

# 转 *cry1Iem* 基因大豆的培育及抗虫性检测

陈秀华, 柏 锡, 潘 欣, 翟 红, 才 华, 纪 巍, 李 勇, 朱延明

(东北农业大学 生命科学学院 植物生物工程研究室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以大豆子叶节为外植体,应用农杆菌介导法,将抗虫(*cry1Iem*)基因转化大豆,筛选标记为 *bar* 基因。经 Glufasinate 筛选,获得大量抗性植株。对转基因 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>代植株进行 PCR 检测,初步证明 *cry1Iem* 基因已经整合到大豆基因组中。对 T<sub>2</sub>代 PCR 阳性植株幼嫩豆荚,采用圆盘分隔法接入初孵幼虫,进行初步的抗虫性检测,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。

**关键词:**大豆; *cry1Iem* 基因; 子叶节; 转基因抗性植株; 抗虫性检测

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2009)06-0959-05

## Cultivation of *cry1Iem* Gene Transformed Soybean and Insect Resistant Assay

CHEN Xiu-hua, BAI Xi, PAN Xin, ZHAI Hong, CAI Hua, JI Wei, LI Yong, ZHU Yan-ming

(Plant Bioengineering Laboratory, College of Life Sciences, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:**Contyledonary nodes were used as explants, and insect resistant gene *cry1Iem* was transformed into soybean via Agrobacterium-mediated method. Bar served as selection marker, and glufasinate was used in explants transformation to screen resistant shoots. Lots of resistant plants were obtained. With PCR detection of T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> generation, insect resistant gene *cry1Iem* was proved to be transformed into soybean preliminarily. Furthermore, immature pods of PCR positive plants in T<sub>2</sub> generation and newly hatched larvae were introduced, and initial insect resistant assay was made by disk method. Result suggested that one transgenic plant had an obvious resistant effect, and another seven plants proved to have some effect.

**Key words:**Soybean; *cry1Iem* gene; Contyledonary nodes; Transformed resistant plants; Insect resistant assay

大豆[*Glycine max*(L.) Merrill]因具有高油和高蛋白的特性,成为重要的油料作物和经济作物,作为原材料广泛应用于食品和工业生产。自 1998 年 Hincee 等<sup>[1]</sup>和 McCabe 等<sup>[2]</sup>分别用农杆菌侵染大豆子叶节方法和基因枪轰击大豆未成熟胚生长点转化大豆成功得到转基因植株以来,大豆遗传转化研究已经有很多成功的报道。目前应用于大豆遗传转化的方法主要有根癌农杆菌介导法<sup>[3-4]</sup>、基因枪法<sup>[5-6]</sup>、花粉管导入法<sup>[7]</sup>、真空抽滤法和超声辅助农杆菌法<sup>[8-9]</sup>等,其中农杆菌介导的子叶节法<sup>[10]</sup>由于具有易于筛选和再生等优势是目前在大豆上应用较成功的方法。

大豆食心虫在我国危害极其严重,常年虫食率高达 10%~20%,是我国大豆生产上亟待解决的重大问题。随着大豆遗传转化技术的日渐成熟,依靠

基因工程技术将抗虫基因导入大豆已成为切实可行的途径。目前在植物抗虫基因工程中应用的抗虫基因主要来自微生物的基因,其中 *Bt* 杀虫蛋白基因是研究比较清楚、应用最广泛和最有潜力的抗虫基因。研究构建了由只在大豆豆荚中表达的特异性启动子 Pmsg 调控的含抗大豆食心虫基因 *cry1Iem* 的植物表达载体,抗除草剂基因 *bar* 为筛选标记;通过农杆菌介导大豆子叶节法将抗虫基因导入大豆,获得转基因植株;通过大豆食心虫抗虫性检测,得到抗虫效果较好的植株。以期起到减轻大豆食心虫造成的危害,提高大豆产量和品质的目的,为培育出具有抗大豆食心虫特性的转基因大豆新品系(种)奠定基础,为大豆抗虫新品种的选育提供种质资源。

收稿日期:2009-10-10

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2008AA10Z153);转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-003);东北农业大学创新团队资助项目(190214)。

第一作者简介:陈秀华(1983-),女,在读硕士,研究方向为植物基因工程与分子生物学。E-mail:cxh150600@126.com。

通讯作者:朱延明,教授,博士生导师。E-mail:ymzhu2001@yahoo.com.cn。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试材料

植物材料选用绥农 14 大豆品种,由黑龙江省农业科学院绥化分院提供。大豆子叶节作为遗传转化受体材料。

工程菌为含豆荚特异性启动子(*PMsg*)、抗虫(*cryIIem*)基因、抗除草剂(*bar*)基因的 LBA4404 农杆菌菌株(图 1)。大豆食心虫幼虫为 2009 年 9 月初从香坊农场采集。

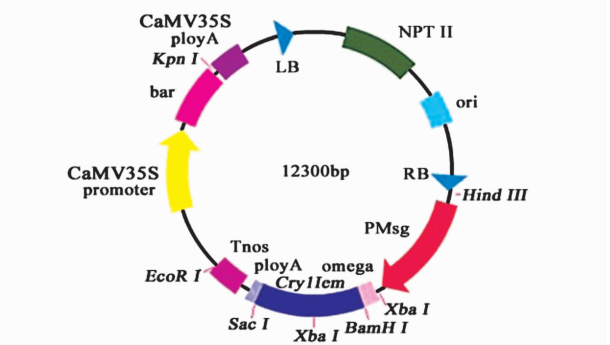
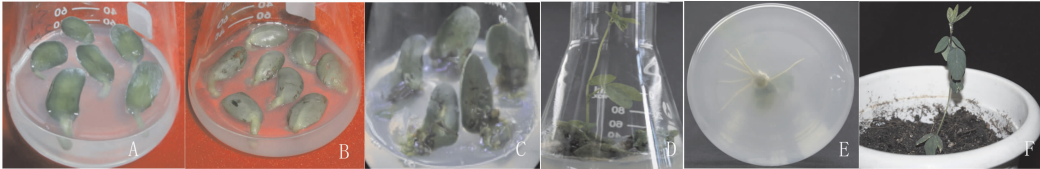


图 1 用于大豆遗传转化的载体图谱

Fig. 1 Structure of the vector used for soybean transformation



A: 子叶节预培养;B: 子叶节共培养;C: 不定芽分化;D: 抗性芽伸长培养;E: 抗性芽生根;F: 抗性植株移栽

A: Cotyledonary nodes precultured; B: Cotyledonary nodes cocultivated; C: Shoots induction; D: Shoots elongation; E: Shoots rooting; F: Regeneration of resistant plant

图 2 大豆遗传转化及再生

Fig. 2 Transformation and regeneration of soybean

1.2.3 抗性植株的 PCR 检测 大豆  $T_0$ 、 $T_1$ 、 $T_2$  代抗性植株叶片,用 CTAB 法提取基因组 DNA,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳检测。

1.2.4 PCR 阳性植株后代的 Glufasinate 筛选 种植 20 粒绥农 14 未转化大豆种子,待长出第 3 片三出复叶时,从长势一致的植株中,选取同位置叶作为试材,设计 0,0.01,0.02,0.03  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  共 4 个 Glufasinate 浓度梯度,每个梯度 3 株,涂抹左半叶片,右半设为对照,7 d 后观察结果,确定 Glufasinate 有效筛选浓度。以 Glufasinate 有效筛选浓度对  $T_2$  代植株进行筛选。

1.2.5 PCR 阳性植株初步抗虫性检测 采用圆盘

## 1.2 试验方法

1.2.1 大豆遗传转化 将氯气灭菌 16 h 的大豆种子置于萌发培养基,光周期 18/6 h。5 d 后在子叶与下胚轴连接处切开,保留 0.5 cm 下胚轴,平均分 2 片子叶,去掉上胚轴和分化的芽,在垂直于子叶与下胚轴连接处轻划几刀,造成伤口,接入预培养培养基(图 2A)。农杆菌在含 Kan  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Sm  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Rif  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的液体培养基上增殖至  $\text{OD}_{600} = 0.6 - 0.8$  (LBA4404),用液体共培养培养基重悬并调整至  $\text{OD}_{600} = 0.6$ 。将预培养 1 d 的子叶节外植体置于菌液中侵染 30 min,其间不时摇动。将侵染后的外植体共培养 5 d(图 2B),用液体芽诱导培养基冲洗外植体,近轴面朝上  $30 \sim 45^\circ$  接入不定芽诱导培养基。14 d 后接入含筛选压力的继代培养基(含  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Glufasinate,图 2C),经过 28 d 的不定芽诱导,转入伸长培养基继续培养,14 d 继代 1 次。

1.2.2 伸长芽的生根及移栽 待不定芽在芽伸长培养基(含  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Glufasinate)中长至约 3 ~ 4 cm 长时(图 2D),将其从底部剪下转至生根培养基中(图 2E),待根长到 2 ~ 3 cm 时开瓶炼苗,再移栽到灭菌土中(图 2F),在光照培养箱中生长结实。

分隔法,每个圆盘中分别放入 17 个株系转基因大豆荚各 1 个,放入对照 2 个,接入 19 头初孵幼虫,任其自由随机选择豆荚蛀食,设 4 次重复。温度  $25 \sim 27^\circ\text{C}$ 。48 h 后观察并记录虫死亡数目、蛀荚情况。

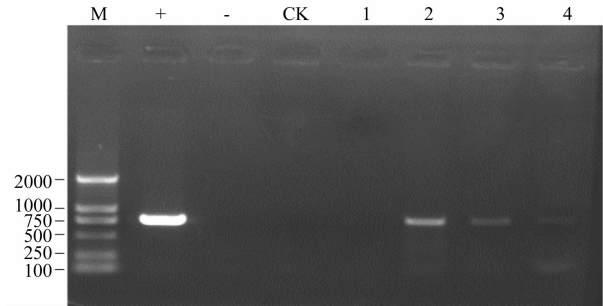
## 2 结果与分析

2.1  $T_0$  代植株的 PCR 检测

抗性植株和未转化植株(阴性对照)叶片的总 DNA 为模板,以含目的基因的质粒为阳性对照,应用 *cryIIem* 基因特异性引物(S: 5'-TACAACCGT-CAAGTGCAG-3', AS: 5'-GTGGACAATCTATGG-GAAT-3')进行 PCR 检测,扩增片段长度为 765 bp,

反应条件为(25  $\mu$ L 体系):94℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1~4 泳道为转基因抗性植株,其中 2~4 泳道扩增出目的条带(图 3)。结果表明,目的基因(*cry1Iem*)已整合到大豆基因组中。



M:核酸分子量标准;DL2000;+:阳性对照;-:负对照;CK:未转化植株;1-4:转基因抗性植株  
M:DNA Marker DL2000;+:Positive control;-:Negative control;  
CK:Untransformed plantlet;1-4:Transgenic resistant plantlets

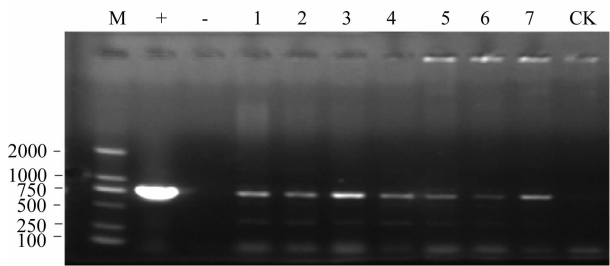
图 3 抗性植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of Glufasinate resistant plants

2.2 T<sub>1</sub>代植株的 PCR 检测

收获 T<sub>0</sub>代 PCR 阳性的转基因植株种子,播于温室中,待长出第 1 片三出复叶时,提取抗性植株和未转化植株总 DNA 进行 PCR 检测。引物如 2.1,反应条件为(25 $\mu$ L 体系):94℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,50.2℃ 30 s,72℃ 30 s,34 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1~7 泳道为转基因 T<sub>1</sub>代植株,均扩增出目的条带(图 4)。



M:核酸分子量标准;DL2000;+:阳性对照;-:负对照;CK:未转化植株;1-7:PCR 植株  
M:DNA Marker DL2000;+:Positive control;-:Negative control;  
CK:Untransformed plant;1-7:PCR positive plants

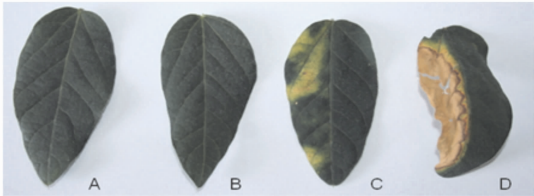
图 4 T<sub>1</sub>代植株 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of T<sub>1</sub> plants

2.3 T<sub>2</sub>代植株检测

2.3.1 T<sub>2</sub>代植株 Glufasinate 筛选 7 d 后观察涂抹 Glufasinate 的未转基因植株叶片,0.3 mg · mL<sup>-1</sup>

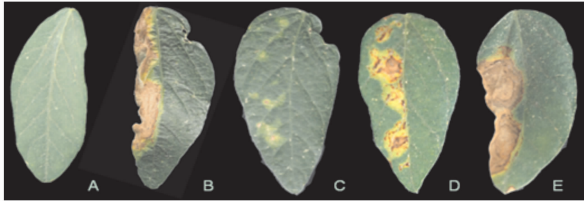
Glufasinate 明显抑制左半叶片生长,而作为对照的右半叶片无明显变化(图 5D)。因此,0.3 mg · mL<sup>-1</sup> 作为 Glufasinate 筛选的有效浓度。以该浓度涂抹 T<sub>2</sub> 代植株叶片(图 6),将叶片能正常生长(图 6C)的植株用于下一步 PCR 检测及抗虫性观察。



A:0 mg · mL<sup>-1</sup>; B:0.1 mg · mL<sup>-1</sup>; C:0.2 mg · mL<sup>-1</sup>; D:0.3 mg · mL<sup>-1</sup>

图 5 Glufasinate 有效筛选浓度确定

Fig. 5 Determination of effective glufasinate concentration



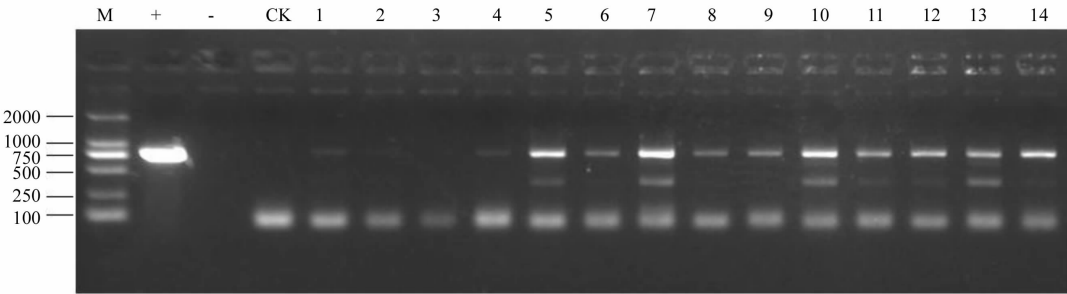
A:未涂抹叶片;B:涂抹的未转化植株叶片;C:转基因植株后代叶片(抗性较强);D、E:转基因植株后代叶片(抗性较弱)  
A:no treatment;B:Glufasinate treatment on untransformed leaf;C:Glufasinate treatment on transformed progeny leaf (with high resistance);D、E:Glufasinate treatment on transformed progeny leaf (with low resistance)

图 6 0.3 mg · mL<sup>-1</sup> Glufasinate 筛选转基因后代植株

Fig. 6 Screening of PCR positive progenies with 0.3 mg · mL<sup>-1</sup> Glufasinate

2.3.2 T<sub>2</sub>代植株 PCR 检测 将经 Glufasinate 筛选后叶片抗性较强的植株提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,引物如 2.1,反应条件为(15 $\mu$ L 体系):94℃ 预变性 10 min;94℃ 30s,50.4℃ 25s,72℃ 30s,36 个循环;72℃ 延伸 10 min。1~14 泳道为转基因植株抗性后代,除 3 外,其余泳道均扩增出目的条带(图 7)。

2.3.3 T<sub>2</sub>代植株初步抗虫性检测 T<sub>2</sub>代 PCR 检测结果稳定的转基因株系初步的抗虫性观察表明,在 17 个转基因株系中株系 9 在各重复中蛀荚总虫孔数和荚内幼虫成活总数均为零(图 8,1~17 为转基因株系,18、19 为未转基因对照),初步判断该株系具有较强的抗虫性。其次为 3,5,10,11,15,16 和 17 等 7 个株系在 4 个重复中仅共有 1 个虫孔,幼虫存

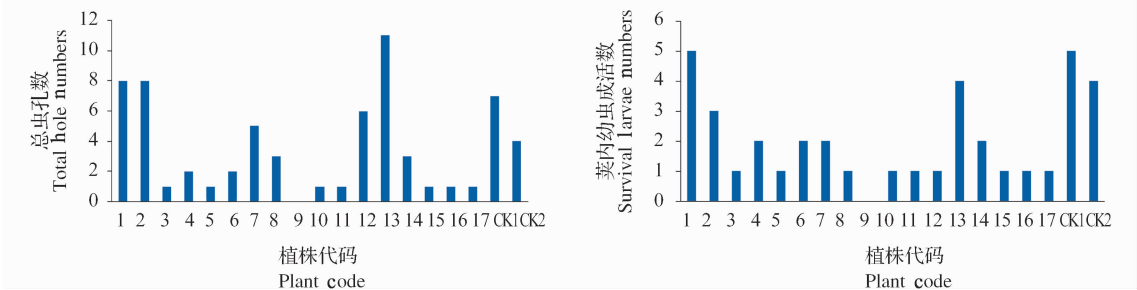


M: 核酸分子量标准;DL2000; + : 阳性对照; - : 负对照;CK: 未转化植株;1 ~ 14: 转基因植株抗性后代  
M: DNA Marker DL2000; + : Positive control; - : Negative control; CK: Untransformed plant; 1 ~ 14: Glufosinate resistant plants

图 7 Glufosinate 抗性 T<sub>2</sub>代植株 PCR 检测

Fig. 7 PCR detection of glufosinate resistant T<sub>2</sub> plants

活在荚内。图 9 显示了豆荚上和豆荚内大豆食心虫的蛀食情况,明显可见,9 号植株具有较强的抗虫性。



A: 蛀荚总虫孔数;B: 荚内幼虫成活总数  
A: Total holes by soybean pod borer; B: Survival borer numbers in soybean pod

图 8 蛀荚大豆食心虫数量统计情况

Fig. 8 No. of soybean pod borer and holes



A: 9 号抗性植株(无虫孔);B: 5 号抗性植株(1 个虫孔);C: 未转化植株(3 个虫孔)  
A: No. 9 resistant to soybean pod borer( no holes ); B: Survival borer numbers in soybean pod(1 hole ); C: Untransformed plant(3 holes )

图 9 大豆食心虫蛀荚情况

Fig. 9 Soybean pod damaged by soybean pod borer

3 讨论

3.1 组织特异性启动子的选择

组织特异性启动子,基因的上游存在着调控序列,启动子除具有一般的结构外,通常还有增强子和沉默子的一般特性。在组织特异型启动子调控下,基因的表达常常只发生在某些特定的器官或组织部位,并往往表现出发育调节的特性。这种类型的启动子的最大优点是:它所启动的外源基因在受体植

物中特异表达,从而克服了组成型启动子启动的外源基因在受体植物中非特异性的持续、高效表达所造成浪费,而在需要该基因大量表达的特定组织部位则因表达量过低又达不到预期效果<sup>[11]</sup>。如研究中使用的豆荚特异性启动子(*PMsg*)<sup>[12]</sup>调控外源基因(*cryIIem*)产物毒蛋白专一表达在豆荚上,虫食豆荚后即可摄入杀虫毒蛋白,人食用不含该蛋白的大豆种子,有效地避免了转基因引起的安全性问题。目前,转基因植物的食品安全性是极为敏感和关注的问题,因此,在植物抗虫、抗病育种中组织特异性启动子是较好的选择。

3.2 提高转基因大豆抗虫性的策略

该研究用的 *cryIIem* 基因是中国农科院植保所采用 PCR-RFLP 方法从苏云金芽胞杆菌标准菌株中分离到的 1 个新的编码 *cryII* 型毒蛋白的基因 *cryIIe*<sup>[13]</sup>。由于未改造的 *Bt* 基因在转基因植物中表达水平很低,只占植株内全部可溶性蛋白的 0.001% 以下,不可能直接毒杀害虫,而 *cryIIe* 基因来自原核生物不适合在植物细胞中高效表达,因此

植保所在进一步研究中将野生型 *cryIIe* 基因人工改造获得 *cryIIem* 基因,使 ICP 在植物中高剂量表达。在植物抗虫基因工程中,也可以同时使用 2 种或 2 种以上 *bt* 基因转化农作物或联合使用 *bt* 基因和其他类型的抗虫基因,以提高转基因作物抗虫性和防止其对 *bt* 基因产生耐受性。除非抗性位点出现的频率很高和杀虫剂剂量低至杂合体可以存活,否则昆虫对两种独立杀虫剂同时产生耐受性基本上是不可能的<sup>[14]</sup>。

4 结论

利用农杆菌介导的大豆子叶节法,以 Glufasinate 为筛选剂,将抗虫(*cryIIem*)基因转化大豆,获得大量抗性植株。转基因 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>代植株的 PCR 检测,证明 *cryIIem* 基因已经整合到大豆基因组中。结合的抗虫性分析,获得了 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。

参考文献

[1] Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:915-922.

[2] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:923-926.

[3] Meuver C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18:180-186.

[4] Ke J, Khan R, Johnsen T, et al. High efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 18:150-156.

[5] Stewart C N, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a syn-

thetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112:121-129.

[6] Maughan P J, Philip R, Cho M J, et al. Biolistic transformation, expression, and inheritance of bovine beta-casein in soybean (*Glycine max*) [J]. *In Vitro Cellular & Development Biology- Plant*, 1999, 35(4):344-349.

[7] Trick H N, Dinkins R D, Santarn E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 1997, 3:9-26.

[8] Santarn E R, Finer J J. Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium[J]. *In Vitro Cellular & Development Biology- Plant*, 1999, 35(6):451-455.

[9] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17:482-488.

[10] Zhang Z Y, Xing A Q, Slaswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1999, 56:37-46.

[11] 皮灿辉, 易自力, 王志成. 提高转基因植物外源基因表达效率的途径[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(1):1-4. (Pi C H, Yi Z L, Wang Z C. The methods of enhancing and optimizing expression of exogenes in transgenic plants[J]. *China Biotechnology* 2003, 23(1):1-4.)

[12] Martina V, Strömvik, Vijaya P, et al. A novel promoter from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41:217-231.

[13] Fuping Song, Jie Zhang, Aixing Gu, et al. Identification of cryII-type genes from bacillus thuringiensis strains and characterization of a novel cryII-type gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9):5207-5211.

[14] 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, 2002:6-9. (Wang G L, Fang H J. Principle and technology of plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Press, 2002:6-9.)

欢迎订阅 2010 年《北方园艺》

《北方园艺》是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、黑龙江省优秀科技期刊。本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。设有试验研究、研究简报、专题综述、设施园艺、实用技术、园林花卉、贮藏与加工、食用菌、中草药、经验交流、农业经纬等栏目。内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新成果、新技术、新品种、新经验。竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生、各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。

国内外公开发行,半月刊,每月 15 日、30 日出版,邮发代号 14-150,每册定价 6.00 元,全年 144.00 元,全国各地邮局均可订阅,或直接向编辑部汇款订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清订购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部  
邮编:150086 电话:0451-86674276 E-mail:bfyybjb@163.com