

抗虫转基因欧洲黑杨的培育*

田颖川 李太元 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

韩一凡 李玲 王学聘 卢孟柱 戴连韵 韩一依 严静君

(中国林业科学院林业研究所, 北京 100091)

Dean W. Gaberiel

(Dept. of Plant Pathology, University of Florida

Gainesville, Florida 32611, USA)

用带有35 S- Ω -Bt-NOS嵌合基因的双元载体的农杆菌LBA 4404 转化欧洲黑杨的叶片外植体, 共获得54株转化再生植株。用这些再生植株对杨尺蠖 (*Apocchmia cinerarius*) 进行毒力测定, 昆虫校正死亡率在80—96%的再生植株占总测定植株的15%。部分再生植株对舞毒蛾进行测定, 表明在5—9天内校正死亡率高达100%, 存活昆虫的生长和发育也明显地受到抑制。根据苗木在苗圃中高中生长和昆虫校正死亡率采用重心聚类法进行分析, 初步选出高中生长良好和杀虫率居中的3株再生植株。以选出的植株为主进行了PCR及PCR产物的Southern blot和再生植株DNA Southern blot测定, 结果证明Bt基因已插入到这些植株的DNA上, 并表达出苏云金杆菌杀虫蛋白的杀虫活性。

关键词 杨树; Bt基因; 抗虫

自1983年第一株含有外源基因的转基因植物诞生后, 利用Ti质粒转化系统或直接转化方法已获得许多抗病毒, 抗除草剂、抗虫以及延迟果实软化等转基因作物。以基因工程手段培育抗虫植物已成为植物生物工程重要研究内容之一。目前国外已获得抗虫转基因蕃茄和棉花并进行了大田试验^[1,2], 国内也已获得抗烟青虫的转基因烟草NC 89 纯合系正进入大田试验中^[3,4]。

在转基因林木的研究方面, 国外于1989年以来对黑云杉、短叶松、花旗松、刺槐、杨树和胡桃进行转化研究^[5-12]。其中Mc Cown 获得了一株银白杨×大齿杨的转基因植株, 并对舞毒蛾和天幕毛虫有杀虫效果^[9]。

为解决国内木材供需矛盾, 我国在本世纪末及下世纪初将计划营造以亿亩计的速生用材林基地。而杨树将是主要造林树种, 但杨树丰产林不丰产的主要原因是食叶害虫和蛀干害虫的危害, 在我国北部地区食叶害虫以杨尺蠖和舞毒蛾、扇舟蛾为主。为此我们于1989年底开始研究将苏云金杆菌(*B. t.*)杀虫蛋白基因转入欧洲黑杨, 现已筛选出一批有*B. t.*杀虫蛋白基因整合至染色体的杨树, 经抗虫生物测定证实, 杨尺蠖和舞毒蛾的死亡率可达80—100%, 并有明显的抑制害虫生长和发育作用。有3株转基因植株153°、12°和192°,

本文于1992年12月15日收到。

* 中国林业科学院林业研究所, 李英梅、卞祖娴、张香华、卞学瑜参加部分工作, 特此致谢。

不仅抗虫性高而且生长速度和长势也很好,已准备进行小面积大田实验。

材 料 和 方 法

(一)材料

1. 菌种和质粒:含B.t.杀虫蛋白基因、35 S启动子等的中间载体质粒及农杆菌。由中国科学院微生物所构建并提供。

2. 植物:来源于阿塞拜疆共和国巴库地区的欧洲黑杨(*Populus nigra*)。

3. 测试昆虫:杨尺蠖(*Apocheimia cinerarius* Erschoff)和舞毒蛾(*Lymantria dispar* Linnacus)由中国林业科学研究院林业研究所提供一龄幼虫。

(二)方法

1. 中间载体的构建:利用中间载体 pBin 437^[3]的衍生载体 pBin 438,我们构建了分别含Kurstaki HD-1株系的3'-端不同程度缺失的CryIA(c)型基因的中间表达载体,该载体不仅含有带双重增强子的35 S启动子,且在AUG起始密码与35 S启动子之间插入了TMV-RNA5'-前导序列,即Ω片段的cDNA以增强翻译效率。分别将含4种不同缺失长度的B.t.基因载体即B.t. 48-212含全长基因3.6 kb; B 48-213, 2.8 kb; B 48-214, 2.1 kb; B 48-215, 1.8 kb; 转入农杆菌LBA 4404做转化植物用^[4]。

2. 杨树外植体的转化:外植体为叶片和茎段,将欧洲黑杨的黄化茎经0.1% HgCl₂消毒10 min,蒸馏水洗净,黄化茎切成1.5 cm小段后,划出伤痕的茎段和无菌苗叶片分别在含4种不同长度的杀虫蛋白基因的农杆菌菌液中浸泡5 min左右后取出,用滤纸吸去表面残留菌液,先置于不含卡那霉素的分化培养基上,在25℃±2℃黑暗条件下培养72 h,然后转到含

卡那霉素的分化培养基上,在光照16 h和25℃±2℃的培养箱中培养。对照为在相同条件下不接种菌液的外植体。当丛生苗伸长到1 cm左右时即转入生根培养基。冬季初期将完整的再生植株移栽到消毒土壤中,即营养杯中,在温室中培育。翌年春,将其移栽到苗圃。

叶片分化培养基为MS含BAP 0.2 mg/L, 2,4-D 0.2 mg/L+卡那霉素50 mg/L。茎段分化培养基为含BAP 0.5 mg/L, 2,4-D 0.2 mg/L,卡那霉素60 mg/L的MS培养基。生根培养基为1/2 MS, NAAO, 0.02 mg/L,卡那霉素50 mg/L,均添加羧苄青霉素500 mg/L。

3. 转基因欧洲黑杨的DNA分子杂交:

(1) 欧洲黑杨DNA的分离:杨树叶片在液氮中研磨成粉后按文献[13]报道的方法提取DNA。

(2) DNA狭槽印渍分析:10 μg转化再生的杨树叶DNA在200 μl 0.4 mol/L NaOH溶液中于65℃变性10 min后通过BioRad公司的狭槽印渍装置吸印到Z-probe膜上,膜与³²P-dCTP标记的1.8 kb B.t.杀虫蛋白基因探针的杂交,参照厂家提供的方法进行。

(3) 用PCR技术及Southern印渍法检测B.t.杀虫蛋白基因在转化杨树植株中的整合:用杨树叶DNA 25 ng在20 μl反应体积中,加dNTP至0.2 mmol/L, Promega公司的Tag DNA多聚酶0.2 u, B.t.基因特异引物各10 pmol(引物1:5'-GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC ATT-3';引物2:5'-AAG TAT ATC CAT CAA ATG TGG ACT-3')。PCR反应在94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃反应1 min,重复30个循环。反应结束后取反应混合物在1% Agarose胶上电

泳检查反应产物。然后将 PCR 产物按先前所述方法^[4]转移到 Z-probe 膜上, 与 ³²P 标记的 B.t. 基因进行杂交以进一步确证 B.t. 基因的整合。

4. 转基因植株抗虫活性测定: 将30头一龄幼虫放入瓶口封闭的玻璃瓶中, 在 20℃±1℃的人工气候箱中饲养, 每隔两天换叶片一次, 同时检查昆虫的死亡数并鉴别虫龄。实验结束时, 将存活的幼虫称重。然后计算幼虫死亡率、校正死亡率、蜕皮指数、幼虫平均体重及毒力。最后根据校正死亡率和株高, 采用重心法进行聚类分析, 画出树状图。计算过程中采用的公式如下:

$$\text{蜕皮指数} = \frac{1\text{龄} \times \text{头数} + \dots + 5\text{龄} \times \text{头数}}{\text{总头数}}$$

$$\text{毒力(毒效)} = \frac{\text{对照蜕皮指数}}{\text{处理蜕皮指数}} - 1,$$

(数值愈高说明毒力愈大)

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{参试昆虫死亡率} - \text{对照昆虫死亡率}}{1 - \text{对照昆虫死亡率}} \times 100\%$$

结果与讨论

(一) 欧洲黑杨的转化

经多次预备试验建立欧洲黑杨的最佳转化和再生系统及选择转化子适合的卡那霉素浓度如表 1。利用叶片和茎段共培养法进行转化后, 在含卡那霉素培养基上选择再生完整植株。从表 1, 可看出在最佳转化, 再生培养基上, 欧洲黑杨叶片在 15 天后可诱导出不定芽, 60 天后即可转入生根培养基进行诱导生根, 转移 9 天后开始生根。但与对照比较无论不定芽的诱导或发根的时间都明显地推迟。以茎段为外植体诱发不定芽时间比叶片外植体要长, 但

幼茎伸长速度比叶片的要显著地快。

利用以上转化条件用含 3' 端缺失不同长度的 B.t. 杀虫蛋白基因的农杆菌转化了欧洲黑杨, 从含全长基因和 2.8 kb B.t. 基因的农杆菌转化的茎段外植体分别得到 26 株和 5 株再生植株, 但移到苗圃后只有全长基因转化的两株存活下来, 其余都因条件的变化而死亡。从 2.1 kb 和 1.8 kb 长的 B.t. 基因转化的叶片外植体分别得到 28 和 115 株再生植株, 这些植株移到苗圃后分别有 9 株和 45 株存活下来, 再生植株从培养瓶转到土壤中的存活率很低, 所以进一步探索此转移条件是得到大量转基因植株的一个重要环节。

(二) 欧洲黑杨转化植株抗虫性的测定

选用杨树两种主要的食叶害虫杨尺蠖和舞毒蛾为测试昆虫, 采用离体叶片在玻璃瓶内喂养, 考虑到 B.t. 杀虫蛋白不仅有快速的杀伤作用, 同时也会有抑制昆虫生长和发育的延迟性的后效应, 因此测定内容设蜕皮指数、毒力和昆虫平均体重。对杨尺蠖的测定结果按死亡率高分为三个大的范围、结果归纳为表 2。

虫试结果表明: (1) 用含 1.8 kb 杀虫蛋白基因的转化植株, 杀虫率都较 3.6 kb, 2.1 kb 的为高(2.8 kb 因定植移栽问题未能得到转化植株), 昆虫死亡率在 80—96% 的占总测试株的 15% 左右; 杀虫率在 50% 以上的有 27 株占 50%。其中多数植株属于 1.8 kb 菌株的转化植株, 这似乎说明较小的 B.t. 杀虫蛋白基因在植物体内有较好的表达, 这一现象与同样中间载体结构转化烟草 NC 89 所得的结果一致^[3,4]。

(2) 根据蜕皮指数计算毒力, 杀虫死亡率在 70—95% 的转化植株有较高的抑制发育作用, 其毒力在 0.5—1.0 以上, 似乎凡杀虫率较高的转化植株也相应地有较好的抑制发育作用。(3) 造成昆虫死亡

表 1 欧洲黑杨的最佳转化系统
Table 1 Optimal transformaton system for *Populus nigra*

| Treatment | Explants | Differentiation medium | Subculture medium | Rooting medium | Days for shoot induction | Days for 1 cm enlongation | Days for rooting |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|
| | | MS BAP 2,4-D Kn (mg/L) | MS BAP Kn (mg/L) | MS NAA Kn (mg/L) | | | |
| Inoculated with <i>A. tumefaciens</i> | Leaf stripes | 1 0.2 0.2 50 | 1 0.2 50 | 1/2 0.02 50 | 15 | 60 | 9 |
| | Segment of etiolated stem | 1 0.5 0.2 60 | 1 0.2 60 | 1/2 0.02 50 | 20 | 45 | 16 |
| Control | Leaf stripes | 1 0.2 0.2 — | 1 0.2 — | 1/2 0.02 — | 13 | 55 | 7 |
| | Leaf stripes on Kn medium | 1 0.2 0.2 50 | 1 0.2 50 | 1/2 0.02 50 | — | — | — |
| | Etiolated Stem | 1 0.5 0.2 — | 1 0.5 — | 1/2 0.02 — | 13 | 47 | 10 |
| | Etiolated Stem on Kn medium | 1 0.5 0.2 60 | 1 0.5 60 | 1/2 0.02 50 | — | — | — |

MS Medium, Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.*, 15:473—497.

表 2 转化再生欧洲黑杨离体叶片对杨尺蠖(*Apocheimia cinerarius*)的毒力测定
Table 2 Toxicity test of detached leaves from transformed *P. nigra* to *Apocheimia cinerarius*

| B.t. gene size(kb) | No. tested poplars | No. of insects* | No. of mortality (%) | Corrected mortality (%) | Exuviation index (平均) | Toxicity | Average weight (mg/larva) | Percentage of tested plants (%) |
|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|----------|---------------------------|---------------------------------|
| 1.8 | 5 | 25—30 | 92.6—96.7 | 91.7—96.3 | 4.2 | 0.5 | 9.95 | 14.8 |
| 1.8 | 3 | 30 | 84.6—90 | 82.7—88.8 | 2.33 | 1.8 | 11.2 | (80—96) |
| 1.8 | 5 | 20—27 | 75—81.8 | 71.9—79.5 | 3.35 | 0.55 | 29.62 | |
| 2.1 | 1 | 27 | 77.8 | 74.9 | 3.14 | 0.59 | 34.9 | |
| 1.8 | 5 | 23—26 | 65.2—73.1 | 60.9—69.7 | 3.42 | 0.5 | 21.74 | 35.2 (50—80) |
| 2.1 | 2 | 24 | 65.0—66.7 | 60.9—69.7 | 4.32 | 0.16 | 53.3 | |
| 3.6 | 1 | 22 | 72.7 | 69.3 | 4.33 | 0.15 | 30.7 | |
| 1.8 | 5 | 20—28 | 58.3—64.3 | 53.1—69.8 | 4.09 | 0.24 | 30.43 | |
| 1.8 | 20 | 18—29 | 13.8—54.5 | 3—48.8 | 3.77 | 0.36 | 48.77 | |
| 2.1 | 6 | 13—29 | 17.2—54.2 | 40.8—48.5 | 3.84 | 0.31 | 45.35 | 50.0 |
| 3.6 | 1 | 28 | 46.4 | 39.7 | 4.62 | 0.08 | 58.1 | (<50) |
| Total CK | 54 | 2 | 11.0 | 0 | 5.0 | 0 | 73.4 | |

* Total larvae of 30 were used in each test. The numbers shown here were the insects remained by the time of mortality examination, because some larvae escaped during testing.

率在50%以上的转化株有27株, 这使进一步筛选抗虫性能高经济性状好的转基因植株成为可能。

用7株转基因欧洲黑杨同时对杨尺蠖和舞毒蛾测定其杀虫毒力结果见表3。结

果说明舞毒蛾对B.t.杀虫蛋白更敏感些, 因为无论是杀虫死亡率或抑制昆虫生长的毒力都比对杨尺蠖的效果好。图版I-A为含全长基因的转基因植株12*离体叶片饲养舞毒蛾七天后的照片, 显示转基因植

表 3 转基因欧洲黑杨离体叶片对舞毒蛾(LD)和杨尺蠖(AC)的毒力测定*
Table 3 Toxicity assay of detached leaves from transgenic poplar to
L. dispar (LD) and *A. cinerarius* (AC)

| Plant No. | Gene length | Insect tested | Number of insects | Corrected mortality (%) | Exuviation index | Toxicity | Average weight (mg/larva) |
|-----------|-------------|---------------|-------------------|-------------------------|------------------|----------|---------------------------|
| 12 | 3.6 | LD | 30 | 88.75 | 3.5 | 0.14 | 40 |
| | | AC | 30 | 69.95 | 7.00 | 0.21 | 1 |
| 153 | 2.1 | LD | 26 | 74.00 | 3.4 | 0.18 | 40 |
| | | AC | 26 | 42.22 | 3.22 | 0.13 | 4 |
| 172 | 2.1 | LD | 30 | 100.00 | — | — | — |
| | | AC | 27 | 100.00 | — | — | — |
| 192 | 1.8 | LD | 28 | 100.00 | — | — | — |
| | | AC | 30 | 84.98 | 3.0 | 0.21 | 28 |
| 65 | 1.8 | LD | 30 | 100.00 | — | — | — |
| | | AC | 30 | 100.00 | — | — | — |
| 113'' | 1.8 | LD | 27 | 100.00 | — | — | — |
| | | AC | 29 | 94.82 | 2.0 | 0.81 | a |
| 105 | 1.8 | LD | 29 | 100.00 | — | — | — |
| | | AC | 30 | 100.00 | — | — | — |
| CK | — | LD | 30 | 0 | 4.00 | 0 | 180 |
| | | AC | 27 | 0 | 3.64 | 0 | 19 |

* The mortality and exuviation index for *L. dispar* were examined at 8 and 11 days of testing respectively, and that for *A. cinerarius* were at 11 and 17 days, respectively.

a. The varvea were too small to weigh ont

株叶片有明显的抗虫作用,基本上没有被幼虫伤害(图中左),而对照(图中右)则被吃掉了大部分。

(三)欧洲黑杨转化株表型性状的现象

虽然具有较好杀虫力的转化株占总株数的50%,而且具有高度杀虫能力(死亡率80—96%)的占15%,但由于外源基因的插入整合至受体染色体是随机和紊乱的,可能由于位置效应而造成转化植株在株高、长势、叶形甚至叶片的颜色等性状发生不同程度的变异。对于欧洲黑杨似乎杀虫能力愈强,这些表型性状的变化也较剧烈。将54株转化的欧洲黑杨,根据上述表型性状的变化大体分成三种类型:类型I:植株株高和叶形与未转化的一样,而且杀虫毒力较低,昆虫死亡率在50%以下;类型II:一年生枝条的叶形呈宽心形与欧美杨的叶形相似,生长势好,个别植株的高度甚至比对照的高,杀虫毒力为中等,昆虫死亡率在50—80%;类型III:株

高显著比对照矮,叶片呈披针形和质地也较厚,表面粗糙而毒力最高,死亡率在80—100%。54株转化再生的欧洲黑杨三种类型的分布情况见表4。造成这些表型差异的真正原因还不清楚,除插入的位置效应外,外源基因的表达产物或在选择培养基中两种抗菌素的存在等都可能引起细胞的某些变异从而导致植株表型的变异。虽

表 4 转基因欧洲黑杨抗杨尺蠖及植株性状变化
Table 4 Classification of phenotype change of transformed *P. nigra*

| Corrected number of plants (%) | Height of plant(cm) | Phenotype class | Percentage of this type (%) |
|--------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------|
| 90—100 | 5 | 42—70 | I 9.3 |
| 80—90 | 3 | 31—72 | II 5.6 |
| 70—80 | 6 | 35—123 | III 11.0 |
| 60—70 | 5 | 39—163 | III 9.3 |
| 50—60 | 8 | 29—163 | III 14.8 |
| 40—50 | 6 | 48—170 | I III 11.0 |
| <50 | 21 | 53—133 | I III 39.0 |
| Total | 54 | | 100 |
| CK | 3 | 140 | I — |

然我们可以选到杀虫率较高、生长势好、形态正常的转基因植株，但进一步研究搞清引起这些变异的原因是对杨树进行基因工程研究的一个重要问题。

(四)适用于推广的抗虫转基因欧洲黑杨的选择

由于初选的54株转化植株的杀虫能力和生长性状变异较大，有必要利用统计方法进一步选择有相当杀虫能力同时又能被实际生产所接受的植株（生长良好的植株），根据对杨尺蠖校正死亡率和株高两个性状采用重心聚类法进行聚类分析，首先据此做出系统聚类树状图，在距离 800 处将54个植株分为11类(资料略)。然后对各类间的校正死亡率和株高进行方差分析，结果表明不同类之间存在着显著差异。最后对各类用LSD法进行多重比较，根据多重比较差异显著性的程度(表 5)选出 3 株植株，即第 7 组的两株和第10组的 1 株。前者的校正死亡率和株高的显著性分别为b和e 而后者的均为b。中选的植株编号是12、192和153，这 3 株对杨尺蠖都具有中等偏上的毒力 (69.95%，84.98%和42.22%校正死亡率)同时生长势、株高也较好(1.23米，1.16米和1.63米)接近或超过对照(1.40米)，这 3 株已扩大繁殖，在进行大田试验中，第 3 和第 4 两组的植株虽然抗虫性较高（校正死亡率的显著性分别为b和a）但生长势很差（显著性分别为g和i），因此不能直接用于生产，但可作为杨树抗虫育种的亲本来源。

(五)转基因欧洲黑杨的DNA杂交分析

在虫测试验基础上，对19株对所试昆

表 5 各类间校正死亡率和株高多重比较表(采用LSD)

Table 5 Clust analysis of corrected mortality and height of the plants (by LSD method)

| Class | number of plants | Corrected mortality (%) | Significance (LSD 0.05)* | Height of plant (cm) | Significance (LSD 0.05)* |
|-------|------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| 1 | 6 | 51.8 | c | 44.5 | i |
| 2 | 14 | 33.5 | e | 60.3 | h |
| 3 | 11 | 64.3 | b | 72.2 | g |
| 4 | 10 | 89.3 | a | 51.0 | i |
| 5 | 2 | 4.0 | f | 66.0 | g |
| 6 | 3 | 36.7 | d | 99.0 | f |
| 7 | 2 | 63.0 | b | 119.5 | e |
| 8 | 2 | 37.2 | d | 141.5 | c |
| 9 | 1 | 38.6 | d | 170.0 | a |
| 10 | 1 | 64.4 | b | 163.0 | b |
| 11 | 1 | 3.4 | f | 133.0 | d |

* Letters represent the significance of variance above 5% level.

虫具有不同毒力及不同株型和长势的再生植株，以及对照植株进行DNA狭槽分析，结果见图版 I -B。结果表明，在19个被测杨树植株DNA中有10个可与 B.t.基因探针进行特异杂交。可能由于DNA提取物的纯度不高或DNA 浓度不准确导致有的杀虫率高的植株在此项分析中未能显出阳性反应。根据昆虫毒力和植株高度做的聚类分析结果，选出了12、192和153 3株较理想的再生植株，通过 PCR 反应对其进行检测（见图版 I -C）。192、153和12产生了预期的0.7 kb PCR产物(12的结果未给出)，该PCR产物转到Z-probe 膜上后与 B.t.基因探针可进行特异的杂交，其中两株所做的 Southern 杂交也呈阳性反应(资料未列出)，充分证明上述植株为转 B.t.基因植株。

参 考 文 献

- [1] David, A. et al., *Bio/technology*, 5:807—812, 1988.
- [2] Perlak, F. J. et al., *Bio/technology*, 8:93, 943, 1990.
- [3] 田颖川等: 生物工程学报, 7(1): 1—10, 1991.
- [4] 李太元等: 中国科学(待发表).
- [5] 卜学贤等: 植物学报, 33(3):206—213, 1991.
- [6] Clapham, D. et al., *Theoretical and Applied Genetics*, 79(5):654—656, 1990.
- [7] Davis, J. M. et al., *Canadian Journal of Forest Research*, 19(9):1118—1123, 1989.
- [8] Gupta, P. K. et al., *Application of Biotechnol. in Forestry and Horticulture*, 339—347, 1989.
- [9] Mc Cown, B. H. et al., *Plant Cell Reports*, 9(10):590—594, 1991.
- [10] Robert, T., *IUFRO Meeting of Genetics and Molecular Biology of Interactions Between Harmful Agents and Trees*, October, 1988.
- [11] Tautous, T. E. et al., *Theoretical and Applied Genetica*, 78(4):531—536, 1989.
- [12] 王善平等: 植物学报, 32(3):172—177, 1990.
- [13] Tai, T. H. and Tanksley, S. D., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 8(4):297—303, 1990.

Insect Tolerance of Transgenic *Populus nigra* Plants Transformed with *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene

Tian Yingchuan Li Taiyuan Mang Keqiang
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Han Yifan Li Ling Wang Xuepin Lu Mengzhu Dai Lianyun
Han Yinong Yan Jingjun

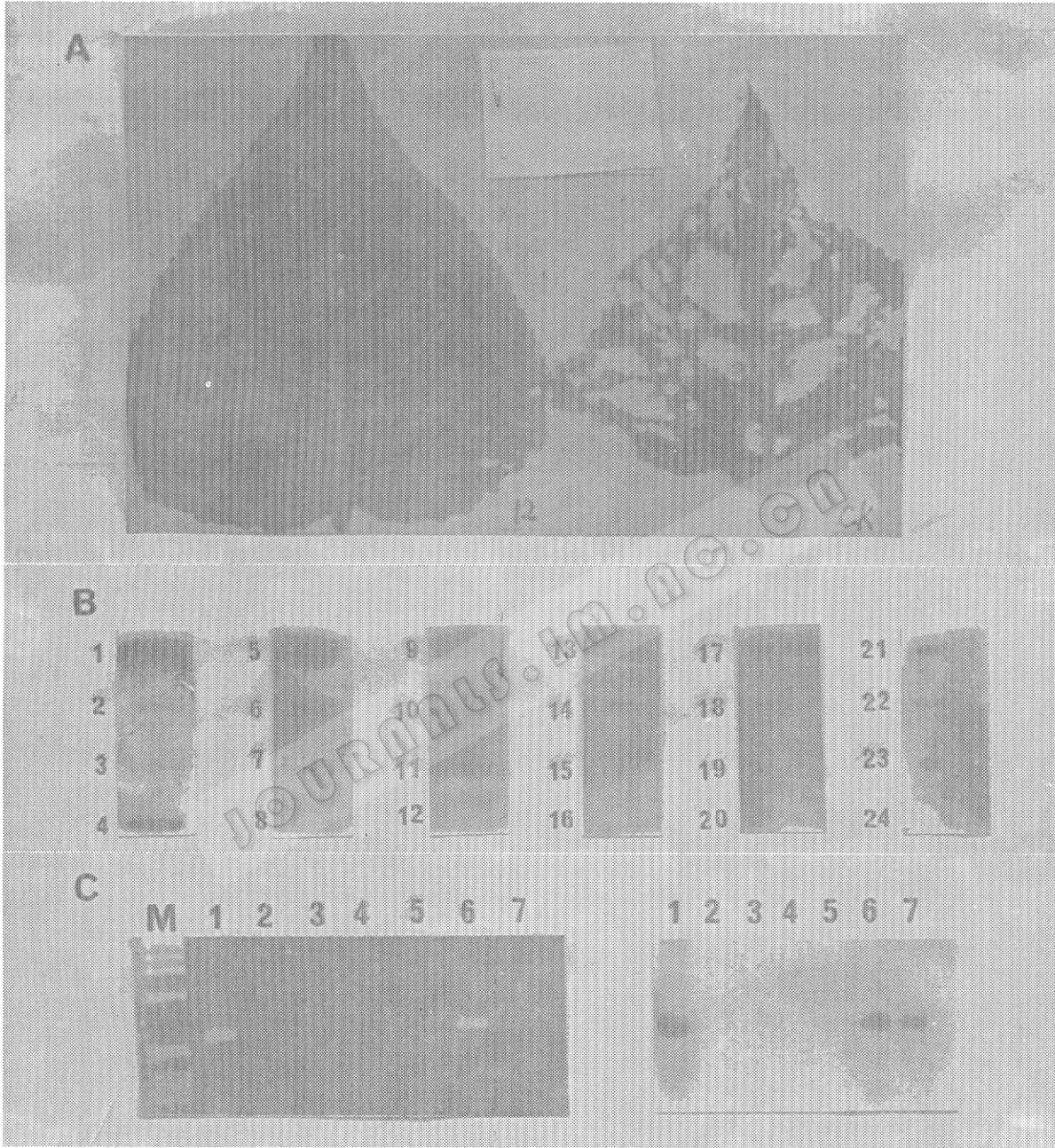
(Institute of Forestry, Chinese Forestry Academy, Beijing 100091)

Dean W. Gaberiel

(Dept. of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, Florida 32611, USA)

Leaves and stem segments of *Populus nigra* were transformed with *A. tumefaciens* LBA 4404 harbouring a binary vector containing chimeric genes of NPT II and 35 S- Ω -B.t. toxin-Nos. Nineteen regenerated kanamycin resistant plants were analysed by DNA hybridization, out of which 10 were shown to be the candidates of transgenic plants. Insect tolerant tests showed that the transgenic plants were toxic to two Lepidopteran pests, *Lymantria dispar* Linnaeus and *Apocheimia cinerarius* Erschoff. Based on the results of Southern-blot of PCR products, and the cluster analysis of their growth and insect resistance, three independent transgenic plants were selected, which are then propagated in the nursery field

Key words *Populus nigra*; B.t. toxin gene; insect resistance



A. Biological assay of detached poplar leaves from transgenic plants (right) and control (left). The picture was taken 7 days after infestation of the insects.

B. Slot blot analysis of DNAs from regenerated poplar plants. Samples were (1); plasmid pB48.101 containing *B. t.* toxin gene as a 10 copy number control. (2), (3), (9); from nontransformed plants; (5); 10 μ g DNA from *B. t.* gene transformed tobacco plants as and positive control, (4), (6)–(8), (10)–(24); from transformed poplar plants, #109,65,302,162,105,182,172,192,113,45,36,12,60,41,189,153,301,212,209 respectively.

C. PCR products (left) and their Southern blot hybridization (right) of transgenic plants, M:1kb ladder; Lane 1; PCR product from pB48.101; Lane 2–5; Negative controls; Lane 6; 192; Lane 7; 153.