

# 水稻抗二化螟特性鉴定技术的评价研究

刘显波<sup>1</sup> 谢黎虹<sup>1</sup> 唐绍清<sup>1</sup> 涂巨民<sup>2</sup> 胡培松<sup>1</sup> 罗炬<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国水稻研究所, 杭州 310006; <sup>2</sup> 浙江大学, 杭州 310000; \* 通讯作者: luojurice@126.com)

**摘 要:** 采用离体叶片、离体茎秆、离体剥开茎秆及活体成株 4 种室内抗性鉴定方法, 对相同水稻材料进行抗二化螟特性鉴定, 同时对这些水稻室内抗二化螟鉴定技术进行了综合评价。结果表明, 这些方法的抗性鉴定结果高度吻合, 离体叶片鉴定方法是目前最快速、有效的抗二化螟鉴定方法。并通过离体叶片和活体成株鉴定方法对转 *Vip3A* 基因水稻材料进行鉴定, 再次验证了离体叶片鉴定方法的有效性。此外, 初步发现对于同为鳞翅目水稻害虫稻纵卷叶螟, 用离体叶片鉴定方法也可进行有效鉴定。

**关键词:** 水稻; 二化螟; 抗性鉴定; 技术评价

**中图分类号:** S511; S435.112<sup>1</sup> **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-8082(2016)04-0035-04

水稻是我国主要的粮食作物, 近 20 年水稻播种面积占全国粮食播种面积的比例一直稳定在 27%~28%, 水稻总产占全国粮食总产的 1/3 以上 (数据来源于中国国家统计局, <http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj>), 超过一半以上的人口以稻米为主食, 水稻的高产稳产对保障我国粮食安全至关重要。稻飞虱、二化螟和稻纵卷叶螟是我国水稻生产中最主要的害虫, 常年给水稻造成巨大的产量损失, 2001-2004 年间全国水稻病虫害发生面积超过 850 万  $\text{hm}^2$  次, 其中, 2003 年稻飞虱、稻纵卷叶螟、水稻螟虫发生面积占病虫害总发生面积的 72.5%<sup>[1]</sup>。据全国农业技术推广服务中心统计, 自 2003 年大爆发以来稻纵卷叶螟年发生 2 000 万  $\text{hm}^2$  次以上, 自 2000 年来螟虫的危害维持在 2 000 万  $\text{hm}^2$  次左右。农药的大量使用造成了环境污染、生产成本增加。因此, 培育抗虫 (稻飞虱、二化螟和稻纵卷叶螟等) 水稻新品种并应用于生产是解决上述问题最经济有效的途径。而建立水稻材料抗虫性的有效鉴定体系是进行抗虫育种的根本基础。

二化螟 *Chilosuppressalis* (Walker) 属于钻蛀性害虫, 在水稻分蘖期危害造成枯鞘、枯心苗, 在穗期危害造成伤株和白穗, 系水稻 3 个主要害虫之一; 然而对水稻抗二化螟特性的高效准确鉴定难度大, 其原因主要有: 幼虫容易转株为害、试验中易发生逃逸; 接虫时二化螟的活性强弱、受鉴水稻材料的发育阶段以及环境条件如温度、湿度等诸多因素影响, 试验条件难以保证高度一致; 鉴定操作流程多且复杂, 易出现偏差。早在 1985 年国际水稻研究所提出了活体成株抗性鉴定方法和抗级标准<sup>[2]</sup>; 2000 年叶恭银等提出利用离体叶片用于转苏云金杆菌毒蛋白基因水稻的二化螟鉴定, 研究发现, 鉴定结果与活体成株鉴定法所取得的结果相吻合<sup>[3]</sup>; 2002 年姚青等发明了离体稻株抗二化螟鉴定

技术, 该方法可靠而且准确<sup>[4]</sup>。2010 年四川省制定“水稻抗二化螟鉴定技术规程”地方标准 (DB51), 包括田间鉴定和离体茎秆鉴定方法<sup>[5]</sup>, 这些鉴定方法各有优缺点。由于是不同的研究者利用不同的材料在不同的时期用不同的方法进行室内抗性鉴定, 鉴定方法和鉴定结果的有效性需要进一步明确<sup>[6]</sup>。鉴于此, 笔者利用同一批水稻材料, 采用离体叶片、离体茎秆、离体剥开茎秆及活体成株等多种室内抗性鉴定方法进行抗性鉴定比较, 以期对这些水稻室内抗二化螟鉴定技术进行综合评价, 为有效鉴定和评价水稻抗二化螟能力提供技术支撑。同时, 选择综合评价最优方法对同为鳞翅目水稻害虫稻纵卷叶螟进行抗性鉴定, 以期找到一种方便快捷的稻纵卷叶螟抗性鉴定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫准备

供试验用二化螟卵块购自中国农业科学院植物保护研究所。将购买的卵块置于培养皿中, 保持一定的温度 (25℃~28℃) 和湿度 (RH 80%~90%), 直至孵化, 取刚刚孵化的幼虫供正式试验用。稻纵卷叶螟幼虫及虫卵在中国水稻研究所富阳实验基地试验田内采集。

### 1.2 供试水稻材料

供试水稻材料包括台中在来 1 号 (简称 TN 1, 感虫对照)、转 *cry1Ab/IAc* 基因水稻华恢 1 号 (抗虫对照) 及其非转基因受体材料明恢 63、转 *Vip3A* 基因水稻及其非转基因受体材料日本晴。

### 1.3 试验地点及种植方式

收稿日期: 2016-02-25

**基金项目:** 农业部转基因重大专项 (2014ZX08001-001, 2016ZX08001-001)

试验在中国水稻研究所富阳转基因中试基地进行,供试水稻材料 5 月 25 日播种,单本分别移栽至大田和塑料桶中,大田每个材料种植 4 行 8 株,每个材料种植 25 个塑料桶。整个生育期间不施任何杀虫剂。

#### 1.4 华恢 1 号阳性株鉴定

取华恢 1 号水稻叶片放置于 1.5 mL 离心管中研磨,并以蒸馏水抽提和稀释,将 Cry1Ab/1Ac 胶体金免疫检测试纸条(美国一龙公司)插入样品液,5min 后观察结果。在试纸条上出现 1 条检测线和 1 条质控线为阳性(含毒蛋白),记为“+”;仅出现 1 条质控线为阴性(无毒蛋白),记为“-”。

#### 1.5 抗螟性鉴定方法

##### 1.5.1 离体叶片法

参考农业部发布的《转基因植物及其产品环境安全检测抗虫水稻抗性鉴定标准》(农业部 953 公告-8.1-2007)中的方法,在水稻分蘖中期,分别从各供试材料的单本种植的稻株中,随机从 3 个分蘖上剪取 3~4 cm 长的叶片(倒 1 叶)各 1 片。随后在叶片两端压上用 0.1 g/L 苯并咪唑保鲜液浸渍过的小滤纸片,将叶片移置小平底玻管(9.5 cm×1.5 cm)内径,然后每管分别接入 12 头蚁螟(二化螟或稻纵卷叶螟),管口塞紧脱脂棉花。第 4 天向管内添加新鲜供试叶片 2~3 片,自开始接虫后第 7 天检查叶片,记录幼虫存活数,对每个玻璃管的活虫体质量进行称量。每个株系鉴定 10 株,2 次重复。

根据试虫存活情况,计算各供试材料每个株系的试虫死亡率,并参照感虫对照的平均试虫死亡率计算试虫校正死亡率和平均校正死亡率,根据校正死亡率划分抗、感等级,评价供试材料的抗二化螟或稻纵卷叶螟特性。校正死亡率=(供试材料试虫死亡率-感虫对照试虫平均死亡率)/(1-感虫对照试虫平均死亡率)×100。分级标准:

| 级别  | 抗性     | 幼虫校正死亡率   |
|-----|--------|-----------|
| 0 级 | HR(高抗) | >80%      |
| 1 级 | R(抗)   | 60.1%~80% |
| 3 级 | MR(中抗) | 40.1%~60% |
| 5 级 | MS(中感) | 20.1%~40% |
| 7 级 | S(感)   | <20%      |
| 9 级 | HS(高感) | 全部死亡      |

##### 1.5.2 离体茎秆法

取分蘖盛期的主分蘖稻苗 2 根,把稻苗擦干,将 2 根稻苗截取成包含叶鞘的 5 cm 茎秆 2 根,随后在茎秆两端压上用 0.1 g/L 苯并咪唑保鲜液浸渍过的小滤纸片。然后每根茎秆分别接入 6 头二化螟蚁螟,将 2 根茎

秆移置小平底玻管(9.5 cm×1.5 cm)内径,管口塞紧脱脂棉花。接虫后第 7 天分别考查或测定幼虫死亡率和活虫体质量。其间,于第 3 天在茎秆两端增加用 0.1 g/L 苯并咪唑保鲜液浸渍过的小滤纸片确保茎秆湿润。每个株系鉴定 5 株,2 次重复。结果统计和评价标准同离体叶片法。

##### 1.5.3 离体剥开茎秆法

取分蘖盛期的主分蘖稻苗 2 根,把稻苗擦干,将 2 根稻苗截取成包含叶鞘的 5 cm 茎秆 2 根,将茎秆剥开,用细毛笔轻轻将 12 头二化螟蚁螟接种在剥开的茎秆中(每个茎秆接虫 6 头),随后在茎秆两端压上用 0.1 g/L 苯并咪唑保鲜液浸渍过的小滤纸片,将茎秆移置小平底玻管(9.5 cm×1.5 cm)内径,管口塞紧脱脂棉花。接虫后第 7 天分别考查或测定幼虫死亡率和活虫体质量。其间,于第 3 天在茎秆两端增加用 0.1 g/L 苯并咪唑保鲜液浸渍过的小滤纸片确保茎秆保湿。每个株系鉴定 5 株,2 次重复。结果统计和评价标准同离体叶片法。

##### 1.5.4 活体成株抗性鉴定法

参照国际水稻研究所抗虫鉴定方法,将种植在塑料桶中且带 2~3 个分蘖的稻株搬至温室,用细毛笔轻轻将二化螟蚁螟接种在夹于茎秆与叶鞘之间的叶舌处,每株接 10 头,并加塑料网罩(直径 20 cm,高 70 cm)。接虫后 2 周移去网罩。接虫后 15 d、30 d 考查各稻株中有无枯心,调查枯心率和枯心指数。每个株系鉴定 10 株,2 次重复。枯心率(%)=单株枯心数/单株分蘖数。参照 Heinrichs<sup>[2]</sup>温室鉴定二化螟抗性按枯心指数进行分级评定。抗性标准:

| 级别  | 抗性     | 枯心指数      |
|-----|--------|-----------|
| 0 级 | HR(高抗) | 无害        |
| 1 级 | R(抗)   | <20%      |
| 3 级 | MR(中抗) | 20.1%~40% |
| 5 级 | MS(中感) | 40.1%~60% |
| 7 级 | S(感)   | 60.1%~80% |
| 9 级 | HS(高感) | >80%      |

## 2 结果与分析

### 2.1 华恢 1 号转基因阳性检测

在移栽至大田和塑料桶 1 周后,对抗虫转基因水稻华恢 1 号所有的单株进行转基因阳性检测,剔除阴性单株,防止阴性单株与阳性单株抗虫性差异造成的试验误差。选取阳性单株进行抗虫性鉴定,结果见图 1。

### 2.2 4 种室内抗虫鉴定方法的吻合性比较

表 1 利用离体叶片、离体茎秆和离体剥离茎秆法对水稻材料抗二化螟特性评价结果

| 供试材料     | 离体叶片法       |       |      |            |    | 离体茎秆法       |       |      |            |       | 离体剥离茎秆法     |       |    |            |    |
|----------|-------------|-------|------|------------|----|-------------|-------|------|------------|-------|-------------|-------|----|------------|----|
|          | 各重复校正死亡率(%) |       |      | 平均校正死亡率(%) | 抗级 | 各重复校正死亡率(%) |       |      | 平均校正死亡率(%) | 抗级    | 各重复校正死亡率(%) |       |    | 平均校正死亡率(%) | 抗级 |
|          | 1           | 2     | 3    |            |    | 1           | 2     | 3    |            |       | 1           | 2     | 3  |            |    |
| 台中在来 1 号 | 1.56        | -3.12 | 1.56 | 0          | HS | -1.69       | 1.69  | 0    | HS         | 5.08  | -5.08       | 0     | HS |            |    |
| 明恢 63    | 1.56        | 4.38  | 4.38 | 3.44       | S  | 6.44        | 14.57 | 8.61 | S          | 12.54 | 14.57       | 13.56 | S  |            |    |
| 华恢 1 号   | 100         | 100   | 100  | 100        | HR | 100         | 100   | 100  | HR         | 100   | 100         | 100   | HR |            |    |

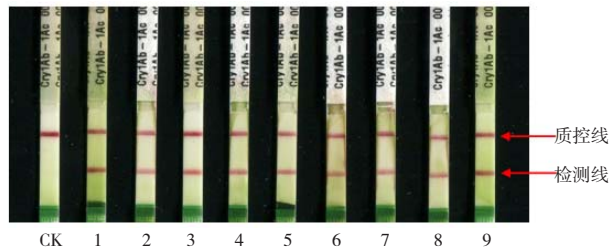
HS——高感;S——感虫;HR——高抗。

表 2 利用活体成株鉴定法对水稻材料进行二化螟抗性评价结果

| 供试材料         | 第 15 天调查 |      |          |    | 第 30 天调查 |      |          |    |
|--------------|----------|------|----------|----|----------|------|----------|----|
|              | 枯心率(%)   |      | 平均枯心率(%) | 抗级 | 枯心率(%)   |      | 平均枯心率(%) | 抗级 |
|              | 重复 1     | 重复 2 |          |    | 重复 1     | 重复 2 |          |    |
| 台中在来 1 号(CK) | 100      | 100  | 100      | HS | 100      | 100  | 100      | HS |
| 明恢 63        | 65       | 60   | 62.5     | S  | 75       | 70   | 72.5     | S  |
| 华恢 1 号       | 0        | 0    | 0        | HR | 0        | 0    | 0        | HR |

表 3 利用离体叶片鉴定法对水稻材料抗稻纵卷叶螟特性评价结果

| 供试材料         | 离体叶片法       |      |       |            |
|--------------|-------------|------|-------|------------|
|              | 各重复校正死亡率(%) |      |       | 平均校正死亡率(%) |
|              | 1           | 2    | 3     |            |
| 台中在来 1 号(CK) | 3.85        | 3.85 | -7.60 | 0          |
| 明恢 63        | 7.69        | 7.69 | -3.85 | 3.85       |
| 华恢 1 号       | 100         | 100  | 100   | 100        |



CK 为常规稻明恢 63, 编号 1~9 为抗虫转基因水稻华恢 1 号单株。

图 1 华恢 1 号的 Cry1Ab/1Ac 蛋白检测结果

分别利用离体叶片、离体茎秆、离体剥离茎秆鉴定技术对感虫对照 TN1、抗虫对照华恢 1 号及常规稻明恢 63 等 3 份水稻材料进行抗二化螟特性鉴定,结果如表 1。从表 1 可以看出,感虫对照 TN1 各重复均表现为不抗二化螟,表现稳定;以 TN1 作为参照,抗虫对照华恢 1 号的校正死亡率为 100%,表现为高抗二化螟;而常规稻明恢 63 3 种鉴定方法的平均校正死亡率在 3.44%~13.56%之间,表现为感二化螟,方差分析表明,3 种鉴定方法结果无显著差异。利用活体成株鉴定方法对同样 3 个品种进行二化螟抗性评估,结果见表 2。从表 2 可见,TN1 枯心率达 100%,华恢 1 号未发现枯心,分别表现为高感和高抗二化螟,与离体叶片法、离体茎秆法、离体剥离茎秆法鉴定结果相吻合;常规稻明恢 63 接虫后第 15 天和第 30 天的枯心率分别为 62.5%和 72.5%,表现为感二化螟,与上述 3 种鉴定方法的结果相同。总体而言,4 种鉴定方法均适宜用于水稻抗二化

螟特性的评价,鉴定结果无明显差异。

2.3 对稻纵卷叶螟的抗性评价

利用离体叶片鉴定方法对感虫对照 TN1、抗虫对照华恢 1 号及常规稻明恢 63 等 3 份水稻材料进行抗稻纵卷叶螟特性鉴定,结果与抗二化螟特性鉴定结果一致,以 TN1 作为参照,抗虫对照华恢 1 号的评价校正死亡率为 100%,表现为高抗稻纵卷叶螟,而常规稻明恢 63 平均校正死亡率为 3.85%,表现为感稻纵卷叶螟(表 3)。因此,对转 *Bt* 抗虫水稻的稻纵卷叶螟抗性鉴定可利用离体叶片鉴定方法进行鉴定。

2.4 转 *Vip3A* 基因水稻材料抗性检测

利用离体叶片鉴定法和活体成株鉴定法对转 *Vip3A* 基因水稻材料进行抗二化螟特性鉴定,除感虫对照品种 TN1 外,转 *Vip3A* 基因水稻材料和对照日本晴在接虫 30 d 后的枯心率均略高于接虫 15 d 的枯心率(表 4),表明接虫 15 d 后二化螟的危害在继续扩展。因此,抗二化螟的特性分析以接虫 30 d 的枯心率结果为准,其中,明恢 63 在接虫 15 d 和 30 d 的枯心率的差异也有相同反应(表 2)。2 种鉴定方法鉴定结果表明,13GV-12、13GV-18、13GV-30 表现为高抗二化螟,抗二化螟能力均优于非转基因对照品种日本晴,GV-2、GV-38、GV-48、GV-54、GV-63、GV-81 表现为感或中感二化螟,与对照日本晴抗二化螟能力相仿,再次验证离体叶片鉴定方法与活体成株鉴定方法的研究结果相一致。



表 4 利用离体叶片鉴定法和活体成株鉴定法对转 *Vip3A* 水稻材料抗二化螟特性评价结果

| 供试材料    | 平均校正死亡率<br>(%) | 抗级 | 枯心率(15 d)<br>(%) | 抗级 | 枯心率(30 d)<br>(%) | 抗级 |
|---------|----------------|----|------------------|----|------------------|----|
| 日本晴     | 7.81           | S  | 40               | MR | 50               | MS |
| 13GV-2  | 1.25           | S  | 75               | S  | 80               | S  |
| 13GV-12 | 90.63          | HR | 0                | HR | 0                | HR |
| 13GV-18 | 100            | HR | 0                | HR | 0                | HR |
| 13GV-30 | 100            | HR | 0                | HR | 0                | HR |
| 13GV-38 | 31.25          | MS | 25               | MR | 45               | MS |
| 13GV-48 | 34.38          | MS | 50               | MS | 55               | MS |
| 13GV-54 | 34.38          | MS | 45               | MS | 55               | MS |
| 13GV-63 | 37.50          | MS | 75               | S  | 80               | S  |
| 13GV-81 | 3.13           | S  | 45               | MS | 80               | S  |
| TN-1    | 0              | HS | 100              | HS | 100              | HS |

3 小结与讨论

目前常用的抗虫性鉴定方法主要包括田间抗虫性鉴定和室内抗虫性鉴定。田间抗虫性鉴定是在自然条件下进行,方法简便,真实感强,但易受田块中虫口密度不均匀、被检测群体大小(及重复数)、气候条件(如温度、湿度等)甚至鸟兽危害等多方面因素影响,鉴定结果容易出现偏差。室内抗虫性鉴定环境可以控制或保护,采取人工接虫,方法易规范,结果可比性强、重复性好,但对于离体材料(叶、茎秆等)存在保鲜、供试虫龄、适宜的被检测群体、后期剥检查虫工作量大等问题,相对于室外抗虫性鉴定,离体抗虫性鉴定的检测成本较高,过程较烦琐,这种方法适宜有条件的单位在需对水稻材料抗虫性准确鉴定的情况下使用。研究结果表明,对水稻抗二化螟特性鉴定采取离体叶片法、离体茎秆法、离体剥开茎秆法鉴定与活体成株法鉴定的结果完全吻合。离体叶片鉴定法具有快速、简便、不损伤稻株、后期容易剥检查虫的优点。对于离体茎秆鉴定剥开与否,试验证明对二化螟的存活和生长无明显差异,但对鉴定后期剥检查虫而言,离体剥开茎秆鉴定法更容易造成二化螟钻入茎秆内鞘内部,由于为害后期茎秆颜色与幼虫体色相近,容易漏检虫数,从而造成数据偏差,而离体茎秆中的幼虫主要存在于茎秆内鞘。总体

而言,离体叶片鉴定法是目前最快速、有效的抗二化螟鉴定方法。另外,离体鉴定法中供试虫龄,以刚刚孵化6 h 以内的蚁螟为宜。运用离体叶片鉴定法测定水稻抗稻纵卷叶螟和抗二化螟的结果一致,对转 *Bt* 抗虫水稻的稻纵卷叶螟抗性鉴定可以利用离体叶片鉴定法进行鉴定。由于稻纵卷叶螟和二化螟同属于鳞翅目害虫,且对 *Bt* 蛋白更加敏感,初步判断对于转 *Bt* 抗虫水稻的稻纵卷叶螟抗性鉴定可以参照其二化螟抗性鉴定结果进行评估,结论是否成立可以通过进一步增加测试品种进行验证。

参考文献

[1] 王艳青. 近年来水稻病虫害发生及趋势分析 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(2):343-347.

[2] Heinrichs E A, Medrano F G, Rapusas H R. Genetic evaluation for insect resistance in rice [J]. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 1985.

[3] 叶恭银,胡萃,舒庆尧,等. 转苏云金杆菌毒蛋白基因水稻抗螟性的离体叶片测定法[J]. 植物保护学报, 2000, 27(1):1-6.

[4] 姚青,赖凤香,张志涛. 水稻抗二化螟特性离体稻株鉴定技术[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4):385-386.

[5] 四川省地方标准 DB51/T1056-2010. 水稻抗二化螟性鉴定技术规程[S].

[6] 张志涛. 水稻品种抗性鉴定技术概述[J]. 国外农学-水稻, 1986 (6):1-7.

Evaluation of Appraisement Method for Rice Resistance to Striped Stem Borer

LIU Xianbo<sup>1</sup>, XIE Lihong<sup>1</sup>, TANG Shaoqing<sup>1</sup>, TU Jumin<sup>2</sup>, HU Peisong<sup>1</sup>, LUO Ju<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup> China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; <sup>2</sup> Zhejiang University, Hangzhou 310000, China; \*Corresponding author: luo-jurice@126.com)

**Abstract:** The identification result was consistent with the resistance evaluation to striped stem borer through four different bioassay methods, including detached-leaf bioassay, detached-stem bioassay, stripping detached-stem bioassay and whole plant bioassay. The detached-leaf bioassay is considered as the most rapid and effective method for evaluating resistance ability to striped stem borer. By both detached-leaf and whole plant bioassays, the author identified transgenic rice with *Vip3A* gene, and further validated the identification effectiveness of the detached-leaf bioassay method. Simultaneously, our preliminary results revealed that detached-leaf bioassay could also perform an accurate identification to rice leaf roller as lepidoptera pests of rice.

**Key words:** rice; striped stem borer; resistance evaluation; technology appraisalment