

文章编号: 1002-1498(2005)02-0183-04

抗生素对山茶愈伤组织诱导和生长的影响

范正琪, 李纪元, 田敏

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:研究了卡那霉素、潮霉素对浙江红山茶、大花红花油茶愈伤组织的生长及对攸县油茶幼苗叶片诱导愈伤的影响, 确定作为选择压力的卡那霉素质量浓度为 $50\sim 60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 潮霉素为 $25\sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 3 种抑菌性抗生素中, 羧苄青霉素促进愈伤组织诱导, 对愈伤组织的生长没有影响, 头孢霉素则有抑制作用, 而羟氨苄青霉素轻微抑制愈伤组织的生长, 但对愈伤组织的诱导影响不大。考虑到抑菌效果, 适于在转基因研究中使用的羧苄青霉素的抑菌质量浓度为 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 羟氨苄青霉素为 $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 抗生素; 山茶; 愈伤组织

中图分类号: S722.13⁺7 文献标识码: A

Effect of Antibiotics on Induction and Growth of Camellia Callus

FAN Zhengqi, LI JiYuan, TIAN Min

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The effect of the supplement of antibiotics on induction and growth of camellia callus was studied. Kannamycin and Hygromycin were more sensitive to growth of callus of *C. chekiangoleosa* than that of *C. magniflora*. Growth of callus would be limited by Kannamycin at $50\sim 60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and Hygromycin at $25\sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The leaves of *C. grisea* seeding could not induced callus when Kannamycin and Hygromycin arrived the same concentration. Carbenicillin could accelerate induction of callus at certain degree but didnot affect the growth of callus. Amoxicillin inhibited slightly the growth of callus. Cefotaximes reduced both the ratio. According to the effect of inhibiting *Agrobacterium tumefaciens*, concentration of Carbenicillin and Amoxicillin were $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively in the study of transformation.

Key words: antibiotics; Camellia; callus

山茶(*Camellia* L.)为观赏性园林植物, 提高它的观赏价值和抗逆性是今后山茶发展的目标。传统的育种方法周期长, 而基因工程为加快育种进程提供了新的手段。农杆菌介导法是植物遗传转化中较为常用的一种方法, 在进行转化体的筛选时也常用抗生素作为选择标记, 卡那霉素、潮霉素是筛选转化体常用的抗生素。此外, 外植体与农杆菌共培养后需要使用抗生素脱菌, 以抑制农杆菌的进一步生长, 常使用的抗生素有羧苄青霉素、头孢霉素等。在植物培养基中加入不同种类和浓度的抗生素会对外植

体的生长发育产生影响, 因此, 在进行目的基因的遗传转化过程中, 对受体材料进行抗生素敏感性测定是十分必要的, 在一定程度上, 它也是转化试验成功与否的关键因素之一。

抗生素对植物离体培养的影响在很多植物上都有报道^[1~7], 但在山茶中却从未有人研究。本文探讨了抗生素对山茶愈伤组织诱导和生长的影响, 从而为农杆菌介导的山茶遗传转化技术体系的建立提供参考依据。

收稿日期: 2004-06-09

基金项目: 中国林业科学研究院亚热带林业研究所青年科技发展基金项目/ 农杆菌介导茶花转化受体系统的建立(0C0202)

作者简介: 范正琪(1976), 女, 浙江桐乡人, 研究实习员, 硕士。

1 材料与方法

111 植物材料

以浙江红山茶 (*Camellia chekiangoleosa* Hu)、大花红花油茶 (*Camellia magniflora* Chang) 生长良好的愈伤组织及攸县油茶 (*Camellia grijsii* Hance) 的无菌苗叶片为供试材料。

112 农杆菌及所含质粒

农杆菌菌株为 EHA105, 含 pKUC 质粒, 该质粒 T2DNA 中插入了新霉素磷酸转移酶基因 *npt II*、潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*、*gus* 报告基因及 Bt 杀虫基因 *cry I Ac*。

113 方法

(1) 选择性抗生素浓度试验: 以 MS 为基本培养基, 在选择性抗生素的培养基中附加 2, 4-D $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时加入各种浓度的卡那霉素、潮霉素。每个处理接种 32 个直径为 0.5 cm 左右的愈伤组织, 24 个 0.5 cm 见方的叶片切块。

(2) 抑菌性抗生素浓度试验: 以 MS 为基本培养基, 在抑菌性培养基中附加 6-BA $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT $0.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IBA $0.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时加入各种浓度的羧苄青霉素、头孢霉素、羟氨苄青霉素。每个处理接种 24 个外植体。

(3) 抑菌性抗生素抑菌作用: 挑取农杆菌单菌落接种于 LB 液体培养基中振荡 (28 e) 过夜, 转移到悬浮培养液中振荡培养至对数生长期, 感染攸县油茶叶片后共培养 3 d, 移到含各浓度的羧苄青霉素、头孢霉素、羟氨苄青霉素培养基上。

2 结果与分析

211 选择性抗生素对山茶愈伤组织生长的影响

本试验所用的农杆菌携带的质粒含有新霉素磷酸转移酶基因 *npt II* 和潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*, 分别对卡那霉素和潮霉素具有抗性, 因此以卡那霉素和潮霉素作为抗性选择标记。

实验材料采用浙江红山茶和大花红花油茶的愈伤组织, 置于添加选择性抗生素的培养基上培养。培养一段时间后, 一些愈伤组织开始停止生长, 并由接触培养基的边缘区域慢慢向中间褐化, 一个月后便可看出, 抗生素浓度由低至高变化中愈伤组织的存活率也随之降低。试验表明: 在两个物种中, 浙江红山茶愈伤组织对抗生素的反应稍比大花红花油茶强烈, 而且抗生素临界致死浓度也略比大花红花油

茶低, 由图 1、2 可见, 卡那霉素和潮霉素对浙江红山茶的致死质量浓度分别为 50 、 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对大花红花油茶愈伤组织的致死质量浓度分别为 60 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此抗生素对浙江红山茶的敏感性高于大花红花油茶。

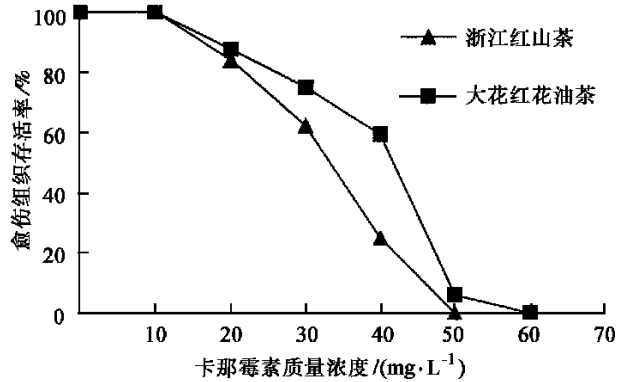


图1 卡那霉素对山茶愈伤组织存活的影响

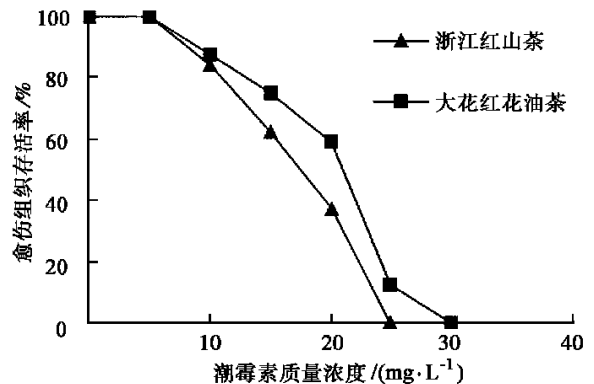


图2 潮霉素对山茶愈伤组织存活的影响

从上面数字也可看出, 两种抗生素对愈伤组织生长的影响存在着显著差异, 作为选择标记时, 卡那霉素的临界致死质量浓度远高于潮霉素, 相对本实验采用的浙江红山茶和大花红花油茶两个山茶物种而言, 卡那霉素的致死质量浓度分别为 50 、 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而潮霉素的致死质量浓度只需 25 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

212 选择性抗生素对山茶叶片愈伤组织诱导的影响

本试验用攸县油茶的叶片切块为外植体, 在添加卡那霉素和潮霉素的培养基上培养, 1 个月后观察结果。实验发现, 一些叶片切块逐渐失去绿色而白化, 抗生素的质量浓度越高, 叶片白化的数量就越多, 而且即使没有白化的叶片在高质量浓度的抗生素环境下也失去了再生愈伤组织的能力。从图 3 中也可以看出潮霉素在较低质量浓度 ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 时就可以达到选择目的, 而卡那霉素需达到较高质量浓度 ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

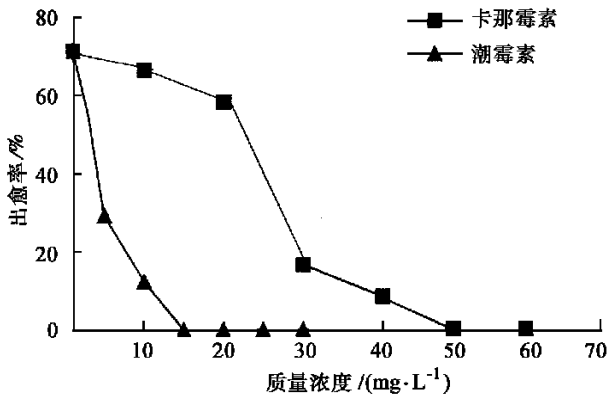


图3 选择性抗生素对攸县油茶出愈率的影响

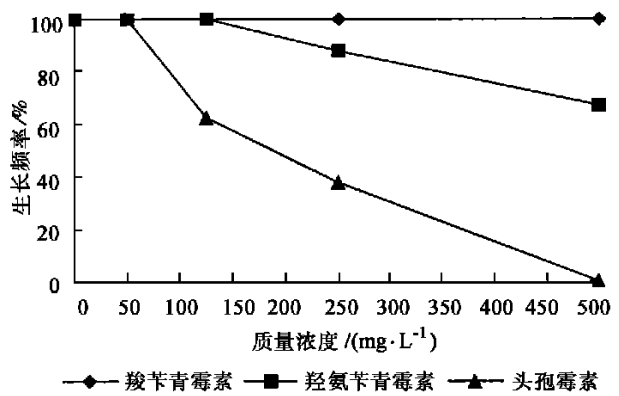


图4 抑菌性抗生素对大花红花油茶愈伤组织生长的影响

213 抑菌性抗生素的抗菌作用

在植物基因转化中常用的抑制农杆菌生长的抗生素有羧苄青霉素、氨苄青霉素、头孢霉素等。由于羟氨苄青霉素与氨苄青霉素具有相同的抗菌谱,而且药性更强,因此本实验采用羟氨苄青霉素代替氨苄青霉素,并与羧苄青霉素及头孢霉素进行比较。感染外植体后,不同抗生素及浓度对农杆菌的抑制效果有所差异,结果见表1。

表1 农杆菌在抑菌性抗生素培养基上的生长情况

抗生素	质量浓度P(mg·L ⁻¹)			
	50	125	250	500
羧苄青霉素	+	+	-	-
羟氨苄青霉素	+	-	-	-
头孢霉素	-	-	-	-

注:/ + 0为农杆菌见生长;/ - 0为农杆菌不见长。

从表1中可看出,头孢霉素的抑菌效果最好,在较低质量浓度(50 mg#L⁻¹)下就可以完全抑制农杆菌的生长,羧苄青霉素在250 mg#L⁻¹以上时才发挥作用,羟氨苄青霉素处于两者之间,其有效质量浓度为125 mg#L⁻¹。

214 抑菌性抗生素对山茶愈伤组织生长的影响

在50~ 500 mg#L⁻¹的质量浓度范围内,3种抑菌性抗生素对大花红花油茶愈伤组织生长的影响呈现了不同的变化。在添加各个质量浓度羧苄青霉素的培养基上,大花红花油茶的愈伤组织都有不同程度的生长,而羟氨苄青霉素对愈伤组织生长有轻微的抑制作用,随质量浓度升高生长频率呈下降趋势,头孢霉素的抑制作用更明显,在500 mg#L⁻¹时则完全抑制生长(图4)。

以攸县油茶的叶片为材料时羧苄青霉素对其愈伤组织的诱导有一定的促进作用,在500 mg#L⁻¹时可达8715%,羟氨苄青霉素基本不影响愈伤组织的

诱导,而头孢霉素在125 mg#L⁻¹时就有较强的抑制作用,随浓度升高这种抑制作用则更明显(图5)。

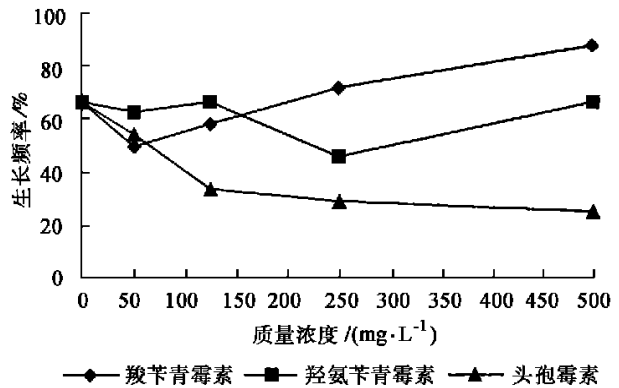


图5 抑菌性抗生素对攸县油茶叶片生长的影响

3 小结与讨论

了解选择性抗生素对山茶愈伤组织诱导和生长的最小抑制浓度,有利于在转基因研究中采取恰当的选择压力。本实验中浙江红山茶愈伤组织对选择性抗生素的敏感性高于大花红花油茶愈伤组织,而且愈伤组织与叶片对抗生素的反应也有所差异,因此在转基因试验中,应考虑到抗生素对山茶各物种和外植体材料间的影响差异。

卡那霉素和潮霉素是遗传转化中常用的选择标记,卡那霉素的临界致死质量浓度较高,一般在50~ 60 mg#L⁻¹之间,作者常常采用略低于临界致死质量浓度作为选择压力,若选择压力过大,不利于转化体的生长。因此,在山茶遗传转化过程中卡那霉素所用的质量浓度为50 mg#L⁻¹,然而一些非转化体会逃避选择而继续生长。本试验中潮霉素对所有山茶外植体都比卡那霉素敏感,宜采用的质量浓度为25 mg#L⁻¹,但由于转基因中所用的质粒有一些不含有潮霉素磷酸转移酶基因hpt,不能用潮霉素作为选择标

记,而且即使含有两个选择标记基因,在进行转基因研究时需消耗大量的抗生素,潮霉素的成本远高于卡那霉素,所以一般都以卡那霉素作为常用的选择标记。

山茶外植体与农杆菌共培养后在表面及浅层组织中共生有大量农杆菌,为杀死和抑制农杆菌的继续生长,以便外植体正常生长发育,必须进行抑菌培养。本试验采用羧苄青霉素、羟氨苄青霉素、头孢霉素作为抑菌性抗生素。在本试验中 3 种抗生素都表现出较好的抑菌效果,相比之下头孢霉素在较低质量浓度下就有较好的抑菌效果。

抗生素不仅对农杆菌有杀伤或抑制作用,而且对植物细胞也有一定的影响。由本试验可知,随着抗生素质量浓度的增加抑菌效果明显加强,山茶愈伤组织对 3 种抑菌性抗生素表现出不同的反应:羧苄青霉素没有影响,羟氨苄青霉素有轻微的抑制作用,而头孢霉素对愈伤组织有严重的伤害;而对攸县油茶叶片诱导愈伤组织来说,羟氨苄青霉素影响不大,羧苄青霉素和头孢霉素分别有促进和抑制作用。

综合考虑,认为在转基因实验中羧苄青霉素的可使用质量浓度为 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,羟氨苄青霉素的可使用质量浓度为 $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,但需谨慎使用头孢霉素。

参考文献:

- [1] 胡桂兵,陈大成,郑启发,等. 1 种抗生素对台湾青枣茎段和愈伤组织生长的影响[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 21~ 23
- [2] 钟名其,楼程富,谈建中. 桑树遗传转化技术中抗生素的浓度优化研究[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2001, 16(2): 1~ 6
- [3] 黄萍,沈存善,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
- [4] 郑树松,安成才,李启任,等. 离体条件下抗生素对棉花愈伤组织生长的影响[J]. 棉花学报, 2002, 14(5): 280~ 282
- [5] 王萍,吴颖,季静,等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响[J]. 遗传, 2001, 23(4): 321~ 324
- [6] 张松,温孚江,朱常香,等. 抗生素对大白菜组织培养形态发生的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(4): 385~ 388
- [7] 郑启发. 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