

卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究^{*}

袁 鹰 刘德璞 王玉民 郑培和

(吉林省农业科学院生物技术中心, 公主岭 136100)

摘要 用 3 个大豆品种作为研究材料, 研究了卡那霉素对种子萌发、子叶节培养、茎尖和组培苗生根的抑制效应。结果表明不同的外植体对卡那霉素的反应存在较大的差异, 用卡那霉素浸泡种子, 浓度最好是 1000ppm, 而种子在含卡那霉素培养基上萌发, 一般为 100—200 ppm 效果较好, 子叶节在生长培养时卡那霉素可采用 50—100ppm。而茎尖、子叶节组培苗, 一旦放入含有卡那霉素培养基内, 不论浓度多少, 无一生根。不同的基因型亦稍有差异。所以在筛选转化子之前一定要进行临界浓度的筛选试验。

关键词 大豆; 抑制; 筛选

中图分类号 S 565.101.2 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2003)04—0261—03

在转基因植物中一个经常使用的标记基因就是卡那霉素抗性基因, 它经常地在实验室用作区分转基因植物细胞和非转基因植物细胞的标记^[1, 2]。卡那霉素属于氨基糖苷类抗生素, 其毒性机理是与植物细胞器叶绿体和线粒体中的核糖体 30S 亚基结合, 从而阻止翻译过程干扰蛋白质合成, 导致植物细胞死亡; 而转化细胞获得了对抗生素的抗性, 在一定浓度的选择性抗生素的选择培养基上存活下来, 而非转化的细胞则因不含该抗性基因而被抑制或杀死^[5]。

现已报道利用这个选择性标记基因超过 30 个属的植物得到了遗传修饰^[3], 包括马铃薯、大豆、向日葵、棉花、拟南芥菜等几十种双子叶植物以及玉米等极少数单子叶植物^[8]。但是卡那霉素在单子叶植物就远不如在双子叶植物上表现得那么有效^[3]。卡那霉素使用浓度因不同物种及不同的外植体类型而不同^[6, 7], 既能有效地抑制非转化细胞的生长, 使之缓慢地死亡又不影响转化细胞的正常生长较为适宜。如果抗生素浓度过低虽然不影响转化体的正常生长, 但会导致出现嵌合体或假转化体现象; 而抗生素浓度过高, 由于毒性太强, 能迅速杀死植物细胞, 死细胞对邻近活细胞往往有很强的抑制作用, 不利于转化细胞生长。基于此, 我们在筛选大豆转化体之前, 进行了有关的探讨, 有针对性的取大豆不同外植体在萌发、生长、生根培养基中加入不同梯度的

无菌抗生素, 观察其萌发、生长、生根情况, 以未加抗生素的培养基接种同样的外植体为对照。

1 材料与方法

1.1 材料

吉林 20 号, 吉林 30 号, 吉林 35 号。

1.2 方法

1.2.1 取种子分别用卡那霉素浓度为 0、500、700、1000、1500ppm 浸泡过夜, 然后接种于营养钵中和 1/2MS₀ 培养基中 15 天后取出种苗对其分类、调查、记录。

1.2.2 取种子分别在含卡那霉素 0、50、100、150、200ppm, 1/2MS₀ 培养基上萌发生长。

1.2.3 取种子在 1/2MS₀ 培养基上生长的无菌苗子叶节, 培养于含卡那霉素 0、20、50、100、200 ppm 生长培养基上观察生长情况。

1.2.4 取无菌苗的茎尖和子叶节的组培苗插入含卡那霉素 0、10、20、50 ppm 生根培养基上, 观察生根情况。

为确保试验的准确性 每次试验重复 3 次, 每组材料取 30 粒种子进行处理, 每组设 1 个对照。

2 培养基

萌发培养基: 1/2MS₀; 1/2MS + 蔗糖 3% + 琼脂 0.8%

生长培养基: 1/2MS + IBA 0.5 ppm + GA3 0.5

* 收稿日期: 2003—03—19

课题来源: 国家“863”研究项目子专项“用基因工程技术改良大豆的抗虫性”(2001—2004)。

作者简介: 袁鹰(1964—), 女, 副研究员, 从事植物组织培养及转基因研究。

ppm +蔗糖 3%+琼脂 0.8%
生根培养基: 1/4MS+NAA0.5 ppm +蔗糖 2%
+琼脂 0.8%
培养基 PH5.8—6 按常规消毒。

3 结果

3.1 用不同浓度的卡那霉素浸泡过夜的种子, 将浸

表 1 不同浓度 的卡那霉素浸泡种子试验

Table 1 1 Examination of different concentration Km soaking seeds

品种	卡那霉素 浓度 ppm	数量 No. of seeds	正常植株数 Normal plants	主根长(cm) Taproot length	须根数(条) No. of fibre	有直无须根 No. of plants without fibre	裂胚数 Split embryos	正常植株百分比 Percentage of normal plants
Varieties	Concentra- tion Km							
吉林 20 Jilin 20	0	30	30	6—7	10—20	0	0	100
	20	500	30	6	4	5—10	20	4
	1000	30	1	3	4	10	19	3
	1500	30	0	0	0	5	25	0
吉林 30 Jilin 30	0	30	30	7—8	8—11	0	0	100
	500	30	7	4—5	6—11	19	3	23.3
	1000	30	1	4	5	12	17	3.3
	1500	30	0	0	0	6	24	0

3.2 在无卡那霉素培养基上萌发生长 10 天的种子侧根已开始生长, 而在含卡那霉素的培养基内的种子无一侧根生长, 15 天后侧根才开始生长, 但不是培养基内主根发出的侧根, 而是暴露在培养基以上的节长出的须根, 而须根一旦接触培养基, 根尖就变黑不再长了, 主根尖也受损。随着卡那霉素浓度的增

泡过的种子在营养钵中种植于 1/2MS₀ 培养基中萌发生长, 当卡那霉素浓度为 500 ppm 时有 20%—30% 种子正常萌发生长, 当卡那霉素浓度为 1000ppm 时, 只有 0.05%—1% 种子正常萌发生长, 其它种子刚拱土根尖长至 1—2cm 时就变黑, 不再继续生长。当卡那霉素浓度为 1500 ppm 时没有一株拱土, 而空白对照 100% 正常萌发生长。因此, 我们认为卡那霉素 1000 ppm 是浸种试验的临界浓度。

加, 植株受损越严重。本研究结果说明大豆根的生长对卡那霉素是很敏感的。因此大豆在不同浓度卡那霉素培养基上萌发的临界浓度为 100—150ppm 而不同品种对卡那霉素敏感性稍有不同, 本试验吉林 30 号较吉林 35 号敏感。所以在不同基因型的转化子筛选前要进行临界浓度的筛选试验。

表 2 大豆在不同浓度卡那霉素培养基上萌发生长情况

Table 2 Soybean germinating in the media content fixed concentration Km

品种	卡那霉素浓度 ppm	处理种子数 No. of seeds	正常植株数 Normal plants	侧根长 cm(每株) Fibre length (cm)	侧根数 No. of fibre	正常植株百分比 Percentage of normal plants
Varieties	Concentration Km					
吉林 30 Jilin 30	0	40	40	8—10	20—25	100
	50	40	6	4—5	8—10	15
	100	40	7	3—4	2—5	50
			7	3—4	7—10	17.5
	200	40	8	2—3	2—5	20
			6	2—3	2—4	15
	300	40	0	0	0	0
	0	40	40	10—12	15—20	100
吉林 35 Jilin 35	50	40	5	3—4	5—10	12.5
	100	40	17	2—3	1—5	42.5
	200	40	5	2—3	5—10	12.5
			8	1—2	1—5	20
	300	40	4	1—2	1—5	10
			0	0	0	0
	200	40	4	1—2	1—5	10
	300	40	0	0	0	0

3.3 培养在含卡那霉素 10、50、100、200 ppm 内的大豆子叶节 15 天内无任何区别, 长势与空白对照一样, 已有再生小苗。20 天后卡那霉素 100、200 ppm

培养基上的小苗茎尖和叶片逐渐变黄; 30 天后卡那霉素 50 ppm 培养基上的再生小苗有 85% 茎尖开始变黄、叶片脱落; 20 ppm 培养基上的再生小苗有 38%

开始变黄,而其它浓度内的组织块已开始褐化,不再出现新芽。由此认为子叶节的卡那霉素临界筛选浓度为50—100ppm。

3.4 置于含卡那霉素0、10、20、50、100 ppm生根培养基内的茎尖和子叶节的组培苗,一周后调查,空白对照内的30株小苗已有28株长出1cm小根,而加卡那霉素的生根培养基内的小苗无一生根。在含卡那霉素生根培养基内的植株基部全部愈伤化。20天后调查不加卡那霉素生根培养基内已全部生根,且植株生长旺盛;凡是在加卡那霉素生根培养基内的植株,无论卡那霉素浓度多少,植株基部都愈伤化,无一生根。更进一步说明卡那霉素抑制大豆生根的效应是很明显的。

4 讨论

在不同的卡那霉素浓度下,从大豆种子的浸泡、种子的萌发力以及无菌子叶节的生长情况看,大豆本身对卡那霉素有一定的抗性,但大豆的基因型不同抗性亦不同,本试验中的吉林30号比吉林20号、吉林35号抗卡那霉素;而不同的处理方法,不同的材料(部位)对卡那霉素抗性也不同。本研究认为大豆的生根对卡那霉素最敏感,其次是子叶节、最后是种子浸泡,但随着卡那霉素浓度的提高,种子的发芽率、幼苗的生长发育均受到越来越大的影响,甚至达到一定程度会完全抑制。

在基因转化过程中,一是在选择外源基因时,最

好选择携带一些针对某些作物较敏感的选择剂作为标记基因;另外要选最敏感的材料和处理方法;如试验中植株的生根对卡那霉素的反应是很敏感的。在筛选转化体时,确定适宜的选择压也是很关键的,尤其是一些植物本身对选择剂具有很高的内源抗性,要根据不同植物、不同材料、不同的处理方法来确定选择剂的适宜浓度,避免一些假转化体现象,真正达到筛选目的。

参 考 文 献

- 1 王关林. 载体构建中常用的选择标记及报告基因[M]. 植物基因工程原理与技术, 北京: 中国科学出版社, 1998, 6: 168—188.
- 2 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社 1994, 123—124, 125.
- 3 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995, 266—286.
- 4 钱迎倩, 田彦, 魏伟, 等. 转基因植物的生态风险评价[J]. 植物生态学报, 1998 No. 4.
- 5 J. P. NappJ, Bijvoet, W. J. Stiekema 转基因植物中的卡那霉素抗性[J]. 生物技术通报, 1998, NO. 1.
- 6 李俊兰. 卡那霉素对棉花下胚轴愈伤组织生长的影响[J]. 棉花学报, 1997 9(4): 209—212.
- 7 Sell Jun. Agrobacterium—mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage[J]. Plant Cell Report, 1995, 14: 620—625.
- 8 刘勋甲, 尹艳, 郑用琰. 遗传标记的发展及分子标记在农作物遗传育种中的运用[J]. II 分子标记在农作物遗传育种中的运用及原理[J]. 湖北农业科学, 1998 3, 10.

STUDY ON CRITICAL AND SCREEN SOYBEAN GROW OF KANAMYCIN

YuanYing Liu Depu Wang Yumin Zheng Peihe

(Jilin Province Key Open Labor On Agora—Biotechnology, Gongzhuling 136100)

Abstract The effects of kanamycin on seed germination, growth of cotyledon, rooting of shoots were investigated using 3 soybean varieties. The results showed that the effect of kanamycin on different explants varied significantly. The critical concentration was 1000ppm. When soybeans seeds were soaked with kanamycin solution where as the critical concentration was 50—100ppm, when soybeans were inoculated on media added kanamycin. For cotyledon node, the certain concentration of kanamycin was 100ppm. None of shoot tips and shoots regenerated from cotyledon culture could root even in the media with lowest concentration of kanamycin. The effect of kanamycin showed slight on different genotypes. The screening for critical concentration of kanamycin must be done before the screening of transformants.

Key words Soybean; Kanamycin; Screen; Restrain