

转基因抗虫棉种子室内筛选

张 文 刘铨义 冯 杨 逯 涛 王国平 王海娟

(新疆生产建设兵团第七师农业科学研究所, 奎屯 833200)

摘要: 为了对转基因抗虫棉后代进行简单、快速、准确地鉴定和筛选, 利用 Bt-CryI Ab/Ac 试纸条法、硫酸卡那霉素浸种法对转基因和非转基因棉花种子进行鉴定和筛选。结果表明: 3 种不同品牌的转基因试纸条检测结果完全一致, 均能快速、准确地检测出转基因和非转基因棉花种子。利用 5000mg/L 的硫酸卡那霉素将棉花种子浸泡 48h 并持续培养 10d, 通过观察棉花种子的发芽率及侧根生长情况也可有效筛选出转基因抗虫棉, 但此种方法较试纸条法检测周期长, 而且存在试验误差, 影响试验准确率。因此, 转基因试纸条法是一种更为快速、简单、准确的鉴定和筛选转基因抗虫棉植株的方法。

关键词: 转基因; 抗虫棉; 室内; 种质; 筛选

棉花是一种重要的天然植物纤维, 也是重要的经济作物。我国是世界上生产、消费与进口棉花最多的国家^[1], 因此棉花在我国农业生产中占据十分重要的地位。近些年来, 由于气候条件、生态环境、耕作制度以及种植业结构的改变, 农业害虫抗药性不断增加, 棉田害虫为害特别是棉铃虫的为害日益严重, 棉铃虫种群数量总体上呈增加趋势^[2]。化学防治是抑制棉铃虫为害的重要手段, 虽然该方法抑制效果好, 但会对环境造成严重污染, 更关键的是长期使用化学杀虫剂极易使棉铃虫产生抗药性, 导致实际生产中化学防治效果甚微^[3-4]。随着科技的不断发展, 我国开始推广种植转基因抗虫棉, 由于其能很好地控制棉铃虫的发生, 种植区域不断扩大, 到 2017 年全国转基因抗虫棉的种植面积约 280 万 hm^2 ^[5]。

转基因抗虫棉是推动我国棉花产业快速发展的重要举措, 建立一种简单、方便、快速的转基因棉花检测与鉴定方法是促进其发展的关键^[6]。卡那霉素抗性基因是目前植物遗传转化中应用最早和最广泛的一种选择标记基因, 通过阻断非转化植株叶绿体蛋白质的合成, 促使植株白化来达到鉴定与筛选的目的。李雪林等^[7]发现利用卡那霉素溶液浸种萌发法可更加简便、大量、快速地鉴定与筛选出转基因棉花植株。赵俊侠等^[8]研究发现将棉种浸泡于

150mg/L 卡那霉素中, 2~4d 后根据种子萌发长度可进行转基因抗虫棉的筛选。吕孟雨等^[9]研究认为采用卡那霉素溶液浸种是一种经济有效且准确可行的筛选含有 *npt-II* 基因的转基因棉花材料的方法。也有学者研究发现, 田间卡那霉素筛选是一种快捷的棉花转基因鉴定与筛选方法, 但可靠性低, 准确率只有 20%^[10]。此外, 田间一株一叶涂抹不仅工作量繁重, 也极易受天气环境和人为操作的影响, 从而造成鉴定结果假阳性偏多^[11]。PCR 技术也是最主要的转基因检测技术之一^[12], 但 PCR 法较复杂, 不但需要昂贵的仪器设备和专业的技术人员, 且耗时较长, 抽样量、抽样面积小也易导致漏检, 不适合大规模筛查和现场即时检测。随着科学技术的发展, 转基因试纸条技术应运而生。宁新民等^[13]提出, 试纸条检测法是一种十分有效的外源抗虫基因检测手段。张欣等^[14]采用转基因试纸条法与荧光定量 PCR 法对大批量稻谷和大米样品进行检测, 2 种方法检测结果基本一致。Mutoni 等^[15]用试纸条法和 PCR 法检测了 115 份玉米样品, 结果显示 PCR 法与蛋白质试纸条法的检测结果完全一致。因此, 本研究通过转基因试纸条法和卡那霉素室内浸种法, 摸索出一种简单、方便、快速、准确的鉴定转基因棉花的方法来满足转基因种子的鉴定与筛选需要。

1 材料与方法

1.1 供试材料 转基因抗虫棉材料为鲁棉研 24 号母本和鲁棉研 24 号父本, 由北京中农金科种业科技有限公司提供; 非转基因材料为国审棉 Z1112 和新

基金项目: 国家现代农业产业技术体系棉花产业技术体系 (CARS-15-49); 新疆生产建设兵团第七师胡杨河市财政科技项目
通信作者: 刘铨义

审棉 Z1146,由新疆生产建设兵团第七师农业科学研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 转基因试纸条检测法 选用浙江托普云农科技股份有限公司(灵敏度 1%)、上海佑隆生物科技有限公司(灵敏度 1%)和奥创生物技术(山东)有限公司(灵敏度 2ng/mL)生产的转基因试纸条进行转基因检测。将 20 粒种子磨碎至粉末状后,按照说明书的步骤进行样本处理和检测,一般 5~10min 可出结果。

阳性(有转基因)即在检测试条的检测区及质控区出现两条紫红色条带,即一条检测线和一条质控线。阴性(无转基因)表现为仅在检测试条的质控区出现一条紫红色质控线。

1.2.2 卡那霉素浸种法 供试药剂为 100 万单位(1g/mL)的硫酸卡那霉素注射液,由河北远征禾木药业有限公司生产。用蒸馏水将硫酸卡那霉素注射液分别配成 0mg/L(蒸馏水)、2500mg/L、5000mg/L、7500mg/L 的溶液,将供试的 4 种棉花种子各取 60 粒,3 个重复,分别浸泡在不同浓度的硫酸卡那霉素溶液中,放入 28℃恒温发芽培养箱中浸种 48h,然后进行沥干催芽 8h,观察棉种发芽情况。将种子按照常规沙培发芽试验的方法播种,放入 28℃恒温发芽培养箱中,于播种后 10d 观察侧根生长情况。

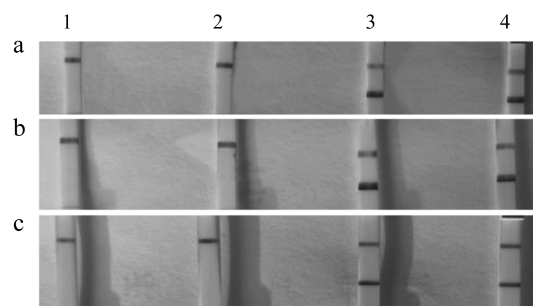
1.3 数据分析 采用 WPS office 软件进行数据处理和制表。

2 结果与分析

2.1 转基因试纸条检测 选用非转基因材料 Z1112、Z1146 和转基因抗虫棉鲁棉研 24 号父本、鲁棉研 24 号母本为材料,用 3 个品牌的 Bt-CryI Ab/Ac 试纸条对其进行检测,结果(图 1)显示 3 个品牌的试纸条检测结果完全一致,均能快速、准确地检测出非转基因材料和转基因抗虫棉材料,且准确率达到 100%,说明转基因试纸条法是一种简单、快捷、准确的转基因抗虫棉筛选方法。

2.2 硫酸卡那霉素溶液浸种后的发芽情况 由表 1 可知,以不同浓度硫酸卡那霉素溶液处理的转基因抗虫棉种子(鲁棉研 24 号父本和鲁棉研 24 号母本)浸泡后发芽率均在 90%(含)以上,而非转基因材料的种子(Z1112 和 Z1146)发芽率随着硫酸卡那霉素溶液浓度的增大而大幅度降低,当硫酸卡那霉

素溶液浓度在 5000mg/L 时,发芽率分别为 31.7%、53.3%,浓度升至 7500mg/L 时,发芽率分别仅为 16.7%、31.7%。



a:奥创生物技术(山东)有限公司转基因试纸条;
b:浙江托普云农科技股份有限公司转基因试纸条;
c:上海佑隆生物科技有限公司转基因试纸条

1: Z1112; 2: Z1146; 3:鲁棉研 24 号父本; 4:鲁棉研 24 号母本

图 1 3 种转基因试纸条对不同棉花品种的检测结果

表 1 硫酸卡那霉素对棉花种子发芽情况的影响

品种	卡那霉素浓度 (mg/L)	发芽数	发芽率 (%)
Z1112	0	20.0	100.0
	2500	12.3	61.7
	5000	6.3	31.7
	7500	3.3	16.7
Z1146	0	20.0	100.0
	2500	16.7	83.3
	5000	10.7	53.3
	7500	6.3	31.7
鲁棉研 24 号父本	0	20.0	100.0
	2500	19.3	96.7
	5000	18.7	93.3
	7500	18.0	90.0
鲁棉研 24 号母本	0	20.0	100.0
	2500	19.0	95.0
	5000	18.3	91.5
	7500	18.0	90.0

2.3 硫酸卡那霉素溶液浸种后侧根生长情况 由图 2 可知,培养 10d 后,不同浓度硫酸卡那霉素溶液处理的转基因抗虫棉均有幼苗长出侧根,硫酸卡那霉素溶液浓度在 5000mg/L 时,鲁棉研 24 号父本和鲁棉研 24 号母本分别有 79.2%、72.4% 的棉种有侧根长出,当硫酸卡那霉素溶液浓度达到 7500mg/L

时,仅有 27.9%、46.0% 的棉种有侧根长出。而非转基因材料随着硫酸卡那霉素溶液浓度的增加侧根长出比率急剧下降,当硫酸卡那霉素溶液浓度在 5000mg/L 时,Z1112 和 Z1146 仅有 5.6%、9.7% 的棉种有侧根长出,至 7500mg/L 时,2 份材料均无侧根长出。因此,用 5000mg/L 的硫酸卡那霉素溶液浸种 48h,并持续培养 10d,可根据侧根发生情况有效筛选出转基因棉花。

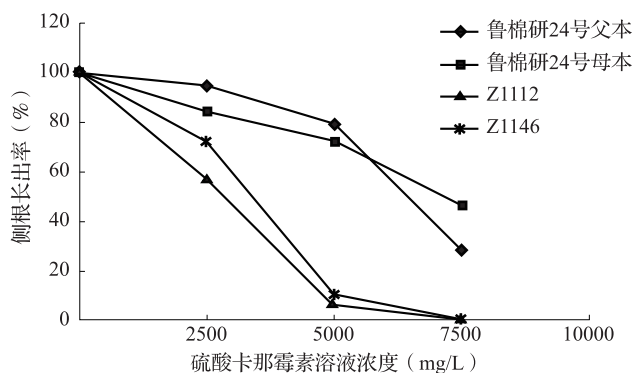


图2 硫酸卡那霉素溶液处理对棉花侧根长出比率的影响

3 结论与讨论

对后代进行筛选和鉴定是转基因抗虫棉育种的首要工作,因此,建立一种快速、准确、成本低廉的转基因抗虫棉筛查方法十分必要。目前,关于转基因棉花的筛选已有许多报道,大多都是在田间利用卡那霉素溶液对叶片进行涂抹,这种方法不仅工作量大,而且受季节的局限^[16]。针对上述情况,有学者开始在室内利用卡那霉素进行转基因植株的后代筛选,李雪林等^[7]研究发现 100mg/L 卡那霉素溶液能显著抑制非转基因棉种的萌发和下胚轴的伸长;经 PCR 验证,筛选出的棉种阳性率达到 95% 以上。王彦霞等^[16]提出了 3 种可在室内快速筛选与鉴定转基因抗虫棉的方法,但都是基于叶片对卡那霉素溶液产生的黄化反应,而且试验的工作量也比较大。寇伟等^[17]研究发现 5000mg/L 卡那霉素溶液浸种后通过观察棉种的侧根生长情况可较为准确、快速地筛选出转基因棉花。孙锋等^[6]研究认为将棉种浸泡在浓度为 4000mg/kg 的卡那霉素溶液中 48h 可快速筛选出转基因种子。本研究结果与上述结果基本类似,用 5000mg/L 的硫酸卡那霉素溶液浸种 48h,并持续培养 10d,可有效筛选出转基因棉花。但也有学者认为利用卡那霉素浸种法筛选转基因种子

受诸多因素影响,如:培养基质、药剂处理方式、卡那霉素浓度、溶液体积、种子数甚至籽粒的饱满程度、浸种时间、遗传背景等都会对筛选效果有很大影响^[18]。

本研究还进行了转基因试纸条检测,结果显示 3 个品牌的试纸条检测结果完全一致,均能快速、准确地检测出转基因抗虫棉材料,整个检测过程只需要 10~15min,且不需要专业的技术人员,对实验的条件要求也不严格,而相对来说,卡那霉素浸种法的检测周期更长,而且存在试验误差,影响试验准确率。因此,转基因试纸条法是一种更为快速、准确的鉴定和筛选转基因抗虫棉植株的方法。随着转基因试纸条技术的不断成熟和发展,其有望在我国转基因植株筛选和鉴定方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 刘洋. 棉花进口企业国际采购策略研究——以江苏省农垦棉业有限公司为例. 南京:东南大学,2016
- [2] 陆宴辉,姜玉英,刘杰,曾娟,杨现明,吴孔明. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. 应用昆虫学报,2018,55(1): 19-24
- [3] 赵肖飞. 棉铃虫田间种群的抗性监测及 GABA 受体的敲除对杀虫剂毒力的影响. 南京:南京农业大学,2017
- [4] 张丹丹,杨现明,陆宴辉,梁革梅. 六种杀虫剂对棉铃虫的毒力效果比较. 应用昆虫学报,2018,55(1): 61-66
- [5] 吴孔明,肖玉涛. 转入抗虫基因减少农药使用——转基因抗虫棉的环境安全和风险管控. 人与生物圈,2018(6): 44-46
- [6] 孙锋,张宽朝,林毅. 转基因棉花中 Bt 蛋白鉴定方法的研究现状. 中国农学通报,2006,22(7): 98-100
- [7] 李雪林,梁华. 基于卡那霉素浸种萌发的转基因棉花后代的快速筛选. 分子植物育种,2014,12(6): 1159-1162
- [8] 赵俊侠,陈耕,潘转霞,郭海莉,夏芝,孙振纲,朱永红,胡晓丽. 一种快速批量转 Bt 基因抗虫棉杂交后代的筛选方法. 山西农业科学,2018,46(11): 1792-1793
- [9] 吕孟雨,杨帆,董福双,柴建芳,赵和,刘永伟,周硕,王海波. 卡那霉素筛选转基因棉花技术研究. 湖南农业科学,2019,401(2): 9-11
- [10] 厚毅清,李忠旺,石有太,欧巧明,罗俊杰,陈玉梁. 大规模转基因彩色棉花后代筛选方法研究. 中国棉花,2012,39(4): 22-25
- [11] 孙敬,唐灿明,袁小玲,朱协飞,张天真. 利用卡那霉素间接鉴定法进行大规模的棉花转基因育种技术. 棉花学报,2000,12(5): 270-276
- [12] 邓汉超,尹长城,刘国振,林健荣,邓平建. 转基因植物核酸成分检测技术研究进展. 中国生物工程杂志,2011,31(1): 86-95
- [13] 宁新民,孔庆平,阿里甫,美丽古丽,陈全家,孔杰,赵其波,朱家辉. 新疆海岛棉抗虫转基因棉花的筛选及抗虫鉴定 // 中国棉花学会,中国农业大学. 中国棉花学会 2009 年年会论文汇编. 北京:中国棉花学会,2009,121-124

鲁中地区糯质谷子品种引种适应性评价

巩法江 李娜 杨平 陈昱利 毕海滨 高明慧 王东峰 卓玛 齐贵 巩素霞

(山东省淄博市农业科学研究院, 淄博 255000)

摘要:糯质谷子胚乳中直链淀粉含量低,支链淀粉含量高,是加工小米黄酒、小米醋的最佳选材。为了传承和发扬传统饮食文化,促进谷子产业健康快速发展,更好地助力乡村振兴,依托“特色功能性谷子品种选育及加工利用研究”项目,从全国各农院所引进收集了19份糯谷种质资源进行了品种适应性试验,以期筛选出优质、高产、抗逆性强、适宜本地区种植的糯质谷子品种。试验结果表明济糯米2号每667m²籽粒产量为372.69kg,在参试品种中最高,比对照品种豫谷18增产27.53kg,增产率达7.98%;汾特5产量最低,为206.68kg,比对照减产138.48kg,减产率为40.12%。通过对各参试品种的产量、农艺性状、抗病性、抗逆性等进行综合分析,济糯米2号、济谷18和李渠黑谷表现较好,适宜在鲁中地区推广种植。

关键词:鲁中地区;糯质谷子;适应性评价

谷子脱壳为小米,小米主要成分是淀粉,含量在50%~60%之间,由直链淀粉和支链淀粉组成^[1]。研究发现,直链淀粉和支链淀粉的不同比例将直接影响到米饭质地和蒸煮品质^[2],直链淀粉比例低,米饭黏性大、柔软、有光泽;支链淀粉亲水基多,能增加小米饭的甜味和黏性^[3]。淀粉结构和性质不仅在一定程度上决定了小米的食品品质,还直接影响加工品质^[4]。

谷子的糯和非糯从理化性质上以直链淀粉含量的高低来确定,直链淀粉含量在2%以下的为糯谷^[5]。糯谷胚乳中直链淀粉含量低,支链淀粉含量高,米饭柔软、有光泽、黏度大、口感较好^[6],而且糯小米比普通小米淀粉分子量小20多倍,食用消化率高20%以上,在国外糯小米有“营养之王”之称^[7]。同时,糯谷也是加工小米黄酒、小米醋及许多传统食品的最佳选材,糯质谷子以其优良的加工性能、高营养价值和高消化速度越来越受到人们的欢迎^[8-9]。但长期以来糯质谷子生产不受重视,种植面积小,品

种混杂、退化严重,产量水平较低。

目前鲁中地区种植的糯谷多为传统地方品种,产量、抗倒伏及抗病性等相对较差,已无法满足实际生产的需求。为了传承和发扬传统饮食文化,促进谷子产业健康快速发展,更好地助力乡村振兴,课题组依托“特色功能性谷子品种选育及加工利用研究”项目的实施,对从全国各农院所引进收集的19份糯谷种质资源进行了品种适应性试验,希望通过引种和田间鉴定,筛选出产量高、品质优、抗逆性强、株型好的糯谷品种进行推广种植,满足本地小米黄酒、小米醋等产品生产的原料需求,同时通过对糯质谷子种质资源各项性状的深入研究,了解其遗传特性,为糯质谷子新品种的选育提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料为近年来从各地科研院所收集的19个糯谷品种,分别为汾特5、汾特6、黄软谷、神木酒谷、龙爪酒谷、子洲毛酒谷、岚县酒谷、济谷18、王村红谷、济糯米2号、贵州糯谷、赤峰糯谷、长治糯谷、长治红糯谷、红酒谷、李渠黑谷、茶圪

基金项目:淄博市重点研发计划(2019gy010022)

通信作者:杨平

[14] 张欣,彭毛,刘波,魏建林.快速试纸条在转基因水稻和大米检测中的应用.粮食科技与经济,2015,40(5):48-49

[15] Mutoni C K, Magiri E, Boga I H, Mugos, Gichuki S T. Inadvertent presence of genetically modified elements in maize food products in Kenyan markets. African Journal of Biotechnology, 2013, 12(31): 4881-4890

[16] 王彦霞,吴立柱,王省芬,马峙英.含NPTII标记基因的转基因抗

虫棉室内快速鉴定方法.棉花学报,2007,19(2):134-138

[17] 寇伟,李榕,陈英杰,崔百明,郑银英.转基因棉花室内种质筛选新方法研究.中国棉花,2014,41(2):22-26

[18] 董福双,高义平,吕孟雨,柴建芳,王海波.利用卡那霉素“浸种法”准确筛选转基因小麦种子的方法研究.麦类作物学报,2013,33(6):1105-1110

(收稿日期:2022-04-06)