



转基因耐除草剂大豆 ZH10-6 目标性状遗传稳定性分析

王 成¹,王雅偲²,李 纳³,姚俊津¹,徐石勇¹,赵 新¹,兰青阔¹,王 永¹

(1. 天津市农业科学院 生物技术研究所,天津 300381; 2. 河北农业大学 植物保护学院,河北 保定 071001; 3. 天津农学院 园艺园林学院,天津 300392)

摘 要:为评估转 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 基因耐除草剂大豆 ZH10-6 耐 30% 草甘膦水剂(孟山都,农达)目标性状在不同世代中的遗传稳定性,利用酶联免疫吸附测定法(ELISA),检测了转基因大豆 ZH10-6 不同世代($T_2 \sim T_4$)、不同生育期以及不同器官中的目标蛋白含量。同时,通过喷施不同剂量的草甘膦,考察了 3 个世代转基因大豆对目标除草剂的耐受性。结果显示:供试转基因材料均能稳定检测出目标蛋白 *G2-EPSPS* 和 *GAT*,且不同世代间的表达量基本一致。目标蛋白在叶片中表达量最高,在籽粒中最低。在喷施相同剂量的草甘膦条件下,3 个世代的转基因大豆 ZH10-6 的株高、成苗率和受害率均与非转基因对照大豆存在显著差异($P < 0.05$),且对 4 倍中剂量的目标除草剂表现出了较强的耐受性。研究结果表明 ZH10-6 的目标性状能够在后代中稳定遗传。

关键词:大豆;转基因;耐除草剂;目标性状;遗传稳定性

Genetic Stability Analysis of Target Traits in Transgenic Herbicide Tolerant Soybean ZH10-6

WANG Cheng¹, WANG Ya-si², LI Na³, YAO Jun-jin¹, XU Shi-yong¹, ZHAO Xin¹, LAN Qing-kuo¹, WANG Yong¹

(1. Biotechnology Research Institute, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300381, China; 2. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 3. College of Horticulture and Landscape Architectures, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Abstract: In order to evaluate the genetic stability of the target traits of 30% glyphosate water (Monsanto) tolerance in transgenic herbicide tolerant soybean at different generations, we used transgenic soybean ZH10-6 with *G2-EPSPS* and *GAT* genes as materials to detect the target protein content in different generations ($T_2 - T_4$), growth stages and organs of transgenic soybean by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the same time, we investigated the tolerance of three generations of transgenic soybean to the target herbicide by spraying different doses of glyphosate. The results showed that, the target proteins *G2-EPSPS* and *GAT* could be detected stably in all transgenic materials, and the expression levels were basically the same among different generations. The expression of target protein was the highest in leaves and the lowest in seeds. Under the condition of spraying the same dose of glyphosate, the plant height, seedling rate and damage rate of transgenic soybean ZH10-6 in three generations were significantly different to those of non-transgenic control soybean ($P < 0.05$), and showed strong tolerance to 4 times medium dose of target herbicide. The results showed that ZH10-6 could be stably inherited in the offspring, which provided data support for the biosafety evaluation of transgenic herbicide tolerant soybean.

Keywords: Soybean; Transgenic; Herbicide tolerance; Target traits; Genetic stability

大豆是我国的主要农作物,同时也是进口的主要农作物之一^[1]。其中,转基因大豆作为进口大豆的主体,对中国大豆产业和市场造成了重大的影响^[2]。转基因大豆的除草剂耐受性是除抗虫性和复合性状以外的主要性状^[3]。自 1996 年商业化种植转基因耐除草剂大豆以来,到 2018 年全球转基因大豆种植面积已有 9 590 万 hm^2 ,占全球转基因作物种植面积的 50%^[4,6]。对大豆田喷施目标除草剂,不仅提高了机械化作业的工作效率,同时也大大降低了生产成本。但随之而来的转基因农作物安全问题,越发引起人们的关注。因此,我国相继制定颁布了一系列法规、条例和规范性文件,指导农业

转基因植物生物安全评价工作,其中提到了对目标性状表现稳定性的测定。

外源基因在传递后代的过程中,会发生基因丢失或表达沉默的现象,仅部分能够稳定遗传^[7]。因此,对转基因植物的目标性状遗传稳定性研究具有重要意义。李冬梅等^[8]对多世代转基因大豆进行除草剂筛选及分子生物学分析,在 T_3 代大豆中检测到目标蛋白的表达,表明目的基因 *TaDREB3a* 与大豆基因组整合,并稳定遗传给后代。岳同卿等^[9]对转 *Bt cry1Ah* 基因抗虫玉米的 $T_2 \sim T_3$ 代的转基因植株进行 DNA 水平和蛋白水平检测,发现外源基因可以逐代稳定遗传,并且田间抗虫性试验也得到了相

收稿日期:2021-05-31

基金项目:国家科技重大专项(2019ZX08013-002)。

第一作者:王成(1988—),男,硕士,助理研究员,主要从事转基因生物安全评价研究。E-mail:wangcheng880625@126.com。

通讯作者:王永(1977—),男,博士,研究员,主要从事农业种质资源育种与转基因生物安全评价研究。E-mail:wytas@126.com。

同的结论。

ZH10-6 是我国自主研发的转 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 基因的耐除草剂大豆,目标除草剂为草甘膦。为评价转基因大豆 ZH10-6 目标性状的稳定性,本研究以其 3 个世代($T_2 \sim T_4$)为材料,通过对不同生育期和器官中目标蛋白进行测定,以及对目标除草剂的耐受性进行分析,评价了目标性状在时间和空间上的遗传稳定性,以期为转基因大豆 ZH10-6 的生物安全评价提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为 $T_2 \sim T_4$ 代转 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 基因耐除草剂 ZH10-6、非转基因对照为中黄 10,均由中国农业科学院作物科学研究所提供。

目标除草剂为 30% 草甘膦水剂(孟山都,农达),农药登记证号为:PD73-88。

ELISA 试剂盒为 *G2-EPSPS* 酶联免疫定量检测

试剂盒(AA1241)和 *GAT* 酶联免疫定量检测试剂盒(AA1341),均购自上海佑隆生物科技有限公司。

1.2 试验地概况

试验于 2019 年 6—10 月在农业农村部农产品及加工品质量监督检验测试中心(天津)转基因试验基地进行,基地位于天津市现代农业科技创新基地院内($39^{\circ}25'40.65''N,116^{\circ}56'42.50''E$)。试验地四周建有 2.8 m 高的隔离围墙,周围 300 m 范围内无农田大豆种植。整个试验期间有专人负责监管。

1.3 试验设计

1.3.1 目标蛋白含量检测 分别对 3 个世代转基因大豆和非转基因对照大豆的不同生长时期的植株组织进行取样,不同组织可从同一植株上获取,实际检测样品数为 4 个转基因和 1 个非转基因样品,叶片/茎秆/根混样后取约 200 g,籽粒取样方法为剥下整个植株的所有籽粒,然后随机抽取 200 ~ 300 粒(表 1)。取样后 5 min 内放置在干冰上,先低温保存或直接运至实验室。所有样品 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 用于 ELISA 检测的大豆组织取样设计
Table 1 The soybean tissue samples for ELISA detection

| 生育时期 Growth stage | 组织类型 Histological type | 样品描述 Sample description | 转基因取样植株数 Number of transgenic plants | 非转基因取样植株数 Number of non-transgenic plants |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|---|--|
| 子叶期 VC | 叶片 | 同一植株上的全部叶片 | 5 | 2 |
| | 根 | 同一植株土壤中的全部根系 | 5 | 2 |
| 三叶期 V3 | 叶片 | 同一植株上的全部叶片 | 5 | 2 |
| | 茎秆 | 同一植株上的主茎 | 5 | 2 |
| | 根 | 同一植株土壤中的全部根系 | 5 | 2 |
| 盛花期 R2 | 叶片 | 同一植株上的全部叶片 | 5 | 2 |
| | 茎秆 | 同一植株上的主茎 | 5 | 2 |
| | 根 | 同一植株土壤中的全部根系 | 5 | 2 |
| | 花 | 同一植株上的全部开放的花 | 5 | 2 |
| 鼓粒满期 R6 | 叶片 | 同一植株上的全部叶片 | 5 | 2 |
| | 茎秆 | 同一植株上的主茎 | 5 | 2 |
| | 根 | 同一植株土壤中的全部根系 | 5 | 2 |
| | 籽粒 | 同一植株主穗上的籽粒 50 ~ 100 粒 | 5 | 2 |
| 完熟期 R8 | 籽粒 | 同一植株主穗上的籽粒 50 ~ 100 粒 | 5 | 2 |

1.3.2 目标除草剂耐受性评价 采用随机区组设计,4 次重复。小区间设有 1 m 宽隔离带,小区净面积不小于 20 m²,设置 4 个处理:ZH10-6 喷施清水;ZH10-6 喷施草甘膦;中黄 10 喷施清水;中黄 10 喷施草甘膦。草甘膦施用剂量分为:农药登记推荐剂量的中剂量(900 g ai·hm⁻²)、中剂量的 2 倍量(1 800 g ai·hm⁻²)、中剂量的 4 倍量(3 600 g ai·hm⁻²)。于大豆生长至 3 叶期茎叶喷施草甘膦,调查各处理

草甘膦耐受性。

1.4 方法

1.4.1 目标蛋白检测样品的处理 称取磨碎及冻干后的大豆组织样品 50 ~ 100 mg。将叶片、根、茎秆、花和籽粒样品放入 2.0 mL 离心管,每 100 mg 样品加入 1 mL 蛋白提取缓冲液,振荡混匀 5 min。将样品在 4 ℃,4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 3 min,取上清液。

1.4.2 目标蛋白含量检测 使用 ELISA 试剂盒,利用 Multiskan Sky 酶标仪测定目标蛋白 G2-EPSPS 和 GAT 在 450 nm 的 OD 值。绘制标准曲线,分别计算出各样品的目标蛋白浓度。

1.4.3 草甘膦耐受性测定 根据 GB/T 17980.125 的要求,分别在用药后 7,14 和 28 d 调查和记录大豆成活率,用药后 14 和 28 d 调查和记录大豆株高(随机选取 10 株)和药害症状(随机选取 10 株)。药害症状分级标准为:0 级:无药害,与清水对照生长一致;1 级:微见药害症状,局部颜色变化,药害斑点占叶面积 10% 以下,恢复快,对生长发育无影响;2 级:轻度抑制生长或失绿,药害斑点占叶面积 1/4 以下,能恢复,推测减产率 0% ~ 5%;3 级:对生长发育影响较大,叶畸形或植株矮化或药害斑点占叶面积 1/2 以下,恢复慢,推测减产 6% ~ 15%;4 级:对生长发育影响大,叶严重畸形或植株明显矮化或叶枯斑 3/4,难以恢复,推测减产 16% ~ 30%;5 级:药害极重,植株死亡。除草剂受害率计算公式如下:

$$X(\%) = \frac{\sum (N \times S)}{T \times M} \times 100$$

其中: X 为受害率; N 为同级受害株数; S 为级别数; T 为总株数; M 为最高级别。

1.5 数据分析

通过 DPS v18.10 进行数据的统计计算,获得不同样品中目标蛋白的含量平均值和标准差,进行目标蛋白含量分析;通过方差分析比较不同处理的转基因大豆及非转基因大豆在成活率和受害率方面的差异,分析转基因大豆对目标除草剂草甘膦的耐受水平。

2 结果与分析

2.1 多世代转基因大豆目标蛋白的时空表达分析
2.1.1 各生育期表达情况分析 对不同生育时期大豆组织器官中的 G2-EPSPS 和 GAT 目标蛋白的测定结果显示,在所选 5 个生育期中,3 个世代转基因大豆中均可稳定检测出 G2-EPSPS 蛋白和 GAT 蛋白。在 VC 期,G2-EPSPS 和 GAT 蛋白在叶片中的含量约为根组织的 2 ~ 4 倍。在 V3 期,G2-EPSPS 和 GAT 蛋白在不同组织中的表达趋势基本一致,即叶片 > 根 > 茎。在 R2 期,叶片中的目标蛋白含量虽然有所下降,但仍高于其它器官,G2-EPSPS 蛋白在根和茎中表达量相近,仅次于叶片,花中最低;GAT 蛋白在茎秆中的含量最低。进入 R6 期,G2-EPSPS 和 GAT 蛋白的表达趋势与 V3 期相似。R6 期和 R8 期籽粒中仅检测出较低含量的目标蛋白(表 2)。

表 2 目标蛋白时空表达结果
Table 2 The results of spatiotemporal expression of objective protein 单位: $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

| 目标蛋白 Interest protein | 世代 Generation | 组织 Organization | 取样时期 Sampling stage | | | | |
|--------------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | VC | V3 | R2 | R6 | R8 |
| G2-EPSPS | T ₂ | 叶片 | 0.456 ± 0.029 | 0.334 ± 0.008 | 0.186 ± 0.003 | 0.193 ± 0.014 | N/A |
| | | 根 | 0.160 ± 0.014 | 0.059 ± 0.001 | 0.023 ± 0.002 | 0.018 ± 0.003 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.013 ± 0.002 | 0.025 ± 0.001 | 0.004 ± 0.000 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.007 ± 0.001 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.014 ± 0.001 | 0.016 ± 0.001 |
| | T ₃ | 叶片 | 0.417 ± 0.012 | 0.314 ± 0.002 | 0.203 ± 0.008 | 0.214 ± 0.000 | N/A |
| | | 根 | 0.156 ± 0.003 | 0.053 ± 0.005 | 0.018 ± 0.006 | 0.027 ± 0.003 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.008 ± 0.001 | 0.034 ± 0.004 | 0.019 ± 0.002 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.009 ± 0.002 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.012 ± 0.003 | 0.015 ± 0.003 |
| | T ₄ | 叶片 | 0.539 ± 0.002 | 0.301 ± 0.001 | 0.210 ± 0.033 | 0.203 ± 0.004 | N/A |
| | | 根 | 0.154 ± 0.006 | 0.037 ± 0.005 | 0.020 ± 0.004 | 0.025 ± 0.002 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.016 ± 0.001 | 0.017 ± 0.005 | 0.016 ± 0.001 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.012 ± 0.002 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.010 ± 0.003 | 0.012 ± 0.004 |

续表 2

| 目标蛋白 Interest protein | 世代 Generation | 组织 Organization | 取样时期 Sampling stage | | | | |
|--------------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | VC | V3 | R2 | R6 | R8 |
| GAT | T ₂ | 叶片 | 0.174 ± 0.001 | 0.135 ± 0.004 | 0.136 ± 0.017 | 0.071 ± 0.007 | N/A |
| | | 根 | 0.039 ± 0.019 | 0.078 ± 0.001 | 0.047 ± 0.001 | 0.023 ± 0.002 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.018 ± 0.002 | 0.013 ± 0.003 | 0.011 ± 0.001 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.062 ± 0.01 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.002 ± 0.001 | 0.003 ± 0.001 |
| | T ₃ | 叶片 | 0.163 ± 0.017 | 0.126 ± 0.007 | 0.118 ± 0.015 | 0.068 ± 0.001 | N/A |
| | | 根 | 0.059 ± 0.002 | 0.055 ± 0.009 | 0.073 ± 0.021 | 0.049 ± 0.027 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.046 ± 0.008 | 0.024 ± 0.019 | 0.017 ± 0.002 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.083 ± 0.002 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.003 ± 0.000 | 0.002 ± 0.001 |
| | T ₄ | 叶片 | 0.151 ± 0.016 | 0.139 ± 0.015 | 0.103 ± 0.017 | 0.085 ± 0.001 | N/A |
| | | 根 | 0.068 ± 0.002 | 0.073 ± 0.007 | 0.023 ± 0.004 | 0.049 ± 0.006 | N/A |
| | | 茎 | N/A | 0.024 ± 0.002 | 0.017 ± 0.001 | 0.013 ± 0.009 | N/A |
| | | 花 | N/A | N/A | 0.084 ± 0.005 | N/A | N/A |
| | | 籽粒 | N/A | N/A | N/A | 0.007 ± 0.002 | 0.006 ± 0.001 |

2.1.2 各组织器官表达情况分析 对大豆 5 个生育时期不同组织器官中的 G2-EPSPS 和 GAT 目标蛋白的测定结果显示, 3 个世代转基因大豆的不同组织器官中, 均可稳定检测到目标蛋白 G2-EPSPS 和 GAT。在叶片中, G2-EPSPS 和 GAT 蛋白的含量均随大豆的生长呈下降趋势, 其中 G2-EPSPS 蛋白在 R2 和 R6 期含量相近, 范围在 0.186 ~ 0.214 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; GAT 蛋白在 V3 和 R2 期含量相近, 范围在 0.103 ~ 0.139 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在根组织中, G2-EPSPS 蛋白的表达规律与其在叶片中基本一致, 而 GAT 蛋白在不同生育期的表达情况无规律可循。在茎秆中, G2-EPSPS 蛋白的含量呈先升后降的规律, 在 R2 期表达量到达最高; GAT 蛋白在 V3 期的表达量最高, 随后逐渐下降。花器官中, GAT 蛋白的表达量明显高于 G2-EPSPS 蛋白, 含量分别为 0.062 ~ 0.084 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、

0.007 ~ 0.012 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在籽粒中, 两种目标蛋白的含量均较低(表 2)。

2.2 不同世代转基因大豆对目标除草剂的耐受性

2.2.1 喷施草甘膦后的成苗率分析 如表 3 所示, 在喷施相同剂量的草甘膦条件下, 3 个世代的转基因大豆 ZH10-6 的成苗率均显著高于非转基因大豆 ($P < 0.05$)。非转基因大豆喷施中剂量草甘膦 7 d 后, 成苗率仅为 14.48% ~ 16.25%; 喷施 14 d 后, 植株全部死亡; 喷施 2 倍中剂量和 4 倍中剂量草甘膦 7 d 后, 植株全部死亡。喷施中剂量、2 倍中剂量和 4 倍中剂量草甘膦后, 转基因大豆材料在 28 d 内均无药害, 与清水对照生长一致, 成苗率为 100.00%。可见, 3 个世代的转基因大豆 ZH10-6 均可耐受 4 倍中剂量的目标除草剂。

表 3 喷施不同剂量草甘膦的大豆成苗率比较

| Table 3 The comparison of seedling formation rate of soybean sprayed with different doses of glyphosate 单位: % | | | | | |
|---|----------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 世代 Generation | 材料 Material | 处理 Treatment | 成苗率 Seedling rate | | |
| | | | 施药后 7 d 7 days after application | 施药后 14 d 14 days after application | 施药后 28 d 28 days after application |
| | | | | | |
| T ₂ | ZH10-6 | 清水 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | 中黄 10 | 清水 | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 中剂量 | 16.25 ± 2.50 b | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 2 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |

续表 3

| 世代 Generation | 材料 Material | 处理 Treatment | 成苗率 Seedling rate | | |
|------------------|----------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | 施药后 7 d | 施药后 14 d | 施药后 28 d |
| | | | 7 days after application | 14 days after application | 28 days after application |
| T ₃ | ZH10-6 | 4 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 清水 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| T ₄ | 中黄 10 | 清水 | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 中剂量 | 15.15 ± 0.79 b | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 2 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 4 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 清水 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | ZH10-6 | 中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| | | 清水 | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 中剂量 | 14.48 ± 2.67 b | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | 中黄 10 | 2 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 4 倍中剂量 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 清水 | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 中剂量 | 14.48 ± 2.67 b | 0.00 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 b |

不同小写字母表示各处理的成苗率在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。下同。

The different lowercase indicate the significant difference of seedling rate of each treatment at the level of $P < 0.05$. The same below.

2.2.2 喷施草甘膦大豆株高和受害率分析 对供试的 3 个世代供试材料株高的调查显示,喷施与未喷施草甘膦的转基因大豆之间,株高无显著性差异 ($P > 0.05$),植株均能正常生长,无受害情况发生。非转基因大豆,在喷施不同剂量草甘膦 14 d 后,植

株均死亡,受害率达到 100.00%,与喷施草甘膦的转基因大豆相比,存在显著性差异 ($P < 0.05$,表 4)。由此可见,耐除草剂基因 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 可在转基因大豆 ZH10-6 的 3 个世代中稳定遗传,并编码表达目标蛋白。

表 4 喷施不同剂量草甘膦的大豆株高和受害率比较

Table 4 The comparison of plant height and damage rate of soybean sprayed with different doses of glyphosate

| 世代 Generation | 材料 Material | 处理 Treatment | 施药后 14 d | | 施药后 28 d | |
|------------------|----------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | | 14 days after application | | 28 days after application | |
| | | | 株高 Plant height/cm | 受害率 Victimization rate/% | 株高 Plant height/cm | 受害率 Victimization rate/% |
| T ₂ | ZH10-6 | 清水 | 55.41 ± 1.10 a | 0.00 | 83.96 ± 1.79 a | 0.00 |
| | | 中剂量 | 55.45 ± 0.94 a | 0.00 | 83.35 ± 1.99 a | 0.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 55.29 ± 0.89 a | 0.00 | 83.93 ± 1.90 a | 0.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 55.60 ± 0.54 a | 0.00 | 83.89 ± 1.42 a | 0.00 |
| | 中黄 10 | 清水 | 55.29 ± 0.88 | 0.00 ± 0.00 b | 82.83 ± 1.29 | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 2 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 4 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | ZH10-6 | 清水 | 53.54 ± 0.05 a | 0.00 | 82.57 ± 0.07 a | 0.00 |
| | | 中剂量 | 53.49 ± 0.04 a | 0.00 | 82.60 ± 0.08 a | 0.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 53.61 ± 0.07 a | 0.00 | 82.57 ± 0.09 a | 0.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 53.56 ± 0.07 a | 0.00 | 82.54 ± 0.13 a | 0.00 |

续表 4

| 世代 Generation | 材料 Material | 处理 Treatment | 施药后 14 d 14 days after application | | 施药后 28 d 28 days after application | |
|------------------|----------------|-----------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|
| | | | 株高 | 受害率 | 株高 | 受害率 |
| | | | Plant height/cm | Victimization rate/% | Plant height/cm | Victimization rate/% |
| T ₄ | 中黄 10 | 清水 | 53.51 ± 0.13 | 0.00 ± 0.00 b | 82.58 ± 0.05 | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 2 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 4 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | ZH10-6 | 清水 | 53.97 ± 0.13 a | 0.00 | 82.41 ± 0.22 a | 0.00 |
| | | 中剂量 | 53.88 ± 0.09 a | 0.00 | 82.38 ± 0.08 a | 0.00 |
| | | 2 倍中剂量 | 53.97 ± 0.08 a | 0.00 | 82.50 ± 0.13 a | 0.00 |
| | | 4 倍中剂量 | 53.95 ± 0.22 a | 0.00 | 82.49 ± 0.07 a | 0.00 |
| | 中黄 10 | 清水 | 53.95 ± 0.07 | 0.00 ± 0.00 b | 82.29 ± 0.32 | 0.00 ± 0.00 b |
| | | 中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 2 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |
| | | 4 倍中剂量 | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a | 植株死亡 | 100.00 ± 0.00 a |

3 讨 论

转基因作物目标性状的遗传稳定性对于其产业化发展具有重要意义。郭兵福等^[10]在研究共表达 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 基因增强转基因大豆植株对草甘膦耐受性时发现,草甘膦抗性基因 *G2-EPSPS* 和降解基因 *GAT* 在 DNA、RNA 和蛋白水平表达稳定且能稳定遗传。邢珍娟等^[11]的研究结果表明,转基因耐除草剂大豆在不同时期、不同组织中的目标蛋白表达存在差异。随着大豆的生长,各组织中 CP4 EPSPS 蛋白的含量变化明显,不同组织在同一时期的 CP4 EPSPS 蛋白含量也不尽不同。于惠林等^[12]在得到了相同结论的同时,也提出了草甘膦的喷施不影响 EPSPS 蛋白表达。翁嘉慧等^[13]分别从转化体 DNA 水平、转录水平和翻译水平,以及转化体对草甘膦的耐受性等方面,对目的基因 *AM79-EPSPS* 的遗传稳定性进行了分析并得到目的基因 *AM79-EPSPS* 在不同世代、不同组织的转录和翻译水平均稳定表达,且转化体对目标除草剂的耐受性也在世代间保持稳定的结论。转基因作物中外源基因的表达受到很多因素的影响,如湿度、温度、非生物胁迫等^[14-17]。本研究虽然所用转化体与前人不同,但在 T₂ ~ T₄代转基因大豆的 5 个生育期和 5 个器官中,均检测出了目标蛋白 G2-EPSPS 和 GAT 的表达,结果与前人一致。

邹俊杰等^[18]在对转基因复合抗虫耐除草剂玉米 BFL4-1 进行了转录水平和蛋白水平检测后,通过

田间玉米螟接虫和喷施草甘膦试验,验证了转化体的功能。除此之外,杨秋姣等^[19]还对转基因大豆的农艺性状进行了调查,发现转基因株系在产量性状、形态性状和品质性状方面均不劣于受体品种,表明外源基因的插入和遗传不会对农艺性状产生明显影响。本研究从转基因植物生物安全评价的角度出发,分析了 3 个世代转基因材料对不同剂量除草剂的耐受性,在区别于前人研究的同时,也验证了实验室 ELISA 试验的结果,使本研究的结果更加严谨、可靠,为转基因耐除草剂大豆的生物安全评价提供有力数据支持。

4 结 论

本研究在实验室测定转基因大豆目标蛋白的表达量,并在田间喷施不同剂量目标除草剂,比较不同世代转基因大豆 ZH10-6 在不同生育期和器官中,G2-EPSPS 和 GAT 蛋白的表达情况,有效评价了目标性状的遗传稳定性。在 3 个世代的转基因材料中,各生育期和器官中均能检出目标蛋白,且世代间的表达规律基本一致。同时,T₂ ~ T₄代 ZH10-6 均保持了对 30% 草甘膦水剂(孟山都,农达)的耐受性。该结果可为耐除草剂转基因大豆 ZH10-6 产业化及其后续监管提供技术支撑。

参考文献

[1] 赵小龙,王溶花,姚金成,等. 我国大豆进口贸易现状及问题分析[J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(12): 21-22, 61. (Zhao X L, Wang R H, Yao J C, et al. Current situation and problems

of soybean import trade in China [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2020, 45(12): 21-22, 61.)

[2] 吴曰程, 王玉斌. 中国转基因大豆进口及其影响分析[J]. 大豆科学, 2019, 38(4): 635-643. (Wu Y C, Wang Y B. The effect of China's GM soybean imports [J]. Soybean Science, 2019, 38(4): 635-643.)

[3] Arujanan. ISAAA in 2019 accomplishment report[R]. Nairobi: ISAAA, 2019: 1-37.

[4] 杨树果. 全球转基因作物发展演变与趋势[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(9): 13-26. (Yang S G. Evolution and developing trend of global biotech/GM crops[J]. Journal of China Agriculture University, 2020, 25(9): 13-26.)

[5] 于滔, 曹士亮, 张建国, 等. 全球转基因作物商业化种植概况 (1996—2018 年)[J]. 中国种业, 2020(1): 13-16. (Yu T, Jia S L, Zhang J G, et al. Overview of global commercial planting of genetically modified crops (1996-2018) [J]. China Seed Industry, 2020(1): 13-16.)

[6] Clive J. Global status of commercialized biotech/GM crops 2018; Biotech crop continue to help meet the challenges of increased population and climate change [M]. New York: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2018.

[7] 王少峡, 王振英, 彭永康. DREB 转录因子及其在植物抗逆中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 7-13. (Wang S X, Wang Z Y, Peng Y K. Dehydration Responsive Element Binding (DREB) transcription activator and its function in plant tolerance to environmental stresses[J]. Plant Physiology Journal, 2004, 40(1): 7-13.)

[8] 李冬梅, 李悦, 李永光, 等. 转 *TaDREB3a* 基因大豆材料抗旱性鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(10): 12-22. (Li D M, Li Y, Li Y G, et al. Identification of drought resistance of transgenic *TaDREB3a* soybean materials [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 50(10): 12-22.)

[9] 岳同卿, 郎志宏, 王延锋, 等. 转 *Bt cry1Ah* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 638-644. (Yue T Q, Lang Z H, Wang Y F, et al. Acquirement of the transgenic maize harboring *Bt cry1Ah* gene and analysis of its inheritable stability [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4): 638-644.)

[10] 郭兵福, 郭勇, 洪慧龙, 等. 共表达 *G2-EPSPS* 和 *GAT* 基因增强转基因大豆植株对草甘膦耐受性[J]. 大豆科技, 2020, 37(2): 37-38. (Guo B F, Guo Y, Liang H L, et al. Co-expression of *G2EPSPS* and *GAT* genes enhanced glyphosate tolerance in transgenic soybean plants[J]. Soybean Science & Technology, 2020, 37(2): 37-38.)

[11] 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, 989. (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, 989.)

[12] 于惠林, 杨鑫浩, 肖娅风, 等. EPSPS 蛋白在转基因耐草甘膦大豆植株中的表达量测定[C]. 长沙: 第十一届全国杂草科学大会论文摘要集, 2013. (Yu H L, Yang X H, Xiao Y F, et al. Expression of EPSPS protein in transgenic glyphosate tolerant soybean plants [C]. Changsha: Abstracts of proceedings of the Eleventh National Weed Science Conference, 2013.)

[13] 翁嘉慧, 楼亿圆, 徐京, 等. 转 *AM79-EPSPS* 基因抗草甘膦大豆遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(9): 1550-1559. (Weng J H, Lou Y Y, Xu J, et al. Genetic stability analysis of transgenic *AM79-EPSPS* glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(9): 1550-1559.)

[14] 王永慧. 温湿度逆境、棉铃大小和生长物质对 *Bt* 棉 *Bt* 蛋白表达量的影响及其生理机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2010. (Wang Y H. Effects of combination of temperature and humidity, boll size, growth substances on *Bt* protein expression and metabolism for *Bt* cotton [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.)

[15] 张桂玲, 温四民. 盐胁迫对转 *Bt* 基因棉苗期 *Bt* 蛋白表达量和氮代谢的影响[J]. 西北农业学报, 2011, 20(6): 106-109. (Zhang G L, Wen S M. Effects of salt stress on *Bt* protein content and nitrogen metabolism of transgenic *Bt* cotton [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(6): 106-109.)

[16] 陈源, 韩勇, 花明明, 等. 低温和湿度胁迫对盛铃期 *Bt* 棉叶片 *Bt* 蛋白表达量的影响[J]. 棉花学报, 2014, 26(4): 29. (Chen Y, Han Y, Hua M M, et al. Effect of stresses of low temperature and different relative humidity on the *Bt* protein content in leaves at the bolling stage in *Bt* cotton [J]. Cotton Science, 2014, 26(4): 29.)

[17] 黄鹂, 郭汝清, 刘标. 杂草环境下转 *EPSPS* 基因大豆 NZL06-698 的生态适应性研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(6): 866-871. (Huang Y, Guo R Q, Liu B. Ecological adaptability of glyphosate-resistant transgenic soybean NZL06-698 in weed environment [J]. Soybean Science, 2017, 36(6): 866-871.)

[18] 邹俊杰, 徐妙云, 张兰, 等. 转基因复合抗虫耐除草剂玉米 BFL4-1 的分子特征及功能评价[J/OL]. 中国农业科技导报: 1-7 [2021-09-27]. <http://doi.org/10.13304/j.nykjdb.2020.0111>. (Zou J J, Xu M Y, Zhang L, et al. Molecular characteristics and functional evaluation of transgenic maize BFL4-1 with stacked insect and herbicide resistance traits [J/OL]. Journal of Agricultural Science and Technology: 1-7 [2021-09-27]. <http://doi.org/10.13304/j.nykjdb.2020.0111>.)

[19] 杨秋姣, 孙晓丽, 孙明哲, 等. 转 *cry6Aa2m* 基因大豆遗传稳定性分析及农艺性状调查[J]. 大豆科学, 2014, 33(5): 629-633. (Yang Q J, Sun X L, Sun M Z, et al. Genetic stability analysis and agronomic traits investigation of *cry6Aa2m* transgenic *Glycine max* [J]. Soybean Science, 2014, 33(5): 629-633.)