

利用草甘膦作为大豆子叶节遗传转化筛选剂的可行性分析

岳岩磊^{1,2,3}, 于丽杰¹, 孙石², 韩天富², 侯文胜²

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081; 3. 黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041)

摘要:以4个非转基因大豆品种自贡冬豆、吉林小粒1号、中黄30和Williams 82以及2个抗草甘膦转基因大豆品系中作J9331和中作J9333为材料,利用大豆子叶节进行遗传转化,草甘膦作为筛选剂,以丛生芽诱导率、成活率和伸长率为考察指标,探索丛生芽诱导期、筛选期和伸长期的适宜草甘膦筛选浓度。结果表明,丛生芽诱导期、筛选期及伸长期的草甘膦适宜筛选浓度范围分别为100~160、220~240和5~10 mg·L⁻¹,3个时期最适宜筛选浓度分别为60、240和5 mg·L⁻¹。

关键词:大豆遗传转化;草甘膦;筛选剂

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0538-04

Feasibility Analysis of Using Glyphosate as the Selective Agent in Soybean Genetic Transformation System with Cotyledonary Nodes as Explants

YUE Yan-lei^{1,2,3}, YU Li-jie¹, SUN Shi², HAN Tian-fu², HOU Wen-sheng²

(1. Life Science and Technology College, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang; 2. MOA Key Lab of Soybean Biology (Beijing), National Key Facility for Crop Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157041, Heilongjiang, China)

Abstract: Using four conventional soybean varieties (Zigongdongdou, Jilinxiaoli-1, Zhonghuang 30 and Williams 82) and two glyphosate-resistant transgenic soybean lines (Zhongzuo J9331 and J9333), the optimal concentrations of glyphosate were explored at three stages of soybean genetic transformation system with the cotyledon nodes as explants. The results showed that it is feasible to use glyphosate as the selective agent, the suitable concentrations are 100-160, 220-240 and 5-10 mg·L⁻¹ respectively at the stages of the induction, screening and elongation of multiple shoots clumps. In the whole, the optimal screening effect can be gotten with the glyphosate concentrations as 60, 240 and 5 mg·L⁻¹ respectively at the three stages.

Key words: Soybean transformation; Glyphosate; Selective agent

草甘膦 (Glyphosate), 学名 N-(膦酰基甲基)氨基乙酸,能够抑制植物体内 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合成酶 (EPSPS) 的活性,使芳香族氨基酸合成受阻,导致植物死亡^[1]。其作为除草剂,具有高效、低毒和广谱的特点,已成为目前世界上生产使用量最大的除草剂品种^[2]。

抗草甘膦转基因作物品种在一定程度上可以满足免耕与机械化生产的需要,提高种植效益。2011年,以抗草甘膦转基因大豆为主的转基因大豆种植面积达到了 7 540 万 hm²,占全球大豆总面积的 84%^[3]。

在大豆遗传转化中,筛选剂的选择不仅直接影响转化效率,而且影响转基因材料的实用性。大豆遗传转化中常用筛选剂主要有抗生素类如潮霉素 (Hygromycin) 和卡那霉素 (Kanamycin) 以及除草剂类如草丁膦 (Glufosinate) 等。卡那霉素成本低、适

用范围广,但不同受体品种的耐受性差异较大^[4]。潮霉素在大豆遗传转化中筛选效果较好,但有研究显示潮霉素会严重抑制一些植物组织的生长^[5]。目前,大豆遗传转化中使用最多的筛选剂是草丁膦^[6]。草甘膦作为一种广谱除草剂虽被广泛应用 30 余年,对其特性、作用机理等的研究较为透彻^[7-10],但其直接作为大豆遗传转化筛选剂的研究鲜有报道。

本研究以 4 个非转基因大豆品种和 2 个抗草甘膦转基因大豆品系为材料,摸索了其在大豆子叶节转化法^[11-13]中的丛生芽诱导、筛选及伸长 3 个阶段对草甘膦抗性的差异,以期明确草甘膦作为筛选剂的使用浓度和作为大豆遗传转化筛选剂的可行性,为大豆遗传转化过程中筛选剂的多样化选择提供具体指导。

收稿日期:2012-04-22

基金项目:国家自然科学基金 (30771358);农业部财政部现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04)。

第一作者简介:岳岩磊 (1984-),女,在读硕士,研究方向为植物分子生物学。E-mail: yueyanlei@163.com。

通讯作者:侯文胜 (1969-),男,博士,研究员,主要从事大豆基因工程研究。E-mail: houwsh@caas.net.cn。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

非转基因大豆品种:自贡冬豆、吉林小粒 1 号、中黄 30 和 Williams 82;抗草甘膦转基因大豆品系:中作 J9331 和中作 J9333;均由本实验室保存和提供。其中,中黄 30 为中作 J9333 的亲本之一。

草甘膦 (Glyphosate) 购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制 培养基参照 Paz 等^[11]和 Zeng 等^[14]报道的方法配制使用。

1.2.2 丛生芽培养 选取饱满、大小均匀、无病的大豆种子,经氯气灭菌后在发芽培养基上发芽 5 d。选取长势良好并一致的含 1 cm 下胚轴的子叶,在子叶节处进行划伤处理后,置于 B5 培养基中恢复培养 5 d。

1.2.3 丛生芽诱导期草甘膦浓度梯度处理 子叶节在 B5 培养基中恢复培养 5 d 后,选取长势一致的子叶插入草甘膦浓度分别为 0、60、100、140、160、180 和 320 mg·L⁻¹的芽诱导培养基中处理 15 d,统计每个子叶节上长出丛生芽的数目。3 次重复,每个重复至少 20 个外植体。

1.2.4 丛生芽筛选期草甘膦浓度梯度处理 子叶节经过 B5 培养基恢复培养 5 d 后,转入不含筛选剂的芽诱导培养基中培养 15 d,选取长势良好并一致的丛生芽,分别转移至草甘膦浓度为 0、100、160、

220、240、260 和 320 mg·L⁻¹的芽诱导培养基中处理 15 d,统计每个浓度下每个品种丛生芽的成活率。3 次重复,每个重复至少 20 个外植体。

1.2.5 丛生芽伸长期草甘膦浓度梯度处理 将长势良好并一致的丛生芽除去子叶,分别植入草甘膦浓度为 0、5、10、15 和 30 mg·L⁻¹的芽伸长培养基中进行处理,每 15 d 更换 1 次培养基,培养 3 个月,统计丛生芽伸长率。3 次重复,每个重复至少 20 个外植体。

1.3 数据分析

使用 SPSS 17.0 软件,对平均值进行 Duncan 多重比较^[15]。

2 结果与分析

2.1 草甘膦对大豆丛生芽诱导及伸长的影响

2.1.1 丛生芽诱导率 子叶节恢复培养 5 d 后,经过不同浓度草甘膦芽诱导培养基处理 15 d,统计丛生芽数目,并进行显著性分析(表 1)。结果显示,随着草甘膦浓度增加,自贡冬豆、吉林小粒 1 号、中黄 30 和 Williams 82 丛生芽诱导率极显著下降,当草甘膦浓度达到 160 mg·L⁻¹时,丛生芽的诱导完全受到抑制。而随着草甘膦浓度的增加,对草甘膦具有抗性的品系中作 J9331 和中作 J9333 的丛生芽诱导率没有显著变化。可见,草甘膦能够较好的抑制非转基因丛生芽的诱导,但对抗草甘膦转基因材料没有明显影响。

表 1 不同浓度草甘膦对丛生芽诱导率的影响
Table 1 Effect of glyphosate concentration on shoot induction rate(%)

品种 Varieties	草甘膦浓度 Glyphosate concentration/mg·L ⁻¹						
	0	60	100	140	160	180	320
自贡冬豆 Zigongdongdou	95.0 ± 1.0A	70.3 ± 8.9B	26.3 ± 15.8C	17.0 ± 14.1CD	2.0 ± 2.0D	1.7 ± 2.8D	0.0 ± 0.0D
吉林小粒 1 号 Jilinxiaoli-1	80.7 ± 7.5A	22.6 ± 8.3B	2.7 ± 2.3C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C
中黄 30 Zhonghuang 30	83.0 ± 14.1A	46.5 ± 7.7B	23.5 ± 17.0C	8.7 ± 8.1C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C
Williams 82	83.7 ± 1.4A	2.7 ± 4.6B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
中作 J9331 Zhongzuo J9331	78.0 ± 11.1A	91.0 ± 5.6A	74.0 ± 14.0A	79.3 ± 9.5A	83.3 ± 7.0A	78.7 ± 2.3A	75.3 ± 4.2A
中作 J9333 Zhongzuo J9333	84.2 ± 10.4A	65.3 ± 18.9A	84.1 ± 4.0A	82.7 ± 2.4A	77.5 ± 10.0A	89.4 ± 6.1A	79.4 ± 7.2A

表中数据为 3 次重复的平均值,平均值比较采用 Duncan 法,不同大写字母表示同行不同处理差异显著(P < 0.01)。下同。

The data are the averages of 3 replications. They are compared using the Duncan method. Values within a line followed by different capital letters are significantly different at 0.01 probability level. The same below.

2.1.2 丛生芽成活率 使用不同浓度的草甘膦处理长势一致的大豆丛生芽 15 d 后,统计丛生芽成活率,并进行显著性分析(表 2)。结果显示,自贡冬豆、吉林小粒 1 号、中黄 30 和 Williams 82 在草甘膦浓度为 260 mg·L⁻¹时丛生芽成活率为 0,不同浓度

间丛生芽诱导率差异显著。而对草甘膦具有抗性的品系中作 J9331 和中作 J9333 随着草甘膦浓度的增加,丛生芽成活率没有显著变化。说明草甘膦对大豆遗传转化中丛生芽的筛选是有效的。

表 2 不同浓度草甘膦对丛生芽成活率的影响

Table 2 Effect of glyphosate concentration on shoot survival rate(%)

品种 Varieties	草甘膦浓度 Glyphosate concentration/mg·L ⁻¹						
	0	100	160	220	240	260	320
自贡冬豆 Zigongdongdou	100.0 ± 0.0A	50.4 ± 15.8B	17.5 ± 7.5C	10.0 ± 0.0CD	0.0 ± 0.0D	0.0 ± 0.0D	0.0 ± 0.0D
吉林小粒 1 号 Jilinxiaoli-1	98.8 ± 2.1A	21.7 ± 18.9B	28.9 ± 19.3B	17.0 ± 18.6B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
中黄 30 Zhonghuang 30	100.0 ± 0.0A	40.0 ± 0.0B	6.0 ± 3.5C	5.0 ± 0.0C	1.1 ± 1.2D	0.0 ± 0.0D	0.0 ± 0.0D
Williams 82	100.0 ± 0.0A	43.3 ± 15.3B	38.4 ± 30.5B	2.7 ± 2.3C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C	0.0 ± 0.0C
中作 J9331 Zhongzuo J9331	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A
中作 J9333 Zhongzuo J9333	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A	100.0 ± 0.0A

2.1.3 丛生芽伸长率 选取长势一致的丛生芽在不同浓度草甘膦处理下进行伸长,每 15 d 更换 1 次培养基,培养 3 个月,统计丛生芽伸长率,并进行显著性分析(表 3)。结果显示,吉林小粒 1 号、中黄 30 及 Williams 82 丛生芽伸长对草甘膦敏感浓度为 5 mg·L⁻¹,自贡冬豆敏感浓度为 10 mg·L⁻¹,在敏感

浓度下丛生芽不能伸长甚至死亡。而中作 J9331 和中作 J9333 在 0 ~ 30 mg·L⁻¹ 草甘膦浓度下丛生芽伸长率没有显著变化。说明在丛生芽伸长期,只需在培养基中添加 5 ~ 10 mg·L⁻¹ 的草甘膦,便可达到较好的筛选效果。

表 3 不同浓度草甘膦对丛生芽伸长率的影响

Table 3 Effect of glyphosate concentration on shoot elongation(%)

品种 Varieties	草甘膦浓度 Glyphosate concentration/mg·L ⁻¹				
	0	5	10	15	30
自贡冬豆 Zigongdongdou	80.6 ± 17.0A	2.0 ± 3.4B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
吉林小粒 1 号 Jilinxiaoli-1	66.7 ± 10.4A	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
中黄 30 Zhonghuang 30	22.1 ± 2.6A	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
Williams 82	96.2 ± 3.4A	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B	0.0 ± 0.0B
中作 J9331 Zhongzuo J9331	33.4 ± 29.5A	29.4 ± 21.6A	33.4 ± 22.0A	35.0 ± 24.1A	34.1 ± 22.5A
中作 J9333 Zhongzuo J9333	44.5 ± 34.4A	36.9 ± 4.3A	38.5 ± 25.9A	49.0 ± 18.8A	54.9 ± 16.6A

2.2 草甘膦在丛生芽三个时期的整体筛选策略

根据以上试验所得结果,设立了两个整体筛选试验(表 4),草甘膦在丛生芽诱导期、筛选期和伸长期的浓度分别为 60、240、5 mg·L⁻¹ 和 160、240、5 mg·L⁻¹。结果表明,丛生芽诱导期使用

60 mg·L⁻¹ 的草甘膦,与 160 mg·L⁻¹ 相比具有同样的筛选结果。而这两组浓度对中作 J9331 丛生芽没有明显的抑制作用。因此建议丛生芽诱导期、筛选期、伸长期的最适草甘膦筛选浓度分别为 60、240 和 5 mg·L⁻¹。

表 4 不同草甘膦筛选策略对丛生芽生长的影响

Table 4 Effect of different glyphosate-screening strategies on shoot growth

Genotypes	草甘膦 Glyphosate/mg·L ⁻¹	重复 1 Replicate 1/%	重复 2 Replicate 2/%	重复 3 Replicate 3/%	平均值 Average/%
自贡冬豆 Zigongdongdou	60-240-5	0	0	0	0
	160-240-5	0	0	0	0
中作 J9331 Zhongzuo J9331	60-240-5	25	60	40	42
	160-240-5	35	55	30	40

3 讨 论

在大豆遗传转化过程中,配合筛选标记基因使用筛选剂可以抑制或阻止非转化细胞的生长,从而使转化细胞获得竞争优势,进而发育成转基因植

株。在大豆子叶节转化系统中,丛生芽生长的 3 个重要阶段中筛选剂的使用量均会有所差异,如草丁膦作为筛选剂时,在丛生芽伸长期的使用量一般为诱导期的一半左右^[6,16]。在本研究中,非转基因大豆品种和抗草甘膦转基因大豆品种对比试验表明,利用草甘膦进行筛选,在组织培养条件下完全可以

将二者区分,即通过适当的筛选策略可以将非转基因材料完全杀死,而抗草甘膦转基因材料不会受到明显影响。在试验中还发现,草甘膦在丛生芽诱导期非转基因大豆品种的筛选剂量达到了丛生芽伸长期的30倍,这可能与草甘膦作用机理有关。草甘膦通过抑制植物体中5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合成酶(EPSPS)的活性,从而抑制光合作用致使植物死亡^[1]。在组织培养的丛生芽诱导期及筛选期,子叶节都带有子叶并主要依靠培养基提供的营养生长,处于异养状态,基本不需要通过光合作用获取养分,草甘膦的抑制作用也相对不明显。而在丛生芽伸长期去除子叶后,由于尚未形成根组织,丛生芽生长对光合产物的依赖相对较大,极微量的草甘膦就会使丛生芽生长完全受到抑制。实验还显示,在诱导期使用低浓度的草甘膦($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),非抗性的丛生芽在筛选期草甘膦临界浓度($240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下也不能存活,具有较好的筛选效果,建议可利用低-高-低($60\text{-}240\text{-}5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)浓度的草甘膦针对3个时期进行组合筛选。

本研究中所用材料中黄30为中作J9333的亲本之一。经对比分析发现,丛生芽诱导期 $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦可以抑制并杀死中黄30的丛生芽,但即使其浓度达到 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,仍对中作J9333无明显抑制作用;丛生芽筛选期,中黄30在 $240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦培养基中成活率为0,而此浓度对中作J9333并无明显作用。丛生芽伸长期,中黄30在草甘膦浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,丛生芽就无法伸长,而中作J9333在草甘膦浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,丛生芽伸长率也无明显变化。通过这种对遗传背景相似的材料进行对比分析,进一步证实了草甘膦作为大豆遗传转化筛选剂的可行性。

参考文献

- [1] Duke S O, Powles S B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide [J]. Pest Management Science, 2008, 64(4): 319-325.
- [2] Williams G M, Kroes R, Munro I C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, 31(2): 117-165.
- [3] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops; 2011. ISAAA Brief No. 43 [M]. NY: Ithaca, 2011.
- [4] 袁鹰, 刘德璞, 王玉民, 等. 卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究 [J]. 大豆科学, 2003(4): 261-263. (Yuan Y, Liu D P, Wang Y M, et al. Study on critical and screen soybean grow of kanamycin [J]. Soybean Science, 2003(4): 261-263.)
- [5] 韦献雅, 牛应泽, 张其坤. 3种筛选NPT-II标记转基因油菜方法研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 37-41. (Wei X Y, Niu Y Z, Zhang Q K. Study on three methods screening transgenic rapeseed tagging NPT-II [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(14): 37-41.)
- [6] Xue R H, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 373-378.
- [7] Franz J E, Mao M K, Sikorski J A. Behavior of glyphosate in soil, hydrosols, and water-methods for glyphosate analyses [J]. Glyphosate: A Unique Global Herbicide, 1997: 65-101.
- [8] Castle L A, Siehl D L, Gorton R, et al. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene [J]. Science, 2004, 304(5674): 1151-1154.
- [9] Pinel C, Landrion E, Lini H, et al. Effect of the nature of carbon catalysts on glyphosate synthesis [J]. Journal of Catalysis, 1999, 182(2): 515-519.
- [10] 邢珍娟, 李飞武, 刘娜, 等. 转EPSPS基因大豆植株中蛋白的表达 [J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 981-984. (Xing Z J, Li F W, Liu N, et al. Expression of CP4 EPSPS protein of genetically modified Roundup Ready Soybean [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 981-984.)
- [11] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant [J]. Euphytica, 2004, 136(2): 167-179.
- [12] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展 [J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701.)
- [13] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(3): 206-213.
- [14] 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(7): 478-482.
- [15] Duncan D B. Multiple range and multiple F tests [J]. Biometrics, 1955, 11(1): 1-42.
- [16] Zhang Z, Xing A, Staswick 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(1): 37-46.