

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

轉殖 proteinase inhibitor II 基因增進水稻之抗蟲能力

[ 2/3 ]

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-322-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：劉麗飛

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

# 轉殖 proteinase inhibitor II 基因增進水稻之抗蟲能力

## Proteinase Inhibitor II Gene Transfer to Rice

### Plants for Insect Resistance

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-322

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：劉麗飛 國立台灣大學農藝系

計畫參與人員：周書旭 國立台灣大學農藝系

#### 一、中文摘要

本計畫的目標是將馬鈴薯塊莖 PinII (proteinase inhibitor) 基因，轉殖到水稻中。以期干擾水稻害蟲的生長發育，增加水稻的抗蟲能力。目前利用農桿菌法轉殖到水稻品種台農 67 號及台梗 9 號，水稻台農 67 號及台梗 9 號已進行四次轉殖，其中兩次轉殖皆是利用台農 67 號，已得到七個獨立的轉殖水稻系統 (T<sub>0</sub>)，轉殖效率為 1.88%、0.03%，其他的材料正在進行水稻植株再生的過程。得到的轉植株已進行 PCR 測定，初步確定轉殖結果，正進行 Southern 鑑定。另一方面，利用 BAPNA 測定轉植株葉片的 PI 活性，其 PI 活性比未轉植株約高 3.5 ~ 9 倍。

**關鍵詞：**水稻、基因轉殖、PI 基因、抗蟲。

#### Abstract

In this project, proteinase inhibitor II (*pinII*) gene, from potato tuber, were transferred to rice plant for increasing the

insect resistant ability of rice plant. *PinII* gene was driven by its original *PinII* promoter, which causes gene expression only when plant is attacked by insects, therefore will not interfere the plant normal growth. The constructed gene was transferred to rice TNG67 and TK9 by *Agrobacterium* method. At present transformation has been done four times. Seven independent T<sub>0</sub> lines were obtained from TNG67. More T<sub>0</sub> lines will be obtained soon. PI activities of each T<sub>0</sub> plants were detected by BAPNA method and showed 3.5 ~ 9 folds higher than that of non-transgenic plants.

**Keywords:** Rice, Gene transfer, Proteinase inhibitor (PI), insect resistant

#### 二、緣由與目的

水稻為亞洲地區最主要的糧食物，但蟲害對水稻的產量與品質都造成極大損失。過去多以化學性藥劑來控制蟲害，易對環境及消費者健康造成威脅；而傳統抗蟲育種過程繁復漫長，因此目前已利用基因轉殖的方法來快速選育抗蟲新品種<sup>(1,2)</sup>。早期轉殖是利用 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 基因，並且已經推出轉殖商業品種。但是 Bt 易使害蟲產生具抗性的新小種，並可能危

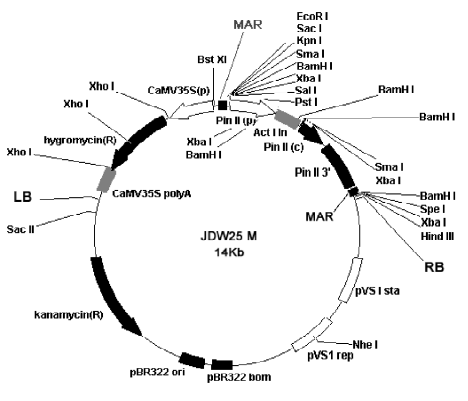
害人体健康，因此目前已改為轉殖 proteinase inhibitor(PI)基因<sup>(3)</sup>。PI 可抑制昆

長；*pin* 基因兩側不加或加入 MAR(matrix attachment region)序列，預期 MAR 序列將

蟲的內臟腔蛋白質分解酵素的活性，造成昆蟲體內某些必需胺基酸的缺乏，使生長發育受限包括進食習慣、生長速度、世代數等等<sup>(3,4,5,6)</sup>。但並不會完全殺死昆蟲而使篩選壓力過大，產生新的抗性小種。是植物本身天然的優良抗蟲基因。此蛋白質經加熱後即受破壞，因此可避免轉殖基因對生態環境及人類健康的影響。由文獻顯示，已有愈來愈多轉殖不同種類PI基因的轉殖菸草、馬鈴薯、蕃茄、萵苣等作物<sup>(7,8,9,10)</sup>。因此本計畫的目標是嘗試轉殖馬鈴薯塊莖 *pinII* 基因，構築係利用 *PinII* 本身的啟動子，使其在受昆蟲攻擊時大量表現，以免影響水稻之正常生長。轉殖方法擬採用農桿菌法以期提高基因表現效率，轉殖水稻擬繁殖至 T<sub>4</sub> 代，各世代分別進行轉殖基因鑑定，PI 活性分析，及抗蟲測試等，預期此項研究真正可以應用於育種程序中，得到抗蟲的水稻優良新品種。

### 三、結果與討論

本計畫執行至今已經完成質體構築並進行四次轉殖。在轉殖質體方面已構築好在雙偶體 pCAMBIA1300，*pin* 基因則採用其本身之啟動子，其特點為受 wounding 調控，避免影響水稻之正常生



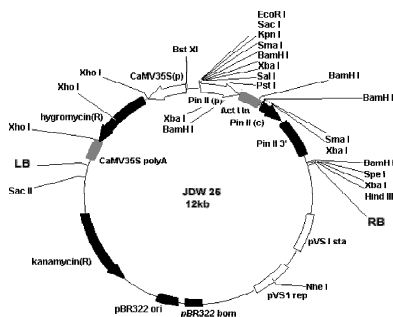
可控制單一拷貝基因插入水稻染色體組，並提高基因表現量。此外篩選基因採用 hygromycin 抗性。共計構築兩種質體，其中 pJDW25 不含 MAR 序列，質體大小約 12Kb，pJDW25M 含 MAR 序列，質體大約 14kb，質體構築示於圖一。

圖一、*PinII* 基因質體構築

基因構築完成後即進行農桿菌殖，係採用水稻胚誘導之癒合組織，與農桿菌共培養後再將農桿菌殺死清除，癒合組織則以 hygromycin 進行篩選，得到之抗性癒合組織移到分化培養基誘導植株再生，此為轉植株 T<sub>0</sub> 世代。目前已針對水稻品種台農 67 號及台梗 9 號等進行四次轉殖，其中兩次轉殖利用台農 67 號已得到 7 個獨立的轉殖水稻系統(T<sub>0</sub>)。轉殖效率 1.88% 以及 0.03% (表一)，目前正努力轉殖中，以得到更多轉植株。T<sub>0</sub> 水稻已盆栽種植於溫室中，生長情況正常，並已開始採收 T<sub>1</sub> 種子。

表一、水稻轉殖 *PinII* 基因之篩選結果

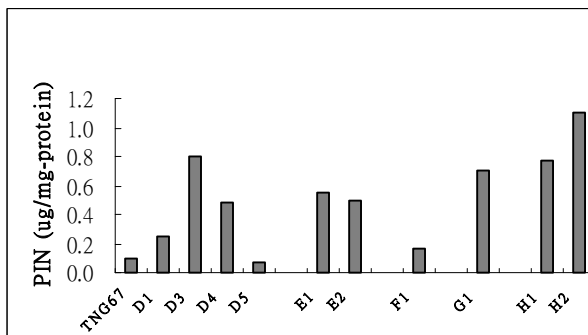
品種	感染癒合組織數目	抗 Hyg 的癒合組織	轉殖系的數目	轉殖植株數目	<sup>a</sup> 轉殖效率 (%)
pJDW25 (TNG67)	212	72	4	9	1.88
pJDW25 (TK9)	242	98	0	0	0
pJDW25 (TNG67)	852	218	3	3	0.03



\*\* Plasmid JDW25 ( pCAMBIA1300 + PinII p - Act I in - Pin II c - PinII 3' )

<sup>a</sup> 轉殖效率= 轉殖系的數目 / 感染癒合組織數目

得到的 T<sub>0</sub> 轉殖株分別針對轉殖的 *PinII* 基因進行 PCR 測定，初步已確認轉殖結果，目前正進行各世代的 Southern 測定，以便鑑定轉殖基因拷貝數及遺傳穩定性。另一方面，利用 BAPNA 測定轉殖株葉片的 PI 活性。未轉殖株的葉片 PI 活性平均 0.15 ug/mg-protein，而轉殖株的 PI 活性約高出未轉殖株約 3.5~9 倍，其中 H2 的 PI 活性最高可達 1.04 ug/mg-protein (圖二)。



圖二、轉殖水稻葉片 PI 活性測試

#### 四、計畫成果自評

本計畫進行順利，已完成基因構築，且利用農桿菌轉殖法，將質體轉殖於水稻台農 67 號及台梗 9 號品種中，但因台梗 9 號轉殖效率不如台農 67 號，目前只得到台農 67 號轉殖株，分別具有不同的 PI 活性，部分植株已收到 T<sub>1</sub> 種子。此外正努力改善培養條件以提高台梗 9 號轉殖效率，預期將可得到更多轉殖株。

#### 五、參考文獻

1. Estruch J, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Koziel MG. 1997. Transgenic plants : An emerging approach to pest control. *Nature Biotech* 15, 137-141.
2. Girard C, Le Metayer M, Bonade-Bottino M, Pham-Delegue MH, Jouanin L. 1998. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 28, 229-37.
3. Gutierrez-Compos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gomez-Lim MA. 1999. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat Biotechnol* 17, 1223-6.
4. Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Sci* 2, 379-384.
5. Mu HM, Liu SJ, Zhou WJ, Wen YZ, Zhang WJ, Wei RX. 1999. Transformation of wheat with insecticide gene of arrowhead proteinase inhibitor by pollen tube pathway and analysis of transgenic plants. *I Chuan Hsueh Pao* 26, 634-42
6. Pechan T, Ye L, Chang YM, Mitra A, Lin L, Davis FM, Williams WP, Luthe DS. 2000. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other lepidoptera. *Plant Cell* 12, 1031-40.
7. Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 16, 168-75.
8. Tamayo MC, Rufat M, Brovo JM, San Segundo B. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211, 62-71.

9. Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ.  
1998. Enhanced transgenic plant resistance to  
nematodes by dual proteinase inhibitor  
constructs. *Planta* 204, 472-9.

10. Yeh KW, Lin MI, Tuan SJ, Chen YM, Lin CY,  
Kao SS. 1997. Sweet potato (*Ipomoea batatas*)  
trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco  
plants confer resistance against *Spodoptera litura*.  
*Plant Cell Reports* 16, 696-699.