

分类号: S443
密 级: 无

单位代码: 10335
学 号: 21316098

浙江大学

硕士学位论文



转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对非靶标害虫褐飞虱
生物学特性的影响及其代谢物质分析

**Effects of RDV-infected transgenic *cry1C* rice on *Nilaparvata*
lugens in biological characteristics and analysis on its
metabolic substances**

申请人姓名: 宁铎

指导教师: 叶恭银 教授

专业名称: 植物保护

研究方向: 农业昆虫与害虫防治

所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二〇一六年六月



Y3029039

转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对非靶标害虫褐飞虱
生物学特性的影响及其代谢物质分析



论文作者签名: _____

指导教师签名: _____

论文评阅人: 双向隐名评阅 _____

答辩委员会主席: 俞晓平 教授 中国计量大学 _____

委员: 万方浩 研究员 中国农业科学院 _____

张传溪 教授 浙江大学 _____

陈学新 教授 浙江大学 _____

叶恭银 教授 浙江大学 _____

答辩日期: 二〇一六年六月九日

**Effects of RDV-infected transgenic cry1C rice on
Nilaparvata lugens in biological characteristics and
analysis on its metabolic substances**



Author signature: Duo Ning

Supervisor signature: Gongyin Ye

Thesis reviewer: Anonymous

Chair: Prof. Xiaoping Yu, Chinese Jiliang University
Prof. Fanghao Wan, Chinese Academy of

Committeeman: Agricultural Sciences

Prof. Chuanxi Zhang, Zhejiang University

Prof. Xuexin Chen, Zhejiang University

Prof. Gongyin Ye, Zhejiang University

Date of Oral Defence: 9 June, 2016

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

转基因生物新品种培育重大专项

(2014ZX08011-01)

介体昆虫-病毒-寄主植物三者互作机制

(2014CB138404)

资助

致 谢

时光飞逝，三年的硕士生活即将结束，在这段校园生活中，自己收获的不仅是知识上的积累，同时也提高自己思考和解决问题的能力，开阔了自己的眼界，培养了积极乐观的生活态度，这是自己不断成长，不断完善的三年。在此我要对所有帮助和支持过我的老师、同学、朋友和家人表达最诚挚的谢意。

首先，我要感谢我的导师叶恭银教授。论文从选题到试验设计、开展，直至撰写与修改等方面都凝聚着导师的心血与汗水。叶老师不仅在学术上给我精心指导，同时还在思想，生活上给我以无微不至的关怀。叶老师一丝不苟的治学态度、渊博精深的学识、敏锐的洞察力和勤勉的敬业精神都给我留下了非常深刻的印象，也让我终生受益。值此论文完成之际，谨向叶老师表示我最衷心的感谢和最崇高的敬意！

本课题组的胡萃教授德高望重、博学多才、治学严谨、为人谦和，让我感受到真正的学者风范，值得我们青年一代效仿学习。此论文能顺利完成，我还必须向本课题组的姚洪渭副教授、黄佳副教授和方琦老师致以我最诚挚的谢意。此外，我还要感谢本研究所何俊华教授、程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、沈志成教授、娄永根教授、张传溪教授、施祖华教授、莫建初教授、蒋明星教授、祝增荣研究员、唐启义研究员、王晓伟教授、徐海君教授、余虹副教授、时敏副教授、鲍艳原副教授、刘银泉副教授等的授业解惑、关心指导，特别感谢娄永根教授和张瑾师姐在水稻挥发物测定上提供的帮助。

同时还要感谢卢增斌、汪芳、王飞、朱宇、徐刚、严智超、王前进、齐易香、刘玉娥、滕子文、巨青松、夏仁英、刘洋、杜玉萍、陈利鹏、武亚苏、杨蕾、贾文茜、党聪、王蓓蓓、肖山、陈晓昂、李萌琪、杨磊、王龙、常学飞、王嘉乐、毛芬、熊时姣、顾桂香、李晶晶、方绍亮、黄天宇的关心和帮助。特别感谢汪芳师姐、卢增斌和韩乃顺师兄对我各方面给予的帮助！王前进师姐、党聪、杨磊、王龙、常学飞在平时科研生活中给予的巨大帮助，水稻组的小伙伴们相互协调和配合保证了实验的顺利进行，在此一并致以真挚的谢意。

感谢我的父母和家人对我始终如一的理解与支持，从他们身上我真正的感受到最无私的爱。还要感谢我的室友侍南、谭辉，感谢你们本硕七年的陪伴。

试验材料承蒙华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室林拥军教授、北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室李毅教授提供,特此表示衷心的感谢!

最后,再次特别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!

宁铎

2016 年 4 月 于浙江大学启真湖畔

摘 要

随着世界人口的不断增加,粮食问题显得愈发重要,但是病虫害严重影响作物的产量和质量。近年来,随着转基因技术的发展,一些抗虫、抗病、抗除草剂的转基因水稻得以培育,在很大程度上为有效控制病虫害提供了重要的种质资源储备。但是转基因水稻可能带来的问题也受到了公众的关注,目前已有大量关于转基因对稻米和田间生态系统影响的研究,但是在逆境条件下转基因水稻安全性的报道比较少。本文研究了转 *cry1C* 基因水稻在感染水稻矮缩病毒 (Rice dwarf virus, RDV) 的条件下,对褐飞虱发育、繁殖、取食和产卵选择性等生物学特性的影响,并通过气相色谱—飞行时间质谱联用仪 (Gas chromatography-time of flight-mass spectrometry, GC-TOF-MS) 对水稻叶片代谢物质进行了代谢组学分析,明确其代谢物质的变化,以评价在逆境条件下 *Bt* 水稻的生态安全性,为转基因水稻能否商业化及推广提供科学依据。主要结果如下:

1、转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱取食和产卵选择性的影响

通过观察室内条件下褐飞虱在不同水稻处理上的着虫数与产卵量,得知褐飞虱对转 *cry1C* 基因水稻与非转基因水稻、感染 RDV 水稻与健康水稻材料在取食和产卵选择上均无明显偏向性。

2、转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱生物学特性的影响

水稻类型 (*Bt* vs non-*Bt*) 对褐飞虱的卵历期、除 3 龄若虫期外的各若虫期及雌雄若虫总历期有显著影响。褐飞虱取食 *Bt* 水稻 T1C-19 后,2 龄、4 龄、5 龄若虫期和雌雄若虫总历期较取食亲本 MH63 的均显著延长。取食感染 RDV 的 T1C-19 较感染 RDV 的 MH63 的卵历期、3 龄若虫期显著延长,但 1 龄若虫期显著缩短。

RDV 病毒 (RDV vs non-RDV) 对褐飞虱 5 龄若虫期和雄若虫总历期有显著影响。褐飞虱取食感染 RDV 的 MH63 水稻后:卵历期和 3 龄若虫期显著缩短,4 龄、5 龄若虫期和雄若虫总历期显著延长。取食感染 RDV 的 T1C-19 水稻后:只有卵历期显著延长,其他参数无显著变化。

水稻类型和感染 RDV 病毒对褐飞虱的若虫存活率、雌雄成虫寿命、产卵量和卵孵化率等生命表参数均没有显著影响。

转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱种群的内在增长率 (r_m)、净生殖率 (R_0)、世代平均历期 (T)、种群加倍时间 (DT)、周线增长率 (λ) 5 个种群参数都没有显著性的影响。

3、转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后水稻的代谢物质分析

通过 GC-TOF-MS 对水稻叶片代谢组学的分析,共得到 920 个有效质谱峰,其中 374 种物质被鉴定出来。多元统计分析表明: T1C-19 和 MH63 之间有 9 种差异化合物, MH63-RDV 和 T1C-19-RDV 之间有 42 种差异化合物, MH63-RDV 和 MH63 之间有 18 种差异化合物, T1C-19-RDV 和 T1C-19 之间有 57 种差异化合物。

通过分析差异化合物所参与的代谢通路,发现多个氨基酸代谢途径受到影响。进一步测定水稻体内游离氨基酸的含量,结果表明: 转 *Bt* 基因对于水稻体内氨基酸的含量没有显著影响,但是感染 RDV 显著提高了 11 种游离氨基酸 (Thr、Ser、Ala、Cys、Val、Ile、Leu、Phe、g-ABA、Lys、Arg) 的含量。

通过收集和测定水稻挥发物,共鉴定出 18 种挥发物。转 *Bt* 基因对于所有挥发物的含量均没有显著的影响,但感染 RDV 对 2-heptanol (2-庚醇) 和 (E)- β -caryophyllene (β -石竹烯) 产生了显著影响,两种差异化合物在感染 RDV 水稻中高于健康水稻。代谢物质分析结果表明转 *cry1C* 基因对于水稻的代谢组学和挥发物含量影响不大,相对于转 *cry1C* 基因,感染 RDV 对于水稻代谢物质有更显著的影响。

关键词: *Bt* 水稻; 水稻普通矮缩病毒; 褐飞虱; 生命表; 代谢组学

Abstract

With the world population increasing, food problem is becoming more and more important. But the plant diseases, insects and weeds are affecting crop yield and quality seriously. In recent years, modern biotechnology has been used to cultivate transgenic rice with insect-resistance, disease-resistance, herbicide-resistant to apply germplasm resource for effectively control pests, diseases, and weeds. But the potential risks of planting transgenic rice also attracted public's attention. Although there have lots of studies on effects of transgene to rice and ecological system in the field, reports related to the safety of transgenic rice under the adverse conditions are oppositely less. In order to accessment the ecological safety of *Bt* rice under adverse conditions, this experiment taking rice dwarf virus (RDV) infected transgenic *cry1C* rice as a research material, studied its affects to development, breed, feeding, ovipositional preference and other biological characteristics of *Nilaparvata lugens*. In order to pinpoint the metabolic change of rice leaves, a metabonomics analysis has been carried out through gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (GC-TOF-MS), This study will provide a scientific basis for commercialization and popularization of transgenic rice. The results are as follows:

1 Effect of transgenic *cry1C* rice plant infected by RDV on *N.lugens* feeding and ovipositional preference

Compared with the numbers of *N.lugens* and its eggs on different rice plant treatments, we learned there were no significant preference on *N.lugens* feeding and ovipositional preference between transgenic *cry1C* rice plant and non-transgenic rice plant, RDV infected rice plant and healthy plant.

2 Effects of transgenic *cry1C* rice plant infected by RDV on *N.lugens* in biological characteristics

Compared with the parent line MH63(non-*Bt*), *Bt* rice plants showed great effects on some biological parameters of the *N.lugens*, such as egg duration, nymph duration(3 instar excepted), male and female nymph total duration. Compared with

parent line MH63, *N.lugens* feeding with T1C-19(*Bt* rice) showed significant prolonged on 2 instar, 4 instar, 5 instar nymph duration and the male and female nymph total duration. Compared with MH63(RDV infected), *N.lugens* feeding with T1C-19(RDV infected) showed significant prolonged on egg duration, 3 instar duration while 1 instar duration significant shortened.

N.lugens feeding with RDV-infected or non-RDV-infected rice plant showed great difference on 5 instar nymph duration and female nymph total duration. Compared with healthy MH63, *N.lugens* feeding with RDV-infected plant showed significant shortened on egg duration and 3 instar nymph duration while showed significant prolonged on 4 and 5 instar nymph duration. There have no significant change on other biological parameters excepted the prolong of egg duration when *N.lugens* feeding with healthy or RDV-infected T1C-19 rice plant.

There have no significant change on nymphal survival rate, adults life span, oviposition amounts, egg hatching rate and other biological parameters when *N.lugens* feeding with *Bt*/non-*Bt* and RDV-infected/non-RDV-infected rice plant.

There have no significant impact on *N.lugens* population intrinsic rate of increase (r_m), net reproductive rate (R_0), generation average duration (T), population doubling time (DT), weekly growth rate (λ) and nymphal survival rate when feeding with RDV-infected transgenic *cry1C* rice plant.

3 Analysis on metabolic substances of RDV-infected transgenic *cry1C* rice plant

Analysis on the metabonomics of rice leaves by GC-TOF-MS, 920 effective mass spectrum peaks have been obtained, among which 374 substances have been identified. By multivariate statistical analysis, we found there have 9 differential compounds between T1C-19 and MH63, 42 differential compounds between MH63-RDV and T1C-19-RDV, 18 differential compounds between MH63 and MH63-RDV, 57 differential compounds between T1C-19 and T1C-19-RDV.

By the analysis of differential compounds participated metabolic pathways, we discovered many amino acid metabolic pathways are affected. Determination the contents of free amino acid experiment indicate that transgene *Bt* have no impacts on amino acid contents in rice plant whereas infected RDV can increase 11 free amino

acids contents significantly, including Thr, Ser, Ala, Cys, Val, Ile, Leu, Phe, g-ABA, Lys and Arg.

By collecting and determination of rice volatiles, 18 kinds of volatiles have been identified. Transgene *Bt* have no appreciable effects on contents of all the volatiles, but rice infected RDV can significantly increase the contents of 2-heptanol and (E)- β -caryophyllene. Transgene *cry1C* have little influence on metabonomics and volatile's contents while infected RDV have more significant impact on metabolic substance of rice plant.

Key words: *Bt* rice; rice dwarf virus; *Nilaparvata lugens*; life table; metabonomics

目 录

致 谢.....	I
摘 要.....	III
Abstract.....	V
第一章 文献综述.....	1
1 <i>Bt</i> 水稻的安全性评价研究进展.....	1
1.1 <i>Bt</i> 水稻的研究概况.....	1
1.2 <i>Bt</i> 水稻的生态安全性研究进展.....	2
2 水稻普通矮缩病的研究进展.....	7
2.1 水稻普通矮缩病基本概况.....	7
2.2 水稻普通矮缩病的危害与发病规律.....	7
3 代谢组学在植物代谢研究中的应用.....	8
3.1 代谢组学简介.....	8
3.2 代谢组学研究技术.....	9
3.3 植物代谢组学的应用.....	10
4 本研究的目的是和意义.....	12
第二章 转 <i>cryIC</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱取食和产卵选择性的影响	13
2.1 材料与方法.....	13
2.1.1 供试昆虫.....	13
2.1.2 供试水稻.....	13
2.1.3 带毒黑尾叶蝉种群的建立.....	14
2.1.4 转 <i>cryIC</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱取食选择性的影响	15
2.1.5 转 <i>cryIC</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱产卵选择性的影响	15
2.1.6 数据统计.....	15
2.2 结果与分析.....	15
2.2.1 转 <i>cryIC</i> 基因对褐飞虱取食选择性的影响.....	15
2.2.2 感染 RDV 对褐飞虱取食选择性的影响.....	16
2.2.3 转 <i>cryIC</i> 基因对褐飞虱产卵选择性的影响.....	17
2.2.4 感染 RDV 对褐飞虱产卵选择性的影响.....	17

2.3 讨论.....	18
第三章 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱生物学特性的影响	20
3.1 材料与方法.....	21
3.1.1 供试昆虫.....	21
3.1.2 供试水稻.....	21
3.1.3 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱发育的影响	21
3.1.4 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱繁殖的影响	21
3.1.5 数据分析.....	22
3.2 结果与分析.....	22
3.2.1 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱生长发育的影响	22
3.2.2 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱繁殖的影响	23
3.2.3 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱种群生命表参数的影响	27
3.3 讨论.....	31
第四章 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后水稻的代谢物质分析	32
4.1 材料与方法.....	33
4.1.1 供试昆虫.....	33
4.1.2 供试水稻.....	33
4.1.3 水稻叶片代谢物的提取.....	33
4.1.4 水稻叶片代谢物的 GC-MS 检测.....	34
4.1.5 水稻叶片代谢物的 GC-MS 数据分析.....	34
4.1.6 水稻挥发物的收集与鉴定.....	35
4.1.7 水稻叶片游离氨基酸含量测定.....	36
4.2 结果与分析.....	36
4.2.1 水稻代谢组学多元统计分析.....	36
4.2.2 转 <i>cry1C</i> 基因对水稻代谢组学的影响.....	41
4.2.3 感染 RDV 对水稻代谢组学的影响.....	41
4.2.4 代谢组学差异化合物的代谢通路分析.....	45
4.2.5 转 <i>cry1C</i> 基因水稻感染 RDV 后水稻的挥发物分析	46

4.2.6 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后水稻对氨基酸代谢的影响49

4.3 讨论.....52

总 结.....54

 本文的研究特色和创新点.....54

 今后有待继续开展的工作.....55

参考文献.....56

作者简介.....69

第一章 文献综述

1 Bt 水稻的安全性评价研究进展

水稻是世界上最主要的粮食作物之一，超过 30 亿人口以稻米作为主食。中国是世界上最大的水稻种植和稻米消费国，随着我国人口的不断增长，到 2030 年，水稻产量要提高到 7850 公斤/公顷，年产量达 2 亿公斤才能满足国内粮食需求(Chen *et al.*, 2011)。而水稻害虫严重威胁了水稻产量，如二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker)、三化螟 *Scirpophaga incertulas* (Walker)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål、白背飞虱 *Sogatella furcifera* Horváth 等严重影响了水稻的产量和质量，每年因为虫害造成的产量损失高达 15%~25% (程式华和李建，2007)，每年水稻螟虫就可以造成了 3.1% 的稻谷损失，经济损失高达 115 亿人民币(盛承发等，2003)。

目前，主要是依靠化学防治对水稻螟虫进行防治，通过喷施杀虫剂在一定程度上可以控制螟虫的危害，保证水稻产量。但是由于水稻螟虫抗药性的产生(Qu *et al.*, 2003, He *et al.*, 2007, 陈文明等，2009)，化学农药的使用量不断加大，不仅破坏了当地的生物多样性，导致很多次要害虫大爆发，同时也造成了环境污染、农药残留等重要问题。随着现代生物学技术的不断发展，迫切需要培育新的抗虫品种，提高作物本身的抗虫性和耐害性，降低虫害对水稻产量和质量的影响。

1.1 Bt 水稻的研究概况

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性细菌，可以产生杀虫晶体蛋白，这种 Bt 蛋白被同靶标昆虫，特别是被鳞翅目的害虫取食后，在昆虫肠道内经过中肠蛋白酶的消化，被降解为活性蛋白，而这种活性蛋白与中肠膜受体结合后，可以在细胞膜上形成孔道，引起细胞溶解，最终导致昆虫死亡(Bravo *et al.*, 2011)。Bt 蛋白作用具有高效和专一性，同时避免对环境的污染，所以是目前是世界上应用最为广泛的抗虫基因之一。

杨虹等(1989)将 Bt 基因导入台北—309 水稻中，获得了首例转 Bt 基因粳稻。到目前为止，国内外已经获得了很多转 Bt 基因的水稻品种 (Fujimoto *et al.*,

1993; High *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011), 有的材料已进入生产试验阶段, 显示了良好的抗虫效果(Huang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Sui *et al.*, 2011, Han *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014)。2009 年农业部给两种转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因的水稻品种“华恢 1 号”和“汕优 63”颁发了安全证书, 2014 年, “华恢 1 号”和“汕优 63”再次获得农业部颁发的安全证书, 允许其在湖北省进行为期五年的生产性试验 (Clive, 2015)。

从 1996 年, 转基因作物初次商业化, 到 2014 年, 全球转基因作物的种植面积增加了 100 多倍, 转基因作物在全世界 29 个国家的数百万农民中获得了前所未有的采用率, 累计种植面积超过 1.8 亿公顷。Klumper 和 Qaim (2014) 综合分析了世界各地农场调查或者田间试验得出的数据, 分析结果表明: 转基因技术降低了 37% 的农药使用率, 提高了 22% 的作物产量, 农民利润增加 68%。根据 *Bt* 水稻产业化所带来的潜在效应分析得知: 种植 *Bt* 水稻之后, 预计农药的使用量减少 80%, 农药的费用开支节约 87%, 产量可增加 6~9%, 同时可避免农药对农民健康所带来的负面影响 (Huang *et al.*, 2005)。

虽然转 *Bt* 水稻的种植有很多优点, 但关于转基因作物的安全性及存在的风险一直没有定论, 科学技术是一把双刃剑, 对于 *Bt* 水稻潜在的生态风险和食品安全也不容忽视。

1.2 *Bt* 水稻的生态安全性研究进展

目前对于转基因植物的安全性评价主要集中在两个方面: 一个是食品安全性, 另一个是生态安全性。水稻作为主要的粮食作物, 转基因水稻的食用安全引起了公众的广泛关注, 目前, 对于食品安全的评价主要是根据实质等同性原则。对于生态环境的安全性评价, 主要集中在基因漂移风险、对非靶标生物和生物多样性的影响, 以及靶标害虫的抗性等方面。下面将重点就 *Bt* 水稻的靶标害虫的抗性问题和在非靶标生物的影响方面评价的相关进展总结如下:

1.2.1 靶标害虫对 *Bt* 水稻的抗性

Bt 水稻的靶标害虫是二化螟、三化螟、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* Guené 和大螟 *Sesamia inferens* (Walker), 与使用化学杀虫剂或抗虫作物品种一样, 在长期的选择压力下, *Bt* 水稻可能导致靶标害虫对其产生抗性, 从而影响 *Bt* 水

稻的可持续利用。

目前,就转基因抗虫水稻而言,靶标害虫尚未产生抗性,但对其可能性已有过相关报道。Han 等(2006)通过 F1/F2 生测法分析了二化螟对 Cry1Ac 毒蛋白的耐受性,结果表明二化螟对毒蛋白的敏感性在个体间产生了明显的变异,其中有 1.5%的二化螟被认定为不敏感个体,其发育进度与对照之间没有显著差异,而且存活率超过 70%,这说明靶标害虫对 *Bt* 水稻具有潜在的抗性风险。

1985 年,McGaughey (1985)通过室内筛选的方法,首次报道了印度谷螟 *Plodia interpunctella* Hübner 对 *Bt* 制剂产生抗性;1990 年,小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 首次在田间条件下被发现对 *Bt* 制剂产生了抗性 (Tabashnik *et al.*, 1990)。目前,在田间至少有 7 种害虫对 *Bt* 杀虫蛋白产生了抗性 (Matten *et al.*, 2008; Tabashnik *et al.*, 2008; Tabashnik *et al.*, 2009; Kruger *et al.*, 2009; Bagla, 2010; Downes *et al.*, 2010)。在室内条件下,至少有 2 种甲虫、4 种蝇类和 10 种蛾类对 *Bt* 蛋白都产生了抗性,而且抗性还在增强 (Tabashnik *et al.*, 2011)。害虫抗性产生的原因主要是昆虫中肠细胞上受体的突变造成的 (Bravo *et al.*, 2011)。

有学者预测,靶标害虫对 *Bt* 植物的抗性问题的,将成为制约其应用和推广的重要因素 (Gould, 1998),因此开展靶标害虫对 *Bt* 水稻的抗性风险评估和治理具有重要意义。

目前已经有多个延缓害虫抗性产生的防治策略 (Bates *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2002),其中庇护所策略和基因聚合策略是最为广泛应用的。庇护所策略的基本原理是在 *Bt* 作物周围种植部分非 *Bt* 作物,使之成为敏感害虫的庇护所,敏感个体与抗性个体随机交配,产生的杂合体后代不能在 *Bt* 植株上存活,从而达到治理害虫的目的。但是就我国水稻目前种植的现状来说,这一方法很难实现。一方面是因为水稻的分散、小农户种植方式,无法保证一定比例的非转基因水稻做为庇护所;另一方面水稻上靶标害虫的寄主范围比较小,在水稻种植区域中没有足够的其他作物可以成为庇护所 (Cuong and Cohen, 2002; Cohen *et al.*, 2008)。

基因聚合策略是指在同一种作物品种里表达至少两种没有交互抗性的 *Bt* 蛋白或者其他来源的抗虫基因。对水稻来说,较为常用的 *Bt* 基因主要是 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ab/cry1Ac*,研究表明 *Cry1Ab* 蛋白与 *Cry1Ac* 蛋白之间存在交互抗性。因此,通过转 *cry1Ab/vip3H* 和 *cry1Ab+CpTI* 基因的水稻得以培育 (Zhao *et al.*,

2004; Tang *et al.*, 2006)。同时, 相对于单一 *Bt* 基因的水稻来说, 采用不同 *Bt* 基因聚合的水稻对二化螟具有更好的抗性 (Yang *et al.*, 2011)。因此, 基因聚合策略更适合国内水稻害虫的抗性治理。

1.2.2 *Bt* 水稻对非靶标植食者的影响

目前, 在水稻生态系统中, 叶蝉、飞虱和蓟马都是主要的非靶标植食者, 虽然 *Bt* 蛋白本身对于刺吸式害虫没有毒性, 但是 *Bt* 基因的插入, 可能会影响水稻体内基因的表达, 从而改变水稻的农艺性状、营养组分、代谢途径、挥发性物质等, 这些非预期效应最终可能会影响到以水稻为食的非靶标植食者。其次, *Bt* 水稻的种植, 会导致靶标害虫减少, 农药的使用量也会减少, 稻田生态系统中的种间竞争会减弱, 从而可能会影响非靶标害虫的发生。

前人在 *Bt* 水稻对于非靶标害虫的影响上做了大量评估, 其结果表明: 不同水稻材料、不同植食者导致最终结果可能有所不同。主要可以总结为三类:

第一类, *Bt* 水稻对于非靶标害虫的发生有抑制作用。Chen 等 (2012) 试验表明: 转基因水稻 KMD2 在连续 4 个世代内对褐飞虱的产卵量有显著的抑制作用, 并且这种抑制作用随着世代的增加而加剧, 同时, 在田间调查中也发现, KMD2 上褐飞虱若虫的密度显著低于其非转基因对照秀水 11。Akhtar 等 (2013) 分析了 6 个 *Bt* 水稻材料 (含 *cry1Ab* 或 *cry1Ab/cry1Ac* 基因) 对稻蓟马 *Stenchaetothrips biformis* (Bagnall) 的影响, 室内实验结果表明: 取食 *Bt* 水稻后, 稻蓟马的若虫发育历期和产卵前期显著延长, 产卵期、雌虫寿命和产卵量显著缩短; 在田间条件下, *Bt* 水稻对稻蓟马的种群密度也有抑制作用。

第二类, *Bt* 水稻对于非靶标害虫的发生有促进作用。周霞等 (2005) 研究表明, 在转基因抗虫水稻克螟稻 2 号田间调查中, 黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 的种群密度比其非转基因对照秀水 11 高出约 1 倍。室内研究表明, 取食克螟稻 1 号的黑尾叶蝉的雌成虫寿命、产卵期均显著长于对照, 以克螟稻 2 号为食的黑尾叶蝉种群内禀生长率是对照秀水 11 的 4~8 倍。Lu 等 (2014) 发现转基因水稻 T2A-1 和 T1C-19 上黑尾叶蝉的产卵前期较非转基因亲本明恢 63 显著缩短, 同时 T2A-1 上的黑尾叶蝉若虫存活率显著提高。

第三类, *Bt* 水稻对于非靶标害虫的发生没有显著影响。Chen 等 (2010) 的研究表明, 转 *cry1Ab* 基因水稻对灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén、褐飞虱和

白背飞虱的发生量和种群组成均无显著影响,不会引起飞虱种群的爆发。**Mannakkara** 等 (2013) 研究结果表明:3 种 *Bt* 水稻 (含 *cry1Ac*、*cry2Aa*、*cry1Ca* 基因) 对褐飞虱的雌雄发育历期、存活率、体重和寿命均没有显著影响,同时多个与免疫、解毒和消化的相关基因表达水平也没有显著变化。从以往的研究结果可以看出:不同的水稻品种、非靶标植食者类型与实验条件可以得到正的、负的或者没有影响。

1.2.3 *Bt* 水稻对自然天敌和有益昆虫的影响

自然天敌可以分为捕食者和寄生者两类,在农田生态系统中为控制害虫种群数量起到重要作用。*Bt* 水稻所表达的 *Bt* 蛋白长期存在农田生态系统中,*Bt* 蛋白可能被植食性昆虫取食后传递给自然天敌,其中影响天敌的主要方式有两种:一种是直接影响,天敌直接寄生或取食在含有 *Bt* 蛋白的寄主、植物组织、花粉或猎物;另外一种是间接影响,因为对 *Bt* 蛋白敏感的猎物或寄主一般会在发育、个体大小和营养成分上发生变化,进而可能影响到下一营养级的生物 (**Romeis et al.**, 2006)。

Tian 等 (2010, 2012) 用取食 *Bt* 水稻的褐飞虱若虫饲喂拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* Boes. et Str. 与食虫瘤胸蛛 *Ummeliata insecticeps* Boes. et Str., 发现其存活率、发育历期和繁殖力与非转基因对照组无显著差异。**Han** 等 (2015) 用取食转 *cry2Aa* 基因水稻的褐飞虱饲喂草间钻头蛛 *Hylyphantes graminicola*, 结果表明:其体内没有发现 *Cry2Aa* 蛋白累积的现象,同时其发育历期、繁殖力、存活率均没有发生显著变化,在三年田间调查中,草间钻头蛛在转 *cry2Aa* 基因水稻和非转基因对照田间的种群密度与动态均没有显著差异。

Wang 等 (2012) 利用纯的 *Cry2A* 毒蛋白和转 *cry2A* 基因水稻的花粉来评价 *Bt* 蛋白对中华通草蛉的影响:结果表明成虫的产卵前期、生殖力和成虫干重与对照之间没有显著差异。**Han** 等 (2014) 分析了转 *cry1Aa* 基因水稻 T2A-1 对黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis* 的影响,实验从饲喂含有 *Cry1Aa* 蛋白的人工饲料、饲喂取食过 T2A-1 水稻的褐飞虱和田间调查三个方面进行考察,结果表明转 *cry1Aa* 基因对寄生蜂的发育历期、雌雄比、体重,田间种群密度等参数均没有显著影响。

Wang 等 (2015a) 利用膳食暴露评估的方法分析了 *Cry1C* 和 *Cry2A* 蛋白对

蜜蜂的影响, 结果表明: 饲喂两种 *Bt* 蛋白并不会对蜜蜂的若虫发育历期、成虫体重、存活率、羽化率等生物学参数和蛋白酶、胰蛋白酶、氨基酸酶等酶的活性产生显著影响。Li 等 (2015) 研究表明: 龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 取食转 *cry1C* 和 *cry2A* 基因水稻花粉后, 其若虫发育历期显著延长, 但存活率、体重、繁殖力等生物学参数均没有显著变化; 在饲喂含有 *Cry1C* 和 *Cry2A* 蛋白的油菜花粉后, 也没有对龟纹瓢虫的各项生物学参数均产生显著影响。

1.2.4 *Bt* 水稻对土壤生物的影响

土壤生物是土壤生态系统的重要组成部分, 其多样性是保持生态系统稳定的基础, 转基因作物的种植可能会对根际生物的土壤环境产生影响, 进而影响到整个土壤生态系统的功能。目前, 在外源基因的表达产物对土壤的影响中, 以转 *Bt* 基因作物表达产物 *Bt* 蛋白的研究为主。

转基因作物中外源基因的表达产物主要通过以下三种途径进入土壤中: 一是通过植株残茬进入 (毕江涛等, 2009), 目前秸秆还田技术得到普遍应用, *Bt* 水稻遗留残茬会向土壤中释放 *Bt* 杀虫蛋白; 二是通过花粉释放, *Bt* 基因会在花粉中表达 *Bt* 蛋白, 进而通过花粉飘落进入土壤之中 (Wu *et al.*, 2002; 黄威等, 2009); 三是通过根系分泌, *Bt* 水稻根系的分泌物可能会影响土壤本身的理化性质, 进而对土壤养分的有效性产生影响。

转 *Bt* 基因作物的长期种植可能会引起 *Bt* 毒素在土壤生态系统中富集, 最终影响到土壤生物的多样性和土壤生态学过程 (Morra, 1994)。祝向钰等 (2013) 分析了 *Bt* 水稻对土壤生物的影响, 与非转基因对照相比, 转 *Bt* 基因会导致土壤中个别跳虫类群的消失, 也对半土生类群、真土生和土壤中跳虫总量产生了显著影响。关潇等 (2015) 采集了水稻不同生育期的土壤样品, 分析 *Bt* 水稻 (HHI 与 *Bt*-SY63) 种植对土壤微生物群落的影响。结果表明, 与非转基因对照组 (MH63 与 SY63) 相比, *Bt* 水稻田中土壤微生物总量差异不显著, 虽然转 *Bt* 基因水稻根际土壤中的真菌、细菌、放线菌随季节变化有明显变化趋势, 但转基因组与非转基因对照组之间不存在显著差异。

戚琳等 (2015) 研究表明, 转 *Bt* 基因水稻对土壤性质的影响在水稻不同生育期和微域会有变化。与秀水 11 相比, *Bt* 水稻克螟稻的凋落物际土壤中可溶性有机氮的含量在苗期和拔节期均显著提高, 而凋落物际土壤铵态氮含量在苗期显

著降低，但凋落物际与交互微域土壤的铵态氮含量在成熟期均显著提高。

2 水稻普通矮缩病的研究进展

2.1 水稻普通矮缩病基本概况

水稻普通矮缩病(Rice dwarf disease)病原为水稻矮缩病毒(Rice dwarf virus, RDV)。寄主主要为禾本科植物，常见的有水稻(*Oryza sativa* L.)、看麦娘(*Alopecurus aequalis* Sobol.)、早熟禾(*Poa annua* L.)、野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)、雀稗(*Paspalum thunbergii* Kunth ex Steud.)等(顾永林, 2012)。

RDV 最初于 1883 年在日本发现，而后传入韩国、朝鲜、尼泊尔和菲律宾等地。在我国初次报道是在 20 世纪 30 年代，而后发病面积不断扩大，1971 年，仅浙江省因 RDV 导致的水稻产量损失高达 2.6 亿公斤，发病面积超过 1000 万亩。RDV 对水稻生产有严重的影响。

RDV 属于呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)，植物呼肠孤病毒属(*Phytoreovirus*)。其病毒基因组是由蛋白质和 12 条超卷曲的双链 RNA 组成，体外存活时间为 48 h，病毒粒体主要集中在病叶的褪绿部分。

2.2 水稻普通矮缩病的危害与发病规律

2.2.1 水稻普通矮缩病的危害症状

水稻在苗期至分蘖期易感病，发病初期，新叶叶脉附近出现黄绿色或黄白色的斑点，随后沿叶脉开始延伸，形成线状的断续条点。发病后期，植株会明显矮缩、分蘖增加成簇状、叶片僵硬、颜色浓绿、节间缩短、根系也会发育不良。在孕穗期感病，会在剑叶和叶鞘上出现点条状病斑，穗颈缩短、包穗或抽小穗，结实率千粒重明显降低，甚至不能结实。(阮义理等, 1981; Kimura *et al.*, 1987; 游秀梅等, 2007)。

2.2.2 水稻普通矮缩病的侵染循环

水稻矮缩病毒可以由黑尾叶蝉、电光叶蝉 *Recilia dorsalis* 和 二点黑尾叶蝉 *Nephotettix virescens* 传播，其中以黑尾叶蝉为主。感染病毒的黑尾叶蝉终身可以传播病毒，病毒可经过卵传给子代，传毒效率高达 85%。RDV 不能通过植株之

间接触、机械接种或者花粉和种子进行传播 (Fukushi *et al.*, 1962)。黑尾叶蝉最短只需 5 min 即可通过吸食感病植株获毒, 黑尾叶蝉获毒后需要经过病毒循环期才能传播病毒 (阮义理等, 1981)。

2.2.2 水稻普通矮缩病的发病规律

水稻普通矮缩病的初侵染源一般来自越冬代的带毒成虫, 晚稻收割后, 获毒的 3、4 龄叶蝉若虫在越冬寄主上生活至翌年 4 月, 羽化为成虫。在单季稻区, 叶蝉会继续留在沟边看麦娘、稗草或冬闲田等禾本科植物上, 并繁殖第 1 代, 6 月上中旬, 田块翻耕后, 这些叶蝉就迁飞到单季稻秧田为害传毒。在单双季混栽或双季稻地区, 冬板田或绿肥田翻耕后, 叶蝉迁飞到早稻秧田中为害传毒, 待早稻收割时又迁飞到连晚秧田和早插连晚本田上, 晚稻收割后病毒继续在黑尾叶蝉体内越冬, 如此循环往复 (顾永林, 2012)。

3 代谢组学在植物代谢研究中的应用

自上世纪 90 年代以来, 随着生命科学研究的发展, 出现了许多新的概念和技术。而代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后, 系统生物学的另一重要研究领域。代谢组学 (Metabonomics/Metabolomics) 旨在研究生物体或组织, 甚至单个细胞的全部小分子代谢物组分及其动态变化 (Nicholson *et al.*, 1999; Fiehn *et al.*, 2000)。代谢物距生物表型最接近, 也是基因与表型之间的桥梁 (Fiehn, 2002)。代谢组学不仅可以揭示基因的功能, 也为生物技术的应用提供了科学依据。

3.1 代谢组学简介

代谢组学定义有 Nicholson 提出的“metabonomics”和 Fiehn 提出的“metabolomics”两种, 虽然两者的拼写及侧重点稍有不同, 但其本质都是从整体上研究生物体的代谢产物 (Nicholson *et al.*, 1999; Fiehn *et al.*, 2000)。当前, 对于代谢组学的定义为: “对某一生物、组织或细胞中所有低分子量 (通常指分子量<1000) 代谢产物进行定性和定量分析的一门科学” (刘贤青等, 2015)。代谢组学以生物系统中的代谢产物做为研究对象, 主要针对相对分子质量小于 1000 的小分子, 通过高通量、高分辨率、高灵敏度的仪器作为分析手段, 结合

模式识别的化学计量学方法,分析生物体受到刺激或干扰后,代谢产物含量、种类的变化或其随时间的变化规律(胡正青等,2010)。代谢组学研究的主要任务是:代谢物的通路分析、代谢物的定性和定量分析、差异代谢物的查找、代谢物的变化规律分析及这些变化规律与所发生的生物学事件之间的联系。

3.2 代谢组学研究技术

3.2.1 基于核磁共振平台(Nuclear magnetic resonance, NMR)的代谢组学技术

NMR 技术是代谢组学研究中应用最早、最为常见的技术之一(Eisenreich and Bacher, 2007; Ward *et al.*, 2007)。NMR 技术对样品的需求量少,前处理也非常简单,但能够提供代谢产物的浓度、结构、分子动力学及相互作用等分子信息,如。同时,NMR 技术也是现有唯一能用于活体和原位研究的技术,NMR 的不足之处是分辨率不高、灵敏度低,很不利于对大量组分的分析。

3.2.2 基于色谱—质谱平台的代谢组学技术

基于质谱的代谢组学分析技术可以分为气相色谱质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)和毛细管电泳色谱质谱联用(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)。这3种色谱—质谱联用分析技术分别适合检测不同极性和类别的代谢物(Bedair and Sumner, 2008)。

GC-MS 是代谢组学研究中应用比较早的分析技术,GC-MS 在样品分析过程中,首先得到较好分离的是易挥发和热稳成分,然后洗脱成分经过电子轰击、质谱检测。比较适用于分析小分子、能气化、热稳定、易挥发的化合物。GC-MS 的优点是有较高的分辨率和灵敏度,有可利用的质谱数据库,方便后期的物质鉴定,易于使用且较为经济。但对难挥发性物质通常需衍生化处理,处理过程繁琐。近年来,飞行时间(Time-of-Flight, TOF)类质谱发展迅速。通过串联 TOF 类质谱,可以针对每一个碎片离子进行高分辨检测,大大提高了检测速度和定性的准确度(段礼新等,2015)。

和 GC-MS 相比,LC-MS 技术以液相色谱作为分离系统。在进样前不需要衍生化处理,适合不易衍生化、不稳定、不易挥发和分子量较大的化合物。LC-MS 的灵敏度和选择性都较好,但没有 GC-MS 那样完备的数据库,导致分析的时间

相对较长,需依赖纯的参照物,在物质的定性和定量上都没有 GC-MS 方便。LC-MS 在植物次级代谢产物(生物碱、酚酸、硫代葡萄糖苷、类黄酮、苯丙素、多胺等)分离分析中得到广泛应用(De Vos *et al.*, 2007)。

与其他类型联用技术相比,CE-MS 具有更高的分离速度和效率,而且样品和试剂需求量少,分析速度快,近年来在代谢组学的研究中越来越受到重视(Garcia-Canas *et al.*, 2011)。

3.3 植物代谢组学的应用

3.3.1 代谢组学在逆境胁迫中的应用

凡是对植物生长发育产生不利影响的条件统称为逆境或胁迫,其中包括生物胁迫和非生物胁迫。植物在长期进化中,形成了一系列生理、代谢以及防御系统来应对逆境胁迫,以维持其生命和持续生长。通过代谢组学可以监测植物面临外界胁迫后产生的代谢变化,进一步揭示植物抗逆的分子机制。

Bailey 等(2003)分析了高镉胁迫对麦瓶草(*Silene cucubalus*)细胞代谢组学的影响。结果表明,与空白对照相比,镉胁迫显著提高了麦瓶草细胞中的醋酸盐和苹果酸的含量,但谷氨酸及一些支链氨基酸的含量却显著降低。

Fumagalli 等(2009)对盐胁迫和干旱条件下的 Arborio 和 Nipponbare 水稻进行了代谢组学分析,通过 NMR 和 H-1 高分辨率魔角旋转(HRMAS)的方法分别测定了水稻根部和地上部分的代谢变化。结果表明,两个水稻品种对两种胁迫均表现出氨基酸和糖类积累,其中,Arborio 对两种非生物胁迫更敏感,两种化合物的积累也比 Nipponbare 植株高。

3.3.2 代谢表型差异研究

代谢组学技术可以用来分析植物不同生长阶段、种植环境、组织的代谢表型差异,在对植物的品质评价、组织特异性和品种判别研究等方面有重要意义。

Fiehn(2003)对笋瓜(*Cucurbita maxima*)的叶片和叶柄脉管进行 GC-MS 分析,共得到了 400 多个峰,通过与标准质谱数据库比对,鉴定出 90 种化合物,并比较氨基酸、糖等代谢物在笋瓜叶片与叶柄脉管之间存在的差别。

Baniasadi 等(2014)将 50 个不同的玉米品种种植于 6 个地点,通过 LC-MS 同时评估了种植环境和遗传背景对于玉米谷粒和饲料的影响,最终发现,种植环

境在玉米谷粒上的影响大于遗传背景所导致的,同时遗传环境对玉米饲料中代谢变化的影响比玉米谷粒更大。

3.3.3 植物基因功能鉴定和辅助育种

Matsuda 等(2010)分析了过表达 *OASA1D*(α -subunit of anthranilate synthase) 基因水稻幼苗的代谢组学变化,研究表明,基因过表达后的幼苗中色氨酸大量积累,在新叶中含量相对较高,同时吲哚类代谢物也显著上调;但对于其他代谢物含量没有显著影响。

Chen 等(2014)利用代谢组学和全基因组关联分析,定位了多个与代谢物含量自然变异相关的位点。进而获得一批控制植物生长(激素、核苷酸等)、逆境生理(生物碱、萜类、酚胺等)和营养品质形成(绿原酸、类黄酮和氨基酸等)等过程相关的候选基因。并鉴定了部分基因的功能,解析并重构了与水稻营养成分和抗逆性相关的重要代谢途径。

3.3.4 转基因植物安全性评价

代谢组学不仅能分析外源基因表达产物的变化情况,也能揭示转基因植物在代谢水平上的各种非预期效应,是客观评价转基因作物和转基因技术安全性的有效新技术。

Zhou 等(2012)通过抗虫水稻的代谢轮廓谱分析发现,组织培养对代谢物轮廓谱的改变比基因插入的影响更显著;Chang 等(2012)同时分析了环境和转基因两个因素对于对转双价抗虫基因稻米代谢图谱的影响,结果表明环境对于代谢组学的影响更大;Kim 等(2013)比较了转基因水稻与非转基因对照体内的 52 种极性化合物,研究结果表明,二者代谢物图谱基本相同。

Frank 等(2012)将转基因玉米与其非转基因对照分别种植在不同季节和地点,系统的研究了转基因和环境条件对玉米代谢轮廓谱的影响。结果显示,在南非和德国生长的转基因玉米与对照相比,代谢物轮廓谱差异仅为 3%和 4%,而环境因素(包括生长季节及生长地方)对代谢物轮廓谱的影响较大,分别达到 10%和 42%,从中可见环境影响远大于转基因带来的影响。

Kusano 等(2015)利用 GC-MS、LC-MS、CE-MS、ICR-MS 等多种分析方法对已育种多年的传统大豆品种与耐草甘膦大豆品种进行代谢组分析,结果表明,根据代谢物的不同可以鉴定出大豆样品的品种,基因转移对代谢物的影响不如育

种时长的影响大,从而可以看出基因转移不是代谢差异的主要原因。

4 本研究的目的和意义

水稻是重要的粮食作物,水稻的产量和质量关系到国家的粮食安全。转 *Bt* 基因水稻材料的培育为提高水稻抗虫性提供了新途径,转基因技术的应用是否会带来潜在的危害,尤其是作为主食的水稻而言,更是引起了公众的关注。在以往的研究中,大部分研究仅分析了转 *Bt* 基因单一因素对水稻的影响,关于逆境条件下,转基因水稻的安全性评估尚不多见。本研究综合了转 *cry1C* 基因和感染 RDV 两个因素对其安全性进行分析,以明确 *Bt* 水稻在感染 RDV 条件下能否对非靶标害虫褐飞虱生物学参数和取食与产卵行为产生影响。

目前,转基因水稻安全性评价主要通过某些特定指标的测定得出,但对于可能存在的非预期效应并不能完整的反映。近年来,随着组学技术的发展,为我们可以全面的,无偏向性了解水稻体内代谢物质提供了可能。通过代谢组学对水稻代谢全谱的检测,我们可以更清晰的了解转 *cry1C* 基因和感染 RDV 对水稻代谢物质的影响。同时,本研究也对水稻的挥发物组分进行检测,全面的分析水稻代谢物质变化。

本研究旨在分析转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后是否会影响非靶标害虫褐飞虱的生物学参数,以及对于水稻代谢物质的影响,以评价转 *Bt* 基因水稻在逆境条件下的安全性,为转基因水稻能否商业化提供科学依据。

第二章 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱取食和产卵选择性的影响

转 *Bt* 基因作物的种植可以为人类带来巨大的经济效益和环境效应，但不可忽视是转基因水稻大面积种植所带来的潜在的环境生态安全问题，包括转基因水稻对靶标生物、非靶标生物和生物多样性的影响等。在转 *Bt* 棉花的大面积种植引起非靶标害虫棉盲蝽的爆发后 (Lu *et al.*, 2010)，转基因作物对非靶标害虫的影响得到了更广泛的关注。对稻田生态系统而言，*Bt* 水稻的引入是否会引起褐飞虱种群发生新的变化同样值得深入探讨。当前大部分研究都集中在转基因本身对于非靶标害虫的影响 (Bernal *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Mannakkara *et al.*, 2013)，逆境条件下转基因水稻对于褐飞虱影响的评估还比较少，本章从个体水平分析抗虫转基因水稻在感染 RDV 的条件下，对其非靶标害虫褐飞虱取食和产卵行为的影响，以评判转 *cry1C* 基因水稻的种植以及感染 RDV 是否有潜在引起褐飞虱为害加重的风险，分析褐飞虱在抗虫转基因水稻田的发展趋势。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉和褐飞虱采集自中国水稻研究所试验田 (富阳)，该试验田近年来无水稻矮缩病发病史。采集回的黑尾叶蝉和褐飞虱在室内分别饲养于感虫水稻品种 TN1 (Taichung Native 1, 籼稻、感虫、为国际标准水稻鉴别品种) 上，连续饲养 3 代后作为供试虫源。室内饲养条件为：温度 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 (明：暗) 14 h: 10 h，湿度 $75 \pm 5\%$ ，光强度 3500~4000 Lux。

2.1.2 供试水稻

水稻品种 T1C-19 是采用农杆菌介导法获得的转基因水稻，表达 *cry1C* 基因。*cry1C* 基因是以野生 *cry1Ca5* 基因的氨基酸作蓝本，根据水稻体内密码子的偏好性来设计，以玉米的 *ubiquitin* 基因作为启动子 (Chen *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006)。

T1C-19 转基因水稻在室内和田间条件下对二化螟、三化螟、稻纵卷叶螟均表现为高抗品种（Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011）。对照水稻是非转基因亲本明恢 63（MH63）。

两种水稻材料均播种于无虫网室内，取 15 日龄左右的稻苗供试验用，移栽后置于控温控光智能人工气候室内培养，利用木村 B 营养液（表 2.1）进行栽种。培养条件为：温度 28℃±1℃，光周期（明：暗）14 h: 10 h，湿度 75±5%，光强度 3500~4000 Lux。

表 2.1 水稻水培营养液配方（Yoshida *et al.*, 1976）

储备液 I	CaCl ₂ : 88.6 g/L; NH ₄ NO ₃ : 91.6 g/L
储备液 II	K ₂ SO ₄ : 71.4 g/L ; NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O: 40.3 g/L
储备液 III	MgSO ₄ •7H ₂ O: 324 g/L
微量元素储备液 IV	MnCl ₂ •4H ₂ O: 1.5 g/L; H ₃ BO ₃ （硼酸）: 0.934 g/L CuSO ₄ •5H ₂ O: 0.031 g/L; 柠檬酸（一水合物）: 11.9 g/L (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O（七钼酸氨）: 0.074 g/L ZnSO ₄ •7H ₂ O: 0.035 g/L; FeCl ₃ •6H ₂ O: 7.7 g/L 以上试剂分别溶解，然后加入 50 ml 浓硫酸，加蒸馏水至 1 L。
配方储备液 1: 1.25 ml/L; 储备液 2: 1.25 ml/L;	
储备液 3: 1.25 ml/L; 微量元素储备液: 1 ml/L	
注：用 NaOH 将 PH 值调至 4.5~5.0，不超过 6.0，稍偏酸无碍。	

2.1.3 带毒黑尾叶蝉种群的建立

在室内条件下，将未感染 RDV 的黑尾叶蝉在 TN1 水稻上连续饲养 3 代后，取 2~3 龄的黑尾叶蝉若虫 200 头，保湿饥饿 2 h，饲喂感染 RDV 的水稻（感病水稻由福建农林大学魏太云老师实验室提供）。饲毒 2 d 后，将黑尾叶蝉转移到健康的 TN1 水稻上饲养 1 周，度过病毒的循环期。随后，选苗龄为 15 d 左右的 TN1 水稻 200 株，分别接入 200 个玻璃试管中（长：25 cm，直径：3 cm），试管底部添加适量的木村 B 营养液，每管种植一株水稻，并按 1~200 进行编号，每管接入度过循环期的黑尾叶蝉 1 头，用海绵塞封口。幼苗每两天更换 1 次，换出的幼苗按编号顺序移栽于人工气候室内，每日观察并记录水稻的发病情况。待水

稻普通矮缩病症状明显后，按对应编号将可以传播 RDV 的黑尾叶蝉收集饲养，建立带毒种群，以供后期攻毒试验使用（陈茂，2005）。

2.1.4 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱取食选择性的影响

分别选取健康的明恢 63 和 T1C-19 水稻主茎各一株，种植于同一圆形塑料盆中，而后置于聚乙烯薄膜塑料制作的笼罩内（直径：18 cm，高：50 cm），每笼接入 15 头保湿饥饿 2 h 的褐飞虱雌成虫，每个处理设置 20 个重复。试验条件同 2.1.1，在接虫 2、4、8、24、48、72 h 后，分别考察各水稻品种上的着虫数。

感染 RDV 的明恢 63 和感染 RDV 的 T1C-19 组，健康的明恢 63 和感染 RDV 的明恢 63 组，健康的 T1C-19 和感染 RDV 的 T1C-19 组的实验处理及方法同上。

2.1.5 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱产卵选择性的影响

按上述取食选择性的方法将四组水稻分别种植于同一圆形塑料盆中，每笼接入 15 头保湿饥饿 2 h 的褐飞虱雌成虫。每个处理设置 20 个重复。产卵 72 h 后将水稻苗取出，于解剖镜下统计每株水稻上的卵块数和各卵块所含的卵粒数，试验条件同上。

2.1.6 数据统计

对感染 RDV 的转 *cry1C* 基因抗虫水稻对褐飞虱取食和产卵选择性数据，采用 DPS 统计软件中的 Student's *t* test 检验进行处理和分析（Tang and Zhang, 2013）。

2.2 结果与分析

2.2.1 转 *cry1C* 基因对褐飞虱取食选择性的影响

褐飞虱对转 *cry1C* 基因水稻 T1C-19 及其亲本的取食选择性结果如图 2.1 所示。通过 *t* 检验分析可知：72 h 内，无论是否感染 RDV，褐飞虱对于转基因水稻 T1C-19 和亲本明恢 63 的取食选择性没有显著性差异 ($p > 0.05$)，转 *Bt* 基因对于褐飞虱的取食选择性没有显著的影响。

通过比较感染 RDV 与未感染 RDV 的水稻处理组可知，感染 RDV 并没有改

变褐飞虱在转基因水稻 TIC-19 和亲本明恢 63 之间的取食选择性(图 2.1)。

2.2.2 感染 RDV 对褐飞虱取食选择性的影响

褐飞虱对感染 RDV 与未感染 RDV 水稻之间的取食选择性结果如图 2.2 所示。通过 *t* 检验分析可知: 72 h 内, 无论是转基因水稻 TIC-19, 还是亲本明恢 63, 是否感染 RDV 对于褐飞虱的取食选择性没有显著性影响 ($p>0.05$)。

通过比较明恢 63 和 TIC-19 处理组结果可知, 转 *cry1C* 基因没有影响褐飞虱在感染与未感染 RDV 水稻上取食选择性的趋势(图 2.2)。

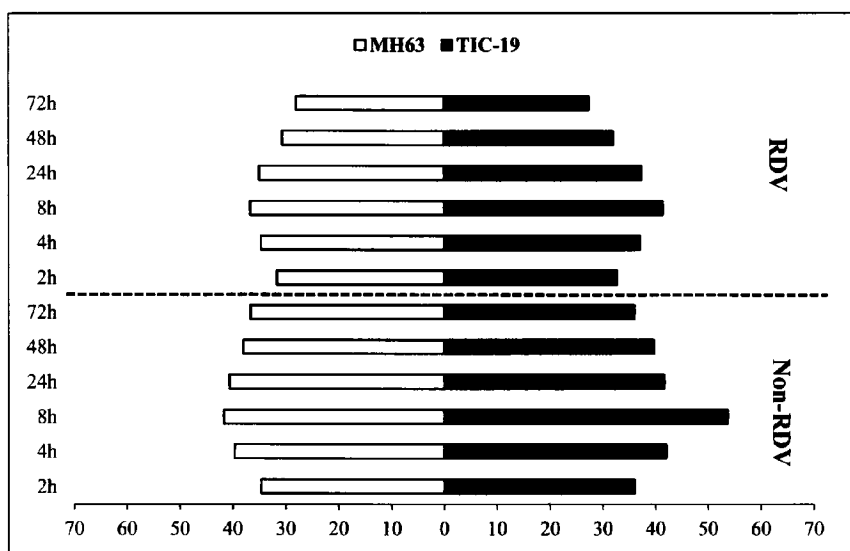


图 2.1 褐飞虱对 *Bt* 水稻 (TIC-19) 及其亲本 (MH63) 的取食选择性

Fig. 2.1 The feeding preference of *N. lugens* between *Bt* (TIC-19) and non-*Bt* rice (MH63)

注:图中数据均为平均数, *示 *t* 测验的结果表明同一时间的数据间存在差异显著 ($p<0.05$)

Note: In the figures, the data are expressed as mean ($n=20$). At the same time, the column marked with the asterisk(*) is significantly different from another one according to Student 's *t*-test ($p<0.05$)

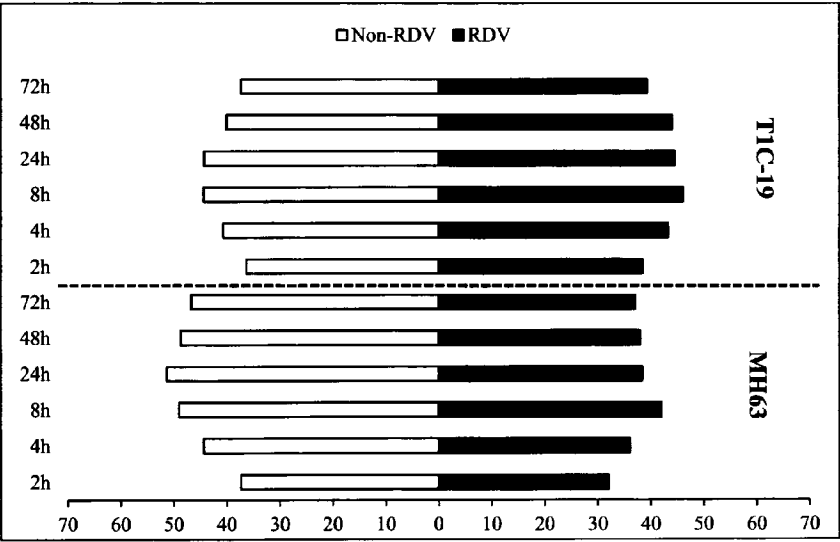


图 2.2 褐飞虱对健康水稻（Non-RDV）及感染 RDV 水稻（RDV）的取食选择性

Fig. 2.2 The feeding preference of *N.lugens* between uninfected（Non-RDV） and RDV-infected（RDV） rice plants

注:图中数据均为平均数,*示 *t* 测验的结果表明同一时间的数据间存在差异显著 ($p<0.05$)

Note: In the figures, the data are expressed as mean (n=20). At the same time, the column marked with the asterisk (*) is significantly different from another one according to Student's *t*-test ($p<0.05$)

2.2.3 转 *cry1C* 基因对褐飞虱产卵选择性的影响

褐飞虱雌虫对转基因水稻 T1C-19 与亲本水稻明恢 63 产卵选择性见表 2.2，通过 *t* 检验分析可知：无论是否感染 RDV，褐飞虱在转基因水稻 T1C-19 上的每雌产卵卵块数、卵粒数/卵块、卵粒总数与非转基因亲本明恢 63 相比，均无显著差异 ($p>0.05$)，转 *cry1C* 基因对于褐飞虱的产卵选择性没有显著的影响，同时感染 RDV 并不能影响褐飞虱雌虫在转基因与亲本水稻之间的产卵选择性。

2.2.4 感染 RDV 对褐飞虱产卵选择性的影响

褐飞虱雌虫对感染 RDV 与未感染 RDV 水稻的产卵选择性见表 2.2，通过 *t* 检验分析可知：褐飞虱雌虫在感染 RDV 的 T1C-19 水稻上的每雌产卵卵块数，

卵粒数/卵块、卵粒总数与未感染 RDV 的 T1C-19 水稻相比, 均无显著差异 ($p>0.05$)。褐飞虱在感染 RDV 的明恢 63 水稻上的每雌产卵卵粒数/卵块显著低于未感染 RDV 的明恢 63 水稻, 但对于每雌产卵卵块数, 卵粒总数没有显著影响。

表 2.2 褐飞虱对健康及感染 RDV 水稻, *Bt* 水稻及其亲本水稻的产卵选择性

Table 2.2 The oviposition preference of *N.lugens* between uninfected and RDV-infected rice, *Bt* and non-*Bt* rice plants

Tested material	No. of egg mass/♀	Egg number/egg mass	Total No. of eggs/♀
MH63	4.31±0.51a	5.86±0.28a	24.31±2.80a
T1C-19	5.02±0.63a	5.17±0.20a	26.12±3.61a
MH63-RDV	3.11±0.39a	3.41±0.16a	11.00±1.47a
T1C-19-RDV	3.36±0.48a	3.63±0.13a	12.37±1.75a
MH63	3.76±0.20a	4.99±0.23a	18.56±1.15a
MH63-RDV	3.80±0.32a	3.78±0.14b	14.67±1.63a
T1C-19	3.97±0.28a	4.34±0.18a	17.27±1.37a
T1C-19-RDV	4.14±0.27a	4.30±0.18a	17.74±1.35a

注：表中数据为平均数±标准误。

Note: the data are means±standard error.

2.3 讨论

本章分别测定了褐飞虱对转 *cry1C* 基因和亲本水稻, 感染 RDV 和健康水稻的取食和产卵选择性。结果表明转 *cry1C* 基因以及感染 RDV 均不会对褐飞虱的取食和产卵选择性产生显著影响。综合各组处理的结果可知: 转 *cry1C* 基因水稻在感染 RDV 的情况下, 不会影响褐飞虱的取食和产卵选择行为。

关于转基因水稻对非靶标害虫选择行为的影响已有一些报道。黄芊等(2013)评估了抗除草剂转基因水稻对褐飞虱取食和产卵行为的影响, 发现褐飞虱在转基因水稻上的取食量、着虫率和产卵选择率与亲本之间均无显著性差异。陈茂等(2004)比较了褐飞虱在转 *SCK* 基因杂交稻恢复系 (MSA) 和转 *cry1Ab* 基因籼

稻 (B1、B6) 及各自亲本对照上的取食与产卵行为, 发现褐飞虱在 MSA 和 B1、B6 上的着虫比率、产卵选择性和产卵量与相应对照明恢 86 和嘉早 935 相比均无显著差异。徐雪亮等 (2015) 研究了转 *cry1Ab/Ac* 基因水稻“赣绿 1 号”对非靶标害虫褐飞虱取食和产卵选择性的影响, 结果表明褐飞虱在“赣绿 1 号”上取食、产卵选择与非转基因亲本均无显著差异。张岚等 (2011) 分析了转 *cry1C* 和 *cry2A* 基因水稻对非靶标害虫灰飞虱的生物学影响, 最终发现两种转基因水稻对灰飞虱的取食和产卵选择均没有显著差异。

昆虫可能是根据其味觉器官得到信号的 (氨基酸浓度等) 强弱, 来选择寄主植物进行取食和产卵, 也可能与稻株叶鞘物理性状和相关挥发或非挥发性物质等有关 (陈茂等, 2003; 俞晓平等, 1990)。以上结果表明, 转 *cry1C* 基因可能没有影响与昆虫选择性相关物质的变化, 转 *cry1C* 基因对于水稻体内及挥发性物质是否产生了影响还需进一步验证。

第三章 转 cry1C 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱生物学特性的影响

在长期的进化过程中, 80%左右的植物病毒病依赖特定的媒介昆虫进行传播 (Hohn, 2007)。植物病毒不仅会对寄主植物的生长和代谢产生影响, 同时也会影响媒介昆虫和以发病植株为食的非介体昆虫。在病毒、昆虫、寄主植物互作中, 对于病毒与介体昆虫之间互作影响的研究较多 (Jiu *et al.*, 2007; 梁莉, 2010; Guo *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012; 韩乃顺, 2015)。在植物病毒对非介体昆虫的影响中, Liu 等 (2010) 研究了中国番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl china virus, TYLCCNV) 对 Q 型烟粉虱生态适应性的影响, 结果表明: 非介体昆虫 Q 型烟粉虱在感染 TYLCCNV 的烟草上取食后, 其产卵量和寿命显著提高。非介体褐飞虱在感染 SRBSDV 的水稻上取食后, 成虫寿命显著缩短, 产卵量显著减少, 种群净增值率、平均世代历期、内禀增长率和周限增长率减少, 种群加倍时间增加 (蒋德春等, 2013)。

水稻螟虫是水稻上的主要害虫, 而转 *Bt* 基因水稻对螟虫有较好的抗性, 但 *Bt* 水稻的种植也可能会促进非靶标害虫种群的增长。黑尾叶蝉取食转基因水稻 T2A-1 和 T1C-19 后, 其产卵前期较非转基因亲本明恢 63 显著缩短, 同时 T2A-1 上的黑尾叶蝉若虫存活率显著提高 (Lu *et al.*, 2014)。在水稻移栽后早中期和中后期, 转基因籼稻 TT9-3 (含 *cry1Ab/cry1Ac* 基因) 田间白背飞虱的若虫密度显著高于对照 IR72 (刘忠诚, 2002)。在水稻生育期后期 (灌浆期和黄熟期), *Bt* 水稻 (含 *cry1Ab* 和 *cry1Ac* 基因) 上褐飞虱的种群密度显著提高 (Wang *et al.*, 2010)。

本研究将水稻普通矮缩病毒 (rice dwarf virus, RDV) 和转 *cry1C* 基因结合起来评价转基因水稻感染病毒后对非靶标害虫褐飞虱的影响, 旨在探明感染 RDV 后, 转基因水稻对非介体昆虫褐飞虱的影响, 为逆境条件下转基因水稻安全性评价提供理论依据。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉和褐飞虱采集自中国水稻研究所试验田（富阳），该试验田近年来无水稻矮缩病发病史，采回来的黑尾叶蝉在室内饲养于感虫品种 TN1 水稻上，连续饲养 3 代后用作试验。室内饲养条件同 2.1.1。

3.1.2 供试水稻

供试水稻材料为转 *cry1C* 基因的抗虫水稻 T1C-19 和其非转基因亲本对照明恢 63 (MH63)，水稻材料播种在无虫网室内，而后移栽到室内，在控温光智能人工气候室培养，其中培养条件同 2.1.2。取苗龄为 60 日的稻苗供试验用。

感染 RDV 水稻的获取：选苗龄为 15 日左右的上述水稻材料，分别接入已编号的大试管中（长：25 cm，直径：3 cm），每管一株水稻，试管底部添加适量的木村 B 营养液。每管分别接入感染 RDV 的黑尾叶蝉 4~5 龄若虫 1 头，用海绵塞封口，取食 48 h 后移栽于人工气候室内，待水稻达 60 日龄，选取 RDV 症状明显的稻株待用。

3.1.3 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱发育的影响

实验设置为健康明恢 63 (MH63)、感毒明恢 63 (MH63-RDV)、健康 T1C-19 (T1C-19)、感毒 T1C-19 (T1C-19-RDV)，共 4 个处理，每个水稻处理 64 个重复。将 60 日龄的 4 个处理的水稻苗洗净后，分别移入底部有适量木村 B 营养液的试管内，每个试管一株水稻，并接入 24 h 内的褐飞虱初孵若虫 1 头，接入若虫后用海绵塞封口。每日观察和记录褐飞虱各龄若虫期的发育和存活情况。待若虫羽化后，鉴定性别，并分别从各个处理水稻上随机选出雌雄成虫各 10 头，称量体重。试验在人工气候室内进行，条件同 2.1.1。

3.1.4 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱繁殖的影响

将同一水稻处理上饲养的雌雄成虫进行配对，并转移到新的试管中，每管一对，每天更换水稻苗并查看是否开始产卵，统计产卵前期。待飞虱开始产卵后，

每天更换一次水稻苗, 换下的水稻苗在解剖镜下记录产卵粒数, 若雄虫死亡, 雌虫存活, 及时补充新的雄虫, 直至雌虫死亡。每个处理 15 个重复, 试验条件同上。

3.1.5 数据分析

褐飞虱的发育历期、产卵量、初羽化成虫鲜重的分析采用 SPSS 软件中的一般线性模型 (GLM) 分析, 进一步用 Student's *t* test 对转基因与非转基因、带毒与不带毒进行两两比较。若虫存活率采用 SPSS 中的 Kaplan-Meier 进行分析。生命表参数: 内禀增长率 (r_m)、周线增长率 (λ)、净生殖率 (R_0)、世代平均历期 (T)、种群加倍时间 (DT) 的计算和显著性分析基于 (Maia *et al.*, 2000) 采用 jackknif 方法 (Hulting *et al.*, 1990) 所编写的 SAS 程序, 对所有的显著性分析 $\alpha=0.05$ 。

3.2 结果与分析

3.2.1 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱生长发育的影响

褐飞虱取食四个不同处理水稻后生长发育情况见表 3.1。是否感毒和水稻类型对褐飞虱生物学参数影响的统计分析见表 3.2。水稻类型 (*Bt* vs non-*Bt*) 对褐飞虱的卵历期、除 3 龄若虫期外的各若虫期及雌雄若虫总历期均有显著影响 ($p<0.05$)。褐飞虱取食 *Bt* 水稻 TIC-19 较取食亲本 MH63 的 2 龄若虫期、4 龄若虫期、5 龄若虫期、雄若虫历期、雌若虫历期均显著延长。取食感染 RDV 的 TIC-19 较感染 RDV 的 MH63 的卵历期、3 龄若虫期显著延长, 但 1 龄若虫期显著缩短 (表 3.3, $p<0.05$)。

RDV 病毒 (RDV vs non-RDV) 对褐飞虱 5 龄若虫期和雄若虫总历期有显著影响 (表 3.2, $p<0.05$)。褐飞虱取食感染 RDV 的 MH63 水稻后: 卵历期、3 龄若虫期显著缩短, 4 龄若虫期、5 龄若虫期、雄若虫龄期显著延长。褐飞虱取食感染 RDV 的 TIC-19 水稻后: 只有卵历期显著延长, 其他参数无显著变化。

转 *cry1C* 基因与 RDV 二者综合因素对褐飞虱的卵历期、3 龄若虫期、4 龄若虫期、5 龄若虫期、雄虫若虫总历期具有显著影响, 对于其他的生物学参数没有

显著影响($p>0.05$)。

3.2.2 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱繁殖的影响

水稻品种 (*Bt* vs non-*Bt*)、RDV 病毒 (RDV vs non-RDV)、转 *cry1C* 基因与 RDV 二者综合因素对褐飞虱的产卵量影响不显著。其中感染 RDV 水稻上的产卵量均高于健康水稻上的产卵量,但尚未达到显著差异。 t 测验的两两比较表明,4 组水稻对比中的产卵前期、产卵量、产卵期都没有显著差异($p>0.05$)。

表 3.1 褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 *Bt* 水稻 T1C-19 和其亲本 MH63 对褐飞虱发育历期及繁殖的影响
 Table 3.1 Development duration and fecundity of *N.lugens* reared on MH63, MH63-RDV, T1C-19, T1C-19-RDV under laboratory conditions

Parameters	MH63		MH63-RDV		T1C-19		T1C-19-RDV	
	Mean±SE	n	Mean±SE	n	Mean±SE	n	Mean±SE	n
Egg duration (days)	8.77±0.09	166	8.52±0.09	169	8.79±0.08	191	9.15±0.10	137
Eggs hatching rate (%)	85.22±8.54	12	75.47±6.97	18	83.46±7.91	14	80.99±8.54	12
1st instar nymph (days)	3.00±0.07	56	3.14±0.06	57	2.97±0.06	62	2.92±0.06	63
2nd instar nymph (days)	2.14±0.07	52	2.26±0.07	57	2.36±0.07	61	2.36±0.07	61
3rd instar nymph (days)	2.29±0.07	51	2.07±0.06	57	2.23±0.06	60	2.27±0.06	60
4th instar nymph (days)	2.30±0.08	46	2.58±0.08	57	2.70±0.08	57	2.52±0.07	60
5th instar nymph (days)	3.73±0.08	45	4.10±0.08	51	4.29±0.07	56	4.23±0.07	56
Total nymph duration of females (days)	14.22±0.23	23	14.57±0.21	27	15.05±0.18	37	14.89±0.21	26
Total nymph duration of males (days)	12.71±0.23	21	13.79±0.19	24	13.85±0.23	19	13.77±0.19	30
Fresh body weight of female adults (mg)	2.32±0.14	10	2.23±0.12	13	2.18±0.13	11	2.35±0.13	12
Fresh body weight of male adults (mg)	1.28±0.04	10	1.31±0.03	11	1.33±0.03	12	1.40±0.04	10
Female longevity (days)	16.59±1.91	17	22.18±1.68	22	17.50±1.44	30	17.58±1.81	19
Male longevity (days)	21.57±2.04	14	18.83±1.80	18	18.75±1.91	16	20.26±1.59	23
Pre-oviposition period (days)	2.50±0.23	18	2.35±0.22	20	2.25±0.25	16	2.47±0.26	15
Oviposition period (days)	15.21±2.27	14	19.32±1.95	19	13.27±2.20	15	14.33±2.20	15
Fecundity (eggs/female)	232.64±51.15	14	327.26±43.91	19	198.67±49.41	15	262.40±49.41	15

注：表中数据为平均数±标准误。

Note: the datas are means±standard error

表 3.2 影响褐飞虱生物学参数因子的方差分析

Table 3.2 Variance analysis of factors affecting the biological parameters of *N.lugens* s

Parameters	Rice type ^a		RDV ^b		Rice lines * RDV ^c	
	F	P	F	P	F	P
Egg duration (days)	13.76	<0.001	0.40	0.527	11.69	0.001
Eggs hatching rate (%)	0.06	0.815	0.58	0.449	0.21	0.652
1st instar nymph (days)	3.98	0.047	0.55	0.46	2.20	0.14
2nd instar nymph (days)	5.58	0.019	0.88	0.349	0.88	0.349
3rd instar nymph (days)	1.20	0.275	2.37	0.125	4.31	0.039
4th instar nymph (days)	4.68	0.032	0.33	0.564	8.80	0.003
5th instar nymph (days)	21.11	<0.001	4.34	0.039	7.84	0.006
Total nymph duration of females (days)	8.36	0.005	0.10	0.752	1.28	0.260
Total nymph duration of males (days)	5.85	0.018	5.90	0.017	6.42	0.013
Fresh body weight of female adults(mg)	0.01	0.941	0.09	0.760	1.02	0.319
Fresh body weight of male adults(mg)	3.90	0.055	2.29	0.139	0.41	0.527
Female longevity (days)	1.16	0.286	2.72	0.102	2.58	0.112
Male longevity (days)	0.14	0.707	0.11	0.740	1.33	0.253
Pre-oviposition period (days)	0.08	0.782	0.02	0.890	0.58	0.448
Oviposition period (days)	2.58	0.114	1.43	0.236	0.50	0.485
Fecundity (eggs/female)	1.04	0.313	2.66	0.108	0.10	0.752

表 3.3 *Bt* 基因、RDV 病毒在两个水稻品种上对褐飞虱发育历期及繁殖的影响Table 3.3 The effects of *Bt* gene and RDV on development duration and fecundity of *N.lugens*

Parameters	T1C-19& MH63		T1C-19-RDV & MH63-RDV		MH63-RDV & MH63		T1C-19-RDV & T1C-19	
	F	P	F	P	F	P	F	P
Egg duration (days)	2.481	0.826	0.160	<0.001	0.358	0.045	0.150	0.005
Eggs hatching rate (%)	0.674	0.858	0.456	0.659	4.002	0.383	0.089	0.834
1st instar nymph (days)	0.003	0.754	2.853	0.004	0.042	0.146	1.179	0.572
2nd instar nymph (days)	22.224	0.019	3.400	0.309	8.242	0.131	0.473	1.000
3rd instar nymph (days)	1.906	0.525	18.233	0.015	19.907	0.015	0.504	0.701
4th instar nymph (days)	1.613	0.001	2.924	0.542	2.648	0.018	1.150	0.080
5th instar nymph (days)	0.044	<0.001	3.792	0.229	1.015	0.001	1.199	0.608
Total nymph duration of females (days)	0.019	0.005	0.026	0.230	0.140	0.325	0.115	0.551
Total nymph duration of males (days)	0.774	0.001	0.062	0.934	0.023	0.002	0.556	0.937
Fresh body weight of female adults (mg)	0.835	0.334	1.371	0.561	0.307	0.699	0.033	0.161
Fresh body weight of male adults (mg)	1.114	0.241	0.013	0.138	0.918	0.565	0.075	0.123
Female longevity (days)	0.013	0.700	3.141	0.075	1.014	0.052	0.634	0.970
Male longevity (days)	1.784	0.340	<0.001	0.544	1.245	0.262	0.345	0.580
Pre-oviposition period (days)	0.304	0.381	0.172	0.765	2.812	0.622	0.105	0.575
Oviposition period (days)	0.504	0.540	5.515	0.086	0.467	0.235	0.475	0.683
Fecundity (eggs/female)	0.000	0.571	1.650	0.388	3.612	0.216	1.371	0.298

3.2.3 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱种群生命表参数的影响

从表 3.4 可以看出, 感染 RDV 的转 *cry1C* 基因水稻对褐飞虱种群的内禀增长率 (r_m)、净生殖率 (R_0)、世代平均历期 (T)、种群加倍时间 (DT)、周限增长率 (λ) 5 个种群参数都没有显著性的影响。

感染 RDV 水稻上取食的褐飞虱内禀增长率 (r_m) 比不带毒水稻上的小, 但都大于 0, 说明种群数量呈上升的趋势, 同样, 各处理的周限增长率都大于 1, 说明此条件下种群呈增长趋势。

若虫期的存活率曲线见图 3.1。从图中可以看出, 感染及未感染 RDV 水稻 T1C-19 及其亲本 MH63 上饲养的褐飞虱若虫具有相似的存活率 ($P=0.146$), 四个处理之间的若虫存活率无显著差异。

褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 T1C-19 及亲本 MH63 的年龄特征存活率、平均日产卵量见图 3.2 和图 3.3, 从图中可以看出, 褐飞虱在不同水稻处理上的年龄特征存活率和平均日产卵量具有相似的趋势。

表 3.4 褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 *Bt* 水稻 T1C-19 和其亲本 MH63 的生命表参数

Table 3.4 Life table parameters of *N.lugens* fed on MH63, MH63-RDV, T1C-19, T1C-19-RDV under laboratory condition

Parameters	MH63	MH63-RDV	T1C-19	T1C-19-RDV
r_m	0.2012±0.0025a	0.1988±0.0011a	0.2105±0.0020a	0.2004±0.0016a
λ	1.2228±0.0030a	1.2199±0.0013a	1.2343±0.0025a	1.2219±0.0020a
R_0	92.67±4.76a	151.96±5.90a	119.18±6.25a	106.29±4.71a
T (d)	22.56±0.37a	25.33±0.24a	22.79±0.26a	23.36±0.16a
DT (d)	3.44±0.04a	3.48±0.02a	3.29±0.03a	3.46±0.03a

All life table parameters were calculated using an SAS program written by Maia *et al.* (2000) using the Jackknife method. Mean ±SE in the same row followed by the same letters are not significantly different at $P=0.05$.

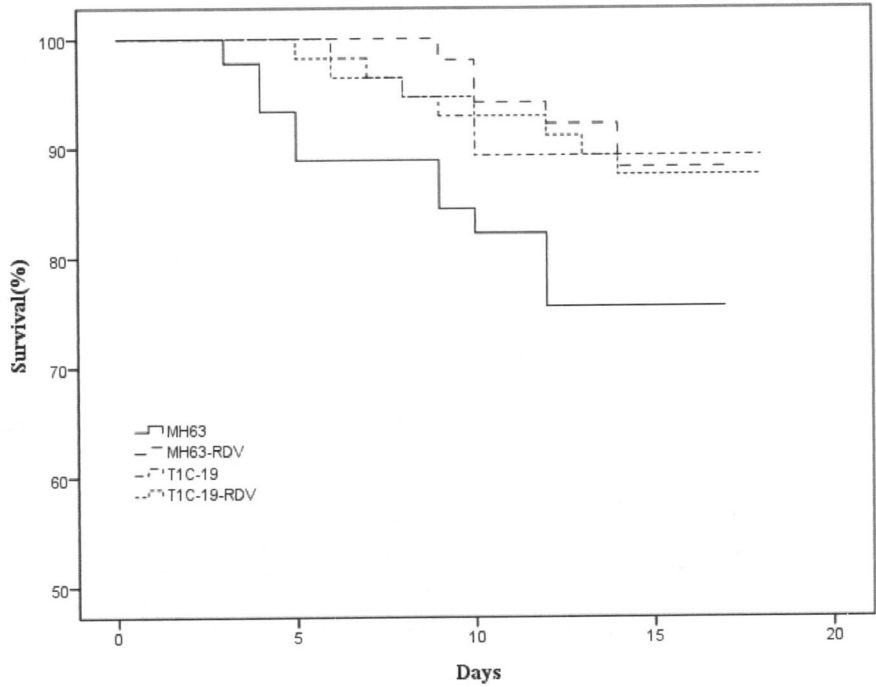


图 3.1 褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 *Bt* 水稻 T1C-19 和其亲本 MH63 的若虫期存活率

Fig. 3.1 Survival of *N.lugens* nymphs over a 20-day period when fed on MH63, MH63-RDV, T1C-19, T1C-19-RDV.

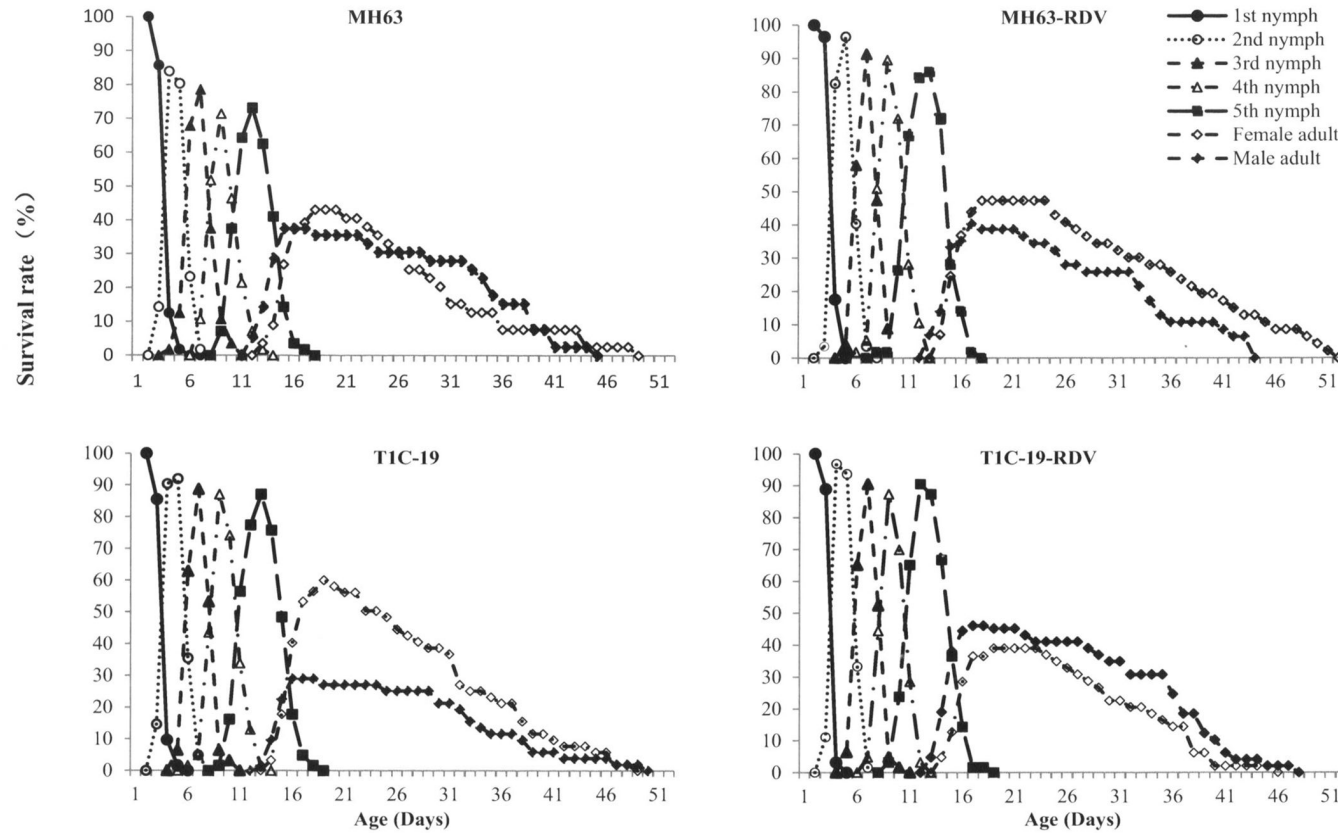


图 3.2 褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 *Bt* 水稻 TIC-19 和其亲本 MH63 的年龄特征存活率

Fig. 3.2 Age-specific survival rate of *N. lugens* reared on MH63, MH63-RDV, TIC-19, TIC-19-RDV under laboratory conditions

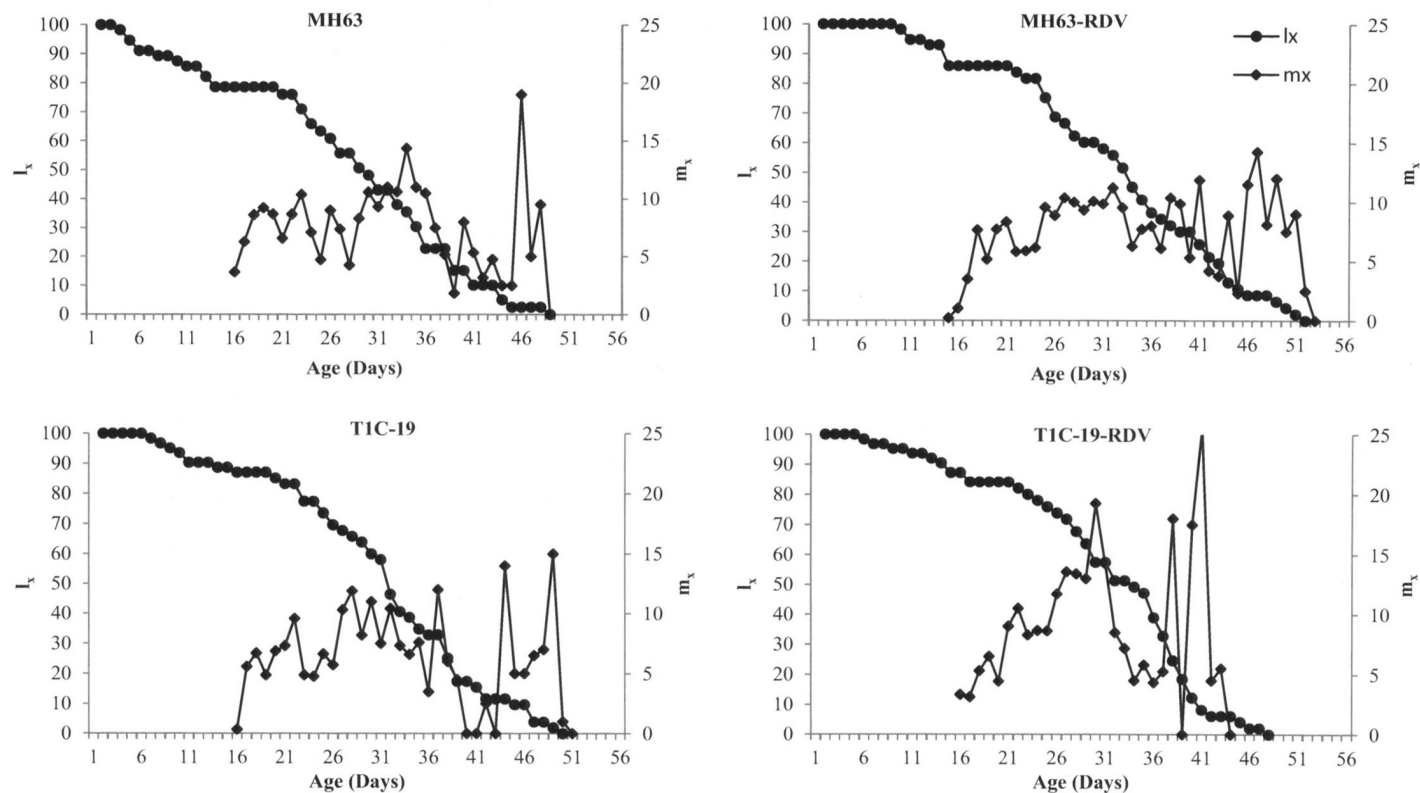


图 3.3 褐飞虱取食感染及未感染 RDV 的 *Bt* 水稻 T1C-19 和其亲本 MH63 的年龄特征存活率和产卵量

Fig. 3.3 Age-specific survivorship (l_x) and age-specific fecundity (m_x) of *N. lugens* reared on MH63, MH63-RDV, T1C-19, T1C-19-RDV under laboratory conditions

3.3 讨论

通过在室内条件下测定了四个水稻处理对褐飞虱生物学特性的影响, 研究表明, 水稻品种 (*Bt* vs non-*Bt*) 与 RDV 病毒 (RDV vs non-RDV) 仅对褐飞虱的卵历期和若虫发育历期产生了影响, 但对褐飞虱的若虫存活率、雌雄寿命、产卵量等其他指标都没有显著影响。同时, 从褐飞虱的生命表种群参数上可以看出, 各处理水稻之间也是没有显著差异的。

前人在 *Bt* 水稻对不同非靶标害虫的影响上做了大量的研究后发现, 不同水稻材料对褐飞虱的影响有一定的差异。Wang 等(2010)发现在转基因水稻 Shanyou 63 (含 *cryIAb* 和 *cryIAc* 基因) 的生长后期, 褐飞虱的种群数量显著高于对照。Chen 等(2012)研究了转基因水稻 KMD2 对褐飞虱生物学参数和田间种群密度的影响, 结果表明, *Bt* 水稻对褐飞虱的产卵量有抑制作用, 而且在 4 个世代内, 抑制作用不断增加, 田间调查也发现 KMD2 上的褐飞虱种群密度显著下降。Lu 等(2015)研究表明, 转 *cryIC* 和 *cry2A* 基因水稻 (T1C-19 和 T2A-1) 仅对褐飞虱 4 龄若虫发育历期有显著影响, 对褐飞虱其他发育历期及蜜露量均无显著影响。由于 *Bt* 蛋白对于褐飞虱等非靶标害虫没有直接的毒性, 因此不同影响的产生可能与 *Bt* 基因的插入所导致的非预期效应有关。

在田间生态系统中, 非介体昆虫和介体昆虫往往取食同一寄主, 而且大部分的植食性昆虫都是病毒的非介体 (Hill, 1987), 研究水稻病毒对于非介体昆虫的影响对于了解田间种群变化有重要的意义。何晓婵等(2011)发现褐飞虱在感染水稻黑条矮缩病毒 (rice black streak dwarf virus, RBSDV) 的水稻上取食后, 若虫存活率和种群数量上升, 体内的保护酶 SOD 和 POD 活性显著提高。RBSDV 还会导致非介体白背飞虱的雌成虫寿命和卵历期显著缩短。同时, 在自然条件下, 感染 RBSDV 的水稻有助于褐飞虱和白背飞虱种群的扩大 (Xu *et al.*, 2014)。

转 *cryIC* 基因的非预期效应和感染 RDV 都有可能影响水稻本身的农艺性状、营养物质、挥发性化合物等方面, 进而影响到稻田系统中的生物群落, 本章结果表明, 转 *cryIC* 基因水稻感染 RDV 后不会对褐飞虱生物学特性产生明显的影响, 但转 *cryIC* 基因和感染 RDV 是否会引起水稻本身代谢物质物质的变化仍需进一步探讨。

第四章 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后水稻的代谢物质分析

随着转基因作物的商业化和大面积种植,有关其非预期效应和生态安全的研究成为热点。外源基因的导入,除了诱导产生预期的效果外,作物基因组的改变还可能会导致转录、代谢水平的变化,进而影响水稻代谢物质种类和含量的变化(易小平等, 2015)。近年来,转录组学、蛋白质组学和代谢物组学等组学技术被应用转基因作物安全性评价中。Wang 等(2015b)通过基因芯片分析了转基因水稻 KMD2 与对照之间基因表达的差异,发现多条与植物激素相关的基因表达水平发生变化,水稻叶片的 LC/MS 分析结果表明:相对于非转基因对照, KMD2 水稻体内的吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)、茉莉酸(Jasmonic acid, JA)含量显著下降,水杨酸(Salicylic acid, SA)、赤霉素(Gibberellin, GA₁)、脱落酸(Absciscic acid, ABA)含量显著上升。由于基因和蛋白表达的微小变化会在代谢物上得到放大,因而从代谢组学上对转基因作物进行检测更容易(赵艳等, 2013)。Kim 等(2013)利用 GC-MS 技术分析了类胡萝卜素合成途径改良后水稻种子的代谢组分,分析了包括有机酸、氨基酸、糖醇和胺类等 52 种极性化合物的含量,发现转基因水稻与其亲本之间代谢物图谱基本等同。

除了植物体内代谢物变化会影响田间生态系统,植物挥发物也是寄主植物与植食性昆虫进行交流的重要介体物质,挥发物组分的变化可以对寄主昆虫的取食、产卵等行为产生影响,同时也会影响到天敌昆虫的寄主选择(刘清松等, 2014)。转基因植物挥发物组分和含量的变化,可能会干扰三级营养层间的化学信息通讯,进而影响生物群落结构和农田生态系统稳定性。在对逆境条件下转基因作物挥发物分析上,大部分研究集中在昆虫诱导后挥发物的变化(Dean and De Moraes, 2006; Blassioli Moraes *et al.*, 2011; Turlings *et al.*, 2005; Schuler *et al.*, 1999; Hagenbucher *et al.*, 2014), 但结果不尽相同。

水稻既是重要的粮食作物,也是田间生态系统的重要组成部分。转 *Bt* 基因所导致的非预期效应可能会引起水稻体内代谢物和挥发物的变化,进而会影响到整个生态系统。本研究评估了转 *cry1C* 基因以及在感染 RDV 的胁迫下,对水稻叶片代谢组学和挥发物产生的影响,为转基因水稻能否商业化提供科学依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 供试昆虫

黑尾叶蝉采集自中国水稻研究所试验田（富阳），该试验田近年来无水稻矮缩病发病史。采集回的黑尾叶蝉在室内分别饲养于感虫水稻品种 TN1 上，连续饲养 3 代后作为供试虫源。其中，饲养条件 2.1.1，感染 RDV 水稻的获取同 3.1.2。

4.1.2 供试水稻

供试水稻材料为转 *cryIC* 基因水稻 T1C-19 和非转基因亲本明恢 63(MH63)，两种水稻材料均播种于无虫网室内。取 15 日龄左右的稻苗，分别接入大试管中（长：25 cm，直径：3 cm），每管一株水稻，试管底部添加适量的木村 B 营养液。两种水稻材料分别设置带毒组和健康组，带毒组每管接入 1 头感染 RDV 的黑尾叶蝉 4~5 龄若虫，健康组每管接入 1 头健康的黑尾叶蝉 4~5 龄若虫，用海绵塞封口。相同条件下取食 48 h 后，移栽到人工气候室，待带毒组水稻发病明显，取同一时期的各处理水稻供试验用。培养条件同 2.1.2。

4.1.3 水稻叶片代谢物的提取

- a) 取 50 mg 水稻叶片样本，加入含有 0.4 ml 甲醇-氯仿（3:1）的 2 ml 离心管内，再加入 20 μ l 核糖醇，漩涡混匀。加入钢珠，在研磨仪上 55 Hz 研磨 5 min；
- b) 将离心管置于离心机内，离心 15 min（4°C，12000 rpm）；
- c) 小心地吸取 0.4 ml 上清液，并转移至 2 ml 进样瓶（甲烷硅基化）中；
- d) 每个样本再取等体积上清液于一个新的 2 ml 进样瓶中，混匀后做为质控样本；
- e) 真空浓缩干燥（30°C，1.5 h）
- f) 加入 80 μ l 甲氧胺盐试剂（甲氧胺盐酸盐，溶于吡啶 20 mg/ml），80°C 孵育 20 min；
- g) 加入 100 μ l BSTFA（含有 1% TCMS, v/v），70°C 孵育 1 h；
- h) 冷却至室温，加入 10 μ l FAMES；

i) 混匀, 上机检测。

4.1.4 水稻叶片代谢物的 GC-MS 检测

检测仪器为 Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪 (GC-TOF-MS), 配有 Agilent DN-5MS 毛细管柱。GC-TOF-MS 试验条件如下:

- a) 进样量: 1 μl , 不分流模式;
- b) 载气: 氮气;
- c) 前进样口吹扫流速: 3 ml min^{-1} ;
- d) 柱流速: 1 ml min^{-1} ;
- e) 柱温: 50°C 保持 1 min, 以 10°C 每分钟的速率上升至 330°C, 保持 5 min;
- f) 前进样口温度: 280°C;
- g) 传输线温度: 280°C;
- h) 离子源温度: 220°C;
- i) 电离电压: -70 eV;
- j) 扫描方式: 85-600 m/z ;
- k) 扫描速率: 20 spectra/sec;
- l) 溶剂延迟: 366 s。

4.1.5 水稻叶片代谢物的 GC-MS 数据分析

4.1.5.1 数据前处理

利用 LECO 公司的 Chroma TOF 4.3X 软件和 LECO-Fiehn Rtx5 database 数据库进行峰提取、滤噪、基线校正、峰对齐、解卷积、峰鉴定和峰面积的确定 (Kind *et al.*, 2009)。对于原始数据中的缺失值利用最小值二分之一法进行模拟。通过四分位数极差或四分位间距法对下游数据进行过滤, 再用内标归一法对过滤后的数据进行标准化处理。

4.1.5.2 模式识别

将归一化的数据导入 SIMCA-P+ 软件 (V13.0, Umetrics AB, Umea, Sweden), 进行模式识别多变量分析。首先采用非监督模式的主成分 (PCA) 分析对总体数据进行分析, 观察组间和样本间的关系, 然后通过偏最小二乘法-判别分析

(PLS-DA) 对不同组别之间差异进行观察和筛选, PLS-DA 模型的质量用 7 折交叉验证进行检验, 最后通过正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 过滤掉不相关的正交信号, 从而获得更加可靠的差异性代谢物。

4.1.5.3 差异代谢物的确定及分析

差异化合物的筛选标准为: OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP (Variable Importance in the Projection) 值大于 1, 同时 Student's *t* test 检验中的 *p* 值小于 0.05, 作为我们组间差异性表达代谢物。通过 NIST (<http://www.nist.gov/index.html>) 和 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 对差异代谢物的性质和所参与的代谢途径进一步分析。

4.1.6 水稻挥发物的收集与鉴定

水稻挥发物的收集参照 Turlings (1998) 和 Lou (2005) 的方法, 收集装置有 5 个垂直放置的圆筒状玻璃缸, 底部为开放式, 直径为 10 cm, 高度为 55 cm。收集装置分为进气和出气两部分, 进气口在玻璃缸的顶部, 空气通过气泵进入活性炭管过滤空气杂质, 后经流量计进入玻璃缸内, 出气口靠近玻璃缸的底部, 接有挥发物捕捉管 (吸附剂为 Super Q, 80~100 目), 排出的气体通过流量计和气泵排走。进气端和出气端的流量计分别设定为 400 ml/min 和 300 ml/min, 玻璃缸底部由两个半圆托盘撑住, 水稻茎秆通过托盘中间的圆孔通过。水稻挥发物持续捕集 8 h, 每个处理水稻重复 5 次。挥发物捕集结束后用 200 μ l 重蒸 CH_2Cl_2 淋洗吸附管中的样品到样品瓶中, 将样品瓶密封后, 放在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 待检测。

利用 GC (HP-6890) - MS (HP-5973) 联用仪对不同水稻处理的挥发物组分进行分离与鉴定, 配有 HP-5 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m), 挥发物测定分析参照 (闫锋, 2009):

- a) 进样量: 3 μ l, 不分流模式;
- b) 载气: 99.999% 高纯氦气;
- c) 柱气流量: 1.0 mL/min;
- d) 柱温升温程序: 40 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) 至 250 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), 6 $^{\circ}\text{C}$ /min;
- e) 进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$;
- f) 气谱/质谱接口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$;

g) 电离电压: 70 eV;

通过核对质谱库及标准化合物质谱图的停留时间,对挥发物的各组分进行定性。通过与内标质谱图的峰面积进行比较,对挥发物各组分做相对定量。各处理水稻的挥发物含量差异采用 SPSS 软件中的一般线性模型 (GLM) 分析。

4.1.7 水稻叶片游离氨基酸含量测定

取 1 g 水稻样品加入含有液氮的研钵内,充分研磨,转移到 10 ml 含 3% 碘基水杨酸的水溶液中;室温条件下震荡 1 h 后,离心 15 min (4°C, 10000 rpm);取离心后的上清液过 0.45 μm 的水相滤膜,将过滤后的溶液转入进样瓶,在日立 L-8900 氨基酸分析仪上进行氨基酸含量测定,每个处理 5 个重复。各处理水稻的游离氨基酸含量差异采用 SPSS 软件中的一般线性模型 (GLM) 分析。

4.2 结果与分析

4.2.1 水稻代谢组学多元统计分析

GC-TOF-MS 对于 4 个水稻材料检测的总质谱图如图 4.1,共检测到 1054 个峰,各个水稻材料之间具有相似的质谱峰。对得到的数据进行过滤和标准化处理,最后得到 920 个有效质谱峰。通过与质谱数据库进行对比,有 374 种物质被鉴定出来。

本研究分别对 TIC-19 与 MH63、带毒 TIC-19 与带毒 MH63、带毒 MH63 与 MH63、带毒 TIC-19 与 TIC-19 进行代谢组学比较分析。PCA 分析是一种无监督分析方法,可以把原始数据样品的分布做一个总体呈现,从各组比较的 PCA 图中可以看出:所有样品均处于 95% 置信区间,同一组的水稻样品较为集中,不同组的水稻样本可以明显分开,说明各组比较中的两样本可以明显区分,可以通过后续的判别分析进一步研究其差异 (图 4.2)。

在 PLS-DA 中先将检测样品按照类别进行分组,再进行分析,PLS-DA 对模型的质量用 7 折交叉验证进行检验,各组比较检验结果见图 4.3,显示模型是有效的。为了排除其他因素对试验结果的影响,对 PLS-DA 模型进行正交矫正处理 (OPLS-DA),从图 4.4 可以看出各组比较中的两个样本有明显的分离。

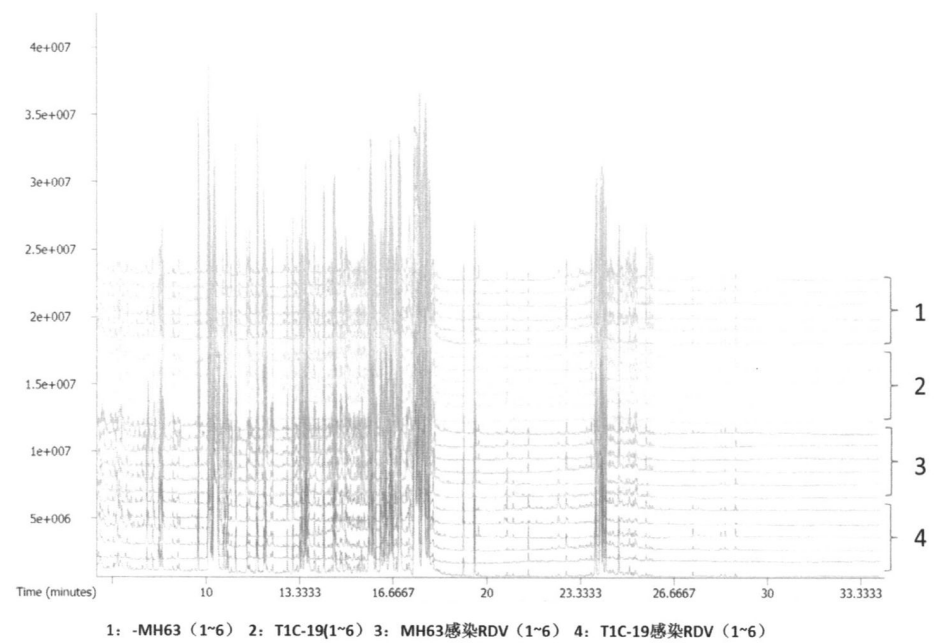


图 4.1 水稻叶片的 GC-TOF-MS 总离子流图

Fig. 4.1 GC-TOF-MS TIC chromatograms of MH63, T1C-19, RDV infected MH63, and RDV infected T1C-19 rice leaf

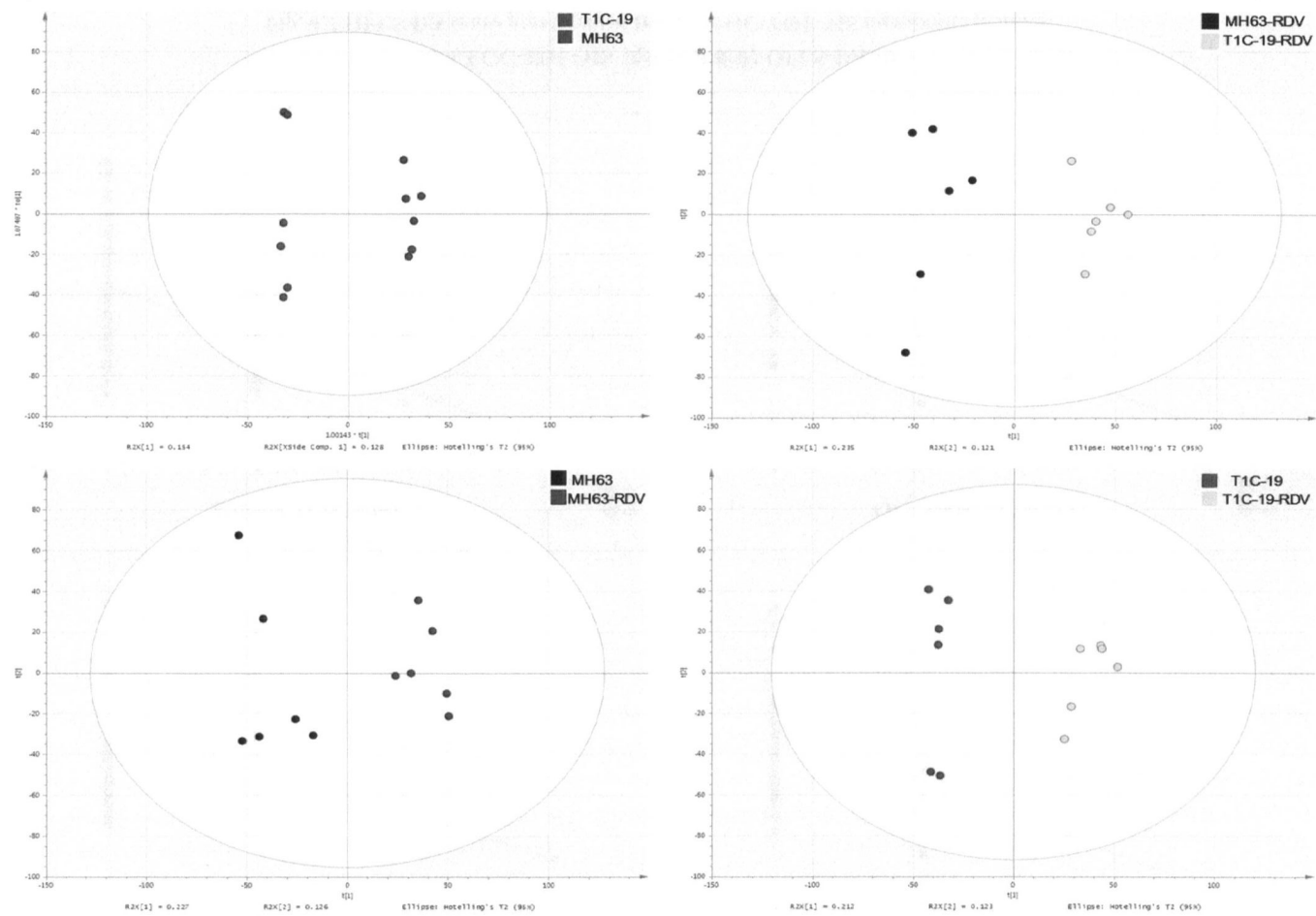


图 4.2 GC-TOF-MS 代谢组分析的 PCA 图
Fig. 4.2 PCA score map derived from the GC-TOF-MS metabolite profiles

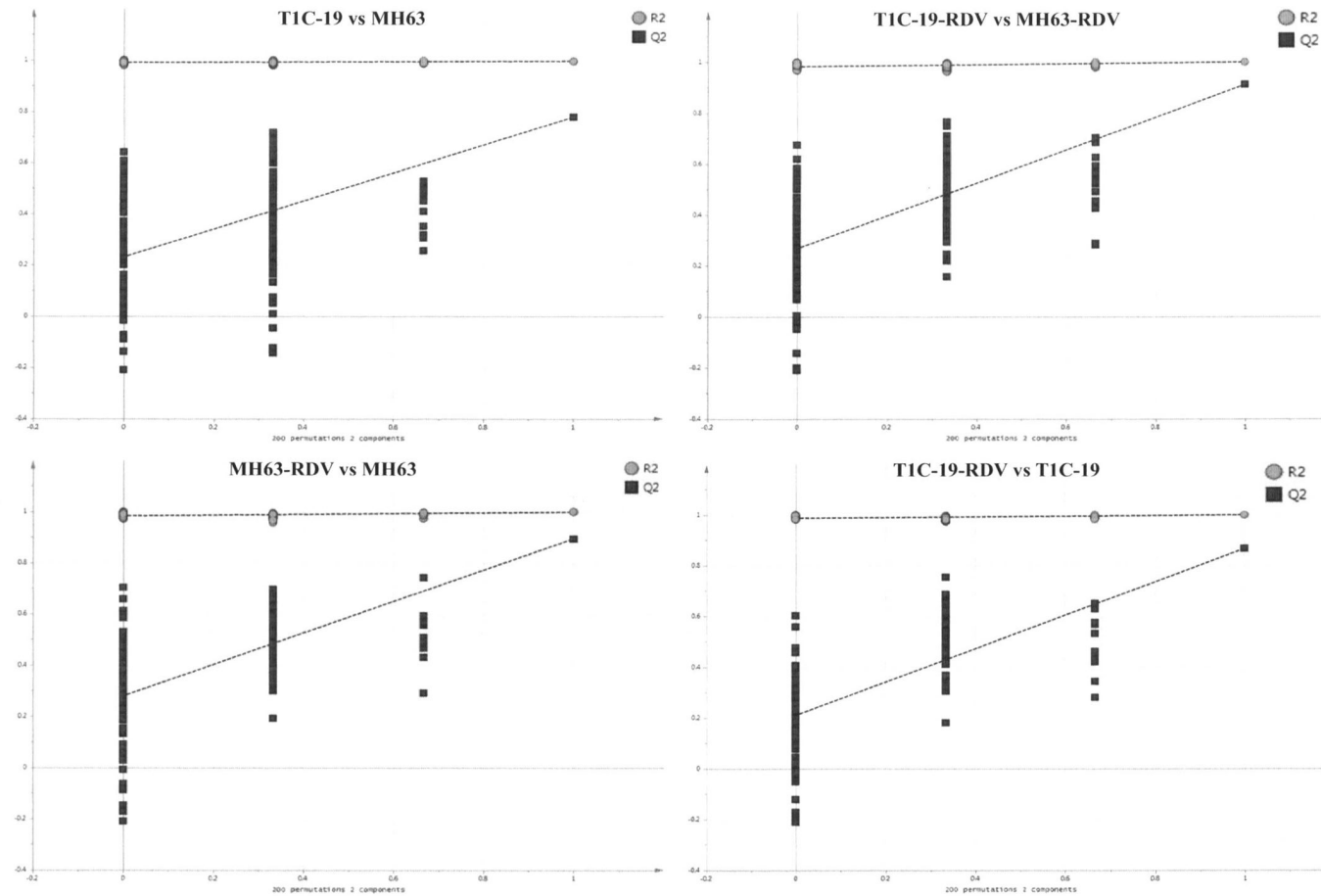


图 4.3 GC-TOF-MS 代谢组分析的 OPLS-DA 图

Fig. 4.3 OPLS-DA score plot derived from the GC-TOF-MS metabolite profiles

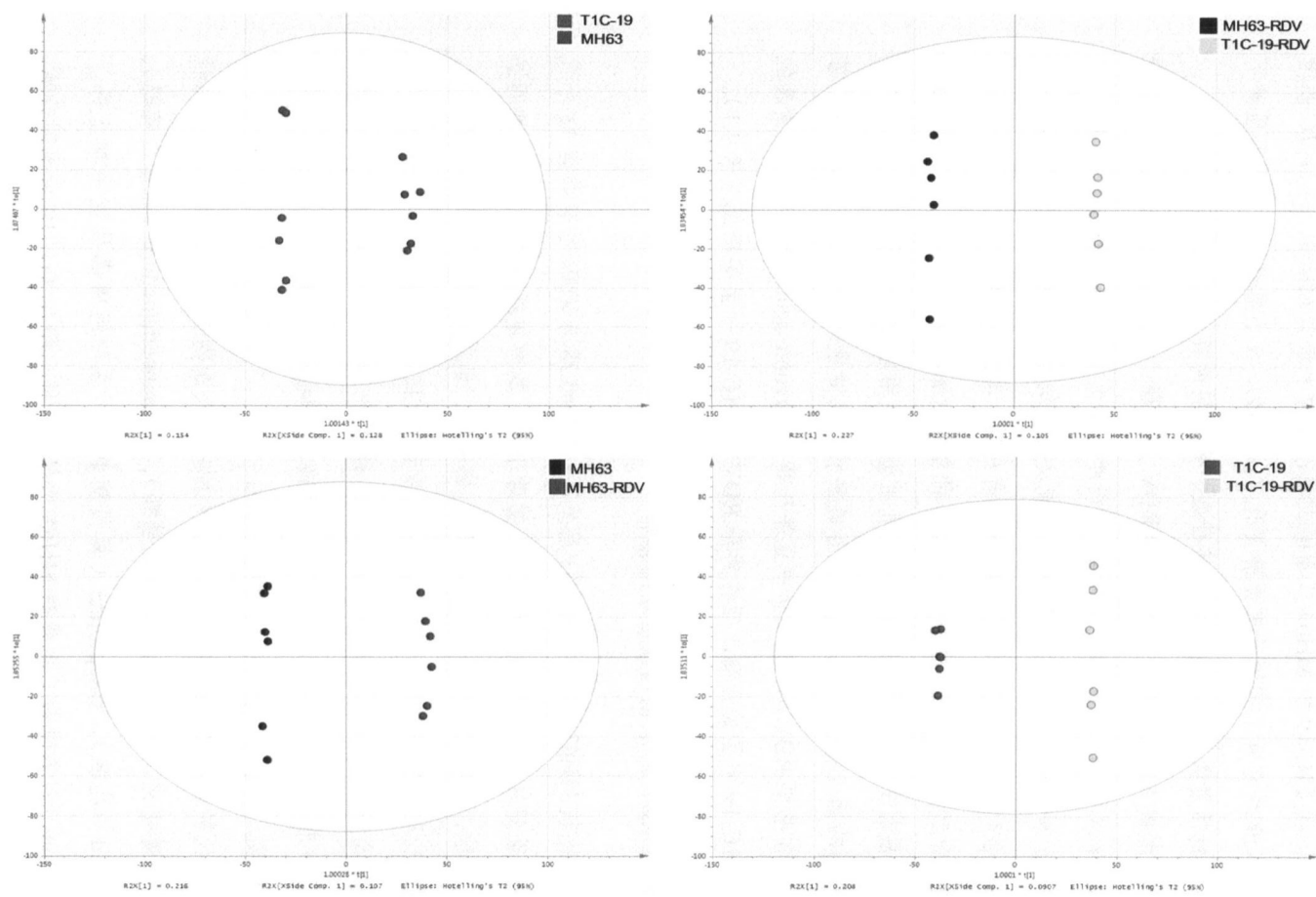


图 4.4 GC-TOF-MS 代谢组分析的 OPLS-DA 模型的置换检验图
Fig. 4.4 Validation plots of PLS-DA derived from the GC-TOF-MS metabolite profiles

4.2.2 转 *cryIC* 基因对水稻代谢组学的影响

通过比较 T1C-19 和 MH63 代谢组发现：相对于亲本 MH63，转 *cryIC* 基因水稻 T1C-19 共有 9 个代谢物有显著变化 ($p<0.05$)，5 个显著上升，4 个显著下降。其中包括糖类 2 种，有机酸、核苷酸、氨基酸类各 1 种，其他 4 种。

通过比较 MH63-RDV 和 T1C-19-RDV 后发现：相对于 MH63-RDV，感染 RDV 的 *Bt* 水稻 T1C-19-RDV 共有 42 种代谢物发生显著变化 ($p<0.05$)，37 种显著上升，5 种显著下降。其中 3 种氨基酸及其类似物，3 种脂肪烃类化合物，2 种芳香化合物，5 种糖类，5 种脂类，5 种有机酸，其他 19 种（图 4.5 和图 4.6）。

通过比较两组处理的差异化合物，3 种差异代谢物在转 *cryIC* 基因后两组处理中都有显著变化，其中 Lactulose（乳果糖）在两组带毒处理中都上升，可能与 *Bt* 基因的插入相关。Glutamine（谷氨酰胺）在健康的 *Bt* 水稻 T1C-19 中显著降低，但在感染 RDV 的 T1C-19 中显著升高。Threonic acid（苏糖酸）在健康的 *Bt* 水稻 T1C-19 中显著升高，但在感染 RDV 的 T1C-19 中显著降低（表 4.1）。

4.2.3 感染 RDV 对水稻代谢组学的影响

通过比较 MH63-RDV 和 MH63 后发现：MH63 感染 RDV 后有共有 18 个代谢物有显著变化，9 个显著上升，9 个显著下降。其中包括 4 种糖类，2 种脂肪烃类化合物，3 种芳香化合物，有机酸、核苷酸、氨基酸类各 1 种，其他 6 种。

通过比较 T1C-19-RDV 和 T1C-19 后发现：T1C-19 感染 RDV 后共有 57 种代谢物发生显著变化，45 种显著上升，12 种显著下降。其中 9 种氨基酸及其类似物，5 种脂肪烃类化合物，2 种芳香化合物，7 种糖类，6 种脂类，1 种核苷酸，2 种有机酸，其他 25 种（图 4.7 和图 4.8）。

通过比较两组处理的差异化合物，7 种差异代谢物在感染 RDV 的两个品种中都有显著变化，Pyrophosphate（焦磷酸）、2-Aminoethanethiol（氨基乙硫醇）、Lactic acid（乳酸）、Oxoproline（氧代脯氨酸）在两组带毒处理中都上升。L-Glutamine（谷氨酰胺）在感病 MH63 中显著降低，但在 T1C-19 中显著升高。2-Deoxyerythritol（1,2,4-丁三醇）、Threonic acid（苏糖酸）在感病 MH63 中显著升高，在 T1C-19 中显著降低（表 4.2）。

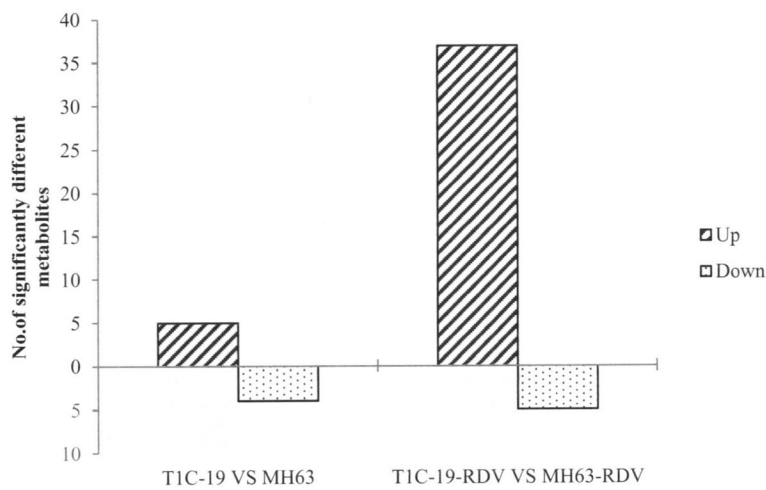


图 4.5 转 *cry1C* 基因后差异代谢物的含量变化情况

Fig. 4.5 The variation of significantly different metabolites content in transgenic *cry1C* rice

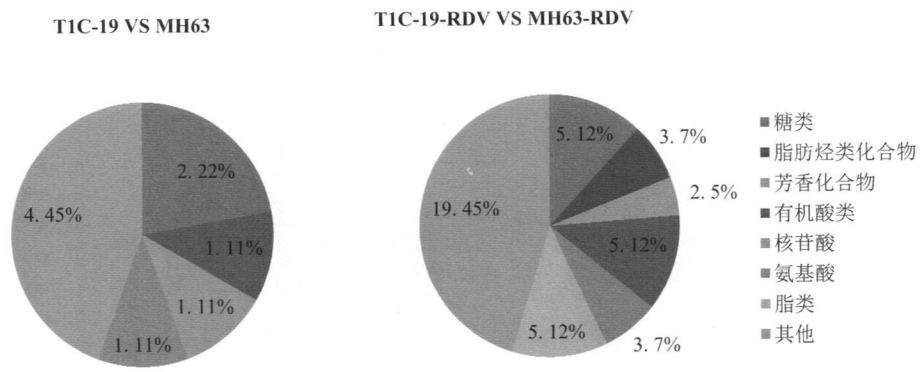


图 4.6 转 *cry1C* 基因后差异代谢物的分类情况

Fig. 4.6 The variation of significantly different metabolites classification in transgenic *cry1C* rice

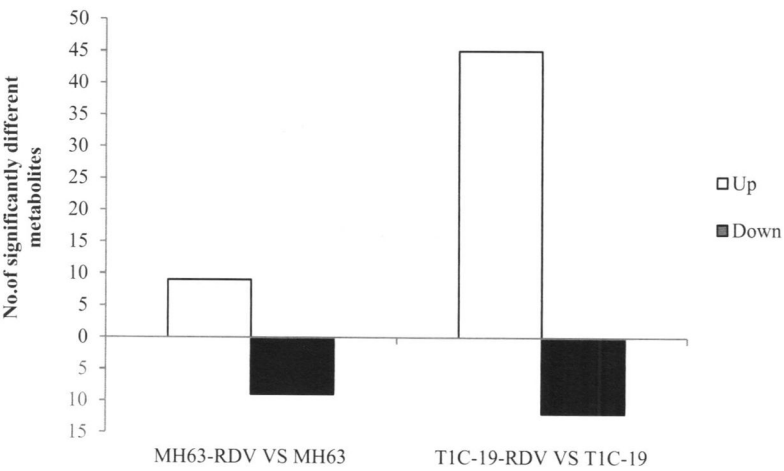


图 4.7 感染 RDV 后差异代谢物的含量变化情况

Fig. 4.7 The variation of significantly different metabolites content in RDV-infected rice

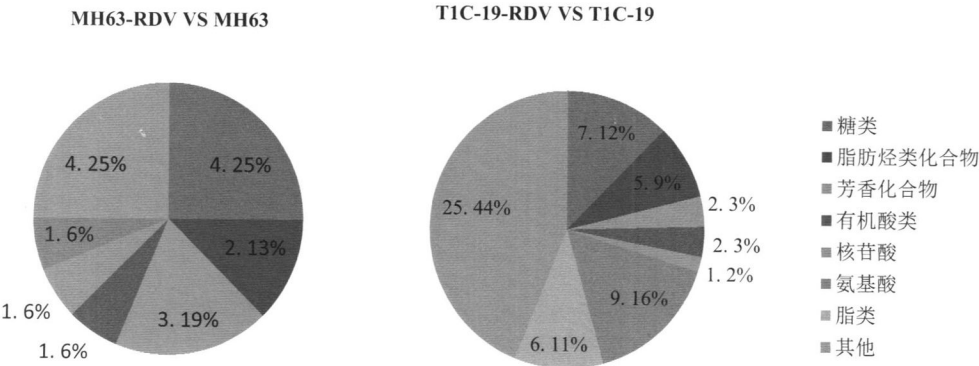


图 4.8 感染 RDV 后差异代谢物的分类情况

Fig. 4.8 The varianion of significantly different metabolites classification in RDV-infected rice

表 4.1 转 *cry1C* 基因引起的水稻代谢物的变化

Table 4.1 The changes of significantly different metabolites in transgenic *cry1C* rice

Peak	中文名	log ₂ foldchange	
		T1C-19 VS MH63	V-T1C-19 VS V-MH63
Lactulose	乳果糖	2.12	27.65
Threonic acid	苏糖酸	20.94	-4.70
Glutamine	谷氨酰胺	-4.08	25.26

表 4.2 感染 RDV 引起的水稻代谢物的变化

Table 4.2 The changes of significantly different metabolites in RDV-infected rice

Peak	中文名	log ₂ foldchange	
		V-MH63 VS MH63	V-T1C-19 VS T1C-19
Pyrophosphate	焦磷酸盐	3.95	5.87
2-Aminoethanethiol	氨基乙硫醇	4.06	2.11
Lactic acid	乳酸	26.38	27.66
Oxoproline	氧代脯氨酸	29.06	1.16
2-Deoxyerythritol	1,2,4-丁三醇	22.40	-2.41
Threonic acid	苏糖酸	21.76	-3.89
Glutamine	谷氨酰胺	-25.57	3.77

4.2.4 代谢组学差异化合物的代谢通路分析

将所有的差异化合物在 KEGG 数据库中进行分析，整理出代谢物映射到的代谢通路，通过分析差异化合物所参与的代谢通路发现，多个氨基酸代谢途径受到影响。在 TIC-19 和 MH63 对比的差异化合物中，Oxaloacetate 和 L-Glutamine 参与丙氨酸，天门冬氨酸和谷氨酸的代谢通路。在 TIC-19-RDV 和 MH63-RDV 比较中，差异化合物 Carnitine、Glutarate 参与赖氨酸降解途径，L-Glutamine、Creatine 参与精氨酸和脯氨酸代谢通路。在 TIC-19-RDV 与 TIC-19 的比较中，共有 9 种氨基酸及其类似物发生显著差异，同时差异代谢物 L-Alanine、L-Aspartate、L-Glutamine、L-Valine、L-Threonine、Creatine、Spermidine、2-Methylmaleate 对多个氨基酸代谢通路产生影响（表 4.3）。

表 4.3 水稻 TIC-19 感染 RDV 后体内氨基酸含量的变化情况
Table 4.3 The variation of amino acid content in RDV-infected rice

Amino Acid	中文名	log ₂ ^{foldchange}
L-Alanine	左旋丙氨酸	1.88
N-Ethylglycine	乙基甘氨酸	1.40
L-Valine	缬氨酸	1.97
L-Threonine	苏氨酸	2.74
L-Aspartic acid	天冬氨酸	2.44
Aminomalonic acid	氨基丙二酸	2.10
N-Acetyl-L-leucine	N-乙酰基-L-亮氨酸	24.97
Creatine	肌氨酸	2.35
L-Glutamine	左旋谷氨酰胺	3.77

4.2.5 转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后水稻的挥发物分析

通过分析转基因水稻 TIC-19 和亲本 MH63 在感染 RDV 和健康状态下的挥发物组分发现：在四种不同的水稻处理中，共鉴定出 18 种化合物（表 4.4），这些化合物的出峰时间主要集中在 8-23 min 之间。其中大部分化合物为萜类化合物，共 15 种，醇类、酮类和酯类化合物各 1 种。

从各处理水稻的挥发物含量来看，大部分挥发物的含量没有太大的差异（表 4.5）。通过对转 *cry1C* 基因与 RDV 病毒两个因素对挥发物影响的分析，转 *cry1C* 基因对于 18 种挥发物的含量均没有显著的影响 ($p>0.05$)。但感染 RDV 对 2-heptanol (2-庚醇) 和 (E)- β -caryophyllene (β -石竹烯) 产生了显著影响($p<0.05$)，两种差异化合物在感染 RDV 水稻中高于健康水稻。转 *cry1C* 基因和感染 RDV 两个因素互作对于所有挥发物含量均没有显著影响（表 4.6）。

表 4.4 经 GC-MS 鉴定的水稻挥发物各组分名称

Table 4.4 Compounds indentified in the volatiles of MH63, TIC-19, MH63-RDV, TIC-19-RDV rice plants, using GC-MS

Peak No.	Retention time (min)	Compounds	Peak No.	Retention time (min)	Compounds
1	8.240	2-heptanone	10	20.760	α -cedrene
2	8.443	2-heptanol	11	20.888	(E)- β -caryophyllene
3	9.076	α -thujene	12	21.285	sesquisabinene A
4	9.249	α -pinene	13	21.497	(E)- β -farnesene
5	11.669	(+)-limonene	14	22.086	α -curcumene
6	13.260	(E)-linalool oxide	15	22.331	zingiberene
7	13.446	linalool	16	22.602	β -bisabolene
8	15.809	methyl salicylate	17	22.916	β -sesquiphellandrene
9	20.484	sesquithujene	18	23.077	(E)-g-bisabolene

表 4.5 经 GC-MS 鉴定的水稻各挥发物的相对含量比较

Table 4.5 The relative content of compounds in the volatiles of MH63, T1C-19, MH63-RDV, T1C-19-RDV rice plants, using GC-MS

No.	Compounds	MH63	T1C-19	MH63-RDV	T1C-19-RDV
1	2-heptanone	0.91±0.23	0.81±0.42	0.92±0.16	0.83±0.08
2	2-heptanol	0.30±0.05	0.33±0.12	0.47±0.02	0.55±0.18
3	α -thujene	0.01±0.01	<0.01	0.02±0.02	<0.01
4	α -pinene	0.10±0.04	0.36±0.33	0.19±0.10	<0.01
5	(+)-limonene	0.20±0.04	0.20±0.09	0.19±0.02	0.16±0.04
6	(E)-linalool oxide	1.60±0.47	1.88±1.02	2.43±1.19	1.94±1.05
7	linalool	0.29±0.11	0.39±0.22	0.31±0.09	0.37±0.14
8	methyl salicylate	0.13±0.03	0.20±0.10	0.22±0.12	0.41±0.27
9	sesquithujene	0.11±0.03	0.17±0.11	0.11±0.06	0.12±0.03
10	α -cedrene	0.07±0.04	0.12±0.10	0.11±0.07	0.08±0.08
11	(E)- β -caryophyllene	<0.01	<0.01	0.23±0.07	0.08±0.08
12	sesquisabinene A	0.34±0.12	0.55±0.38	0.36±0.10	0.40±0.18
13	(E)- β -farnesene	0.23±0.07	0.36±0.19	0.26±0.06	0.40±0.08
14	α -curcumene	0.11±0.08	0.15±0.15	0.07±0.07	0.13±0.13
15	zingiberene	0.55±0.31	1.01±0.63	0.54±0.21	1.04±0.39
16	β -bisabolene	5.64±1.81	6.14±4.47	6.84±0.86	3.79±3.73
17	β -sesquiphellandrene	<0.01	<0.01	0.06±0.06	<0.01
18	(E)- γ -bisabolene	0.24±0.14	0.33±0.30	0.21±0.14	0.25±0.25

注：表中数据为平均数±标准误。

Note: the datas are means±standard error.

表 4.6 经 GC-MS 鉴定的水稻各挥发物含量的方差分析

Table 4.6 Variance analysis of the content of volatiles in MH63, T1C-19, MH63-RDV, T1C-19-RDV rice plants, using GC-MS

No.	Compounds	Rice lines ^a		RDV ^b		Rice lines*RDV ^c	
		F	P	F	P	F	P
1	2-heptanone	0.16	0.694	0.00	0.952	0.00	0.979
2	2-heptanol	0.41	0.532	5.60	0.034	0.08	0.786
3	α -thujene	0.90	0.360	0.04	0.852	0.04	0.852
4	α -pinene	0.07	0.802	0.88	0.365	2.56	0.134
5	(+)-limonene	0.10	0.752	0.22	0.648	0.09	0.766
6	(E)-linalool oxide	0.01	0.925	0.17	0.690	0.12	0.733
7	linalool	0.37	0.555	0.00	0.979	0.03	0.872
8	methyl salicylate	0.90	0.360	1.15	0.303	0.16	0.698
9	sesquithujene	0.22	0.645	0.21	0.653	0.11	0.741
10	α -cedrene	0.01	0.940	0.00	0.957	0.34	0.572
11	(E)- β -caryophyllene	1.56	0.233	6.03	0.029	1.56	0.233
12	sesquisabinene A	0.45	0.513	0.11	0.744	0.20	0.665
13	(E)- β -farnesene	1.85	0.197	0.14	0.713	0.00	0.951
14	α -curcumene	0.21	0.655	0.10	0.759	0.01	0.946
15	zingiberene	1.80	0.202	0.00	0.982	0.01	0.945
16	β -bisabolene	0.28	0.605	0.06	0.815	0.55	0.472
17	β -sesquiphellandrene	0.42	0.529	0.42	0.529	0.42	0.529
18	(E)-g-bisabolene	0.11	0.743	0.09	0.771	0.02	0.892

4.2.6 转 *cryIC* 基因水稻感染 RDV 后水稻对氨基酸代谢的影响

代谢组学数据表明,感染 RDV 后的 *Bt* 水稻对水稻氨基酸代谢通路产生影响,故进一步分析了感染与未感染 RDV、转 *Bt* 基因与非转基因亲本水稻体内的氨基酸含量(表 4.7)。通过双因素分析比较感染 RDV 和转 *Bt* 基因对于水稻体内的氨基酸含量的影响,结果表明,转 *Bt* 基因对于水稻体内氨基酸含量的影响没有达到显著差异,但是感染 RDV 会显著影响 11 种游离氨基酸(Thr、Ser、Ala、Cys、Val、Ile、Leu、Phe、ABA、Lys、Arg)的含量,而且这 11 种氨基酸的含量在感染 RDV 后的水稻体内均大于健康水稻的含量,即感染 RDV 后显著提高了水稻体内氨基酸含量(表 4.8)。

表 4.7 水稻体内氨基酸含量

Table 4.7 Amino acid content in rice plants.

含量 (ug/g)	MH63	MH63-RDV	T1C-19	T1C-19-RDV
Asp	142.286±23.135	183.935±23.135	106.239±20.036	159.286±23.135
Thr	90.659±19.691	160.652±19.691	109.088±17.052	176.621±19.691
Ser	144.014±18.571	188.826±18.571	161.652±16.083	216.211±18.571
Glu	287.509±60.978	380.280±60.978	298.339±52.809	191.462±60.978
Gly	26.859±3.578	26.632±3.578	30.171±3.099	29.133±3.578
Ala	96.375±11.656	192.164±11.656	112.280±10.094	125.361±11.656
Cys	26.226±4.262	36.919±4.262	33.514±3.691	42.092±4.262
Val	14.860±2.457	25.592±2.457	17.348±2.127	20.525±2.457
Met	332.581±38.217	341.890±38.217	367.295±33.097	311.576±38.217
Ile	5.215±.612c	8.192±.612	5.667±.530c	9.044±.612
Leu	15.582±2.095	17.954±2.095	13.859±1.815	27.198±2.095
Tyr	26.524±3.563	25.708±3.563	28.631±3.086	33.962±3.563
Phe	18.635±1.687	27.756±1.687	17.272±1.461	28.749±1.687
g-ABA	213.114±39.964	418.288±39.964	232.886±34.610	466.853±39.964
Lys	23.069±3.050	34.497±3.050	24.039±2.641	39.426±3.050
His	6.890±0.699	8.511±0.699	6.650±0.605	7.877±0.699
Arg	15.512±2.206	23.356±2.206	18.116±1.911	22.678±2.206

注：表中数据为平均数±标准误。

Note: the data are means±standard error.

表 4.8 水稻体内氨基酸含量的方差分析

Table 4.8 Variance analysis of amino acid content in rice plants

含量 (ug/g)	Rice lines ^a		RDV ^b		Rice lines * RDV ^c	
	F	P	F	P	F	P
Asp	1.835	0.209	4.468	0.064	0.065	0.805
Thr	0.814	0.391	13.008	0.006	0.004	0.950
Ser	1.567	0.242	7.636	0.022	0.073	0.792
Glu	2.272	0.166	0.014	0.908	2.859	0.125
Gly	0.704	0.423	0.033	0.859	0.014	0.909
Ala	5.085	0.051	23.266	0.001	13.427	0.005
Cys	2.280	0.165	5.453	0.044	0.066	0.803
Val	0.294	0.601	8.547	0.017	2.522	0.147
Met	0.004	0.954	0.393	0.546	0.772	0.402
Ile	1.213	0.299	28.769	<0.001	0.114	0.743
Leu	3.436	0.097	14.992	0.004	7.306	0.024
Tyr	2.255	0.167	0.428	0.529	0.794	0.396
Phe	0.013	0.912	39.741	0.000	0.520	0.489
g-ABA	0.78	0.400	32.198	<0.001	0.138	0.718
Lys	0.998	0.344	20.612	0.001	0.449	0.519
His	0.416	0.535	4.429	0.065	0.085	0.777
Arg	0.203	0.663	8.433	0.017	0.590	0.462

4.3 讨论

本章通过代谢组学和挥发物含量测定, 分析了感染 RDV 的转 *cry1C* 基因水稻代谢物质的非预期影响。通过代谢组学结果可以看出, 对于非转基因亲本 MH63 水稻, 在没有感染 RDV 的条件下 (T1C-19 vs MH63), 转 *cry1C* 基因对于代谢组的影响不大, 仅有 9 种代谢物发生显著差异; 在感染 RDV 后 (T1C-19-RDV vs MH63-RDV), 有 42 种代谢物发生了显著变化。在 MH63 感染 RDV 后有 18 种代谢物发生变化, 但 T1C-19 感染 RDV 后有 57 个差异代谢物, 说明在转 *Bt* 基因和感染 RDV 之中单一因素的影响下, 对于水稻的代谢组学变化影响不大, 两个因素互作后的影响远大于其中单一因素的影响。可能是 *Bt* 基因带来的非预期效应和感染 RDV 的相互作用, 对水稻的代谢轮廓产生了影响, 同时也说明评价逆境条件下的转基因作物安全性的必要性。

在以往的报道中, 研究人员综合考察了环境条件和基因插入两个因素对水稻代谢物图谱的影响, 种植的地点和时间对于转基因水稻代谢组学的影响往往大于转基因本身。王玲 (2013) 通过 GC-MS 分析了转入血清蛋白基因水稻种子和亲本 TP309 水稻种子之间的代谢组分差异, 得到 17 个代谢物发生变化; 在比较不同地区的 TP309 代谢物中, 有 40 个代谢物的含量发生变化, 转基因对水稻代谢物带来的影响小于生长环境带来的影响。Chang 等 (2012) 研究了转 *cry1Ac* 和 *scK* 基因可能带来的非预期效应, 结果表明种植的时间和地点是影响代谢组分发生变化的主要原因, 虽然得到了一些差异化合物, 但是这些变化和转入外来基因没有直接关系, 环境因素比基因插入对水稻代谢组分的影响更大。Zhou 等 (2012) 同样分析了转 *cry1Ac* 和 *scK* 基因对水稻代谢轮廓谱的影响, 研究结果表明, 组织培养对转基因水稻代谢物轮廓谱的改变比外源基因插入的影响更显著。

通过对感染 RDV 的转 *cry1C* 基因水稻挥发物变化分析可知, 感染 RDV 对于水稻的两种挥发物组分含量产生了影响, 但转基因本身以及转基因与 RDV 互作不会显著影响水稻挥发物的含量, 这和前人的研究是相似的。任少鹏 (2015) 分析了转 *Bt* 抗虫与抗除草剂基因后水稻的挥发物变化情况, 结果表明外源基因导入对于苗期的挥发物有一定的影响, 但对于成熟期水稻没有显著影响。Qi 等 (2011) 研究表明, 野生型和转基因水稻的挥发物没有显著差异, 但经二化螟诱导后, 转基因水稻的虫害诱导挥发物含量显著低于野生型。在氨基酸分析中, 转

Bt 基因并没有对氨基酸含量产生明显影响,但感染 RDV 显著提高了水稻体内氨基酸含量。

本研究结果可以看出,转 *cry1C* 基因对水稻的代谢物质影响不大,感染 RDV 对于水稻代谢组、氨基酸含量和挥发物的影响均大于转 *cry1C* 基因的影响。对于感染 RDV 所引起代谢通路和氨基酸含量变化的机理,还需要进一步分析。

总 结

本研究通过在室内条件下分析了转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对于褐飞虱生长发育、寿命、繁殖和取食与产卵选择的影响。结果表明：转 *cry1C* 基因和感染 RDV 仅对褐飞虱的若虫发育历期产生了一定影响,对褐飞虱的存活率、寿命、产卵量等指标均没有显著影响。在对褐飞虱种群生命表参数统计中,各处理水稻间的内禀增长率、净生殖率、世代平均历期、种群加倍时间、周限增长率也没有显著差异。在笼罩选择性实验中,褐飞虱对转 *cry1C* 基因和非转基因水稻,感染 RDV 水稻和健康水稻之间没有明显的偏向性,转 *cry1C* 基因和感染 RDV 不会影响褐飞虱的取食和产卵选择性。

通过对各组水稻处理的代谢组学、游离氨基酸和挥发物的测定与分析,结果表明：转 *cry1C* 基因对于水稻体内代谢组学影响不大,但感染 RDV 后差异化合物的种类明显增加。相对于转 *cry1C* 基因,感染 RDV 对于水稻代谢物质的影响更大,在水稻体内游离氨基酸和挥发物含量变化中也有类似的结果,感染 RDV 后 11 种游离氨基酸和 2 种挥发物含量都显著上升,但转 *cry1C* 基因对氨基酸和挥发物的含量均没有显著影响。

综上所述：转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱大部分生物学参数均没有显著影响,也不会影响褐飞虱的取食和产卵选择性。但会对水稻体内的代谢组学产生一定的影响,其差异化合物主要来源于感染 RDV 对水稻代谢物质的影响。

本文的研究特色和创新点

第一,在感染 RDV 的逆境条件下,评估了转 *cry1C* 基因水稻对非靶标害虫褐飞虱生物学特性的影响。发现转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后对褐飞虱大部分生物学参数没有产生影响,仅对若虫发育历期产生了一定影响。

第二,利用代谢组学和挥发物分析,更加全面的了解转 *cry1C* 基因水稻感染 RDV 后代谢物质变化情况。发现转 *cry1C* 基因对于水稻代谢物质的影响不大,感染 RDV 会显著影响包括氨基酸在内的多种代谢物和两种挥发物的含量。

今后有待继续开展的工作

第一：分析水稻感染 RDV 后体内代谢组学和氨基酸含量发生变化的分子机理，进一步解析 RDV 和水稻之间的互作机制。

第二：通过嗅觉仪对褐飞虱的选择性进行分析，排除寄主选择过程中光、颜色等因素的影响，更加准确的反应褐飞虱对不同水稻挥发物的趋性。

第三：研究水稻感染 RDV 后两种挥发物发生变化的原因，以及差异挥发物对于褐飞虱趋性的影响。

参考文献

- 毕江涛, 贺达汉. 2009. 植物对土壤微生物多样性的影响研究进展. 中国农学通报, 25(9): 244-250.
- 陈茂. 2005. 转基因抗虫、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: 1-228.
- 陈茂, 叶恭银, 胡萃, J. Tu, S. K. Datta. 2003. *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): 32-36.
- 陈茂, 叶恭银, 胡萃, Datta, S K. 2003. *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, 舒庆尧. 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.
- 陈文明, 胡君, 何月平, 刘叙杆, 周威君, 沈晋良 & 王彦华. 2009. 2007年江浙地区二化螟抗药性检测. 中国农业科学(03): 1100-1107.
- 程式华, 李建. 2007. 现代中国水稻, 金盾出版社, 中国, 北京: 1-606.
- Clive, J. 2015. 2014年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志(01): 1-14.
- 段礼新, 漆小泉. 2015. 基于Gc-Ms的植物代谢组学研究. 生命科学(8): 971-977.
- 傅强, 王峰, 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.
- 顾永林. 2012. 水稻矮缩病的研究. 农业灾害研究, 02(1): 1-5.
- 关满, 吴刚, 王敏. 2015. 转Bt基因水稻对土壤微生物群落结构的影响. 湖北农业科学, 54(5): 1046-1052.
- 韩乃顺. 2015. *Bt*水稻-RDV-黑尾叶蝉三者关系的初探. 浙江大学硕士学位论文: 1-81.
- 何晓辉. 2013. 两种水稻黑条矮缩病毒对稻飞虱及其主要天敌的影响. 南京农业大学硕士学位论文: 1-88.
- 何晓辉, 徐红星, 郑许松, 杨亚军, 高广春, 潘建红, 陆强, 吕仲贤. 2011. 水稻黑条矮缩病毒对非介体稻飞虱——白背飞虱适应性的影响. 中国水稻科学, 25(6): 654-658.
- 胡正青, 林夏珍, 郭明. 2010. 代谢组学研究技术进展. 中国现代应用药学(6): 485-490.
- 黄芊, 凌炎, 蒋显斌, 龙丽萍, 黄凤宽, 黄所生, 吴碧球. 2013. 转*Bar*基因水稻及草铵膦对

- 褐飞虱取食和产卵行为的影响. 南方农业学报, 44(7): 1110-1114.
- 黄威, 张运红, 陈迪勤, 胡红青, 庄光泉. 2009. Bt蛋白在几种土壤中的降解与残留. 华中农业大学学报, 28(2): 169-173.
- 蒋德春, 金道超, 杨洪, 袁雷. 2013. 南方水稻黑条矮缩病对非介体褐飞虱生长发育和繁殖的影响. 山地农业生物学报, 32(1): 1-5.
- 李毅, 周雪平, 韩成贵, 范在丰, 吴祖建, 王锡锋, 周益军, 张仲凯, 何震天, 陈晓英, 安德荣, 吴云锋, 曹雪松. 2011. 稻麦主要病毒病识别与控制, 中国农业出版社, 中国, 北京: 1-102
- 梁莉. 2010. 水稻、黑尾叶蝉与水稻矮缩病毒三者间关系的初步研究, 浙江大学硕士学位论文: 1-80.
- 梁莉, 郭建洋, 田俊策, 陈洋, 胡萃, 叶恭银. 2010. 水稻矮缩病毒对黑尾叶蝉卵巢发育与产卵量的影响. 植物保护学报, 37(4): 375-376.
- 刘清松, 李云河, 陈秀萍, 彭于发. 2014. 转基因抗虫植物-植食性昆虫-天敌间化学通讯的研究进展. 应用生态学报, 25(8): 2431-2439.
- 刘贤青, 罗杰. 2015. 植物代谢组学技术研究进展. 科技导报(16): 33-38.
- 刘志诚, 叶恭银, 胡萃, K. D. Swapan. 2002. Bt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.
- 戚琳, 刘满强, 蒋林惠, 张健桥, 李修强, 陈法军, 胡锋. 2015. 基于根际与凋落物际评价转Bt水稻对土壤线虫群落的影响. 生态学报(5): 1434-1444.
- 任少鹏. 2015. 转基因水稻对其非靶标植食性害虫玉米蚜*Rhopalosiphum maidis* (Fitch)的影响. 浙江大学博士学位论文: 1-138.
- 阮义理, 蒋文烈, 林瑞芬. 1981. 稻病毒病介体昆虫灰稻虱的研究. 昆虫学报(3): 283-290.
- 盛承发, 王红托, 高留德, 宣维健. 2003. 我国水稻螟虫大发生现状、损失估计及防治对策. 植物保护, 29(1): 37-39.
- 王玲. 2013. 转基因水稻的代谢组学研究. 北京化工大学硕士学位论文: 1-81
- 徐雪亮, 肖叶青, 季香云, 刘子荣, 陈连生, 蒋杰贤, 陈大洲, 胡兰香, 姚英娟. 2015. 转Bt基因水稻“赣绿1号”对非靶标害虫褐飞虱取食、产卵行为及生长发育的影响. 应用昆虫学报(4): 1-6.
- 闫锋. 2009. 水稻介导的害虫互作及相关水稻基因*OsRLK*突变体获得. 内蒙古农业大学博士学位论文: 1-114.

- 杨虹, 李家新, 郭三堆, 陈学军, 范云六. 1989. 苏云金芽孢杆菌 Δ -内毒素基因导入水稻原生质体后获得转基因植株. 中国农业科学(5): 1-5.
- 游秀梅, 游秀姬. 2007. 水稻矮缩病的发生与防治. 福建农业(4): 24.
- 俞晓平, 巫国瑞, 胡萃. 1990. 不同水稻品种对白背飞虱产卵的影响. 浙江农业大学学报(1): 61-65.
- 易小平, 谭燕华, 彭存智, 谢翔 & 贺萍萍. 2015. 转基因作物安全评价的检测技术. 热带生物学报(01): 98-104.
- 张岚, 林克剑, 李飞, 侯茂林. 2011. 转 $cry1C$ 和 $cry2A$ 不同抗虫基因水稻品种对非靶标害虫灰飞虱生物学特性的影响. 植物保护, 37(6): 120-125.
- 赵艳, 李燕燕. 2013. 组学技术评价转基因农作物的非预期效应. 遗传, 35(12): 1360-1367.
- 周霞, 程家安, 胡阳, 姜永根. 2005. 转 Bt 基因水稻克螟稻对黑尾叶蝉种群增长的影响. 中国水稻科学, 19(1): 76-80.
- 祝向钰. 2013. 转 Bt 水稻对土壤动物群落结构与数量动态的影响研究. 南京农业大学硕士学位论文: 1-87.
- Akhtar, Z. R., J. C. Tian, Y. Chen, Q. Fang, C. Hu, M. Chen, Y. F. Peng & G. Y. Ye. 2010. Impacts of six *Bt* rice lines on nontarget rice feeding thrips under laboratory and field conditions. *Environ Entomol*, 39: 715-726.
- Akhtar, Z. R., J. C. Tian, Y. Chen, Q. Fang, C. Hu, Y. F. Peng & G. Y. Ye. 2013. Impact of six transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines on four nontarget thrips species attacking rice panicles in the paddy field. *Environ Entomol*, 42: 173-180.
- Bagla, P. 2010. India hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. *Science*, 327: 1439-1439.
- Bai, Y., R. Yan, X. Ke, G. Ye, F. Huang, Y. Luo, and J. Cheng. 2011. Effects of transgenic *Bt* rice on growth, reproduction, and superoxide dismutase activity of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) in laboratory studies. *J Econ Entomol*, 104: 1892-9.
- Bailey, N., M. Oven, E. Holmes, J. K. Nicholson, and M. H. Zenk. 2003. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in silene cucubalus cell cultures via H-1 NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*, 62: 851-858.
- Baniasadi, H., C. Vlahakis, J. Hazebroek, C. Zhong, and V. Asiago. 2014. Effect of environment and genotype on commercial maize hybrids using LC/MS-based

- metabolomics. *J Agr Food Chem*, 62: 1412-1422.
- Bates, S. L., J. Z. Zhao, R. T. Roush, and A. M. Shelton.** 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat Biotechnol*, 23: 57-62.
- Bedair, M., and L. W. Sumner.** 2008. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trac-Trend Anal Chem*, 27: 238-250.
- 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*. *Entomol Exp Appl*, 102: 21-28.
- Blassioli Moraes, M. C., R. A. Laumann, M. F. Santos Aquino, D. P. Paula, and M. Borges.** 2011. Effect of *Bt* genetic engineering on indirect defense in cotton via a tritrophic interaction. *Transgenic Res*, 20: 99-107.
- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, and M. Soberon.** 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Molec*, 41: 423-431.
- Bravo, A., S. S. Gill & M. Soberon.** 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- Chang, Y., C. Zhao, Z. Zhu, Z. Wu, J. Zhou, Y. Zhao, X. Lu, and G. Xu.** 2012. Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with *cry1Ac* and *scd* genes. *Plant Mol Biol*, 78: 477-487.
- Chen, H., W. Tang, C. Xu, X. Li, Y. Lin, and Q. Zhang.** 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against Lepidopteran rice pests. *Theor Appl Genet*, 111: 1330-1337.
- Chen, M., A. Shelton, and G. Ye.** 2011. Insect-resistant genetically modified rice in China: from research to commercialization. *Annual Review of Entomology*, 56: 81-101..
- Chen, M., J. Z. Zhao, H. L. Collins, E. D. Earle, J. Cao, and A. M. Shelton.** 2008. A critical assessment of the effects of *Bt* transgenic plants on parasitoids. *Plos One*, 3: e2284.
- Chen, W., Y. Gao, W. Xie, L. Gong, K. Lu, W. Wang, Y. Li, X. Liu, H. Zhang, H. Dong, W. Zhang, L. Zhang, S. Yu, G. Wang, X. Lian, and J. Luo.** 2014. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism. *Nat Genet*, 46: 714-721.
- Chen, Y., J. C. Tian, W. Wang, Q. Fang, Z. R. Akhtar, Y. F. Peng, H. Cui, Y. Y. Guo, Q. S.**

- Song, and G. Y. Ye.** 2012. *Bt* rice expressing *Cry1Ab* does not stimulate an outbreak of its non-target herbivore, *Nilaparvata lugens*. *Transgenic Res*, 21: 279-91.
- Chen, Y., J. Tian, Z. Shen, Y. Peng, C. Hu, Y. Guo, and G. Ye.** 2010. Transgenic rice plants expressing a fused protein of *cry1Ab/Vip3H* has resistance to rice stem borers under laboratory and field conditions. *J Econ Entomol*, 103: 1444-1453.
- Cohen, M. B., M. Chen, J. S. Bentur, K. L. Heong, and G. Ye.** 2008. *Bt* rice in Asia: potential benefits, impact, and sustainability. In *Progress in Biological Control*, eds. J. Romeis, A. M. Shelton & G. G. Kennedy, 223-248..
- 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. *B Entomol Res*, 92: 265-268.
- Dalgies., C. E., E. C. Horning, M. G. Horning, K. L. Knox, and K. Yarger.** 1966. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem J*, 101: 792.
- De Vos, R. C. H., S. Moco, A. Lommen, J. J. B. Keurentjes, R. J. Bino, and R. D. Hall.** 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2: 778-791.
- Dean, J. M., and C. M. De Moraes.** 2006. Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J Chem Ecol*, 32: 713-24.
- Downes, S., R. J. Mahon, L. Rossiter, G. Kauter, T. Leven, G. Fitt, and G. Baker.** 2010. Adaptive management of pest resistance by *Helicoverpa* species (Noctuidae) in Australia to the *Cry2Ab* *Bt* toxin in Bollgard II (R) cotton. *Evol Appl*, 3: 574-584.
- Eisenreich, W., and A. Bacher.** 2007. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry*, 68: 2799-2815.
- Fiehn, O.** 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, 48: 155-71.
- Fiehn, O.** 2003. Metabolic networks of *cucurbita maxima* phloem. *Phytochemistry*, 62: 875-886.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R N., and Willmitzer, L.** 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*, 18: 1157-61.

- Frank, T., R. M. Roehlig, H. V. Davies, E. Barros, and K. Engel. 2012. Metabolite profiling of maize kernels-genetic modification versus environmental influence. *J Agr Food Chem*, 60: 3005-3012.
- 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.
- Fukushi, T., I. Kimura, and E. Shikata. 1962. Some morphological characters of rice dwarf virus. *Virology*, 18: 192-&.
- Fumagalli, E., E. Baldoni, P. Abbruscato, P. Piffanelli, A. Genga, R. Lamanna, and R. Consonni. 2009. NMR techniques coupled with multivariate statistical analysis: tools to analyse *Oryza sativa* metabolic content under stress conditions. *J Agron Crop Sci*, 195: 77-88.
- Garcia-Canas, V., C. Simo, C. Leon, E. Ibanez, and A. Clfuentes. 2011. Ms-based analytical methodologies to characterize genetically modified crops. *Mass Spectrom Rev*, 30: 396-416.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol*, 43: 701-726.
- Guo, J. Y., G. Y. Ye, S. Z. Dong, and S. S. Liu. 2010. An invasive whitefly feeding on a virus-infected plant increased its egg production and realized fecundity. *Plos One*, 5: e11713.
- Guo, J. Y., S. Z. Dong, X. L. Yang, L. Cheng, F. H. Wan, S. S. Liu, X. P. Zhou, and G. Y. Ye. 2012. Enhanced vitellogenesis in a whitefly via feeding on a begomovirus-infected plant. *Plos One*, 7: e43567.
- Hagenbucher, S., F. L. Wackers, F. E. Wettstein, D. M. Olson, J. R. Ruberson, and J. Romeis. 2013. Pest trade-offs in technology: reduced damage by caterpillars in *Bt* cotton benefits aphids. *Proc Biol Sci*, 280: 20130042.
- Hagenbucher, S., F. L. Waeckers, and J. Romeis. 2014. Indirect multi-trophic interactions mediated by induced plant resistance: impact of caterpillar feeding on aphid parasitoids. *Biol Letters*, 10:20130795.
- Han, L., K. Wu, Y. Peng, F. Wang & Y. Guo. 2006. Evaluation of transgenic rice expressing

- cry1ac and cpti against *Chilo Suppressalis* and intrapopulation variation in susceptibility to cry1Ac. *Environ Entomol*, 35: 1453-1459.
- Han, L., M. Hou, K. Wu, Y. Peng & F. Wang. 2011. Lethal and sub-lethal effects of transgenic rice containing cry1Ac and cpti genes on the pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker). *Agricultural Sciences In China*, 10: 384-393.
- Han, Y., J. Chen, H. Wang, J. Zhao, Y. He & H. Hua. 2015. Prey-mediated effects of transgenic *cry2Aa* rice on the spider *Hylyphantes graminicola*, a generalist predator of *Nilaparvata lugens*. *Biocontrol*, 60: 251-261.
- Han, Y., J. Meng, J. Chen, W. Cai, Y. Wang, J. Zhao, Y. He, Y. Feng & H. Hua. 2014. *Bt* rice expressing *cry2Aa* does not harm *Cyrtorhinus lividipennis*, a main predator of the nontarget herbivore *Nilaparvata lugens*. *Plos One*, 9(11): e112315.
- He, Y. P., W. M. Chen, J. L. Shen, C. F. Gao, L. Q. Huang, W. J. Zhou, X. G. Liu & Y. C. Zhu. 2007. Differential susceptibilities to pyrethroids in field populations of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera : Pyralidae). *Pestic Biochem Phys*, 89: 12-19.
- High, S. M., M. B. Cohen, Q. Y. Shu, and I. Altosaar. 2004. Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends Plant Sci*, 9: 286-292.
- Hill, D. S. 1987. Agricultural insect pests of temperate regions and their control., 75(3):1-659..
- Hohn, T. 2007. Plant virus transmission from the insect point of view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17905-6.
- 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.
- Hulting, F. L., D. B. Orr, and J. J. Obrycki. 1990. A computer-program for calculation and statistical comparison of intrinsic rates of increase and associated life table parameters. *Fla Entomol*, 73: 601-612.
- Jiu, M., X. P. Zhou, L. Tong, J. Xu, X. Yang, F. H. Wan, and S. S. Liu. 2007. Vector-virus mutualism accelerates population increase of an invasive whitefly. *Plos One*, 2: e182.
- Kim, J. K., S. Park, S. M. Lee, S. Lim, H. J. Kim, S. Oh, Y. Yeo, H. S. Cho, and S. Ha. 2013. Unintended polar metabolite profiling of carotenoid-biofortified transgenic rice reveals substantial equivalence to its non-transgenic counterpart. *Plant Biotechnol Rep*, 7: 121-128.

- Kimura, I., Y. Minobe, and T. Omura. 1987. Changes in a nucleic-acid and a protein-component of rice dwarf virus-particles associated with an increase in symptom severity. *J Gen Virol*, 68: 3211-3215.
- Kind, T., G. Wohlgemuth, D. Y. Lee, Y. Lu, M. Palazoglu, S. Shahbaz, and O. Fiehn. 2009. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, 81: 10038-48.
- Kluemper, W. & M. Qaim. 2014. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *Plos One*, 9(11):e111629-e111629
- Kruger, M., J. B. J. Van Rensburg, and J. Van den Berg. 2009. Perspective on the development of stem borer resistance to *Bt* maize and refuge compliance at the vaalharts irrigation scheme in south Africa. *Crop Prot*, 28: 684-689.
- Kusano, M., I. Baxter, A. Fukushima, A. Oikawa, Y. Okazaki, R. Nakabayashi, D. J. Bouvrette, F. Achard, A. R. Jakubowski, J. M. Ballam, J. R. Phillips, A. H. Culler, K. Saito, and G. G. Harrigan. 2015. Assessing metabolomic and chemical diversity of a soybean lineage representing 35 years of breeding. *Metabolomics*, 11: 261-270.
- Li, Y., X. Zhang, X. Chen, J. Romeis, X. Yin & Y. Peng. 2015. Consumption of *Bt* rice pollen containing *cry1C* or *cry2A* does not pose a risk to *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). *Scientific Reports*, 5: 7679-7679
- Li, Y., Y. Wang, J. Romeis, Q. Liu, K. Lin, X. Chen & Y. Peng. 2013. *Bt* rice expressing *cry2Aa* does not cause direct detrimental effects on larvae of *Chrysoperla sinica*. *Ecotoxicology*, 22: 1413-1421.
- Liu, J., M. Li, J. Li, C. Huang, X. Zhou, F. Xu & S. Liu. 2010. Viral infection of tobacco plants improves performance of *Bemisia tabaci* but more so for an invasive than for an indigenous biotype of the whitefly. *Journal Of Zhejiang University-science B*, 11: 30-40.
- Lou, Y. G., M. H. Du, T. Turlings, J. A. Cheng, and W. F. Shan. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. *J Chem Ecol*, 31: 1985-2002.
- Lu, Y., K. Wu, Y. Jiang, B. Xia, P. Li, H. Feng, K. A. Wyckhuys, and Y. Guo. 2010. Mirid

- bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of *Bt* cotton in China. *Science*, 328: 1151-4.
- Lu, Z. B., J. C. Tian, W. Wang, H. X. Xu, C. Hu, Y. Y. Guo, Y. F. Peng & G. Y. Ye. 2014. Impacts of *Bt* rice expressing cry1C or cry2A protein on the performance of nontarget leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), under laboratory and field conditions. *Environ Entomol*, 43: 209-217.
- Lu, Z. B., Y. E. Liu, N. S. Han, J. C. Tian, Y. F. Peng, C. Hu, Y. Y. Guo & G. Y. Ye. 2015. Transgenic *cry1C* or *cry2A* rice has no adverse impacts on the life-table parameters and population dynamics of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Manag Sci*, 71: 937-945.
- Lu, Z., Y. Liu, N. Han, J. Tian, Y. Peng, C. Hu, Y. Guo, and G. Ye. 2015. Transgenic *cry1C* or *cry2A* rice has no adverse impacts on the life-table parameters and population dynamics of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Manag Sci*, 71: 937-945.
- Maia, A. H., A. J. Luiz, and C. Campanhola. 2000. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *J Econ Entomol*, 93: 511-8.
- Mannakkara, A., L. Niu, W. Ma & C. Lei. 2013. Zero effect of *Bt* rice on expression of genes coding for digestion, detoxification and immune responses and developmental performances of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). *J Insect Physiol*, 59: 985-993.
- Matsuda, F., A. Ishihara, K. Takanashi, K. Morino, H. Miyazawa, K. Wakasa, and H. Miyagawa. 2010. Metabolic profiling analysis of genetically modified rice seedlings that overproduce tryptophan reveals the occurrence of its inter-tissue translocation. *Plant Biotechnol-Nar*, 27: 17-27.
- Matten, S. R., G. P. Head, and H. D. Quemada. 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of *Bt* crops within ipm programs. In *progress in biological control*, eds. J. Romeis, A. M. Shelton & G. G. Kennedy, 5: 27-39..
- Mcgaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus-thuringiensis*. *Science*, 229: 193-194.

- Morra, M. J.** 1994. Assessing the impact of transgenic plant-products on soil organisms. *Mol Ecol*, 3: 53-55.
- Nicholson, J K., Lindon, J C., and Holmes, E.** 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29: 1181-9.
- Qi, J., G. Zhou, L. Yang, M. Erb, Y. Lu, X. Sun, J. Cheng, and Y. Lou.** 2011. The chloroplast-localized phospholipases D α 4 and α 5 regulate herbivore-induced direct and indirect defenses in rice. *Plant Physiol*, 157: 1987-1999.
- Qu, M. J., Z. J. Han, X. J. Xu & L. N. Yue.** 2003. Triazophos resistance mechanisms in the rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). *Pestic Biochem Phys*, 77: 99-105.
- Romeis, J., Meissle, M., and Bigler, F.** 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol*, 24: 63-71.
- Schuler, T. H., R. Potting, I. Denholm, and G. M. Poppy.** 1999. Parasitoid behaviour and *Bt* plants (Vol 400, Pg 825, 1999). *Nature*, 402: 750-750.
- Shelton, A. M., J. Z. Zhao, and R. T. Roush.** 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annu Rev Entomol*, 47: 845-881.
- Sui, H., Z. Y. Li, Y. B. Xu, C. Han, L. Z. Han & F. J. Chen.** 2011. Occurrence dynamics of migratory pest insects *Cnaphalocrocis medinalis* and *Sogatella furcifera* in transgenic *Bt* rice field in Xing'an county of Guangxi province. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 22: 3021-3025.
- Tabashnik, B. E., A. J. Gassmann, D. W. Crowder, and Y. Carriere.** 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nat Biotechnol*, 26: 199-202.
- Tabashnik, B. E., F. Huang, M. N. Ghimire, B. R. Leonard, B. D. Siegfried, M. Rangasamy, Y. Yang, Y. Wu, L. J. Gahan, D. G. Heckel, A. Bravo, and M. Soberon.** 2011. Efficacy of genetically modified *Bt* toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nat Biotechnol*, 29: 1128-U98.
- Tabashnik, B. E., J. B. J. Van Rensburg, and Y. Carriere.** 2009. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol*, 102: 2011-2025.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson.** 1990. Field development of

- resistance to *Bacillus-thuringiensis* in *Diamondback moth* (Lepidoptera, Plutellidae). J Econ Entomol, 83: 1671-1676.
- Tang, Q. Y., and C. X. Zhang.** 2013. Data processing system (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. Insect Sci, 20: 254-260.
- Tang, W., H. Chen, C. Xu, X. Li, Y. Lin, and Q. Zhang.** 2006. Development of insect-resistant transgenic Indica rice with a synthetic *cryIC** gene. Mol Breeding, 18: 1-10.
- Tian, J. C., Y. Chen, Z. L. Li, K. Li, M. Chen, Y. F. Peng, C. Hu, A. M. Shelton, and G. Y. Ye.** 2012. Transgenic *cryIAb* rice does not impact ecological fitness and predation of a generalist spider. Plos One ,7: e35164.
- Tian, J. C., Z. C. Liu, M. Chen, Y. Chen, X. X. Chen, Y. F. Peng, C. Hu, and G. Y. Ye.** 2010. Laboratory and field assessments of prey-mediated effects of transgenic *Bt* rice on *Ummeliata insecticeps* (Araneida: Linyphiidae). Environ Entomol, 39: 1369-77.
- Turlings, T., P. M. Jeanbourquin, M. Held, and T. Degen.** 2005. Evaluating the induced-odour emission of a *Bt* maize and its attractiveness to parasitic wasps. Transgenic Res, 14: 807-816.
- Turlings, T., U. B. Lengwiler, M. L. Bernasconi, and D. Wechsler.** 1998. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. Planta, 207: 146-152.
- Wang, F., D. Ning, Y. Chen, C. Dang, N. S. Han, Y. E. Liu & G. Y. Ye.** 2015b. Comparing gene expression profiles between *Bt* and non-*Bt* rice in response to brown planthopper infestation. Frontiers In Plant Science, 6: 1181.
- Wang, Y., G. Zhang, J. Du, M. Wang, and B. Liu.** 2010. Influence of transgenic hybrid rice expressing a fused gene derived from *cryIAb* and *cryIAc* on primary insect pests and rice yield. Crop Prot, 29: 128-133.
- Wang, Y., L. Zhang, Y. Li, Y. Liu, L. Han, Z. Zhu, F. Wang & Y. Peng.** 2014. Expression of *cryIAb* protein in a marker-free transgenic *Bt* rice line and its efficacy in controlling a target pest, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). Environ Entomol, 43: 528-536.
- Wang, Y., Y. Li, Z. Y. Huang, X. Chen, J. Romels, P. Dai & Y. Peng.** 2015a. Toxicological, biochemical, and histopathological analyses demonstrating that *cryIC* and *cry2A* are not toxic to larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. J Agr Food Chem, 63: 6126-6132.

- Wang, Y., Y. Li, J. Romeis, X. Chen, J. Zhang, H. Chen, and Y. Peng. 2012. Consumption of *Bt* rice pollen expressing *cry2Aa* does not cause adverse effects on adult *Chrysoperla sinica tjeder* (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol Control*, 61: 246-251.
- Ward, J. L., J. M. Baker, and M. H. Beale. 2007. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *Febs J*, 274: 1126-1131.
- Wolfenbarger, L. L., S. E. Naranjo, J. G. Lundgren, R. J. Bitzer, and L. S. Watrud. 2008. *Bt* crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *Plos One*, 3(5):e2118-e2118.
- Wu, G., H. Cui, G. Ye, Y. Xia, R. Sardana, X. Cheng, Y. Li, I. Altosaar, and Q. Shu. 2002. Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in *Bt* (*Bacillus Thuringiensis*) transgenic rice. *Theor Appl Genet*, 104: 727-734.
- Xu, H., X. He, X. Zheng, Y. Yang, and Z. Lu. 2014. Influence of rice black streaked dwarf virus on the ecological fitness of non-vector planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Sci*, 21: 507-514.
- Xu, X., Y. Han, G. Wu, W. Cai, B. Yuan, H. Wang, F. Liu, M. Wang, and H. Hua. 2011. Field evaluation of effects of transgenic *cry1Ab/cry1Ac*, *cry1C* and *cry2A* rice on *Cnaphalocrocis medinalis* and its arthropod predators. *Sci China Life Sci*, 54: 1019-28.
- Yang, Z., H. Chen, W. Tang, H. Hua, and Y. Lin. 2011. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest Manag Sci*, 67: 414-422.
- Yoshida S, Forno D, Cock J, et al. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines: 1-83.
- Zaidi, M. A., G. Ye, H. Yao, T. H. You, E. Loit, D. H. Dean, S. Riazuddin & I. Altosaar. 2009. Transgenic rice plants expressing a modified *cry1Ca1* gene are resistant to *Spodoptera litura* and *Chilo suppressalis*. *Mol Biotechnol*, 43: 232-242.
- Zhang, Y., Y. Li, Y. Zhang, Y. Chen, K. Wu, Y. Peng & Y. Guo. 2011. Seasonal expression of *Bt* proteins in transgenic rice lines and the resistance against Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* (Walker). *Environ Entomol*, 40: 1323-1330.
- Zheng, X., Y. Yang, H. Xu, H. Chen, B. Wang, Y. Lin & Z. Lu. 2011. Resistance performances of transgenic *Bt* rice lines T(2A)-1 and T1c-19 against *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol*, 104: 1730-1735.

- Zhao, H., Y. Zhang, K. Wu, K. Zhao, Y. Peng, and Y. Guo.** 2004. Expression of Cry1Ac protein in *cryAc/CpTI* transgenic rice and its resistance in different stages to *Chilo suppressalis*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12: 76-79.
- Zheng, X., Y. Yang, H. Xu, H. Chen, B. Wang, Y. Lin, and Z. Lu.** 2011. Resistance performances of transgenic *Bt* rice lines T(2A)-1 and T1c-19 against *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol*, 104: 1730-5.
- Zhou, J., Zhang, L., Li, X., Chang, Y W., Gu, Q., Lu, X., Zhu, Z., Xu, and G W.** 2012. Metabolic profiling of transgenic rice progeny using gas chromatography-mass spectrometry: the effects of gene insertion, tissue culture and breeding. *Metabolomics*, 8: 529-539.

作者简介

教育经历

2009 年 9 月—2013 年 6 月 吉林大学植物保护专业 学士学位

2013 年 9 月—2016 年 6 月 浙江大学植物保护专业 硕士学位

攻读硕士学位阶段发表的学术论文:

Wang, F., D. Ning, Y. Chen, C. Dang, N. S. Han, Y. E. Liu & G. Y. Ye. 2015.
Comparing gene expression profiles between *Bt* and non-*Bt* rice in response to
brown planthopper infestation. *Frontiers In Plant Science*, 6: 1181