

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201512019

耿天龙, 李佛生, 于敏, 等. 不同抗生素对金发草愈伤组织生长分化的影响 [J]. 广西植物, 2016, 36(10):1238-1244

GENG TL, LI FS, YU M, et al. Effects of different antibiotics on callus differentiation and growth of *Pogonatherum paniceum* [J]. *Guihaia*, 2016, 36(10): 1238-1244

不同抗生素对金发草愈伤组织生长分化的影响

耿天龙, 李佛生, 于敏, 罗枫雪, 唐琳, 王胜华*

(四川大学 生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 该研究以金发草愈伤组织为材料, 通过分析比较不同抗生素种类(卡那霉素、潮霉素、头孢噻吩钠和氨苄青霉素)和浓度对金发草愈伤组织生长分化的影响, 来确定适用于金发草遗传转化体系中的抗性筛选剂和抑菌剂。结果表明:(1)金发草愈伤组织对卡那霉素很敏感, 且其分化率随着卡那霉素浓度的增加显著减少($P=0.01$)。当卡那霉素浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 金发草愈伤组织的生长分化受到明显抑制, 且有大量的白化苗形成, 但分化率仍有 36.56%; 当卡那霉素浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 金发草愈伤组织的分化率为 11.94%, 只有很少部分的愈伤分化出绿色的丛生苗; 当卡那霉素浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 金发草愈伤组织基本褐化死亡, 分化率仅为 2.26%。因此, 浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素适合作为金发草遗传转化体系中的抗性筛选剂。(2)金发草愈伤组织对潮霉素的敏感性要比卡那霉素弱, 且潮霉素对金发草愈伤组织分化率的影响小, 但毒害作用大。因此, 潮霉素不适合作为金发草遗传转化体系中的抗性筛选剂。(3) $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢霉素和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化影响很小且能有效抑制杂菌的生长, 较高浓度的氨苄青霉素对金发草愈伤组织的抑制作用不太明显。因此, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢霉素和较高浓度的氨苄青霉素均可作为金发草遗传转化体系中的抑菌剂。该研究确定了适用于农杆菌介导的金发草遗传转化体系中的抗性筛选剂和抑菌剂, 为金发草的遗传改良及功能性基因的研究奠定了基础。

关键词: 金发草, 愈伤组织, 抗生素, 遗传转化, 抗性筛选剂, 抑菌剂

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)10-1238-08

Effects of different antibiotics on callus differentiation and growth of *Pogonatherum paniceum*

GENG Tian-Long, LI Fo-Sheng, YU Min, LUO Feng-Xue, TANG Lin, WANG Sheng-Hua*

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In the study, *Pogonatherum paniceum* calluses were selected as the experimental materials, and the effects of different kinds of antibiotics (kanamycin, hygromycin, ceftiofur sodium and ampicillin) and its concentrations to the growth and differentiations of *P. paniceum* calluses were compared and analysed in order to find out the suitable resistance selection agent and antibacterial agent in genetic transformation system of *P. paniceum*, respectively. The results were as follows: (1) *P. paniceum* callus had a strong sensitivity to kanamycin and the differentiation rate significantly decreased as the concentration of kanamycin increased ($P=0.01$). When the concentration of kanamycin was $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the growth and differentiation of *P. paniceum* callus were significantly suppressed and differentiated a large number

收稿日期: 2016-02-01 修回日期: 2016-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(31270360) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270360)].

作者简介: 耿天龙(1988-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学研究, (E-mail) tianlong_geng@126.com。

*通讯作者: 王胜华, 博士, 教授, 主要从事植物生殖与发育等研究, (E-mail) shwang200@aliyun.com.cn。

of whiten seedlings, but the differentiation rate was still at 36.56%. When the concentration of kanamycin was $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, differentiation rate of *P. paniceum* callus was at 11.94%, and only part of calluses were differentiated into green seedlings. However, when the concentration of kanamycin was $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, *P. paniceum* callus almost turn brown or dead, and the differentiation rate was only at 2.26%. Hence, $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of kanamycin was fit for serving as the resistance selection agent in genetic transformation system of *P. paniceum*. (2) *P. paniceum* callus had a less strong sensitivity to hygromycin than kanamycin. The effects of hygromycin on differentiation rate of *P. paniceum* callus was very small, but the toxicity was big, so hygromycin was not suitable as the resistance selection agent in genetic transformation system of *P. paniceum*. (3) $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of ceftiofur sodium and ampicillin had a little effect on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus, and all were able to inhibit the bacteria effectively. Moreover, the inhibition of little higher level of ampicillin to the growth and differentiation of *P. paniceum* callus was less obvious. Therefore, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of ceftiofur sodium and little higher level of ampicillin could be used as the antibacterial agent in genetic transformation system of *P. paniceum* as well. This study found out the suitable kinds and concentration of antibiotics served as the resistance selection agent and the antibacterial agent in *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation system of *P. paniceum*, respectively, which provides the reference for studying genetic improvement and functional genes of *P. paniceum*.

Key words: *Pogonatherum paniceum*, callus, antibiotics, genetic transformation, resistance selection agent, antibacterial agent

在农杆菌介导的植物基因遗传转化体系中, 抗生素是必不可少的, 且根据其功能不同主要分为抗性筛选剂和抑菌剂两类(郑进等, 2006)。抗性筛选剂是用于淘汰未转化成功的植株, 而转化成功植株又不受影响的一类抗生素(谭伟等, 2008)。抑菌剂是在农杆菌侵染之后, 能及时有效地杀死或抑制植物受体材料上多余的农杆菌和杂菌, 防止其危害植物受体材料并影响植株再生的一类抗生素(徐淑红和徐香玲, 2004)。然而, 不同植物受体材料对抗生素敏感程度和毒害耐受程度均不同, 每种植物受体材料都有它适合的抗生素种类和用量(郑进等, 2006; 李文兰等, 2010; 茆永萍等, 2012; 唐亚萍等, 2012; 高行英等, 2013; 于永明等, 2014)。因此, 在建立植物农杆菌介导的遗传转化体系之前, 必须进行抗生素的敏感性试验, 以筛选出合适的抗生素种类和浓度作为遗传转化体系的抗性筛选剂和抑菌剂。

植物转基因中常用抗性筛选基因有 *npt II* 基因、*aph(4)-I* 基因和 *spec* 基因等。其中, *npt II* 基因转入植物基因组后通过编码新霉素磷酸转移酶, 使转化植株具有抗卡那霉素、新霉素和 G418 等抗性; *aph(4)-I* 基因转入植株之后具有抗潮霉素的抗性(王相春等, 2011)。常用的抑菌剂主要有头孢噻唑钠类、青霉素类和大环内脂类(徐淑红和徐香玲, 2004)。其中, 最常用的头孢噻唑钠和氨苄青霉素分别为头孢噻唑钠类和青霉素类。虽然各种抑菌剂对细菌的作用机理不尽相同, 但头孢噻唑钠类抗生素的化学结构与青霉素类不同之处在于母核 7-氨

基头孢烷酸(7-ACA)取代了 6-氨基青霉烷酸, 所以两者对细菌的作用机理相似(郑进等, 2006)。

金发草(*Pogonatherum paniceum*)是一种多年生禾本科岩生草本植物, 广泛分布于亚洲的温带、热带和亚热带地区, 大洋洲及非洲等地区, 以及我国的西南、南部地区和台湾等(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1997)。金发草根系发达, 抗旱耐瘠, 可在风化岩石、滑坡、裸地等恶劣的生态环境中生长并形成草坪, 是一种许多逆境生态恢复的先锋物种, 在水土保持、生态护坡方面有着较好的应用前景(王海洋等, 2005; 王文国等, 2010)。金发草秆质坚硬, 外形酷似小竹, 节上生根, 自然形态优美, 可作为园林绿化植物(王海洋等, 2005)。金发草不同外植体(茎、叶、种子等)的再生体系已经建立, 其愈伤组织诱导率与再生率高达 100%(Wang et al, 2006, 2007)。然而, 不同抗生素对金发草愈伤组织生长分化的影响还未有相关报道, 且对其遗传转化体系的建立至关重要。因此, 本研究以金发草愈伤组织为材料, 综合分析比较卡那霉素/潮霉素/头孢噻唑钠和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响, 以期确定适用于农杆菌介导的金发草遗传转化体系中的抗性筛选剂和抑菌剂。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

金发草种子采自四川省遂宁市。挑选饱满成熟

表1 卡那霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

Table 1 Effects of different concentrations of Kanamycin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus

卡那霉素浓度 Concentration of Kanamycin (mg · L ⁻¹)	分化率 Differentiation rate (%)	愈伤组织生长分化情况 Growth and differentiation condition of callus
0	95 ± 4.80A	愈伤组织生长良好,且分化出大量丛生苗 Calluses grew well, and differentiated into a large number of seedlings
5.0	77.8 ± 3.42B	分化出丛生苗的愈伤组织生长较好,但部分愈伤块未分化出丛生苗,或出现小部分的白化苗 Calluses differentiated into seedlings grew well, but part of calluses could not differentiated into seedlings, or came out some albino plantlets
10.0	36.56 ± 3.11C	愈伤组织生长受抑制大小约为对照的1/2,且生长的丛生苗大部分均为白化苗 Half of calluses' growth was inhibited, and most of differentiated seedlings were albino plantlets
15.0	11.94 ± 2.94D	只有很小部分的愈伤分化出绿色的丛生苗,其余褐化或分化出小丛的白化苗 Only small part of calluses differentiated seedlings, others died or differentiated albino plantlets
20.0	2.26 ± 1.26E	每瓶中大约1~3颗分化出黄绿色丛生苗,其余愈伤组织块基本褐化死亡 About 1-3 calluses differentiated seedlings in a bottle, the others were all dead
30.0	0.20 ± 0.50F	愈伤组织几乎全部褐化死亡 Almost calluses were dead

注:分化率数据用平均值 ± 标准差表示,且数据后的不同大写字母表示处理间在0.01水平有显著差异。下同。

Note: Data of differentiation rate are expressed as mean ± SD, and the different uppercase letters behind the data represent significant differences among treatments at the level of 0.01. The same below.

的种子,20%次氯酸钠浸泡15 min后,无菌水冲洗3~5次,接种于诱导培养基,诱导出愈伤组织;然后将愈伤组织块转入继代培养基中,两周继代一次,挑取白色或黄白色多瘤状胚性愈伤组织,作为实验材料。诱导愈伤及继代培养都是在(26 ± 1)℃暗条件下进行(Wang et al,2006,2007)。

1.2 试剂与培养基

卡那霉素、潮霉素、头孢噻唑钠和氨苄青霉素均购自于SIGMA公司;诱导及继代培养基为MS+NAA 2 mg · L⁻¹+2,4-D 1 mg · L⁻¹+3%蔗糖+0.8%琼脂粉(pH5.8);分化培养基为MS+3%蔗糖+0.8%琼脂粉+不同浓度和种类的抗生素(pH 5.8)。

表2 潮霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of Hygromycin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus

潮霉素浓度 Concentration of Hygromycin (mg · L ⁻¹)	分化率(%) Differentiation rate	愈伤组织生长分化情况 Growth and differentiation condition of the callus
10.0	95.25 ± 3.86A	大部分愈伤分化出大量丛生苗,但与对照相比,丛生苗较小 Most of calluses differentiated into seedlings, but the seedlings were smaller than that of ck
20.0	88.25 ± 3.10B	分化出丛生苗的愈伤生长较好,每瓶仅2~3块愈伤褐化死亡或白化 Calli differentiated seedlings grew well, only 2-3 calluses were dead or albino per bottle
30.0	71.25 ± 2.99C	大部分愈伤块分化出丛生苗,但分化出的丛生苗很小,愈伤组织生长缓慢。分化出丛生苗的愈伤块约有一半的面积被褐化死亡 Most of calluses differentiated into seedlings, but small and grew slowly. About half area of each differentiated calluses were dead
50.0	65.5 ± 2.52C	在分化出的丛生苗的愈伤面积中约70%~80%被褐化,而且分化出的丛生苗极小 About 70%-80% area of each differentiated calli were dead, and the differentiated seedlings were very small
100.0	20.25 ± 2.16E	大部分愈伤死亡,而存活的愈伤块表面变绿,却未能观察到丛生的小苗 Most of calluses were dead, and the survival calluses turned into green but no seedlings were observed

1.3 实验方法

将生长良好的愈伤组织分别放入含不同浓度和种类抗生素的分化培养基中培养,如5、10、15、20、30、50 mg · L⁻¹的卡那霉素,10、20、30、50、100 mg · L⁻¹的潮霉素,300、500、1 000 mg · L⁻¹的头孢噻唑钠和500、1 000 mg · L⁻¹的氨苄青霉素。每瓶大约30块愈伤组织,重复四次,以未添加抗生素的分化培养基为对照。培养条件为(25 ± 1)℃,2 000 lx光照12 h/d。3周后观察不同抗生素及其浓度对金发草愈伤组织生长和诱导丛生芽的抑制作用,拍照,记录数据并分析。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

表1显示,金发草愈伤组织对卡那霉素的敏感性很强。当卡那霉素浓度为10mg · L⁻¹时,金发草

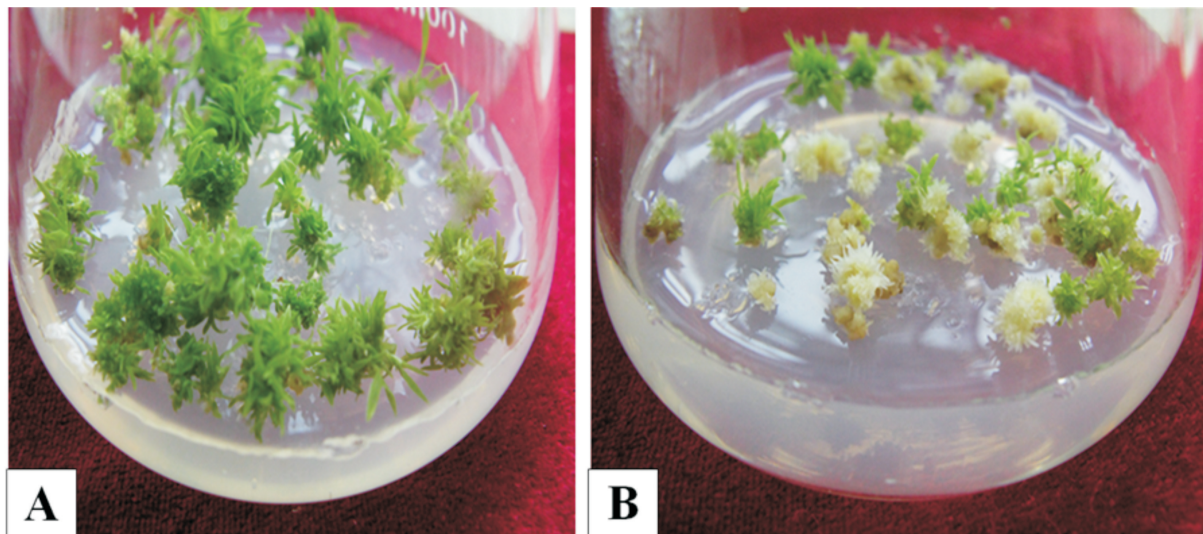


图 1 卡那霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响 A. 对照,未加卡那霉素; B. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素。

Fig. 1 Effects of Kanamycin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus A. CK, no antibiotics; B. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kanamycin.

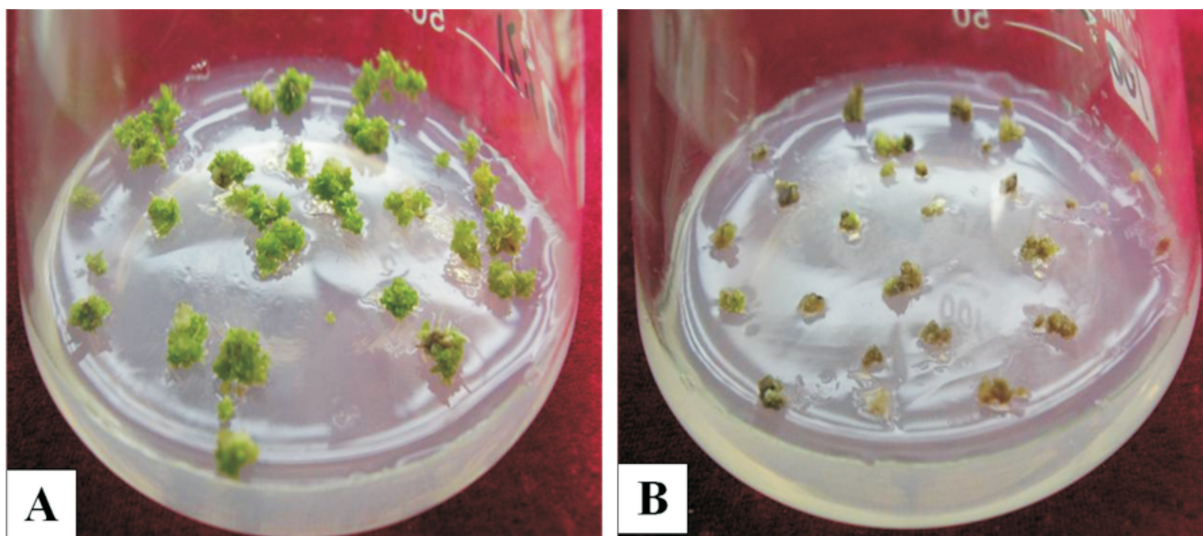


图 2 潮霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响 A. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素; B. $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素。

Fig. 2 Effects of Hygromycin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus

A. $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hygromycin; B. $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hygromycin.

愈伤组织的生长和分化受到明显抑制,并出现大量白化苗(图 1),但分化率仍有 36.56%。当卡那霉素浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,金发草愈伤组织的分化率为 11.94%,只有很小部分的愈伤分化出绿色的丛生苗。然而,当卡那霉素浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,金发草愈伤组织基本褐化死亡,分化率也只有 2.26%。因此, $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素浓度适合作为金发草遗

传转化体系中的抗性筛选剂。

2.2 潮霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

由表 2 可知,金发草愈伤组织对潮霉素的敏感程度比卡那霉素弱,但毒害作用大。与 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素相比, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素几乎不影响金发草愈伤组织的分化,其分化率仍可达到 95.25%,但分化出来的丛生苗较小(表 2,图 2:A)。当潮霉素

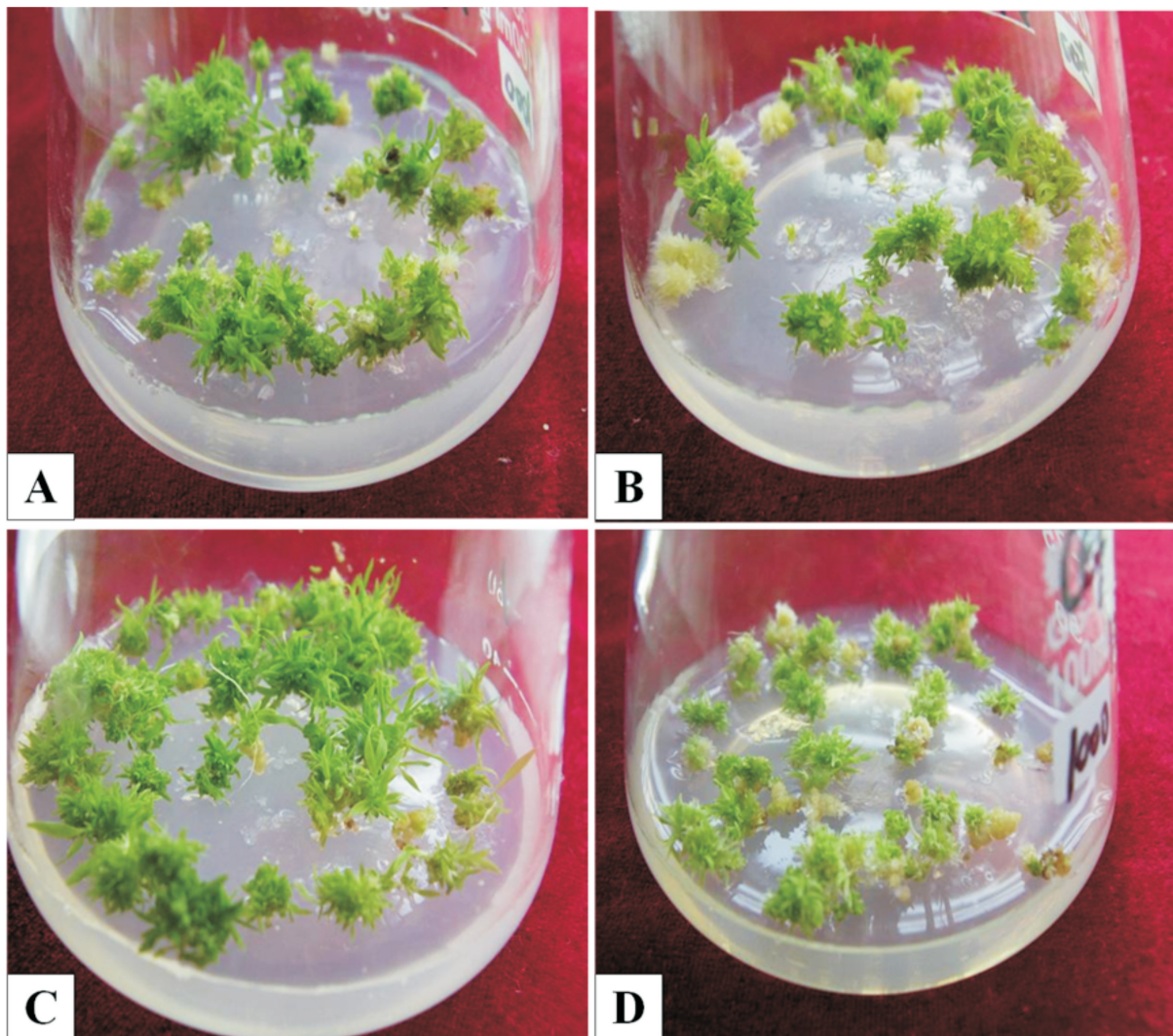


图 3 头孢噻呋钠和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响 A. $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢噻呋钠;
B. $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢噻呋钠; C. $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素; D. $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素。

Fig. 3 Effects of different concentration of Cefitofur sodium and Ampicillin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus A. $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cefitofur sodium; B. $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cefitofur sodium; C. $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ampicillin; D. $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ampicillin.

浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 仍有超过一半的愈伤组织可以分化出丛生苗, 只是在分化出的丛生苗的愈伤面积中有 $70\% \sim 80\%$ 被褐化, 而且分化出的丛生苗极小。另外, 当潮霉素浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大部分愈伤死亡, 而存活的愈伤块表面变绿, 说明仍有愈伤组织分化, 分化率为 20.25% , 只是未能观察到丛生的小苗(图 2:B)。这说明潮霉素比卡那霉素对愈伤组织分化率的影响较小, 但毒害作用更大, 主要导致愈伤组织的褐化或死亡, 很少有白化现象。因此, 潮霉素不适合作为金发草愈伤组织遗传转化体系中的抗性筛选剂。

2.3 头孢噻呋钠和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

本研究中, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢噻呋钠对金发草愈伤组织分化影响很小, 分化出来的丛生苗生长良好(图 3:A)。然而, 当头孢噻呋钠浓度达到 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 约一半的愈伤被抑制生长, 且分化出的小苗颜色发黄且有白化现象(图 3:B)。这说明高浓度的头孢噻呋钠对金发草愈伤组织有一定的毒害作用。因此, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢噻呋钠可以作为金发草遗传转化体系中的抑菌剂。

与头孢噻呋钠相比, 氨苄青霉素对金发草愈伤

表 3 头孢噻吩钠和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响

Table 3 Effects of different concentration of Ceftiofur sodium and Ampicillin on the growth and differentiation of *P. paniceum* callus

抗生素浓度 Concentration of antibiotics ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	分化率 Differentiation rate (%)	愈伤组织生长分化情况 Growth and differentiation condition of the callus
Cef(300)	90±5.10AB	极少量愈伤未分化,分化出的丛生苗生长良好 Very little calluses were undifferentiated, and the differentiated seedlings grew well
Cef(500)	71.25±2.22C	有小部分愈伤未分化,分化出的丛生苗生长良好 A small part of calluses was undifferentiated, and the differentiated seedlings grew well
Cef(1000)	56.75 ± 1.71D	约有一半的愈伤没有分化,且分化出的丛生苗颜色发黄或白化 About half of calluses were undifferentiated, and the seedlings were with yellow colour or albino
Amp(500)	95.25 ± 3.30A	极少量愈伤未分化,分化出的丛生苗生长良好 Very little calluses were undifferentiated, and the differentiated seedlings grew well
Amp(1000)	85.75 ± 2.87B	有少部分愈伤未分化,分化出的丛生苗较小,长势好 A small part of calluses was undifferentiated, and the differentiated seedlings were small but grew well

注: Cef 表示头孢噻吩钠, Amp 表示氨苄青霉素; 分化率数据用平均值±标准差表示, 且数据后的不同大写字母表示处理间在 0.01 水平有显著差异。

Note: Cef represents Ceftiofur sodium, Amp represents Ampicillin; Data of differentiation rate are expressed as mean ± SD, the different uppercases behind the data represent significant differences among treatments at the level of 0.01.

组织的抑制作用不太明显, 当氨苄青霉素浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对金发草愈伤组织的生长分化基本无影响, 分化出的丛生苗生长良好(表 3, 图 3:C)。当氨苄青霉素浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 仍有 85.75% 的分化率, 只是分化出的丛生苗较小但长势好, 此外氨苄青霉素也能有效抑制细菌生长。因此, 较高浓度的氨苄青霉素也可以作为金发草遗传转化体系中的抑菌剂。

3 讨论与结论

在农杆菌介导的植物高效遗传转化体系中, 选择合适的抗性筛选剂和抑菌剂是至关重要的(王关林和方宏笃, 2002)。然而, 所选择抗生素种类和浓度因植物受体材料的不同而有所差异。抗性筛选剂是与转化所用载体中的抗性基因有关, *npt II* 基因以其生物安全性好且易于筛选而广泛用于农杆菌介导的植物遗传转化研究中(王紫萱和易自力, 2003)。然而, 不同植物受体材料对卡那霉素的敏感程度不尽相同。如 Jin et al (2006) 在建立苜蓿愈伤组织的遗传转化体系时, 发现当使用 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素时, 转化频率达到最高。邢文超等(2006)发现薰衣草对卡那霉素很敏感; $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素导致薰衣草不能诱导出愈伤; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素致使薰衣草外植体黄化甚至死亡。常用的抗性筛选剂有卡那霉素和潮霉素。本研究发现卡那霉素和潮霉素对金发草愈伤组织均有较强的抑制作用, 但潮霉

素对金发草愈伤组织的毒害太大, 甚至直接褐化死亡。当潮霉素浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大部分愈伤死亡, 而存活的愈伤块表面变绿。这与老芒麦对潮霉素的敏感性相似(李达旭等, 2006)。因此, 选择卡那霉素作为金发草愈伤组织遗传转化体系中的抗性筛选剂。但抗性筛选剂的浓度不能太低也不能太高, 太低会产生过多的假阳性植株, 太高会对植物产生毒害(王关林和方宏笃, 2002, 王相春等, 2011)。因此, $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素适合作为金发草遗传转化的抗性筛选剂。

在农杆菌介导的植物遗传转化体系中, 外植体与农杆菌共培养之后, 需要清洗外植体上附着的农杆菌, 同时为抑制农杆菌的繁殖, 必须在筛选培养基中加入抑菌剂(徐淑红和徐香玲, 2004; Wu et al, 2005)。但是, 抑菌剂在对农杆菌生长起抑制作用的同时, 也会对植物受体材料的生长分化产生影响。因此, 有必要对抑菌剂进行敏感性实验, 以便找出抑菌效果好而对植物受体材料生长与分化的影响最小的抗生素并确定其适宜浓度。由于头孢噻吩钠与生长素 2,4-D 和 NAA 等有相类似的化学结构, 因此头孢噻吩钠在植物组织培养中具有激素效应, 低浓度能促进植物愈伤组织的分化与生长, 但浓度过大会对植物组织有一定的副作用(詹立平等, 2004)。本研究中发现高浓度的头孢噻吩钠($1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对金发草愈伤组织毒害较大, 会影响转基因植株的再生, 不适宜做抑菌剂。但是, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢噻吩钠能有效抑制农杆菌的生长且对金发草愈伤组织

影响很小。而且 Li et al(2015)发现 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的头孢噻唑钠能够有效抑制杂菌的生长,因此,可以作为金发草愈伤组织遗传的转化体系中的抑菌剂。与头孢噻唑钠相比,金发草愈伤对氨苄青霉素的敏感性较弱。当氨苄青霉素浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对金发草愈伤组织的生长分化基本无影响,分化生的丛生苗生长良好。这和吴关庭等(2005)的抗生素对高羊茅的研究结果一致。较高浓度的氨苄青霉素对金发草愈伤组织的影响也很小,可以作为金发草愈伤组织遗传转化体系中的抑菌剂。

总之,本研究比较分析了卡那霉素、潮霉素、头孢噻唑钠和氨苄青霉素对金发草愈伤组织生长分化的影响,成功确定了 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素适合作为金发草愈伤组织遗传转化体系中的抗性筛选剂; $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素和较高浓度的氨苄青霉素均适合作为金发草愈伤组织遗传转化体系中的抑菌剂。这为金发草的遗传改良及功能性基因的研究奠定了基础。

参考文献:

DENG J, YAN S, HOU P, et al, 2005. Effects of different antibiotics at various concentrations on culture of *Jatropha curcas* [J]. Chin J Appl Environ Biol, 11(2):156-159. [邓君萍, 颜双春, 侯佩, 等, 2005. 不同抗生素种类及浓度对麻疯树培养的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 11(2):156-159.]

FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE, 1997. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 10, No. 2 [M]. Beijing: Science Press; 102-104. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1997. 中国植物志(第十卷二分册) [M]. 北京: 科学出版社: 102-104.]

GAO X, LI M, WANG T, et al, 2013. Effects of different antibiotics on plant regeneration on Chinese Chive (*Allium tuberosum* Rottle) callus [J]. Mol Plant Breed, 11(4):559-565. [高行英, 李梅兰, 王婷婷, 等, 2013. 不同抗生素对韭菜根愈伤组织诱导及再生的影响 [J]. 分子植物育种, 11(4):559-565.]

JIN SM, GUAN QJ, LUO QX, et al, 2006. Study on high frequency regeneration and transformation system of Alfalfa from embryogenic callus [J]. Mol Plant Breed, 4(4):571-578.

LI DX, ZHANG J, ZHAO J, et al, 2006. Transformation of embryogenic calli of Siberian wildrye grass (*Elymus sibiricus* L. cv. Chuancuo No. 2) mediated by *Agrobacterium* [J]. J Plant Physiol Mol Biol, 32(1):45-51. [李达旭, 张杰, 赵建, 等, 2006. 根癌农杆菌介导转化川草二号老芒麦胚性愈伤组织 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 32(1):45-51.]

LI FS, LI MY, ZHAN C, et al, 2015. A reliable and high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of *Pogonatherum paniceum* embryogenic callus using GFP as a reporter gene [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 120(1):155-165.

LI W, LI H, SHENG X, 2010. Effects of different antibiotics on receptor system of *siraitia grosvenirii* genetic transformation [J]. Mol Plant Breed, 8(3):529-532. [李文兰, 李华英, 盛小伟, 2010. 不同抗生素对罗汉果遗传转化受体系统的影响

[J]. 分子植物育种, 8(3):529-532.]

LIN JJ, ASSADD-GARCIS N, KOU J, 1995. Plant hormone effect of antibiotics of the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells [J]. Plant Sci, 109:171-177.

MAO Y, DAI L, CHEN Q, et al, 2012. Sensitivity on leaf culture of petunia hybrida by different antibiotics [J]. J Anhui Agric Sci, 40(33):16096-16098. [茆永萍, 戴铃莺, 陈青建, 等, 2012. 不同抗生素对矮牵牛叶片培养的敏感性试验 [J]. 安徽农业科学, 40(33):16096-16098.]

TAN W, YANG JJ, PENG JH, et al, 2008. Application of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation methods in the monocotyledons [J]. Plant Physiol Comm, 44(3):557-562. [谭伟, 杨俊杰, 彭金环, 等, 2008. 根癌农杆菌介导法在禾本科植物遗传转化中的应用 [J]. 植物生理学报, 44(3):557-562.]

TANG Y, YUAN H, QIN J, 2012. Effects of different antibiotics on callus growth of *Saussurea involucrata* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 32(3):611-615. [唐亚萍, 原慧, 覃建兵, 2012. 不同抗生素对雪莲愈伤组织生长的影响 [J]. 西北植物学报, 32(3):611-615.]

WANG GL, FANG HD, 2002. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press. [王关林, 方宏笃, 2002. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社.]

WANG HY, PENG L, LI SC, et al, 2005. Growth characteristics of rock plant *Pogonatherum paniceum* [J]. Chin J Appl Ecol, 16(8):1432. [王海洋, 彭丽, 李绍才, 等, 2005. 岩生植物金发草生长特征研究 [J]. 应用生态学报, 16(8):1432.]

WANG WG, Li R, Wang SH, et al, 2010. GIS-Based analysis on suitable distribution area and habitat of *Pogonatherum paniceum*, a plant for soil and water conservation [J]. Soil Water Cons Chin, 6:33-35. [王文国, 李锐, 王胜华, 等, 2010. 基于 GIS 的水土保持植物金发草的适生区与生境分析 [J]. 中国水土保持, 6:33-35.]

WANG WG, WANG SH, WU XA, et al, 2007. High frequency plantlet regeneration from callus and artificial seed production of rock plant *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack (Poaceae) [J]. Sci Hortic, 113:196-201.

WANG WG, WANG SH, ZHUANG GQ, et al, 2006. *In vitro* rapid propagation of rock plant *Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack [J]. Plant Physiol Comm, 42(3):482. [王文国, 王胜华, 庄国庆, 等, 2006. 岩生植物金发草的离体快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 42(3):482.]

WANG X, CHENG Z, ZENG Q, et al, 2011. Advances in selection marker genes of plant transformation [J]. J Anhui Agric Sci, 39(22):13290-13291. [王相春, 程在全, 曾千春, 等, 2011. 植物筛选标记基因应用进展 [J]. 安徽农业科学, 39(22):13290-13291.]

WANG Z, YI Z, 2003. The application of Kanamycin in transgenic plants and the biosafety assessment of Kanr Gene [J]. Chin Biotechnol, 23(6):9-13. [王紫萱, 易自力, 2003. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价 [J]. 中国生物工程杂志, 23(6):9-13.]

WU GT, HU ZH, LANG CX, et al, 2005. The effects of antibiotics on growth and differentiation of embryogenic calli of tall fescue [J]. Acta Agric Nucl Sin, 19(2):88-91. [吴关庭, 胡张华, 郎春秀, 等, 2005. 抗生素对高羊茅胚性愈伤组织生长与分化的