

三种抗生素对丰水梨叶片不定芽再生的影响 及其对根癌农杆菌的抑菌效果

甘惠芳, 蔡斌华, 乔玉山, 佟兆国, 章 镇^①

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以丰水梨 (*Pyrus pyrifolia* 'Hosui') 离体叶片为实验材料, 研究了氨苄青霉素 (Amp)、羧苄青霉素 (Carb) 和头孢霉素 (Cef) 对丰水梨叶片不定芽再生的影响及其对根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的抑菌效果。结果表明, 在 100~500 mg·L⁻¹ 浓度范围内, 3 种抗生素对丰水梨叶片愈伤组织诱导均无显著影响。Amp、Carb 和 Cef 抑制丰水梨叶片不定芽再生的起始浓度分别为 100、200 和 200 mg·L⁻¹; 当浓度高达 500 mg·L⁻¹ 时, Amp、Carb 和 Cef 均极显著地抑制叶片不定芽再生。除 500 mg·L⁻¹ Cef 处理组外, 不同浓度 Amp、Carb 和 Cef 对丰水梨每个外植体的再生不定芽数没有显著影响。与对照相比, 在 100~500 mg·L⁻¹ 浓度范围内, 3 种抗生素均对根癌农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 有显著的抑制作用, 且对菌株 EHA105 的抑制效果强于菌株 LBA4404。研究结果显示, 在丰水梨遗传转化体系中, 可以选择 300 mg·L⁻¹ 的 Amp 和 Cef 作为理想的杀菌剂。

关键词: 丰水梨; 抗生素; 不定芽再生; 抑菌作用

中图分类号: S661.203.2; Q943.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)01-0057-04

Effects of three antibiotics on regeneration of adventitious buds from *Pyrus pyrifolia* 'Hosui' leaf and inhibition to *Agrobacterium tumefaciens* GAN Hui-fang, CAI Bin-hua, QIAO Yu-shan, TONG Zhao-guo, ZHANG Zhen^① (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(1): 57-60, 79

Abstract: Effects of ampicillin, carbenicillin and cefotaxime on regeneration of adventitious buds from *Pyrus pyrifolia* 'Hosui' leaf and inhibition of the three antibiotics to *Agrobacterium tumefaciens* were studied with *in vitro* leaves of *P. pyrifolia* 'Hosui'. The results show that the three antibiotics (100-500 mg·L⁻¹) have no significant effect on callus induction of the leaves. Adventitious bud regeneration starts to be restrained at 100 mg·L⁻¹ of ampicillin and 200 mg·L⁻¹ of carbenicillin or cefotaxime. When the concentrations of the three antibiotics are up to 500 mg·L⁻¹, the regeneration of adventitious buds are extremely significantly inhibited. Ampicillin, carbenicillin and cefotaxime with different concentrations have no significant effects on the regenerated adventitious bud number per explant except 500 mg·L⁻¹ cefotaxime. Contrast to the control, reproduction of *A. tumefaciens* LBA4404 and EHA105 strains is significantly inhibited by the three antibiotics at 100-500 mg·L⁻¹, and the inhibition to EHA105 is better than that to LBA4404. It is concluded that 300 mg·L⁻¹ ampicillin and cefotaxime are ideal bactericides for *P. pyrifolia* 'Hosui' genetic transformation system.

Key words: *Pyrus pyrifolia* 'Hosui'; antibiotic; adventitious bud regeneration; bactericidal effect

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的植物遗传转化方法是最有效、应用面最广的方法之

一^[1]。抗生素不仅对根癌农杆菌有杀伤或抑菌作用, 对植物细胞的生长、分裂和分化也具有一定的抑

收稿日期: 2008-03-31

基金项目: 江苏省高新技术项目 (BG2006313)

作者简介: 甘惠芳 (1984—), 女, 四川邻水人, 硕士研究生, 主要从事园艺植物组织培养方面研究工作。

^①通讯作者 E-mail: zhangzhen_nj@hotmail.com

制作用,且对不同根癌农杆菌、不同植物以及不同外植物的生物效应差异较大^[2-6],因而,对杀菌抗生素种类和浓度的选择将直接影响植物遗传转化的成败。目前,采用农杆菌介导法进行梨属(*Pyrus* L.)植物的转基因研究在国外已有成功报道^[7-10],且诸多研究表明,植物基因型与抗生素的种类和浓度密切相关。近年来,国内研究者也相继展开了这方面的研究^[11-13],但不同抗生素对砂梨[*P. pyrifolia* (Burm. f.) Nakai]品种丰水梨(*P. pyrifolia* 'Hosui')叶片再生影响的研究尚未见报道。砂梨在加工和切割过程中普遍存在褐变问题,给果农和果商带来巨大的经济损失。通过转基因方法培育抗褐变品种是解决这一问题的有效途径之一。

在前期建立丰水梨离体叶片不定芽再生体系的基础上^[14],作者选择了氨基青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)和头孢霉素(Cef)3种常用抗生素,探讨它们在遗传转化过程中对丰水梨离体叶片不定芽诱导的影响及其对根癌农杆菌的抑菌效果,为丰水梨遗传转化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2006年至2007年在本校园艺学院果树生物技术实验室进行。根癌农杆菌菌株为LBA4404(Rif^r+Cmr^r)和EHA105(Rif^r+Kmr^r)。供试丰水梨离体叶片来源于本实验室保存的无菌苗。氨基青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)和头孢霉素(Cef)购自荷兰Duchefa Biochemie公司,利福平(Rif)、氯霉素(Cm)和卡那霉素(Km)购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 抗生素对叶片不定芽再生影响的实验方法
叶片不定芽再生培养基为添加了 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 的NN69培养基(pH 5.8,含 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂),设置Amp、Carb和Cef的浓度分别为100、200、300、400和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,过滤灭菌后,添加至叶片不定芽再生培养基中。以不含抗生素($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的叶片不定芽再生培养基为对照。

从苗龄20~30 d的丰水梨试管苗上剪取顶部幼嫩平展的叶片,用无菌刀垂直于叶中脉横切2刀,使叶块远轴面接触培养基,将叶块接种在有上述培养

基的培养皿中,每个培养皿($850 \text{ mm} \times 180 \text{ mm}$,含25 mL培养基)接种20个叶块,每处理接种4个培养皿(4次重复)。于 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下暗培养,21 d后统计愈伤组织诱导率。然后移至温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照度 4800 lx 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的条件下培养,7周后统计不定芽再生率和每叶片的再生芽数。

1.2.2 抑菌效果的测定方法
设置Amp、Carb和Cef浓度分别为100、300和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),过滤灭菌后,分别添加至含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif的10 mL YEB液体培养基中,以不含抗生素的YEB液体培养基为对照。将单克隆的根癌农杆菌菌株LBA4404接种于含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cm的上述培养基中,单克隆的根癌农杆菌菌株EHA105接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km的上述培养基中,每处理重复4次。于 28°C 、黑暗条件下、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养16 h后,用754型紫外分光光度计测定菌液的 OD_{600} 值。

1.3 数据处理

利用Excel数据分析软件进行单因素方差分析,并采用邓肯氏新复极差法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 抗生素对丰水梨叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响

氨基青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)和头孢霉素(Cef)对丰水梨叶片愈伤组织诱导率的影响见表1。与对照相比,在叶片不定芽基本培养基中添加 $100 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp、Carb和Cef,对丰水梨叶片愈伤组织诱导率均没有明显影响,因此,在愈伤组织培养阶段,在培养基中可以添加的抗生素种类选择范围较广,且在 $0 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内丰水梨叶片愈伤组织对抗生素的反应较不敏感。

由表1还可以看出,低浓度($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Amp对丰水梨叶片不定芽再生有显著的抑制作用($P < 0.05$),不定芽再生率下降至75.84%; $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carb和Cef对叶片不定芽再生的抑制作用不显著($P > 0.05$)。随浓度的提高,3种抗生素对丰水梨叶片不定芽再生的抑制作用逐渐增强,在 $200 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,3个处理组的不定芽再生率均与对照有极显著差异($P < 0.01$)。当浓度达 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Carb和Cef几乎完全抑制叶片不定芽的再生,叶片不定芽再生率分别仅为5.70%和

4.17%; Amp 则明显抑制叶片不定芽的再生,使不定芽再生率下降至 32.78%。当 Amp 浓度为 100~300 mg·L⁻¹、Cef 浓度为 200~400 mg·L⁻¹时,叶片不定芽再生率分别为 75.84%~62.94% 和 56.58%~43.26%,各浓度处理组对不定芽再生率的影响差异不显著;而在 200~500 mg·L⁻¹浓度范围内,不同浓度的 Carb 处理组对不定芽再生的抑制作用有极显著差异($P < 0.01$)。此外,除 500 mg·L⁻¹ Cef 处理能极显著降低每个外植体的再生不定芽数外($P < 0.01$),与对照相比,其他处理组对每个外植体的再生不定芽数均无明显影响。

表1 氨苄青霉素、羧苄青霉素和头孢霉素对丰水梨叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响¹⁾

Table 1 Effects of ampicillin, carbenicillin and cefotaxime on callus induction and adventitious bud regeneration of *Pyrus pyrifolia* 'Hosui' leaf¹⁾

抗生素浓度/mg·L ⁻¹ Conc. of antibiotic	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	不定芽再生率/% Regeneration rate of adventitious bud	每个外植体再生不定芽数 Number of adventitious bud per explant
氨苄青霉素 Ampicillin			
0	100.00aA	91.51aA	1.67aA
100	97.83aA	75.84bAB	1.69aA
200	97.55aA	68.31bB	1.62aA
300	97.78aA	62.94bB	1.89aA
400	95.06aA	38.50cC	1.53aA
500	97.71aA	32.78cC	1.41aA
羧苄青霉素 Carbenicillin			
0	97.50aA	91.51aA	1.67aA
100	100.00aA	87.50aA	1.97aA
200	100.00aA	31.25cC	1.61aA
300	97.50aA	51.25bB	2.04aA
400	100.00aA	18.73dCD	1.88aA
500	98.75aA	5.70eD	1.25aA
头孢霉素 Cefotaxime			
0	100.00aA	91.51aA	1.67aA
100	97.50aA	89.80aA	1.85aA
200	98.81aA	56.58bB	1.32aA
300	98.68aA	57.76bB	1.55aA
400	100.00aA	43.26bB	1.60aA
500	100.00aA	4.17cC	0.42bB

¹⁾ 同列中不同的大写字母和小写字母分别表示在 1% 和 5% 水平上差异显著(邓肯氏新复极差法) Different capitals and small letters in the same column indicate significant differences at 1% and 5% levels by Duncan's multiple range test, respectively.

2.2 抗生素对根癌农杆菌抑菌效果的比较

在添加了不同浓度 Amp、Carb 和 Cef 的 YEB 液体培养基中培养 16 h 后,根癌农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 菌液的 OD 值见表 2。由表 2 可见,在

100、300 和 500 mg·L⁻¹ 3 个浓度水平上, Amp、Carb 和 Cef 对菌株 LBA4404 和 EHA105 的抑菌效果均极显著高于对照($P < 0.01$),且总体上对 EHA105 菌株的抑制效果优于 LBA4404 菌株。对于 LBA4404 菌株,100 mg·L⁻¹ Amp、Carb 和 Cef 处理组的 OD 值分别是对照的 1/13、1/16 和 1/4,并随抗生素浓度的增加抑制效果越明显;浓度为 100 和 300 mg·L⁻¹ 时, Carb 和 Amp 的抑菌效果基本相近, Cef 的抑菌效果最差;浓度为 500 mg·L⁻¹ 时,3 种抗生素的抑菌效果无明显差异。对于 EHA105 菌株,当浓度为 100 mg·L⁻¹ 时, Carb 的抑菌作用最强, Amp 的抑菌作用次之, Cef 的抑菌作用最差;当浓度为 300 mg·L⁻¹ 时, Carb 的抑菌效果最强, Amp 与 Cef 的抑菌效果相近;当浓度为 500 mg·L⁻¹ 时,3 种抗生素对 EHA105 菌株的抑菌效果没有明显差异。

表2 氨苄青霉素、羧苄青霉素和头孢霉素对根癌农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 的抑菌效果比较¹⁾

Table 2 Comparison of bactericidal effect of ampicillin, carbenicillin and cefotaxime on strain LBA4404 and EHA105 of *Agrobacterium tumefaciens*¹⁾

抗生素浓度/mg·L ⁻¹ Conc. of antibiotic	不同菌株菌液的 OD 值 OD value of bacterial liquid of different strains	
	LBA4404	EHA105
0(CK)	0.442aA	1.064aA
氨苄青霉素 Ampicillin		
100	0.034dD	0.083cC
300	0.026eD	0.076deCD
500	0.005fE	0.005fE
羧苄青霉素 Carbenicillin		
100	0.028deD	0.079cdCD
300	0.025eD	0.010fE
500	0.004fE	0.007fE
头孢霉素 Cefotaxime		
100	0.111bB	0.104bB
300	0.096cC	0.072eD
500	0.010fE	0.005fE

¹⁾ 同列中不同的大写字母和小写字母分别表示在 1% 和 5% 水平上差异显著(邓肯氏新复极差法) Different capitals and small letters in the same column indicate significant differences at 1% and 5% levels by Duncan's multiple range test, respectively.

3 讨 论

氨苄青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Carb)和头孢霉素(Cef)是根癌农杆菌介导的遗传转化中广泛使用的杀菌剂,它们能以较低的副作用来抑制细菌细胞壁的合成^[3]。这 3 种抗生素对大多数菌株具有较好的杀菌效果,但因植物种类及品种不同对植株同

一组织的再生产不同的效果^[4-6]。本文的结果显示,100~500 mg·L⁻¹的 Amp、Carb 和 Cef 均不影响丰水梨叶片愈伤组织的诱导。但刘淑芳等^[12-13]的研究表明,浓度高于 300 mg·L⁻¹的 Carb 显著抑制巴梨(*Pyrus communis* 'Bartlett')和身不知梨(*P. pyrifolia* 'Shenbuzhi')叶片愈伤组织的诱导,浓度低于 50 mg·L⁻¹的 Carb 显著抑制考密斯梨(*P. communis* 'Comice')叶片愈伤组织的诱导。表明对于不同种类及不同品种梨属植物而言,在叶片愈伤组织诱导过程中,抗生素的作用有一定的差异。

国外有研究报道,500 mg·L⁻¹ Cef 和 250~1 000 mg·L⁻¹ Carb 能抑制金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、白云杉[*Picea glauca* (Moench) Voss.]、西洋梨(*Pyrus communis* L.)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)和小麦(*Triticum aestivum* L.)等种类的组织再生^[15-20],且 500 mg·L⁻¹ Cef 对胡萝卜(*Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm.)^[21]和海棠(*Malus* spp.)^[3,22]的组织再生也有影响。本文的研究结果表明,Carb 和 Cef 浓度越高,对丰水梨叶片不定芽再生的抑制作用越明显,浓度在 100 mg·L⁻¹时的抑制作用不明显,浓度为 500 mg·L⁻¹时几乎完全抑制叶片不定芽再生,这与国内外多数学者的研究结果一致。

国内学者对梨叶片再生的研究结果表明,抗生素种类和浓度的选择直接影响砂梨和西洋梨叶片的再生^[11-12]。刘淑芳等^[12-13]认为,梨对 Carb 很敏感,对 Amp 较不敏感;浓度在 200 mg·L⁻¹以上的 Carb 显著抑制巴梨和身不知梨叶片不定芽再生,200 mg·L⁻¹ Carb 完全抑制考密斯梨叶片不定芽的再生;Amp 浓度低于 500 mg·L⁻¹,对巴梨叶片不定芽再生率的影响不大,且仅使身不知梨叶片不定芽再生率较对照有一定程度的下降。本文的研究结果也显示,Amp 对丰水梨叶片不定芽再生的影响较小,而 Carb 对丰水梨叶片不定芽再生影响显著。

刘淑芳等报道^[13],Amp 浓度超过 300 mg·L⁻¹、Carb 浓度超过 100 mg·L⁻¹,均对考密斯梨每叶片的再生芽数有极显著影响,但在 100~500 mg·L⁻¹浓度范围内,Cef 的影响不显著。本文的结果显示,浓度为 100~500 mg·L⁻¹的 Amp 和 Carb 均不影响丰水梨每个外植体的再生不定芽数,只有当浓度高于 400 mg·L⁻¹时,Cef 才对每个外植体的再生不定芽数有极显著影响。愈伤组织诱导率、不定芽再生

率和每个外植体再生不定芽数 3 个指标均表明,抗生素对梨叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响因种类和品种的不同而异,与植物基因型有关。

Amp、Carb 和 Cef 对根癌农杆菌菌株 LBA4404 和 EHA105 抑菌效果的研究结果显示,抗生素对根癌农杆菌的抑菌效果与抗生素的种类、浓度和根癌农杆菌菌株的不同等因素有关。在未添加抗生素的常规培养液中,菌株 EHA105 菌液的 OD 值极显著高于 LBA4404 菌液,表明菌株 EHA105 的繁殖力高于菌株 LBA4404,这可能是抗生素对 EHA105 抑菌作用高于 LBA4404 的原因之一。由于根癌农杆菌繁殖能力越强,脱菌难度越大,在遗传转化过程中需要添加的抗生素浓度也要相应增加^[2],因此,在实际应用过程中,要从抗生素和菌株等多方面综合考虑,建立适宜的植物遗传转化体系。

综合 3 种抗生素对丰水梨叶片不定芽再生的影响和对根癌农杆菌的抑菌效果,作者认为,在丰水梨遗传转化体系中,可以选择 300 mg·L⁻¹的 Amp 和 Cef 作为理想的杀菌剂。

参考文献:

- [1] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1985, 227: 1229-1231.
- [2] Lin J J, Assad-Garcia N, Kuo J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells[J]. *Plant Science*, 1995, 109(2): 171-177.
- [3] Yepes L M, Aldwinckle H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, 37(3): 257-269.
- [4] 王萍,吴疑,何娜,等. 抗生素对农杆菌抑制的效果和大豆外植体诱导的影响[J]. *东北师大学报:自然科学版*, 2000, 32(遗传学专辑): 39-42.
- [5] 张献龙,李涛,孙济中. 抗生素对棉花愈伤组织诱导和生长的影响[J]. *华中农业大学学报*, 1996, 15(2): 123-126.
- [6] 王勇,陈爱玉,夏至松,等. 抗生素对桑树外植体生长与分化的影响[J]. *蚕业科学*, 1996, 22(2): 72-76.
- [7] Mourgues F, Chevreau E, Lambert C, et al. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.)[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 16: 245-249.
- [8] Matsuda N, Gao M, Isuzugawa K, et al. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communis* L.) with leaf-section and axillary shoot-meristem explants[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 45-51.