

# 转抗虫基因三倍体毛白杨植株体内 农杆菌残存与逃逸

杨敏生<sup>1</sup>, 米 丹<sup>1</sup>, D. Ewald<sup>2</sup>, 王 颖<sup>3</sup>, 梁海永<sup>1</sup>, 甄志先<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学, 保定 071000; 2 Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, BFH, Germany;

3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

**摘要:**用部分改造的 *BtCry1Ac* 基因与慈菇蛋白酶抑制剂 (*API*) 基因构建的双抗虫基因表达载体,通过农杆菌介导法对三倍体毛白杨进行了转化,对转化后植株体内残存农杆菌在继代培养和移栽过程中进行了跟踪检测。结果表明:通过对转化再生植株的分子生物学检测,42 个株系中,33 个株系为阳性,阳性率达到 80%;用 Bt 毒蛋白抗血清进行 ELISA 检测结果表明,7 个转基因株系都有 Bt 杀虫蛋白表达;基因转化后,可采用附加 50 mg/L 卡那霉素,300 mg/L 羧苄青霉素的筛选培养基消除细菌并进行抗性芽筛选。对 28 个转基因株系叶片、茎段和根段在含有卡那霉素 50 mg/L YEB 培养基上进行细菌培养,通过在 T-DNA 区、质粒 *Vir* 区和农杆菌基因组设计引物,进行 PCR 检测,证明有 3 个株系(33、37、5 号)检测到残存工程农杆菌,并在组培瓶中存活 24 个月。将带菌的 3 个株系组培苗移栽到花盆中,室内培养 1 个月后,在 33 号株系根际土壤中检测到了目的农杆菌。

**关键词:**双抗虫基因;三倍体毛白杨;残存农杆菌;根际土壤

文章编号:1000-0933(2006)11-3555-07 中图分类号:Q968 文献标识码:A

## The survival and escape of *Agrobacterium tumefaciens* in triploid hybrid lines of Chinese white poplar transformed with two insect-resistant genes

YANG Min-Sheng<sup>1</sup>, MI Dan<sup>1</sup>, D. Ewald<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, LIANG Hai-Yong<sup>1</sup>, ZHEN Zhi-Xian<sup>1</sup> (1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China; 2. Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, BFH, D-15377 Waldsiedersdorf, Germany; 3. Institute of Tropical Biological sciences, State key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Haikou 571101, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3555 ~ 3561.

**Abstract:** Two partly modified insect-resistant genes (*BtCry1Ac* gene [Bt gene toxin against Lepidopteran insects] and *API* gene [arrowhead proteinase inhibitor]) were transferred to the triploid hybrid of Chinese white poplar ((*Populus tomentosa* Carr. × *Populus bolleana* Louche) × *Populus tomentosa* Carr.) mediated by *A. tumefaciens*. An examination was made concerning the survival of *Agrobacterium* in transgenic plants during the process of transplanting and subculturing on the nutrient medium. Results suggested that 80% of plants, which we got by repetitious selection on media added with 50 mg/L kanamycin and 300 mg/L carbenicillin showed positive reactions after examination with molecular methods. The ELISA test indicated that the Bt toxoprotein was expressed in 7 of the transgenic sub-clones. Leaves, stems and roots of all the 28 transgenic plants were cultured on the YEB medium added with 50 mg/L kanamycin and the survival of *Agrobacterium* was detected in 3 sub-clones (33, 37, 5) which could have existed for 24 months in the bottle. Those 3 transgenic sub-clones were transplanted and cultivated for one month in the room, and then the target *Agrobacterium* was found in rhizosphere of the sub-clone 33.

**Key words:** two partly modified insect-resistant genes; triploid hybrid of Chinese white poplar; *Agrobacterium*; rhizosphere

随着遗传修饰的生物体 (Genetically modified organisms GMOs) 步入商业化道路,关于 GMOs 释放所带来的风

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371176)

收稿日期:2006-01-10;修订日期:2006-08-30

作者简介:杨敏生(1962~),男,内蒙古多伦县人,博士,教授,主要从事林业生物技术及抗逆生理研究. E-mail: dueloo@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371176)

Received date: 2006-01-10; Accepted date: 2006-08-30

Biography: YANG Min-Sheng, Ph. D., Professor, mainly engaged in forest biotechnology and tree stress physiology. E-mail: dueloo@yahoo.com.cn

险性便也成为安全性评价的焦点<sup>[1-13]</sup>。目前,对转基因植物环境安全性方面的考虑主要集中在转基因漂流(transgen flow/dispersal)所造成的转基因作物与其野生亲缘种间的基因流动以及转基因产物进入土壤后对土壤生物多样性的影响等问题上。转基因植物中外源基因流动的途径大致有两个:一是通过转基因植物的种子或组织扩散到新的生境中,并生存下来;二是通过花粉向同种或近缘种非转基因植物转移。不断有研究证实这些不同来源的转基因,通过花粉向相关植物野生种或近缘种转移的事实。可能存在的第三条漂流途径是非同种生物间,如植物与微生物(细菌、真菌、病毒等)间在自然界中发生基因转移,但这条途径至今还未得到充分的理论证明<sup>[6]</sup>。在这条途径中,农杆菌可能扮演着重要角色。

农杆菌介导的遗传转化已成为植物基因转化的首选方法。在众多的转基因植物中,80%是由农杆菌介导转化获得的<sup>[14-18]</sup>。在树木基因转化中,应用农杆菌介导法已先后在欧洲黑杨、毛白杨、杨树、松树、香枫、云杉、刺槐、苹果、李、桃、杏、猕猴桃、柑橘等多种树种上得到转化再生植株<sup>[18,19]</sup>。通过农杆菌介导进行植物基因转化中,如果遗传修饰的工程农杆菌在植物体内存活,可将携带外源基因的工程农杆菌释放到土壤中,并为质粒在土壤微生物间穿梭提供可能性。本文报道了通过农杆菌介导法,将构建在一个载体上的双抗虫基因(*BtCry1Ac* 基因和慈菇蛋白酶抑制剂基因 *API-A* 基因)转化三倍体毛白杨,并对转化植株体内工程农杆菌存活动态进行了检测,为外源基因在非同种生物间转移提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

将部分改造后的 *BtCry1Ac* 杀虫蛋白基因(简称 Bt 基因)和慈菇蛋白酶抑制剂(*API-A*)基因构建在一个植物表达载体 *pBtiA* 上,所含的抗性筛选标记基因为卡那霉素抗性基因 *Npt* (新霉素磷酸转移酶基因)。土壤农杆菌 LBA4404 及以上载体由中国科学院微生物研究所田颖川构建并提供<sup>[20]</sup>。含有双抗虫基因的表达载体如图 1 所示。

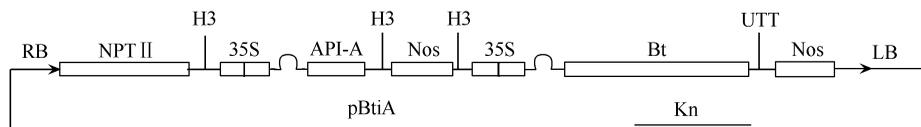


图 1 含有双抗虫基因的表达载体

Fig. 1 Expression vector carrying two insect-resistant genes

### 1.2 植物材料

采用北京林业大学培育的三倍体毛白杨((毛白杨 × 新疆杨) × 毛白杨)无性系 73 作为试验植物材料。

### 1.3 转化方法

采用农杆菌介导法进行基因转化。将叶片在活化的农杆菌中浸菌 20min,共培养 3d,将叶片洗净并在附加 50 mg/L 卡那霉素,300 mg/L 羧苄青霉素的筛选培养基上培养。诱导叶片不定芽分化和诱导芽增殖培养基为 MS + 6-BA0.6mg/L + NAA0.1mg/L,诱导嫩茎生根培养基为 1/2MS + IBA0.4mg/L。在生根及连续 12 个月继代增殖培养中,培养基附加 50 mg/L 卡那霉素和羧苄青霉素 200mg/L。培养条件为:每天照光 14h,光照强度 2000lx,温度(25 ± 2)。

### 1.4 转化植株的分子生物学检测

采用地高辛试剂盒进行 Southern blot 检测,试剂盒购自美国 Roche Diagnostics 公司。用 *Bam*H 对所提取 DNA 进行酶切,杂交检测方法参照田颖川等<sup>[20]</sup>。Bt 毒蛋白检测中,蛋白质的提取按照 Perlak 等<sup>[21]</sup>所述的方法进行。用 BioRad550 型酶标仪测定结果。ELISA 试剂盒购自美国 Agdia 公司。

### 1.5 转化植株细菌培养方法

1.5.1 组培苗细菌培养 分别取继代培养不同时期各转基因株系组培苗根段、茎段、叶片于含卡那霉素 50 mg/L、利福平 20 mg/L、链霉素 50mg/L 的 YEB 固体培养基平板上,培养箱中(28 ± 1) 培养过夜,每天观察并记

录菌生长情况。将各系号所长的菌挑出置于同样的平板上,待其长出菌后,挑入 YEB 液体培养基中(含卡那霉素 50 mg/L、利福平 20 mg/L、链霉素 50mg/L),振荡培养,提取细菌总 DNA 和质粒 DNA 进行 PCR 检测。

1.5.2 土壤和植物组织中农杆菌的分离:将组培苗移栽到经过灭菌的盆土壤中,室内培养 1 个月后,分别取转基因各株系根段、茎段、叶片表面消毒后,于无菌研钵中研成浆状,倒入 YEB 培养液(20 ml)中震荡培养过夜。将根部携带的大块土粒除去,并在无菌水中洗过后,置于 YEB 培养液震荡 20 min 得根际土悬液。菌针挑取震荡后培养液于含卡那霉素 50 mg/L、利福平 20 mg/L、链霉素 50 mg/L 的 YEB 固体培养基上划线,(28 ±1) 培养箱中培养,待长菌后挑选与目的农杆菌相似的菌落并纯化。检测方法同上。

## 1.6 工程农杆菌检测引物设计

为检测工程农杆菌在植物内存活,在农杆菌和 Ti 质粒特异 DNA 序列设计引物,通过 PCR 检测,证明工程农杆菌的存活。引物序列及扩增片段长度见表 1。

表 1 工程农杆菌鉴定的引物序列和扩增长度

Table 1 The primers to detect <i>A. tumefaciens</i> used for transformation				
检测基因 Tested genes	引物序列 Primer sequence	退火温度 Anneal temperature ( )	扩增片段长度 Segment size (bp)	备注 Note
<i>BtCry1Ac</i>	5 CTGACGTAAAGGATGACGCAC 3	55	750	35 S/Bt 基因组和引物 检测外源抗虫基因 <i>BtCry1Ac</i>
	5 ACTATTGATA GTCGCGGCATC 3			
<i>APtA</i>	5 CTGACGTAAAGGATGACGCAC 3	50	700	35S/API 基因组和引物 检测外源抗虫基因 <i>APtA</i>
	5 CGATGCCAAGCAAGGTTTT 3			
<i>Npt</i>	5 GCATTCCGTCTTGCTGTA 3	55	600	检测抗性标记基因新霉素磷酸转移酶 基因
	5 GATGTTTCGCTTGGTGGTIC 3			
<i>Vir-G</i>	5 GCCGACAGCACCCAGTTCAG 3	53	380	检测 Ti 质粒毒区 <i>Vir-G</i> 基因
	5 CCACTCCACTTTGAATGCCG 3			
<i>ChvE</i>	5 GATGGCAAAGGGTCCGTICAA 3	58	630	检测农杆菌染色体基因组上毒性基因 ( <i>ChvE</i> 基因)
	5 CGCATGTGTCITTCAGCTTATTICA 3			

## 2 试验结果

### 2.1 农杆菌介导的基因转化、检测及表达

用部分改造 *BtCry1Ac* 基因与慈菇蛋白酶抑制剂(*APtA*) 基因构建的双抗虫基因表达载体,以试管内无茵叶片为外植体,通过农杆菌介导法转化三倍体毛白杨无性系,获得了一批转化再生植株。基因转化后,在含卡那霉素 50mg/L 的分化培养基上诱导产生不定芽,在生根培养基上对转基因植株作进一步筛选,最终诱导再生率为 18% 左右。经过含卡那霉素培养基的生根及叶片再生多次筛选后得到的转化三倍体毛白杨株系,移植到苗圃中生长 1a 后,进行 PCR 检测。在检测的 42 个株系中,33 个株系为阳性,阳性率达到 80%。为了进一步证实 PCR 检测结果的准确性,对转基因三倍体毛白杨 4 个高抗系号进行了 Southern 杂交。选用地高辛试剂盒进行 Southern 杂交,证明测试的 4 个株系外源基因均以单拷贝的形式整合到三倍体毛白杨基因组中。

用 Bt 毒蛋白抗血清进行 ELISA 检测结果表明,7 个转基因株系都有 Bt 杀虫蛋白表达。用经分子生物学检测的 28 个转基因株系叶片进行杨扇舟蛾(*C. anachoreta* Fabricius) 幼虫饲虫试验,在参加测试的 28 个株系中,有 11 个株系对三倍体毛白杨具有较强的抗虫性,杨扇舟蛾幼虫死亡率在 80% ~ 100% 之间;有 7 个株系抗性中等,幼虫死亡率在 60% ~ 80% 之间;有 10 个系号抗虫性低,幼虫死亡率在 0 ~ 60% 之间。未转基因三倍体毛白杨叶片喂养的昆虫幼虫死亡率为 7.4%。

### 2.2 农杆菌介导转化中抗生素对工程农杆菌的抑菌效果

将浸菌后三倍体毛白杨叶片分别接入到含有不同羧苄青霉素浓度的分化培养基中,放置于(25 ±2) °C,光强为 2000 lx 组培室里培养。2 周内统计菌发生情况和植物生长状况。表 2 结果表明,培养初期,不同浓度的羧苄青霉素都具有杀菌作用,约 3d 左右可看到叶边缘及切口处的菌落消失,但经一段时间的培养后,抗生素药效逐渐丧失,又会有白色的农杆菌从叶边缘及切口处长出。而且随添加的羧苄青霉素浓度的增加,其抑菌作用越好,抑菌持续时间越长。当羧苄青霉素浓度达到 300 mg/L 以上时,可完全抑制细菌生长。因此在基因

转化后,采用附加 50 mg/L 卡那霉素,300 mg/L 羧苄青霉素的筛选培养基消除细菌并进行抗性芽筛选。为完全消除细菌,获得抗性芽后,在连续 12 个月继代增殖培养及生根培养中,培养基均附加 50 mg/L 卡那霉素和 200 mg/L 羧苄青霉素。在实验中也发现,当羧苄青霉素浓度高于 300 mg/L,严重抑制苗木的分化和生长。

2.3 转基因植株体内工程农杆菌的培养

通过农杆菌介导法获得抗性芽后,在含卡那霉素 50 mg/L 和羧苄青霉素 200 mg/L 的培养基上进行连续 12 个月继代培养。12 个月后转入不含卡那霉素和羧苄青霉素的培养基上继续继代增殖培养。对 28 个转基因株系叶片、茎段和根段在含有卡那霉素 50 mg/L YEB 培养基上进行细菌培养,有 3 个株系获得类似农杆菌的菌落。对这 3 个株系不同继代培养时期检验结果表明,菌落在培养基上的形态与阳性菌 *pBtiA-LBA4404* 相似,但生长速度有差异,见图 2 和图 3。

由图 2 可见,农杆菌 *pBtiA-LBA4404* 在 YEB 培养基上生长极其迅速,6h 即有菌落开始出现,24h 便可长出大量菌落;而继代 12 个月后,置于 YEB 培养基上的叶片 72h 后才有菌落出现,5d 才可出现大量菌落,明显比纯的农杆菌 *pBtiA-LBA4404* 的生长速率慢;在继代 24 个月后,7d 左右大量菌落才出现,速率进一步减缓;继代 36 个月后(获得抗性芽约 30 个月),培养 10d 未见菌落长出。结果说明,随着继代时间的延长,农杆菌在叶片组织中的数量减少,活性降低,从而导致培养时间延长。

2.4 植物体内工程农杆菌检测

对 3 个株系,取培养不同时期的芽进行生根培养,分别提取生根培养 15d 组培苗根、茎、叶,在含有卡那霉素 50 mg/L 的 YEB 培养基上培养,获得菌落,提取基因组和质粒 DNA,进行分子生物学检测。检测了位于农杆菌质粒 T-DNA 区目的基因 *BtCry1Ac* 基因和 *APtA* 基因,抗性标记基因 *Npt* 基因,位于 Ti 质粒毒区基因 *Vir-G* 基因及位于农杆菌基因组上的 *ChvE* 基因。检测结果见图 4。

由检测结果可知,从获得转基因株系后,连续继代培养 24 个月中,不同时期从组培无菌苗根、茎、叶中分离得到的细菌,在质粒 DNA 中均检测到外源抗虫基因 *BtCry1Ac* 和 *APtA* 基因、卡那霉素标记基因 *Npt* 基因及载体质粒特征基因 *Vir-G* 基因,同时在农杆菌染色体组 DNA 中检测到 *ChvE* 基因,均与阳性对照农杆菌 *pBtiA-LBA4404* 一致。说明工程农杆菌可在这 3 个株系组培苗中存在。在转基因后 12 至 24 个月中,多次进行检测,均能够检测到工程农杆菌在组培苗中存在。

2.5 移栽到土壤后工程农杆菌的检测

表 2 羧苄青霉素浓度对菌的抑制能力

Table 2 Inhibiting capacity to bacterium of different concentration of carbenicillin

羧苄青霉素浓度 Carbenicillin concentration (mg/L)	农杆菌侵染面积 Infection area (%)				叶片生长状况 Growth status of leaves
	5d	10d	20d	30d	
0	40	100	100	100	死亡
100	0	0	10.3	48.3	部分叶片死亡
200	0	0	3.0	15.7	部分叶片褐化
300	0	0	0	0	健康无菌
500	0	0	0	0	健康无菌

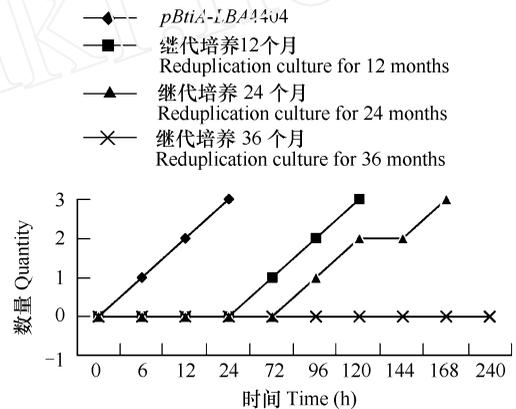


图 2 33 号叶片内残存农杆菌生长速率

Fig. 2 Growth rate of surviving Agrobacteria in leaves of sub-clone 33  
注: 0: 刚刚接种或将叶子置于 YEB 培养基上 Just putting leaves on YEB medium; 1: 开始出现菌落 Beginning to grow colony; 2: 出现少量菌落 Small quantity of colony appeared; 3: 出现大量菌落 Large quantity of colony appeared; ~1: 标志值, 无实际意义 Markable value, no real sense



图 3 组培苗茎段(a)和叶片(b)在 YEB 培养基上菌落生长情况

Fig. 3 Growth of colonies in stems (a) and leaves (b) of transgenic plants on YEB medium

在转基因后 12 至 24 个月中,多次进行检测,均能够检测到工程农杆菌在组培苗中存在。

将带菌的 3 个株系组培苗移栽到盆中,在室内培养 1 个月后,从不同株系幼苗取根段、茎段、叶片及根际土,在含卡那霉素 50 mg/L、利福平 20 mg/L、链霉素 50 mg/L 的 YEB 培养基上培养细菌。结果发现所有植物材料及根际土均能获得菌落,颜色和形状与目的农杆菌相似。但是只有 33 号株系根际土中分离的细菌,能够扩增出目的基因、*Npt* 基因、*Vir-G* 基因、和 *ChvE* 基因的片段,证明是工程农杆菌 *PBtiA4404*。但在植物组织中均未检测到目的菌的存在(见图 5 和表 3)。

### 3 讨论

转基因漂流研究主要集中在通过花粉向同种或近缘种非转基因植物转移及转基因植物的种子或组织向新的生境中扩散方面。非同种生物间,如植物与微生物(细菌、真菌、病毒等)间在自然界中发生基因转移的可能性,虽然有一些现象,但这条途径至今还未得到充分的理论证明<sup>[6]</sup>。Hoffmann 等<sup>[13]</sup>证实了转基因植物中的外源基因会水平转移到其它微生物中。他们发现,转基因油菜、黑芥菜、蒺藜和甜豌豆中抗生素基因可通过转基因植株的根系分泌物转移到一种能与植物共生的黑曲霉微生物中。

Saxena 等<sup>[22]</sup>在《自然》杂志上发表文章,首次发现基因工程 Bt 杀虫作物产生的 Bt 杀虫毒素可由根部渗入周围土壤,移栽 Bt 转基因玉米 25d 后发现,Bt 毒素通过根部渗出物进入了周围的土壤,且保持了很强的活性,仍能杀虫;而他们进行的对照实验却发现,在温室环境下培植的野生型玉米,其根系周围土壤中没有 Bt 毒素存在。还有许多研究表明,Bt 毒蛋白还可通过叶子进入土壤,其毒性可在土壤中长时间保留,对土壤和水体中的微生物产生一定影响<sup>[23~26]</sup>。在转化植物的过程中可能仍有农杆菌残留在植物体内,从而成为其内生菌,本实验对转基因杨树组培苗培养和移栽过程中,携带外源基因转化载体的农杆菌检测发现,农杆菌能够在植物体内有活,从而说明农杆菌中介可能是非同种生物间转基因传递的一条重要途径。

农杆菌介导法进行基因转化后,一般通过青霉素等抗菌素消除附着在转基因植物表面的包括工程农杆菌在内的细菌,但不能将农杆菌完全消除。本研究表明,采用常规的、植物能忍受的抗菌素浓度(本项研究中为羧苄青霉素 300 mg/L),虽然能够抑制农杆菌的生长,在连续苗木分化和生根培养中,也看不到农杆菌的存在,但不能完全消除工程农杆菌。转基因后,在植物中仍然有工程农杆菌存活,当农杆菌存在于植物叶片和茎表面及组织内部,特别是在内细胞间隙,抗菌素将不能发挥作用。在获得抗性芽后连续 24 个月的继代培养中,有 3 个株系的组培苗中均能够检测到工程农杆菌的存在。

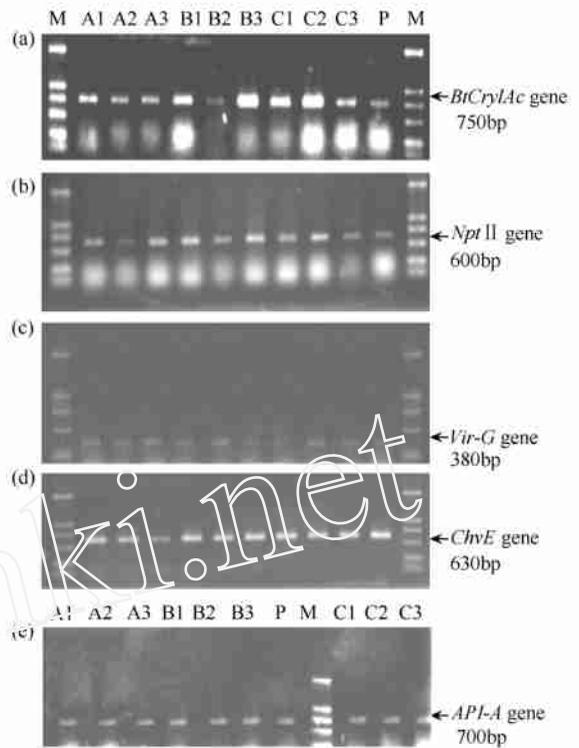


图 4 转基因植株(33,37,5 号株系)培养的菌落工程农杆菌 *BtCryIAc* (a)、*Npt* (b)、*Vir-G* (c)、*ChvE* (d)、*APF-A* (e) 基因检测结果

Fig. 4 Genes of the *Agrobacterium* coming from the transgenic plants (sub-clones 33, 37, 5)  
M: Marker (DL2000; 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp); 1, 2, 3: 根 root, 茎 stem, 叶 leaf; A, B, C: sub-clone 33, sub-clone 37, sub-clone 5; P: 阳性对照 positive plasmid

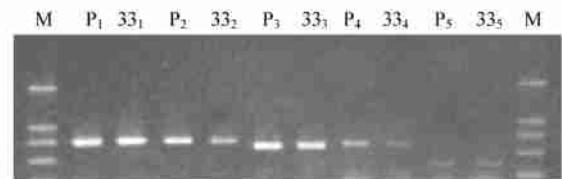


图 5 移栽后 1 个月 33 号株系根际土中农杆菌基因检测结果  
Fig. 5 Genes from an *Agrobacterium* strain in rhizosphere of sub-clone 33 after being transplanted for 1 month

注:M:Marker(DL2000);1,2,3,4,5: *ChvE*, *BtCryIAc*, *Npt*, *APF-A*, *Vir-G*;P:阳性质粒 positive plasmid

表 3 不同时期菌落生长指标

Table 3 Growth index of the colonies in different phase

材料来源 Material source	取材部位 Part	菌落特性 Character of colony				基因检测 Genes test		
		颜色 Colour	形状 Shape	培养天数 (d) Culture days	Kan 抗性 Resistance aag. kan.	<i>Npt</i>	<i>BtCry1Ac</i> 和 <i>APFA</i>	<i>Vir-G</i> 和 <i>ChvE</i>
组培继代 12~24 个月 Cultivation for 12~24 months	根 Root	+/+/+	+/+/+	1~2	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
	茎 Stem	+/+/+	+/+/+	2~3	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
	叶 Leaf	+/+/+	+/+/+	3~5	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
移栽后 25d 25 days after transplanting	根际土 Rhizosphere	+/+/+	+/+/+	2~3	+/+/+	+/-/-	+/-/-	+/-/-
	根 Root	+/+/+	+/+/+	2~4	+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-
	茎叶 Stem and leaf	+/+/+	+/+/+	2~3	+/+/+	-/-/-	-/-/-	-/-/-

表中 + 表示与农杆菌 *pBtiA-LBA4404* 指标相符, - 表示不相符, 或为阴性; 排列顺序为 33/37/5 号 + : accordance with the positive *Agrobacterium* strain used for transformation; - : no accordance with the positive *Agrobacterium* strain; sequence: 33/37/5

当带有工程菌的组培苗移栽到土壤后, 工程农杆菌有可能会直接随植物进入土壤, 并在土壤中存活。携带农杆菌的转基因植株释放到环境中所带来的可能后果包括: (1) 假阳性转化现象, 即外源基因在农杆菌中表达而不是在植物中; (2) 工程农杆菌从植物直接释放到土壤中; (3) 通过同种细菌或非同种微生物间的质粒交换将外源基因转入到其他微生物中; (4) 通过昆虫等将附着在植株表面的工程农杆菌转递到其他植物上。如果上述情况出现, 可能会对环境造成潜在危险, 特别是对多年生, 通过无性繁殖的杨树危险可能更大。从我们的试验结果可知, 这种可能性是存在的。

将带菌的 3 个株系组培苗移栽到盆中, 室内培养 1 个月后, 发现只在 1 个株系根际土中分离的细菌是工程农杆菌 *pBtiA-LBA4404*, 在 3 个株系植物组织中均未检测到目的菌的存在。分析其原因可能是, 在组培瓶中, 培养条件稳定, 适宜农杆菌在植物表面或细胞间隙生存, 移栽后, 农杆菌的生存环境发生改变, 不利于其生存, 菌落含量急剧减少; 农杆菌进入土壤后, 菌落含量很低, 由于取样误差, 难以培养出细菌; 此外, 本研究发现转基因株系是经过近两年继代培养的茎尖生根后移栽, 工程农杆菌的含量和活性已经很低。因此即使进入了土壤, 其在土壤中的存活能力以及与其他菌的竞争能力也可能有限, 所以在土壤和植物中不能完全培养出菌落。但上述结果至少可以证明, 携带工程农杆菌的转基因植物材料, 移栽到土壤中, 是可以将工程菌扩散到土壤环境中。

本文研究结果是否具有普遍性尚须在其他植物中进一步验证, 但这种可能性在理论上是存在的。因此, 建议通过农杆菌介导方法进行遗传转化中, 转基因植株在释放到环境之前应进行严格的农杆菌检测, 淘汰带菌的株系。

#### References:

- [ 1 ] Li G Y, Si K Y, Liang W F, *et al.* Progress and bio-safety of the transgenic agricultural products. *Journal of Northwest Normal University*. 2002, 38(3): 112~117.
- [ 2 ] Jia S R. Environment and food biosafety assessment of transgenic plants. *Evolution Bioengineering*, 1997, 17(6): 37~42.
- [ 3 ] Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Effects of transgenic crops on soil ecosystem. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(4): 491~494.
- [ 4 ] Wang Z H, Ye Q F, Shu Q Y, *et al.* Impact of root exudates from transgenic plants on soil micro ecosystems. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(3): 373~375.
- [ 5 ] Li Z L, Yang M S. Potential risk and safety evaluation in the release of transgenic plant to environment. *North Botany Research*. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2002. 4:182~187.
- [ 6 ] Fan L J, Zhou X P, Hu B M, *et al.* Gene dispersal risk of transgenic plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(4): 630~632.
- [ 7 ] Wang Z H, Shu Q H, Ye Q F, *et al.* Approaches of transgenic escape from transgenic plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2001, 18(2): 137~142.
- [ 8 ] Chevre A M, Eber E, Renard M. Transgenic rape and environmental hazards. *Biofuttr*, 1997, (172): 44~48.
- [ 9 ] Conner A J. Genetically engineered Crops—environmental and food safety issues. *The royal society of New Zealand, Miscellaneous Series*, 1997, 39:10~14.

- [10] Beringer J E. Releasing genetically modified organisms: Will any harm outweigh and advantage. J. Appl Ecol., 2000, 37: 207 ~ 214.
- [11] VanGaall T M, Galatowitsch S M, Strefeler M S. Ecological consequences of hybridization between a wild species (*Echinacea purpurea*) and related cultivar (*E. purpurea* 'White Swan'). Scientia Horticulturae, 1998, 76:73 ~ 88.
- [12] Snow A A, Palma P M. Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks. Bioscience, 1997, 47(2): 86 ~ 96.
- [13] Hoffmann T, Gölz C, Schieder O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *A. niger* after co-culture with transgenic higher plants. Curr Genet, 1994, 27:70 ~ 77.
- [14] Wang J X, Sun Y. Progress of plants genetic transformation by *Agrobacterium*. Biotechnology Information, 1999, 1:7 ~ 13.
- [15] Wang C L, Lu B F, Zhang X C, et al. Molecular basis of *Agrobacterium* — plant gene transfer. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2002, 14(1): 1 ~ 5.
- [16] Mahlakshmi A, Khurana P. *Agrobacterium* — mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Biochemistry of Biotechnology, 1995, 4(2):55 ~ 59.
- [17] Barrett C Cobb E, McNicol R, et al. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1997, 47:135 ~ 144.
- [18] Wang Y, Lin X L, Shen X H, et al. Xylophyta genetic transformation by *Agrobacterium*. Biotechnology Bulletin, 1999, 6: 23 ~ 27.
- [19] Li Z L, Yang M S. Advances on genetic engineering breeding of poplar. Journal of Agricultural University of Hebei, 2002, 25(supp. 1): 145 ~ 158.
- [20] Tian Y C, Zheng J B, Yu H M, et al. Studies of transgenic hybrid poplar 741 transformed with two insects resistant genes. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(3): 263 ~ 268.
- [21] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 3324 ~ 3328.
- [22] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. Nature, 1999, 402: 480 ~ 481.
- [23] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 33:35 ~ 39.
- [24] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil Biol Biochem, 2001, 33:1225 ~ 1230.
- [25] Sims S R, Rern J E. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* spp. kurstaki cryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: Laboratory microcosm and field studies. J Agro Food Chem, 1997, 45:1502 ~ 1505.
- [26] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. J Environ Qual, 2000, 29:691 ~ 705.

#### 参考文献:

- [1] 李桂英, 司克媛, 梁万福, 等. 转基因农作物的研究现状及安全性. 西北师范大学学报, 2002, 38(3): 112 ~ 117.
- [2] 贾士荣. 转基因植物的环境及食品安全性. 生物工程进展, 1997, 17(6): 37 ~ 42.
- [3] 王建武, 冯远娇, 骆世明. 转基因作物对土壤生态系统的影响. 应用生态学报, 2002, 13(4): 491 ~ 494.
- [4] 王忠华, 叶庆富, 舒庆尧, 等. 转基因植物根系分泌物对土壤微生物生态的影响. 应用生态学报, 2002, 13(3): 373 ~ 375.
- [5] 李志兰, 杨敏生. 转基因植物环境释放潜在风险及其安全性评价. 北方植物学研究(第四集). 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002. 182 ~ 187.
- [6] 樊龙江, 周雪平, 胡秉民, 等. 转基因植物的基因漂流风险. 应用生态学报, 2001, 12(4): 630 ~ 632.
- [7] 王忠华, 舒庆尧, 叶庆富, 等. 转基因植物外源基因逃逸的途径. 植物学通报, 2001, 18(2): 137 ~ 142.
- [14] 王雪景, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展. 生物技术通报, 1999, 1:7 ~ 13.
- [15] 王丛丽, 陆柏方, 张学成, 等. 农杆菌-植物间基因转移的分子基础. 生命科学, 2002, 14(1): 1 ~ 5.
- [18] 王瑶, 林木兰, 沈锡辉, 等. 农杆菌介导的木本植物遗传转化. 生物技术通报, 1999, 6:23 ~ 27.
- [19] 李志兰, 杨敏生. 杨树基因工程育种研究进展. 河北农业大学学报. 2002, 25(supp. 1): 145 ~ 158.
- [20] 田颖川, 郑均宝, 虞红梅, 等. 转双抗虫基因杂种 741 毛白杨的研究. 植物学报, 2000, 42(3): 263 ~ 268.