

文章编号:1000-8551(2006)02-116-02

卡那霉素对杨树和刺槐外植体生长与分化的影响¹郑进^{1,2} 康薇¹ 王慧¹ 刘凯于¹ 洪华珠¹ 彭建新¹

(1. 华中师范大学昆虫学研究所,湖北 武汉 430079;2. 湖北生态工程职业技术学院,湖北 武汉 430200)

摘要:卡那霉素(Km)对中嘉8号杨芽苗生长具有明显的抑制作用,随着浓度的提高,芽苗存活率逐渐降低,当 Km \geq 60 mg/L 时,存活率为 0。Km 对宽叶刺槐茎段的分化和芽的生长有较大影响,Km = 10 mg/L 时,促进分化,分化频率达 100%,高出对照 11.1%;Km \geq 40mg/L 时,抑制芽的生长,芽的黄花率为 100%;Km \geq 60mg/L 时,没有芽的分化。因此,中嘉8号杨、宽叶刺槐遗传转化用卡那霉素为选择剂是合适的。

关键词:杨树;刺槐;组织培养;抗生素

EFFECTS OF KANAMYCIN ON THE GROWTH AND DETERMINATION OF POPLA AND BLACUST

ZHENG Jin^{1,2} KANG Wei¹ WANG Hui¹ LIU Kai-yu¹ HONG Hua-zhu¹ PENG Jian-xin¹

(1. Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, ;2. Hubei Ecology Vocational College, Wuhan, Hubei 430200)

Abstract: Kanamycin(Km) showed inhibition effects on the growth of *Populus deltoids* "63/69" with plant survival rates being reduced as concentration increasing. When Km \geq 60 mg/L, there was no plant survived. It also had inhibition effects on the regeneration and growth of shoots of *Robinia pseudoacacia* L. When Km = 10 mg/L, the shoots regenerated were promoted and shoots induction rates was 100%, 11.1% over control. When Km \geq 40 mg/L, shoots etiolation rates was 100%. When Km = 60 mg/L, there was no shoots regenerated. Thus, Km is optimal for genetic engineering of the "63/69" and *Robinia pseudoacacia* L.

Key words: *Populus deltoides*; *Robinia pseudoacacia* L.; tissue culture; antibiotics

卡那霉素(Km)是植物遗传转化中最常用的选择性抗生素^[1]。卡那霉素抗性基因是转基因植物研究中经常使用的标记基因,用作区分转基因植物细胞和非转基因植物细胞^[2]。杨树是重要的速生经济树种,也是转基因林木研究的模式植物^[3]。有些杨树无性系对 Km 极为敏感,不利于转基因组织的分化或生根^[5]。于志水等在 Km 含量为 20mg/L 的培养基上 108 杨(*Populus euramericana* cv. "114/69")叶片未分化出有效芽(对照分化率 90.9%)^[6]。中嘉8号杨(*Populus deltoids* "63/69")是湖北省平原湖区绿化和营造短周期工业原料林的主栽树种,利用基因工程技术对其定向改良具有较大的应用价值。刺槐是营造生态公益林、

优质用材林的重要树种,也是优良的蜜源树种和家畜饲料来源^[7,8]。国内外刺槐遗传转化的报道较少^[9-11]。有的认为刺槐对 Km 不敏感,不宜作为刺槐转化的选择剂^[6,12],也有用 Km 作为刺槐转化选择剂获得成功的报道^[11]。因此,选择合适的 Km 浓度对杨树、刺槐的遗传转化仍然非常重要。本文测定了中嘉8号杨和宽叶刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)对卡那霉素的敏感性,为进一步的基因转化奠定基础。

1 材料与方法

中嘉8号杨由中国林科院与湖北省林业局共同培

收稿日期:2005-05-15

基金项目:湖北省林业厅重点科技项目(编号:2002033)

作者简介:郑进(1962-),男,湖北武汉人,教授,在读博士,从事生物技术教学和林木转基因研究。E-zhengjin0202@126.com;Tel:0139 71464845。洪华珠为通讯作者。

育。宽叶刺槐由湖北省林业局国有林场管理站提供。供试无菌杨树芽苗、刺槐茎段由华中师范大学昆虫学研究所组培室提供。

基本培养基: 杨树芽苗生长 1/2MS + BA 0.08mg/L + IBA 0.015mg/L + 蔗糖 25g/L + 琼脂 7g/L (pH5.8); 刺槐茎段分化: 1/2MS + BA 0.2mg/L + NAA 0.01mg/L + 蔗糖 25g/L + 琼脂 6.5mg/L (pH6.0)。卡那霉素购自武汉天源生物技术有限公司。

杨树、刺槐对卡那霉素敏感性测定: 向基本培养基中加入卡那霉素, 浓度依次为 10、20、25、40、50、60mg/L, 配制测定培养基, 倒入容量为 50ml 的三角瓶中。每种处理 3 次重复, 以不加卡那霉素为对照。每瓶接种杨树芽苗 3 株 (苗高 1cm), 共 210 株芽苗、刺槐茎段 3 个 (长 2cm), 共 210 个茎段。置于温度 25℃、相对湿度 75%、光照每天 16h、光强 2000lx 条件下培养, 40d 后记录结果。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对中嘉 8 号杨树芽苗生长的影响

由图 1 可见, Km 对中嘉 8 号杨树芽苗生长具有明显的抑制作用。随着 Km 浓度提高, 芽苗的平均存活数和存活率逐渐下降, 当 Km ≤ 10mg/L 时, 对芽苗生长没有影响, 芽苗存活率为 100%; 当 Km ≥ 60mg/L 时, 芽苗不能存活。

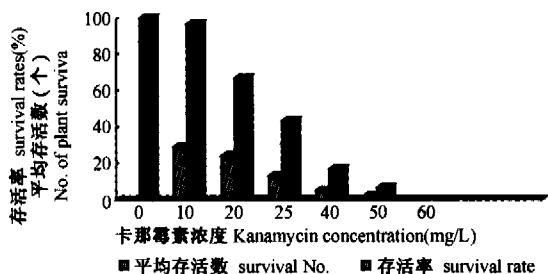


图 1 Km 对中嘉 8 号杨树芽苗生长的影响

Fig.1 Effects of Kanamycin on plant growth

2.2 卡那霉素对宽叶刺槐茎段分化的影响

由图 2 可见, Km 浓度较低时, 对刺槐茎段分化有一定的促进作用; 浓度较高时, 对茎段分化和芽的生长都有明显的抑制作用。Km 为 10 ~ 20mg/L 时, 处理的平均出芽数和分化频率高于对照, 其中 Km 为 10mg/L 时, 分化频率为 100%, 高于对照 11.1%; Km ≥ 25mg/L 时, 随着 Km 浓度提高, 分化频率逐渐降低, Km 为 60mg/L 时, 抑制芽的分化, 无从生芽产生; Km 为 20 ~

40mg/L 时, 随着 Km 浓度提高, 黄化芽逐渐增多; Km ≥ 40mg/L 时, 黄化芽达 100%。

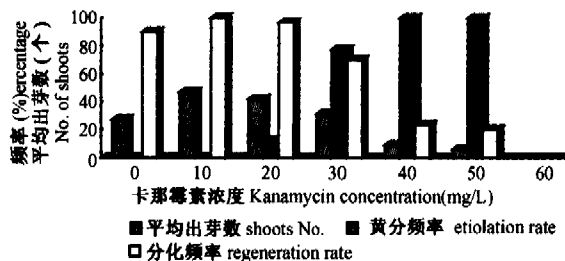


图 2 Km 对宽叶刺槐茎段分化的影响

Fig.2 Effects of kanamycin on stem regeneration

3 结论与讨论

3.1 不同植物材料组织培养时对抗生素的反应存在差异^[13]

笔者曾用 Km 含量为 5mg/L 的培养基分化中嘉 8 号杨叶片, 未诱导出芽 (对照出芽率 100%)。本实验当 Km ≤ 10mg/L 时, 芽苗生长正常, 存活率为 100%; 当 Km ≥ 60mg/L 时, 抑制芽苗的生长, 芽苗存活率为 0。这表明中嘉 8 号杨叶片与芽苗对 Km 的反应差别很大。农杆菌介导的叶盘法是杨树遗传转化的主要方法^[3,4]。因此, 用叶盘法转化中嘉 8 号杨时, 直接加 Km 选择, 由于叶盘分化率极低, 转化难以完成, 但可以延迟到叶盘分化之后选择, 通过选择抗性芽筛选转化体。同时, 为了提高转化效率, 筛选中嘉 8 号杨抗性芽的 Km 浓度可控制在 40 ~ 50mg/L 比较适宜。

3.2 抗生素对多种植物组织有不良影响^[14], 有些抗生素表现出植物激素类似物的效应^[11]

本实验中, Km 为 10mg/L 时, 宽叶刺槐茎段分化频率为 100%, 而对照仅为 90%, 表明 Km 对刺槐茎段出芽具有促进作用。实验同时证明, 卡那霉素对刺槐茎段分化和芽的生长都具有明显的影响, Km 为 40mg/L 时, 芽的生长被抑制, 黄化芽达 100%; Km 为 60mg/L 时, 芽的分化被抑制, 没有新芽产生。可见, Km 适合作为刺槐遗传转化的选择剂, 这与夏阳等的报道相一致^[10], 与牛正田等和 Igasaki 等的报道不同^[7,15]。不一致的原因可能与所取的实验材料有关。

参考文献:

- [1] Shackelford N J, Chen C A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Rep*, 1996, 14 (1): 50 ~ 57
- [2] Nap J P, Bijvoet J, W. Stiekema J. 转基因植物中的卡那霉抗性 [译文]. *生物技术通报*, 1998, 1: 45 ~ 47

采用真空包装至关重要。添加抗氧化剂以后,虽然在 整个贮藏期内,普通的排气包装其 TBARS 值和过氧化值也低于脂肪氧化酸败的临界值,但对于辐照冷却肉贮藏效果的评价应从感官、微生物、脂肪氧化等多个指标来综合考虑,进一步的试验研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Olson D G. Irradiated food. Food Technology, 1998, 52:56 ~ 62
- [2] 张映,刘桂林,等编. 食品生物化学. 太原:山西高校联合出版社,1995
- [3] Delincee H. Detection of food treated with ionizing radiation. Trends Food Sci. Technol, 1998, 59(11):1164 ~ 1166
- [4] Gray J I, Gomma E A, et al. Oxidative quality and shelf - life of meats. Meat Science, 1996, 43:111 ~ 123
- [5] 段静芸,徐幸莲,等. 气调包装在鲜肉保鲜中的应用. 食品科技, 2002, 1:62 ~ 65
- [6] Ahn D U, Nam K C, et al. Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiated raw pork. Meat Science, 2000, 54: 209 ~ 215
- [7] Ahn D U, Nam K C, et al. Addition of antioxidant to improve quality and sensory characteristics of irradiated pork patties. Food Chemistry and Toxicology, 2002, 67(7):2625 ~ 2630
- [8] Formanek Z, Lynch A, et al. combined effects of irradiation and the use of natural antioxidants on the shelf - life stability of overwrapped minced beef. Meat Science, 2003, 63:433 ~ 440
- [9] Lacroix M, Smoragiewicz W, et al. Prevention of lipid radiolysis by natural antioxidants from rosemary and thyme. Food Research International, 1997, 30(6):457 ~ 462
- [10] Ahn D U, Olson D G, et al. Effect of Muscle Type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and Color in raw pork patties. Meat Science, 1998, 49:27 ~ 39
- [11] Ahn D U, Nam K C. Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off - odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. Meat Science, 2003, 63:1 ~ 8
- [12] Ahn D U, Nam K C, et al. Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiated raw pork. Meat Science, 2000, 54: 209 ~ 215
- [13] Ahn D U, Nam K C, et al. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time. Meat Science, 2001, 58:431 ~ 435
- [14] 王璋,许时婴,等译. 食品化学(第三版). 北京:中国轻工业出版社,2003
- [15] Mattison M L, Kraft A A, Olson D G, et al. Effect of low dose irradiation of pork loins on the micro flora, sensory characteristics and fat stability. Journal of Food Science, 1986, 51(2):284 ~ 287
- *****
- (上接第 117 页)
- [3] 郑进,刘凯于,洪华珠. 杨树抗性转基因研究进展. 湖北林业科技, 2004, 1:31 ~ 37
- [4] 朱乾浩. 植物转化细胞研究进展. 世界农业, 1996, 3:21 ~ 24
- [5] 赵华燕,卢善发,晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程研究. 植物学通报, 2001, 8(2):169 ~ 176
- [6] 于志水,尚胜军,赵继梅,等. 杨树转化系统再生初步研究及卡那霉素敏感性测定. 辽宁林业科技, 2003, 2:9
- [7] 牛正田,张秀梅,罗晓芳. 刺槐对 3 种抗生素敏感性的测定. 植物生理学通讯, 2004, 40(1):98 ~ 99
- [8] 潘志刚,游应天. 中国主要外来树种引种栽培,北京:科学出版社,1994
- [9] Davis J M, Keathly D E. Detection and analysis of T-DNA in crown gall tumors and kanamycin resistant callus of *Robinia pseudoacacia*. Can J Forest Res, 1989, 19(4):1118 ~ 1123
- [10] *Robinia pseudoacacia* L., black locust and morphological alterations induced by *Agrobacterium-rhizogenes*-mediated transformation. Plant Science, 1993, 88(2):149 ~ 157
- [11] 夏阳,梁慧敏,陈受宜,等. 四倍体刺槐转甜菜碱醛脱氢酶基因的研究. 中国农业科学, 2004, 37(8):1208 ~ 1211
- [12] Ckkel E T, Pedersen M G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. Acta Hort, 1988, 225:199 ~ 207
- [13] Lin J J, Jonathan K. Plant hormone effect of antibiotics on transformation efficient of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells. Plant Sci, 1995, 109:171 ~ 177
- [14] Fuchs R L, Ream J E, Hammond E G et al. Safety assessment of the neomycin phototransferase II. Bio/technol, 1994, 11: 1543 ~ 1547
- [15] Igasaki T, Mohri T, Ichikawa H, Shinohara K. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. Plant Cell Reports, 2000, 19(5):448 ~ 453