

抗生素对台湾青枣茎段和愈伤组织生长的影响

胡桂兵^{1,2}, 陈大成¹, 郑启发¹, 黄自然³

(1 华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642; 2 浙江大学园艺系, 浙江 杭州 310029;
3 华南农业大学蚕业服装系, 广东 广州 510642)

摘要: 探讨了卡那霉素(Kan)、羧苄青霉素(Cb)、头孢霉素(Cef)和氨苄青霉素(Amp)4 种抗生素对台湾青枣幼嫩茎段和疏松的愈伤组织生长的影响, 初步确立了对台湾青枣(*Ziziphus mauritiana* Lam.)进行农杆菌介导的遗传转化研究中的抑菌和转化体的筛选策略。Kan $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 50 d 后茎段基本停止生长并开始变成白色(白化); Kan $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胚性愈伤组织生长受到明显的抑制, Kan $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其生长基本停止且开始褐变, Kan $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时胚性愈伤组织完全变褐。适当浓度的 Cb 或 Cef 对芽的伸长生长有一定的促进作用, Cb+Cef 却对芽的伸长出现轻微的抑制效应。Amp 对茎段生长有抑制作用。

关键词: 台湾青枣; 抗生素; 遗传转化

中图分类号: S665.102

文献标识码: A

台湾青枣(*Ziziphus mauritiana* Lam.)的童期特别短, 是进行童期形成相关基因的克隆和进行转基因研究的好材料。台湾青枣的转基因研究工作刚刚开始, 笔者已经建立了一套组培再生系统^[1], 本文介绍了卡那霉素、羧苄青霉素、头孢霉素和氨苄青霉素等抗生素对台湾青枣幼嫩茎段和疏松的愈伤组织生长影响的试验情况, 试验结果有助于在进行转基因的研究时, 制订切实可行的抑菌和筛选方案。

1 材料与方法

试验植物材料为台湾青枣(*Ziziphus mauritiana* Lam.)栽培品种‘高朗 1 号’组培苗的茎段及其粒状疏松的愈伤组织, 在华南农业大学园艺系园艺生物技术实验室无菌保存。愈伤组织的基本培养基为 MS+2,4-D($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)+ZT($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)+蔗糖($3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 茎段的基本培养基为 1/2MS+蔗糖($10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 琼脂($7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。基本培养基分装、高压灭菌后, 待冷却到 40°C 左右在超净台中将抗生素加进基本培养基中, 第 2 d 将茎段或生长旺盛的疏松的愈伤组织接种于附加抗生素的培养基中进行培养。抗生素的种类与质量浓度: 卡那霉素(Kan)为 0、25、50、75、100、125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 羧苄青霉素(Cb)、头孢霉素(Cef)和氨苄青霉素(Amp)均分别为 0、100、200、300、400、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经 30、50 d 分别进行调查统计。每处理接种 5 瓶, 每瓶 5 个切段(或克隆), 重复 3

次。

所有试验材料置于光照培养箱中培养, 温度为 28°C , 光照度 2400 lx, 光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。试验数据用美国 SAS 研究所的 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 台湾青枣的 Kan 最小抑制浓度(MIC)

从表 1 和表 2 可见: 台湾青枣茎段对 Kan 比较敏感, 当培养基中 Kan 达到 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 50 d 后茎段基本停止生长并开始变成白色(白化)而死亡, 随着 Kan 浓度的增大, 白化率逐渐增大。总体结果差异极显著, 当培养基中 Kan 达到 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 结果差异不显著。

生长旺盛的胚性愈伤组织在含 Kan 的固体培养基上继代培养 30 d 后, 结果如表 3。与对照相比较, 差异全部达到极显著水平, 当培养基中 Kan 达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 结果差异不显著。

培养过程中观察到, 附加 $\rho(\text{Kan}) = 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中胚性愈伤组织受到明显的抑制, $\rho(\text{Kan}) = 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 基本停止生长且有些变褐, $\rho(\text{Kan}) = 75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上培养基中胚性愈伤组织完全变褐。说明台湾青枣愈伤组织对 Kan 敏感, 一定浓度的 Kan 能有效地抑制胚性愈伤组织的生长。因此, 转化处理的愈伤组织可采用培养基中附加 $\rho(\text{Kan}) = 25 \sim 75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 来筛选转化细胞。在芽或苗期, 用 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为选择

压力比较合适. 无论是用茎段还是用愈伤组织, 都存在个体差异, 即使是用较高的 Kan 浓度, 都有个别逃避死亡而存活下来, 因此作为遗传转化的基因受体, 经选择压力筛选后, 都有可能出现非转化体的现象.

表 1 Kan 对台湾青枣茎段生长影响的 LSD 多重比较
Tab. 1 LSD multi-comparisons of effect of Kan on stem segment growth of ber

$\rho(\text{Kan})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	平均白化死亡率 mean mortality ^{1)/} %
125	100.0A
100	100.0A
75	94.7A
50	64.0B
25	26.7C
0	0.0D

1) 白化死亡率=(白化茎段数÷接种总茎段数)×100%;
不同大写字母表示经方差分析在 0.01 水平差异显著

表 2 Kan 对台湾青枣茎段生长影响的方差分析
Tab. 2 Variance analysis of effect of Kan on stem segment growth of ber

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.01}
source of variation					
总处理间 treatments	5	27 065.80	5 413.2	108.8**	5.06
误差 error	12	597.33	49.8		
总变异 total variation	17	27 663.11			

表 3 Kan 对台湾青枣胚性愈伤组织生长影响的 LSD 多重比较

Tab. 3 LSD multi-comparisons of effect of Kan on propagation of embryogenic callus of ber

$\rho(\text{Kan})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	愈伤组织平均增殖率 mean ratio of callus proliferation ^{1)/} %
0	135.63A
25	21.53B
50	8.23C
75	1.80C
100	0.00C
125	0.37C

1) 愈伤组织增殖率=(愈伤组织增殖质量÷接种量)×100%;
2) 不同大写字母表示经方差分析在 0.01 水平差异显著

2.2 抑菌类抗生素对台湾青枣生长的影响

从影响曲线(图 1)看, 适当浓度的 Cb 或 Cef 对芽的伸长生长有一定的促进作用, Cb+Cef 对芽的伸长却出现轻微的抑制效应. 这可能是由于相同浓度 Cb、Cef 有相加的作用, 造成其有效浓度过大而抑制了植物的生长效应. 试验过程中还观察到, 这 3 种处理的芽切口处均或多或少地产生愈伤组织, 而 Amp

没有类似的促进作用. 试验总体差异显著, 抗生素种类对芽生长影响较大, 浓度之间影响不显著(表 4). 从抑菌类抗生素种类对台湾青枣生长的影响来看, Cb 与 Cef 之间、Cb+Cef 与 Amp 之间、Cb+Cef 与 Cef 之间效果差异均不显著(表 5). 在转基因操作中, 含 Cb+Cef 的培养基对芽的生长不会造成大的伤害.

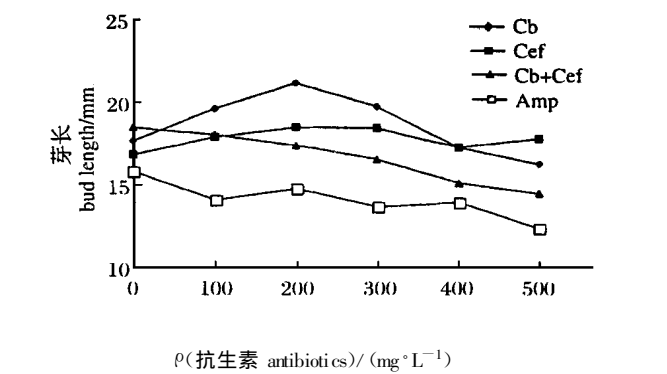


图 1 抑菌抗生素对侧芽生长的影响
Fig. 1 Effect of bacterium inhibiting antibiotics on adventitious buds

表 4 抑菌类抗生素对台湾青枣生长影响的方差分析
Tab. 4 Variance analysis of effect of bacterium inhibiting antibiotics on growth of ber

变异来源	source of variation	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
总处理间	treatments	8	79.08	9.89	3.82*	2.64	4.00
抑菌物因素	inhibitor factor	3	57.96	19.32	7.46**	3.29	5.42
浓度因素	concentration factor	5	21.12	4.22	1.63	2.90	4.56
误差	error	15	38.82	2.59			
总变异	total variation	23	117.91				

表 5 抑菌类抗生素对台湾青枣生长影响的 LSD 多重比较
Tab. 5 LSD multi-comparisons of effect of bacterium inhibiting antibiotics on growth of ber

处理	平均芽长
treatment	mean length of buds ^{1)/} mm
Cb	18.61A
Cef	16.94AB
Cb+Cef	15.46CB
Amp	14.51C

1) 不同大写字母表示经方差分析在 0.01 水平差异显著

3 讨论

了解 Kan 对台湾青枣的茎段或胚性愈伤组织生长的最小抑制浓度(MIC)有利于在转基因研究中采取恰当的选择压力, 把非转化体控制在最少限度内. 进行转基因研究试验中经验告诉我们, 转化体经选择压力后生长势均较弱, 若选择压力过大, 不利于转化体的生长. 所以, 我们常常采用低于临界致死浓度

作为选择压力. 这样往往造成非转化体逃避选择. 无论是用茎段还是用愈伤组织, 都存在个体差异. 从上述的试验结果也可看出, 即使是用 Kan $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对茎段或胚性愈伤组织进行继代培养, 也无法将外植体全部杀死.

因此, 首先可以肯定, 台湾青枣不管是茎段还是胚性愈伤组织对 Kan 是敏感的, Kan 可以作为转基因研究中的选择压力, 而且有一个对基因受体材料生长的最小抑制浓度(MIC). 其次, 即使是用较高的 Kan 浓度, 都有个别逃避死亡而存活下来, 因此作为遗传转化的基因受体, 经选择压力筛选后, 都有可能

出现非转化体的现象.

参考文献:

[1] 胡桂兵, 郑启发, 刘成明, 等. 毛叶枣的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(5): 435—436.
[2] 郑启发, 陈大成, 胡桂兵, 等. 抗生素对沙田柚外植体分化及生长的影响[J]. 广东农业科学, 1998, (1): 22—24.
[3] 王节之, 孙毅, 郝晓芬, 等. 抗生素对谷子外植体的影响[J]. 生物技术, 2000, 10(2): 6—9.
[4] 蓝玲, 叶可可, 曹阳, 等. 抗菌肽 D 基因转化广东桑的研究[J]. 广东蚕业, 1998, 32(2): 12—18.

Effect of Antibiotics on Growth of Stem Segments and Callus
of Ber(*Ziziphus mauritiana* Lam.)

HU Gui-bing^{1,2}, CHEN Da-cheng¹, ZHENG Qi-fa¹, HUANG Zi-ran³

(1 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Dept. of Horticulture, Zhejiang Univ., Hangzhou 310029, China;

3 Dept. of Sericulture & Habilitments South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Effects of antibiotics, including kanamycin (Kan), carbenicillin (Cb), cefotaxime (Cef), ampicillin (Amp), on growth of stem segments and callus of ber(*Ziziphus mauritiana* Lam. var. Gaolang No. 1) were studied. Strategy of bacterium inhibition and GMOs(genetically modified organism) selection of ber has been determined initially in agrobacterium-mediated genetic transformation. Stem segments would stop growing and become white after 50 d in Kan $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment; Embryogenic Callus growth would be inhibited significantly by Kan treatment at $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and would be suspended and start to turn brown at $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and would be brown completely at $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ or above. Moderate concentration of Cb or Cef could promote growth of bud at certain degree, Cb+Cef would have a slight inhibition to bud elongation. Amp played a role of inhibition for stem segment growth.

Key words: ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.); antibiotics; genetic transformation

【责任编辑 柴 焰】