

大豆高代抗虫转基因后代分子检测与抗蚜虫鉴定分析

刘贤雯,王彪,姚陆铭,肖亮,武天龙

(上海交通大学 农业与生物学院 植物科学系,上海 200240)

摘要:采用PCR扩增对大豆抗虫转基因高代株系目的基因进行检测,并通过生物鉴定的方法检测转基因后代抗虫性。结果表明:在共转化的3个目标基因中,含有单基因植株共409株,双基因179株,三基因36株,占所检测植株总数的百分比分别为37.8%、17.0%和3.4%;含有单个*pta*基因的植株数量最多,为239株,占检测植株总数的22.6%。选择8个转基因高代品系,接种蚜虫,在接种后第15天蚜虫数量达到最高峰,在37~66头之间,对照平均为154头,结果表明抗虫转基因植株具有明显的抗蚜性。多基因共转化转基因植株的高代分离明显,但纯合的转基因后代对蚜虫抗性仍显著。

关键词:转基因大豆;分子检测;抗蚜鉴定

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)03-0455-04

Molecular Detection and Aphid Resistance Analysis of Later Generation of Transgenic Soybean

LIU Xian-wen, WANG Biao, YAO Lu-ming, XIAO Liang, WU Tian-long

(Plant Science Department, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The target genes in high generations of transgenic soybean were detected by PCR amplification and their resistances to aphid were also investigated. The results showed that in co-transformation of three genes, there were 409 plants with single gene, 179 plants owning double genes and 36 plants having three genes, accounted for 37.8%, 17.0% and 3.4% of total detecting plants, respectively; the number of plants only with *pta* gene were the most, 239 plants accounted for 22.6% of total plants. The number of aphids was up to the highest after inoculated on transgenic soybean for 15 days, the range of 37 to 66 in eight transgenic lines, but the control had 154 aphids. Segregation in high generations of transgenic soybean was obvious using gene co-transformation, but resistance to aphids in their homozygous progenies was still significant.

Key words: Transgenic soybean; Molecular identification; Resistance to aphids

大豆虫害严重影响大豆的产量和品质。大豆虫害中,以同翅目的蚜虫危害最为严重,蚜虫通过食叶对大豆植株造成危害,同时又是传播病毒的媒介。大豆蚜虫中等发生年份造成大豆减产20%~30%,严重年份达50%以上^[1]。而仅靠传统喷洒农药的防治方法,无法从根本上解决蚜虫对大豆的危害。通过转基因手段培育具有抗虫性的植株,能够有效预防并减轻大豆蚜虫对大豆植株造成的损害,对提高大豆产量和品质具有重要意义^[2]。国内学者已开展了大豆抗蚜虫转基因研究。陈秀华等^[3]将抗虫(*cryIIem*)基因导入大豆,获得大量抗食心虫的转基因植株。杨向东等^[4]利用基因工程技术将双价抗虫基因*bt*和*CpTI*导入大豆品种吉林20和吉林27中,并获得稳定表达,转化植株抗大豆食心虫的能力稳定遗传,对苜蓿夜蛾也有抗性。上海交

通大学农业与生物学院大豆实验室通过农杆菌介导的方法获得转*bt*和*pta*基因的大豆植株^[5-6]。但是转基因植株后代中,因存在嵌合体等原因,高代转化株中外源基因易丢失,稳定遗传到高代的比例较低。

该研究对高代的抗虫转基因后代进行定性PCR检测,通过对目标片段的扩增,筛选出含有目的基因的转基因株系,同时通过田间生物鉴定的方法分析转基因植株的抗虫表现,以期获得具有生产意义抗蚜性强的栽培品种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用的转基因大豆均为高代转化株系(T₀)。

收稿日期:2011-01-02

基金项目:转基因重大专项资助项目(2009ZX08004-009B);国家自然科学基金资助项目(30871549);上海科委重点资助项目(103919N1500);上海市重点学科建设资助项目(B209)。

第一作者简介:刘贤雯(1985-),女,在读硕士,研究方向为生物技术和作物遗传育种。

通讯作者:武天龙(1951-),男,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:tianlongwu@263.net。

7 ââ Ýq ä T Š' g h Q f i æé , æâ- Å
Ñ" q ç 5 6 » 7 ö , Ó~ Q ã âçè, è

' W* - Å ç Ýq w x • ž ä% D ¶ 5 6 ó !
5 6 ð V i f p á ! æ 6 ð • ä% s Ú ç Ú 5
6 Ð z - j 5 6 ê

óýð, f y é ý ÿ éóýð ü óüââââ
, œ A ú Ú ÿ è

ã%ã, óýð° ç

- Å° M óýðq • b Ð Þ ç ... è = q ö , *
, • b ê • - ò ðñ - ° M & ' • b 5 6 Ö óýðâ
- f , , À Å Ñ " óýð† . T Ž À Ð Å ^ - è
ã%ã, i b ÿò

ã%ã, 1 2 , F q 5 6 ! é ! Á Å i y - Å 0 ã
0 | } Ñ z ãè

u ã, š › ! | ! () * \$ ^ Y Z
ã, ÿ " ! !

Å 0 E ç	Å 0 }
ÿ ý	ÿ "
<hr/>	
! 5 6 !	
! Š ã	ò ò ð ò ò ð ò ò ð ò ð ð ò ò
! Š ã	ò ò ð ò ò ð ð ò ò ò ò
! 5 6 , !	
ÿ ð Š	ð ò ð ò ò ò ð ð ò ò ò ò ò
ÿ ð Š	ò ò ð ð ð ò ð ò ò ò

ã%ã, < - { X , ÿò Ó p e x ÿ Q ã% » ûž
1 ãâ ^ óýð, f y ã 7 ³ ã% » ûâ • < V
W " á ý ÿ ââââ è û ã% » ûâ óýð,
f y áç è » ã% » ûâ Å 0 áââ » è û ã%
¥ ã% » ûâ Å ã » ûâ ô ú É Ø Ó x Ö Q ã% » ûê
' u - èæ áç æ • áç Æ Ö ð - èæ ãâ
Ð Þ ç ã ãæ È É éá ãâ Ð ... K éá — ãâ
è

ã%ã, A B ' ' , M ½ < ÿò Æ " 6 0 ç » ûâ
ã% Û Ž À q | í í ì Ò * € • Ĭ Ð Ñ " è 9 - d
' Q D ç Ý , ð - d ' Q ç Ý † ^ è ãâ Ì Ü
5 Ĭ Ð ãâ ã Ò° , è

ã% Ð ¹ b h i

• f Å & ' h ö 6 â A B P ³ ~ é q & ' | è
! ê ¹ & ' | q @ x • b ç û f , , à * â ... j •
½ - q q] ^ á Á › ú - q â ã - X @ x • b ú f
q Y 8 ð ÷ ãâè ' ' ¶ á ¶ ... q | ¶ ^ - è

d ! é ! T 5 6 ÿò Ñ " ±² , 7 ó - q
è%ç 5 6 » 7 , ÿ € • ª - â q D | ¶ f , , è`
è%ç 5 6 » 7 , ÿ * â ^ M ç%ð , ã%ð

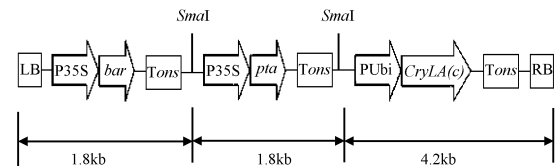
, â ^ M ç ^ h % áç çâ âè

® ö , Þ • ... ãâ / j T Ö h | ¶ ê M f , ,
à * q w È | ¶ ã Ú á %ö , ! ãb Ð Þ ç • q
> Ô ð h æ ~ † | ¶ ê f ° K Ö h ... çéââéâç
T ãâ x Ø ~ z q | ¶ ~ • èè è

ä, W X - . /

ã%ã, † () ! " i b ÿò ö ö

' W* 0 - q r Š w x • ž ä% D ¶ 5 6 á !
T ! ã • ä% s Ú ç Ú 5 6 á â† ^ ò ð ũ Š
ñðââââ Š ýðè ' l í Ñ í ãè



, , ũñð è 1 âÿâç óò ũ âç r S % á ó 5 6 â ó
ýp Ø Û % á ! ó ! 5 6 â ÿ ð Æ Ĭ p r S % à ò æ á áó !
5 6 â ñð è 1 è

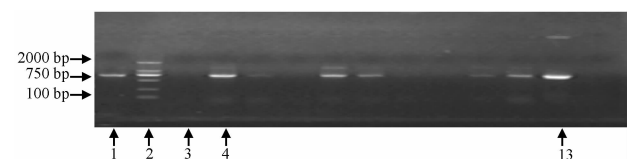
, , ũñó ! á ÿâç óò ũ âç ! á ó á
óýp ! ! á ! ó ! á ÿ ó ' " ! Š
! á ò æ á áó ! á ñó ! à

E ã, Å Å ò ð ũ ñðââââ Š ýð Å v » E

ò à ã, ũ ò ð ũ ñðââââ Š ýð !!

ã% 5 6 f ° ò ò ũ âç r S q z - j - á
ë D - 5 6 á âè ò ũ âç r S q J V i f p
5 6 á ! âè Æ Ĭ p r S % " ! r S q !
5 6 á ò æ á âè

° M q & ' • b 5 6 Ö óýð Æ ç b c € •
ÿò Æ " Ñ " á é ! • ! 5 6 q Æ " b c & ñ
f ° Q ççææææ • èææ æ - 3 ê y Ũ Æ " O²
è è d Ñ " q ö , á² é ! T ! 5 6 á Æ "
Þ ó - 3 ê á » • Q 2 á% 5 6 f á 5 6 Ö *
" l W a P ê í ä Q > f Ñ " ö , ! 5 6 q Æ "
±² á á Q - L [D ¶ Ñ " q è%ç Ý , ÿ é
! T ! 5 6 q Ñ " ±² è

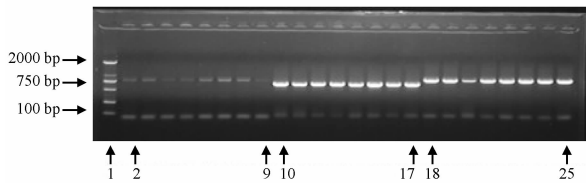


, , æð - d ' òââóýð ũ óüââââð - d ' òæ† ãâè
Ñ " ö , è

, , ãâ ! # ! ô ââóýð " ô ââ ! # Š
! ôæðâââ ! ! # " l à

E ã, S . š › l - ! () * ö ö W X

ò à ã, ÿò & ! & !



, , äaóýð ü óúääääò ä†èà ! 5 6 ô äâ † äéà 5 6 ô
 äê†äçà ! 5 6 è
 , , äaóýð " ô ä ß èà ô äâ ß äéà ! ô
 äê ß äçà ! à
 E â, • : ¼ Ð ÿ š › * ê, † x – m é ! | !
 () * ÿò š › WX
 ò %ä ÿò & óýð ! ! !
 ! !à ! !!
 & ! Š ! # " !

ä%ä, | ™† () | – ~ ™* ÿò š ›
 b c ÿò W⁻ Ñ“ † † ¢ 5 6 ö , » À A R
 ; f ...7 * äýò Ñ“ u á q ó - ö , , ¼ 9 »
 á äâê 3 ¹ Ñ“ q ð , Ó ~ Q ä âçè, ä Ñ“
 q g ÿ Ó ~ Q éè%ê

u ä, ÿò š › . / WX ä, " ! ÿò ! !				
5 6 ö	ð , ~ . ø # " Ó ~ q , ¼ " ! ÿ ! á	Ö Ñ“ ö , Ó ~ q , ¼ " ! ÿ ! á	g ÿ ~ . ñ " ! ÿ ! á	Ò 3 ¹ g ÿ , ¼ " ! ÿ ! á
!	èè	è%ä	ää	æ%ä
	äää	è%ä	âé	çä%ä
!	ääè	ää%ä	èæ	èä%ä
é !	êä	é%ä	âè	æ%æ
! é !	çæ	ç%ä	äç	ää%ä
é !	ææ	æ%ä	âé	ää%ä
é ! é !	âè	â%æ	äç	âè%ä
Á 5 6 ý	æä	æ%ä	ää	äç%ä
Ó T !	ä âçè	çè%ä	èè	èä%ä

Ñ“ † † ž ¹ ð 5 6 ö , Ê æè, å 5 6
 äéè, ä 5 6 âè, ģ ° Ò 3 ¹ Ñ“ ö , äé%ä é
 äé%ä ÜT ä%ä èž ¹ ð % ! 5 6 q ö , ~ . }
 o ä äâé, ä Ñ“ ö , q äâ%ä ÜK Ñ“ q éè
 %og ÿ * ä èæ%og ÿ á † † ~ K ð % ! 5 6 â
 , ¼ » { èä%ä èK ž ¹ r 5 6 q ö , %ox * ä
 ± ¢ Ý ¹ é ! 5 6 q ö , } o áéä, ä 3 ¹
 ö , q é%ä ÜK äè%og ÿ * † † ® ± ž ¹ é !
 5 6 â ¼ Q æ%ä èÑ“ ± ² ³ ' v ! 5 6 l W
^a P á » 7 q ö , %ox ~ 9 C æ Q èè, ä Ñ“
 ö , Ó ~ q , ¼ Q è%ä é

ä%ä, | ™† () | – ~ ™ Ð ¹ b š ›

ï d &' | ¶ µ ¶ q ä%og h Q d ' ä ç ®
 ö , ç ® ~ é ± # q | ¶ ~ . € • ! Â â ² z ›
 € • | ¶ D⁻ Ñ“ q ê%ç Ý , ÿ q | ¶ ~ . ,
 C Â d ' á äâê

u ä, ¹ ÿ W ₋ ~ â X n Ò ä, " ! & ! ! ! " !					
¥ O	g ÿ	Ö h ... ~ ó & ! " ! á			
ý à	û	ç	ää	äç	ää
ā	èäç ß ā	āā	āæ	èæ	çā
ä	æā ß ā	é	āæ	çā	æ
â	èää ß æ	āè	äç	èä	çç
æ	èää ß è	è	âè	èè	èé
ç	èçç ß æ	āā	äç	çā	æç
è	èää ß é	é	āā	ââ	ââ
é	èçâ ß è	āā	ââ	âè	ââ
ê	èää ß æ	é	ââ	æ	æç
d ' ò ú	ð	èè	ääé	äçè	âæ
	ñ	éè	ääé	äçâ	äää

ž • ÿ äé%ä 4 f „ Ö h ...&' ö , | ¶
 ~ . q n y ³ Á⁻ ä < , 9 ± ² ³ ' äK ö í â%äç
 q ú Ø 5 ä ¹ j k , 9 d ' ¹ ³ Á n y è • Q j
 k q D ¶ V { _ › ³ » Â d ' á æè

u æ ¹ ÿ â X " " b } ~ . / æ ! # & "				
¥ O	Ö h q • ~ ó & ! " ! á			
ý à	ç	ää	äç	ää
ā	äâ%ä † ä%ä	äâ%ä † ç%ä	èä%ä † ç%ä	çâ%ä † ä%ä
ä	è%ä † ä%ä	äâ%ä † ä%ä	çâ%ä † ä%ä	æ%ä † ä%ä
â	äè%ä † ä%ä	äè%ä † ä%ä	èä%ä † ä%ä	çç%ä † ä%ä
æ	è%ä † ä%ä	äç%ä † ä%ä	èè%ä † ä%ä	èé%ä † ä%ä
ç	äç%ä † ä%ä	äè%ä † ä%ä	çâ%ä † ä%ä	æç%ä † ä%ä
è	è%ä † ä%ä	äâ%ä † ä%ä	ââ%ä † ä%ä	ââ%ä † ä%ä
é	äè%ä † ä%ä	äè%ä † ç%ä	âè%ä † ä%ä	âè%ä † ä%ä
ê	è%ä † ä%ä	äâ%ä † ä%ä	æ%ä † ä%ä	æè%ä † ä%ä
ò ú ä	èè%ä † ä%ä	ääè%ä † ä%ä	äçè%ä † ä%ä	âæ%ä † ä%ä
ò ú ä	èè%ä † ç%ä	ääè%ä † ä%ä	äè%ä † ä%ä	äää%ä † ä%ä

, , ® } ~ ä ... Ö q ç ® ñ ô £ ^a z ' K ä%äç ú Ø n y ³ Á è
 , , " \$! " \$ & ! \$!! \$
 ! & ! ! ä%äç ! & # ä

Ö h äç ... ä ¶ ~ . K èâ†éâ⁻ Þ . ¹ â
 %og h äK çâ†éâ⁻ Þ . q ¹ ä%og h ä ¶ ~ .

低于 50 头有 3 个品种。而对大豆蚜敏感的 2 个对照处理,在接种 15 d 后,蚜虫数量均超过 100 头。接种 20 d,蚜虫数量略有回落,表明蚜虫繁殖在 15 d 时到达高峰,随后种群数量开始减少。与对照相比,转抗虫基因的后代对蚜虫具有较高的抗性。

3 结论与讨论

在该研究中,主要检测 *bt* 和 *pta* 基因的抗虫表现,*bar* 基因作为一种筛选标记,因其抗除草剂的能力也将作为今后培育栽培品种的一个重要的参考指标。

转基因高后代中,对所有 1 056 个单株检测发现,*bt* 基因稳定遗传到高代的植株数较少,占检测植株总数的比例为 6.5%。而 *pta* 基因稳定遗传到高代的植株个体数较多,占检测植株的 22.6%。与此基因相比,*pta* 基因能相对稳定的遗传保留在目标个体中。含有三基因的个体仅为 36 株,占检测植株的 3.4%。单个基因稳定遗传到后代要比多个基因稳定遗传到后代的比率高。多个基因高代遗传转化的稳定性仍是今后需要攻克的难题。

关于蚜虫的鉴定,是在温室中栽培活体植株上进行检测,更接近于作物的实际生长情况。叶片离体检测时,无法检测蚜虫在整株上的繁殖习性,活动范围等特征。同时无法证明蚜虫在离体单片叶片上与在整株上的变化是否一致,植株自身的生理活动是否对蚜虫的生活习惯造成影响,活体抗性检测较离体叶片能够得到更全面的信息。该研究表明,接种 5 d 后,蚜虫数量在 5~19 头间;接种 10 d 后,蚜虫数量在 12~37 头间;接种 15 d 时,蚜虫达到高峰值 37~66 头间;随后蚜虫数量略有回落。Yao 等^[9]研究表明,转 *pta* 基因植株上蚜虫种群数量明显小于未转基因的敏感型品种,同时转基因植株较传统栽培品种对于蚜虫的抗性增强明显。

农杆菌介导以出芽方式而不通过愈伤组织转化存在较多的嵌合体,再加上 PCR 含有较多假阳性现象,导致后代的遗传分析存在一定的偏离^[10]。为获得更准确的结果,需进一步进行分子检测如 Southern blotting、Western blotting 等以及其它功能验

证,以选育出具有生产价值的转基因新种质。

参考文献

- [1] 王春荣, 邓秀成, 殷立娟, 等. 2004 年黑龙江省大豆蚜虫暴发因素分析[J]. 大豆通报, 2005(3):19. (Wang C R, Deng X C, Yin L J, et al. Analysis of the cause of soybean aphid eruption[J]. Soybean Bulletin, 2005(3):19.)
- [2] 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.)
- [3] 陈秀华, 柏锡, 潘欣, 等. 转 *cryIIem* 基因大豆的培育及抗性检测[J]. 大豆科学, 2009, 28(6):959-963. (Chen X H, Bai X, Pan X, et al. Cultivation of *cryIIem* gene transformed soybean and insect resistant assay[J]. Soybean Science, 2009, 28(6):959-963.)
- [4] 杨向东, 郭东全, 包绍君, 等. 双价抗虫转基因大豆抗苜蓿夜蛾分析[J]. 农业科学与技术(英文版), 2008, 9(3):67-69. (Yang X D, Guo D Q, Bao S J, et al. Resistance analysis of the binary insect-resistant transgenic soybean to *Heliothis virescens* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3):67-69.)
- [5] Ma X H, Wu T L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30(2):209-216.)
- [6] 马晓红, 姚陆铭, 武天龙. 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(5):373-378. (Ma X H, Yao L M, Wu T L. High frequency plant regeneration from whole cotyledonary node explants and comparison with cotyledonary node and embryonic tip regeneration system in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Soybean Science, 2008, 27(5):373-378.)
- [7] Hill C B, Li Y, Hartman G L. Resistance to the soybean aphid in soybean germplasm[J]. Crop Science, 2004, 44(1):98-106.
- [8] Mensah C, Difonzo C, Nelson R L, et al. Resistance to soybean aphid in early maturing soybean germplasm[J]. Crop Science, 2005, 45(6):2228-2233.
- [9] Yao J H, Pang Y Z, Qi H X, et al. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternate* agglutinin confers enhanced resistance to aphids[J]. Transgenic Research, 2003, 12:715-722.
- [10] Dang W, Wei Z M. An optimized agrobacterium-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173(4):381-389.