

不同抗生素种类和浓度对苦瓜培养的影响

叶 杨, 刘 欣, 樊哲仁, 唐 琳

(四川大学 生命科学学院, 四川 成都, 610064)

摘 要:以苦瓜(*Momordica charantia* L.)的各外植体为试验材料,研究不同抗生素种类和浓度对苦瓜培养的影响;比较了在添加不同种类和浓度抗生素的MS培养基中,苦瓜不同外植体及对应愈伤组织诱导和增殖。结果表明:卡那霉素是用于筛选转化植株的最佳抗生素,100 mg/L是抗性筛选的最适宜浓度。

关键词:苦瓜;抗生素;组织培养

中图分类号:S 642. 503. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)10-0018-04

根癌农杆菌介导法是植物基因转化过程中最有效而且应用最广泛的方法,而这种方法必须通过抗生素筛选才能获得理想的转化植株^[1]。由于抗生素对受体材料的生长和分化有不同程度的抑制作用^[2-8],因此在基因转化前要对受体材料进行抗生素敏感性测定,找出适合受体的最佳抗生素和最佳浓度^[9]。目前常用的抑菌剂有氨基青霉素、头孢唑林钠、特美汀,抑菌剂要求既能抑制根癌农杆菌生长又不影响受体细胞正常生长分化;同

时在转化后期要加入选择剂,给予植物细胞产生一种选择压力,致使未转化细胞在施用选择剂条件下不能生长、发育、分化^[10],卡那霉素是筛选转化中常用的抗生素之一。

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属于葫芦科苦瓜属,1 a生蔓性草本植物。不仅是一种重要的蔬菜作物,而且还是具有很高药用价值的药用植物,全国各地均有栽培^[11]。目前还未见有关抗生素对苦瓜再生体系影响的报道,该试验以苦瓜不同外植体及对应的愈伤组织为试验对象,重点比较了在几种抗生素及不同浓度下愈伤组织的产生和生长情况,以期对苦瓜遗传转化体系的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

第一作者简介:叶杨(1982-),女,在读硕士,现从事苦瓜离体培养及转基因方面的研究工作。

通讯作者:唐琳。E-mail: tangl66@sina.com。

基金项目:教育部博士点基金资助项目(2002061088)。

收稿日期:2008-04-21

[6] 王熹,俞美玉,陶龙兴,等. 烯效唑对小麦苗期生长的调控作用[J]. 华北农学报,1995,10(2):50-56.

[7] 王熹,俞美玉,陶龙兴. 烯效唑的生理活性及应用研究初报[J]. 作物杂志,1993(2):33-34.

Effects of Seed Soaking with Uniconazole on The Growth and Yield of Chinese Chive Seedlings

XIE Gui-ying¹, WANG Xue-hu², SUN Shu-jun¹, YUAN Guo-hui¹

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Shijiazhuang Zerun Agricultural Science and Technology Development Co. Ltd., Shijiazhuang, Hebei 050020, China)

Abstract: Effects of seed soaking with Uniconazole on the growth and yield of Chinese chive seedlings were investigated. The results showed that the Uniconazole treatments with different concentration (1~20 mg/L) could decrease the plant height, increase stem diameter and healthy index. The treatment with 5 mg/L Uniconazole was best. Field experiments showed that early yield after planting under Uniconazole treatment with 5 and 10 mg/L concentration increased by 11.5%~14.7%.

Key words: Chinese chive; Uniconazole; Seed soaking; Seedling growth; Yield

苦瓜品种为蓝山长白,其种子购自四川省农科院种子市场。产地:四川。

1.2 试剂与培养基

4种抗生素:氨苄青霉素、卡那霉素、头孢唑林钠、特美汀(特美汀为 Beecham Pharmaceuticals Brentford England 产品,头孢唑林钠购自深圳市制药厂,其他均购自 SIGMA 公司),MS 固体诱导培养基(外植体根:MS+NAA 1.0 mg/L+BA 4.0 mg/L;外植体茎:MS+NAA 2.0 mg/L+BA 2.0 mg/L;外植体子叶、真叶:MS+BA 4.0 mg/L)。所有培养基 pH 为 5.8,高压灭菌。

1.3 试验方法

苦瓜种子剥壳,在超净台上依次用 70% 酒精和 0.1% 升汞消毒约 50 s 和 6~8 min,无菌水冲洗 3~5 次。将种子接种到 MS₀ 固体培养基上,25℃,充分光照,20 d 左右可获得无菌苗。

将生长 20 d 左右无菌苗的根、茎、真叶、子叶(及相应的愈伤组织)切成直径约 5 mm 的外植体,转入含不同种类和浓度的各种抗生素的培养基。

所用 4 种抗生素:氨苄青霉素、特美汀、卡那霉素、头孢唑林钠,单位均为 mg/L。氨苄青霉素、特美汀:0(对照)、100、250、500、1 000;卡那霉素、头孢唑林钠:0、50、100、250、500。每种抗生素的每一浓度作用于苦瓜的 4 种外植体(根、茎、真叶、子叶)及其对应愈伤组织,每次培养 5 瓶,25 个接种数,重复 3 次,并以未加抗生素的对应培养基(MS₀)为对照。同一种外植体均在外植体对应的培养基(此为前期试验中确定的,在无抗生素状态下诱导该外植体产生愈伤的最佳培养基)上培养,培养条件为 20~25℃ 左右,光照强度 2 000 lx,每天光照 14 h。以诱导愈伤组织生长等情况分析抗生素对外植体(愈伤组织)生长的影响。每隔 1 周观察愈伤组织的生长情况并记录、拍照,观察 40~60 d。

2 结果与分析

2.1 氨苄青霉素对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

通过 50 d 的观察,各外植体的愈伤组织诱导率和增殖体积都不及对照,说明各浓度下抗生素对愈伤的增殖都有所抑制,外植体在含 100 mg/L 和 1 000 mg/L 氨苄青霉素的培养基中生长受到了较大的抑制,而在中间浓度下的生长却受抑制较小(表 1),表现为愈伤组织的体积仅稍小于对照,色泽、形状都与对照相差不大,氨苄青霉素对苦瓜外植体的抑制作用是不稳定的,并不表现为浓度越大抑制越强,甚至在子叶上还起到了促进作用。通过对愈伤组织诱导率的方差分析(以子叶为例,表 2)看出氨苄青霉素对子叶诱导率的影响显著。

在 Excel 表中输入对应的试验数据,利用 Excel 软件运算,进行 F 检验,若 $F > F_{0.05}$ 则显著(* 表示),否则表示不显著,若 $F > F_{0.01}$ 则极其显著(** 表示),否则表

示不显著。此处 $F > F_{0.05}$ 说明氨苄青霉素对子叶诱导率的影响显著。

表 1 不同浓度氨苄青霉素对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

浓度/mg·L ⁻¹	外植体类型	愈伤组织诱导率	愈伤增殖体积
0	根	1±0	+++
	茎	1±0	+++
	叶	0.95±0.05	++
	子叶	0.84±0.16	+++
100	根	0.17±0.09	+
	茎	0.36±0.2	+
	叶	0.9±0.1	++
	子叶	0.6±0.08	+
250	根	0.42±0.16	++
	茎	0.9±0.1	++
	叶	0.76±0.01	++
	子叶	0.75±0.04	++
500	根	0.56±0.04	++
	茎	0.9±0.1	++
	叶	0.78±0.04	+
	子叶	0.88±0.04	+
1 000	根	0	—
	茎	0.15±0.05	+
	叶	0.40±0.08	++
	子叶	0.9±0.1	++

注:+,有愈伤组织被诱导,体积小,直径多小于 0.5 cm; ++,愈伤组织较多,体积较大,直径多在 0.5~1.0 之间; +++,愈伤组织最多,体积最大,直径多在 1.0~2.0 之间; —,没有愈伤组织。下同。

表 2 氨苄青霉素对子叶愈伤诱导率的方差分析

差异源	平方和	自由度	均方	F	$F_{0.01}$	$F_{0.05}$
组间	0.18	4	0.045	5.05	5.99	3.48
误差	0.09	10	0.01			
总计	0.27	14				

表 3 不同浓度特美汀对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

浓度/mg·L ⁻¹	外植体类型	愈伤组织诱导率	愈伤增殖体积
0	根	1±0	+++
	茎	1±0	+++
	叶	0.95±0.05	++
	子叶	0.84±0.16	+++
250	根	0.88±0.12	+++
	茎	1±0	+++
	叶	0.95±0.04	++
	子叶	1±0	+++
500	根	0.68±0.12	+++
	茎	1±0	++
	叶	1±0	++
	子叶	0.96±0.04	++
750	根	0.92±0.08	+++
	茎	1±0	++
	叶	0.96±0.05	+
	子叶	0.76±0.15	+
1 000	根	0.95±0.25	++
	茎	1±0	++
	叶	1±0	+
	子叶	0.88±0.08	+

2.2 特美汀对苦瓜外植体及对应愈伤组织生长的影响

特美汀对苦瓜的外植体几乎没有抑制作用,其所有外植体对愈伤组织的诱导率都相当高(表3),甚至有些比对照还高,推测特美汀起到了类似植物激素的作用^[12],促进外植体诱导出愈伤组织。特美汀各浓度对苦瓜外植体愈伤诱导率影响差异不大,相同浓度下不同外植体之间的差别也不大。值得注意的是把外植体叶放在含500 mg/L特美汀的培养基上,观察到生成的愈伤组织有8%发生了分化形成芽,通过进一步培养能形成芽簇进而形成健康植株^[13]。由于苦瓜通过愈伤组织再生植株困难^[14],因此能达到此分化率实属不易,但其作用机制不明确^[15],有待进一步的研究。

表4 不同浓度头孢唑林钠对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

浓度/mg·L ⁻¹	外植体类型	愈伤组织诱导率	愈伤增殖体积
0	根	1±0	++
	茎	1±0	+++
	叶	0.95±0.05	++
	子叶	0.84±0.16	++
50	根	0.8±0.08	++
	茎	1±0	+++
	叶	0.92±0.04	++
	子叶	0.92±0.04	++
100	根	0.76±0.05	+
	茎	1±0	++
	叶	0.9±0.02	++
	子叶	0.84±0.08	++
250	根	0.75±0.08	++
	茎	0.8±0.12	++
	叶	0.75±0.04	++
	子叶	0.46±0.06	++
500	根	0.75±0.04	++
	茎	0.76±0.08	++
	叶	0.7±0.05	+
	子叶	0.28±0.08	+

2.3 头孢唑林钠对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

表5 头孢唑林钠对子叶对应愈伤组织诱导率影响的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	F _{0.01}	F _{0.05}
组间	0.94944	4	0.23736	27.22**	5.99	3.48
误差	0.0872	10	0.00872			
总计	1.03664	14				

注:F>F_{0.01},说明头孢唑林钠对子叶愈伤组织诱导率影响极显著。

在不同浓度含头孢唑林钠的培养基上,子叶的生长状况受影响较大(表4),表现为在500 mg/L的时候有明显的抑制作用,而外植体根、茎、叶却受影响不大。此外,各外植体的生长状态中诱导率差异也不明显,愈伤组织的增殖体积和对照相比变化不大,外植体愈伤组织生长良好,颜色、外形均与对照无明显差异,说明抗生素对除子叶外其余外植体有所抑制但不明显,对子叶总体方差分析结果表示头孢唑林钠对子叶愈伤组织诱导率

影响极显著(表5),可以用作抑菌剂。

2.4 卡那霉素对苦瓜外植体及对应愈伤组织生长的影响

在含50 mg/L的卡那霉素培养基上诱导率不高仅有很少愈伤组织生长(表6),根、茎、叶、子叶分别为0%、40%、4%、35%。在40 d后观察,外植体茎和子叶膨大明显,而根和叶则变化不大,共同之处是诱导出的愈伤组织体积很小,仅在外植体切口边缘观察到一些,并且增殖缓慢,颜色由最初的绿色变成部分呈黄色。100 mg/L以上浓度则没有观察到有任何愈伤组织出现。总体各项方差分析显示,卡那霉素各浓度对外植体的生长影响极显著(以子叶为例,表7),相同浓度下(以50 mg/L为例)外植体生长状态差异也极显著(表8)。结果显示,苦瓜外植体对卡那霉素较敏感,且100 mg/L是观察到的无愈伤组织生长的最低浓度,也是毒性最小的,适合做筛选剂。

表6 不同浓度卡那霉素对苦瓜外植体及对应愈伤组织的影响

浓度/mg·L ⁻¹	外植体类型	愈伤组织诱导率	愈伤增殖体积
0	根	1±0	+++
	茎	1±0	+++
	叶	0.95±0.05	++
	子叶	0.84±0.16	+++
50	根	0	+
	茎	0.4±0.04	+
	叶	0.04±0.04	+
	子叶	0.35±0.15	+
100,250,500	根	0	++
	茎	0	+++
	叶	0	++
	子叶	0	+++

表7 卡那霉素对子叶愈伤组织诱导率影响的方差分析

差异源	平方和	自由度	均方	F	F _{0.01}
组间	1.63	4	0.41	42.48**	5.99
误差	0.10	10	0.01		
总计	1.73	14			

注:F>F_{0.01},说明卡那霉素对子叶愈伤组织诱导率影响极显著。

表8 50 mg/L卡那霉素对苦瓜不同外植体愈伤组织诱导率的方差分析

差异源	平方和	自由度	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}
组间	0.40	3	0.13	28.03**	4.07	7.59
误差	0.038	8	0.005			
总计	0.44	11				

注:F>F_{0.01},说明苦瓜各外植体愈伤组织诱导率在含50 mg/L卡那霉素培养基上差异极显著。

3 讨论

在根癌农杆菌介导的植物基因转化中,选择合适的筛选剂和抗菌剂非常重要。植物的材料不同,筛选剂和抗菌剂对其生长和作用的浓度就不同。用于筛选转化体的抗生素种类与所用转化质粒中所携带的标记基因

有关,卡那霉素就是一种常用的标记基因。该试验测试了不同浓度的卡那霉素对苦瓜外植体生长的影响,发现苦瓜外植体对卡那霉素较敏感,100 mg/L 以上浓度没有任何愈伤组织出现。由于高浓度的抗生素能迅速杀死细胞,而死细胞对周围细胞的生长有强烈抑制作用,不利于转化细胞的生长。因此要找到最低致死浓度,在苦瓜的遗传转化试验中选择卡那霉素是合适的,其使用浓度为 100 mg/L。

氨苄青霉素、特美汀、头孢唑林钠是抑菌剂,在转化过程中共培养结束后的筛选培养基中要加入一定浓度的抗生素以抑制和杀死农杆菌。因此,选用抑菌剂时,需要在达到抑菌目的同时尽量对外植体的生长和愈伤组织的诱导、分化产生少的影响。试验结果表明,头孢唑林钠各浓度对外植体的生长影响差异多数不大,相同条件下外植体之间的生长状态差异诱导率不显著。由于头孢唑林钠的抑菌效果优于氨苄青霉素^[16],综合分析头孢唑林钠应该对苦瓜外植体生长影响较小的合适的抑菌剂。

参考文献

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002:330-334.
- [2] 刘淑芳,汤浩茹,贺永明.抗生素对“考密斯”梨叶片不定梢诱导的影响[J].北方园艺,2007(5):32-34.
- [3] 高喜叶,李晓燕,李明,等.几种抗生素对酸樱桃离体培养产生不定芽与再生根的影响[J].内蒙古农业大学学报,2007,28(3):239-243.
- [4] Li W, Chen X Y, Din X, et al. Establishment of genetic transformation system of *Populus euphratica* and optimization of antibiotic concentration[J]. 广西植物,2007,27(4):622-626.
- [5] 郑进,康薇,王慧,等.抗生素对中嘉 8 号杨叶片愈伤组织诱导和不定芽形成影响[J].湖北生态工程职业技术学院学报,2006,4(1):1-3.
- [6] 孙璟哈,李滨胜,崔杰.两种抗生素对甜菜离体叶柄分化的影响[J].中国甜菜糖业,2006(3):18-20.
- [7] 韦大器,时群,李梅.抗生素对尾巨桉愈伤组织诱导和植株再生的影响[J].植物生理学通讯,2007,43(4):719-720.
- [8] 王丽,张俊莲,王蒂.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.
- [9] 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.
- [10] 闫新甫.转基因植物[M].北京:科学出版社,2003:117.
- [11] 宋莉英,高峰.苦瓜离体培养过程中内源激素含量的变化[J].植物学通报,2006,23(2):192-196.
- [12] Li Z N, Liu G F, Fang F, et al. Adventitious shoot regeneration of *Platanus acerifolia* Willd. facilitated by Timentin, an antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation[J]. Forestry Studies in China, 2007, 9(1):14-18.
- [13] 唐琳,苟小平,陈放,等.用离体培养无性繁殖苦瓜[J].四川大学学报(自然科学版),1999,36:144-147.
- [14] 宣朴,陈新,岳春芳,等.苦瓜愈伤组织再生植株研究[J].西南农业学报,2006,19:940-942.
- [15] 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(1):52-56.
- [16] 王黎波,李晓燕.抗生素在植物组织培养中控制污染的应用[J].辽宁农业科学,2007(3):69-70.

Effects of Different Antibiotics at Various Concentrations on Culture of *Momordica charantia* L.

YE Yang, LIU Xin, FAN Zhe-ren, TANG Lin

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: The explants of *Momordica charantia* were elected to study the effects of different antibiotics at various concentrations on their growth. The induction and growth of callus was compared after putting different explants in the MS culture media antibiotics at different concentrations. Variance analysis and overall observation indicated that the most proper antibiotic for selecting transformed explants and callus was Kanamycin, and the best concentration for resistance selection was 100 mg/L.

Key words: *Momordica charantia* L.; Antibiotic; Tissue culture

白菜 霜霉病的防治

白菜团棵期、包心期从外层老叶开始发病,叶片正面形成多角形或不规则形的黄褐色病斑,叶背面病斑处产生白色霉状物,严重时叶片枯死、不抱心。发病初期发现中心病株立即摘除病叶喷药防治。预防药剂选用 65% 的百菌清 600 倍液喷施,隔 10 d 喷 1 次,连喷 2 次。治疗药剂选用 64% 的杀毒矾 600 倍液喷施。