

# 转 *EPSPS* 基因抗草甘膦棉花的遗传分析

燕树锋<sup>1,2,3</sup>, 祝水金<sup>2</sup>, 刘海芳<sup>4</sup>, 卢彩霞<sup>1,3</sup>, 铁双贵<sup>1,3</sup>

(1. 河南省农业科学院 粮食作物研究所, 河南 郑州 450002; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院 农学系, 浙江 杭州 310085;  
3. 河南省玉米生物学重点实验室, 河南 郑州 450002; 4. 济源市农业局, 河南 济源 454650)

**摘要:**为分析转基因抗草甘膦棉花早代遗传情况,以花粉管通道法获得的26个转5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因(*EPSPS*)抗草甘膦棉花转化事件为材料,以其背景亲本中棉所49为对照,喷施草甘膦后对转基因棉 $T_1$ 、 $T_2$ 分离比例进行考察。 $T_1$ 田间抗性鉴定结果表明,经卡方检测20个转化事件 $T_1$ 分离符合3:1的分离规律,即外源基因插入1个位点;6个转化事件不符合1对基因的分离规律,出现了偏分离。 $T_2$ 田间抗性鉴定结果表明,通过花粉管通道法共获得152个纯合株系,分别来源于25个转化事件;对 $T_2$ 不纯合株系继续进行分离比例的考察,发现来源于15个转化事件的57个株系符合3:1的分离规律;此外卡方检测结果表明,每个转化事件都有不符合3:1分离规律的株系,且其中10个转化事件没有符合3:1分离规律的株系。表明通过花粉管通道法获得的转基因植株中外源基因的整体和遗传均较复杂。

**关键词:**棉花;草甘膦;*EPSPS*基因;遗传分析

中图分类号:S188;S562 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)03-0054-04  
doi:10.7668/hbxb.2015.03.010

## Genetic Analysis of Transgenic Glyphosate-resistance Cotton with *EPSPS* Gene

YAN Shu-feng<sup>1,2,3</sup>, ZHU Shui-jin<sup>2</sup>, LIU Hai-fang<sup>4</sup>, LU Cai-xia<sup>1,3</sup>, TIE Shuang-gui<sup>1,3</sup>

(1. Cereal Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
2. Agronomy Department, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310085,  
China; 3. Henan Provincial Key Lab of Maize Biology, Zhengzhou 450002, China;  
4. Jiyuan Agriculture Bureau, Jiyuan 454650, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to analysis the genetic characters of transgenic glyphosate-resistance cotton with *EPSPS* gene, using the glyphosate-resistant cotton transformation events G6-1 – G6-26 as the materials, and their non-transgenic genetic background cultivar CCRI-49 as control. Field resistance test in  $T_1$  plants showed that the 20 of 26 transformation events were consistent with the ratio of 3:1 and the other transformation events were inconsistent with single-gene Mendelian inheritance according to  $\chi^2$  test. Field resistance test in  $T_2$  plants showed 152 homozygous resistance lines were obtained derived from 25 transformation events, respectively. Fifty-seven lines derived from 15 transformation events were consistent with the ratio 3:1 through the analysis of heterozygous resistance lines. Furthermore, every transformation event had lines which were inconsistent with the ratio of 3:1, and 10 transformation events did not have lines which were consistent with the ratio of 3:1. These suggested the integration and genetic mode of exogenous gene transformed by the pollen tube pathway method were complex.

**Key words:** Cotton; Glyphosate; *EPSPS* gene; Genetic analysis

棉花是我国主要的纤维和油料作物。花粉管通道技术由于具有不需组织培养过程、不受品种基因型控制、技术简单、转化速度快、育种周期短等优点,是我国棉花上最常采用的遗传转化方法之一<sup>[1]</sup>。

我国应用花粉管通道技术将抗虫基因(苏云金芽孢杆菌基因 *Bt*、豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *CPTI*、雪花莲凝集素基因 *sGNA*、修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *SCK* 等)<sup>[2-4]</sup>、品质改良基因(二脂酰甘油酰基转移

收稿日期:2015-02-06

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2015ZX08005-005)

作者简介:燕树锋(1982-),男,河南汤阴人,助理研究员,博士,主要从事植物基因工程和分子育种方面的研究。

通讯作者:祝水金(1962-),男,浙江海盐人,教授,博士,主要从事棉花分子生物学方面的研究。

酶基因 *DGAT*、蚕丝芯蛋白基因 *FIB* 和外源纤维素合酶基因 *ACS* 等)<sup>[5-8]</sup>、抗病基因(几丁质酶基因 *CHI* 和葡萄糖氧化酶基因 *GLU* 等)<sup>[9-10]</sup>、抗逆基因(雪莲拟磷脂酰乙醇胺结合蛋白基因 *PEBP*、胆碱脱氢酶基因 *BETA* 和突变的乙酰乳酸合成酶基因 *ALS* 等)<sup>[11-12]</sup>和抗除草剂基因(5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因 *EPSPS* 等)<sup>[13]</sup>等多种功能基因及其组合导入我国棉花主栽品种中,并选育成不同类型的转基因抗虫、抗除草剂、抗病、抗逆和品质改良的棉花种质系和品种,为我国转基因棉的产业化奠定了基础。

草甘膦具有高效、低毒、无残留、廉价等优点,是棉田化学除草的首选除草剂。由于自然界没有抗草甘膦的棉花种质,因此,培育转基因抗草甘膦棉花品种是棉田应用草甘膦化学除草的先决条件。目前,转基因抗草甘膦作物仍未在我国得到商业化应用,浙江大学从假单胞杆菌中克隆了抗草甘膦的 *EPSPS-G6* 基因,并通过花粉管通道技术将该基因导入中棉所 49 中,创造了转基因抗草甘膦棉花种质,这为培育和推广具有我国自主知识产权的抗草甘膦棉花品种创

造了条件。本研究以浙江大学通过花粉管通道法获得的 26 个转基因抗草甘膦棉花转化事件为材料,对转 *EPSPS* 基因抗草甘膦棉花进行遗传分析,为抗草甘膦棉花育种应用以及商业化生产提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

G6-1 ~ G6-26 是浙江大学通过花粉管通道技术将其克隆的 *EPSPS-G6* 基因导入到中棉所 49 中获得的 26 个转基因抗草甘膦棉花转化事件。95% 草甘膦原药(粉剂)由浙江新安化工集团股份有限公司生产。

### 1.2 抗草甘膦植株调查

将 95% 草甘膦原药用水配置成 20 mmol/L 的草甘膦溶液,于 3 叶期对转基因棉株进行喷施,10 d 后进行抗性株调查。 $T_1$  调查每个转化事件总株数和正常苗株数。对  $T_1$  抗性株进行自交,单株收获;第 2 年,于苗期对  $T_2$  植株喷施草甘膦,10 d 后调查每个转化事件的总株系数和纯合株系数,不纯合株系调查总株数和正常苗株数。

表 1  $T_1$  转 *EPSPS-G6* 基因棉花田间鉴定结果

Tab. 1 Field resistance identification result of the  $T_1$  transgenic cotton with *EPSPS-G6*

材料(转化事件) Material (Transformation event)	总株数 Total plants number	正常苗株数 Resistant plants number	抗性株比例/% Resistant plants percentage	3:1 分离 <i>P</i> 值 <i>P</i> value for segregation ratio of 3:1
G6-1	98	44	44.9	<0.01
G6-2	41	27	65.9	0.18
G6-3	19	14	73.7	0.89
G6-4	18	12	66.7	0.41
G6-5	71	49	69.0	0.24
G6-6	12	9	75.0	1.00
G6-7	33	23	69.7	0.48
G6-8	17	14	82.4	0.48
G6-9	22	14	63.6	0.22
G6-10	27	21	77.8	0.74
G6-11	78	56	71.8	0.51
G6-12	64	49	76.6	0.77
G6-13	81	62	76.5	0.75
G6-14	46	30	65.2	0.13
G6-15	20	11	55.0	<0.05
G6-16	29	15	51.7	<0.01
G6-17	25	15	60.0	0.08
G6-18	67	42	62.7	<0.05
G6-19	34	23	67.6	0.32
G6-20	23	15	65.2	0.28
G6-21	14	7	50.0	<0.05
G6-22	25	15	60.0	0.08
G6-23	26	17	65.4	0.26
G6-24	41	26	63.4	0.09
G6-25	35	20	57.1	<0.05
G6-26	34	21	61.8	0.07
中 49 Zhong 49	26	0	0	

1.3 统计分析

用 Excel 2007 软件进行卡方检测( $\chi^2$ )和  $P$  值计算。 $P$  值使用统计函数 CHIDIST 进行计算。

2 结果与分析

2.1 T<sub>1</sub> 转基因抗草甘膦棉花的遗传分析

由表 1 可知,对获得的 26 个转基因抗草甘膦棉花转化事件 T<sub>1</sub> 进行抗性鉴定发现,抗性株比例为 44.9% ~82.4%。其中,G6-8 的抗性株比例最高,达到 82.4%;G6-1 抗性株比例最低,为 44.9%。经卡方检测发现,20 个转化事件 T<sub>1</sub> 分离符合 3:1 的分离规律( $P>0.05$ ),即外源基因插入 1 个位点;6 个转化事件不符合 3:1 的分离规律( $P<0.05$ ),偏离孟德尔遗传规律,其原因还有待进一步分析。

2.2 T<sub>2</sub> 转基因抗草甘膦棉花的遗传分析

由表 2 可见,对获得的 26 个转基因抗草甘膦棉

花转化事件 T<sub>2</sub> 进行抗性鉴定发现,纯合株系总数为 152,分别来自 25 个转基因抗草甘膦棉花转化事件,表明这些株系各自所对应的 T<sub>1</sub> 单株为纯合单株。除 G6-8 所有 12 个株系是不纯合株系和 G6-4 所有 9 个株系是纯合株系外,其余 24 个转化事件均含有数目不等的纯合株系和不纯合株系,说明这些转化事件 T<sub>1</sub> 单株基因型有杂合的也有显性纯合的。对 T<sub>2</sub> 不纯合株系继续进行分离比例的考察,发现来源于 15 个转化事件的 57 个株系符合 3:1 的分离规律。此外,卡方检测结果表明,每个转化事件都有不符合 3:1 分离规律的株系,且 G6-2、G6-6、G6-7、G6-11、G6-19、G6-20、G6-22、G6-24、G6-25 和 G6-26 这 10 个转化事件没有符合 3:1 分离规律的株系。可见,通过花粉管通道法获得的转基因植株中,外源基因的整合和遗传均较复杂。

表 2 T<sub>2</sub> 转 *EPSPS-G6* 基因棉花田间鉴定结果  
Tab.2 Field resistance identification result of the T<sub>2</sub> transgenic cotton with *EPSPS-G6*

材料(转化事件) Material (Transformation event)	总株系数 Total lines number	纯合株系数 Homozygous lines number	不纯合株系 Heterozygous lines	
			符合 3:1 株系数 Number of lines consistent with the ratio of 3:1	不符合 3:1 株系数 Number of lines inconsistent with the ratio of 3:1
G6-1	14	4	6	4
G6-2	6	5		1
G6-3	13	10	1	2
G6-4	9	9		
G6-5	12	8	1	3
G6-6	8	7		1
G6-7	12	11		1
G6-8	12	0	10	2
G6-9	9	4	4	1
G6-10	11	4	2	5
G6-11	13	9		4
G6-12	16	9	3	4
G6-13	17	5	6	6
G6-14	15	2	4	9
G6-15	11	4	3	4
G6-16	13	5	3	5
G6-17	14	5	4	5
G6-18	16	7	3	6
G6-19	6	2		4
G6-20	11	5		6
G6-21	7	4	1	2
G6-22	11	3		8
G6-23	13	2	6	5
G6-24	14	7		7
G6-25	15	12		3
G6-26	12	9		3

### 3 结论与讨论

通过花粉管通道法获得的转基因植株,后代分离中普遍存在显性个体明显低于孟德尔比例的现象。马盾等<sup>[14]</sup>研究表明,利用花粉管通道法获得的转基因棉花,其  $T_1$  和  $T_2$  都有偏离孟德尔遗传的现象;蒋玉蓉<sup>[15]</sup>发现子房注射质粒 DNA 获得的转基因后代,其抗性和非抗性株的分离不符合孟德尔遗传规律;王守才<sup>[16]</sup>研究发现,转基因植株虽在早代有偏离孟德尔比例的现象,但三代以后趋于正常,并且在群体中稳定下来。本研究通过对花粉管通道法获得的转基因材料  $T_1$  和  $T_2$  遗传情况进行研究,发现  $T_1$  和  $T_2$  两世代均有不符合孟德尔遗传规律的现象,这与上述的研究结果一致, $T_3$  以上高世代的遗传稳定性还有待于进一步试验验证。

花粉管通道技术目前已经在棉花、大豆、玉米、小麦和水稻等 10 多种作物上得到成功应用<sup>[17]</sup>。Zhou 等<sup>[18]</sup>认为,外源基因是通过花粉管通道进入受精卵囊;邓德旺等<sup>[19]</sup>认为,外源基因导入的途径为花粉管外通道而非花粉管内通道,直接转化处于融合期无壁生殖细胞而不是受精卵;曾君祉等<sup>[20]</sup>认为,受精前后的卵细胞类似未完全酶解的原生质体,因此其转化机理应与原生质体的转化相似。对于花粉管通道技术的机理目前尚未形成定论,花粉管通道技术获得的转化植株早代的遗传不稳定性可能与其转化机理有关,但外源基因的直接导入,如采用基因枪法、PEG 法、花粉管通道法、超声波法等 10 余种遗传转化方法,均易造成阳性株比例显著降低,并产生偏离孟德尔遗传规律的现象,这或许与基因的整合部位(细胞质还是细胞核)、染色体上的整合位点、整合位点稳定性以及甲基化等造成外源基因沉默和丢失有关。

#### 参考文献:

[1] 周小云,李秋英,马 盾,等. 陆地棉花花粉管通道法的应用研究[J]. 中国棉花,2011,38(6):14-17.

[2] 谢道昕,范云六,倪万潮,等. 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B辑),1991,21(4):367-373.

[3] 郭金英. 转 *Bt* + *Sck* 双价基因抗虫棉的培育及其遗传稳定性研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.

[4] 倪万潮,郭三堆,贾士荣. 花粉管通道法介导的棉花遗传转化[J]. 中国农业科技导报,2000,2(2):27-31.

[5] 张震林,陈 松,刘正奎,等. 转蚕丝芯蛋白基因获得高强纤维棉花植株[J]. 江西农业学报,2004,16(1):15-19.

[6] 张海平,王学德,邵明彦,等. 外源纤维素合酶基因对棉纤维品质的改良作用[J]. 棉花学报,2008,20(2):110-115.

[7] 刘正杰,张 园,王玉美,等. 陆地棉 *GhDGAT1* 基因干涉载体构建与遗传转化[J]. 中国农业大学学报,2013,18(5):1-8.

[8] 王安可. *VgDGAT1* 基因在棉花中的遗传转化和表达研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.

[9] 程红梅,简桂良,倪万潮,等. 转几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因提高棉花对枯萎病和黄萎病的抗性[J]. 中国农业科学,2005,38(6):1160-1166.

[10] 王冬梅,李建平,张艳红,等. 利用转基因技术获得抗病陆地棉的初步研究[J]. 新疆农业科学,2007,44(11):108-110.

[11] 吕秀娟,危晓薇,艾秀莲,等. 新疆陆地棉转化雪莲 *XLPEBP* 基因的研究[J]. 新疆农业科学,2007,44(1):47-49.

[12] 周小云,马 盾,危小微,等. 新疆陆地棉转雪莲 *PEBP* 基因抗寒性研究[J]. 棉花学报,2009,21(1):64-66.

[13] 刘锡娟,刘昱辉,王志兴,等. 转 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(*EPSPS*)基因抗草甘膦烟草和棉花的获得[J]. 农业生物技术学报,2007,15(6):958-963.

[14] 马 盾,周小云,黄乐平. 花粉管通道法转基因棉花后代的遗传特性[J]. 西北农业学报,2008,17(3):147-149.

[15] 蒋玉蓉. 棉花遗传转化方法与耐盐、抗除草剂基因的转化利用研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.

[16] 王守才. 转基因在玉米中的规律及其稳定性的研究[D]. 北京:中国农业大学,1996.

[17] 简纯平,李开绵,欧文军. 花粉管通道法转基因育种研究进展[J]. 热带作物学报,2012,33(5):956-961.

[18] Zhou G Y, Weng J, Zeng Y S. Inheritance of exogenous DNA into cotton embryos[J]. *Methods in Enzymology*, 1983,101:433-488.

[19] 邓德旺,郭三堆,杨志民. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,1999,3(21):124-125.

[20] 曾君祉,吴有强,王东江,等. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨[J]. 科学通报. 1998,43(6):561-566.