

# 花粉管通道介导的抗除草剂基因 (*bar*) 对大豆的遗传转化

刘昭军<sup>1</sup>, 李 铁<sup>1</sup>, 刘丽艳<sup>1</sup>, 刘 琦<sup>1</sup>, 王 珣<sup>1</sup>, 马启慧<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

**摘要** 采用花粉管通道介导法将含有 *bar* 基因的 pPTN140 质粒 DNA 导入 8 个黑龙江省大豆主栽品种 (系), 导入 1384 朵花, 共获得 1164 粒种子, 经 2 次 Basta 除草剂筛选后共获得 3 个品种的除草剂抗性植株 8 株。对其进行 PCR 以及 PCR – Southern 杂交检测均为阳性结果, Southern 杂交结果显示, 8 个除草剂抗性后代植株整合数目不同, 其中 2 株整合单拷贝基因, 另外 6 株分别整合 3 ~ 8 个拷贝的 *bar* 基因。对 8 个抗性植株的后代进行了除草剂抗性分析, D<sub>1</sub> – D<sub>3</sub> 代均出现除草剂抗性植株, 表明 *bar* 基因可以在转基因植株后代中遗传, 抗性遗传分析结果表明不同株系间以及株系内除草剂抗性缺乏规律性, 分离比率不符合孟德尔遗传规律。说明大豆花粉管通道法转化基因存在多拷贝共抑制现象。目前获得除草剂抗性稳定的 D<sub>3</sub> 代株系 82 个。试验说明利用花粉管通道技术进行大豆转化是可行的。

**关键词** 大豆; 花粉管通道法; *bar* 基因; 转化

**中图分类号** S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000 – 9841 (2007) 03 – 0310 – 05

SOYBEAN [ *GLYCINE MAX* (L.) MERR. ] TRANSFORMATION OF HERBICIDE RESISTANT GENE (*BAR*) VIA POLLEN TUBE PATHWAY

LIU Zhao-jun<sup>1</sup>, LI Tie<sup>1</sup>, LIU Li-yan<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1</sup>, WANG Xun<sup>1</sup>, MA Qi-hui<sup>2</sup>

(1. Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086;  
2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086)

**Abstract** Plasmid pPTN140 containing *bar* gene was transferred into eight soybean cultivars via pollen tube pathway, 1384 flowers were treated and 1164 seeds were harvested. Eight plants of three cultivars were survived after two times Basta screening. Positive results were given by PCR and PCR – Southern certification on the eight herbicide resistant plants. Southern blotting shown that the eight plants integrated different copies *bar* gene, two of them integrated single copy gene and other six plants integrated three to eight copies gene respectively. Genetic analysis was done to the offspring of the eight plants and indicated that there were still herbicide resistant plants in D<sub>1</sub> – D<sub>3</sub> generation, which suggested that *bar* gene could inherit to the transformed offspring and functioned in it. Genetic analysis of herbicide resistance indicated that there was no regularity within lines or among lines, and the segregation of herbicide resistance didn't

收稿日期: 2006 – 08 – 17

基金项目: 黑龙江省农科院创新工程项目 (2006 年度)

作者简介: 刘昭军 (1974 – ), 男, 副研究员, 博士, 主要从事作物基因工程及分子育种研究。

obey the Mendelian Law. It also indicated that there were co-inhibiting phenomena because of multiple copies gene integrated in pollen tube pathway. By now, 82 stable herbicide resistant lines of D<sub>3</sub> generation had been obtained. The research showed that it was feasible to transform soybean via pollen tube pathway.

**Key words** Soybean[ *Glycine max*( L. ) Merr. ]; Pollen tube pathway; *bar* gene

花粉管通道法是由我国学者周光宇先生于 20 世纪 70 年代首先提出分子育种方法<sup>[1]</sup>, 从 80 年代初, 我国科技工作者将该方法先后应用到水稻、棉花、大豆、玉米等作物上, 创造并培育了一大批新种质、品种<sup>[2~7]</sup>。与基因枪轰击或农杆菌介导的转化方法相比, 花粉管通道法具有操作简便, 不需要组织培养等优点, 理论上适用于任何有性生殖植物的遗传转化。应用花粉管通道法转化大豆的工作已有一些报道<sup>[4,5,8~10]</sup>, 但大多数实验的分子生物学证据不充分。本研究将含有 *bar* 基因的质粒通过花粉管通道导入到大豆中, 并通过 PCR 扩增和 Southern blot 等分子生物学方法对转化植株及其后代进行了检测, 并对后代除草剂抗性进行了遗传分析, 获得了除草剂抗性稳定的株系。

试验为花粉管通道法在大豆遗传转化中的应用提供了充分的分子生物学证据并深入的研究了导入基因的遗传规律, 为大豆花粉管通道转化育种提供了一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验所用 8 个大豆材料均为黑龙江省主栽大豆品种(系), 分别为黑农 35, 黑农 40, 黑农 48, 合丰 35, 合丰 42, 03-408, 绥农 14 和绥农 20, 由黑龙江省农科院生物技术研究中心和大豆研究所提供。含有的 pPTN 140 质粒 DNA 由中国农科院王连铮研究员提供。

1.2 试剂

所用限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、*bar* 基因 PCR 扩增引物(上游链: 5' AAA CCC ACg TCA TgC CAg CTC 3'; 下游链: 5' CgA CAA gCA Cgg TCA ACT TC 3')、随机引物<sup>32</sup>P 标记试剂盒均购自大连宝生物公司; TRIZOL 试剂盒购自 GibcoBRL 公司; HybondTM2N + 尼龙膜购自 Amersham 公司; 其它常用试剂购自沈阳联星生物工程公司。

1.3 方法

1.3.1 *bar* 基因的转化 采用本实验室所确定的最

佳大豆花粉管通道法<sup>[4,11]</sup>转化大豆。第一天下午在田间选择未开放即将开放的花蕾(不能看到花瓣), 去除其余的花朵, 花朵基部用标签标明时间, 第二天中午 9:00 和 12:00 之间选择花冠高出最高花萼 3~5 mm 的花, 将花瓣摘除掉, 切除柱头, 用 5mL 注射器将约 4~7 μL DNA(质粒 DNA 的浓度为 500 ng/μL)使 DNA 溶液完全浸没子房, 在子房上方形成一个液滴。去除附近未转化花, 挂牌注明转化基因、品种及日期。处理 5~10 d 后, 定期去除新花蕾, 秋后收获 D<sub>0</sub>代种子室温保存。

1.3.2 除草剂抗性筛选 D<sub>0</sub>代种子出苗后, 在三初复叶出现时, 参考章善庆等的方法<sup>[12]</sup>, 对 D<sub>0</sub>代植株喷洒 50 mg/L Basta 溶液(含有草丁膦), 进行抗性初步筛选, 在 2 周后用同样浓度的草丁膦溶液对抗性株进行复筛。

1.3.3 *bar* 基因的检测 大豆叶片总 DNA 提取: 在田间选取除草剂抗性株的幼嫩叶片, 参照王关林和方宏筠的方法(1998)稍加修改<sup>[13]</sup>。提取的基因组 DNA 融于超纯水后, 4℃保存待用。

PCR 分析: 25 μL 反应液中, 含正反引物(5 pmol)各 1 μL、10xBuffer 2.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、模板 DNA(70~100 ng) 1 μL、TaqDNA 聚合酶(5 u/μL) 0.3 μL、灭菌超纯水补足至 25 μL。PCR 程序为: 94℃ 预变性 5 min, 然后是 94℃ 20 s, 58℃ 40 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 7 min, 保存于 4℃。取 PCR 产物 5 μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离并观察。

转化后代的 PCR-Southern 杂交以及 Southern 杂交参照分子克隆试验指南(第三版)上提供的方法<sup>[14]</sup>。

1.3.4 除草剂抗性基因的遗传分析 在大豆的三初复叶期对 D<sub>0</sub>-D<sub>3</sub>转基因植株喷洒含有草丁膦溶液(50 mg/L)进行除草剂抗性鉴定。分析转基因株系的 D<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>株系间以及部分 D<sub>3</sub>株系内的除草剂抗性分离比, 统计实验数据, 计算各个株系后代的分离比例, 分析抗除草剂基因的遗传情况。

2 结果与分析

2.1 *bar* 基因的转化结果

本研究用含有 *bar* 基因的质粒 pPTN140 转化 8 个大豆品种(系),共操作 1384 朵花,收获 617 荚,平均结荚率为 44.9%,收获 D<sub>0</sub>代种子 1164 粒,结实率为 65.7%,平均每荚结 1.88 个籽粒(见表 1)。总的来看,导入的花朵结实率高,获得的籽粒总数较多,因此筛选转化体成为转化成功的关键。

表 1 D<sub>2</sub>代转基因大豆除草剂抗性的分析

Table 1 Analysis of herbicide resistance in D<sub>2</sub> generation of transgenic soybean plants

株系 Lines	除草剂抗性		预期分离比 Expected ratio	$\chi^2$
	Resistance to basta			
	抗	感		
	Resistant	Susceptible		
D <sub>1HF-1</sub>	33	27	1: 1	0.22
D <sub>1HF-2</sub>	33	16	3: 1	1.21
D <sub>1HF-3</sub>	35	13	3: 1	0.01
D <sub>1HF-4</sub>	12	27	1: 1	0.24
D <sub>1SN-1</sub>	31	11	3: 1	0.01
D <sub>1L-1</sub>	15	20	1: 1	0.15
D <sub>1L-2</sub>	14	34	1: 1	0.28
D <sub>1L-3</sub>	28	35	1: 1	0.08

注:卡方测验的 95% 及 99% 可信值分别为 3.84 及 6.63。  
Note: Values of the 95% and 99% confidence level in the Chi-square test were 3.84 and 6.63, respectively

2.2 除草剂抗性筛选

将 D<sub>0</sub>代种子于次年按照组合分别播种于试验田中,通过 Basta 草丁膦除草剂的重复喷洒筛选,共收获 3 个组合的 D<sub>1</sub>代抗性植株 8 株,其中 4 株合丰 35、1 株绥农 14 和 3 株 03-408。从除草剂筛选结果来看花粉管通道法转化大豆转化效率较低,转化率只有 0.22%,需要说明的一点是很多已经整合 *bar* 基因的后代植株由于未有蛋白表达或表达量低而被杀死,说明本系统还有待进一步优化。

2.3 *bar* 基因的检测

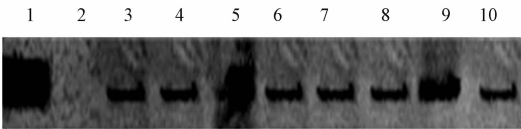
对 8 株除草剂阳性的植株进行 *bar* 基因的 PCR 以及 PCR-Southern 检测,结果 8 个植株均扩增出同阳性对照同样大小的条带,证明 8 个植株均整合了 *bar* 基因(见图 1、图 2)。

1:Marker;2:质粒;3:阴性对照  
(未转化植株);4~11:D<sub>1</sub>代转基因植株

1:Marker;2: Positive CK (plasmid);3:Negative CK;4~11: Transformed D<sub>1</sub> plants

图 1 大豆 D<sub>1</sub>代植株的 PCR 检测

Fig.1 PCR analysis of soybean D<sub>1</sub> generation plants



1:阳性对照(质粒);2:阴性对照  
(未转化植株);3~10:D<sub>1</sub>代转基因植株

1:Positive CK (plasmid);2: Negative CK;  
3~10:Transformed D<sub>1</sub> plants

图 2 大豆 D<sub>1</sub>代植株 PCR-Southern 检测

Fig.2 PCR-Southern analysis of soybean D<sub>1</sub> generation plants

2.4 Southern 杂交检测

对花粉管通道法获得的 D<sub>0</sub>代大豆植株的 8 个植株的叶片提取 DNA,检测其基因组整合 *bar* 基因拷贝数。根据图 3 所示,8 个 D<sub>0</sub>代大豆转基因植株整合 *bar* 基因的拷贝数分别为:受体合丰 35 的后代 D<sub>1HF1</sub>、D<sub>1HF2</sub>、D<sub>1HF3</sub>、D<sub>1HF4</sub> 拷贝数为 7、1、8、3 个;绥农 14 的后代 D<sub>1SN</sub> 为 1 个;03-408 的后代 D<sub>1IL1</sub>、D<sub>1IL2</sub>、D<sub>1IL3</sub> 为 3、5、5 个。上述结果表明,*bar* 基因已经整合到大豆基因组中,在大豆基因组中的整合多为多拷贝、并有多插入位点(图 3),个别单株整合基因多达 8 个拷贝。因此花粉管通道法获得的转化后代存在多拷贝现象。

从右至左:1~4:合丰 35 的 D<sub>0</sub>植株;5:  
绥农 14 D<sub>0</sub>代植株;6~8:03-408 的 D<sub>0</sub>代植株  
From right to left:1~4:D<sub>0</sub>plants of HF35;  
Plants of SN14;6~8:Plants of 03-408

图 3 大豆 D<sub>0</sub>代植株的 Southern blotting 检测

Fig.3 Southern blotting analysis of soybean D<sub>0</sub> plants

2.5 转基因后代的除草剂抗性遗传分析

对 D<sub>1</sub>代植株经草丁膦 Basta 的筛选后,获得 8 个抗性植株,经扩繁后获得 387 株 D<sub>2</sub>代植株,经过喷洒除草剂草丁膦 Basta 筛选后,获得 D<sub>2</sub>代抗性株系 191 个。三个组合的 D<sub>2</sub>代转基因大豆除草剂抗性的遗传数据统计见表 1,卡方检测结果表明 D<sub>2</sub>代植株除草剂抗性呈现不规则的分离比例,各株系间除草剂抗性分离比例介于 0.41 ~ 2.69 之间,只有 2 个株系(D<sub>1HF-3</sub>、D<sub>1SN-1</sub>)抗性分离比符合 3: 1 的分离比率,其余多数不符合孟德尔分离比例。对来自 D<sub>2</sub>代的 191 个抗性株系,在 D<sub>3</sub>代经草丁膦 Basta 处理鉴定,有来自 4 个株系的 D<sub>2</sub>代抗性株系内除草剂抗性分离比例符合 2: 1 的期望值(表 2),而其它 4 个株系则不符合获得 2: 1 的期望值。获得了稳定除草剂抗性的 D<sub>3</sub>代 82 个株系。为了研究整合基因在单个株系内的遗传情况,在 D<sub>3</sub>代 109 个分离株系中随机选取 41 个株系,调查 Basta 除草剂喷洒后株系内除草剂抗性的分离比例(表 3)。结果表明,分离比率从高到低分别为 1: 1 (44.0 % )、2: 1 (26.8 % )、>3: 1 (12.1 % )、1.5: 1 (9.8 % )、3: 1 (7.3 % )。

表 2 8 个 D<sub>3</sub>代转基因株系间除草剂抗性的分离比例

Table 2 Segregation of herbicide resistance among D <sub>3</sub> lines in 8 pedigrees				
系统名 Pedigree No.	分离株系 Segregated lines	稳定株系 Stable lines	预期比例 Expected ratio	$\chi^2$
D <sub>1HF-1</sub>	15	1	2: 1	8.21
D <sub>1HF-2</sub>	25	12	2: 1	0.00
D <sub>1HF-3</sub>	14	21	2: 1	1.24
D <sub>1HF-4</sub>	9	3	2: 1	0.51
D <sub>1SN-1</sub>	15	8	2: 1	0.00
D <sub>1IL-1</sub>	8	7	2: 1	0.21
D <sub>1IL-2</sub>	8	6	2: 1	0.11
D <sub>1IL-3</sub>	15	14	2: 1	0.10

Note: df = 1,  $\chi^2$  (0.05) = 3.841

本研究通过花粉管通道技术将 *bar* 基因导入大豆,由于花粉管通道法的转化特点,基因的整合位置及拷贝数目都是不确定因素,因此造成除草剂抗性在各世代间多数不能遵循一定的比例。通过 Southern 杂交结果表明,D<sub>1</sub>代 8 个除草剂抗性植株只有 2 个单株整合了单拷贝的基因,其余 6 个植株则整合了 3 到 8 个拷贝的基因。在各世代中只有整合单拷贝基因株系的除草剂抗性分离符合一对显性基因控

制的遗传规律,其余株系分离规律无规律性可言。Peng 等<sup>[15]</sup>与 Wang 等<sup>[16]</sup>分别报道了外源基因在转基因水稻后代的遗传有的符合孟德尔单显性基因分离规律,有的则不符合孟德尔单显性基因分离规律;并且认为这可能与外源基因所处的遗传背景以及其在受体染色体上插入的位点和拷贝数有关。因此,利用花粉管通道技术进行转化需要多世代观察,才能获得稳定遗传的转基因株系,该方法还有待进一步完善。

表 3 部分 D<sub>3</sub>代株系内除草剂抗性的分离情况

Table 3 Segregation of herbicide resistance within D <sub>3</sub> lines of transgenic soybean plants		
分离比例 Segregation ratio	株系数 No. of lines	比率(%) Ratio
>3: 1	53	12.1
3: 1		7.3
2: 1	11	26.8
1.5: 1	4	9.8
1: 1	18	44.0
合计 Total	41	100

3 讨论

用花粉管通道法转化大豆的籽实得率高,平均莢的成活率为 38.6%,容易获得种子。该系统的关键之处在于如何从大量的后代植株中通过有效的方法筛选出少数的目标植株以及提高转化效率,因此先对 D<sub>0</sub>代转基因植株进行草丁膦的抗性筛选,然后再进行分子鉴定效果较理想。

从转化后代的除草剂抗性分离分析结果来看,不同世代株系之间的除草剂抗性基因的遗传情况复杂,同一株系不同世代的除草剂抗性分离比率也在变化。说明不同株系间虽然都整合了 *bar* 基因,但是在基因组上的整合位置及整合的拷贝数以及对受体基因组的影响是不同的,这同刘昭军的总 DNA 花粉管通道法转化的研究结果有类似之处<sup>[17,18]</sup>。从除草剂抗性遗传数据统计来看,花粉管通道法转化的后代除草剂抗性可能存在多种遗传机制<sup>[19]</sup>。不同组合、同组合不同株系之间的遗传机制各有不同。在雄配子或雌配子形成或它们接合的过程中,如 *bar* 基因的结构、排列等方面发生了变化,从而使雄配子或雌配子之一方的 *bar* 基因被抑制或发生沉默,结

果 *bar* 基因仅由未受到抑制(沉默)的一方(雄或雌配子)表达,致使本应发生 3: 1 的后代呈现出 1: 1 的分离。但沉默(或抑制)的基因又活化,故 1: 1 分离后代又出现了 3: 1 的分离。这一结果还说明基因抑制与活化是相对的。但何种条件致使基因抑制又是什么条件使抑制的基因活化值得进一步研究。只有整合单拷贝基因的后代分离比例遵循一定的规律性。由于花粉管通道导入法是裸露的 DNA 质粒直接导入受体细胞,因此,在转化过程中进入受体细胞的外源 DNA 拷贝数较多,整合到大豆基因组的拷贝数也较多,整合位点多,不同世代间各植株转化的 *bar* 基因发生了转基因丢失、截短、重排等过程,外源 DNA 的结构变化也复杂,遗传稳定性也较差,但已经整合到大豆基因组的外源基因一般能够稳定遗传,但传递规律性较差。这同农杆菌转化后代多为单拷贝的特点是不同的<sup>[13]</sup>。下一步对其遗传规律的研究,应采用系谱法仔细观察记载直至高世代,同时通过杂交和回交方式验证遗传规律,对其在后续世代及其在杂交后代中的遗传稳定性作进一步的跟踪研究。

参 考 文 献

[1] 周光宇,龚蓁蓁,王自芳. 远缘杂交的分子基础[J]. 遗传学报. 1979,6(4):405-413.

[2] 王才林,赵凌,宗寿余,等. 用花粉管通道法将 *bar* 基因导入水稻获得可遗传的转基因植株[J]. 江苏农业学报,2002,18(3):129-133.

[3] 黄骏麒,钱思颖,刘桂玲,等. 外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状的变异[J]. 遗传学报,1981,8(1):56-62.

[4] 雷勃钧,君光初,卢翠华,等. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学,1991,10(1):58-63.

[5] 崔岩,杨庆凯,周思军. 利用花粉管通道技术导入大豆抗病虫目的基因[J]. 生物技术,2002,(6):5-7.

[6] 丁群星,谢友菊,戴景瑞,等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究[J]. 中国科学(B 辑),1993,23(7):707-713.

[7] 裴新梧,崔凯荣,孔英珍,等. 导入高粱 DNA 选育丰产、抗逆小麦新品系及其 RAPD 分子验证[J]. 兰州大学学报(自然科学版),1999,35(2):130-135.

[8] 刘德璞,李长有. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系[J]. 松江学刊(自然科学版),1995,3:40-43.

[9] 杜海军,芦兴武,赵恩鹏,等. 花生 DNA 导入大豆的后代 POD、SOD 活性及其同工酶谱分析[J]. 东北师大学报(自然科学版),1996,1:87-89.

[10] 徐香玲,邹联沛,刘伟华,等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学,1999,(2):101-108.

[11] 周思军. 大豆抗虫基因转移及转化系统优化研究[D]. 东北农业大学博士学位论文,2000.

[12] 章善庆,童汉华,薛锐,等. 利用 *bar* 基因导入恢复系提高杂交稻纯度的尝试[J]. 中国农业科学,1998,31(6):33-37.

[13] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998:600-601.

[14] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D. W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南,第三版[M]. 北京:2002,科学出版社,502-512.

[15] Peng J, Wen F, Lister R M, et al. Inheritance of gus and neo genes in transgenic rice[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 91-104.

[16] Wang Z H, Cui H R, Shu Q Y, et al. Genetic analysis of transgenes in the progenies of Bt rice cross to conventional rice varieties[J]. Heredities, 2000, 22(5):309-312.

[17] 刘昭军. 大豆外缘 DNA 直接导入技术及育种应用[J]. 大豆科学,2004, 4:301-306.

[18] 刘昭军,李希臣,刘丽燕,等. 大豆白化致死突变系的发现与分析[J]. 大豆科学,2005,3:229-231.

[19] 曾君祉,吴有强,王东江,等. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨[J]. 科学通报,1998, 43(6):561-566.