

对引进的美国大豆品种进行转基因成分的检测^{*}

宋 扬 吴存祥 侯文胜 韩天富^{**}

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要 利用田间表型鉴定和PCR检测相结合的方法,对从美国引进的46个大豆品种进行了转基因成分的检测。实验过程中,首先通过喷洒草甘膦对待测材料进行表型鉴定,然后通过PCR分子检测分析CaMV35S启动子和NOS终止子的有无,初步判定引进材料是否为转基因大豆,最后对目的基因CP4-EPSPS进行检测,进一步确定所测材料是否为抗草甘膦转基因大豆。大豆本身的凝集素基因作为PCR检测的内置检测标准,有效排除了由于DNA质量、实验操作等因素对检测结果的影响。结果表明,在所检测的46个引进品种中,5个是抗草甘膦转基因品种,41个是非转基因品种,它们可作为我国大豆新品种选育的亲本材料。

关键词 转基因大豆;草甘膦;PCR;CP4-EPSPS

中图分类号 S 565.101 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)02-0116-05

自1994年美国孟山都(Monsanto)公司研制的抗除草剂转基因大豆品种获准推广以来,转基因大豆的种植面积不断扩大^[1, 2]。2003年,美国种植了2400多万公顷转基因大豆(其中2200万公顷为抗除草剂转基因大豆),占其大豆总面积的81%。阿根廷种植的转基因大豆更是接近其大豆种植面积的100%。目前,转基因大豆的播种面积已占世界大豆总面积的一半以上,并有进一步扩大的趋势^[3-5]。

随着我国农产品市场的不断开放,国外的转基因大豆大量涌入我国^[6, 7],从国外引进的大豆品种也很可能是转基因材料。因此,完善转基因大豆的检测方法不仅对保护我国消费者的知情权和生态环境非常必要,而且对我国大豆育种特别是转基因大豆的研究和利用具有重要意义^[8, 9]。

在过去的10余年中,美国在大豆育种领域取得了新的进展。美国大豆品种具有高产、高油、抗倒等优良特性,可供我国大豆育种者利用。因此,及时引进美国大豆品种作为我国大豆育种的亲本,可拓宽我国大豆品种的遗传基础,提高大豆育种的水平。本研究旨在通过田间鉴定和PCR技术相结合的方法,对近年引进的美国大豆品种进行转基因成分检测,以期为我国大豆育种者提供不含转基因成分的亲本材料,同时,为实现对进口转基因大豆的高效、

可靠检测提供技术支持。

国内外学者对作物转基因成分的检测方法已进行了不少研究^[10-14]。本研究采用田间表型鉴定和PCR检测相结合的方法,对近年从美国引进的大豆新品种进行了转基因成分的检测。实验过程中把大豆自身的凝集素基因作为内置检测标准,排除了由于DNA质量、实验操作等因素对PCR检测结果的影响^[15-17],这不但可以为转基因大豆的快速鉴定提供可靠方法,而且可以用于引种材料的转基因背景分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

供试的美国大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]品种名称见表1。其中,41份为美国近10余年来育成的新品种(伊利诺大学Randall Nelson博士提供),其余5个可能为转基因品种(H6686RR、RT560RR、H6255RR、RT557RR和RT512RR,由邱丽娟博士提供)。研究中以非转基因大豆品种绥

^{*} 收稿日期:2004-12-06

基金项目:农业部“948”项目、北京市自然科学基金(5042019)和国家重点基础研究发展计划(2002CB111301)

作者简介:宋扬(1981-),女,在读硕士研究生,从事植物生物技术研究。

^{**} 通讯作者: Tel: 010-68918784; E-mail: hantf@mail.caas.net.cn

农 14 为阴性对照, 转基因大豆品种 Ag4501^[10-14] 为 阳性对照, 所有供试品种在本所网室隔离种植。

表 1 供试美国大豆品种清单

Table 1 List of soybean varieties introduced from U. S. A.

品系名称	熟期组	品系名称	熟期组	品系名称	熟期组	品系名称	熟期组
Line	Maturity group	Line	Maturity group	Line	Maturity group	Line	Maturity group
Dak soy	0	NE 3297	III	Tiffin	II	U A RK - 5896	V
Sargent	0	NE 3399	III	Apollo	II	T N 5 - 95	V
Walsh	0	Rend	IV	HF93 - 083	II	Delsoy 5710	V
Jim	0	Omaha	IV	Savoy	II	Fowler	V
MN 0301	0	HS93 - 4118	IV	Olympus	II	Clifford	V
MN 0901	0	Ina	IV	Darby	III	Anand	V
Surge	0	TN4 - 94	IV	Athow	III	H 6686 RR	-
Titan	I	Troll	IV	Kottman	III	RT 560RR	-
MN 1302	I	Strong	IV	Pana	III	H 6255 RR	-
MN 1801	I	Pace	V	Stout	III	RT 557RR	-
NE 1900	I	Accomac	V	NE 3400	III	RT 512RR	-
Stride	I	TN93 - 99	V				

1. 1. 2 引物

根据已知转基因大豆品种基因组中特有基因组件成分的序列^[13, 14], 分别针对 CaM V35S 启动子、NOS 终止子、CP4 - EPSPS 基因和大豆内源凝集素基因(lectin)合成了相应的特异引物(表 2)。

1. 2 方法

1. 2. 1 非抗草甘膦大豆致死浓度的筛选

分别将绥农 14 和 Ag4501 种在 65cm×45cm 的种子箱内, 种子密度为 20 粒/行×7 行/箱。出苗 14d 后对其进行不同浓度的草甘膦喷洒处理, 处理浓度分别为有效成分 0kg/hm² (CK)、0. 8、1. 0、1. 2、1. 4、1. 6 和 1. 8kg/hm²。处理 4d 后, 对其进行表型鉴定。

1. 2. 2 对实验材料的处理和表型鉴定

将待检测的 46 个引种材料和绥农 14 及 Ag4501 分别种在直径为 26cm 的花盆中, 出苗 14d

后, 用得出的致死浓度进行喷洒处理, 处理 4d 后, 进行表型鉴定。

1. 2. 3 总 DNA 提取

称取约 30mg 幼嫩叶片, 参照吕山花等^[15]的方法提取大豆总 DNA。

1. 2. 4 PCR 检测

抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测均采用相同的 PCR 反应体系, 总反应体积 25ul, 包括 16. 7ul ddH₂O, 2. 5ul 10×buffer(含 Mg²⁺), 1. 6ul 2. 5mM dNTPs, 2×0. 625ul 10uM 检测 Primer, 2×0. 375ul 10uM lectin Primer, 0. 2ul 5U Taq 酶, 2. 0ul 基因组 DNA(30 - 60ng)。反应程序为: 95℃预变性 5min 后进行 40 个热循环, 每循环 94℃变性 1min, 退火 30s, 72℃延伸 1min, 循环结束后 72℃延伸 5min。扩增 CaM V35S 启动子、NOS 终止子、CP4 - EPSPS 基因的退火温度分别为 59℃、56℃和 58℃。检测时,

表 2 引物序列和扩增片段大小

Table 2 Primer DNA sequences and the length of PCR products

检测对象	引物名称	产物长度	引物序列
Detect target	Primer name	Length of PCR product	Primer DNA sequence
CaM V35S 启动子	35S - 1	165bp	5'TCA TCC CTT ACG TCA GTG GAG3'
	35S - 2		5'CCA TCA TTG CGA TAA AGG AAA3'
NOS 终止子	NOS - 1	180bp	5GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG3'
	NOS - 2		5'TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA3'
CP4 - EPSPS 基因	CP4 - EPSPS - 1	146bp	5GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC3'
	CP4 - EPSPS - 2		5'CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC3'
凝集素基因	Lectin - 1	436bp	5'CTT CGC CGC TTC CTT CAA C3'
	Lectin - 2		5GAG TCC CGT GGC AGC AGA G3'

均以绥农 14 为阴性对照、Ag4501 为阳性对照、ddH₂O 为空白对照。

1.2.5 PCR 检测结果与材料表型鉴定的比较

将 PCR 检测结果与草甘膦喷洒处理后材料的表型进行比较, 确定田间抗性检测与 PCR 检测的一致性。

2 结果与分析

2.1 非抗草甘膦大豆的致死浓度

草甘膦喷洒处理 4d 后, 经表型鉴定发现, 不同的草甘膦浓度处理对阳性对照 (Ag4501) 均无影响, 而随草甘膦浓度的增大, 阴性对照 (绥农 14) 受害反应越来越明显, 其表型反应对比如图 1。草甘膦浓度等于或大于 1.0 kg/hm² 时, 阴性对照叶片枯黄, 叶边缘卷曲, 生长点坏死, 植株死亡, 可以确定 1.0 kg/hm² 为非抗草甘膦大豆的致死浓度。

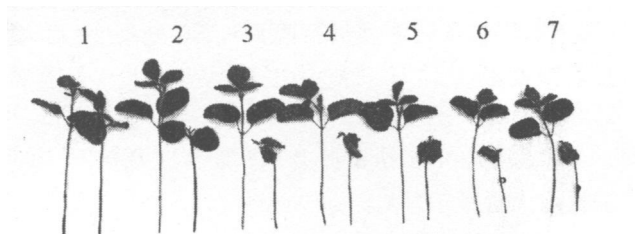


图 1 大豆对不同浓度草甘膦处理的反应

Fig. 1 The reaction of soybean lines to glyphosate.

草甘膦浓度 (glyphosate concentration): 1: 0 kg/hm²; 2: 0.8 kg/hm²; 3: 1.0 kg/hm²; 4: 1.2 kg/hm²; 5: 1.4 kg/hm²; 6: 1.6 kg/hm²; 7: 1.8 kg/hm².

每组左侧植株为阳性对照 (Ag4501), 右侧植株为阴性对照 (绥农 14)。

In each group the nearside plant is the positive control (Ag4501) and the starboard plant is the negative control (Suinong 14).

2.2 供试材料的田间表型

处理 4d 后, 阳性对照 (Ag4501) 及 5 个可能的转基因品系 H6686RR、RT560RR、H6255RR、RT557RR 和 RT512RR 对于 1.0 kg/hm² 的草甘膦未产生受害反应。而阴性对照 (绥农 14) 和 41 个尚待检测的引进材料均对草甘膦呈现受害反应。说明该检测浓度在田间检测中也是有效的, 初步判断在 H6686RR、RT560RR、H6255RR、RT557RR 和 RT512RR 中可能含有草甘膦抗性基因, 而其它 41 个引进材料中可能不含该基因成分。

2.3 PCR 检测结果

进一步的 PCR 检测发现, H6686RR、

RT560RR、H6255RR、RT557RR、RT512RR 针对 CaMV35S 启动子的 PCR 扩增产物约为 160bp、NOS 终止子的 PCR 扩增产物约为 180bp、CP4-EPSPS 基因的 PCR 扩增产物约为 150bp (图 2), 与研究设计相符。说明这 5 个材料为抗草甘膦转基因大豆。

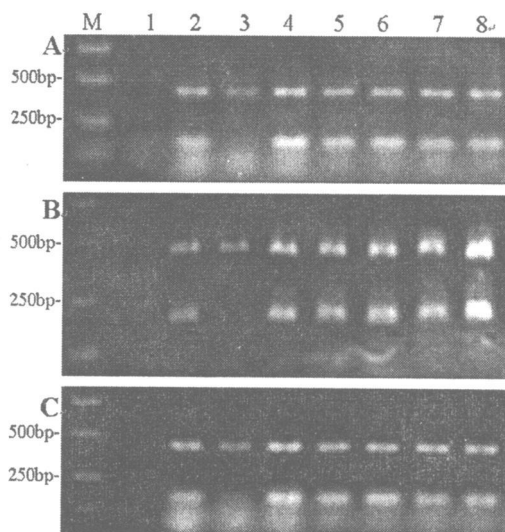


图 2 疑似转基因大豆外源基因和凝集素基因的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR analysis of foreign gene and lectin gene in possible transgenic soybeans

A: CaMV35S 启动子和凝集素基因的 PCR 检测结果

PCR analysis of CaMV35S promoter and lectin gene.

B: NOS 终止子和凝集素基因的 PCR 检测结果

PCR analysis of NOS terminator and lectin gene.

C: CP4-EPSPS 基因和凝集素基因的 PCR 检测结果

PCR analysis of CP4-EPSPS and lectin genes

M: Marker; 1: ddH₂O; 2: Ag4501 (positive control); 3: Suinong 14 (negative control); 4: H6686RR; 5: RT560RR; 6: H6255RR; 7: RT557RR; 8: RT512RR.

另外 41 个待测引进品种对 CP4-EPSPS 基因的 PCR 检测结果均呈阴性 (图 3)。其中, 内置标准凝集素基因的 PCR 扩增产物约为 440bp, 说明这 41 种材料均不是抗草甘膦转基因大豆。

2.4 PCR 检测结果与材料表型鉴定的比较

田间表型鉴定表明, 在所检测的 46 份美国大豆品种中, 41 份材料对草甘膦敏感, 而 5 个可能的转基因品系 H6686RR、RT560RR、H6255RR、RT557RR、RT512RR 对该浓度的草甘膦不敏感。这与 PCR 检测结果吻合, 说明前 41 种材料不是抗草甘膦大豆, 而后 5 种大豆为抗草甘膦的转基因大豆。

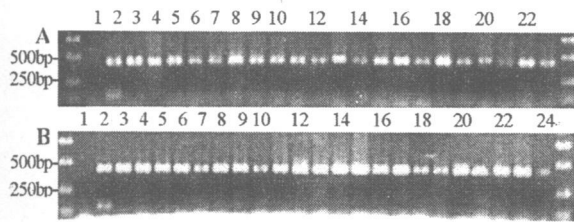


图3 可能的非转基因大豆中CP4-EPSPS基因和凝集素基因的PCR检测结果

Fig. 3 PCR analysis of CP4-EPSPS and lectin genes in possible nontransgenic soybeans

A: 1: ddH₂O; 2: Ag4501; 3: Suinong 14; 4: Accomag; 5: Anand; 6: Apollo; 7: Athow; 8: Clifford; 9: Daksoy; 10: Darby; 11: Delsoy5710; 12: Fowler; 13: HF93-083; 14: HS93-4118; 15: Ina; 16: Jim; 17: Kottman; 18: MN0301; 19: MN0901; 20: MN1302; 21: MN1801; 22: NE1900; 23: NE3297.

B: 1: ddH₂O; 2: Ag4501; 3: Suinong 14; 4: NE3399; 5: NE3400; 6: Olympus; 7: Omaha; 8: Pace; 9: Pana; 10: Rend; 11: Sargent; 12: Savoy; 13: Stout; 14: Stride; 15: Strong; 16: Surge; 17: Tiffin; 18: Titan; 19: TN4-94; 20: TN5-95; 21: TN93-99; 22: Troll; 23: UARK-5896; 24: Walsh.

3 讨论

在众多转基因作物的检测方法中,当蛋白质不表达或对转基因原料进行加工时,用ELISA法、Western法、酶法可能无法检测出外源基因的表达产物。而Southern、Northern等方法成本大,耗时耗力,不适合进行大量材料的检测。相对而言,直接对植株进行田间表型鉴定和PCR检测则简便易行,成本相对较低,便于进行大规模检测。

本研究在他人已有工作基础上进一步完善了将田间表型鉴定和PCR检测相结合的转基因大豆检测方法。检测中首先通过田间实验得到非抗草甘膦大豆的致死浓度,然后通过田间实验对待检测材料进行表型鉴定。再通过PCR检测分析CaMV35S启动子和NOS终止子,初步判定该大豆是否为转基因大豆,最后对插入的CP4-EPSPS基因进行PCR检测,进一步判定材料是否为抗草甘膦转基因大豆。实验中把大豆内源凝集素基因作为内置检测标准,排除了由于DNA质量、实验操作等因素对PCR检测结果的影响。大豆凝集素基因的PCR扩增产物长度为436bp,与CaMV35S启动子、NOS终止子、CP4-EPSPS基因的扩增产物长度有明显差异,可在同一PCR反应体系中检测。内置标准的设定避

免了假阴性结果的发生,增加了检测结果的准确性。

在本研究筛选出的41份非转基因大豆中,属于0成熟期组的早熟品种与黑龙江中部至吉林北部的品种成熟期组相当,属于V成熟期组的较晚熟品种的成熟期类型相当于黄淮海夏大豆晚熟品种、长江下游夏大豆早熟品种和西南高原晚熟春大豆品种^[18],其它品种的成熟期组介于上述两类品种之间。可见,这些引进品种可在我国南北主要大豆产区试种或作杂交育种的亲本,在完成本研究的转基因成分鉴定和植物检疫工作后,这些育种材料已分发给有关育种单位,将在今后的工作中对其农艺性状进行系统的观察和考评,为我国的育种工作者提供种质材料。

参 考 文 献

- 雷秉乾. 农业转基因生物的发展及安全管理[J]. 垦殖与稻作, 2003, 2: 4-6.
- 张磊, 戴頔和. 转基因大豆安全性评价与发展趋势[J]. 安徽农学通报, 2003, 9(1): 54-55.
- 苏少泉. 转基因抗除草剂作物评述[J]. 现代农药, 2003, 2(4): 3-7.
- 程焉平. 抗除草剂转基因作物的研究及其安全性[J]. 吉林农业科学, 2003, 28(4): 23-28.
- Wilson RF. Perspectives on the impact of biotechnology on soybean production and utilization[R]. In Moscardi F et al. (eds.), Proceedings of VII World Soybean Research Conference, Londrina, PR, Brazil, 2004, pp85-96.
- 张纪兵, 赵克强, 张爱国. 基因工程技术应用对有机农业生态环境的影响[J]. 农业现代化研究, 2003, 24(6): 418-421.
- 贾士荣. 转基因作物的环境风险分析研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 175-187.
- 张启发. 转基因作物: 研发、产业化、安全性与管理[J]. 中国大学教育, 2003, 3: 35-40.
- Anklam E, Gadani F, Heinze P. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products[J]. Eur Food Res Technol, 2002, 214: 3-26.
- Comi L, Facciotti, Hiatt WR. Expression in plants of a mutant aroA gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate[J]. Nature, 1985, 317: 741-744.
- Stalker DM, Hiatt WR, Comi L. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate[J]. Biol. Chem., 1985, (260): 4724-4728.
- Duncan K, Lewendon A, Cogging JR. Mutant EPSP synthase genes from tomato *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max* E. coli K-12 confer tolerance to glyphosate[J]. FEBS Lett, 1984, (170): 59-63.
- 蒋原, 祝长青, 林宏. 利用PCR技术检测转基因大豆 Roundup Ready的研究[J]. 检验检疫科学, 2001, 11(4): 11-20.

- 14 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[J]. 集美大学学报, 2001, 6(1): 87 – 92.
- 15 吕山花, 常汝镇, 陶波, 等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学, 2003, 36(8): 883 – 887.
- 16 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[J]. 集美大学学报, 2001, 6(1): 87 – 92.
- 17 刘光明, 李庆阁, 王群力, 等. 多重荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 和 NOS 方法的建立[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(4): 493 – 497.
- 18 汪越胜. 中国大豆品种的熟期组、生态区域及光温反应遗传特性的研究[D]. 南京农业大学博士学位论文, 1999, 12 – 36.

IDENTIFICATION OF THE TRANSGENIC ELEMENTS IN THE INTRODUCED AMERICA SOYBEAN LINES

Song Yang Wu Cunxiang Hou Wensheng Han Tianfu

(*Institute of Crop Sciences, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

Abstract In the present study, both field screening and PCR detection were conducted to identify the transgenic elements in 46 accessions of introduced America soybean varieties. First, the introduced varieties were screened by foliar spaying of glyphosate at lethal concentration in the field; Secondly, CaMV35S promoter, NOS terminator and lectin genes were examined by using PCR to determine if these lines were genetically modified; Finally, CP4 – EPSPS and lectin genes were amplified with PCR to determine if they were glyphosate – resistant transgenic soybeans. The lectin gene of soybean itself was used as internal standard to exclude the interference of DNA quality and experimental operation problems. Among the forty – six introduced America soybean varieties, five were found to be glyphosate – resistant and transgenic, and other forty – one were nontransgenic. The latter can be used as parents in soybean breeding program in difference regions of China.

Key words Transgenic soybean; Glyphosate; PCR; CP4 – EPSPS