

抗生素 G418 在甘蔗组织培养中的最佳筛选浓度

林美娟¹, 薛志平², 陈平华¹, 高三基¹, 陈如凯^{1*}

(1. 福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 本试验在农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室建立的甘蔗再生体系的基础上, 在甘蔗愈伤组织培养的不同阶段, 分别加入不同质量浓度的 G418 选择性试剂, 以确定用于甘蔗遗传转化筛选的最适浓度。结果表明, G418 对各供试甘蔗愈伤组织的抑制作用相似, 愈伤组织生长、分化、生根 3 个阶段的抗性筛选质量浓度分别为 20–35、15–35 和 25 mg · L⁻¹。

关键词: 甘蔗愈伤组织; G418; 筛选浓度

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-5470(2006)01-0006-05

The most suitable concentration of G418 for sugarcane culture

LIN Mei-juan¹, XUE Zhi-ping², CHEN Ping-hua¹, GAO San-ji¹, CHEN Ru-kai¹

(1. Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, P. R. China, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: The study was based on the regeneration system of sugarcane established by Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture. In the different stages of sugarcane callus culture, they were added into different concentration of G418, in order to ascertain the most suitable concentration of screening in sugarcane genetic transformation. The results showed that the restraining effects of G418 on each six sugarcane callus were similar. The screening concentration of G418 in the growth, regeneration and rootage stages of sugarcane callus were 20–35, 15–35 and 25 mg · L⁻¹ respectively.

Key words: sugarcane callus; geneticin; screening concentration

用于遗传转化甘蔗的质粒通常含有 NPT II 筛选标记基因, 该基因使植物细胞产生对氨基糖苷类抗生素如卡那霉素(kanamycin)、G418(geneticin)、巴龙霉素(paromomycin)的抗性^[1]。迄今所有转化成功的报道中, 卡那霉素是利用最多的一种选择性试剂, 但是单子叶植物对卡那霉素表现出很高的天然抗性, 特别是甘蔗经卡那霉素处理后, 出现白化苗的现象非常严重^[2,3]。目前, G418 在水稻、小麦、甘蔗的抗性筛选利用上已有一些报道^[1,4,5], 但不同作物或同一作物不同品种的筛选浓度差异较大。因此, 建立甘蔗多个品种在各组培阶段的筛选体系, 为转基因植株的初期筛选提供依据显得尤其迫切和重要。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 用于建立甘蔗 G418 筛选体系的品种有: 福农 95-1702、福农 94-0403、桂糖 96-211、桂糖 96-44、粤糖 96-86、粤糖 96-794。

1.1.2 药品与培养基 本试验使用的抗生素 G418 为 Promega 公司产品, 其它常规药品均为分析纯, 由农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室提供。

(1) 诱导培养基(CM₁): MS + 3 mg · L⁻¹ 2,4-D + 30 g · L⁻¹ 蔗糖 + 6 g · L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8; (2) 继代

收稿日期: 2005-01-06 修回日期: 2005-10-10

基金项目: 国家“863”高新技术研究发展计划资助项目(2001AA241191, 2002AA241031); 948 引进国际先进技术项目(2003-Q06)资助。

作者简介: 林美娟(1982-), 女, 研究方向: 作物生物技术。

* 通讯作者。

培养基(CM₂): MS + 2 mg · L⁻¹ 2,4-D + 30 g · L⁻¹蔗糖 + 6 g · L⁻¹琼脂粉, pH 5.8; (3) 分化培养基(CM₃): MS + 2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ NAA + 30 g · L⁻¹蔗糖 + 6 g · L⁻¹琼脂粉, pH 5.8; (4) 生根培养基(CM₄): 1/2 MS + 3 mg · L⁻¹ NAA + 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA + 60 g · L⁻¹蔗糖 + 0.5 g · L⁻¹活性炭 + 6 g · L⁻¹琼脂粉, pH 5.8.

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织和分化苗的准备 从田间选取生长健壮、无病虫害的上述甘蔗品种梢部, 去掉叶片, 经体积分数为 75% 酒精擦洗消毒干净, 在无菌条件下, 剥取生长点以上 10 cm 内的幼嫩叶梢, 横切厚为 2 mm 左右的圆片, 接种于 CM₁ 培养基上, 在 26 - 28 °C 黑暗条件下培养, 诱导产生愈伤组织. 选取生长旺盛的愈伤组织, 接种在 CM₃ 培养基上, 在 26 - 28 °C, 每天 12 - 14 h 2000 lx 的光照条件下培养, 分化幼苗备用.

1.2.2 各培养阶段的 G418 抗性试验 (1) 继代培养阶段. G418 设 7 个浓度梯度: 0 (CK)、10、15、20、25、30、35 mg · L⁻¹. 选取生长旺盛, 直径约 2 mm 的愈伤组织块为试验材料, 接种在含有 G418 的 CM₂ 培养基上. 在 26 - 28 °C 黑暗条件下培养, 每 10 天转 1 次新鲜培养基. 每个试验浓度接种 3 瓶, 每瓶 20 块材料, 每 10 天对试验进行观察, 记录生长情况, 并统计结果.

(2) 分化培养阶段. G418 设 8 个浓度梯度: 0 (CK)、15、20、25、30、35、40、45 mg · L⁻¹. 选取生长旺盛, 直径约 2 mm 的愈伤组织块为试验材料, 接种在含有 G418 的 CM₃ 培养基上. 在 26 - 28 °C, 每天 12 - 14 h 2000 lx 的光照条件下培养, 每 10 天转 1 次新鲜培养基. 每个试验浓度接种 3 瓶, 每瓶 15 块材料, 每 10 天对试验进行观察, 记录分化情况, 并统计结果.

(3) 生根培养阶段. G418 设 5 个浓度梯度: 0 (CK)、10、15、20、25 mg · L⁻¹. 选取生长旺盛长势一致, 株高 4 - 5 cm 的分化苗, 接种在含有 G418 的 CM₄ 培养基上. 在 26 - 28 °C, 每天 12 - 14 h 2000 lx 的光照条件下培养, 每 10 天转 1 次新鲜培养基. 每个试验浓度接种 3 瓶, 每瓶 5 株分化苗, 每 10 天对试验进行观察, 记录生根情况, 并统计结果.

1.2.3 统计分析 方差分析过程通过 SAS 统计分析软件完成, 均值多重比较采用 *q* 检验法, 愈伤组织分化率及生根率的数据经过反正弦平方根转化后进行分析.

2 结果与分析

2.1 G418 对甘蔗愈伤组织生长的抑制作用

G418 对上述 6 个供试品种的抑制作用大致相同 (图 1), 方差分析结果见表 1. 方差分析表明, 不同 G418 浓度处理对甘蔗愈伤组织的生长有极显著影响, 品种间愈伤组织的生长差异不显著, 不同 G418 浓度处理与品种间的互作不显著.

表 1 G418 浓度对甘蔗愈伤组织生长影响的方差分析

Table 1 Variance analysis of the effect of G418 concentration on the growth of sugarcane callus

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值 ¹⁾
浓度	5	146.66	29.33	39.49**
品种	5	1.37	0.27	0.37
浓度 × 品种	25	3.77	0.15	0.20
误差	144	106.96	0.74	
总变异	179			

¹⁾ ** 表示差异达 0.01 显著水平.

在继代培养基中, CK 的愈伤组织正常生长, 体积增大明显, 富有光泽, 颜色鲜黄, 组织块颗粒致密, 能发育形成胚性愈伤组织. 但随着 G418 浓度的提高以及培养时间的延长, 愈伤组织的生长受到明显的抑

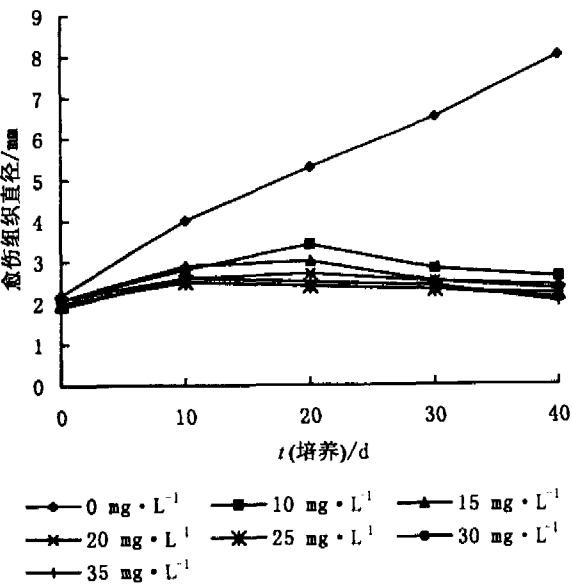


图 1 愈伤组织对 G418 反应的直径变化曲线

Fig. 1 The diameter curve of callus response to G418

制,体积增加速度减缓,并相继出现褐化现象(图 2). 当 G418 为 10、15、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织体积生长量减少,胚性愈伤组织的产生明显减少. 而当质量浓度增至 25、30、35 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织失去光泽而变得暗淡,呈现水渍状,个别品种褐化现象严重(如桂糖 96-211). 愈伤组织死亡速度一般随着质量浓度的加大而加快,在 20 d 左右已完全死亡. 因此,选取培养 20 d 作为筛选时间. 而各个品种的具体筛选浓度详见表 2.

2.2 G418 对甘蔗愈伤组织分化的抑制作用

在分化培养基中,大部分供试品种 CK 的愈伤组织在光照培养箱中培养 10 d 左右都能继续膨大生长,并分化出绿色的不定芽. 随着培养天数的延长,大部分品种的愈伤组织分化率在 20 d 左右达到最高(图 3),而在加有 G418 的培养基中,各供试品种的愈伤组织分化受阻明显. 随着 G418 浓度的提高和培养时间的延长,愈伤组织块的色泽逐渐变褐色,质地呈棉花状,分化率也大幅度降低. G418 对各供试品种愈伤组织块分化的影响效果大致相似(图 4). 当 G418 为 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,大部分品种愈伤组织分化率有所降低,虽然部分可分化出不定芽,但其生长速度明显较慢,长势较弱. 当 G418 为 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,某些品种的愈伤组织褐化相当严重(如粤糖 96-86、福农 95-1702),经历了一个少量分化到最后绝大部分死亡的过程. 当 G418 在 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,大部分品种的愈伤组织就很难生长分化,即使有个别愈伤组织会分化出少量不定芽,也会在 30 d 内死亡;而到了 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的质量浓度时,所有供试品种在培养期间从未出现分化现象. 考虑到大部分 CK 的愈伤组织在培养 40 d 后已经分化生长为 4–5 cm 高的无根苗,符合生根培养阶段的要求,因此以分化 40 d 为界,各品种的分化筛选浓度详见表 3. 方差分析(表 4)表明,不同 G418 浓度处理对甘蔗愈伤组织分化率的影响达极显著水平,品种间的愈伤组织分化率差异达极显著水平,不同 G418 浓度处理与品种间的互作也达极显著水平.

表 2 各甘蔗品种愈伤组织生长阶段的 G418 筛选浓度

Table 2 The G418 selection concentration of various sugarcane callus in growth stage

品种	福农 95-1702	福农 94-0403	桂糖 96-211	桂糖 96-44	粤糖 96-86	粤糖 96-794
$\rho(\text{G418})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	20	20	25	30	30	35

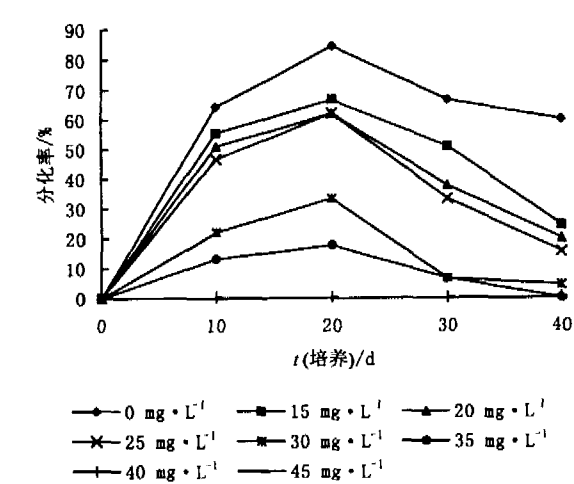


图 3 不同 G418 浓度下的愈伤组织分化率曲线

Fig. 3 The curve of callus regeneration percentage under different G418 concentrations



图 2 G418 浓度对愈伤组织生长的影响

Fig. 2 Callus growth under different G418 concentrations

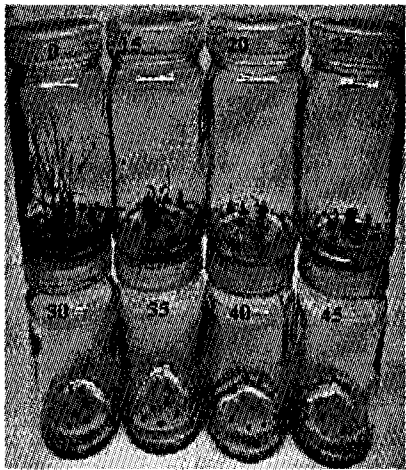


图 4 G418 浓度对愈伤组织分化的影响

Fig. 4 Callus regeneration under different G418 concentrations

表 3 各甘蔗品种愈伤组织分化阶段的 G418 筛选浓度

Table 3 The G418 selection concentration of various sugarcane callus in regeneration stage

品种	福农 95-1702	福农 94-0403	桂糖 96-211	桂糖 96-44	粤糖 96-86	粤糖 96-794
$\rho(\text{G418})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	20	25	25	15	30	35

表 4 G418 浓度对甘蔗愈伤组织分化率影响的方差分析

Table 4 Variance analysis of the effect of G418 concentration on the regeneration percentage of sugarcane callus

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值 ¹⁾
浓度	6	7154.62	1192.44	20.97**
品种	7	44679.34	6382.76	112.23**
浓度 × 品种	42	9565.08	227.74	4.00**
误差	168	9554.84	56.87	
总变异	223			

¹⁾ ** 表示差异达 0.01 显著水平.

2.3 G418 对甘蔗分化苗生根的抑制作用

经过 20 d 对分化苗生根生长情况的调查见表 5.

表 5 G418 对甘蔗分化苗生根阶段的影响¹⁾

Table 5 Effect of G418 on sugarcane regeneration plants in rootage stage

$\rho(\text{G418})$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根率/%						平均单株根数						平均根长/cm					
	F ₁	F ₂	G ₁	G ₂	Y ₁	Y ₂	F ₁	F ₂	G ₁	G ₂	Y ₁	Y ₂	F ₁	F ₂	G ₁	G ₂	Y ₁	Y ₂
0	93.3	100.0	100.0	86.7	93.3	86.7	15	12	20	13	17	15	3.4	4.0	4.3	3.0	2.7	2.4
10	66.7	73.3	80.0	60.0	66.7	53.3	6	5	9	4	8	5	2.1	2.7	3.7	2.3	2.0	1.8
15	40.0	40.0	46.7	33.3	40.0	33.3	4	4	6	4	5	3	1.1	1.5	2.2	1.1	0.9	0.6
20	13.3	20.0	26.7	6.7	26.7	13.3	2	3	4	2	3	2	0.6	0.4	0.8	0.4	0.5	0.5
25	0	8.0	0	0	13.3	0	0	2	2	0	2	0	0	0.3	0	0	0.4	0

¹⁾ F₁、F₂、G₁、G₂、Y₁、Y₂ 分别代表福农 95-1702、福农 94-0403、桂糖 96-211、桂糖 96-44、粤糖 96-86、粤糖 96-794;生根率/% = (生根株数 ÷ 接种总株数) × 100.

从表 5 可见,不加 G418 的 CK 生根率在 86.7% - 100% 之间,植株生长良好,根系发达;添加 G418 后,幼苗生根生长受到严重影响(图 5). 当 G418 为 10 mg · L⁻¹ 时,虽然部分植株生长良好,也有主根和侧根,但随着 G418 浓度的增加,其单株根数和根长度也随之降低,与 CK 相比,不但侧根显著减少,根长度急剧变短,苗高也明显变矮. 当 G418 为 20 mg · L⁻¹ 时,虽然植株能长出主根,但主根又细又短,已经不能分化出侧根,叶片开始出现白斑和枯褐斑. 当 G418 为 25 mg · L⁻¹ 时,大部分叶片已黄化枯死,只有个别品种(如福农 94-0403 和粤糖 96-86)有极个别植株生根,而且即使部分植株生根,其主根

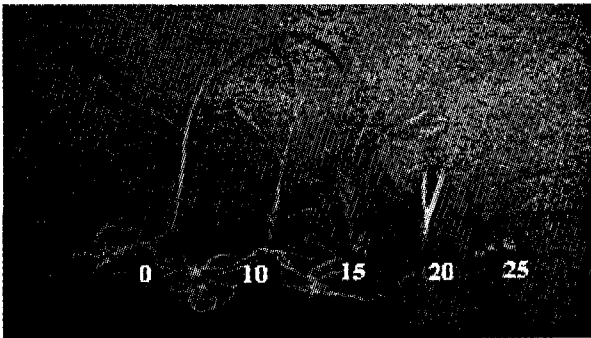


图 5 G418 浓度对甘蔗分化苗生根的影响
Fig. 5 The rooting of regeneration plants under different G418 concentrations

的根长仅 0.3 - 0.4 cm,不能分化出侧根,不具备移栽成活的条件. 因此, G418 为 25 mg · L⁻¹ 可作为各甘蔗品种的生根筛选浓度. 对甘蔗愈伤组织生根率、平均单株根数及平均根长影响的方差分析结果(表 6)表明,不同 G418 浓度对甘蔗愈伤组织生根率、平均单株根数及平均根长的影响达极显著水平,品种间的愈伤组织生根率、平均单株根数及平均根长的差异亦达极显著水平.

3 讨论

NPT II 基因是迄今植物遗传转化中应用最为广泛的选择标记基因之一,它的表达可以使转化细胞对 G418 产生抗性. 本试验通过对福农 95-1702、福农 94-0403、桂糖 96-211、桂糖 96-44、粤糖 96-86、粤糖 96-794 等 6 个甘蔗品种在含有不同质量浓度 G418 培养基中的反应,确定了它们的筛选浓度,建立了比较完

整的筛选体系,为后续的这些甘蔗品种遗传转化研究提供了前提. G418 对甘蔗愈伤组织的生长、分化和分化苗的生根都有强烈的抑制作用,不利于甘蔗的正常生长. 在具体的某一浓度下,甘蔗愈伤组织的生长、分化和生根完全受到抑制,甚至死亡. 通常以愈伤组织块的褐化现象作为甘蔗愈伤组织死亡的标准. 但在遗传转化过程中,许多转化体是由褐化的愈伤组织块再生而来的. 因此,笔者认为单凭愈伤组织的颜色变化来定性其为死亡,有欠妥当,如果以一般生物的生长变化曲线来看,以愈伤组织大小的变化来定量判定其死亡,似乎更为科学一些. 而在愈伤组织的分化和生根上,则比较易于判断,不分化和不生根或者生根能力很弱,其结果只能是死亡. 此外,在试验过程中未有白化苗的出现,所以笔者认为 G418 比较适宜作为上述甘蔗供试品种的筛选试剂. 在转化体的筛选过程中,按照建立的筛选体系,将 G418 加入组织培养的各个阶段培养基上,简单方便、可操作性强,能够在细胞水平上及时淘汰大部分非转化体,减轻试验的后期检测工作量,节约试验的时间和成本.

表 6 G418 浓度对甘蔗愈伤组织生根率、平均单株根数及平均根长影响的方差分析¹⁾

Table 6 Variance analysis of the effect of G418 concentration on rooting percentage, average root number and length of sugarcane callus

变异来源	自由度	生根率		平均单株根数		平均根长	
		均方	F 值	均方	F 值	均方	F 值
浓度	4	7945.86	403.80 **	188.97 **	144.62 **	10.54 **	73.24 **
品种	5	169.53	8.62 **	9.74 **	7.45 **	0.82 **	5.71 **
误差	20	19.68		1.31		0.14	

¹⁾ * * 表示差异达 0.01 显著水平.

参考文献:

[1] 刘伟华,李文雄,胡尚连,等. 小麦组织培养和基因枪轰击影响因素探讨[J]. 西北植物学报,2002,22(3):602-610.
[2] 林俊芳,张银东,陈如凯,等. 基因枪法转化甘蔗胚性愈伤组织获得白化苗[J]. 福建农业大学学报,1997,26(1):18-23.
[3] 陈丽新,李松,谭芳,等. 甘蔗愈伤组织、组培幼苗对抗生素的敏感性试验[J]. 广西蔗糖,2002,27(2):3-7.
[4] 罗素兰,林皎月,长孙东亭. 甘蔗组织培养中不同阶段的抗性及 PPT 抗性筛选试验[J]. 海南大学学报,2003,21(3):259-265.
[5] 陈平华,陈如凯,高三基. 甘蔗愈伤组织 G418 最低抑制浓度的测定[J]. 江西农业大学学报,2005,27(1):63-67.

(责任编辑:陈幼玉)