

几种抗生素对大白菜种子发芽及 离体子叶再生的影响

杨广东^{1,2}, 朱 祯³, 李燕娥², 朱祝军¹

(1. 浙江大学园艺系, 浙江 杭州 310029; 2. 山西农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000;

3. 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要:培养基中添加不同浓度的卡那霉素、头孢霉素和羧苄青霉素, 观察抗生素对大白菜基因型 GP-11 种子发芽以及离体子叶再生的影响。结果表明: GP-11 种子在含有 200 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上发芽生长时, 幼苗子叶完全黄化, 侧根数为 0; 随卡那霉素浓度的增加, 芽、主根和侧根生长均受到一定程度抑制, 但发芽率和发芽势不受影响。4 日苗龄的离体子叶在含有 10 mg/L 卡那霉素并附加一定激素的改良 MS 培养基生长时, 基本无绿芽诱出, 在含 7.5 mg/L 和 5 mg/L 卡那霉素的培养基中, 诱出的绿芽率只有 32.5% 和 40.2%; 在仅含 3 mg/L 卡那霉素的生根培养基中, 小苗完全丧失生根能力。在添加浓度高至 400 mg/L 的头孢霉素或羧苄青霉素的诱芽培养基中, GP-11 诱芽率为 0, 且它们之间差异不明显, 但在添加头孢霉素或羧苄青霉素的生根培养基中, 小苗生根依然正常。试验结果表明, 在农杆菌介导的基因转化中, 对大白菜转化苗筛选的卡那霉素浓度在 10 mg/L 左右是适宜的, 添加的抑菌剂浓度在能控制农杆菌生长的同时, 尽量降低浓度, 最好不超过 400 mg/L; 在诱导生根培养基中, 卡那霉素浓度不宜超过 3 mg/L。另外, 对 T₀ 代转基因种子进行遗传分析时在发芽培养基中添加卡那霉素浓度应该达到 200 mg/L。

关键词: 大白菜; 卡那霉素; 头孢霉素; 羧苄青霉素; 发芽; 再生

中图分类号: S634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2002)01-0055-05

在植物基因工程和遗传转化中, 经常使用抗生素抗性基因作为选择标记, 其中来自大肠杆菌的氨基糖苷-3-磷酸转移酶(NPT II)基因是最常见的一种。npt II 作为抗性标记基因, 一般与目的基因连锁在一起, 可赋予转基因植株对氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素、新霉素和 G418 等)产生抗性, 抑制卡那霉素等与植物细胞内叶绿体和线粒体核糖体结合^[1], 保证叶绿体和线粒体蛋白质的正常合成和幼苗的正常绿色, 而非转基因植株由于缺乏 npt II, 能够引起诸如烟草、棉花、油菜等多种植物绿色器官黄化^[2,3]。不同作物对卡那霉素的敏感程度不同, 因此在基因转化过程中对转化苗进行筛选和得到转基因种子后对后代进行遗传分析所采用的卡那霉素选择浓度也有差异。另外在农杆菌介导的基因转化过程中, 头孢霉素和羧苄青霉素作为抑菌剂可以有效抑制农杆菌在培养基中的生长, 但研究发现前者对白菜、甘蓝和辣椒等组织块的芽分化同时有抑制作用, 后者则有促进作用^[4,7]。笔者目前正在进行大白菜等多种蔬菜的基因转化工作, 为了探讨卡那霉素、头孢霉素和羧苄青霉素等抗生素对大白菜离体子叶再生及其种子发芽的影响程度, 以期为大白菜转基因植株的选择与后代遗传分析摸

索出一套行之有效的办法,特进行了本试验。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*(Lour.) olsson) 基因型 GP-11, 是笔者经多年选育的自交不亲和系。

1.2 试验设计

挑选饱满种子用 75% 酒精消毒 5 min, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 浸泡 20 min, 无菌水冲洗 4 次, 在无菌条件下浸泡 24 h, 然后播种在附加卡那霉素(kanamycin sulfate, Sigma 产品) 浓度分别为 0, 25, 50, 75 和 100 mg/L 的 MS 培养基上, 设 3 次重复, 每重复 40 粒种子, 培养温度 28 ℃, 每天光照 16 h, 光照强度 2000 lx。于发芽第 4 d 和第 6 d 记数发芽种子, 计算发芽势和发芽率; 于发芽第 6 d 测定芽长(下胚轴基部至芽顶端的长度)、主根长(下胚轴基部至主根尖端的长度)、侧根数(根长大于 1 cm 的第一侧根数), 并观察幼苗子叶颜色变化。

取 4 日龄的大白菜无菌苗带柄子叶(柄长 1 mm) 为外植体, 在分别添加 0, 2.5, 5, 7.5, 10 mg/L 卡那霉素和 0, 100, 200, 300, 400 mg/L 头孢霉素(Cefotaxime Na, Gibco 产品) 以及 0, 100, 200, 300, 400 mg/L 羧苄青霉素(Carbenicillin, Sigma 产品) 的不同激素组合的 MS 培养基上诱导成苗, 3 次重复, 每次重复 80~100 个外植体, 期间继代 2~3 次, 60 d 后统计绿芽率, 培养条件同上。

将在无卡那霉素培养基上获得的绿芽分别植入含 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L 卡那霉素和 0, 100, 200, 300, 400 mg/L 头孢霉素以及 0, 100, 200, 300, 400 mg/L 羧苄青霉素的生根培养基中诱导生根, 3 次重复, 每重复 4 个绿芽, 20 d 后统计生根情况。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对大白菜种子发芽的影响

从表 1 可以看出, 大白菜种子的发芽势和发芽率几乎全是 100%, 处理间差异不显著, 这表明卡那霉素对大白菜种子发芽率和发芽势没有影响。但随卡那霉素处理浓度的提高, 芽的生长明显受到抑制, 当卡那霉素浓度为 200 mg/L 时与其他 4 个浓度的差异达到极显著水平, 此时芽长只有对照的 56%。卡那霉素对主根的生长也有显著的抑制作用, 浓度越高, 抑制作用越大, 卡那霉素浓度为 0 mg/L 和 50 mg/L 与 100, 150 和 200 mg/L 水平间差异达到极显著, 浓度为 200 mg/L 时的主根长只有对照的 22.3%, 抑制程度达到 77.7%。与对芽长和主根长的影响类似, 卡那霉素使侧根数明显减少, 卡那霉素浓度为 0 时平均为 7 个, 而 200 mg/L 处理时则降为 0 个, 不同处理间差异达到极显著水平。

从观察大白菜幼苗子叶颜色来看, 卡那霉素对叶绿素的形成有明显的抑制作用。培养基中卡那霉素浓度为 0 时, 子叶颜色为正常绿色, 当卡那霉素浓度从 50 mg/L 增加到 150 mg/L 时, 子叶颜色由绿色稍黄逐渐转为黄带微绿, 当达到 200 mg/L 时, 子叶全部变为黄色。从表 1 还可以看出, 卡那霉素浓度与对芽长、主根长等的抑制程度呈正相关, 其中与对侧根

数的抑制程度呈极显著正相关($r=0.899$), 其余相关性均未达到显著水平。因此, 本文认为侧根数和子叶颜色变化可以作为筛选转基因后代植株的主要依据, 其他指标可以作为一种辅助手段。

表 1 卡那霉素对大白菜种子发芽的影响

卡那霉素 浓度(mg/L)	发芽势 (%)	发芽率 (%)	芽长 (cm)	主根长 (cm)	侧根数 (个)	子叶颜色
0	100±0 aA	100±0 aA	4.15±0.14 aA	3.76±0.14 aA	7±0.85 aA	绿色
50	99±0.87 aA	100±0 aA	4.17±0.09 aA	3.51±0.21 aA	2.1±0.46 bB	绿稍黄
100	99.5±0.8 aA	100±0 aA	3.92±0.02 bA	1.87±0.12 bB	0.8±0.05 cC	黄绿色
150	100±0 aA	100±0 aA	3.68±0.36 bA	1.66±0.16 bB	0.2±0.01 dD	黄带微绿
200	100±0 aA	100±0 aA	2.33±0.50 cB	0.84±0.08 cB	0±0 eE	黄色
相关系数	0	0	0.674	0.748	0.899**	

2.2 卡那霉素、头孢霉素和羧苄青霉素对大白菜离体子叶再生的影响

卡那霉素对植株再生有很大的抑制作用, 在基因转化过程中用适当浓度的卡那霉素进行筛选是获得抗性芽的关键所在。卡那霉素浓度过高, 对转化细胞造成强烈的毒害作用, 致使大量外植体在选择培养基上很快死亡; 浓度太低, 对抗性芽不能进行严格筛选, 会产生假抗性芽和大量嵌合体。表 2 说明, 当卡那霉素浓度为 10 mg/L 或再增加浓度时, 基本无绿芽萌发, 当卡那霉素浓度为 7.5 mg/L 和 5 mg/L, 绿芽率也只有 32.5% 和 40.2%, 这表明在选择培养基中卡那霉素浓度为 10 mg/L 时对大白菜转化体的筛选是最为有效的。

从表 3 可以看出, 头孢霉素和羧苄青霉素的存在极大抑制了大白菜离体子叶再生, 在仅含 100 mg/L 头孢霉素或羧苄青霉素的诱芽培养基中, 诱导芽率均不到 30%; 随头孢霉素或羧苄青霉素浓度增加, 诱芽率急剧下降, 在 400 mg/L 时已基本无绿芽分化。在含有 300 mg/L 的羧苄青霉素的诱芽培养基中, 诱芽率比头孢霉素稍高, 但差异并不明显。

表 2 卡那霉素浓度对大白菜离体子叶再生的影响

卡那霉素浓度 (mg/L)	接种数 (个)	诱导芽数 (个)	绿芽率 (%)
0	100	84	100
5	100	71	40.2
7.5	100	76	32.5
10	100	74	0
12.5	100	68	0

表 3 头孢霉素和羧苄青霉素对大白菜离体子叶再生的影响

	头孢霉素(mg/L)					羧苄青霉素(mg/L)				
	0	100	200	300	400	0	100	200	300	400
接种数(个)	100	92	100	85	100	98	95	97	94	100
诱导芽数(个)	84	27	9	2	0	83	27	10	3	0
诱导芽率(%)	84	29.3	9	2.4	0	84.7	28.4	10.3	3.2	0

2.3 卡那霉素、头孢霉素和羧苄青霉素对大白菜再生苗生根的影响

卡那霉素还严重抑制大白菜离体子叶再生苗的生根。在不含卡那霉素的生根培养基中, 每个小苗可长出 5~6 条长约 2~3 cm 的白色根, 20 d 后移入土钵并成活。在含 1 mg/L 和 2 mg/L 卡那霉素的培养基中, 小苗只产生细短白色的毛状须根, 偶尔有 1~2 个细长的小根, 移入土钵只有少数几个成活; 当卡那霉素浓度达到 3 mg/L 时, 小苗完全无法生根, 20 d 后小苗由绿变为黄绿色, 无法移出三角瓶。与卡那霉素相反, 头孢霉素和羧苄青霉素对大白菜

小苗的生根几乎没有影响,在附加浓度高至 400 mg/L 的头孢霉素或羧苄青霉素的生根培养基中,苗生根率均在 90% 以上。

3 讨论

在得到转基因 T_0 代种子后,为了尽快地初步验证这些种子是不是真正的转基因材料,常将种子播种在附加一定浓度的卡那霉素的培养基上,能正常发芽并保持正常绿色、可以健壮成长的有可能是转基因种子,然后根据这些变化进行外源基因的遗传分析;这些幼苗长到一定大小可移栽到大田,并用于进一步的分子验证和大田测试;而那些不能正常发芽、幼苗黄化的必是“假转基因”材料,在培养基上生长不久便会死亡,因此可以及早地淘汰这些种子。对于不同类型的种子,在培养基上附加卡那霉素的浓度可能也大不一样。在筛选转基因棉花种子时,卡那霉素浓度可以加到 1 000 mg/L^[3]。与棉花不同,大白菜对卡那霉素比较敏感,本文初步认为当卡那霉素浓度为 200 mg/L 时,非转基因大白菜幼苗子叶完全黄化,侧根数几乎为 0,这个浓度和这两个指标基本上可作为鉴别转基因种子与非转基因种子的一套标准。

在基因转化过程中用适当浓度的卡那霉素进行筛选是获得抗性芽的关键一步。本试验表明(表 2),当卡那霉素浓度为 10 mg/L 时,对大白菜转化体的筛选是最有效的;但在我们的转化实验中,大白菜离体子叶直接放在含 10 mg/L 卡那霉素的诱芽培养基上很难分化,因此我们先把离体子叶置于不含或仅含低浓度卡那霉素的分化培养基诱出小芽后,再转到含 10 mg/L 卡那霉素的培养基上进行筛选。另外,尽管不同大白菜基因型组培成苗率有着很大差别,但 10 mg/L 的卡那霉素均可完全抑制绿芽的出现。在含 3 mg/L 卡那霉素的诱根培养基中,大白菜子叶再生苗很难生根,这表明根系的发育对卡那霉素更为敏感,极低的卡那霉素浓度(3 mg/L)就可完全抑制根系发育。

在甘蓝型油菜的外植体与根癌农杆菌共培养转化中,Charest 等^[7]和 De Blook 等^[9]曾观察到头孢霉素对外植体材料有毒害作用,会抑制愈伤组织的形成和植株分化,但羧苄青霉素则有促进作用。本试验中,我们看到大白菜离体子叶在含 400 mg/L 头孢霉素的培养基上渐趋黄化和质地变软,最终丧失不定芽诱导的能力;而羧苄青霉素对子叶的形态和芽抑制程度稍次于头孢霉素,但差异并不明显。因此,在大白菜转化中,头孢霉素和羧苄青霉素均可作为抑菌剂,而且在能抑制住农杆菌生长的同时,尽量降低抑菌剂浓度。我们在转化实验中发现 400 mg/L 的头孢霉素可以抑制住农杆菌的生长,在第二次继代和以后的培养中浓度可以递减甚至不加,不会引起农杆菌的旺盛生长。另外在生根培养基中,浓度高至 400 mg/L 的头孢霉素和羧苄青霉素对生根没有影响。

参考文献:

- [1] Bevan M W, Flavell R B, Chilton N D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation [J]. *Nature*, 1990, 304: 184-187.
- [2] 李燕娥,焦改丽,李淑君,等. 转基因棉花纯合系的获得和遗传分析研究[J]. *中国农业科学*, 1998, 31

- (5): 44– 47.
- [3] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657– 663.
- [4] 方宏筠, 李大力, 王关林, 等. 转豇豆胰蛋白酶抑制剂基因抗虫甘蓝植株的获得[J]. 植物学报, 1997, 39(10): 940– 945.
- [5] 余建明, 蔡小宁, 朱 祯, 等. 普通不结球白菜抗虫转基因植株的获得[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(2): 79– 82.
- [6] 程振东, 卫志明, 许智宏. 芸苔属作物的遗传转化[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(3): 161– 164.
- [7] Charest P J, Holbrook L A, Gabard J, *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 438– 445.
- [8] Chi G L. Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinyl glycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes[J]. Plant Cell Report, 1990, 9: 195– 198.
- [9] De Block M, De Brouwer D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1989, 91: 694– 701.
- [10] Zhu Y X, Ou Yang W J, Zhang Y F, *et al.* Transgenic sweet pepper plants from agrobacterium mediated from transformation[J]. Plant Cell Report, 1996, 16: 71– 75.

Influence of Antibiotics on Germination of Chinese Cabbage Seed and *in vitro* Regeneration of Its Cotyledon

YANG Guang-dong^{1, 2}, ZHU Zhen³, LI Yan-e², ZHU Zhu-jun¹

(1. Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China;

3. Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: This paper studied the effect of the supplement of kanamycin, ceftaxime and carbenicillin on the germination of Chinese cabbage GP-11 seeds and *in vitro* regeneration of its cotyledon. The results showed that the seedling cotyledons completely became yellow and the number of lateral root was approximately zero when the concentration of kanamycin on germination media was raised to 200 mg/ L. With the supplement of kanamycin, shoot, main root and lateral roots of GP-11 were inhibited. However, the germination rate and germination percentage did not change. No green shoot can be induced when cotyledons of 4-days seedling were cultured in reformation MS media which was supplemented with 10 mg/L kanamycin and some hormone, and percentage of green shoot was only 32.5% and 40.2% when the concentration of kanamycin was 7.5 mg/L and 5 mg/L, respectively. Little shoot completely lose the ability to root when kanamycin concentration in root media was only 3 mg/L. In shoot-induced media added with 400 mg/L ceftaxime or carbenicillin, the percentage of shoot induction was zero, and there was no difference between ceftaxime and carbenicillin. Small shoot can normally root when cultured in media attached different concentration of ceftaxime and carbenicillin.

Key words: Chinese cabbage; Kanamycin; Ceftaxime; Carbenicillin; Germination; Regeneration