

## 利用种子萌发法快速检测抗草铵膦转基因大豆

常 晶, 孟凡立, 李永光, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 教育部大豆生物学教育部重点实验室, 农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**转基因后代植株遗传存在不稳定性,能够快速有效地筛选后代阳性植株成为转基因研究工作的重点。通过在培养基中添加不同浓度的草铵膦进行种子萌发试验,结果普通受体大豆品种东农 50 在大于  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦筛选压力下,种子萌发率显著降低,植株根系生长受到抑制,基本不能完成正常的生活史;携带 *bar* 基因的 Southern 拷贝  $T_2$  代转基因大豆种子在添加  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦的 MS 培养基中 34.7% 能正常萌发生长,利用 *CaMV35S* 和 *bar 2* 对引物对  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦筛选得到的转基因植株进行检测,能扩增出正确的条带,结果均为阳性。研究表明应用种子萌发法能够快速检测草铵膦转基因大豆。

**关键词:**转基因大豆;草铵膦抗性;萌发法;分子检测

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0534-04

## Rapid Detecting Glufosinate-Tolerant Transgenic Soybean via Seed Germination Method

CHANG Jing, MENG Fan-li, LI Yong-guang, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology, Agricultural Ministry's Northeast Areal Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** We need to choose a repaid and effective method to solve the problem that transgenic offsprings are genetic instable. In this study, the seeds of Dongnong 50 were sowed in MS medium contained different concentrations of glufosinate. Under  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate, the germination rate and growth of non-transgenic recipient Dongnong 50 were seriously inhibited and couldn't complete life cycle, while 34.7% of the transgenic soybean could not only germinate and grow up, but also could amplify the right specific segment using *CaMV35S* and *bar* primers. We can deduce that the germination method is a rapid and effective method to detect glufosinate-tolerant transgenic soybean.

**Key words:** Transgenic soybean; Glufosinate tolerance; Germination method; Molecular assay

随着转基因技术的进步,转化体系已经逐步得到改进和优化。培育出遗传稳定的转基因阳性植株、达到培育优良性状新品种成为转基因育种研究的重点。转基因株系后代采用单籽传种法,采用外源基因鉴定及遗传性分析等方法可鉴定外源基因是否成功转育到转基因植物中并稳定遗传表达。

检测外源基因方法主要通过检测筛选标记基因或报告基因的存在以及外源目的基因 PCR 扩增、Southern 杂交、原位杂交等。检测筛选标记基因或报告基因的存在状态,是一种方便、快捷的外源基因检测方法<sup>[1-2]</sup>。利用 PCR、Southern 杂交、Northern 杂交和 Western 杂交等分子检测手段对每个世代的转基因植株进行检测,检测工作量较大、费时费钱,因此迫切需要一种简单、易行的检测方法以挑选遗传稳定的转基因后代。采用种子萌发法对转基因种子进行草铵膦抗性筛选已经在油菜、水稻等作物品种中得到成功应用,筛选方法简单而且准确性较

高<sup>[3-5]</sup>。草铵膦(Glufosinate),又名草丁膦,属磷酸类除草剂<sup>[4]</sup>。草铵膦主要在植物体内强烈的抑制谷氨酰合成酶(Glutamine Synthetase, GS)的活性,导致铵离子积累从而抑制植物光合作用,最终引起植物细胞氨中毒死亡<sup>[5-6]</sup>。草铵膦对抗性植物的胁迫是一种适应过程,转基因植株经过损伤期、修复期、基本恢复等过程表现出对草铵膦的抗性。在植物遗传转化中草铵膦主要作为一种筛选剂,广泛应用于农杆菌介导目的基因转化植株前期的外植体筛选过程中<sup>[7-8]</sup>。

在大豆转基因阳性后代的筛选中,适合的草铵膦浓度对转基因后代的筛选至关重要。本文探讨了草铵膦对非转基因大豆种子萌发的影响,确定最佳筛选浓度,并对携带草铵膦抗性基因的转基因大豆株系进行深入研究。探讨种子检测法对转基因大豆检测的可能性和实用性,为快速检测抗草铵膦转基因大豆提供新方法。

收稿日期:2012-04-02

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08004-00213)。

第一作者简介:常晶(1986-),女,在读硕士,研究方向为大豆生物技术。E-mail:changjing\_0405@yahoo.com.cn。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

T<sub>2</sub>代 *bar* 基因 Southern 单拷贝转基因大豆株系种子、受体大豆品种东农 50 种子;草铵膦(Glufosinate):200 g·L<sup>-1</sup>,拜尔作物科技公司,韩国;Easy Taq DNA 聚合酶、DNA Marker, TaKaRa 公司;琼脂糖(Agarose),西班牙进口试剂;引物,上海生工生物工程公司。

### 1.2 方法

1.2.1 东农 50 在不同浓度草铵膦处理下的萌发 选取当年收获的饱满的东农 50 种子,氯气消毒 8 h 后分别接种于含有 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、10.0 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦的 MS 萌发培养基上。每瓶播种 10 粒,3 次重复。在 24±1℃,16 h 光照/8 h 黑暗培养箱内进行培养,5 d 后对各处理浓度大豆萌发情况进行统计分析,计算萌发率(种子突破种皮,胚根伸出,下胚轴伸长记为萌发),同时将各处理的材料转移蛭石中,放入 24±1℃,16 h 光照/8 h 黑暗的人工气候箱进行培养,选取适合的草铵膦浓度作为转基因大豆筛选压力。

1.2.2 转基因大豆草铵膦筛选 选取 T<sub>2</sub>代 *bar* 基因 Southern 杂交单拷贝转基因大豆株系后代种子共 300 粒为待鉴定材料、普通受体大豆种子 300 粒为参照材料,2 组材料分为 3 个处理组,每个处理组 100 粒,经氯气消毒 8 h 后,播种于含有 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦的 MS 萌发培养基中。8 d 后,将正常萌发的植株移栽到蛭石中。培养基成分及蛭石培养条件同 1.2.1。

1.2.3 转基因植株的 PCR 检测 取转基因大豆叶片 300 mg,放入 1.5 mL 离心管中,液氮研磨,加入 400 μL SDS 裂解缓冲液;50℃ 温浴 30 min,其间颠倒 1 次,再加入 100 μL 5 mmol·L<sup>-1</sup> KAc 涡旋混匀,冰上放置 30 min;加入 500 μL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),充分颠倒混匀,4℃ 离心 10 min;取上清液,加入等体积的预冷异丙醇,颠倒混匀,4℃ 离心 10 min;弃上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,室温干燥后加入 20 μL 去离子水溶解,-20℃ 保存备用。

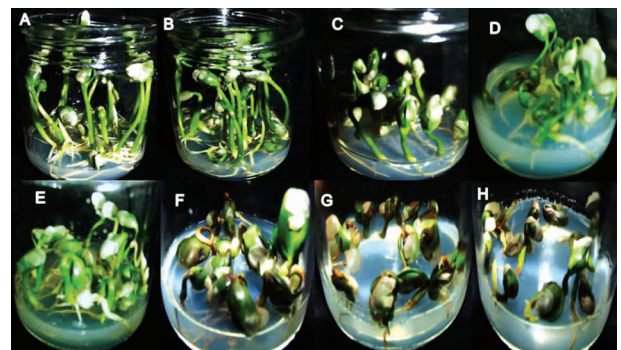
为明确种子萌发检测法对转草铵膦抗性转基因大豆的可能性和实用性,本研究通过提取 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压力下存活的待鉴定转基因材料基因组 DNA,进一步采用 PCR 方法检测待鉴定转基因材料基因组中是否存在 *CaMV35S* 和 *bar* 基因来证明存活的转基因材料为稳定遗传的转基因植株。分别设计基因特异性引物, *CaMV35S*: 5'-CCCGCCTTCAGTTTAG-3' 和 5'-GCATTGTAG-

GAGCCAC-3'; *bar*: 5'-AAGCCCTGTGCCTCCA-3' 和 5'-TTCGCAAGACCTTCCTCTAT-3',分别扩增出 *bar* 引物目的条带为 457 bp、*CaMV35S* 引物目的条带为 314 bp。PCR 反应体系:20 μL,10× 缓冲液 2.0 μL,dNTP Mix(10 mmol·L<sup>-1</sup>)0.5 μL,各正、反引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)1.0 μL,MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U·μL<sup>-1</sup>)0.3 μL,模板 2.0 μL,灭菌去离子水 12.7 μL。PCR 反应条件 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 1.0 min,30 个循环;72℃ 终延伸 10 min。8 μL PCR 产物上样,1% 琼脂糖电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 受体东农 50 的最佳草铵膦筛选浓度

种子萌发之初即为吸水膨胀的过程,无需各种营养物质的积累和消耗。东农 50 种子萌发吸水膨胀过程中,各浓度处理下受体种子生长并未见到明显的差异。从种子胚萌动生长开始,随着草铵膦浓度的增大,根的生长受到了明显的抑制、根尖褐化程度加大、须根系逐渐减少;株高显著下降;子叶颜色逐渐失绿、变紫(图 1,图 2),氨的积累程度加大,呈现出氨中毒现象。随着筛选浓度的增大,东农 50 萌发率逐渐降低,当筛选浓度达 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 时东农 50 的萌发率接近 0(图 3)。移栽到蛭石中培养 5 d 后,各浓度处理组材料呈现出不同长势,随着药剂处理浓度增加植株的生长逐渐受到抑制,5.0 mg·L<sup>-1</sup> 的筛选压力下植株不能正常完成生活史(图 4-F)。综合以上结果可以得出,5.0 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压力对普通受体东农 50 种子的萌发具



A~H 分别代表草铵膦浓度为 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、10.0 mg·L<sup>-1</sup>;

A-H represent 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 and 10.0 mg·L<sup>-1</sup> glufosinate-ammonium, respectively; the same in Fig. 3 and Fig. 4.

图 1 东农 50 在不同草铵膦浓度处理下的萌发情况  
Fig. 1 Germination of Dongnong50 under different glufosinate-ammonium concentration

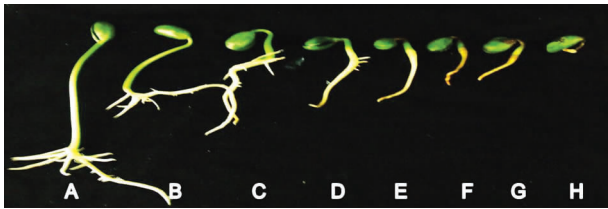


图2 东农 50 在不同草铵膦浓度处理下的生长状况

Fig. 2 Growth of Dongnong 50 under different glufosinate-ammonium concentration

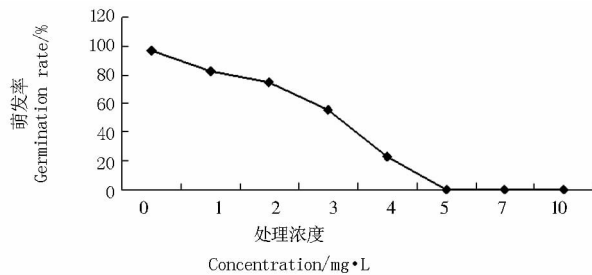


图3 东农 50 在不同草铵膦浓度处理下的萌发率

Fig. 3 Germination rate of Dongnong 50 under different glufosinate-ammonium concentration



图4 东农 50 移栽后的生长状况

Fig. 4 Growth of Dongnong 50 under different glufosinate-ammonium concentration treatment after transplanting

有明显的抑制作用,因此将此浓度界定为普通受体东农 50 种子萌发最佳抑制浓度。

## 2.2 转基因株系在最佳草铵膦筛选浓度下的萌发

如图 5 所示,在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦筛选压力下,  $T_2$  代 Southern 杂交 *bar* 基因单拷贝的转基因株系后代根长并未受到明显抑制,子叶无明显失绿及褐化;而东农 50 受体种子根的生长受到严重抑制并伴有子叶明显褐化失绿。由表 1 可知,转基因株系后代种子平均萌发率约达 34.7%,受体大豆种子平均萌发率仅约为 1.1%。说明  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦能明显抑制普通受体大豆东农 50 试验组材料的生长而对转基因后代试验组材料则无明显抑制现象,进一步证实种子萌发法可作为鉴别含有 *bar* 基因的转基因株系后代阳性种子和非阳性种子的一种方

法,而培养基中添加  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦则为鉴定的最佳浓度。

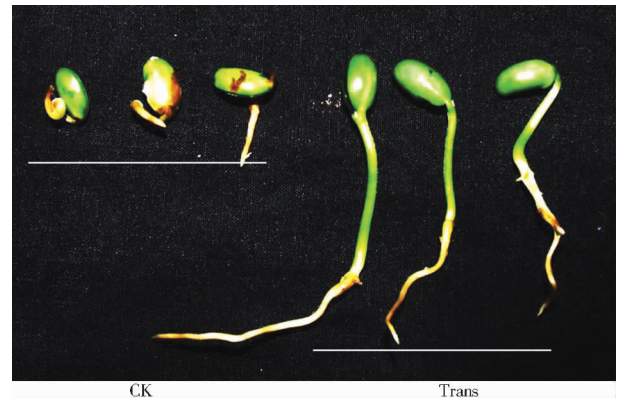


图5 受体和转基因材料在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦浓度下的长势

Fig. 5 Growth of receptor and transgenic plants in  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate-ammonium

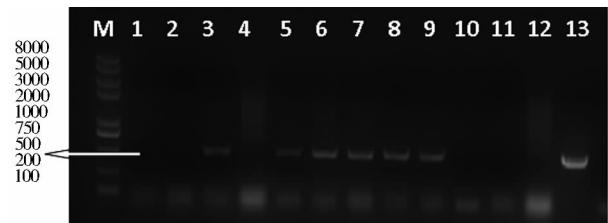
表1 受体和转基因材料在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦浓度下的萌发率

Table 1 Germination rate of receptor and transgenic plants in  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate-ammonium concentration (%)

材料 Material	1	2	3	平均值 Mean
转基因大豆株系 Transgenic lines	38	31	35	34.7
东农 50 Dongnong50	1.2	0.7	1.2	1.1

## 2.3 草铵膦抗性的分子检测

由图 6 可以看出,在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的草铵膦浓度筛选压力下,转基因株系后代植株 *bar* 引物能扩增出正确的条带,普通受体植株扩增不出正确条带。由图 7 可以看出  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的草铵膦浓度筛选压力下转基因株系 *CaMV35S* 扩增出正确的条带,而普通受体植株扩增不出正确条带。在  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的草铵膦筛选压力下,将存活的转基因试验材料进行 PCR 检测,60% 植株能扩增出正确的 *bar* 基因和 *CaMV35S* 基因特异性条带。

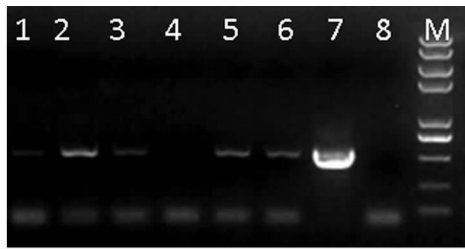


M;DL8000 DNA Marker;1~9:转基因大豆 PCR 产物;10~12:对照大豆扩增的阴性对照;13:pCambia-LTP 质粒扩增的阳性对照;

M;DL8000 DNA Marker;1-9:Transgenic soybean;10-12:Negative control of control soybean;13:Plasmid positive control

图6 PCR 检测大豆 *bar* (457 bp) 基因电泳图谱

Fig. 6 The detection of soybean by PCR with primer *bar* (457 bp)



M:DL8000 DNA Marker;1~6:转基因大豆 PCR 产物;7:  
*pCAMBIA-LTP* 质粒扩增的阳性对照;8:对照大豆扩增的阴性  
对照

M:DL8000 DNA Marker;1-6: Transgenic soybean;7: Plasmid  
positive control;8: Negative control of control soybean

图 7 PCR 检测大豆 *CaMV35S* (414 bp) 基因电泳图谱

Fig. 7 The detection of soybean by PCR with  
primer *CaMV35S* (414 bp)

### 3 结论与讨论

研究结果表明随着在受体东农 50 种子萌发培养基中依次添加 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  草铵膦,受体东农 50 种子长势逐渐受到抑制。播种于萌发培养基 8 d 后的受体东农 50 材料全部种于蛭石中,6 d 后可观察到随着处理组材料添加的草铵膦浓度逐渐增加受体植株东农 50 种子长势逐渐受到的抑制,当草铵膦筛选浓度达到 5.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,受体植株东农 50 种子无完成正常生活史的能力,筛选浓度继续增加时受体植株东农 50 种子在蛭石中呈腐烂状。

转基因后代遗传不稳定性一直是转基因育种存在的问题,转基因植株后代目的基因拷贝数多以及在基因减数分裂时重组交换等因素都可能导致目的基因丢失或沉默。转基因植株随着繁衍代数增加其后代种子量加大,如何能快速、省时的筛选出真正转基因株系植株,获得遗传稳定性强的转基因品种一直成为困扰转基因育种工作者的问题<sup>[9-13]</sup>。分子检测方法中 PCR 方法只能鉴定目标基因是否整合到植物基因组中、RT-PCR 方法只能检测目标基因是否转录为 RNA,不仅存在耗费人力、物力的问题而且不能鉴定目标基因是否能翻译成蛋白质并进行目标性状表达。种子萌发方法具有操作简单,成本低廉,检测周期短等优点,适合于对多品种、较大量样本的产品初筛试验。既可以节省检测成本,还可缩短检测时间。

### 参考文献

[1] 张文银,安永平,王彩芬,等. 主要转基因作物研究现状及其产业化进展[J]. 生物技术通报,2008(5):1-4. (Zhang W Y, An

Y P, Wang C F, et al. Review of development of genetically modified crops on research and commercial use[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(5):1-4. )

[2] 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. )

[3] 张宏军,崔海兰,倪汉文,等. 抗草铵膦转基因水稻快速方法比较[J]. 生物技术通报,2003(1):45-48. (Zhang H J, Cui H L, Ni H W, et al. Comparison of the methods of detecting glufosinate-tolerant transgenic rice seeds[J]. Biotechnology Bulletin, 2003(1):45-48. )

[4] 徐传祥,鞠本科,王文东,等. 简单实用的转抗除草剂基因后代植株鉴定方法-种子萌发法[J]. 复旦学报(自然科学版), 2000,30(3):318-321. (Xu C X, Kuai B K, Wang W D, et al. Seed germination test a simple but effective way of analyzing transgenic progenies transformed with the bar gene[J]. Journal of Fudan University(Natural Science Edition), 2000,30(3):318-321. )

[5] 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,1998. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998. )

[6] 张宏军,刘学,张佳,等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. 农药科学与管理,2004(4):23-27. (Zhang H J, Liu X, Zhang J, et al. Mechanism and utilization of glufosinate-ammonium[J]. Pesticide Science and Administration, 2004(4):23-27. )

[7] 张宏军,倪汉文,周志强,等. 抗草铵膦转基因作物及其生物安全性研究进展[J]. 中国农业大学学报,2002,7(5):54-56. (Zhang H J, Ni H W, Zhou Z Q, et al. Major progress on biosafety of glufosinate resistant transgenic crops[J]. Journal of China Agricultural University, 2002, 7(5):54-56. )

[8] Thompson C J, Movva N R, Tizard R, et al. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. EMBO Journal, 1987, 6:2519-2523.

[9] Zhang Z, Xing A, Staswick P E, 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.

[10] Zeng P, Vadrnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Plant Cell Reports, 2004, 22:478-482.

[11] 王清连,张宝红,郭腾龙,等. 转基因棉花外源基因的遗传[J]. 生命科学研究,2001,5(4):345-350 (Wang Q L, Zhang B H, Guo T L, et al. Inheritance of exogenous genes in transgenic cotton[J]. Life Science Research, 2001, 5(4):345-350. )

[12] 简玉瑜,陈远玲,李静,等. 转基因水稻外源基因的遗传和表达初步研究[J]. 华南农业大学学报,2001,22(1):56-59. (Jian Y Y, Chan Y L, Li J, et al. Primary studies on inheritance and expression of foreign gene in transgenic rice[J]. Journal of South China Agriculture University, 2001, 22(1):56-59. )

[13] 孙磊,韩俊友,李宏宇. 大豆再生植株抗草铵膦的筛选方法研究[J]. 大豆科学,2010,29(6):1019-1023. (Sun L, Han J Y, Li H Y. Comparison on methods screening of transgenic soybean resistant to glufosinate [J]. Soybean Science, 2010, 29(6):1019-1023. )