

文章编号: 0258-7025(2001)01-0093-04

激光微束穿刺法获得抗虫转基因油菜 及其后代的研究

侯丙凯 周奕华 刘桂珍 宋桂英 王兰岚 陈正华

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘要 利用激光微束穿刺法将苏云金芽孢杆菌的毒蛋白(δ -endotoxin)基因导入了油菜,经聚合酶催化链式反应(PCR)和PCR Southern杂交证明抗虫基因已导入油菜基因组中并能在 T_1 代得到遗传。对转基因植株进行了抗虫性测试,结果表明某些植株具有较好的抗虫性,并且这种抗虫性在 T_1 代仍能保持。实验结果表明抗虫基因已整合进油菜基因组并得到了稳定的遗传。

关键词 激光微束穿刺 抗虫基因 油菜 转基因植株, T_1 代

中图分类号 S 123 文献标识码 A

Acquisition of insect-resistant transgenic *Brassica napus* and Its Progeny by laser microbeam puncture

HOU Bing-kai ZHOU Yi-hua LIU Gui-zhen

SONG Gui-ying WANG Lan-lan CHEN Zheng-hua

(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract The introduction of insect-resistant δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into *Brassica napus* was carried out by laser microbeam puncture. The acquisition of transgenic plants and the inheritance of transgene in T_1 generation were confirmed by PCR and PCR Southern blot hybridization. The bioassay of transgenic plants showed that some of the plants exhibited tolerant to pest insects and insect-resistance was maintained in the T_1 generation. These results showed that the insect-resistance gene was integrated into the genome of *Brassica napus* and was stably inherited.

Key words laser microbeam puncture, insect-resistance gene, *Brassica napus*, transgenic plant, T_1 generation

1 引言

油菜是世界四大油料作物之一,也是我国主要的经济作物。在油菜生产上,能大面积发生并造成严重减产的害虫有10多种,其中包括鳞翅目的小菜蛾和小菜粉蝶等。近年来,人们利用基因工程技术将外源抗虫基因导入农作物,为抗虫育种提供了一条新的途径。

将抗虫基因导入油菜,虽已有一些报道^[1,2],但都采用了农杆菌介导法,该法操作复杂,而且需经过共培养和抑菌筛选阶段,容易造成外植体的褐化甚至死亡,影响转基因植株再生。利用激光微束穿刺法将外源基因导入植物细胞,因具有操作简单、定位

准确、对细胞损伤小以及外植体适用性广泛而受到重视。近年来,王兰岚等在激光微束转化方面做了大量工作,并在世界上率先得到了有分子证据的稳定转化植株^[3,4]。到目前为止,利用激光穿刺法导入植物细胞的外源基因主要是筛选标记基因、报告基因和抗病基因^[5,6],关于抗虫基因的激光导入,国内外一直未见报道。本文报道利用激光微束穿刺法成功地将苏云金杆菌的抗虫基因导入油菜并获得抗虫转基因植株及其后代的实验结果。

2 材料与方法

2.1 实验条件

用于转化的植物受体材料为甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的双低(低硫苷、低芥酸)品种

“H165”。该品种在我国有大面积种植。用于转化的植物表达载体(PBBt9)含有苏云金杆菌的杀虫蛋白基因 *cryIA(a)* (3.5 kb) 和筛选标记基因 NPTII, 该质粒载体由本实验室构建(图1)。

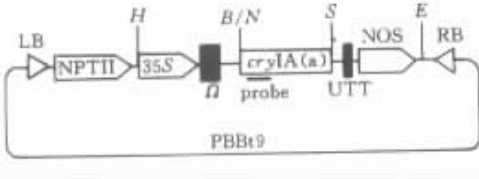


图1 植物表达载体 PBBt9 的结构图

Fig.1 Structure of plant expression vector PBBt9

LB: left border; RB: right border; B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; N: *Nco*I; S: *Sal*I. The PCR fragment used as a probe in Southern blot is denoted

所用的激光器是由中国科学院遗传研究所和重庆京渝激光生物研究所共同研制的 Nd:YAG 激光细胞显微照射系统。能够发射 4 种波长的激光, 输出激光微束的脉宽及能量均可调。激光器引入一台相差显微镜并配备电视监视系统, 可监视整个激光穿刺过程。油菜子叶柄的获得、具体穿刺过程以及穿刺后转化植株的筛选基本参考张海燕等的方法^[6], 但略有改进。其中的高渗液采用了 Weber 等^[7] 的配方(10 mmol/L Tris, 0.7 mol/L 山梨醇, pH7.2), 质粒 DNA 浓度采用 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

2.2 检测与分析

根据 *cryIA(a)* 基因编码区 *Eco*RI 核心片段的碱基顺序, 设计合成 2 个引物 5' 端引物: 5'GCCATTCTAGATTAGAAGG3' 取自 *cryIA(a)* 编码区第 286 ~ 305 处的同源序列。3' 端引物: 3'CCGTTGGTGTAGAATACCTA5' 取自 *cryIA(a)* 编码区第 875 ~ 894 处的互补序列。预期的 PCR 产物长度为 609 bp(碱基对)。按 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Boehringer) 地高辛 DNA 标记和检测试剂盒(宝灵曼公司出品)推荐的方法, 将扩增的 DNA 片段用地高辛标记后作为探针。用改良的 CTAB 法^[8] 从转化植株和对照植株的叶片提取总 DNA 作为模板, 利用上述两种引物进行 PCR 扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并从凝胶转移到尼龙膜上, 与标记的探针 DNA 进行杂交。杂交过程采用 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Boehringer) 说明书中所推荐的方法。

用于抗虫实验的测试虫为小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 的二龄幼

虫。小菜蛾幼虫由人工饲养获得, 棉铃虫幼虫由中国农业科学院植物保护研究所王武刚先生提供。取转基因植株的叶片放于 10 cm 培养皿中进行虫试。每皿放 10 头幼虫, 同时以未转基因植株作对照。每个植株及对照各重复 3 次。在接虫后的第 7 天统计死活虫数, 将存活的幼虫称重, 并计算校正死亡率、平均体重, 记录叶片受害程度。取转基因植株自交后代的种子 (T_1 代), 播种于盆土。待植株长至七、八片叶子时, 提取叶片 DNA 进行 PCR 扩增, 以分析外源基因的遗传稳定性。同时进行虫试以检测后代的抗虫能力。

3 实验结果

3.1 转基因植株的获得

激光穿刺过的油菜子叶柄在含 30 mg/L 卡那

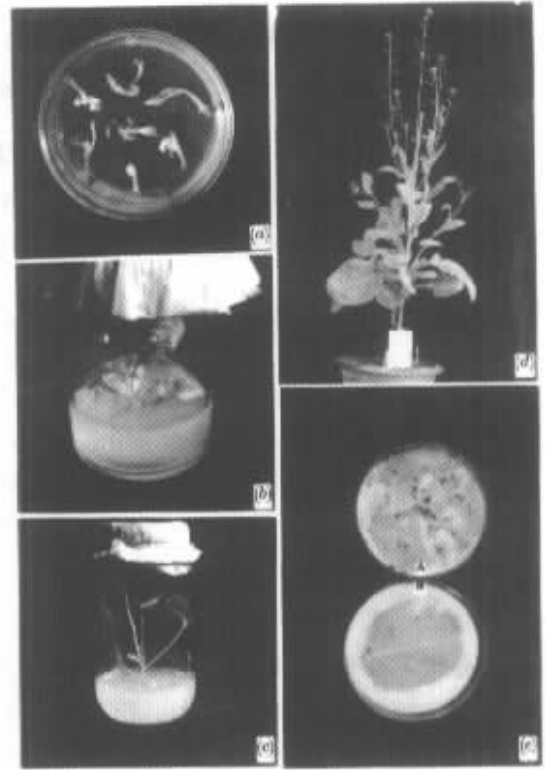


图2 (a) 在选择培养基上子叶柄的再生芽; (b) 在选择培养基上的卡那霉素抗性芽; (c) 在生根培养基上的转基因油菜; (d) 在花盆中的转基因油菜; (e) BT2 转基因油菜 T_1 代的抗虫性 (A: 对照; B: T_1 代植株)

Fig.2 (a) Regeneration of shoots from petiole on selection medium; (b) Kanamycin-resistant shoot on selection medium; (c) Transgenic plant on root-regeneration medium; (d) Transgenic plant in pot; (e) The bioassay of T_1 generation from BT2 transgenic plant (A: CK; B: T_1 transgenic plant)

霉素的筛选培养基上经一个月左右的培养,子叶柄基部开始长出再生小芽(图 2(a)),大部分为白芽,绿芽产生率约为 5% 左右。将这些绿芽转入新鲜的筛选培养基上,再经 2 个月左右的筛选,除有少数逐渐白化被淘汰以外,大多数仍保持抗卡那霉素的能力(图 2(b))。将这些抗性稳定的绿芽转入生根培养基,共得到 8 株完整的植株(图 2(c))。移栽盆土后,这 8 棵植株均能正常生长发育(图 2(d))。经人工辅助自交授粉,均已获得了 T_1 代种子。

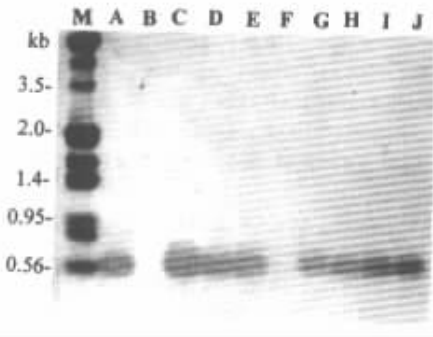


图 3 转基因植株中的 *cryIA(a)* 基因 PCR Southern Blot 鉴定

Fig.3 PCR Southern Blot of *cryIA(a)* gene in transgenic plants

M : marker ; A : PBBt9 plasmid DNA as positive control ;

B : untransformed plants samples as negtive control ;

C to J : transgenic plant samples

3.2 转基因植株的 PCR 和 PCR Southern Blot 鉴定

对转基因植株所作的 PCR 扩增结果表明,在所得的 8 株植株中,均能扩增出分子量为 0.6 kb 的特异条带,而对照的非转基因植株则无这一条带。用来自 *cryIA(a)* 的探针与扩增的条带进行 Southern 杂交,结果表明,有 7 株的扩增条带出现了明显的杂交信号(图 3),由此证明这 7 株的 PCR 扩增产物为 *cryIA(a)* 的同源序列。以上结果说明,利用激光微束穿刺法,苏云金杆菌的杀虫蛋白基因已被成功地导入了油菜的细胞中。

3.3 转基因植株的抗虫性测定

用二龄的小菜蛾和棉铃虫幼虫对 PCR Southern 杂交呈阳性的 7 株转基因植株(分别命名为 BT1 ~ BT7)进行抗虫测试。饲喂 7 天以后的结果表明,这 7 株转基因植株具有不同的抗虫效果(表 1),其中 BT2 和 BT7 号植株抗虫性较好,两种幼虫在这些叶片上均取食较少,叶片受害最轻。幼虫的生长发育明显受阻,死亡率较高,存活的幼虫个体小,体重增长较慢。BT1, BT3, BT5 和 BT6 号植株也具有一定的抗虫性,但与对照相比,幼虫死亡率的增加和体重的减少都不明显。而 BT4 号植株几乎没有表现出抗虫性。这些抗虫测定结果表明,杀虫蛋白毒素在多数转基因植株中已得到表达,但表达量在不同的植株中存在很大差异。

表 1 转基因油菜植株对小菜蛾和棉铃虫幼虫的抗性测定

Table 1 Bioassay on transgenic plants of *Brassica napus* with second instar larvae of *Plutella xylostella* and *Heliothis armigera*

No.	Average weight (mg) of a larvae at 7th day		Modified mortality (%)		Leaf damage	
	a	b	a	b	a	b
CK	8.57	114.2	0	0	3	3
BT1	7.64	102.6	20	11	2	3
BT2	3.43	58.1	71	67	1	1
BT3	8.30	89.7	10	10	2	2
BT4	8.85	110.0	0	0	3	3
BT5	8.60	90.6	12	20	2	2
BT6	7.90	87.0	20	14	2	2
BT7	4.71	62.7	60	63	1	1

Note : CK : representes untransformed plants. BT1 ~ BT7 : represente transgenic plants of *Brassica napus*. a and b represente the results of bioassay with *Plutella xylostella* and *Heliothis armigera*, respectively. 1, 2 and 3 represente leaf mildly, moderately and severely damaged, respectively.

3.4 转基因植株后代的 PCR 分析及抗虫性

对抗虫性较强的 BT2 和 BT7 转基因植株的 T_1 代(分别是 26 株和 30 株)进行了 PCR 分析,结果表

明,能扩增出 0.6 kb 预期条带的后代植株各占 86% 和 79%。这表明抗虫基因已经稳定地遗传给后代,但在后代中出现了分离现象。用小菜蛾幼虫

对 PCR 阳性反应的部分 T_1 代植株进行了虫试,结果表明,BT2 和 BT7 的后代仍然具有较好的抗虫性,抗虫效果未见明显降低(图 2(e))。

4 讨 论

将抗虫基因导入植物,已有的工作大多采用了农杆菌介导法,利用直接转化法获得成功的例子仅见于花粉管通道法^[9]、子房注射法^[10]和基因枪法^[11,12]等少数报道。本文作者曾用农杆菌介导法转化油菜,转化频率只有 2% 左右。而激光微束穿刺法由于对外植体损伤小,几乎未见到外植体的褐化,在筛选过程中绿芽产生率可高达 5% 左右,明显提高了转化频率。本研究利用激光微束穿刺法成功地将 Bt 杀虫蛋白基因高效转入油菜并获得转基因植株,从而为油菜乃至其他作物的抗虫育种提供了一条新的外源基因导入方法。

研究中得到的不同转基因植株其抗虫性表现出了很大差异,这可能是与抗虫基因在油菜基因组中整合的拷贝数及整合位点不同,从而造成了毒蛋白的表达量不同有关。有的转基因植株(例如 BT2, BT7)及其 T_1 代具有较好的抗虫性,害虫致死率可达 70% 左右,目前正对它们的 T_2 代进行遗传分析和抗虫性测试。这些转基因植株的获得对于利用基因工程手段进行油菜的抗虫育种奠定了基础。

参 考 文 献

1 C. N. Stewart, M. J. Adang, J. N. All *et al.*. Insect control and dosage effects in transgenic Canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. *Plant Physiol.*, 1996, **112**: 115 ~ 120

2 Li Xuebao, Zheng Shixue, Mao Huizhu *et al.*. Insect-resistant transgenic plants of *Brassica napus* and analysis of resistance in the plants. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1999, **26**: 262 ~ 268 (in Chinese)

3 Wang Lanlan, Fu Rongzhao, Song Guiying *et al.*. Introduction of exogenous genes into wheat using puncture technique of microbeam laser. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1995, **22**: 394 ~ 399 (in Chinese)

4 Zhou Yihua, Han Liling, Wang Lanlan *et al.*. Introduction of Gus gene into *Lotus* and acquisition of transgenic plants via laser microbeam puncture. *Chinese J. Lasers* (中国激光), 1997, **A24**: 380 ~ 384 (in Chinese)

5 Fu Daolin, Wang Lanlan. The developments about laser microbeam transgenic techniques. *Acta Laser Biology Sinica* (激光生物学报), 1999, **8**: 70 ~ 74 (in Chinese)

6 Zhang Haiyan, Tian Yingchuan, Zhou Yihua *et al.*. Introduction of PAP cDNA into *B. napus* and acquisition of transgenic plants resistant to viruses. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1998, **43**: 2534 ~ 2537 (in Chinese)

7 G. Weber, S. Monajembashi, J. Wolfrum *et al.*. Genetic change induced in higher plant cell by a laser microbeam. *Physiol. Plant*, 1990, **79**: 190 ~ 193

8 S. Rogers, A. J. Bendich. Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, **A6**: 1 ~ 10

9 Xie Daoxin, Fan Yunliu. Transgenic rice plant of a superior Chinese cultivar *Zhonghua* No. 11 containing the Bt endotoxin gene in its genome. *Sci. Chin. (ser. B)*, 1992, **35**: 566 ~ 569

10 Ding Qunxing, Xie Youju, Dai Jingrui *et al.*. Introduction of Bt gene into maize with ovary injection. *Sci. Chin. (ser. B)*, 1994, **37**: 563 ~ 572

11 B. H. McCown, D. E. McCabe, D. R. Russel. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 1991, **9**: 590 ~ 594

12 Mao Huizhu, Tang Ti, Cao Xiangling *et al.*. Insect-resistant transgenic *Brassica oleracea* and the research on their progeny. *Sci. Chin. (ser. C)* (中国科学), 1996, **26**: 339 ~ 347 (in Chinese)