

羧苄青霉素对几种浆果分化及生长的影响研究

张寅玲¹, 黄俊轩², 李建科², 李双跃², 刘艳军², 杨恩芹²

(1. 天津生物工程职业技术学院 天津 300462; 2. 天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要: 研究了羧苄青霉素对蓝莓、树莓及蔓越莓 3 种浆果不同外植体的再生、生长的影响及对农杆菌的抑制作用。结果表明: 在分化阶段蓝莓与树莓羧苄青霉素浓度应在 200 ~ 300 mg/kg 而且继代时间应在 7 d 而蔓越莓可以采用 400 mg/kg, 继代时间可在 7 ~ 14 d; 在生根阶段 3 种植物羧苄青霉素浓度应在 200 mg/kg 以下。

关键词: 蓝莓; 树莓; 蔓越莓; 羧苄青霉素
中图分类号: S 663 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)16—0135—03

蓝莓、树莓及蔓越莓是稀有的保健果品, 风味独特、美味, 还具有观赏价值, 近几年已被广泛栽培, 关于它们的育种工作也正在进^[1]。由于这 3 种浆果都从野生驯化而来, 种质资源贫乏, 要引入新的品种性状通过杂交培育十分困难, 而采用现代分子育种技术会很容易增加它的品种特性, 使其能广泛栽培与推广成为可能。目前关于这 3 种浆果的转基因研究还未见报道。但是由于植物转基因技术体系影响因素多且因素之间又可能互相作用, 所以造成了转化频率较低、重复性差等缺点, 其中一个重要的影响因素就是抗生素。在植物基因转化过程中, 为抑制农杆菌生长, 防止因其过度生长而产生污染, 常在培养基中添加抑菌性抗生素。为了适当运用抗生素, 就需要对抗生素的使用浓度进行敏感性测定^[2]。现以蓝莓、树莓及蔓越莓 3 种浆果的茎段为外植体就不同浓度的羧苄青霉素对它们分化、生长及对农杆菌有效抑制的影响进行试验, 以获取可靠的试验结果, 旨在为今后的转化研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的蓝莓、树莓及蔓越莓组培苗由天津农学院园林植物实验室提供。根癌农杆菌 LBA4404 及 C58 由该

实验室保存。抗生素均购于鼎国生物技术公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 蓝莓、树莓及蔓越莓茎段分化培养基: MS+KT 0.25 mg/L+IAA 0.5 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.65%; 伸长培养基: 1/2MS+IAA 0.25 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.65%; 生根培养基: 1/2MS+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.65%。培养基经高压灭菌, 待其温度降至 50℃以下但未凝固之前加入抗生素, 充分摇匀, 冷凝后待用。

1.2.2 不同浓度羧苄青霉素对蓝莓、树莓及蔓越莓茎段分化及试管苗生根的影响 取未经转化的蓝莓、树莓及蔓越莓组培苗, 接种在含羧苄青霉素浓度梯度的分化和生根培养基上, 分别观察茎段或试管苗的生长状况, 经 21 d 后进行调查统计。羧苄青霉素的浓度为 0、200、400、600、800 mg/L。每处理接种 5 瓶, 每瓶 10 个切段 3 次重复, 置 28℃培养, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 24 h/d。定期观察外植体的生长情况。

1.2.3 不同浓度羧苄青霉素对 2 种农杆菌抑制效果测定 挑取农杆菌 LBA4404 及 C58 单菌落分别接种到 YEB 液体培养基中, 在摇床上过夜培养, 当菌液的 OD 值为 0.4 时取出, 浸染蓝莓、树莓及蔓越莓的茎段外植体 10 min 后, 取出外植体, 用滤纸吸干。将经农杆菌处理的蓝莓、树莓及蔓越莓的茎段接入含有不同浓度羧苄青霉素的分化培养基中培养 40 d, 逐日观察并记录农杆菌的生长情况。

2 结果与分析

2.1 羧苄青霉素对蓝莓、树莓及蔓越莓茎段分化影响

21 d 后对蓝莓、树莓及蔓越莓茎段分化的情况进行统计。从表 1 可知, 在羧苄青霉素的浓度低于 200 mg/kg 时, 3 种植物的分化率都能达到 100%, 而且分化的芽生长情况也都很正常; 但羧苄青霉素的浓度高于

第一作者简介: 张寅玲(1974), 女, 天津人, 本科, 讲师, 现主要从事制药技术方面的教学与研究工作。E-mail: zhangyinling74@126.com.

通讯作者: 杨静慧(1961-), 女, 甘肃兰州人, 博士, 教授, 现主要从事园艺和生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: jinghuiyang2@yahoo.com.cn.

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(072CKFNC1100); 天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0803120)。

收稿日期: 2010-03-31

200 mg/kg 时,情况就发生了变化,只有蔓越莓的分化率及生长情况没受影响,蓝莓与树莓都在不同程度上受到了影响,其中树莓的影响最大,当羧苄青霉素的浓度达到 600 mg/kg 时,分化的芽开始出现死亡的现象,因此蓝莓、树莓的羧苄青霉素的用量应低于 200 mg/kg 较为理想,而蔓越莓则可以适当增加到 400 mg/kg 以上。

表 1 羧苄青霉素对 3 种浆果茎段分化率影响 %

品种	羧苄青霉素浓度/mg · kg ⁻¹				
	0	200	400	600	800
蓝莓	100(+)	100(+)	78(0)	23(0)	12(0)
树莓	100(+)	100(+)	34(0)	21(-)	0
蔓越莓	100(+)	100(+)	100(+)	100(+)	100(0)

注 + 表示分化出的芽生长正常;0 表示分化出的芽生长停止;- 表示分化出的芽萎蔫或死亡。

2.2 羧苄青霉素对蓝莓、树莓及蔓越莓组培苗生根影响

由表 2 可知,在羧苄青霉素的浓度低于 100 mg/kg 时,3 种植物的生根率都能达到 100%,而且植株生长情况也都很正常;但羧苄青霉素的浓度高于 100 mg/kg 时,情况就发生了变化,只有树莓的分化率在 400 mg/kg 时没受影响,蓝莓与蔓越莓都在不同程度上受到了影响,其中蓝莓的影响最大,当羧苄青霉素的浓度达到 200 mg/kg 时,蓝莓的生根率就开始下降,因此蓝莓、蔓越莓的羧苄青霉素的用量应低于 200 mg/kg 较为理想,而树莓则可以适当增加到 200~400 mg/kg 之间。

表 2 羧苄青霉素对 3 种浆果组培苗生根率影响 %

品种	羧苄青霉素浓度/mg · kg ⁻¹				
	0	200	400	600	800
蓝莓	100(+)	67(+)	73(0)	11(0)	0
树莓	100(+)	100(+)	100(0)	56(-)	0
蔓越莓	100(+)	100(+)	89(+)	23(+)	0

注 + 表示植株生长正常;0 表示植株生长停止;- 表示植株萎蔫或死亡。

2.3 不浓度羧苄青霉素对农杆菌抑制效果

经过农杆菌处理的 3 种浆果外植体,在分化培养基上生长 40 d 后,对每种处理出现肉眼能够发现的农杆菌菌落情况统计结果见表 3、4。由表 3 可知,不浓度羧苄青霉素对农杆菌 LBA4404 抑制效果在 3 种浆果上表现不同,其中蓝莓与蔓越莓的抑菌效果明显好于树莓;从每种植物上出现的菌落来看,在羧苄青霉素浓度低于 200 mg/kg 时,3 种植物出现菌落的时间都不超过 7 d,而当羧苄青霉素浓度达到 400 mg/kg 时,3 种植物出现菌落的时间都超过 14 d,因此在 3 种植物转化培养中羧苄青霉素浓度在 400 mg/kg 时,继代时间应控制在 14 d。当羧苄青霉素浓度达到 600 mg/kg 以上时,虽然出现菌落的时间延长至 30 d 左右,但从外植体的生长来看,基本生长停止或死亡。

从表 4 可以看出,不浓度羧苄青霉素对农杆菌 C58 抑制效果在 3 种浆果上表现基本相同,其中蓝莓与蔓越

莓的抑菌效果略好于树莓;从每种植物上出现的菌落来看,在羧苄青霉素浓度低于 200 mg/kg 时,3 种植物出现菌落的时间都不超过 7 d,而当羧苄青霉素浓度达到 400 mg/kg 时,3 种植物出现菌落的时间都在 14 d 左右,因此在 3 种植物转化培养中羧苄青霉素浓度在 400 mg/kg 时,继代时间应控制在 10 d 以下。当羧苄青霉素浓度达到 600 mg/kg 以上时,虽然出现菌落的时间延长至 20 d 以上,但从外植体的生长来看,基本生长停止或死亡。

表 3 羧苄青霉素对农杆菌 LBA4404 抑制效果 d

品种	羧苄青霉素浓度/mg · kg ⁻¹				
	0	200	400	600	800
蓝莓	2	7	20	30	32
树莓	1	7	16	19	19
蔓越莓	2	5	23	32	33

注:表中数据为出现菌落的天数 表 4 同

表 4 羧苄青霉素对农杆菌 C58 抑制效果 d

品种	羧苄青霉素浓度/mg · kg ⁻¹				
	0	200	400	600	800
蓝莓	1	5	15	26	30
树莓	1	4	13	20	21
蔓越莓	1	5	16	28	33

以上 3 种植物进行基因转化过程中,如果以茎段为外植体,在分化阶段蓝莓与树莓羧苄青霉素浓度应在 200~300 mg/kg,而且继代时间应在 7 d 而蔓越莓可以采用 400 mg/kg,继代时间可在 7~14 d;在生根阶段 3 种植物羧苄青霉素浓度应在 200 mg/kg 以下,由于在生根阶段农杆菌基本被抑制,为了利于生根,可适当延长继代时间直到可以移栽。

3 结论与讨论

从试验结果可以看出,羧苄青霉素对 3 种植物的分化及生根的影响不同,分析原因可能由于不同植物对羧苄青霉素的忍耐程度不同所致^[3-5],因此在进行基因转化试验时一定要对所用外植体进行羧苄青霉素的耐受性检测,以便获得准确的用量,提高转化率。同时植物在生根培养时对羧苄青霉素的反应要强于分化阶段,因此在生根阶段可适当降低其用量。

比较羧苄青霉素对农杆菌 LBA4404 与 C58 的抑制效果来看,农杆菌 LBA4404 更容易抑制生长^[6],因此,在基因转化试验中应根据所用农杆菌的菌株不同,所用羧苄青霉素的浓度及继代时间都应做出相应的调整。此外,影响羧苄青霉素对农杆菌的抑制效果的因素还很多,如侵染时菌液的浓度、时间以及共培养时间等因素^[7]。

参考文献

[1] 顾颖. 蓝浆果与蔓越橘[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
[2] 高武军, 段红英, 卢龙斗, 等. 油菜转化体系中抗生素浓度的优化试验[J]. 河南科学, 2002, 20(3): 257-259.

广东石斛快速繁殖及种苗移栽技术

詹启成¹, 李雪^{1, 2}, 祁英¹, 杨双霞¹, 叶清梅¹, 简丽观¹

(1. 泉州市泉美生物科技发展有限公司 福建 泉州 362012; 2. 福建省特色花卉工程技术研究中心 福建 福州 350013)

摘要: 利用野生广东石斛种子, 经无菌播种在 MS+香蕉 70 g/L+AC 3 g/L+蔗糖 30 g/L, 琼脂 7.0 g/L, pH 5.4 种子萌发后形成大量 PLBS 需要 110 d 左右。这些 PLBS 在培养基 MS+BA 0.1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上繁殖系数为 6.0 以上。而 PLBS 在培养基 1/4MS+香蕉 70 g/L+AC 1 g/L 分化成细小植株后, 再经 1/2MS+香蕉 70 g/L+NAA 0.5 mg/L+AC 0.3 g/L 培养后形成完整植株。播种苗在温室中用水草种植其成活率 100%。

关键词: 广东石斛; 种子; 繁殖

中图分类号: S 567.1⁺5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001—0009(2010)16—0137—03

广东石斛(*Dendrobium wilsonii* Rolfe)又名白花铜皮石斛, 茎直立或斜立, 细圆柱形, 通常长 10~30 cm, 粗 4~6 mm, 不分枝, 节间长 1.5~2.5 cm。叶革质, 二列、

数枚, 互生于茎的上部, 狭长圆形, 叶鞘革质。总状花序 1~4 个, 从落了叶的老茎上部发出, 具 1~2 朵花; 长 4~7 mm, 花大, 8~9 cm, 乳白色, 开展; 中萼片长圆状披针形; 侧萼片三角状披针形, 与中萼片等长; 花瓣近椭圆形; 唇瓣卵状披针形, 比萼片稍短而宽得多, 唇盘中央具 1 个黄绿色的斑块, 密布短毛^[1, 2]。广东石斛全株入药, 有养气、化痰、镇静之功效, 常用以制作环草石斛、黄草石斛^[3, 4], 具有较高的药用价值, 由于原始资源的极度破坏, 导致野生广东石斛已经濒临灭绝。

第一作者简介: 詹启成(1963-), 男, 湖北麻城人, 本科, 农艺师, 现从事花卉育种及资源引进及鉴定工作。
通讯作者: 李雪(1968-), 男, 重庆大足人, 硕士, 现从事园艺植物选育快繁及产业化研究工作。E-mail: Snowthlee@yhoo.com.cn。
基金项目: 福建省省院科技合作专项(农业)资助项目(2009N4008)。
收稿日期: 2010-04-12

[3] CAO Ying, HU Shang-lian. Meropenem as an alternative antibiotic agent for suppression of *Agrobacterium* in genetic transformation of orchid [J]. *Agricultural Sciences in China* 2006, 5(11): 839-846.
[4] 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.
[5] 范国强, 赵振利, 曹艳春. 抗生素对悬铃木体外植株再生影响的研究[J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(3): 279-284.

[6] 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.
[7] 朱海生, 潘东明, 林义章等. 根癌农杆菌介导草莓遗传转化研究[J]. *核农学报*, 2008, 22(1): 36-40.
(注: 该文作者还有杨静慧, 工作单位为天津农学院园艺系。)

The Effects of Carbenicillin on Growth and Differentiation of Three Berries

ZHANG Yan-ling¹, HUANG Jun-xuan², LI Jian-ke², LI Shuang-yue², LIU Yan-jun², YANG En-qin², YANG Jing-hui²

(1. Tianjin Biological Uacational Technical College Tianjin 300462; 2. Horticultural Deparment of Tianjin Agricultural University, Tianjin 300884)

Abstract: The research aimed to provide references for further study of gene transformation of blueberry, raspberry and cranberry in *Agrobacterium*-mediated transformation. Effects of carbenicillin on the growth and differentiation of various explants of three berries were studied and the inhibitive effects of carbenicillin upon *Agrobacterium tumefaciens* also were studied. The results showed that the optimum concentrations of carbenicillin on stage of differentiation of blueberry and raspberry was 200~300 mg/kg, and the time of subculture was 7 days; The optimum concentrations of carbenicillin on stage of differentiation of cranberry was 400 mg/kg, and the time of subculture was 7~14 days; The optimum concentration of carbenicillin on stage of rooting of three berries was under 200 mg/kg.

Key words: blueberry; raspberry; cranberry; carbenicillin