

杨树 NL-80106 转 Bt 基因植株的获得及抗虫性

饶红宇 陈 英 黄敏仁 王明床

(南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 南京 210037)

伍宁丰 范云六

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导将苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒蛋白基因 Bt 转入杨树 NL-80106 (美洲黑杨 × 小叶杨, *Populus deltoides* × *Populus simonii*), 获得了再生植株。PCR 及 PCR-Southern blotting 的分析结果表明, Bt 基因已整合到基因组中。部分转基因植株的杀虫实验表明, 转基因植株 B45 和 B64 对一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linn.) 幼虫有明显抗性, 饲喂转基因杨树叶片的幼虫死亡率显著高于未转基因的对照植株。

关键词: Bt; 杨树 NL-80106; 转基因; 抗虫性

中图分类号: S792.11; Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)02-0001-05

Genetic transformation of poplar NL-80106 transferred by Bt gene and its insect-resistance RAO Hong-yu, CHEN Ying, HUANG Min-ren, WANG Ming-xiu (Forest Genetics and Gene Engineering Laboratory, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037), WU Ning-feng, FAN Yun-liu (The Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(2): 1~5

Abstract: Genetically transformed poplar (*Populus deltoides* × *Populus simonii*) plants were regenerated after co-cultivation of leaf disks with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 that harbored a binary vector pFWZ10 which induced *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene (Bt gene) and *npt* II gene. Some transformations that were confirmed by PCR and PCR-Southern blotting showed obviously insect-resistance compared with the control poplar. Elisa will be done to identify the expression of Bt gene in the transformed poplar plants.

Key words: *Bacillus thuringiensis* (Bt); poplar NL-80106; gene transformation; insect-resistance

杨树是重要的速生经济树种。杨树人工林林分结构单一, 容易发生大面积虫害, 目前难于用常规育种方法选育抗虫杨树品种。但利用基因工程已获得转杨树基因植株^[1-8], 伍宁云等^[2], McCown B. H. 等^[3]和田颖川等^[4]分别将苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入杨树获得了转基因植株, 某些转基因植株表现出明显抗虫性; Leple J. C. 等^[5]、郝贵霞等^[6]和 Klopfenstein N. B.^[7]利用不同的蛋白酶抑制剂基因转化杨树, 也获得了转基因植株。

杨树 NL-80106 是南京林业大学从美洲黑杨 × 小叶杨 (*Populus deltoides* × *Populus simonii*) F₁代中选育出的优良无性系, 在黄淮地区广泛种植, 具有生根力强、造林成活率高、生长快等优良性状。本文用农杆菌介导法成功地将经过修饰的 Bt 基因导入杨树 NL-80106, 获得了转抗虫基因植株, 并对其进

行了分子生物学鉴定和杀虫实验。

1 材料和方法

1.1 材料

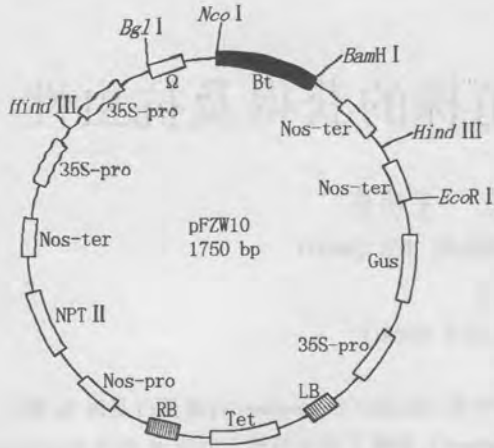
1.1.1 菌种和质粒 根癌土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 培养基为 YEB, 所携带的双元质粒 pFWZ10, 其结构见图 1。

1.1.2 供试杨树及培养基 实验材料为杨树 NL-80106 的无菌苗, 以茎段或叶片分化芽的方式增殖。

收稿日期: 2000-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (C39900117)

作者简介: 饶红宇, 女, 1967年9月生, 湖南长沙县人, 博士, 讲师, 主要从事林木生物技术研究。



35S-pro: CAMV 35S 启动子 CAMV 35S gene promoter; Ω : Ω 增强子 Ω gene translational enhancer; Bt: 苏云金杆菌毒蛋白基因 *Bacillus thuringiensis* toxin-protein gene; Nos-ter: 胭脂碱合成酶基因启动子 nopaline synthetase gene promoter; Gus: β -葡萄糖苷酶基因 β -glucuronidase gene; LB: T-DNA 左边界序列 T-DNA left board sequence; Tet: 抗四环素基因 tetracycline resistance gene; RB: T-DNA 右边界序列 T-DNA right board sequence; NPT II: 新霉素磷酸转移酶基因 neomycin phosphotransferase-II gene; Hind III, Bgl I, Nco I, BamHI, EcoR I: 限制性内切酶 restrictive enzymes.

图1 双元质粒 pFWZ10 的图谱

Fig. 1 Construction of binary vector pFWZ10

生根培养基为 MS, 分化培养基为 $MS_1 = MS + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg/L} + \text{NAA } 0.02 \text{ mg/L}$ 。

1.1.3 试验昆虫 舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linn.) 一龄幼虫是完全人工孵化的, 由中国林业科学院林业研究所提供。

1.1.4 引物及试剂 所用 Bt 基因为引物 1: 5' GAA GGA TTG AGC AAT CTC TAC 3'; 引物 2: 5' CAA TCA GCC TAG TAA GGT CGT 3', 由赛百盛生物工程公司合成; Taq 酶由中国农业大学合成, $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ 购自亚辉生物公司, 其他生化试剂购自生工生物公司。

1.2 方法

1.2.1 LBA4404(pFWZ10)的活化 挑单菌落于 5 mL YEB 附加四环素 (Tc) 5 mg/L 的液体培养基中, 230 r/min 振荡, 28°C 过夜培养, 至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$ 。继续扩大培养于 50 mL 的 YEB 液体培养基中, 230 r/min 振荡, 28°C 培养 2~4 h, 至 $OD_{600} = 0.3 \sim 0.6$, 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 以同体积 MS 液体培养基悬浮, 即用于 NL-80106 遗传转化。

1.2.2 杨树 NL-80106 的遗传转化 根癌农杆菌介导以叶盘法转化杨树 NL-80106。取健壮、幼嫩而舒展的 NL-80106 无菌苗叶片, 用解剖刀切成 0.5

~1.0 cm^2 大小的叶盘, 于分化培养基上暗中预培养 1~2 d; 将叶盘与活化的 LBA4404 (pFWZ10) 菌液混合, 感染 5 min, 无菌滤纸吸去多余菌液, 于分化培养基上 25°C 暗培养 1~2 d; 转移至选择培养基 ($MS_1 + \text{km } 75 \text{ mg/L} + \text{cb } 500 \text{ mg/L}$, km 为卡那霉素, cb 为羧苄青霉素) 上培养, 温度 25°C, 光照 16 h/d, 光照强度 1 600~2 000 lux。

1.2.3 km 抗性植株的再生 将在选择培养基上得到的 4~8 cm 抗性芽切下, 转移至生根培养基上生根, 温度 25°C, 光照 16h/d, 光照强度 1 600~2 000 lux。

1.2.4 抗性植株的 PCR 和 PCR-Southern 分子检测 CTAB 法^[9] 提取植物总 DNA, 常规方法进行转化植株的 PCR 检测。电泳检测扩增结果。PCR 电泳胶切下转膜, 按 Southern 常规方法^[9] 进行杂交。

1.2.5 转基因植株杀虫实验 取 PCR-Southern 阳性的部分植株的叶片, 对人工孵化的舞毒蛾一龄幼虫进行杀虫试验, 每序号两组, 每组 3 头舞毒蛾一龄幼虫, 于铺有湿润无菌滤纸的小细胞培养皿中, 以转化植株和对照植株的新鲜无菌叶片饲喂幼虫, 置于 25°C 人工气候室中, 每 2 d 观察幼虫发育和死亡情况并称重。重复一次。第 10 d 观察实验结果, 并计算幼虫平均体重及校正死亡率。

校正死亡率 = (参试昆虫死亡率 - 对照昆虫死亡率) / (1 - 对照昆虫死亡率)

2 结果和讨论

2.1 筛选杨树 NL-80106 遗传转化的最优条件

2.1.1 卡那霉素 (km) 对杨树 NL-80106 分化的影响 本实验所构建的植物表达载体 pFWZ10 携带有新霉素磷酸转移酶 (*npt II*) 基因, 因此以卡那霉素 (km) 筛选转化芽。杨树不同程度存在着对 km 的本底抗性^[6, 8, 10], 适当的 km 筛选水平可减少假阳性。结果 (表 1) 表明杨树 NL-80106 有一定 km 抗性本底, 在 km 20 mg/L 及 40 mg/L 选择压力下叶盘产生少量抗性芽, 分化频率为 38.71% 和 25.9%; 当 km 浓度达 60 mg/L 时, 虽然仍有 9.68% 的叶盘分化出不定芽, 但不定芽呈黄色或透明状玻璃化, 继续培养则逐渐死亡; 而 km 浓度超过 80 mg/L 时不产生任何分化。因此 km 60 mg/L 可认为是筛选杨树 NL-80106 转化细胞的临界浓度,

本实验中以 75 mg/L km 浓度选择抗性芽。

表 1 卡那霉素(km)浓度对杨树 NL-80106 叶片分化的影响
Table 1 Influence of kanamycin (km) concentration on shoot regeneration from poplar NL-80106 leaf disks

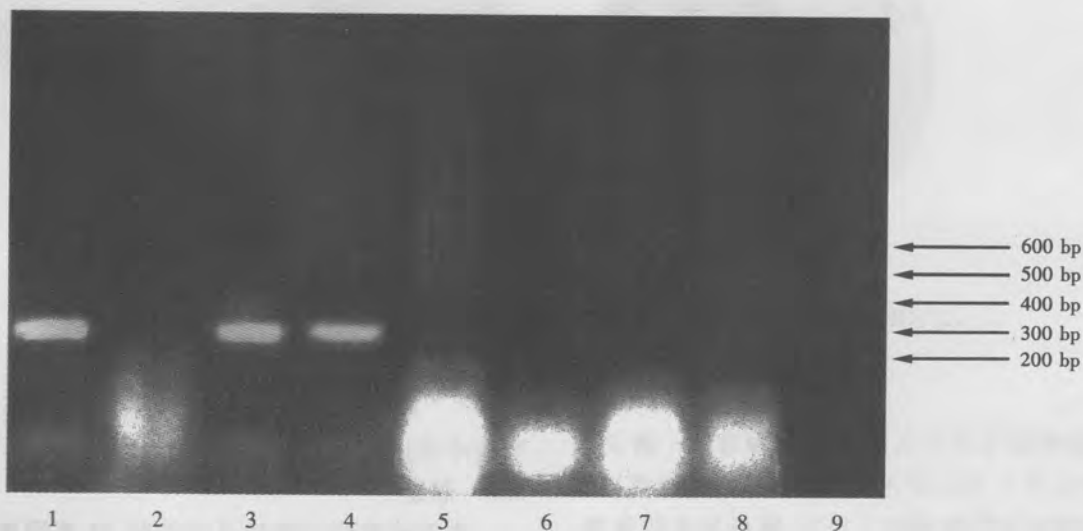
卡那霉素浓度 Kanamycin concentration (mg/L)	供试 外植体数 Number of explants	产生分化芽外植体数 Number of regeneration explants	外植体分化频率 Rate of regeneration explants (%)
0	21	20	95.24
20	31	12	38.71
40	27	7	25.93
60	31	3	9.68
80	30	0	0.00
100	21	0	0.00

2.1.2 预培养时间 预培养有利于杨树的转化^[8, 11]。比较了不同预培养时间对抗性芽产生的影响,培养 30 d 统计分化出抗性芽的外植体数。实验结果(表 2)表明,不进行预培养转化外植体抗性芽诱导率仅有 3.13%, 负对照没有任何分化;预培养 1d, 转化外植体抗性芽诱导率提高了 5 倍多(17.26%); 预培养 2 d, 则提高到 11 倍(33.52%)。虽然负对照也分化出少量不定芽,但在后继培养中逐渐黄化死亡。当预培养增加到 3 d, 在转化外植体抗性芽诱导率提高(42.71%)的同时,负对照抗性芽诱导率也大幅提高(24.39%), 易产生假阳性。因此预培养 1~2 d, 既可提高 km 抗性芽诱导率, 又能减少假阳性的产生。

表 2 预培养时间对产生卡那霉素抗性芽的影响
Table 2 Influence of pre-culture time on km-resistant (km^r) shoot regeneration

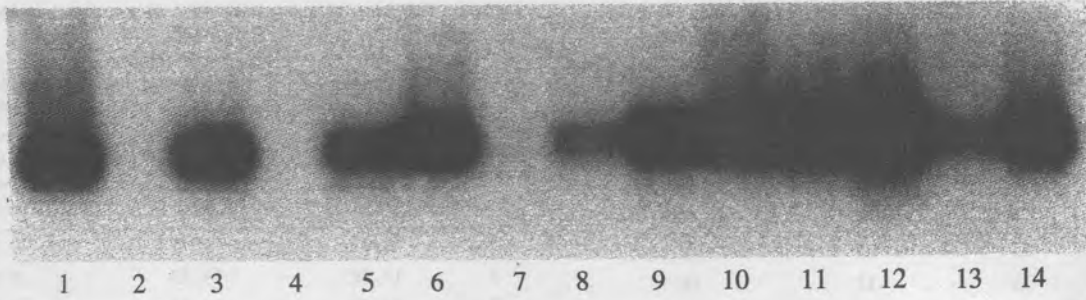
预培养 时间 Pre- culture time (days)	共培养外植体 km 抗性芽分化频率 km ^r shoot regene- ration rate from coculture explant (km 75mg/L) (%)	对照外植体在无 km 培养基上分化频率 Regeneration rate of no coculture explant (without km) (%)	对照外植体在含 km 培养基上的分化频率 Regeneration rate of no coculture explant (km 75mg/L) (%)
0	3.13	99.10	0.00
1	17.26	99.33	3.51
2	33.52	97.81	7.87
3	42.71	98.65	24.39

2.1.3 转化植株的获得 抗性芽能否在含 km 的培养基中生根是衡量转化植株的重要标志^[6], 但杨树转化中也发现 km 强烈抑制转基因植株的生根^[8, 11]。NL-80106 的生根对 km 极为敏感, 在附加低于 20 mg/L km 的生根培养基上, 均没有生根。在 75 mg/L km 选择压力下, 未经菌液感染的对照外植体通常在伤口处产生一些膨大, 有时也产生少量芽, 但在 1~2 次继代培养中逐渐死亡, 而感染菌液的外植体在此选择压力下所产生的抗性芽, 经过 2~3 次继代(约 50~60 d), 继代中逐步减少培养基中的生长素含量, 在此过程中一些抗性芽逐渐黄化至死亡, 一些呈玻璃化, 只选择健壮生长到 4~8 cm 的抗性芽移入生根培养基中生根, 得到完整转化植株。



9: DNA 分子量标记, DNA 100bp ladder; 1: 阳性对照, pFWZ10 质粒 DNA, pFWZ10 control; 2: 阴性对照, 未转基因杨树 NL-80106 un-transformed poplar NL-80106; 3, 4: 转基因植株 transformed poplars; 5~8: 非转基因杨树 NL-80106 un-transformed poplar NL-80106.

图 2 部分杨树转化植株的 PCR 检测
Fig. 2 PCR amplification results of some km-resistant regeneration poplar



1: 阳性对照, pFWZ10 质粒, Bt control; 2: 阴性对照, 未转基因杨树 NL-80106 un-transformed poplar NL-80106; 3~14: 转基因植株 transformed poplars.

图3 部分杨树转化植株的 PCR-Southern 杂交

Fig. 3 Southern blotting of the products of PCR amplification

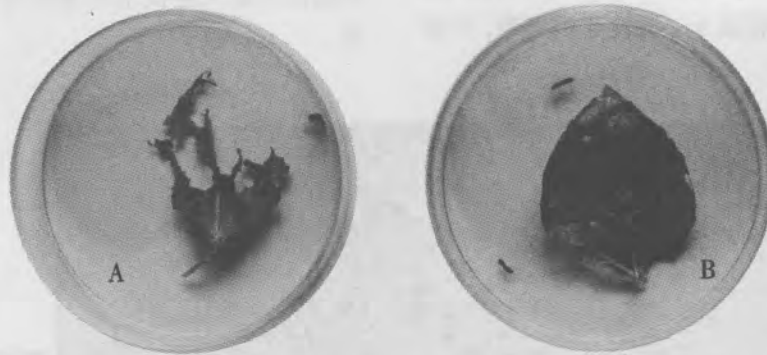
2.2 Bt 基因整合到转化植株基因组中的分子检测

提取 km 抗性植株 DNA, 以质粒 pFWZ10 为阳性对照, 以未转化杨树 NL-80106 的 DNA 为阴性对照, 用 Bt 基因特异双引物进行 PCR 扩增的结果见图 2, 可以看出, 未转化植株没有 PCR 扩增片段, km 抗性植株 3 和 4 的 DNA 经 PCR 扩增后出现 290bp 大小的片段, 与阳性对照 pFWZ10 所扩增出的一致, 而 5~8 未扩增出同样片段, 说明 Bt 基因整合到 3 和 4 植株的基因组中, 5~8 植株为 km 假阳性。

为进一步证明 PCR 扩增片段是目的基因片段, 以 Bt 基因酶切片段为探针进行 PCR-Southern 杂交的结果见图 3, 可以看出, 植株 3, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 14 的目的带显示出与阳性对照一致的信号, 阴性对照未转基因杨树植株没有显示信号, 说明 Bt 基因已整合到这些杨树无性系的基因组中。

2.3 转 Bt 基因植株对舞毒蛾的抗虫性

转 Bt 基因杨树 B64 叶片喂饲舞毒蛾第 4 d 的结果(图 4)表明, 转基因植株有明显的抗虫性。



A: 未转基因杨树 un-transformed poplar; B: 转基因杨树 B64 Bt transformed poplar B64

图4 转 Bt 基因杨树对一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linn.) 的抗性

Fig. 4 Insect-resistance of Bt transformed poplar to *Lymantria dispar* Linn.

转基因植株叶片对人工孵化的舞毒蛾一龄幼虫杀灭效果见表 3, 可以看出, 大部分转 Bt 基因植株均能不同程度抑制舞毒蛾幼虫生长, 降低幼虫取食量, 并具有一定的杀虫率, 其中 B45 和 B64 的抗虫性表现较显著。但是 B59 的 PCR-Southern 杂交虽为阳性, 却不表现出抗虫性, 这可能是 Bt 基因在转基因

植株中表达沉默造成的。

2.4 总结

本实验成功地将经过修饰的 Bt 基因转入杨树优良无性系 NL-80106 基因组中, 获得了再生植株。转 Bt 基因杨树植株对一龄舞毒蛾幼虫的抗虫性实验表明, 转基因植株 B45、B64 能明显抑制幼虫生长,

降低幼虫取食量,延缓幼虫蜕皮,并能使幼虫致死。因而,该研究结果可为培育抗虫杨树新品种提供科学依据。

表3 转 Bt 基因杨树对一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linn.) 的抗性
Table 3 Insect-resistance of Bt transformed poplar to *Lymantria dispar* Linn.

无性系 Clones	PCR ¹⁾	PCR- Southern ¹⁾	幼虫的校正死亡率 Relative death rate of testing larva (%)	幼虫的平均体重 Average weight of living larva (mg)
CK	-	-	0	11.73
B10-2	+	+	25.00	4.93
B19	+	+	50.00	4.72
B30	+	+	33.41	8.35
B45	+	+	83.33	6.93
B58	+	+	50.00	2.26
B59	+	+	0	7.10
B64	+	+	83.33	3.60
B107	+	+	50.00	4.18

¹⁾ + 为检测结果阳性 the result is the same as pFWZ10; - 为检测结果阴性, the result is the same as non-transformed poplar

参考文献

- 饶红宇, 黄敏仁. 杨树基因工程研究的现状及展望[J]. 林业科技开发, 1999, (4):3~6.
- 伍宁丰, 范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立[J]. 科学通报, 1991, 36(9):705~708.
- McCown B N, McCabe D E, Russell D R, *et al.* Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration[J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 590~594.
- 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的培育[J]. 生物工程学报, 1993, 9(4):291~297.
- Leple J C, Brasileiro A C M, Michel M F, *et al.* Toxicity to *Chrysomela tremulae* (*Coleopter chrysomelidae*) of poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor[J]. *Molecular Breeding*, 1995, 14: 319~328.
- 郝贵霞, 朱 桢, 朱之梯. 豇豆蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(12):1276~1282.
- Klopfenstein N B. Transgenic populus hybrid expressed a wound-inducible potato proteinase II - CAT gene fusion[J]. *Can J For Res*, 1991, 26(6): 711~751.
- 赵世民, 祖国诚, 刘根齐, 等. 通过农杆菌介导法将兔防御素 NP-1 基因导入毛白杨 (*P. tometosa*) [J]. 遗传学报, 1999, 26(6):711~714.
- 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等著, 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 37~38, 55~68, 589.
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Report*, 1994, 13: 256~261.
- Tzfira T, Benmeir H, Vainstein A, *et al.* Highly efficient transformation and regeneration of aspen plants through shoot-bud formation in root culture[J]. *Plant Cell Report*, 1996, 15: 566~571.

(责任编辑:宗世贤)

植物资源与环境学报

(原名:《植物资源与环境》)

欢迎订阅 欢迎赐稿

全国优秀科技期刊 华东地区优秀期刊 江苏省优秀期刊

1992年创刊,2000年第9卷起启用新名。江苏省植物研究所、江苏省植物学会及中国环境科学

学会植物园保护分会联合主办,国内外公开发行人。本刊为 BA、CA、CAB、SCI、中国生物学文摘、中国林业文摘、中国环境科学文摘等国内外著名刊库收摘。入编《中国学术期刊光盘版》,并作为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊全文收录。本刊围绕植物资源与环境两个中心命题,刊登植物资源开发、利用和保护,自然保护区与植物园的建设,植物与环境的相互作用等领域的论文、简报和综述。

本刊为季刊,大16开,64页,中国标准刊号 ISSN1004-0978, CN32-1339/S, 邮发代号:28-213。编辑部地址:南京中山门外江苏省·中国科学院植物研究所内,邮编:210014,电话:025-4432128-3203。