

两种抗生素的效价比及其对甘农3号紫花苜蓿愈伤组织生长发育的影响

胡静¹, 马晖玲¹, 谢俊仁², 耿小丽¹

(1. 甘肃农业大学 草业学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 两种抗生素羧苄青霉素和头孢霉素对农杆菌 LBA4404 的抑菌效果及其对甘农 3 号紫花苜蓿愈伤组织的生长、体细胞胚分化的影响进行了研究。结果表明, 羧苄青霉素的抑菌效果较好, 适宜浓度为 200~300 mg/L; 在浓度 200~400 mg/L 的羧苄青霉素可促进芽分化; 头孢霉素对甘农 3 号下胚轴离体培养的毒性大, 浓度为 600 mg/L 时完全抑制芽分化。因此, 羧苄青霉素为适宜抑菌剂, 愈伤诱导阶段的适宜浓度为 300 mg/L, 体胚形成及芽诱导分化阶段的适宜浓度为 200 mg/L。

关键词: 紫花苜蓿; 抗生素; 根癌农杆菌; 组织培养

中图分类号: S 54; S 143.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5500(2007)02-0001-04

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 素有“牧草之王”的美称, 在科学试验中又是研究植物发育的模式植物。但其属中等耐盐牧草, 在含盐量较高的盐碱地上生长不良。因此培育耐盐紫花苜蓿品种对于进一步开发利用盐碱地和扩大苜蓿生产都有重要意义。用传统的育种方法, 选育耐盐品种进展极为缓慢, 随着分子生物学的发展, 人们现在可以依赖基因工程技术提高牧草的耐盐碱性^[1]。利用转基因技术培养紫花苜蓿抗盐碱性新品种是目前牧草育种中最有效的手段。

农杆菌介导法以其方法简单、效率高、拷贝数少等优点成为双子叶植物重要的、行之有效的基因转化方法。然而在目的基因的转化过程中, 外植体需经农杆菌侵染, 才可能将目的基因导入植物细胞中。侵染后材料需脱毒处理才可以进行正常的生长和发育, 研究中常用抗生素来进行脱毒处理。如何选择抗生素的种类及浓度, 使之既能有效的抑制农杆菌又不会影响愈伤组织的诱导及分化, 是转基因成败的关键因素。因此, 选用 2 种抗生素的 8 个浓度梯度, 研究了其对农杆菌 LBA4404 的抑制效果, 并观察在不同抗生素、不同

浓度下紫花苜蓿外植体愈伤组织的诱导、体细胞胚形成的情况, 从而确定基因转化中抗生素的种类和使用量, 为后续的紫花苜蓿转基因工作提供可参考的数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试品种甘农 3 号紫花苜蓿由甘肃农业大学提供。羧苄青霉素 (Carb)、头孢霉素 (Cef) 购自北京欣京科生物工程有限公司, 用重蒸水配置成 100 mg/mL 的母液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, -20 $^{\circ}$ C 下保存。

1.2 菌株和质粒

菌株为根癌农杆菌 LBA4404, 含有重组子质粒 pBM, 携带有 35S 启动子—BADH 结构基因—Nos 终止子的融合基因。

1.3 培养基

农杆菌培养基采用 YEB 培养基 (蛋白胨 5 g/L, 酵母浸膏 1 g/L, 牛肉浸膏 5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.493 g/L, 蔗糖 7 g/L), 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 高压灭菌 20 min, 待冷至 40 $^{\circ}$ C 以下时加入过滤灭菌后的卡那霉素 (Kan) 50 mg/L 和利福平 (Rif) 20 mg/L。LB 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母浸膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂 7 g/L, 蔗糖 7 g/L), 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2, 高压灭菌 20 min, 待冷至 40 $^{\circ}$ C 以下时加入过滤灭菌后的卡那霉素 50 mg/L 和利福平 20 mg/L。

甘农 3 号紫花苜蓿无菌苗的培养采用 MS 培养

收稿日期: 2006-08-30; 修回日期: 2006-11-17

基金项目: 国家科技部“奶业专项”子课题“优质高产多抗苜蓿新品种育种和筛选研究”(2002BA518A03)

作者简介: 胡静(1982-), 女, 辽宁建昌人, 在读硕士。马晖玲为通讯作者。

基,附加 20 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂;其愈伤组织诱导阶段采用 MS 基本培养基附加 2 mg/L 2,4-D、1 mg/L NAA、30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂;诱导体胚形成及芽分化培养基均为 MS 基本培养基附加 2 mg/L 2,4-D、1 mg/L NAA、20 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂。

1.4 试验方法

1.4.1 抗生素对农杆菌增殖的影响 用牙签挑取一白色单菌落于 YEB 液体培养基中培养过夜(27~28 °C,175 r/min)。分别吸取培养过夜的菌液 100 μL 于含有不同种类及不同浓度抗菌素的 5 mL YEB 液体培养基中,置于摇床上继续过夜培养。抗生素 Carb 与 Cef 浓度均分别设为 0、50、100、200、300、400、500、600 mg/L,共为 15 个处理。取 15 个处理的 YEB 液体培养基各 2 mL,稀释 3 倍后,以未加菌液的液体 YEB 为空白,未加抗生素的 YEB 为对照,在波长 600 nm 下用分光光度计测定其紫外吸收值(D_{600nm})。每个处理设 3 次重复,计算 3 次重复的 D_{600nm} 平均值^[2]。

1.4.2 抗生素对外植体愈伤组织诱导及芽分化的影响 抗生素 Carb 与 Cef 浓度均分别设为 0、100、200、300、400、500、600 mg/L,共 13 个处理。以培养 6~8 d 的无菌苗的下胚轴(4~5 mm)为外植体来源,每皿接入 30 块,每个处理 3 个重复,20 d 后统计愈伤组织出愈率;将已培养 15 d 的愈伤组织接入体胚诱导及分化培养基中进行培养并继代,20 d 后统计观察愈伤组织的分化情况。培养条件为 25 °C,光照 16 h,黑暗 8 h,光强 3 000 lx。

评价指标^[3]:愈伤组织诱导率(%)=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数)×100%;体细胞胚分化率(%)=(出现球形体细胞胚的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数)×100%;芽分化率(%)=(分化出芽的材料数/球形体细胞胚的材料数)×100%。

2 结果与分析

2.1 抗生素对农杆菌的抑制作用

当浓度为 50 和 100 mg/L 时,羧苄青霉素的抑菌效果稍强于头孢霉素;而当浓度为 200 mg/L 时,羧苄青霉素就已经完全抑制农杆菌生长,此浓度可以作为临界浓度。而头孢霉素浓度达到 600 mg/L,才起到了完全抑制效果。可见,农杆菌 LBA4404 对羧苄青霉素相对比较敏感,两种抗生素的抑菌效果有较大差异,羧苄青霉素的抑菌效果明显优于头孢霉素(图 1)。

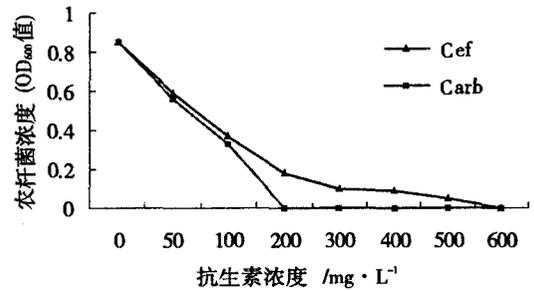


图 1 不同抗生素对农杆菌抑制效果

Fig. 1 The effect of two antibiotics on arobacterium

2.2 抗生素对甘农 3 号紫花苜蓿愈伤组织形成及芽分化的影响

2.2.1 抗生素对甘农 3 号紫花苜蓿愈伤组织和体细胞胚形成的影响 抗生素对紫花苜蓿的愈伤组织诱导、体细胞胚生长状况的影响如表 1 所示。甘农 3 号紫花苜蓿在对照培养基(未加抗生素)中出愈率达到 100%,3 d 部分外植体有膨大现象,愈伤组织淡绿,8 d 以后全部形成愈伤组织,此时的颜色为乳白,逐渐粘渍化,20 d 部分形成球形体细胞胚,形成率为 46.7%;而附加不同浓度的羧苄青霉素及头孢霉素情况下,外植体 2 d 就已明显膨大,6 d 即可全部愈伤化,出愈率仍均为 100%,且愈伤组织呈淡黄色,湿润,10~15 d 就已有球形体细胞胚出现,球形体细胞胚率均在 43.3%~50%,差异不大。从形态来看,含羧苄青霉素的胚性愈伤组织为淡黄色,绿色芽点依稀可见,镶嵌在愈伤组织表面;而含头孢霉素处理中的胚性愈伤组织则为深黄色,绿色芽点浓重,稠密,甚至整体绿化,然后边缘微褐。结果表明,两种抗生素在浓度为 0~600 mg/L

表 1 抗生素对愈伤组织形成及芽分化的影响

Table 1 The effect of antibiotic on callus and differentiation

抗生素	浓度 /mg · L ⁻¹	出愈率 /%	体细胞胚形 成率/%	芽分化率 /%
Carb	0	100	46.7	17.9
	100	100	50.0	16.7
	200	100	46.7	35.7
	300	100	48.3	20.7
	400	100	50.0	20.0
	500	100	46.7	10.7
	600	100	50.0	10.0
Cef	0	100	46.7	17.9
	100	100	43.3	3.9
	200	100	46.7	10.7
	300	100	45.0	14.8
	400	100	46.7	17.9
	500	100	50.0	13.3
	600	100	50.0	0

时,对愈伤组织的形成及生长的影响没有明显差异,但含抗生素的愈伤组织诱导培养基可以缩短愈伤组织形成时间,刺激其快速形成体细胞胚,抗生素对愈伤组织的形成有促进作用。

2.2.2 抗生素对甘农 3 号紫花苜蓿丛生芽分化的影响 当两种抗生素浓度为 100 mg/L 时,芽分化率均低于对照,且头孢霉素处理低于羧苄青霉素处理;当抗生素浓度在 200~400 mg/L 时,芽分化率均高于对照。含 200、300 mg/L 羧苄青霉素的培养基中 40 d 时首先出现了丛生芽;当羧苄青霉素浓度为 200 mg/L 时,芽分化率达到最高值 35.7%,此后随着羧苄青霉素浓度的增加,芽分化率下降,当浓度为 600 mg/L 时,芽分化率达到 10.0%,在试验中观察到,此浓度下有 16.7% 胚性愈伤组织出现了紫红色现象,表明 600 mg/L 的羧苄青霉素已对体胚产生了毒害。而头孢霉素浓度为 100~400 mg/L 时,芽分化率随浓度的升高而升高,当浓度为 400 mg/L 时,芽分化率为 17.9%,与对照等同,为附加此类抗生素的最佳浓度;而后随着头孢霉素浓度的增加,丛生芽率明显下降,当浓度达到 600 mg/L 时,没有芽分化现象(图 2)。只有当抗生素浓度为 500 mg/L 时,附加头孢霉素处理的芽分化率才高于羧苄青霉素处理,分别为 13.3% 和 10%,由此,羧苄青霉素(200~400 mg/L)能够促进甘农 3 号芽分化,而头孢霉素则对甘农 3 号有抑制作用。

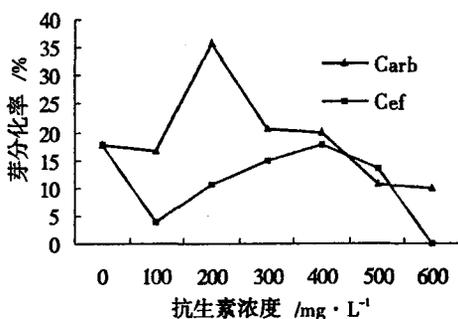


图 2 抗生素种类及浓度对芽分化率的影响
Fig. 2 The effect of different antibiotics and concentrations on buds

在胚性愈伤组织形成到芽分化阶段,可以观察到体胚的褐化现象,形态特征为:黄绿→绿→深绿→褐;淡黄→黄褐→褐,最后死亡。含有头孢霉素的培养基中,绿色芽点出现较早,但后期,绿点生长停滞,体胚渐变黄褐。由图 3 可知,随着羧苄青霉素和头孢霉素浓度的增加,体胚的褐化数量也呈增加趋势,说明两种抗

生素均会引起胚性愈伤组织的褐化,且浓度愈高褐化愈严重。在 0~600 mg/L 时,相同浓度下,头孢霉素中的体胚褐化率始终高于羧苄青霉素,可见,头孢霉素较羧苄青霉素更易导致胚性愈伤组织的褐化现象产生。两种抗生素对体胚生长均有一定的伤害作用,但头孢霉素对紫花苜蓿胚性愈伤组织的毒害作用明显大于羧苄青霉素,甘农 3 号紫花苜蓿离体培养中的抗生素应选择羧苄青霉素。

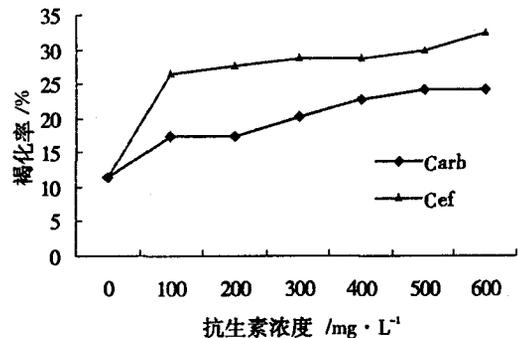


图 3 抗生素对体胚褐化程度的影响
Fig. 3 The effect of antibiotics on brown

3 讨论

3.1 抗生素的抑菌效应比较

在农杆菌介导的基因转化以及转基因植株再生过程中,转化初期能够有效抑制农杆菌生长,防止细菌过度生长而产生污染,是转基因成败的瓶颈。吴关庭等^[4]研究表明,在农杆菌介导的高羊茅遗传转化中,抑菌剂以选用羧苄青霉素较为合适,浓度为 250~300 mg/L,试验与之相符。据郑进^[5]报道,头孢霉素的抑菌效果比羧苄青霉素好,当浓度为 200 mg/L 时,头孢霉素已完全抑制农杆菌,而羧苄青霉素抑制率仅为 54.6%,这与试验研究结果不一致。试验中,羧苄青霉素的抑菌效果明显好于头孢霉素,200 mg/L 可完全抑制农杆菌,但在实践中,采用此浓度虽然初期能抑制农杆菌,但后期农杆菌仍会大量生长,导致愈伤组织死亡,可能是因为与农杆菌共培养后的外植体浅层组织中共生有大量农杆菌未被完全抑制,未达到脱菌培养的目的。因此,初期需要适当加大羧苄青霉素浓度到 300 mg/L,后期可降低抗生素浓度。

3.2 抗生素对培养材料的影响及适宜抗生素的选择

在培养基中添加对植物细胞无毒害作用或毒性较小的抗生素,既能有效地抑制细菌生长,又不影响植物细胞的正常生长。目前所用的抑菌性抗生素,主要是

羧苄青霉素和头孢霉素^[6]。不同植物材料对羧苄类和头孢类抗生素的反应有差异,羧苄青霉素对高粱茎尖再生的影响最小,其浓度达 500 mg/L 时茎尖再生率仍高达 38.14%;头孢霉素低浓度时对高粱茎尖再生率影响较小,但其浓度 > 50 mg/L 时茎尖再生率明显下降^[7]。吴关庭等^[4]研究了两种常用抗生素对高羊茅胚性愈伤组织生长和分化的影响,结果表明头孢霉素明显抑制愈伤组织生长,而浓度低于 500 mg/L 的羧苄青霉素能促进愈伤组织生长;两种抗生素对愈伤组织分化均有抑制作用,但羧苄青霉素的抑制作用要比头孢霉素小。在甘蓝型油菜的外植体与根癌农杆菌共培养转化中,Charest^[8]和 De Blok 等^[9]曾观察到头孢霉素对外植体材料有毒害作用,会抑制愈伤组织的形成和植株分化,但羧苄青霉素则有促进作用。本试验中,羧苄青霉素和头孢霉素在甘农 3 号紫花苜蓿愈伤组织诱导阶段起促进作用,淡黄湿润,出现丛生芽先于对照。羧苄青霉素浓度在 200~400 mg/L 时,对芽分化有促进作用,浓度为 200 mg/L 时,芽分化率达到最高值 35.7%。而头孢霉素对材料的芽分化具有明显的毒害作用,褐化死亡现象严重。鉴于此,在甘农 3 号紫花苜蓿的基因转化研究中,抑菌剂选取羧苄青霉素为宜,愈伤诱导阶段浓度为 300 mg/L,体胚形成及芽诱导分化阶段浓度为 200 mg/L,以达到抑制农杆菌生长,促进转化植株形成的目的。

参考文献:

- [1] 陈玉香,周道玮. 转基因牧草研究进展[J]. 中国草地, 2002,24(3):61~63.
- [2] 徐淑红,徐香玲. 植物遗传转化中抑菌剂的选择[J]. 植物研究,2004,24(4):491~492.
- [3] 张静妮. 苜蓿植株再生体系的建立及 sacB 基因转化的影响因素研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005.
- [4] 吴关庭,胡张华,郎春秀. 抗生素对高羊茅胚性愈伤组织生长与分化的影响[J]. 核农学报,2005,19(2):88~91.
- [5] 郑进,康薇,彭建新. 抗生素对农杆菌的抑制和对杨树叶片分化的影响[J]. 林业科技开发,2006,20(1):34~36.
- [6] 王关林,方钧. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京:科学出版社,2002. 346.
- [7] 林凤,张春宇,王洪岩. 抗生素对高粱茎尖再生的影响及再生体系的建立[J]. 中国生态农业学报,2005,13(2):74~76.
- [8] Charest P J, Holbrook L A, Gabard J, et al. *Agrobacterium-mediated* transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. [J]. Theor Appl genet, 1988,75: 458~445.
- [9] De Blok M, De Brouner D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1989,91: 694~701.

Evaluation of two antibiotics and their effect on tissue culture of *Medicago sativa* cv. Gannong No. 3

HU Jing¹, MA Hui-ling¹, XIE Jun-ren², GENG Xiao-li¹

(1. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Effects of two kinds of antibiotics on the inhibition for *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and the growth of tissue culture of alfalfa (*Medicago sativa* cv. Gannong No. 3) were studied. The result showed that carbentcillin was better for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of alfalfa. The optimal concentration was 200~300 mg/L, and buds induction could be stimulated with concentration of 200~400 mg/L. The toxicity of cefotaxime to alfalfa explants was higher than that of carbentcillin, and the shoots induction almost was restrained while the concentration reached 600 mg/L. It could be concluded that carbentcillin was the proper bacteriostatic agent, the suitable concentration for callus inducing was 300 mg/L and 200 mg/L for buds induction.

Key words: alfalfa; antibiotic; *Agrobacterium tumefaciens*; tissue culture