

抗生素对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

康薇¹, 郑进², 洪华珠¹ (1. 华中师范大学, 湖北武汉 430079; 2. 黄石理工学院, 湖北黄石 435003)

摘要 [目的]为宽叶刺槐进一步的基因转化提供依据。[方法]研究3种抗生素对宽叶刺槐愈伤组织诱导与分化的影响。[结果]在3种抑菌抗生素中,链霉素和噻孢霉素对刺槐外植体离体培养的毒性比羧苄青霉素大,羧苄青霉素只在高浓度才对不定芽的分化有抑制作用。[结论]农杆菌介导刺槐遗传转化时,选用浓度300~400 mg/L的羧苄青霉素抑菌较适合。

关键词 抗生素;刺槐;组织培养

中图分类号 S722.3*7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)29-12593-02

Effects of Antibiotics on Induction and Differentiation of Blacust Callus

KANG Wei et al (Huazhong Normal University, Wuhan, Hubei 430079)

Abstract [Objective] The research aimed to provide references for further study of gene transformation of blacust. [Method] Effects of three kinds antibiotics on induction and differentiation of blacust callus *in vitro* were studied. [Result] Among three kinds antibiotics, higher toxicity of cefotaxime and streptomycin were observed having stronger toxicity than that of carbentcillin to the explants, which only showed inhibition to plantlet regeneration under higher concentration. [Conclusion] Concentration of 300-400 mg/L carbentcillin was optional for the remove of bacterial cells in blacust transformation mediated by *Agrobacterium*.

Key words Antibiotics; Blacust; Tissue culture

宽叶刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)是优良的蜜源树种和家畜饲料来源^[1]。随着刺槐组织培养技术的日趋成熟,借助植物转基因技术,可以获得目标多样化的刺槐优良品种。迄今,有关刺槐转基因技术研究的报道较少,国外有4例文献报道^[2-5],国内仅有1例报道^[6],且成功的转化试验都是由根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*A. rhizogenes*)介导完成的。应用农杆菌介导法进行植物转基因时,一般要经过农杆菌感染、共培养、选择培养、转基因植株再生等多个环节,除感染和共培养外,其余环节都要用到抗生素作为筛选转化体的选择剂和抑制农杆菌生长的抑菌剂^[7]。研究表明,向培养基中添加抗生素会影响植物组织的正常生长与分化^[7-8]。目前,选择性抗生素对刺槐外植体分化影响的报道较多^[3,9-10],抑菌性抗生素对刺槐外植体分化的影响鲜有报道。笔者在研究宽叶刺槐组培技术的基础上,比较了几种常用抑菌抗生素对刺槐小叶愈伤组织诱导和分化的影响,为进一步的基因转化打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 外植体。宽叶刺槐取自湖北省国有林场管理站苗圃,试验用组培苗由华中师范大学昆虫学研究所培育,愈伤组织诱导用继代培养25 d的组培苗幼嫩小叶作外植体。

1.1.2 基本培养基。愈伤组织诱导培养基:MS + BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7.0 g/L(pH值5.8);愈伤组织分化不定芽培养基:MS + BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 7.5 g/L(pH值5.8)。

1.1.3 抗生素。噻孢霉素(Cefotaxime, Cef.),羧苄青霉素(Carbentcillin, Crb.),链霉素(Streptomycin, Str.)由美国Duchefa公司生产。

1.2 方法 向基本培养基中加入抗生素,Cef.、Crb.浓度依次为100,200,300,400,500 mg/L,Str.浓度依次为10,20,30,40,50 mg/L。每个处理接种45个外植体,3次重复,以不加

抗生素为对照。接种时,将小叶平放在培养基上,用镊子轻轻压实,25 d后,计算愈伤组织诱导率;将愈伤组织切成小方块(0.5 cm×0.5 cm),转入含有不同浓度抗生素的分化培养基上,45 d后,调查不定芽分化率。培养条件为温度(25±2)℃,相对湿度75%,光照16 h/d,光强2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 Cef.对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响 表1表明Cef.对宽叶刺槐小叶愈伤组织诱导及不定芽分化有显著影响。高浓度的Cef.不利于愈伤组织和芽的分化,对不定芽分化率和有效芽数的抑制作用更加明显。当Cef.浓度为300 mg/L时,愈伤组织诱导率和不定芽分化率分别下降到68.9%和46.7%,有效芽数仅为对照的17.1%;当Cef.浓度为500 mg/L时,只有少量愈伤组织产生,没有不定芽发生。

表1 Cef.对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

Table 1 Effects of cefotaxime on callus induction and differentiation

Cef. 浓度 concentration	接种外植体数//个 Inoculated explants	愈伤组织诱导率//% Callus induction rate	不定芽分化率//% Adventitious bud differentiation rate
0	45	100.0	91.1
100	45	97.8	91.1
200	45	91.1	80.0
300	45	68.9	46.7
400	45	37.8	13.3
500	45	20.0	0

2.2 Str.对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响 Str.对宽叶刺槐小叶愈伤组织诱导和分化芽的抑制作用比Cef.显著增强(见表2)。在附加浓度为100 mg/L Str.的培养基上,愈伤组织诱导率与不定芽分化率仅为64.4%和51.1%,与对照相比,愈伤组织生长速度慢、质地较硬,有效芽数仅为对照的34.2%;Str.浓度为40 mg/L时,有少量愈伤组织产生,没有不定芽发生;当Str.浓度为50 mg/L时,没有愈伤组织形成。

2.3 Crb.对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响 由表3可知,Crb.对宽叶刺槐小叶愈伤组织诱导与不定芽分化的抑制

作者简介 康薇(1983-),女,湖北荆门人,博士研究生,研究方向:植物转基因研究。

收稿日期 2008-07-28

表2 Str. 对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

Table 2 Effects of streptomycin on callus induction and differentiation

Str. 浓度 concentration	接种外植体数//个 Inoculated explants	愈伤组织诱导率//% Callus induction rate	不定芽分化率//% Adventitious bud differentiation rate
0	45	100.0	97.8
100	45	64.4	51.1
200	45	42.2	26.7
300	45	24.4	8.7
400	45	11.1	0
500	45	0	0

作用较小。Crb. 浓度为 300 mg/L 时,愈伤组织诱导率、不定芽分化率和有效芽数与对照的差别不大;Crb. 浓度为 500 mg/L 时,有效芽数仍可达到 27 个,为对照的 37%。所以,用小叶作外植体转化宽叶刺槐时,选用 Crb. 作为农杆菌生长的抑菌剂较为合适,浓度以 300~400 mg/L 为宜。

表3 Crb. 对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响

Table 3 Effects of carbentocillin on callus induction and differentiation

Crb. 浓度 concentration	接种外植体数//个 Inoculated explants	愈伤组织诱导率//% Callus induction rate	不定芽分化率//% Adventitious bud differentiation rate
0	45	100.0	93.3
100	45	100.0	91.1
200	45	97.8	88.9
300	45	95.6	86.7
400	45	77.8	64.4
500	45	60.0	42.2

3 结论与讨论

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^[11]。了解抑菌性抗生素对刺槐愈伤组织诱导和分化不定芽的抑制作用,有利于转基

因研究中选择合适的抗生素用量。该试验中宽叶刺槐小叶对 3 种抑菌抗生素的反应存在差异,表明在转基因试验中,应考虑到不同抗生素对刺槐外植体材料影响的差异。

Cef.、Crb. 和 Str. 是农杆菌介导植物遗传转化中的常用抑菌抗生素,对多数菌株的杀菌效果较好,但对植物组织有不良影响^[7]。试验结果表明,3 种抗生素对宽叶刺槐小叶愈伤组织诱导和不定芽分化的抑制作用 Str. 最强,Cef. 次之,Crb. 较小。随着抗生素浓度升高,愈伤组织诱导率和不定芽分化率而迅速减少,当 Cef. 浓度为 500 mg/L,Str. 浓度为 400 mg/L 时,没有不定芽发生,当 Crb. 浓度为 500 mg/L 时,有效芽数仍可达到 27 个。所以,用小叶作外植体转化宽叶刺槐时,宜选用 Crb. 为农杆菌的抑菌剂,用量为 300~400 mg/L。

参考文献

- [1] 王树芝,田砚亭,李云. 生长调节物质对刺槐复叶再生的影响[J]. 核农学报,2004,18(3):207-211.
- [2] DAVIS J M, KEATHLY D E. Toward efficient clonal propagation of mature black locust trees using tissue culture[J]. Nitrogen Fixing Tree Research Reports,1987,5:57-58.
- [3] DAVIS J M, KEATHLY D E. Detection and analysis of T-DNA in crown gall tumors and kanamycin resistant callus of *Robinia pseudoacacia*[J]. Can J Forest Res,1989,19(4):1118-1123.
- [4] HAN K H, GORDEN M P, KEATHLEY D E. Genetic transformation of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) biotechnology in agriculture and forestry[J]. Transgenic Trees,2000,159:273-280.
- [5] IGASAKI T, MOHRI T, ICHIKAWA H, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*[J]. Plant Cell Reports, 2000,19(5):448-453.
- [6] 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[J]. 中国农业科学,2004,37(8):1208-1211.
- [7] 郑进,康薇,洪华珠. 抗生素在农杆菌介导植物转基因应用[J]. 林业科技开发,2006,20(3):8-11.
- [8] 康薇,郑进,洪华珠. 链霉素对杨树叶片分化不定芽的影响[J]. 林业科技,2006,31(5):1-2.
- [9] 牛正田,张秀梅,罗晓芳. 刺槐对 3 种抗生素敏感性测定[J]. 植物生理通讯,2004,40(1):98-99.
- [10] 郑进,康薇,王慧,等. 杨树、刺槐对卡那霉素敏感性的测定[J]. 核农学报,2006,20(2):116-117.
- [11] 郑进. 中嘉 8 号杨转 BtCry1A 基因的研究[D]. 武汉:华中师范大学,2006:53.

(上接第 12592 页)

3 讨论

试验结果表明,MS 培养基浓度对试管苗生根影响较大,试管苗在 1/2 MS 培养基中生根效果良好,生根率达到 95%,且茎叶生长旺盛。1/2 MS 培养基中加入 IBA 0.5 mg/L 以及活性炭 0.5 mg/L 时对试管苗的生根及生长有促进作用。天然物质的加入对春石斛试管苗生根的效果也明显,培养基中添加 100 g/L 椰子汁的效果最佳,生根率可达 97%。

参考文献

- [1] 刘金,潘光华. 兰花[M]. 北京:中国农业出版社,1998:34-35.
- [2] 乔佳伟. 春石斛栽培要点[J]. 中国花卉园艺,2005(8):18-19.
- [3] 毛碧增,李凤玉,王春,等. 春石斛组织培养技术研究[J]. 浙江大学学报:理学版,2003,30(5):580-583.

- [4] 王玉英,李枝林,余朝秀. 春石斛试管增殖研究初报[J]. 中国农学通报,2005,21(2):208-209.
- [5] 蒋丽娟,孙友平,李培旺. 培养因子对绿玉树离体微型快繁的影响[J]. 广西科学,2003,10(3):232-237.
- [6] 吴翠蓉,刘丽娜,于爱萍,等. 离体条件下几种不同的因子对芦笋诱导生根的研究[J]. 植物研究,2006,26(4):430-434.
- [7] 吴辉,赵俊,宋锡全. 四种不同培养基对诱导金钗石斛幼苗生根的影响[J]. 贵州科学,2007,25(2):65-67.
- [8] 黎建玲,黄肇宇,詹源庆,等. 金钗石斛试管苗生根研究[J]. 广西科学院学报,2006,22(2):87-89.
- [9] 赖家业,杨振德. 活性炭在土朽椴组织培养中的作用[J]. 广西热作科技,1999(4):10-11.
- [10] 韩文璞,袁明莲. 活性炭在甜樱桃组织培养中的应用[J]. 落叶果树,2001(3):7-8.
- [11] 徐宏英,赵玉明,谢海军,等. 大花蕙兰组培快繁影响因素分析[J]. 园艺学报,2002,29(2):183-185.