



陈沼汀, 董昭旭, 刘 双, 等. 转 *cry1Ab13* 基因玉米新种质的创制[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 31-37.

转 *cry1Ab13* 基因玉米新种质的创制

陈沼汀, 董昭旭, 刘 双, 孙国旭, 李 晖, 魏晓禹, 孙 苏, 关淑艳
(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】构建包含抗鳞翅目害虫基因 *cry1Ab13* 的重组植物表达载体, 并利用其创制对玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 具有优良抗性的转基因玉米 *Zea mays* L. 新种质。【方法】利用同源重组法将 *cry1Ab13* 基因连接到表达载体 pCAMBIA3300-Bar 上, 获得以抗除草剂 Bar 基因为筛选标记的植物表达载体 pCAMBIA3300-cry1Ab13-Bar。通过农杆菌介导法转化玉米自交系 H99 幼胚, 对再生植株进行逐代除草剂筛选、PCR 检测及 T₂ 代植株的 Southern blotting 检测、实时荧光定量 PCR 检测, 并对转基因植株进行田间及室内抗虫性鉴定。【结果】构建了 *cry1Ab13* 基因的植物表达载体, 转化玉米获得 3 株高抗玉米螟和 1 株抗玉米螟的 T₂ 代转基因植株。Southern blotting 证明 *cry1Ab13* 基因已经整合到玉米基因组中, 实时荧光定量 PCR 结果表明 *cry1Ab13* 基因已经在玉米植株内表达。抗虫性鉴定结果表明, 与对照相比转基因植株对玉米螟的抗性显著提高。【结论】将 *cry1Ab13* 基因导入玉米并成功表达, 显著提高了转基因玉米对玉米螟的抗性, 为抗虫玉米新种质的创制奠定了基础。

关键词: 抗虫性; *cry1Ab13* 基因; 转基因玉米; 玉米螟
中图分类号: S433.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2016)05-0031-07

Creation of new transgenic maize germplasm harboring *cry1Ab13* gene

CHEN Zhaoxing, DONG Zhaoxu, LIU Shuang, SUN Guoxu, LI Hui, WEI Xiaoyu, SUN Su, GUAN Shuyan
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】To construct a plant expression vector including a lepidopteran-resistant gene *cry1Ab13* and use it to create a new transgenic maize germplasm with high resistance to *Ostrinia furnacalis*. 【Method】The *cry1Ab13* gene was inserted into expression plasmid pCAMBIA3300-Bar by homologous recombination method, and the plant expression vector pCAMBIA3300-cry1Ab13-Bar with Bar gene as a selection marker was obtained. Following *Agrobacterium* mediated transformation of the immature embryo of maize inbred line H99, the regenerated plants were detected by PCR and herbicide-resistance selection for each generation. T₂ generation plants were also detected by Southern blotting and real-time quantitative PCR. The resistance of transgenic plants to *O. furnacalis* was tested indoor and in the fields. 【Result】A plant expression vector containing the *cry1Ab13* gene was successfully constructed and three T₂ transgenic maize with high resistance and one T₂ transgenic maize with resistance to *O. furnacalis* were obtained. The *cry1Ab13* gene was integrated into maize genome as confirmed by Southern blotting, and it was expressed in maize as shown by real-time quantitative PCR. The resistance of transgenic plants to *O. furnacalis* was improved significantly compared to non-transgenic control. 【Conclusion】We introduced the *cry1Ab13* gene into maize and its expression significantly improved the resistance of maize to *O. furnacalis*, which will promote the development of new insect-resistant maize germplasm.

Key words: insect resistance; *cry1Ab13* gene; transgenic maize; *Ostrinia furnacalis*

收稿日期: 2016-02-15 优先出版时间: 2016-07-05
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160705.1200.044.html>
作者简介: 陈沼汀 (1990—), 女, 硕士研究生, E-mail: 562770926@qq.com; 通信作者: 关淑艳 (1971—), 女, 教授, 博士, E-mail: 458194095@qq.com
基金项目: 吉林省省级粮食生产发展专项 (2015001); 吉林农业大学科研启动基金 (201242)

玉米 *Zea mays* L. 是我国重要的粮食作物,在粮食、饲料、工业、能源等方面都有着重要的应用^[1]。据统计,到 2020 年我国将实现粮食增产 500 亿 kg,其中玉米增产占 53%^[2]。提高玉米产量对于我国粮食安全及经济发展具有重要战略意义。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 是鳞翅目螟蛾科昆虫,是影响我国玉米生产的主要害虫。玉米螟咬食玉米茎、叶、穗等,对玉米的产量及品质产生直接影响,其危害贯穿玉米生产的各个阶段,造成玉米减产 20% ~ 30%^[3]。转 *Bt* 基因的玉米,通过表达 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ie* 等杀虫晶体蛋白,从而产生对玉米螟等害虫的抗性^[4-5]。1990 年科学家首次利用转基因技术获得转 *Bt* 基因的玉米植株^[6-7],近年来我国在抗虫转基因玉米的研究方面也取得了诸多成果^[8-9]。*cry1Ab* 是抗虫转基因玉米研发过程中的重要基因,是应用得最多且应用最成熟的抗虫基因。据 ISAAA 2016 年统计数据显示,世界各国已批准允许作为食物及饲料的抗虫转基因玉米有 115 个,其中有 52 个是含有 *cry1Ab* 基因的转基因玉米;BT11、BT176、MON810 等转 *cry1Ab* 基因玉米自交系作为第 1 批抗虫转基因玉米材料在抗虫转基因玉米育种上具有广泛的应用并取得了显著的效果;近年来,有关转基因玉米食用安全性评价的研究报道不断出现,众多研究一致表明,其食用安全性及营养特性与非转基因玉米相比无显著差异^[10-12]。因此,利用 *cry1Ab* 基因进行抗虫转基因玉米的研发在经验及理论上具有独特的优势,为加快我国抗虫转基因玉米的研发进程,有必要深入研究克隆得到的不同种 *cry1Ab* 基因。*cry1Ab13* 基因是由中国农业科学院植物保护研究所病虫害生物学国家重点实验室从苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) BtC005 中克隆得到的抗虫基因,其编码的杀虫晶体蛋白对鳞翅目昆虫具有高效杀虫活性^[13]。本研究利用分子生物学技术将 *cry1Ab13* 基因连接到含有 *Bar* 基因的植物表达载体 pCAMBIA3300 上,并利用农杆菌介导法将其

导入玉米自交系 H99 中,通过除草剂筛选、PCR 检测及抗虫性鉴定,以获得抗玉米螟的转基因玉米植株,为抗虫转基因玉米品种的种质创制提供材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

含 pUC57-*cry1Ab13* 质粒菌株及植物表达载体 pCAMBIA3300-*Bar* 由吉林省农业科学院提供。基因受体玉米自交系 H99 幼胚、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 、农杆菌 *Agrobacterium* 菌株 EHA105 均由吉林农业大学植物生物技术中心提供。亚洲玉米螟幼虫由吉林农业大学农业综合技术现代化研究所提供。构建表达载体所用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 试剂盒购自 Vazyme 公司。玉米基因组提取试剂盒购自康为世纪公司。试验所用培养基:LB、YEP、诱导、侵染、共培养、筛选、分化和生根培养基均参照关淑艳等^[14]方法。

1.2 重组植物表达载体的构建

提取 pUC57-*cry1Ab13* 质粒及 pCAMBIA3300-*Bar* 质粒,以 CaMV35S 启动子下游 *Bam*H I 识别位点作为 *cry1Ab13* 基因插入位点,根据 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 所提供的 Clon Express 快速克隆技术要求对载体及目的片段进行分析,设计特异性引物(表 1)。以 pUC57-*cry1Ab13* 质粒为模板 PCR 扩增 *cry1Ab13* 基因,回收目的基因片段(1 971 bp)和 *Bam*H I 酶切 pCAMBIA3300-*Bar* 质粒所得的线性化载体,根据 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 说明书进行操作,同源重组反应得到重组植物表达载体 pCAMBIA3300-CaMV35S-*cry1Ab13*-Nos-CaMV35S-*Bar*-Nos(图 1)。

1.3 农杆菌介导的玉米幼胚的遗传转化

玉米自交系 H99 自交授粉 11 d 后挑取幼胚用作工程菌侵染宿主,玉米幼胚挑取见郭新梅等^[15]的方法。农杆菌介导玉米幼胚的遗传转化及转化后玉米组织培养再生植株,参见刘强等^[16]的方法。

表 1 引物信息¹⁾
Tab. 1 Primer information

目的片段名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增序列/bp
<i>cry1Ab13</i> *	AGAACACGGGGGACTCTAGATCTAGACCC- GGGCCTAT	GATCGGGGAAATTCGAGCTCTTAT- CAAAGTTCATCCTT	1 971
<i>cry1Ab13</i> **	TTTGGAGAGAGTGTGGGGT	GATCCCTCGATACCTGAGC	155
CaMV35S	TAGAGGACCTAACAGAAC	CCGTGTTCTCTCCAAATG	500
<i>Bar</i>	TCAAATCTCGGTGACGGGC	ATGAGCCCAGAACGACGC	552
<i>Actin</i>	ATCTTGACTGAGCGTGTTATTCC	GCTGGTCTGGCTGTCTCC	75

1) *、** 分别表示该引物用于 *cry1Ab13* 基因的 PCR 扩增和荧光定量 PCR 检测;划线处为 *Bam*H I 酶切位点及同源臂。

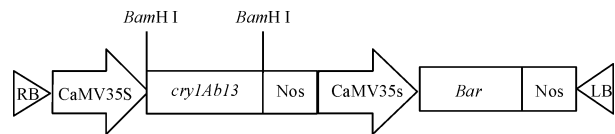


图1 重组植物表达载体 T-DNA 区结构图

Fig.1 T-DNA region of plant recombinant expression vector

1.4 转基因植株的分子检测

1.4.1 转基因玉米植株的 PCR 检测 对6叶期玉米叶片涂抹3倍正常工作浓度草胺膦溶液逐代进行抗除草剂转基因植株筛选,提取对草胺膦表现抗性的植株基因组 DNA,方法见康为世纪公司植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书。以玉米转基因植株基因组 DNA 为模板,分别以非转基因植株基因组 DNA 和重组植物表达载体质粒为对照(CK)和阳性对照,利用表1所示特异性引物对 *cry1Ab13* 基因、CaMV35S 启动子、*Bar* 基因分别进行扩增。PCR 程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 57 s,退火温度分别为 56 ℃、50 ℃、55 ℃,反应 57 s,72 ℃ 延伸 70 s,30 个循环;72 ℃ 后延伸 10 min;经 PCR 检测呈阳性的转基因植株进行套袋自交,以同样的方法进行逐代筛选。

1.4.2 转基因玉米植株的 Southern blotting 检测 利用 CTAB 法大量提取 T₂ 代 PCR 检测为阳性和非转基因植株 5~6 叶期心叶基因组,利用 *Hind*Ⅲ 对基因组 DNA 进行充分单酶切过夜,扩增 *cry1Ab13* 基因并纯化目的片段用于制备杂交探针,利用随机引物法根据 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书进行探针标记,用 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶对基因组酶切片段进行分离,转膜、固定、杂交等具体操作步骤及所用试剂配制参考文献[17]。

1.4.3 转基因玉米植株的实时荧光定量 PCR 检测 以非转基因植株为对照,分别提取非转基因植株和 Southern 杂交检测为阳性的 T₂ 转基因植株 6 叶期心叶总 RNA,并反转录成 cDNA 作为 PCR 扩增模板,以引物(表1)扩增 *cry1Ab13*,以肌动蛋白 *Actin* 基因(GenBank 登录号:NM_001252731.2)作为内参基因同时进行 PCR 扩增。扩增条件为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 20 s,56 ℃ 反应 30 s,共 40 次循环。利用 SYBR Green 染料标记的实时荧光定量 PCR 对来自不同转化事件的转基因植株 *cry1Ab13* 基因的相对表达量进行分析(SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购自 TaKaRa 公司)。每个样本设置 3 次生物学重复,并进行 3 次技术重复。

1.5 转基因玉米植株的抗虫性鉴定

1.5.1 转基因植株的田间抗虫性鉴定 将 T₂ 代转基因种子与 H99 自交系种子(对照)播种于大田,并

对转基因群体材料进行筛选,选取筛选到的阳性植株进行接虫试验。于植株 6~8 叶期时,将初孵玉米螟幼虫于清晨湿度较高时接于玉米心叶中,每株植株接虫 30 头,14 d 后调查食叶级别,抗虫性评价标准参照文献[18],1~3 级:虫孔针刺状;4~6 级:虫孔火柴头大小;7~9 级:虫孔大于火柴头。抗性级别分类:1.00~2.09 级(高抗),2.10~4.09 级(抗虫),4.10~6.09 级(中抗),6.10~8.09 级(感虫),8.10~9.00 级(高感)。

1.5.2 转基因植株的苗期室内抗虫性鉴定 将经 Southern 检测阳性的植株收获的转基因种子与非转基因植株种子(对照)按株系分别种于塑料盆内,每盆 15 粒,经除草剂筛选及 PCR 检测后去除阴性及多余植株,每盆保留 5 株转基因阳性植株。待植株长至 5~6 叶期时进行接虫,每株植株接 25 头初孵玉米螟幼虫于心叶中,置于人工气候室培养,接虫 14 d 后调查玉米虫害级别,逐株调查,以 5 株的均值作为该株系的抗虫级别,抗虫性鉴定标准同“1.5.1”。

1.5.3 转基因植株籽粒及苞叶抗虫性鉴定 取 Southern blotting 检测阳性的转基因玉米授粉后 13 d 的籽粒和最内层苞叶分别饲喂玉米螟幼虫,以非转基因玉米材料作为对照。将等量的籽粒和苞叶分别置于培养皿内,每个培养皿内接 10 头初孵玉米螟幼虫,置于人工气候室培养。每株设 3 次重复,每天检查玉米螟取食和存活情况,及时更换同 1 株的籽粒及苞叶,分别在第 4、8、12 天统计玉米螟死亡率。

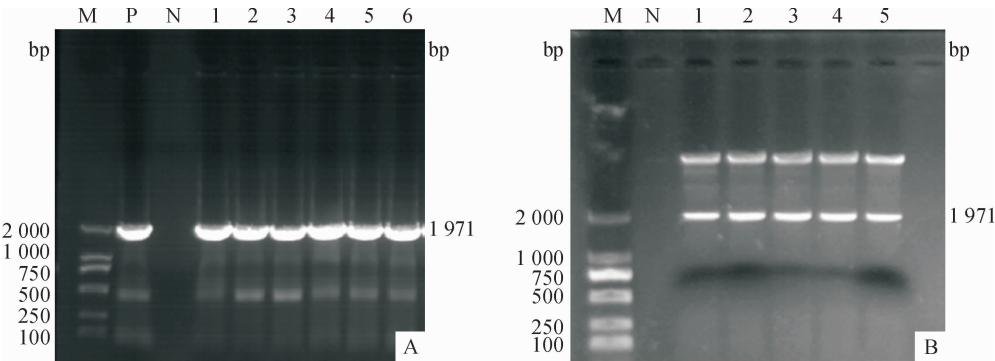
2 结果与分析

2.1 重组植物表达载体的鉴定

提取重组表达载体质粒,利用 *cry1Ab13* 基因特异性引物进行目的基因扩增,得到特异性扩增产物,大小与目的基因 *cry1Ab13* (1 971bp) 大小一致(图 2)。重组质粒经 *Bam*H I 单酶切,可得到 2 个大小不等片段,大片段长度与线性化 pCambia3300-*Bar* 长度一致,小片段与 *cry1Ab13* 基因大小一致。进一步对重组质粒中的插入片段进行测序,测序结果与目的基因 *cry1Ab13* 相似性达 100%。综上可以证明 *cry1Ab13* 基因已经成功连接到 pCambia3300-*Bar* 插入位点处,表达载体 pCambia3300-*cry1Ab13*-*Bar* 构建成功。

2.2 农杆菌介导的玉米转化植株的获得

利用农杆菌介导法将 pCambia3300-*cry1Ab13*-*Bar* 导入玉米幼胚,经过筛选培养、分化和生根共获得 50 株再生苗,将 50 株三叶期再生幼苗室内移栽到土壤,共有 30 株幼苗成活。



M:DNA marker DL 2000;P:阳性对照;N:阴性对照;1~6:重组质粒。

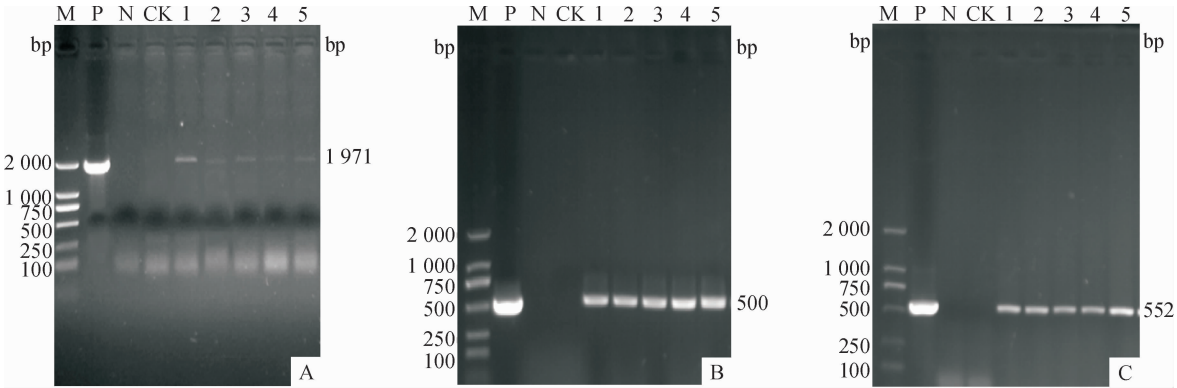
图 2 重组植物表达载体 pCAMBIA3300-cry1Ab13-Bar 的 PCR (A) 与酶切验证 (B)

Fig. 2 Verification of the recombinant vector pCAMBIA3300-cry1Ab13-Bar using PCR(A) and digestion(B)

2.3 转基因植株的分子鉴定

2.3.1 转基因植株的 PCR 检测结果 提取抗除草剂转基因植株基因组 DNA, 分别对 *cry1Ab13* 基因、CaMV35S 启动子及 *Bar* 基因进行特异性 PCR 扩增,

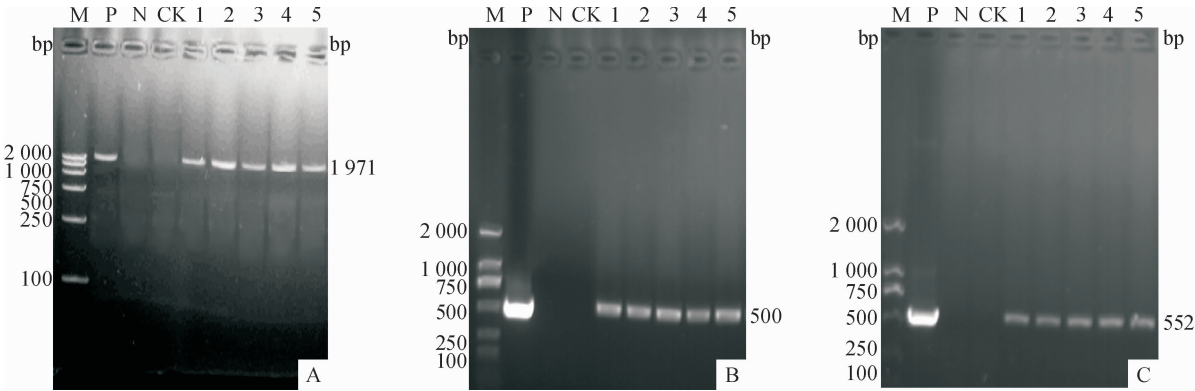
扩增产物进行 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶检测, 筛选具有以上 3 种基因条带的 T_1 代和 T_2 代转基因植株如图 3、4 所示, 筛选到的转基因阳性植株按株系逐代编号, 结果见表 2。



M:DNA marker DL 2000;P:阳性对照;N:阴性对照;CK:非转基因植株;1~5:转基因植株;A、B、C 分别为对 *cry1Ab13* 基因、CaMV35S 启动子及 *Bar* 基因的扩增结果。

图 3 部分 T_1 代转基因玉米 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR detection of some T_1 generation transgenic maize



M:DNA marker DL 2000;P:阳性对照;N:阴性对照;CK:非转基因植株;1~5:转基因植株;A、B、C 分别为对 *cry1Ab13* 基因、CaMV35S 启动子及 *Bar* 基因的扩增结果。

图 4 部分 T_2 代转基因玉米 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR detection of some T_2 generation transgenic maize

2.3.2 转基因植株的 Southern blotting 选取 T_2 代植株 PCR 检测结果为阳性的植株进行 Southern blot-

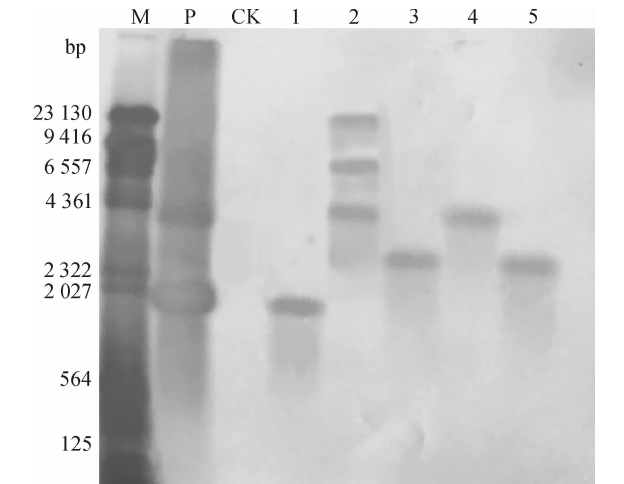
ting 检测, 以 *cry1Ab13* 基因扩增片段作为阳性对照, 非转基因植株 DNA 作为阴性对照, 20 株 PCR 阳性

植株中有 5 株经 Southern 杂交出现明显杂交信号(图5),其中T₂-2-3-1为3拷贝,其余均为单

表 2 PCR 检测阳性玉米植株
Tab.2 PCR-positive maize plants

世代	来源	植株数	编号
T ₀		8	T ₀ -1 ~ T ₀ -8
T ₁	T ₀ -1	1	T ₁ -1-1
	T ₀ -2	4	T ₁ -2-1 ~ T ₁ -2-4
	T ₀ -3	1	T ₁ -3-1
	T ₀ -4	2	T ₁ -4-1 ~ T ₁ -4-2
	T ₀ -5	1	T ₁ -5-1
	T ₀ -8	1	T ₁ -8-1
T ₂	T ₁ -1-1	2	T ₂ -1-1-1 ~ T ₂ -1-1-2
	T ₁ -2-1	1	T ₂ -2-1-1
	T ₁ -2-3	5	T ₂ -2-3-1 ~ T ₂ -2-3-5
	T ₁ -2-4	3	T ₂ -2-4-1 ~ T ₂ -2-4-3
	T ₁ -3-1	2	T ₂ -3-1-1 ~ T ₂ -3-1-2
	T ₁ -4-1	4	T ₂ -4-1-1 ~ T ₂ -4-1-4
	T ₁ -5-1	3	T ₂ -5-1-1 ~ T ₂ -5-1-3

拷贝,非转基因植株无明显杂交信号出现,并且不同植株的杂交条带位置存在差异。证明外源基因 *cry1Ab13* 已整合到了玉米基因组中,并且随机整合到了玉米基因组的不同位置。

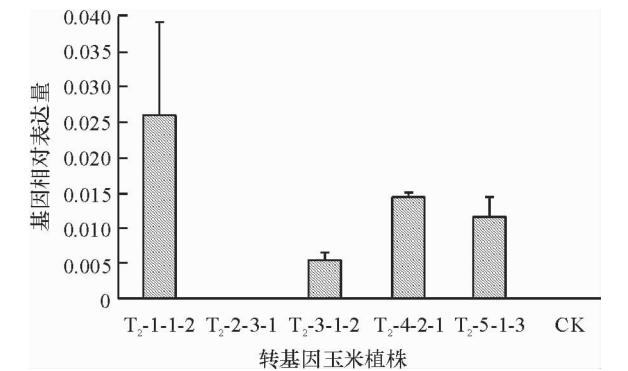


M:λHind III DNA marker;P:阳性对照;CK:非转基因植株;1~5 分别为转基因植株 T₂-1-1-2、T₂-2-3-1、T₂-3-1-2、T₂-4-2-1 和 T₂-5-1-3。

图 5 T₂ 代转基因玉米 *cry1Ab13* 基因的 Southern 杂交检测
Fig.5 Southern blotting detection of *cry1Ab13* gene in T₂ transgenic maize

2.3.3 转基因植株的实时荧光定量 PCR 检测 实时荧光定量 PCR 结果显示,溶解曲线均有单峰出现,表明反应特异性较好,无引物二聚体及非特异性产物的干扰;扩增曲线光滑平稳,荧光吸收图谱 S 型曲线性状完好,符合定量检测要求。各株内参基因 Ct 值在 19 ~ 20 之间,目的基因 Ct 值在 25 ~ 34 之间,不

同植株 *cry1Ab13* 基因的 Ct 值具有明显的差异,且植株 T₂-2-3-1 内参基因 Ct = 19.34, *cry1Ab13* 基因在设定的 40 个循环内未检测到 Ct 值,说明外源基因在不同转基因事件中表达量具有明显差异,转基因植株 T₂-2-3-1 中 *cry1Ab13* 基因未表达。各植株中 *cry1Ab13* 基因相对表达量见图 6。

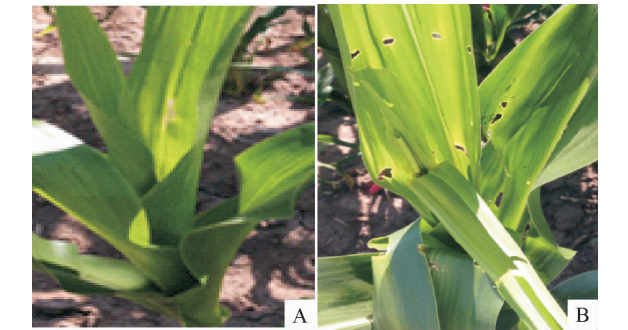


基因相对表达量用 $2^{-\Delta CT}$ 表示,其中 $\Delta CT = Ct_{cry1Ab13} - Ct_{Actin}$; CK:非转基因植株;图中所示数据为 $\bar{x} \pm SE, n = 9$ 。

图 6 转基因玉米中 *cry1Ab13* 基因相对表达量
Fig.6 Relative expression of *cry1Ab13* gene in transgenic maize

2.4 转基因玉米植株抗虫性鉴定

2.4.1 田间抗虫性试验 T₂ 代转基因植株的田间接虫试验表明,PCR 阳性 T₂ 代转基因植株对亚洲玉米螟具有较强的抗性(图 7A),接虫 14 d 后植株生长良好,心叶大多表现为未受虫害或仅有少量针状虫孔,而非转基因的对照组则受虫害严重(图 7B),心叶及外部叶片均有大量较大虫孔,对玉米螟表现为高度敏感性,但也有个别 PCR 阳性植株抗虫性较差,与对照组无显著差异。



A:转基因植株;B:非转基因植株。
图 7 转基因玉米植株田间抗虫性鉴定

Fig.7 Evaluation of resistance of transgenic maize plants to *Ostrinia furnacalis* in the field

2.4.2 室内接虫试验 为更准确地鉴定转基因植株的抗虫性,将 Southern 杂交阳性植株自交后代于室内按株系(编号 L1 ~ L5)种植,接虫试验结果表明,各 Southern blotting 阳性植株后代株系对玉米螟抗性表现不同,L1、L5 植株的心叶有少量针刺状(直

径 ≤ 1 mm) 虫孔; L4 的虫孔为针刺状, 数量稍多于 L1 与 L5; L3 的心叶上有大量的针刺状虫孔; L2 的心叶上有少量直径大于 2 mm 的虫孔; 对照株系心叶上的虫孔稍多于 L2, 虫孔的直径也大于 2 mm。逐株统计各株系的抗虫级别, 对相同接虫处理条件下的转基因株系与对照株系抗虫性差异显著性进行 t 检验, 检验结果(表 3)与试验观测结果相符, L1、L4、L5 达

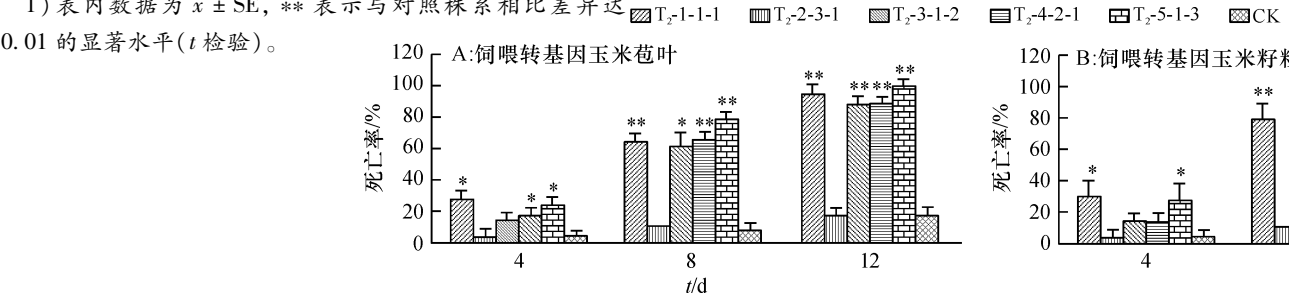
表 3 室内转基因玉米株系苗期对玉米螟的抗性级别
Tab.3 The resistant levels of transgenic maize lines to *Ostrinia furnacalis* at seeding stage indoor

转化事件	株系号	食叶级别 ¹⁾	抗性级别
T ₂ -1-1-2	L1	1.40 ± 0.21 **	高抗
T ₂ -2-3-1	L2	7.02 ± 2.17	易感
T ₂ -3-1-2	L3	3.62 ± 0.42 **	抗
T ₂ -4-2-1	L4	2.22 ± 0.19 **	高抗
T ₂ -5-1-3	L5	1.46 ± 0.36 **	高抗
未转化	CK	7.62 ± 0.42	易感

1) 表内数据为 $\bar{x} \pm SE$, ** 表示与对照株系相比差异达 0.01 的显著水平(t 检验)。

到高抗水平, L3 达到 3 级抗性水平, 转化事件 T₂-2-3-1 后代株系 L2 对玉米螟抗性较差, 与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.4.3 灌浆期苞叶及籽粒抗虫性鉴定 分别在饲喂转基因玉米籽粒及苞叶 4、8、12 d 后统计 3 次重复试验各组玉米螟死亡率, 并对各组结果与非转基因的对照组结果进行独立样本 t 检验, 结果见图 8。除植株 T₂-2-3-1 的籽粒及苞叶对玉米螟的抗性较差, 与对照组无显著差异外, 转基因植株对玉米螟的抗性明显高于非转基因对照株。转 *cry1Ab13* 基因的试验组玉米螟幼虫生长缓慢, 随饲喂时间增加死亡率不断提高, 喂食 8 d 后试验组玉米螟死亡率达到 80% 左右, 而非转基因的对照组玉米螟幼虫生长速度快, 死亡率低, 饲喂 8 d 后死亡率只有 10% 左右。不同转基因植株对玉米螟的抗性表现也不同, 各转基因植株对玉米螟的相对抗性水平与实时荧光定量 PCR 检测到 *cry1Ab13* 基因相对表达量基本一致。



图中数据为 $\bar{x} \pm SE$, $n=3$; * 和 ** 分别代表相同处理时间的转基因植株与非转基因植株(CK)的玉米螟死亡率达到 0.05 和 0.01 的显著差异水平(t 检验)。

图 8 饲喂转基因玉米籽粒及苞叶对玉米螟死亡率的影响

Fig.8 Effects of feeding transgenic corn kernels or bracts of ears on the mortality rate of *Ostrinia furnacalis*

3 讨论与结论

1995 年 Armstrong 等^[19]的研究证明 *cry1Ab* 毒蛋白的结构赋予其对小菜蛾 *Plutella xylostella*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 等较强的杀虫活性。随后国内外许多研究人员将 *cry1Ab* 基因导入玉米, 并证明表达 *cry1Ab* 蛋白的转基因玉米对亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 及欧洲玉米螟 *O. nubilalis* 都有很好的田间抗性, 能高效控制心叶期及穗期玉米螟的危害。本研究在檀建新等^[13]的研究基础上, 利用同源重组的方法将抗虫基因 *cry1Ab13* 连接到含有抗除草剂草胺膦的 *Bar* 基因的植物表达载体上, 遗传转化玉米得到 5 株稳定遗传至 T₂ 代的转基因植株, *cry1Ab13* 基因在玉米中的表达赋予转基因植株抗玉米螟的特性。外源基因稳定高效的表达是转基因工作的重要目标, 王忠华等^[20]的研究表明, *cry1Ab* 基因水稻转化植株经 4~5 次自交后, 目的基因仍能稳定遗传且呈单位点显性方式遗传。本研究通过 Southern 杂交、实时荧

http://xuebao.scau.edu.cn

光定量 PCR 技术对 *cry1Ab13* 基因在植株中的整合及表达情况进行分析。试验结果表明除转基因事件 T₂-2-3-1 外其余各转基因植株中 *cry1Ab13* 均为单拷贝形式整合在基因组中, 且成功转录表达, 但各单株间相对表达水平存在一定的差异。而转基因事件 T₂-2-3-1 中 *cry1Ab13* 基因以 3 拷贝形式存在, 且表达受到抑制, 转录水平与非转基因植株无显著差异, 分析原因可能是由于 *cry1Ab13* 基因的多拷贝整合或位置效应引起的转录水平的基因沉默^[21]。岳同卿等^[22]的抗虫转基因玉米的研究结果显示, 不同转化事件的抗虫效果存在一定的差异, 本研究得出同样的结论。Day 等^[23]指出外源基因在基因组内的整合位置不同可以导致基因表达水平不同, 为解释上述现象提供了理论参考。转基因植株田间及室内对玉米螟抗性评价结果表明, 转入 *cry1Ab13* 基因能够显著提高植株对玉米螟的抗性, 本试验中转 *cry1Ab13* 基因玉米的杀虫效果与 *cry1Ab13* 基因的表达水平基本一致, 与王培等^[24]研究结果相符, 但也有研究表明

转基因作物 Bt 蛋白表达量与杀虫效果并不一致^[25-26]。

本研究构建了植物表达载体 pCambia3300-*cryIAb13-Bar*,并通过农杆菌介导法将其导入玉米自交系 H99,获得了4株抗玉米螟及抗除草剂的 T₂ 代转基因植株。下一步将通过优化植物重组表达载体中的表达调控元件来提高转基因植株的抗虫效果,并继续进行转基因株系的自交扩繁及严格的筛选鉴定,为抗虫玉米新品种的研发提供材料。

参考文献:

- [1] 李少昆,王崇桃. 玉米高产潜力途径[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [2] 赵久然,王荣焕. 中国玉米生产发展历程、存在问题及对策[J]. 中国农业科技导报,2013,15(3):1-6.
- [3] NICOLAS J A, TAMAYO N V, CAOILI B L, et al. Improving the yield of glutinous white corn by distance of planting and use of biocontrol agents for management of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenee[C]//Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture. Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials, Manila, Philippines, 21-24 April, 2013. Manila, Philippines: Asian PGPR Society for Sustainable Agriculture, 2013: 50-74.
- [4] HE K, WANG Z, ZHOU D, et al. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. J Econ Entomol, 2003, 96(3): 935-940.
- [5] 王月琴,何康来,江帆,等. BT799 玉米对亚洲玉米螟抗性研究[J]. 应用昆虫学报,2014,51(3):636-642.
- [6] FROMM M E, MORRISH F, ARMSTRONG C, et al. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants[J]. Nat Biotechnol, 1990, 8(9): 833-839.
- [7] GORDON-KAMM W J, SPENCER T M, MANGANO M L, et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants[J]. Plant Cell, 1990, 2(7): 603-618.
- [8] 郝曜山,孙毅,杜建中,等. 转双价抗虫基因 BmkIT-Chitinase 玉米株系的获得[J]. 分子植物育种,2012,10(2): 147-154.
- [9] 李桂玲,李明泽,刘宗华,等. 转 Bt 基因抗虫玉米的研究[J]. 生物技术通报,2009(5): 9-13.
- [10] SHIMADA N, MURATA H, MIKAMI O, et al. Effects of feeding calves genetically modified corn Bt11: A clinico-biochemical study[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(10): 1113-1115.
- [11] TRABALZA-MARINUCCI M, BRANDI G, RONDINI C, et al. A three-year longitudinal study on the effects of a diet containing genetically modified Bt176 maize on the health status and performance of sheep[J]. Livest Sci, 2008, 113(2): 178-190.
- [12] BUZOIANU S G, WALSH M C, REA M C, et al. Effect of feeding genetically modified Bt MON810 maize to 40-day-old pigs for 110 days on growth and health indicators [J]. Animal, 2012, 6(10): 1609-1619.
- [13] 檀建新,张杰,宋福平,等. 苏云金芽孢杆菌 *cryIAb13* 基因的克隆及表达研究[J]. 微生物学报,2002,42(1):40-44.
- [14] 关淑艳,赵丽娜,刘慧婧,等. 农杆菌介导的 *sbe2a* 基因 RNAi 载体对玉米遗传转化的研究[J]. 作物杂志,2011(2):36-40.
- [15] 郭新梅,张晓东,韩立新,等. 不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(4): 68-72.
- [16] 刘强,张丽媛,马红丹,等. 转 *phyA* 基因玉米新种质的创制[J]. 华南农业大学学报,2014,35(1):43-48.
- [17] 刘强. *phyA* 基因植物表达载体的构建及转化玉米的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2013.
- [18] 何康来,王振营,周大荣,等. 玉米抗螟性鉴定方法与评价标准[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(5):439-443.
- [19] ARMSTRONG C L, PARKER G B, PERSHING J C, et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* [J]. Crop Sci, 1995, 35(2): 550-557.
- [20] 王忠华,吴刚. Bt 水稻中 *cryIAb* 基因的遗传分析[J]. 遗传学报,2001,28(9): 846-851.
- [21] 刘悦萍,赵晓萌,宫飞. 转基因植物中外源基因沉默机制的研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(4): 80-83.
- [22] 岳同卿,郎志宏,王延锋,等. 转 Bt *cryIAb* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报,2010,18(4): 638-644.
- [23] DAY C D, LEE E, KOBAYASHI J, et al. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced [J]. Genes Dev, 2000, 14(22): 2869-2880.
- [24] 王培,何康来,王振营,等. 转 *cryIAb* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报,2012,39(5): 395-400.
- [25] 王冬妍,王振营,何康来,等. Bt 玉米杀虫蛋白含量的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果[J]. 中国农业科学,2004,37(8): 1155-1159.
- [26] 张永军,吴孔明,郭予元. 转 Bt 基因棉花杀虫蛋白含量的时空表达及对棉铃虫的毒杀效果[J]. 植物保护学报,2001,28(1): 1-6.