



## 转Bt基因烟草中Cry1Ac基因的叠加效应

任亚超<sup>1,2</sup> 董研<sup>1,2</sup> 张文林<sup>1,2</sup> 杨敏生<sup>1,2\*</sup>

1河北农业大学 林学院,保定 071000;2河北省林木种质资源与森林保护重点实验室,保定 071000

\*通讯作者, yangms100@126.com

**摘要** 植物转基因研究发现,多拷贝插入往往导致外源基因表达量下降,但在构建载体时将同一外源基因串联构建于同一载体上,转化植株后是否会提高外源基因的表达量尚未报道。为了提高转基因植物中外源目的基因的表达量,探索同一目的基因叠加对基因表达及转基因植株生长的影响,本研究利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的叶盘法分别将携带单、双苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)基因Cry1Ac的植物表达载体转化烟草(*Nicotiana tabacum*)组培苗,并对转基因株系进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、荧光定量PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)(绝对定量)、Bt毒蛋白及杀虫性检测,以鉴定外源基因是否整合至烟草基因组及外源基因的表达情况,同时对两种载体转化的转基因株系及非转基因植株进行形态及生理生化指标测定,观测转基因植株的生长情况。结果表明,通过PCR检测,获得转单Cry1Ac基因株系9个,转双Cry1Ac基因株系8个,目的基因均整合至烟草基因组;荧光定量PCR及毒蛋白检测表明,转双Cry1Ac基因株系Cry1Ac基因的转录丰度约为转单Cry1Ac株系的2.6倍,Cry1Ac毒蛋白含量约为转单Cry1Ac基因株系的10倍,转双Cry1Ac基因株系的两个数值都显著高于转单Cry1Ac基因株系;室内饲虫实验结果表明,转两种载体株系对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)一龄幼虫和二龄幼虫的致死率均为100%,转双Cry1Ac基因株系的致死时间较短;形态及生理生化指标测定结果表明,大部分转基因株系的生长指标与对照无显著差异,部分转双Cry1Ac基因株系表现出矮化现象。总体来说,本研究中转双Cry1Ac基因株系较转单基因株系在外源基因表达量上得到提高,而在植株生长等方面未受到明显影响。本研究为探索提高外源基因表达量的方法以及转化其他植物提供基础理论基础。

**关键词** Cry1Ac基因,烟草,遗传转化,外源基因表达,生理生化指标

**中图分类号** S188 **文献标志码** A

## Superposition Effect of Cry1Ac Gene in Transgenic Bt Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

REN Ya-Chao<sup>1,2</sup> DONG Yan<sup>1,2</sup> ZHANG Wen-Lin<sup>1,2</sup> YANG Min-Sheng<sup>1,2\*</sup>

1.College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Key Laboratory of Germplasm Resources of Forest Trees Production of Hebei, Baoding 071000, China

\*Corresponding author, yangms100@126.com

**Abstract** Plant transgenic studies have found that multiple copies insertion often lead to decreased expression of exogenous genes. However, when constructing the vector, the same exogenous gene is constructed on the same vector with series connection. Whether it will improve the expression of exogenous genes after transformation of plants has not been reported. In order to improve the expression of exogenous gene in transgenic plants and explore the effect of superposition of the same target gene on gene expression

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31370663和No. 31660211)和河北省研究生创新资助项目(No. 1099009)

收稿日期:2017-05-04 接受日期:2017-05-25

and transgenic plant growth, in this study, the plant transformation vectors carrying single and double *Bacillus thuringiensis*(Bt) gene *CryIAc* respectively were transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum*) tissue culture seedlings by *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*)-mediated leaf disc method. Then, the transgenic lines were detected by polymerase chain reaction (PCR), fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) (Absolute quantitative) and Bt toxin and insect resistance tests to identify whether or not the exogenous gene was integrated into the tobacco genome and the expression were carried out. At the same time, morphological indexes and physiological and biochemical indexes of the transgenic plants transformed with the two vectors and non-transgenic plants were observed to research the growth of the transgenic plants. The results showed that nine transgenic single *CryIAc* gene lines and 8 transgenic dual *CryIAc* gene lines were obtained by PCR detection, and the target genes were integrated into the tobacco genome. FQ-PCR and toxin detections showed that the *CryIAc* gene transcriptional abundance of the transgenic dual *CryIAc* gene lines was about 2.6 times higher than that of transgenic single *CryIAc* gene lines, the *CryIAc* toxin content of the transgenic dual *CryIAc* gene lines was about 10 times higher than that of transgenic single *CryIAc* gene lines, and the two types of values of the transgenic dual *CryIAc* gene lines were significantly higher than that of transgenic single *CryIAc* gene lines. The result of indoor insect feeding test showed that with the increase of feeding days, the mortality of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) fed with transgenic lines leaves increased gradually. There were some differences among different transgenic lines. The lethal rates of the two kinds of transgenic lines against the first instar larvae of *Helicoverpa armigera* were 100%. When feeding for three days, the larva mortality rate of transgenic dual *CryIAc* gene lines B1, B4, B6, B7 and transgenic single *CryIAc* gene lines A2, A7 reached 100%. Feeding for four days, the larva mortality rate of B3, B5, B8, A1, A3, A4, A5, and A9 reached 100%. At five days, the larva mortality rate of all transgenic lines reached 100%, while the rate of non-transgenic tobacco was less than 10%. Moreover, the lethal rates of the two kinds of transgenic lines against the second instar larvae of *Helicoverpa armigera* were also 100%. The larva mortality rate of B7 and B6 reached 100% at feeding for five days and six days respectively, while A2 and A5 reached 100% at feeding for eight days. Overall, the lethal time of the transgenic dual *CryIAc* gene lines was shorter than transgenic single *CryIAc* gene lines, and transgenic dual *CryIAc* gene lines had high insect resistance. The morphological and physiological and biochemical indexes detections showed that there were no significant differences in the parameters of ground diameter, net photosynthetic rate (Pn), stomatal conductance (Cond), intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci), transpiration rate (Tr), maximum fluorescence (Fm), chlorophyll a (Chla), and total chlorophyll content (CT) among transgenic dual *CryIAc* gene lines and CK and transgenic single *CryIAc* gene lines. While there were some differences in other parameters. On the whole, the growth of most transgenic lines was not significantly different from that of the control group, and some of the transgenic dual *CryIAc* gene lines showed dwarfing phenomenon. In general, in this study, compared with transgenic single *CryIAc* gene lines, the exogenous gene expression level of transgenic dual *CryIAc* gene lines was improved, and the plant growth and other aspects were not significantly affected. This study will lay the foundation for exploring ways to improve the expression of exogenous genes and to transform other plants.

**Keywords** *CryIAc* gene, Tobacco, Genetic transformation, Exogenous gene expression, Physiological and biochemical indexes

作为重要的杀虫微生物,苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)中的晶体蛋白基因成为抗虫转基因研究的热点,其种类很多,且具有特异性(吴刚等, 2000, 生物工程进展, 20(2): 45-48; 崔杰, 2008; 冯妍, 2010)。目前, Bt基因已成为研究最深入、应用最广泛的抗虫基因,相继转化多种植物并得到表达,包括烟草(*Nicotiana tabacum*)、棉花(*Gossypium* spp)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、油

菜(*Brassica campestris*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、杨树(*Populus*)等(孙立洋等, 2011; Dong, Li, 2007; Lu et al., 2010; Rensburg, 2007; Himanen et al., 2008; Mi et al., 2015; 杨敏生等, 2006)。虽然Bt基因的应用越来越广泛,但其杀虫效果却不尽如人意(练云等, 2008, 科学通报, 53(6): 658-663; 王桂英等, 2016)。因此,人们在筛选不同基因型、更换启动子、添加核基质结合区(matrix associated region, MAR)结构等方面做了大量工作,以期提高Bt毒蛋白的表达量(Wang et al., 2008; 石春林等, 2000; 李晨, 刘博林, 2015; Qiu et al., 2017)。虽然上述方法对提高外源基因的表达水平具有一定作用,但是外源基因在受体植物的表达还会受到整合拷贝数等影响(Hobbs et al., 1990; Matzke et al., 1994; Elmayan, Vaucheret, 1996; Jorgensen et al., 1996; 常丽娟等, 2013; 曾凡锁, 詹亚光, 2004)。

转基因研究表明,遗传转化中,多拷贝往往导致基因表达效果下降(Flavell, 1994; Kohli et al., 1999; Yang et al., 1998; Cervera et al., 2000; 郭旺珍等, 2001; 吴娜拉胡, 2012)。郭旺珍等(2001)通过对整合位点不同的转Bt抗虫棉品系进行互交,选出2对Bt基因纯合的抗虫棉品系(含4个Bt基因),结果表明抗性并未因为Bt基因拷贝数的增加而增强,相反还因转基因间的同源抑制而有所降低。吴娜拉胡(2012)在转Bt *cry1Ba3* 和 Bt *cry1Ia8* 基因抗虫花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)的研究中发现,转基因株系1Ba-8中目的基因的插入拷贝数为多拷贝,其对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的抗虫效果较单拷贝的株系差。Li等(2002)在拷贝数对转基因烟草外源基因表达影响研究中,对转 *uidA* 基因烟草进行 Southern 杂交和 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因( $\beta$ -glucosidase gene, *GUS*)表达分析发现, *GUS* 基因失活植株的基因组中整合了多个 *uidA* 拷贝,而 *GUS* 活性高的转基因植株多为 *uidA* 单拷贝,表明 *uidA* 基因失活与基因多拷贝整合有关。翟琪麟等(2013)利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法将构建好的共表达载体 pXCS-*HbWRKY11-HbWRKY7*-HAS $\beta$  转入野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),获得了抗Basta除草剂的拟南芥转基因植株, Southern 结果表明,单拷贝的拟南芥转化株系 S2 和 S5 的表达量要高于其他多拷贝的株系。造成这种现象的主要原因是由重复序列诱导的基因沉默(Hobbs et al., 1990; Linn et al., 1990),其分

子机制还不是很清楚,但大多与DNA-DNA、DNA-RNA的相互作用有关。研究表明,DNA重复序列之间容易形成异位配对(Dorer, Henikoff, 1994),使DNA异染色质化,抑制基因的转录;而DNA-RNA相互作用可诱导外源基因启动子区的甲基化(Asaad et al., 1993)。此外,T-DNA重排形成串联多联体时,有未知序列插入连接处使其结构发生改变(Fladung, 1999; Kohli et al., 1999; Kumar, Fladung, 2000),同源序列基因竞争转录因子引起基因失活(夏兰芹等, 2000)等也可能导致外源基因表达水平下降。但是在载体构建时,将同一基因串联构建在同一载体上,且采用不同启动子启动及调控元件,是否可提高该基因的表达效果尚未有尝试。

Bt基因是目前转基因研究中应用最多的抗虫基因,其种类繁多,具有特异性,其中CryIAc基因是对鳞翅目害虫具有抗性的种类之一。本研究拟通过农杆菌介导法将构建好的分别携带单、双CryIAc基因的植物表达载体转化烟草组培苗,筛选出转基因株系,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、荧光定量PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)(绝对定量)、酶联免疫(enzyme-linked immunoassay, ELISA)检测,探索外源基因在转基因植株中的整合、转录及翻译情况,同时对两种载体的转基因植株进行株高、地径、叶片数等生长性状指标,以及光合作用参数、叶绿素荧光参数、叶绿素含量等生理生化指标测定,以期探索转不同数目基因对转基因植株中外源基因表达及生长的影响,为探索提高外源基因表达量方法及转化其他植物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和植物表达载体

实验涉及的菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105,皆为本实验室保存。

利用本实验室构建的多基因表达载体构建系统(Dong et al., 2017)构建分别携带单、双CryIAc基因的植物表达载体N7和N31,保存于大肠杆菌中,两种载体的结构如图1所示,其中两个载体上均添加了MAR结构(MAR与核基质结合形成一个相对



独立的疏松染色质 loop 结构,从而保证转录单元的相对独立性,减少位置效应)。两者均具有卡那霉素抗性,其中载体 N7 上 *CryIAc* 基因的启动子为玄参花叶病毒(figwort mosaic virus, FMV)启动子,基因表达盒两侧有 MAR 结构,载体 N31 为同一 *CryIAc* 基因串联在 T-DNA 区,上游 *CryIAc* 基因的启动子为 FMV,下游 *CryIAc* 基因的启动子为 CaMV35S,且加有 *AtADH5*'-UTR 增强子,串联表达盒外侧有 MAR 结构。

### 1.1.2 受体材料

用于遗传转化的植物材料为烟草(*Nicotiana tabacum*) Wisconsin35 组培苗,由河北农业大学农学院肖凯教授提供。实验所用昆虫为棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)一龄幼虫和二龄幼虫(鳞翅目),棉铃虫卵和二龄幼虫购于河南省济源白云实业有限公司,由卵孵化的一龄幼虫用于实验,二龄幼虫直接用于实验。

### 1.1.3 主要试剂

实验涉及的 *Taq* DNA 聚合酶、10× PCR Buffer 和感受态制备试剂盒(Competent Cell Preparation Kit)购自宝生物(TaKaRa, 大连)公司; dNTP 及 San-Prep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生物工程技术服务有限公司(上海);植物总 RNA 提取试剂盒

及反转录试剂盒购自赛诺生物科技有限公司(张家口); 2×Sybr Green qPCR Mix 试剂购自艾德莱生物科技有限公司(北京); Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA 试剂盒购自 Agdia 公司(美国); 引物由生物工程技术服务有限公司(上海)合成。

### 1.1.4 实验所用引物

利用 Primer Premier 5.0 软件,根据各基因(*nptII* 基因、*CryIAc* 基因)及启动子(FMV 启动子、CaMV35S 启动子)的序列设计引物,引物信息见表 1。

## 1.2 方法

### 1.2.1 农杆菌介导的叶盘法转化烟草

利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒载体 N7 和 N31,利用感受态制备试剂盒(Competent Cell Preparation Kit)制备农杆菌 EHA105 热激感受态,用热激法将 N7 和 N31 转化农杆菌 EHA105 感受态。通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草(Horsch et al.,1985)。选取无菌、健壮、鲜绿的烟草叶片,沿其叶脉剪成 0.5~1 cm<sup>2</sup> 的叶盘,用 5%蔗糖溶液稀释菌液(N7 和 N31)(1:1),用稀释后的菌液侵染叶盘 8 min,将叶片取出用无菌吸水纸吸干,接种于培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA)上共培养,暗培养 2 d 后转接至培养基(MS+

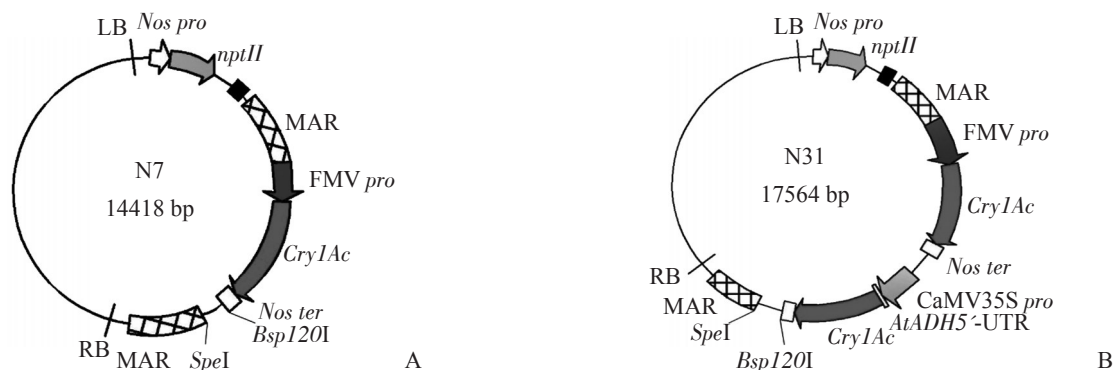


图 1 载体 N7(A)和 N31(B)结构图

Figure 1 Structures of vector N7(A) and N31(B)

N7: 单 *CryIAc* 基因植物表达载体; N31: 双 *CryIAc* 基因植物表达载体; *Nos pro*: 胭脂碱合成酶基因启动子; *nptII*: 新霉素磷酸转移酶基因; MAR: 核基质结合区; FMV *pro*: 玄参花叶病毒启动子; *CryIAc*: 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因; *Nos ter*: 胭脂碱合成酶基因终止子; CaMV35S *pro*: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子; *AtADH5*'-UTR: 拟南芥乙醇脱氢酶(ADH)5'端非编码区  
N7: Plant transformation vector carrying single *CryIAc* gene; N31: Plant transformation vector carrying double *CryIAc* gene; *Nos pro*: Promoter of nopaline synthase gene; *nptII*: Neomycin phosphotransferase gene; MAR: Matrix associated region; FMV *pro*: Figwort mosaic virus promoter; *CryIAc*: *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene; *Nos ter*: Terminator of nopaline synthase gene; CaMV35S *pro*: Cauliflower mosaic virus 35S promoter; *AtADH5*'-UTR: 5' noncoding region of *Arabidopsis thaliana* ethanol dehydrogenase

表1 实验涉及的引物信息

Table 1 The primer information involved in the test

编号 No.	引物名称 Primer name	引物序列 (5'~3') Primer sequence	T <sub>m</sub> /°C	片段长度/bp Length of fragment	用途 Purpose
35#	35send F	ATTTCATTTGGAGAGAACACGG	58.6	-	与bt1 R配合使用鉴定35S启动子所启动的CryIAc基因 In combination with bt1 R to identify the CryIAc gene promoted by the 35S promoter
103#	nptII F	ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCT	63.5	473	nptII基因检测 nptII gene detection
	nptII R	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG	56.1		nptII gene detection
105#	bt1 F	ATGGATAACAATCCGAACATCA	54.5	546	CryIAc基因检测 CryIAc gene detection
	bt1 R	CCACCTTTGTCCAAACTGAA	58.2		CryIAc gene detection
125#	FMV F	GCGGCCGCAAGCTTGTCAA	61.9	573	FMV启动子检测 FMV promoter detection
	FMV R	GGTATTGGATCCATTACAAGATCTC	58.7		FMV promoter detection
176#	CryIAc F	TAGAGTTCGTGTGAGGTATGCT	55.3	176	CryIAc基因荧光定量PCR检测 CryIAc gene detection by fluorescent quantitative PCR
	CryIAc R	TGTTGCCGAATGAAGATGTGAA	55.6		CryIAc gene detection by fluorescent quantitative PCR

2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+50 mg/L Kan+400 mg/L Cef)上筛选,每隔2个星期换一次培养基。待抗性芽长至2 cm左右,将其转接至生根培养基(MS+75 mg/L Kan+400 mg/L Cef)上进行筛选,放置于温度25±2 °C、光照强度1 500~2 000 lx和光/暗周期为14/10 h的培养室培养。而对照组(CK)为叶盘浸泡于5%蔗糖溶液中8 min,取出叶片擦干进行共培养,之后接种于不含抗生素的培养基中培养,其他条件同上。对在生根培养基上生根的株系进行扩繁,驯化后移栽至温室,栽种至内径18 cm、高20 cm的大花盆中,每盆1株,每个株系至少6株。

### 1.2.2 转基因株系的PCR检测

从温室中采集各株系和非转基因烟草(CK)叶片,采用改良的CTAB法(王关林,方宏筠,2002)提取各株系基因组DNA。以基因组DNA为模板,分别用nptII基因、CryIAc基因、FMV启动子的正反引物(103#, 105#, 125#),利用Taq酶对两种载体类型的转基因植株进行PCR检测,此外,利用根据35S末端序列设计的正向引物(35#)及FMV启动子的正向引物分别与CryIAc基因的反向引物配对,对转N31载体的转基因植株进行检测。

PCR反应体系(20 μL): 10×PCR buffer 2 μL, dNTP(10 mmol/L)0.4 μL, 正反引物(20 μmol/L)各0.4 μL, Taq酶0.2 μL, DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 15.6 μL。

反应程序: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性50 s, 50~55 °C(不同引物退火温度不同)退火50 s, 72 °C

延伸60 s, 30个循环; 72 °C延伸7 min。反应结束后,通过1% TAE琼脂糖凝胶电泳观察扩增产物片段有无及长度。

### 1.2.3 转基因株系的荧光定量PCR检测

随机选择温室栽植的转化两种载体的各转基因株系及非转基因对照(CK)植株3株,采集自上而下的第三片叶片,采用张家口赛诺生物科技有限公司的植物总RNA提取试剂盒及反转录试剂盒,按照说明书流程提取叶片总RNA并反转录,利用CryIAc基因荧光定量引物176#及2×Sybr Green qPCR Mix,通过Agilent Technologies Stratagene Mx3005P Real-Time PCR仪进行扩增反应,反应体系(20 μL): 2×Sybr Green qPCR Mix 10 μL, 正反引物(20 μmol/L)各1 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环;之后进行51~95 °C的熔解曲线分析。采用绝对定量的方法,根据标准曲线计算CryIAc基因的转录情况。

### 1.2.4 转基因植株的Bt毒蛋白检测

随机抽取各转基因株系温室苗木各3株,分别采集自上而下的第四片叶片,采用Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA试剂盒,进行Bt毒蛋白检测。阳性对照为试剂盒自带,阴性对照为非转基因烟草。检测过程参照试剂盒的说明,用BioRad 550型酶标仪进行检测。蛋白浓度以每克新鲜叶片所含毒蛋白纳克(ng)计算。

### 1.2.5 转基因植株对棉铃虫的抗虫性检测

各转基因株系分别随机选取3株,采集成熟叶片饲喂一龄棉铃虫幼虫,以非转基因烟草(CK)为对照。饲养棉铃虫的每个处理选用大小一致的叶片,放置于底部直径7 cm、高10 cm的干净带透气盖的组培瓶中,每瓶布置30头幼虫,每个株系号设3次重复,每天换取新鲜叶片,并调查死亡率。

每种载体随机各选取2个株系,每个株系选取3株,采集叶片饲喂二龄棉铃虫幼虫,以CK为对照。放置于底部直径7 cm、高10 cm的干净带透气盖的组培瓶中,每瓶布置20头幼虫,每个株系号设3次重复,每天换取新鲜叶片,并调查死亡率。

### 1.2.6 转基因植株的生长指标测定

各转基因植株和CK在温室生长5周时,用不锈钢刻度尺测量各植株的株高,每个系号3次重复;用千分尺测量各植株的地径,每个系号3次重复;用直尺测量各植株叶片的长和宽,每个植株测量3个叶片,每个系号3次重复;最后统计各植株的叶片数量,每个系号3次重复。

### 1.2.7 转基因植株的光合作用参数测定

在温室生长5周时,上午9:00~10:00,选取各转基因株系和CK顶端第二到三片功能叶,采用Li-6400XT便携式光合仪(美国拉格公司生产)对光合作用相关参数进行测定,其中包括:净光合速率(net photosynthetic rate, Pn)、气孔导度(stomatal conductance, Cond)、胞间CO<sub>2</sub>浓度(intercellular CO<sub>2</sub> concentration, Ci)及蒸腾速率(transpiration rate, Tr),每个系号3次重复。

### 1.2.8 转基因植株的叶绿素荧光参数测定

测定光合作用参数的同时,采用便携式调制叶绿素荧光仪PAM-2500(上海泽泉科技有限公司生产)测定温室中各转基因株系和CK的初始荧光(initial fluorescence, Fo)、最大荧光(maximum fluorescence, Fm)、光系统II的最大光合效率(maximum photosynthetic efficiency of photosystem II, Fv/Fm)和可变荧光/初始荧光(variable fluorescence/initial fluorescence, Fv/Fo),并测定各参数的快速光响应曲线,测定前用暗处理夹片对烟草叶片进行20 min的暗处理,每个处系号3次重复。

### 1.2.9 转基因植株的叶绿素测定

选取各转基因株系和CK的叶片,测定叶绿素a(chlorophyll a, Chla)、叶绿素b(chlorophyll b, Chlb)及叶绿素总含量(total chlorophyll content, CT),方法参照李合生(2000),用TU-1901双束紫外可见光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)进行测定,含量以mg/g FW表示,每个系号3次重复。

## 1.3 数据分析

采用Microsoft Excel和DPS v7.05数据处理系统对各项参数进行数据整理、作图、方差分析、多重比较和相关分析,其中方差分析及多重比较采用Duncan新复极差法( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的获得

通过农杆菌介导法将两种植物表达载体分别转化烟草,在分化筛选培养基上,转基因烟草叶片形成愈伤组织并长出抗性芽,而未转化烟草不能分

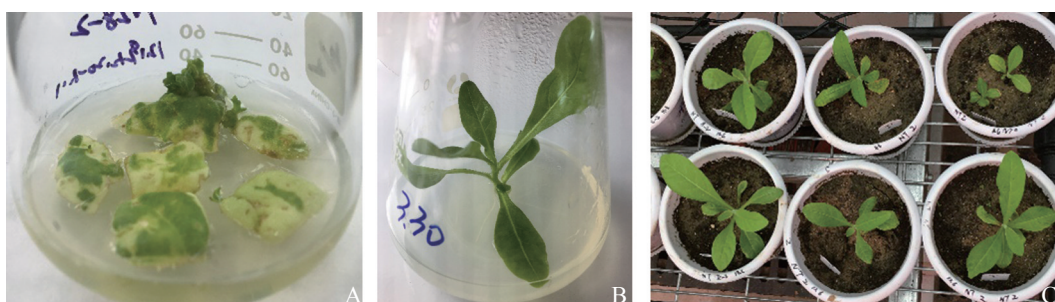


图2 转基因烟草的获得

Figure 2 The acquisition of transgenic tobacco

A: 烟草叶盘在筛选培养基上长出抗性芽; B: 抗性芽在生根培养基生根; C: 生根株系移栽至花盆

A: Tobacco leaves grew resistant shoots in the screening medium; B: Resistant shoots rooted in the rooting medium; C: Rooting lines were transplanted to small pots



化,且叶片逐渐发黄枯萎;将抗性芽转接至生根筛选培养基,转化每种载体的株系均可生根,对照未生根。将生根株系再分化扩繁,生根后移栽到花盆,放置于温室培养(图2),最终获得经Kan初步筛选的转单*CryIAc*基因株系9个(A1~A9),转双*CryIAc*基因株系8个(B1~B8)。

## 2.2 转基因株系中外源基因的PCR检测

分别用*nptII*基因、*CryIAc*基因、FMV启动子的正反引物,对两种载体类型的转基因植株进行PCR检测,此外,利用根据35S和FMV末端序列设计的正向引物及*CryIAc*基因的反向引物分别对转N31载体的转基因株系进行检测,质粒载体N31作为阳性对照(CK+),非转基因烟草为阴性对照(CK-)。结果表明,各转基因株系和阳性对照均检测到*nptII*基因(图3A)、FMV启动子(图3B)、*CryIAc*基因(图3C)的扩增片段,扩增片段大小分别为473、573、546 bp,阴性对照未检测到;同时转N31载体的转

基因株系和阳性对照检测到由35S末端序列设计的正向引物及*CryIAc*基因的反向引物扩增的目的片段(图3D),大小为626 bp,同时也检测到由FMV末端序列设计的正向引物及*CryIAc*基因的反向引物扩增的目的片段,大小为1 131 bp(图3E),而阴性对照未检测到目的片段(图3)。

## 2.3 转基因株系中外源基因的转录丰度测定

荧光定量PCR(绝对定量)检测*CryIAc*基因的转录丰度结果表明(表2),同一载体不同转基因株系间*CryIAc*基因转录丰度存在一定差异,非转基因烟草未检测到*CryIAc*基因转录表达。转双*CryIAc*基因株系间(B1~B8)差异显著,变异系数为0.679,而大部分转单*CryIAc*基因株系间(A1, A3, A5~A9)差异不显著。部分转双*CryIAc*基因株系高于转单*CryIAc*株系,其中B1、B4、B5、B7较高,数量级为E+05;而B2低于转单*CryIAc*基因株系,造成这种现象的原因可能为插入位置、基因同源性或外源基

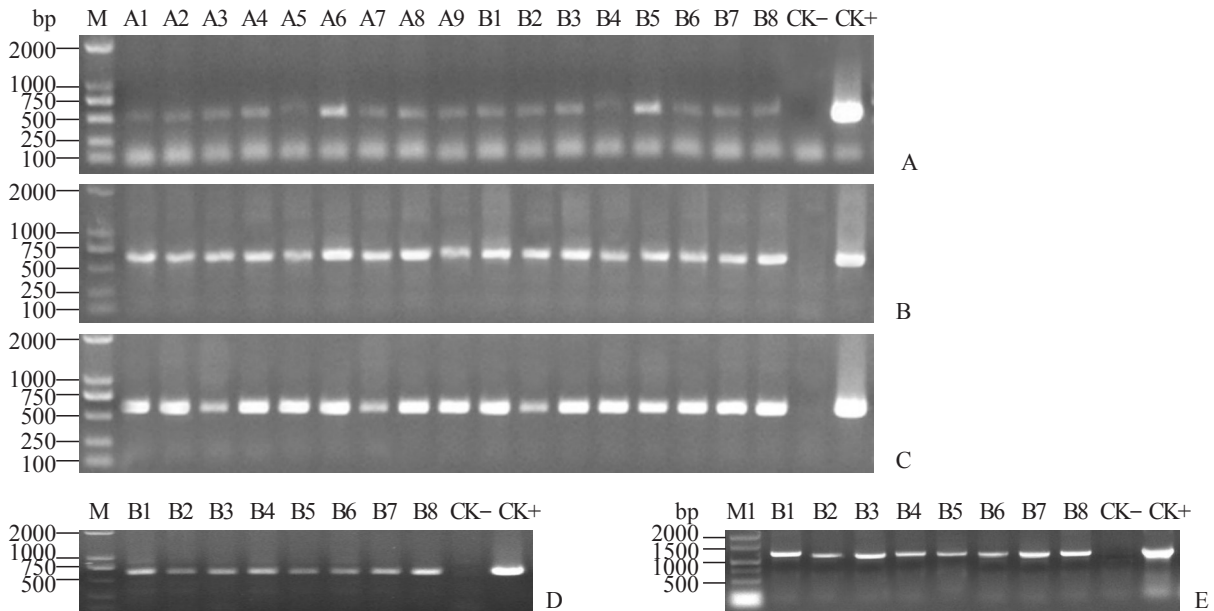


图3 转基因株系PCR检测电泳图

Figure 3 PCR electrophoresis of transgenic lines

A: *nptII*基因的PCR检测电泳图;B: FMV启动子的PCR检测电泳图;C: *CryIAc*基因的PCR检测电泳图;D: 35S启动子正向引物与*CryIAc*基因反向引物PCR检测电泳图;E: FMV启动子正向引物与*CryIAc*基因反向引物PCR检测电泳图;M: DL2000 DNA marker; M1: DNA分子标记; A1~A9: 转单*CryIAc*基因株系; B1~B8: 转双*CryIAc*基因株系; CK-: 非转基因烟草; CK+: 携带所有外源基因的质粒(N31)

A: PCR electrophoresis of *nptII* gene; B: PCR electrophoresis of FMV promoter; C: PCR electrophoresis of *CryIAc* gene; D: PCR electrophoresis with forward primer of 35S promoter and reverse primer of *CryIAc* gene; E: PCR electrophoresis with forward primer of FMV promoter and reverse primer of *CryIAc* gene; M: DL 2 000 DNA marker; M1: DNA marker; A1~A9: Transgenic single *CryIAc* gene lines; B1~B8: Transgenic dual *CryIAc* gene lines; CK-: The untransformed tobacco; CK+: The plasmid carrying all exogenous genes (N31)

因拷贝数的影响。对两种载体转录丰度进行 *t* 检验, 结果表明两载体转化株系的转录丰度存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 转双 *CryIAc* 基因株系的转录丰度约为转单 *CryIAc* 株系的 2.6 倍。

## 2.4 转基因株系 *CryIAc* 毒蛋白含量检测

两种载体转基因株系 *CryIAc* 毒蛋白含量检测结果, 见表 3。各株系均检测到毒蛋白表达, 但不同转基因株系间毒蛋白表达量存在一定差异, 部分株系间达到显著差异, CK 未检测到 *CryIAc* 毒蛋白。转双 *CryIAc* 基因株系间毒蛋白含量波动较大, 变异系数为 0.999, 其中, B7 毒蛋白含量最高, 为 1 533.413 ng/g, B2 最低, 为 2.963 ng/g, 与转录丰度结果一致; 转单 *CryIAc* 基因株系间波动较小。对两种载体毒蛋白含量进行 *t* 检验, 结果表明两载体间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 转双 *CryIAc* 基因株系的毒蛋白含量约为转单 *CryIAc* 基因株系的 10 倍, 转双

*CryIAc* 基因株系在翻译水平较转单 *CryIAc* 基因株系高。两种类型转基因株系的转录丰度与毒蛋白表达量的相关系数为 0.938 ( $P < 0.01$ ), 达到极显著相关(图 4)。

## 2.5 转基因株系的抗虫性对比

对棉铃虫一龄幼虫饲虫实验结果表明(图 5), 随着饲养天数增加, 转基因叶片饲养的棉铃虫幼虫死亡率逐渐增加。饲喂 3 d 时, 转双 *CryIAc* 基因株系 B1、B4、B6、B7 及转单 *CryIAc* 基因株系 A2、A7 的幼虫致死率已达到 100%, 饲喂 4 d 时, B3、B5、B8 及 A1、A3、A4、A5、A9 达到 100%, 5 d 时所有转基因株系均达到 100%, 而非转基因株系小于 10%。从致死时间来看, 转双 *CryIAc* 基因株系较转单 *CryIAc* 基因株系短, 表现出一定优势。

对棉铃虫二龄幼虫饲虫实验结果表明(图 6), 随着饲喂天数增加, 转基因叶片饲喂的棉铃虫幼虫

表 2 *CryIAc* 基因的转录丰度

Table 2 The transcriptional abundance of *CryIAc* gene

载体类型	株系号	转录丰度	载体平均值	变异系数
Vector type	Line no.	Transcriptional abundance	Vector average	Coefficient of variation
N31 ( <i>CryIAc</i> + <i>CryIAc</i> )	B1	1.68E+05±3.99E+04 a	9.71E+04*±7.05E+04	0.679
	B2	8.22E+03±1.66E+03 c		
	B3	3.60E+04±1.07E+04 bc		
	B4	1.38E+05±3.64E+04 a		
	B5	1.46E+05±4.19E+04 a		
	B6	6.93E+04±5.01E+04 b		
	B7	1.86E+05±2.12E+04 a		
	B8	2.45E+04±2.65E+03 bc		
N7 ( <i>CryIAc</i> )	A1	5.00E+04±1.77E+04 ab	3.70E+04±1.15E+04	0.293
	A2	5.44E+04±2.18E+04 a		
	A3	2.95E+04±7.26E+03 abc		
	A4	2.13E+04±1.10E+03 c		
	A5	2.77E+04±4.73E+03 bc		
	A6	3.16E+04±5.89E+03 abc		
	A7	4.77E+04±1.60E+04 ab		
	A8	4.04E+04±1.65E+04 abc		
	A9	3.05E+04±1.36E+04 abc		
-	CK	0.00E+00±0.00E+00 f	0.00E+00	-

N31(*CryIAc*+*CryIAc*): 携带双 *CryIAc* 基因植物表达载体 N31; N7(*CryIAc*): 携带单 *CryIAc* 基因植物表达载体 N7; 同列不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*表示两载体转基因株系之间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

N31(*CryIAc*+*CryIAc*): Plant transformation vector N31 carrying dual *CryIAc* gene; N7(*CryIAc*): Plant transformation vector N7 carrying single *CryIAc* gene; Different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). \* indicates there is a significant difference between transgenic lines of two vectors ( $P < 0.05$ ); The same below



死亡率逐渐增加。饲喂5和6 d时,转基因株系B7和B6的幼虫致死率分别达到100%,而A2和A5在饲喂8 d时到达100%,而非转基因株系小于10%,转双CryIAc基因株系较单CryIAc基因株系对棉铃虫二龄幼虫的致死效果好。

## 2.6 转基因植株生长特性对比

两种载体类型的转基因植株及非转基因植株的生长性状、光合作用参数、叶绿素荧光参数及叶绿素含量的平均值及变异系数如表4所示。从生长性状来看,不同类型株系间存在一定差异,转双CryIAc基因株系在株高、叶片数及叶片长宽比方面与转单CryIAc基因株系及对照存在一定差异( $P < 0.05$ ),而在地径方面差异不显著,转单CryIAc基因株系与对照差异不大,其中转双CryIAc基因株系变异系数较大,总体来说,转基因株系与对照差异不大;从光合作用参数来看,不同类型株系间存在一定差异,大部分参数未达到显著差异,转双CryIAc基因株系的净光合速率( $P_n$ )、胞间CO<sub>2</sub>浓度( $C_i$ )和蒸腾速率( $Tr$ )变异系数较转单CryIAc基因株系大,而气孔导度( $Cond$ )较转单CryIAc基因株系小,总体来看,转双CryIAc基因株系光合作用参数的波动性

较大,从 $P_n$ 来看,转双CryIAc基因株系平均值高于转单CryIAc基因株系,但两者均低于对照;从 $Cond$ 、 $C_i$ 和 $Tr$ 来看,转双CryIAc基因株系平均值低于转单CryIAc基因株系和对照;从叶绿素荧光参数来看,不同类型株系间存在一定差异,转双CryIAc基因株系的初始荧光( $F_0$ )显著高于转单CryIAc基因及对照( $P < 0.05$ ),最大荧光( $F_m$ )差异不大,而转双CryIAc基因株系的光系统II的最大光合效率( $F_v/F_m$ )及可变荧光/初始荧光( $F_v/F_0$ )显著低于转单CryIAc基因株系和对照( $P < 0.05$ );从叶绿素含量来看,转双CryIAc基因株系的叶绿素含量要低于转单CryIAc基因株系和对照,从叶绿素a和叶绿素总含量来看,差异不显著。

各类型株系叶绿素荧光参数的光响应如图7所示。随着光合有效辐射(PAR)的增加,各参数均呈一定的趋势变化。结果表明,随着PAR的增加, $Y_{II}$ 和 $q^p$ 逐渐降低,转双CryIAc基因株系高于转单CryIAc基因株系和CK;而 $Y(NPQ)$ 、 $Y(NO)$ 、 $q^N$ 和ETR逐渐升高且最终达到稳定状态,转双CryIAc基因株系的 $Y(NPQ)$ 、 $q^N$ 和ETR高于转单CryIAc基因株系和对照,而对照的 $Y(NO)$ 高于转基因株系。转基因株系与对照变化趋势一致,且差异不大。

表3 转基因株系的毒蛋白含量

Table 3 The toxin content of transgenic lines

载体类型	株系号	平均值/(ng·g <sup>-1</sup> )	载体平均值/(ng·g <sup>-1</sup> )	变异系数
Vector type	Line no.	Average value	Vector average	Coefficient of variation
N31( <i>CryIAc</i> + <i>CryIAc</i> )	B1	944.985±351.817 b	546.613*±545.798	0.999
	B2	2.963±0.326 d		
	B3	22.697±9.839 d		
	B4	855.833±268.894 b		
	B5	504.100±61.501 c		
	B6	493.844±245.403 c		
	B7	1 533.413±183.253 a		
	B8	15.067±10.098 d		
N7( <i>CryIAc</i> )	A1	112.081±25.467 a	55.173±40.010	0.725
	A2	93.381±41.783 ab		
	A3	23.712±6.105 c		
	A4	13.937±1.803 c		
	A5	65.645±6.593 b		
	A6	14.664±7.213 c		
	A7	74.097±27.081 ab		
	A8	9.238±1.281 c		
	A9	89.801±35.666 ab		
-	CK	0	0	-

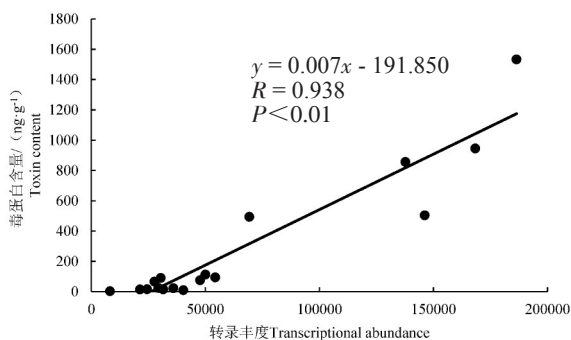


图4 转录丰度与毒蛋白含量的相关分析图

Figure 4 Correlation analysis between transcriptional abundance and toxin content

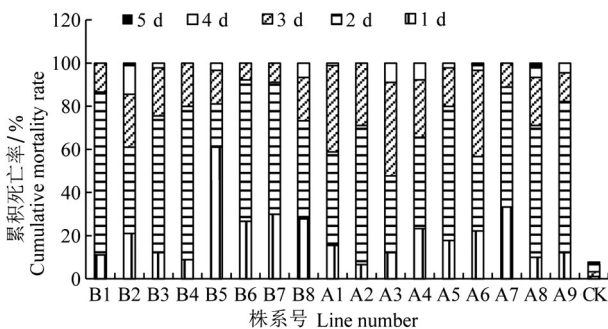


图5 各转基因株系对棉铃虫一龄幼虫的致死效应

Figure 5 The lethal effect of transgenic lines on *Helicoverpa armigera* first instar larvae

B1~B8: 转双 *CryIAc* 基因株系; A1~A9: 转单 *CryIAc* 基因株系; CK: 非转基因烟草

B1~B8: Transgenic dual *CryIAc* gene lines; A1~A9: Transgenic single *CryIAc* gene lines; CK: Non-transgenic tobacco

### 3 讨论

目前,外源基因的整合拷贝数与其表达量之间的关系并没有定论。有研究表明,外源基因拷贝数对其表达量存在正效应或负效应(Hobbs et al., 1990);也有研究表明,拷贝数与表达量没有必然联系(华志华等, 2001)。但近年来许多研究表明,外源基因多拷贝整合时,常常会导致外源基因不同程度的失活。

本研究中,多数转双 *CryIAc* 基因株系的外源基因转录及翻译水平明显高于转单 *CryIAc* 基因株系,表明 *CryIAc* 基因的叠加提高了表达水平,发挥了一定的累积效应。此外,少数转双 *CryIAc* 基因株系表达量较低,个别甚至低于转单 *CryIAc* 基因株系,导致这种现象发生的原因可能为插入拷贝数或者基因同源性的影响(Qiu et al., 2017; 李宝健, 朱华晨,

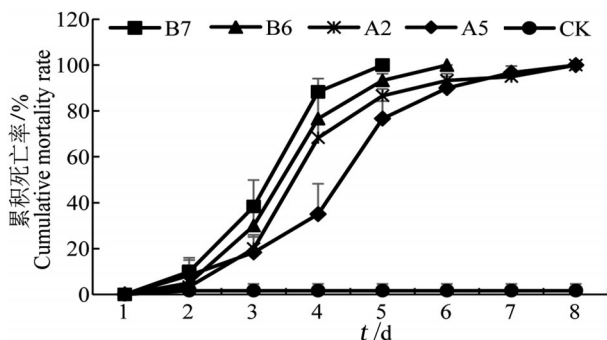


图6 转基因株系对棉铃虫二龄幼虫的致死效应

Figure 6 The lethal effect of transgenic lines on *Helicoverpa armigera* second instar larvae

B7、B6: 转双 *CryIAc* 基因株系; A2、A5: 转单 *CryIAc* 基因株系; CK: 非转基因烟草

B7, B6: Transgenic dual *CryIAc* gene lines; A2, A5: Transgenic single *CryIAc* gene lines; CK: Non-transgenic tobacco

2005; 郭兴启等, 2003; 夏兰芹等, 2000; Meyer et al., 1992)。为了提高 *CryIAc* 基因的表达量,载体 N31 中第二个 *CryIAc* 基因的启动子采用 CaMV35S 强启动子,在一定程度上可能会提高 *CryIAc* 基因的表达量,但是 CaMV35S 启动子启动的单 *CryIAc* 基因载体中外源基因表达效果如何尚不清楚。刘娇娇等(2014)对转 *CryIAc* 和 *BADH* 基因(由 CaMV35S 启动子启动)烟草中外源基因的表达量进行检测,结果表明 *CryIAc* 毒蛋白含量最高为 414.63 ng/g,而本研究中转双 *CryIAc* 基因株系中 *CryIAc* 毒蛋白含量最高可达 1 533.413 ng/g,表明 *CryIAc* 基因表达量的提高主要由基因叠加引起的。从每种转基因类型来看,转双 *CryIAc* 基因株系 *CryIAc* 基因的变异系数较大,而转单 *CryIAc* 基因株系变异系数较小,其原因可能是转单 *CryIAc* 基因株系外源目的基因只有一个 *CryIAc* 基因,没有其他外源基因的干扰,而转双 *CryIAc* 基因株系一次性插入两个 *CryIAc* 基因,由于两基因相同,可能出现重复序列诱导的甲基化现象(刘悦萍等, 2005),也可能是存在表达时各种底物的竞争,或者两基因间存在一定的互作关系,从而导致基因表达不是十分稳定(Qiu et al., 2017)。

本研究中转单、双 *CryIAc* 基因株系分别对棉铃虫一龄幼虫和二龄幼虫进行抗性实验,结果表明转单、双 *CryIAc* 基因株系对一龄幼虫的致死率均达到 100%,但是转双 *CryIAc* 基因株系对幼虫的致死时间短于转单 *CryIAc* 基因株系;转单、双 *CryIAc* 基因株系对二龄幼虫的致死率均也达到 100%,转双

*CryIAc* 基因株系对幼虫的致死时间较短,综合来看,转双 *CryIAc* 基因株系对棉铃虫的抗虫效果高于转单 *CryIAc* 基因株系。练云等(2008, 科学通报, 53 (6): 658-663)利用获得的转 *CryIAc* 基因烟草对棉铃虫初孵幼虫进行杀虫实验,结果表明饲喂 5 d 时死亡率仅为 73.61%。高珍(2013)在转基因抗虫棉对棉铃虫的致死效应研究中发现,苗期转 *CryIAc* 基因棉花 DP33B 对棉铃虫一龄幼虫的致死率为 91.01%,而蕾期和铃期均下降,分别为 78.15%和 58.93%。与上述研究相比,本研究中转 *CryIAc* 基

表 4 不同类型烟草植株生长特性对比

Table 4 Comparison of growth characteristics of different types of tobacco plants

类型 Type	指标 Index	N31		N7		CK 平均值 Average value of CK
		平均值 Average value	CV	平均值 Average value	CV	
生长性状 Growth traits	株高/cm Plant height	5.079±1.783 b	0.351	8.933±1.449 a	0.162	8.567±2.065 a
	地径/mm Ground diameter	3.517±0.446 a	0.127	4.070±0.349 a	0.086	4.000±1.000 a
	叶片数/个 Number of leaves	8.000±1.333 b	0.167	9.963±0.655 a	0.066	9.667±0.577 a
	叶片长宽比 Leaf aspect ratio	3.185±0.247 a	0.077	2.759±0.171 b	0.062	2.327±0.114 c
光合作用参数 Photosynthetic parameters	净光合速率/( $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) Net photosynthetic rate	4.764±1.353 ab	0.284	3.585±0.741 b	0.207	5.059±0.069 a
	气孔导度/( $\text{mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) Stomatal conductance	0.077±0.030 a	0.385	0.108±0.058 a	0.531	0.095±0.042 a
	胞间 $\text{CO}_2$ 浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) Intercellular $\text{CO}_2$ concentration	1070.443±205.662 a	0.192	1187.336±82.943 a	0.070	1210.654±30.033 a
	蒸腾速率/( $\text{mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) Transpiration rate	1.384±0.566 a	0.409	1.398±0.439 a	0.314	1.438±0.532 a
叶绿素荧光参数 Chlorophyll fluorescence parameters	初始荧光 Initial fluorescence	0.386±0.038 a	0.097	0.332±0.015 b	0.046	0.335±0.025 b
	最大荧光 Maximum fluorescence	1.292±0.072 a	0.056	1.345±0.062 a	0.046	1.318±0.086 a
	光系统 II 的最大光合效率 Maximum photosynthetic efficiency of photosystem II	0.699±0.035 b	0.051	0.752±0.019 a	0.026	0.744±0.031 a
	可变荧光/初始荧光 Variable fluorescence/initial fluorescence	2.406±0.379 b	0.158	3.069±0.307 a	0.100	2.953±0.460 a
	叶绿素含量 Chlorophyll content	0.469±0.122 a	0.261	0.565±0.090 a	0.159	0.656±0.174 a
叶绿素含量 Chlorophyll content	叶绿素 a/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Chlorophyll a	0.172±0.042 b	0.246	0.212±0.036 ab	0.169	0.246±0.061 a
	叶绿素 b/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Chlorophyll b	0.641±0.165 a	0.257	0.777±0.125 a	0.161	0.902±0.235 a
	叶绿素总含量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Total chlorophyll content					

N31: 转双 *CryIAc* 基因株系; N7: 转单 *CryIAc* 基因株系; CK: 非转基因烟草; 同行不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。CV: 变异系数

N31: Transgenic dual *CryIAc* gene lines; N7: Transgenic single *CryIAc* gene lines; CK: Non-transgenic tobacco; Different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). CV: Coefficient of variation



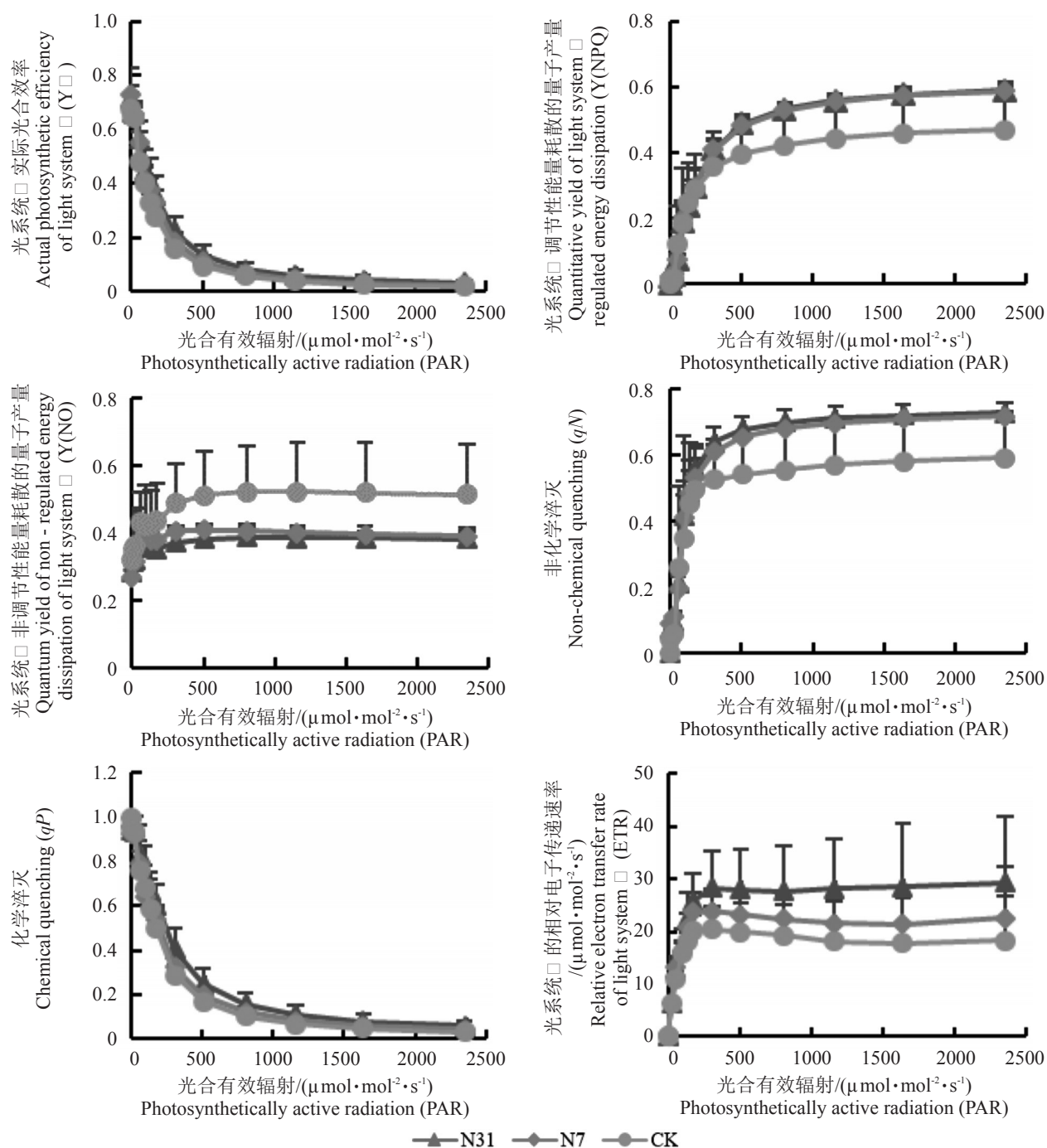


图7 各株系叶绿素荧光参数的光响应

Figure 7 Light response of Chlorophyll fluorescence parameters of every lines

因烟草株系对棉铃虫的抗虫效果较高,且双 *CryIAc* 基因的叠加明显提高了抗虫效果。

转双 *CryIAc* 基因株系的株高要低于转单 *CryIAc* 基因株系和对照,其原因可能为 *CryIAc* 毒蛋白的高表达对植株产生抑制作用,有些毒蛋白表达量低的株系也可能为外源基因插入位置的影响 (Rawat et al., 2011)。有研究表明,使用组成型强启

动子 CaMV35S 可能会出现转基因植株矮化的现象,启动子所驱动基因在植物不需要的情况下仍能够强烈地表达,改变了植物的正常基因调控和代谢途径,影响了植物的生长发育 (高峰等, 2008)。在以后的研究中可以尝试采用诱导性启动子,避免外源基因过表达,对植株本身产生伤害 (柳小庆, 陈茹梅, 2012)。

总的来说,本研究中所用双CryIAc基因植物表达载体对提高CryIAc基因的表达量具有一定的效果,但基因表达不是十分稳定,在以后的研究中可以尝试构建携带双T-DNA的表达载体,每个CryIAc基因位于一个T-DNA上,在转化植物后,两T-DNA随机插入植物基因组中,可能会避免基因互相抑制的机率,但也可能会增加插入位置影响的机率。有研究表明,载体中外源基因的位置及排列顺序对其表达存在一定影响,两外源基因背向式排列时其表达量均达到最高(Qiu et al., 2017),因此在后续研究中还可以将两CryIAc基因排列为背向式结构,以期提高CryIAc基因的表达量,筛选出CryIAc基因高效表达组合类型,为后续其他转抗虫基因植物育种奠定基础。

#### 4 结论

本研究利用农杆菌介导法将分别携带单、双CryIAc基因的植物表达载体转化烟草组培苗,通过卡那霉素筛选及PCR检测,获得转基因株系,表明外源基因已整合至烟草基因组;对各转基因株系进行荧光定量PCR(绝对定量)、ELISA检测及棉铃虫室内饲喂实验,表明外源基因在转录水平和翻译水平均得到表达,各转基因株系在转录水平、翻译水平和抗虫性方面均存在一定差异,但转双CryIAc基因株系要高于转单CryIAc基因株系;对各类型转基因株系进行了生长特性对比研究,结果表明在地径、Pn、Cond、Ci、Tr、Fm、Chla、CT等参数方面转双CryIAc基因株系与对照及转单CryIAc基因株系无显著差异,而在其他参数方面则存在一定差异。综上所述,转双CryIAc基因株系在外源基因表达量上较转单CryIAc基因得到提高,而在植株生长方面未受到明显影响。研究表明,CryIAc基因的叠加可以提高其表达量,并且对植株生长未造成明显影响。本研究为探索提高外源基因表达量的方法及转化其他植物提供一定的理论依据。

#### 参考文献

常丽娟,刘勇,宋君,等. 2013. 转基因植物中外源基因的沉默及应对策略[J]. 生物技术通讯, 24(6): 881-885. (Chang L J, Liu Y, Song J, et al. 2013. Silence of exogenous genes in transgenic plants and the coping strategies [J]. Letters in Biotechnology, 24(6): 881-885.)

崔杰. 2008. 抗虫Bt基因CryIAc甜菜叶绿体遗传转化与表达

研究[D]. 博士学位论文, 哈尔滨工业大学, 导师: 杨谦, pp. 4-8. (Cui J. 2008. Genetic transformation and expression of Bt gene cryIAc in chloroplast of sugar beet [D]. Thesis for Ph.D., Harbin Institute of Technology, Supervisor: Yang Q, pp. 4-8.)

冯妍. 2010. 塔形毛白杨再生体系的建立及Bt抗虫基因工程的研究[D]. 硕士学位论文, 东北林业大学, 导师: 戴绍军, pp. 2-4. (Feng Y. 2010. Regeneration of *Populus tomentosa* Carr. cv 'BJHR01' and research of Bt insect-resistant genetic engineering[D]. Thesis for M.S., Northeast Forestry University, Supervisor: Dai S J, pp. 2-4.)

高峰,熊爱生,彭日荷,等. 2008. 抗逆相关DREB转录因子的研究进展及应用[J]. 上海农业学报, 24(1): 118-123. (Gao F, Xiong A S, Peng R H, et al. 2008. Research progress and application of DREB transcription factor related to stress tolerance[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 24(1): 118-123.)

高珍. 2013. Cry2Ab与CryIAc互作对棉铃虫的影响及相关机制研究[D]. 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 梁草梅, pp. 46-47. (Gao Z. 2013. Study on Cry2Ab and CryIAc interaction and related mechanism against *Helicoverpa armigera* (Hübner)[D]. Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Liang G M, pp. 46-47.)

郭旺珍,孙敬,郭玉芳,等. 2001. 转基因抗虫棉Bt基因不同剂量的聚合与抗虫性表现[J]. 遗传学报, 28(7): 668-676. (Guo W Z, Sun J, Guo Y F, et al. 2001. Investigation of different dosages of inserted Bt genes and their insect-resistance in transgenic Bt cotton[J]. Acta Genetica Sinica, 28(7): 668-676.)

郭兴启,李菡,张杰道,等. 2003. 表达马铃薯Y病毒外壳蛋白基因的转基因烟草抗病机制[J]. 应用与环境生物学报, 9(4): 372-376. (Guo X Q, Li H, Zhang J D, et al. 2003. Evidence for RNA-mediated resistance to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein gene[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 9(4): 372-376.)

华志华,朱学峰,林鸿生,等. 2001. 基因枪转化获得的转基因水稻中外源基因整合与表达规律研究[J]. 遗传学报, 28(11): 1012-1018. (Hua Z H, Zhu X F, Lin H S, et al. 2001. Studies of the integration and expression of exogenes in transgenic rice obtained via particle bombardment transformation[J]. Acta Genetica Sinica, 28(11): 1012-1018.)

李宝健,朱华晨. 2005. 论应用多基因转化策略综合改良生物体遗传性研究方向的前景□. 多基因转化策略中的规律、前景和问题[J]. 中山大学学报(自然科学版), 44

- (4): 79-83. (Li B J, Zhu H C. 2005. On the prospects of applying the multi-gene transformation strategy (MTS) to modify the inheritance of organisms □. General principles, possible problems and prospects of the MTS[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 44(4): 79-83.)
- 李晨, 刘博林. 2015. 转 Bt 基因抗虫作物培育现状及 Bt 蛋白的改造和聚合策略的利用[J]. 生物工程学报, 31(1): 53-64. (Li C, Liu B L. 2015. Bt transgenic crops for insect-resistance and modification of Bt protein and utilization of stacking strategy[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 31(1): 53-64.)
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, pp. 167-169. (Li H S. 2000. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments[M]. Higher Education Press, Beijing, China, pp. 167-169.)
- 刘娇娇, 王桂英, 任亚超, 等. 2014. Bt *CryIAC*、*BADH* 双价基因对烟草的遗传转化及表达检测[J]. 河北林果研究, 29(2): 169-174. (Liu J J, Wang G Y, Ren Y C, et al. 2014. Genetic transformation and expression detection of tobacco transformed by Bt *CryIAC* and *BADH*[J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 29(2): 169-174.)
- 柳小庆, 陈茹梅. 2012. 增强外源基因在转基因植物中表达的策略[J]. 中国农业科技导报, 14(1): 76-84. (Liu X Q, Chen R M. 2012. Strategies for enhancing expression of foreign genes in transgenic plant[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 14(1): 76-84.)
- 刘悦萍, 赵晓萌, 宫飞. 2005. 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, 21(4): 80-83. (Liu Y P, Zhao X M, Gong F. 2005. Advances of researches on the mechanism of transgene silencing in transgenic plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 21(4): 80-83.)
- 石春林, 朱祯, 徐鸿林, 等. 2000. 转基因烟草中 Bt 毒蛋白基因的表达行为[J]. 植物学报, 42(3): 269-273. (Shi C L, Zhu Z, Xu H L, et al. 2000. Expression behavior of Bt toxin gene in transgenic tobaccos[J]. Acta Botanica Sinica, 42(3): 269-273.)
- 孙立洋, 李静, 袁虎威, 等. 2011. *Bt-BADH-GA20ox-rolB* 多基因在转化烟草中的表达分析[J]. 北京林业大学学报, 33: 86-90. (Sun L Y, Li J, Yuan H W, et al. 2011. Expression analysis of *Bt-BADH-GA20ox-rolB* multigenes in transgenic tobacco plant[J]. Journal of Beijing Forestry University, 33: 86-90.)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, pp. 638-659. (Wang G L, Fang H J. 2002. Plant Genetic Engineer[M]. Science Press, Beijing, China, pp. 241-243.)
- 王桂英, 刘晓杰, 冯争光, 等. 2016. 杨树转抗虫基因研究进展[J]. 河北林果研究, 31(4): 325-331. (Wang G Y, Liu X J, Feng Z G, et al. 2016. Research progress review of transgenic poplar with insect-resistant genes[J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 31(4): 325-331.)
- 吴娜拉胡. 2012. 转 Bt *cryIba3* 和 Bt *cryIIa8* 基因抗虫花椰菜的研究[D]. 硕士学位论文, 东北农业大学, 导师: 黄大昉, pp. 33-37. (Wu N L H. 2012. Transformation of cauliflower with Bt *cryIba3* and Bt *cryIIa8* gene[D]. Thesis for M.S., Northeast Agricultural University, Supervisor: Huang D F, pp. 33-37.)
- 夏兰芹, 王远, 郭三堆. 2000. 外源基因在转基因植物中的表达与稳定性[J]. 生物技术通报, 3: 8-12. (Xia L Q, Wang Y, Guo S D. 2000. The stability of the expression of foreign genes in transgenic plants[J]. Biotechnology Information, 3: 8-12.)
- 杨敏生, 李志兰, 王颖, 等. 2006. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达[J]. 林业科学, 42(9): 61-68. (Yang M S, Li Z L, Wang Y, et al. 2006. Transformation and expression of two insect-resistant genes to hybrid triploid of Chinese white poplar[J]. Scientia Silvae Sinica, 42(9): 61-68.)
- 曾凡锁, 詹亚光. 2004. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略[J]. 植物学通报, 21(5): 565-577. (Zeng F G, Zhan Y G. 2004. Integration of exogenous genes in transgenic plant genomes: Characteristics and approaches[J]. Chinese Bulletin of Botany, 21(5): 565-577.)
- 翟琪麟, 安泽伟, 李雅超, 等. 2013. 一种植物双基因共表达载体的构建及应用[J]. 农业生物技术学报, 21(5): 612-620. (Zhai Q L, An Z W, Li Y C, et al. 2013. Construction and application of a co-expression vector for double genes in plants[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(5): 612-620.)
- Assaad F F, Tucker K L, Singer E R. 1993. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 22(6): 1067-1085.
- Cervera M, Pina J A, Juárez J, et al. 2000. A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype[J]. Theoretical and Applied Genetics, 100(5): 670-677.
- Dong H Z, Li W J. 2007. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton[J]. Journal of Agronomy and Crop Sciences, 193: 21-29.



- Dong Y, Ren Y C, Yang M S, et al. 2017. Construction of a new type of multi-gene plant transformation vector and genetic transformation of tobacco[J]. *Biologia Plantarum*, 61(1): 13-23.
- Dorer D R, Henikoff S. 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*[J]. *Cell*, 77(7): 993-1002.
- Elmayan T, Vaucheret H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally [J]. *The Plant Journal*, 9: 787-797.
- Fladung M. 1999. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). □ . Flanking DNA sequences and T-DNA structure [J]. *Molecular General Genetics*, 260(6): 574-581.
- Flavell R B. 1994. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 91(9): 3490-3496.
- Himanen S J, Nissinen A, Dong W X, et al. 2008. Interactions of elevated carbon dioxide and temperature with aphid feeding on transgenic oilseed rape: Are *Bacillus thuringiensis* (Bt) plants more susceptible to nontarget herbivores in future climate[J]. *Global Change Biology*, 14(6): 1437-1454.
- Hobbs S L, Kpodar P, DeLong C M. 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants[J]. *Plant Molecular Biology*, 15(6): 851-864.
- Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 227(4691): 1129-1131.
- Jorgensen R A, Cluster P D, English J, et al. 1996. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs antisense constructs and single copy vs complex T-DNA sequences[J]. *Plant Molecular Biology*, 31: 957-973.
- Kohli A, Griffith S, Palacios N, et al. 1999. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination[J]. *The Plant Journal*, 17(6): 591-601.
- Kumar S, Fladung M. 2000. Transgene repeats in aspen: Molecular characterization suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome[J]. *Molecular General Genetics*, 264(1): 20-28.
- Li X G, Chen S B, Lu Z X, et al. 2002. Impact of copy number on transgene expression in tobacco[J]. *Acta Botanica Sinica*, 44(1): 120-123.
- Linn F, Heidmann L, Saedler H, et al. 1990. Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation[J]. *Molecular General Genetics*, 222(2): 329-336.
- Lu H H, Wu W X, Chen Y X. 2010. Decomposition of Bt transgenic rice residues and response of soil microbial community in rapeseed-rice cropping system[J]. *Plant and Soil*, 336: 279-290.
- Matzke A J, Neuhuber F, Park Y D, et al. 1994. Homology dependent gene silencing in transgenic plants: Epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes[J]. *Molecular General Genetics*, 244(3): 219-229.
- Meyer P, Linn F, Heidmann I, et al. 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *Al* gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 231(3): 345-352.
- Mi X X, Ji X Z, Yang J W, et al. 2015. Transgenic potato plants expressing *cry3A* gene confer resistance to Colorado potato beetle[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7): 443-450.
- Qiu T, Dong Y, Ren Y C, et al. 2017. Effects of the sequence and orientation of an expression cassette in tobacco transformed by dual Bt genes[J]. *Plasmid*, 89: 1-8.
- Rawat P, Singh A K, Ray K, et al. 2011. Detrimental effect of expression of Bt endotoxin *CryIAc* on *in vitro* regeneration, *in vivo* growth and development of tobacco and cotton transgenics[J]. *Journal of Biosciences*, 36(2): 363-376.
- Rensburg J B J V. 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt- transgenic maize[J]. *South African Journal of Plant and Soil*, 24(3): 147-151.
- Wang G, Zhang J, Song F, et al. 2008. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting nontarget species in the field[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5): 1536-1543.
- Yang H, Singsit C, Wang A, et al. 1998. Transgenic peanut plants containing a nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus show divergent levels of gene expression[J]. *Plant Cell Reports*, 17(9): 693-699.

(责任编辑 杜霜慧)