage by target and non-target insect pests under different protection regimes in India. *Crop Protection* 25: 800-813.
- Shelton, A. M., J. L. Robertson, J. D. Tang, C. Perez, S. D. Eigenbrode, H. K. Preisler, W. T. Wilsey, and R. J. Cooley. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology* 86: 697-705.
- Shivrain, V. K., N. R. Burgos, K. A. K. Moldenhauer, R. W. Mcnew, and T. L. Baldwin. 2006. Characterization of spontaneous crosses between clearfield rice (*Oryza sativa*) and red rice (*Oryza sativa*). *Weed Technology* 20: 576-584.
- Shu, Q. Y., G. Y. Ye, H. R. Cui, X. Y. Cheng, Y. B. Xiang, D. X. Wu, M. W. Gao, Y. W. Xia, C. Hu, R. Sardana, and I. Altosaar. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding* 6: 433-439.
- Shukle, R. H., and L. L. Murdock. 1983. Lipoxxygenase, trypsin-inhibitor, and lectin from soybeans - effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae). *Environmental Entomology* 12: 787-791.
- Siegel, J. P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 13-21.

- Smith, C. M., X. M. Liu, L. J. Wang, X. Liu, M. S. Chen, S. Starkey, and J. F. Bai. 2010. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *Journal of Chemical Ecology* 36: 260-276.
- Sogawa, K. 1982. The rice brown planthopper - feeding physiology and host plant interactions. *Annual Review of Entomology* 27: 49-73.
- Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2004a. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodiversity and Conservation* 13: 579-590.
- Song, Z. P., B. R. Lu, Y. G. Zhu, and J. K. Chen. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. *New Phytologist* 157: 657-665.
- Song, Z. P., B. R. Lu, B. Wang, and J. K. Chen. 2004b. Fitness estimation through performance comparison of F-1 hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O-sativa*. *Annals of Botany* 93: 311-316.
- Song, Z. P., W. Y. Zhu, J. Rong, X. Xu, J. K. Chen, and B. R. Lu. 2006. Evidences of introgression from cultivated rice to *Oryza rufipogon* (Poaceae) populations based on SSR fingerprinting: implications for wild rice differentiation and conservation. *Evolutionary Ecology* 20: 501-522.
- Sticklen, M. B. 2007. Feedstock crop genetic engineering for alcohol fuels. *Crop Science* 47: 2238-2248.
- Sticklen, M. B. 2009. Expediting the biofuels agenda via genetic manipulations of cellulosic bioenergy crops. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 3: 448-455.
- Sujii, E. R., P. H. B. Togni, E. Y. T. Nakasu, C. S. S. Pires, D. P. de Paula, and E. M. G. Fontes. 2008. Impact of Bt cotton on the population dynamics of the cotton aphid in greenhouse. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43: 1251-1256.
- Sun, X., A. Wu, and K. Tang. 2002. Transgenic rice lines with enhanced resistance to the small brown planthopper. *Crop Protection* 21: 511-514.
- Sun, Y., J. J. Cheng, M. E. Himmel, C. D. Skory, W. S. Adney, S. R. Thomas, B. Tisserat, Y. Nishimura, and Y. T. Yamamoto. 2007. Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. *Bioresource Technology* 98: 2866-2872.

- Tan, H., G. Y. Ye, Z. C. Shen, Y. F. Peng, and C. Hu. 2006. Effects of transgenic indica rice expressing a gene of *cry1Ab* with insect resistance on the development and reproduction of nontarget pest, *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Phytophylacica sinica* 33: 251-256.
- Tang, W., H. Chen, C. G. Xu, X. H. Li, Y. J. Lin, and Q. F. Zhang. 2006. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene. *Molecular Breeding* 18: 1-10.
- Tang, Q. Y., and M. G. Feng. 2007. DPS Data processing for practical statistics. Science Press, Beijing, China.
- Theis, N., and M. Lerdau. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164: S93-S102.
- Thipyapong, P., and J. C. Steffens. 1997. Tomato polyphenol oxidase - Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology* 115: 409-418.
- Thipyapong, P., M. D. Hunt, and J. C. Steffens. 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220: 105-117.
- Tomme, P., R. A. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol* 37: 1-81.
- Torres, J. B., and J. R. Ruberson. 2005. Canopy- and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields: Patterns and mechanisms. *Environmental Entomology* 34: 1242-1256.
- Torres, J. B., and J. R. Ruberson. 2007. Abundance and diversity of ground-dwelling arthropods of pest management importance in commercial Bt and non-Bt cotton fields. *Annals of Applied Biology* 150: 27-39.
- Toschki, A., L. A. Hothorn, and M. Ross-Nickoll. 2007. Effects of cultivation of genetically modified Bt maize on epigeic arthropods (Araneae: Carabidae). *Environmental Entomology* 36: 967-981.
- Truitt, C. L., H. X. Wei, and P. W. Pare. 2004. A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. *Plant Cell* 16: 523-532.
- Tsai, C. C., C. H. Lai, C. S. Yang, C. K. Lin, and H. Y. Tsen. 2008. Toxicological evaluation of transgenic rice flour with an *Escherichia coli* phytase gene *appA* by sub-chronic feeding study in Wistar rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 382-388.

- Tu, J. M., G. A. Zhang, K. Datta, C. G. Xu, Y. Q. He, Q. F. Zhang, G. S. Khush, and S. K. Datta. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nature Biotechnology* 18: 1101-1104.
- Ussuf, K. K., N. H. Laxmi, and R. Mitra. 2001. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80: 847-853.
- Vacher, C., D. Bourguet, M. Desquilbet, S. Lemarie, S. Ambec, and M. E. Hochberg. 2006. Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic Bt corn? *Biology Letters* 2: 198-202.
- van der Hoorn, R. A. L., and J. D. Jones. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 400-407.
- Vinocur, B., and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Vogel, K. P., and H. J. G. Jung. 2001. Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20: 15-49.
- Volkmar, C., and B. Freier. 2003. Spider communities in Bt. maize and not genetically modified maize fields. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 110: 572-582.
- Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195-216.
- Wan, J., F. M. Dunning, and A. F. Bent. 2002. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* 2: 259-73.
- Wang, F., Q. H. Yuan, L. Shi, Q. Qian, W. G. Liu, B. G. Kuang, D. L. Zeng, Y. L. Liao, B. Cao, and S. R. Jia. 2006. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O-rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *Plant Biotechnology Journal* 4: 667-676.
- Wang, Y., and S. Johnston. 2007. The status of GM rice R&D in China. *Nature Biotechnology* 25: 717-718.
- Wang, Z. H., Y. Wang, H. R. Cui, Y. W. Xia, I. Altosaar, and Q. Y. Shu. 2002.

- Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 738-744.
- Whitehouse, M. E. A., L. J. Wilson, and G. A. Constable. 2007a. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 273-285.
- Whitehouse, M. E. A., L. J. Wilson, and G. A. Constable. 2007b. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic (vol 58, pg 273, 2007). *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 383-U15.
- Wu, C., Y. Fan, C. Zhang, N. Oliva, and S. K. Datta. 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cry1A(b)* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports* 17: 129-132.
- Wu, D. X., Q. Y. Shu, Q. F. Ye, L. Zhang, C. X. Ma, and Y. W. Xia. 2003. Comparative studies on major nutritional components and physicochemical properties of the transgenic rice with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Food Biochemistry* 27: 295-308.
- Wu, K. M., and Y. Y. Guo. 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology* 50: 31-52.
- Wu, Z. P., B. J. Xu, and Z. Y. Chen. 2001. Separation and purification of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxic protein Cry1Ab from transgenic rice by ion-exchange chromatography. *Chromatographia* 53: 571-573.
- Wünn J, Klöti A, Burkhardt PK, Ghosh Biswas GC, Launis K, Iglesia VA, Potrykus I. 1996. Transgenic *indica* rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cry1A(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/technol.*, 14: 171-176.
- Yazaki, J. 2002. Rice functional genomics via CDNA microarray: Construction of the rice expression database and the comprehensive gene expression profiles. *Plant and Cell Physiology* 43: S5-S5.
- Ye, G. Y., C. Hu, Q. R. Shu, H. R. Cui, and M. W. Gao. 2000. The application of detached-leaf bioassay for evaluating the resistance of transgenic rice to stem borers. *Acta phytopylacica sinica* 27: 1-6.
- Ye, G. Y., J. Tu, H. Cui, K. Datta, and S. K. Datta. 2001a. Transgenic IR72 with

- fused Bt gene *cry1Ab/cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions. *Plant Biotechnology* 18: 125-133.
- Ye, G. Y., Q. Y. Shu, H. W. Yao, H. R. Cui, X. Y. Cheng, C. Hu, Y. W. Xia, M. W. Gao, and I. Altosaar. 2001b. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Journal of Economic Entomology* 94: 271-276.
- Ye, R. J., H. Q. Huang, Z. Yang, T. Y. Chen, L. Liu, X. H. Li, H. Chen, and Y. J. Lin. 2009. Development of insect-resistant transgenic rice with *Cry1C**-free endosperm. *Pest Management Science* 65: 1015-1020.
- Yu, J., S. N. Hu, J. Wang, G. K. S. Wong, S. G. Li, B. Liu, Y. J. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Q. Zhang, M. L. Cao, J. Liu, J. D. Sun, J. B. Tang, Y. J. Chen, X. B. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. J. Cong, J. N. Geng, Y. J. Han, L. Li, W. Li, G. Q. Hu, X. G. Huang, W. J. Li, J. Li, Z. W. Liu, L. Li, J. P. Liu, Q. H. Qi, J. S. Liu, L. Li, T. Li, X. G. Wang, H. Lu, T. T. Wu, M. Zhu, P. X. Ni, H. Han, W. Dong, X. Y. Ren, X. L. Feng, P. Cui, X. R. Li, H. Wang, X. Xu, W. X. Zhai, Z. Xu, J. S. Zhang, S. J. He, J. G. Zhang, J. C. Xu, K. L. Zhang, X. W. Zheng, J. H. Dong, W. Y. Zeng, L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. D. Ren, X. W. Chen, J. He, D. F. Liu, W. Tian, C. G. Tian, H. G. Xia, Q. Y. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, J. Wang, W. M. Zhao, P. Li, W. Chen, X. D. Wang, Y. Zhang, J. F. Hu, J. Wang, S. Liu, J. Yang, G. Y. Zhang, Y. Q. Xiong, Z. J. Li, L. Mao, C. S. Zhou, Z. Zhu, R. S. Chen, B. L. Hao, W. M. Zheng, S. Y. Chen, W. Guo, G. J. Li, S. Q. Liu, M. Tao, J. Wang, L. H. Zhu, L. P. Yuan, and H. M. Yang. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Yuan, Z. Q., C. Y. Zhao, Y. Zhou, and Y. C. Tian. 2001. Aphid-resistant transgenic tobacco plants expressing modified *gna* gene. *Acta Botanica Sinica* 43: 592-597.
- Zaidi, M. A., G. Y. Ye, H. W. Yao, T. H. You, E. Loit, D. H. Dean, S. Riazuddin, and I. Altosaar. 2009. Transgenic rice plants expressing a modified *cry1Ca1* gene are resistant to *Spodoptera litura* and *Chilo suppressalis*. *Molecular Biotechnology* 43: 232-242.
- Zavala, J. A., A. G. Patankar, K. Gase, D. Q. Hui, and I. T. Baldwin. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in

- Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiology* 134: 1181-1190.
- Zhang, F., L. Zhu, and G. C. He. 2004. Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. *Journal of Plant Physiology* 161: 53-62.
- Zhang, G. F., F. H. Wan, S. T. Murphy, J. Y. Guo, and W. X. Liu. 2008. Reproductive biology of two nontarget insect species, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and *Orius sauteri* (Hemiptera: Anthocoridae), on Bt and non-Bt cotton cultivars. *Environmental Entomology* 37: 1035-1042.
- Zhang, N. Y., S. Linscombe, and J. Oard. 2003. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. *Euphytica* 130: 35-45.
- Zhang, W. Q., S. D. Linscombe, E. Webster, S. Y. Tan, and J. Oard. 2006. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield rice to red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica* 152: 75-86.
- Zhao, J. Z., J. Cao, Y. X. Li, H. L. Collins, R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2003. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology* 21: 1493-1497.
- Zhao, J. Z., J. Cao, H. L. Collins, S. L. Bates, R. T. Roush, E. D. Earle, and A. M. Shelton. 2005. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8426-8430.
- Ziegelhoffer, T., J. A. Raasch, and S. Austin-Phillips. 2009. Expression of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endo-beta-1,4-glucanase catalytic domain in transplastomic tobacco. *Plant Biotechnology Journal* 7: 527-536.
- Ziegler, M. T., S. R. Thomas, and K. J. Danna. 2000. Accumulation of a thermostable endo-1,4-beta-D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Molecular Breeding* 6: 37-46.

