

毒杀天牛基因 *mBt886cry3a* 转化小黄菊研究

周 洲^{1,2}, 尹新明¹, 卢孟柱³, 江志伟¹, 王 沛¹

(1. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技大学 林学院

河南 洛阳 471003; 3. 中国林业科学研究院 林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘 要: 毒蛋白编码基因 *Bt886cry3Aa* 对小黄菊进行了遗传转化, 转化植株经过 PCR 和总 DNA 狭缝杂交验证, 得到转基因小黄菊 4 个样品株。对菊天牛 2 龄幼虫的生物测定表明: 4 个样品株毒杀活性明显高于对照, 校正死亡率分别为: 45.89%、39.12%、35.42% 和 22.41%。*mBt886cry3a* 转基因植株表现出较强的天牛毒杀活性, 为天牛等钻蛀性害虫的防治提供了研究基础。

关键词: 菊天牛; 毒蛋白; 遗传转化; 小黄菊

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0048-03

小黄菊 (*Dendrathera grandiflorum* 'Xiao Huang') 是一种多年生菊科草本植物, 可用于日常保健饮品或入药, 同时还具有很高的园艺观赏价值, 花色淡雅, 香味宜人。小黄菊在河南省栽培面积广泛, 是河南省著名的“四大怀药”之一^[1]。菊天牛 (*Phytoecia rufiventris*) 是菊花上的重要害虫^[2], 河南小黄菊栽培过程中有些年份危害严重, 常需要使用杀虫剂来预防和控制危害。为使化学杀虫剂导致的环境污染和残留减少到最小程度, 抗虫小黄菊品种应用是一种有效的方法。植物基因工程已成为植物新品种培育的一种重要手段, 已有关于菊花抗虫遗传转基因的研究报道均是针对鳞翅目害虫^[3-5], 菊天牛等鞘翅目害虫的抗虫基因工程尚处于探索阶段。在建立小黄菊的遗传转化再生体系的基础上^[6], 通过转基因提高植株抗虫性, 探索小黄菊的基因工程抗虫育种。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pBin438-*mBt886cry3a* 含 *NPT-II* 基因和 *mBt886cry3a* 基因, 该质粒的构建方法是将 *mBt886cry3a* 基因置 pBin438 质粒中 GUS 基因编码序列(图 1)。利用液氮冻融直接转化法^[7]将质粒 pBin438-*mBt886cry3a* 转入农杆菌 GV3101 中。



图 1 植物表达载体 pBin438-*mBt886cry3a*

Fig. 1 a Plant expression vector pBin438-*mBt886cry3a*

1.2 小黄菊叶盘法遗传转化

从平板上挑取含有质粒 pBin438-*mBt886cry3a* 的农杆菌 GV3101 工程菌株单菌落, 接种到 20 mL 附加 Km 50 mg/L 的 LB^[8] 液体培养基中 (pH 7.2), 于 27℃ 恒温摇床中 180 rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。取 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 菌液, 按 2% 的比例转入新配置的无抗生素的 LB 液体培养基中, 在相同转速和温度下, 培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0 时用于转化。小黄菊 *Dendrathera grandiflorum* 'Xiao Huang' 无菌苗的幼嫩叶片剪成 1 cm² 的方块, 于上述菌液中浸泡 10 min, 稍用无菌滤纸吸去多余菌液后, 转入过渡培养基 MS₁: MS^[9] + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 于 25℃、闭光、2 d 过夜培养。过夜培养后的材料转入抗生素筛选培养基 MS₂: MS + 羧苄青霉素 500 mg/L + Km 20 mg/L, 在 25℃ 下, 16 h/8 h 光周期下进行培养, 其间 14 d 继代 1 次, 待其分化出抗性小苗。抗性丛生苗分株后, 转入生根培养基 1/2 MS + Km 10 mg/L 上进行生根培养, 待转化小苗根系生长至约 5 cm 长度时, 将完整的抗性植株移栽至温室。

1.3 转基因小黄菊植株的分子生物学验证

以 *mBt886cry3Aa* 基因序列设计引物, 引物 m1: 5'-ACCCAGTGTCAAGCAGAAACCC, 引物 m2: 5'-GTC-CACGCTCTTATGAGTCCAG。CTAB 法^[10]快速微量提取转化植株的叶片 DNA, 植物 DNA 作模板做 PCR 扩增, 选取扩增结果呈阳性的植株作 DNA 狭缝杂交验证移栽温室。植株 DNA 提取纯化经 *EcoR* I 单酶解后用于

第一作者简介: 周洲 (1978-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: zhouzhou_caf@yahoo.com.cn

通讯作者: 尹新明 (1956-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为昆虫生理生化与害虫生物防治。E-mail: Xinmingyin@hotmail.com

基金项目: 河南省杰出人才创新基金资助项目 (074200510018); 河南科技大学博士科研启动基金资助项目 (09001266)。

收稿日期: 2009-06-10

Southern 狭缝杂交, 杂交试剂盒为 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche 公司, 试验步骤遵照试剂盒产品使用说明。

1.4 转基因小黄菊杀虫活性生物测定

试虫取自河南温县农科所菊花田的成虫, 在河南农业大学昆虫生理室经过饲养产卵后, 用人工饲料饲养得到菊天牛 2 龄幼虫。幼虫进行生物测定前饥饿 24 h。供试转基因菊花选取顶端幼嫩叶片和嫩茎, 于液氮速冻条件下于研钵中研磨成粉, 同等重的天牛人工饲料均匀混合, 同时设置未经基因遗传转化的小黄菊植株为对照 CK, 幼嫩茎叶与人工饲料等量混合。试验菊天牛于全自动人工气候箱中培养, 25℃恒温、70%恒湿、光照 16 h、黑暗 8 h。饲养容器为 5 mL 塑料管, 管帽处留透气孔。生物测定每处理 5 头, 5 次重复。

2 结果与分析

2.1 转基因小黄菊植株的获得

在小黄菊遗传转化再生体系的基础上, 采用农杆菌叶盘法, 将 *mBt886cry3a* 基因导入小黄菊。结果表明, 小黄菊叶片以农杆菌浸染 10 min, 菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 共培养时间在 60~72 h, 可获得较高的转化频率。经过共培养的叶片组织转至含 500 mg/L 羧苄青霉素及 20 mg/L 卡那霉素的筛选培养基培养 20 d, 外植体出现不定芽(图 2 A), 在选择培养基中进行筛选得到 41 株绿苗, 小苗转移到含有 20 mg/L 卡那霉素的生根培养基(1/2 MS+NAA 0.1 mg/L), Km 中诱导生根, 35 株发育成为形态正常的小植株(图 2 B), 并且将小苗移栽至温室。在温室中生长健康, 秋季开花正常。

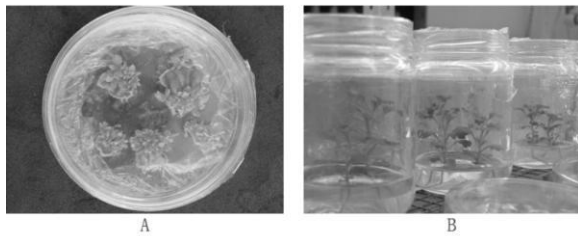


图 2 小黄菊遗传转化
注: A 转化叶片外植体分化不定芽, B 小苗生根。
Fig. 2 Genetic transformation of *Dendrathera grandiflorum* 'Xiao Huang'
Note: A transformation of leaf explants differentiation of adventitious buds, B seedlings that taking root.

2.2 转基因小黄菊植株的 PCR 检测

取形态正常的抗生素抗性筛选植株经 PCR 扩增 *mBt886cry3a* 基因。电泳图见图 3 所示。泳道“1~4”与泳道“+”阳性对照均扩增出 500 bp 大小一致的片段。检测出 4 株转化植株为有效植株。

2.3 转基因小黄菊植株的狭缝杂交

PCR 结果呈阳性的转基因系提取基因组总 DNA, 1、2、3、4 号植株的总 DNA 狭缝杂交检测结果呈现阳性

条带(图 4), 与 PCR 扩增结果一致, *mBt886cry3a* 整合进植株基因组, 转基因阳性植株用于抗虫活性分析。

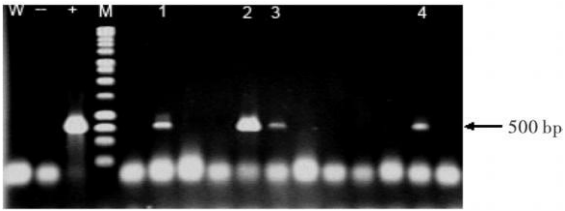


图 3 转 *mBt886cry3a* 基因植株的 PCR 检测电泳图
注: W 表示模板空白对照扩增, - 表示未转化植株 DNA 扩增 + 表示质粒 pBin438-*mBt886cry3a* 扩增, M 表示分子量标记, 1~4 表示结果呈阳性的转基因植株扩增。

Fig. 3 Plant gene transfer PCR detection of *mBt886cry3a* electrophoresis
Note: W indicated control template amplification - indicated non transformed plants DNA amplification, + indicated that plasmid pBin438-*mBt886cry3a* amplified 1~4 indicated positive amplification of transgenic plants.

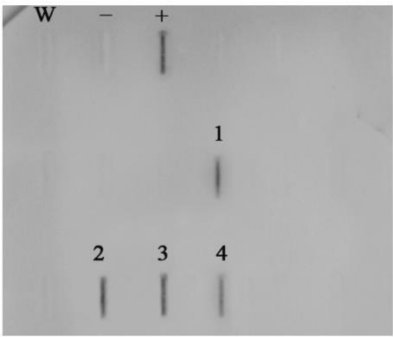


图 4 转 *mBt886cry3a* 基因植株 DNA 狭缝杂交
注: W 表示水作空白对照, - 表示未转化植株 DNA, + 表示质粒 pBin438-*mBt886cry3a*, 1~4 表示结果呈阳性的转基因植株 DNA。

Fig. 4 DNA slot blot of Gene transfer *mBt886cry3a* plant
Note: W indicated blank control, - indicated that no transformation of plant DNA, + indicated that plasmid pBin438-*mBt886cry3a*, 1~4 indicated positive transgenic plants DNA.

2.4 转基因小黄菊对菊天牛的生物测定

M₁、M₃、M₂、M₄ 分别代表 1~4 号样品植株, 取小黄菊嫩茎混合人工饲料饲喂菊天牛 2 龄幼虫。转基因系对菊天牛幼虫毒杀活性生物测定结果表明, 4 个转基因系(M₁~M₄)对菊天牛幼虫均有显著的毒杀活性, 且转基因系之间差异明显(表 1)。小黄菊转基因系 M₁ 的毒杀效果最好, 2 龄幼虫的校正死亡率为 46.89%; M₃、M₂、M₄ 转基因系毒杀效果依次降低, 2 龄幼虫的校正死亡率分别为 39.12%、35.42% 和 22.41%。

表 1 转基因植株对菊天牛幼虫生物测定结果

植株编号 Strain	平均死亡率 Mortality/%	校正死亡率 Mortality/%
M ₁	77.14±3.04d	45.89
M ₂	66.67±2.23c	35.42
M ₃	70.37±2.65c	39.12
M ₄	53.66±4.04b	22.41
CK	31.25±3.04a	0

注: 显著性水平为 0.05, 相同字母表示差异显著。
Note: The significance level was 0.05 level, the same letters significantly different.

3 讨论

田颖川用对鳞翅目害虫具有高毒力的 Bt 毒蛋白人工合成的 *Cry1Ac* 基因构建了双元表达载体 pBin438-*Cry1Ac*, 并将 *Cry1Ac* 基因转入松树表达, 转基因松树对鳞翅目害虫毒杀致死率达 70%^[11]。pBin-438 是高效的植物表达载体。从对鞘翅目昆虫具有良好毒杀作用 Bt886 菌株中克隆出对天牛害虫毒杀作用强烈的 Bt 毒蛋白编码基因 *cry3Ad*^[12], 并且在不改变 *cry3Aa* 基因编码前提下, 以杨树基因密码子的偏好性为基础, 对密码子进行有利于植物高效表达的优化, 人工合成得到改造基因 *mBt886cry3a*^[13], 生物测定原核表达的 *mBt886cry3a* 蛋白证实对光肩星天牛幼虫具有很强的毒杀活性^[14]。为了探究 *mBt886cry3a* 在植物体内表达的生物活性以及对其它天牛等害虫毒杀活性, 植物表达载体 pBin438-*mBt886cry3a* 转化小黄花菊对菊天牛幼虫校正死亡率最高接近 46%。表明 *mBt886cry3a* 在植物体内表现的毒杀活性还是很好的, 作为抗鞘翅目昆虫的候选基因有非常大的应用价值。转基因植株对其它害虫影响以及在自然田间表现如何, 如何使转基因表现更强的杀虫活性还有待研究。

参考文献

- [1] 陈明达, 白锦雯, 全柳香. 四大怀药的开发与利用[J]. 河南农业科学, 2000(4): 53.
- [2] 蒋细旺, 包满珠, 薛东. 我国菊花虫害种类、直观特征及危害[J]. 湖北农业科学, 2002(6): 74-77.
- [3] Van Wordragen M F, Honee G, Don H J M. Insect-resistant chrysanthemum calluses by introduction of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene[J]. Transgene Research, 1993(3): 170-180.

- [4] Shinoyama H, Komano M, Nomura Y, et al. Introduction of delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* to chrysanthemum *Dendranthema grandiflorum* (Ramat) Kitamura for insect resistance[J]. Breeding Science, 2002, 52(1): 43-50.
- [5] 王关林, 刘彦泓, 郭绍华, 等. 雪花莲凝集素基因转化菊花及转基因植株的抗蚜性研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1434-1439.
- [6] 周洲, 尹新明, 张德强, 等. 小黄花菊遗传转化再生体系的建立[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(5): 36-39.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.
- [10] 王西平, 王跃进, 张剑侠, 等. 葡萄早熟芽变品种“早生高墨”的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(3): 473-476.
- [11] Wei T, Ying C T. Transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plants expressing a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* with enhanced resistance to *Dendrolimus punctatus* Walker and *Cryptorhynchus formosicola* Staud[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(383): 835-844.
- [12] 陈军, 杜孟芳, 尹新明, 等. 抗光肩星天牛苏云金芽孢杆菌 Bt886 菌株得分离及对毒蛋白编码基因的初步鉴定[J]. 林业科学, 2004, 40(5): 138-142.
- [13] 陈军, 刘友全, 卢孟柱. 抗天牛基因 *cry* III A 的改造及人工合成[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(4): 39-41.
- [14] Chen J, Dai L Y, Wang X P, et al. The *cry3Aa* gene of *Bacillus thuringiensis* Bt886 encodes a toxin against long-horned beetles[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 67(3): 351-356.

mBt886cry3a Gene Transformed into *Chrysanthemum Dendranthema grandiflorum* ‘Xiao Huang’ Resistant to The Long Horn Beetles

ZHOU Zhou^{1,2}, YIN Xin-ming¹, LU Meng-zhu³, JIANG Zhi-wei¹, WANG Pei¹

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 3. Key Laboratory of Forest Silviculture of Forestry CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: *Bt886Cry3Aa* was cloned from *Bacillus thuringiensis* 886 strain, which was shown toxic to the larva of long horn beetle. Based on the characters of coding usage for pulpous genes, *mBt886cry3a* was artificially modified and then named *mBt886cry3a*. *Anoplophora glabripennis* infests *Chrysanthemum Dendranthema grandiflorum* ‘Xiao Huang’ seriously in Henan province. Transgenic approach may be an efficient way to control long horn beetle. In this study, *mBt886cry3a* were transformed into *Chrysanthemum Dendranthema grandiflorum* ‘Xiao Huang’ through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Four independent transformed lines of *mBt886cry3a* ly were obtained, by PCR and DNA blotting. Bioassay of four transgenic lines to second instars larvae of *Anoplophora glabripennis* under the control condition showed that they gave the mortalities of larvae from high as 45.89%, 39.12% and 35.42% to low as 22.41%. There was a statistical difference between the transgenic lines and wide line ($P < 0.05$). The *mBt886cry3a* transgenic chrysanthemum plants exhibited high activity against *Anoplophora glabripennis*, thus this study provides the basis for the genetic modification on plant resistant to long horn beetles.

Key words: *Phytoecia rufiventris*; Bt; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; *Dendranthema grandiflorum* ‘Xiao Huang’