

转 *bar* 基因小麦和非转基因小麦抗除草剂 鉴定方法比较

李欣 杜丽璞 殷桂香 徐惠君 林志珊 余茂云 叶兴国

(中国农业科学院作物科学研究所/国家基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物遗传育种重点实验室,北京 100081)

摘要: 方便、快捷、准确地对转基因小麦中的 *bar* 基因进行检测,对于筛选纯合稳定转基因植株、获得无筛选标记转基因植株、鉴定常规小麦品种和商品小麦中的 *bar* 基因成分等具有一定价值。本试验对叶片涂抹、植株喷洒、培养基添加除草剂 3 种方法鉴定转 *bar* 基因小麦植株的效果进行了比较,表明 3 种方法都能很好鉴定转基因小麦中的 *bar* 基因,叶片涂抹 200mg/L Liberty 鉴别的准确性高于 PCR 检测。植株喷洒 Basta 的适宜浓度为 100mg/L,喷洒 Liberty 的适宜浓度为 150mg/L,培养基添加 Bialaphos 的适宜浓度为 5~8mg/L。叶片涂抹和植株喷洒除草剂方法受环境条件影响较大,区别转基因植株和非转基因植株的标准不够明确。相比之下,成熟胚离体培养除草剂筛选不受外界环境条件的影响,具有鉴定效果直观明了、操作简单、试验周期短等优点,在检测小麦转入或飘入的 *bar* 基因方面具有潜在应用前景。

关键词: 转基因小麦; 商品小麦; *bar* 基因; 除草剂抗性; 成熟胚培养

Comparison of Different Methods for *bar* Gene Detection in Transgenic or Non-transgenic Wheat Using Herbicide as Tool

LI Xin, DU Li-pu, YIN Gui-xiang, XU Hui-jun, LIN Zhi-shan, SHE Mao-yun, YE Xing-guo

(Key Laboratory of Crop Genetic and Breeding, Ministry of Agriculture/National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: It is very useful to detect *bar* gene in transgenic and non-transgenic wheat by a method with convenience, swiftness and reliability for the screening of stable transgenic lines, development of marker-free transgenic plants, inspection of commercial wheat varieties and products. Three identification methods of leaf painting, plant spraying and mature embryos *in vitro* culture with the herbicides corresponding to *bar* gene were compared and evaluated in this study. Results indicated that transgenic or non-transgenic wheat plants and seeds with or without *bar* gene could be distinguished well by the three methods mentioned above. Application of leaf painting with 200mg/L Liberty for the confirmation of the herbicide transgenic plants was better than PCR analysis in accuracy. The optimal concentrations for plant spraying were 100mg/L for Basta and 150mg/L for Liberty, and the available amount of Bialaphos in medium for the intro mature embryos is 5-8 mg/L. However, the first two methods were influenced in some extent by environmental conditions such as temperature, light and nutrition in practice, which often led to an unclear observation in symptom for detecting the *bar* plants. In comparison, mature embryo *in vitro* culture on the medium with herbicide was less environment dependant, and showed some advantages including clear observation, easy manipulation and short time expense. Therefore, mature embryo *in vitro* culture identification was strongly suggested to be used in the detection and inspection of *bar* gene in transgenic and commercial wheat.

Key words: Transgenic wheat; *bar* gene; Herbicide resistance; Mature embryo culture

收稿日期: 2011-09-25 修回日期: 2012-05-20

基金项目: 国家转基因专项(2011ZX08010-004)

作者简介: 李欣, 大专, 研究方向: 小麦遗传转化。E-mail: xinzhx0616@163.com

通讯作者: 叶兴国, 博士, 研究员, 研究方向: 小麦生物技术育种。E-mail: yexg@mail.caas.net.cn

转化细胞的有效筛选是获得转基因植株的基础。*bar* 基因作为转基因植物研究中广泛使用的筛选标记具有独特优势,其编码产物膦丝菌素乙酰转移酶可有效水解培养基中谷氨酰胺合成酶的竞争抑制剂 PPT 及其类似物 Basta、Bialaphos、Liberty、Glu-fosinate 等,使体内谷氨酰胺合成途径正常进行,从而免除了体内氨离子积累对植物细胞的毒害^[1]。尽管编码新霉素磷酸转移酶、潮霉素磷酸转移酶、磷酸甘露糖异构酶的 *nptII*、*hpt* 和 *pmi* 等也是植物遗传转化中广泛应用的标记基因^[2-7],但小麦对卡那霉素、潮霉素等抗生素具有较高的天然抗性^[4-5],构建表达载体时利用 *nptII*、*hpt* 作为筛选标记难以获得转基因植株。相反,利用 *bar* 基因作为筛选标记对转化后的小麦外植体、愈伤组织和再生植株进行筛选的效果比较理想,在基因枪介导和农杆菌介导的小麦转基因研究中均获得了转基因植株,在所有筛选标记中转化效率最高^[2,5,8-10]。

获得小麦抗性再生植株后,通常利用 PCR、Southern 等分子手段进一步对小麦转基因植株进行鉴定、筛选和纯合^[5-10],但在规模化转基因小麦研究中,对转基因植株全部进行分子检测具有工作量大、耗时长、消耗大等缺点,其中,PCR 检测结果往往还不够稳定,影响了鉴定阳性转基因植株的准确性。所以,探索、优化一种利用除草剂对转 *bar* 基因后代植株进行快速、简便、准确、直观鉴定的方法非常必要。Zhang 等^[11]、Xing 等^[12]、Sato 等^[13]、叶兴国等^[14]利用叶片涂抹 Liberty 除草剂对获得的转基因大豆植株进行了初步筛选,然后利用 Southern 和 PCR 进行了确认,检测结果基本吻合。将叶片涂抹 Liberty 除草剂鉴定转基因大豆的方法引用到小麦中,鉴定效果也比较理想^[15]。周森平等^[16]利用 Basta 喷洒小麦 T_0 植株,对存活植株进一步进行了 NH_4^+ 含量测定和 PCR 检测,认为 Basta 喷洒有较高的准确性。尽管如此,目前还是缺乏一种快速、便捷、稳定、准确、有效鉴定小麦 *bar* 基因的方法。本研究拟对叶片涂抹、植株喷洒、培养基添加除草剂方法鉴定转 *bar* 基因阳性小麦植株的效果进行比较,分析不同方法的适用性,以确定最优方案,对小麦转基因研究和功能基因组研究具有一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 小麦材料

本研究所用的转 *GCE* 基因小麦稳定株系 Wt29 由本课题组先前利用农杆菌转化法获得(转化用表

达载体为携带 *bar* 基因的 pCAMBIA3301),已经过 Southern 杂交确认^[15];小麦品种轮选 987 由中国农业科学院作物科学研究所刘秉华研究员提供,扬麦 158 分由江苏省里下河地区农业科学研究所程顺和研究员提供;移栽成活的 T_0 候选转 *bar* 基因小麦植株由本课题组利用基因枪转化法获得(转化用表达载体为携带 *bar* 基因的 pAHC20)。

1.2 叶片涂抹除草剂

配制浓度为 200mg/L 的 Liberty® (AgrEvo, 美国) 除草剂溶液,用棉签蘸取适量除草剂溶液涂抹拔节期-开花期的小麦旗叶,在标记部位来回涂抹 5~6 次,试验于 16:00-17:00 进行,5~7d 后调查涂抹部位对除草剂的反应,确定抗性植株。

1.3 植株喷洒除草剂

小麦分蘖期和孕穗期分别用微量喷雾器喷洒除草剂,除草剂包括 Basta® (Bayer, 法国) 和 Liberty, Basta 浓度设置 80mg/L 和 100mg/L, Liberty 浓度设置 100mg/L 和 150mg/L, 试验在傍晚进行,同时设置对照,每个处理喷洒 60 株,7~10d 后调查植株生长情况。

1.4 成熟胚培养和除草剂筛选

小麦成熟种子用 70% 酒精灭菌 10min, 25% 次氯酸钠浸泡 25min, 无菌水清洗 3~5 次, 适量无菌水浸泡过夜; 然后用 25% 次氯酸钠灭菌 15min, 无菌水清洗 3~5 次, 取出成熟胚接种在 1/2MS 附加不同浓度 Bialaphos (0, 3, 5, 8mg/L) (Wako, 日本) 固体培养基 (pH 5.8) 上, 25℃、光照条件下培养 7~10d, 调查成熟胚萌发和生长情况。

1.5 基因组 DNA 提取和 PCR 检测

利用 SDS 法从移栽成活的 T_0 候选转基因植株叶片中提取基因组 DNA, 根据 *bar* 基因序列设计引物进行 PCR 检测, 上游引物序列为 5'-GCAC-CATCGTCAACCACTA-3', 下游引物序列为 5'-TCAG-CAGGTGGGTGTAGAG-3' (北京奥科鼎盛生物科技有限公司, 中国)。反应体系为 20 μ l, 其中包括 1 μ l 基因组 DNA, 0.25mmol/L dNTP, 10 μ l PCR buffer, 0.5 U Taq (Tiagen, 中国); 扩增体系为 94℃ 预变性 5min; 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环; 72℃ 10min; PCR 反应在 C-1000 Thermal Cycler 仪上进行 (Bio-Rad, 美国), 扩增片段长度为 270bp。

2 结果与分析

2.1 转 *bar* 基因 T_0 小麦植株叶片涂抹除草剂鉴定和 PCR 检测

孕穗期利用叶片涂抹 200mg/L 的 Liberty 除草剂

对基因枪介导法转化轮选 987 小麦品种获得的 241 株 T_0 候选转基因植株进行了鉴定, 并从这些候选转基因植株中提取基因组 DNA, 利用 PCR 检测进行了验证。叶片涂抹除草剂结果表明, 涂抹除草剂 5~7d 后绝大部分植株的涂抹部位表现为全部坏死, 38 株

在涂抹部位没有坏死反应(图 1-A) 抗性植株百分率为 15.77%; PCR 检测结果表明 62 株扩增出了 *bar* 基因特异条带(图 1-B) 阳性植株百分率为 25.73%, 叶片涂抹除草剂检测与 PCR 检测吻合率为 61.29%, 发现前者比后者具有更高的检测准确性。

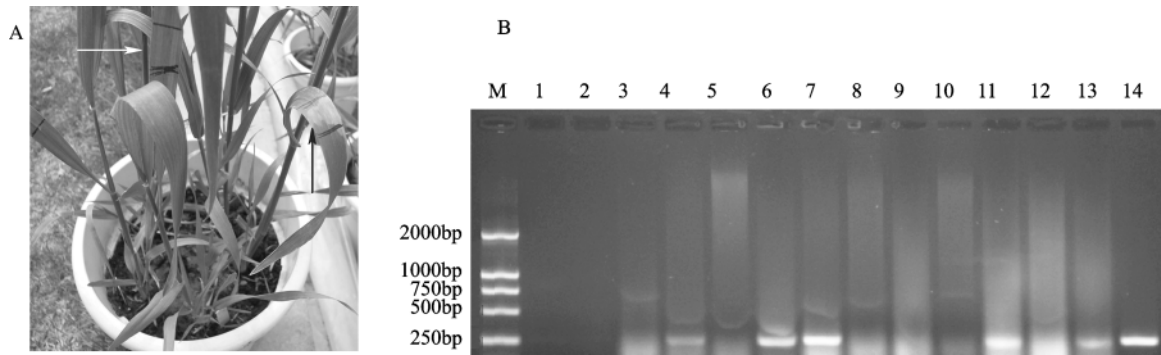


图 1 T_0 转 *bar* 基因植株叶片涂抹 Liberty 除草剂检测和 PCR 检测

Fig. 1 Leaf painting with Liberty and PCR test of transgenic T_0 plants transformed *bar* gene

A: 叶片涂抹 200mg/L Liberty 除草剂检测(水平箭头所指为抗性植株,垂直箭头所指为敏感植株);

B: PCR 检测(M: marker; 1: ddH₂O; 2: 阴性对照; 3~13; 抗性再生植株; 14: 阳性对照)

A: leaf painting with 200mg/L Liberty (resistant plant and sensitive plant pointed by horizontal and vertical arrows, respectively);

B: PCR test (M: marker; 1: ddH₂O; 2: wild type plant; 3-13: transgenic T_0 plants; 14: positive control)

2.2 转 *bar* 基因稳定小麦株系喷洒除草剂抗性表现

以拔节期的扬麦 158 植株为材料, 分别喷洒 Basta 和 Liberty 除草剂, 喷洒 7~10d 后, Basta 80mg/L 和 100mg/L 处理下分别有 54 株和 60 株表现伤害症状, 伤害率分别为 90% 和 100%, Liberty 100mg/L 和 150mg/L 处理下分别有 51 株和 60 株表现伤害症状, 伤害率分别为 85% 和 100% (图 2-A)。

结果表明, Liberty 筛选抗性植株的效果与 Basta 相当, 适宜喷洒浓度分别为 150mg/L 和 100mg/L。

进一步以 Liberty 150mg/L 喷洒分蘖期转 *bar* 基因稳定株系 Wt29 植株, 以扬麦 158 为对照, 喷洒后 10~14d 对照植株几乎全部死亡, Wt29 植株生长正常, 没有出现任何除草剂毒害症状(图 2-B), 表明 150mg/L Liberty 在苗期喷洒后筛选、鉴定抗除草剂植株的效果更明显。

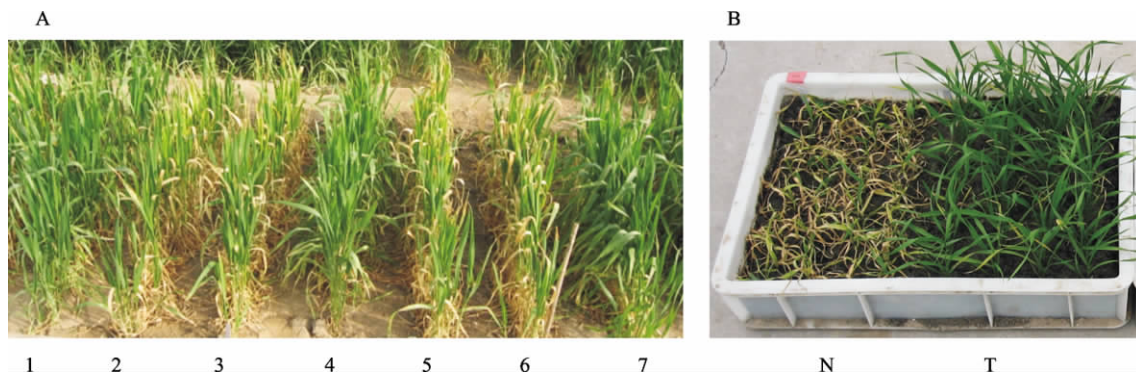


图 2 非转基因小麦植株和转 *bar* 基因小麦植株喷洒除草剂检测

Fig. 2 Plant spraying test with herbicide of non-transgenic and transgenic wheat plant with *bar* gene

A: 非转基因植株扬麦 158 拔节期喷洒不同种类和浓度除草剂(1~7: 对照处理; 2: 80mg/L Basta; 3: 100mg/L Basta; 5: 100mg/L Liberty;

6: 150mg/L Liberty); B: 转基因植株分蘖期喷洒 150mg/L Liberty 除草剂(N: 非转基因植株扬麦 158; T: 转 *bar* 基因植株 Wt29)

A: non-transgenic plants of Yangmai158 at jointing stage sprayed with different herbicide in two dosages(1~7: control Yangmai158; 2: 80mg/L Basta;

3: 100mg/L Basta; 5: 100mg/L Liberty; 6: 150mg/L Liberty); B: transgenic plants containing *bar* gene at tillering stage sprayed with 150mg/L Liberty (N: non-transgenic plants of Yangmai158; T: transgenic plants with *bar* gene, Wt29)

2.3 转 *bar* 基因稳定小麦株系成熟胚离体培养抗除草剂评价

转 *bar* 基因稳定株系 Wt29 的成熟种子灭菌后, 将成熟胚接种在含 0、3、5、8mg /L Bialaphos 培养基上培养, 以轮选 987 成熟胚为对照, 7d 后调查筛选效果, Wt29 在不同浓度 Bialaphos 培养基上没有出现伤害

症状, 根、芽生长正常(图 3); 对照在不含 Bialaphos 培养基上生长正常, 而在含 Bialaphos 培养基上根、芽生长明显抑制(图 3), 表现为根系短小、上翘, 芽粗短、停顿、缺绿。在 3mg /L Bialaphos 培养基上畸形苗的百分率为 95%, 在 5mg /L 和 8mg /L Bialaphos 培养基上畸形苗的百分率均达到 100% (表 1)。

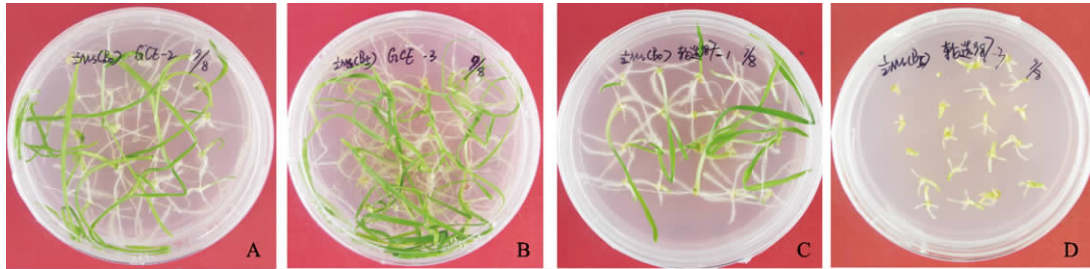


图 3 转 *bar* 基因小麦材料和非转基因小麦材料成熟胚离体培养抗除草剂检测

Fig. 3 Growth status of the mature embryos of transgenic and non-transgenic wheat on the medium with and without Bialaphos

A: Wt29 成熟胚在不含除草剂培养基上生长情况; B: Wt29 成熟胚在含 Bialaphos 5mg /L 培养基上生长情况;
C: 轮选 987 成熟胚在不含除草剂培养基上生长情况; D: 轮选 987 成熟胚在含 Bialaphos 5mg /L 培养基上生长情况

A: transgenic Wt29 on herbicide-free medium; B: transgenic Wt29 on the medium with Bialaphos 5mg /L;

C: non-transgenic Lunxuan987 on herbicide-free medium; D: transgenic Wt29 on the medium with Bialaphos 5mg /L

表 1 转 *bar* 基因小麦材料和非转基因小麦材料成熟胚在含除草剂培养基上鉴定情况

Table 1 Identification summary of the mature embryos of *bar* transgenic and non-transgenic wheat on the medium with and without Bialaphos

Bialaphos 浓度(mg /L)	转 <i>bar</i> 基因小麦(Wt29)				非转基因小麦(轮选 987)			
	Transgenic wheat with <i>bar</i> (Wt29)				Non-transgenic wheat (Lunxuan987)			
	成熟胚数 Mature embryos tested	正常苗数 Normal seedlings (NS)	畸形苗数 Abnormal seedlings	正常苗率(%) Rate of NS	成熟胚数 Mature embryos tested	正常苗数 Normal seedlings	畸形苗数 Abnormal seedlings	正常苗率 (%) Rate of NS
0	60	60	0	100	60	60	0	100
3	60	60	0	100	60	3	57	5
5	57	57	0	100	80	0	80	0
8	64	64	0	100	80	0	80	0

3 讨论

叶片涂抹除草剂、植株喷洒除草剂和成熟胚离体培养除草剂筛选 3 种方法比较, 叶片涂抹除草剂和植株喷洒除草剂受环境条件(温度、光照、风力、降水、营养等)和人为因素影响较大, 生理性病害与除草剂伤害不易区分, 往往干扰了鉴定抗除草剂植株的准确性。成熟胚离体培养除草剂筛选不受外界环境条件的影响, 鉴定效果直观明了, 而且操作比较简单, 周期也比较短。但在从共转化法获得的转基因

因分离后代群体中筛选无 *bar* 筛选标记转基因植株方面, 叶片涂抹除草剂筛选具有独特优势, 除了在除草剂涂抹部位表现症状外, 其他部位不受毒害, 候选植株可以正常生长发育和结实, 这在无 *bar* 基因筛选标记转基因大豆培育中应用比较成功^[11-14]。

转基因成分是目前进出口粮食、区域试验参试品种的主要检测目标, *bar* 基因是主要检测对象之一, 成熟胚离体培养除草剂筛选试验周期短, 不受小麦生长季节和环境条件限制, 可同时鉴定大量样品, 是检测转基因高代材料、商品小麦、常规方法衍生小

麦品种中 *bar* 基因的有效、快捷方法,具有潜在的应用前景。

除了 *bar* 基因外,在小麦遗传转化中利用的抗除草剂基因还有 *EPSPS*(5-烯醇丙酮酰草莽酸-3-磷酸合成酶基因)^[1,17-19]、*ALS*(乙酰乳酸合成酶基因)^[1,20]等。*EPSPS* 基因编码的突变型 EPSP 酶对草甘膦类除草剂(Glyphosate 或 Round up)不敏感,通过补偿被草甘膦破坏的植物内源 EPSP 酶而表现抗性^[1]。*ALS* 基因编码的突变型 ALS 酶对双草醚类除草剂不敏感,通过补偿被双草醚破坏的植物内源 ALS 酶而表现抗性^[11-14]。利用 *EPSPS*、*ALS* 作为筛选标记均有获得转基因小麦植株的报道^[17-20]。本研究针对转 *bar* 基因小麦植株建立的成熟胚离体培养除草剂筛选方法对鉴定转 *EPSPS*、*ALS* 等抗除草剂小麦具有借鉴价值。

在以 *bar* 基因作为筛选标记的小麦遗传转化研究中,基因枪轰击或农杆菌侵染后通常用 Bialaphos 2~5mg/L 对转化的外植体进行筛选,获得抗性愈伤组织和再生植株^[10,21-23]。本研究结果表明,Bialaphos 3mg/L 以下对小麦组织或器官没有明显筛选结果,Bialaphos 适宜的筛选浓度应在 3mg/L 以上,这与 Altpeter^[9]等、Zhang 等^[24]的观点一致,即在转化体筛选中需提高 Bialaphos 等除草剂的用量,以及时排除非转化细胞或愈伤组织,提高转化效率。

参考文献

- [1] 莽克强. 植物基因过程进展[M]//孙敬三,陈维伦. 植物生物技术和作物改良. 北京:中国科学技术出版社,1990:5-14
- [2] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Nat Biol Technol, 1992, 10: 667-674
- [3] Ortiz J P A, Reggiardo M I, Ravizzini R A, et al. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation [J]. Plant Cell Res, 1996, 15: 877-881
- [4] 叶兴国,徐惠君,杜丽璞,等. 小麦遗传转化中适宜选择剂浓度和标记基因的确定 [J]. 农业生物技术学报,2000(8): 71-73
- [5] Witzens B, Brettell R I, Murray E R, et al. Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment [J]. Aust J Plant Physiol, 1998, 25: 39-44
- [6] Wright M, Dawson J, Dunder E, et al. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene *pmi*, as the se-

- lectable marker [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 429-436
- [7] Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl A, et al. Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation [J]. J Cereal Sci, 2006, 43: 3137
- [8] Weeks J T, Anderson O D, Blechl A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077-1084
- [9] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants [J]. Plant Cell Rep, 1996, 16: 12-17
- [10] Pellegrineschi A, Noguera L M, Skovmand B, et al. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants [J]. Genome, 2002, 45: 421-430
- [11] Zhang Z, Xing A, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1999, 56: 37-46
- [12] Xing A, Sato S, Staswick P, et al. The use of the two T-DNA binary system to drive marker-free transgenic soybeans [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2000, 36: 456-463
- [13] Sato S, Xing A, Ye X, et al. Production of γ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean [J]. Crop Sci, 2004, 44: 646-652
- [14] 叶兴国,秦华. 通过构建三段 T-DNA 载体高频率获得无标记转基因大豆植株的研究 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(1): 138-144
- [15] 叶兴国,程红梅,徐惠君,等. 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶双价基因小麦的获得和鉴定 [J]. 作物学报, 2005, 31(5): 583-586
- [16] 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, 26(6): 935-940
- [17] Zhou H, Arrowsmith J W, Fromm M E. Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15: 159-163
- [18] Hu T, Metz S, Chay C, et al. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1010-1019
- [19] Zhou H, Berg J D, Blank S E, et al. Field efficacy assessment of transgenic roundup ready wheat [J]. Crop Sci, 2003, 43: 1072-1075
- [20] Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, et al. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1325-1331
- [21] Barro F, Rooke L, Bekes F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15: 1295-1299
- [22] 徐惠君,庞俊兰,叶兴国,等. 基因枪法向小麦导入 *Nib8* 黄花叶病毒复制酶基因的研究 [J]. 作物学报, 2001, 27(11): 688-693
- [23] Wu H, Doherty A, Jones H D. *Agrobacterium*-mediated transformation of bread and durum wheat using freshly isolated immature embryos [J]. Method Mol Biol, 2009, 478: 93-103
- [24] Zhang S, Rybszynski J J, Landenberg W G, et al. An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration [J]. Plant Cell Rep, 2000, 18: 959-966