

卡拉霉素在转基因黄籽油菜中的应用^①

林 呐^{1,2}, 刘列钊^{1,2}, 周清元^{1,2},
孙 伟^{1,2}, 陈历晨^{1,2}, 李加纳^{1,2}

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆, 400715; 2. 重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400715

摘要: 为筛选出黄籽油菜遗传转化中卡拉霉素或卡拉霉素(kanamycin, Kan or km)最佳质量浓度, 首先将油菜子叶接种在不同质量浓度 Kan(0~180 mg/L)的分化培养基上, 结果发现 Kan 质量浓度小于 60 mg/L 有利于绿苗分化. 然后在不同质量浓度 Kan 的分化培养基上对农杆菌侵染的下胚轴进行筛选, 结果表明初代培养 Kan 质量浓度以 20~40 mg/L 为宜, 同样质量浓度继代培养后可获得抗性愈伤和转基因阳性苗. 最后利用 Kan 抗性对转基因黄籽油菜后代进行研究, 苗期到薹花期生长的植株进行叶片涂抹法筛选, Kan 最适质量浓度为 4 g/L, 时间为 4~10 d; T1 代抗性分析、GUS 染色分析、T1 代籽粒的 PCR 检测说明转基因在 T1 代、T2 代可遗传并出现分离. β -葡萄糖苷酶基因(GUS)和聚合酶链式反应(PCR)验证叶片涂抹进行 Kan 抗性筛选的方法准确性高, 可达 100%.

关键词: 卡拉霉素; 转基因黄籽油菜; 抗性

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)11-0001-07

甘蓝型黄籽油菜 *Brassica napus* L. 具有种皮薄、含油量高、油质清澈^[1]透明、饼粕的饲用价值高等一系列优点, 因而近年来受到育种家的重视, 选育甘蓝型黄籽油菜成为油菜育种的主要目标之一. 但黄籽油菜生长势、抗逆性较低, 产量较低, 在生产中难以直接大面积推广利用, 限制了其优质特性的发挥. 通过转基因技术可提高抗逆性、改良油的品质、抗虫和抗除草剂等^[2], 如导入抗草甘膦的基因^[3]、 $\Delta 6$ -脂肪酸脱饱和酶基因、Bt 杀虫蛋白基因、抗溴苯腈基因等^[3]. 但是, 以往的研究大多数使用的都是黑籽油菜^[2, 4-5], 外源基因导入黄籽油菜的非常少, 而对其转基因后代表达情况的研究更少.

植物转基因载体构建中, 一个常用的选择性标记基因——新霉素磷酸转移酶基因(neomycin phosphotransferase, npt II), 它表达的结果使转化的细胞对新霉素、巴龙霉素、卡拉霉素、G418 等抗生素产生抗性, 因而在遗传转化中作为区分转基因和非转基因植株的明显标记, 筛选的方法多用于组织培养, 也有用于后代植株筛选, 目前在芥菜、小麦、棉花、水稻、番茄等植物上应用较多, 但应用于黄籽油菜很少.

卡拉霉素对植物细胞表现毒性的机理是与植物细胞叶绿体和线粒体中的核糖体 30S 亚基结合, 影响 70S 起始复合体生成, 干扰叶绿体及线粒体的蛋白质生物合成, 最终导致植物细胞死亡. 而转基因植物由于含有卡拉霉素抗性(npt II)基因而抑制了其作用, 所以通过卡拉霉素筛选, 转化体就很容易从非转化体中筛选出来^[6]. 没有抗性的植株在卡拉霉素筛选时会出现叶绿体缺失, 黄化或白化的现象; 而有抗性的植株能正常生长.

本试验通过 Kan 对甘蓝型黄籽油菜子叶分化、下胚轴遗传转化、转基因后代幼苗的筛选, 探索其对黄籽油菜的再生、遗传转化、后代表达及遗传的影响, 并用 GUS 染色、PCR 检测验证转基因后代的结果, 以期应用 Kan 对甘蓝型黄籽油菜转化及后代的影响进行相关的遗传分析, 为研究黄籽油菜的遗传转化、外源基因表达及基因在后代中的遗传机制等提供参考.

^① 收稿日期: 2013-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171584); 重庆市自然科学基金项目(cstc2011jjA80005); 博士启动项目(104260-20710930).

作者简介: 林 呐(1977-), 女, 四川什邡人, 博士, 讲师, 主要从事基因工程研究.

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘蓝型黄籽品种 GH01, 种子由西南大学农学与生物科技学院油菜工程技术研究中心提供。

1.2 菌株与质粒

根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 工程菌 LBA4404 为转化受体菌, 植物表达载体质粒 pCAM-BIA2301, pCNR 是个含抗卡拉霉素基因 nptII 和 GUS 基因的双元载体。目的基因是来自于匍枝根霉的 $\Delta 6$ -脂肪酸脱饱和酶基因-RnD6D。

1.3 转基因黄籽油菜材料

甘蓝型黄籽品种通过农杆菌介导的方法获得转基因第一代 T0, 移栽到田间, 自交获得转基因第二代 T1 种子, 播种到田间, 再次自交获得第三代 T2 种子。

1.4 方 法

1.4.1 卡拉霉素对黄籽油菜再生的敏感性

甘蓝型黄籽品种 GH01 的种子消毒后, 接种到 MS 培养基中发芽, 切取 7 d 苗龄幼苗带柄子叶, 接于 MS + 0.2 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2, 4-D 培养基中预培养 2 d, 再分别转至(含 0 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 140 mg/L, 160 mg/L, 180 mg/L, 200 mg/L) Kan 共 11 个梯度的分化培养基, 进行敏感性试验。分别在 14 d 和 21 d 后观察生长情况, 统计分化数。

1.4.2 卡拉霉素对黄籽油菜遗传转化的影响

将上述生长的黄籽油菜下胚轴切下, 侵染农杆菌后, 转入分化培养基 MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2, 4-D + 1.0 mg/L KT + 3 mg/L AgNO₃ 中, 并附加 7 个不同质量浓度的卡拉霉素(10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L, 100 mg/L), 7 d 后观察生长的情况, 并记录。继代转入相同的培养基, 10 d 后观察生长, 并记录。

1.4.3 非转基因油菜叶片对卡拉霉素的敏感性

以非转基因油菜 5133 为材料, 卡拉霉素(Kan)溶液分别配制出 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 g/L 质量浓度共 7 个梯度, 在苗期以每株油菜 3 片真叶作为 1 个质量浓度梯度, 每天用棉花涂抹标记叶片正反面到湿润, 重复 10 株, 观察记录叶片的反应情况, 确定卡拉霉素筛选的最佳质量浓度和观察的最适时间。若遇雨天, 推迟涂抹。

1.4.4 转基因油菜 T1 代的卡拉霉素筛选

使用最适质量浓度的卡拉霉素溶液, 筛选 5013 的 60 株, 5016 的 58 株 2 个群体的油菜, 每天观察记录叶片颜色变化, 2 周后再观察结果。

1.4.5 GUS 染色检测

选取 1.4.2 试验筛选的愈伤组织和分化的叶片, 以及卡拉霉素筛选的转基因后代新鲜的叶片 0.1~0.2 g 加 500~800 μ L GUS 染液浸泡, 于水浴锅 37 $^{\circ}$ C 12~16 h, 取出染液再加 70%~75% 无水乙醇抽提至叶绿素完全失去, 观察记录结果并拍照。GUS 染液配方: X-Gluc 500 μ g/mL, EDTA 10 mmol/L, Na₃PO₄ 100 mmol/L, K₄[Fe(CN)₆] \cdot 3H₂O 0.5 mmol/L, K₄[Fe(CN)₆] 0.5 mmol/L, Triton x-100 0.1%。

1.4.6 T1 代种子籽粒的 PCR 检测

对 GUS 染色检测植株的新鲜种子籽粒进行取样, 采用 CTAB 法快速抽提总基因组 DNA, 用于 PCR 反应。根据 pCAMBIA2301 的 GUS 基因设计引物 FGUS 5'-CTGAAGTGGCAGACTATCCCG-3', RGUS 5'-GTCCGCATCTTCATGAC GACC-3' 用于检测特异扩增 GUS 约 489 bp 大小的片段。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 扩增产物于 1% 的琼脂糖电泳检测, 拍照并记录结果。

2 结果与分析

2.1 卡拉霉素对子叶分化的影响结果分析

由图 1 可看出, 随着卡拉霉素质量浓度的增加, 白化苗分化增加, 质量浓度超过 180 mg/L 无芽苗分

化, 说明黄籽油菜不抗卡拉霉素. Kan 质量浓度在 0~60 mg/L 和 80~160 mg/L 范围内, 质量浓度越高, 白化苗分化比例越高, 超过 160 mg/L 则有下降趋势, 180 mg/L 以上白化苗不再产生, 即白化苗的产生先经历了一个快速增长的过程, 再经历一个稳定增长的过程, 后经历一个增长下降的过程, 最后是增长停止的过程. 此结果说明 Kan 导致了白化苗的分化, 但质量浓度过高会抑制白化苗分化. Kan 筛选过程对植株伤害很大, 白化苗是其表现形式, 它在生长过程中因无叶绿体进行光合作用而逐渐死亡, 实际上就是抑制细胞生长, 使之缓慢死亡的过程. 白化苗的增长过程表现出黄籽油菜具或多或少的抗逆性, 但因其本身不抗卡拉霉素, 所以 Kan 达到一定质量浓度, 分化停止.

绿苗分化率表现趋势验证了上述观点, 绿苗分化随着 Kan 浓度的提高基本处于下降趋势, 在 60~180 mg/L 的范围和白化苗增长趋势相同, 说明绿苗的分化这时候也处于一个稳定时期, 表现出一定的抗逆性. 从抑制分化情况看出, Kan 质量浓度小于 60 mg/L 有利于绿苗分化.

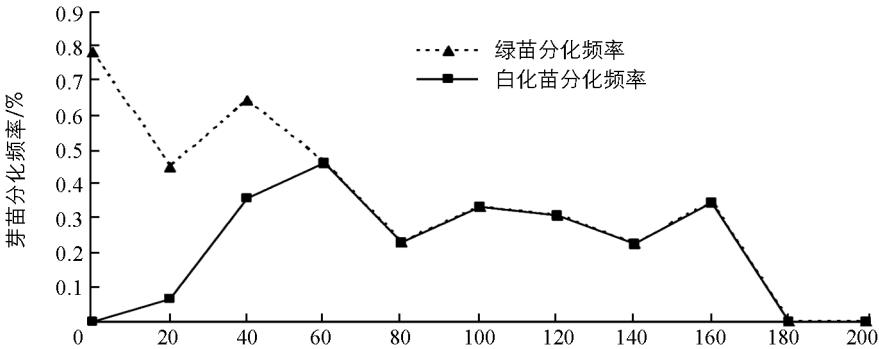


图 1 Kan 质量浓度对子叶分化频率的影响

2.2 卡拉霉素对黄籽油菜遗传转化的影响结果分析

表 1 通过卡平方分析, 愈伤组织个数和初代 7 d 后产生的绿芽个数差异具有统计学意义, 说明卡拉霉素会影响诱导愈伤组织、分化绿芽. 但愈伤组织个数的影响因素不仅有卡拉霉素, 还有实验中农杆菌侵染造成的差异, 实验发现农杆菌侵染愈伤组织后会出现颜色的变化, 有绿色、黄色、褐色愈伤产生, 绿色愈伤利于分化, 黄色、褐色愈伤分化效率不高, 图 2 可看出绿色愈伤组织得到了 GUS 表达, 验证了绿色愈伤是抗性愈伤, 说明从绿色愈伤分化出来的抗性芽是转化苗(图 2). 卡拉霉素对绿芽的分化影响非常具有统计学意义, 随着质量浓度的增长, 绿芽出芽率降低, 说明卡拉霉素在黄籽油菜遗传转化中抑制了绿芽分化.

表 1 不同卡拉霉素质量浓度对油菜分化的影响

Kan 质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	下胚轴数/ 个	愈伤组织 个数/个	初代 7 d 出芽数/个	初代 7 d 绿芽个数/个	继代 10 d 的绿芽数/个	芽的生 长状况
10	156	73	17	15	13	* * * * *
20	165	108	10	5	5	* * * * *
30	151	104	12	5	4	* * * * *
40	173	130	20	9	7	* * * * *
50	170	99	11	2	1	* * *
70	159	99	9	0	0	* *
100	142	98	10	0	0	* *
χ ² (卡平方)	—	35.12	—	31.84	2.96	—

注: $\chi^2_{0.05}, 6=12.59$; * * * * * 表示长势良好, 下胚轴深绿, 芽深绿, 分化芽多; * * * * 表示长势一般, 下胚轴黄绿并有枯黄, 芽黄白色, 新生芽多白化; * * * 表示长势差, 下胚轴枯黄, 膨大并有枯死, 芽基本都白化; * * 表示基本不生长, 下胚轴大多枯黄, 甚至死亡, 芽全白化.

Kan 质量浓度大于 50 mg/L 的培养基上几乎没有绿芽分化出来, 说明黄籽油菜在农杆菌侵染后, 对 Kan 的耐受程度只能在 0~50 mg/L 之间, 超过这个范围不能分化出芽. 20~40 mg/L 的范围绿芽出芽率变化不大, 说明这个质量浓度范围是既能承受又能正常生长的范围. 10 mg/L 的绿芽被筛选的特征不明显, 而大于 40 mg/L 的绿芽出芽率非常少. 因此, 分化筛选的初代培养 Kan 质量浓度以 20~40 mg/L 为宜.

继代培养后, 绿芽数差异不具有统计学意义但也在减少, 说明卡拉霉素的筛选有持续效应, 并且可筛

除掉具有假阳性的绿苗，若继续继代，发现与第一次继代相比几乎没有变化，说明剩下的绿苗可能都是抗性植株。

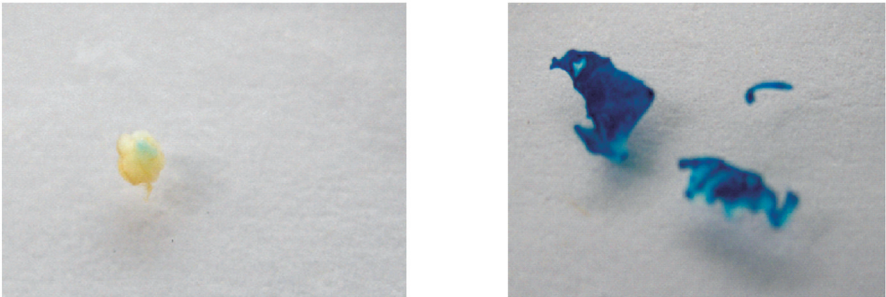


图 2 共培养 10 d 后绿色愈伤组织和再生苗叶片 GUS 表达

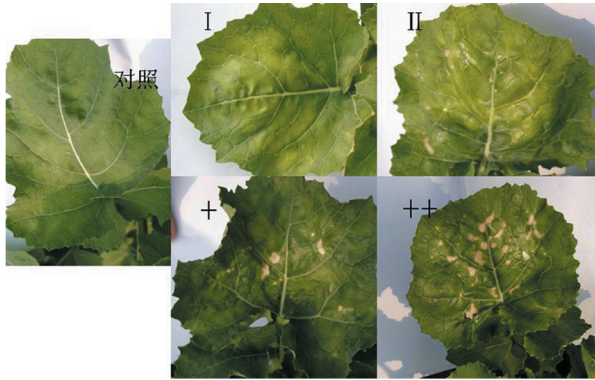
2.3 Kan 对非转基因油菜叶片的影响结果分析

经 4 d 涂抹，观察结果发现(图 3-A)处理后叶片出现不同程度变黄，严重的呈现不同的灼烧情况. 参照筛选转基因棉花、大豆的方法结合实际情况，以叶片变黄程度为标准，对叶片的反应进行分级：处理部位不变色，记为 0 级；处理部位稍有失绿，呈现差异，记为 I 级；处理部位失绿与正常叶色差异明显，且略有皱缩现象，记为 II 级；按灼烧的情况分为：稍有灼伤记为 +，灼伤强烈记为 ++。

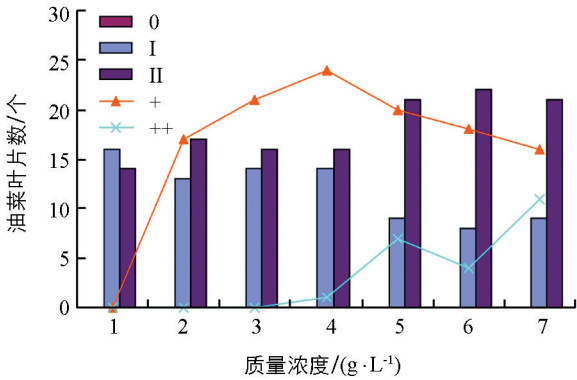
0 级说明 Kan 对叶片的正常生长影响不大；I 级说明 Kan 已对叶片起胁迫作用；II 级说明 Kan 的胁迫加剧，叶片承受力下降导致变黄程度加剧；轻微灼烧(+)的叶片，代表 Kan 胁迫其抗逆力降到最低限度，影响叶片正常生理代谢；黄色斑点(易于观察)，灼烧严重现象(++)则是 Kan 已侵蚀叶片组织，导致叶片细胞坏死. 因此，非转基因油菜对 Kan 表现敏感的情况确定为叶片同时表现 II 和 + 现象的时候。

图 3-B 统计结果表明：I 和 II 的现象在 4 g/L 和 5 g/L 之间发生明显变化，I 逐渐下降，II 逐渐上升，说明这时候叶片受到的胁迫加剧，变黄程度表现明显. 在 Kan 为 4 g/L 时，+ 现象达到最大值，++ 现象有明显启动，所以我们认为 Kan 质量浓度为 4 g/L 是所有现象比较敏感的时候，因而确定 Kan 筛选的最适质量浓度为 4 g/L。

另外，实验中如果不继续涂抹，两天后发现：Kan 质量浓度在 1~4 g/L 几乎全呈现明显 II 级变化，说明 Kan 质量浓度小也可通过延长时间来达到筛选目的. 但要快速筛选，Kan 质量浓度以 4 g/L 最为合适。



(A)



(B)

图 3 非转基因油菜的 Kan 抗性表现

2.4 转基因油菜 T1 代 Kan 抗性结果分析

在 Kan 的最适质量浓度下，经过 10 d 涂抹，转基因油菜 T1 代 5013,5016 两个株系群体中，个体间叶片呈现出不同颜色的变化，出现了抗性差异. 5013 全部植株叶片变黄呈 II 级即不抗 Kan，5016 一部分植株叶片则没变黄呈现抗性(图 4)。

统计 T1 代抗 Kan 结果发现，60 株 5013 全不抗；58 株 5016 中有 12 株植株带有抗性，46 株不抗. 此结果说明转基因在后代中出现了分离，5016 分离比例接近于 3 : 1，但有抗性明显少于不抗，属于单因子隐性遗传，这和一些学者认为转基因是单因子显性遗传^[7-9]的结论完全不同. 实验中筛选时间延长，因油菜正处

于旺盛生长期, 抗性较强, 需延长时间才能达到筛选目的, 同时也说明新展开的叶片对卡拉霉素较敏感, 而越老的叶片其抗性越强^[10], 筛选时叶片越幼嫩越好. 田间种植的材料以苗期到薹花期时筛选较好. 4 g/L 的 Kan 溶液处理叶片抗性反应灵敏且较易观察, 能在最短时间内达到筛选目的; 超过 4 g/L 时叶片灼伤严重, 所以 Kan 最适质量浓度为 4 g/L.



图 4 T1 代油菜叶片颜色变化的最终结果(Kan=4 g · L⁻¹)

2.5 T1 代植株的 GUS 染色检测和种子籽粒的 PCR 检测

5013 和 5016 的 T0 代 GUS 染色结果染上了蓝色, 说明 2 个 T0 代材料为转基因材料. 选取 8 个 T1 代植株进行 GUS 染色, 其中有颜色的为 5016-1,5016-12,5016-15(图 5)共 3 株植株, 而没有颜色的是 5013-4,5013-13,5013-11,5013-18,5016-22, 说明它们不含有 GUS 基因或者 GUS 基因不表达. 染色的结果与抗性结果完全吻合, 验证了 GUS 基因与 npt II 基因紧密连锁, 并且也说明 T0 代转基因材料中的目的基因遗传到了 T1 代, 并且出现了分离. PCR 检测同样验证了 GUS 染色、Kan 抗性鉴定结果, 充分说明了 Kan 叶片涂抹法进行抗性筛选的准确性可达 100%. 同时, 5016-1 * 是天然材料和 5016-1 自交材料都有目标片段, 也说明了目标片段遗传到了下一代, 至于遗传的机制还需进一步通过 Southern 杂交, 将大量群体材料的田间筛选等实验进行分析研究.

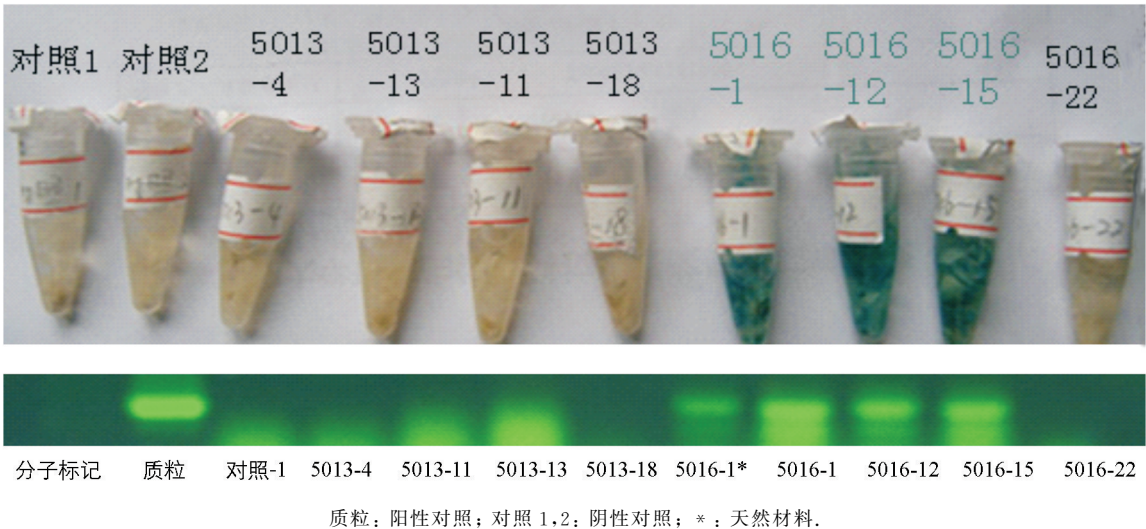


图 5 T1 代植株的 GUS 染色及部分转基因油菜 PCR 检测结果

3 讨 论

3.1 卡拉霉素对黄籽油菜再生、遗传转化的影响

卡拉霉素对植株再生的影响因不同物种、不同外植体而不同, 但主要影响在于植株的分化. 这个影响过程是循序渐进的, 先是抑制分化产生白化苗, 绿苗分化逐渐下降, 进一步产生白化苗增加, 最后白化苗产生也停止. 只有产生抗性植株才会使这种影响下降, 愈伤组织的变化说明了农杆菌侵染和卡拉霉素的筛

选对其细胞生长的抑制作用非常大,而黄色愈伤和褐色愈伤分化率不高,说明了分化时卡拉霉素杀死细胞过多,死细胞对邻近活细胞有很强的抑制作用,不利于转化细胞生长,造成抗性植株分化率低.要提高分化效率就不可避免地降低卡拉霉素质量浓度,造成假阳性植株分化的机会增多.因而试验结果发现初代筛选以 20~40 mg/L Kan 为宜,继代培养有持续筛选效果,可筛除假阳性植株. GUS 结果也验证了这样筛选出来的愈伤组织和再生苗是抗性材料,即转基因材料.

3.2 卡拉霉素对转基因黄籽油莱后代的筛选

非转基因油菜的抗性试验是为了选出合适的 Kan 浓度,用于筛选 T1 代转基因油菜.试验结果表明 Kan 质量浓度过低不易观察,过高对植株损害大.通过对随机选取的油菜叶片进行不同质量浓度的 Kan 涂抹,观察到质量浓度跟抗性不成正相关,抗性跟叶片生长的状态有关,幼嫩叶片对卡拉霉素较敏感,越老的叶抗性越强.马丽华等^[11]对转 Bt 棉 Kan 田间筛选时也得出了相同结论,顶部第 2 片叶比第 4,6 片叶 Kan 敏感性高.不同植物生长时期对 Kan 抗性表现也不同,韦献雅等^[12]在 2 片子叶期筛选转基因油菜最佳 Kan 选择为 200 mg/L;周玉等^[13]在棉苗 4~5 片真叶期筛选转基因适宜质量浓度为 4~5 g/L;实验中处于薹花期的植株因叶片生理状态变老,抗性加强而延长筛选时间也说明抗性与生理状态有关.所以,筛选的 Kan 质量浓度应该是一个动态变化的范围,与叶龄和涂抹生长期相关,应尽早于叶片敏感性高的时候筛选.

由于卡拉霉素并不影响植株核基因组蛋白的正常表达,因此植株对卡拉霉素处理表现出一定的滞后效应,一般在 3 d 以后反应明显加剧^[10],故观察时间需相应延长.试验中发现涂抹 4 d 后若未继续涂抹,观察 2 d 后植株叶片还有反应,因此筛选转基因植株要延长观察时间直至变化稳定.而遇到雨天会稀释 Kan 质量浓度,涂抹和观察时间需相应延长,试验结果多少也会受影响.为避免天气的影响,最好选在连续晴天进行试验.

试验中发现不抗和抗性的分离比例接近于 3:1,符合孟德尔分离定律,属于单因子隐性遗传.这与其他学者结果不太相同,如施荣华等^[7]研究苏云金杆菌杀虫蛋白基因 CryIA 和选择标记基因 npt II 导入油菜后的遗传规律表明遗传方式符合孟德尔单因子显性遗传;林良斌等^[8] Kan 抗性分析和 PCR 分析转入的 Bt 杀虫蛋白基因多数符合孟德尔单因子显性遗传,这 2 个试验都是大规模群体筛选得出,分析与此结论不同的原因是本试验材料的群体太少,仅 2 个群体,样本也不大;同时 T0 代自交后代具有随机性而不能抽取一部分作后代分离比例的验证,还不能排除存在基因沉默、基因丢失的问题.因此,转基因后代遗传机制和分离比例还需通过 Southern 杂交,大量群体材料的田间筛选等实验验证.特别是多拷贝基因的遗传相对复杂,需尽量筛选单拷贝基因纯合的材料^[14].

GUS 染色和 PCR 检测结果充分说明了叶片涂抹法的准确性高,可达 100%.与 GUS 染液的价格昂贵和 PCR 的复杂相比,此方法更简单易行,节省时间和成本,可用于油菜转基因后代大规模、快速地初步筛选及后代遗传分析.

4 结 论

卡拉霉素在转基因黄籽油莱中的应用主要在于遗传转化、转基因后代筛选^[15],在遗传转化中可通过卡拉霉素筛选出抗性植株获得转基因苗,同时筛除假阳性苗.在转基因后代中可通过群体筛选出抗性植株,获得转基因遗传的分离比例,分析其遗传机制,研究外源基因在后代的遗传行为,且准确性高.

参考文献:

- [1] 董翠月,万华方,梁 颖.甘蓝型油菜种皮黄酮类色素种类的研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2007,32(1): 97—100.
- [2] 孙 洁,黄 团,李加纳,等.农杆菌培养方式和预培养基激素对比对甘蓝型油菜下胚轴转化效应分析[J].西南大学学报:自然科学版,2007,29(12): 49—53.
- [3] 官春云.油菜的转基因育种[J].中国油料作物学报,2005,27(1): 97—103.
- [4] 谢伶俐,殷家明,李加纳,等.激素对油菜子叶再生及转基因瞬间表达的影响[J].西南师范大学学报:自然科学版,2007,32(5): 50—55.
- [5] 张瑞熙,申 敏,殷家明,等.农杆菌介导转化油菜中几种影响玻璃化频率的因素[J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(4): 9—13.

- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 527—606.
- [7] 施荣华, 李学宝. 外源基因在转基因油菜后代中的表达及遗传学分析 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2003, 34(2): 208—212.
- [8] 林良斌, 官春云, 周小云, 等. 转基因抗虫油菜中 Bt 杀虫蛋白基因稳定遗传和高效表达及抗虫性研究 [J]. 作物学报, 2002, 28(2): 175—178.
- [9] WANG Li, ZHAO Chun-mei, WANG Yi-ju, et al. Over Expression of Chloroplast localized Small Molecular Heat-Shock Protein Enhances Chilling Tolerance in Tomato Plant [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 167—174.
- [10] 刘 斌, 吴 迪, 侯文胜. 卡那霉素叶片涂抹法筛选转基因大豆植株的有效性 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12): 80—82.
- [11] 马丽华, 许红霞, 胡育昌. 转 Bt 基因棉卡那霉素田间快速检测法 [J]. 中国棉花, 2000, 27(12): 11—12.
- [12] 韦献雅, 牛应泽, 张其坤. 3 种筛选 NPT-Ⅱ 标记转基因油菜方法研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 37—41.
- [13] 周 玉, 王留明, 张学坤. 转基因抗虫棉田间快速鉴定方法研究 [J]. 山东农业科学, 2000, 23(1): 48—49.
- [14] 燕丽萍, 夏 阳, 梁慧敏, 等. 卡那霉素叶片涂抹法田间筛选转基因苜蓿的研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 22—26.
- [15] 赵 爽, 雷建军, 陈国菊, 等. 卡那霉素在转基因芥菜中的应用 [J]. 遗传, 2008, 30(4): 501—507.

Application of Kanamycin in Transgenic Yellow-Seeded Rape (*Brassica napus* L.)

LIN Na^{1,2}, LIU Lie-zhao^{1,2}, ZHOU Qing-yuan^{1,2},
SUN Wei^{1,2}, CHEN Li-chen^{1,2}, LI Jia-na^{1,2}

1. School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Rapeseed Engineering and Technology Research Center, Chongqing 400715, China

Abstract: Cotyledons of yellow seed rape were inoculated onto differentiation media with different concentrations of kanamycin (Kan) to screen the optimal Kan concentration in genetic transformation, and the results indicated that a Kan concentration of less than 60 mg/L was beneficial to green shoot differentiation. Then, hypocotyls infected by *Agrabacterium tumefaciens* were transferred to differentiation media containing Kan of different concentrations, and it was found that 20—40 mg/L Kan concentration in the primary culture was appropriate, and resistant calli and regenerated positive plantlets were obtained after successive transfer cultures. Finally, Kan resistance in the transgenic yellow seed rape offspring was studied. The method of leaf daubing was used in transgenic plant growing from the period of young shoot to flowering, and the optimum Kan concentration was found to be 4 g/L and the daubing time 4 to 10 days. Kan resistance of T1 generation, GUS staining analysis, PCR detection of T1 generation showed that transgenic seeds in T1 and T2 generations was inheritable and segregation occurred. GUS and PCR verification in this study demonstrated that the accuracy of the method of leaf daubing to screen resistant plants was as high as 100%.

Key words: kanamycin; transgenic yellow-seeded rape; resistance

