

几种抗生素对离体培养中植物 形态发生的影响

刘 凡 曹鸣庆

佐藤隆德

(北京市农林科学院蔬菜研究中心 100081)

(日本农林水产省野菜茶叶试验场 514-23)

摘 要 抗生素羧苄青霉素 (Carbenicillin), 头孢霉素II(Keflodin)和Claforan影响甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 游离小孢子培养胚胎发生, 其浓度越高, 影响越大。羧苄青霉素促进辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 子叶外植体愈伤组织发生, 同时, 还影响油菜小孢子胚再生植株及辣椒子叶再生株的生根, 产生粗短根甚或发育为瘤状物。

关键词 抗生素 植物离体培养 形态发生

抗生素是一类具有一般或特别抑制生物活体 (尤其是细菌) 生长的化学物质、药剂或农药。它们早就被植物组织培养工作者用于解决离体培养中的污染问题^[2~4]。近年来随着农杆菌在高等植物基因工程中的普遍应用, 抗生素作为遗传转化系统中的杀菌剂和转化株筛选剂, 也得到广泛应用^[5]。在抗生素对植物形态发生的影响方面, 目前国内外有关报道较少, 且不详细。抗生素使用失当往往造成实验失败。本文报道在离体培养实验中使用几种抗生素所观察到的若干现象和结果, 并予以探讨, 以期引起对这一问题的关注。

1 材料和方法

1.1 游离小孢子胚胎发生

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L. cv. Topaz) 花蕾 (2~4 mm) 取自10/5℃(昼/夜)栽培供试母株, 表面消毒后, 捣挤出小孢子, 经过滤、离心后, 置60mm无菌培养皿以 2×10^5 个/ml密度于液体培养基中在黑暗下薄层培养, 2ml/皿, 设置三次重复。培养基(NLN-13)参照Sato, T.等^[6], 蔗糖浓度13%。培养温度32℃。3d后经或不经与根癌农杆菌共培养, 然后将小孢子重新悬浮于分别含不同浓度的羧苄青霉素 (Carbenicillin)、头孢霉素II (Keflodin)和Claforan的NLN-13培养基中继续培养。14d后转入25℃加光照培养。一周后观察记载胚胎形成情况, 胚产量以平均每培养皿诱形成数计。继而将胚转入含羧苄青霉素500mg/l的1/2MS培养基中培养, 进一步观察根的发生情形。

1.2 辣椒不定芽发生及生根

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 品种为Fushimi。种子消毒后在1/2MS无菌培养基上萌发。取发芽15d后的无菌苗子叶切段为外植体, 置SP-3培养基 (MS基本培养基+玉米素

5mg/L)上,加或不加羧苄青霉素。在25℃下光照培养一个月后,统计具不定芽或芽原基的切片的数值,同时计录外植体形态。将再生的辣椒无根幼苗移植于分别含羧苄青霉素、Claforan和头孢霉素II 500mg/L的1/2MS生根培养基上,不含激素。3周后观察记载发根情况。

实验中所用3种抗生素购自Sigma等公司,经过滤灭菌后,按一定浓度加入冷却至50℃以下的各类培养基中。

2 结果与分析

2.1 羧苄青霉素浓度对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响

随着培养基中羧苄青霉素含量的增加,无论是经或未经与根癌农杆菌共培养,油菜游离小孢子的胚胎发生数均呈明显递减趋势(表1),胚胎形态也从正常逐渐变得不正常,子叶渐趋愈伤组织化。

表1 羧苄青霉素浓度对油菜品种Topaz小孢子胚胎发生的影响

浓 度 (mg/L)	胚 胎 产 量		子 叶 期 胚 数	
	A	B	A	B
0	300	*	94	*
50	268	170	61	42
100	180	104	29	25
200	206	80	14	9
300	115	45	5	5
400	123	39	3	4
500	22	11	3	1

A—未与农杆菌共培养; B—与农杆菌共培养; *—严重污染

2.2 三种抗生素对油菜小孢子胚胎发生的影响

在相同的浓度下,Claforan和头孢霉素II比羧苄青霉素对小孢子胚胎发生具有更强烈的抑制作用(表2)。

表2 三种抗生素下油菜游离小孢子培养胚的产量

抗 生 素 种 类	抗 生 素 浓 度	
	100 mg/L	200 mg/L
Carbenicillin	25	10
Claforan	7	-
Keflodin	-	0

2.3 羧苄青霉素对油菜小孢子胚胎植株生根的影响

培养基中含500mg/L羧苄青霉素时,大大阻抑了小孢子胚胎植株的生根。培养后10d内,未加羧苄青霉素的培养基上有95%的再生株长根(22/23),根细长,形态正常。而在含羧苄青霉素500mg/L的基质上只有33.3%(14/42)的植株生根,且根呈短粗

状,形态不正常。

2.4 羧苄青霉素对辣椒子叶外植体器官发生的影响

经仔细观察,在未加羧苄青霉素的SP-3培养基上,辣椒子叶外植体切口表面形成愈伤组织的数量较少,分化的不定芽均未经愈伤组织而从切口表面直接发生。其中约有半数芽原基能继续发育为完整植株。在含羧苄青霉素500mg/L的SP-3培养基上,外植体切口表面形成较多量的愈伤组织,开始时也有若干芽原基形成,随着培养时间的延长,这些芽原基被旺盛生长的愈伤组织遮盖,并渐渐脱分化,最终未能分化为具茎叶的植株。

2.5 羧苄青霉素、Claforan和头孢霉素II

对辣椒再生株生根的影响

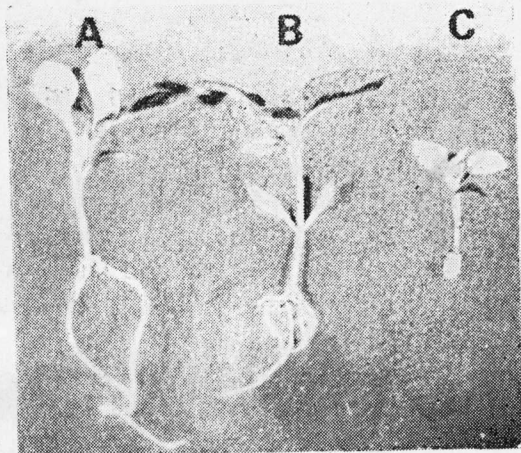
从离体辣椒子叶不定芽再生的幼苗,在含500mg/L Claforan或头孢霉素II的1/2MS培养基上,有形态正常的根系发生。而在含500mg/L羧苄青霉素的同一培养基上,再生株的根发生和发育不正常,其形状极端短粗,甚至呈现瘤状(附图)。

3 讨论

在抗生素对离体培养植物形态发生的影响方面,Pollock等^[4]曾报道青霉素和头孢霉素能促进烟草细胞系的生长。Phillips^[3]和Derrop^[7]曾报道磷霉素(Phosphonomycin)及青霉素能促进菊芋、向日葵和长春花等的细胞培养物的生长。胡薇等^[1]报道在草莓诱导丛芽培养中,青霉素的加入显著降低了丛芽

诱导率和植株鲜重。随着青霉素浓度从10mg/L增加到200mg/L,愈伤组织的诱导能力、不定根分化能力和根的粗度均呈正相关增加,但根的伸长受到限制。这一结果与本试验中羧苄青霉素对辣椒子叶外植体愈伤组织的生长、辣椒和油菜离体再生株根的生长等的影响相同。

羧苄青霉素、Claforan、头孢霉素II等抗生素在目前植物基因工程研究中日益得到广泛应用。Mathias等^[8]报道低浓度羧苄青霉素(60~100mg/L)能促进小麦愈伤组织发生,而对不定芽和不定胚发生的影响很小。但他们提及在使用根瘤农杆菌的转化实验中,体细胞胚胎及愈伤组织的生长受制菌浓度(250~500mg/L)羧苄青霉素的不良影响。最近,松田长生等^[9]报道在葡萄转化实验中,Claforan对葡萄不定胚的发育和生长无影响。当浓度在0~500mg/L的范围内,不定胚能正常发生,根的伸长也未曾受阻。但是,在本试验中,羧苄青霉素、Claforan和头孢霉素II对油菜游离小孢子胚胎发生均有不良影响。在使用羧苄青霉素的转化实验中,随着浓度从50mg/L增加到500mg/L,小孢子胚的产量明显呈逐渐下降趋势。造成上述结果不尽相同的原因,很可能是在不同的研究对象和体系中,抗生素对外植体形态发生的影响有所不同。抗生素对植物组织和细胞的毒力虽然很小,但毕竟还存在。抗生素的抗菌作用不同于一般的消毒剂,它们是通过生物化学方式干扰细菌的代谢机能,多数呈抑菌作用,少数具溶菌或杀菌作用。羧苄青霉素在很低浓度时即能呈抑菌作用。在以根



附图 三种抗生素对辣椒子叶再生株生根的影响

A 1/2 MS+500 mg/L Keflodin; B 1/2 MS+500mg/L Claforan; C 1/2 MS+500mg/L Carbenicillin

癌农杆菌为介导的植物外源基因转化体系中,羧苄青霉素的一般使用浓度为500mg/L。本实验中将羧苄青霉素的浓度降至50mg/L时,小孢子胚产量接近未加羧苄青霉素的对照,而且也未发生因农杆菌大量增殖而造成的污染。而无羧苄青霉素的对照培养两日后即严重污染。这一结果表明,在使用较高浓度抗生素杀菌时,如果严重影响外植体形态发生,可考虑降低抗生素的使用浓度。

参 考 文 献

- 1 胡薇等.草莓组培中青霉素效应的研究.见:中国植物生理学会、中国细胞生物学学会编:全国植物组织和细胞培养及其应用专题学术会议摘要汇编.成都,1992, 50
- 2 Dotts J H and Roberts L W. Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures. *In Vitro*, 1981, 17 (6) : 467~470
- 3 Phillips R et al. Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminations without effecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Sci Lett*, 1981 (21) : 235~240
- 4 Pollock K et al. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, 1983 (2) : 36~39
- 5 Shaw C H et al. A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. *Gene*, 1983 (23) : 315~330
- 6 Sato T et al. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*, 1989 (8) : 486~488
- 7 Deropp R S. *Phytopathology*, 1949, 39: 822
- 8 Mathias R J and Boyd L A. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in HEXAPLOID Bread Wheat (*Triticum aestivum* L. EM. THELL). *Plant Science*, 1986 (46) : 217~223
- 9 Matsuta N H et al. *Agrobacterium* mediated transformation of grape and regeneration of transgenic plants. *Japanese Journal of Breeding*, 1991 (41) : 74~75

Effects of Several Antibiotics on the Morphogenesis of Explants Cultured *in vitro*

Liu Fan Cao Mingqing

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Takanori Sato

(National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants
and Tea, Japan, 514-23)

Abstract The morphogenesis of explants cultured *in vitro* was affected by three different antibiotics, i.e. Carbenicillin, Claforan, and Keflodin. All of them showed an unfavorable effect on microspore embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus* cv. Topaz. For Carbenicillin, within the range of 0—500mg/L, the higher the concentration, the less the embryos were produced. The best concentration of Carbenicillin seemed to be 50mg/L for inhibiting bacteria growth and achieving favourable production of embryos. Carbenicillin also had some stimulative effects on callus formation of pepper cotyledon explants, and on rooting of regenerated plants resulting in shorter and thicker roots or even roots with tumors.

Key words: Antibiotics; Plant culture *in vitro*; Morphogenesis