

转化用抗生素对青花菜离体再生的影响

秦耀国^{1,2}, 曹必好², 杨翠芹³, 陈国菊², 雷建军²

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院 四川 雅安 625012; 2. 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 3. 四川农业大学 农学院 四川 雅安 625012)

摘要: 为确定农杆菌转化青花菜时所用抗生素的适宜浓度, 在分化与生根培养基中分别添加不同浓度的卡那霉素(Km)、500 mg/L 的羧苄青霉素(Cb)与头孢霉素(Cef), 探讨了青花菜离体再生的影响。结果表明: 青花菜外植体对Km比较敏感, 表现在分化阶段10 mg/L Km能抑制带柄子叶与下胚轴分化不定芽, 在生根阶段15 mg/L Km能完全抑制根的生出。在脱菌抗生素的使用上, 分化阶段宜用Cb, 并逐步降低浓度, 生根阶段宜用低浓度的Cef。

关键词: 青花菜; 再生; 分化; 抗生素

中图分类号: S 635.903.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0036-03

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)又名西兰花、绿菜花、茎椰菜、木立花椰菜、意大利芥蓝等, 是十字花科芸薹属甘蓝种中以绿色花球为产品器官的1、2 a生草本植物, 是一种重要的蔬菜作物。随着青花菜栽培规模的扩大和消费量的增长, 虫害、采后易衰老、不耐贮等问题日益突出, 成为其发展的限制因子。基因工程技术为导入外源基因以创新种质和改良品种提供了捷径, 近些年, 外源基因转化青花菜的研究已有一些报道^[1-3]。

在转化操作之前, 对外植体进行抗生素敏感性试验是十分必要的, 包括选择抗生素与脱菌抗生素。选择抗生素的应用要依据转化载体上所含的抗性标记基因, 同时待转化植物细胞对该抗生素必须是敏感的, 即抗生素能抑制或杀死正常的植物细胞, 而转化细胞由于抗性标记基因的表达能解除抗生素的毒性, 能够存活。NPTII作为一种抗性选择标记基因与其对应的卡那霉素(kanamycin, Km)作为选择压在蔬菜作物的遗传转化中最为常用。脱菌抗生素用于共培养后杀死农杆菌, 否则农杆菌在培养基上繁殖蔓延, 外植体无法生存。常用的脱菌抗生素有羧苄青霉素(carbenicillin, Cb)、头孢霉素(cefotaxime, Cef)和羧噻吩青霉素(timentin), 对农杆菌都有杀伤和抑制作用, 同时对植物细胞同样有一定的生物学效应。该试验探讨了Km、Cb与Cef对青花菜带柄子叶与下胚轴离体再生的影响, 为更好地进行青花菜的遗传转化研究奠定基础。

第一作者简介: 秦耀国(1979-), 男, 硕士, 讲师, 现从事蔬菜遗传育种与生物技术研究工作。E-mail: qinyaoguo@sina.com。

通讯作者: 雷建军(1957-), 男, 湖南省祁东县人, 博士, 教授, 现从事蔬菜作物遗传育种与基因工程方向研究工作。

基金项目: 广东省重大专项资助项目(2002A2070301)。

收稿日期: 2008-10-29

1 材料与方法

1.1 供试材料

青花菜品种“里绿”, 种子购自北京市种子分公司。

1.2 无菌苗的培养

挑选饱满的种子, 75%乙醇中浸泡30 s, 2%次氯酸钠溶液灭菌15 min, 其间不时摇动, 无菌水冲洗4~5次, 播种于MS固体培养基上。在(25±1)℃、每天光照16 h/8 h, 黑暗条件下培养6~8 d。

1.3 外植体与培养基

取5 d龄(子叶刚展平)的无菌苗带柄子叶、下胚轴为外植体。带柄子叶分化培养基为MSB(MS矿质元素+B₆有机成分)+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L, 下胚轴分化培养基MSB+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1 mg/L, 附加质量浓度3%蔗糖, 1%琼脂, pH 5.8。不定芽生根培养基为MS+IAA 0.1 mg/L。

1.4 外植体对Km的敏感性试验

将外植体接种于含Km 5、10、15、20、25、50 mg/L的分化培养基中, 每个处理接种50个外植体, 试验其对Km的敏感性, 以确定分化过程中适宜的Km选择压; 将高度大于1 cm且较一致的不定芽插入到含Km 5、10、15、20、25、50 mg/L的生根培养基中确定生根选择压。

1.5 不同脱菌抗生素Cb和Cef对芽分化与生根影响

将外植体接种在分别添加终浓度为500 mg/L的Cb和Cef的分化培养基上, 研究对外植体分化率的影响。将分化的不定芽接种到分别添加终浓度为500 mg/L的Cb和Cef的生根培养基上, 研究对不定芽生根的影响。以无抗生素的分化或生根培养基作为对照(CK)。抗生素的添加均采用过滤灭菌, 待培养基冷却至约60℃后加入。

2 结果与分析

2.1 分化阶段Km选择压的确定

试验表明带柄子叶对 Km 较敏感,如图 1,在低浓度下虽能脱分化出愈伤组织,但始终无芽的分化,随时间延长,子叶逐渐白化死亡;下胚轴在 Km 5 mg/L 的培养基上能再生出芽,但随浓度升高,当大于 10 mg/L 的条件下不能分化出芽,见图 2。将外植体先接种于不含 Km 的分化培养基上预培养 1 周,再转接于含上述浓度 Km 培养基上,在 Km 浓度大于 10 mg/L 时也都无芽的分化。所以确定在分化阶段以 10 mg/L 作为适宜的 Km 选择压。

2.2 生根阶段 Km 选择压的确定

将高度大于 1 cm 的不定芽插入到含 Km 不同浓度

的生根培养基上,5 d 后在 Km 15 mg/L 及以上的处理中,部分芽顶端现紫红色,表现中毒症状;2 周后在 Km 10 mg/L 以上培养基上不定芽基部出现溃烂,而在 Km 5 mg/L 上部分芽基部稍膨大;20 d 后在 Km 10 mg/L 以上培养基上不定芽叶片开始变黄,出现死株现象。但随时间延长,发现在 Km 5 mg/L 的培养基上 50% 的芽分化出根,在 10 mg/L 上有 2 个芽分化出极短根,原因可能是未及时转接使抗生素失效,致使 Km 对生根不再有抑制作用。确定在生根阶段加入终浓度为 15 mg/L Km 以进一步选择。

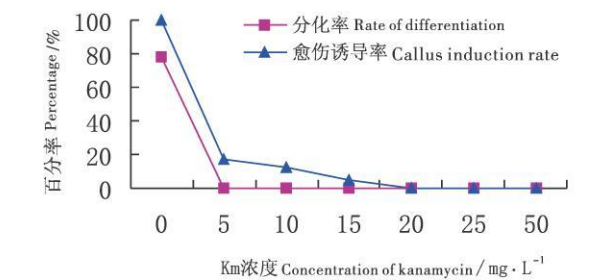


图 1 Km 对带柄子叶分化的影响

Fig. 1 Effect of kanamycin on differentiation of cotyledon with petiole

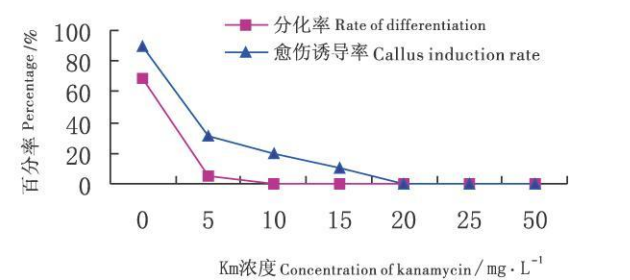


图 2 Km 对下胚轴分化的影响

Fig. 2 Effect of danamycin on differentiation of hypocotyl

2.3 不同脱菌抗生素 Cb 和 Cef 对不定芽分化的影响

2 种脱菌抗生素对 2 种外植体的芽分化率均有影响,结果见表 1。Cef 的抑制作用较 Cb 大,对带柄子叶再生有强烈的抑制作用,易引起伤口细胞褐化死亡,使之不能分化;Cef 对下胚轴芽分化有一定抑制作用,而

Cb 对芽分化抑制作用较小,因此在芽分化阶段宜用 Cb 脱除农杆菌。外植体与农杆菌共培养后先用 500 mg/L Cb 迅速杀死培养基表面的农杆菌,而后转接到 200 ~ 300 mg/L 的培养基中,以降低对分化出芽的影响。

表 1 Cb 和 Cef 对不定芽分化的影响

Table 1		Effect of carbenicillin and cefotaxime on shoots differentiation					
抗生素及浓度 Antibiotics and its concentration/ mg · L ⁻¹	外植体数目 No. of explants	带柄子叶 Cotyledon with petiole		下胚轴 Hypocotyl			
		分化数 No. of differentiation	分化率 Rate of differentiation/ %	分化数 No. of differentiation	分化率 Rate of differentiation/ %		
Cb 500	35	12	34.3	17	48.6		
Cef 500	25	0	0	9	39		
CK	30	23	76.7	22	73.3		

表 2 Cb 和 Cef 对不定芽生根的影响

Table 2 Effect of carbenicillin and cefotaxime on rooting of shoots			
附加成分 Additional elements/ mg · L ⁻¹	总数 Total number	生根的不定芽数 No. of shoots with roots	百分率 Percentage/ %
Cb 500	25	0	0
Cef 500	25	12	48
CK	50	46	92

2.4 Cb 和 Cef 对不定芽生根的影响

结果见表 2,表明在含有 Cb 500 mg/L 的生根培养基上,不定芽不能生根;而添加 Cef 500 mg/L 时,仅部分芽能生根,生根率低于对照,且较对照生根慢、根短,不利于以后的移栽。所以如果在分化阶段脱菌效果好时,生根时可不加 Cef,如仍能见到农杆菌长出,可加低浓度(如 100~300 mg/L)的 Cef。

3 讨论

青花菜外植体对 Km 较敏感,试验证明 10 mg/L 浓度可完全抑制其分化,Km 选择压初步定为 10 mg/L。尽管青花菜的转化中有采用 25 mg/L Km 的报道^[3],虽更高浓度 Km 更能起抑制作用,但也有研究表明浓度低比浓度高要好,因为高浓度毒性更强,能迅速杀死植物细胞,死细胞对邻近活细胞往往有抑制作用,不利于转化细胞生长。不定芽生根时对 Km 的敏感性也很强,在高浓度 Km 选择压力的选择培养基上非转化体难生根,只有转化的芽才能生根,所以在一定选择压力下生根也是实现转化的有力佐证^[4]。通过将农杆菌划线于含不同浓度脱菌抗生素的 MS 固体培养基平板,在无脱菌抗

生素的平板上能长出菌落,而在 100 mg/L 或以上浓度的 Cb 或 Cef 的平板上无农杆菌长出,说明 Cb 或 Cef 能有效抑制农杆菌。Cb 和 Cef 对青花菜外植体芽分化均有抑制作用,Cef 的抑制作用更大,容易引起伤口处细胞褐化死亡,阻遏芽的分化。所以分化时选 Cb,共培养后先用 500 mg/L Cb 迅速杀死接触培养基的农杆菌,后降低浓度防止外植体表面和浅层组织中残留的农杆菌长出;生根阶段则宜用 Cef,即在转化过程的不同阶段应用不同的脱菌抗生素作抑菌剂。这与在甘蓝型油菜和甘蓝上的研究结果一致^[5-6]。但可能因试验材料或培养基的不同,也有相反的结论,卫志明等^[7]、徐淑平等^[8]分别比较了不同抗生素对甘蓝和花椰菜下胚轴芽分化的影响,认为 Cef 优于 Cb。

参考文献

[1] 秦耀国,雷建军,曹必好.青花菜遗传育种与生物技术应用研究进展

[J].北方园艺,2004(2):11-13.

[2] 黄科,曹家树,余小林.CYP86MF 反义基因转化获得青花菜雄性不育植株[J].中国农业科学,2005,38(1):122-127.

[3] Mets T D, Dixit R, Earle E D, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* Var italica) and cabbage (*B. oleracea* Var capitata) [J]. Plant Cell Reports, 1995, 15: 287-292.

[4] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002.

[5] 程振东,卫志明,许智宏.根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J].植物学报,1994,36(9):657-663.

[6] 雷建军,杨文杰,宋洪元,等.水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因转化甘蓝的研究.加入 WTO 和中国科技与可持续发展-挑战与机遇、责任与对策[M].北京:中国科学出版社,2002.

[7] 卫志明,黄健秋,徐淑平,等.甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导 B. t. 基因转化甘蓝[J].上海农业学报,1998,14(2):11-18.

[8] 徐淑平,卫志明,黄健秋.根癌农杆菌介导 B. t. 基因和 CpTi 基因对花椰菜的转化[J].植物生理与分子生物学报,2002,28(3):193-199.

Effect of Antibiotics for Transformation on *in vitro* Regeneration of Broccoli

QIN Yao-guo^{1,2}, CAO Bi-hao², YANG Cui-qin³, CHEN Guo-ju², LEI Jian-jun²

(1. College of Forestry and Horticulture Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 3. College of Agriculture Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: To determine the appropriate concentration of antibiotics in *Agrobacterium* transformation of broccoli, different concentration of kanamycin, 500 mg/L Cb and Cef were added into differentiation and rooting medium to discuss their effects on *in vitro* regeneration of broccoli. The results showed that explants of broccoli were more sensitive to kanamycin. 10 mg/L kanamycin could inhibit cotyledons with petiole and hypocotyls from differentiating adventitious buds, and 15 mg/L kanamycin was able to inhibit roots from taking entirely. As regards the use of antibacterial antibiotics, carbenicillin was apt to be used in the differentiation stage and the concentration should be reduced gradually. Low concentration of cefotaxime was apt to be used in rooting stage.

Key words: Broccoli; Regeneration; Differentiation; Antibiotics

大棚蔬菜按时浇水也有害

很多菜农在管理大棚蔬菜时,一般都是按天浇水(一般每 10 d 左右浇一次水)。这种按天浇水的做法非常不可取,如果不看实际情况,只是机械地按天浇水,必然会因浇水过多、过大出现沤根、死棵等现象。

蔬菜浇水应根据蔬菜长势、土壤状况、天气变化等进行调整,而不是每隔多少天浇一次水。合理浇水首先要看植株长势,通常植株缺水时,叶

片会萎蔫,长势会减弱,果实脐腐病发生较多,这时就应及时补充水分。

其次,要看土壤墒情,如果在大棚土壤不早时浇水,不仅不利于提高地温,而且还容易导致土壤透气性变差,致使根系缺氧,降低根系的活力,造成沤根,出现黄叶现象。

再次,在浇水之前一定要收看天气预报,不仅要选择晴天浇水,还要保证浇水后有 2~3 d 的晴天,以避

免浇水后遇到阴雨天气,导致棚内湿度增大,地温降低,病害多发,深冬季节更需特别注意,在连阴雨后骤晴的前 2 d,也不适宜浇水,应先提高棚温和地温,使植株基本恢复正常再浇水。

最后,要看地温,蔬菜适宜的日平均地温在 22℃ 左右,而深冬季节,大棚内地温多在 15~20℃,若浇水过量或是浇水时机不对,就会使地温迅速下降,造成根系受伤,危及植株地上部的生长。因此,低温时浇水最好在上午拉开草苫后进行。