

转单、双 *Bt* 基因 741 杨外源基因表达和抗虫性比较

王桂英^{1,2}, 杨敏生^{1,*}, 霍雪梅¹, 刘晓杰²

(1. 河北农业大学林学院, 河北保定 071001; 2. 廊坊市农林科学院, 河北廊坊 065000)

摘要:【目的】研究联合使用两种或两种以上的抗虫基因的抗虫效果, 同时鉴定并筛选出转双 *Bt* 基因 741 杨对鳞翅目和鞘翅目害虫有较强抗性的株系。【方法】选取转三基因 (*Cry3Aa* + *Cry1Ac* + *API*) 741 杨 8 个株系、转双基因 (*Cry1Ac* + *API*) 741 杨 1 个株系和转单基因 (*Cry3Aa*) 741 杨 3 个株系为试材, 从外源基因 PCR 检测、毒蛋白表达和抗虫性三方面对转基因株系进行对比分析。【结果】经 PCR 扩增后各转基因株系出现了预期的电泳条带。ELISA 蛋白检测显示转基因株系中都有与所含基因相应的 *Bt* 杀虫蛋白表达。用转基因株系新鲜叶片进行柳蓝叶甲 *Plagiodera versicolora* 和美国白蛾 *Hyphantria cunea* 室内饲虫实验表明: 转入不同抗虫基因的杨树对昆虫的抗性具有选择性, 对非靶标昆虫没有毒杀作用。转双 *Bt* 基因 741 杨具有双抗性, 不同转基因株系表现出高中低的抗性水平: 在对柳蓝叶甲的抗性上, 筛选出的其中 5 个高抗株系 (pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9) 的抗性水平明显比含 *Cry3Aa* 单 *Bt* 基因的 3 个高抗株系 (pCC11, pCC53 和 pCC84) 高; 在对美国白蛾的抗性上, 有 7 个株系 (pCCA2 ~ pCCA7 和 pCCA9) 的抗性水平与含 *Cry1Ac* 单 *Bt* 基因株系 (pB29) 表现一致, 只有 1 个株系 (pCCA1) 对美国白蛾表现出了极低的抗性。【结论】多个抗虫基因在 741 杨上的联合使用, 不仅扩大了抗虫谱, 其中的高抗株系还具有了更高的抗虫能力, 有效地发挥了基因的叠加效应。

关键词: 741 杨; 外源基因; 单 *Bt* 基因; 双 *Bt* 基因; 抗虫性

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)07-0798-06

Comparison of exogenous gene expression and insect-resistance ability of transgenic 741 poplars with single and double *Bt* genes

WANG Gui-Ying^{1,2}, YANG Min-Sheng^{1,*}, HUO Xue-Mei¹, LIU Xiao-Jie² (1. College of Forest, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; 2. Langfang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Langfang, Hebei 065000, China)

Abstract: 【Aim】To study the combining effects of two or more insect-resistance genes in plants, as well as to screen and confirm double *Bt* transgenic 741 poplar lines with high resistance against coleopteran and lepidopteran insects. 【Methods】Eight lines with three transgenes (*Cry3Aa* + *Cry1Ac* + *API*), one line with double transgenes (*Cry1Ac* + *API*) and three lines with single transgene (*Cry3Aa*) of transgenic 741 poplar were used as experimental materials. Comparative studies were conducted from three aspects: PCR detection of exogenous gene, the expressions of insecticidal proteins and the assessment of insect-resistance ability of plant. 【Results】The expected electrophoretic bands from the transgenic lines appeared in PCR amplification. ELISA detection showed that the expression of insecticidal proteins was consistent with the exogenous genes in each line. Toxicity tests were performed in the laboratory with *Plagiodera versicolora* and *Hyphantria cunea* on fresh detached leaves. Transgenic poplar lines carrying different insect-resistance genes demonstrated selective resistance to target insects, but showed no toxic effects towards non-target insects. Transgenic 741 poplar lines with double *Bt* transgenes had double insect-resistance ability, and individual lines showed resistance ranging from high, medium to low. Five lines (pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 and pCCA9) selected with high resistance against *P. versicolora* showed higher toxicity than three single *Cry3Aa* gene lines with high resistance (pCC11, pCC53, and pCC84). As regard to resistance toward *H. cunea*, seven lines (pCCA2 – pCCA7 and pCCA9) exhibited similar effectiveness as the single *Bt* line (pB29) and only one line (pCCA1) showed an extremely low level of resistance. 【Conclusion】The combination of multiple insect-resistance genes in

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费重大项目(201004004); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2011AA100201)

作者简介: 王桂英, 女, 1969 年 8 月生, 河北保定人, 博士研究生, 主要从事林木生物技术研究, E-mail: moonlight0808@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: deu100@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2012-04-11; 接受日期 Accepted: 2012-06-18

741 poplars exerts gene stacking effects which not only expand its insect-resistance spectrum but also improve its insect-resistance ability largely.

Key words: 741 poplar; exogenous gene; single *Bt* gene; double *Bt* genes; insect-resistance

抗虫基因主要有三大来源——微生物、植物和动物,不同来源、不同类型及不同基因型的抗虫基因杀虫谱不同(侯丙凯和陈正华,2000;郑均宝等,2000;杨敏生等,2005)。王彦平等(2008)经过对转基因 741 杨的抗虫选择性研究,证明转 *Cry3Aa* 基因的 741 杨专一毒杀鞘翅目害虫,转 *Cry1Ac* 基因的 741 杨专一毒杀鳞翅目害虫。早期抗虫研究多集中于将单一基因转入植物,伍宁丰和范云六(1991)将 HD-1 杀虫蛋白基因导入欧洲黑杨 *Populus nigra*,成为我国转抗虫基因杨树的首例。随着昆虫对转基因植株产生耐受性及抗性有了越来越多报道之后(Tabashnik *et al.*, 1997; Bates *et al.*, 2005; Christou *et al.*, 2006),研究者们开始将两个或多个不同的抗虫基因转入同一植物中,以期通过基因叠加的方法使昆虫难以对两种或两种以上的抗虫物质同时产生抗性(张冰玉等,2005; Gatehouse, 2008; 王继磊等,2010)。田颖川等(2000)将 *Cry1Ac* 基因和慈姑蛋白酶抑制基因 *API* 构建成一个双元表达载体,并成功导入 741 杨,这是国内首次报道用双抗虫基因获得的抗虫杨树。通过构建双价或多价表达载体、共转化、二次转化、杂交以及花粉管通道法等方法,已经在烟草、棉花、水稻、杨树等双抗转基因中获得成功(郭三堆等,1999;李明亮等,2000;饶红宇等,2000; Tu *et al.*, 2000; 苏宁等,2002)。

本实验室经过 10 多年在抗虫转基因杨树上的研究,已获得同时表达 *Cry1Ac* 基因和慈姑蛋白酶抑制剂基因 *API* 的专一毒杀鳞翅目害虫的双抗 741 杨(田颖川等,2000);在此基础上,通过二次转化法再将 *Cry3Aa* 基因导入,成功得到了含有三基因双 *Bt*(*Cry1Ac* + *Cry3Aa* + *API*) 741 杨;此外本实验室的单一表达 *Cry3Aa* 基因对鞘翅目害虫专一毒杀的 741 杨也已田间试验(王永芳等,2002;甄志先等,2007)。为了鉴定双 *Bt* 株系与单 *Bt* 株系在抗虫性上的差别,同时筛选出双 *Bt* 741 杨高抗株系,对 741 杨的双 *Bt* 8 个株系、单 *Bt* 4 个株系进行了外源基因表达测定和抗虫性对比试验。

1 材料和方法

1.1 植物材料

普通杂种 741 毛白杨 [*P. alba* L. × (*P.*

daurica Dode + *P. simonii* Carr.) × *P. tomentosa* Carr.]; 已转入 *Cry3Aa* 基因的 741 杨高抗鞘翅目株系 pCC11, pCC53 和 pCC84; 已转入 *Cry1Ac* + *API* 基因的 741 杨高抗鳞翅目株系 pB29, 及在 pB29 基础上转入 *Cry3Aa* 基因获得的 pCCA 系列 8 个株系(pCCA1 ~ pCCA7 和 pCCA9)。以上材料统一通过组培快繁,生根后移栽大田,取一年生大田苗叶片进行实验。

1.2 转基因植株的 PCR 检测

取转基因植株田间苗新鲜叶片,在实验室内各称取 0.5 g,采用 CTAB 法提取基因组 DNA。用 *Cry1Ac* 基因和 *Cry3Aa* 基因各自特异性引物进行 PCR 扩增,以农杆菌中含双 *Bt* 和单 *Bt* 的质粒做阳性对照(菌落 PCR),阴性对照为未经转化的普通 741 杨。检测 *Cry1Ac* 基因及 *Cry3Aa* 基因的引物分别为 F1, R1; F2, R2,均由本实验室保存。F1: 5'-CTGACGTAAGGATGACGCAC-3'; R1: 5'-ACTATTG ATAGTCGCGGCATC-3'; F2: 5'-ACCGTCTCTGCTAA GCTCGGTCTT-3'; R2: 5'-TGGCCAAGCGAGGACCC CTGGAAG-3', 扩增片段长度分别为 749 bp 和 612 bp。PCR 扩增的反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 50 s, 53℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环;最后, 72℃ 延伸 7 min。

1.3 ELISA 毒蛋白检测

检测 *Cry1Ac* 蛋白用美国 Agdia 公司的 Bt-*Cry1Ab/1Ac* ELISA 蛋白检测试剂盒;检测 *Cry3Aa* 蛋白用 Agdia 公司的 Bt-*Cry3A* ELISA 蛋白检测试剂盒,阳性对照试剂盒自带,阴性对照为 741 杨。检测过程参照试剂盒的说明及牛小云等(2011)的实验方法进行,用 BioRad 550 型酶标仪测定结果。蛋白浓度以每克新鲜叶片所含毒蛋白纳克(ng)或微克(μg)数计算。

1.4 转基因植株的抗虫性检测

用转基因株系和对照 741 杨共计 13 个样品的一年生田间苗叶片饲喂柳蓝叶甲 *Plagioder a versicolora* 和美国白蛾 *Hyphantria cunea*。为防止出现因寄生蜂致死现象,参试昆虫均室内人工饲养。柳蓝叶甲分别用 3 龄幼虫及成虫进行试验,每个样品每次布置 30 头,设 3 次重复;美国白蛾用 4 龄幼虫,每个样品每次布置 15 头,设 6 次重复。选取大

小一致的新鲜叶子,放置于干净带透气盖的组培用三角瓶中。实验结束进行死亡率等死亡指标的计算:死亡率 = 饲养末期的死亡总数/初期的饲养总数 $\times 100\%$; 累计死亡率 = 在一定时间内总死亡虫数/初始实验总虫数 $\times 100\%$ 。

1.5 数据统计与分析

每天调查昆虫的死亡情况并录入 Excel 表中,计算每天的死亡率及累计死亡率,最后计算出多次重复的平均值及标准误。所有试验数据均用 Microsoft Excel 进行统计处理及图表分析。

2 结果与分析

2.1 转基因植株 *Bt* 基因 PCR 扩增

转基因植株经特异引物 PCR 扩增 *Cry1Ac* 基因(图 1:A)发现, pB29 及 pCCA 系列的 8 个株系均扩增得到一条与阳性质粒作模板 PCR 扩增条带大小相同的约 750 bp 的特异条带(引物扩增长度为 749 bp), 而单转 *Cry3Aa* 基因的 pCC11, pCC53, pCC84 和未转化 741 杨的对照基因组均未出现 PCR 扩增

特异条带; 各转基因植株经特异引物 PCR 扩增检测 *Cry3Aa* 基因(图 1: B), pCCA 系列的 8 个株系与 pCC11 和 pCC53(pCC84 未检测)在预期长度 612 bp 处得到一条特异条带, 而未转化的 741 杨及 pB29 基因组未出现 PCR 扩增条带。两次扩增结果表明, 转基因 741 杨不同株系中的基因正确无误且稳定存在于各自的基因组中。

2.2 转基因植株 *Bt* 毒蛋白的 ELISA 检测

ELISA 检测 *Cry1Ac* 蛋白, 检测结果双 *Bt* 741 杨 pCCA 系列的 8 个株系和 pB29 呈现蓝色阳性反应, pCC11, pCC53 和 pCC84 和对照 741 杨无显色反应; ELISA 检测 *Cry3Aa* 蛋白, 检测结果双 *Bt* 8 个株系及 pCC11, pCC53 和 pCC84 呈现黄色阳性反应, pB29 及未转化的 741 杨无显色反应。双 *Bt* 株系能同时表达两种 *Bt* 毒蛋白(*Cry1Ac* 和 *Cry3Aa* 蛋白); 单 *Cry3Aa* 基因株系 pCC11, pCC53 和 pCC84 只有 *Cry3Aa* 蛋白表达; 单 *Cry1Ac* 基因株系 pB29 只有 *Cry1Ac* 蛋白表达; 未转基因 741 杨未检测到有以上两种蛋白表达。各转基因株系的毒蛋白表达量如表 1。

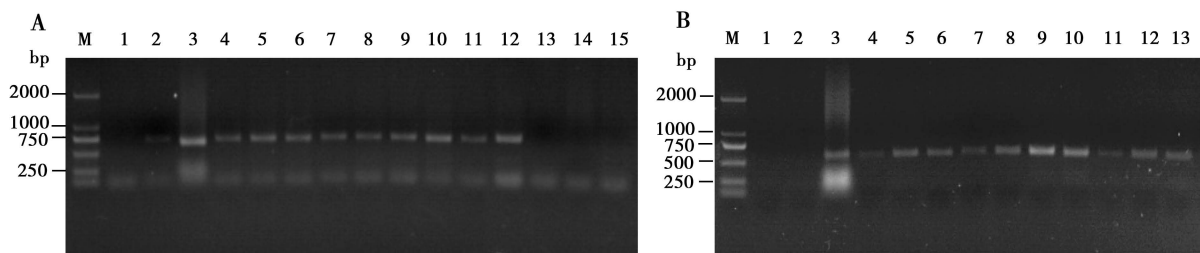


图 1 转基因 741 杨 *Cry1Ac* 基因(A)和 *Cry3Aa* 基因(B)PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Cry1Ac* (A) and *Cry3Aa* (B) from transgenic 741 poplar plants

A. M: 标准分子量 DL2000; 1: 阴性对照 Negative control; 2: pB29; 3: 阳性对照 Positive control (pCambia1305-*Cry1Ac-Cry3Aa*); 4-11: pCCA 系列 8 个株系 Eight lines of pCCA series; 12: 阳性对照 Positive control (pCambia1305-*Cry1Ac*); 13-15: pCC 系列的 3 个株系 Three lines of pCC series; B. M: 标准分子量 DL2000; 1: 阴性对照 Negative control; 2: pB29; 3: 阳性对照 Positive control (pCambia1305-*Cry1Ac-Cry3Aa*); 4-11: pCCA 系列 8 个株系 Eight lines of pCCA series; 12-13: pCC 系列 2 个株系 Two lines of pCC series.

2.3 转基因植株的抗虫性对比

2.3.1 转基因株系对柳蓝叶甲的致死效应对比: 用 8 个双 *Bt* 株系的叶片饲喂柳蓝叶甲 3 龄幼虫和成虫, 以未转基因 741 杨作对照, 饲喂 1 d 后的死亡率如图 2。可以看出: 不同株系转基因 741 杨对柳蓝叶甲均有毒杀作用, 但死亡率不同。pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9 对柳蓝叶甲具有较高的毒杀力, 取食 1 d 后的 3 龄幼虫死亡率就达到了 88%~95%; pCCA3, pCCA4, pCCA7 的死亡率均不足 50%。成虫对毒蛋白的耐受性比 3 龄幼虫增强, 总体死亡率明显偏低, 取食 1 d 后的死亡

率仅在 0%~15%; 4 d 时 pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9 导致的成虫的死亡率达到 77%~95%, 而 pCCA3, pCCA4 和 pCCA7 导致的死亡率只有 19%~45% (数据未列出)。

综合 3 龄幼虫及成虫的虫试结果, 确定 pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9 为双 *Bt* 741 杨高抗鞘翅目株系。为鉴定这 5 个株系同转单 *Cry3Aa* 基因 741 杨 pCC 系列的 3 个高抗株系的抗虫性高低, 用柳蓝叶甲成虫进行深入对比试验(图 3)。可以看出: pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9 的总体抗性水平明显高于 pCC11, pCC53 和

表 1 转基因 741 杨不同株系的 Cry1Ac 和 Cry3Aa 蛋白含量

Table 1 Cry1Ac and Cry3Aa contents in transgenic 741 poplar lines		
株系 Lines	Cry1Ac 蛋白含量 Cry1Ac content (ng/g · FW)	Cry3Aa 蛋白含量 Cry3Aa content (μg/g · FW)
pCCA1	41.44	12.78
pCCA2	57.76	12.61
pCCA3	16.44	4.59
pCCA4	55.24	2.24
pCCA5	26.73	12.09
pCCA6	56.45	12.49
pCCA7	55.71	3.30
pCCA9	34.59	13.30
pCC11	0.00	8.51
pCC53	0.00	7.71
pCC84	0.00	8.06
pB29	60.32	0.00
741 (CK)	0.00	0.00

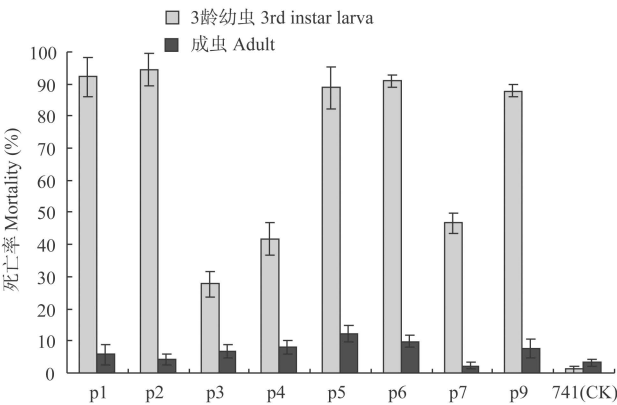


图 2 双 *Bt* 741 杨不同株系上柳蓝叶甲 3 龄幼虫和成虫的死亡率

Fig. 2 Mortalities of the 3rd instar larvae and adults of *Plagioder a versicolora* on double *Bt* 741 poplar lines
p1 - 7: pCCA1 - 7; p9: pCCA9.

pCC84。用 pCCA 的 5 个高抗株系饲喂的成虫 3 d 时 60% 以上死亡, 5 d 时的死亡率达到 了 85% ~ 100%; 而 pCC 的 3 个株系 3 d 时的死亡率在 50% 以下, 5 d 时也只有 60% ~ 70%; pB29 不含有抗鞘翅目的 *Cry3Aa* 基因, 柳蓝叶甲的死亡情况和未转基因 741 杨基本一致。这种转不同 *Bt* 基因株系的抗虫选择性进一步验证了 *Bt* 基因的专一毒杀特性。

2.3.2 转基因株系对美国白蛾的致死效应对比: 美国白蛾共有 7 个龄期, 取中间的 4 龄幼虫做叶片

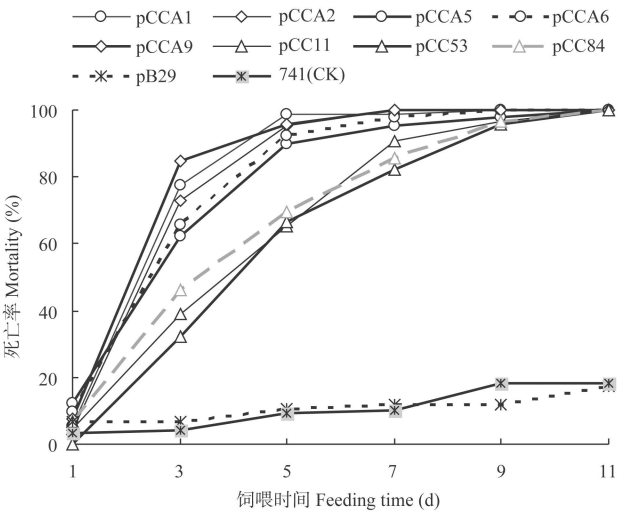


图 3 转基因 741 杨不同株系上柳蓝叶甲成虫的死亡率对比
Fig. 3 Comparison in mortalities of adult *Plagioder a versicolora* on transgenic 741 poplar lines

饲喂试验, pCC 系列的 3 个株系不含抗鳞翅目的 *Cry1Ac* 基因, 对美国白蛾没有抗性, 和对照 741 杨表现一致, 死亡率在 0 ~ 10% (数据未列出)。对双 *Bt* 741 杨 8 个株系、pB29 和 741 杨进行的对比(表 2)结果显示: 7 个双 *Bt* 株系(pCCA1 除外)和 pB29 的死亡高峰出现在第 5 天, 第 7 ~ 9 天时死亡率达到 100%; pCCA1 的杀虫效果最差, 取食到第 5 天时无死虫现象, 到第 9 天的死亡率只有 23%。

3 讨论

对两种昆虫的虫试结果表明双 *Bt* 基因 741 杨 pCCA 系列具有了双抗特性, 对鳞翅目和鞘翅目害虫兼具抗性。在对鞘翅目柳蓝叶甲的抗性上, 筛选出的 5 个高抗株系 pCCA1, pCCA2, pCCA5, pCCA6 和 pCCA9 比单转 *Cry3Aa* 基因的 3 个高抗株系 pCC11, pCC53 和 pCC84 具有更好的抗虫效果, 说明在 *Cry1Ac* + *API* 基因已经存在的情况下, 通过二次转化法转入 *Cry3Aa* 基因获得的多基因植株确实发挥了基因的叠加效应。柳蓝叶甲对植物的为害特点是成虫与幼虫同时取食叶片, 成虫边取食边产卵(杨振德等, 2005), 卵孵化后的 1 ~ 3 龄幼虫集中在一个叶片取食, 取食完一个叶片再转移到新的叶片。而成虫具有迁飞特性, 当一株幼嫩杨树或柳树被吃光之后, 成虫寻找新的幼嫩叶片或幼树而迁移。5 个双 *Bt* 高抗株系对柳蓝叶甲毒杀效果显著, 成虫取食 3 d 后 60% 以上死亡, 仍然存活的成虫取食量、活性及产卵受到了明显抑制, 到第 5 天基本

表 2 转基因 741 杨不同株系上美国白蛾 4 龄幼虫的死亡率
Table 2 Mortalities of the 4th instar larvae of *Hyphantria cunea* on transgenic 741 poplar lines

株系 Lines	死亡率 Mortality (%)				
	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5	第 7 天 Day 7	第 9 天 Day 9
pCCA1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 0.09	23.33 ± 0.14
pCCA2	0.00 ± 0.00	36.67 ± 0.24	86.67 ± 0.19	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
pCCA3	0.00 ± 0.00	3.33 ± 0.05	90.00 ± 0.14	93.33 ± 0.09	100.00 ± 0.00
pCCA4	0.00 ± 0.00	13.33 ± 0.00	80.00 ± 0.19	96.67 ± 0.05	100.00 ± 0.00
pCCA5	0.00 ± 0.00	10.00 ± 0.05	70.00 ± 0.05	93.33 ± 0.09	100.00 ± 0.00
pCCA6	0.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	73.33 ± 0.09	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
pCCA7	0.00 ± 0.00	6.67 ± 0.09	63.33 ± 0.24	93.33 ± 0.00	100.00 ± 0.00
pCCA9	0.00 ± 0.00	3.33 ± 0.05	60.00 ± 0.47	96.67 ± 0.05	100.00 ± 0.00
pB29	0.00 ± 0.00	3.33 ± 0.05	53.33 ± 0.57	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
741 (CK)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 0.09	10.00 ± 0.14	10.00 ± 0.05

达到了 85%~100% 死亡率, 只有个别成虫能存活至 10 d 左右。成虫取食转基因叶片后几天之内的高速死亡不仅防止了对叶片的危害、新卵的产生及下一代的孵化, 还有效阻止了成虫的迁飞转移。

在对鳞翅目美国白蛾的抗性上, pCCA 系列是在 pB29(已含有抗鳞翅目的 *Cry1Ac* + *API* 基因)的基础上, 通过二次转化法导入抗鞘翅目的 *Cry3Aa* 基因所得, 理论上应与 pB29 表现出一致抗性。但在抗虫性测试中, 只有 7 个株系与 pB29 表现一致, 而 pCCA1 对美国白蛾 4 龄幼虫表现了较低的抗性。由此看来, 通过二次转化法导入新的外源基因将会对原有基因组及蛋白表达产生不同程度的影响, 采用构建多价表达载体通过一次转化法获得多抗的方法将会避免这一现象的发生。有关慈姑蛋白酶抑制剂基因 *API* 在 741 杨抗虫上的贡献, 因为没有单转 *API* 基因和单转 *Cry1Ac* 基因的 741 杨作对照, 所以本研究没有对 *API* 基因进行蛋白表达检测和抗虫性对比试验。但有研究表明, 联合表达 *Cry1Ac* 基因和 *API* 基因的棉花, 较单一表达 *Cry1Ac* 基因的棉花抗虫性得到了明显加强(Guo *et al.*, 2003)。

转入不同抗虫基因的杨树对昆虫的抗性具有一定的选择性, 对非靶标昆虫没有毒杀作用。抗鳞翅目的 *Cry1Ac* 基因和抗鞘翅目的 *Cry3Aa* 基因在 741 杨中的同时表达, 使得这一杨树品种对两类主要林业害虫兼具了抗性, 扩大了抗虫谱。遗传转化同时获得的一批转基因植株多呈现不同的抗性水平(Génissel *et al.*, 2003; 杨敏生等, 2006; 王颖等, 2007), 对转抗虫基因植物的抗虫性鉴定一般通过饲虫试验, 根据死亡率确定出高中低抗植株, 往往

高抗株系受到重视。但是, 在推广应用转基因杨树品种时, 采用多个转基因株系混合造林, 如采用高抗、中抗株系及对照带状混交林栽培模式, 将有利于维护自然生态系统特别是自然界的生物多样性(Andow and Zwahlen, 2006; 胡建军等, 2010), 因此中低抗植株也应受到重视和深入研究。

参 考 文 献 (References)

Andow DA, Zwahlen C, 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters*, 9(2): 196–214.

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.

Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse JA, Gatehouse AMR, 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science*, 11(6): 302–308.

Gatehouse JA, 2008. Biotechnological prospects for engineering insect resistant plants. *Plant Physiology*, 146(3): 881–887.

Génissel A, Augustin S, Courtin C, Pilate G, Lorme P, Bourguet D, 2003. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc. Biol. Sci.*, 270(1517): 791–797.

Guo HN, Wu JH, Chen XY, Luo XL, Lu R, Shi YJ, Qin HM, Xiao JL, Tian YC, 2003. Cotton plants transformed with the activated chimeric *Cry1Ac* and *API-B* genes. *Acta Botanica Sinica*, 45(1): 108–113.

Guo SD, Cui HZ, Xia LQ, Wu DL, Ni WC, Zhang ZL, Zhang BL, Xu YJ, 1999. Development of bivalent insect-resistant transgenic cotton plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 32(3): 1–7. [郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 武东亮, 倪万潮, 张震林, 张保龙, 徐英俊, 1999. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学, 32(3): 1–7]

Hou BK, Chen ZH, 2000. Progress of anti-insect genetic engineering of

- plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 17(5): 385–393. [侯丙凯, 陈正华, 2000. 植物抗虫基因工程研究进展. 植物学通报, 17(5): 385–393]
- Hu JJ, Yang MS, Lu MZ, 2010. Advances in biosafety studies on transgenic insect-resistant poplars in China. *Biodiversity Science*, 18(4): 336–345. [胡建军, 杨敏生, 卢孟柱, 2010. 我国抗虫转基因杨树生态安全性研究进展. 生物多样性, 18(4): 336–345]
- Li ML, Zhang H, Hu JJ, Han YF, Tian YC, 2000. Study on insect-resistance transgenic poplar plants containing both *Bt* and *PI* gene, *Scientia Silvae Sinicae*, 36(2): 93–97. [李明亮, 张辉, 胡建军, 韩一凡, 田颖川, 2000. 转 *Bt* 基因和蛋白酶抑制剂基因杨树抗虫性的研究. 林业科学, 36(2): 93–97]
- Niu XY, Huang DZ, Yang MS, Li XF, Fu XS, 2011. Temporal and spatial expression of *Bt* toxic protein in transgenic *Btcry3A* hybrid poplar 741. *Scientia Silvae Sinicae*, 47(12): 154–157. [牛小云, 黄大庄, 杨敏生, 李晓芬, 付新爽, 2011. 转 *Btcry3A* 抗虫基因杨树中毒蛋白的时空表达. 林业科学, 47(12): 154–157]
- Rao HY, Chen Y, Huang MR, Wang MX, Wu FN, Fan YL, 2000. Genetic transformation of poplar N-80106 transferred by *Bt* gene and its insect-resistance. *Journal of Plant Resources and Environment*, 9(2): 1–5. [饶红宇, 陈英, 黄敏仁, 王明麻, 伍宁丰, 范云六, 2000. 杨树 N-80106 转 *Bt* 基因植株的获得及抗虫性. 植物资源与环境学报, 9(2): 1–5]
- Su N, Yang B, Meng K, Li YN, Sun M, Sun BY, Shen GF, 2002. The research of *Bt* and *OC* gene cotransformation in tobacco chloroplast. *Scientia Agricultura Sinica*, 35(4): 394–398. [苏宁, 杨波, 孟昆, 李佚女, 孙萌, 孙丙耀, 沈桂芳, 2002. 双价抗虫基因共转化烟草叶绿体的研究. 中国农业科学, 35(4): 394–398]
- Tabashnik BE, Liu YB, Finson N, Masson L, Heckel DG, 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 94(5): 1640–1644.
- Tian YC, Zheng JB, Yu HM, Liang HY, Li CQ, Wang JM, 2000. Studies of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect-resistant genes. *Acta Botanica Sinica*, 42(3): 263–268. [田颖川, 郑均宝, 虞红梅, 梁海永, 李常青, 王进茂, 2000. 转双抗虫基因杂种 741 毛白杨的研究. 植物学报, 42(3): 263–268]
- Tu JM, Zhang GA, Datta K, Xu CG, He YQ, Zhang QF, Khush GS, Datta SK, 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotechnology*, 18(10): 1101–1104.
- Wang JL, Liu DQ, Ding YM, Ge F, Li WX, Tian RH, 2010. Research advances in *Bt* transgenic anti-insect plants. *Journal of Biology*, 27(4): 75–78. [王继磊, 刘迪秋, 丁元明, 葛锋, 李文娟, 田荣欢, 2010. *Bt* 转基因抗虫植物研究进展. 生物学杂志, 27(4): 75–78]
- Wang Y, Zhen ZX, Yang MS, Li ZL, Liang HY, Yan HX, 2007. Expression of exogenous gene and correlation analysis of characters of transgenic triploid of Chinese white poplar carrying two insect resistance genes. *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 907–913. [王颖, 甄志先, 杨敏生, 李志兰, 梁海永, 阎海霞, 2007. 转双抗虫基因三倍体毛白杨外源基因表达及性状相关性分析. 昆虫学报, 50(9): 907–913]
- Wang YF, Gao BJ, Zheng JB, Zhang JH, 2002. The test on the resistance of transgenic clones of hybrid poplar 741 on *Apriona germari* (Hope). *Journal of Agricultural University of Hebei*, 25(2): 53–56. [王永芳, 高宝嘉, 郑均宝, 张炬红, 2002. 转基因 741 杨对桑天牛的抗性鉴定. 河北农业大学学报, 25(2): 53–56]
- Wang YP, Li J, Yang MS, Liang HY, 2008. Insect resistance selectivity of transgenic hybrid poplar 741. *Scientia Silvae Sinicae*, 44(8): 67–71. [王彦平, 李静, 杨敏生, 梁海永, 2008. 转不同抗虫基因 741 杨的抗虫选择性. 林业科学, 44(8): 67–71]
- Wu FN, Fan YL, 1991. The establishment of poplar plants containing *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *Chinese Science Bulletin*, 36(9): 705–708. [伍宁丰, 范云六, 1991. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立. 科学通报, 36(9): 705–708]
- Yang MS, Gao BJ, Wang JM, Liang HY, Du KJ, 2005. Analysis of main characteristic of white poplar hybrid 741 transformed two insect-resistant genes. *Scientia Silvae Sinicae*, 41(1): 91–97. [杨敏生, 高宝嘉, 王进茂, 梁海永, 杜克久, 2005. 转双抗虫基因 741 杨基本特性分析. 林业科学, 41(1): 91–97]
- Yang MS, Li ZL, Wang Y, Wang JM, Liang HY, 2006. Transformation and expression of two insect-resistant genes to hybrid triploid of Chinese white poplar. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(9): 61–67. [杨敏生, 李志兰, 王颖, 王进茂, 梁海永, 2006. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达. 林业科学, 42(9): 61–67]
- Yang ZD, Zhu L, Zhao BG, Fang J, 2005. Bionomics of *Plagioderma versicolora* in the laboratory. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 647–650. [杨振德, 朱麟, 赵博光, 方杰, 2005. 柳蓝叶甲的生物学特性室内观察. 昆虫知识, 42(6): 647–650]
- Zhang BY, Su XH, Li YL, Zhang YA, Qu LJ, Wang YZ, Tian YC, 2005. Transformation of poplar (*Populus alba* $\times$ *P. glandulosa* cv. '84K') with binary insect resistant genes and analysis of insect resistance. *Forest Research*, 18(3): 364–368. [张冰玉, 苏晓华, 李义良, 张永安, 曲良建, 王玉珠, 田颖川, 2005. 转双价抗蛀干害虫基因杨树的获得及其抗虫性鉴定. 林业科学研究, 18(3): 364–368]
- Zhen ZX, Li J, Liang HY, Tian YC, Yang MS, 2007. Expressions of *BtCry3A* gene in transgenic poplar and its resistance against *Apriona germari*. *Science of Sericulture*, 33(4): 538–542. [甄志先, 李静, 梁海永, 田颖川, 杨敏生, 2007. 转 *BtCry3A* 基因杨树毒蛋白表达及对桑天牛抗性的研究. 蚕业科学, 33(4): 538–542]
- Zheng JB, Liang HY, Gao BJ, Wang YF, 2000. Selection and insect resistance of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect-resistant genes. *Scientia Silvae Sinicae*, 36(2): 13–19. [郑均宝, 梁海永, 高宝嘉, 王永芳, 2000. 转双抗虫基因 741 毛白杨的选择及抗虫性. 林业科学, 36(2): 13–19]

(责任编辑: 赵利辉)