

大群体转基因大麦后代快速筛选研究

李静雯¹, 张正英², 王立光¹, 陈 军¹, 朱天地¹

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所以, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以携带有潮霉素标记基因的 RNAi 转基因大麦和常规大麦为材料, 采用叶片涂抹法进行了潮霉素筛选浓度确定及转基因大麦 T2 代和回交后代的筛选和 PCR 检测。结果表明, 3 000 mg/L 潮霉素连续涂抹 3 次, 5 d 后转基因大麦涂抹区域无受害症状, 生长受害率显著低于无涂抹处理。潮霉素涂抹检测结果与其 PCR 检验结果的符合度为 96.2%, 目的基因筛选准确率可达 61.8%。表明所建立的活体幼苗潮霉素叶片涂抹法筛选转基因大麦快速, 直观、准确, 具有一定可行性。

关键词: 转基因大麦; 潮霉素; 潮霉素磷酸转移酶基因; 叶片涂抹

中图分类号: S512.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)08-0012-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.08.004

Study on Quickly Screening Large Group Transgenic Barley Progeny

LI Jingwen¹, ZHANG Zhengying², WANG Liguang¹, CHEN Jun¹, ZHU Tiandi¹

(1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Institute of Crops, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Using RNAi transgenic barley and conventional barley carrying hygromycin marker gene as experimental materials, the concentration of hygromycin screening by leaf smearing method was determined, and the screening and PCR detection of T2 generation and backcross progenies of transgenic barley were carried out. The results showed that 3 000 mg/L hygromycin was applied for three times continuously. After 5 days, no symptoms were found in the smearing area of GM barley, and the rate of growth damage was significantly lower than that of non-smearing treatment. The coincidence between the results of hygromycin smear test and those of PCR test was 96.2%, and the accuracy of target gene screening was up to 61.8%. Therefore, the hygromycin leaf smear method for screening transgenic barley was rapid, intuitive and accurate, and had certain feasibility.

Key words: Transgenic barley; Hygromycin; Hygromycin phosphotransferase gene (*hpt*); Leave painting

大麦是全球普遍栽培的第四大禾谷类作物, 不仅用途多样, 而且适应性广, 既是粮食和饲料, 也是生产啤酒的重要原料, 具有良好的耐旱性、耐寒性和耐盐性^[1], 是遗传和生理研究的模式种类^[2-3]。自 1994 年首次获得可育转基因大麦植株以来, 大麦转基因的研究发展迅速, 已成为实现基因功能验

证和作物育种的重要方法^[4-5]。随着最近高质量的大麦基因组参考序列的公布^[6-7], 为谷物的全面遗传和基因组研究提供了重要资源, 也为大量基因的功能研究提供了基础。

转基因大麦获得后, 如何快速有效地从庞大的转基因后代群体中检测出携带有目的基因的转基因植株是转基因大麦研究的重要

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 国家自然科学基金(31660391、31460350)。

作者简介: 李静雯(1979—), 女, 甘肃榆中人, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究工作。
Email: lj-lg614@163.com。

环节。基于抗生素-筛选标记基因等建立的抗生素筛选体系,由于其经济、简便、直观,对于转基因纯系种质的筛选和转基因亲本与杂交组合纯度的检测具有指导意义^[8]。大麦转化中潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt II* 是采用较多的筛选标记^[9],其产物的作用底物潮霉素B (*Hygromycin B*)是一种氨基糖苷类抗生素,通过竞争叶绿体和线粒体中的核糖体与延长因子 EF-2 的结合位点,破坏各种细胞中核糖体的功能,从而抑制蛋白的合成,使敏感组织褐化死亡^[10]。潮霉素通过干扰蛋白质合成以抑制植物生长,可以帮助筛选转化外源基因的细胞、组织和再生植株^[11-12]。利用潮霉素涂抹叶片快速筛选转基因植株的方法,在水稻与杨树中已有报道^[13-14]。在转基因大麦中关于潮霉素的研究多见于遗传转化阶段,后代规模化筛选方面的报道较少。我们开展了转基因大麦及常规品种不同浓度潮霉素叶片涂抹的鉴定,并对大群体转基因大麦及回交后代筛选效果进行了研究,以期对实现大群体转基因大麦的快速选择、加快育种进程提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试大麦品种为甘啤4号, Golden Promise, 转基因大麦9份 T2 代材料(分别为 242-01-01、242-03-01、242-06-01、242-10-01、242-17-01、242-18-01、242-20-01、242-24-01、242-02-01)以及转基因大麦与甘啤4号回交后代材料1份(RNAi-BC3)。该转基因大麦为甘肃省农业科学院生物技术研究所创制的以“Golden Promise”为受体获得的带有 *hpt* 基因的 RNAi *B-hordein* 转基因大麦^[15],甘啤4号为甘肃省农业科学院培育的优质啤酒大麦品种^[16-17],不带 *hpt* 基因。试验用潮霉素 B 由 Roche 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 潮霉素筛选浓度的确定 将甘啤4

号、Golden Promise 及以转基因大麦种植于育苗钵,在温度 25 ℃、光照/黑暗 16 h/8 h 条件下培养。根据预实验结果,共设置了 500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、4 000 mg/L 7 个潮霉素浓度。在 3 叶 1 心期将配制的 Hyg 溶液用医用棉签均匀涂抹于第 2 叶,涂抹区域 2 cm 左右,以浸润为准,连续涂抹 3 d,挂牌标记。涂抹后第 5 天观察叶片的反应,统计生长受害率,以明确潮霉素涂抹后大麦叶片的变色效果和不同类型大麦幼苗的潮霉素敏感浓度。

1.2.2 潮霉素叶片涂抹筛选法在大麦转基因后代及回交后代筛选中的验证 在确定的筛选条件下,对已导入外源基因 *hpt* 和 RNAi 构件的 9 个转基因大麦株系的 T2 代幼苗及回交后代进行抗性筛选,5 d 后统计筛选结果。剪取抗性幼苗的新鲜叶片,采用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取大麦基因组 DNA 作为模板,进行 *hpt* 和 *B-hordein* RNAi 干涉构件片段 PCR 检测。潮霉素和目的基因引物序列、反应体系和条件见文献^[18]。

抗性筛选有效率(%)=(PCR阳性株数/抗性苗数)×100%。

2 结果与分析

2.1 潮霉素涂抹后大麦叶片表现

Hyg 涂抹 5 d 后观察发现,大麦叶片涂抹区域呈现不同程度的受害症状(图1)。大麦叶片对 Hyg 处理后的最终反应程度划分为 3 个等级:Ⅰ为涂抹部位叶色正常;Ⅱ为涂抹部位叶片出现点状褐化,叶色仍为绿色;Ⅲ为涂抹部位大片褪绿,叶片黄化,严重者呈灼烧状。甘啤4号及对照 Golden Promise 涂抹区域黄化,叶片死亡,携带有 *hpt* 的转基因大麦涂抹区域叶色正常(图1-a)。

叶片Ⅲ级反应,基本上消除了叶片自身对潮霉素处理的负面效应,可作为潮霉素起始筛选的标准。



图 1 大麦叶片潮霉素涂抹结果

2.2 潮霉素筛选浓度的确定

通过表 1 可以看出, 随着筛选浓度升高, 大麦品种潮霉素涂抹区域受害程度均加重, 生长受害率上升。不同品种大麦幼苗在不同潮霉素涂抹浓度下叶片受害表现有所差异。甘啤 4 号在 2 000 mg/L 潮霉素处理后叶片发黄, 其生长受害率达 100%, 显著高于

其他处理; Golden Promise 大麦叶片在潮霉素浓度 $\leq 1\ 500$ mg/L, 叶片无伤害, 当浓度为 2 500 ~ 4 000 mg/L 时生长受害率各处理无显著差异, 但是叶片受害程度不同, 浓度为 3 000 mg/L 以上时叶片灼烧状严重。转基因大麦在 3 000 mg/L 时叶片涂抹区域无变化。因此确定以 3 000 mg/L 作为转基因大麦后代筛选浓度。

2.3 潮霉素筛选方法在大麦转基因后代及回交后代筛选中的验证

对 RNAi *B-hordein* 转基因大麦 9 个转化事件 T2 代材料共计 765 株转基因后代幼苗于 3 叶 1 心期进行 3 000 mg/L 潮霉素涂抹, 5 d 后统计筛选结果。结果显示, 404 株幼苗表现抗性, 抗性筛选有效率达 96.2%, 表明利用 3 000 mg/L 潮霉素在 3 叶 1 心期涂抹筛选转基因大麦后代是可行的。之后筛选转基因大麦与甘啤 4 号回交后代 (RNAi-BC3)83 株幼苗, 获潮霉素阳性株 42 株, 抗性筛选有效率达 66.7% (表 2, 图 2-A)。

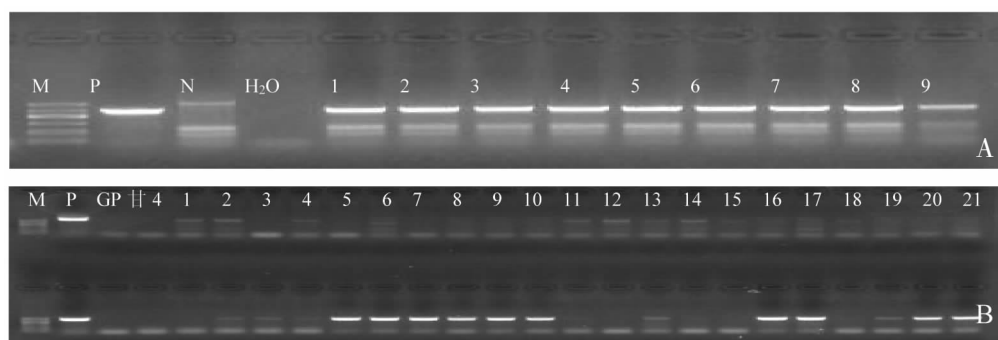
为进一步明确潮霉素 PCR 阳性株是否存在 *B-hordein* RNAi 构件, 选取 2 个转化事件共计 170 株进行目的基因正反向片段 PCR 检测, 其中 105 株检测到同时含有醇溶蛋白基因正反向片段, 表明潮霉素筛选 *B-hordein* RNAi 构件的准确率为 61.8%。回

表 1 不同大麦品种幼苗对潮霉素的敏感性

品 种	潮霉素浓度 (mg/L)	生长受害率 (%)	涂抹区黄化表现
甘啤 4 号	2 000	100 a	黄化, 面积较大
	1 500	66.7±0.06 b	明显黄化, 点状失绿
	1 000	42.9±0.06 c	失绿, 黄化明显, 个别点状失绿
	500	16.9±0.06 d	失绿, 黄化
Golden Promise	4 000	66.7±0.06 a	灼烧状, 叶片黄化死亡
	3 000	66.7±0.09 a	严重灼烧状, 大片黄化失绿
	2 500	66.7±1.50 a	灼烧状, 个别局部失绿
	2 000	33.3±0.67 b	点状褐化
转基因大麦	4 000		叶色正常, 个别点状褐化
	3 000		叶色正常

表 2 潮霉素叶片涂抹法筛选大麦转基因后代及回交后代株系抗性的筛选

株系编号	总株数 /株	Hyg 抗性株 /株	PCR 检测阳性株 /株	抗性筛选有效率 / %
242-01-01	48	40	39	97.5
242-03-01	56	36	35	97.2
242-06-01	49	15	15	100
242-10-01	46	12	10	83.3
242-17-01	49	0	0	0
242-18-01	48	33	32	97.0
242-20-01	15	0	0	0
242-24-01	71	16	16	100
243-02-01	383	252	248	98.4
RNAi-BC3	83	63	42	66.7



A: Hyg PCR 检测(917bp); 1-9: 潮霉素筛选阳性株。B: 目的基因 RNAi 构件正反向 PCR 检测。上排: 正向片段(600 bp); 下排: 反向片段(530 bp)。P: 阳性对照; N: 阴性对照; 2、4、6、11、13、17、19 为目的基因阳性株。

图 2 部分转基因大麦及回交后代 PCR 检测结果

表 3 潮霉素阳性株目的基因检测

株系编号	Hyg 阳性株 /株	目的基因检测 阳性株 /株	潮霉素筛选 准确率 / %
242-24-01	16	11	70.6
243-02-01	153	81	52.9
RNAi-BC3	42	33	75.0

交后代的目的基因检测准确率为 75.0%(表 3, 图 2-B)。

3 小结与讨论

通过对大麦活体幼苗叶片开展潮霉素涂抹筛选研究, 建立了潮霉素快速筛选大群体转基因大麦后代的方法。研究表明, 在 3 叶 1 心期采用 3 000 mg/L 的潮霉素溶液对嫩叶进行连续 3 d 的涂抹, 根据 5 d 后叶片涂抹区域受害症状可快速区分转基因植株, 潮霉素基因 PCR 检测符合度可达 96.2%, 目的基因筛选准确率可达 61.8%。该方法筛选转基因大麦后代快速、直观、准确, 可行性高。

本研究发现, 潮霉素快速选择的效果因

涂抹浓度、观测时间变化很大, 这与殷奎德等^[18]的结果一致。首先, 只有选择超过转基因大麦自身抗性范围的处理浓度(如大麦敏感型的潮霉素浓度 > 2 000 mg/L) 时, 才能进行有效筛选, 否则会增加假阳性单株的数量, 影响选择的效果。其次, 叶片生长的不同状态对潮霉素处理结果有很大影响, 新展开的叶片对潮霉素较敏感, 越老的叶片对其抗性越强, 为减少误差应于 3 叶 1 心期挑选生长一致的、完全展开的叶片为检测对象, 以提高选择的准确性。此外, 在潮霉素液中添加粘着剂(表面活性物质)涂抹效果更好。外界天气也会对涂抹效果有影响, 如果涂抹期间有雨, 最好再行补涂 1 次。

抗生素标记基因一般都与目的基因以连锁的方式构建在同一 T-DNA 上^[8], 理论上目的基因构件存在于筛选出的转基因大麦潮霉素阳性株, 但是由于 RNAi 转基因大麦目的基因 PCR 反应易于变化, 实际操作中需

要探索出适合的退火温度等反应条件以便于更好的筛选出目的基因阳性株。

伴随大量的转基因生物产生, 标记基因的安全性是转基因食品安全性关注的焦点问题之一。目前已有共转化系统法、转座子系统法、位点特异性重组系统法、重组酶系统法、外源基因清除技术及叶绿体转化技术可培育新的无选择标记的转基因作物^[8], 但这些技术只适用于新的无标记转基因植株的培育。有研究者认为可通过人工理化诱变, 将现有的已经育成有重大应用价值转基因材料中的 *hpt* 基因剔除或部分片段失活^[19]。此外, 在食品安全方面, 有研究表明潮霉素蛋白潜在致敏性很低, 在加工食品中均已不同程度的发生了降解, 对生物安全的影响很小^[20-21]。

参考文献:

- [1] 史戴文·E.扬乌尔里希. 大麦生产、改良与利用 [M]. 张国平, 邬飞波, 等译. 杭州: 浙江大学出版社, 2012: 1-3.
- [2] DAWSON I K, RUSSELL J, POWELL W. et al. Barley: A translational model for adaptation to climate change[J]. *New Phytol*, 2015(206): 913-931.
- [3] PURUGGANAN M D, FULLER D Q. The nature of selection during plant domestication[J]. *Nature*, 2009(457): 843-848.
- [4] WAN Y, LEMAUX P G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants[J]. *Plant Physiology*, 1994, 104: 37-48.
- [5] 张仲博, 张玉红, 韩凝, 等. 大麦转基因技术研究进展及其应用 [J]. *麦类作物学报*, 2011, 31(3): 560-568.
- [6] DAI F, WANG X L, ZHANG X Q, et al. Assembly and analysis of a qingke reference genome demonstrate its close genetic relation to modern cultivated barley[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018(16): 760-770.
- [7] MASCHER M, GUNDLACH H, HIMMELBACH A, et al. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome [J]. *Nature*, 2017(544): 427-433.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- [9] 韩秀丽, 王文良, 田田. 大麦转化中潮霉素和草丁膦的筛选效果研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 44(4): 525-532.
- [10] OLHOFT P M, FLAGEL L E, DONOVAN C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. *Planta*, 2003, 5: 723-735.
- [11] HIEI Y, OHTA S, TORIYAMA K, et al. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6: 271-282.
- [12] ALDEMITA RR, HODGES TK. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japonica and indica rice varieties[J]. *Planta*, 1996, 199: 612-617.
- [13] 富昊伟, 沈圣泉, 李友发, 等. 水稻穗期活体植株对潮霉素的敏感性分析及突变体选育 [J]. *核农学报*, 2012, 26(2): 198-202.
- [14] 王丹, 邹莉, 王义, 等. 杨树对潮霉素的敏感性研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2010, 32(1): 47-50.
- [15] 李静雯, 张正英, 令利军, 等. 利用 RNAi 抑制 B-hordein 合成降低大麦籽粒蛋白质含量 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(19): 3746-3756.
- [16] 徐银萍, 潘永东, 方彦杰, 等. 甘啤系列 7 个啤酒大麦品种在武威市的比较试验初报 [J]. *甘肃农业科技*, 2014(1): 6-8.
- [17] 王效宗, 潘永东, 陈富. 啤酒大麦新品种甘啤 4 号选育报告[J]. *甘肃农业科技*, 2003(3): 8-10.
- [18] 殷奎德, 张兴梅, 郑桂萍, 等. 一种快速检测转基因水稻潮霉素抗性标记的方法[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2010, 22(2): 45-48.
- [19] 李友发, 富昊伟, 陆强. 转基因及常规水稻穗期对潮霉素的敏感性[J]. *浙江农业科*

甘肃省蔬菜比较优势区域差异分析

张玉鑫¹, 潘新², 高军³, 王晓巍¹, 张俊峰¹, 马彦霞¹

(1. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业农村厅, 甘肃 兰州 730030; 3. 甘肃省统计局, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 以比较优势理论为依据, 运用综合比较优势指数法对甘肃省6类26种蔬菜在14市(州)的比较优势进行了分析。结果表明, 甘肃省蔬菜生产存在显著的区域差异, 不同市(州)具有各自的优劣势蔬菜种类。甘肃省应当按照比较优势原理, 调整各市(州)的作物种植结构, 实现蔬菜生产的合理布局 and 专业化生产, 以充分发挥蔬菜生产的比较优势。

关键词: 蔬菜; 比较优势; 区域差异; 甘肃省

中图分类号: S-03;S63-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)08-0017-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.08.005

Analysis of Differences of Vegetables' Regional Comparative Advantage in Gansu Province

ZHANG Yuxin¹, PAN Xin², GAO Jun³, WANG Xiaowei¹, ZHANG Junfeng¹, MA Yanxia¹

(1. Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Agricultural and Rural Department of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730030, China; 3. Statistics Bureau of Gansu Province, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract: Based on the theory of comparative advantage, the comparative advantage index method was used to analyze the comparative advantage of 26 kinds of vegetables in 14 cities (states) of Gansu Province. The results indicated that there were significant regional differences in vegetable production in Gansu Province, and different cities (states) had their own advantages and disadvantages of vegetable varieties. According to the principle of comparative advantage, Gansu Province should adjust the crop planting structure of each city (prefecture), realize the rational distribution and specialized production of vegetable production, so as to give full play to the comparative advantage of vegetable production.

Key words: Vegetables; Comparative advantage; Regional difference; Gansu Province

甘肃省位于中国大陆部分地理中心, 地域辽阔, 地形呈狭长状, 是中国唯一占有三大自然区(东部季风区、西北干旱区和青藏高原区)的省区。特殊的地理位置导致了省

收稿日期: 2018-12-24; 修订日期: 2019-04-28

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1506RJZA195); 国家特色蔬菜产业技术体系兰州综合试验站(CARS-24-G-25); 农业部西北地区蔬菜科学观测实验站(2015-A2621-620321-G1203-066)。

作者简介: 张玉鑫(1980—), 男, 甘肃张掖人, 副研究员, 主要从事蔬菜栽培技术研究工作。Email: zhangyuxin@gsagr.ac.cn。

通信作者: 王晓巍(1968—), 男, 甘肃宁县人, 研究员, 主要从事作物栽培与节水技术研究工作。Email: wangxw@gsagr.ac.cn。

- [20] 徐文涛, 芦云, 罗云波, 等. 潮霉素磷酸转移酶的致敏性评价研究[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 261-264.
- [21] 沈立明, 吴永宁, 张建中, 等. 不同加工条件下转基因大米潮霉素标记基因(hpt)稳定性研究[J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 431-434.

(本文责编: 陈伟)