

抗生素对‘考密斯’梨叶片不定梢诱导的影响

刘淑芳^{1,2}, 汤浩茹², 贺永明¹

(1. 辽宁农业职业技术学院 熊岳 115009 2. 四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014)

摘要:研究了氨基青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)、头孢霉素(Cef)、卡那霉素(Km)和新霉素(Nm)对‘考密斯’叶片愈伤组织和不定梢诱导的影响。结果表明, Cef对‘考密斯’叶片分化影响较小, 当浓度达500mg/L时, 出愈率 and 不定梢再生率分别为93.33%和51.48%, 与对照差异不显著; Amp浓度在50~100mg/L时, 对‘考密斯’叶片再生无显著影响, 只有当Amp浓度高于100mg/L时, ‘考密斯’的不定梢再生率才受到显著抑制; ‘考密斯’对Carb的发应较为敏感, 其浓度为50mg/L时, 出愈率 and 不定梢再生率已降低到85.56%和25.00%, 与对照差异极显著, 浓度为200mg/L时, 完全抑制了‘考密斯’的不定梢再生; Km浓度为10mg/L时, 已完全抑制了不定梢的再生, 当Km浓度增加到60mg/L时, ‘考密斯’叶片全部白化死亡; Nm浓度为10mg/L时, 极显著的抑制了‘考密斯’叶片再生, 当浓度达40mg/L时, 已无不定梢发生。

关键词: 梨; 抗生素; 出愈率; 不定梢再生

中图分类号: S 482.3⁺ 9; S 661.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)05-0032-03

根癌农杆菌介导的植物遗传转化方法是植物转基因研究中最有效而且应用最广泛的方法^[1]。采用根癌农杆菌介导的遗传转化必须要对受体材料进行抗生素敏感性测定。这是因为, 许多抗生素对受体材料的生长和分化具有明显的抑制作用^[2~5], 目前所用的既能有效抑制根癌农杆菌生长, 又不影响受体正常分化和生长的抗生素主要有氨基青霉素(Ampicillin, Amp)、羧苄青霉素(Carbenicillin, Carb)和头孢霉素(Cefotaxime, Cef); 同时, 在转化操作后的筛选过程中, 要根据侵染时采用的菌株所携带的抗生素抗性标记基因不同, 而使用不同种类的抗生素作为抗性筛选剂, 使其能有效地抑制非转化体细胞的生长, 卡那霉素(Kanamycin, Km)是筛选转化体最常用的抗生素之一。

尽管目前有关梨转基因研究已有成功的报道^[6~8], 而且多数采用的是农杆菌介导法^[9], 但尚未见有关不同抗生素对梨再生体系的影响方面的报道。为了保证有效地抑制农杆菌介导法中农杆菌的生长而不影响梨叶片的正常分化和再生, 同时减少假转化体的出现, 提高基因转化效率。为此, 试验研究了Amp、Carb、Cef和Km对‘考密斯’梨叶片愈伤组织和不定梢诱导的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以梨品种‘考密斯’(Pyrus communis L. cv. Com-

ice)为试材, 试材来源于四川农业大学林学院园艺学院综合实验室建立并保存的无菌试管苗。

1.2 试剂

Amp、Carb、Cef、Km和Nm均购自荷兰Duchefa Biochemie公司。

1.3 叶片不定梢诱导培养基

由四川农业大学林学院园艺学院综合实验室筛选出的叶片不定梢诱导最佳培养基^[10], 其配方为: NN69+IBA 0.1mg/L+TDZ 4.0mg/L; 培养基均附加蔗糖30g/L, 琼脂5.5g/L及水解酪蛋白(CH) 0.25g/L, pH 5.8。

1.4 试验方法

将所需质量浓度的Amp、Carb、Cef、Km经过滤灭菌后, 分别附加于叶片不定梢诱导培养基中, Amp、Carb和Cef设置的质量浓度均为0, 50, 100, 200, 300, 400, 500mg/L; Km和Nm设置的质量浓度为0, 10, 20, 40, 60, 80, 100mg/L。

从苗龄35d左右的试管苗上剪取顶部幼嫩平展的叶片, 并将叶片剪为0.5~1cm²叶块, 以远轴面接触培养基, 每种抗生素的每个质量浓度接种3个培养皿, 每个培养皿(大小为850mm×180mm, 含33mL培养基)接种20个叶块, 重复3次。在培养过程中, 定期观察叶片变化及不定梢发生情况。培养至40d时, 调查不定梢的再生情况, 并统计出愈率, 不定梢再生率和死亡率。

1.5 培养条件

未经特殊说明, 叶片接种后, 均于光强4800Lx、光照周期16h/8h、室温23±2℃条件下培养, 培养皿用Parafilm'密封。

第一作者简介: 刘淑芳(1976-), 女, 硕士研究生, 现在辽宁农业职业技术学院任教, E-mail: lsf1997@163.com。

收稿日期: 2007-01-03

2 结果与分析

2.1 Km 和 Nm 敏感性试验

Km 明显抑制 考密斯 叶片愈伤组织的发生和不定梢诱导, 当 Km 浓度为 10mg/L 时, 其出愈率由对照的 100%降低到 12. 22%(表 1), 呈极显著差异, 此时完全抑制了不定梢再生, 叶片死亡率达 26. 11%。随着 Km 浓度的增加, ‘考密斯’ 叶片的白化死亡率逐渐升高, 当浓度增加到 60mg/L 时, ‘考密斯’ 叶片已全部死亡。Nm 敏感性试验发现, 当 Nm 浓度为 10mg/L 时, ‘考密斯’ 的出愈率和不定梢再生率受到明显的抑制, 出愈率和不定梢分别由对照的 100%和 63. 33%降低到 82. 41%和 18. 70%, 与对照差异极显著。Nm 浓度增加到40mg/L 时, 已无不定梢发生, 死亡率为 26. 11%, 呈极显著差异。随着浓度的升高, 死亡率逐渐增大, 浓度升高到 80mg/L 时, ‘考密斯’ 叶片已全部白化死亡。

2.2 Amp、Carb 和 Cef 对 ‘考密斯’ 叶片愈伤组织和不定梢诱导的影响

低浓度(≤100mg/L)的 Amp 对 ‘考密斯’ 叶片的出愈率和不定梢再生率影响极小, 当浓度为 100mg/L 时, 仍有 100%的出愈率和 55. 19%的再生率。Amp 浓度增加到 200mg/L 时, 不定梢再生率由对照的 63. 33%降低到 34. 26%(表 2), 呈极显著差异。随着 Amp 浓度的增加 再生率逐渐降低, 当浓度升高到 500mg/L 时, ‘考密斯’ 叶片已无不定梢发生。

‘考密斯’ 对 Carb 的发应较为敏感, 其浓度为 50mg/L 时, 出愈率和不定梢再生率已降低到 85. 56%和 25. 00%, 与对照差异极显著。随着 Carb 浓度的升高, 明显抑制 ‘考密斯’ 叶片的再生, 当 Carb 浓度为 200mg/L 时, 已无不定梢发生。在高浓度(≥300mg/L)下, 白化死亡率逐渐增大, 当 Carb 浓度升高到 500mg/L 时, 有 96. 67%的叶片已经死亡。

表 1 Km 和 Nm 对 ‘考密斯’ 叶片愈伤组织和不定梢诱导的影响

抗生素种类		出愈率	不定梢再生	平均每叶	死亡率
和浓度 (mg/L)		(%)	率 (%)	梢数	(%)
卡那霉素	0	100.00 aA	63.33 aA	1.69 aA	0.00 eE
	10	12.22 bB	0.00 bB	0.00 bB	26.11 dD
	20	0.00 cC	0.00 bB	0.00 bB	55.56 cC
	40	0.00 cC	0.00 bB	0.00 bB	86.30 bA B
	60	0.00 cC	0.00 bB	0.00 bB	100.00 aA
	80	0.00 cC	0.00 bB	0.00 bB	100.00 aA
	100	0.00 cC	0.00 bB	0.00 bB	100.00 aA
新霉素	0	100.00 aA	63.33 aA	1.69 aA	0.00 dD
	10	82.41 bB	18.70 bB	1.52 aA	0.00 dD
	20	51.48 cC	5.00 cC	1.67 aA	0.00 dD
	40	15.19 dD	0.00 cC	0.00 bB	26.11 cC
	60	1.67 eD	0.00 cC	0.00 bB	69.44 bB
	80	0.00 eD	0.00 cC	0.00 bB	100.00 aA
	100	0.00 eD	0.00 cC	0.00 bB	100.00 aA

注: 数据用邓肯氏新复极差法进行检验(A, B=0. 01; a, b=0. 05), 以下同。

表 2 Amp、Carb 和 Cef 对 ‘考密斯’ 叶片愈伤组织和不定梢诱导的影响

抗生素种类 和浓度 (mg/L)	出愈率 (%)	不定梢再生 率 (%)	平均每叶 梢数	死亡率 (%)	
氨苄青霉素	0	100.00 aA	63.33 aA	1.69 aA	0.00 bB
	50	100.00 aA	57.04 aA	1.45 aA	0.00 bB
	100	100.00 aA	55.19 aA	1.67 aA	0.00 bB
	200	96.67 aA	34.26 bB	1.90 aA	0.00 bB
	300	89.81 aA	15.56 cC	1.39 aA	0.00 bB
	400	63.89 bB	1.67 dD	0.33 bB	0.00 bB
	500	18.70 cC	0.00 dD	0.00 bB	27.59 aA
羧苄青霉素	0	100.00 aA	63.33 aA	1.69 abA	0.00 eE
	50	85.56 bB	25.00 bB	1.87 aA	0.00 eE
	100	53.70 cC	10.56 cC	1.44 bA	0.00 eE
	200	8.70 dD	0.00 dD	0.00 cB	34.26 dD
	300	0.00 dD	0.00 dD	0.00 cB	65.74 cC
	400	0.00 dD	0.00 dD	0.00 cB	79.44 bB
	500	0.00 dD	0.00 dD	0.00 cB	96.67 aA
头孢霉素	0	100.00 aA	63.33 a	1.69 a	0.00
	50	100.00 aA	56.85 a	1.74 a	0.00
	100	100.00 aA	55.93 a	1.67 a	0.00
	200	100.00 aA	55.55 a	1.44 a	0.00
	300	96.48abA	54.90 a	1.37 a	0.00
	400	94.81abA	52.22 a	1.73 a	0.00
	500	93.33bA	51.48 a	1.58 a	0.00

Cef 对 ‘考密斯’ 叶片分化影响较小, 当浓度达 500mg/L 时, 出愈率和不定梢再生率分别为 93. 33%的 51. 48%, 与对照差异不显著。因此, 在 ‘考密斯’ 的遗传转化中, Cef 可以作为抑制根癌农杆菌生长的抑菌剂使用。

3 讨论

在梨的遗传转化中, 通常以新霉素磷酸转移酶基因(NptII)作为选择标记基因, 这一基因的表达产物赋予转基因植物对 Km 的抗性。Km 是一种广谱杀菌剂, 对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌均有影响, 但是对植物的毒性较大。黄萍^[1] 等研究了抗生素对中华猕猴桃叶柄愈伤组织诱导及分化芽的影响, 发现 Km 浓度大于25mg/L 时, 无不定梢发生。而唐东芹^[2] 的研究发现 75mg/L Km浓度为东方百合的胚性愈伤组织的筛选浓度, 这主要是由于不同的外植体对卡那霉素的敏感性不同, 在具体的试验中, 需根据不同的材料确定合适的筛选浓度。试验测试了 Km 和 Nm 对 ‘考密斯’ 叶片愈伤组织及不定梢的影响, 发现 Nm 浓度为 40mg/L, 就可抑制所有不定梢的发生, 由于高质量浓度的抗生素能迅速杀死细胞, 而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用, 不利于转化细胞生长, 因此在筛选质量浓度时一般应略低于全致死浓度, 据此确定, 20mg/L 作为 ‘考密斯’ 叶片不定梢 Nm 筛选浓度。而 Km 在非常低的浓度(10mg/L)就无不定梢发生, 因此认为 Km 不适合作为 ‘考密斯’ 遗传转化中的筛选浓度。

抑制细菌细胞壁合成的抗生素如 Amp、Carb 和

Cef, 相对而言对植物细胞无毒性或毒性较小。Amp、Carb 和 Cef 是农杆菌介导的植物遗传转化中广泛使用的杀菌剂, 对大多数菌株的杀菌效果好, 但对植物组织的影响不同^[3, 4, 13], 在大白菜子叶培养中, Cef 抑制芽和根的分化, 有显著的毒害作用, 而 Carb 对分化的影响不大, 其作用主要表现为缩短分化时间。郑启发^[14]等研究认为, Carb 和 Cef 浓度为 300~400mg/L 时抑菌效果较好, 对外植体的生长分化影响较小。该研究发现, 在‘考密斯’遗传转化工作中, 在不影响外植体生长分化的前提下, 可使用较高浓度(500mg/L)的 Cef 作为农杆菌的杀菌剂, 因为在培养过程中, 抗生素很快会失效, 农杆菌的快速繁殖会给试验带来很多麻烦。Amp 浓度在 100mg/L 以内时, 对‘考密斯’叶片出愈率和不定梢再生率的影响极小, 可以考虑作为抑菌剂使用。Carb 浓度大于 50mg/L 时, 因其抑制愈伤组织和不定梢的分化, 不宜用于‘考密斯’的遗传转化中。

由于多数抗生素在较高浓度时对植物材料均有一定毒性, 所以不能用抗生素代替无菌消毒技术, 抗生素只能在一些植物材料难以消毒或一些宝贵材料受到污染必须强救时才可以考虑用作一种手段来去菌。

参考文献:

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 194-317.
- [2] 陈夜江, 赖钟雄. 果树基因工程的应用与面临的主要问题[J]. 福建果

树, 2002(1): 14-18.

- [3] 王萍, 吴疑, 何娜等. 抗生素对农杆菌抑制的效果和大豆外植体诱导的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2000, 遗传学专辑: 39-42.
- [4] 张献龙, 李涛, 孙济中. 抗生素对棉花愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(2): 123-126.
- [5] 王勇. 抗生素对桑树外植体生长与分化的影响[J]. 蚕业科学, 1996, 22(2): 72-76.
- [6] Mourgues F, Chevreau E, Lambert C, et al. Efficient Agrobacterium mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.)[J]. Plant Cell Report, 1996, 16: 215-219.
- [7] Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E et al. Activity of different antibacterial peptides on *Erwinia amylovora* growth and evaluation of the phytotoxicity and stability of cecropins[J]. Plant Sig, 1998, 139: 83-91.
- [8] Puterka GJ, Bocchetti G, Dang P, et al. Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, pear psylla (*Homoptera: Psyllidae*)[J]. J Econ Entomol, 2002, 95: 797-802.
- [9] 刘翠琼, 汤浩茹. 梨叶片培养与转基因研究进展[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 374-378.
- [10] 刘翠琼. 梨的离体培养与叶片不定梢诱导研究[D]. 四川雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2003.
- [11] 黄萍, 沈孝善, 马朝宏. 抗生素对猕猴桃叶柄愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(6): 6-7.
- [12] 唐东芹, 钱虹妹, 黄丹枫等. 百合基因转化直接分化受体系统的建立[J]. 江苏农业科技, 2003, 3: 48-51.
- [13] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌甘蓝型对油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657-663.
- [14] 郑启发, 陈大成, 胡桂兵等. 抗生素对沙田柚外植体分化及生长的影响[J]. 广东农业科学, 1998, 1: 22-24.

Effects of Antibiotics on Callus Induction and Shoot Regeneration From the Leaves of Pear cv. Comice

LIU Shu-fang^{1,2}, TANG Hao-ru², HE Yong-ming¹

(1. Liaoning Agricultural Vocation-technical College, Xiongyue 115009; 2. Forestry and Horticultural College of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: Effects of Ampicillin, Carbenicillin, Cefotaxime, Kanamycin and Neomycin on callus induction and shoot regeneration from the leaves of ‘Comice’ were studied. The results showed that when the concentration of Cefotaxime was at 500mg/L, the rates of callus induction and shoot regeneration from the leaves of ‘Comice’ were 93.33% and 51.48% respectively, which were not significant difference from that of CK. Ampicillin hadn’t significant effects on the regeneration of the leaves of ‘Comice’ within concentrations at 50~100mg/L, but shoot regeneration from the leaves of ‘Comice’ was greatly restrained when the concentrations of Ampicillin at more than 100mg/L. The concentration of Carbenicillin was at 50mg/L, the rates of callus induction and shoot regeneration from the leaves of ‘Comice’ were 85.56% and 25.00% respectively, which were significant difference from that of CK. Redifferentiation of the leaves was thoroughly restrained when the concentration of Carbenicillin was at 200mg/L. Kanamycin thoroughly inhibited shoot regeneration when the concentration of Kanamycin was at 10mg/L. ‘Comice’ was all dying when the concentration of Kanamycin was at 60mg/L. Redifferentiation of the leaves was significant restrained when the concentration of Neomycin was at 10mg/L. The concentration of Neomycin was at 40mg/L, redifferentiation of the leaves was thoroughly inhibited.

Key words: Pear; Antibiotics; Callus induction; Shoot regeneration