西北农业学报 2002, 11(3): 17~ 20
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

卡那霉素在转基因小麦后代筛选中的应用研究*

奚亚军[1,2], 候文胜[1], 张启发[2], 路 明[1]
(1.西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100; 2.华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,湖北武汉 430070)

摘 要: 从转基因小麦后代分离群体中选择含有外源基因的目标植株是培育转基因小麦的重要环节。用卡那霉素筛选西农 1376和西农 2611小麦,结果表明,80 mg/L卡那霉素能有效抑制非转化小麦幼苗的正常生长;小麦不同基因型对卡那霉素的敏感性稍有差异;经 PCR检测,80 mg/L卡那霉素筛选出抗性苗的阳性率达到 90%。

关键词: 卡那霉素; 转基因小麦; 后代; 筛选
中图分类号: S512.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2002)03-0017-04

Application of Kanamycin in the Selection of Transgenic Wheat Progeny

XI Ya-jun[1,2], HOU Wen-sheng[1], ZHANG Qi-fa[2], LU Ming[1]
(1. College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. National Key Lab for Crop Genetics and Improvement of Huazhong Agriculture University, Wuhan Hubei 430070, China)

Abstract Selection target plant with foreign gene from transgenic wheat progeny is the key step to wheat transformation. The selection effects to wheat of Xinong1376 and Xinong2611 with Kanamycin were studied. The results showed that non-transformation wheat could be refrained effectively by Kanamycin of 80 mg/L and there was a little difference of different wheat genotype to Kanamycin. By PCR analysis in the resistant seedling to Kanamycin of 80 mg/L, the frequency of PCR positive amounted to 90%.

Key words Kanamycin; Transgenic wheat; Progeny; Selection

近年来,小麦基因工程研究进展较快,人们已采用多种途径将一些外源目的基因导入普通小麦[1]。与常规品种相似,转基因小麦在有性世代传递过程中也存在基因分离、基因丢失等。目前,通常采用β-葡萄糖苷酸酶(GUS)染色反应或 PCR-Southern杂交法从转基因小麦后代群体中筛选含有外源基因的转化植株[2]。但随着植物转化技术的不断改进,转化效率的提高,转基因小麦的数量、规模会相应增加,在庞大的转基因后代群体中利用这 2种方法进行筛选会相当困难,在实践中也不可行。因此,必须寻找一种新的筛选体系来替代 GUS染色和 PCR-Southern杂交技术。

现阶段,在向小麦导入的许多目的基因中都嵌合了新霉素磷酸转移酶基因(nptⅡ),具有抗卡那霉素的功能。利用合适浓度的卡那霉素处理转基因小麦后代种子,有可能在浸种催芽期就筛选出转基因植株[3]。为此,本实验对卡那霉素不同处理的筛选效果进行了研究,以期为卡那霉素在小麦遗传转化中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

西农 1376西农 2611和导入了抑制衰老基因 P_{SAG12}-IPT的 T_1代西农 1376,其中 P_{SAG12}-IPT基因携带卡那霉素选择标记基因。

* 收稿日期: 2002-01-18
基金项目: 华中农大作物遗传改良国家重点实验室开放课题项目,"九五"国家重点科技攻关项目。
作者简介: 奚亚军(1969-),男,陕西白水人,副研究员,主要从事小麦杂种优势及转基因研究。

1.2 卡那霉素有效筛选浓度试验

卡那霉素浓度设置为 0, 40 mg/L, 80 mg/L, 120 mg/L, 160 mg/L, 200 mg/L 六个水平,重复 3次。每个处理各取 50粒西农 1376和西农 2611种子,分置 2个皿中,70% 酒精表面消毒后,用 0.15% 氯化汞消毒 15~ 20 min,无菌水漂洗 4~ 5次。在含不同浓度卡那霉素的筛选液(筛选液为 1/2 MS)中浸种 24 h后,发芽。定期补充含相应浓度卡那霉素的筛选液,28℃下每天光照 14~ 16 h,共培养 15 d。调查发芽率、成苗数、发根数、根系长度、幼苗高度、白苗始发时期及白苗率等。

1.3 T_1代西农 **1376**卡那霉素抗性苗的 **PCR**检测

取 30粒已导入抑制衰老基因 P_{SAG12}- IPT的 T_1代西农 1376种子,消毒后,于适宜浓度的卡那霉素筛选液中进行筛选,15 d后将抗性苗移入盆栽,抽提 DNA进行 PCR检测。PCR引物依据叶片衰老启动子 P_{SAG12}序列设计,引物序列为 P_{SAG12}- R: 5′TGGCTGAAGTGATAACCGTC 3′, P_{SAG12}- F: 5′GCAAAGAGACGAGGAAGAAA 3′,扩增片段长度为 526 bp。PCR反应条件为:94℃预变性 3 min→ 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35个循环→ 72℃延伸 7 min, 4℃保存。

1.4 试 剂

卡那霉素为 Sigma公司产品,其余为国产试剂。

2 结果与分析

2.1 西农 **1376**和西农 **2611**对卡那霉素的敏感性

卡那霉素的毒性机理是与植物细胞器叶绿体和线粒体的核糖体 30S亚基结合,从而阻止翻译过程,干扰蛋白质合成,导致植物死亡[4]。由表 1可见,卡那霉素对西农 1376和西农 2611的发芽率无显著影响,对成苗数、幼苗高度则影响较大(图 1),表现为随着卡那素浓度升高,成苗数、幼苗高度降低,说明卡那霉素不影响种子萌发,却抑制芽的生长,使其成苗频率降低,生长速度减慢。

表 1 卡那霉素对小麦种子生长发育的影响

Table 1 Effects of Kanamycin on wheat seed growth

品 种 Variety	浓 度 /(mg·L⁻¹) Concentration	发芽率 /% Gemination rate	成苗数 /株 No. of Seedlings	发根数 /条 No. of roots	白苗始发日 /d White seedling starting time	15d白苗率 /% White seedling rate at 15d
西农 1376 Xinong1376	0	91.3	49.0	6.0	无白苗	0
	40	90.0	35.3	6.0	7	60.7
	80	91.7	25.3	5.7	5	100
	120	92.3	20.7	4.3	4	100
	160	89.3	17.3	4.0	1	100
	200	92.0	16.0	4.0	1	100
西农 2611 Xinong2611	0	90.7	48.3	6.0	无白苗	0
	40	91.0	39.7	6.0	8	64.0
	80	90.3	30.0	6.0	6	100
	120	90.3	26.3	5.7	4	100
	160	92.7	20.7	4.3	1	100
	200	90.0	15.7	4.0	1	100

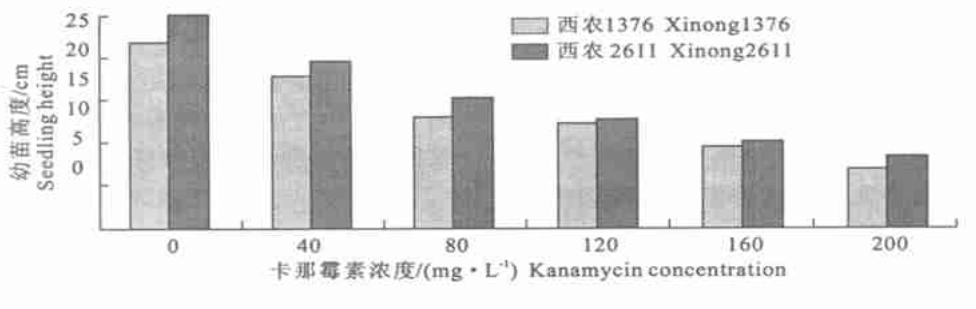


图 1 卡那霉素对幼苗高度的影响

Fig. 1 Effects of Kanamycin on seedling height

卡那霉素对根的影响与对芽的影响相同。用卡那霉素处理,西农 1376和西农 2611的根系长度都短于 CK,生长速度较 CK减慢,表现趋势为 0> 40 mg /L> 80 mg /L> 120 mg /L> 160 mg /L > 200 mg /L(图 2) ;当浓度达到 120 mg /L后,发根数目减少。

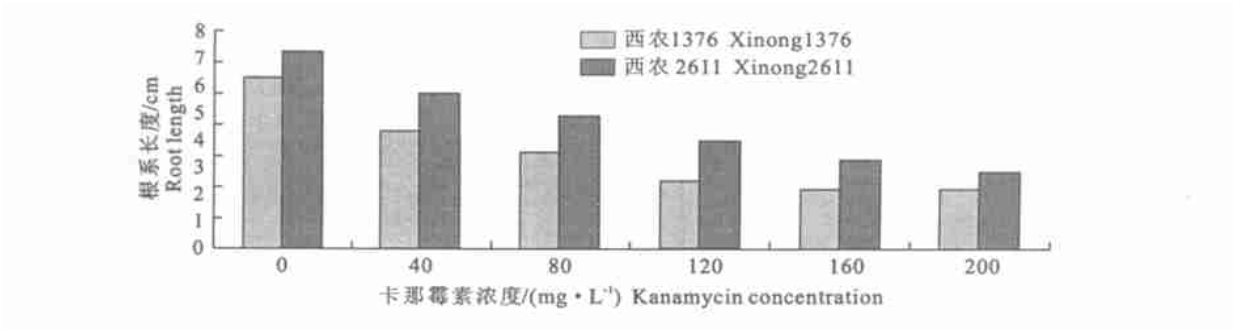


图 2　卡那霉素对根系长度的影响

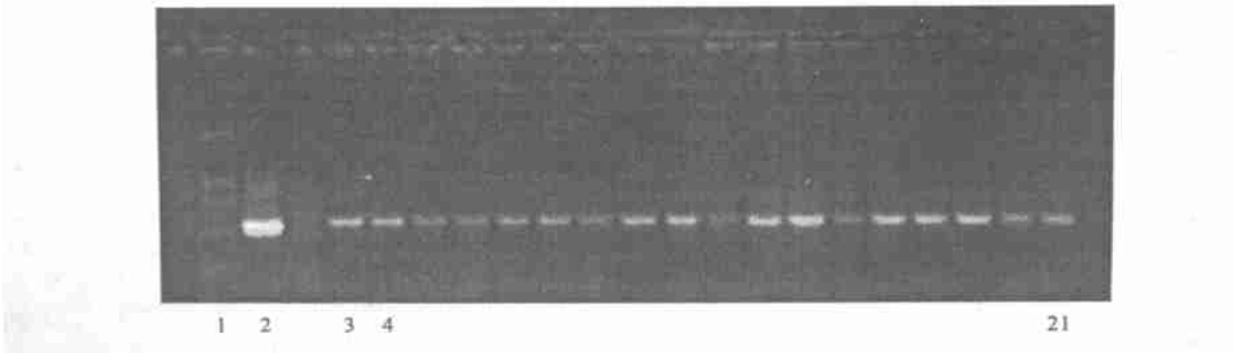
Fig. 2　Effects of Kanamycin on root length

卡那霉素不同处理间幼苗白化现象差异较大, 40 mg/L卡那霉素处理,西农 1376在第 7天、西农 2611在第 8天起出现白化苗,至培养结束,白苗率仅为 60. 7%和 64. 0%,若用其筛选转基因后代,势必容易造成非转化株的大量逃逸;当卡那霉素浓度达到 80 mg /L时,2个品种分别从第 5天、第 6天起幼苗开始失绿,至处理结束,白苗率均达到 100%,表明卡那霉素浓度达到 80 mg/L时已能完全抑制西农 1376和西农 2611幼苗的正常生长;而 160 mg /L和 200 mg /L处理, 2个品种幼苗初始就全部发生白化 (仅叶尖绿) 。根据筛选试剂选择应符合浓度低、经济安全原则,用 80 mg /L卡那霉素筛选西农 1376和西农 2611小麦转基因后代,既能有效防止非转化株的逃逸现象发生,同时又可以避免卡那霉素浓度过高对转基因植株造成的伤害。

同时,从表 1看出,西农 1376和西农 2611对卡那霉素的反应存在一定程度的基因型差异,其中,西农 1376较西农 2611对卡那霉素敏感。

2. 2　T_1代西农 1376卡那霉素抗性苗的 PCR检测

研究表明,采用 80 mg /L卡那霉素筛选 T_1代西农 1376种子 30粒,成苗 27株,其中 7株为白化苗, 20株为抗性苗,经 PCR检测, 18株为携带有目的基因片段的阳性单株 (图 1),用公式阳性率 = PCR阳性株数 /抗性苗数× 100% 计算得卡那霉素筛选出抗性苗的阳性率达到 90%;同时观察到卡那霉素抗性苗的发根数、根系长度、幼苗高度均与对照无显著差异,表明 80 mg/L卡那霉素已能有效抑制西农 1376非转化体幼苗的生长,用其对西农 1376小麦转基因后代进行筛选是完全可行的。



1~ Ladder DNA, 2~ 阳性对照, 3~ 阴性对照, 4~ 21为卡那霉素抗性苗

1~ Ladder DNA, 2~ Positive CK, 3~ Negative CK, 4~ 21~ Resistant seedlings to Kanamycin

图 3　卡那霉素抗性苗 PCR扩增结果

Fig. 3　The PCR result of resistant seedlings to Kanamycin

3　讨　论

卡那霉素对人畜和环境无害,且价格低廉,是转基因植物研究中应用最广泛的筛选试剂。一些研究认为,单子叶植物特别是一些重要的禾谷类

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作物如小麦、水稻、大麦、玉米等对卡那霉素具有较高的天然抗性,卡那霉素对其选择无效[5]。本研究用卡那霉素筛选西农 1376和西农 2611种子,结果表明,80 mg/L卡那霉素能有效抑制非转化小麦幼苗的正常生长,PCR检测 T_1 代西农 1376卡那霉素抗性苗的结果证实,用 80 mg/L卡那霉素对转基因小麦后代种子进行筛选具有可行性和有效性。这一结果对花粉管通道法转基因小麦的当代筛选也有借鉴意义。

西农 1376和西农 2611对卡那霉素的敏感性存在一定程度的基因型差异,卡那霉素对其他材料是否有同样影响,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 肖兴国,张爱民,聂秀玲.转基因小麦研究进展与展望[J].农业生物技术学报,2000,8(2):111~116.

[2] Clark M S主编.顾红雅,翟礼嘉等译.植物分子生物学实验手册[M].北京:高等教育出版社,1998.

[3] 王中华,舒庆尧,贺华龙,等. Bt转基因水稻对抗生素反应的初步研究[J].植物生理学通讯,2001,37(2):111~113.

[4] 傅荣昭主编.植物遗传转化技术手册[M].北京:中国科学技术出版社,1994.

[5] Hauptmann R M, Vasil V, Ozias-Akins P *et al*. Evaluation of selectable for obtaining stable transformants in the Gramineae[J]. Plants Physiol. 1988,86:602~606.

欢迎订阅《新疆农垦科技》

《新疆农垦科技》是由新疆生产建设兵团科学技术委员会主办的综合性农业科技期刊。为中国学术期刊(光盘)版入编及中国学术期刊网入网期刊。同时创办了自己的网上期刊:http://www.xjnkkj.com.cn

除传统的栏目:作物栽培技术、园林技术、植物保护、畜牧兽医技术、农田水利、农业机械、育种技术、科学施肥、农副产品加工与利用、新品种介绍、新技术应用、科技论坛、科技工作者建议、国外科技考察、科技新成果、科技大世界、信息选萃、开发指南、试试看等二十多个栏目外,还将增设机械采棉技术、计算机农业、农业信息技术等新栏目,以求跟上新的信息时代,为广大读者提供农业前沿技术。

本刊 2003年为大 16开本,48页,四封、插页均彩色精印。逢单月 25日出版,每期定价 3.5元,全年 6期 21.00元。邮发代号 58-86,国内统一刊号 CN65-1093/S,国际连续出版物号 ISSN 1000-361X。国外由中国国际图书贸易总公司(北京 399信箱)发行。若错过订期可直接汇款到我刊编辑部邮购,并请注明订阅年份、期数、份数。由银行汇款者,请按下面帐号信汇或电汇:帐号:1846,开户行:农行兵团支行民主路营业部。

联系地址:新疆乌鲁木齐市光明路 15号《新疆农垦科技》编辑部 邮编:830002
电话:(0991)2843108 传 真:(0991)2843108 联系人:韩海涛
网址:http://www.xjnkkj.com.cn 电子信箱:xjnkkj@mail.xj.cninfo.net

欢迎订阅 2003年《农业生物技术学报》(双月刊)

《农业生物技术学报》是中国农业生物技术学会、中国农业大学和农业部科技司联合主办的学术刊物。国内统一刊号:CN11-3342/S,邮发代号:2-367,国际连续出版号:ISSN1006-1304,国外发行代号:BM1673。本刊主要反映我国农业生物技术领域中最新的科研成果,促进国内外学术交流。主要刊登动物、植物、微生物及林业、海洋生物技术有创新的基础研究和应用研究等方面的学术论文以及重要领域的最新国内外研究进展的综述和重要问题的专家论谈。可供高等院校师生、农业科技工作者、农业领导干部等参阅。

本刊大 16开本,每期 102页左右,每期定价 12.00元。2003年改为双月刊,出版 6期,全年共 72.00元(免费邮寄)。欢迎广大读者到全国各地邮局订阅,亦可直接向编辑部订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2号中国农业大学(西校区)《农业生物技术学报》编辑部,邮编:100094。电话及传真:010-62893684。E-mail:NSJXB@mail.cau.edu.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net