

王莹,袁英. 抗除草剂转基因玉米的快速鉴定方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):54-56.

抗除草剂转基因玉米的快速鉴定方法

王莹¹,袁英²

(1. 长春职业技术学院食品与生物技术分院, 吉林长春 130033; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 吉林长春 130033)

摘要:以含不与除草剂甘膦结合的突变型 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶基因除草剂筛选标记的转基因玉米为材料,通过叶片喷雾和叶片离体平板培养等试验,建立快速非分子生物学抗除草剂转基因玉米的鉴定方法。结果表明:用 5 000 mg/L 草甘膦叶片喷雾和用 70 mg/L 草甘膦叶片离体培养可快速准确地鉴定是否转入除草剂基因。

关键词:转基因玉米;抗除草剂;草甘膦;鉴定方法

中图分类号: S513.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0054-03

随着转基因作物商业化生产的发展,转基因作物种植面积从 1996 年的 170 万 hm^2 增加到 2012 年的 1.7 亿 hm^2 ,增长了 99 倍,这是前所未有的突破,其中抗除草剂作物种植面积最大^[1]。在植物转基因研究过程中,通常采用选择性标记基因提高筛选效率,而除草剂基因是较常用的筛选标记基因,而 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)基因最常用。目前,国际上种植面积最大的抗除草剂转基因玉米是转 EPSPS 基因抗农达除草剂玉米^[2]。近几年,国内对抗除草剂转基因玉米和抗除草剂筛选方法的研究也取得了很大的成功^[3-11]。在转基因研究和安全评价等过程中对转基因植株的鉴定是不可少的环节^[12],传统上初步鉴定转基因的方法是利用聚合酶链反应(PCR)鉴定目的基因 DNA 片段是否存在;但是 PCR

方法步骤繁琐,做大量鉴定运用时有一定的局限性。利用筛选标记基因的农艺性状,建立快速有效的非生物鉴定方法非常必要。本研究以抗除草剂转基因玉米为研究材料,通过叶片喷雾、叶片离体培养方法建立抗除草剂转基因玉米快速的鉴定方法,并探索出可以有效区分转化和非转化植株的筛选剂浓度。本研究建立的 2 种检测方法既可用于转基因植株当代的检测筛选,又可用于转基因后代植株的大规模检测,大大减少了转基因后代培养和进一步鉴定的工作量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用的植株材料列于表 1。

1.1.2 试剂 41% 草甘膦异丙胺盐药剂,由美国孟山都公司生产;6-苄氨基嘌呤(6-BA),购于 Sigma 公司;国产琼脂,由上海鼎国生物技术有限公司提供;EPSPS 试纸条购于美国恩沃劳格公司。

1.1.3 筛选培养基(液)的制备 叶片喷雾液:50 mL 灭菌水中加入 1 滴吐温 20,再加入不同浓度的除草剂。离体培养筛选培养基:0.7% 琼脂、1 mg/L 6-BA,煮沸使琼脂溶解,冷却

收稿日期:2013-08-15

基金项目:吉林省财政厅育种项目。

作者简介:王莹(1982—),女,吉林长春人,硕士,讲师,从事生物技术方向研究。Tel:(0431)84602461;E-mail:grammy1981@163.com。

通信作者:袁英,硕士,研究员,从事作物遗传转化研究。Tel:(0431)87063098;E-mail:32854085@qq.com。

因型要选择最佳的处理组合。

植物激素种类和基因型对马铃薯外植体植株的再生有一定的影响,从试验结果可以看出:不同基因型外植体的平均分化率差距很大,变化范围为 16.89%~28.22%,这说明在选择转化受体时应该考虑高再生率的基因型。同一基因型的外植体在不同的激素作用下分化率也有差别,配方为 MS + 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L ZT + 0.5 mg/L IAA 的培养基分化诱导率较高,而配方为 MS + 1.75 mg/L ZT + 1 mg/L IAA 的培养基分化诱导率较低。

本试验建立了一套较完整的关于青海省主栽马铃薯品种的组培快繁体系,以期有助于这些品种的大规模推广种植。

参考文献:

- [1] 谢开云,屈冬玉. 中国马铃薯育种进程[C]//中国马铃薯年会论文集. 哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2002:5-9.
- [2] Cassells A C, Goetz E M, Austin S. Phenotypic variation in plants produced from lateral buds, stem explants and single-cell-derived

callus of potato[J]. Potato Research,1983,26(4):367-372.

- [3] Higgins E S, Hulme J S, Shields R. Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Science, 1992, 82(1):109-118.

- [4] Dale P J, Hampson K K. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Euphytica, 1995, 85(1/3):101-108.

- [5] 王萍,王昱,季静. 马铃薯两个基因型不同外植体的组织培养与植株再生[J]. 中国马铃薯,2006,20(6):326-328.

- [6] 秦敏,邵刚. 马铃薯再生体系的建立及其遗传分析[J]. 中国马铃薯,2005,19(5):270-273.

- [7] 双宝,李文英,李文滨,等. 马铃薯优化再生系统的建立[J]. 马铃薯杂志,1995,9(3):134-138.

- [8] 高华援,王楠,王庆峰,等. 马铃薯组织培养中常见的污染问题及解决办法[J]. 吉林农业科学,2007,32(2):28-30.

- [9] 张永成,张凤军. 马铃薯不同基因型幼芽茎外植体的组织培养[J]. 农业科技通讯,2009(6):44-46.

表 1 植物材料及来源

材料名称	来源	筛选标记基因	目的基因性状
吉 853 EPS	转基因获得	<i>CP4-EPSPS</i>	抗除草剂草甘膦
MO17 EPS	转基因获得	<i>CP4-EPSPS</i>	抗除草剂草甘膦
吉 853 CK	转基因受体品种	无	无
MO17 CK	转基因受体品种	无	无

至 55℃ 后加入不同浓度的除草剂,制成固体培养平板。

1.2 方法

1.2.1 叶片喷雾法筛选转基因植株 将 0、1 000、3 000、5 000、7 000 mg/L 草甘膦溶液均匀地喷洒在 4 叶期转基因玉米和对照材料的叶片表面,直到叶片滴水为止,8~10 d 后观察。

1.2.2 叶片离体培养法筛选转基因植株 剪取 4 叶期新长出 5 d 左右的新鲜绿色叶片(两端均留有切口),长度约为 1 cm,平贴在含有 0、10、30、50、70、90 mg/L 草甘膦固体培养基上(完全接触培养基),25℃,16 h 光照/8 h 培养 2~10 d,观察。

1.2.3 转基因植株试纸条检测 试纸条快速检测法:取稍许长度约为 1 cm 的叶片,放入 1.5 mL 的离心管中,用研磨棒将叶片研碎,加入 0.5 mL 提取液,搅拌均匀,将试纸条按规定

的方向插入混合液中,5 min 后观察结果。若试纸条出现 2 条带,就表明该植株是阳性植株;若出现 1 条带,说明是阴性植株;如果没有带,表明操作有误^[16]。

2 结果与分析

2.1 叶片喷洒除草剂法鉴定转基因植株

植物叶片喷洒除草剂后,野生型植物叶片会发生枯萎,而抗除草剂转基因植物则正常生长,说明该方法可用于鉴定含抗除草剂基因的转基因植株。

含 *CP4-EPSPS* 基因的玉米 Mo17 EPS 和吉 853 EPS 对除草剂草甘膦具有抗性。草甘膦喷洒的浓度梯度试验结果表明,喷洒草甘膦即可在较短的时间内显著区分玉米 Mo17 和吉 853 植株是否含有 *CP4-EPSPS* 基因。喷洒草甘膦 8~10 d 后,当草甘膦浓度大于 5 000 mg/L 时,野生型玉米叶片植株整株枯萎死亡,有明显中毒症状,而含 *CP4-EPSPS* 转基因玉米没有任何枯萎症状(图 1),表明用该浓度的除草剂草甘膦喷洒玉米叶片可快速区分转基因玉米是否携带 *CP4-EPSPS* 基因。并且含 *CP4-EPSPS* 转基因玉米在高浓度草甘膦下依然能正常生长,表现出对草甘膦良好的耐受性。

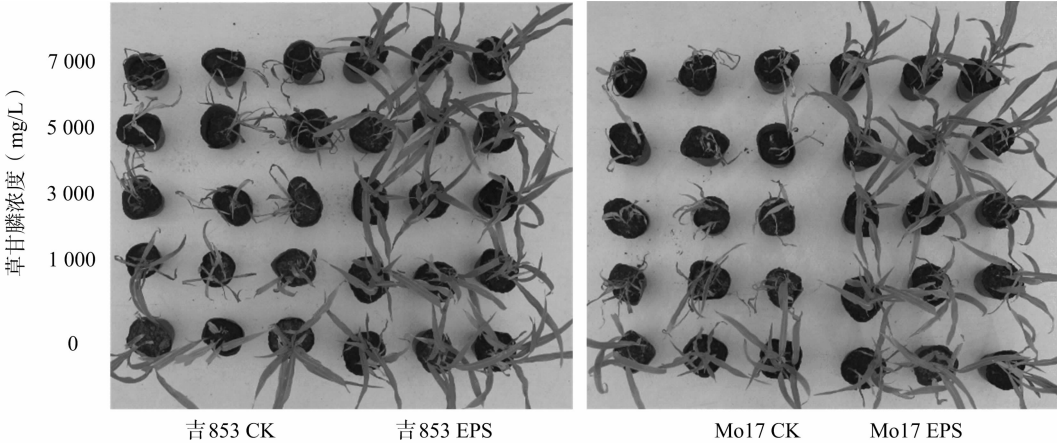


图 1 叶片喷洒草甘膦浓度试验结果

2.2 叶片离体培养法鉴定转基因植株

用含除草剂的水溶液浸泡植株叶片,可简便地鉴定转基因植株。但由于植株叶片有较大的表面张力,影响了筛选剂与叶片的接触。而在琼脂培养基上,叶片可以完全接触含有筛选剂的培养基,因此配置了含不同浓度除草剂的琼脂培养基用于叶片抗性筛选剂的鉴定。由于培养基中不含糖分,可有效地避免离体叶片上滋生细菌和真菌。为了保持叶片的鲜绿,笔者还在培养基中加入了 1 mg/L 6-BA。

随着草甘膦浓度的增加,野生型植株叶片逐渐出现褐色现象。对于玉米材料吉 853 而言,当培养基中草甘膦浓度大于 50 mg/L 时,野生型叶片全部褐化;而对于 Mo17 而言,培养基中草甘膦浓度大于 70 mg/L 时,野生型叶片大部分褐化。而转基因材料植株叶片没有明显的褐化症状,保持鲜绿色(图 2)。因此,含有 70 mg/L 草甘膦的固体培养平板即可快速鉴定玉米植株是否携带 *CP4-EPSPS* 基因。

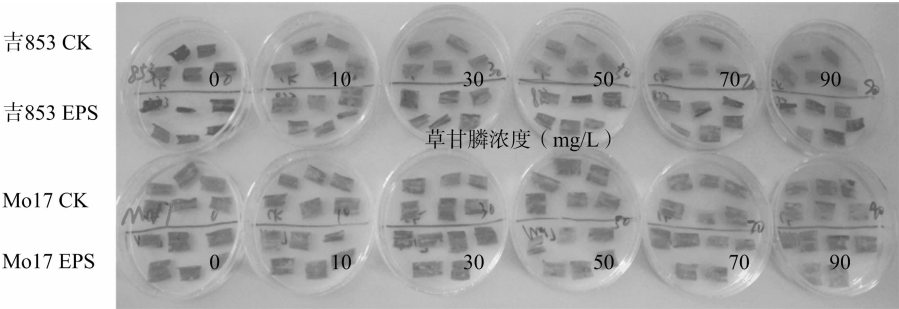


图 2 离体叶片平板培养法草甘膦浓度试验结果

2.3 转基因植株分子检测

使用试纸条检测方法对玉米吉 853 和 Mo17 叶片进行检测,结果如图 3 所示。吉 853 EPS 和 Mo17 EPS 等 2 种转基因植株叶片进试纸条检测均为阳性,吉 853 CK 和 Mo17 CK 等 2

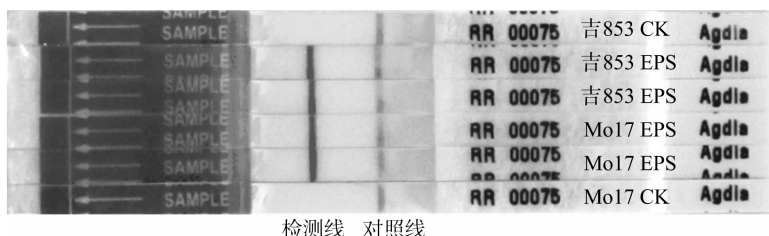


图3 CP4-EPSPS试纸条检测结果

3 结论与讨论

随着转基因玉米种植面积的日益扩大,建立标准的转基因检测方法十分必要,通常采取基因水平检测法和蛋白水平检测法^[13],但是都费时费力,在大规模、快速检测时有一定的局限性。本研究以抗除草剂转基因玉米为研究材料,建立叶片喷雾法和叶片离体培养法 2 种快速的鉴定抗除草剂转基因玉米方法。与传统的分子检测方法相比,这 2 种方法方便易行、成本低、误差小,可明显地减少转基因植株后续检测的工作量,在植物转基因领域及转基因安全检测工作中具有很好的应用前景。

叶片喷雾法及离体叶片培养法既可用于转基因植株当代的检测,又可用于转基因植株后代的检测。草甘膦是目前世界上使用量最大的农药,抗草甘膦转基因作物是世界上种植面积最广的转基因作物^[14]。5 000 mg/L 草甘膦溶液叶片喷雾可以快速杀死非转基因玉米植株,而 CP4-EPSPS 转基因玉米在草甘膦浓度达到 7 000 mg/L 时仍能正常生长;采用离体叶片培养法,70 mg/L 草甘膦浓度可以有效将 CP4-EPSPS 转基因玉米与非转基因玉米区分开来。草甘膦药效快,土壤中可快速降解,不仅广泛用于农业生产,同时在植物转基因研究中也十分重要。采用合适浓度直接喷雾或者叶片离体培养可以有效区分转化和非转化植株。由于除草剂的来源和不同作物叶片对除草剂的吸收不同,采用叶片喷雾法检测抗除草剂转基因水稻和大豆时分别需要 300、135 mg/L 草铵膦^[12]。借鉴离体叶片鉴定转基因植物水稻的经验^[15],培养基中含有 70 mg/L 草甘膦可有效区分是否为抗除草剂转基因玉米。这些不仅说明叶片喷雾法及叶片离体培养法可有效鉴定转基因材料,也说明 EPSPS 基因在玉米中表达后的确能够提高玉米对草甘膦的抗性。这些不仅说明叶片喷雾法及叶片离体培养法可有效地鉴定转基因材料,也说明 CP4-EPSPS 这个基因在玉米中表达后的确能够提高玉米对草甘膦的抗性。对采用这 2 种检测方法获得的转基因植株采用试纸条检测,结果 100% 吻合。

本研究表明,经过适宜筛选压力可有效区分转基因植株和非转基因,而且方法简单、快速、准确,特别适合于转基因后代植株的大规模筛选。该方法也有不足之处,如较老叶片对筛选剂反应不灵敏,易造成结果误判,应选取幼嫩叶片进行试验。在实际应用中,还应根据基因来源、筛选剂来源及植物材

种非转基因植株叶片试纸条检测均为阴性。这一结果与本研究检测 CP4-EPSPS 基因的 2 种方法(叶片喷雾和叶片离体培养法)的结果一致。

料不同探索适合的浓度。该方法对以除草剂为筛选标记的转基因检测是有效可行的,尤其在大规模的转基因后代检测中具有一定的实用价值,为今后转基因作物育种筛选提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] James C. 2012 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(2): 1-8.
- [2] 武淑香, 姜志磊, 孔祥梅, 等. 抗除草剂转基因玉米育种筛选方法的建立[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 155-160.
- [3] 梁雪莲, 王引斌, 卫建强, 等. 作物抗除草剂转基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2001(2): 17-21.
- [4] 段发平, 梁承邨, 黎垣庆. Bar 基因和转 Bar 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 166-172.
- [5] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物与除草剂开发及使用[J]. 农药, 2002, 41(7): 3-7.
- [6] 孙丙耀, 倪丕冲, 沈桂芳. 农作物抗除草剂基因工程[J]. 生物技术通报, 2002(6): 5-10.
- [7] 张宏军, 刘学, 张佳, 等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. 农药科学与管理, 2004, 25(4): 23-27.
- [8] 刘小红. Bar 基因的转化及抗草丁膦除草剂转基因玉米植株的获得[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(1): 25-29.
- [9] 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.
- [10] 胡海军, 史振声, 钟雪梅. 抗除草剂转基因玉米的研究进展[J]. 分子植物育种: 网络版, 2012, 10: 1185-1190.
- [11] 魏俊杰, 陈梅香, 张晓丽. 抗除草剂转基因玉米研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(14): 8012-8013, 8017.
- [12] 马林, 周练, 周正剑, 等. 抗除草剂转基因水稻和大豆快速准确检测技术研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 38(6): 647-654.
- [13] 吕山花, 邱丽娟, 陶波. 转基因植物食品检测技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2002(4): 34-38.
- [14] 苏少泉. 草甘膦述评[J]. 农药, 2005, 44(4): 145-149.
- [15] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 等. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 264, 268.
- [16] 卢涛, 李红艳, 章洁琼, 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.