

通过农杆菌介导法将 Bt (cryIA) 基因导入大豆^{*}

周思军¹ 李希臣¹ 刘昭军¹ 刘丽艳¹ 杨庆凯²

(1. 黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学大豆研究所, 150030)

摘要 采用农杆菌介导的大豆子叶节转化系统成功地将 Bt 基因 (cryIA) 导入大豆。从发芽 5—7 天的无茵苗切取子叶节外植体, 经农杆菌感染和共培养后, 在选择培养基上 4 周左右出现抗性不定芽。将不定芽转移到芽伸长培养基上, 4—6 周后再生苗长至 2.5—3cm 高。再将再生苗切下转入生根培养基, 2 周左右生根。生根后的再生植株经逐步锻炼移入盆中, 所有植株均能正常开花结荚。在移栽成活的 8 株 T₀ 植株中有 7 株 PCR 检测呈阳性反应; 在 7 个 T₁ 株系中有 4 个株系存在 PCR 阳性植株。取 4 个稳定遗传的 T₁ 代株系内的阳性植株的叶片提取 DNA, 用地高辛标记的 Bt 基因探针进行 Southern 杂交分析, 结果 4 个株系均呈现阳性, 证明 Bt 基因已整合到受体大豆的基因组内并能传递给后代。

关键词 大豆; 转基因植株; Bt 基因; 转化

中图分类号 S565.035.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2001)03-0157-06

大豆是公认的难转化 (recalcitrant) 作物, 其主要原因是从转化的细胞或组织分化再生植株困难。虽然已经有了再生频率相对较高的再生系统, 包括体细胞胚胎发生和器官发生再生系统, 但这些再生系统尚不能与现有的植物转化方法很好地结合^[1]。Hinchee 等^[2] 和 McCabe 等^[3] 首先获得大豆转基因植株, 他们分别采用了农杆菌介导法和基因枪法。此后, 又有一些成功的报道^[4-14], 包括最成功的商品化抗除草剂转基因大豆。尽管许多研究者致力于优化大豆的转化系统, 但大豆转化的频率仍很低, 重复性很差, 还远未模式化。本文采用农杆菌介导法, 用 Bt 基因转化大豆获得成功。并对农杆菌介导的大豆转化系统进行了优化, 结果将另文报道。

1 材料和方法

1.1 菌株及植物转化载体

农杆菌菌株 EHA105 由北京大学林忠平教授提供。二元载体 pGB14A2B (由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆实验室构建和提供) 含有两个 (双向) 人工合成的 GFM CryIA (Bt) 杀虫基因、nptII 基因和 gus 基因, 启动子分别为 35S、nos 和

35S, 终止子均为 nos (详见图 1)。

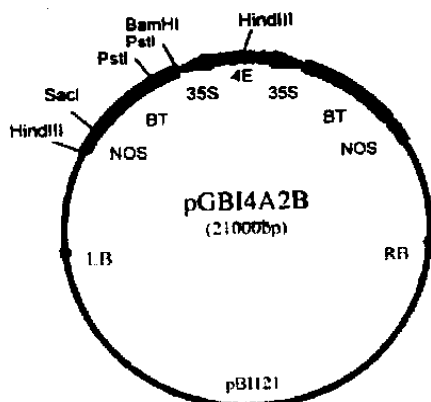


图 1 双价 Bt 基因的植物表达载体图谱

Fig 1 Binary vectors utilized in the experiments

1.2 转化方法

菌液制备: 从新鲜平板中挑取单菌落, 接种到含相应抗生素的 YEP 培养基中, 27℃振荡培养至对数生长期 (OD₆₀₀ ≈ 0.5)。菌液在 4000rpm、4℃下离心 10 分钟, 然后将细菌重悬在 1/10 B5 培养基 (Gamborg 等, 1968) 中 (OD₆₀₀ ≈ 0.5)。重悬培养基中附加有 1.7mg l⁻¹ BA、0.25mg l⁻¹ GA3、100μM AS (乙酰丁香酮) 和 3% 的蔗糖, AS 在高压灭菌后加入。培养基的 pH 在高压灭菌前调至 5.4, 并加入 20mM MES 作为 pH 缓冲剂。

* 收稿日期: 2001-02-21

作者简介: 周思军, (1957-), 男, 博士, 研究员, 从事植物转基因研究。

外植体制备: 选用无病、饱满的大豆种子进行消毒: 70% 酒精 1 分钟→0.1—0.2% HgCl 15 分钟→无菌水冲洗 4—5 次, 每次至少 5 分钟→无菌水浸泡 2 小时以上。消毒后的种子接种在 B5 培养基(含或不含 BA)或 0.6% 琼脂上发芽。用发芽 5—7 天的无菌苗切取子叶节外植体: 在离子叶节 3mm 左右处切去下胚轴, 再切去 1/3 的子叶, 然后在两个子叶中间将胚轴纵向切开, 去掉顶芽, 用解剖刀在子叶与胚轴交接处直径约 3mm 的范围内划 5—7 刀。经过此番操作, 每个无菌苗可产生 2 个用于转化的子叶节外植体。

转化及筛选: 将制备好的子叶节外植体放入重悬后的菌液中浸泡 5—30 分钟。倒掉菌液, 将外植体放入上下均铺有无菌滤纸的大培养皿内, 吸掉多余的菌液。然后将外植体近轴面朝下接种在铺有一层无菌滤纸的共培养培养基上。共培养培养基与细菌重悬培养基相同, 加 0.5% 琼脂固化。培养物在 24—25℃、黑暗或弱光下共培养 3 天。共培养 3 天后将外植体转入无菌三角瓶中, 加入液体 B5 培养基(含有 1.7 mg l^{-1} BA、 0.25 mg l^{-1} GA3、3% 蔗糖、 500 mg l^{-1} 羧苄青霉素和相应选择剂, pH 5.6)摇动三角瓶洗两次, 或在摇床上 150rpm 振荡培养 2—3 天, 每天更换新鲜培养基。然后转入固体培养, 培养基成分相同, 子叶近轴面朝上, 下胚轴插入培养基。每两周转接一次, 转接时切去下胚轴基部的老化组织。待芽可见时, 将外植体转入芽伸长培养基。培养基成分与不定芽诱导培养基大体相同: 将 BA 浓度降为 1.0 mg l^{-1} 或改用 1.0 mg l^{-1} 玉米素, GA3 浓度增至 0.5 mg l^{-1} , 添加 0.2 mg l^{-1} IBA, 加或不加 Gln 和 Asn 各 50 mg l^{-1} 。待再生苗长到 3cm 高时, 切下转入 1/2B5 培养基(附加 $0.5—2.0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA 或 NAA, 2% 蔗糖, 0.8% 琼脂)诱导生根。培养条件均为 22—26℃, 相对湿度 70—75%, 光周期 16/8 小时。

再生植株移栽: 再生植株生根并长出两片以上复叶后, 将三角瓶打开盖, 在气候箱中(相对湿度 85%、光照强度 3000Lux、温度 22—26℃)锻炼 5—7 天。然后取出小植株, 洗净根部的培养基, 栽入盛有灭菌的沙、土(1:1)混合物的小盆中, 在气候箱中继续培养 1—2 周。在前一周时间内逐渐降低相对湿度至 75%, 使小植株得到逐步驯化。然后栽入大盆生长至成熟。

1.3 转基因植株的检测及鉴定

GUS 分析: 参照 Jefferson 等(1987)^[15] 的方法进行。

PCR 鉴定: Bt 基因的特异引物由大连宝生物工程公司合成。引物序列为:

上链: 5'-AGCATGCCATACAAC TGC-3'

下链: 5'-TCAAGATGTCCATCAAGT-3'

PCR 反应体系: 反应体积为 $20 \mu\text{l}$ (2.0 mM dNTPs $1.6 \mu\text{l}$, 25 mM MgCl₂ $2 \mu\text{l}$, $10 \times$ 反应缓冲液 $2 \mu\text{l}$, 引物 $1 \mu\text{l}$, 模板 DNA $1 \mu\text{l}$, $4 \text{ U} \mu\text{l}^{-1}$ Taq 酶 $0.4 \mu\text{l}$, 水 $11 \mu\text{l}$)。反应程序为 95℃, 10 分钟 + 30 个循环(94℃, 1 分钟; 48℃, 1 分钟; 72℃, 2 分钟) + 72℃, 10 分钟, 4℃保温。

Southern 杂交: 将质粒 pGBI4A2B 的扩增产物回收并纯化用作探针标记。PCR 引物和反应体系同 PCR 鉴定。应用柱式胶回收试剂盒(购于上海华舜生物工程有限公司)回收扩增产物。采用地高辛标记试剂盒(购自博士德公司)以随机引物法标记探针。杂交程序参照 Sambrook 等(1989)^[16] 的方法和试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 大豆子叶节再生系统的优化

植物转化的受体系统的再生频率直接影响转化的效率。已报道的大豆子叶节再生的诱导培养基一般为 B5 或 MS 基本培养基附加 $1—3 \text{ mg l}^{-1}$ 的 BA, 加或不加少量的 IBA。对外植体制备前种子发芽阶段(3—14 天)的培养基很少有人研究。为了优化大豆子叶节再生的诱导培养基, 同时考虑到种子发芽阶段的培养基可能对子叶节丛生芽的诱导有影响, 设计了三组试验: 用三个大豆品种, 在三种不同的发芽培养基上发芽(5 天), 然后切取子叶节外植体接种在三种丛生芽诱导培养基上, 诱导丛生芽。试验结果见表 1。

从表 1 可以看出, 基因型、发芽培养基和诱导培养基均对大豆子叶节不定芽的诱导频率有显著影响。大豆子叶节的不定芽诱导频率在三种诱导培养基上表现不同。目前常用的大豆不定芽诱导培养基 MMS 和 B5BA 之间没有明显差异。但附加 IBA 却使诱导频率明显下降, 三个品种趋势一致。虽然 MMS 和 B5BA 的诱导频率差不多, 但 MMS 的成分比 B5BA 复杂的多, 从这个意义上讲, B5BA 优于

表 1 大豆子叶节再生系统的优化

Table 1 Optimization of regeneration system from cotyledonary node of soybean										
基因型 Genotype	发芽培养基 Germinator	MMS			B5BA			B5BA/ IBA		
		TE	RE	%	TE	RE	%	TE	RE	%
黑农 35	B5BA	40	28	70. 0	40	29	72. 5	40	18	45. 0
	B5	38	25	65. 8	40	25	62. 5	38	16	42. 1
	Agar	40	21	52. 5	40	22	55. 0	40	12	30. 0
合丰 35	B5BA	38	24	63. 2	40	26	65. 0	40	16	40. 0
	34. 2	B5	40	21	52. 5	40	22	55. 0	38	13
	Agar	40	18	45. 0	40	17	42. 5	40	11	27. 5
合丰 39	B5BA	40	22	55. 0	39	20	51. 3	40	12	30. 0
	27. 5	B5	40	18	45. 0	40	17	42. 5	40	11
	Agar	40	15	37. 5	40	16	40. 0	40	8	20. 0

三种丛生芽诱导培养基分别是 MMS、B5BA 和 B5BA/ IBA。MMS: MS 大量元素+ 4 倍 MS 微量元素+ B5 维生素+ 3mgL⁻¹BA+ 0. 04 mgL⁻¹NAA+ 1. 5mgL⁻¹ 维生素 B1+140mgL⁻¹L- 脯氨酸; B5BA: B5 (Gamborg 等, 1986)+ 1. 7 mgL⁻¹BA; B5BA/ IBA: B5+ 1. 7 mgL⁻¹BA+ 0. 2 mgL⁻¹IBA。三种发芽培养基分别是 B5BA、B5 和 0. 6%琼脂。TE: 外植体总数; RE: 产生不定芽的外植体总数; %: RE/ TE× 100。

The three media for induction of adventitious buds are MMS (MS macro-elements + 4-fold MS micro-elements+ B5 organic substances+ 3mgL⁻¹BA+ 0. 04mgL⁻¹NAA+ 1. 5mgL⁻¹VB1+ 140mgL⁻¹L-proline), B5BA (B5+ 1. 7mgL⁻¹BA) and B5BA/ IBA (B5BA+ 0. 2 mgL⁻¹IBA). The three germination media are B5BA, B5 and 0. 6%Agar. TE: total explants; RE: regenerated explants; %: RE/ TE× 100.

MMS。发芽阶段的培养基成分对大豆子叶节的不
定芽诱导频率具有明显影响。三种培养基以 B5BA
最佳, 6% 琼脂发芽的子叶节诱导率最低, 说明离体
培养条件和 BA 在发芽阶段即对大豆子叶节不定芽
的产生具有诱导作用。三个大豆品种的不定芽诱导

频率具有极显著的差异, 再一次证明了大豆体细胞
再生的基因型差异和农杆菌介导法转化的基因型依
赖性。

2. 2 大豆子叶节转化的效果和转基因植株的获得
大豆子叶节经农杆菌感染和共培养后, 在选择

表 2 农杆菌介导的大豆子叶节转化结果

Table 2 Agrobacterium-mediated transformation of soybean cotyledonary node							
试验批号 No. of exp.	外植体总数 Total explant	再生苗数 Reg. shoots	生根苗数 Rooted shoots	移栽成活株数 Survived plants	T ₀ PCR 阳性株数 PCR-positive plants (T ₀)	T ₁ Southern 阳性株数 Sou. + pos. plants (T ₁)	实际转化频率 Real frequency
选择模式 A Selection mode A							
1	100	0	0	0	0	0	0.5%
2	200	4	3	2	1	1	
3	200	0	0	0	0	0	
4	200	3	2	1	1	0	1.0%
总数 Total	700	7	5	3	2	1	
频率 Frequency		1.0%	71.4%	60.0%	66.7%	50.0%	
选择模式 B Selection mode B							
5	200	6	2	1	1	0	0.5%
6	200	8	3	2	2	1	
7	100	2	0	0	0	0	
8	200	10	4	2	2	2	1.0%
9	200	5	0	0	0	0	
总数 Total	900	31	9	5	5	3	
频率 Frequency		3.4%	29.0%	55.6%	100%	60.0%	

选择模式 A: 卡那霉素在不定芽诱导培养基、芽伸长培养基和生根培养基中的浓度分别为 200、100 和 0 mgL⁻¹; 选择模式 B: 卡那霉素在上述三种培养基中的浓度分别为 150、80 和 50 mgL⁻¹。

Selection mode A: the concentrations of kanamycin in reduction medium, shoot-elongating medium and rooting medium were 200, 100 and 0 mgL⁻¹ respectively; Selection mode B: the concentrations of kanamycin in the three media were 150, 80 and 50 mgL⁻¹ respectively.

培养基上一般需经4周左右出现抗性不定芽(见图版2)。将不定芽转移到芽伸长培养基上,4~6周后再生苗可长至2.5~3cm高(见图版3)。再将再生苗切下转入生根培养基,2周左右可生根(见图版4)。生根后的再生植株经逐步锻炼移入盆中(见图版5),所有植株均能正常开花结荚(见图版6)。

转化试验按批进行,每批200或100个外植体。采用两种选择模式。选择模式A的选择强度较大(卡那霉素在诱导、伸长和生根培养基中的浓度分别为200、100和0 mg l⁻¹),但生根时无选择压力;选择模式B选择强度较温和(卡那霉素在三种培养基中的浓度分别为150、80和50 mg l⁻¹),但生根时也进行选择。两种选择模式、9批试验的结果见表2。

从表2中可见选择模式是至关重要的。选择模式A由于选择强度大,再生苗频率低,平均只有1%;但因生根时不筛选,仍有非转化植株逃逸,在移栽成活的植株中,阳性植株占66.7%,也就是说还有33.3%的非转化植株; T₁代的Southern阳性株系占T₀代阳性植株的50.0%,说明T₀代阳性植株中有较多的嵌合体。选择模式B由于选择强度较温和,

再生苗率大幅度提高(3.4%);由于生根时继续筛选,生根率由模式A的71.4%下降到29.0%,但移栽成活植株中的阳性植株率提高到100%,说明生根筛选可有效地筛选掉非转化植株; T₁代Southern阳性株系占T₀代阳性植株的60.0%,说明T₀代阳性植株中仍有嵌合体。粗略地看,选择模式B的转化效率比选择模式A提高了1倍左右。

总的来看,该系统的转化频率是低的,最高实际转化频率只有1.0%。农杆菌介导的大豆遗传转化具有很强的基因型依赖性,本研究所选用的大豆基因型(黑农35)在对农杆菌的敏感性和再生反应两方面均属中等水平,具有一定代表性。

2.3 T₀代转基因植株的检测

对移栽成活的8株T₀代植株取叶片提取模板DNA,用质粒DNA作阳性对照,用非转化的受体大豆的DNA作阴性对照,用Bt基因的特异引物进行了PCR扩增反应。8株中有7株呈现阳性反应,扩增出与质粒DNA的扩增带相同的DNA带,而阴性对照无带(见图2),初步证明了被转的Bt基因已整合到受体大豆的基因组中。

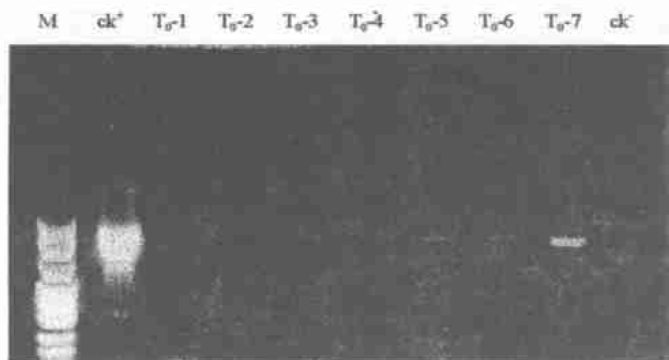


图2 大豆T₀植株的PCR检测。泳道1: Marker(PUC mix);

泳道2: 阳性对照(质粒); 泳道3~9: 大豆T₀转基因植株; 泳道10: 阴性对照(未转化植株)。

Fig. 2 PCR analysis of soybean T₀ plants. Lane 1: Molecular marker (pUC Mix); Lane 2: positive ck (plasmid);

Lanes 3~9: soybean plants carrying T-DNA of pGBI4A2B; Lane 10: negative ck (untransformed soybean plant).

2.4 T₁代转基因株系的鉴定及被转基因的遗传

从T₀植株上收获T₁种子,按株系种植在试验地小区中。每个株系分单株取叶片提取DNA进行PCR扩增以检测被转基因的遗传和分离情况。7个株系中的4个株系有阳性植株,其分离比例(阳性植株/阴性植株)分别为5/2、1/1、6/1和3/1(见表3)。而另外3个株系没有阳性植株,说明它们的T₀植株是嵌合体,被转基因未能传递给后代。

取4个稳定遗传的T₁代株系内的阳性植株的

叶片提取DNA,以未转化的受体植株的DNA为阴性对照,以质粒DNA为阳性对照,用限制性内切酶Hind II进行消化,切下T-DNA内部3.2kb的含有Bt基因的片段。然后用地高辛标记的Bt基因探针进行Southern杂交(具体程序见材料和方法)。结果4个PCR阳性株系均呈现与质粒DNA相同的杂交带,而阴性对照无杂交带(见图3),证明Bt基因已整合到受体大豆的基因组内并能传递给后代。

表 3 转基因大豆植株 T₁ 代的遗传和分离情况

Table 3 Inheritance and separation of the transgenic soybean plants in T₁ generation

株系编号 No. of plant	总株数 Total plants	PCR 阳性株数 PCR+ positive plant	PCR 阴性株数 PCR- negative plant	分离比例 Separation
1	6	0	6	
2	7	5	2	5/2
3	4	2	2	1/1
4	11	0	11	
5	17	0	17	
6	7	6	1	6/1
7	12	9	3	3/1

分离比例为株系内的阳性植株总数比阴性植株总数。
Separation refers the ratio of the number of PCR+ plants to the number of PCR- plants in the plant line.

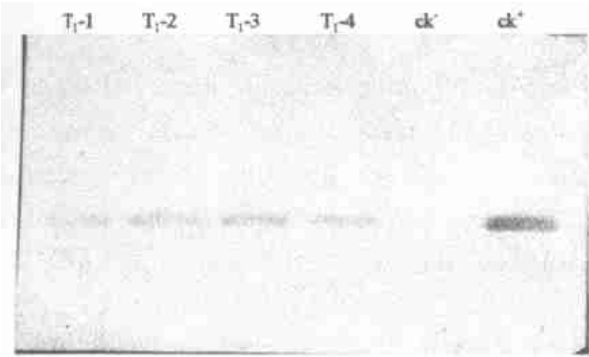


图 3 大豆 T₁ 植株的 Southern 杂交鉴定。泳道 1—4: 大豆转基因植株; 泳道 5: 阴性对照; 泳道 6: 阳性对照。
Fig. 3 Southern analysis of soybean T₁ plants. Lanes 1—4: soybean T₁ plants; Lane 5: negative ck; Lane 6: positive ck.

2.5 被转基因的表达

取转基因植株和阴性对照植株的叶片经表面消毒、切割后, 接种于含卡那霉素 100 mg l⁻¹ 的 MSNAA/K 培养基上, 转基因植株的叶片颜色保持绿色并形成愈伤组织, 而阴性对照植株的叶片颜色变褐, 不能形成愈伤组织(见图版 8—9)。

转化的愈伤组织及转基因植株的叶片和茎切片能被 X—Gluc 不同程度地染色, 而阴性对照不被染色(见图版 7)。

苜蓿夜蛾幼龄幼虫的接种鉴定结果, 有两个转基因株系表现出明显的抗虫性(见图版 10—11), 另两个株系的抗虫性不十分明显。

上述结果表明被转的 npt II、gus 和 Bt 基因均在转基因植株中得到表达。

3 结语

本试验的结果表明农杆菌介导的大豆子叶节转化系统是可行的, 但转化频率仍较低, 并具有很强的基因型依赖性; 在 T₀ 代转基因植株中存在较高比例

的嵌合体。采用适当的选择模式可提高系统的转化效率。生根筛选可有效地筛选掉非转化植株。

参考文献

1 周思军. 大豆遗传转化的主要障碍及研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2001, (3): 24—27.

2 Hinchey MAW, DV Conner Ward, CA Newell, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium — mediated DNA transfer[J]. BIO/TECHNOL. 1988, 6: 915—922.

3 McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell, et al. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration[J]. BIO/TECHNOL. 1988, 6: 923—926.

4 南相日, 刘文萍, 刘丽艳, 等. PEG 介导 Bt 基因转化大豆原生质体获得转基因植株[J]. 大豆科学 1998, 17(4): 326—329.

5 南相日, 卫志明. 利用聚鸟氨酸提高大豆原生质体外源基因的转化效率[J]. 实验生物学 1999 32(4): 409—411.

6 苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究[J]. 植物学报 1999, 41(10): 1046—1051.

7 Chee PP, KA Fober, JL Slightom. Transformation of soybean (Glycine max) by infecting germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens[J]. Plant Physiol. 1989 91: 1212—1218.

8 Chen L, Y Dan, JM Tyler, et al. Transgenic soybean generated from hypocotyl explants[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1999, 35: 61A.

9 Christou P. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration[J]. Physiol. Plant. 1990, 79: 210—212.

10 Di R, V Purcell, GB Collins, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Rep. 1996, 15: 746—750.

11 Finer JJ, MD McMullen. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue[J]. In Vitro Cell Dev. Biol. 1991, 27P: 175—182.

12 Sato S, C Newell, K Kolacz, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. Plant Cell Rep. 1993, 12: 408—413.

13 Stewart CN, MJ Adang, JN All, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a syn-

- thetic bacillus thuringiensis cry1Ac gene[J]. Plant Physiol. 1996, 112: 121—129. . .
- 14 Trick HN, JJ Finer. Sonication—assisted Agrobacterium—mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L]. Merrill) embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Rep. 1998, 17: 482—488.
- 15 Jefferson RA, TA Kavanagh, WM Bevan. gus fusions: (— glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO J. 1987, 6: 3901—3907.
- 16 Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. MOLECULAR CLONING A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

图版说明

1 子叶节丛生不定芽; 2—3 在筛选培养基上的抗性小苗; 4 抗性小苗在生根培养基上被诱导生根; 5 移栽前的转化植株; 6 结荚的转化植株; 7 GUS 基因在叶片和茎中表达; 8 转化植株的叶片在含卡那霉素的培养基上保持绿色并能形成愈伤组织; 9 非转化植株的叶片在含卡那霉素的培养基上褐化不能形成愈伤组织; 10 接种苜蓿夜蛾后的非转化株系; 11 接种苜蓿夜蛾后的转化株系。

Explanation of Plates

1 Adventitious buds from cotyledon node; 2—3 Resistant shoots on selection medium; 4 Rooting of the resistant shoot on rooting medium; 5 Transformed plants before transplant; 6 Podded transformed plant; 7 Expression of gus gene in the leaf and stem; 8 The leaves of transformed plants keep green and form callous on medium containing kanamycin; 9 The leaves of untransformed plants get brown and can not form callus; 10 Untransformed plant line inoculated with flax budworms; 11 Transformed plant line inoculated with flax budworms.

INTRODUCTION OF Bt GENE(cryIA) INTO SOYBEAN BY *Agrobacterium* — MEDIATED TRANSFORMATION

Zhou Sijun¹ Li Xichen¹ Liu Zhaojun¹ Liu Liyan¹ Yang Qingkai²

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

2. Institute of Soybean, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract *Bacillus thuringiensis* cryIA gene was introduced into soybean successfully with *Agrobacterium* — cotyledonary node transformation system. Cotyledonary node explants were prepared from 5—7 day old seedlings, infected and co—cultivated with *Agrobacterium tumefaciens*. Resistant adventitious buds emerged after 4 weeks on selective medium. The buds were transferred onto elongation medium and regenerated shoots grew to 2.5—3 cm high after 4—6 weeks. The shoots were cut off and transferred onto rooting medium. After about 3 weeks, the rooted plantlets were hardened off and transferred into pots. All the plants could flower and set seeds normally. Among the 8 transplanted survival T₀ plants, seven gave positive PCR reaction; and 4 of the 7 T₁ plant lines had PCR positive plants. DNA was extracted from the leaves of positive plants in the 4 T₁ plant lines, and southern blot was conducted with probe of Bt gene. All the 4 lines are positive, indicating that the Bt gene has integrated into the receiver's genome and can be passed to progenies.

Key words Soybean; Transgenic plant; Bt gene; Transformation

周思军等：通过农杆菌介导法将 *Bt(cryIA)* 基因导入大豆

Zhou Sijun et al. : Introduction of *Bt gene (cryIA)* into soybean by *Agrobacterium* - mediated transformation

