

# 谷子潮霉素抗性浓度的筛选与研究

王节之, 郝晓芬, 郑向阳, 王潞英, 孙美荣

(山西省农业科学院谷子研究所, 长治 046011)

**摘要:** 谷子组织培养不同阶段(愈伤组织、分化再生苗和根)潮霉素抗性浓度均在 5 mg/L 明显敏感, 最高临界浓度为 10 mg/L。米粒的潮霉素抗性浓度偏高 10 mg/L 开始敏感, 最高临界浓度 15 mg/L。潮霉素抗性浓度的筛选为检测谷子转几丁质酶基因奠定基础。

**关键词:** 谷子; 组织培养; 米粒; 潮霉素; 浓度

中图分类号: S515.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(1999)04-0060-03

抗潮霉素基因作为选择标记基因与几丁质酶基因构建在同一表达的载体上, 一起转入植物, 用来帮助鉴定转化几丁质酶基因的细胞、组织和再生植株。在选择压力下, 不含标记基因及其产物的非转化细胞和组织死亡, 转化细胞由于有抗性, 可继续成活, 分裂并分化和长成植株<sup>[1]</sup>。因此, 研究谷子材料的潮霉素抗性浓度十分重要, 它是检测转几丁质酶基因产物不可缺少的工作。

## 1 材料和方法

### 1.1 组培不同阶段潮霉素抗性浓度的筛选方法

以晋谷 21 号幼穗为外植体, 消毒后在无菌条件下接入诱导愈伤的培养基中 25 d 后, 转入含潮霉素浓度为 0 mg/L(对照)、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 的诱导愈伤培养基中 20 d, 观察愈伤组织生长情况, 然后把活力愈伤组织接入分化苗培养基, 30 d 后检查不同浓度诱导愈伤的分化率来定潮霉素的抗性浓度<sup>[1]</sup>。

诱导谷子幼穗 30 d 后<sup>[2]</sup>, 挑选质密白色、分化力强的愈伤组织接于含潮霉素浓度为 0 mg/L(对照)、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 的分化苗培养基, 观察 5 d、10 d、15 d、30 d 不同浓度培养基愈伤变化以及分化率。

检测根的潮霉素抗性浓度时, 考虑分化苗的早晚大小不一致, 接于分化根的培养基长根的差异难辨别是潮霉素的影响还是苗的原因, 为了减少误差把米粒接于含潮霉素浓度为 0 mg/L(对照)、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 的分化根培养基, 观察根的生长情况代替潮霉素对分化根的影响。

### 1.2 米粒的潮霉素抗性浓度的筛选方法

米粒浸泡消毒后, 在无菌条件下接于含潮霉素浓度为 0 mg/L(对照)、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 的 MS 长苗培养基, 观察其 10 d、20 d、30 d 生长情况及致死临界浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 潮霉素对愈伤组织的影响

谷子幼穗 7 月 20 日接于诱导愈伤培养基, 8 月 15 日转接于含不同浓度潮霉素的诱导培养基, 9 月 5 日发现随着潮霉素浓度的增加愈伤的颜色越来越深。0 mg/L 对照的愈伤为质密白色; 5 mg/L 和 10 mg/L 的愈伤成了白黄色; 15 mg/L 和 20 mg/L 的愈伤变成了浅褐与褐色。9 月 5 日把对照和白黄色愈伤接于分化苗培养基。10 月 5 日观察, 对照愈伤分化率约 80%; 5 mg/L 的愈伤分化率 20%, 其余愈伤变褐; 10 mg/L 的只有 20% 愈伤出现绿点无分化出小苗, 说明过高的潮霉素浓度有抑制细胞分裂生长作用, 筛选愈伤的抗性浓度宜定为 5~10 mg/L 范围<sup>3</sup>。

### 2.2 潮霉素对分化再生苗的影响

从试验结果看出, 随着潮霉素浓度增加, 分化率越来越低。5 d 时观察, 5 mg/L 培养基的愈伤由白色变成白黄; 10 mg/L、15 mg/L 的培养基中愈伤是一半变白黄色, 一半变褐; 20 mg/L 的愈伤全部变褐。10 d 后, 5 mg/L 的愈伤组织分化出现绿点, 有的愈伤出现有象猫耳的黄小叶; 10 mg/L 的白黄愈伤出现黄绿点; 15 mg/L 的变成褐色愈伤, 个别浅褐愈伤上有稀疏的绿点; 0 mg/L 的白色愈伤覆满绿点。15 d 后, 0 mg/L 的培养基中有的愈伤分化出浓绿小苗; 5 mg/L 分化出的再生苗叶子略黄; 10 mg/L 的有少部分愈伤分化出微弱小苗, 其余愈伤为褐色; 15 mg/L 的只有很少的愈伤分化出黄色小叶。30 d 后, 对照分化率 90%, 株高 2 cm, 叶绿苗壮; 5 mg/L 的分化率平均 50%, 株高 1 cm, 叶子黄色; 10 mg/L 的分化率平均 20%, 小苗枯黄; 15 mg/L 的愈伤全褐。由此看来, 15 mg/L 的潮霉素浓度对分化再生苗有抑制作用, 5~10 mg/L 作为分化再生苗抗性浓度范围。

### 2.3 潮霉素对根的影响

随着潮霉素浓度增加侧根和根毛越来越少与越来越短, 株高也相应的低矮。10 d 时, 除了对照有侧根, 其它处理均无。平均株高从含潮霉素浓度小到大的顺序为 5 cm, 5 cm, 4.5 cm, 3.5 cm, 2.5 cm; 20 d 后, 对照有侧根和根毛并且白嫩; 5 mg/L 的部分植株有侧根和根毛; 10 mg/L 的少部分植株有侧根与根毛, 大部分植株只有长长一条主根; 15 mg/L 和 20 mg/L 的培养基中根又短又枯黄。株高分别为 9.5 cm, 8.5 cm, 7.5 cm, 3.5 cm (苗黄), 3.5 cm (苗黄)。由于根发育不良影响上部苗的生长, 筛选根的临界抗性浓度不能超过 10 mg/L, 5 mg/L 的浓度对根开始有一定影响。

### 2.4 米粒在含潮霉素浓度培养基上的特征

米粒接种于含有潮霉素浓度为 0 mg/L (对照)、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L 的 MS 培养基中, 3 d 开始萌动。10 d 后, 以潮霉素浓度从小到大的顺序株高平均分别为 4.5 cm, 4.5 cm, 4.5 cm, 3.5 cm, 3.5 cm, 而根是越来越细短。20 d 后, 株高平均为 6 cm, 6 cm, 5.5 cm (部分叶子变黄), 5.5 cm (部分叶子变黄), 3.5 cm (植株枯黄), 除了 20 mg/L 的根短枯黄外, 其余的根部随着潮霉素浓度的增加侧根又少根毛又短。30 d 后株高分别为 8 cm, 7 cm, 5.5 cm (多部分枯萎), 5.5 cm (全部枯萎), 3.5 cm (全部枯黄), 除了对照与 5 mg/L 处理的每株 2~4 条侧根且白嫩外, 其它处理的根很稀少。因此, 米粒长苗抗性浓度定于 10~15 mg/L 范围。

### 3 讨论

潮霉素抗性浓度的筛选是分阶段进行的, 每阶段的临界抗性浓度差异不十分大。愈伤组织、分化再生苗以及根的生长均从 5 mg/L 浓度开始敏感, 临界抗性浓度不超过 10 mg/L。而米粒稍微高些, 它的抗性浓度范围 10 ~ 15 mg/L, 可能是由于米粒自身营养供幼苗生长有关, 当苗长大时才吸收培养基营养, 使抗性有所增强。若愈伤诱导与分化再生苗连续潮霉素抗性浓度筛选, 有些学者认为, 浓度可能逐次降低, 谷子是否有类似情况有待进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1—15.
- [2] 王节之, 张海风, 郑向阳. 晋谷 21 号幼穗组织培养的研究[J]. 山西农业科学, 1998, 26(1): 30—32.
- [3] 毋秋花, 田文忠, 等. 基因枪转移 Bar 基因获得抗除草剂(Basta)的糜子蔗克隆再生[J]. 遗传, 1998, 20(3): 23—26.
- [4] 赵彬, 薛庆中. 基因枪在水稻遗传转化中的应用及其转化技术的优化[J]. 生物技术, 1998, 8(1): 4—6.

## Selection of Millet Resistance Concentration of Hygromycin

WANG Jie-zhi, HAO Xiao-fen, ZHENG Xiang-yang,

WANG Lu-ying, SUN Mei-rong

(Millet Research Institute Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Changzhi 046011)

**Abstract:** The result of experiment showed that callus differentiation regrowthes and roots become sensitivity when the resistance concentration of hygromycin in culture medium reached 5 mg/L. The critical concentration is 10 mg/L. Husked millet become sensitivity when the concentration reached 10 mg/L. The critical concentration is 15 mg/L. The resistance concentration of hygromycin selected is the basis for testing transgenes millet plant.

**Key words:** Millet; Tissue culture; Resistance concentration; Hygromycin