

## 大豆再生植株抗草铵膦的筛选方法研究

孙磊<sup>1,2</sup>, 韩俊友<sup>1</sup>, 李宏宇<sup>2</sup>

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130000; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

**摘 要:**为解决农杆菌介导的大豆子叶节转化试验中草铵膦筛选所得转基因后代假阳性高的问题, 采用浸种法、根吸法、叶片涂抹法、叶片喷洒法 4 种筛选方法和多种筛选浓度对大豆再生植株及其后代抗性进行筛选。结果采用 1:200 草铵膦浓度的叶片喷洒法效果最佳。叶片喷洒法筛选 6802 株转化植株, 获得了 9 株抗性植株, 其后代的分子检测表明均为阳性植株。因此, 采用叶片喷洒法对大豆抗草铵膦植株进行筛选的方法简便可行。

**关键词:**大豆; 再生植株; 筛选; 草铵膦

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)06-1019-05

## Comparison on Methods Screening of Transgenic Soybean Resistant to Glufosinate

SUN Lei<sup>1,2</sup>, HAN Jun-you<sup>1</sup>, LI Hong-yu<sup>2</sup>

(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130000, Jilin; 2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

**Abstract:** Four screening methods and several screening concentrations were used to screen soybean regeneration plant and the resistance of its progeny as well as to resolve the problem of high false-positive regeneration plants in agrobacterium-mediated transformation of soybean cotyledons after glufosinate screening. After screening the 6802 transgenic plants by spraying the leaf, 9 resistant plants were obtained, and the molecular detection of their progeny showed that they were all positive transgenic plants. Therefore, the results indicated that the method that screening the transgenic plant by the leaf spraying was feasible.

**Key word:** Soybean; Regeneration; Screening; Glufosinate

大豆作为食用油和植物蛋白的主要来源, 是我国最重要的农作物之一<sup>[1-2]</sup>。但目前大豆育种中仍面临着诸如病虫害多、品质劣、产量低等多方面挑战。利用生物工程手段解决上述问题是改良大豆的一种重要方法, 目前大豆遗传转化多采用基因枪法<sup>[3]</sup>和农杆菌介导法<sup>[4]</sup>, 而不管用何种转化方法, 转基因后代的筛选都十分重要。当前一般采用抗性培养基筛选<sup>[5-6]</sup>, 草铵膦是转化大豆常用的抗性筛选剂<sup>[7-8]</sup>, 且在培养基中经过抗性筛选后获得的再生植株仍有较大比率的假阳性植株。针对这种情况, 采用多种筛选方法和筛选浓度对再生植株及其后代进行抗草铵膦筛选, 以期获得合适的筛选方法和筛选浓度。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试大豆品种垦农 18; 除草剂: 以 glufosinate-

Ammonium (浓度为  $113.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , T. Specialty Prods Inc) 为母液, 根据不同浓度按比例稀释。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 浸种法 浸种法分为 2 种即: 浸泡未萌发的种子和浸泡萌发的种子。试验中设 6 个一定比例的选择浓度梯度分别是: 清水对照、1:2500、1:2000、1:1500、1:1000 和 1:500 稀释浓度的 Glufosinate-Ammonium 溶液。

浸泡未发芽大豆种子: 利用上述 6 个不同草铵膦浓度, 浸泡未萌发 40 粒大豆种子, 24 h 后播种, 7 d 后调查出苗情况。同时同一草铵膦稀释浓度不同浸泡时间处理大豆种子: 采用 1:2000 草铵膦浓度, 将浸泡时间设为 0、36、38、40、42、44、46、48、50、52 和 54 h 共 10 个处理, 每个处理 100 粒, 每个处理设清水对照 10 粒。

浸泡已发芽大豆种子: 先将大豆种子在清水里泡涨, 之后在直径 18 cm 的培养皿中催芽。采用

收稿日期: 2010-06-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA10Z107); 转基因专项资助项目(2008ZX08010-004, 2009ZX08004-010B)。

第一作者简介: 孙磊(1984-), 男, 硕士, 研究方向为基因工程与分子生物学。E-mail: jlusl@163.com。

通讯作者: 李宏宇, 副研究员。E-mail: Lihongyu@caas.net.cn。

1:2000稀释草铵膦浓度浸泡已经发芽的种子,设 10 min 和 2、4、6、8、10、12、14、16 h 共 9 个处理,每个处理 100 粒,同时每个处理设清水对照 10 粒。

1.2.2 根吸法 设清水对照、1:2500、1:2000、1:1500、1:1000 和 1:500 共 6 个草铵膦浓度处理,2 次重复,将 20 粒正常大豆种子和 1 粒阳性转基因大豆种子播于直径 20 cm 花盆中,因已知转基因种子不足,1:2500 处理未播种转基因种子,然后将盆置于含不同浓度草铵膦的直径 30 cm 的盆中,每盆中药液量为 2 L。7 d 后调查出苗率。

1.2.3 叶片涂抹法 设清水对照、1:2500、1:2000、1:1500、1:1000 和 1:500 共 6 个草铵膦浓度处理,室内配制不同浓度草铵膦除草剂。在每株大豆上挑选刚展开的幼嫩叶片及其下面的第 1 片三出复叶的中间叶片用记号笔从中间划一条线,将叶片分成均等的两部分,用棉签蘸取草铵膦溶液,均匀涂抹其中的一半叶片,3~5 d 后观察,如果涂抹除草剂的部分与未涂抹部分颜色相同,则证明此植株对草铵膦具有抗性;如果涂抹除草剂的部分枯萎致死,而另一部分仍然保持绿色,则证明此植株对草铵膦没有抗性。

1.2.4 叶片喷洒法 设清水对照、1:2000、1:1000、1:500 和 1:200 共 5 个草铵膦稀释浓度的溶液。待植株真叶完全展开时,使用 5 种浓度溶液对植株表面进行喷洒,7 d 后调查植株存活情况。

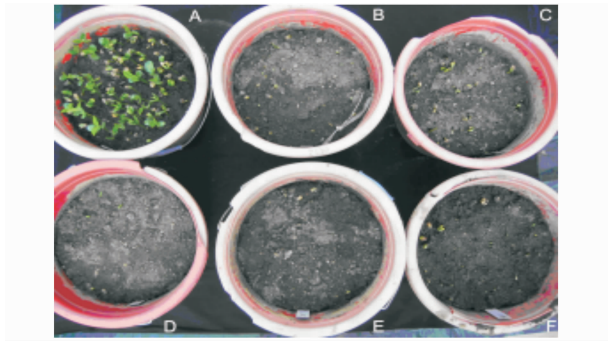
1.2.5 再生植株及其后代抗草铵膦筛选 将收获的  $T_1$  种子按株行种植。待植株真叶完全展开后,喷洒 1:200 倍的草铵膦,7 d 后观察植株生长状况。

$T_2$  代筛选抗性的植株单株收获、播种,在真叶展开时喷洒 1:200 倍的草铵膦,调查抗性植株和敏感植株的数量。

2 结果与分析

2.1 浸种法

2.1.1 浸泡未发芽大豆种子 结果见图 1,清水对照有 37 株出土,其它处理大豆均延缓发芽出土,1:500 稀释浓度有 4 株出土,1:1000 草铵膦浓度处理后种子能正常萌发,但不能出土,1:1500 也只有 10 株出土,1:2000 有 17 株出土,1:2500 有 15 株出土,基于上述结果,1:500 草铵膦仍有 10% 种子发芽出土,筛选效果不理想。



A:CK, B:1:2500, C:1:2000,  
D:1:1500, E:1:1000, F:1:500

图 1 不同稀释浓度的草铵膦浸种试验

Fig.1 Assay of different concentration  
glufosinate soaking seeds

考虑将浸种时间延长,可能增加筛选效果。因此做了同一草铵膦稀释浓度(1:2000),不同处理时间试验。结果见表 1,不处理直接播种的试验,出苗率为 95%(38/40),到处理时间为 42 h,出苗率仅为 6%,但种子在清水里 36 h 发芽率降低到 70%,42 h 就降低到 50%。该实验室转化大豆获得转基因植株的效率只有 0.3%,按处理 42 h 计算筛选转化植株,筛选出来的几率为 0.165%,损失 45%。因此该方法不适用于转基因植株的筛选,且该方法浸泡种子时间长,种子易发臭,霉变。

表 1 草铵膦浸种时间对出苗率的影响

Table 1 Effects of glufosinate treatment times on  
emergence rate

处理时间 Treatment time/h	对照 Control/%	处理 Treatments/%
36	70	1
38	40	10
40	40	5
42	50	6
44	50	6
46	60	0
48	30	0
50	60	1
52	54	50
20	0	1

2.1.2 浸泡已发芽大豆种子 为了减轻浸种时间对种子发芽率的影响,拟处理已发芽的种子,缩短处理时间。从结果(表 2)看,处理 14 h 的效果好,清水处理的种子发芽率为 90%,草铵膦处理的发芽率为 0。但该方法播种时容易导致胚根折断,并要求土壤含水量高,否则发芽种子的胚根会干枯死亡。

表 2 草铵磷浸发芽种子不同时间对出苗率的影响

Table 2 Effects of glufosinate treatment times on emergence rate of germination seed		
处理时间	对照	处理
Treated time	Control/%	Treatment//%
10min	90	81
2h	90	54
4h	80	47
6h	80	45
8h	80	12
10h	50	3
12h	90	4
14h	90	0
16h	80	1
CK	90	

2.2 根吸法

结果见图 2,采用根吸法,1:500 草铵磷稀释浓度效果只是使发芽延后,植株仍能发芽出土(图

2A),效果不好,同样浓度增加根吸次数,共吸 3 次,结果见图 2B,可见清水对照生长正常,其它处理垦农 18 豆苗均全部枯死,已知转基因植株仍能生长,但 1:500 和 1:1000 叶片也有轻微皱缩且长势明显弱于 1:1500 和 1:2000。因此建议取 1:2000 作为筛选浓度,3 次重复。

根吸法受土壤条件影响较大,土壤中有有机质含量和土壤含水量均影响试验结果。因此,该方法重复性较差,如试验中发现在 1:2000 草铵磷稀释浓度下,第 1 次野生型对照全部死亡,第 2 次重复试验发现对照仍有存活植株。因此根吸法用该浓度草铵磷筛选结果不稳定。利用该方法筛选到 2 株抗性转化植株,能正常生长结实(图 3),后代分子检测为转基因植株。



图 2 不同浓度草铵磷根吸法试验  
Fig.2 Assay of different concentration glufosinate on roots

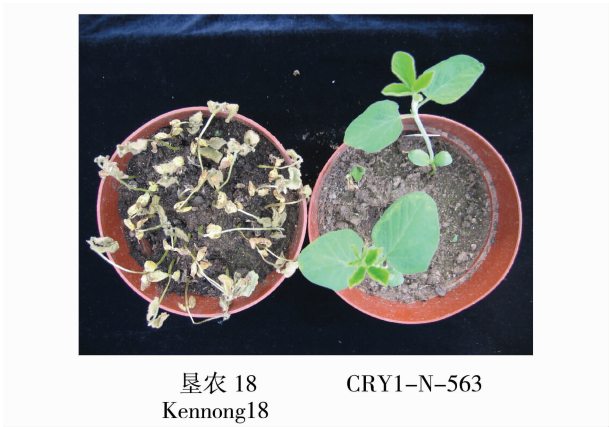


图 3 抗草铵磷转化植株

Fig.3 Transformed plants that resistant to glufosinate

2.3 叶片涂抹法

不同叶龄对草铵磷的抗性不同,使用 1:2000 草铵磷稀释浓度涂抹嫩叶,涂抹草铵磷叶片有些干枯死亡,有些只是部分干枯,嫩叶对 1:2000 浓度较敏感(图 4A);但同样浓度涂抹老叶,叶片只表现轻微受害,只叶边缘有坏死枯斑(图 4B);采用 1:500 草铵磷浓度稀释,涂抹叶片结果与 1:2000 的结果相似,嫩叶极敏感(图 4C),涂抹草铵磷部分全部枯死,但老叶仍是部分枯死(图 4D)。

用叶片涂抹法对获得的再生的部分植株的新叶涂抹 1:2000 的草铵磷结果见表 3。在 531 株大豆叶片涂抹鉴定中,2 片叶均抗的为 57 株,占 10.7%;1 片叶抗的为 161 株,占 30.3%;2 片叶均不抗的为 313 株,占 58.9%。将 531 株 T<sub>0</sub> 再生植株单株收种。T<sub>1</sub> 代经喷洒 1:200 稀释的草铵磷无抗性植株。

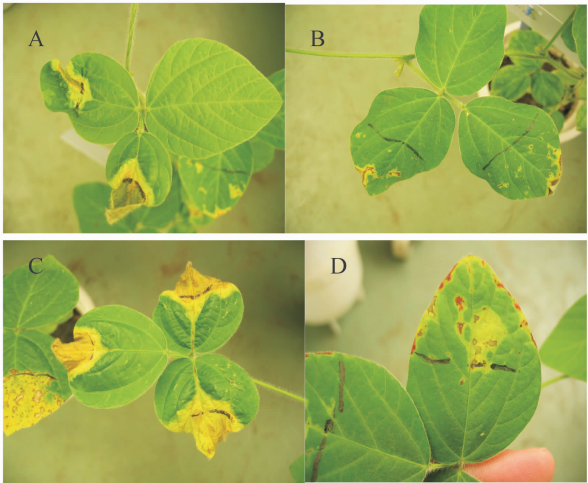


图 4 叶片涂抹草铵磷表型  
Fig.4 Effect of glufosinate painted on leaves



表 3 叶片涂抹法对再生植株的筛选  
Table 3 Effect of Glufosinate painted on leave

转化的质粒	草铵膦涂抹 2 片均有抗性	草铵膦涂抹只有 1 片带抗性	草铵膦涂抹 2 片均不带抗性
Transformed plasmid	Both of two leaves resistant to glufosinate	One of two leaves resistant to glufosinate	None of leaf resistant to glufosinate
FKF	8	13	24
TFL	0	1	3
MAF	6	28	23
TOC1	5	23	43
FT	19	39	76
PHYD	6	13	40
SOC1-2	7	15	20
RGA1	1	12	44
ZTL	4	13	26
GI	1	3	4
ELF3	0	1	10

2.4 叶片喷洒法

不同草铵膦稀释浓度叶片喷洒法结果显示, 1:500浓度的结果,在几次试验中表现不稳定,有时喷后野生型垦农 18 全部枯干死亡,有时有个别植株叶片干枯死亡,但生长点未死,可再发新叶,不死亡。而 1:200 浓度适合应用于转基因植株的筛选,利用该方法该浓度筛选获得的抗性植株,经分子检测均为转基因植株。利用该方法在温室小量试验(图 5A、B)和在田间大量试验中(图 5C、D)共筛选 6802 株,获得了 9 株抗性植株,在后代的分子检测中均为转化植株。该方法筛选结果可靠,操作简单,省工省时。



A、B 温室内筛选 A:喷草铵膦后植株状态,B:喷草铵膦后植株状态; C、D 图 大田筛选 C:为喷药前大豆正常生长, D:为筛选后大部分植株死亡,绿色两株为抗性植株。  
A、B:Screening in greenhouse. A: Soybean's status after spraying glufosinate, B: Soybean's status after spraying glufosinate. C、D:Screening in field. C: Soybean lived normally before spraying of glufosinate, D: Most of soybean died after spraying of glufosinate, the green two are resistant to glufosinate.

图 5 叶片喷洒草铵膦筛选效果

Fig.5 Effect of glufosinate spraying on leaves

3 讨论

通过对转基因大豆 4 种筛选方法结果的比较,发现叶片喷洒法最为合适。研究表明浸种法会降低种子发芽率,且操作复杂,因此不是转基因植株筛选的最佳方法。根吸法重复性差,不稳定因素多,不宜采用。叶片涂抹法结果不稳定可能由 2 个原因导致,一为再生植株为嵌合体,而 T<sub>0</sub> 代由于光线不足,再生植株的结荚率受到很大影响<sup>[9]</sup>,一般只结 3 个荚,结 8 粒种子,这样可能转化的嵌合体部分没有收到种子;另一个原因是叶片涂抹法不准确,不适合作为一种检测方法。叶片涂抹法效果受叶龄影响较大<sup>[10]</sup>,因为有些再生植株新生叶也呈深绿色,对草铵膦抗性较浅绿的新叶强,因此只根据叶龄,涂抹结果也难以准确筛选转化植株,且要经常观察是否有嫩叶需要涂抹,涂抹速度慢,费工费时,不适合筛选使用。4 种筛选方法中以叶片喷洒法效果最好,喷洒浓度为 1:200 草铵膦,在之后的 Southern blot 试验、RT-PCR 检测试验、Western blot 试验及 GFP 观察<sup>[11,12]</sup>中均证实所筛选植株为阳性。该方法只需喷洒一次,操作简单、方便,省工省时,适合于大量筛选。如果只是个别植株的筛选可选择根吸法,采用 1:2000 浓度吸 3 次,也可筛选到抗性植株。

参考文献

[1] 余永亮,梁慧珍,王树峰,等. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化[J]. 大豆科学,2010,29(1):143-150. (Yu Y L, Liang H Z, Wang S F, et al. Research progress and commercialization on transgenic soybean in China[J]. Soybean Science,2010, 29(1):143-150. )  
[2] 盛东峰,杨同文. 转基因大豆的研究及应用[J]. 周口师范学院学报,2007,25(2):83-85. (Sheng D F, Yang T W. Transgenic soybean research and security assessment[J]. Journal of Zhoukou

- Normal University, 2007, 25(2):83-85.)
- [3] Vain P, McMullen M D, Finer J J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize[J]. Plant Cell Reprots, 1993, 12:84-88.
- [4] Chen S Y. High-efficiency agrobacterium-mediated transformation of soybean [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(5):610-617.
- [5] 薛仁镐, 谢宏峰. 利用改良的草铵膦筛选系统快速而有效筛选转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4):373-378. (Xue R G, 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.)
- [6] 唐晓飞, 刘丽君, 张小明, 等. 高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 再生条件的优化[J]. 大豆科学, 2008, 27(4):203-207. (Tang X F, Liu L J, Zhang X M, et al. Improvement of regeneration system in high yield soybean lines Hajiao5337 and Hajiao5489[J]. Soybean Science, 2008, 27(4):203-207.)
- [7] 寇坤, 刘丽君, 曲姗姗, 等. 大豆新品系黑农 56 子叶节再生体系的优化[J]. 大豆科学, 2009, 28(3):400-408. (Kou K, Liu L J, Zhang X M, et al. Improvement of regeneration system in new soybean line Heinong 56[J]. Soybean Science, 2009, 28(3):400-408.)
- [8] 刘敏, 朱洪德, 高中利. 抗除草剂转基因大豆遗传分析[J]. 大豆科学, 2010, 29(1):33-36. (Liu M, Zhu H D, Gao Z L. Inheritance analysis of herbicide-resistant transgenic soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(1):33-36.)
- [9] 刘晓冰, Stephen J. Herbert, 金剑, 等. 增加光照及其与改变源库互作对大豆产量构成因素的影响[J]. 大豆科学, 2006, 25(1):6-10. (Liu X B, Herbert S J, Jin J, et al. Light enrichment and its interactions with source-sink alteration on yield and yield components in soybean[J]. Soybean Science, 2006, 25(1):6-10.)
- [10] 应珊, 何晓薇, 王秀荣, 等. 影响农杆菌介导的大豆转化效率的因素研究[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1):32-40. (Ying S, He X W, Wang X R, et al. Assessment of factors affecting the transformation efficiency of soybean cotyledonary-node agrobacterium-mediated transformation system[J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(1):32-40.)
- [11] 宋雯雯, 刘宝辉, 杨明亮, 等. 农杆菌介导法将 SPS 基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(3):387-390. (Song W W, Liu B H, Yang M L, et al. Transformation of SPS gene into soybean via agrobacterium-mediated method[J]. Soybean Science, 2008, 27(3):387-390.)
- [12] 王庆中. 转 BoTMT 基因大豆的获得及鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006:20-23. (Wang Q Z. Obtaining and identification of transgenic soybean with the gene of BoTMT[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006:20-23.)

(上接第 1018 页)

- [8] 刘杰, 张颖, 曾宪锋, 等. 有机-无机复混肥对大豆产量和品质的影响[J]. 大豆通报, 2002(1):10-11. (Liu J, Zhang Y, Zeng X F, et al. Affect of organic and inorganic mixed fertilizer on yield and quality of soybean[J]. Soybean Bulletin, 2002(1):10-11.)
- [9] 孙世超. 大豆施用生物有机肥对产量及构成因素的影响[J]. 大豆通报, 2002(4):11-12. (Sun S C. The influence of using biological organic fertilizer on yield and component element of soybean[J]. Soybean Bulletin, 2002(4):11-12.)
- [10] 李鸣雷, 谷洁, 高华, 等. 不同有机肥对大豆植株性状、品质和产量的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(9):67-72. (Li M G, Gu J, Gao H, et al. Effects of different organic fertilizer on plant character, quality and yield of soybean[J]. Journal of Northwest Agriculture and Forest University: Natural Science Edition, 2007, 35(9):67-72.)
- [11] 康国战, 翟金中, 张振华, 等. 大豆施用有机无机复混肥的增产效果[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(2):316-317. (Kang G Z, Zhai J Z, Zhang Z H, et al. Effect of the mixture of organic and inorganic compound fertilizer on soybean yield increment[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2003, 31(2):316-317.)
- [12] 王立刚, 李维炯, 邱建军, 等. 生物有机肥对作物生长、土壤肥力及产量的效应研究[J]. 土壤肥料, 2004(5):12-17. (Wang L G, Li W J, Qiu J J, et al. Effect of biological organic fertilizer on crops growth soil fertility and yield[J]. Soils and Fertilizers, 2004(5):12-17.)
- [13] 张文君, 刘兆辉, 江丽华, 等. 有机无机复混肥对作物产量及品质的影响[J]. 山东农业科学, 2005(3):57-58. (Zhang W J, Liu Z H, Jiang L H, et al. Effect of organic-inorganic compound fertilizer on crop yield and quality[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2005(3):57-58.)