

抗生素对农杆菌的抑制和杨树叶片分化的影响

郑进 康薇 彭建新 洪华珠*

(华中师范大学昆虫学研究所)

摘要:中嘉8号杨为湖北省林业厅和中国林科院从美洲黑杨的实生后代中选育的杨树新品系。以中嘉8号杨为材料,探讨了四种抗生素对农杆菌的抑制和对杨树离体叶片分化的影响。结果表明,噻孢霉素的抑菌效果最好,选用100~200 mg/L的噻孢霉素来抑菌是比较合适的,羧苄青霉素和链霉素对杨树叶片离体培养的毒性比噻孢霉素大,卡那霉素完全抑制芽的分化。

关键词:杨树;组织培养;抗生素;根癌农杆菌

Effects of Antibiotics on Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration of Leaf of Poplar in Vitro

// ZHENG Jin, KANG Wei, PENG Jian-xin, HONG Hua-zhu

Abstract: Effects of four kinds of antibiotics on the inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* and the response of *Populus deltoids* "63/69" in vitro culture were studied. The experiment showed that cefotaxime is the best for the removal of *Agrobacterium* cells maintained in explants after co-culture, 100 ~ 200 mg/L of cefotaxime is optimal for the removal of bacterial cells in poplar transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Higher toxicity of carbentellin and streptomycin to poplar explants was observed than that of cefotaxime. However, kanamycin inhibited the shoots induction nearly completely.

Key words: Poplar; Tissue culture; Antibiotics; *Agrobacterium tumefaciens*

Author's address: Institute of Entomology of Central China Normal University, 430079, Wuhan, China

杨树(*Poplar*)是重要的速生经济树种,也是林木转基因研究的模式植物^[1]。农杆菌介导的叶盘法是杨树遗传转化的主要方法^[1,2]。在农杆菌介导的转化过程中,抗生素是常用的选择剂和抑菌剂,用于杀灭农杆菌^[3]。不同抗生素对不同植物组织培养的影响存在差异^[4,5]。为了提高转化效率,应当使用对农杆菌抑制效果好同时又对外植体再生影响较小的抗生素。中嘉8号杨是湖北省林业厅与中国林科院合作,从美洲黑杨(*Populus deltoids*) I-63 × I-69的实生后代中选育的速生、丰产、优质、抗性强的杨树新品系^[6],目前未见中嘉8号杨基因转化的报道。本研究以中嘉8号杨为材料,探讨了四种抗生素对农杆菌的抑制效果和对杨树离体叶片分化的影响,为进一步的遗传转化打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试无菌中嘉8号杨组培苗由华中师范大学昆虫学研究所组培室提供。卡那霉素(kanamycin, Km)、

噻孢霉素(cefotaxime, Cef)、羧苄青霉素(carbentellin, Crb)、链霉素(streptomycin, Str)由美国Duchefa公司生产。所用农杆菌菌株LBA4404(*Agrobacterium tumefaciens*),内含pFZY1质粒,该质粒携带npt II基因和CptI基因,由南京林业大学黄敏仁先生惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 抗生素对农杆菌的抑制作用

取农杆菌LBA4404单菌落,接种于5 mL YEB液体培养基中振荡培养(27℃, 220 r/min)过夜;再取0.5~1 mL菌液转接至25 mL YEB液体培养基中,培养至指数生长期,收集菌体并稀释菌液至OD₆₀₀值为0.6。将预培养1 d的外植体在菌液中浸染8 min,用无菌滤纸吸去多余的菌液,共培养4 d后接入含抑菌抗生素的培养基上。10 d后,以校正抑菌率(Rectification Inhibiting Rate, RIR)测定抗生素对农杆菌的抑制作用。其公式为:校正抑菌率=(对照无农杆菌生长外植体-处理无农杆菌生长外植体)/对照无农杆菌生长外植体×100%。

1.2.2 抗生素对杨树叶片分化的影响

在继代25 d的试管苗上选取颜色正常、充分展开的第4或第5片叶为外植体,叶的大小、形状和色泽基本一致。剪去叶尖(深达主脉)和边缘,以叶尖剪

收稿日期:2005-07-25

修回日期:2005-11-18

基金项目:湖北省林业局重点科研项目“利用昆虫病毒防治杨小舟蛾的研究”(编号:2002033)。

第一作者简介:郑进(1962-),男,副教授,博士生,从事生物技术教学和林木转基因研究。通讯作者:洪华珠。

口处与培养基接触的方式接种。叶片分化培养基为 MS + BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L + 抗生素。3 次重复, 每个处理 15 瓶, 每瓶接 3 个外植体(下同)。培养条件: 温度 25℃、相对湿度 75%、光照 16 h/d、光强 2 000 lx(下同)。20 d 后记录叶片分化频率。

2 结果与分析

2.1 抗生素对农杆菌的抑制作用

由图 1 可知, Cef 的抑菌效果最好, 对菌株 LBA4404 的校正抑菌率, 在 30 mg/L 时已经达到 71.4%, 用量从 30 mg/L 增加到 150 mg/L 时校正抑菌率提高 10.4%, 在 200 mg/L 定时完全抑制菌株的生长, 达 100%; 其次是 Str, 对菌株 LBA4404 的校正抑菌率, 在 100 mg/L 时为 80%, 在 200 mg/L 时为 86.4%; Crb 对菌株 LBA4404 的抑菌效果较差, 在 200 mg/L 时其校正抑菌率仅为 54.6%。

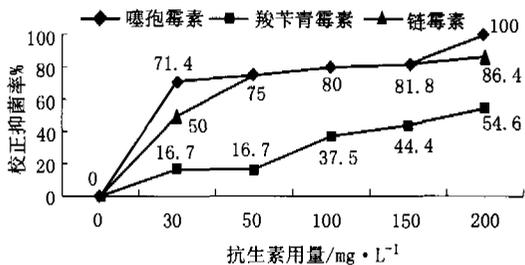


图1 抗生素对农杆菌的抑制效果

2.2 抗生素对叶片分化的影响

2.2.1 噻孢霉素对叶片分化的影响

由图 2 可知, Cef 对叶片诱导愈伤组织和不定芽都有抑制作用, 但作用程度不同。在所取浓度范围内, 不同浓度间愈伤组织的诱导频率差别较小, 幅度为 55.6% ~ 64.4%, 这表明 Cef 对愈伤组织分化的敏感性较弱。不同浓度间芽的诱导频率差别较大, Cef 为 50 ~ 200 mg/L 时诱导频率为 75.6% ~ 73.34%, 与对照差异不大; 之后, 随着 Cef 浓度的增加, 诱导频率逐渐降低, Cef 为 500 mg/L 时诱导频率仅为 13.3%。

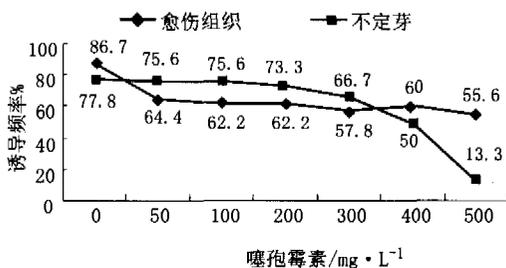


图2 噻孢霉素对杨树叶片分化的影响

2.2.2 羧苄青霉素对叶片分化的影响

由图 3 可知, Crb 对叶片诱导愈伤组织影响与 Cef

相似, 反应不敏感; Crb 对叶片诱导芽的抑制作用较为明显, 随着浓度提高, 芽的诱导频率迅速降低, Crb ≥ 200 mg/L 时诱导频率降到 15.6% 以下, Crb 为 500 mg/L 时诱导频率仅为 6.7%。

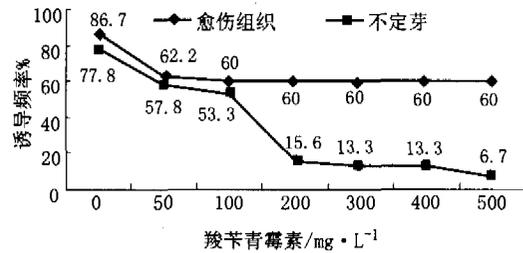


图3 羧苄青霉素对杨树叶片分化的影响

2.2.3 链霉素对叶片分化的影响

由图 4 可知, Str 对叶片诱导愈伤组织和芽都有显著影响。高浓度的 Str 不利于诱导愈伤组织和芽产生。Str 对芽诱导的抑制作用更为显著。当 Str 为 50 mg/L 时愈伤组织的诱导频率为 51.1%, 芽的诱导频率仅为对照的 20.1%; 当 Str ≥ 300 mg/L 时虽有愈伤组织产生, 但叶片不能分化出不定芽。

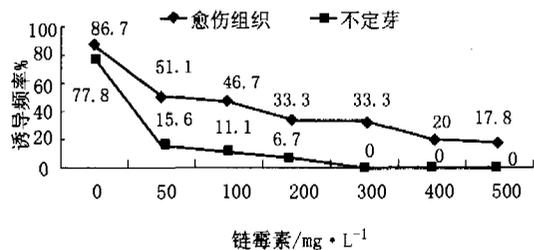


图4 链霉素对杨树叶片分化的影响

3 结语

(1) 实验结果表明, Cef、Crb 和 Str 对菌株 LBA4404 都有抑制作用, 抑菌效果 Cef 最好, Crb 次之, Str 最差, 但 Crb 和 Str 对杨树叶片分化芽的抑制作用比 Cef 要大。当 Cef、Crb 和 Str 为 200 mg/L 时, 芽的分化频率依次为 73.3%、15.6% 和 6.7%。综合考虑, 在农杆菌介导的杨树遗传转化中, 选用 Cef 作为抑菌剂更为合适, 浓度为 100 ~ 200 mg/L。此时, 校正抑菌率可达 80% 以上。

(2) 抗生素是植物基因转化中常用的杀菌剂和选择剂, 但对不同植物的影响不同^[7,8], 本实验中, Km 对杨树离体叶片分化具有较强的抑制作用, 在所选浓度范围内 (5, 10, 20, 30, 50, 60 mg/L), 供试叶片都没能分化出不定芽。Km 是植物遗传转化中常用的选择性抗生素^[8]。因此, 在用叶盘法进行杨树基因转化时直接加入 Km 不利于转化体的筛选, 与樊军锋等的报

应用研究

道^[9]不相一致。这可能与杨树不同株系的遗传差异有关^[3]。

(3)有些抗生素表现出植物激素类似物的效应^[8]。本实验中,在含有 Str 的培养基中,有些叶片的叶柄和叶缘同时分化出不定芽,而对照和其他处理不定芽只在叶缘处发生,其作用机理有待进一步研究。

参考文献

- [1]郑进,刘凯于,洪华珠. 杨树抗性转基因研究进展[J]. 湖北林业科技, 2004(1):31-37.
 [2]Shackelford N J, Chen C A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14(1): 50-57.
 [3]闫新甫. 转基因植物[M]. 北京:科学出版社, 2003.

- [4]王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社, 1998.
 [5]Lin J J, Jonathan K. Plant hormone effect of antibiotics on transformation efficient of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells[J]. Plant Sci, 1995, 109:171-177.
 [6]王宏乾,邱本旺,陈永新,等. 中嘉 8 号等杨树杂交新品系选育[J]. 林业科技开发, 2003, 17(6):21-23.
 [7]Yepes L M, Adwinckle H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1994, 37:257-269.
 [8]Shackelford N J, Chlan C A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14(1):50-57.
 [9]樊军锋,韩一凡,李铃,等. 84K 杨树耐盐基因转化研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4):33-37.

(通讯地址:430079,武汉市珞瑜路 152 号)

扶芳藤快速扩繁试验

敖妍^{1,2} 鲁韧强¹ 潘青华¹

(1 北京市农林科学院林果所 2 内蒙古农业大学林学院)

摘要:分别采用扦插、播种和嫁接等扩繁方法,对红脉扶芳藤、宽瓣扶芳藤、紫红扶芳藤和金边扶芳藤等品种进行了快速扩繁试验,研究不同扶芳藤品种最适宜的繁殖方式和取材方法及各品种在不同繁殖方式中所需要的适宜条件和处理方法。试验结果得出:7月最适宜扦插,生根最快;红脉扶芳藤的生根能力强于宽瓣扶芳藤和紫红扶芳藤,1 a、2 a 生枝条强于当年枝,扦插 30 d 后可以移栽;种子经浓度为 20 mg/kg 的 GA₃ 处理最利于生长,根系数和株高均达到最大值。红脉扶芳藤嫁接在丝棉木上,成活率最高,达 100%。

关键词:扶芳藤;扦插;嫁接;播种

The Rapid Propagation Techniques of *Euonymus Fortunei* // AO Yan, LU Ren-qing, PAN Qing-hua

Abstract: The rapid propagation techniques of *Euonymus fortunei* were reported in this paper. Three propagation methods (cutting, grafting and seed) applying to 4 varieties of *E. fortunei*, *E. fortunei* 'Hongmai', *E. fortunei* 'Kuanban', *E. fortunei* 'Purple' and *E. fortunei* cv. 'Emeraldn Gold', were compared, and the propagation material, season and condition were also tested to seek the suitable propagation ways for *E. fortunei*. The results showed that the best season for cutting of *E. fortunei* would be July when the rooting of cuttings could be the quickest. Among the four tested varieties of *E. fortunei*, *E. fortunei* 'Hongmai' performed the highest rooting ability of cuttings. The rooting ability of cuttings from 1 ~ 2a old branches would be better than that from young shoots. Cuttings could be transplanted 30 days after cuttage. By seed propagation, the suitable treatment of hormone was disposed in 20mg/kg GA₃ where roots and growth of seedlings could perform the best. For grafting propagation, *E. fortunei* 'Hongmai' also performed the highest survival percentage as 100% among the four tested varieties of *E. fortunei* when grafting on *E. bungeanus*.

Key words: *Euonymus fortunei*; Cutting; Grafting; Seeding

First author's address: Forestry and Pomology Institute, Beijing Academy of Agricultural Sciences, 100093, Beijing, China

扶芳藤 (*Euonymus fortunei* (Turcz.) Hand. - Mazz) 属卫矛科 (Celastraceae) 卫矛属 (*Euonymus*) 常绿藤本

或匍匐状灌木,俗称蔓卫矛、爬行卫矛、万年青、换骨筋等,原产于我国^[1,2],在长江中下游及广西、云南、贵州等地野生资源丰富^[3,4]。扶芳藤具抗病虫、抗干旱、抗盐碱和耐寒等生态学特性,同时具有生长快、耐践踏、攀缘附着能力强等特点,是城市高层建筑墙体及屋顶、立交桥、公路铁路护坡的重要立体绿化植物

收稿日期:2005-07-15

基金项目:北京市科技新星项目(编号:2003B18)。

第一作者简介:敖妍(1981-),女,硕士生。从事园林植物繁殖研究。

通讯作者:潘青华,副研究员。