

抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响

刘 晓 东, 王 婷 婷, 刘 群 录, 陈 嘉 熙

(东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以非洲紫罗兰无菌幼叶为试材,分别研究了3种抑菌抗生素(头孢霉素、头孢氨苄、羧苄青霉素)和3种筛选抗生素(硫酸卡那霉素、硫酸新霉素、G418)对非洲紫罗兰离体叶片不定芽再生的影响。结果表明:羧苄青霉素和头孢霉素是非洲紫罗兰遗传转化过程中适宜的抑菌抗生素,其适宜浓度均为300 mg/L,而头孢氨苄对非洲紫罗兰离体叶片的毒害作用较大,不适宜作为其转化过程中的抑菌抗生素;硫酸卡那霉素和G418对非洲紫罗兰不定芽再生有较强的抑制作用,可以作为筛选抗生素,其适宜的筛选浓度分别为50 mg/L和5 mg/L,而硫酸新霉素不适宜作为非洲紫罗兰遗传转化的筛选抗生素。

关键词:抗生素;非洲紫罗兰;不定芽

中图分类号:S 681.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0080-03

非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)属苦苣苔科(Gesneriaceae)非洲苦苣苔属(*Saintpaulia*)多年生草本植物,又名非洲堇。其花色艳丽,品种繁多,且开花期长,适宜在室内养殖,因此有“室内花卉皇后”的美称^[1]。非洲紫罗兰现有20 000多个品种,现代非洲紫罗兰在生长习性、花期及开花时间上相比原始种都有显著的提

高。虽然品种繁多,但是,目前非洲紫罗兰还缺少某些重要的观赏性状,特别是缺乏黄色花品种^[2]。由于传统的育种技术周期长且局限于已有的基因型,目前利用基因工程来定向改良观赏花卉的相关性状已经成为快速培育新品种的技术手段^[3-6]。其中,农杆菌介导法是最常用的转基因手段^[7-9],在农杆菌介导的转化过程中,植物和农杆菌共培养一段时间后,需要使用抑菌抗生素来及时有效地抑制农杆菌的生长;同时,需要根据载体所携带的标记基因来使用对应的筛选抗生素对转化体进行筛选^[10]。由于不同植物对不同种类的抗生素反应程度不同,故在用农杆菌介导法进行遗传转化之前,必须对所用的抑菌抗生素和筛选抗生素的种类和浓度进行

第一作者简介:刘晓东(1963-),男,硕士,教授,研究方向为园林植物引种栽培和养护管理及草坪建植。E-mail: liu196316@163.com.

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(200903056)。

收稿日期:2013-10-30

Application of the Local Materials in Dwellings of Hotian “Ayiwang”

MENG Fu-li¹, YUE Bang-rui², LIU-Ping¹

(1. School of Literature and Art, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 2. School of Architecture, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an, Shaanxi 710055)

Abstract: Taking dwellings of “Ayiwang” in Hotian traditional settlement as an example, analyzed the relationship of local materials resources characteristic and resolution of traditional settlement-building. Three construction intelligence that getting materials, selecting materials, using materials were summarized, they were using local materials, adjust measures to local conditions; comprehensive selection, the main of convenient; using material used to make the best long. Typical Hotian “Ayiwang” of dwellings in Southern Xinjiang. High of foundation, hedge and adobe wall, introverted of courtyard, a half open nest etc. Local characteristics of the traditional settlement of terminological patterned of architectural language. Actively explore the improvement of local materials and application technology promotion, local materials in the future new vernacular architecture plays the positive role was discussed.

Key words: local materials; Hotian local-style dwellings; vernacular of settlement; constructing-intelligence

筛选^[11-16]。该试验在已建立的非洲紫罗兰叶片高效再生体系的基础上,探讨了几种抑菌抗生素(头孢氨苄、头孢霉素、羧苄青霉素)以及筛选抗生素(G418、硫酸卡那霉素、硫酸新霉素)对非洲紫罗兰叶片再生不定芽的影响,以期确定合适的抑菌抗生素和筛选抗生素的种类和浓度,为其遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

非洲紫罗兰无菌苗为上海交通大学园林实验室保存。试验所用不定芽诱导培养基均为:MS(MS粉 4.4 g)+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L,添加蔗糖 30 g/L,结冷胶(Gelrite) 2.6 g/L。经 120℃ 高压灭菌 20 min后,在超净工作台添加所需抗生素。

试剂:硫酸卡那霉素(Kanamycin sulfate)、硫酸新霉素(Neomycin Sulphate)的灭菌溶液,购自生工生物;G418(Geneticin)、羧苄青霉素(Carbenicillin)、头孢霉素(Cefalexin)、头孢氨苄(Cephalexin monohydrate),均购自 BBI。

1.2 试验方法

以非洲紫罗兰无菌苗叶片作为外植体,在超净工作台上剪成(0.5×0.5) cm² 大小,分别接种在添加有不同种类和浓度抗生素的不定芽诱导培养基上,其中硫酸卡那霉素和硫酸新霉素的浓度均为:10、30、50、80、100 mg/L,G418 的浓度为:1、2、3、4、5 mg/L,羧苄青霉素、头孢霉素和头孢氨苄的浓度均为:100、200、300、400、500 mg/L。以不含抗生素的培养基为对照(CK)。每个处理设 4 次重复,每次重复 8 个叶片外植体。在温度(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx 的条件下进行培养。定期观察外植体的变化和不定芽的再生情况,培养 40 d 后统计叶片不定芽再生率。不定芽再生率(%)=产生不定芽的外植体数/总外植体数×100%。

1.3 数据分析

利用 SPSS 软件进行单因素方差分析,并采用 Duncan 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 抑菌抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响

由表 1 可知,头孢氨苄对非洲紫罗兰不定芽再生的影响最大。添加头孢氨苄的培养基中外植体失绿现象严重,外植体放置 7 d 左右,便开始失绿。200 mg/L 的头孢氨苄就可以显著的抑制不定芽的再生,当其浓度上升至 400 mg/L 时,不定芽再生率下降至 4.17%,500 mg/L 时所有外植体发生褐化,最终导致外植体的死亡。头孢霉素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响相对较小,随着头孢霉素浓度的增大,非洲紫罗兰不定芽再生率整体呈现下降的趋势,当浓度范围在 100~400 mg/L 时,不定芽再生率均为 70%左右,对不定芽再

生的影响较小。当浓度升高至 500 mg/L 时,不定芽再生率显著下降至 58.33%。在 3 种抑菌抗生素中,羧苄青霉素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响最小。添加羧苄青霉素的处理组,与 CK 相比,二者的不定芽再生率没有显著差异,而且外植体生长健康,呈现浓绿色。在添加 300 mg/L 的处理中,不定芽再生率反而有所提高。这可能是由于羧苄青霉素可以促进部分植株外植体的再生^[17]。同时,经查阅相关文献^[18-21] 可知,200~300 mg/L 的羧苄青霉素和头孢霉素即可较好的抑制农杆菌的生长。因此,在培养基中添加 300 mg/L 的羧苄青霉素或头孢霉素,在可以有效抑制农杆菌生长的同时,对不定芽再生的影响也较小,适合作为非洲紫罗兰不定芽再生阶段的抑菌抗生素。而头孢氨苄不适合作为非洲紫罗兰不定芽再生阶段的抑菌抗生素。

表 1 3 种抑菌抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响

Table 1 Effects of three antibacterial antibiotics on adventitious shoot regeneration of *Saintpaulia ionantha*

质量浓度 /mg·L ⁻¹	头孢霉素		头孢氨苄		羧苄青霉素	
	外植体数 /个	不定芽再 生率/%	外植体数 /个	不定芽再 生率/%	外植体数 /个	不定芽再 生率/%
0(CK)	32	87.50 b	32	75.00 d	32	87.50 a
100	32	75.00 ab	32	58.33 c	32	83.33 a
200	32	66.67 ab	32	29.17 b	32	79.17 a
300	32	70.83 ab	32	12.50 a	32	91.67 a
400	32	79.17 ab	32	4.17 a	32	70.83 a
500	32	58.33 a	32	0.00 a	32	87.50 a

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column show significant differences at 0.05 level. The same below.

2.2 筛选抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响

由表 2 可知,随着 3 种抗生素浓度的增加,非洲紫罗兰不定芽再生率随之下降,但对不同抗生素的敏感度不同。硫酸卡那霉素对非洲紫罗兰不定芽再生有明显地抑制作用。当其浓度为 30 mg/L 时,就可以使不定芽再生率从 84.38%下降到 6.25%;80 mg/L 时即可完全抑制不定芽的再生。G418 对非洲紫罗兰不定芽再生的影响也相对较大。1 mg/L 的 G418 就可以使其再生率从对照组的 84.38%下降到 59.38%。当其浓度增加到 4 mg/L 时,不定芽再生率只有 9.38%,当其浓度继续升高到 5 mg/L 时就几乎可以抑制所有不定芽的再生。相较于硫酸卡那霉素和 G418 来说,非洲紫罗兰离体叶片对硫酸新霉素的敏感度较低。添加 10~80 mg/L 的硫酸新霉素的试验组,不定芽再生率无明显差异。当浓度上升到 100 mg/L 时,不定芽再生率下降至 37.50%,但仍然较高。因此硫酸新霉素不适合作为非洲紫罗兰不定芽再生阶段的选择抗生素。硫酸卡那霉素和 G418 可以作为非洲紫罗兰不定芽再生阶段的选择抗生素,且其适宜选择的浓度分别为 50 mg/L 和 5 mg/L。

表2 3种筛选抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响

Table 2 Effect of three selective antibiotics on adventitious shoot regeneration of *Saintpaulia ionantha*

质量浓度 /mg·L ⁻¹	硫酸卡那霉素		硫酸新霉素		G418	
	外植体数 /个	不定芽再 生率/%	外植体数 /个	不定芽再 生率/%	外植体数 /个	不定芽再 生率/%
0(CK)	32	90.63b	32	84.38d	32	84.38c
1					32	59.38b
2					32	50.00b
3					32	40.63b
4					32	9.38b
5					32	3.13a
10	32	84.38b	32	62.50c		
30	32	6.25a	32	62.50bc		
50	32	3.13a	32	62.50b		
80	32	0.00a	32	56.25a		
100	32	0.00a	32	37.50a		

3 结论与讨论

在非洲紫罗兰遗传转化过程中,通常需要使用合适种类和浓度的抗生素来抑制农杆菌的生长繁殖以及对非洲紫罗兰再生的不定芽进行筛选。抑菌抗生素在抑制农杆菌的同时,不能抑制不定芽的再生。该研究表明,头孢霉素和羧苄青霉素适宜作为非洲紫罗兰不定芽再生阶段的抑菌抗生素,其最适抑菌浓度均为300 mg/L。头孢氨苄对非洲紫罗兰不定芽再生的影响较大,200 mg/L的头孢氨苄即可对不定芽的再生产生较大的抑制作用。因此头孢氨苄不是非洲紫罗兰不定芽再生阶段的最适抑菌抗生素。3种抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生均有抑制作用,但抑制程度不同。硫酸卡那霉素和G418对非洲紫罗兰不定芽再生的抑制作用较大,可以作为非洲紫罗兰遗传转化的选择抗生素,选择浓度分别为50 mg/L和5 mg/L。硫酸新霉素不适宜作为非洲紫罗兰遗传转化的选择抗生素。

参考文献

[1] 张卫东.室内花卉皇后-非洲紫罗兰[J].园林,2002(2):20-21.

[2] Kushikawa S, Hoshino Y, Mii M. Agrobacterium mediated transformation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. [J]. Plant Science, 2001, 161(5): 953-960.

[3] 傅荣昭,马江生.观赏植物色香基因工程研究进展-文献综述[J].园艺学报,1995,22(4):381.

[4] 何小玲,王金发.观赏花卉的品质基因及其基因工程问题[J].植物生理学通讯,1998,34(6):462-466.

[5] 张石宝,胡虹,李树云.花卉基因工程研究进展 I:花色[J].云南植物研究,2001,23(4):479-487.

[6] 赵云鹏,陈发棣,郭维明.观赏植物花色基因工程研究进展[J].植物学通报,2003,20(1):51-58.

[7] 傅荣昭,刘敏.通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株[J].植物生理学报,1998,24(1):72-76.

[8] 赵万苓,姜世平,付新生,等.利用农杆菌介导法将查尔酮合酶基因导入大岩桐[J].分子植物育种,2006,4(1):45-48.

[9] 蔡文燕.根癌农杆菌介导人乳铁蛋白基因转化中国水仙的初步研究[D].福州:福建师范大学,2005.

[10] 郑进,康薇,洪华珠.抗生素在农杆菌介导植物转基因中的应用[J].林业科技开发,2006,20(3):8-11.

[11] 李杰,刘颖,黄洁虹,等.G418和氯霉素作为转基因盐藻的抗生素筛选标记[J].生物技术,2003,13(3):22-23.

[12] 王成,王义军,李慧玉,等.抗生素对根癌农杆菌的抑菌作用及对新疆西伯利亚黑杨组培叶片再生的影响[J].东北林业大学学报,2009,37(9):4-7.

[13] 吕永杰,李仕贵,周晓禾.观赏兰科植物组培快繁及遗传转化的研究进展[J].中国生物工程杂志,2003,23(10):42-46.

[14] 罗素兰,陈若,长孙东亭.番茄组培苗的不同阶段对抗生素和PPT的抗性筛选试验[J].海南大学学报(自然科学版),2003(1):13.

[15] 于志水,尚胜军,赵继梅,等.杨树转化受体系统再生初步研究及卡那霉素敏感性测定[J].辽宁林业科技,2003(5):9-10.

[16] 罗素兰,林皎月,长孙东亭.甘蔗组织培养中不同阶段的抗生素及PPT抗性筛选试验[J].海南大学学报(自然科学版),2003(3):15.

[17] 张明洲,崔海瑞,舒庆尧,等.抗生素对高粱离体培养反应的影响[J].核农学报,2004,18(2):113-117.

[18] 张福丽,王贤,李季平,等.抗生素对根癌农杆菌抑制作用及对大豆子叶节再生的影响分析[J].广东农业科学,2011(14):76-78.

[19] 周小梅,李君剑,赵军良,等.抗生素对农杆菌的抑制和对油菜外植体分化的影响[J].西北植物学报,2005,25(1):52-56.

[20] 王丽,张俊莲,王蒂,等.抗生素对根癌农杆菌的抑菌效果及对烟草叶片分化的影响[J].中国烟草学报,2006,12(1):32-37.

[21] 詹立平,姜静,赵鑫,等.农杆菌抑菌剂的抑菌效果及其对小黑杨叶片不定芽产生率的影响[J].植物生理学通讯,2004,40(6):689-692.

Effect of Antibiotics on Adventitious Shoot Regeneration of *Saintpaulia ionantha*

LIU Xiao-dong, WANG Ting-ting, LIU Qun-lu, CHEN Jia-xi

(Landscape Architecture College, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Taking *in vitro* leaves of *Saintpaulia ionantha* as material, the effect of three antibacterial antibiotics (cefotaxime, cephalixin monohydrate, carbenicillin) and three selective antibiotics (kanamycin sulfate, neomycin sulphate, G418) on adventitious shoot regeneration were studied. The results showed that carbenicillin and cefotaxime sodium were better choices to use as antibacterial antibiotic for *Saintpaulia ionantha* in the process of genetic transformation, and the optimum concentrations were both 300 mg/L. However, cephalixin monohydrate was not a suitable antibiotics because of its toxic effects on the *in vitro* leaves. Among the three kinds of selective antibiotics, kanamycin sulfate and G418 was more suitable because they had strong inhibition on the shoot regeneration of *Saintpaulia ionantha*, and the optimum concentrations were 50 mg/L and 5 mg/L, while neomycin sulphate was not a proper antibiotics.

Key words: antibiotics; *Saintpaulia ionantha*; adventitious shoot