

转 *cry2Ah-vp* 基因玉米的抗虫性鉴定

李梦桃^{1,2} 李圣彦² 汪海² 张杰³ 苍晶^{1*} 郎志宏^{2*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;
3. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为获得新型抗虫转基因玉米, 将通过群体筛选获得的具有抗虫性的转 *cry2Ah-vp* 基因玉米 VP1-5 采用 PCR、Southern blot、实时荧光定量 PCR (qPCR)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 等方法进行阳性植株鉴定、拷贝数分析、转录水平和翻译水平分析, 同时通过室内和田间生物活性测定鉴定转基因玉米 VP1-5 对东方黏虫 *Mythimna separata* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 的抗性。结果表明, 在转基因玉米 VP1-5 中 *cry2Ah-vp* 基因已整合到玉米基因组, 以单拷贝的形式插入; *cry2Ah-vp* 基因在转基因玉米 VP1-5 不同部位组织中均可以正常转录, 在灌浆期叶片中的 mRNA 表达量最高, 相对表达量为 32.67, 在灌浆期穗轴中的 mRNA 表达量最低, 相对表达量为 3.74; Cry2Ah-vp 蛋白在转基因玉米 VP1-5 的 6 叶期各组织中表达量均较高, 其中在叶片中的表达量达到 2 155.18 ng/g FW, 在抽雄期花丝中的表达量最高, 达到 2 165.86 ng/g FW; 且转基因玉米 VP1-5 对东方黏虫有很高的杀虫活性, 接虫 3 d 后幼虫死亡率达到 100.00%; 对亚洲玉米螟幼虫也有明显的生长抑制作用。表明转基因玉米 VP1-5 可作为玉米抗虫育种和害虫防治的种质资源。

关键词: 害虫防治; 苏云金芽胞杆菌; *cry2Ah-vp* 基因; 转基因玉米; 东方黏虫; 亚洲玉米螟

Identification of insect resistance in the transgenic maize harboring *cry2Ah-vp* gene

LI Mengtao^{1,2} LI Shengyan² WANG Hai² ZHANG Jie³ CANG Jing^{1*} LANG Zhihong^{2*}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China;
2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
3. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insects Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To obtain the novel insect-resistant maize, the insect-resistant transgenic event VP1-5 harboring *cry2Ah-vp* gene was detected for the foreign gene insertion, copy number, transcriptional and translational expression of *cry2Ah-vp* gene by using PCR, Southern blot, real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the bioassay in the laboratory and field was conducted to identify the resistance of VP1-5 transgenic maize to *Mythimna separata* and *Ostrinia furnacalis*. The results showed that *cry2Ah-vp* gene was integrated into maize genome with a single copy in transgenic maize VP1-5. The *cry2Ah-vp* gene was correctly transcribed in different tissues showing the highest expression in leaf and the lowest expression in cob during grain-filling stage, and the relative mRNA level were 32.67 and 3.74, respectively. The Cry2Ah-vp protein was expressed relatively high in all tissues at six-leaf stage, especially in leaf where the expression was 2 155.18 ng/g FW. Overall, the highest expression of Cry2Ah-vp protein was 2 165.86 ng/g FW in silk at tassel stage. VP1-5 transgenic maize was demonstrated to have high insecticidal toxicity towards armyworm by the fact that

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08003-001)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: cangjing2003@163.com, langzhihong@caas.cn

收稿日期: 2019-03-06

the mortality of armyworm larvae reached 100.00% 3 d after inoculation; VP1-5 obviously inhibited the weight gain of the corn borer larvae. This study indicated that VP1-5 transgenic maize could be a good germplasm resource for insect resistance and pest control.

Key words: pest control; *Bacillus thuringiensis*; *cry2Ah-vp* gene; transgenic maize; *Mythimna separata*; *Ostrinia furnacalis*

玉米是重要的粮食作物,也是重要的饲料和工业原料,但由于虫害每年减产大约7%,严重时可达20%(张社梅和赵芝俊,2009)。1996年转基因抗虫作物开始商业化种植,这在一定程度上减少了杀虫剂的使用,提高了作物的产量和质量,给种植者带来了良好的收益(Estruch et al., 1997; Bates et al., 2005)。国际上关于转基因抗虫玉米的研究主要集中于孟山都公司、杜邦先锋公司、先正达公司等大型跨国生物技术公司,涉及的苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 杀虫蛋白基因主要包括 *cry1Ab*、*cry1F*、*vip3A*、*cry1A.105* 和 *cry2Ab2* 等(Schmidt et al., 2009; Storer et al., 2010; James, 2015)。国内转基因玉米的研究起步晚于国外,随着转基因研究体系的逐渐成熟,近年来研究进度逐渐加快,抗虫转基因玉米涉及的Bt杀虫蛋白基因主要有 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ab/cry2Aj* 和 *cry1Ah* 等(韩岚岚等, 2008; Yang et al., 2014)。东方黏虫 *Mythimna separata* 是一种常见的玉米害虫,属鳞翅目夜蛾科,在我国广泛分布,具有迁飞性、暴食性等特点,在幼虫时期暴食玉米叶片,严重发生时可在短期内吃光叶片,造成玉米减产甚至绝收(江幸福等, 2014)。现有的Bt杀虫蛋白基因对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 有良好的防治效果,但在东方黏虫防治上还需要寻求有效的抗虫基因(杨素娟等, 2016; 刘臣等, 2017; 王振营和王晓鸣, 2019)。

Bt杀虫蛋白基因 *cry2Ah* 是通过混合土壤样品池制备宏基因组,利用Bt杀虫蛋白基因特异性引物扩增获得的一个新型杀虫基因,Cry2Ah蛋白对亚洲玉米螟有体重抑制活性,对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 有生长抑制活性,同时对Cry1Ac抗性棉铃虫也有很好的生长抑制活性(Shu et al., 2013)。将Cry2Ah的第354位缬氨酸后面插入1个脯氨酸从而得到Cry2Ah-vp突变体,其在突变位置上与Cry2Ab具有相同的碳骨架,将 *cry2Ah* 和 *cry2Ah-vp* 这2个基因分别转入烟草植株后发现,与Cry2Ah相比Cry2Ah-vp对棉铃虫有更高的杀虫活性(Li et al., 2018)。因此, *cry2Ah-vp* 基因是培育新型抗虫玉米的优良候选基因。

本课题组前期根据植物基因的密码子偏好性和tRNA转运饥饿对 *cry2Ah-vp* 基因进行密码子优化,将优化后的 *cry2Ah-vp* 基因与草铵膦抗性基因 *bar* 构建到同一植物表达载体上,利用农杆菌介导法转入玉米中获得转 *cry2Ah-vp* 和 *bar* 基因的玉米(Li et al., 2018)。本试验拟对获得的转 *cry2Ah-vp* 和 *bar* 基因玉米进行PCR、Southern blot、实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等分子检测和生物活性测定,确保外源基因的有效插入和稳定表达,并评价其对东方黏虫和亚洲玉米螟的室内和田间抗性,以期为玉米抗虫育种和害虫防治提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: T₁代转 *cry2Ah-vp* 基因抗虫玉米材料VP1-5,该材料来源于pC2HB-vp载体的转化,该载体由ubiquitin启动子连接 *cry2Ah-vp* 基因以及CaMV35S启动子连接 *bar* 基因组成,通过农杆菌介导转化获得,该材料与质粒pC2HB-vp载体均保存于中国农业科学院生物技术研究所在郎志宏实验室;以实验室保存的玉米自交系郑58材料作为非转基因对照。

供试虫源: 东方黏虫、亚洲玉米螟虫卵购自北京美延农业科技有限公司。虫卵在28℃人工气候箱中进行孵化,孵出的1日龄幼虫作为供试虫源直接进行生物活性测定。

药剂及试剂: 200 g/L草铵膦(glufosinate ammonium)水剂,浙江永农生物科学有限公司。BAR快速检测试纸条,北京奥创金标生物公司;各种限制性内切酶、*Taq* DNA Polymerase,日本TaKaRa公司; 2×*Taq* Master Mix (Dye)、2×*Taq* Plus Master II Mix (Dye),南京诺唯赞生物科技有限公司; PCR DIG Probe Synthesis Kit、DIG High Prime DNA标记和杂交检测试剂盒II,德国Roche Applied Science公司; HybondTM-XL尼龙膜,美国GE公司; Cry2A定量检测ELISA试剂盒,美国Envirologix公司; RevertAid

反转录试剂盒,美国 Thermo Fisher 公司;RNA 提取试剂 Trizol、2×TransStart® Top Green qPCR Super Mix,北京全式金生物技术有限公司。

仪器:RXXZ500C 人工气候箱,中国宁波江南仪器厂;5415D 离心机,德国 Eppendorf 公司;Tgradient PCR 仪,德国 Biometra 公司;Biosystems® QuantStudio® 3 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Fisher 公司;JY300E 电泳仪、JY-SPFT 电泳槽,北京君意电泳设备有限公司;Gel Doc XR+凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;ELx-808 全自动酶标仪,美国 Bio-Tex 公司;LF-II 分子杂交炉,宁波新芝生物科技股份有限公司;AI600 超灵敏多功能成像仪,美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 转基因玉米草铵膦抗性筛选及 BAR 试纸条检测

田间种植转基因 T₁ 代玉米 VP1-5 (T₀ 代自交收获) 和非转基因对照玉米郑 58, 于畦长 20 m、行长 3 m 的小区进行种植, 株距 15 cm、行距 60 cm, 转基因玉米材料 VP1-5 重复种植 2 个小区, 非转基因对照材料郑 58 种植 1 个小区。由于在转化 *cry2Ah-vp* 基因的同时, 引入了草铵膦抗性基因 *bar* 基因, 它能编码草铵膦乙酰转移酶 (phosphinothricin *N*-acetyltransferase, PAT), PAT 能使草铵膦的自由氨基乙酰化, 从而使草铵膦对转基因植物无毒性作用, 植株能正常生长, 因此对大田种植的 T₁ 代转化玉米植株进行了 2‰ 草铵膦喷施筛选。为了方便快捷地筛选出阳性转基因植株, 首先对玉米转化植株进行草铵膦喷施, 依据草铵膦大田推荐用量 750 g/hm², 配制浓度为 2‰ 的草铵膦水溶液, 即在 5 L 水中加入 200 g/L 草铵膦原液 50 mL, 在玉米 4 叶期喷施 1 次, 7 d 后观察玉米生长情况, 统计活苗数。为确保存活植株为阳性植株及喷施浓度的有效性, 对喷施草铵膦后的存活植株再用 BAR 快速检测试纸条进行检测, BAR 试纸条能够快速对样本中 PAT 蛋白进行特异性检测, 从存活转化植株和非转基因对照植株上分别剪取 1 cm×1 cm 大小的玉米叶片, 放入装有 0.5 mL 蒸馏水的 1.5 mL EP 管中, 使用尖头玻璃棒进行研磨, 然后将 BAR 快速检测试纸条插入 EP 管中, 等待 2 min 后观察试纸条上的质控线和检测线, 上条带为质控线, 下条带为检测线, 当质控线和检测线均有紫色条带出现时, 表明该植株为阳性转基因植株, 只有质控线 1 个条带时则为阴性植株。

1.2.2 转基因玉米的 PCR 检测

为验证外源基因是否插入到转基因玉米材料 VP1-5 基因组中, 采用 CTAB 法从转 *cry2Ah-vp* 和

bar 基因玉米 VP1-5 及非转基因对照玉米郑 58 植株的叶片组织中提取基因组 DNA (Porebski et al., 1997), 以质粒 pC2HB-vp 为正对照, 以非转基因玉米郑 58 为负对照, 以 ddH₂O 为空白对照, 用 *bar* 基因和 *cry2Ah-vp* 基因的特异性引物分别进行 PCR 检测, 引物由北京中美泰和生物技术有限公司合成。检测 *bar* 基因的 20 μL 反应体系: DNA 模板 100 ng、0.2 μmol/L 引物 *bar* F1 (5'-TGACGCACAATCCCACTATCCT-3')/*bar* R1 (5'-CAGCGACCACGCTCTTGAAGC-3') 各 0.5 μL、2×*Taq* Master Mix (Dye) 10 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 30 次循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。*cry2Ah-vp* 基因的 PCR 检测体系与 *bar* 基因相同, 仅将引物替换为 *cry2ah-vp* F1 (5'-ACCTCATCTTCCCGTC-3')/*cry2ah-vp* R1 (5'-GGTGTGCTCTGCTCG-3')。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 次循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。所得 PCR 产物均通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用凝胶成像仪观察 PCR 扩增产物大小, 确定 *bar* 基因和 *cry2Ah-vp* 基因是否均转入玉米植株, 并选取有条带的阳性植株进行下一步验证。

1.2.3 转基因玉米的 Southern blot 分析

为确定外源基因插入的拷贝数, 提取 1.2.2 中经 PCR 检测到的转基因玉米 VP1-5 阳性植株基因组 DNA 和非转基因对照玉米郑 58 植株的基因组 DNA, 将 50 μg 转基因玉米基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*HI、*Eco*R I、*Sac* I 进行酶切, 非转基因对照玉米基因组 DNA 用限制性内切酶 *Hind* III 酶切, 酶切产物均在 0.7% 琼脂糖凝胶上于 30 V 过夜电泳, 电泳产物通过毛细管转移至带正电荷的尼龙膜上。以 *cry2Ah-vp* 基因的 862 bp 片段为探针进行 Southern blot 检测, 以含 *cry2Ah-vp* 基因片段为正对照, 以非转基因玉米郑 58 为负对照。50 μL 探针反应体系: DNA 模板 100 ng、0.2 μmol/L 正向引物 (5'-GAGTGGATGGAGTGGAAG-3') 和反向引物 (5'-C-GATGTTTGGGAAGGTCT-3') 各 0.5 μL、2×*Taq* Plus Master II Mix (Dye) 25 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 15 s, 56℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 次循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。探针 DNA 用 PCR DIG Probe Synthesis Kit 标记为 DIG-11-dUTP, 按照 DIG High Prime DNA 标记和杂交检测试剂盒 II 的说明书进行操作。用超灵敏多功能成像仪的自动化学发光成像分析系统进行

DNA 杂交信号图像分析。

1.2.4 转基因玉米的 qPCR 检测

为检测转基因玉米植株中 *cry2Ah-vp* 基因在转录水平的表达差异,利用 qPCR 方法进行测定分析。选取大田种植的抽穗期和灌浆期 T₁ 代转基因玉米 VP1-5 的雄穗、心叶、叶、苞叶、花丝、穗轴、籽粒、茎、根组织,分别取 100 mg 上述各部位组织用 Trizol 提取其总 RNA。利用 RevertAid 反转录试剂盒反转录合成 cDNA,以合成的 cDNA 为模板使用 Biosystems® QuantStudio® 3 实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 RT-PCR。以 *actin* 基因为参考基因,分别用引物 vp1-5-qF1 (5'-AGGGCGTACATGGTGAGC-3') 和 vp1-5-qR1 (5'-GGATGGGGGAGATGGTGA-3') 检测 *cry2Ah-vp* 基因的转录水平,用引物 *actin*-qF1 (5'-GGCATCATACATTTTACAACGAA-3') 和 *actin*-qR1 (5'-ATGGCGACATACATAGCAGGAGT-3') 检测 *actin* 基因的转录水平。20 μL 反应体系: 2×TransStart® Top Green qPCR Super Mix 10 μL、0.2 μmol/L 正反向引物各 0.4 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 补足 20 μL。反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火加延伸 34 s, 进行 40 个循环, 然后采用 2^{-ΔΔC_T} 法对 qPCR 数据进行相对定量分析。每处理 3 次生物学重复。

1.2.5 转基因玉米的 ELISA 分析

为明确转基因玉米的 Cry2Ah-vp 蛋白表达量,选取 T₁ 代转基因玉米 VP1-5 的 3 个株系,每个株系选 3 株植株,分别取 6 叶期、抽穗期和灌浆期的心叶、叶、茎、根、雄穗、花丝、苞叶、穗轴、籽粒组织,利用 ELISA 法测定转基因植株各组织中的 Cry2Ah-vp 蛋白表达量。分别取 100 mg 上述各组织研磨后,按照 Cry2A 定量检测 ELISA 试剂盒说明书提取 Cry2Ah-vp 蛋白,使用酶标仪在波长 450 nm 处测量 OD 值,重复读取 3 次,计算平均数,根据 Cry2A 蛋白标准品的 OD 值绘制标准曲线,计算 Cry2Ah-vp 蛋白的表达量。

1.2.6 转基因玉米的生物活性测定

为测定转基因玉米的抗虫性,参考王冬妍等(2004)和宋苗等(2016)方法在玉米生长到 6 叶期时进行室内和田间生物活性测定。东方黏虫和亚洲玉米螟幼虫的室内生物活性测定使用 24 孔培养皿,取 1 cm×1 cm 大小的 6 叶期玉米叶片分别放在 24 个孔内,每个孔内放入 1 头 1 日龄初孵东方黏虫幼虫或 1 日龄初孵亚洲玉米螟幼虫,每天记录活虫和死虫的数量,以虫体瘫软发黑、不能主动进食及移动的判定为死亡,连续记录 7 d,并计算死亡率,死亡率=死亡幼

虫数/总幼虫数×100%。以非转基因对照玉米郑 58 的 6 叶期叶片处理作为对照,每个处理 3 次重复。田间生物活性测定试验在玉米生长至 6 叶期时进行,分别将 1 日龄初孵东方黏虫幼虫和初孵亚洲玉米螟幼虫用毛笔接种到每个小区的所有转 *cry2Ah-vp* 和 *bar* 基因玉米 VP1-5 和非转基因对照玉米郑 58 植株上,转基因玉米重复接种 2 个小区,非转基因对照玉米接种 1 个小区,接虫 2 周后进行调查统计,观察植株受害情况并拍照记录,进行抗性评价。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,采用 *t* 测验法进行差异显著性检验。

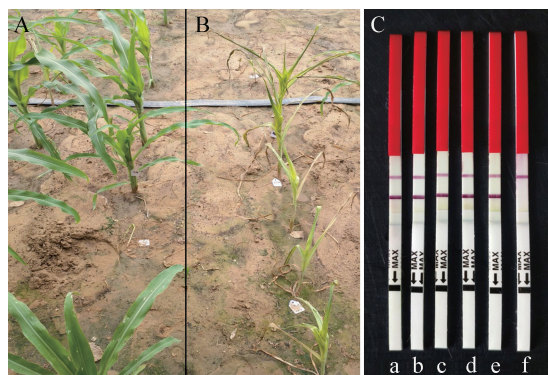
2 结果与分析

2.1 转基因植株草铵膦筛选与 BAR 试纸条检测结果

转入草铵膦抗性基因 *bar* 和抗虫基因 *cry2Ah-vp* 玉米植株在喷施草铵膦 7 d 后,可以观察到部分植株叶色深绿、植株健壮、生长发育正常,未表现出任何除草剂危害症状,初步鉴定为成功转入 *bar* 基因的阳性植株(图 1-A),而部分植株出现发黄、萎蔫、甚至死亡的情况,说明该部分植株为阴性植株,*bar* 基因未成功转入(图 1-B)。为了进一步确定草铵膦喷施后存活植株为转 *bar* 基因植株,利用 BAR 试纸条进行检测,发现所有存活植株的检测试纸条上都可以看到 2 条带,分别为质控线和检测线(图 1-C-a~e),证明喷施草铵膦后的存活植株为转 *cry2Ah-vp* 基因和 *bar* 基因的植株并表达了 *bar* 基因;在非转基因对照郑 58 植株的检测试纸条上只有 1 条质控线,无检测线(图 1-C-f)。证明通过草铵膦喷施筛选获得的阳性植株都是成功转入 *bar* 基因和 *cry2Ah-vp* 基因的植株,利用草铵膦筛选去除大量未成功转入 *bar* 基因的植株是一种方便快捷的检测方法。对筛选获得的转 *cry2Ah-vp* 和 *bar* 基因植株进行后续的分子检测和抗虫性鉴定。

2.2 转基因玉米 VP1-5 的 PCR 鉴定

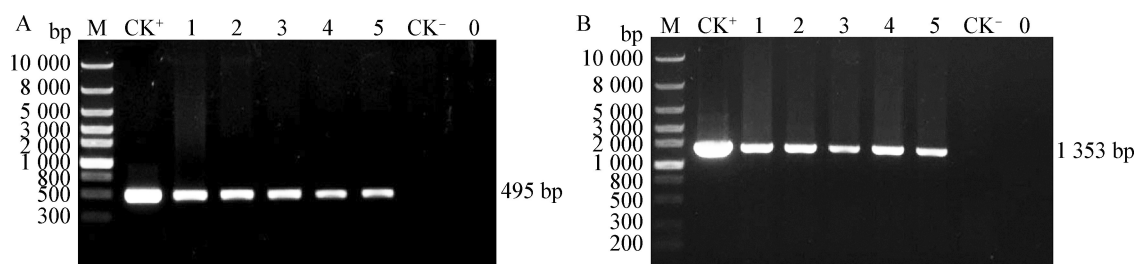
利用 *bar* 引物进行 PCR 扩增时,转基因玉米 VP1-5 植株均扩增出大小为 495 bp 的目的条带,与正对照一致,负对照郑 58 植株无扩增条带,表明检测的 5 株植株都是转 *bar* 基因阳性植株(图 2-A);同样以该基因组 DNA 为模板,利用 *cry2Ah-vp* 引物进行扩增时可以检测到大小为 1 353 bp 的目的条带,与正对照相同,而负对照郑 58 无扩增条带,表明 5 株植株均已成功转入 *cry2Ah-vp* 基因(图 2-B)。证明转基因玉米 VP1-5 阳性植株中同时成功转入 *bar* 和 *cry2Ah-vp* 基因。



A: 阳性植株; B: 阴性植株; C: BAR试纸条检测结果, 其中a~e为阳性植株, f为对照郑58。A: Positive plants; B: negative plants; C: BAR strip test result, a~e are positive plants, and f is the control Zheng 58.

图1 草铵膦喷施7 d后转 *cry2Ah-vp* 和 *bar* 基因玉米植株的生长状况及 BAR 试纸条检测结果

Fig. 1 Growth status of transgenic maize with *cry2Ah-vp* and *bar* genes seven days after glufosinate spraying and BAR strip test results



M: DNA marker; CK⁺: 以质粒pC2HB-vp为模板的正对照; 1~5: VP1-5转基因玉米植株; CK⁻: 以郑58基因组DNA为模板的负对照; 0: 以ddH₂O为模板的空白对照。M: DNA marker; CK⁺: positive control of pC2HB-vp plasmid; 1~5: VP1-5 transgenic maize; CK⁻: negative control Zheng 58 of non-transgenic maize; 0: blank control with ddH₂O.

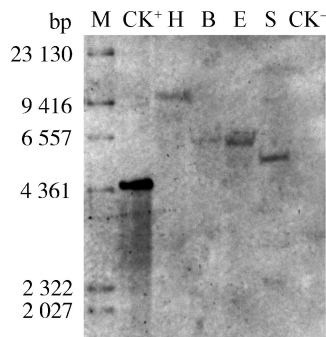
图2 部分转基因玉米VP1-5阳性植株中 *bar* 基因(A)和 *cry2Ah-vp* 基因(B)的PCR检测结果

Fig. 2 PCR detection of (A) *bar* gene and (B) *cry2Ah-vp* gene in positive plants of some VP1-5 transgenic maizes

2.3 转基因玉米VP1-5的Southern blot分析

Southern blot分析结果显示,转基因玉米VP1-5基因组DNA通过4种限制性内切酶酶切后,在每个泳道上都有1条杂交条带,表明在转基因玉米VP1-5

植株中, *cry2Ah-vp* 基因以单拷贝的形式整合到玉米基因组中,非转基因对照郑58植株中未检测到杂交信号(图3)。Southern blot结果证实外源 *cry2Ah-vp* 基因被成功转化并整合到玉米基因组中。



M: DNA marker; CK⁺: 含 *cry2Ah-vp* 基因片段的正对照; H、B、E、S: 分别以 *Hind* III、*Bam*H I、*Eco*R I、*Sac* I酶切的VP1-5玉米基因组DNA; CK⁻: *Hind* III酶切的郑58玉米基因组DNA为负对照。M: DNA marker; CK⁺: positive control of *cry2Ah-vp* gene fragment; H, B, E, S: VP1-5 genomic DNA digested with *Hind* III, *Bam*H I, *Eco*R I, and *Sac* I, respectively; CK⁻: negative control of Zheng 58 genomic DNA digested with *Hind* III.

图3 T₁代转基因玉米VP1-5的Southern blot检测

Fig. 3 Southern blot analysis of T₁ generation of VP1-5 transgenic maize

2.4 *cry2Ah-vp* 在转基因玉米 VP1-5 中的转录分析

提取抽雄期和灌浆期转基因玉米 VP1-5 不同部位组织的总 RNA, 反转录后利用 qPCR 检测 *cry2Ah-vp* 基因是否可以形成稳定的 mRNA 正常转录。结果表明, *cry2Ah-vp* 基因在转基因玉米植株各部位组织中均可以正常转录, 但在不同时期不同部位组织中的转录水平存在差异。在抽雄期以叶片中的 mRNA

转录水平最高, 相对表达量为 28.67; 在灌浆期以叶片和花丝中的 mRNA 转录水平最高, 相对表达量分别为 32.67 和 28.46, 以穗轴中的 mRNA 表达量最低, 相对表达量为 3.74, 在灌浆期叶片中的 mRNA 相对表达量是穗轴中 mRNA 相对表达量的 8.74 倍 (图 4)。表明 *cry2Ah-vp* 基因在玉米 VP1-5 植株中可以形成稳定的 mRNA, 在转录水平上可以正常转录。

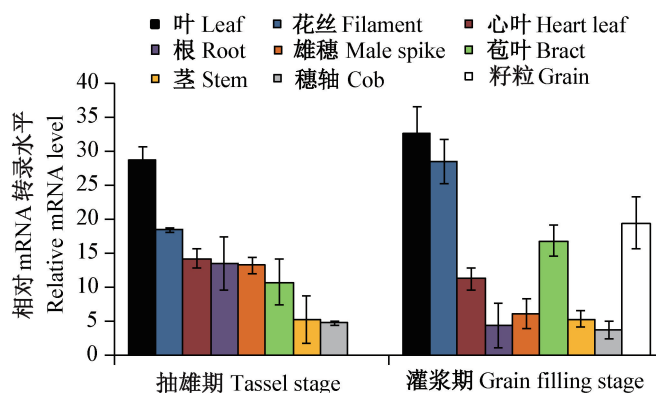


图 4 转基因玉米 VP1-5 不同时期和各部位组织中 *cry2Ah-vp* 的转录水平

Fig. 4 Transcriptional expression of *cry2Ah-vp* gene in different tissues of VP1-5 transgenic maize at two developmental stages
图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

2.5 转基因玉米 VP1-5 中 Cry2Ah-vp 蛋白的定量分析

转基因玉米 VP1-5 不同部位组织的 ELISA 检测结果显示, Cry2Ah-vp 蛋白在 6 叶期、抽穗期和灌浆期的不同部位组织中均有表达。玉米处于 6 叶期时, Cry2Ah-vp 蛋白在叶、根、茎中的表达量较高, 其中在叶片中的表达量最高, 为 2 155.18 ng/g FW; 玉米处于抽雄期时, Cry2Ah-vp 蛋白在各部位组织中的表

达量高于在灌浆期各部位组织中的表达量, 其中在花丝中的表达量最高, 为 2 165.86 ng/g FW; 玉米处于灌浆期时, Cry2Ah-vp 蛋白在苞叶中的表达量最高, 为 1 340.24 ng/g FW (图 5)。表明不同生育期转基因玉米 VP1-5 的各部位组织中均有 Cry2Ah-vp 蛋白表达, 可以保证玉米在整个生长期内免受靶标害虫为害, 降低玉米产量损失。

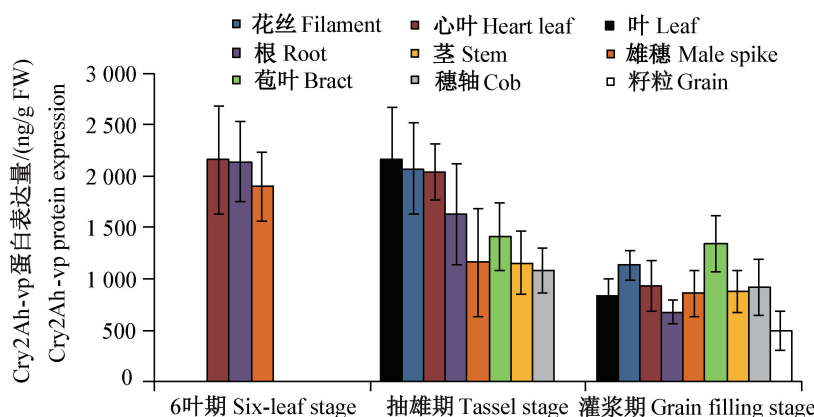


图 5 不同发育期转基因玉米 VP1-5 各部位组织中 Cry2Ah-vp 蛋白的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of Cry2Ah-vp protein in different tissues of VP1-5 transgenic maize at three developmental stages
图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.

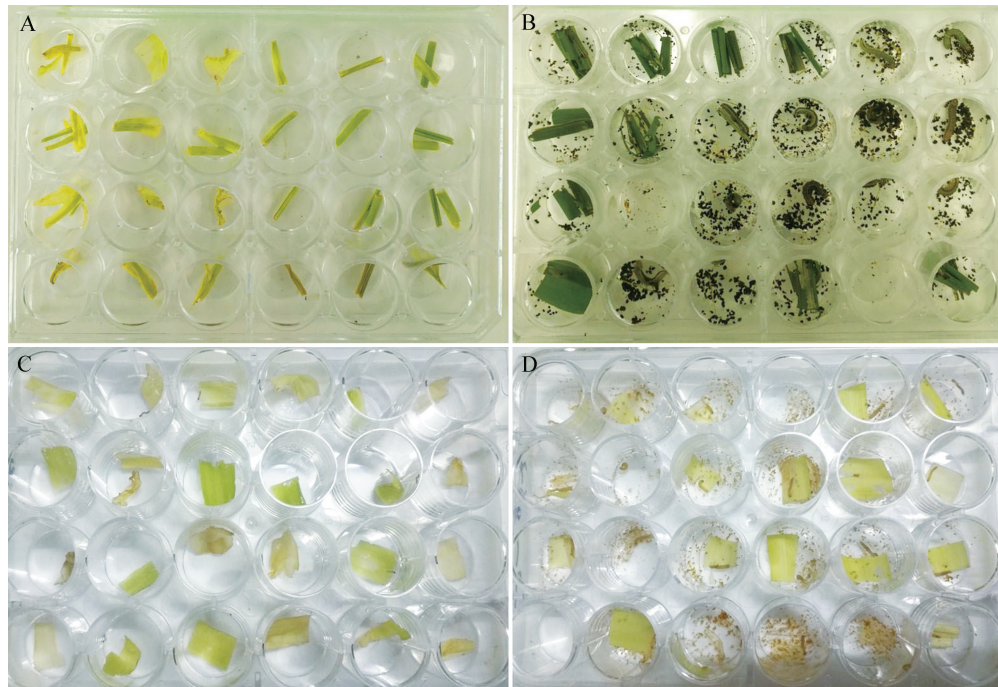
2.6 转基因玉米 VP1-5 对 2 种害虫的生物活性

室内生物活性检测结果显示, 转基因玉米植株 VP1-5 在接入 1 日龄初孵东方黏虫幼虫 3 d 后即表现出极强的杀虫抗性, 幼虫死亡率达 100.00%, 玉米叶

片损伤轻微, 只有少数针刺状虫孔 (图 6-A), 而用非转基因对照玉米郑 58 叶片喂食的幼虫虫体大, 无受害状, 玉米叶片几乎全部被吞食 (图 6-B), 幼虫死亡率仅为 8.33%, 极显著低于转基因玉米处理组 ($P <$

0.01);转基因玉米植株VP1-5叶片在接入1日龄初孵亚洲玉米螟幼虫3 d后,部分幼虫死亡,死亡率为25.00%,存活幼虫的生长受到明显抑制,玉米叶片略有孔洞(图6-C),而用非转基因对照玉米郑58叶片喂食的幼虫生长良好,虫体无受害状,玉米叶片大部分被吞食(图6-D),幼虫死亡率为16.67%,极显著

低于转基因玉米处理组($P<0.01$)。进一步观察喂食VP1-5玉米叶片存活的亚洲玉米螟幼虫,发现虫体较小,其体长约为对照组虫体长的1/3,活力下降,已不能进一步完成生长发育。表明转基因玉米VP1-5对东方黏虫有很强的杀虫作用,对亚洲玉米螟有明显的生长抑制作用。



A~B: 东方黏虫幼虫分别喂食转基因玉米VP1-5和非转基因对照玉米郑58叶片3 d后; C~D: 亚洲玉米螟幼虫喂食转基因玉米VP1-5和非转基因对照玉米郑58叶片3 d后。A~B: Armyworm larvae are fed with the transgenic corn VP1-5 and non-transgenic corn Zheng 58 leaves for 3 d; C~D: Asia corn borer larvae are fed with the transgenic corn VP1-5 and non-transgenic corn Zheng 58 leaves for 3 d.

图6 转基因玉米VP1-5对东方黏虫和亚洲玉米螟的室内生物活性检测结果

Fig. 6 Laboratory bioassay of armyworm and Asia corn borer with VP1-5 transgenic maize

在田间接虫2周后观察转基因玉米VP1-5和非转基因对照玉米郑58的植株生长情况,发现接东方黏虫后,VP1-5植株叶片表面光滑无孔洞(图7-A),郑58植株叶片有缺刻及虫孔(图7-B);接亚洲玉米

螟后,VP1-5植株叶片表面几乎无孔洞(图7-C),郑58植株叶片有较多虫孔(图7-D)。表明转基因玉米VP1-5对东方黏虫和亚洲玉米螟都有防治效果,尤其对东方黏虫有很好的杀虫效果。



A~B: 接东方黏虫的转基因玉米VP1-5和非转基因对照玉米郑58叶片; C~D: 接亚洲玉米螟的转基因玉米VP1-5和非转基因对照玉米郑58叶片。A~B: The transgenic corn VP1-5 and non-transgenic corn Zheng 58 leaves treated with armyworm; C~D: the transgenic corn VP1-5 and non-transgenic corn Zheng 58 leaves treated with Asia corn borer.

图7 转基因玉米VP1-5对东方黏虫和亚洲玉米螟的田间生物活性检测结果

Fig. 7 Field bioassay of transgenic maize VP1-5 to armyworm and Asia corn borer

3 讨论

自首例转 Bt 杀虫蛋白基因抗虫作物商业化以来,全球种植面积达到 20 亿 hm^2 ,国内转 *cry1Ac* 基因的 Bt 棉花已经商业化种植了 20 年,转基因 Bt 棉花的使用率接近 96%(James, 2015)。转基因抗虫作物的广泛应用,在取得重要的经济效益和环境效益的同时也面临着新的问题:一是主要害虫防治后次要害虫上升为主要害虫;二是害虫的抗性治理,害虫的抗性进化已成为 Bt 作物的主要威胁(Gould, 1998; Soberón et al., 2007; Meihls et al., 2008)。所以,在新型抗虫转基因作物创制过程中, Bt 杀虫蛋白基因的选择要基于扩大其杀虫谱和抗性治理 2 个方面考量。*cry2Ah1* 基因是国内科学家克隆的第 3 等级新基因,与目前抗虫转基因作物普遍采用的 *cry1Ab* 基因(登录号 AAA22561.1)和 *cry1Ac* 基因(登录号 AAA22331.1)的序列相似性只有 18.50% 和 19.62%, *cry2Ah* 基因对亚洲玉米螟、棉铃虫和 *Cry1Ac* 抗性棉铃虫均具有很好的生长抑制活性(Shu et al., 2013),转 *cry2Ah-vp* 基因烟草对 *Cry1Ac* 抗性棉铃虫有杀虫活性(Li et al., 2018),因此, *cry2Ah-vp* 基因是创制新型抗虫转基因作物、扩大杀虫谱和延缓害虫抗性产生的候选基因。本研究将 *cry2Ah-vp* 基因导入玉米,一方面在大田玉米中评价 *cry2Ah-vp* 基因的功能,利于其在相关作物中的应用,另一方面获得的抗虫转基因玉米材料可用于抗虫育种,可为抗虫玉米产业化推广做好技术储备。

本研究在玉米中转入 *cry2Ah-vp* 基因的同时引入了耐草铵膦基因 *bar* 基因,一方面可以作为转化的筛选标记基因,另一方面可以赋予转基因作物除草剂耐受性,易于田间管理。对转 *cry2Ah-vp* 基因植株进行田间群体筛选时,首先通过草铵膦筛选获得存活植株,再利用 BAR 试纸条对存活植株进行检测,结果显示草铵膦筛选的存活植株均为试纸条检测呈阳性的植株,表明这 2 种检测方法均有效,且使转基因植株的筛选工作更方便快捷、省时省力。本研究对转基因玉米植株的 PCR 检测结果也证明了 *cry2Ah-vp* 基因和 *bar* 基因连锁存在,并正确表达,此结果与张欣(2017)研究结果一致,表明复合性状不会影响抗虫基因的表达活力和转基因作物的遗传稳定性。

本研究分子检测结果表明, *cry2Ah-vp* 基因已成功插入玉米基因组,并以单拷贝形式插入,保证了 *cry2Ah-vp* 基因表达的稳定性,外源基因低拷贝数是

保证转基因事件转入基因稳定的一个重要条件,避免多拷贝插入产生“共抑制(co-suppression)”(Matzke et al., 1996; Lowe et al., 2009),进一步分析 *cry2Ah-vp* 基因在转录水平的表达情况,可以看出 *cry2Ah-vp* 基因在转基因玉米 VP1-5 中能正常转录,在抽雄期和灌浆期的叶片中表达量最高,本研究选用的是玉米组成型启动子 *ubiquitin*, *cry2Ah-vp* 基因在检测的 2 个发育时期(抽雄期和灌浆期)的各部位组织中都有转录,但是表达量存在差异,说明外源基因的表达受不同部位组织调节,这与梁海生等(2018)研究结果一致。ELISA 检测结果显示, *Cry2Ah-vp* 蛋白在玉米 6 叶期的叶片中表达量最高,对叶期东方黏虫发生有很好的防治作用,高表达的 *Cry2Ah-vp* 蛋白可以有效消灭 1 代东方黏虫,减少其后期对玉米的为害;在灌浆期苞叶中 *Cry2Ah-vp* 蛋白表达量最高,可以减少害虫为害玉米果穗。随着玉米生育期延长, *Cry2Ah* 蛋白的表达量趋于降低,该结果与孙红炜等(2018)在转 *Gry1Ab/cry2Aj* 和 *G10evo-epsps* 基因玉米中 Bt 蛋白的表达趋势相同。

生物测定结果表明,携带 *cry2Ah-vp* 的转基因玉米对东方黏虫幼虫的毒性较高,其幼虫死亡率极显著高于对照,与王振营等(2005)研究转 *cry1Ab* 基因的 MON810 和 Bt11 玉米相比,杀虫效果更明显。常雪等(2007; 2016)研究转不同 Bt 杀虫蛋白基因玉米的杀虫效果,证明转 *cry1Ab* 基因玉米对东方黏虫有抗虫效果,但接虫 3 d 后幼虫死亡率低于本试验中喂食转基因玉米 VP1-5 的东方黏虫幼虫死亡率。蒋善军等(2010)研究了 *Cry1Ac* 蛋白对黏虫初孵幼虫的影响,结果表明 *Cry1Ac* 蛋白对黏虫有明显的体重抑制作用,但取食含 *Cry1Ac* 蛋白饲料的幼虫并未完全死亡,对其生长发育有严重影响, *Cry1Ac* 蛋白显著影响黏虫的化蛹和飞行能力。与其它 Bt 杀虫蛋白基因相比, *cry2Ah-vp* 对黏虫具有较高的毒性,如刘臣等(2017)评价了 *Cry2Ab4*、*Cry2Ah1*、*Cry1Ca7* 及 *Vip3Aa11* 蛋白对鳞翅目害虫的杀虫活性,发现 *Cry2Ah1* 蛋白对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、甜菜夜蛾 *S. exigua* 具有很好的致死作用,对棉铃虫、亚洲玉米螟和二化螟 *Chilo suppressalis* 也具有较好的杀虫效果,但对黏虫只有明显的体重抑制作用,致死效果不明显。 *cry2Ah-vp* 基因与 *cry2Ah1* 基因相比,有 1 个缬氨酸插入,改变了 *Cry2Ah* 蛋白与棉铃虫刷状缘膜囊泡的亲合性,提高了转基因烟草的抗虫活性(Li et al., 2018),本研究也证明改造的 *cry2Ah-vp* 基因对

东方黏虫的杀虫活性有所提高。*cry1Ah-vp* 基因对多种作物害虫有很好的杀虫效果,也可以利用 *cry2Ah-vp* 基因转化其它作物,例如棉花、蔬菜,培育多种抗虫作物。且 *cry2Ah-vp* 基因与 *cry1Ac* 基因无交互抗性,对 Cry1Ac 抗性棉铃虫有杀虫活性(Li et al., 2018),所以可以将获得的转 *cry2Ah-vp* 基因玉米与转 *cry1A* 类基因玉米杂交,培育出对东方黏虫、亚洲玉米螟和棉铃虫有杀虫效果的抗虫转基因玉米,也可以延缓害虫抗性的产生,在玉米抗虫育种上有很好的商业化前景。

参考文献 (References)

- BATES SL, ZHAO JZ, ROUSH RT, SHELTON AM. 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnology*, 23(1): 57–62
- CHANG X, CHANG XY, HE KL, WANG ZY, BAI SX. 2007. Resistance evaluation of transgenic Bt maize to oriental armyworm. *Journal of Plant Protection*, 34(3): 225–228 (in Chinese) [常雪, 常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄. 2007. 转 *cry1Ab* 基因玉米对粘虫的抗性评价. *植物保护学报*, 34(3): 225–228]
- CHANG X, WANG W, SHEN ZC, YE GY. 2016. Evaluation of transgenic *cry1Ab/cry2Aj* and *cry1Ab/vip3DA* maize events for their resistance to *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua* and *Prodenia litura*. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 951–957 (in Chinese) [常雪, 王伟, 沈志成, 叶恭银. 2016. 转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 玉米对棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的抗性评价. *植物保护学报*, 43(6): 951–957]
- ESTRUCH JJ, CAROZZI NB, DESAI N, DUCK NB, WARREN GW, KOZIEL MG. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, 15(2): 137–141
- GOULD F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701–726
- HAN LL, SONG FP, ZHANG J, ZHAO KJ. 2008. Activity analysis of Cry protein from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 39(8): 21–24 (in Chinese) [韩岚岚, 宋福平, 张杰, 赵奎军. 2008. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白对棉铃虫活性分析. *东北农业大学学报*, 39(8): 21–24]
- JAMES C. 2015. 20th anniversary of the global commercialization of biotech crops (1996 to 2015) and biotech crop highlights in 2015. ISAAA Brief, No. 51
- JIANG SJ, LUO LZ, HU Y, ZHANG L. 2010. Effects of Cry1Ac protein on growth and development, reproduction and flight potential of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(12): 1360–1366 (in Chinese) [蒋善军, 罗礼智, 胡毅, 张蕾. 2010. Cry1Ac 毒蛋白对粘虫生长发育、繁殖及飞行能力的影响. *昆虫学报*, 53(12): 1360–1366]
- JIANG XF, ZHANG L, CHENG YX, LUO LZ. 2014. New characteristics and trend analysis of armyworm occurrence and damage in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 51(6): 1444–1449 (in Chinese) [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智. 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. *应用昆虫学报*, 51(6): 1444–1449]
- LI SY, WANG ZY, ZHOU YY, LI CH, WANG GP, WANG H, ZHANG J, LIANG GM, LANG ZH. 2018. Expression of *cry2Ah1* and two domain II mutants in transgenic tobacco confers high resistance to susceptible and Cry1Ac-resistant cotton bollworm. *Scientific Reports*, 8(1): 508
- LIANG HS, LI MT, LI SY, WANG H, ZHANG J, LANG ZH. 2018. Agronomic traits analysis of transgenic Bt *cry1Ah* maize HGK60 line. *Biotechnology Bulletin*, 34(7): 92–100 (in Chinese) [梁海生, 李梦桃, 李圣彦, 汪海, 张杰, 郎志宏. 2018. 转 Bt 基因抗虫玉米 HGK60 的农艺性状分析. *生物技术通报*, 34(7): 92–100]
- LIU C, CHEN L, WANG BJ, ZHAO M, LIANG GM, GUO YY. 2017. Insecticidal activity of four Bt toxins against six important Lepidoptera pests. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(6): 774–779 (in Chinese) [刘臣, 陈琳, 王冰洁, 赵曼, 梁革梅, 郭予元. 2017. 四种 Bt 蛋白对六种重要鳞翅目害虫的杀虫活性评价. *中国生物防治学报*, 33(6): 774–779]
- LOWE BA, SHIVA PRAKASH N, WAY M, MANN MT, SPENCER TM, BODDYPALLI RS. 2009. Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. *Transgenic Research*, 18: 831
- MATZKE MA, MATZKE AJM, EGGLESTON WB. 1996. Paramutation and transgene silencing: a common response to invasive DNA? *Trends Plant Science*, 1(11): 382–388
- MEIHLS LN, HIGDON ML, SIEGFRIED BD, MILLER NJ, SAPPINGTON TW, ELLERSIECK MR, SPENCER TA, HIBBARD BE, BLAIR DS, NICHOLAS JM, et al. 2008. Increased survival of western corn rootworm on transgenic corn within three generations of on-plant greenhouse selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49): 19177–19182
- POREBSKI S, BAILEY LG, BAUM BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1): 8–15
- SCHMIDT JEU, BRAUN CU, WHITEHOUSE LP, HILBECK A. 2009. Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2): 221–228
- SHU CL, ZHANG JT, CHEN GH, LIANG GM, HE KL, CRICKMORE N, HUANG DF, ZHANG J, SONG FP. 2013. Use of a pooled clone method to isolate a novel *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin with activity against *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 31–33
- SOBERÓN M, PARDO-LÓPEZ L, LÓPEZ I, GÓMEZ I, TABASH-

- NIK BE, BRAVO A. 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318(5856): 1640–1642
- SONG M, WANG H, ZHANG J, HE KL, LIANG GM, ZHU L, HUANG DF, LANG ZH. 2016. Resistance evaluation of Bt *cry1Ah*-transgenic maize to Asia corn borer, cotton bollworm and oriental armyworm. *Biotechnology Bulletin*, 32(6): 69–75 (in Chinese) [宋苗, 汪海, 张杰, 何康来, 梁革梅, 朱莉, 黄大昉, 郎志宏. 2016. 转 Bt *cry1Ah* 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟、棉铃虫和黏虫的抗性评价. *生物技术通报*, 32(6): 69–75]
- STORER NP, BABCOCK JM, SCHLENZ M, MEADE T, THOMPSON GD, BING JW, HUCKABA RM. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1031–1038
- SUN HY, LI F, GAO R, XU XH, YANG SK, LU XB. 2018. Bt protein spatial-temporal expression and evaluation for resistance of transgenic *cry1Ab/cry2Aj* and *G10evo-epsps* maize. *Journal of Biosafety*, 27(1): 63–68 (in Chinese) [孙红炜, 李凡, 高瑞, 徐晓辉, 杨淑珂, 路兴波. 2018. 转 *cry1Ab/cry2Aj* 和 *G10evo-epsps* 基因玉米中 Bt 蛋白的时空表达及抗性评价. *生物安全学报*, 27(1): 63–68]
- WANG DY, WANG ZY, HE KL, CONG B, WEN LP, BAI SX. 2004. Food consumption and utilization of the fifth instar larvae of *Mythimna separata* (Walker) feeding on the leaves of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing CryIAb protein. *Acta Entomologica Sinica*, 47(2): 141–145 (in Chinese) [王冬妍, 王振营, 何康来, 丛斌, 文丽萍, 白树雄. 2004. 粘虫高龄幼虫对转 Bt 基因玉米的消化和利用. *昆虫学报*, 47(2): 141–145]
- WANG ZY, WANG DY, HE KL, BAI SX, CONG B. 2005. Evaluation the control effects of the transgenic *Bacillus thuringiensis* corn expressing CryIAb protein on the larvae of *Mythimna separata* (Walker) in laboratory. *Journal of Plant Protection*, 32(2): 153–157 (in Chinese) [王振营, 王冬妍, 何康来, 白树雄, 丛斌. 2005. 转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价. *植物保护学报*, 32(2): 153–157]
- WANG ZY, WANG XM. 2019. Current status and management strategies of corn pests and diseases in China. *Plant Protection*, 45(1): 1–11 (in Chinese) [王振营, 王晓鸣. 2019. 我国玉米病虫害发生现状、趋势与防控对策. *植物保护*, 45(1): 1–11]
- YANG F, KERNS DL, HEAD GP, LEONARD BR, NIU Y, HUANG FN. 2014. Occurrence, distribution, and ear damage of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in mixed plantings of non-Bt and Bt corn containing Genuity® SmartStax™ traits. *Crop Protection*, 55: 127–132
- YANG SJ, HUANG MZ, LI YQ, ZHOU ZS, JIANG XF, GAO JG, CHENG YX, ZHANG J. 2016. Screening and analysis of insecticidal activity of protein from *Bacillus thuringiensis* against *Mythimna separata*. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 30–35, 62 (in Chinese) [杨素娟, 黄闽忠, 李艳秋, 周子珊, 江幸福, 高继国, 程云霞, 张杰. 2016. 对黏虫具有杀虫活性的 Bt 蛋白筛选及分析. *植物保护*, 42(3): 30–35, 62]
- ZHANG SM, ZHAO ZJ. 2009. Application prospect analysis of transgenic maize in China based on maize diseases and pests situation. *Journal of Maize Sciences*, 17(3): 149–152 (in Chinese) [张社梅, 赵芝俊. 2009. 我国玉米病虫害防治与转基因玉米的应用前景分析. *玉米科学*, 17(3): 149–152]
- ZHANG X. 2017. Study on genetic stability of transgenic crops with stacked traits. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [张欣. 2017. 复合性状转基因作物的遗传稳定性研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]

(责任编辑: 李美娟)