

# 转双价抗蛀干害虫基因杨树的获得及其抗虫性鉴定

张冰玉<sup>1</sup>, 苏晓华<sup>1\*</sup>, 李义良<sup>1</sup>, 张永安<sup>2</sup>, 曲良建<sup>2</sup>, 王玉珠<sup>2</sup>, 田颖川<sup>3\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 中国林业科学研究院森林生态与环境保护研究所, 北京 100091; 3. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

关键词: 杨树; 遗传转化; 双价基因; 蛀干害虫; 抗虫性

中国分类号: S792.11 文献标识码: A

## Transformation of Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa* cv. '84K') with Binary Insect Resistant Genes and Analysis of Insect Resistance

ZHANG Bing-yu<sup>1</sup>, SU Xiao-hua<sup>1</sup>, LI Yi-liang<sup>1</sup>, ZHANG Yong-an<sup>1</sup>

QU Liang-jian<sup>2</sup>, WANG Yuzhu<sup>2</sup>, TIAN Ying-chuan<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China; 3. Institute of Microbiology, CAS, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Transgenic poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa* cv. '84K') plants with the coleopterous insect resistant genes (*BtCry3A* and *OC-I*) were obtained. The transgenic nature of these plants was confirmed by PCR amplification and dot hybridization. The transgenic poplar's toxicity towards the *Anoplophora glabripennis* larvae was assessed on two year old selected plants in laboratory conditions. The results indicated that the transgenic lines BOGA-38 and BOGA-39 were deleterious for *A. glabripennis* larvae, and BOGA-5, BOGA-31, BOGA-38, BOGA-39 could inhibit the growth of *A. glabripennis* larvae. BOGA-39 was the most toxic one among the transgenic lines, with 41.18% corrected mortality rate and 78.90% growth inhibit rate for the larvae.

**Key words:** *Populus*; transformation; binary genes; coleopterous insect; insect resistance

随着我国大规模人工林的发展, 天牛等高危害虫干森林害虫蔓延肆虐。目前, 防治蛀干森林害虫主要采用人工机械防治和化学防治等。由于绝大多数蛀干害虫具有繁殖速度快、生活场所隐蔽、世代较长并不整齐等特点, 防治难度较大, 所以到目前为止, 由蛀干森林害虫所导致的虫害并未得到根本的控制, 并且呈逐年加重态势, 对林业生产和生态环境建设影响严重。如在我国的华东、华北、东北、西北等地都有大片杨树(*Populus* spp.)、柳树(*Salix* spp.)被光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis* Motsch.)毁灭的报道。三北

防护林工程, 遭受天牛的危害严重, 完全失去利用价值, 经济损失严重<sup>[1]</sup>。为减轻蛀干害虫给林业生产造成的巨大危害, 减少有毒化学农药的使用量, 保护环境和生态平衡, 培育抗蛀干害虫的林木是解决这一难题的安全、环保、有效的方法之一。

由于林木的世代周期较长, 采用基因工程手段在短时间内培育出抗虫林木新品种已经成为育种工作中行之有效的方法。杨树作为林木基因工程的模式树种, 其遗传转化研究, 特别在抗虫转基因方面已经取得突破性进展, 获得了大量抗虫转基因植

收稿日期: 2004-12-02

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项课题——优质高产抗旱耐盐碱杨树基因工程育种研究(J2002-B-004)

作者简介: 张冰玉(1969—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事林木生物工程育种研究。

\* 通讯作者: [suxh@caf.ac.cn](mailto:suxh@caf.ac.cn); [tianyc@sun.im.ac.cn](mailto:tianyc@sun.im.ac.cn)

株<sup>[2-10]</sup>, 其中我国抗虫转基因欧洲黑杨 (*P. nigra* L.) 和双抗虫转基因 741 杨已于 2002 年获得国家林业局基因安全委员会审定批准商品化生产<sup>[11]</sup>; 上述均为获得抗叶部害虫转基因杨树的研究报道, 迄今为止, 国内外尚无成功获得转抗蛀干害虫基因杨树的报道。

害虫对转单一 *Bt* 杀虫基因的单价抗虫植物产生抗性的潜在危险已普遍引起了关注。因此, 人们已经尝试联合使用 *Bt* 毒蛋白基因和其它类型杀虫机理不同的抗虫基因, 如各种蛋白酶抑制剂基因 (*CPTI*、*OC*), 以防止或延迟害虫产生耐受性, 同时也可以扩大转基因植物的抗虫谱。范贤林等<sup>[12]</sup>研究表明: 转双抗虫基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 对幼虫死亡率、存活虫体质量、化蛹率和化蛹时间等生长发育的影响, 均显著高于转单基因烟草; 苏宁等<sup>[13]</sup>研究也表明, 转双价抗虫基因 (*BtCry1Ac*、*OC*) 烟草植株比转单一抗虫基因植株具有更强的杀虫活性。

本研究采用农杆菌介导法, 将两种杀虫机理不同基因 (*BtCry3A* 和 *OC-I*) 导入银腺杂种杨基因组中, 其中 *BtCry3A* 基因对杨树天牛所隶属的鞘翅目具有高度专一的抗性<sup>[14]</sup>, 水稻 (*Oryza sativa* L.) 巯基

蛋白酶抑制剂 (*OC-I*) 属巯基类蛋白酶抑制剂, 对鞘翅目昆虫有较强的抗虫性<sup>[15]</sup>, 以期通过两种抗虫基因的抗性互补和协同增效作用, 提高转基因杨树的抗蛀干害虫抗性, 为进一步选育抗蛀干害虫转基因杨树新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

以银腺杂种杨 (84K 杨) (*Populus alba* L. × *P. glandulosa* Dode cv. '84 K') 的无菌苗为材料, 取其完全展开的叶片作为遗传转化的外植体。

### 1.2 农杆菌及植物表达载体质粒

农杆菌为 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, 其中含有植物表达载体质粒 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> (图 1)。

在含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素、25 mg·L<sup>-1</sup> 利福平、50 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素的 YEP 固体培养基上, 划线培养含有 *BtCry3A* 基因和 *OC-I* 基因的农杆菌 LBA4404, 挑取单菌落接种于含有相同抗生素的 YEP 液体培养基中, 在 26 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 培养 12~14 h, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集菌体, 用 MS 液体培养基将其稀释到 OD<sub>600nm</sub> = 0.4~0.6, 备用。

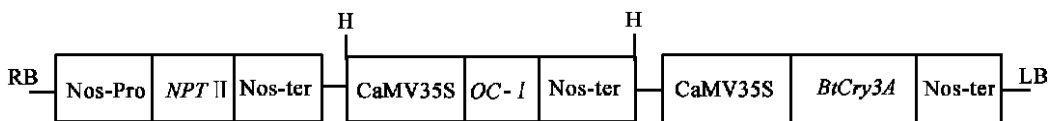


图1 植物表达载体 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> 的结构示意图

### 1.3 农杆菌介导的杨树叶片遗传转化和植株再生

转化方法主要参照 Confalonieri 等<sup>[16]</sup>的方法, 并作了适当的修改。将 0.5~1.0 cm<sup>2</sup> 的叶盘浸入转化菌液中, 轻微震荡, 处理 30 min, 取出叶盘, 在无菌滤纸上吸干, 接种到 MS+ 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的分化培养基上, 27 °C、黑暗条件下共培养 2 d 后, 将共培养后的叶盘用含有 300 mg·L<sup>-1</sup> 头孢霉素的无菌水冲洗后, 在无菌滤纸上吸干, 转移到附加卡那霉素 60 mg·L<sup>-1</sup>、头孢霉素 300 mg·L<sup>-1</sup> 的选择分化培养基上筛选, 每 10 d 左右更换一次培养基, 直至长出不定芽。切取再生的卡那霉素抗性芽 (1.0~1.5 cm), 转入附加卡那霉素 50 mg·L<sup>-1</sup> 的 1/2MS + 0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.02 mg·L<sup>-1</sup> IBA 选择生根培养基中诱导生根, 进一步培养成为完整的小植株, 并进行扩繁。植株再生及扩繁均在 27 °C/21 °C、2 000 lx、每日光照 16 h 的培养室内培养。

### 1.4 转基因植株的 PCR 检测

取无菌苗叶片, 采用 CTAB 法<sup>[17]</sup> 提取转基因杨树植株及对照植株的基因组 DNA。抗虫基因 *BtCry3A* PCR 引物序列为: 5' 引物为: 5'-ACTGCT-GATAACAACACGGAG-3', 3' 引物为: 5'-CAGT-GATCAGTGACTCTTGCG-3'。PCR 产物大小约为 0.6 kb。阳性对照的模板为含有双价抗虫基因 (*BtCry3A* 和 *OC-I*) 的 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> 质粒, 阴性对照的模板为未经转化的银腺杂种杨基因组 DNA。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C, 1 min, 57 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 扩增 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离。

### 1.5 转基因植株的点杂交检测

取大约 10 μg 植物总 DNA, 热变性后, 转移到尼龙膜上, 同时加上 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> 质粒 DNA (20 ng) 为对照, 紫外交联固定膜。用 *BtCry3A* 基因和 *OC-I* 基因的

特异引物(5'引物为:5'-TCGAGCGACGGAGGGCCGGT-3', 3'引物为:5'-GCATTTGCACTGGCATCGACA-3'), 以质粒 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> DNA 为模板进行 PCR 扩增。电泳并回收 *BtCry3A* 基因和 *OC-1* 的特异基因片段, 标记为探针, 探针的标记、杂交、洗膜及显影采用 ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Biosciences) 试剂盒, 方法参照说明书。

### 1.6 转基因植株室内虫试

对 8 个斑点杂交检测呈阳性的直径 2 cm 以上的两根一干转基因株系进行了室内虫试, 室内虫试在中国林科院森林生态与环境保护研究所完成。

1.6.1 供试虫源 供试虫为光肩星天牛, 成虫采于野外, 室内产卵孵化后幼虫在生化培养箱内(22 °C, 暗培养)用人工饲料饲养, 至 2 龄做为供试虫。

1.6.2 抗虫性鉴定方法 将转基因株系及对照主干锯为 10 个长约 20 cm 的小段(每株系取 2 株), 每小段接光肩星天牛幼虫 2 头, 树段两段用湿润的脱

脂棉包好后用封口膜密封以保持湿度, 每 2 d 调查 1 次, 记录死虫数及体质量, 并更换脱脂棉, 15 d 后统计虫试结果。

#### 1.6.3 相关数据的计算方法

$$\text{死亡率} = \frac{\text{处理虫数} - \text{活虫数}}{\text{处理虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$$

$$\text{幼虫生长抑制率} = \frac{\text{对照增质量} - \text{处理增质量}}{\text{对照增质量}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 转化体的筛选和转基因植株的再生

叶盘外植体在选择分化培养基上筛选约 20~ 30 d, 部分叶盘边缘长出不定芽, 在不断筛选过程中, 大部分不定芽白化死亡, 少量绿色芽逐渐长大。将 0.7~ 1.0 cm 的不定芽转移到含 50 ng·L<sup>-1</sup>卡那霉素的生根培养基中诱导生根, 共获得 42 株完整植株(图 2)。



图 2 获得的银腺杂种杨卡那霉素抗性芽(左)及植株(右)

### 2.2 转基因植株的 PCR 检测

提取转基因杨树和对照基因组 DNA, 用双价抗虫基因中 *BtCry3A* 基因的 PCR 特异引物, 进行 PCR 扩增。从 PCR 的结果来看, 在所检测的 39 株抗卡那霉素植株中, 有 17 株扩增出约 0.6 kb 的 DNA 片段, 其大小与 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub> 质粒为模板的扩增片段相同, 也与抗虫基因 *BtCry3A* 中 2 个引物之间推算出的片段大小相符合, 而未转化对照植株则没有条带, 3 次重复结果均一致, 由于双价抗虫基因中 *BtCry3* 和 *OC-1* 紧密连锁, 从而可以初步推断这些抗卡那霉素植株的基因组中整合了双价抗虫基因(图 3)。

### 2.3 PCR 阳性植株的斑点杂交检测

将 17 个 PCR 阳性株系的植物总 DNA, 不经过酶切, 变性后直接点于尼龙膜上, 进行斑点杂交。为了保证检测的可靠性, 用人工合成的 *BtCry3A* 基因和 *OC-1* 基因的特异引物, 进行 PCR 扩增。电泳并回收



图 3 部分转基因植株的 PCR 检测(M: 标准分子量; 1: 质粒 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub>; 2: 未转化对照; 3~ 10: 转基因植株 BOGA-15; BOGA-16; BOGA-17; BOGA-30; BOGA-31; BOGA-38; BOGA-39; BOGA-40)

*BtCry3A* 基因和 *OC-1* 的特异基因片段, 标记为探针, 分别与植物总 DNA 进行杂交。检测结果表明, 在检测的 17 个株系中, 斑点杂交均呈阳性(图 4)的株系有 13 个, 从而证明这些 PCR 阳性株系的基因组中整合了双价抗虫基因。

## 2.4 转基因杨树抗虫性室内鉴定

### 2.4.1 转基因株系对光肩星天牛幼虫的杀虫效果

从转基因株系对光肩星天牛幼虫的杀虫效果统计结果(表1)可以看出,在8个转基因株系中,BOGA-

39对光肩星天牛具较强的毒杀作用,校正死亡率达41.18%;BOGA-38的毒杀作用中等,校正死亡率为11.76%;其它转基因株系的毒杀作用则不明显。

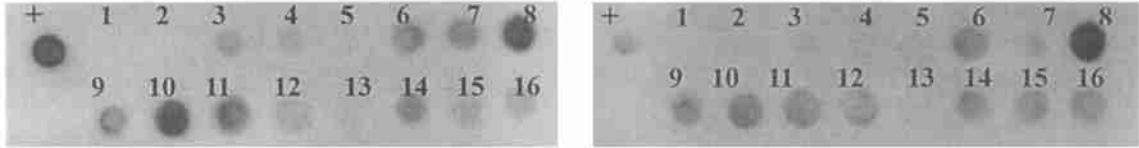


图4 部分转基因植株分别以 *BtGry3A* 基因(左)和 *OC-I* 基因(右)为探针进行斑点杂交的检测结果(+ : 质粒 pBC<sub>3</sub>O<sub>1</sub>; 1: 未转化对照; 2: H<sub>2</sub>O; 3~ 16: BOGA-13、BOGA-15、BOGA-16、BOGA-31、BOGA-34、BOGA-39、BOGA-38、BOGA-41、BOGA-30、BOGA-26、BOGA-4、BOGA-33、BOGA-36、BOGA-40)

表1 转基因株系对光肩星天牛幼虫试结果(15 d)

系号	试虫数/条	试虫初质量/g	死亡率/%	校正死亡率/%	平均体质量/g	抑制率/%
BOGA-5	20	0.03129	15	0.000	0.03654	71.02
BOGA-42	20	0.03392	20	5.882	0.06869	-93.80
BOGA-30	20	0.02573	20	5.882	0.04655	-15.91
BOGA-31	20	0.03517	15	0.000	0.05049	14.80
BOGA-36	20	0.03301	10	-5.882	0.05541	-24.74
BOGA-38	20	0.03292	25	11.760	0.04652	24.40
BOGA-39	20	0.03423	50	41.180	0.03807	78.90
BOGA-41	20	0.03545	15	0.000	0.05576	-13.07
CK	20	0.02450	15	0.000	0.04247	0.00

2.4.2 转基因株系对光肩星天牛幼虫生长量的影响 室内生物测定的结果(表1)初步表明,转基因株系BOGA-39(图5)和BOGA-5能明显抑制光肩星天牛幼虫的生长,抑制率分别为78.90%和71.02%;BOGA-38和BOGA-31对幼虫生长具有一定的抑制作用,其它转基因株系对幼虫生长抑制作用不明显。

38、BOGA-39对光肩星天牛幼虫具有一定的毒杀作用,BOGA-5、BOGA-31、BOGA-38和BOGA-39不同程度的抑制了光肩星天牛幼虫的生长,其中,转基因株系BOGA-39对光肩星天牛幼虫的毒杀和生长抑制作用显著,而其它转基因株系的毒杀和生长抑制作用不明显。转基因植株不同个体间目标形状存在差异是转基因研究中普遍存在的现象,与转基因植物中外源基因插入位点、基因沉默和转录后的调控等有关<sup>[18]</sup>。

由于受供试天牛幼虫数量的限制以及保证试验的可靠性,对照中最初接入的虫子较小,导致对照幼虫的死亡率较高、生长较为缓慢,这就可能导致了虫试结果中部分株系出现负的校正死亡率和生长抑制率,而且表现出抗虫性的株系的校正死亡率和生长抑制率偏低。针对以上原因,作者将对上述株系进行进一步的室内和大田抗虫性检测,并对外源基因的整合、拷贝数和表达水平、抗虫稳定性等做进一步的分析研究,以对其抗虫性作出更加科学准确的评价。

### 参考文献:

- [1] 张玉平,于立增,张宝贵.四种农药使用打孔注药防治光肩星天牛的药效分析[J].天津农林科技.2004,178:23~24

## 3 讨论

采用农杆菌介导法获得了银腺杂种杨转双价抗虫基因(*BtGry3A*和*OC-I*)植株,通过PCR检测和点杂交证实,该基因已经整合进杨树基因组。转基因杨树抗虫性室内测定初步表明:转基因株系BOGA-

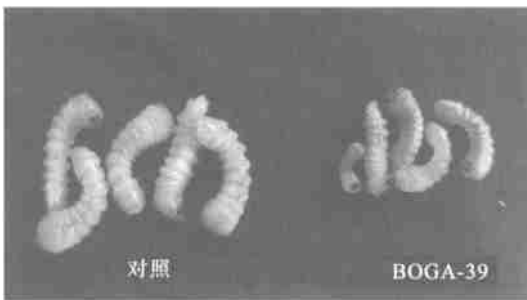


图5 转基因株系室内生物测定实验结果(BOGA-39株系对光肩星天牛幼虫生长的抑制)

- [2] Robison D J, McCown B H, Raffa K F. Responses of gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantridae*) and forest tent caterpillar (*Lepidoptera: lasiocampidae*) to transgenic poplar *Populus* spp., containing a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin gene [J]. *Environ Entomol*, 1994, 23: 1030~ 1041
- [3] Lepel J C, Bonacê Bottino M, Augustin S, et al. Toxicity to chrysomela tremulae (*Coleoptera: Chrysomelidae*) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor [J]. *Molecular Breeding*, 1995, 1: 319~ 328
- [4] 陈颖, 李强, 李玲, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的 Western 印迹法分析 [J]. *林业科学*, 1996, 32(3): 274~ 276
- [5] 饶红宇, 陈英, 黄敏仁, 等. 杨树 NL280106 转 Bt 基因植株的获得及抗虫性 [J]. *植物资源与环境学报*, 2000, 9(2): 1~ 5
- [6] 李明亮, 张辉, 胡建军, 等. 转 Bt 基因和蛋白酶抑制剂基因杨树抗虫性的研究 [J]. *林业科学*, 2000, 36(2): 93~ 97
- [7] 伍宁丰, 孙芹, 姚斌, 等. 抗虫的转 Aa IT 基因杨树的获得 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(2): 129~ 133
- [8] Delledonne M, Allegro G, Belenghi B, et al. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance [J]. *Molecular Breeding*, 2001, 7: 35~ 42
- [9] 诸葛强, 王婕琛, 陈英, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 抗虫转基因新疆杨的获得 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(4): 491~ 496
- [10] Génissel A, Lepel J C, Millet N, et al. High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic cry3Aa gene from *Bacillus thuringiensis* ssp *tenebrionis* [J]. *Molecular Breeding*, 2003, 11: 103~ 110
- [11] 苏晓华, 张冰玉, 黄秦军, 等. 我国林木基因工程研究进展及关键领域 [J]. *林业科学*, 2003, 39(5): 111~ 118
- [12] 范贤林, 石西平, 赵建周, 等. 转双基因烟草对棉铃虫的杀虫活性评价 [J]. *生物工程学报*, 1999, 15(1): 6~ 10
- [13] 苏宁, 孙萌, 杨波, 等. 双价抗虫基因叶绿体共转化植株抗虫性及其后代表型分析 [J]. *遗传*, 2002, 24(3): 288~ 292
- [14] 崔洪志, 郭三堆. Bt 毒蛋白抗虫植物基因工程进展 [J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(2): 166~ 172
- [15] 孟昆, 苏宁, 沈桂芳. 水稻巯基蛋白酶抑制剂研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2000, 2: 5~ 7
- [16] Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, et al. Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (KT<sub>3</sub>) gene [J]. *Mol Breeding*, 1998 (4): 137~ 145
- [17] Csaikl U M, Bastian H, Brettschneider R, et al. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies [J]. *Plant Mol, Biol Repr* 1998 (61): 69~ 86
- [18] 杨金水, 王光清. 转基因的失活与沉默 [J]. *生物工程进展*, 1995, 15(3): 41~ 45