

# 卡那霉素对 108 杨不定芽诱导的影响

李永丽<sup>1</sup>, 周洲<sup>1</sup>, 郑涛<sup>1,2</sup>, 贾会霞<sup>1,3</sup>, 魏静<sup>1,4</sup>

(1. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091; 4. 中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

**摘要:**以 108 杨为试材, 以茎段、叶柄、叶片 3 种外植体的高效不定芽诱导再生为基础, 研究了不同梯度浓度卡那霉素(Km)对 108 杨不定芽诱导的影响。结果表明: 茎段外植体对 Km 表现出较高的耐受性, 叶柄和叶片外植体的敏感性高; 在遗传转化过程中 70 mg/L 的 Km 作为茎段外植体的临界筛选浓度较为合适; 对于叶柄和叶片外植体, 选择 30 mg/L 的 Km 临界筛选浓度较为合适。

**关键词:**108 杨; 离体培养; 卡那霉素

**中图分类号:**S 792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0119-03

我国的杨树基因工程已经取得了许多成果, 但转基因受体杨树多不是主栽品种, 即使经过大量基因改良工作后, 其速生性和适应性都受到先天条件的局限, 许多基因工程研究成果没有在生产中广泛应用<sup>[1]</sup>。为了使杨树基因工程改良研究与林业生产实际应用更紧密结合, 从生产中一些优良主栽品种的遗传转化进行突破具有重大现实意义。108 杨 (*Populus × euramericana* cl. 'Guariento') 是我国华北中原地区目前最好的杨树良种之一<sup>[2-3]</sup>, 是理想的转基因受体材料。在基因转化过程中, 外植体要经历合适浓度筛选抗生素的筛选过程。遗传转化中要求施加的选择压能有效地抑制非转化细胞的生长, 使之缓慢死亡, 又不影响转化细胞的正常生长<sup>[4-5]</sup>。卡那霉素作为一种常用的选择性抗生素, 对植物再生有显著的抑制作用, 但即使同一植物的不同部位其抑制效果也不尽相同。该研究旨在确定选择标记抗生素卡那霉素对 108 杨茎段、叶柄和叶片 3 种外植体分化的最适分化抑制浓度, 为 108 杨遗传转化、基因工程改良工作提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

108 杨 (*Populus × euramericana* cl. 'Guariento')

**第一作者简介:**李永丽(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为林木生物技术, 现从事林木病理学教学与研究工作。

**责任作者:**周洲(1978-), 男, 博士, 副教授, 现从事林木遗传育种教学与研究工作。E-mail:zhouzhouhaust@163.com。

**基金项目:**林木育种国家工程实验室、林木花卉遗传育种教育部重点实验室开放基金资助项目(FOP2010-14); 国家“863”计划资助项目(2011AA100201); 2011 河南科技大学大学生研究训练计划资助项目(SRTP)。

**收稿日期:**2011-11-23

组培苗由河南科技大学林学院实验室培育保存。组织培养温度 (25 ± 1) °C, 光照时间 16 h/d, 光照强度 2 000 lx。

### 1.2 试验方法

将 108 杨生根组培无菌苗茎段和叶柄分别剪成 1 cm 左右的短段, 完全展开的叶片横向深达主脉剪 3 道伤口, 接种在丛生芽诱导培养基上, 每处理 40 个外植体。在最适不定芽诱导培养基中添加梯度浓度的卡那霉素(Km), 培养基组成为 MS + TDZ 0.05 mg/L + 6-BA 0.05 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L, 附加琼脂 5 g/L, pH 为 6.0。茎段、叶柄剪成长度 1 cm, 分别接种在 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 mg/L 10 个 Km 梯度浓度; 完全展开的叶片横向深达主脉剪 3 道伤口, 分别接种在 Km 浓度为 0、10、20、30、40、50 mg/L 的基本培养基中。以上每个处理浓度接种 30 个外植体, 观察不定芽诱导情况, 30 d 后进行结果统计。数据用 SPSS 软件中的一维方差方法进行统计分析。

## 2 结果与分析

由表 1 可知, 茎段、叶柄和叶片 3 种外植体分别置于最适分化培养基, 发现随着培养基中 Km 含量逐渐增加, 最终不能诱导出丛生芽的外植体数量也逐渐增多。

茎段外植体随着抗生素浓度由低至高的变化, 外植体分化率降低(图 1)。在不含 Km 的培养基上, 对照组茎段外植体分化率达 100%, 两段切口形成愈伤组织最多, 形成了大量丛生状不定芽; 茎段外植体对 Km 耐受度较高, 在 Km 浓度 10~20 mg/L 培养基上可以正常分化, 30~40 mg/L 浓度下少量外植体分化受抑制, 在 Km 含量分别为 50、60、70 mg/L 的培养基上, 茎段外植体受抑制率分别为 33.3%、66.7%、86.7%, 3 个浓度下对茎段分化抑制结果间差异显著, 70 mg/L 与 80 mg/L 及以上浓度抑制结果间则无显著性差异。

表1 Km对108杨丛生芽诱导的抑制作用

Table 1 Inhibition Effects of Kanamycin on adventitious bud induction of *Populus×euramericana* cl. 'Guariento'

Km /mg·L <sup>-1</sup>	茎段外植体受抑制数量 Inhibition number of stem explants	叶柄外植体受抑制数量 Inhibition number of leafstalk explants	叶片外植体受抑制数量 Inhibition number of leaf explants
0	0a	0a	3a
10	0a	3a	10b
20	0a	15b	19c
30	2a	21c	29d
40	5a	25c	30d
50	10b	28c	30d
60	20c	29c	
70	26d	30c	
80	27d	30c	
90	29d	30c	

注:MS为基本培养基。同列数字旁不同小写字母分别表示不同处理间差异达到显著( $P<0.05$ )水平。

The basic medium is MS.

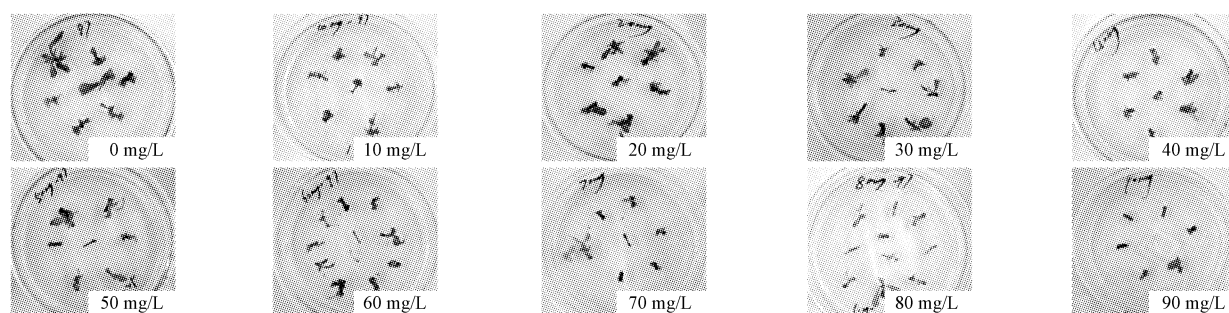


图1 不同质量浓度卡那霉素作用于茎段外植体的不定芽诱导

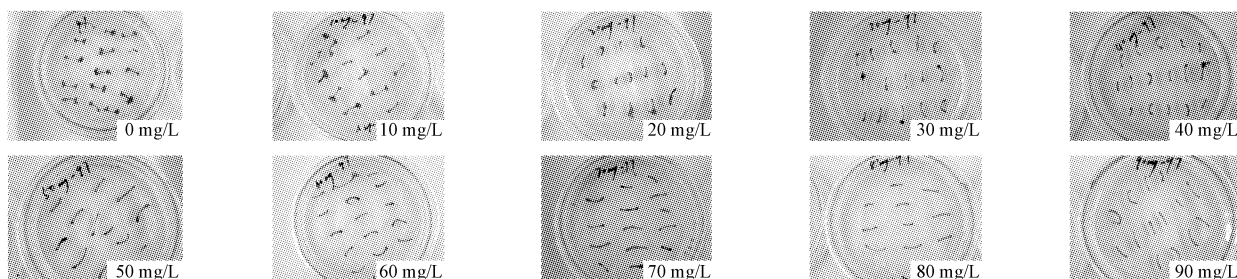
Fig.1 Effects of different Kanamycin concentration on adventitious bud induction from stems of *Populus×euramericana* cl. 'Guariento'

图2 不同质量浓度卡那霉素作用于叶柄外植体的不定芽诱导

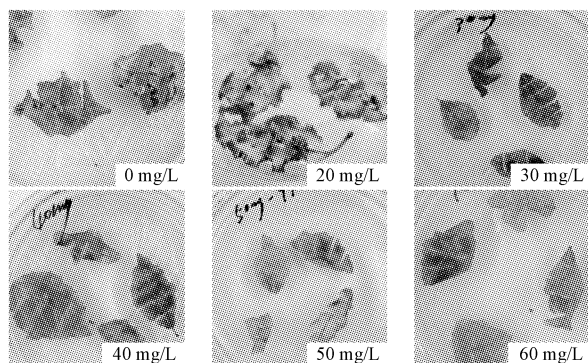
Fig.2 Effects of different Kanamycin concentration on adventitious bud induction from leafstalk of *Populus×euramericana* cl. 'Guariento'

图3 不同质量浓度卡那霉素作用于叶片外植体的不定芽诱导

Fig.3 Effects of different kanamycin concentration on adventitious bud induction from leaf of *Populus×euramericana* cl. 'Guariento'

由图2可知,叶柄培养20 d后,在不含Km的培养基上,对照组叶柄外植体分化率100%。培养基中Km含量分别为10、20、30 mg/L时,叶柄外植体分化受抑制率分别为10%、30%、70%,叶柄分化受抑制结果间差异显著,30 mg/L与40 mg/L及以上含量抑制结果间则无显著性差异。

由图3可知,叶片外植体培养20 d后,在不含Km的培养基上,对照组分化率达90%。培养基中Km含量分别为10、20、30 mg/L时,叶片外植体分化受抑制率分别为33.3%、63.3%、99.7%,叶片比叶柄对Km敏感度更高;叶片分化受抑制结果间差异显著,30 mg/L与40 mg/L及以上含量抑制结果间则无显著性差异。

### 3 结论与讨论

基因转化的效率与组织培养的效率 and 基因转化系统相关,筛选方法也是其中重要的一环。为促进转化细胞的分裂生长,抑制非转化细胞,必须对培养的细胞施加选择压<sup>[4]</sup>。Km抗性基因是转基因研究中最常用的标记基因,用做区分转基因植物细胞和非转基因植物细胞。不同杨树品种对Km表现出的耐受程度间有差异,叶片的选择临界浓度多集中在40~50 mg/L<sup>[4-7]</sup>,该试验不但研究了108杨叶片外植体的Km反应,同时还测定了茎段和叶柄对Km的反应。结果表明,不同外植体置于最适培养基上,其选择临界浓度也不尽相同。茎段外植体对Km表现出较高的耐受性,而叶柄和叶片外植体的敏感性高。在含Km 70 mg/L的培养基上,茎段外植

体分化受抑制率达 86.7%,且在 70 mg/L 以上浓度间抑制结果无显著性差异,对于茎段外植体,在 108 杨遗传转化过程中 70 mg/L 的 Km 作为茎段外植体的临界筛选浓度较为合适。当 Km 30 mg/L 含量时,叶柄和叶片外植体分化受抑制率达 70% 和 96.7%,且含量 30 mg/L 以上浓度间抑制结果无显著性差异;对于叶柄和叶片外植体,遗传转化过程中 Km 选择 30 mg/L 的临界筛选浓度。

#### 参考文献

[1] 卢孟柱,胡建军.我国转基因杨树的研究及应用现状[J].林业科技开发,2006(6):1-4.

[2] 王维正,刘红.林木良种指南[M].北京:中国林业出版社,2003:88-96.

[3] 牛正田.黑杨派无性系苗期产量相关性状的遗传变异[D].北京:中国林业科学研究院,2007.

[4] 杨敏生,李志兰,王颖,等.双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达[J].林业科学,2006,42(9):61-68.

[5] 郝贵霞,朱桢,朱之梯.毛白杨遗传转化系统优化的研究[J].植物学报,1999,41(9):936-940.

[6] 诸葛强,王婕琛,黄敏仁,等.新疆杨高效遗传转化系统的建立[J].植物资源与环境学报,2003,12(4):62-70.

[7] 樊军锋,韩一凡,李铃,等.84K 杨树耐盐基因转化研究[J].西北林学院学报,2002,17(4):33-37.

## Effects of Kanamycin on Adventitious Buds Induction of *Populus × euramericana* cl. 'Guariento'

LI Yong-li<sup>1</sup>, ZHOU Zhou<sup>1</sup>, ZHEN Tao<sup>1,2</sup>, JIA Hui-xia<sup>1,3</sup>, WEI Jing<sup>1,4</sup>

(1. College of Forestry, Hanan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003; 2. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091; 4. Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** Effective adventitious buds regeneration of stems, petioles and leaves of *Populus × euramericana* cl. 'Guariento' were used as foundation, influence from various Kanamycin (Km) concentrations were studied. The results showed that stem was quite tolerant to kanamycin, which proper concentration was 70 mg/L in transformation; while petioles and leaves were very sensitive and an appropriate concentration was 30 mg/L.

**Key words:** *Populus × euramericana* cl. 'Guariento'; *in vitro* culture; kanamycin

## 带囊衣糖水桔子罐头如何加工

不脱囊衣的糖水桔子罐头的生产工艺是在蜜桔剥皮、分瓣后,将桔瓣浸泡在柠檬酸等有机酸溶液中,然后称量装罐、注入糖水,经真空脱气封口后,加热杀菌成制品。此法最大特点是无脱囊衣工序,将桔瓣上覆盖的囊衣转为可食部分。

传统的全脱囊衣工序系采取盐酸及氢氧化钠溶液浸泡处理,但在脱囊衣的酸碱处理过程中,由于桔瓣果肉外露,故易招致桔瓣表面粗糙及碎瓣的产生,另外为了除去残留碱,约经 1 h 的水洗流漂,容易造成砂囊内的果汁成分流失。

为克服上述传统全脱囊衣糖水桔子罐头生产方法和质量上存在的问题,故开发带囊衣糖水桔子的生产方法。

**制作方法:**首先,剥皮、分瓣,桔瓣在 0.5~10% 柠檬酸等有机酸溶液中,以 30~60℃ 浸泡 10~60 min,或者以冷酸溶液(约 10℃ 以下)浸泡 1 夜左右。然后,缓缓水洗,沥水后称量、装罐,注入 30%~50% 的糖水,经脱气封口后,以 80℃ 约 20 min 加热杀菌,即可使桔瓣上的囊衣可食化。也就是说,将有机酸浸透到囊衣组织里,杀菌时因罐内桔瓣浸泡在糖水之中,受其加热作用而使其囊衣实现可食化。

**工艺优点:**按该方法生产的带囊衣糖水桔子,由于省去了桔瓣脱囊衣工序,并且不需要碱处理,所以不必进行长时间的漂洗。因此,几乎不损伤桔瓣,又不招致果汁成分的流失,同时还能提高原料利用率。桔瓣表面包裹着光滑的囊衣,食味和口感都很好。因省去了以往的碱处理及相应的水漂洗工序,所以使整个处理工序的所需时间也能比传统方法缩短 1 h 以上。同时由于废水中不含囊衣碎片及胶质物,因此对工业化生产场合的废水处理非常有利。总之,此法可大幅度地缩短加工处理时间,并对质量、工程管理都是很有效的。

**实例:**剥皮、分瓣后的桔瓣,在 40℃ 的 3% 柠檬酸溶液中浸泡 40 min。缓缓水洗后沥去水后称取约 250 g 桔瓣于 5 号罐内,注入 40% 左右的糖水。然后真空封口,以 80℃ 左右加热杀菌约 20 min 后冷却,即为成品。