

转基因欧洲黑杨中 *Bt* 基因表达特性的研究^{*}

王军辉¹ 张建国¹ 胡建军¹ 张真¹ 张守攻^{1**}

(1 中国林业科学研究院林业科学研究所 北京 100091)

2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 北京 100091)

摘要 利用 PCR 检测了转基因欧洲黑杨当代和杂交后代群体, 外源 *Bt* 基因在 7 年生的转基因欧洲黑杨 14 个无性系中稳定存在, *Bt* 基因在杂交后代中分离比例为 1:1。转基因欧洲黑杨作母本进行杂交时有落花、落果现象, 可能是基因改造影响了它们的某些生理功能。

关键词 转基因欧洲黑杨 *Bt* 基因 表达 稳定性

自 Vaeck 等^[1]首次于 1987 年获得抗烟草天蛾的转 *Bt* 杀虫晶体蛋白基因烟草植株以来, 人们已成功地将各种经密码子优化的 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*, 苏云金芽孢杆菌) 基因导入各种植物^[2-4], 获得了 50 多种抗虫转 *Bt* 基因植物, 其中, 转 *Bt* 基因马铃薯、玉米、棉花等已经商品化生产^[5]。随着转基因植物的不断增加, 其安全性问题也越来越引起了人们的广泛重视。其中外源基因在转基因植物中的稳定性是安全性评价的一个方面。目前构建的转基因植物还不能控制外源基因插入的位置及拷贝数, 外源基因在转基因植物中的行为也不清楚, 所以外源基因在转基因植物中的遗传稳定性是一个值得关注的问题。关于外源基因遗传规律的报道较多, 总的来说, 外源基因的遗传规律有三种方式: 一是单基因位点的孟德尔遗传方式; 二是多基因位点的孟德尔遗传方式; 三是非孟德尔的遗传方式。外源基因在后代中的遗传多样性通常采用转基因植株与非转基因植株杂交或转基因植株自交, 同时结合表型传递、标记或报告基因的表达、及分子杂交等方法来分析外源基因在后代中的遗传。由于遗传转化方法的不同, 外源基因整合到受体细胞染色体上的作用机制也不同, 所表现出的遗传规律也大有差异。

如果抗虫转基因植物的后代发生了基因分离, 其种子就不能再用作抗虫植物来种植, 否则可能会

带来经济损失。这就要求一种转基因植物, 要明确其外源基因的遗传稳定性^[6-9]。外源基因的遗传和表达研究在水稻、玉米、小麦 (*Triticum aestivum* Linn)、大豆、豌豆等作物中已有报道。许多研究已表明, 转基因植物中的外源基因在自交群体中一般以单显性基因方式传递, 在与非转化亲本回交的后代中则表现 1:1 分离。外源抗虫基因 *cry1 Ab* 在转基因抗虫棉品系与常规棉杂交 F_2 代群体中以单位点显性基因方式遗传^[10]。Sachs 等报道, 利用不同来源的转基因抗虫棉 MON81 和 MON249 与常规抗虫棉杂交, 发现 *cry1Ab* 基因在 MON81 和常规棉杂交 F_2 和 F_{2-4} 中以孟德尔单位点显性基因方式遗传, 而在 MON249 与常规棉杂交 F_2 和 F_{2-4} 中则并非如此^[11]。

本研究利用转基因欧洲黑杨与非转基因杨树进行杂交, 研究转基因当代亲本和杂交后代中外源基因的遗传方式, 以期今后开展转基因杨树的生态风险性评价、合理持续利用转基因欧洲黑杨及害虫的综合防治等方面提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1994 年在新疆玛纳斯平原林场建立欧洲黑杨转基因实验林, 面积约 1hm², 株行距 3m × 4m。共 17 个系号, 其中包括 14 个转 *Bt* 基因欧洲黑杨系号、2 个未转化的欧洲黑杨和健杨 (*P. euramericana* (Dode) Guineir cv. 'Robusta') 为对照^[12-13]。分布在 6 个区组中, 每个区组的系号重复 6 次, 单株小区 (李 等, 1996; 陈颖等, 1996; 田颖川等, 1993)。

收稿日期: 2003-09-22 修回日期: 2003-11-19

^{*} 国家“973”基金资助项目 (G1999016005)

^{**} 通讯作者, 电子信箱: Shouong.zhang@forestry.ac.cn

1.2 DNA 的提取

在转基因试验林中采取林冠层每个系号隔一株抽取一株,共抽样 6 株,每株分别抽取东、南、西、北不同部位的中下部枝条各一枝。以 8~ 10 叶片片,迅速装入保温箱。DNA 的提取按照 CTAB 法。

1.3 PCR 分析

经过多次对模板、引物、MgCl₂、dNTP 的用量和退火温度的实验,建立了总反应体积为 25μl 的如下 PCR 反应体系。

DNA 首先在 94℃ 下预变性 3min,经过 3 步(94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min)30 轮循环后,在 72℃ 保温 10min。总反应体积 25μl,含 TaqDNA 聚合酶 0.2μl,4 种 dNTP 各 2μl,PCR 缓冲液(10m mol/L tris·HCl, pH= 8.3, 50mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100 和 1.5mmol/L MgCl₂) 上下游引物浓度 2μl。根据 Bt 的序列设计,所用的上游和下游引物序列分别为 5' TTCCTTGCAG-GAAATCCCACC3' 和 5' GCCAGAATTG-AACACATGAGCGC3'。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

2 结果分析

2.1 转基因欧洲黑杨外源基因稳定性的 PCR 检测

从新疆玛纳斯平原林场转基因试验林中采集 14 个转基因欧洲黑杨无性系叶片,测定外源 Bt 基因的存在情况。以 Bt 毒蛋白基因的一对特异引物进行扩增,从 14 个无性系中均可以得到一条均一

的条带,片断大小约 950bp。以未转化欧洲黑杨总 DNA 为模板没有扩增条带。

经 PCR 分子生物学试验,试验结果表明,转基因欧洲黑杨在大田种植 7 年后, Bt 基因仍然在转基因植株中存在,未发生丢失现象(图 1)。

2.2 转基因欧洲黑杨后代遗传分析

以转基因植株 153 为母本,非转基因植株为父本,进行人工控制授粉杂交,获得转基因杨树 F1 代,通过对 F1 代共 120 个个体进行 PCR 分子生物学试验检测,试验结果发现阳性植株 67 株,阴性植株 53 株。经卡方检验分析,杂交后代分离比例为 1 : 1,说明转基因 Bt 基因为一显性基因,遵从孟德尔遗传规律;转基因呈单位点显性遗传,同时也证明转基因在 Bt 杨树中是单拷贝插入的(图 2)。

3 结论和讨论

经 PCR 分子生物学试验结果表明,转基因欧洲黑杨在大田种植 7 年后, Bt 基因仍然在转基因植株当代(T₀) 中稳定存在。Gilles Pilate 对转标记基因(*UdA*) 杨树的稳定性进行了研究。7 年的试验结果表明,尽管不同转基因品系外源基因表达水平差异较大,但都能稳定表达。同时组织化学分析揭示出外源基因存在于木材的不同年轮和根部。

Bt 基因为一显性基因,在转基因杂交后代中遵从孟德尔遗传规律。这表明转基因在 F1 代群体中以单位点显性方式遗传,也从另一个侧面反映 T-DNA 是单拷贝插入杨树基因组的。Gilles Pilate 对

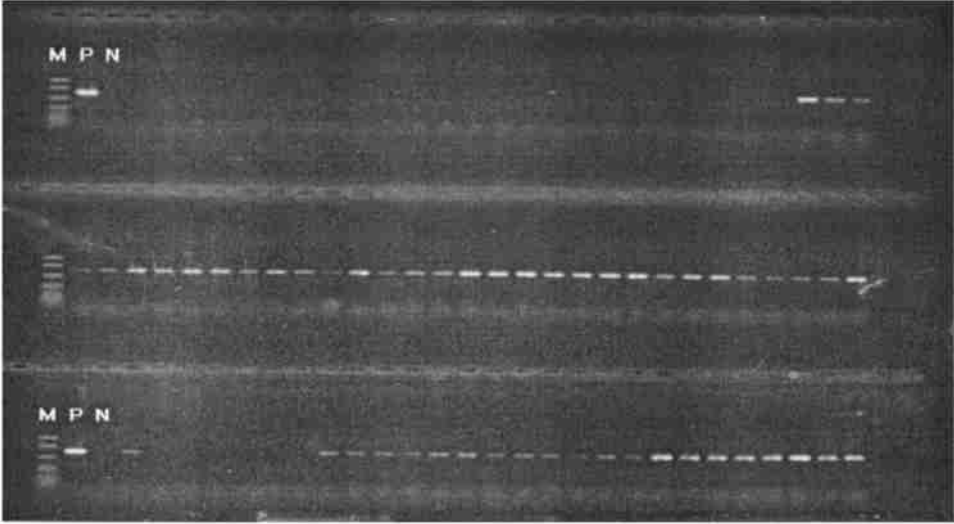


图 1 转基因欧洲黑杨中 Bt 基因的 PCR 检测
Fig.1 Bt gene of transgenic *Populus nigra* characterized by PCR

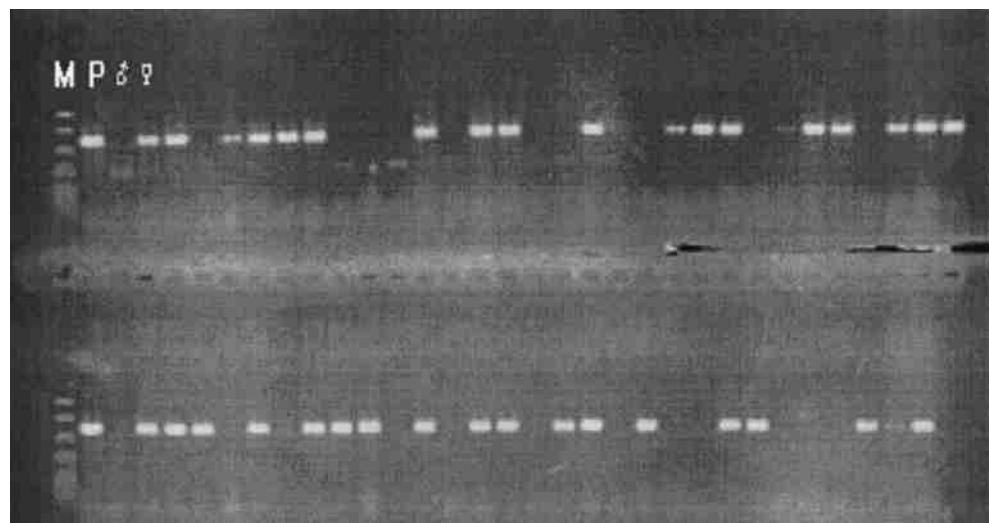


图 2 转基因欧洲黑杨 153 与非转基因植株杂交后代 PCR 分析
Fig. 2 Expression *bt* gene in the progenies of *Bt* transgenic poplar 153
crossed to conventional poplar

M: 标准分子量; P: 阳性质粒; ♀: 母本(153); ♂: 父本(CK); 未标数字的为杂交后代

转基因子代的研究结论和我们的一致, 在转基因子代中 *UdA* 基因的分离比例为 1/2: 1/2, 同时不同子代的 *GUS* 活性差别较大。万士梅等对转基因燕麦 (*Avena sativa* L.) 后代中外源基因 (*bar*) 的遗传与表达研究表明, 在所有检测的 R₂ (第 2 代) 群体中, *bar* 基因的分离符合孟德尔分离规律^[14]。施荣华等以转基因油菜后代 (R₁ 和 R₂ 代) 株系为材料, 系统地研究了苏云金杆菌杀虫蛋白基因 *CryA* 和选择标记基因 *npt II* 导入油菜后的遗传规律。结果表明 R₁ 代卡那霉素抗性为 3: 1 分离方式, 在 R₂ 代卡那霉素抗性植株中, 有 1/3 为 *npt II* 基因纯合型 (T: T), 另 2/3 为杂合型 (T: O), 其遗传方式符合孟德尔单因子显性遗传^[15]。现在我们正用今年得到的更多杂交组合后代作进一步的实验。

基因改造过程可能导致了其它生理过程的改变。基因改造和组培过程可能在一定程度上影响了原有基因的表达, 改变了转基因植物的某些生理特性, 尤其是次生物质代谢, 进而影响转基因植物抗逆、抗病等性状。这些生理改变可能会影响该转基因植物与其它动植物或微生物的关系, 进而影响原来生态环境的生态系统结构。农科院植保所最近发表的结果表明, 从三叶期到花铃期, 转 *Bt* 基因抗虫棉的缩合单宁水平比同品种常规棉明显降低。转基因植株因外源基因的导入引起育性下降的现象比较普遍, 杨洪全等报道了 *Rch001* 启动子引导

的 *iaal* 基因导入烟草后花器和果实发育异常现象; 施荣华等在对转基因油菜的研究中也发现类似情况, 主要表现为株行矮壮、叶片皱缩、花粉败育、整株结实率下降^[15]。我们的实验发现转基因雌株在杂交时普遍存在落花、早期落果的现象, 可能就是基因改造影响了转基因植物的次生物质代谢, 其分子机制尚有待研究, 可能与外源基因插入成花基因的位点或合成激素的基因位点有关, 或者因为非等位基因间的互补、修饰、共抑制等作用, 可能导致基因表达的失调, 因此外源基因在转基因植物中的分布、行为和可能的功能是安全性评价的一个非常重要的方面。

外源基因的遗传分离受转化方法、外界环境和植物自身生物学特性等诸多因素的影响。一般来说, 农杆菌介导的遗传转化后代多呈简单的孟德尔遗传, 而一些直接转化法, 如基因枪法的后代分离相对复杂一些。这是因为, *Ti* 质粒在受体染色体上一般呈特异的交换组合, 整合的位置较固定拷贝数较少。基因枪法一般为随机整合, 整合方式和整合位置以及整合的拷贝数往往不确定, 所以, 后代遗传方式较复杂。

外界环境条件的改变可以使外源 DNA 甲基化程度发生变化, 并引起外源基因表达的强烈变化 (Broer, 1996)。Meyer 等^[16] 发现, 将 A₁ 基因转化矮牵牛植株移栽至大田后, 由于光照加强, 温度升高,

使转基因植株的花色变化程度比培育在温室中更为显著,转基因失活的植株数目更多。Lindquist^[17]通过对转基因植株进行光、热、厌氧和伤害等逆境处理分析发现,高温能诱导热休克蛋白的表达,同时降低其它基因的RNA表达水平。许多研究表明,光照加强会增加基因沉默产生的机率并影响基因沉默产生的时间(Wassenegger等,1994; Meyer等,1992; Elkind等,1990; Van der krol等,1990; Borne等,1994)。

由发育调控的外源基因表达主要表现为两种方式:发育前期表达正常,后期逐渐下降,一旦产生沉默,会在整个生长期中保持下去;发育后期成熟植株,下部叶子高表达,而上部叶子表达却受到抑制。Flavell^[18]和Meyer^[16]在研究转CHS和A₁基因的矮牵牛发现,有些转基因植株的同一植株上,一些枝开紫花,一些枝开白花,已知紫花和白花与外源、内源基因的表达有关,这种在植株或花器官的发育过程中所产生的后修饰(epigenetic changes),表明基因沉默现象是可逆的,并且是受发育调控的。由35S强启动子所驱动的转基因沉默现象在过去已有许多报道。

参考文献

- [1] Vaeck M, Reynaerts A, Hoffe H, et al. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 1987, 328: 33~ 37
- [2] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, et al. Modification of coding sequence enhances plants expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3324~ 3328
- [3] Estruch J J, Carozzi N C, Desai N, et al. transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, 1997, 15

- (2): 137~ 141
- [4] Pefereon M. Progress and prospects for field use of Bt. *Genes in crops. Trends in Biotechnology*, 1997, 15(5): 173~ 177
- [5] 王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. Bt 杀虫蛋白基因与 Bt 转基因抗虫植物研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(1): 392~ 399
- [6] 王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. Bt 水稻杂交育种中转基因的遗传分析. *遗传*, 2000, 22(5): 309~ 312
- [7] 温孚江, J Peng R M, Lister T K. *gusA* 和 *neo* 基因在转基因水稻后代的遗传分析. *农业生物技术学报*, 1994, 2(1): 37~ 43
- [8] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. “克螟稻”后代 *cry1Ab* 基因表达特性及其对二化螟抗性的研究. *中国农业科学*, 2001, 34(5): 496~ 501
- [9] 王忠华, 吴刚, 崔海瑞. Bt 水稻中 *cry1Ab* 基因的遗传分析. *遗传学报*, 2001, 28(9): 846~ 851
- [10] 李燕娥, 焦改丽, 李淑君, 等. 转基因棉花纯合系的获得和遗传分析研究. *中国农业科学*, 1998, 31(5): 44~ 47
- [11] Sachs E S, Benedict J H, Stelly D M, et al. Expression and segregation of genes encoding Cry IA insecticidal proteins in cotton. *Crop Science*, 1998, 38(1): 1~ 11
- [12] 卢梦柱, 韩一凡, 杜生明. 林木基因工程风险评估和安全管理现状. *林业科学研究*, 1999, 12(3): 325~ 331
- [13] 胡建军, 刘庆一, 王克胜, 等. 欧洲黑杨转 Bt 毒蛋白基因植株大田抗虫性测定. *林业科学研究*, 1999, 12(2): 202~ 205
- [14] 万士梅 蒯本科. 外源基因(*bar*) 在转基因燕麦(*Avenasativa* L.) 后代中的遗传与表达. *复旦学报*, 1998, 37(4): 450~ 454
- [15] 施荣华, 李学宝. 外源基因在转基因油菜后代中的表达和遗传学分析. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2000, 34(2): 208~ 212
- [16] Meyer P. Variation of Transgenes Expression in Plants. *Euphytica*, 1995, 85: 359~ 366
- [17] Lindquist S. The environment stimuli influencing gene expression that have been investigated with transgenic plants include light, heat, anaerobic stress and wounding. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55, 1151
- [18] Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of novel sequence duplications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3490~ 3496

Studies on Safety Assessment of Transgenic *Bt* Poplar

WANG Juirhui¹ ZHANG Jiarr guo¹ HU Jiarr jun¹ ZHANG Zhen² ZHANG Shour gong

(1 Research Institute of forestry Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

(2 Institute of Forest Ecology Environment and protection Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091 China)

Abstract The purpose is to detect the stability of foreign gene in *Bt* poplar, the transmission of the transgene to the tree progenies using a protocol on detection Bt gene in tree sample by means of PCR technique. The results show that the gene was stable after seven years in the plantation. Flowers were collected from a male transgenic tree and pollinated in controlled conditions. Progeny seeds were germinated and grown *in vitro*. Analyses revealed that segregation appears to follow Mendel's rule as 67 out of 120 individual tested harbor the transgene with the expected 1:1 segregation.

Key words Transgenic poplar Bt transgene Expression Stability