

· 药材与资源 ·

转双价抗虫基因 Bt-CpTI 提高四倍体菘蓝对小菜蛾抗性

丁如贤¹, 肖莹², 王凯¹, 陈万生², 张汉明^{1*}, 张磊^{1*}

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第二军医大学长征医院, 上海 200003)

摘要:目的 将外源苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因 *CryIA(c)* 和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *CpTI* 共同转入四倍体菘蓝以获得鳞翅目昆虫小菜蛾抗性。方法 构建了以 CaMV 35S 为启动子, 新霉素磷酸转移酶 (*Npt^r*) 为选择标记, 带有 *CryIA(c)* 基因和 *CpTI* 基因的植物表达载体 pGBI121S4ABC 并转入根癌农杆菌 LBA4404。采用叶盘法遗传转化四倍体菘蓝。转基因再生植株经 PCR 和 Southern 杂交检测, 并进行抗小菜蛾实验。结果 T_0 代转化四倍体菘蓝的双基因阳性转化率达到 16.67%。Southern 杂交检测结果表明外源 *CryIA(c)* 基因和 *CpTI* 基因均已经随机整合到转基因菘蓝的基因组中。与野生对照相比, 转基因四倍体菘蓝对小菜蛾显示出明显抗性。结论 转双价抗虫基因 Bt-CpTI 是提高四倍体菘蓝对小菜蛾抗性的有效手段。

关键词: 四倍体菘蓝; 根癌农杆菌; 抗虫; 苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 杀虫蛋白基因 *CryIA(c)*; 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (*CpTI*); Southern 杂交

中图分类号: R282.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)04-0621-04

Enhanced resistance of transgenic tetraploid *Isatis indigotica* by Bt and CpTI to mothsDING Ru-xian¹, XIAO Ying², WANG Kai¹, CHEN Wan-sheng², ZHANG Han-ming¹, ZHANG Lei¹

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract : Objective Two insect resistance genes *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) crystal protein gene *CryIA(c)* and cowpea trypsin inhibitor gene *CpTI* were introduced into tetraploid *Isatis indigotica* to enhance the resistance to moths. **Methods** *I. indigotica* was transformed with a plasmid, pGBI121S4ABC, containing *CryIA(c)* *Bt* and *CpTI* and the selectable gene (*Npt^r*) driven by the CaMV35S promoter via *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediated transformation. Then PCR and Southern blotting assay were conducted followed by moth bioassay test. **Results** Co-transgenic rate of the two genes in tetraploid *I. indigotica* was 16.67%. The integration and expression of introduced genes in T_0 regenerated transgenic plants were confirmed by Southern blotting assays. Insect bioassay test demonstrated transgenic lines had significant inhibition to moths, compared with wild type control. **Conclusion** Co-transformation of *Bt* and *CpTI* genes is an effective strategy to enhance the resistance to moths for tetraploid *I. indigotica*.

Key words: tetraploid *Isatis indigotica* Fort.; *Agrobacterium tumefaciens*; insect resistance; *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) crystal protein *CryIA(c)* gene; cowpea trypsin inhibitor (*CpTI*); Southern blotting

菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 为十字花科菘蓝属植物, 是我国传统中药, 历代常用, 根入药称板蓝根, 叶入药称大青叶, 有清热解毒、凉血利咽的功效, 可防治病毒性感染等疾病。课题组经过 10 余年的努力, 完成了菘蓝的四倍体育种工作, 该品系根、叶明显较原二倍体高产, 药理实验等质量指标也都明显超过原二倍体亲本^[1]。然而, 虫害仍然是影响四倍体菘蓝产量的重要因素之一, 鳞翅目昆虫白粉蝶

和小菜蛾引起的虫害相当严重, 其地上部分可被害虫全部吃光。若喷施农药又会带来农残严重影响药材质量的新问题。现代分子生物学特别是植物抗虫基因工程的迅速发展, 为防治害虫提供了一条新途径^[2]。本研究利用根癌农杆菌介导将抗虫基因 *CryIA(c)* 和 *CpTI* 同时转入四倍体菘蓝, 获得的双价转基因植株对小菜蛾显现出强抗虫能力。

1 材料与方法

* 收稿日期: 2008-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870919, 300709210)

作者简介: 丁如贤(1963—), 男, 江苏南通人, 博士, 副教授, 主要从事药用植物生物工程工作。

Tel: (021) 25074572 E-mail: rxding@smmu.edu.cn

* 通讯作者 张汉明 Tel: (021) 25074575 E-mail: hmzhang@smmu.edu.cn;

张磊 Tel: (021) 25074574 E-mail: starzhanglei@gmail.com

1.1 无菌外植体的获得:挑选色泽黑亮饱满的四倍体菰蓝种子经 0.1% HgCl_2 浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次后接种到 1/2 MS 培养基上, 25、12 h 光照/d, 光强度 4 000 lx。

1.2 植物表达载体的构建和工程菌株培养:含有 pGBII21S4ABC 的菌株 LBA4404 是由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆先生提供的。pGBII21S4ABC 质粒 T-DNA 区结构见图 1。

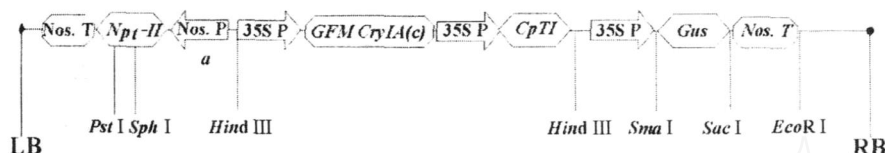


图 1 PGBII21S4ABC 质粒图谱

Fig. 1 Structure of plasmid pGBII21S4ABC

从抗性培养基上挑取 LBA4404 单菌落接种在含有 100 mg/L 链霉素 (streptomycin, Str) 和 100 mg/L 卡那霉素 (kanamycin, Kan) 的液体 YEP 培养基中, 28、200 r/min 条件下振荡过夜培养至对数生长期 $A_{600} = 0.5$; 4、5 000 r/min 离心 8 min, 收集菌体沉淀, 用等体积 1/2 MS 重悬培养, 28、200 r/min 振荡培养活化 30 min 用于转化。

1.3 菰蓝外植体遗传转化:取生长 8~10 d 的菰蓝子叶, 剪一定数量的伤口, 浸入活化好的工程菌中, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮, 28、180 r/min 振荡 15 min; 取出外植体用无菌滤纸吸去表面多余菌液, 置于固体共培养基上 (MS + BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L), 25 暗培养 2~3 d; 取出外植体, 用无菌水冲洗 3 次后接种于选择分化培养基 (MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + Kan 20 mg/L + Cef 500 mg/L) 上, 25、12 h 光照/d, 光强度 4 000 lx 进行培养, 2 周继代 1 次。待不定芽长至 2 cm 左右, 切下转移至生根培养基 (MS + NAA 0.2 mg/L + Kan 20 mg/L + Cef 500 mg/L)。根系发达后, 开瓶炼苗 2~4 d, 洗去根部的培养基, 移栽至泥炭土与珍珠岩 (3:1) 混合的穴盘, 浇灌足够的水分, 喷洒 5% 的井冈霉素 (validamycin A)。放至自然光照温室中, 控制温度 25、湿度 80%。

1.4 PCR 检测:取 Kan 抗性植株叶片, 采用改良的 CTAB^[3] 法提取总 DNA。反应体系为 25 μL 。2.5 U *Ex Taq* (Takara) 0.5 μL ; 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer (Mg^{2+} Plus) 2 μL ; dNTP (0.25 mmol/L)

1.6 μL , 上下游引物 F *CryIA(c)*: 5'-GGTTA-CACT-CCCA TCGACA TCTCG-3'; R *CryIA(c)*: 5'-CCATA GCGAACTCT GTTCCGTC-3'。F *CpTI*: 5'-GGATTTGAAGCACCTCGGAAGT-3'; R *CpTI*: 5'-ACTCATCATCTTCA TCCCTG-

GA-3' (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 模板 10~20 ng。梯度 PCR 反应程序为: 94 预变性 7 min, 94 变性 45 s, 72 延伸 1 min。退火温度从 65 每 2 个循环下降 2~3, 然后在 50 反应 18 个循环, 72 延伸 7 min。

1.5 Southern 杂交:提取 PCR 阳性转基因菰蓝总 DNA (10 ng, *Hind* 酶切过夜, 50 V 电压, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 9 h 后转到尼龙膜上, 转移方法和探针的制备见《分子克隆实验指南》。预杂交 2 h 后, 68 杂交过夜。55 先用 2 $\times$ SSC/0.1% SDS 溶液洗膜 30 min (两次), 然后室温下轻摇孵育 40 min。将尼龙膜用塑料薄膜包裹, 暗室曝光大约 40 min 后, 进行 8 min 显影, 1 min 水浴, 16 min X 光片定影, 流水冲洗 5 min 后观察。

1.6 抗小菜蛾功能试验:从田间取回小菜蛾幼虫, 培养在 24、70% 湿度的培养箱中, 每天饲喂新鲜菰蓝叶片, 使幼虫长大化蛹, 羽化, 交配。雌虫产卵后, 收集虫卵, 然后分期使卵粒孵化, 孵化后约 48 h 的幼虫用于试验, 试验前称幼虫体质量。取 Southern 杂交阳性且移栽存活的 T_0 代转基因四倍体菰蓝上半部鲜嫩生长旺盛的叶片, 放入直径为 12 cm 的培养皿内。每皿底部垫放浸湿的纱布, 放置 3 张叶片。用软毛笔接种已称质量的幼虫 10 条, 24 培养箱, 12 h 光照/d, 光强度 4 000 lx 培养。饲喂第 9 天统计死亡幼虫数, 取出存活的幼虫精确称质量, 观察其生长和叶片被摄食情况。抗虫试验重复 3 次。

2 结果

2.1 转基因植株的 PCR 检测:提取 Kan 抗性植株叶片 DNA 作为模板, 基因特异引物进行 PCR 扩增检测 *CryIA(c)* 和 *CpTI* 基因。质粒 pGBII21S4ABC 为阳性对照, 未转化的菰蓝基因组 DNA 为阴性对照, 水为模板作为空白对照。结果

显示:抗性再生植株 DNA 中均扩增出了 683 bp 的 *CryIA(c)* 基因特异性片段和 715 bp 的 *CpTI* 基因特异性片段(图 2),而阴性对照未扩增出目的片段,初步证明再生苾蓝植株基因组中可能有外源 *CryIA(c)* 和 *CpTI* 基因序列的插入。在检测的 258 株转基因小苗中,双基因 PCR 阳性棵数为 43,共转化率为 16.67%。

2.2 Southern 鉴定:PCR 只能考察转基因植株内存在外源目的基因片段,而不能完全确定外源目的

基因片段是否已整合进宿主基因组,可能存在假阳性结果,因此进一步采用 Southern 杂交分析验证独立转化植株。以 *CryIA(c)* 为标记探针的杂交结果表明转基因苾蓝 3~18 样品均出现 1 或 2 条杂交带,以 *CpTI* 为标记探针的杂交结果表明转基因苾蓝 3~18 样品均出现一条杂交带,而野生对照(Line 1)则未出现任何杂交带,证明 *CryIA(c)* 和 *CpTI* 基因已经成功整合进苾蓝基因组,且为低拷贝形式,有利于转基因的正常表达(图 3)。

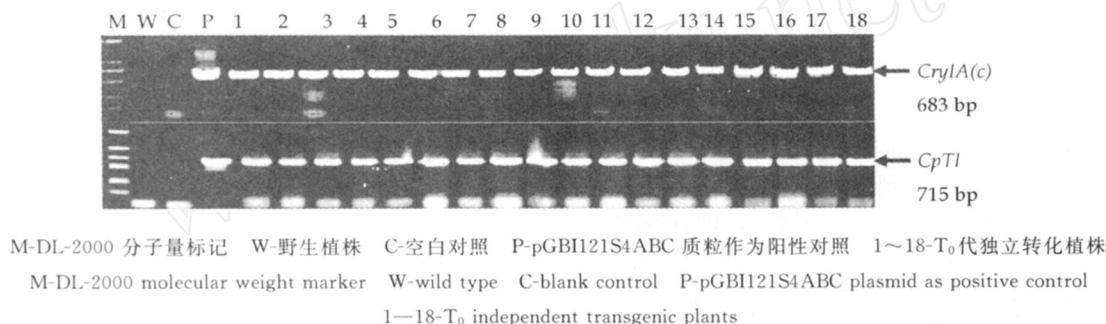


图 2 再生植株 *CryIA(c)* 和 *CpTI* 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR Analysis of *CryIA(c)* and *CpTI* in transgenic plants

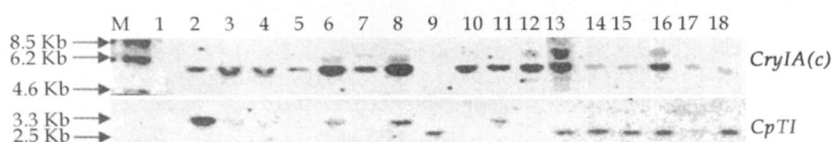


图 3 再生植株的 Southern 杂交分析

Fig. 3 Southern blotting analysis of *CryIA(c)* and *CpTI* in regeneration transgenic plants

2.3 抗小菜蛾活性测定:昆虫饲喂第 9 天,以小菜蛾幼虫死亡率、存活幼虫平均体质量和叶片受损伤程度为指标,检测转基因四倍体苾蓝的抗虫活力(表 1)。与未转基因对照相比,大多数转基因植株能明显抑制幼虫生长,表现为昆虫死亡率升高,存活幼虫平均体质量减轻,叶片受损伤程度减弱。经最小显著极差法检验,1、2、3、6、7、8、9、10、12 号独立转化株系与对照相比有极显著差异($P < 0.01$),4、5 号昆虫的死亡率达到 100%。小菜蛾幼虫的中毒症状一般出现于饲喂叶片后的第 3 天,幼虫摄食量减少,活动减慢,虫体开始萎缩,幼虫体内隐约呈红色。5~6 d 后幼虫逐渐死亡,虫体呈红色并变软腐败。有部分幼虫尽管不能被杀死,但虫体生长明显受到抑制,后期化蛹比对照晚 4~5 d,并且是异常蛹(蛹体小,呈红色)。这些蛹最后都腐坏而不能化羽成虫。

3 讨论

害虫是造成农林业减产的重要因素之一,喷施

表 1 转基因苾蓝植株抗虫活性

Table 1 Insecticidal activity of transgenic plants of tetraploid I. indigotic to moths

株系	昆虫死亡率/ %	存活幼虫平均体质量/ mg	叶片损伤程度
1	33.3	44.571 ± 7.079 *	+
2	43.3	30.380 ± 6.443 *	+
3	20	42.957 ± 5.645 *	++
4	100	-	+
5	100	-	+
6	36.6	39.917 ± 10.25 *	+
7	0	33.140 ± 3.296 *	++
8	0	44.130 ± 6.569 *	++
9	0	44.278 ± 6.309 *	++
10	0	55.890 ± 5.408 *	++
11	0	117.270 ± 6.476 *	+++
12	0	21.150 ± 2.696 *	++
对照	0	163.540 ± 9.620 *	++++

最小极差法检验有极显著差异: * $P < 0.01$, “+”表明叶片受虫害损害面积为 20%

Duncan's test (LSR): extreme significance at * $P < 0.01$ level, “+” indicates percentage of damage leaf area is 20%

化学农药、生物杀虫剂是目前主要的防治方法,但前者会造成环境污染,后者成本较高。植物基因工程

的兴起与发展,为利用基因工程防治虫害打开了新的局面。

微生物来源的苏云金杆菌杀虫结晶蛋白基因(*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein, *Bt* toxin)^[4]是世界范围内使用最广泛的杀虫基因,其产生的杀虫蛋白对鳞翅目昆虫具有很强和专一的毒性,对人畜安全无害^[5~7]。目前苏云金杆菌杀虫蛋白基因已引入烟草、棉花、水稻、玉米等50余种植物,成功提高其抗性^[8~12]。豇豆胰蛋白酶抑制剂(*cowpea trypsin inhibitor*, *CpTI*)作为一种植物来源的昆虫蛋白酶抑制剂^[13],能抑制昆虫或动物消化系统的蛋白酶活性,从而影响昆虫的消化作用而致昆虫死亡。由于其具有抗虫谱广且昆虫不易对其产生耐受性的特点,*CpTI*被作为植物抗虫基因工程一个重要的候选基因。目前*CpTI*基因已经被成功转入烟草、棉花、油菜等多种农作物中^[14]。

随着转基因抗虫棉新品种成功在全球推广,人们越来越意识到植物抗虫基因工程的巨大作用。然而自然选择和进化的结果使昆虫在遗传基础上降低了对毒蛋白基因的敏感性。昆虫的抗性是转基因植物是否能持续高效抗虫不容忽视的问题^[15]。多抗虫基因共转化为解决这一问题提供了一个有效的策略。同时转化2个或2个以上抗虫基因,使转基因植物表达出不同的杀虫蛋白,以缓解昆虫对毒蛋白产生的抗性,延长其在使用上的年限。该方法已成功应用于棉花、烟草等作物,并显示出显著的抗虫效果^[16]。将使用最广泛的*Bt*杀虫蛋白基因和*CpTI*基因共同转化植物,两种抗虫机制完全不同的基因共同作用,将会大大降低昆虫产生耐受性的机率,克服野生型*CpTI*抗性不够强的问题,有效地扩展转基因植物的抗虫谱,对于生长周期中存在众多种类害虫的植物具有更佳的实际应用效果。本研究中,采用根癌农杆菌介导将*Bt*和*CpTI*共同转化四倍体苘蓝,转基因植株对小菜蛾幼虫成活、生长具有显著的抑制作用。今后将进一步研究转基因苘蓝中两种外源基因蛋白表达、子代的遗传稳定性和转基因苘蓝的品质评价等内容,以期获得安全、优

质、高产的转基因抗虫苘蓝新品系。

参考文献:

- [1] 乔传卓,吴美枢,戴富宝. 苘蓝多倍体育种的研究[J]. 植物学报, 1989, 31(9): 678-683.
- [2] 李庆军,董艳桐,施冰. 植物抗虫基因的研究进展[J]. 农林科技, 2002, 27(2): 22-25.
- [3] Porebski S, Bailey G, Baum B R. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15: 8-15.
- [4] James C (2004) Global Status of Commercialised Transgenic Crops ISAAA Briefs No. 32: Preview. ISAAA, Ithaca, N Y. [J]. , -.
- [5] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheeman S E, et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco[J]. *Nature*, 1987, 330: 160-163.
- [6] Van Rie J, McGaughey W H, Johnson D E. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* [J]. *Science*, 1990, 247: 72-74.
- [7] Knight P J, Crickmore N, Ellar D J. et al. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N [J]. *Mol Microbiol*, 1994, 11(3): 429-436.
- [8] Vadlamudi R K, Weber E, Ji I, et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 5490.
- [9] Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Annu Rev Entomol*, 1995, 132: 1.
- [10] Delannay X, Lavalley B, Proksch R K, et al. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein [J]. *Bio/Technology*, 1989, 7: 1265-1269.
- [11] Michael G K, Gary L B, Cindy B, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Biotechnology*, 1994, 11: 194-200.
- [12] 程茂高,乔卿梅,原国辉. 植物外源抗虫基因及其应用[J]. 生物技术通报, 2004(5): 18-20.
- [13] 徐鸿林,翟红利,王锋,等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)及其在抗虫转基因作物中的应用[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(1): 18-27.
- [14] 李文兰. 植物抗虫基因工程的应用与展望[J]. 广西农业科学, 2004 (35): 245-248.
- [15] 张汉尧,刘小珍,杨宇明. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 河南农业科学, 2005 (3): 11-15.
- [16] Christou P, Capell T, Kohli A, et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(6): 302-308.