

转 *TaDREB3* 基因大豆基因漂流距离及频率的研究

张彬彬, 李永光, 盖江南, 李文滨

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为明确转基因大豆的种植及生态安全性,将导入抗逆基因 *TaDREB3* 的转基因大豆 T_4 代播种于大田,周围种植非转基因对照,收获转基因大豆周围不同距离的非转基因大豆种子。经过连续2 a的田间及盆栽试验,通过除草剂草丁膦的筛选和分子检测等手段,研究了转 *TaDREB3* 基因大豆的基因漂流距离及漂流频率。结果表明:在三叶期整株喷洒 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草丁膦是较适宜的抗性植株筛选浓度;在自然条件下漂流距离为1 m的非转基因大豆中检测到1条阳性带,漂流距离为3、5和8 m的非转基因大豆均未检测到阳性带,确定转 *TaDREB3* 基因大豆基因漂流距离为1 m,基因漂流频率为0.0348%。

关键词:转基因大豆;基因漂流;漂流距离;漂流频率

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0563-03

Distance and Frequency of Gene Flow in Transgenic Soybean Overexpressing *TaDREB3*

ZHANG Bin-bin, LI Yong-guang, GAI Jiang-nan, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to investigate the ecological safety issues associated with transgenic soybeans planting, seeds of T_4 generation of transgenic lines overexpressing *TaDREB3*, a stress-tolerant gene, were sowed in the field, surrounded with the nontransgenic control plant. The distance and frequency of gene flow in transgenic soybean overexpressing *TaDREB3* were determined. Two successive years' field and potted tests were carried out through glufosinate selection as well as molecular detection. The results showed that the optimal concentration of glufosinate selection in the trifoliolate stage was $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. One positive plant was detected in the nontransgenic soybean at 1 m distance from the transgenic plant center, while no positive was detected in 3, 5 and 8 m plants. Therefore, the possibility of *TaDREB3* gene flow under nature condition was 0.03478% with 1 m distance.

Key words: Transgenic soybean; Gene flow; Distance of gene flow; Frequency of gene flow

利用生物工程的方法将外源基因导入作物以期改良其产量、品质、抗性等性状,是目前应用比较广泛的育种方法,大豆、玉米、水稻等多种作物已经被成功转化^[1-2]。同时转基因作物的安全性研究也成为国内外普遍关注的课题^[3-4]。对于转基因作物,尤其是野生资源非常丰富的大豆,其导入的外源基因是否会发生漂流?如发生基因漂流,漂流距离有多远?漂流的频率是多少?转基因大豆对野生大豆或栽培大豆是否产生影响还鲜有报道^[5]。

TaDREB3 基因是从小麦 (*Triticum aestivum* L.) 中克隆的转录因子,在非生物胁迫条件下诱导表达可提高植株的抗旱性和耐盐性^[6-8]。以东农50大豆为试验材料,通过农杆菌介导法将 *TaDREB3* 基因及筛选标记基因 *bar* 转化大豆,获得高世代稳定遗传的转基因植株。并通过除草剂草丁膦的筛选

和分子检测等手段,对转 *TaDREB3* 基因大豆 T_4 代植株的基因漂流距离及频率进行了研究,为转基因大豆的安全性评价提供直接证据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

转 *TaDREB3* 基因大豆的 T_4 种子、非转基因大豆种子(东农50),由东北农业大学大豆科学研究所提供。

1.2 酶与试剂

PCR引物, dNTP, *Taq* 酶等由生工生物工程(上海)有限责任公司提供;试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 草丁膦筛选浓度的设定 对非转基因大豆植株在三叶期分别用0、50、75、100和150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

收稿日期:2011-05-13

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-002)。

第一作者简介:张彬彬(1977-),女,讲师,博士,主要从事植物生物技术研究。E-mail:bbzhang77@126.com。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@yahoo.com。

的草丁膦喷洒整株叶片,3 d后观察,根据叶片枯黄及萎蔫程度确定草丁膦的筛选浓度。

1.3.2 基因漂流试验 试验于2009年5~10月在黑龙江省农业科学院大庆分院安达市郊的试验地大豆隔离区中进行。地势平坦,土壤肥沃。试验地周围2 000 m范围以内没有任何作物,5 000 m范围以内没有豆科作物种植,均为饲料用草。以10×80 m为中心区种植转基因大豆,周围种植10 m非转基因大豆对照(东农50)为漂流检测区。收获转基因大豆中心区东、南、西、北4个垂直方向半径为1、3、5和8 m范围的1 m²非转基因大豆。

漂流距离检测试验于2010年6~8月进行,对1、3、5和8 m范围内收获的非转基因大豆(东农50)分别随机取3 000粒进行盆栽。三叶期用含75 mg·L⁻¹的草丁膦手动喷雾器进行整株喷洒,3 d后观察叶片有无黄色斑点,整株叶片均没有黄色斑点的初步确定为抗性植株,提取其DNA并进行PCR检测。

1.3.3 DNA提取与PCR检测 植物DNA的提取采用小量提取法(常规方法)^[9]。根据DREB基因的一段序列设计PCR引物,扩增的片段为712 bp,引物序列如下:

5'-GGCAAGGAAGAAGCAACATCTGACTGG-3'

5'-TGACGGTAGATCGGAAGGACGCTGA-3'

PCR反应条件:94℃预变性8 min,94℃变性1 min,62℃复性30 s,72℃延伸30 s,72℃终延伸5 min,4℃终止反应,35个循环。

1.3.4 基因漂流频率的估算方法 按种子成苗数的基因漂流频率进行计算,公式如下:

基因漂流频率(%)=(草丁膦抗性苗数/总出苗数)×100

2 结果与分析

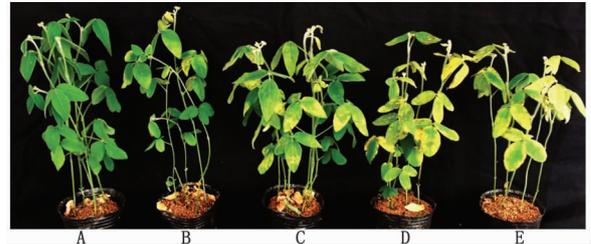
2.1 草丁膦筛选浓度的确定

对非转基因大豆的植株在三叶期分别用0、50、75、100和150 mg·L⁻¹的草丁膦喷洒整株叶片,3 d后观察。发现喷洒75 mg·L⁻¹草丁膦的植株叶片表面开始有黄色斑点,喷洒100 mg·L⁻¹的植株叶片黄色斑点较大,且有萎蔫(图1)。最终确定75 mg·L⁻¹草丁膦较适宜作为抗性植株的筛选浓度。

2.2 转TaDREB3基因大豆的基因漂流距离

对收获的不同距离范围内的非转基因大豆(东农50)在三叶期用含75 mg·L⁻¹的草丁膦手动喷雾器进行整株喷洒,结果施药3 d后,90%出现整株叶片均有黄色斑点,且有轻度萎蔫。将叶片均无黄色斑点的初步确定为抗性植株(图2)。1 m筛选出21株,3 m筛选出19株,5 m筛选出20株,8 m筛选出

14株,对其提取DNA并进一步进行PCR检测发现:漂流距离为3、5和8 m的非转基因大豆均没有检测到阳性带(图略);漂流距离为1 m的非转基因大豆,检测到1条阳性带(图3)。说明距离转基因大豆为1 m以外的没有发生基因漂移,转TaDREB3大豆基因漂流距离为1 m。



A、B、C、D、E分别为0、50、75、100、150 mg·L⁻¹草丁膦喷洒3 d后的植株。

A、B、C、D和E stands for soybean plant three days after sprayed with 0, 50, 75, 100 and 150 mg·L⁻¹ glufosinate, respectively.

图1 非转基因大豆草丁膦筛选浓度的确定

Fig. 1 Appropriate glufosinate concentration for nontransgenic soybean selection

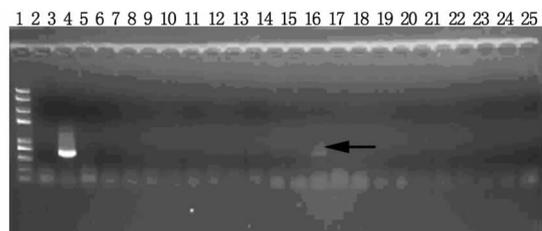


A:非抗性植株 B:抗性植株

A: Negative B: Positive

图2 喷洒草丁膦3 d后的大豆植株表现

Fig. 2 Performance of soybean plant after sprayed glufosinate for 3 days



1. Marker; 2. 水; 3. 阳性质粒; 4. 东农50; 5~25. 经草丁膦初筛的1 m的非转基因大豆。

1. Marker; 2. H₂O; 3. Positive plasmid; 4 Dongnong50; 5-25. Non-transgenic soybean that was 1 m away from transgenic soybean and showed resistance in glufosinate treatment

图3 经草丁膦初筛的非转基因大豆(漂流距离为1 m)PCR检测

Fig. 3 PCR analysis on positive lines in glufosinate treatment (with distance of flow as 1 m)

2.3 转 *TaDREB3* 基因大豆的基因漂流频率

从表 1 可以看出,转基因大豆在 1 m 的漂流频

率为 0.0348%,3、5 和 8 m 的均为 0。说明转基因

大豆在自然条件下,基因漂流的频率较低。

表 1 转 *TaDREB3* 基因大豆在不同距离的基因漂流频率

Table 1 The frequency of gene flow of transgenic soybean overexpressing with different distance

距离 Distance/m	播种数 Sowing seeds number	出苗数 Emergence number	PPT 抗性植株 Plants with PPT resistance	PCR 检测阳性株数 Plants with PCR positive	基因漂流频率 Frequency of gene flow/%
1	3000	2876	21	1	0.0348
3	3000	2908	19	0	0
5	3000	2901	20	0	0
8	3000	2892	14	0	0

3 讨论

植物中外源基因的扩散可以通过种子或无性繁殖体散落在环境中形成自生苗,开花后与野生近缘种或其它品种杂交,形成自我繁殖的个体,如在远距离的运输过程中发生种子散落,基因通过这种方式发生逃逸的距离可能会很远;也可以通过携带转基因的花粉传播至其它品种或近缘野生种,产生杂种,从而完成转基因向环境漂流的过程^[10]。大豆属于自花授粉植物,天然杂交率很低,但不排除外源基因漂流到非转基因大豆、特别是近缘野生大豆和豆科杂草的可能性^[11]。该研究中发现在自然条件下,转基因大豆漂流频率为 0.0348%,漂流距离为 1 m,这与有关转基因大豆漂流概率接近 0.05%、漂流距离为 0.7 m 的研究结果相符^[5]。

另外,在试验中发现,转 *TaDREB3* 基因大豆在表现出抗旱、耐盐碱性的同时,主茎节数、分枝数、单株荚数等农艺性状也显著提高^[12],但是转基因大豆的品质性状是否发生改变,以及种植转基因大豆对土壤的微生物构成、数量和对后茬作物的生长发育是否有影响,都有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 武小霞,李文滨,张淑珍. 我国大豆转基因研究进展[J]. 大豆科学,2005,24(2):144-149. (Wu X X, Li W B, Zhang S Z. The research advance on soybean transgene in China[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 144-149.)
- [2] 李建生. 玉米分子育种研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 10-13. (Li J S. Progress of molecular breeding in maize[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2007, 9(2): 10-13.)
- [3] 朱彦涛,徐虹,郭嵩光,等. 植物转基因技术与当代社会发展[J]. 中国农学通报,2008,24(4):509-522. (Zhu Y T, Xu H, Guo A G, et al. Plant transgenic technique and current social development[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(4): 509-522.)
- [4] 刘娜,李葱葱,徐文静,等. 转基因作物环境安全性研究进展[J]. 分子植物育种,2006,4(1):9-14. (Liu N, Li C C, Xu W J, et al. Advances study on environmental safety of transgenic crops[J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(1): 9-14.)
- [5] 吕晓波,王宏燕,刘琦,等. 抗草甘膦转基因大豆在黑土生态系统种植的安全性研究[J]. 大豆科学,2009,28(2):260-265. (Lv X B, Wang H Y, Liu Q, et al. Biosafety of roundup ready soybean(RRS)planted in black soil ecosystem[J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 260-265.)
- [6] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the DRF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold inducible gene expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 290:998-1009.
- [7] Klucher K M, Chow H, Reiser L, et al. The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2* [J]. Plant Cell, 1996, 8(2): 137-153.
- [8] Liu W Q, Shi Y C, Hu Y J. The tolerance to abiotic stresses mediated by *DREB*-like transcription factors in *nicotiana tabacum* [J]. Journal of Wuhan Botanical, 2007, 25(3): 222-225.
- [9] 周思君. 小样品大批量大豆模板 DNA 快速分离法[J]. 大豆科学, 1999, 18(4): 318-321. (Zhou S J. Rapid isolation of soybean DNA for PCR with large numbers of small samples[J]. Soybean Science, 1999, 18(4): 318-321.)
- [10] 薄慧杰. 转基因油菜检测技术与环境安全性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006:36-47. (Bo H J. Development of detection techniques and assessment of environmental risks of transgenic rape seeds[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2006: 36-47.)
- [11] 刘琦,李希臣,刘昭军,等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 I 大豆风媒介传粉的基因漂移实验研究[J]. 黑龙江农业科学, 2008(1): 14-16. (Liu Q, Li X C, Liu Z J, et al. Study on gene flow of roundup ready soybean with CP4 EPSPS. I Study on roundup ready gene move to soybean by anemophily[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2008(1): 14-16.)
- [12] 张彬彬,刘淼,马有志,等. 转 *TaDREB3* 基因大豆的农艺性状研究[J]. 东北农业大学学报,2010,41(12):6-10. (Zhang B B, Liu M, Ma Y Z, et al. Study on agronomic traits of transgenic soybean overexpressing *TaDREB3* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(12): 6-10.)