

石文慧, 安然, 郭海霞, 等. 阿莫西林在农杆菌介导甘蓝型油菜遗传转化中的使用和优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(12): 58–62.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.013

# 阿莫西林在农杆菌介导甘蓝型油菜遗传转化中的使用和优化

石文慧<sup>1</sup>, 安然<sup>1</sup>, 郭海霞<sup>1</sup>, 张金文<sup>1,2,3</sup>, 王朋宝<sup>2,3</sup>, 曹智<sup>2,3</sup>, 王志伟<sup>2,3</sup>, 乔岩<sup>2,3</sup>

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃兰州 730070; 2. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃兰州 730070;

3. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070)

**摘要:**旨在寻找一种应用于农杆菌介导的甘蓝型油菜转化体系中能替代羧苄青霉素 (Carb) 和头孢霉素 (Cef) 的高效抗生素。以甘蓝型油菜杂交种青杂 5 号的恢复系“1831R”为试验材料, 对苗龄 4~5 d 的下胚轴进行侵染, 培养并观察抑菌效果、芽再生状况以及对转化效率的影响。结果表明, 较高浓度 (500~600 mg/L) 处理下, 4 种抗生素 [Carb、Cef、特美汀 (Tim)、阿莫西林 (Amo)] 都可以很好地抑制农杆菌的生长, 浓度低于 500 mg/L 时, 抑菌效果由大到小为 Carb > Amo > Cef > Tim。随着 4 种抗生素浓度的增加, 芽再生率呈先增加后降低趋势, 300 mg/L 时达到最大, 且在相同浓度下, 芽再生率由大到小为 Amo > Carb > Tim > Cef。经草甘膦抗性筛选及 PCR 检测, 转化体系中使用 Amo 的转化效率为 1.9%, 比 Carb、Cef 转化效率分别高 58.33%、90.00%。因此, 阿莫西林在有效脱除农杆菌的同时, 对芽再生的抑制作用最小, 并具有较高转化效率。本研究对提高农杆菌介导的油菜遗传转化效率、加快油菜种质资源创新将具有重要的作用和意义。

**关键词:**阿莫西林; 根癌农杆菌; 甘蓝型油菜; 遗传转化效率; 抗生素; 芽再生

**中图分类号:** S634.303.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0058-05

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 是重要的油料作物, 30 多年来油菜转基因研究得到了迅速发展, 以转基因技术为核心的生物技术被誉为第二次“绿色革命”。陈锦清等育成的高含油量转基因油菜超油 1 号、超油 2 号新品系是目前世界上含油量最高的甘蓝型油菜<sup>[1]</sup>。何业华等将 *Bt* 基因导入甘蓝型油菜湘油 13 号, 现已获得遗传稳定的抗虫油菜新品系<sup>[2]</sup>。但转化过程中, 植物组织与携带目的基因的根癌农杆菌共培养后, 往往难以抑制和脱除农杆菌, 使得外植体成活率下降, 愈伤诱导率和芽再生率降低, 转化效率偏低, 从而限制转基因技术的广泛利用, 影响油菜育种水平的提高和新基因的功能分析鉴定。因此, 为实现高效的遗传转化, 有必要找到一种高效抗生素, 在有效脱除农杆菌的同时, 减少对愈伤诱导和芽再生的抑制作用, 对于甘蓝型油菜遗传转化具有重要的应用价值。

农杆菌介导法已成为油菜等芸薹属植物基因转化中最常用的方法。目前为止, 已先后在甘蓝型油菜、白菜型油菜、芥菜等作物上实现了报告基因、抗除草剂基因、抗病虫基因、雄性不育基因、改良油菜成分和蛋白组分基因等的遗传转化。2004 年山西农业大学利用花粉介导法将 *GUS* 基因转入油菜, 其转化频率高达 2.8%, 逐步建立甘蓝型冬油菜花粉介导转

化的新体系<sup>[3]</sup>。卢爱兰等将芜菁花叶病毒基因导入油菜, 获得对油菜黄化花叶病毒 (TuMV) 抗性<sup>[4]</sup>。2014 年徐茜育成了具有抗草甘膦基因的甘蓝型油菜新品种浙大 619<sup>[5]</sup>。石东乔等将反义油酸脱饱和酶基因 (*Fad2* 基因) 导入油菜, 获得了高油酸含量, 低亚油酸、亚麻酸的转基因油菜<sup>[6]</sup>。长期以来, 农杆菌介导的遗传转化采用的抑菌剂多为羧苄青霉素和头孢霉素, 因为它们可以抑制原核生物细胞壁的生成, 进而抑制细菌。关于羧苄青霉素 (carbenicillin) 和头孢霉素 (cefotaxime) 对油菜转化的研究已有报道<sup>[7]</sup>, 裴冬丽等在白菜型油菜的转化中发现这 2 种抗生素对农杆菌菌株 LBA4404 有很强的抑制作用<sup>[8]</sup>。高武军等研究发现 500 mg/L 的羧苄青霉素可以完全抑制农杆菌的生长<sup>[9]</sup>。Han 等在小麦的遗传转化中发现头孢霉素在 250 mg/L 可以完全抑制农杆菌生长<sup>[10]</sup>。在高粱遗传转化中发现 250~500 mg/L 的羧苄青霉素可以有效抑制农杆菌<sup>[11]</sup>。但是, 以上研究并没有分析头孢霉素和羧苄青霉素对植物再生潜力的影响。有研究认为头孢霉素可能会抑制芽的分化<sup>[12-14]</sup>, 而羧苄青霉素则抑制根的形成<sup>[15]</sup>。此外, 抗生素的浓度对遗传转化也有一定的影响。如浓度为 250 mg/L 的头孢霉素不利于玉米愈伤组织的形成<sup>[16]</sup>, 并最终导致转化效率反而低于 100 mg/L 的处理; 羧苄青霉素在随后的试验中都采用 100 mg/L 来抑制农杆菌<sup>[17]</sup>。特美汀 (timentin) 和阿莫西林 (amoxicillin) 是应用于农杆菌介导的植物遗传转化中的新型抗菌素, 特别是在胚性愈伤组织再生系统中具有很好地抑菌效果, 而且对组织再生的抑制较小。Costa 等在农杆菌介导烟草的转化中发现特美汀具有较高的转化频率并对根的生长具有促进作用<sup>[18]</sup>。胡威研究柑橘时发现特美汀降低了芽的再生频率, 导致 70% 的再生芽产生突变, 而在阿莫西林

收稿日期: 2017-01-09

基金项目: 甘肃省高等学校基本科研业务费专项; 甘肃省干旱生境作物学重点实验室开放基金 (编号: GSCS-2012-03)。

作者简介: 石文慧 (1989—), 女, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种方面研究。E-mail: 1264555017@qq.com。

通信作者: 张金文, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种方面研究。E-mail: jwzhang305@163.com。

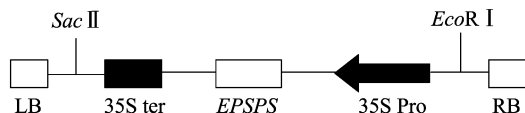
的培养基中是正常的<sup>[19]</sup>。阿莫西林是一种无菌单独包装、稳定且便于携带的抗生素,其价格相对于羧苄青霉素、头孢霉素、特美汀便宜。2014 年 Naing 等首次研究了阿莫西林对“鲜红”菊花[*Chrysanthemum morifolium* (Ramat)] 叶片外植体培养的植株再生能力的影响,发现 250 mg/L 的阿莫西林不但可以抑制农杆菌菌株 LBA4404,而且对外植体具有高效的转化频率,证明了阿莫西林可有效取代羧苄青霉素或头孢霉素<sup>[20]</sup>。但阿莫西林应用于农杆菌介导的甘蓝型油菜遗传转化中并未见报道。

因此,本研究在油菜种质遗传转化过程中,设置 4 种不同浓度的抗生素,以确定适合于甘蓝型油菜农杆菌介导的抗生素种类和浓度,并明确阿莫西林在甘蓝型油菜遗传转化中的效果,这对于提高农杆菌介导的油菜遗传转化效率、加快油菜种质资源创新具有重要的理论价值和应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与药品

以甘蓝型油菜杂交种青杂 5 号的恢复系“1831R”为试验材料。农杆菌菌株选用 LBA4404、GV3101。植物表达载体为 pCambia1300(图 1),该载体使用草甘膦抗性基因 *EPSPS* (5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶) 替换了 pcambia1300 的潮霉素抗性标记 *Hyp*(图 1)。羧苄青霉素(Carb)、头孢霉素(Cef)、特美汀(Tim)、阿莫西林(Amo)、Kan、Rif、AgNO<sub>3</sub>、AS、6-BA、2,4-D、NAA、草甘膦均用 0.22 μm 的滤膜抽滤。



LB—左边界;35S ter—CaMV35S terminator;EPSPS—草甘膦抗性基因;35S Pro—CaMV35S 启动子;RB—右边界

图1 植物基因表达载体 pCambia1300

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的制备 外植体制备参照邹智等的研究方法<sup>[21]</sup>。选取籽粒饱满的种子,70%乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 2~3 次;1%的次氯酸钠溶液(0.3 g + 30 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)浸泡 13~15 min(期间不时摇动),无菌水冲洗 3~5 次;接种于萌发培养基上,每瓶约 20 粒种子,置培养箱培养诱导萌发,培养条件如下:温度(25 ± 3)℃下,光照 16 h/d,光强 2 000 lx 萌发。4~5 d 后切取其下胚轴,转接于预培培养基。

1.2.2 含表达载体 pCambia1300 的农杆菌菌株 LBA4404、GV3101 的活化 参照王关林等所述的方法<sup>[22]</sup>。(1)取出含表达载体 pCambia1300 的农杆菌菌株 LBA4404 划线接种于含 50 mg/L Kan + 50 mg/L Rif 的 YEP 固体培养基平板上,28℃下倒置黑暗培养 2~3 d。(2)于转化前 1 d 挑取单菌落,接种于 20 mL 含 50 mg/L Kan + 50 mg/L Rif 的 YEP 液体培养基中,置于摇床上 28℃下 200~210 r/min 培养过夜(16 h 左右),使菌体达到对数期( $D_{600\text{nm}} = 0.6 \sim 0.8$ )。(3)取 400 μL 菌液转接入 20 mL 无抗生素的 YEP 液体培养基中,继续培养 4~6 h。(4)将菌液倒入无菌带盖的 50 mL 离心管内,盖上管盖,用封口膜封口,4 000 r/min 离心 5 min。(5)取出离心管,在超净工作台上弃去上清,向离心管内加入

适量 MS 液体培养基,悬浮起菌体,28℃下 210 r/min 离心,使其吸光度达到 0.4~0.6 之间,即可用作接种外植体的工程菌液。农杆菌 GV3101 的活化等同。

1.2.3 外植体的农杆菌侵染 将预培 2~3 d 的下胚轴置于无菌的小培养皿中,向皿中倒入制备好的工程菌液,中间经缓慢晃动数次,3~5 min 后倒掉菌液,然后将下胚轴投入无菌水中清洗 3 遍,置于无菌滤纸上,吸干表面液滴,随即转移到共培养培养基(不含抗生素和草甘膦)中,25℃下黑暗培养 2 d。

1.2.4 4 种抗生素对抑制 2 种土壤根癌农杆菌菌株的作用 试验设计 2 个处理,即将 500 mg/L 4 种抗生素(Carb、Cef、Tim、Amo)分别加入 2 种土壤根癌农杆菌菌株的 YEP 培养基(分别挑取农杆菌菌株 LBA4404、GV3101 的单菌落于 25 mL 含 50 mg/L Kan + 50 mg/L Rif 的 YEP 液体培养基中),置于摇床上 28℃下 200~210 r/min 培养过夜(16 h 左右),2 种土壤根癌农杆菌菌株的 YEP 培养基不加任何抗生素设为对照,然后分别测其吸光度。

1.2.5 抗生素浓度设计和抑菌效果鉴定 试验设计 4 个处理,每个处理设 6 个浓度梯度,即 100、200、300、400、500、600 mg/L,每个处理设置 3 次重复。将农杆菌菌株 LBA4404 侵染后共培养 2 d 的外植体转入抑菌培养基。培养基经高压灭菌后,按试验设计分别添加不同浓度的抗生素,于植物培养箱中培养,培养条件为 28℃、16 h/8 h 光周期、光照度 2 000 lx。在培养 3 d 后连续观察抑菌情况。抑菌完全的标准为外植体在与培养基接触的部位未出现农杆菌菌落。抑菌率 = 未孳生农杆菌的外植体数/农杆菌侵染后的总外植体数 × 100%。

1.2.6 抗生素对芽再生的影响鉴定 在抑菌 7 d 之后,采用杨长友等报道的愈伤诱导培养基(MS 培养基,含 4.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 3.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>, NAA、AgNO<sub>3</sub>、灭菌后另加)<sup>[23]</sup>,培养基经高压灭菌后,按“1.2.5”节设计的抗生素浓度梯度,分别添加,同时设置对照试验,即外植体(未经农杆菌侵染)在愈伤诱导过程中不加抗生素,28℃、16 h/8 h 光周期、光照度 2 000 lx 培养 20 d 后连续观察愈伤诱导情况。采用王俊生等报道的愈伤分化培养基(MS 培养基,含 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA, NAA 灭菌后另加)<sup>[24]</sup>。培养基经高压灭菌后,按“1.2.5”节设计的抗生素浓度梯度,分别添加,同时设置对照试验,即外植体(未经农杆菌侵染)愈伤分化过程中不加抗生素,培养条件为 28℃、16 h/8 h 光周期、光照度 2 000 lx,培养 15 d 后观察芽再生情况。芽再生率 = 带芽外植体数/总外植体数 × 100%

1.2.7 草甘膦抗性筛选及 PCR 检测 试验设计 4 个处理,即依据“1.2.6”节试验结果分别在芽再生培养基加入 4 种抗生素各自相对应的最适浓度,每个处理设置 3 次重复。同时加入抗性筛选试剂草甘膦(Gly),浓度为 8 mg/L。芽再生培养基为 MS 培养基,含 4.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 8 mg/L Gly, NAA、抗生素灭菌后另加。15 d 后统计拟转基因植株,并进行 PCR 验证,统计转化率。转化率 = 转基因植株总数/总外植体数 × 100%。

用 CTAB 法提取拟转基因植株和对照(未转化植株)的基因组 DNA,用于 PCR 扩增。

EPSPS 基因的 PCR 引物为 5'-TCTACAAATCTATCTC-

TCTCG -3',5'-GGAACTACTCACACATTATTA -3'。

产物长度为 1 350 bp, 建立 25  $\mu$ L 反应体系: ddH<sub>2</sub>O (17.5  $\mu$ L)、10  $\times$  PCR Buffer (2.5  $\mu$ L)、dNTP Mixture (2.0  $\mu$ L)、上游引物 (0.75  $\mu$ L)、下游引物 (0.75  $\mu$ L)、TaKaRa Taq (0.5  $\mu$ L)。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 52.9  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 81 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min。反应结束后, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测反应产物。

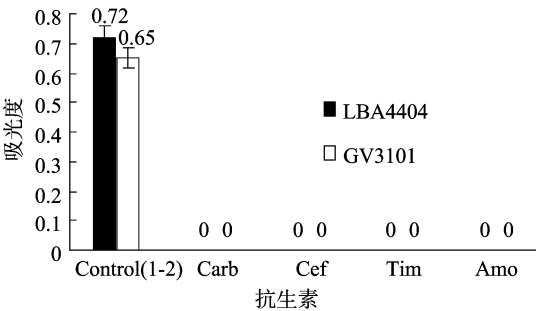
1.3 数据处理

试验数据采用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 进行处理。

2 结果与分析

2.1 4 种抗生素对抑制根癌农杆菌的效果

500 mg/L 的 4 种抗生素对抑制根癌农杆菌菌株 (LBA4404、GV3101) 的效果如图 2 所示。结果显示, 加入羧苄青霉素 (Carb)、头孢霉素 (Cef)、特美汀 (Tim)、阿莫西林 (Amo) 的液体 YEP 培养基吸光度都为 0。在对照试验中, 吸光度在正常值 (0.6 ~ 0.8) 之间。说明浓度为 500 mg/L 的 4 种抗生素均有抑制农杆菌菌株 LBA4404、GV3101 繁殖和生长



处理1—在农杆菌 LBA4404 中加入 50 mg/L Kan、50 mg/L Rif、500 mg/L Carb/Cef/Tim/Amo, 处理2—在农杆菌 GV3101 中加入 50 mg/L Kan、50 mg/L Rif、500 mg/L Carb/Cef/Tim/Amo, 对照—在农杆菌菌株 LBA4404、GV3101 中仅分别加入 50 mg/L Kan、50 mg/L Rif

图2 4 种抗生素在抑制土壤根癌农杆菌的影响



a ~ f—阿莫西林浓度依次在 600、500、400、300、200、100 mg/L 下的抑菌效果

图4 阿莫西林在不同浓度下的抑菌效果

2.3 4 种不同浓度的抗生素对芽生长的影响

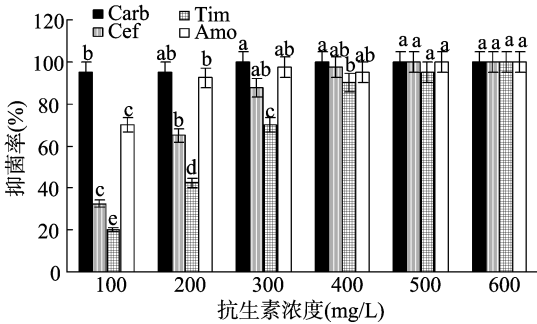
4 种不同浓度的抗生素对芽生长的影响不同 (图 5)。从总体趋势来看, 随着 4 种抗生素浓度的增加, 芽再生率呈先增加后降低趋势, 其中浓度在 300 mg/L 时达到最大; 且在相同浓度下, 经 Amo 处理的芽再生率最高, 其次为 Carb、Tim、Cef。当 Amo 浓度在 100 ~ 200 mg/L 时, 比相同浓度下的 Carb、Cef、Tim 芽再生率高 3.62%、13.86%、14.05%; 当 Amo 浓度在 300 mg/L 时, 比相同浓度下的 Carb、Cef、Tim 芽再生率高 1.86%、9.76%、9.76%; 当 Amo 浓度在 400 ~ 600 mg/L 时, 比相同浓度下的 Carb、Cef、Tim 芽再生率高 1.29%、9.53%、8.98%。由以上结果可知, 4 种抗生素中阿莫西林浓度在

的效果, 可以用于后续试验。

2.2 4 种不同浓度抗生素在 MS 固体培养基上的抑菌效果

如图 3 所示, 4 种抗生素浓度在 500 ~ 600 mg/L 对抑菌率的影响差异不显著, 而在 100 ~ 400 mg/L 对抑菌率的影响差异显著。其中, 100 mg/L 时, Carb 比 Cef、Tim、Amo 抑菌率高 151.11%、303.57%、32.94%, Amo 比 Cef、Tim 抑菌率高 88.89%、203.57%; 200 mg/L 时, Carb 比 Cef、Tim 抑菌率高 37.65%、105.26%, Amo 比 Cef、Tim 抑菌率高 88.89%、203.57%; 300 mg/L 时, Carb 比 Tim 抑菌率高 50.63%, Amo 比 Tim 抑菌率高 49.37%; 400 mg/L 时, Carb 比 Tim 抑菌率高 10.78%, Amo 比 Tim 抑菌率高 8.01%。表明较高浓度 (500 ~ 600 mg/L) 抗生素处理下, 4 种抗生素都可以很好地抑制农杆菌的生长。同时, 浓度低于 500 mg/L 时, Carb 抑菌效果最好, 其次是 Amo, 再次是 Cef、Tim。

以 Amo 为例, 共培养 7 d 后发现, 当浓度在 400 ~ 600 mg/L 时, 其抑菌效果如图 4 - a、图 4 - b、图 4 - c 所示, 接种下胚轴的培养基中未见农杆菌孳生; 当浓度为 300 mg/L 时, 培养基中虽未见农杆菌孳生, 但下胚轴少许脱水且与培养基接触的部位呈水渍状, 褐化较严重, 活性降低, 如图 4 - d; 当浓度为 100 ~ 200 mg/L 时, 下胚轴基部出现大量农杆菌菌落, 菌落数与抗生素浓度呈反比。



柱上不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著。图 8 同

图3 4 种不同浓度抗生素的抑菌率

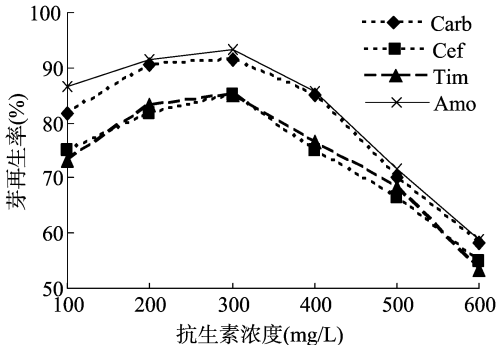
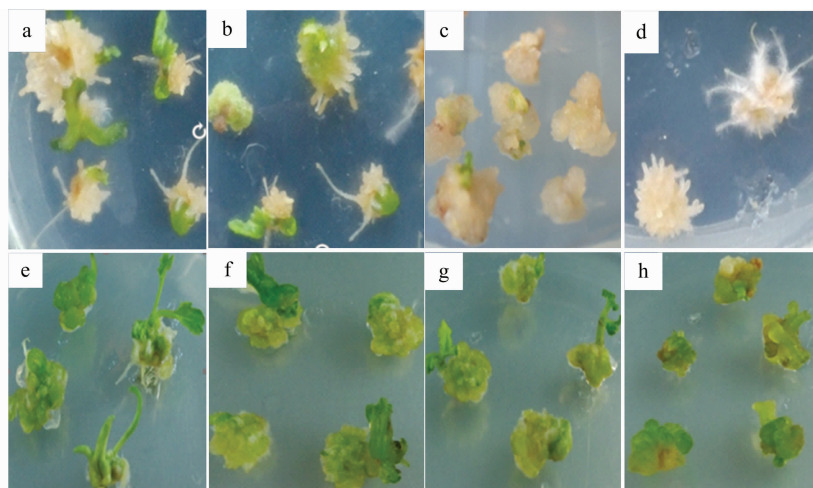


图5 4 种不同浓度抗生素的芽再生率

300 mg/L 时最适于芽再生。

以 Amo 为例,其不同浓度对愈伤诱导芽再生的影响不同,Amo 浓度在 300 ~ 600 mg/L 下时,可以发现随着浓度的增加,经愈伤诱导芽再生的数量在明显下降,当浓度增加至 600 mg/L 时,愈伤组织停止生长而且生长出毛根,这表明高浓度的抗生素可抑制愈伤组织芽的再生。图 6 中 e ~ h 是第 35 天

时 4 种抗生素浓度在 300 mg/L 时对愈伤诱导芽再生的生长状况。经 Amo 处理的芽的生长要优于 Cef、Tim,而与 Carb 处理的芽的生长状况差异不大;经 Cef 处理的愈伤组织分化的再生芽呈现玻璃化现象;经 Tim 处理的愈伤组织出现绿点,但并未分化出芽。



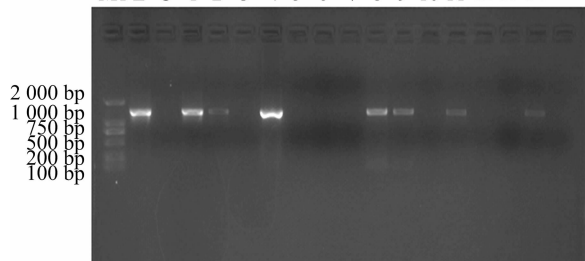
a ~ d—阿莫西林浓度在 300、400、500、600 mg/L 对愈伤诱导芽再生的影响; e ~ h—300 mg/L 浓度下羧苄青霉素、头孢霉素、阿莫西林、特美汀对芽再生的影响

图6 不同浓度的阿莫西林对愈伤诱导芽再生的影响

## 2.4 草甘膦抗性筛选及 PCR 检测

500 个总外植体,经草甘膦抗性筛选,转化过程使用 Carb 的拟转化植株 18 株;使用 Cef 的拟转化植株 13 株;使用 Tim 的拟转化植株 8 株;使用 Amo 的拟转化植株 25 株。提取拟转化植株的 DNA,以质粒 pCambia1300 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照,进行 PCR 扩增(图 7),统计转化效率(图 8)。

M1 E C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



M1—DL2000 的 DNA 分子标准; E—质粒 pCambia1300; C—未转化对照植株; 1 ~ 15—部分 DNA 分子的 PCR 扩增结果

图7 转基因植株中草甘膦抗性基因 *EPSPs* 的部分 PCR 检测

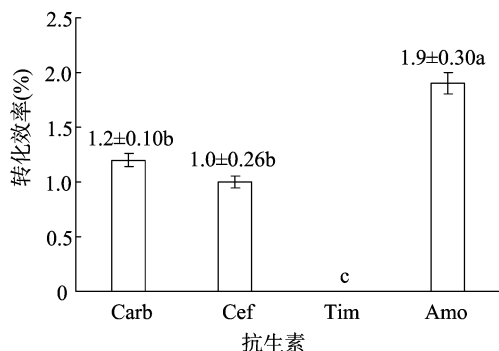


图8 300 mg/L 的 Carb、Cef、Tim、Amo 对转化效率的影响

试验发现使用 Carb 的拟转化植株 18 株中经 PCR 扩增得到 6 株与预期长度一样的扩增产物,转化效率为 1.2%;使用 Cef 的拟转化植株 13 株中经 PCR 扩增得到 3 株与预期长度一样的扩增产物,转化效率为 1.0%;使用 Tim 的拟转化植株 8 株中经 PCR 扩增未得到与预期长度一样的扩增产物;使用 Amo 的拟转化植株 25 株经 PCR 扩增得到 10 株与预期长度一样的扩增产物,转化效率为 1.9%。Amo 比 Carb、Cef 转化效率分别高 58.33%、90.00%。而阴性对照未扩增到相应的片段。初步证明 *EPSPs* 基因已成功导入到甘蓝型油菜恢复系中,且说明转化过程适用 Amo 的转化效率是最高的。

## 3 讨论与结论

本研究表明,在甘蓝型油菜杂交种青杂 5 号的恢复系“1831R”的遗传转化过程中,采用新型的抗生素制剂,包括了农杆菌介导的植物转化中常用的抗生素[羧苄青霉素(Carb)、头孢霉素(Cef)]和尚未广泛应用的新型抗生素[阿莫西林(Amo)、特美汀(Tim)],以转化再生植株表现为依据,研究 4 种抗生素对农杆菌的脱除效果以及对油菜再生植株转化率的影响,发现转化初期,较高浓度(500 ~ 600 mg/L)抗生素处理下,4 种抗生素都可以很好地抑制农杆菌的生长,浓度低于 500 mg/L 时,Carb 抑菌效果最好,其次是 Amo,再次是 Cef、Tim。周小梅等在研究 9 种抗生素的抑制效果时发现 Carb 在 500 mg/L、Cef 在 600 mg/L 时对农杆菌菌株 LBA4404、EHA105 可以达到很好的抑菌效果<sup>[7]</sup>,本研究结果与之类似。Gould 等在松树遗传转化中也得到类似的研究结果<sup>[25]</sup>。Naing 等在菊花的研究中发现,Amo 在 250 mg/L 可以完全抑制农杆菌菌株 LBA4404 的生长<sup>[20]</sup>。黄昌蓉在研究甘蓝型油菜早熟基因遗传转化体系的建立时发现,分化培养阶



段 500 mg/L 的 Tim 难以控制农杆菌的生长,会导致外植体全部褐化,然后死亡<sup>[26]</sup>,但本研究发现, Tim 在 400 mg/L 时可以达到很好的抑菌效果,这可能与农杆菌侵染的菌液浓度和时间有关,而本研究与 Cheng 等研究烟草遗传转化中的结果<sup>[27]</sup>类似。

抗生素不仅对农杆菌有抑制作用,而且对芽再生也有一定的影响。适宜的抑菌剂既要使农杆菌具有良好的抑制作用,又不能对外植体生长产生较大影响<sup>[28]</sup>。在芽再生阶段,随着 4 种抗生素浓度的增加,芽再生率呈先增加后降低趋势,其中浓度在 300 mg/L 时达到最大。且在相同浓度下,经 Amo 处理的芽再生率最高,其次为 Carb、Tim、Cef。Naing 研究发现 Carb 和 Amo 对芽再生的影响比 Cef 小,本试验结果与之一致。Ren 在研究柑橘的遗传转化中发现经阿莫西林处理的愈伤组织诱导芽再生的频率优于特美汀处理<sup>[19]</sup>,本研究结果与之一致。Cef 和 Tim 在不同浓度下诱导愈伤组织产生再生芽数量低于 Carb,这与前人在疫苗、结球甘蓝、玉米中的研究结果<sup>[15-19]</sup>类似。经草甘膦抗性筛选及 PCR 检测,转化体系中使用 Amo 的转化效率比 Carb、Cef 转化效率分别高 58.33%、90.00%。

综上,阿莫西林是甘蓝型油菜杂交种青杂 5 号的恢复系“1831R”遗传转化中最适的抗生素。羧苄青霉素、头孢霉素、阿莫西林、特美汀对后续再生芽生根能力是否有影响,以及残留的抗生素是否会影响转化植株移栽至大田后的生长,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈锦清,黄锐之,郎春秀,等. 油菜 *PEP* 基因的克隆及 *PEP* 反义基因的构建[J]. 浙江大学学报,1999(4):365-367.
- [2] 何业华,熊兴华,官春云,等. 根癌农杆菌介导 *TA29-Barnase* 基因转化甘蓝型油菜的研究[J]. 作物学报,2003,29(4):615-620.
- [3] 杜春芳. 花粉介导法在油菜转基因育种中的应用研究[D]. 太谷:山西农业大学,2004.
- [4] 卢爱兰,陈正华,孔令洁,等. 抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究[J]. 遗传学报,1996(1):77-83.
- [5] 徐茜. 甘蓝型油菜抗草甘膦基因遗传转化及其抗性鉴定[D]. 杭州:浙江大学,2014.
- [6] 石东乔,周奕华,张丽华,等. 农杆菌介导的油菜脂肪酸调控基因工程研究[J]. 高技术通讯,2001,11(2):1-7.
- [7] 周小梅,李君剑,赵军良,等. 抗生素对农杆菌的抑制和对油菜外植体分化的影响[J]. 西北植物学报,2005,25(1):52-56.
- [8] 裴冬丽,耿慧霞,冯翔阳,等. 抗生素对白菜型油菜愈伤组织诱导的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(16):168-171.
- [9] 高武军,段红英,卢龙斗,等. 油菜转化体系中抗生素浓度的优化试验[J]. 河南科学,2002,20(3):257-259.
- [10] Han S N, Oh P R, Kim H S, et al. Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2007,10(2):92-97.
- [11] 张明洲,崔海瑞,舒庆尧,等. 抗生素对高粱离体培养反应的影响[J]. 核农学报,2004,18(2):113-117.
- [12] Ghedin E, Charest H, Zhang W W, et al. Inducible expression of suicide genes in *Leishmania donovani* amastigotes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998,273(36):22997-23003.
- [13] Cheng Z D, Wei Z M, Xu Z H. Transformation of brassica napus using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants[J]. Acta Botanica Sinica, 1994,36(9):657-663.
- [14] 余建明,蔡小宁,朱卫民,等. 结球甘蓝抗虫转基因植株及其后代的抗性表现[J]. 江苏农业学报,2001,17(2):73-76.
- [15] de Block M. Methods and means for increasing the tolerance of plants to stress conditions;US7786349[P]. 2010-08-31.
- [16] Ishida Y, Yamamoto A, Eady R A, Watt F M, et al. Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis[J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1996,44(2):167-175.
- [17] Yasumoto H, Kim S, Zhan Y, et al. Dominant negative c-jun gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia in rats[J]. Gene Therapy, 2001,8(22):1682-1689.
- [18] Costa M, Nogueira F, Figueira M L, et al. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars[J]. Plant Cell Reports, 2000,19(3):327-332.
- [19] 胡威. 农杆菌介导柑橘遗传转化体系的优化[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.
- [20] Naing A H, Kyungil P, Sun hyung L, et al. Appropriate choice of antibiotics for plant regeneration and optimization of selective agents to be used in genetic transformation of chrysanthemum[J]. Plant Omics Journal, 2014,7(4):237-243.
- [21] 邹智,卢长明. 整株转化法及其在油菜上的应用与展望[J]. 植物学报,2009,44(2):236-244.
- [22] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [23] 杨长友,袁中厚,郑小敏,等. 甘蓝型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 生物技术通报,2013(1):111-115.
- [24] 王俊生,范小芳,谭光轩,等. 甘蓝型黄籽油菜高油品系下胚轴再生体系研究[J]. 河南农业科学,2012,41(1):45-48.
- [25] Gould J H, Zhou Y X, Padmanabhan V, et al. Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium*[J]. Molecular Breeding, 2002,10(3):131-141.
- [26] 黄昌蓉. 甘蓝型油菜早熟基因遗传转化体系的建立及转基因植株初步鉴定[D]. 杭州:浙江大学,2013.
- [27] Cheng Z M, Schnurr J A, Kapaun J A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998,17(8):646-649.
- [28] 付晓佳,张倩,李琳,等. 农杆菌介导烟草抗真菌  $\beta-1,3$ -葡聚糖酶基因转化洋桔梗[J]. 江苏农业学报,2016,32(1):44-50.