

抗虫的转 AaIT 基因杨树的获得

伍宁丰 孙 芹 姚 斌 范云六*

(中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

饶红宇 黄敏仁 王明麻

(南京林业大学森林遗传和基因工程实验室 南京 210037)

摘 要 通过根癌农杆菌叶盘法将构建在双元载体上的昆虫特异性神经蝎毒素 AaIT 基因转化至中国南方杨树 N-106(小叶杨×美洲黑杨, *P. deltoides* × *P. simonii*) 中, 共获得了 62 株再生植株。PCR 分析及 PCR 产物 Southern blotting 的分析结果表明, AaIT 基因整合在再生植株的基因组上。对部分转 AaIT 基因植株进行了杀虫实验, 转基因植株 A5 对一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫有明显的抗性, 饲喂转基因杨树叶片的幼虫死亡率显著高于未转基因对照植株, 其取食面积小, 存活幼虫体重明显小于对照。ELISA 分析证明了 AaIT 蛋白的表达。

关键词 昆虫特异性神经蝎毒素 AaIT, 杨树, 遗传转化, 转基因杨树

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0129-05

杨树是温带地区主要造林树种, 由于其生长速度快, 已成为许多国家弥补森林资源的缺乏, 解决木材需要的主要树种, 是商业速生林的标准材料。我们选择的实验材料 N-106 是我国科学家自己培育的美洲黑杨×小叶杨 (*P. deltoides* × *P. simonii*) 的优良杂种, 主要适应范围为黄淮海, 江淮流域(黄河以南, 长江以北地区), 常用来作低洼地的人造林。其主要特点是生根力强, 造林成活率高, 耐寒, 耐盐碱。近年来虫害严重, 杨树林生产常遭受严重损失。传统的喷洒化学农药和微生物制剂防治害虫的方法副作用大, 花费高, 由于抗源缺乏, 传统育种选择手段提高树木抗性工作十分困难, 杨树的遗传工作为创造抗虫的新资源及其育种开辟了新的途径。

伍宁丰、范云六^[1]于 1991 年报道了 B. t. δ -内毒素基因导入欧洲黑杨获得了转基因植株; McCown B. H. 等^[2]获得了一株抗虫的银白杨×大齿杨转 B. t. 基因植株 B. t-11, 其无性系能明显抑制舞毒蛾和天幕毛虫的摄食和体重增加。田颖川等^[3]也报道了对舞毒蛾具有高抗性的转 B. t. 基因欧洲黑杨。Leple J. C. ^[4]将半胱氨酸酶抑制剂基因导入欧洲山杨×美洲山杨, 转基因植株能明显抑制山杨叶甲的生长、发育, 并提高致死率。

据世界银行(1998 年)报道^[5], 在美国, 棉铃虫和玉米螟在实验室和田间条件下对转单一 B. t. 基因的作物均产生了抗性。因此寻找新的基因源, 对于利用多基因策略来防止害虫对转单一 B. t. 基因植株产生抗性将是十分重要的。昆虫特异性神经蝎毒素 AaIT 是从北非蝎子 *Androctonus australis*^[6] 毒液中分离出的一种活性成分, 是由 70 个氨基酸组成的多肽。AaIT 毒素主要毒杀鳞翅目昆虫, 特别对夜蛾科的一些重要的农作物害虫有效。它特异性地作用于昆虫神经系统, 使昆虫产生收缩麻痹, 而对甲壳动物、哺乳动物等其他动物均无毒性, 具有高效、特异性强、安全性好等优点。本文所用昆虫特异性蝎神经毒素 AaIT 基因是本实验室根据植物基因的密码子选择偏向, 经过密码子优化后人工合成的^[7], 并已证明在昆虫杆状病毒和转基因烟草中均具有杀虫活性^[8,9]。通过根癌农杆菌将建构在双子叶高效表达载体上 AaIT 的基因转化至小叶杨×美洲黑杨 (*P. deltoides* × *P. simonii*) 中, 获得了转基因植株, 经杀虫实验和蛋白表达分析, 证明已获得了表达 AaIT 基因的抗虫的转基因杨树, 这是迄今为止第一篇关于抗虫转 AaIT 基因的杨树的报道。

收稿日期: 1999-03-09, 修回日期: 1999-11-04。

基金项目: 国际洛克菲勒基金资助。

* 联系人。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒：实验中所用菌种为含 AaIT

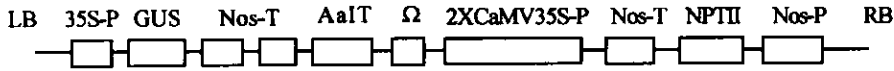


图 1 含有 AaIT 的植物双元表达载体(pGNY-2)的结构图

Fig.1 The construction of binary vector containing AaIT gene

1.1.2 酶和生化试剂：购自 Promega 公司、Pharmacia 公司、BRL 公司等。

1.1.3 植物材料：杨树品种为美洲黑杨×小叶杨 (*P. deltoides* × *P. simonii*)，由南京林业大学遗传育种室提供无菌苗。

1.1.4 测试昆虫：一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫购自中国林业科学研究院森林保护研究所。

1.2 杨树的转化

以杨树叶片和叶柄为外殖体。将杨树无菌苗叶片切成 0.5cm 左右的小方片，放在预先铺有一张滤纸的 MS 分化培养基上 (含琼脂 8g/L，蔗糖 30g/L，BA0.5mg/L，NAA0.02mg/L)，将此平皿封好放在 25℃ 培养箱中暗培养过夜，然后将这些小叶片取出，放在含有重组表达载体的农杆菌 LBA4404 菌液中侵染 10min。侵染后取出外殖体置无菌滤纸上吸干其表面的菌液，然后放回到培养皿中，封好后置于培养箱中共培养 3d。3d 后将外殖体置于附加卡那霉素 (60mg/L) 和羧苄青霉素 (500mg/L) 的选择性分化培养基上，16h 光照培养，同时以未侵染叶片外殖体作对照。待分化的抗性芽长到 1cm 左右转入 MS0 生根培养基上 (含 500mg/L 羧苄青霉素)，诱导生根。

1.3 再生植株中 AaIT 基因 PCR 的扩增及 PCR Southern 杂交检测

从再生植株叶片中提取基因组 DNA，参考 Hillis^[10] 的方法用 CTAB 缓冲液提取。DNA 纯化后作为模板进行 PCR 扩增，PCR 反应程序为：94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 2min，35 个循环。反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测，并进一步进行 Southern blotting 分析。

1.4 再生植株中 AaIT 蛋白的检测

取 0.1g 叶片组织，加入 500μL PBS 缓冲液，研磨后倒入小离心管中，10 000r/min 离心 5min。取 200μL 加入酶标板，4℃ 包被过夜，第二天用 PBST

植物双元表达载体 (pGNY-2) 的根瘤农杆菌 LBA4404，菌种及质粒均为本实验室构建和保存，含 AaIT 植物双元表达载体 (pGNY-2) 的结构如图 1 所示：

(PBS, Tween20 0.3%) 洗涤 2 次，加入封闭缓冲液 (3% 脱脂奶粉, 0.3% Tween 20, PBS) 37℃ 孵育 2h，PBST 用洗涤 2 次，加入第一抗体 (1:200 稀释)，4℃ 反应过夜，再用 PBST 洗涤 2 次，加入碱性磷酸酯酶标记的第二抗体 (用 PBST + 1% 脱脂奶粉稀释)，4℃ 反应过夜。PBST 洗涤 3 次，加入 100μL 显色底物，2h 后在 500nm 处测光吸收。

1.5 再生植株的抗虫性测定

待再生植株的小苗长至 4~5cm，取其部分叶片用室内培养皿法测转化植株对鳞翅目害虫舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 一龄幼虫的抗性。将叶片放在无菌的培养皿中，培养皿底部放有两层湿润滤纸保湿，将大小一致且已称重的一龄舞毒蛾幼虫放入平皿中，每皿放 5 头幼虫，每株每次 2 皿，于 25℃ 培养箱中培养，观察幼虫的存活、体重、取食及生长情况。每隔 3d 称虫重一次，并统计虫子的死亡数，计算死亡率。根据以下公式计算出活虫的平均体重及平均死亡率：

$$\text{平均体重 } W = \sum W_i / n_1, \text{ 体重标准差 } s_1 = \sqrt{(\sum (W_i - W)^2) / n_1}$$

$$\text{平均死亡率 } L = \sum L_i / n_2, \text{ 死亡率标准差 } s_2 = \sqrt{(\sum (L_i - L)^2) / n_2}$$

注： W_i ：个体虫重； W ：平均体重； n_1 ：实验总虫数； L_i ：死亡率； L ：平均死亡率； n_2 ：实验次数。

2 结 果

2.1 杨树转化及植株再生

经过根瘤农杆菌侵染后的小叶片和叶柄切段放在选择性分化培养基上，大约 10d 后，外殖体开始萌生小芽点，产生的芽点逐渐分化出不定芽；而未经根瘤农杆菌侵染的阴性对照在选择性分化培养基上看不见芽点产生，外殖体逐渐变黄，不产生不定芽。待经农杆菌转化得到的绿色不定芽长至 1cm 左右时，转移至生根培养基上诱导生根。

先后 6 次遗传转化共转化外殖体 408 个，产生卡那霉素抗性不定芽 76 个，其中 62 个在生根培养

基上生根,并长出小苗。

2.2 转化植株中 AaIT 基因 PCR 的检测

待小苗长至 3cm 左右时,取 0.1g 左右重的叶片,用 CTAB 法提取植物基因组 DNA,用 AaIT 基因两侧引物 A1、A2 (A1: ATGAAGAAGAACG-GCTACGCCGTTGATAGC; A2: GTTGATGATG-GTAGTGTCGCA)PCR 扩增 AaIT 基因片段,同时以未转化杨树植株叶片 DNA 作对照。在检测的 46 株小苗中,有 21 株呈 PCR 阳性,扩增出一条 220bpDNA 的片段,同 AaIT 基因大小相符,而未转化对照杨树植株 PCR 呈阴性反应。图 2 为部分转化植株 PCR 检测结果。

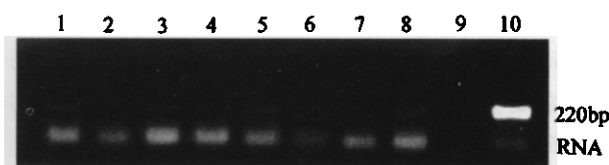


图 2 部分转化植株 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR amplification results of some transformed plants

1. A5; 2. A10; 3. A12; 4. A17; 5. A18; 6. A19; 7. A30; 8. A44; 9. Negative control (untransformed plant); 10. Positive control (agrobacterium with plasmid pGNY-2)

2.3 PCR 产物的 Southern 杂交

随机选择 3 株 (A5、A12、A18) PCR 阳性的植株做 PCR-Southern, 以排除 PCR 扩增可能出现的假阳性结果。实验结果表明, PCR 扩增的 DNA 片段与 AaIT 基因探针特异性杂交, 出现清晰的杂交带 (如图 3), 进一步证明了 AaIT 基因在转基因杨树基因组的整合。

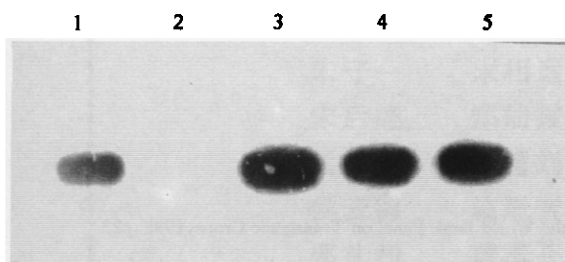


图 3 杨树转化植株 PCR 产物 Southern 的杂交

Fig. 3 Southern blotting analysis of PCR amplification products

1. Positive control (pGNY-2 in LBA4404); 2. Negative control (untransformed plant); 3. A5; 4. A12; 5. A18 (PCR positive plants)

2.4 转化植株的 ELISA 分析

提取 15 株转化植株 (包括 A5、A12、A18) 的可

溶性蛋白组分, 用抗 GST-AaIT 蛋白抗体进行 ELISA 分析, 结果表明, 其中两株 A5、A12 阳性反应显著, OD_{500} 分别为 0.20、0.24, 而对照为 0.02, A5、A12 在 500nm 的光吸收值是对照的 10 倍, 说明 AaIT 基因在这两株植物中得到了表达, 其他各株 (包括 A18) 呈阴性, 它们的 OD_{500} 与对照相比没有显著区别。图 4 显示了转化植株 ELISA 分析的结果。

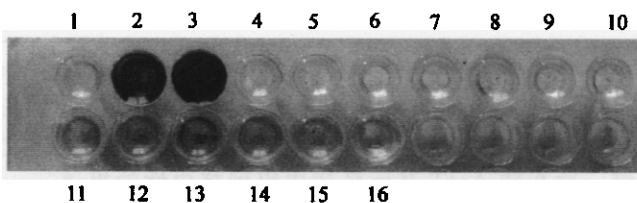


图 4 杨树转化植株 ELISA 的分析

Fig. 4 ELISA analysis of transgenic poplar

1. A3; 2. A5; 3. A12; 4. A13; 5. A14; 6. A15; 7. A16; 8. A17; 9. A18; 10. A19; 11. A20; 12. A21; 13. A22; 14. A23; 15. A24; 16. CK

2.5 转化植株的杀虫活性分析

对 PCR-Southern 呈阳性的植株 A5、A12、A18 进行了重复 3 次的杀虫实验。结果表明, A5 杀虫效果显著, 第四天幼虫死亡率为 40%, 第七天死亡率达 80%, 其叶片取食面积很小, 只有几个针眼大小的小孔, 而对照叶片已几乎被吃光, 活虫虫体大小也显著小于对照 (如图 5); A12 杀虫效果较明显, 第四天幼虫死亡率为 40%, 第七天死亡率达 55%, 且活虫虫体重量明显小于对照。A18 植株的杀虫效果不明显, 第七天死亡率为 25%, 这一结果与 ELISA 分析 A18 呈阴性是相吻合的。植株杀虫结果见表 1。

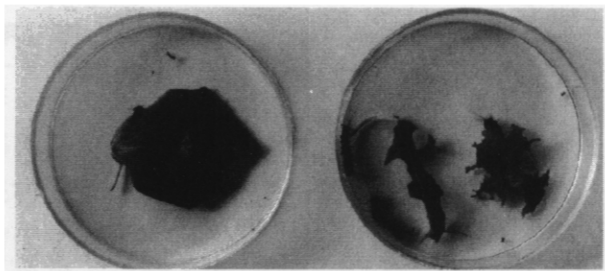


图 5 转基因植株 A5 和未转基因对照杀虫实验 6d 结果

Fig. 5 Insect assay result of plant A5 and the control after six days

Left: Transgenic plant A5; Right: Untransformed control

3 讨论

转 AaIT 基因杨树植株对一龄舞毒蛾幼虫的抗性实验表明, 转基因植株 A5、A12 有明显抑制幼

表 1 杨树转化植株的杀虫实验结果

Table 1 Insect feeding test of some transformed poplar plants

Plant No.	PCR	ELISA	First day	Fourth day		Seventh day	
			Average weight survivors/mg	Average weight survivors/mg	Average lethal rate/%	Average weight of survivors/mg	Average lethal rate/%
A5	+	+	0.6±0.1	2.0±0.4	40.0±5	6.8±0.8	80.0±10
A12	+	+	0.6±0.0	1.8±0.1	40.0±10	6.0±0.6	55.0±5
A18	+	-	0.6±0.1	2.9±0.3	25.0±5	12.5±1.2	25.0±5
CK	-	-	0.6±0.1	4.1±0.5	0.0±0.0	16.0±2.7	0.0±0

虫生长,降低幼虫取食量,延缓幼虫蜕皮,并能使幼虫致死的作用。这是继转 AaIT 烟草抗虫报道后^[9]第一次在转 AaIT 基因杨树中得到抗虫性的报道。

在我们的实验中,用 ELISA 的方法检测 AaIT 在转基因植株中的表达,因为这是近年来国际上检测转基因植株中蛋白的表达能否在大田中具有抗虫性所应用的方法。从我们的实验结果来看,转基因植株 A5 和 A12 的 PCR-Southern 及 ELISA 反应均呈阳性,前者比后者的杀虫效果显著,但 ELISA 反应比后者稍弱。这个实验结果可能是与转基因植株 A5、A12 表达的 AaIT 蛋白的活性有关。转基因植株 A18 的 PCR-Southern 反应呈阳性,3 次重复杀虫实验均证明该植株具有一定的杀虫效果(第 7 天幼虫平均死亡率为 25%),但其 ELISA 反应与对照相比没有明显差别,这可能是表达的蛋白量太低,用 ELISA 方法难以检测出来,用 Western blotting 方法检测其蛋白的工作正在进行之中。

昆虫特异性蝎神经毒素 AaIT 与 B. t、CpTi 等

的杀虫机理不同,前者是特异性地作用于目标昆虫的神经系统,而后者影响昆虫的消化系统。以前人们研究 AaIT 对昆虫的作用,是用注射的方法,但我们在转 AaIT 基因烟草^[9]以及本工作的转 AaIT 杨树中均证明了口服 AaIT 一样有杀虫效果,它们的作用机理有待进一步研究。

转化多个基因到植物中以防止害虫产生抗性,是近年来抗虫植物基因工程的新策略^[11]。我们已经获得了高抗虫转双基因(B. t. 和 CpTi)的烟草,并证明了转双基因的烟草比转单基因烟草有更强的杀虫活性^[12,13]。用转基因烟草饲喂人工饲养的棉铃虫进行抗药性实验,经过连续 18 代的室内抗性汰选实验证明,转双基因的烟草与转单基因烟草相比,显著延缓了害虫抗性的发展^[14,15]。AaIT 基因专一性强,安全性好,特别是它与 B. t 等的杀虫作用机理不同,因此为植物持久性抗虫基因工程的多基因策略提供了新的基因源。目前杨树的双基因(B. t + AaIT)转化工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 伍宁丰,范云六. 科学通报,1991,36(9):705~708
- [2] McCown B N et al. *Plant Cell Reports*, 1991,9:590~594
- [3] 田颖川,李太元,莽克强等. 生物工程学报,1993,9(4):291~297
- [4] Leple J C et al. *Molecular Breeding*, 1995,1(4):319~328
- [5] Henry W Kendall, Roger Beachy et al. *Bioengineering of Crops*, Report of the World Bank Panel on Transgenic Crops, 1998, p23
- [6] Zlotkin E, Fraenkel G, Miranda F. *Toxicon*, 1971,9:1~8
- [7] 姚斌,范云六. 农业生物技术学报,1995,3(2):86~92
- [8] 姚斌,范云六,赵荣敏等. 中国科学(C), 1996,26(1):78~84
- [9] 姚斌,范云六,曾勤. 生物工程学报,1996,12(2):113~118
- [10] Hillis D M et al. *Nucleic acids III: Sequencing*. In: Hillis D M, Mortiz C. (eds) *Molecular Systematics*, Sinauer, Sunderland, 1990, pp. 318~370
- [11] 范云六, Bt 抗虫植物遗传工程, 李向辉主编《植物遗传操作》, 北京: 高等教育出版社, 1994, pp32~48
- [12] 赵荣敏, 范云六, 石西平. 生物工程学报, 1995, 11(1): 1~5
- [13] 范贤林, 石西平, 赵建周. 生物工程学报, 1999, 15(1): 6~10
- [14] Zhao J Z, Shi X P, Fan Y L et al. *Rice Biotechnology Quarterly*, 1998, 34: 9~10
- [15] 赵建周, 范云六, 范贤林. 科学通报, 1999, 44(15): 1635~1639

Insect-resistant Transgenic Poplar Expressing AaIT Gene

WU Ning-Feng SUN Qin YAO Bin FAN Yun-Liu

(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

RAO Hong-Yu HUANG Min-Ren WANG Ming-Xiu

(*Laboratory of Forestry Genetic Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037*)

Abstract Insect-specific scorpion neurotoxin AaIT gene inserted into a binary vector was transferred into a hybrid poplar clone N-106 (*P. deltoides* × *P. simonii*) growing in the Southern of China. We obtained sixty-two regenerated plants by *Agrobacterium tumefaciens* transferring system. PCR and PCR-Southern analysis showed that AaIT gene was incorporated into the genome of some recovered poplar plants. One of the transformed plants named A5 was significantly resistant to feeding by first instar larvae of *Lymantria dispar*, compared with the untransformed control plant. It caused a decrease in leaf consumption by larvae, a lower larval weight gain and a higher larval mortality rate of *Lymantria dispar*. ELISA analysis proved that AaIT gene was expressed in this transformed poplar plant.

Key words Insect-specific scorpion neurotoxin AaIT gene, poplar (*P. deltoides* × *P. simonii*), Genetic transformation, transgenic poplar