

抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析

谢龙旭¹ 徐培林^{1*} 聂燕芳¹ 田颖川^{2*}

¹(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

²(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 构建了含草甘膦抗性突变基因(*aroAM12*)和人工合成重组 Bt 抗虫基因(*Bts1m*)的植物表达载体 pCM12-s1m。*aroAM12* 基因的表达由 CaMV35S 启动子控制, *Bts1m* 基因的表达由 2E-CaMV35S 启动子和 Ω 因子控制。通过农杆菌介导, 将 *aroAM12* 和 *Bts1m* 基因转化到烟草中, 转基因烟草通过在含草甘膦的 MS 培养基上筛选而获得。Southern blot 分析表明所有经过草甘膦筛选出的转化植株都整合有 *aroAM12* 基因, 约 70% 的转化植株同时整合有 *aroAM12* 和 *Bts1m* 基因。Northern blot、Immunodot blot 分析进一步证明整合的两个基因在转录、翻译水平上均进行了表达, 不同植株之间表达存在着差异。草甘膦抗性和虫试实验证明, 获得的转基因烟草对草甘膦和烟青虫具有很强的抗性。

关键词 转基因烟草, 草甘膦, *aroAM12*, *Bts1m*, 植物表达载体

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0545-07

标记基因是植物转基因工作的重要工具。草甘膦是一种内吸广谱性除草剂, 具有高效、低毒的特点^[1], 所以是一种理想的植物筛选剂。Comai 和 Padgett 等分别对鼠伤寒沙门氏杆菌的草甘膦抗性基因(*aroA*)、大肠杆菌的 *aroA* 基因进行了定点突变后转化烟草和豌豆, 表现出较高水平的草甘膦抗性^[2, 3]。此外, 把来源于农杆菌变种 EPSPs 莽草酸羟基乙烯转移酶(EPSPs)基因(*CP4*)导入甜菜、棉花和大豆中, 成功获得具有草甘膦抗性的转基因作物^[4-6]。由于草害和虫害均是农作物减产的重要原因, 因此培育抗虫抗除草剂作物具有很大的商业价值。本文构建了含本实验室通过基因优化技术(Gene shuffling)^[7]获得的 *aroAM12* 基因和中国科学院微生物研究所田颖川等合成的苏云金芽孢杆菌(Bt)杀虫蛋白基因(*Bts1m*)双价基因植物表达载体(pCM12-s1m), 通过农杆菌介导法将其导入烟草中, 并且首次用 *aroAM12* 基因为选择标记, 筛选出抗草甘膦、抗虫双抗植株, 为进一步作物转化奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和培养基

pCAMBIA1300 和 pCR2.1 分别购自 CAMBIA 和 Novagen 公司。大肠杆菌 XL1-Blue 和农杆菌 LBA4404 由本实验室保存。LB 培养基用于培养大肠杆菌, YEB 培养基用于培养农杆菌。

1.2 酶与试剂

各种内切酶购自 Promega 公司; 质粒回收、胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 探针制备试剂盒、总 RNA 提取、BCPI/NBT System Blot 试剂盒均购 MBI Fermentas 公司; 引物由上海博亚(BioAsia)公司合成。

1.3 植物表达载体的构建

含 2E-35S- Ω -*Bts1m* 片段^[8]的 pBtpCR2.1 和含 CaMV35S-TSP-*aroAM12* 片段的 pGAT1300 质粒由本实验室构建并保存。用 *Hind* III + *Xba* I 分别切割 pBtpCR2.1 和 pGAT1300, 通过琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段。将 2E-35S-*Bts1m* 和 35S-TSP-*aroAM12* 片段同时克隆到 pCAMBIA1300 中, 最终得到抗虫、抗

收稿日期 2003-03-14, 修回日期 2003-06-11。

基金项目 国家 863 高技术研究发展计划项目资助(No. 2001AA212191)。

* 通讯作者。1 Tel: 86-20-84038085; Fax: 86-20-84113676; E-mail: 13640737322@163.net

2 Tel: 86-10-62642577; E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

除草剂的双价植物表达载体 pCM12-s1m (见图 1), 用氯化钙法^[9]将 pCM12-s1m 导入土壤农杆菌 LBA4404 中。

1.4 烟草外植体的转化

烟草 (*N. tacaccum* cv *Xanthi*) 转化采用叶盘法^[10]。4~5 叶期的烟草无菌苗叶盘 (0.5 cm × 0.5 cm) 用含有 pCM12-s1m 的土壤农杆菌 LBA4404 感染后, 置于分化培养基 (MS + 1mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂) 上培养, 1 周后将叶盘移入含 0.03 mmol/L 草甘膦的分化培养基上再生。30 d 后, 将分化出的不定芽移入含 0.05 mmol/L 草甘膦的生根培养基 (MS + NAA 0.1 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂) 上, 待根系形成后炼苗, 移入温室盆栽。

1.5 转化烟草植物的 PCR 分析

检测转 *aroAM12* 基因引物 P1 5' > CATGCCAT-GGAATCCCTGACGTTACAA < 3'; P2 5' > CGCGATC-CTTAGCAGGCTACTCATTC < 3', 应扩增出 1.3kb 大小的片段; 检测转 *Bt*s1m 基因引物 P3 5' > TATCCCAT-TGTTCCGAGTCC < 3'; P4: 5' > CATCAGACT-CAAGTTGTTA-3', 应扩增出 0.96kb 大小的片段。取 50 ng 总 DNA, 在 20 μL 反应体系中进行目的基因的扩增。扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 然后以 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.6 转基因烟草对草甘膦的抗性实验

离体实验 将转基因烟草和野生型烟草的叶盘, 分别置于含不同浓度 (0 ~ 1.20 mmol/L) 草甘膦的分化培养基上, 28 ± 2℃、光照/黑暗 = 16/8 h 条件下培养, 观察叶盘分化情况。整株实验 待移栽的烟草长至 15 ~ 20 cm 高时, 用 0.5% 的除草剂 Roundup® 喷洒, 每 3 d 一次, 一共喷洒 3 次, 观察苗的受损伤情况。

1.7 转基因烟草抗虫实验

将转基因烟草和野生型烟草叶片分别放入铺有浸湿滤纸的培养皿中, 叶柄基部用湿润的脱脂棉球包裹。将 2 龄烟青虫 (*H. assulta*, 中山大学生物防治国家重点实验室提供) 预先称重, 每个叶片接虫 4 头, 于 28 ± 2℃、光照/黑暗 = 16/8 h 的温室中培养, 3 d 后观察幼虫生存和发育情况并称重。每组实验重复 3 次。

1.8 转基因烟草 Southern blot 检测

烟草基因组 DNA 提取参照 Edwards 等方法^[11], 取 25 μg 总 DNA, 经 *EcoR* I 完全酶切后, 0.8% 琼脂

糖胶电泳, 将 DNA 转移到 Hybond-N⁺ 尼龙膜上, 用 α-³²P-dCTP 作为标记的 DNA 探针进行分子杂交^[8]。

1.9 转基因烟草 Northern blot 检测

用 RNA 提取试剂盒提取烟草总 RNA。取 5 μg RNA, 1.2% 的含有甲醛的变性 Agarose 电泳, 将 RNA 转移到 Hybond-N⁺ 尼龙膜上, 用 α-³²P-dCTP 作为标记的 DNA 探针进行分子杂交^[8]。

1.10 转基因烟草 Immunodot blot 检测

取烟草幼叶, 液氮冷冻后研碎, 加入提取缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl, 0.02% NaN₃, 0.001% PMSF pH 9.0), 离心, 取上清, 得到植物总蛋白粗提物。采用 Bradford 法^[12]测定蛋白浓度。参照 BCPI/NBT System blot 试剂盒所提供的方法, 分别用 EPSPs 抗血清 (兔抗血清, 效价 1:200, 实验室自制) 和 Bt 蛋白抗血清 (兔抗血清, 效价 1:250), 进行 Immunodot blot 检测。

2 结果

2.1 植物表达载体 pCM12-s1m 的构建

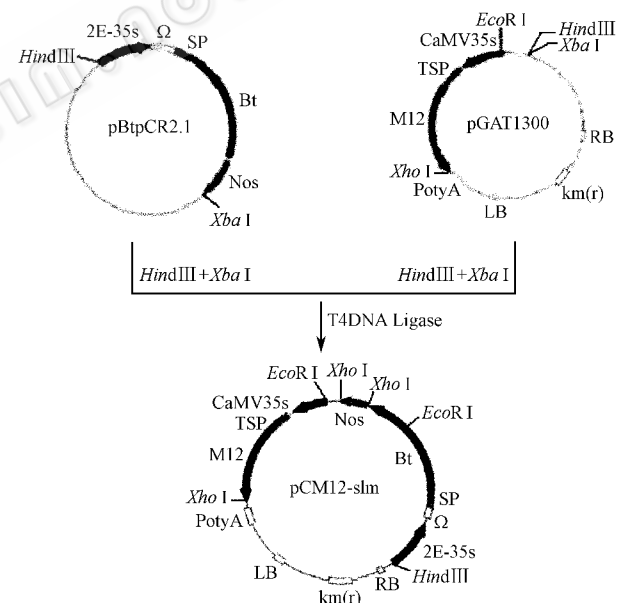


图 1 植物表达载体 pCM12-s1m 的构建

Fig. 1 Construction of the plant expression vector pCM12-s1m

本研究在原构建的 pBtpCR2.1 和 pGAT1300 基础上再次进行了组合, 得到抗草甘膦、抗虫植物双价基因表达载体 pCM12-s1m (图 1)。因为整个芳香族氨基酸的合成过程是在叶绿体中进行, 所以在 *aroAM12* 基因 5' 端连接了一段 220 bp 的烟草 EPSPs 信号肽编码区 (TSP) 序列, 使 *aroAM12* 的表达产物最终被导入叶绿体中^[13]。*aroAM12* 基因表达由 CaMV35S 启动子控制。为使植物表达的 Bt 杀虫蛋白能分泌到胞外以提高杀虫蛋白的稳定性, 在

*Bt*s1*m* 基因前添加了烟草致病相关蛋白的信号肽 (PR1b) 编码区序列, 同时在该基因的前面加有 2E-35S 强启动子和有增强翻译功能的烟草花叶病毒 (TMV) RNA 的 Ω 片段编码序列以便提高 *Bt*s1*m* 的表达量。

2.2 烟草外植体转化的筛选

本实验共接种 150 块外植体, 在含 0.03 mmol/L 草甘膦的分化培养基上筛选, 得到 60 个左右不定芽, 而后将其转移到含 0.05 mmol/L 草甘膦的生根培养基上, 诱导根的形成, 最终获得 40 棵具有良好根系的烟草植株。转化率约为 27% (40/150)。

2.3 转化烟草植物的 PCR 检测

采用 PCR 技术快速检测外源基因的整合情况。用 P1、P2 (*aroAM12* 引物) 扩增应得到 1.3kb 的 DNA 片段, 而用 P3、P4 (*BtS1m* 引物) 扩增应得到 0.96kb 的 DNA 片段。图 2 为部分转化植株 PCR 扩增结果。图 2(a) 中, 6 株转化烟草 (3~8) 均有 1.3kb 大小的片段出现, 和阳性对照扩增出的片段大小相同, 而阴性对照则没有该条带的出现。图 2(b) 表明有 4 株 (3~6) 通过转化得到的烟草中有 0.96kb 大小的片段, 同阳性对照大小相符, 而阴性对照和 2 株 (7~8) 经过转化的烟草无相应条带出现, 证明这两株烟草中没有整合 *Bt*s1*m* 基因。筛选得到的 40 棵植株经 PCR 检测, 全部含 *aroAM12* 基因, 而用 *Bt*s1*m* 基因的引物对该 40 棵植株检测, 只有 28 棵 PCR 阳性, 12 棵无相应条带出现。这一结果表明, 在双价表达载体携带有外源基因的 T-DNA 片段整合到植物染色体的过程中, 有 30% (12/40) 的 *Bt*s1*m* 基因丢失。

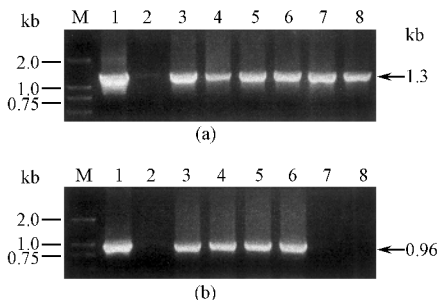


图 2 转化烟草的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of tobacco plants transformed with pCM12-s1m

The DNA was amplified with (a) *aroAM12* primers or (b) *Bt*s1*m* primers. M. DNA ladder; 1. Positive control; 2. Negative control; 3~8. Transgenic plants M12-Bt/a, M12-Bt/b, M12-Bt/c, M12-Bt/d, M12-Bt/e and M12-Bt/f

2.4 转基因烟草的草甘膦抗性分析

为了检测转基因烟草对草甘膦的抗性情况, 将

40 株转基因烟草叶片在含有不同草甘膦浓度的分化培养基上培养。结果表明所有转基因烟草叶片均能在含 1.00 mmol/L 草甘膦浓度的培养基上萌芽, 部分能抗 1.20 mmol/L 草甘膦, 而非转基因烟草在含 0.02 mmol/L 草甘膦浓度的培养基上叶片逐渐失绿变白而死亡 (Plate I -A(a)) 表明获得的烟草植株抗性提高了 50~60 倍。整株烟草对草甘膦的抗性如 Plate I -A(b) 所示, 用 0.5% 的除草剂 Roundup (r) 约 7.7 mmol/L 喷洒 3 次后, 未转化烟草枯萎变黄, 而转基因植株生长没有受到明显影响, 表明获得的转基因烟草具有很强的抗性。

2.5 转基因烟草的抗虫实验

将经过 PCR 检测 *Bt*s1*m* 基因呈阳性的 28 株转化烟草进行虫试实验。室内饲养 3 d 后发现, 尽管抗性强弱程度不同, 但所有检测的植株均对烟青虫产生抗性。Plate I -B 为经过 3 d 后烟青虫的取食情况: 1、2、3 株转基因烟草叶片上的烟青虫取食少量叶片后就停止进食, 继续培养到第 6 天, 全部死亡, 而对照的野生型烟草则被取食干净, 烟青虫生长发育没有受到明显影响。其具体发育和死亡情况见表 1。

表 1 转基因烟草对烟青虫 *H. assulta* 幼虫生存和发育的影响

Table 1 Effects of transgenic tobacco on survival and development of *H. assulta* of second instar larvae at three and six day infestation

Number. assayed plants	Mortality/%		Survival weight/mg	Leaf consumption
	3days	6days	3days	3days
1	88.5	100	0.6 ± 0.3	+
2	80.0	90.0	0.8 ± 0.2	+
3	85.0	100	0.6 ± 0.35	++
4	80.0	100	0.5 ± 0.28	+
5	82.0	95.0	0.7 ± 0.25	+
CK	0	0	5.5 ± 0.4	++++

1~6. Transgenic plant M12-Bt/a, M12-Bt/b, M12-Bt/c, M12-Bt/d, M12-Bt/g; CK. Untransformed control plant.

从以上结果可以看出, 整合到烟草植株中的 *Bt*s1*m* 基因成功表达出了高活性的 Bt 毒性。

2.6 转基因烟草的 Southern blot 分析

根据表达载体上酶切位点的分布情况 (图 3c), 采用 Southern blot 对转化体的再生植株进行分析, 以检测外源基因的整合情况。从图 5a 中可以看出, *aroAM12* 基因序列内没有 *EcoR*I 酶切位点, 所以出

现的杂交带条数就是 *aroAM12* 基因在植株中的拷贝数,从 1~6 依次为 1、3、2、2、1、1。*Bts1m* 基因序列内部有一个 *EcoR I* 酶切位点,而且该位点恰好位于同 *Bts1m* 基因探针互补区域内,所以用 *EcoR I* 酶切时,无论插入几个拷贝的 T-DNA,必定会切出一条恒定大小(1.1kb)的 DNA 片段。从图 4b 中所出现的杂交条带(1~4)上可以看出,在大约 1.1kb 大小处

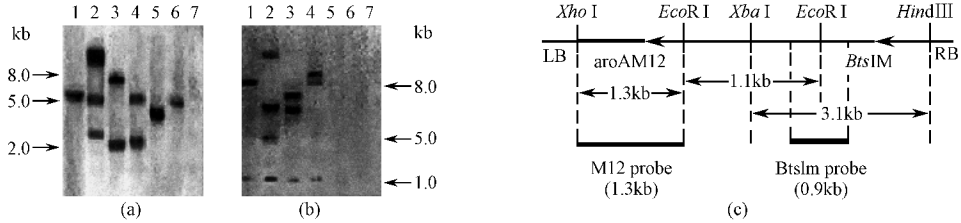


图 3 转基因烟草植株的 Southern blot 分析

Fig. 3 Southern blot analysis of transgenic tobacco plants

Lines 1 ~ 6. Transgenic plant M12-Bt/a ,M12-Bt/b ,M12-Bt/c , M12-Bt/d ,M12-Bt/e and M12-Bt/f ; Line 7. Untransformed control plant. The DNA was digested with *EcoR I* and hybridized with *aroAM12* DNA fragment (a) or with *Bts1m* DNA fragment (b). Penal (c). Map of the T-DNA region of the vector pCM12-s1m. Locations of the probes were indicated

2.7 转基因烟草的 Northern blot 分析

使用相同标记的 DNA 探针进行 Northern blot 分析。从杂交结果(图 4a、b)发现,用 *aroAM12* 基因探针杂交时,所有的转化植株都出现了明显的杂交信号,杂交条带约为 1.30kb 左右,与期望值大小相近,而阴性对照未出现任何杂交信号,表明 *aroAM12* 基

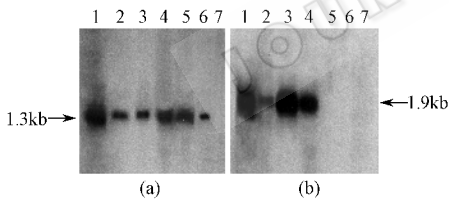


图 4 转基因烟草的 Northern blot 分析

Fig. 4 Northern blot analysis of transgenic tobacco plants

Lines 1 ~ 6. Transgenic plants M12-Bt/a ,M12-Bt/b , M12-Bt/c , M12-Bt/d ,M12-Bt/e and M12-Bt/f ; line 7. Untransformed control plant. The RNA was hybridized with *aroAM12* DNA fragment (a) or with *Bts1m* DNA fragment (b).

因在转录水平上进行了有效表达。从杂交信号上看,1 号植株最强,4、5 次之,2、3、6 相对较弱,表明 mRNA 在转录水平上存在差异。用 *Bts1m* 基因探针杂交时,只有 4 个植株(1~4)出现了明显的杂交信号,杂交条带大小约为 1.90kb 左右,也与期望值大小相近,而 2 个经过转化的植株(5~6)和阴性对照则未出现任何杂交信号,表明该 4 个植株的 *Bts1m* 基因在转录水平上得到了表达,5、6 两植株在 T-DNA 整合过程中 *Bts1m* 基因丢失,因此没有相应的 mRNA 存在。

出现了一条共有的条带,其它杂交带数目、大小反映外源基因的拷贝数和整合情况。结合图 3a 及图 3c,可以判断出从第 1 到第 4 株的杂交带条数分别为 1、3、2、2。Southern blot 杂交结果进一步表明在 T-DNA 整合过程中,同 PCR 结果相符合,即存在部分 *Bts1m* 基因丢失。

2.8 转基因烟草的 Immunodot blot 检测

用 EPSPS 抗血清同植物总粗蛋白反应时(样品均稀释为 5mg/mL,每个样品取 5 μ L),阳性对照和所有的转化植株都出现了明显的信号,而未转化植株则只有很弱的背景信号(Plate 1-C(a)),表明 *aroAM12* 基因在翻译水平上进行了有效的表达。

3 讨论

利用抗生素类抗性基因作为标记基因备受关注,人们担心携带这类基因的重组微生物或转基因植物可能将其抗性基因转移到环境或肠道微生物中,导致抗生素抗性的广泛传播。草甘膦具有对人畜无毒,且能在土壤中迅速被降解的优点,因此是一种理想的筛选剂。草甘膦可无选择地抑制植物的 EPSPS 活性^[2],阻断芳香族氨基酸的合成,从而阻断植物的生长。以往获得抗草甘膦转基因农作物的途径主要有:1)导入过量表达的 EPSPs 基因(*aroA*),以此抵御草甘膦的竞争性抑制;2)通过定点突变,获得对草甘膦低亲和性或无亲和性的 EPSPs。本文所采用基因优化技术(Gene shuffling)获得的草甘膦抗性突变体 *aroAM12* 的表达产物在多个氨基酸位点发生了突变,导致酶对底物 PEP 亲和性增加,同时对草甘膦的亲和性下降,从而提高了对草甘膦的抗性^[7]。以 *aroAM12* 基因为筛选标记基因组合改良的 *Bts1m* 抗虫基因,通过农杆菌介导法,用草甘膦筛选出的 R₀ 代转化植株中几乎都抗草甘膦,它的转化率

约为 27%。另外,在本研究进行的同时,用潮霉素作为选择标记,筛选出含鼠伤寒沙门氏杆菌 *Salmonella typhimurium* 的 EPSP 合成酶基因(*StaroA*)转化植株,草甘膦抗性实验分析发现在草甘膦浓度为 0.03 mmol/L 时几乎没有芽分化出来(资料略),因此野生型 *StaroA* 基因不能作为筛选标记,同时也证明 *aroAM12* 基因同 *StaroA* 基因相比,抗性大幅提高(30~40 倍)。本研究所采用的 Bt 基因是人工合成的重组基因,由 CryIAb N 端的 331 个氨基酸和 CryIAc C 端 284 个氨基酸组合而成,在 5' 端添加了烟草致病相关蛋白的信号肽 PR1b 编码区序列^[8]。通过筛选得到的抗虫烟草植株尽管单株间所表现出的抗性呈现一定的差异,但抗虫能力都很强,并且植株的其它生长性状并未受到影响,说明组建的嵌合 *Bts1m* 基因进行了充分的表达。Southern blot 结果表明,具有双抗性的转基因植株同时整合有 *aroAM12* 和 *Bts1m* 基因,而抗草甘膦不抗虫的转基因植株,只能检测到 *aroAM12* 基因。这表明大约有 30% 的 *Bts1m* 基因在整合过程中丢失。这一结果同 Tinland 得到的结论相符^[15],所以在植物表达载体中,选择标记基因的位置,通常靠近 T-DNA 左边界,减小转化细胞携带缩短减切 T-DNA 的可能。Southern blot 还证明不同转基因植株中的外源基因的拷贝数不同并且整合位点是随机的。通过对 Northern blot、Immunoblot 及草甘膦抗性和虫试结果分析发现,转基因植株抗性的强弱,同插入的基因拷贝数并不呈正相关,有些多拷贝插入的植株抗性反而下降,这可能是由基因沉默现象造成的^[16]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Forlani G, Mangiagalli A. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, **31**(7): 991 - 997
- [2] Comai L, Facciotti D, Hiatt W R *et al.* Expression in plant of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature*, 1985, **317**(24): 741 - 774
- [3] Padgett S R, Re D B, Gasser C S *et al.* Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. *J Biol Chem*, 1991, **266**(33): 22364 - 22369
- [4] Mannerlöf M, Tuveesson S, Steen P *et al.* Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica*, 1997, **94**(1): 83 - 91
- [5] Nida D L, Kolacz K H, Buehler R E *et al.* Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *J Agric Food Chem*, 1996, **44**(7): 1960 - 1966
- [6] Padgett S R, Kolacz K H, Delanny X *et al.* Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*, 1995, **35**(5): 1451 - 1460
- [7] HE M (何鸣), ZENG H Y (曾海燕), XU P L (徐培林) *et al.* Cloning and mutagenesis of the *aroA* gene. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sun Yat Seni* (中山大学学报), 2002, **41**(2): 76 - 79
- [8] ZHAO C Y (赵存友), YUAN Z Q (袁正强), QIN H M (秦红敏) *et al.* Studies on transgenic tobacco plants expressing two kinds of insect resistant genes. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(3): 273 - 277
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Horch R B, Fry J E, Hoffmann N L *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, **227**(4691): 1229 - 1231
- [11] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**(6): 1349
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 - 254
- [13] Della-Cioppa G, Bauer S C, Klein B K *et al.* Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, **83**(18): 6873 - 6877
- [14] Tinlind B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Sciences*, 1991, **1**(6): 178 - 184
- [15] Vaucheret H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, 2001, **17**(1): 29 - 34

Construction of a Vector Conferring Herbicide and Pest Resistance in Tobacco Plant

XIE Long-Xu¹ XU Pei-Lin^{1*} NIE Yan-Fang¹ TIAN Ying-Chuan^{2*}

¹(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

²(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Science , Beijing 100080 , China)

Abstract A binary plant expression vector , pCM12-slm , carrying the *aroAM12* mutant gene encoding bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS) and the *Bts1m* recombinant gene consisting of 331 N-terminal amino acids of CryIAC and 284 C-terminal amino acids of CryIAb has been constructed. The truncated *Bts1* gene was fused with the PR1b signal peptide sequence and expressed in tobacco plants under the control of 2E-CaMV35S promoter and the omega(Ω) translation enhancer sequence from tobacco mosaic virus. The mutant *aroAM12* was fused with the transit sequence of tobacco EPSPS and expressed in tobacco plants under the control of the CaMV35S promoter. Tobacco leaves were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring the pCM12-slm plasmid , and the transgenic plants were selected directly on medium containing the herbicide. Forty glyphosate resistant plants were regenerated , with a transformation frequency of 27% . Transgenic plants were initially assessed for glyphosate resistance by placing leaf discs on shoot induction media containing the herbicide. Rooted plantlets , propagated from selected transgenic tobacco , were transferred to soil in a greenhouse and tested for glyphosate resistance by spraying them with Roundup at a commercial recommended dose. The glyphosate resistance assay indicated that all the transgenic plants showed highly resistant to the herbicide. The PCR assay showed that the *aroAM12* gene was present in all of the 40 T₀ transfer plants , and *Bts1m* genes present in 28 of 40 of the transgenic plants. Southern blot analysis further confirmed that the copy number of the transgenes varied from one to three copies in different transgenic plants. Northern blot and immunodot blot showed that the *aroAM12* and *Bts1m* genes were expressed at the transcription and translation levels. Transgenic plants containing both the *aroAM12* and *Bts1m* genes were further assessed for insect resistance. Tobacco leaves of T₀ transgenic plants were infested with tobacco bollworm *H. assulta* larvae for 6 days. The result(table 1) showed that the survival rate of insect larvae was between 0 ~ 10% , and the growth of insect larvae was seriously inhibited , suggesting pCM12-slm as a dual functional vector with potential application in breeding of glyphosate and insect resistance transgenic plants.

Key words transgenic tobacco , glyphosate , *aroAM12* , *Bts1m* , plant expression vector

Received : 03-14-2003

This work was supported by grant from the State 863 High Technology R&D Project of China(No. 2001AA212191).

* Corresponding author. 1 Tel : 86-20-84038085 ; Fax : 86-20-84113676 ; E-mail : 13640737322@163.net

2 Tel : 86-10-62642577 ; E-mail : tianyc@sun.im.ac.cn