

抗草甘膦基因 *mEPSPS* 转化油菜研究

柳 寒, 周永明*

(作物遗传改良国家重点实验室, 农业部油菜遗传育种重点实验室, 华中农业大学, 湖北 武汉, 430070)

摘要: *mEPSPS* 基因是编码 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶的抗草甘膦基因。本研究通过根癌农杆菌介导的遗传转化, 将人工合成改造的草甘膦抗性基因 *mEPSPS* 导入甘蓝型油菜品系甲 572, 获得了 4 株转基因植株。分子检测证明, 外源 *mEPSPS* 基因已整合到转基因油菜基因组中并能稳定遗传到下一代。各转基因植株中 *mEPSPS* 基因能正确表达, 但不同转化株的基因表达量之间有差异。转 *mEPSPS* 油菜自交一代在稀释 100 倍的 41% 农达异丙胺盐制剂 (含草甘膦 3 039mg/L) 喷洒条件下仍能正常生长, 而不含转基因的对照植株在稀释 200 倍农达 (含草甘膦 1 519mg/L) 之后全部死亡。

关键词: 油菜; *mEPSPS* 基因; 转基因; RT-PCR 表达分析; 农达; 抗除草剂

中图分类号: Q812; S565.403 文献标识码: A 文章编号: 1007-9084(2012)06-0582-04

Genetic transformation of rapeseed with the glyphosate-resistant gene *mEPSPS*

LIU Han, ZHOU Yong-ming*

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Key Laboratory of Rapeseed Genetics and Breeding, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Previously cloned *mEPSPS* gene [conferring glyphosate herbicide (Roundup), resistance] was introduced into a *Brassica napus* line Jia 572 by *Agrobacterium*-mediated transformation method. Molecular analysis demonstrated that 4 independent transgenic plants were obtained, and the *mEPSPS* gene was inherited to the next generation. RT-PCR analysis indicated that the *mEPSPS* gene could be successfully transcribed in transgenic rapeseed plants although the expression levels varied among different lines. Herbicide resistance assay by Roundup spray showed that the transgenic plants survived under 100-time diluted solution with commercial glyphosate-containing 41% herbicide (as 3 039mg/L glyphosate), while the wild type died even under a 200-time diluted solution.

Key words: Rapeseed; *mEPSPS* gene; Transgene; RT-PCR analysis; Roundup; Herbicide resistance

油菜是我国最重要的油料作物, 是主要的食用油、蛋白质饲料及工业原料来源之一。草害是影响油菜生长和产量的主要生物逆境之一。据报道, 我国每年有 50%~80% 的油菜种植面积发生草害, 可造成 15%~20% 的产量损失^[1]。传统栽培模式中的人工除草需大量的劳力投入, 增加了种植成本。使用选择性化学除草剂对油菜杂草控制有一定效果。但由于油菜地经常是单子叶和双子叶类杂草混生, 对施药时间和剂量要求严格, 往往难以达到理想

的效果。因此, 培育广谱非选择性的抗除草剂油菜品种十分必要。

目前生产上抗除草剂的油菜品种有两种类型。一类是通过诱变获得的抗除草剂油菜, 如从自然群体中通过连续选择获得的抗阿特拉津的油菜^[2], 以及从原生质体培养中分离出的抗绿磺隆的甘蓝型油菜自发突变体^[3]。但这两种突变体都表现出对产量的负效应^[3,4], 其在生产上的应用有一定局限性。另一类抗除草剂油菜来自生物技术育种, 主要是利用转基因手段获得的抗除草剂油菜品种, 其中影响

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 国家油菜产业技术体系 (nycytx-00503)

作者简介: 柳 寒 (1986-), 女, 湖北武汉人, 博士研究生, 主要从事油菜生物技术研究, E-mail: liuhan0603@webmail.hzau.edu.cn

* 通讯作者: 周永明, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: ymzhou@mail.hzau.edu.cn

最大的为抗草甘膦油菜^[5]。

草甘膦是一种广谱性的内吸传导型除草剂,通过抑制 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)的活性阻断莽草酸路径,使植物芳香族氨基酸合成受阻^[6,7],从而导致植物死亡。与其它除草剂相比,草甘膦具有除草效果好、环境残留低等优点,在杂草防治中应用广泛。草甘膦能被土壤颗粒紧密吸附并迅速被土壤微生物降解,其半衰期少于 30d,比大多数除草剂短^[8]。研究表明,在喷施草甘膦一个月后,土壤中的草甘膦和草甘膦的代谢产物 AMPA(氨基甲基磷酸,aminomethylphosphonic acid)的含量几乎可以忽略^[9]。目前大部分草甘膦抗性作物的抗性基因均来自农杆菌的 *CP4-mEPSPS* 基因^[10]。

作物遗传改良国家重点实验室林拥军研究组利用农杆菌介导的遗传转化,将人工合成改造的抗草甘膦基因 *CP4-EPSPS*(以下简称 *mEPSPS*)转入水稻,并证明转基因水稻具有良好的抗草甘膦特性^[11]。为了明确该基因是否可作为油菜抗除草剂的基因资源,我们通过农杆菌介导的遗传转化,将 *mEPSPS* 基因导入甘蓝型油菜,并对转基因后代进行了分子检测和抗性鉴定分析。

1 材料和方法

1.1 植物材料及试剂

转基因受体材料为甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)自交系甲 572。油菜种子用 75%乙醇浸泡 45s,0.1% HgCl₂ 消毒 10min,无菌水清洗 3 次后,播于 1/2MS 固体培养基上,置于 22~24℃ 下遮光培养。种子萌发 5d 后切取下胚轴,作为转化的外植体。

试剂:用于遗传转化筛选的草甘膦购自 Sigma-Aldrich,为高纯度的草甘膦粉末(产品目录号 P9556)。转基因植物抗性检测使用有效浓度为 41% 的农达异丙胺盐制剂(含草甘膦 303.9g/L),为孟山都公司生产。

1.2 菌株和质粒

用于油菜转化的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌系是 GV3101,含有携带 35S 启动子控制的 *mEPSPS* 基因的表达载体 pCambia1300s^[11],由作物遗传改良国家重点实验室林拥军教授提供。

1.3 遗传转化方法

取遮光条件下生长 5d 的油菜下胚轴,切成 5~7mm 长节段。用侵染悬浮液(MS + 30.0g/L 蔗糖 + 100.0μm/L 乙酰丁香酮)将培养至 OD = 0.8 的农杆菌进行重悬浮,取稀释 20 倍的悬浮液侵染下胚

轴 20min。将侵染后的下胚轴转入愈伤诱导培养基(MS + 30.0g/L 蔗糖 + 18.0g/L 甘露醇 + 1.0mg/L 2,4-D + 0.3mg/L KT + 30.0μm/L STS + 300.0mg/L Timentin + 50.0mg/L 草甘膦 + 8.0g/L 琼脂)中培养 20d,之后转入分化培养基(MS + 10.0g/L 葡萄糖 + 0.25g/L 木糖 + 0.6g/L MES + 2.0mg/L ZT + 0.1mg/L IAA + 300.0mg/L Timentin + 50.0mg/L 草甘膦 + 8.0g/L 琼脂)中培养,每 20d 继代一次。

1.4 转基因植株的 PCR 检测和 Southern 杂交

PCR 检测:取 T₀ 转基因单株叶片,采用 Edwards^[12] 方法提取植物总 DNA,以引物 P1(5'-CAGCGACGACATCCACTACAT-3')和 P2(5'-TC-CAGGACCTCAGCGAACTT-3')检测人工合成的 *mEPSPS* 基因。所用 PCR 反应条件:94℃ 预变性 3min,94℃ 变性 30s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环后,于 72℃ 延伸 5min,扩增片段为起始密码子 ATG 下游 368bp 到 1100bp,大小为 732bp,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

Southern 杂交分析:CTAB 法提取转基因植株总 DNA^[13],采用通用的 Southern 杂交程序^[14]。用于杂交分析的油菜 DNA 量为 40μg,所用探针为 P1 和 P2 引物扩增出的 *mEPSPS* 部分片段。

1.5 转基因植株的表达分析

提取转基因植株幼苗期叶片的总 RNA,使用反转录试剂盒(TransGen,北京)合成 cDNA 第一链。以甘蓝型油菜 *BnACTIN* 基因作为内标,使用 *mEPSPS* 基因的全长扩增引物 P3 和 P4 检测基因的表达(P3: ATGGCGCAGATCAGGAGCAT; P4: CTATTAGT-GCTTGCTGTACTTC)。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 90s,28 个循环后,于 72℃ 延伸 10min。

1.6 转基因植株的抗性鉴定

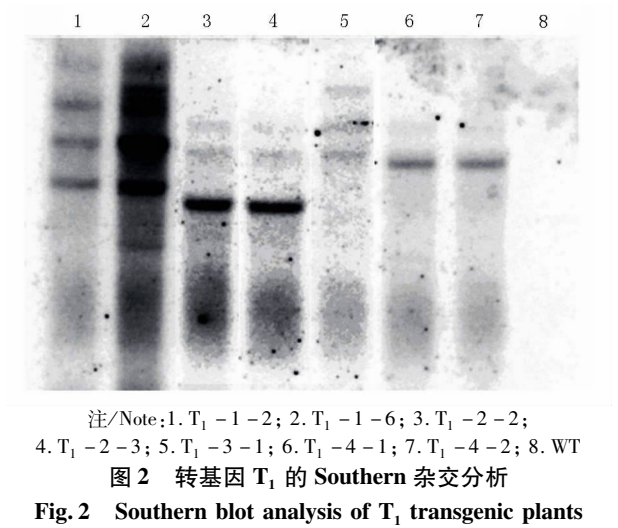
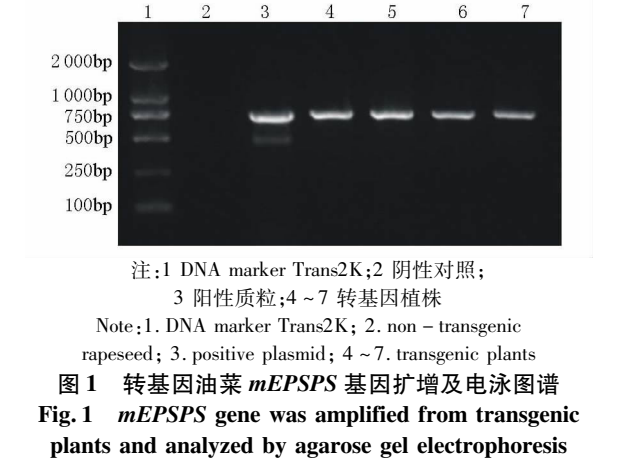
收获种子种植于 50 孔穴盘中,相同条件下播种未转化的甲 572 种子作为对照。待植株长至 4~5 片真叶时,将 41% 农达异丙胺盐制剂稀释 100 倍(含草甘膦 3039mg/L)、200 倍(含草甘膦 1519mg/L)分别进行喷洒,7d 后观察喷洒结果。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 和 Southern 杂交分析

通过转化,用 50mg/L 草甘膦筛选到 4 株再生植株,PCR 检测均为阳性(图 1)。将这些植株移入玻璃温室繁殖至 T₁。分别从 4 个株系中随机选择 2 株经 PCR 检测为阳性的单株进行 Southern 杂交分析(其中第三个株系 T₁ 只得到一株阳性单株)。单

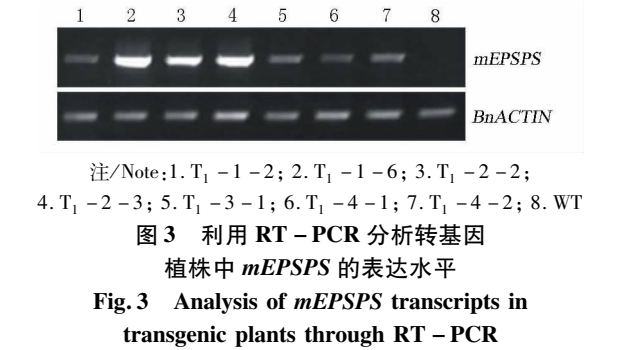
株采用 T_x - Y - A(X:繁殖代数;Y:株系编号;A:株系后代对应单株编号)格式编号。Southern 杂交结果显示,除来自第4株系的两个单株 T₁ - 4 - 1 和 T₁ - 4 - 2 为单拷贝外,其余株系后代单株均为多拷贝,且同一株系来源单株杂交带型基本一致(图2)。其中 T₁ - 1 - 2 和 T₁ - 1 - 6 杂交带型稍有差异,可能是由于拷贝数发生分离所致。Southern 的结果证明, *mEPSPS* 基因已成功整合到植物基因组中。



2.2 转基因植株的表达分析

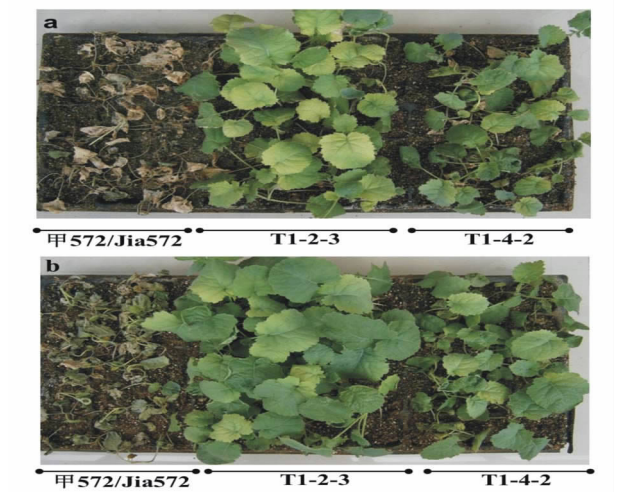
外源基因整合到植物基因组中,由于位置效应以及基因组修饰作用的存在,基因的表达往往会受到影响,表现为表达上调、下调或基因沉默。为了确定外源基因的表达水平,我们以上述 Southern 分析单株后代为材料,混合取样提取总 RNA,以甘蓝型油菜 *BnACTIN* 作为内标进行了半定量分析。结果如图3所示,野生型对照中没有检测到外源基因的表达,而各转基因株系中 *mEPSPS* 基因均能正常表达,且不同株系间基因表达量亦存在差异,但表达量的高低与拷贝数的多少无明显关系。如 T₁ - 3 - 1 为3拷贝,但其 *mEPSPS* 基因的表达量却和单拷贝

的 T₁ - 4 - 2 相当,远远低于同为3拷贝的 T₁ - 2 - 3。同一株系来源单株基因表达量基本一致,但株系1除外,其单株表达差异可能是由非共有的插入位点所造成的。



2.3 转基因植株的抗性鉴定

根据上述表达分析的结果,选择基因表达量高的 T₁ - 2 - 3 后代和基因表达量低的 T₁ - 4 - 2 后代进行抗性鉴定实验。结果显示(图4),在稀释100倍(含草甘膦3039mg/L)和稀释200倍(含草甘膦1519mg/L)的41%的农达异丙胺盐制剂喷洒条件下,非转基因对照甲572在7d后全部萎焉死亡,而 T₁ - 2 - 3 和 T₁ - 4 - 2 仍能继续生长,但生长状况存在差异。在200倍除草剂作用下, T₁ - 2 - 3 和 T₁ - 4 - 2 叶片均稍发黄,但 T₁ - 2 - 3 长势明显优于 T₁ - 4 - 2,表现为生长较快,叶片较大。随着喷洒浓



注:a 农达稀释100倍(含草甘膦3039mg/L)喷洒7d后结果;
b 农达稀释200倍(含草甘膦1519mg/L)喷洒7d后结果
甲572 为非转化株对照(转基因供体),
T₁ - 2 - 3 和 T₁ - 4 - 2 为两个独立的转基因家系
Note: a. Plants sprayed with 100 × Roundup (with glyphosate 3039mg/L) after 7d; b. Plants sprayed with 200 × Roundup (with glyphosate 1519mg/L) after 7d.
Jia 572, non-transformed control; T₁ - 2 - 3 and T₁ - 4 - 2, two independent transgenic lines

图4 转基因油菜农达抗性鉴定

Fig.4 Herbicide-resistance analysis of transgenic plants

度的提高,转基因植株叶片均大面积黄化,其中 T₁-4-2 还出现了部分叶片萎焉现象,但两个株系最终均能恢复正常生长。

3 讨论

杂草是油菜生产过程中最重要的生物胁迫之一,严重影响了油菜的产量和品质,培育和推广抗除草剂品种是解决油菜草害问题的有效途径。草甘膦是一种甘氨酸的衍生物,生产成本较低;其作为一种非选择性的内吸传导型除草剂,除草效果好,在生产上应用广泛。本实验利用农杆菌介导的遗传转化,成功的将 *mEPSPS* 基因转入冬性甘蓝型油菜,获得了抗草甘膦转基因油菜。本研究 and 前人结果^[11]表明,*mEPSPS* 在单子叶及双子叶植物中均能发挥有效的抗草甘膦效应。

有研究报道草甘膦浓度为 1 200mg/L 时就能有效杀灭杂草^[15]。本研究获得的转基因植株在草甘膦浓度为 3 039 mg/L (稀释 100 倍)的喷洒条件下仍能继续生长,表明其抗性较强。另外,基因表达量高的转基因植株抗性明显高于基因表达量低的植株,可见 *mEPSPS* 基因的表达量越高,抗性越强,这与 Ye 等^[16]的报道结果一致。如果使用更为高效的启动子,有可能进一步提高抗性。这些转基因家系的获得为确定除草剂的有效使用浓度奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘忠松,官春云,陈社员. 抗除草剂油菜研究及其进展[J]. 作物研究,2003,17(2):70-72.
- [2] Maltais B, Bouchaiw C J. Unemoutarde des oiseaux (*Brassica rapa* L.) résistante à lâtrazine[J]. Phytoprotection,1978,59:117-119.
- [3] Magha M I, Guerche P, Bregeon M, et al. Characterization of a spontaneous rapeseed mutant tolerant to sulfonyleurea and imidazolinone herbicide[J]. Plant Breed,1993,11:132-141.
- [4] Sundby C, Chow W S, Anderson J M. Effects on photosynthesis II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of serine-264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus* L. [J]. Plant Physiol,1993,103:105-113.
- [5] Gianessi L P. Economic and herbicide use impacts of

- glyphosate-resistant crops[J]. Pest Manag Sci,2005,61:241-245.
- [6] Gruys K J, Walker M C, Sikorski J A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *E. coli* [J]. Biochemistry,1992,31:5 534-5 544.
- [7] Gruys K J, Marzabadi M R, Pansegrau P D, et al. Steady state kinetic evaluation of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Arch Biochem Biophys,1993,304:345-351.
- [8] Cerdeira A L,Duke S O. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops; A Review [J]. J Environ Qual,2006,35:1 633-1 658.
- [9] Veiga F, Zapata J M, Fernandez Marcos M L, et al. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain[J]. Sci Total Environ,2001,27:135-144.
- [10] Duke S O,Powles S B. Glyphosate;a once-in-a-century herbicide[J]. Pest Manag Sci,2008,64:319-325.
- [11] 吴慧敏. 抗除草剂水稻培育及应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.
- [12] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Res,1991,19(6):1 349.
- [13] Winnepeninckx B, Backeljau T, De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from mollusks [J]. Trends in Genetics,1993,9:407.
- [14] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. J Mol Bio,1975,98:503-517.
- [15] Zhou H, Arrowsmith J W, Fromm M E, et al. Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation[J]. Plant Cell Rep,1995,15(7):159-163.
- [16] Ye G N, Hajdukiewicz P T J, Broyles D, et al. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco[J]. Plant J,2001,25(3):261-270.

(责任编辑:郭学兰)