

# 广适性转 *bar* 基因大豆除草剂草丁膦筛选浓度的研究

厉志<sup>1,2</sup>, 王曙明<sup>1,2</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 孟凡梅<sup>1</sup>, 衣志刚<sup>1</sup>, 董志敏<sup>1,2</sup>

(1. 吉林省农业科学院 大豆研究所, 吉林 长春 130033; 2. 国家大豆工程研究中心, 吉林 长春 130033)

**摘要:**草丁膦作为转基因筛选剂具有高效、快速、简便等优点。为了提高筛选转基因大豆阳性植株的效率,以6个常用的转基因受体大豆品种为材料,在温室和田间,采用叶片涂抹和整株喷施两种方法,通过受体品种叶片颜色变化和致死浓度确定了转基因后代材料适宜筛选浓度,其中适宜涂抹浓度为  $100 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,适宜喷施浓度为  $700 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以转 *bar* 基因  $T_1$  代大豆植株进行验证,筛选浓度筛选准确率分别达到 61.3% 和 73.9%。本研究为抗草丁膦转基因大豆后代材料的筛选提供了重要依据。

**关键词:** *bar* 基因;转基因大豆;除草剂;草丁膦;筛选

**中图分类号:** S482.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2013)06-0810-04

## Study on Screening Concentration of Wide Adaptability Herbicide-Resistant *bar*-Transgenic Soybean

LI Zhi<sup>1,2</sup>, WANG Shu-ming<sup>1,2</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, MENG Fan-mei<sup>1</sup>, YI Zhi-gang<sup>1</sup>, DONG Zhi-min<sup>1,2</sup>

(1. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China; 2. National Engineering Research Center for Soybean, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Glufosinate proves to be effective and convenient in screening transgenic soybean plants. To improve the screening efficiency of transgenic positive plants, the glufosinate screening concentrations were determined by two methods (daubing and spraying) in the greenhouse and field, with six common soybean transgenic receptor varieties as materials. The suitable glufosinate screening concentrations for daubing and spraying were  $100 \sim 150$  and  $700 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively, when determined by leaves color changes and mortality rate of soybean plants. Then the availability was tested by  $T_1$  plants of soybean transgenic lines with *bar* gene, the accuracy rate was 61.3% and 73.9%, respectively. The results would facilitate the screening of glufosinate-resistant transgenic soybean progenies.

**Key words:** *bar* gene; Transgenic soybean; Herbicide; Glufosinate; Screening

草丁膦作为转基因材料筛选剂,具有高效、快速、简便等特点,被广泛应用于转基因研究中。目前,草丁膦筛选转基因大豆后代材料,通常采用萌芽法、叶片涂抹法以及喷施法等。而不同作物、不同筛选方法使用草丁膦的浓度存在较大差异<sup>[1-4]</sup>。

大豆转基因后代材料的筛选主要是在真叶和三出复叶两个时期进行涂抹或整株喷施。卢涛等<sup>[5]</sup>研究认为,  $135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦叶片涂抹可用于转基因大豆植株的大规模筛选。李永光等<sup>[6]</sup>研究表明,  $80$  和  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  分别为叶片涂抹和全株喷施时筛选转基因和非转基因大豆的适宜草丁膦浓度。

本研究以6个常用的转基因受体为材料,通过设定不同的浓度梯度,分别以叶片显著变色和整株死亡为标准,对草丁膦涂抹法和喷施法适宜筛选浓度进行研究。并以转 *bar* 基因大豆  $T_1$  代植株验证所确定的筛选浓度的可靠性,以期草丁膦抗性转基因大豆的筛选提供具有广泛适用性的筛选浓度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为华春6号、小粒豆1号、吉育73、吉育89、黑农38和铁丰29;用于验证筛选浓度的花粉管通道法转化获得的  $T_0$  代种子 11 086 粒,其中涂抹法 5 405 粒,喷施法 5 681 粒;

除草剂为草丁膦,由日本明治制药株式会社生产; *bar* 基因试纸条购自 EnviroLogix, *bar* 基因检测引物:

BAR-F: 5'-ACAAGCACGGTCAACTTCC-3'

BAR-R: 5'-ACTCGGCCCGTCCAGTCGTA-3'

### 1.2 试验设计

1.2.1 涂抹法 在温室中用小钵播种,每钵2株,每个品种选取长势均匀整齐的30株进行涂抹。草丁膦设 50, 100, 150, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  4个浓度。在第一片三出复叶完全展开后,选取其中2片复叶,用记

收稿日期:2013-08-16

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08004-001-05;2014ZX08004-002B-003)。

第一作者简介:厉志(1981-),男,硕士,助理研究员,主要从事大豆分子育种研究。E-mail: lizhi527@126.com。

通讯作者:董志敏(1978-),女,博士,副研究员,主要从事大豆育种研究。E-mail: dongzhimin2005@126.com。

号笔从中间划线将叶片均分,用棉签蘸取草丁膦溶液,均匀涂抹其中叶尖部分。温室要求保持足够的光照时间和强度。涂抹 3~5 d 后观察,若涂抹除草剂的部分与未涂抹部分颜色无明显变化,则认为此植株对草丁膦具有抗性;若涂抹部位显著变色或枯死,而未涂抹部分仍然保持绿色,则认为此植株对草丁膦没有抗性。

1.2.2 喷施法 采用温室和大田栽培两种方式。温室中设 300,400,500,600,700,750 mg·L<sup>-1</sup> 6 个浓度,在大田中设 500,600,700,750,800 mg·L<sup>-1</sup> 5 个浓度。

在温室中小钵播种,每钵 2 株。每个品种于真叶期选取长势均匀整齐的 30 株进行喷施。大田中按 3 m 行长 1 行区播种,每个品种分别于真叶期和第一片三出复叶期选取长势均匀整齐的 30 株进行喷施,3 次重复。采用超低量喷雾器对叶面进行喷施并尽量做到喷施均匀。温室要求保持足够的光照时间和强度,大田喷施应选择光照充足风力小的天气。在 10~14 d 后进行观察。若喷施后的大豆植株叶片颜色无明显变化,则认为此植株对草丁膦具有抗性;若喷施后叶片发生枯黄、萎蔫并脱落,则认为此植株对草丁膦没有抗性。

1.3 除草剂筛选浓度准确性检测

1.3.1 叶片涂抹法最佳浓度准确性检测 将通过花粉管通道法获得的 T<sub>0</sub> 代种子在温室里播种于小钵中,每钵 1 株,每个品种设对照。待第一片三出复叶完全展开后,利用涂抹法进行筛选,将筛选到的抗性植株,利用 *bar* 基因试纸条检测。提取试纸条阳性植株基因组,进行 PCR 检测。

1.3.2 整株喷施法适宜浓度准确性检测 利用喷施法对花粉管通道法获得的 T<sub>0</sub> 代种子进行筛选,将筛选到的抗性植株,利用 *bar* 基因试纸条检测。提取试纸条阳性植株基因组,进行 PCR 检测。

1.3.3 对照样本的验证 对 T<sub>0</sub> 代种子进行筛选时,在使用草丁膦涂抹或喷施前,采集叶片样品,保存于超低温冰箱。经草丁膦筛选后,提取死亡植株基因组,将每 10 份基因组混合成一个样本,共制备

20 个混合样本,分别进行 PCR 检测。

1.4 数据分析

统计各品种在不同浓度下的死亡情况,并利用 DPS 7.05 分析品种间以及各个品种不同浓度间死亡率的变异系数。

2 结果与分析

2.1 涂抹法致死浓度的确定

大豆叶片对草丁膦的敏感程度可以直接从叶片的颜色和形态变化来观察。由表 1 可知,当草丁膦溶液浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup> 时,发生叶片枯萎变黄的植株数量较少,叶片死亡率为 60%~74%,且品种间变异系数(7.2%)较大,这表明在该浓度下,品种间对草丁膦抗性差异较大,可能存在基因型差异,且并未达到临界浓度。随着浓度的增加,死亡率明显上升,当浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup> 时,各品种死亡率均超过 90%,且各品种死亡率较为接近,变异系数较小。而浓度达到 150 mg·L<sup>-1</sup> 时,各品种均接近全部死亡,变异系数同样很小。而 200 mg·L<sup>-1</sup> 的浓度下,死亡率均达 100%,表明浓度过高,已经超过临界浓度。由此可见,涂抹法的临界浓度为 100~150 mg·L<sup>-1</sup>。除此,还发现单片叶涂抹草丁膦时,只作用在涂抹叶片而邻近叶片未见显著变化,说明草丁膦主要在涂抹部位发生作用。综上所述,涂抹法确定的适宜筛选浓度在 100~150 mg·L<sup>-1</sup> 范围内。

2.2 喷施法致死浓度的确定

为了满足大规模筛选的需要,在温室中对真叶期大豆进行整株喷施。由表 2 可知,当草丁膦浓度为 300~500 mg·L<sup>-1</sup> 时,各品种都没有达到临界浓度。随着草丁膦浓度的升高,草丁膦对叶片的毒害程度加剧,死亡率明显增加。当浓度为 700 mg·L<sup>-1</sup> 时,死亡率超过 90%;当浓度达 750 mg·L<sup>-1</sup> 时,各品种均接近完全死亡,且在 700 和 750 mg·L<sup>-1</sup> 两个浓度下,变异系数均较低。因此,可初步确定温室中整株喷施最适浓度为 700~750 mg·L<sup>-1</sup>。

表 1 涂抹法死亡率统计  
Table 1 Mortality statistics for smear screening(%)

草丁膦浓度 Glufosinate concentration/mg·L <sup>-1</sup>	吉育 73 Jiyu 73	小粒豆 1 号 Xiaolidou 1	铁丰 29 Tiefeng 29	吉育 89 Jiyu 89	黑农 38 Heinong 38	华春 6 号 Huachun 6	变异系数 Variation coefficient
50	60	70	74	67	65	65	7.2
100	92	95	96	94	94	95	1.5
150	97	100	100	99	98	98	1.2
200	100	100	100	100	100	100	0
变异系数 Variation coefficient	21.2	15.7	13.5	17.3	18.3	18.4	

表 2 温室真叶期喷施死亡率统计

Table 2 Mortality statistics for spray screening in the true leaf stage under greenhouse( % )

草丁膦浓度 Glufosinate concentration/mg · L <sup>-1</sup>	吉育 73 Jiyu 73	小粒豆 1 号 Xiaolidou 1	铁丰 29 Tiefeng 29	吉育 89 Jiyu 89	黑农 38 Heinong 38	华春 6 号 Huachun 6	变异系数 Variation coefficient
300	16	16	19	18	19	18	7.7
400	35	39	38	41	37	38	5.3
500	63	61	70	67	63	61	5.6
600	77	78	81	79	77	80	2.1
700	93	94	97	94	95	95	1.4
750	99	100	100	100	100	100	0.4
变异系数 Variation coefficient	51.4	50.5	48.4	47.7	49.4	49.8	

在温室条件下,采用相同的浓度梯度,测定了三出复叶期喷施草丁膦时植株的死亡情况。由表 3 可知,死亡率变化趋势与真叶期相一致,整株死亡

临近浓度与真叶期相同,均为 700 ~ 750 mg · L<sup>-1</sup>。这表明随着幼苗的生长,死亡临界浓度几乎不发生变化。

表 3 温室三出复叶期喷施死亡率统计

Table 3 Mortality statistics for spray screening in the terately compound leaf stage under greenhouse( % )

草丁膦浓度 Glufosinate concentration/mg · L <sup>-1</sup>	吉育 73 Jiyu 73	小粒豆 1 号 Xiaolidou 1	铁丰 29 Tiefeng 29	吉育 89 Jiyu 89	黑农 38 Heinong 38	华春 6 号 Huachun 6	变异系数 Variation coefficient
300	16	17	20	18	17	18	7.7
400	36	39	38	38	37	37	2.8
500	60	61	71	67	63	63	6.4
600	80	81	83	80	79	80	1.7
700	91	93	94	92	91	93	1.3
750	98	99	100	100	98	100	1.0
变异系数 Variation coefficient	51.0	49.6	47.4	48.6	49.5	49.6	

在大田中进行真叶期喷施,发现与温室中结果相似(表 4)。当浓度为 500 ~ 600 mg · L<sup>-1</sup>时,死亡率较低,未达到致死浓度。当浓度达 700 ~ 750 mg · L<sup>-1</sup>时,

死亡率为 90% ~ 99%,且品种间变异系数较小,表明此时已达到临界浓度。当浓度达 800 mg · L<sup>-1</sup>时,植株全部死亡,超出临界浓度。

表 4 大田喷施死亡率统计

Table 4 Mortality statistics for spray screening in field( % )

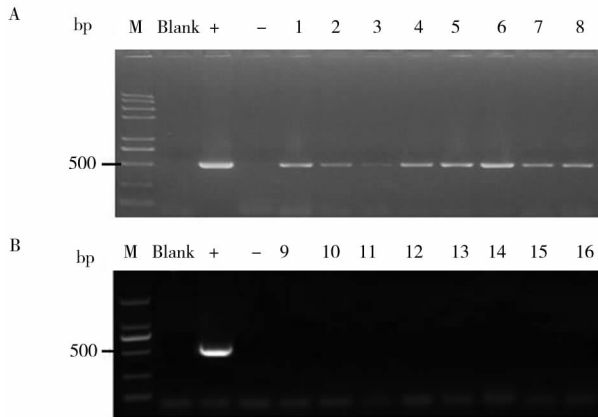
草丁膦浓度 Glufosinate concentration/mg · L <sup>-1</sup>	吉育 73 Jiyu 73	小粒豆 1 号 Xiaolidou 1	铁丰 29 Tiefeng 29	吉育 89 Jiyu 89	黑农 38 Heinong 38	华春 6 号 Huachun 6	变异系数 Variation coefficient
500	58	60	69	66	60	64	6.7
600	78	81	81	79	77	79	2.0
700	90	92	94	92	91	94	1.7
750	96	98	97	97	96	99	1.2
800	100	100	100	100	100	100	0
变异系数 Variation coefficient	20.1	19.0	14.7	16.3	19.3	17.7	

2.3 T<sub>1</sub>代植株筛选验证临界浓度可靠性验证

为了确认上述浓度的草丁膦对转基因植株的筛选效果,通过除草剂涂抹及整株喷施法对花粉管通道转基因后代材料进行除草剂筛选。其中通过

叶片涂抹法和喷施法筛选分别获得抗性植株 31 和 23 株。利用 *bar* 基因试纸条对抗性植株进行检测,共检测出阳性植株 36 株,其中涂抹法 19 株,喷施法 17 株。同时,利用 *bar* 基因引物进行 PCR 检测,*bar*

基因试纸条检测的植株 PCR 皆为阳性(图 1A);而叶片涂抹法和随机选取的 20 个对照样本的 *bar* 基因试纸条和 PCR 检测皆为阴性(图 1B)。因此,就 *bar* 基因试纸条和 PCR 检测结果而言,叶片涂抹法的准确率为 61.3%;整株喷施法的准确率为 73.9%。



A: 阳性植株检测; B: 阴性植株检测; M: DNA maker; 1~8:  $T_1$  代阳性植株; 9~16:  $T_1$  代阴性植株。

A: Positive plant identification; B: Negative plant identification. Lane M: DNA maker; 1-8: Positive soybean plants of  $T_1$  generation. 9-16: Negative soybean plants of  $T_1$  generation.

图 1  $T_1$  代植株 PCR 检测

Fig. 1 PCR identification of  $T_1$  generation plant

### 3 结论与讨论

本研究以常用的转基因受体大豆为材料,通过设定较大范围的浓度梯度,以叶片变色和整株死亡为标准,确定了叶片涂抹和整株喷施法的草丁膦最适筛选浓度分别为  $100 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $700 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,就 *bar* 基因试纸条和 PCR 检测结果而言,二者的准确率分别为 61.3% 和 73.9%。大豆的苗期叶片涂抹浓度与已报道的其他作物苗期涂抹浓度比较接近;而整株喷施法作物间差异较大。已报道的其他作物苗期喷施致死浓度,小麦三叶期为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[7]</sup>,玉米为  $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[8]</sup>,水稻为  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[9]</sup>。可见大豆的致死浓度显著高于小麦和水稻,而与玉米相当。

此外,研究表明大豆对不同浓度草丁膦的敏感性不同,处理浓度越高反应越敏感、越迅速,但不同品种对低浓度草丁膦的敏感性存在明显差异。本研究中 6 个品种对较低浓度草丁膦的抗性不同,其

中吉育 73 和黑农 38 的抗性较强,而铁丰 29 的抗性相对较弱;但随着施用浓度的提高,抗性差异逐渐减少,在接近临界浓度时,已无明显差异。这表明本研究所确定的草丁膦筛选浓度可广泛用于不同大豆品种的转基因筛选。

### 参考文献

- [1] 刘艳芝,王玉民,王中伟,等. 大豆和苜蓿对除草剂的抗性研究[J]. 吉林农业科学,2005,30(4):22-24. (Liu Y Z, Wang Y M, Wang Z W, et al. Studies on soybean and alfalfa resistant to herbicide[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2005, 30(4): 22-24.)
- [2] 杨朝国,杨方方,张登峰. 抗除草剂草丁膦转基因玉米后代筛选方法的研究[J]. 作物杂志,2010(6):32-35. (Yang C G, Yang F F, Zhang D F. Methods of screening transgenic maize with herbicide glufosinate resistance[J]. Crops, 2010(6): 32-35.)
- [3] 黄益洪,刘春光,马鸿翔,等. 小麦花粉管途径转化及高效筛选体系的建立[J]. 分子植物育种,2004,6(2):777-782. (Huang Y H, Liu C G, Ma H X, et al. Wheat transformation by pollen-tube pathway and high effective screening system[J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 6(2): 777-782.)
- [4] 陈浩,陈社员,官春云,等. 转 *bar* 基因油菜对非选择性除草剂草丁膦的抗性研究[J]. 作物研究,2010,24(3):160-163. (Chen H, Chen S Y, Guan C Y, et al. Resistance of *bar*-transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) to herbicide PPT[J]. Crop Research, 2010, 24(3): 160-163.)
- [5] 卢涛,李红艳,唐桂香,等. 以 *bar* 基因为筛选标记转基因大豆的获得及鉴定[J]. 大豆科学,2011,30(6):895-900. (Lu T, Li H Y, Tang G X, et al. Acquisition and identification of transgenic soybean using *bar* as a selective agent[J]. Soybean Science, 2011, 30(6): 895-900.)
- [6] 李永光,黄文佳,李文滨,等. 大豆对草丁膦敏感性研究[J]. 大豆科学,2011,30(5):749-751. (Li Y G, Huang W J, Li W B, et al. Sensitivity of soybean to herbicide glufosinate[J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 749-751.)
- [7] 周森平,余桂红,任丽娟,等. 转抗除草剂基因小麦植株的筛选方法研究[J]. 麦类作物学报,2008,28(6):935-940. (Zhou M P, Yu G H, Ren L J, et al. Screening of transgenic wheat plants resistant to herbicide[J]. Journal of Triticeae Crops, 2011, 30(5): 749-751.)
- [8] 陈兰. 拟南芥 *CBL1* 基因在玉米中遗传转化的研究[D]. 长春: 吉林大学,2011. (Chen L. Study on transformation of *CBL1* gene of *Arabidopsis thaliana* in maize [D]. Changchun: Jilin University, 2011.)
- [9] 唐微. 转 *bar* 基因抗除草剂水稻的培育[J]. 湖北农业科学,2007,46(4):488-490. (Tang W. Development of herbicide-resistant transgenic indica rice[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2007, 46(4): 488-490.)