双抗虫基因转化欧美杨107的研究

杨艳丽，刘兴菊，刘桂林，周　宁，付晓鹏，梁海永

（河北农业大学，河北省林木种质资源与森林保护重点实验室，河北 保定 071000）

摘　要：以欧美杨107为试材，采用农杆介导法进行双抗虫基因（*Bt Cry*1Ac基因＋*API*慈姑蛋白酶抑制剂基因）的遗传转化研究，探讨了影响欧美杨107的遗传转化的不同因素，初步建立了欧美杨107品种高效组织培养再生体系及遗传转化体系。结果表明：经PCR检测和虫试效果，证明了目的基因已经整合到欧美杨107的基因组中，从转基因株系中筛选出生长发育正常并抗虫能力强的优良株系。

关键词：欧美杨107；农杆菌；遗传转化；再生体系；检测

中图分类号：S 792.11　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2012)07－0120－03

欧美杨107原产意大利，系美洲黑杨和欧洲黑杨的杂交种，是我国北方包括西部地区防护林、用材林的主要造林树种之一。长期以来杨树新品种适应性和抗逆性变差，易发生病虫害，化学杀虫剂的使用虽然能起到一定的防治效果，但环境污染严重。微生物杀虫剂虽然能克服化学农药的缺点，但见效慢，杀虫谱窄，受环境条件影响大，因而限制其广泛应用[1]。

随着分子生物学的发展和成熟起来的植物基因工程学为林木防治病虫害开辟了一条新途径，安全有效，可降低投资和减少环境污染。1987年首次报道了转抗虫基因植物[2]，1993年，我国获得一批转 *Bt Cry*1Ac 基因的欧洲黑杨，其对舞毒蛾和杨尺蠖毒杀死亡率可达80%～90%[3]，其它杨树抗虫基因转化也取得了较大进展[4-5]。2000年，又报道了转双抗虫基因，即Bt毒蛋白基因及慈菇蛋白酶抑制剂基因（*Bt Cry*1Ac和*API*-A）的741杨，能很好的毒杀杨扇舟蛾、美国白蛾等多种鳞翅目食叶害虫[6-7]。抗虫基因在杨树生活周期中存在并发挥其抗虫功能，克服了农药危害的缺点，因此杨树转基因技术的研究具有广阔的现实意义和经济意义。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　植物表达载体　含部分改造的 *Bt Cry*1Ac 基因及慈姑蛋白酶抑制剂 *API* 基因的植物表达载体为pBtiA，含有选择标记基因为卡那霉素抗性基因NPT II基因，农杆菌LBA4404由河北农业大学生物技术研究所提供。

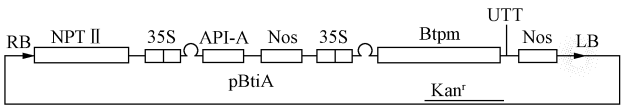

图1　双抗虫基因表达载体pBtiA质粒结构图

Fig.1　The structural drawing of tow insect-resistant gene expression vector pBtiA plasmid

1.1.2　植物材料　由河北农业大学生物技术研究所组培室提供的欧美杨107，采用多继代培养获得大批量试验用苗。

1.2　试验方法

1.2.1　欧美杨107叶片再生体系的建立　选取生长良好的欧美杨107无菌苗叶片，在无菌操作台上将叶片剪2～3刀，伤口部位经过主叶脉。设计6种MS加不同激素培养基列于表1，经过15 d左右培养，间断性观察其分化程度并做好记录，选择出分化程度最好的培养基。

表1　叶片再生培养基

Table 1　The medium of leaf regeneration　mg/L

培养基 Medium	6-BA	NAA	IAA	2,4-D	TDZ
A	0.5	0.1			
B	0.5		0.15		
C	0.5			0.5	
D			0.5		0.05
E			1.0		0.05
F	0.5		0.1		

1.2.2　欧美杨107遗传转化体系的建立　将YEB固体培养基（100 mL）融化，待其温度降到与体温相近时在无菌操作台上添加卡那霉素Kan、链霉素，摇匀，均匀倒入已灭菌的培养皿中，待其凝固，采用三级稀释法划菌，在28℃恒温培养箱中培养16～24 h。从YEB固体培养基

第一作者简介：杨艳丽（1985-），女，在读硕士，研究方向为园林植物栽培生理。E-mail：yyl_2004@163.com。

责任作者：梁海永（1973-），男，副教授，研究方向为林业生物技术。E-mail：lianghy@hebau.edu.cn。

基金项目：国家高技术研究发展计划（“863”计划）资助项目（2011AA100201）。

收稿日期：2012－01－10

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

上选取单菌落接种于加有 Kan、链霉素的 YEB 液体培养基中,于 28℃,160 r/min 的摇床上避光振荡培养至对数生长期,取部分倒入无菌离心管,4 000 r/min 离心、5 min 收集菌体,用 MS 培养液重悬菌体,4 000 r/min 离心 5 min 后再收集菌体,此后用 MS 培养液稀释至所需浓度即可用于感染杨材料。参照 Horsch R B 等[8]方法并作部分改进对材料进行侵染转化。

1.2.3 转化再生植株的 PCR 鉴定 转化再生植株卡那霉素生根筛选:当再生培养基上长出 1～2 cm 的再生芽时,将转化芽接种在含 Kan 和青霉素的生根培养基 1/2MS 附加 IBA 上,进行生根筛选。转基因欧美杨 PCR 鉴:从每株转基因欧美杨 107 植株上取 0.5～1.0 g 长势较好的叶片,采用改良 CTAB 法[9]提取总 DNA;引物及 PCR 体系:蛋白酶抑制剂基因引物:5′GCT GAA TTC GAC CAT GGC GGC CTC CAA CGC T 3’;5′CGA TGC CCA GCA AGG TTT T 3′。Bt 基因引物:5′GCC CTT ACA ACC GCT ATT CC3’;5′AGC AAA TTC TGT CCC GTC AA3’。PCR 体系:采用 25 μL 的反应体系,向各管中依次加入:ddH_2O 16.8 μL;引物 1(10 pM) 1 μL;引物 2 (10 pM) 1 μL;*Tag* 酶(5 U/μL) 0.2 μL;dNTP (2.5 mM) 2 μL;10×Buffer 3 μL;模板 DNA 1 μL;PCR 反应:设置 PCR 仪程序为

30 cycles

94℃ 4 min→95℃ 1 min→52℃ 1 min→72℃ 1 min→72℃ 7 min→4℃ 10～30 min。

琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 10 μL,用 1.0%的琼脂糖进行凝胶电泳。电泳结束后,凝胶在紫外透射反射仪下观察对照与转基因植株 DNA 扩增条带的差异,照相记录。

1.2.4 转基因植株的饲虫试验 选取 1 龄美国白蛾饲养,取 CK、PB1、PB2、PB3、PB4、PB5、PB7 进行试验,每皿 30 头幼虫,放入新鲜叶片,记载昆虫死亡数。总死亡率=饲养末期的死亡总数/初期的饲养总数×100%。

2 结果与分析

2.1 欧美杨 107 叶片再生体系的建立

从表 2 可看出,培养基 B 叶片分化程度最好,再生不定芽的频率高达 100%,不定芽数量最多。其它几组配比虽也有不定芽的产生,但芽小量少。由图 2 可看出,培养基 B:MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.15 mg/L 为适合用于叶片转化的培养基。

图 2 叶片再生不定芽

Fig. 2 Regeneration of adventitious buds leaves

表 2 不同激素浓度对叶片再生的影响

Table 2 The affect of different hormones on leaf regeneration

培养基 Medium	叶片数 Blades /个	再生频率 Regeneration frequency/%	每叶片再生芽数 Number of buds per leaves regeneration/个	生长状况 Growth conditions
A	20	90	8±3	芽小,颜色正常
B	20	100	40±10	芽较多,成簇生长,发育良好
C(5 d 后转入 F)	20	55	3±2	芽较小,多数伤口处干枯
D	20	65	4±1	芽较小,量少,部分伤口干枯
E	20	80	6±3	芽小,部分伤口略有干枯

2.2 欧美杨 107 转基因植株的鉴定

2.2.1 抗卡那霉素转化植株的筛选 对转化植株 107 杨编号,然后放入到含卡那霉素 50 mg/L 的生根培养基中,观察植株生根全过程。由表 3 可看出,对照未转基因 107 杨在含 50 mg/L 卡那霉素的生根培养基中不能生根,生根率为 0%,转化的植株即使在含有 50 mg/L 卡那霉素生根培养基中其生根率也能达到 75%以上,甚至 100%,可以初步断定基因的转化成功与否。

表 3 转化再生植株卡那霉素生根筛选

Table 3 Transformed regenerated kanamycin roots selection

株系 Strain	生根率 Rooting rate/%	每条根长 Each root length/cm	根数 Root number/条
CK	0	0	0
PB1	100	2.5±0.6	5.1±2.3
PB2	100	3.2±1.0	4.8±1.7
PB3	75	2.4±0.4	4.2±1.2
PB4	95	2.8±0.7	5.3±1.5
PB5	100	3.0±0.3	5.6±2.7

2.2.2 欧美杨 107 转化再生植株的 PCR 检测 提取转化再生植株不同株系和未转化 107 杨基因组 DNA,以质粒 pBtiA 作阳性对照,以未转基因 107 杨作为阴性对照,进行 PCR 扩增。2 个电泳图(图 3、4)可以看出,转化植株的 DNA 经过 PCR 扩增分别扩增出与质粒 DNA 相同的 749、495 bp 的目的片段,证明转化植株的 DNA 中含有与农杆菌相同的基因片段,可以初步证明目的基因已经整合到欧美杨 107 的基因组中。

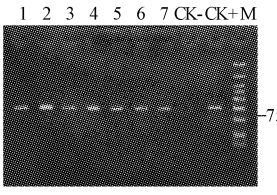

图 3 PCR 检测 *Bt* 基因

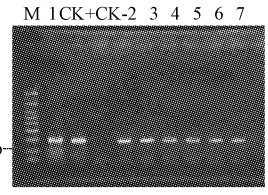

图 4 PCR 检测 *API* 基因

注:Marker D L 3 000;CK-:为植株阴性对照;CK+:质粒阳性对照;1～7 为转基因植株。

Fig. 3 PCR detection *Bt* gene Fig. 4 PCR detection *API* gene

Note:M:Marker D L 3 000;CK-:Negative control of plant;CK+:positive control of plasmid;1～7 are genetically modified plants.

2.2.3 转基因株系对美国白蛾幼虫的致死效果 用不同系号叶片饲养美国白蛾 5 d,由表 4 可知,不同系号转基因 107 杨对美国白蛾有明显的致死效果,PB4 和 PB5 号效果不好,没有死亡,但其它号系均有很好的效果。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

由图 5 可看出,当饲虫试验 3 d 时,对照植株饲虫健壮无死亡情况,且取食面积增大,而转基因植株饲虫大部分死亡、拒食。由此可以证明,抗虫基因已经转入了株系中,并得到较好的表达。

表 4　不同转基因株系饲养美国白蛾幼虫的致死效果

Table 4　Different transgenic feeding *Hlyphantria cunea* larvae lethal effects

株系 Strain	1 d 死亡率 Mortality rate /%	1 d 取食面积 Feeding area /cm²	2 d 死亡率 Mortality rate /%	2 d 取食面积 Feeding area /cm²	3 d 死亡率 Mortality rate /%	3 d 取食面积 Feeding area /cm²	4 d 死亡率 Mortality rate /%	4 d 取食面积 Feeding area /cm²	5 d 死亡率 Mortality rate /%	5 d 取食面积 Feeding area /cm²
CK	0	2.01	0	2.90	0	5.16	0	14.05	0	25.27
PB1	0	0.06	10.00	0.06	96.67	0	100	0	100	0
PB2	3.33	0.04	46.67	0.02	90.00	0	100	0	100	0
PB3	3.33	0.13	30.00	0.21	60.00	0.05	90	0	100	0
PB4	0	1.84	0	2.50	0	4.61	0	9.01	0	19.34
PB5	0	1.90	0	1.80	0	3.07	0	10.70	0	21.78
PB7	3.33	0.05	43.33	0.11	93.33	0	100	0	100	0

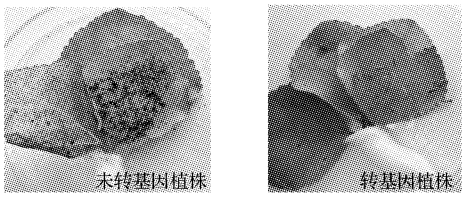

图 5　美国白蛾饲虫效果

Fig. 5　Raise insect experiment results

3　结论与讨论

在植物基因转化中再生系统应具有较高的再生频率,并且芽数量越多越好,这样才能具有高频转化的可能性。试验中发现当分化培养基中 6-BA 的浓度太高时分化速率较快,但苗生长细弱,可通过适当降低其浓度,使其分化速率下降,从而提高叶片的生长强度,以便于试验侵染时使用。通过该试验建立了欧美杨 107 的分化培养基的优化体系,结果表明,欧美杨 107 的适宜分化培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.15 mg/L。

经过基因转化再生的嫩茎植株,由于双抗虫基因的插入,同时也将新霉素磷酸转移酶基因插入到植物基因组中,从而表现出对卡那霉素的抗性。通过转化株系在添加 50 mg/L 卡那霉素的培养基的生根状况,即可初步断定基因的转化成功与否。若转化再生植株移至生根培养基中并不生根,逐渐叶片变黄,这种植株作为假阳性个体将在以后的生长中逐渐被淘汰。经过对欧美杨 107 进行 PCR 检测,其中有 7 株呈阳性,证实已经将抗虫基因转入了欧美杨 107 中。对其中 6 个系号进行虫试,效果比较明显,其中 PB4 和 PB5 号几乎没有抗虫性,其它系号效果很好,其中原因还需进一步研究。

参考文献

[1] 李荣森.微生物防治害虫[M].北京:科学出版社,1983.

[2] Barton K A,Whitely H R,Ying N S. Bacillus thuringiensisδ-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* providesresistence to lepidepteran insects [J]. Plant Phsiol,1987,85:1107-1109.

[3] 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.

[4] 郝贵霞,朱祯,朱之悌.转 *CpTI* 基因毛白杨的获得[J].林业科学,2000,36(1):116-119.

[5] 饶红宇,伍宁丰,陈英,等.杨树 NL-80106 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] 田颖川,郑均宝,虞红梅,等.转双抗虫基因杂种 741 毛白杨的研究[J].植物学报,2000,42(3):263-268.

[7] 郑均宝,田颖川,高宝嘉,等.转双抗虫基因 741 毛白杨的选择及抗虫性[J].林业科学,2000,36(2):13-19.

[8] Horsch R B,Fry J E,Hofiman N L,et al. A simple and general method of transferring genes intoplants [J]. Science,1985,227:1229-1231.

[9] Edwards K,Johnstone C,Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Research,1991,19(6):1349.

(该文作者还有杨旭,工作单位同第一作者。)

Study on Two Insect-resistant Gene Transformation of Poplar 107

YANG Yan-li,LIU Xing-ju,LIU Gui-lin,ZHOU Ning,FU Xiao-peng,YANG Xu,LIANG Hai-yong

(Agricultural University of Hebei,Hebei Key Laboratory for Tree Genetic Resources and Forest Protection,Baoding,Hebei 071000)

Abstract: Taking Poplar 107 as material, and two kinds of insect genes (*BtCry*1Ac genes and *API* genes) genetic transformation study was mediated by the agrobacterium, the impact factors to Poplar 107 during the genetic transformation were discussed, and the more efficient tissue culture regeneration and genetic transformation system for Poplar 107 were established. The results showed that after the PCR detection and worm test results, it proved that the aim gene had been integrated into the Popar 107 genome, and the target was to select the top-quality plants with normal growth and strongly construct insect ability from the transgenic plants.

Key words: Poplar 107; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; regeneration system; detection

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn