

## 抗虫基因 *cry1Ab13* 在大豆中的遗传转化及抗虫性鉴定

高 嵩<sup>1</sup> 何 欢<sup>1</sup> 吴 楠<sup>1</sup> 韩 丹<sup>1</sup> 曲 静<sup>1</sup> 张 君<sup>1</sup> 张凤晶<sup>2</sup> 王丕武<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 生物技术中心, 吉林 长春, 130118; 2. 长春八一医院, 吉林 长春, 130061)

**摘 要:** *cry1Ab13* 基因是抗虫基因, 编码的杀虫晶体蛋白对鳞翅目害虫具有一定的毒杀作用, 构建了植物表达载体 pCambia3300-35S-*cry1Ab13*, 通过花粉管通道法将该载体转入大豆品种吉农 28 中, 经 PCR 扩增检测得到 15 株  $T_1$  代阳性植株。Southern blotting 分析显示有 5 株出现杂交信号, 并以单拷贝形式整合到大豆基因组中。荧光定量 PCR 测定结果表明: *cry1Ab13* 基因在转化植株的叶、茎秆中均有表达, 每株表达量各不相同, 在叶片部位表达量相对较高, 最高为 6.7, 最低为 2.5; 在茎部表达量最高为 0.76, 最低为 0.31。对  $T_1$  代阳性植株籽粒, 采用圆盘分隔法接入大豆食心虫幼虫, 进行初步抗虫试验, 结果显示转化植株抗虫效果明显, 但后代稳定性还需进一步研究。

**关键词:** 大豆; *cry1Ab13* 基因; 植物表达载体; 抗虫

中图分类号: S332.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0550

## Identification on Insect-resistant Gene of *cry1Ab13* Transformation into *Glycine max* L. Merr.

GAO Song<sup>1</sup>, HE Huan<sup>1</sup>, WU Nan<sup>1</sup>, HAN Dan<sup>1</sup>, QU Jing<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Feng-jing<sup>2</sup>, WANG Pi-wu<sup>1</sup>

(1. Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Changchun Bayi Hospital, Changchun 130061, China)

**Abstract:** The *cry1Ab13* gene used in this experiment is the insect resistant gene, it encodes insecticidal crystal protein and has certain toxic killing effect on *Lepidoptera* pests. The plant expression vector of pCambia3300-35S-*cry1Ab13* was constructed. The transgenic plants were obtained by pollen-tube pathway transformation of soybean JN28. 15 transformed plants in  $T_1$  generation were tested by PCR, while Southern blotting indicated that only 5 of them showed hybridization bands, and the functional fragment was integrated into the soybean genome by single copy. The result of quantitative real-time PCR showed that the *cry1Ab13* gene was expressed in soybean leaves and stems, and each plant expression was different, the relatively high expression was in leaves, the highest was 6.7, the lowest was 2.5, while it was 0.76 and 0.31 in the stems. The seeds of PCR positive plants in  $T_1$  generation and newly hatched larvae were introduced, and initial insect resistant assay was made by disk method. Result suggested that transgenic plant had an obvious resistant effect. Further investigations on the genetic stability of *cry1Ab13* in transgenic plants and generations are to be carried out.

**Keywords:** Soybean; *Cry1Ab13*; Plant expression vector; Insect-resistant

大豆虫害是影响大豆产量和质量的一个重要因素。1991–2010 年我国大豆虫害发生面积从  $4.93\ 697 \times 10^6$  次  $\cdot$   $\text{hm}^{-2}$  增至  $8.344\ 06 \times 10^7$  次  $\cdot$   $\text{hm}^{-2}$ , 虫害发生强度从 0.70% 增至 1.02%<sup>[1]</sup>。大豆食心虫 (*Leguminivora glycinivorella* Matsumura)、豆天蛾 (*Clanis bilineata*)、大豆卷叶螟 (*Lamprosema indicata* Fabricius)、豆荚螟 (*Etiella zinckenella* Treitschke) 等鳞翅目害虫幼虫取食大豆豆荚和籽粒, 严重影响大豆的产量和品质。为有效防治虫害, 大量使用化学杀虫剂, 不仅污染环境, 对人和动物也有伤害。在全球农药市场中, 28% 的市场份额是杀虫剂, 仅 2011 年一年销售总额就达到了 140 亿美元<sup>[2]</sup>, 因此, 有效防治害虫已成为有关国民经济发展的重大事件。2015 年 1~6 月据国家统计局统计, 全国农药总产量为 180.7 万 t, 同比增加 3.2%, 除草剂产量为 88.4 万 t,

杀虫剂产量为 24.8 万 t<sup>[3]</sup>。减少化学杀虫剂用量, 采用综合方法防治害虫是实现农业可持续发展的必然趋势, 通过利用转基因技术, 使抗虫基因在植物中表达, 是综合防治害虫的重要方式之一<sup>[4]</sup>。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是对鳞翅目等多种害虫具有高毒杀作用的微生物。在它的芽孢期, 能够产生使特定昆虫致死的杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs)<sup>[5]</sup>。到目前为止 *cry1Ab* 基因共有 42 种<sup>[6]</sup>, 其 ICPs 的氨基酸序列同源性为 75%~95%, 只是杀虫活性不同。本试验所用的 *cry1Ab13* 基因与上述 *cry1Ab* 基因同源性达到 95% 以上, 对鳞翅目害虫具有高毒杀作用。当昆虫取食 ICPs 后, ICPs 昆虫肠道内被激活, 并于肠道内特有的特异性结合蛋白结合, 结合以后, ICPs 全部或部分嵌合于肠道内的细胞膜中, 使细胞膜产

收稿日期: 2016-02-15

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2014ZX08004-004)。

第一作者简介: 高嵩 (1989-), 女, 硕士, 从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail: gaosong2425@icloud.com。

通讯作者: 王丕武 (1958-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: peiwuw@163.com。

生一些孔洞或离子通道,导致细胞内渗透压被破坏,而细胞破裂。随着以上过程的发生,昆虫将不再食,最后死亡<sup>[7]</sup>。因此 *Bt* 在植物转基因抗虫育种中也得到广泛的应用与研究,例如转 *Bt* 基因玉米、棉花、水稻、大豆等,尤其是抗虫棉在我国得到了大面积的种植。*cry1Ab* 基因在水稻研究试验应用比较广泛,如转 *cry1Ab* 基因在“克螟稻”<sup>[8]</sup>、水稻汕优 63<sup>[9]</sup>、基因粳稻<sup>[10]</sup>等试验中,这类基因对水稻螟、稻纵卷叶螟、二化螟等鳞翅目害虫表现出明显抗性。而且檀建新等<sup>[11]</sup>试验证明,*cry1Ab13* 基因对小菜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫等鳞翅目害虫具有高毒杀力。蓝岚等<sup>[12]</sup>将抗虫基因 *cryIA* 转入大豆品种东农 63 中,并将 T<sub>2</sub>代阳性植株进行室内抗虫试验,比对照品种具有明显抗性。陈秀华等<sup>[13]</sup>将抗虫基因 *cryIIem* 转化到绥农 14 中,并对 T<sub>2</sub>代阳性植株进行抗虫性检测,得到 1 株具有明显抗虫效果和 7 株抗虫效果较好的转基因植株。姚瑶等<sup>[14]</sup>将 *cry1C* 抗虫基因转入大豆品种 Williams 82 中,获得 28 株阳性大豆转化植株。

应用基因工程技术筛选高毒杀力的 *Bt* 基因,构建稳定的工程菌,不仅具有专一性,而且能够大大缩短育种年限,还能增强杀虫效率,是解决大豆食心虫普遍发生的有效途径。*cry1Ab* 基因在大豆中的应用还少有报道,本试验将前期克隆的 *cry1Ab13* 构建植物表达载体并转化大豆,以选育抗虫性良好的转基因大豆新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆重组载体 pUC57-*cry1Ab13* 和表达载体 pCambia3300-35S 均由吉林省农业科学院提供。所用受体大豆品种为吉农 28,大肠杆菌 DH5α 菌株由本实验室提供。大豆食心虫为 2015 年 9 月中下旬在本实验室农场采集。

1.2 方法

1.2.1 构建 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 植物表达载体 分别提取 pUC57-*cry1Ab13* 和 pCambia3300-35S 的质粒 DNA,使用特异性引物 AbS/AbAS(表 1),PCR 扩增含有 *cry1Ab13* 目的基因的 pUC57 克隆载体质粒 DNA,PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 35 s,62℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 35 s,72℃ 后延伸 10 min,35 个循环,4℃ 保存。PCR 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,并将回收纯化目的片段 *cry1Ab13*,与基础表达载体 pCambia3300 分别使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切。然后分别回收基础表达载体和目的基因片段,使用 T4 连接酶进行连接,22℃ 反应 18 h,65℃ 使酶失活 20 min。将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞中,次日挑取所有单菌落并进行质粒 DNA 的提取,对质粒 DNA 进行 PCR 检测及双酶切鉴定。PCR 回收产物由北京三博远志生物技术公司进行测序。将得到以抗除草剂 *Bar* 基因为筛选标记的 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 植物表达载体。植物表达载体结构,如图 1 所示。

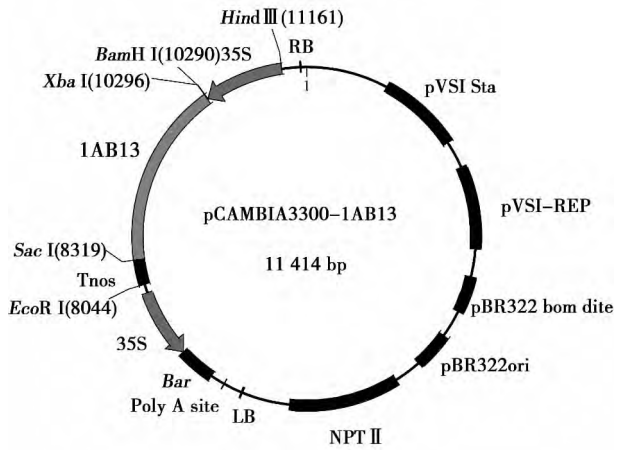


图 1 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 表达载体结构  
Fig. 1 The structure chart of over expression vector pCambia3300-35S-*cry1Ab13*

表 1 引物信息  
Table 1 The information of primers

名称	引物序列	酶切位点	目的片段大小
Name	Primer sequence( 5′→3′)	Restriction site	Target fragment length/bp
Ab1	TTTGGATCCAAGCTTTCTAGACCCGGGCTAT	<i>Bam</i> H I	1995
Ab2	TTTGAGCTCTCAAAGTTCATCCTTCTCGGAGT	<i>Sac</i> I	
35S1	TAGAGGACCTAACAGAAC	500	
35S2	CCGTGTTCTCTCCAAATG		
Bar1	TCAAATCTCGGTGACGGGC	552	
Bar2	ATGAGCCCAGAACGACGC		
NOS1	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG		

续表 1

名称	引物序列	酶切位点	目的片段大小
Name	Primer sequence(5'→3')	Restriction site	Target fragment length/bp
NOS2	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	192	
QAb1	TTTGGAGAGAGTGTGGGGTC		
QAb2	GATCCCTCGATACCCCTGAGC		
QB1	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC		
QB2	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC		

1.2.2 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 植物表达载体的遗传转化 本试验采用花粉管通道法<sup>[15-16]</sup>将构建好的 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 的质粒 DNA 转入受体大豆品种吉农 28 中。

1.2.3 PCR 检测 采集 T<sub>1</sub>代转基因大豆植株幼嫩叶片,采用 CTAB 法<sup>[17-18]</sup>提取基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板,pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 质粒作为阳性对照,未转化大豆植株作为阴性对照,无菌水作为空白对照,对以下基因:目的基因 *cry1Ab13*、抗除草剂基因 *Bar*、启动子基因 35S、终止子基因 Nos 分别进行 PCR 检测。特异性引物 Ab1/Ab2、Bar1/Bar2、35S1/35S2 和 Nos1/Nos2 由 primer 5.0 软件设计(表 1)。

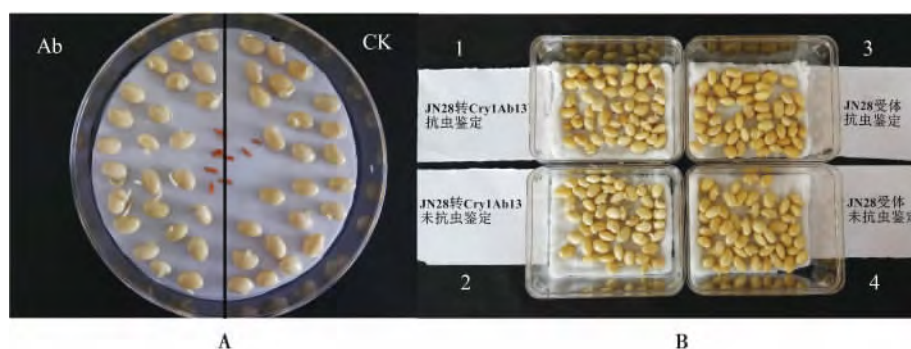
1.2.4 转基因植株的 Southern blotting 检测 大量提取 T<sub>1</sub>代阳性转基因植株叶片的基因组 DNA,以其为模板,pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 质粒 DNA 作为阳性对照,未转化大豆植株作为阴性对照,使用 *Hind* III 限制性内切酶 37℃ 酶切 18 h,将目的基因 *cry1Ab13* 回收纯化后作为探针,使用 Southern 杂交试剂盒(Roche 公司产品),并按照说明书上操作步骤进行 Southern 杂交检测。

1.2.5 转基因植株的荧光定量 PCR 检测 将 Southern 检测出现杂交信号的转基因植株,利用 Total RNA Extraction Kit 试剂盒,提取叶片及茎秆的总

RNA,测定浓度后反转录得到 cDNA。结合荧光定量 PCR 原理,选择大豆肌动蛋白基因为内参基因,并根据目的基因 *cry1Ab13* 和内参基因基因序列,设计了特异性引物:QAb1/QAb2 和 QB1/QB2(表 1)。依据 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明进行操作,每个样本以及对照 CK 的 cDNA 均重复 3 次,采用两步法进行 PCR 扩增,根据相对定量中的 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法进行计算<sup>[19]</sup>,对大豆叶片和茎秆组织总 RNA 进行分析<sup>[20-21]</sup>。

1.2.6 T<sub>1</sub>代转基因植株抗虫性鉴定 随机各选取 200 粒 PCR 检测为阳性的 T<sub>1</sub>代转化植株大豆籽粒,以未转化的大豆籽粒为对照,进行室内抗虫性鉴定,在室温为 20~22℃,湿度为 85%~90% 的条件下,采用圆盘分隔法检测转抗虫基因的大豆植株对大豆食心虫的抗性<sup>[22]</sup>,籽粒浸泡催芽 16 h 后使用。

准备铺有两层滤纸圆形培养皿(需高压灭菌),将 10 头大豆食心虫幼虫放置在培养皿中心,外周等距放置生长健康、大小一致的大豆籽粒,让大豆食心虫自主选择,将 25 粒转化大豆籽粒均匀分散在培养皿左侧,25 粒未转化大豆籽粒均匀分散在培养皿右侧,设 4 次重复,保湿籽粒 6 d 后,观察记录虫蛀情况,及幼苗的芽长和鲜重。根据大豆籽粒的生长情况划分其抗虫性的强弱,进行有针对性的进一步研究。圆盘分隔法如图 2A 所示。



Ab: 转基因大豆籽粒; CK: 未转化大豆籽粒; 1、2: 转基因大豆籽粒; 3、4: 未转化大豆籽粒;  
1、3: 接种大豆食心虫。

Ab: Transgenic seed; CK: Non-transformed seed; 1 2: Transgenic seed; 3 4: Non-transformed seed;  
1 3: Inoculation of soybean moth.

图 2 圆盘分隔法抗虫鉴定(A)及对比试验(B)

Fig. 2 Insect-resistance identification by disk method (A) and contrast test (B)

为保证准确性,设计了一组对比试验。准备 4 个铺有纱布的培养盒(需高压灭菌),分别将 50 粒转化大豆籽粒均匀分散在第 1、2 两个培养盒中,并在第 1 盒中放入 20 头大豆食心虫,作为吉农 28 转 *cry1Ab13* 抗虫性鉴定,第 2 盒不放入大豆食心虫,为吉农 28 转 *cry1Ab13* 未抗虫性鉴定;再分别将 50 粒未转化大豆籽粒均匀分散在第 3、4 两个培养盒中,并在第 3 盒中放入 20 头大豆食心虫,作为吉农 28 受体抗虫性鉴定,第 4 盒不放入大豆食心虫,为吉农 28 受体未抗虫性鉴定。鉴定方法同上。对比试验如图 2B 所示。

## 2 结果与分析

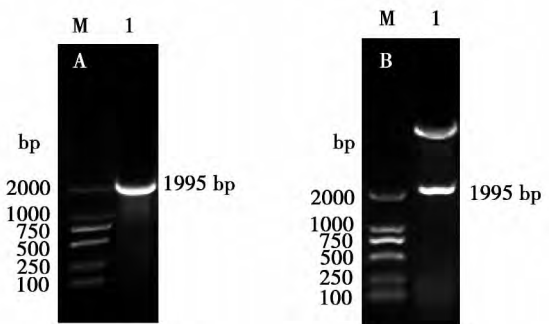
### 2.1 植物表达载体的质粒 PCR 及酶切鉴定

以重组载体 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 质粒为模板,使用引物 AbS/AbAS(表 1)进行 PCR 扩增得到 1 995 bp 目的条带,经 *Sac* I/*Bam* H I 双酶切鉴定得到 1 995 bp 的目的片段,如图 3 所示。说明 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 植物表达载体构建成功。

### 2.2 T<sub>1</sub>代转基因植株的获得及检测

2.2.1 PCR 检测 以提取的转基因植株的基因组 DNA 为模板,植物表达载体 pCambia3300-35S-*cry1Ab13* 的质粒 DNA 为阳性对照,未转化的大豆植

株为阴性对照,无菌水为空白对照,对目的基因 *cry1Ab13*、抗除草剂基因 *Bar*、启动子 35S 和终止子 Nos 进行 PCR 检测。由图 4 可知,模板位置的条带与阳性对照位置相同(1 995, 552, 500, 192 bp),且阴性对照和空白对照均无扩增条带产生,说明 PCR 检测结果可靠。经 PCR 检测得到 15 株 T<sub>1</sub>代转基因阳性植株。

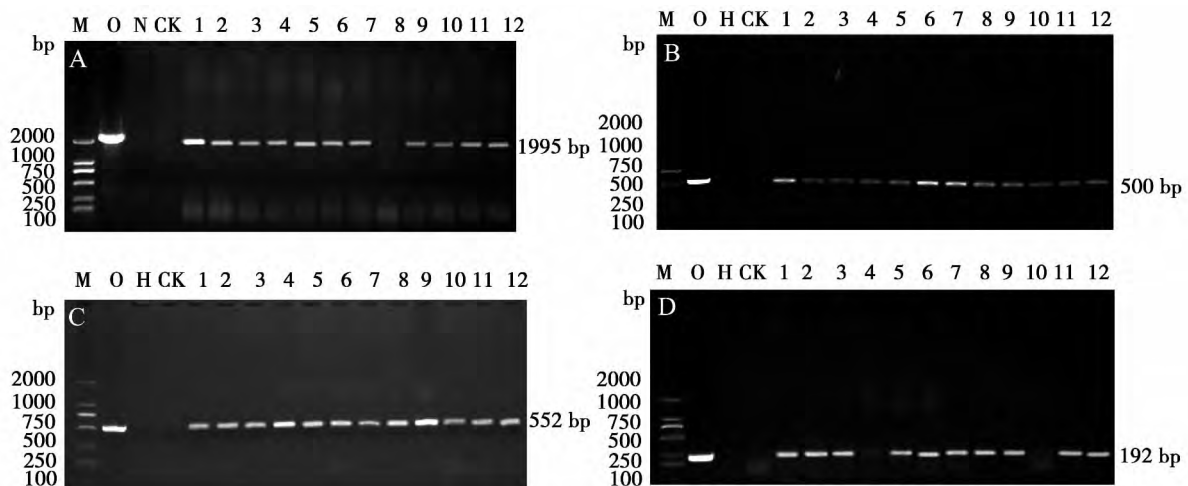


M: DL2000 DNA marker; 1: 质粒 pCambia3300-35S-*cry1Ab13*.

M: DNA Marker DL2000; 1: Plasmid pCambia3300-35S-*cry1Ab13*.

图 3 *cry1Ab13* 基因质粒 PCR 扩增(A)及双酶切鉴定(B)

Fig. 3 PCR detection (A) and double enzyme digestion (B) of plasmid *cry1Ab13*



M: DL2000 DNA marker; O: 质粒 DNA; H: 无菌水; CK: 未转化植株; 1~12: 转化植株。

M: DNA Marker DL2000; O: Plasmid DNA; H: Sterile water; CK: Non-transformed plant; 1-12: Transgenic plants.

图 4 T<sub>1</sub>代阳性植株目的基因 *cry1Ab13* (A)、35S (B)、*Bar* (C) 及 Nos (D) 的检测

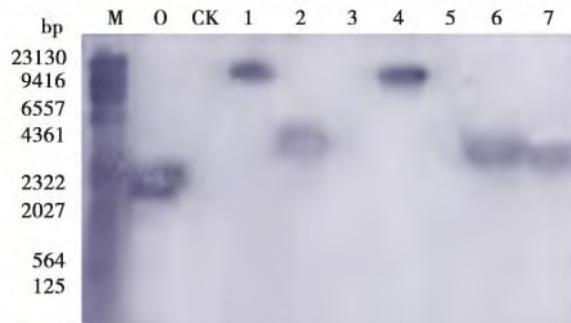
Fig. 4 PCR detection of T<sub>1</sub> transgenic plants with *cry1Ab13* (A) 35S (B) *Bar* (C) and Nos (D)

2.2.2 Southern blotting 检测 对 T<sub>1</sub>代 PCR 检测为阳性的转基因植株,进行 Southern blotting 检测。*cry1Ab13* 基因的 PCR 回收产物为阳性对照,非转化植株作为阴性对照,进行 Southern 杂交分析。如图 5 所示,在 1、2、4、6、7 这 5 条泳道中各出现单条杂交带,而非转化植株没有出现杂交带,说明 *cry1Ab13* 基因以单拷贝的形式已经整合到大豆基因组当中,

且整合发生于不同的基因座位上。

2.2.3 荧光定量 PCR 检测 将 Southern 杂交检测出现杂交信号的 5 株转基因植株,进行荧光定量 PCR 检测。如图 6 所示,转基因大豆植株中 *cry1Ab13* 基因在叶片和茎秆中均有表达,在叶中的表达量分别为: 5.39 4.00 6.77 2.49 3.44; 在茎秆中的表达量分别为: 1.10 0.77 1.16 0.31 0.97,不

同转化植株间 *cry1Ab13* 基因的表达量有所不同,且叶片中的表达量明显比茎秆中的表达量高。*cry1Ab13* 基因在 3 号的叶片和茎秆中表达量最高。

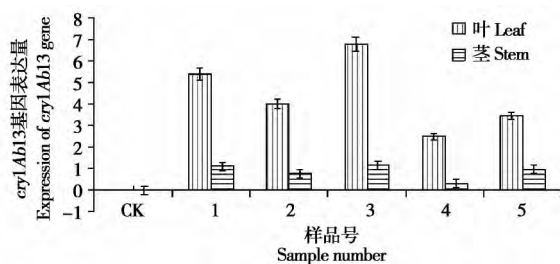


M:  $\lambda$  Hind III DNA Marker; O: 质粒 DNA; CK: 未转化植株; 1~7: 转化植株。

M:  $\lambda$  Hind III DNA Marker; O: Plasmid DNA; CK: Non-transformed plant; 1~7: Transgenic plants.

图 5  $T_1$  代转基因植株 Southern 杂交检测

Fig. 5 Southern blot analysis of  $T_1$  transgenic plants

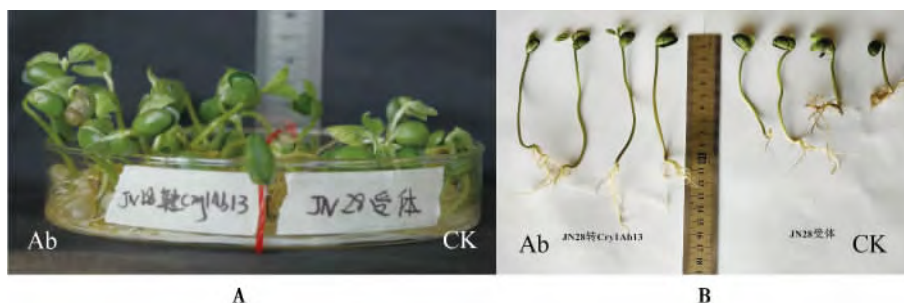


CK: 未转化植株; 1~5: 转化植株。

CK: Non-transformed plant; 1~5: Transgenic plants.

图 6 *cry1Ab13* 基因在  $T_1$  代转化植株中相对表达量

Fig. 6 The relative expression of  $T_1$  transgenic plants with *cry1Ab13* gene



Ab: 转化幼苗; CK: 未转化幼苗。

Ab: Transgenic seedling; CK: Non-transformed seedling.

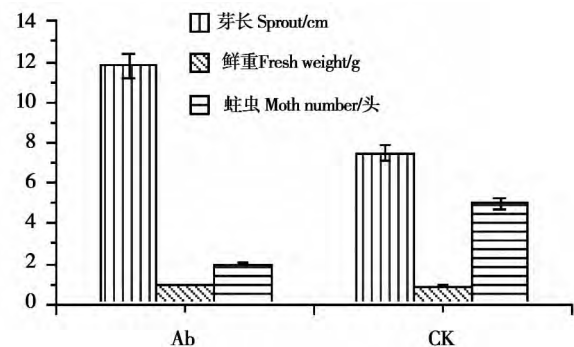
图 8  $T_1$  代转基因植株圆盘分割法的抗虫性鉴定

Fig. 8 The insect-resistance identification of  $T_1$  transgenic plants by disk method

对比试验抗虫性鉴定结果: 第 1 组芽长变幅为 8.0 ~ 13.9 cm, 平均 10.06 cm; 鲜重变幅为 0.89 ~ 1.39 g, 平均为 1.06 g; 第 2 组芽长变幅为 8.1 ~ 14.7 cm, 平均 11.23 cm; 鲜重变幅为 0.81 ~ 1.40 g,

### 2.3 $T_1$ 代转基因植株的抗虫性鉴定

根据圆盘分割法检测结果, 转化植株芽长变幅为 8.9 ~ 14.3 cm, 平均为 11.8 cm; 鲜重变幅为 0.804 ~ 1.267 g, 平均 0.967 g; 驻虫数最高为 2 头, 最低为 1 头, 平均 2 头。未转化植株芽长变幅为 2 ~ 13 cm, 平均 7.47 cm; 鲜重变幅为 0.317 ~ 1.259 g, 平均 0.869 g; 驻虫数最高为 6 头, 最低为 4 头, 平均为 5 头。如图 7 所示, 转化植株与未转化植株芽长以及驻虫数有显著差异, 鲜重相差较小。表明转化籽粒在萌发过程中会释放一定的化学信息, 具有一定的驱虫性。



Ab: 转基因籽粒; CK: 未转化籽粒。

Ab: Transgenic seed; CK: Non-transformed seed.

图 7 圆盘分割法植株的芽长、鲜重及驻虫数的统计情况

Fig. 7 The statistics of plants with sprout length fresh weight and the number of moths by disk method

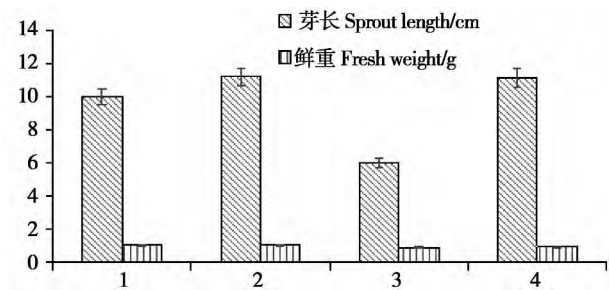
如图 8 所示, 在相同环境和条件下, 转化植株正常生长, 茎挺且直, 长势良好; 而非转化植株生长缓慢, 有的甚至停止生长, 茎较短小, 长势较弱, 转化植株的生长状态明显优于非转化植株。说明大豆食心虫对非转化植株的生长有一定的抑制作用。



异显著,鲜重相差较小。

如图 9 所示,第 1 组与第 2 组皆为转化植株籽粒,第 1 组在大豆食心虫的影响下与第 2 组的平均芽长相差 1.17 cm;第 3 组与第 4 组皆为非转化植株籽粒,第 3 组在大豆食心虫的影响下与第 4 组的平均芽长相差 5.18 cm;第 1 组与第 3 组均接种大豆食心虫,两组芽长相差 4.05 cm;第 2 组与第 4 组均未接种大豆食心虫,两组芽长相差 0.04 cm。

如图 10 所示,在相同环境条件下,转化植株以及未接种大豆食心虫的非转化植株长势良好(第 1、2、4 组),正常生长,而接种大豆食心虫的非转化植株(第 3 组),生长状态与其它 3 组具有明显差异,少部分正常生长,部分长势较弱,有的甚至停止生长。



1、2: 转基因籽粒; 3、4: 未转化籽粒; 1、3: 接种大豆食心虫。

1 2: Transgenic seed; 3 4: Non-transformed seed; 1 3: Inoculation of soybean moth.

图 9 对比试验植株的芽长、鲜重及驻虫数的统计情况

Fig. 9 The statistics of plants with sprout length, fresh weight and the number of moths by contrast test



1、2: 转化幼苗; 3、4: 未转化幼苗; 1、3: 接种大豆食心虫。

1 2: Transgenic seedling; 3 4: Non-transformed seedling; 1 3: Inoculation of soybean moth.

图 10  $T_1$  代转基因植株对比试验的抗虫性鉴定

Fig. 10 The insect-resistance identification of  $T_1$  transgenic plants by contrast test

通过以上比较可以看出,在未接种大豆食心虫的条件下(第 2、4 组),转化植株与非转化植株芽长基本相同,在接种大豆食心虫的条件下,转化植株芽长差异较小(第 1、2 组),非转化植株芽长差异较为显著(第 3、4 组),说明在萌发过程中大豆食心虫对大豆生长有一定的抑制作用,并且转化植株与非转化植株相比(第 1、3 组),对大豆食心虫产生的抑制作用有一定的抗性。

### 3 结论与讨论

花粉管通道转化法是将外源 DNA 通过花朵在授粉过程中形成的花粉管外通道进入胚囊,到达子房后与此时正处于感受态状态下的合子、卵细胞或者其他早期胚胎细胞整合,受精卵正处于减数分裂 DNA 复制的活跃状态,更利于达到转化的目的。因此,花粉管通道法的应用除了需要注意操作手法以外,还需要了解所转化植株的授粉时间以及花粉管通道形成的时间,才更有助于提高转化效率。

目前我国利用花粉管通道法成功获得转基因植株的案例有很多,李茫雪等<sup>[23]</sup>将 *Bt-CPTI* 双价抗虫基因对优良玉米自交系进行遗传转化阳性率达到 2.19%。张立等<sup>[24]</sup>将防御素基因 *alfAFP* 转入小麦中,对转基因后代进行的条锈病抗性鉴定,发现 *alfAFP* 基因对小麦抗病性提高有一定的作用。范

乾程等<sup>[25]</sup>将油体蛋白(Oleosin)基因转入花生中,阳性率达到了 18%。以上试验说明花粉管通道技术可以用于大豆转基因的应用与研究中。

本试验成功构建了以 *Bar* 基因为筛选标记的植物表达载体 pCambia3300-35S-*cry1Ab13*,通过花粉管通道法将该载体转入吉农 28 大豆品种中,经 PCR 扩增检测得到 15 株  $T_1$  代阳性植株,转化率达到了 2.8%,经 Southern blotting 检测有 5 株出现杂交信号,并以单拷贝形式整合到大豆基因组中,通过荧光定量 PCR 检测的结果表明 *cry1Ab13* 基因在转化植株叶片、茎秆中均有表达,每株表达量各不相同,且在叶片中的表达量明显比茎秆中的表达量高。由于大豆青荚皮与黄豆芽成分相似<sup>[26]</sup>,选择使用萌发的  $T_1$  代阳性植株籽粒进行抗虫鉴定,根据抗虫鉴定结果可以看出,由于植物挥发物会刺激昆虫信息素的产生及释放,对其产生抑制或排斥作用,进而干扰昆虫对信息素的反应<sup>[27]</sup>,可以初步判断该基因的转化植株具有一定的驱虫性,并且对能够抑制大豆萌发生长的大豆食心虫有一定抗性。由于时间限制,抗虫效果以及转基因植株挥发物是否改变需进一步研究与验证。

### 参考文献

[1] 欧阳芳,门兴元,戈峰. 1991-2010 年中国主要粮食作物生

- 物灾害发生特征分析[J]. 生物灾害科学, 2014, 37(1): 1-6. (OuYang F, Men X Y, Ge F. Analysis of biological disasters in main food crops of China [J]. Biological Disaster Science 2014, 37(1): 1-6.)
- [2] 孙克. 全球十大杀虫剂的市场与展望 [J]. 农药, 2013, 52(9): 625-631. (Sun K. Market and outlook of the top ten insecticides in the world [J]. Agrochemicals 2013, 52(9): 625-631.)
- [3] 杨晓玲. 2015 年上半年我国农药行业运行情况 [J]. 中国农药, 2015(8): 56-58. (Yang X L. Operation of pesticide industry in China in the first half of 2015 [J]. Journal of China Agrochemicals 2015(8): 56-58.)
- [4] 武小霞, 李文滨. 大豆抗虫基因工程研究进展及发展趋势 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 502-506. (Wu X X, Li W B. Research progress and development direction of soybean pest-resistance gene engineering [J]. Journal of Northeast Agricultural University 2005, 36(4): 502-506.)
- [5] Bravo A, Gill S S, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control [J]. Toxicon, 2007, 49(4): 423-435.
- [6] [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/tox-ins2.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/tox-ins2.html).
- [7] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E, et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco [J]. Nature, 1987, 330(6144): 160-163.
- [8] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. “克螟稻”后代 *cry1Ab* 基因表达特性及其对二化螟抗性的研究 [J]. 中国农业科学, 2001, 34(5): 496-501. (Wu G, Cui H R, Shu Q Y, et al. Expression patterns of *cry1Ab* gene in progenies of ‘Kemingdao’ and the resistance to striped stem borer [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(5): 496-501.)
- [9] 张志罡, 李勇, 朱兆洲. *Cry1Ab* 杀虫蛋白在转 *Bt* 水稻中的表达及在害虫体内的积累动态 [J]. 中国植保导刊, 2010(7): 4. (Zhang Z G, Li Y, Zhu Z Z. Expression of *Cry1Ab* in *Bt* rice and its accumulation dynamics in the body of insect pest [J]. China Plant Protection 2010(7): 4.)
- [10] 刘玉娥, 卢增斌, 叶恭银. 转 *cry1Ab* 基因粳稻对稻纵卷叶螟成虫产卵行为的影响 [J]. 植物保护学报, 2015, 42(1): 17-24. (Liu Y E, Lu Z B, Ye G Y. Effects of transgenic *cry1Ab japonica* rice lines on the oviposition behavior of adult rice leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis* [J]. Journal of Plant Protection 2015, 42(1): 17-24.)
- [11] 檀建新, 张杰, 宋福平, 等. 苏云金芽孢杆菌 *cry1Ab13* 基因的克隆及表达研究 [J]. 微生物学报, 2002, 1: 5. (Tan J X, Zhang J, Song F P, et al. The study on cloning and expression of *Bt cry1Ab13* gene [J]. Acta Microbiologica Sinica 2002, 1: 5.)
- [12] 蓝岚, 吴帅, 申丽威, 等. 根癌农杆菌介导大豆转 *Bt-cryIA* 抗虫基因 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(1): 29-35. (Lan L, Wu S, Shen L W, et al. Transgenic of soybean with *Bt-cry IA* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences 2013, 35(1): 29-35.)
- [13] 陈秀华, 柏锡, 潘欣, 等. 转 *cry1Iem* 基因大豆的培育及抗虫性检测 [J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 959-963. (Chen X H, Bai X, Pan X, et al. Cultivation of *cry1Iem* gene transformed soybean and insect resistant assay [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 959-963.)
- [14] 姚瑶, 钱雪艳, 李闯, 等. 抗虫基因 *Cry1C* 转化大豆的研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12461-12463. (Yao Y, Qian X Y, Li C, et al. Genetic transformation of soybean with insect-resistant genes *Cry1C* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences 2014, 42(35): 12461-12463.)
- [15] Shou H, Palmer R G, Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure [J]. Plant Molecular Biology Reporter 2002, 20(4): 325-334.)
- [16] 武小霞, 刘伟婷, 刘琦, 等. 利用花粉管通道法将抗虫基因 (*cryV*) 转入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 565-574. (Wu X X, Liu W T, Liu Q, et al. Introduction of anti-pest gene (*cryV*) to soybean via pollen-tube pathway [J]. Soybean Science 2010, 29(4): 565-574.)
- [17] 杨金慧, 王丕武, 曲静, 等. *BADH/pepB* 双价基因无选择标记表达载体转化苜蓿的初步研究 [J]. 中国草地学报, 2009, 31(4): 20-23. (Yang J H, Wang P W, Qu J, et al. Research on transforming *BADH* and *pepB* bivalent gene with marker-free expression vector into *Alfalfa* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2009, 31(4): 20-23.)
- [18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2014: 742-744. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. 2ed. Beijing: Science Press 2014: 742-744.)
- [19] Lerat S, England L S, Vincent M L, et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for roundup ready corn and roundup ready soybean in soil samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, 53(5): 1337-1342.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Lee E J, Schmittgen T D. Comparison of RNA assay methods used to normalize cDNA for quantitative real-time PCR [J]. Analytical Biochemistry 2006, 357(2): 299-301.
- [22] 李婷婷, 韩岚岚, 赵奎军, 等. 圆盘分割法在转基因大豆抗虫鉴定上的应用 [J]. 作物杂志, 2011(4): 20-22. (Li T T, Han L L, Zhao K J, et al. Application of disk segmentation method in insect resistance identification of transgenic soybean [J]. Crops, 2011(4): 20-22.)
- [23] 李茫雪, 张赫然, 于晶, 等. 花粉管通道法将 *Bt-CPTI* 双价抗虫基因转入玉米自交系的研究 [J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 29-33. (Li M X, Zhang H R, Yu J, et al. Transferring *Bt-CPTI* two insect-insect genes into maize inbred lines by pollen tube pathway [J]. Journal of Maize Sciences 2010, 18(1): 29-33.)
- [24] 张立, 王建峰, 王晓杰, 等. 花粉管通道法介导小麦抗病相关基因的转化和抗锈性鉴定 [J]. 麦类作物学报, 2013, 33(1): 1-5. (Zhang L, Wang J F, Wang X J, et al. Wheat transformation of resistant genes to diseases using pollen-tube pathway [J]. Journal of Triticeae Crops 2013, 33(1): 1-5.)
- [25] 范乾程, 谭玲玲, 王亚, 等. 花粉管通道法验证花生 *Oleosin* 基因启动子的特异性表达 [J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 52-56. (Fan Q C, Tan L, Wang Y, et al. Identification of specific expression of promoter of oleosin gene via pollen-tube pathway method [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(12): 52-56.)
- [26] 杜俊岭, 赵晓丽. 大豆食心虫人工饲养技术初探 [J]. 黑龙江农业科学, 1993(1): 37-39. (Du J L, Zhao X L. The technology of artificial breeding of soybean pod borer [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 1993(1): 37-39.)
- [27] 胡代花, 杨晓伟, 冯俊涛, 等. 大豆食心虫性信息素的研究及应用进展 [J]. 农药学报, 2014, 16(3): 235-244. (Hu D H, Yang X W, Feng J T, et al. Advances in there search and application of sex pheromone of soybean podborer, *Leguminivora glycinivorella* (Matsumura) [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2014, 16(3): 235-244.)