

芥菜型油菜抗虫转基因植株及其后代株系的研究*

李学宝¹ 秦明辉¹ 施荣华¹ 陈光荣¹ 白永延²

¹(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

²(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 带有 1~2mm 子叶柄的芥菜型油菜子叶经农杆菌感染后,培养在附加 10~20mg/L 卡那霉素的 MS 选择培养基上筛选转化愈伤组织及不定芽。卡那霉素抗性苗相继在含 30~50mg/L 卡那霉素的选择培养基上继代培养,再转移到含 20mg/L 卡那霉素的生根培养基上诱导生根。以苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因为探针,进行 Southern blot 分子杂交,得到阳性结果。PCR 分析也证明外源基因整合到油菜基因组并稳定传递到后代。转基因植株的抗虫性和卡那霉素抗性在自交后代中得到保持,筛选得到纯合的转基因植株后代株系。

关键词 芥菜型油菜, 杀虫晶体蛋白基因, 遗传转化, 抗虫性

分类号 Q943.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0482-88

油菜是我国重要的油料作物,具有十分重要的经济意义。油菜属十字花科芸苔属植物,生长期间常受到鳞翅目等害虫的危害,造成大面积减产。近 20 多年来,人们研究利用苏云金芽孢杆菌等杀虫微生物制成生物农药,替代化学杀虫剂杀灭害虫,以减少化学农药对环境的污染和人类健康的危害。但是,由于细菌制剂成本昂贵,田间条件下稳定性差,推广应用受到一定限制。利用植物基因工程技术将苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因(Bt-IPC gene)导入农作物,获得抗虫转基因植物。抗虫试验表明,转基因植物杀虫效果明显^[1~4]。有关芥菜型油菜的遗传转化,国外曾有研究报道^[5]。但是,该研究仅局限于导入标记基因,转基因植株不具有应用价值。我们以我国种植的优良芥菜型油菜品种为材料,优化了油菜细胞转化的条件^[6]。本文报道将苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因导入芥菜型油菜品种,获得抗虫的转基因植株,并系统探讨外源基因在转基因油菜后代植株中的传递和表达稳定性等问题。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试的芥菜型油菜(*Brassica juncea*)品种为望江凉亭,由中国农科院油料所提供。选取饱满的油菜种子,用 95% 乙醇浸泡 30 s,0.02% HgCl₂ 溶液表面灭菌 20min,无菌水冲洗数次后,置 MS 培养基上萌发生长成苗。取 4~6d 龄的无菌苗子叶,用作试验材料。

1.2 根癌农杆菌培养及油菜外植体转化

所用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) ASE1(pBYT367)为双质粒系统,质粒

* 国家自然科学基金(No. 39670398)和湖北省自然科学基金资助项目。

收稿日期:1998-03-30, 修回日期:1999-05-25。

载体含有苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因(经序列分析证实该基因属 *Cry IA(c)*^[4]和新霉素磷酸转移酶基因(*npt II*)。

挑取单个菌落,接种在 AB 培养基(pH 7.0)中,振荡培养(28℃, 200r/min)1~2d 后,离心收集细菌。将细菌重新悬浮于 MS 培养基(pH 5.6, 附加乙酰丁香酮和胭脂碱各 100μg/L)中,在相同条件下继续培养 4~8h,诱导活化细菌 *vir* 基因。

将带有子叶柄的子叶浸入农杆菌液中 3~5min,转移到含 4.5mg/L 6-BA 的 MS 培养基上共培养 2~3d 后,再转移到附加 10mg/L 卡那霉素,500mg/L 羧苄青霉素和 5~15mg/L AgNO₃ 的相同培养基上,光照培养 2 周。然后,将子叶外植体转移到含 20mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上继续培养,筛选转化体。分化出来的抗性苗相继在含 30~50mg/L 卡那霉素的培养基上培养筛选,淘汰非转化体。将抗性苗移入含 20mg/L 卡那霉素和 0.5mg/L IBA 的 MS 培养基,诱导生根后,移栽于土壤中生长发育,开花结实。

1.3 Southern blot 分析

参照 Mettler 等的方法^[7]抽提植物叶片总 DNA,用核酸内切酶 *Eco RI* 消化,琼脂糖凝胶电泳后,转移到尼龙膜上。取 *Cry IA(c)* 基因 1.3kb *Pst I* 片段做探针,用随机引物法和 P³²-dCTP(Amersham 公司产品)标记探针,DNA 分子杂交在 42℃ 恒温条件下进行^[8]。将杂交后的尼龙膜置 -70℃ 条件下,放射自显影。

1.4 PCR 扩增 *Cry IA(c)* 基因片段

取转化植株和对照植株叶片,抽提总 DNA,用作模板。按 *Cry IA(c)* 基因的碱基顺序,设计合成引物,预期的 PCR 产物长度为 968 bp,PCR 反应参照毛慧珠等的方法进行^[4]。琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,紫外灯下观察并照相。

1.5 杀虫活力检测

将甜菜夜蛾(*Laphygma exigua*)卵(或幼虫),培养在 70% 湿度,24℃ 光照培养箱内,孵化,幼虫长大化蛹,交配。雌虫产卵后,收集虫卵。卵粒孵化后约 36d 的幼虫用于试验,试验前称量幼虫体重。

从转化植株和对照植株上取一定量的叶片,切成圆片,放入直径 9cm 的培养皿中,立即小心地放入 10 条幼虫,于 24℃ 条件下培养。每 2d 更换一次叶片,统计幼虫死亡数,并取出存活的幼虫称重,观察其生长和叶片被摄食情况。

1.6 幼苗的卡那霉素抗性检测

取转基因植株及对照植株自交后代的种子,灭菌后在 MS 培养基上萌发 2~4d。切去无菌苗根部,将无根苗插入含 20~30mg/L 卡那霉素的 MS 培养基。2~4 周后,统计幼苗生根率,根生长情况和绿苗数、白苗数及真叶生长情况。

2 实验结果

2.1 转化体的筛选

经农杆菌感染的子叶外植体,培养在含 10mg/L 卡那霉素的选择培养基上,光照培养一段时间后,再移入含 20mg/L 卡那霉素的选择培养基上继续培养,直接分化出芽。将选出的卡那霉素抗性苗相继转移到含 20, 30 和 50mg/L 卡那霉素的培养基上多次继代筛选,逐步加强选择压力,部分抗性苗仍保持绿色,并正常生长发育,其余则逐渐白化死亡。

将正常生长的卡那霉素抗性苗转移到含 20mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上诱导生根,再生完整植株。经长时间反复筛选,淘汰非转化体。最终获得 17 个抗性株系(同一愈伤组织来源的抗性苗算作一个株系),共 100 多株试管苗。先后将这些试管苗移栽于大田(或盆栽),均可发育至成熟。

2.2 转化植株的 Southern blot 分析

经 *Eco* RI 消化的油菜叶片总 DNA, Southern 转移到尼龙膜上,与 *Cry* IA(c) 基因的 1.3 kb *Pst* I 片段杂交。结果表明,大多数受试植株的 DNA 显示杂交信号。在 *Cry* IA(c) 基因编码顺序中有一个 0.7kb 的 *Eco* RI 核心片段,它包括在 1.3kb *Pst* I 探针顺序中^[4],在转基因植株中都具有这一预期的杂交带(核心片段)。此外,转基因植株尚含有另一较大片段的杂交带(图 1),证明外源杀虫基因已整合到油菜基因组中。

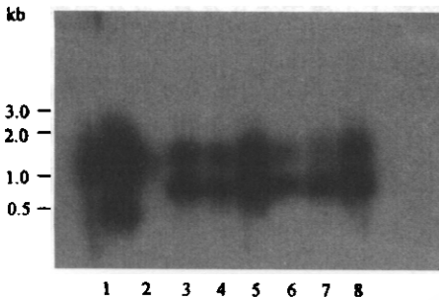


图 1 转基因植株的 Southern blot 分析

Fig.1 Southern blot analysis in transgenic plants 3~8. Total DNA of transgenic plants digested with *Eco* RI; 2. Total DNA of non-transgenic plant digested with *Eco* RI; 1. Probe DNA (1.3 kb *Pst* I fragment of *Cry* IA gene)

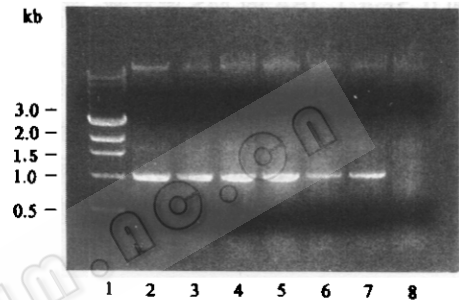


图 2 转基因植株杀虫晶体蛋白基因 PCR 扩增

Fig.2 Polymerase chain reaction of *Cry* IA(c) gene in transgenic plants 2~7. Transgenic plants; 8. Non-transgenic plant; 1. Marker

2.3 PCR 扩增试验

取上述转化植株的后代(T1, T2 和 T3 代)植株叶片,抽提 DNA,做 PCR 试验,多数植株显示预期的扩增带,对照株为阴性反应(图 2),表明 *Cry* IA(c) 基因已通过有性过程稳定传递到后代中。用 1.3kb *Cry* IA(c) 基因片段为探针,做 DNA 杂交试验,PCR 阳性植株均有 1kb 杂交带,证明 PCR 扩增产物为 *Cry* IA(c) 基因同源顺序(资料未显示)。

2.4 转基因植株的抗虫性分析

取转化植株和对照植株叶片饲喂甜菜夜蛾。试验结果(表 1)表明,供试的部分 T0 代转化植株(R2, R5, R9, R10 株系)对幼虫具有明显的毒性,饲喂 10d 后的存活幼虫平均体重显著低于对照组,幼虫死亡率明显增加。对上述抗虫株系(R2, R5, R9, R10)的部分 T1 后代植株进一步进行了抗虫分析,每一株系随机取数株,其中仍有一些具有抗虫性(表 1 仅列出部分实验的数据)。对部分转基因株系 T2 代植株所做的抗虫试验也表明,一些 T2 代植株仍具有杀虫活力,表明杀虫晶体蛋白基因能够在后代植株中表达(表 1)。经抗虫试验选出的抗虫性植株,其后代植株中分离出不具抗性的植株,表明这些植株为杂合

体,造成后代植株基因分离,或者可能由于外源基因在传递过程中失活(Gene silence)^[9,10]所致。在 T3 代中,我们获得抗虫性一致的后代株系(R9-5, R10-3)(表 2),并经卡那霉素抗性分析证实它们是遗传上稳定的纯合体(T4 代,资料未列出)。

2.5 转基因植株后代卡那霉素抗性遗传分析

取油菜转化株系种子,无菌萌发后切去根部,以去根幼苗的根再生能力为指标,检测转化株系对卡那霉素的抗性。结果表明,不同株系对卡那霉素的耐受性不同,其耐受卡那霉素的浓度范围为 30~100mg/L 或更高。而且,卡那霉素抗性和抗虫性之间不表现严格的相关性。有些株系卡那霉素抗性很强,但抗虫性差。相反,一些株系卡那霉素抗性

表 2 转基因油菜 T3 代株系 R9-5 和 R10-3 对甜菜夜蛾幼虫的毒性分析

Table 2 Toxicity assay in transgenic plant progeny lines R9-5 and R10-3 (T3 generation) of *Brassica juncea* with neonate *Laphygma exigua* larvae

Plant No.	Average weight of a larva at 10 th d/mg	Mortality of larvae/%
R9-5-1	64.3±6.1	44
R9-5-2	80.7±7.2	33
R9-5-3	50.8±4.4	56
R9-5-4	57.1±5.0	56
R9-5-5	72.9±8.3	44
R10-3-1	51.5±4.7	67
R10-3-2	79.0±8.2	33
R10-3-3	61.2±5.8	44
R10-3-4	56.4±5.7	44
R10-3-5	64.3±6.0	56
CK	116.5±11.2	0

表 1 转基因油菜植株(T0 代)及其后代植株(T1, T2 代)对甜菜夜蛾的毒性分析

Table 1 Toxicity assay in transgenic plants (T0 generation) and their progenies (T1 and T2 generations) of *Brassica juncea* with neonate *Laphygma exigua* larvae

Plant No.	Average weight of a larva at 10 th d/mg	Mortality of larva/%
A. T0 generation		
R1	65.4±10.5	0
R2	19.4±3.2	56
R3	41.6±9.6	0
R5	12.4±5.1	56
R6	54.2±3.0	11
R8	33.8±5.9	44
R9	8.8±2.3	44
R10	20.0±0.3	78
CK	54.2±7.8	0
B. T1 generation		
R2-1	68.2±5.2	12
R2-4	75.7±11.3	60
R5-1	75.6±6.0	30
R8-1	69.0±5.5	60
R8-4	125.4±8.1	6
R9-3	115.4±13.6	0
R9-5	56.7±5.2	60
R10-1	73.6±8.4	48
CK	114.0±14.2	0
C. T2 generation		
R2-1	172±11.0	23
R2-5	121±6.3	46
R5-1	161±9.3	0
R5-3	202±20.0	0
R9-5	50±4.1	54
R10-3	54±7.5	40
R10-8	98±5.2	15
R10-9	88±6.7	8
R10-10	156±8.3	8
R10-13	165±11.1	0
CK	187±12.1	0

稍低,而抗虫性却很好。*npt II* 基因和 *CryIA(c)* 基因在转基因油菜植株中的表达强度是不一致的,可能与外源基因整合后的修饰及插入位点的相邻 DNA 结构等有关。

用 X² 检验法对 T1 代幼苗生根率所做的统计分析(表 3)表明,外源基因在转基因油菜中的遗传方式为核基因单一位点显性遗传,分离比符合 Mendel 分离规律(3:1)。进一步的分析表明,T2 和 T3 代植株仍具有卡那霉素抗性,且部分植株株系不发生分离现象,表明它们是纯合体(表 4)。而且,在 PCR 方法所做的基因扩增试验中,大多数的抗性植

表 3 转基因油菜 T1 代卡那霉素抗性分析

Table 3 Kanamycin-resistance assay in seedlings of transgenic T1 generation of *Brassica juncea*

Plant No.	Total number of shoots	Number of rooted shoots	Number of non-rooted shoots	X ² test
R1	75	49	26	+
R2	26	18	8	+
R3	89	66	23	+
R4	113	86	27	+
R5	67	57	10	+
R6	36	34	2	-
R7	47	37	10	+
R8	63	45	18	+
R9	70	52	18	+
R10	61	48	13	+
R14	53	45	8	+
R15	46	40	6	+
CK	83	0	83	+

Note: 1). +, $P > 0.05$, fitting 3:1 gene segregation; -, $P < 0.05$, not fitting 3:1 gene segregation;

2). MS medium with 25 mg/L kanamycin and 0.1mg/L NAA.

表 4 转基因油菜 T2 和 T3 代卡那霉素抗性分析及纯合性分析

Table 4 Analysis of kanamycin-resistance and gene homozygosity in seedlings of transgenic T2 and T3 generations of *Brassica juncea*

Plant No.	Total number of shoots	Number of rooted shoots	Number of non-rooted shoots	X ² test
A) T2 generation				
R2-8	32	28	4	+
R7-2	32	26	6	+
R8-4	20	11	9	+
R9-5	100	72	28	+
R9-7	36	26	10	+
R10-1	36	34	2	-
R10-3	52	37	15	+
R11-1	40	38	2	-
R11-2	76	73	3	-
R11-3	48	32	16	+
R11-4	12	10	2	+
R12-3	42	26	16	+
R14-2	72	48	24	+
R16-1	44	31	13	+
R16-3	76	70	6	-
CK	35	0	35	-
B) T3 generation				
R2-1	18	18	0	-
R2-2	28	23	5	+
R8-2	64	57	7	-
R9-1	22	22	0	-
R9-2	84	67	17	+
R9-4	78	71	7	-
R10-1	24	17	7	+
R14-2	24	15	9	+
CK	30	0	30	-

Note: 1) +, $P > 0.05$, fitting 3:1 gene segregation; -, $P < 0.05$, not fitting 3:1 gene segregation;

2) MS medium with 25 mg/L kanamycin and 0.1 mg/L NAA.

株检测到 *Cry IA(c)* 基因的同源顺序,表明外源基因 *npt II* 和 *CryIA(c)* 能够稳定地连锁遗传。通过几代的选育,获得纯合的转基因油菜株系。

3 讨 论

本研究成功地将苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因导入芥菜型油菜,获得转基因植株。害虫饲喂试验表明,不同的转基因植株之间,杀虫活力存在较大差异。这种情况在其他一些转基因植物中也可观察到^[3,4],可能与外源基因整合位点与整合后的基因修饰有关。一些研究^[9,10]表明,胞嘧啶甲基化导致外源基因在转基因植物中沉默(Gene silence),这是不同转化株系外源基因表达差异的原因之一。是否在外源基因传递过程中也可存在此类甲基化现象,从而导致后代植株中外源基因表达活性下降或完全丧失活性,有待进一步研究。饲喂转基因油菜叶片后,幼虫出现中毒现象,摄食量减少,活动减缓,生长发育明显受阻,最后逐渐死亡。进一步的研究表明,油菜转基因植株具有的杀虫活力在 T1, T2 及 T3 代中仍然得到保持。我们获得多个芥菜型油菜抗虫转化株系,可能为该作物品种改良提供新的种质资源和良好的育种材料。

一些研究表明, AgNO_3 可抑制乙烯活性,提高植株再生频率^[11~13]。我们的研究也表明,在无 AgNO_3 的情况下,也能获得转化植株,但转化频率较低,在培养基中添加一定浓度的 AgNO_3 ,可以提高转化频率。这可能是由于 AgNO_3 能够促进油菜转化愈伤组织的不定芽分化,而不是直接促进细胞转化。

卡那霉素作为一个广泛使用的选择剂,在植物转化研究中起了重要作用。但是,油菜等芸苔属作物对卡那霉素很敏感,我们在实验中观察到,低浓度(5mg/L)的卡那霉素即严重抑制油菜子叶外植体细胞增殖和不定芽分化。在本试验的早期阶段,我们用较高起始浓度的卡那霉素筛选转化体。虽然对各种实验条件和因素进行了探索,但一直未获成功。共培养结束后,若将感染农杆菌的油菜子叶外植体直接转移到含 30~50mg/L 卡那霉素的 MS 选择培养基上,大约 1 周后,子叶柄切口处开始褐化,不能形成愈伤组织及不定芽。继续培养一段时间后,外植体逐渐死亡。后来的研究表明,在培养初期,采用较低的选择压力(卡那霉素浓度为 10~15 mg/L),对油菜转化细胞启动分裂和分化较为有利,获得抗卡那霉素的愈伤组织及再生苗。然后再通过反复继代筛选,逐步加强选择压力,严格淘汰一些“逃逸”的非转化体,收到良好的效果^[6]。在上述研究中,我们逐渐建立了完善的芥菜型油菜再生和转化系统,获得 17 个转基因植株株系,并正在对外源基因在这些转化株系细胞染色体上的位置进行基因定位和分析。

参 考 文 献

- [1] X. Delannay, B. J. Lavallee, R. K. Probsch *et al.* *Bio/Technology*, 1989, 7:1265~1269
- [2] F. J. Perlak, R. W. Dwaton, T. A. Armstrong *et al.* *Bio/Technology*, 1990, 8:939~943.
- [3] X. B. Li, H. Z. Mao, Y. Y. Bai. *Plant Cell Reports*, 1995, 15:97~101.
- [4] 毛慧珠, 唐 锡, 曹湘玲等. 中国科学(C辑), 1996, 26:339~347.
- [5] H. Mathews, N. Bharathan, R. E. Litz *et al.* *Plant Sci.*, 1990, 72:245~252.
- [6] 秦明辉, 李学宝, 陈光荣等. 华中师范大学学报(自然科学版), 1994, 28:536~542.

- [7] I. J. Mettler. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 1987, 5:536~349.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed). New York, Cold Spring Harbour Lab. Press. 1989, pp. 9.31~9.58.
- [9] A. J. Matzke, M. A. Matzke. *Curr. Opin Plant Biol.*, 1998, 1:142~148.
- [10] M. J. Dieguez, H. Vaucheret, J. Paszkowski *et al.* *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 259:207~215.
- [11] M. De Block, D. De Brouwer, P. Tenning *et al.* *Plant Physiol.*, 1989, 91:694~701.
- [12] G. L. Chi, G. D. Brfield, G. E. Sim *et al.* *Plant Cell Reports*, 1990, 9:195~198.
- [13] S. E. Radke, J. C. Turner. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:499~505.

Transgenic Plants of *Brassica juncea* with Insect-resistance and Genetic Analysis of the Progeny*

Li Xuebao¹ Qin Minghui¹ Shi Ronghua¹ Chen Guangrong¹ Bai Yongyan²

¹(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079)

²(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Cotyledons with the petioles were cut from axenic seedlings and infected with *Agrobacterium tumefaciens*. After 2 days of cultivation, the explants were transferred to MS selection medium with 10~20mg/L kanamycin and 4.5 mg/L 6-BA for shoot differentiation. Shoots with kanamycin-resistance were subcultured on selection medium with 30~50 mg/L kanamycin for eliminating escaped non-transformants, and then rooted on MS medium containing 20mg/L kanamycin and 0.5 mg/L IBA. Transgenic plants were transplanted into soil and grew in the field. DNA Southern blot hybridization and polymerase chain reaction showed that some of the plants were positive when probed with the insecticidal crystal protein gene. The transgenic plants exhibited resistance to pest insects such as *Laphygma exigua* in leaf feeding experiments. Kanamycin-resistance and insect-resistance were maintained in the progeny. The foreign genes were delivered to the progeny according to Mendelian Law of single gene segregation.

Key words *Brassica juncea*, insecticidal crystal protein gene, genetic transformation, insect-resistance

* The Project Was Supported by National Foundation of Sciences of China(No. 39670389) and Foundation of Sciences of Hubei Province.