

• 药材与资源 •

抗草甘膦半夏的获得及其草甘膦筛选体系的建立

唐俊¹, 陈敏², 刘万宏¹, 张磊³, 廖志华^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学药学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 3. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 将抗草甘膦突变基因 (*aroA-M12*) 转入半夏, 获得草甘膦抗性植株。方法 用携带植物表达载体 pASM12 的根癌农杆菌 LBA4404 对半夏进行叶盘法转化; 在选择培养基中加入 10 mg/L 草甘膦进行筛选, 获得草甘膦抗性的再生植株; 对再生植株进行 PCR 检测和草甘膦抗性实验。结果 PCR 检测表明幼叶的转化频率达 23%, 叶柄的转化频率达 33%; 对 PCR 阳性植株进行草甘膦抗性实验, 多数植株在不同程度上表现出对草甘膦的抗性。结论 本实验建立了半夏的遗传转化方法及草甘膦筛选的转化体系。为培育抗除草剂的半夏新品种及草甘膦筛选体系在半夏基因工程中的应用奠定了基础。

关键词:半夏; 根癌农杆菌; 遗传转化; 草甘膦

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0585-04

Obtaining of anti-glyphosate *Pinellia ternate* and establishment of transformation system using glyphosate as selectable marker

TANG Jun¹, CHEN Min², LIU Wan-hong¹, ZHANG Lei³, LIAO Zhi-hua¹

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To transfer the anti-glyphosate gene *aroA-M12* into *Pinellia ternate* and get transgenic plantlets with resistance to glyphosate. **Methods** *P. ternate* was transformed via *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring the plasmid pASM12; Transgenic explants were directly selected on medium containing glyphosate 10 mg/L and transgenic plantlets were confirmed by genomic PCR techniques and glyphosate resistance test. **Results** PCR Analysis showed the transformation frequency of young leaf blades was 23% and petioles was 33%; Glyphosate resistance test indicated that most transgenic plantlets could resist to glyphosate at various levels. **Conclusion** The establishment of the transformation method facilitates *P. ternate* of breeding anti-herbicide varieties of *P. ternate* and applying the glyphosate-based selection system for *P. ternate* genetic engineering.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit.; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; glyphosate

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. 是天南星科半夏属多年生植物, 以块茎入药, 具有燥热化痰、降逆止呕、消痞散结的功效, 近年来又发现其具有抗肿瘤、抗早孕、护肝降血脂的作用^[1], 社会需求量很大。在种植过程中, 杂草对半夏产量的影响相当严重, 然而使用除草剂同时也会让半夏致死^[2], 通过基因工程技术培育抗除草剂半夏可以很好地解决这个问题。草甘膦是一种高效、低毒的内吸性广谱除草

剂。草甘膦的作用机制是竞争性抑制莽草酸途径中的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶 (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS), 阻断植物体内的芳香族氨基酸的合成^[3], 从而使植物致死。Comai 等^[4]首次从鼠伤寒沙门氏菌克隆编码草甘膦不敏感型 EPSPS 的抗草甘膦突变基因 (*aroA*) 并且转化烟草获得第一个抗草甘膦转基因作物。在植物中, EPSPS 定位于叶绿体, Della 等^[5]将融合叶绿

收稿日期: 2007-07-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30500303)

作者简介: 唐俊 (1984—), 男, 江西省南昌市人, 西南大学在读硕士研究生, 从事药用植物代谢工程方面的研究。

* 通讯作者 廖志华 Tel: 86-23-68367146 Fax: 86-23-68252365 E-mail: zhiliao@swu.edu.cn

体转运肽的 *E. coli* 突变 *aroA* 基因转入短牵牛, 得到了更好的抗性。本实验将基因优化技术 (gene shuffling) 获得的高效抗草甘膦突变基因 *aroA-M12*^[6] 通过农杆菌介导转入半夏基因组, 获得了抗草甘膦的转基因半夏。

1 材料与方法

1.1 植物材料和工程菌: 本实验所用半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. 由重庆市中药研究院张明研究员惠赠; 所用工程菌为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 由本实验室保存; 携带高效抗草甘膦突变基因 *aroA-M12* 的植物表达载体 pASM12 (图 1), 由中山大学王和勇博士惠赠。该表达载体中 *aroA-M12* 是通过基因优化技术获得的高效抗草甘膦突变基因, ASP 是一段 240 bp 的拟南芥 EPSPS 叶绿体转运肽编码序列^[7]。

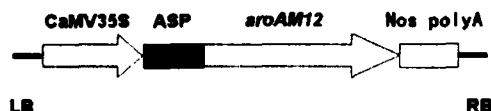


图 1 植物表达载体 pASM12 的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of plant expression vector pASM12

1.2 无菌外植体的获得: 将半夏块茎去皮, 75% 乙醇浸泡 10 min, 0.1% HgCl_2 溶液浸泡 20 min, 再用无菌水冲洗 3~5 次。切除已消毒块茎表面, 接种于生芽培养基 (M1: MS+BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L), 置于光照 3 000 lx×12 h/d、温度 25 °C 的培养箱中发芽。取展开 3 d 的幼叶切成 1 cm² 左右的叶盘, 叶柄剪成 1 cm 长小段作为外植体供转化。

1.3 工程菌的活化: 取 -70 °C 甘油保藏的菌种 100 μL 接种于 5 mL 培养基中培养至 $A_{600\text{ nm}}=1.0$ 左右; 再从中吸取 1 mL 菌液加至 50 mL 培养基中, 培养至 $A_{600\text{ nm}}=0.3$, 加入乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 至终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$; 继续培养至菌液 $A_{600\text{ nm}}=0.6$; 常温离心收集菌体, 等体积 MS 液体培养基重悬菌体并加入 AS 至终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 即可用于转化。

1.4 草甘膦筛选压的选择: 在再生培养基 (M2: MS+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L) 中分别添加草甘膦浓度为: 0、4、6、8、10、12、14 mg/L。将外植体接种于含不同浓度草甘膦的 M2, 每个质量浓度各接种 30 个叶片和叶柄。置于光照 3 000 lx×12 h/d, 温度 25 °C 的培养箱中培养, 根据外植体对草甘膦的耐受能力确定筛选压。

1.5 叶盘法转化: 外植体首先置于预培养培养基 (M3: MS+BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L) 预培养 2 d。用无菌钢针在外植体上扎出少许伤口, 在活化的工程菌中浸染 8 min, 无菌滤纸吸去外植体上的菌液; 置于共培养培养基 (M4: MS+AS 100 $\mu\text{mol/L}$), 在 25 °C 的暗箱中共培养 2 d; 共培养后用无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸吸干, 接种于选择培养基 [M5: MS+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+羧苄青霉素 (Carbenicillin, Cb) 300 mg/L+草甘膦 10 mg/L], 光照 3 000 lx×12 h/d, 温度 25 °C 培养。每 3 周继代 1 次, 以未转化的外植体作为对照。待转化苗长至高约 2 cm 时从外植体上游离, 转到生根培养基 (M6: MS+草甘膦 10 mg/L) 上生根。

1.6 转基因植株的 PCR 检测: 采用 SDS 小量 DNA 抽提法^[8], 从叶片中提取总 DNA。取 50 ng 的总 DNA, 以 *aroA-M12* 特异性引物 P1: 5'-CATGC-CATGGAATCCCTGACGTTCAA-3'; P2: 5'-CG-CGGATCCTTAGCAGGCTACTCATTC-3', 在 50 μL 的反应体系中, 按 94 °C、5 min, 94 °C、45 s, 54 °C、45 s, 72 °C、90 s, 循环 30 次; 72 °C、10 min 的程序进行 PCR 扩增, 以质粒 DNA 作阳性对照, 非转化植株 DNA 作阴性对照, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7 转基因半夏的草甘膦耐受实验: 将 PCR 检测为阳性的转基因植株洗净培养基后移栽到装有灭菌泥土的花盆中, 保鲜袋套后置于阴凉处, 一周后摘去保鲜袋。移栽成活后, 选取各转基因株系展开 7 d 以上的叶, 从叶柄基部切下, 将叶柄浸泡于不同浓度的草甘膦水溶液中, 草甘膦的浓度设置为 0、10、20、40、60、80、100、120 mg/L, 并以非转基因植株的叶作为对照。置于光照 3 000 lx×12 h/d, 温度 25 °C 的培养箱中培养, 两周后观察叶片的受损程度。然后以 0.84 kg/hm² 的用量对叶片耐受能力超过 80 mg/L 株系进行植株喷淋, 并以非转基因植株作为对照^[6]。

2 结果

2.1 外植体对草甘膦的耐受结果: 在含草甘膦的 M2 上生长 4 周, 不定芽诱导率和外植体颜色的结果见表 1。当草甘膦质量浓度低于 4 mg/L 时外植体能很好地再生; 草甘膦 10 mg/L 时外植体的再生被抑制, 基本没有不定芽生长, 但外植体没有枯黄, 为黄绿色; 草甘膦 14 mg/L 时外植体枯黄白化丧失生命力。因此, 选用 10 mg/L 草甘膦作为转化植株的筛选压力较为适宜, 能较好地抑制非转化细胞的再

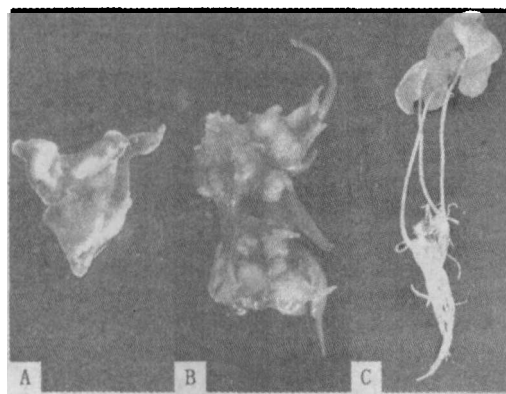
表 1 草甘膦对半夏叶片和叶柄再生的影响

Table 1 Effect of glyphosate on regeneration from leaf blades and petioles of *P. ternate*

草甘膦/ (mg · L ⁻¹)	不定芽诱导率/%		外植体颜色	
	叶片	叶柄	叶片	叶柄
0	100	100	绿色	绿色
4	97	100	绿色	绿色
6	50	57	绿色	绿色
8	10	17	黄绿	黄绿
10	7	10	黄绿	黄绿
12	1	3	黄色	黄色
14	0	0	蜡黄	蜡黄

生且又不会影响转化细胞的有效再生。

2.2 转基因半夏植株的获得:在 M5 上筛选 30 d 后,外植体伤口处的不定芽长至 2 cm 左右,从叶片和叶柄上各游离 2 cm 高的不定芽 30 株,在 M6 上生根率达 100% (图 2),又经 35 d 的生长后,转基因植株高约 8 cm。



A-未转化外植体的筛选 B-转化外植体的筛选

C-转基因植株生根

A-selection of untransformed explants B-selection of transformed explants C-rooting of transformants

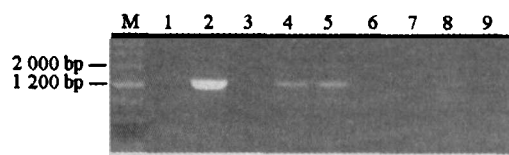
图 2 草甘膦筛选获得转基因半夏

Fig. 2 Pathway of gaining transgenic *P. ternate*

by selection system of glyphosate

2.3 PCR 检测结果:对转化植株进行 PCR 检测 (图 3),*aroA-M12* 基因扩增的片段应为 1 284 bp。PCR 检测结果表明质粒 DNA 作阳性对照能得到预期的条带,阴性对照没有任何条带。在检测的 60 株转化株中,来自叶柄的转化株有 10 株呈阳性,来自叶片的转化株有 7 株呈阳性。用叶柄作为转化受体转化效率高于幼叶,叶柄的转化频率达 33%,幼叶的转化频率只有 23%。

2.4 转基因半夏的草甘膦耐受性:为了检测转基因半夏的抗草甘膦能力,证明转基因的效果,取各独立转基因株系的叶片进行草甘膦耐受性实验。结果表明对照组在草甘膦达 20 mg/L 时开始枯黄,转基因



M-Marker ■ 1-阴性对照 2-阳性对照 3~9-各转基因植株

M-Marker ■ Lane 1-negative control Lane 2-positive control Lanes 3-9-independent transgenic plants

图 3 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR Analysis for transgenic *P. ternate*

组则能耐受 60 mg/L 以上的质量浓度,个别耐受质量浓度达 100 mg/L。对移栽的转化植株进行草甘膦 (0.84 kg/hm²) 喷淋后,转化植株能正常生长,对照植株则出现枯黄现象,表明转入 *aroA-M12* 基因的半夏对草甘膦有抗性。

3 讨论

本实验探索了半夏的农杆菌转化方法,并且建立了一个完整的转化筛选体系。通过预实验和本实验的多组对比研究发现:使用 300 mg/L 的 Cb 作为除菌剂能有效地抑制农杆菌的生长且不会影响外植体的再生,而使用现在广泛使用的头孢霉素 (Cef) 则会抑制外植体的再生;叶柄较幼叶转化率高 10%,更适宜作为遗传转化的受体;通过 1、2、3 d 的共培养时间梯度,共培养 2 d 最为合适,共培养时间过长则后期无法除菌。

目前农杆菌介导的转化研究中主要是使用抗生素抗性基因作为筛选标记,这种方法一直备受质疑,人们担心携带这类基因的转基因作物可能将其抗性基因转移到环境或肠道微生物中,导致抗生素耐受性的广泛传播。草甘膦是一种广谱除草剂,它能在土壤中迅速降解、对人畜无毒,是一种理想的筛选剂。获得抗草甘膦转基因作物的主要途径有:过量表达 EPSPS,抵抗草甘膦的竞争性抑制;导入编码草甘膦不敏感型突变 EPSPS 的基因。以抗草甘膦基因作为选择标记,将草甘膦作为筛选剂应用于基因工程,可以摆脱抗生素筛选的种种弊端,为植物基因工程提供一种安全且经济的筛选方法。本实验获得抗草甘膦半夏,为克服半夏种植过程中受杂草危害的难题提供了新手段,为半夏的经济种植打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.
- [2] 郭巧生. 半夏研究进展 [J]. 中药研究与信息, 2000, 2 (10):13-19.
- [3] Mousdale D M, Coggins J R. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedlings

- of *Pisum sativum* L. [J]. *Planta Med*, 1984, 160: 78-83.
- [4] Comail L, Facciotti D, Hiattl W R, et al. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate [J]. *Nature*, 1985, 317: 741-744.
- [5] Della-cioppa G, Bauer S C, Taylor M L, et al. Target in a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants [J]. *Biotechnology*, 1987, 5: 579-584.
- [6] He M, Yang Z Y, Nie Y F, et al. A new type of class I bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1568: 1-6.
- [7] 王和勇. 植物转化体草甘膦筛选技术平台的建立 [D]. 广州: 中山大学, 2004.
- [8] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 6: 1349.

ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物

王 翀, 周天华, 杨 雪, 郭 晶, 赵桂仿*

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘 要:目的 采用 ISSR-PCR 技术对绞股蓝属 (*Gynostemma* Bl.) 绞股蓝 *G. pentaphyllum*、五柱绞股蓝 *G. pentagynum*、心籽绞股蓝 *G. cardiospermum*、长梗绞股蓝 *G. longipes*、喙果绞股蓝 *G. yixingense*、疏花绞股蓝 *G. laxiflorum*、广西绞股蓝 *G. guangxiense* 7 种药用植物进行 DNA 分子水平鉴定。方法 CTAB 法提取绞股蓝属植物总 DNA, 以 57 条 ISSR 引物进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分析。结果 筛选出产物清晰稳定的 14 条引物, 其中引物 UBC-873 与 UBC-895 具有较高的多态性条带比率, 均可独立区分 7 种绞股蓝属植物。结论 ISSR-PCR 分析可有效区分鉴别常见绞股蓝属植物。

关键词: 绞股蓝属; ISSR; DNA 指纹图谱; 分类鉴定

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)04-0588-04

Identification of seven plants of *Gynostemma* Bl. by ISSR-PCR

WANG Chong, ZHOU Tian-hua, YANG Xue, GUO Jing, ZHAO Gui-fang

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China (Ministry of Education),

College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Objective To identify seven species of *Gynostemma* Bl., including *G. pentaphyllum*, *G. pentagynum*, *G. cardiospermum*, *G. longipes*, *G. yixingense*, *G. laxiflorum*, and *G. guangxiense*, by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Methods** General DNA was isolated from leaves of the seven species in *Gynostemma* Bl. by CTAB, 57 primers constituted by ISSR were tested for PCR and sepharose electrophoresis. **Results** Fourteen primers amplified polymorphic bands, the amplification patterns of primers UBC-873 and UBC-895 were higher in terms of polymorphic and amplified band ratio. They are used to distinguish all the examined seven species. **Conclusion** ISSR-PCR Method provides a quick, reliable molecular marker technique for the identification of different species of *Gynostemma* Bl.

Key words: *Gynostemma* Bl.; ISSR; DNA fingerprint; classified identification

绞股蓝属 (*Gynostemma* Bl.) 植物为多年生攀援草本, 包含 16 种 2 变种, 隶属于 2 亚属 2 组, 主要分布于热带亚洲地区^[1]。该属广布种绞股蓝 *G. pentaphyllum* (Thunb.) Mak. 为我国常用中药, 具有悠久的应用历史, 可全草入药, 现代药理学研究证明绞股蓝属植物含有多种皂苷, 其基本化学结构是达玛烷型, 具有抑制肿瘤、降低血脂、提高机体免疫

力、镇静止痛等作用^[2-4], 但不同种间生药形态组织及总皂苷量差别较大^[5]。由于生态环境的不断破坏, 野生绞股蓝资源日益减少, 而市场需求的不断增加, 导致国内绞股蓝药材资源来源复杂, 药材质量差异显著并且从形态学上难以区分^[6,7], 为有效利用绞股蓝属植物资源, 对该属进行分类及正确鉴定尤为重要。

收稿日期: 2007-09-10

作者简介: 王 翀 (1979—), 女, 陕西西安人, 西北大学生命科学学院博士研究生, 主要从事种质资源多样性研究。

E-mail: wangchongmail@163.com

* 通讯作者 赵桂仿 Tel: (029) 88305207 E-mail: guifang@nwu.edu.cn