

抗除草剂转基因大豆遗传分析

刘 敏, 朱洪德, 高中利

(黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘 要:以6个在黑龙江省大面积推广的高油或高蛋白大豆品种(垦农4号、垦农18、垦农19、垦农21、垦农22、垦农30)与6个转基因抗除草剂品种(TSB1~TSB6)进行杂交,对杂交后代 F_1 、 F_2 、 F_3 和 BC_1 的抗除草剂特性进行了遗传分析并对每个世代抗感比进行统计分析。结果表明:抗除草剂基因在 F_2 代开始分离,各世代抗感比为 F_2 代3:1、 F_3 代5:1、 BC_1 代1:1,符合孟德尔遗传规律,表明抗除草剂基因由1对显性基因控制。

关键词:转基因大豆;遗传分析;显性基因

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)01-0033-04

Inheritance Analysis of Herbicide-Resistant Transgenic Soybean

LIU Min, ZHU Hong-de, GAO Zhong-li

(College of Agronomy, Heilongjiang August First Reclamation University, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract: Six high-quality soybean varieties (Kennong 4, Kennong 18, Kennong 19, Kennong 21, Kennong 22 and Kennong 30) largely promoted in Heilongjiang Province were used to conduct the direct and reciprocal crosses with six transgenic herbicide-resistant varieties (TSB1-TSB6). The genetic analysis of herbicide-resistant for F_1 , F_2 , F_3 and BC_1 generation were conducted, and the ratio of resistant and non-resistant plant in each generation were 3:1, 5:1 and 1:1. Results indicate that herbicide-resistance was controlled by a dominant gene and it could be explained by Mendelian genetic principles.

Key words: Transgenic soybean; Inheritance analysis; Dominant gene

在大豆栽培中,杂草的防除是一个重要环节^[1]。20世纪80年代以来,随着进口除草剂的增加及国产除草剂生产规模的扩大,我国大豆施用化学除草剂的面积也不断增大,但目前尚无理想的低成本大豆田除草剂^[2]。因此,选育抗除草剂大豆成为最经济方便控制杂草的技术。

随着分子生物学理论和基因转化、组织培养等技术的不断发展,转基因植物研究取得了飞速发展^[3]。转基因大豆是世界上最早商品化、推广应用速度最快的转基因作物^[4],其中种植最多的是美国Monsanto公司的耐草甘膦大豆(Roundup Ready Soybean,简称RR大豆)^[5],这种大豆的研制为大豆田除草提供了新的思路和方法。

采用抗除草剂的转基因大豆品种与在黑龙江省大面积推广的优良大豆品种进行杂交,杂种后代 F_1 、 F_2 、 F_3 和 BC_1 植株在2~3叶期喷施41%的草甘

膦异丙胺盐水剂,连续选择抗性植株,研究抗除草剂基因的遗传规律,为抗草甘膦大豆品种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

6个抗除草剂转基因大豆TSB1~TSB6;6个黑龙江八一农垦大学培育的在黑龙江省大面积推广的高油或高蛋白大豆品种,垦农4号、垦农18、垦农19、垦农21、垦农22和垦农30。

1.2 试验方法

试验在黑龙江八一农垦大学科研所进行,2行小区,行长5 m,垄距67 cm,株距10 cm,小区面积6.70 m²。于2007年7月20日大豆盛花期开始做人工杂交,分别以6个转基因大豆品种为父、母本与6个优质大豆品种做正反交,配制成12个杂交组合

收稿日期:2009-11-08

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2003AA207170、2004AA207160);国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A04);引进国际先进农业科学技术计划资助项目(2008-Z24);黑龙江省发展高新技术产业专项资金资助项目(FW06B902)。

第一作者简介:刘敏(1984-),女,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:liumin8415@hotmail.com。

通讯作者:朱洪德,研究员。E-mail:zhd495@163.com。

(表 1),每个组合做 50 朵花,杂交植株挂牌写明组合号。

表 1 转基因大豆品种与常规高品质大豆品种的杂交组合

Table 1 Cross combination of transgenic soybean varieties and conventional high - quality soybean varieties

组合代号 Cross No.	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	7-6
母本 Female	TSB1	TSB2	TSB3	TSB4	TSB5	TSB6
父本 Male	垦农 30	垦农 22	垦农 21	垦农 19	垦农 18	垦农 4
	Kennong 30	Kennong 22	Kennong 21	Kennong 19	Kennong 18	Kennong No. 4
组合号 Cross No.	7-7	7-8	7-9	7-10	7-11	7-12
母本 Female	垦农 4	垦农 18	垦农 19	垦农 21	垦农 22	垦农 30
	Kennong No. 4	Kennong 18	Kennong 19	Kennong 21	Kennong 22	Kennong 30
父本 Male	TSB1	TSB2	TSB3	TSB4	TSB5	TSB6

10 月上旬按组合分别收取 F₁代,每个组合得到 80 ~ 180 粒种子,各组合随机选取 50 粒种子当年冬天到海南进行加代繁殖,得到 F₂代,每个组合得到种子 500 ~ 1 000 粒,苗期均对 F₁代植株喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂,淘汰死株。

2008 年 5 月种植 F₂代,同时种植保留的 TSB2 × 垦农 22、TSB5 × 垦农 18 和垦农 19 × TSB3 组合的 F₁代种子和亲本,F₁代与亲本回交得到 BC₁代(表 2),苗期均对 F₂代和 F₁代植株喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂,调查抗与不抗的植株比率,淘汰死株,10 月上旬按组合分别收取 F₃和 BC₁代。

表 2 回交一代 BC₁杂交组合

Table 2 Cross combination of BC₁

组合代号 Cross No.	8-1	8-2	8-3
母本 Female	垦农 22	TSB5 × 垦农 18	垦农 19 × TSB3
父本 Male	Kennong 22	TSB5 × Kennong 18	Kennong 19 × TSB3
母本 Female	TSB2 × 垦农 22	垦农 18	垦农 19
父本 Male	TSB2 × Kennong 22	Kennong 18	Kennong 19

2009 年种植 F₃代和 BC₁代,田间管理同常规生产田。选择无风晴朗的 7 月 13 日下午对小区喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂,3 d 后第 1 次田间调查,7 d 后第 2 次田间调查。

2 结果与分析

2.1 F₁代抗除草剂表现

选取 TSB1 × 垦农 30、TSB2 × 垦农 22 和垦农 21 × TSB4 的 F₁代种子和亲本在小区内种植,喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂后进行田间调查。7 月 16 日第 1 次调查发现 3 个 F₁代植株和 3 个转基因植株生长良好,垦农 21、垦农 22 和垦农 30 有不同程度的萎焉,但无死亡现象。7 月 20 日第 2 次田间

调查发现,F₁和转基因植株生长良好,垦农 21、垦农 22 和垦农 30 全部萎焉死亡。

结果表明,转基因的亲代和杂交 F₁代均对 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂表现出抗性,而常规大豆植株全部死亡,符合孟德尔遗传规律,当亲本基因型为 RR 和 rr 时,正反交得到的子代 F₁为 Rr,植株表现由显性基因 R 控制的性状,因此,假设抗除草剂基因由 1 对显性基因控制。

2.2 F₂代抗除草剂表现

F₂代试验小区喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂后,7 月 16 日第 1 次田间调查发现每个小区均有萎焉植株,但是数目有差异,部分植株对药剂没反应。7 月 20 日第 2 次田间调查发现,第 1 次调查时萎焉的植株全部死亡,其余植株正常生长(表 3)。

表 3 F₂代抗性分析

Table 3 Analysis of resistance for F₂ generation

组合代号 Cross Number	总株数 Total number	抗性植株 Resistant plants/R	不抗植株 Non-resistant plants/r	R/r	X ²	P
7-1	109	81	27	3:1	0.0123	0.9115
7-2	100	80	20	4:1	1.0800	0.2987
7-3	60	38	22	1.73:1	3.7556	0.0526
7-4	48	39	9	4.40:1	0.6944	0.4047
7-5	50	35	15	2.33:1	0.4267	0.5136
7-6	71	55	16	3.43:1	0.1174	0.7319
7-7	53	42	11	3.82:1	0.3082	0.5788
7-8	69	50	19	2.63:1	0.1208	0.7282
7-9	112	83	29	2.86:1	0.0119	0.9131
7-10	60	40	20	2.00:1	1.8000	0.1797
7-11	67	44	23	1.91:1	2.6318	0.1047
7-12	97	72	25	2.88:1	0.0034	0.9533

F₂代喷药后得到的数据采用 DPS 系统下模型拟合优度检测,X²检验显著水平全部大于 0.05,假设抗除草剂品种的基因型为 RR,常规不抗除草剂

品种的基因型为 rr, F₁ 代基因型应为 Rr, F₂ 将出现 1/4RR、2/4Rr 和 1/4rr 3 种基因型。具有 RR 和 Rr 基因型的大豆植株抗除草剂, 而 rr 基因型的大豆植株不抗除草剂, 喷草甘膦后 F₂ 代活苗与死苗之比为 3:1, 这表明试验得到的 R/r 和孟德尔遗传规律的 3:1 相符合。因此, 抗除草剂基因由 1 对显性基因控制的假设完全成立。

2.3 F₃ 代抗除草剂表现

F₃ 代试验小区喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂后, 7 月 16 日第 1 次田间调查发现每个小区有萎焉植株, 萎焉数目明显少于 F₂ 代, 大部分植株对药剂没反应。7 月 20 日第 2 次田间调查发现, 第 1 次调查时萎焉的植株全部死亡, 其余植株正常生长 (表 4)。

表 4 F₃ 代抗性分析
Table 4 Analysis of resistance for F₃ generation

组合代号 Cross No.	总株数 Total number	抗性植株 Resistant plants/R	不抗植株			
			Non- resistant plants/r	R/r	X ²	P
7-1	135	114	21	5.43:1	0.0533	0.8174
7-2	91	78	13	6.00:1	0.2206	0.6386
7-3	113	92	21	4.38:1	0.1777	0.6733
7-4	78	67	11	6.09:1	0.2077	0.6486
7-5	98	85	13	6.54:1	0.5885	0.4430
7-6	90	74	16	4.63:1	2.1333	0.1441
7-7	107	89	18	4.94:1	0.0075	0.9311
7-8	122	103	19	5.42:1	0.0410	0.8396
7-9	114	96	18	5.33:1	0.0158	0.9000
7-10	96	82	14	5.85:1	0.1688	0.6812
7-11	99	84	15	5.60:1	0.0727	0.7874
7-12	85	70	15	4.66:1	0.0094	0.9311

F₃ 代喷药后得到的数据采用 DPS 系统下模型拟合优度检测, X² 检验显著水平全部大于 0.05, 根据孟德尔遗传规律, F₂ 代植株自交得到 F₃ 代, 后代基因型理论上会使活苗与死苗的比例为 5:1, 即: (3/2RR + Rr): 1/2rr, 这表明试验得到的 R/r 和孟德尔遗传规律的 5/1 相符合, 进一步证明了抗除草剂基因由 1 对显性基因控制的假设是正确的。

2.4 BC₁ 代抗除草剂表现

BC₁ 代试验小区喷施 41% 的草甘膦异丙胺盐水剂后, 7 月 16 日田间调查发现每个小区有萎焉植株, 萎焉数目明显大于 F₁ 和 F₂ 代, 部分植株对药剂没反应。7 月 20 日田间调查发现, 第 1 次调查时萎

焉的植株全部死亡, 其余植株正常生长 (表 5)。

表 5 BC₁ 代抗性分析
Table 5 Analysis of resistance for BC₁ generation

组合代号 Cross No.	总株数 Total number	抗性植株 Resistant plants/R	不抗植株			
			Non- resistant plants/r	R/r	X ²	P
8-1	89	40	49	0.82	0.7191	0.3964
8-2	97	58	39	1.49	3.3402	0.0676
8-3	114	64	50	1.28	1.4825	0.2234

3 个 BC₁ 代喷药后得到的数据采用 DPS 系统下模型拟合优度检测, X² 检验显著水平全部大于 0.05, 基于以上基因型假设, 杂交 F₁ 代的基因型为 Rr, 正回交遗传模式: rr/Rr → 2Rr + 2rr; 反回交遗传模式: Rr/r → 2rr + 2Rr。具有 Rr 基因型的大豆植株抗除草剂, 具有 rr 基因型的大豆植株不抗除草剂, 因此, 喷药后活苗与死苗之比为 1:1, 这表明得到的 R/r 和孟德尔遗传规律的 1:1 相符合。上述正反交的遗传行为表现一致, 证明除草剂的抗性不受细胞质影响。

3 讨论

3.1 常规杂交获得转基因植株的抗除草剂基因

通过对 F₁、F₂、F₃ 和 BC₁ 的遗传分析证实, 抗除草剂基因受 1 对显性核基因控制, 通过常规的杂交方法可把它转育到其它大豆品种中。例如, 以 TSB2 为母本, 垦农 18 为父本进行杂交, F₁ 基因型为 Rr, 以垦农 18 为父本回交 1 次, 出现 Rr 和 rr 2 种基因型, 喷药后得到 Rr, 再自交后代分离出现 3 种基因型, 苗期喷施草甘膦对植株进行抗性选择, 出现死苗的为杂合体淘汰, 其余则为纯合的抗除草剂的大豆植株。由于抗除草剂基因能嵌入到不同的染色体及同一染色体的不同位置, 引起不同的遗传效应^[6], 因而后代应注意优良性状的选择^[7]。

3.2 在杂交育种方面的应用

近年来, 转基因大豆给大豆主产国带来巨大效益^[8], 转基因作物商品化种植面积迅速扩大^[9], 选育抗草甘膦的大豆品种已成为大豆育种的一个热门领域^[10]。目前虽有多种遗传转化方法, 但是最为适合的方法却很少。基因枪转化以其不受基因型的限制而倍受青睐^[11], 但基因枪转化也存在着拷贝数多的现象^[12-13]。除此之外, 有些转化的材料不能直接应用于生产^[14]。因此, 可利用已有的

转基因材料与常规的大豆品种杂交,将外源基因转入农艺性状优良的大豆品种。通过对已有稳定的转基因大豆品系和常规大豆有性杂交,并利用现有的大豆转基因研究基础,与传统育种方法紧密结合,建立起新的转基因大豆育种技术体系,不但可以改善大豆生产状况,而且可以选育更加优良的大豆新品种。

参考文献

- [1] 梁雪莲,王引斌.作物抗除草剂转基因研究进展[J].生物技术通讯,2001(2):17-21. (Liang X L, Wang Y B. The progress of studies on herbicide resistance gene of crop[J]. Biotechnology Information, 2001(2):17-21.)
- [2] James C. Executive summary, Global status of commercialized biotech/GM crops[R]. ISAAA Briefs, 2005, No. 34.
- [3] Horvath H, Jensen L G, Wong O T, et al. Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(1):1-11.
- [4] 潘良文,陈家华,沈禹飞,等.进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的监测比较研究[J].农业生物技术学报,2001,12(3):175-177. (Pan L W, Chen J H, Shen Y F, et al. Detection comparison of CP4-EPSPS gene from genetically modified Roundup-Ready rapeseed and soybean[J]. Letters in Biotechnology, 2001, 12(3):175-177.)
- [5] Phillip A C. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleraceavar. Capital*) cultivar[J]. Genome, 2000, 43:317.
- [6] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. Science, 1999, 286:950-952.
- [7] 罗振锋,李启云.转基因大豆产业化现状及展望[J].大豆科学,2005,24(8):220-223. (Luo Z F, Li Q Y. Commercialization status and research progress of transgenic soybean[J]. Soybean Science, 2005, 24(8):220-223.)
- [8] 刘海坤,卫志明.大豆遗传转化研究进展[J].植物生理与分子生物学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2):126-134.)
- [9] James C. Global status of commercialized Biotech/GM Crops:2007 (ISAAA Briefing No 37)[C]. Executive Summary, 2007.
- [10] Wiese A F. Inheritance of 2,4-D and propazine resistance in grain Sorghum[M]. Abstract Meet. Weed Science Soc. Am., 1969, 29.
- [11] Berberich SAJE Ream. Safety assessment of insect-protected cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to conventional cottonseed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 41:365-371.
- [12] Sch nbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth W A, et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail[J]. Proceedings of the National Academic Sciences, 2001, 98(4):1376-1380.
- [13] 冯道荣,邱国华,许新萍,等.多基因植物表达载体的构建[J].西北植物学报,2001,21(4):609-614. (Feng D R, Qiu G H, Xun X P, et al. Construction of plant expression vectors containing multiple genes [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2001, 21(4):609-614.)
- [14] Shaner D L. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicides and on resistance management[J]. Pest Management Science, 2000, 56:320-326.

欢迎订阅 2010 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办国内外公开发行的专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊,反映大豆科学研究的最新成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部

邮编:150086

电话:0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com ddkexue@126.com