

国会艳,李继光,张春蕊,等. 非洲紫罗兰组培体系中卡那霉素的抗性筛选[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):56-57.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.018

非洲紫罗兰组培体系中卡那霉素的抗性筛选

国会艳¹, 李继光¹, 张春蕊², 任如意¹

(1. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江 157012; 2. 东北林业大学林木遗传育种

国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:采用组织培养技术,在非洲紫罗兰组培过程中的愈伤组织诱导、芽的分化、生根阶段分别进行不同浓度卡那霉素(Kan)的抗性筛选。结果表明,在愈伤组织诱导阶段,Kan浓度为60 mg/L时外植体的愈伤诱导受到抑制;在芽的分化阶段,Kan浓度为80 mg/L时芽的增殖受到抑制;在生根阶段,Kan浓度为120 mg/L时生根受到抑制。

关键词:卡那霉素;抗性筛选;非洲紫罗兰

中图分类号: S681.204⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0056-02

自1983年成功获得转基因烟草以来^[1],关于转基因的研究越来越多,世界转基因市场总收入超过30 000亿美元,仅转基因植物种子的收入可达3 000亿美元^[2]。目前已成功获得200多种转基因植物,3 000多例转基因植物已进入大田试验阶段^[3]。在植物的转基因研究中,*npt-Ⅱ*基因常被作为选择标记基因,该基因编码氨基糖苷-3'-磷酸转移酶(aminoglycoside-3'-phosphotransferase)Ⅱ,又称npt-Ⅱ(neomycin phosphotransferase Ⅱ),该酶使氨基糖苷类抗生素(卡那霉素、新霉素、巴龙霉素G418等)磷酸化而失活^[4];因此,*npt-Ⅱ*基因可用作遗传转化过程中区分转基因、非转基因植物细胞的标记^[5]。卡那霉素(kanamycin, Kan)影响线粒体和叶绿体的核糖体70S起始复合物生成,使蛋白质合成受阻,最终导致细胞死亡^[6]。根据其特性,对以*npt-Ⅱ*基因为选择标记基因的转基因后代株系进行筛选,后代发生分离,含目的基因的株系一定携带*npt-Ⅱ*基因,对卡那霉素处理不敏感;不含目的基因的植株不具有卡那霉素抗性,对卡那霉素处理敏感。目前,利用Kan对转基因株系进行筛选已经应用于水稻、小麦、棉花、番茄等作物^[7]。不同植物、不同类型的外植体应使用不同浓度的卡那霉素,使其有效抑制未转化成功的细胞生长并使之缓慢死亡,又不影响转化成功的细胞正常生长。抗生素浓度过低虽不影响转化株的正常生长,但可能出现嵌合体和假阳性现象;抗生素浓度过高则毒性过强,会快速杀死细胞,而死细胞对邻近活细胞常有较强的抑制作用,不利于转化细胞的生长^[8]。非洲紫罗兰(*Saintpaulia ionantha*)为非洲苦苣苔科多年生草本植物,原产于非洲坦桑尼亚海拔

700~1 000 m的乌桑巴拉山,是一种观赏价值较高的室内盆栽花卉,被誉为“室内花卉皇后”^[9-10]。植物基因工程不仅广泛应用于农作物的改良,也是花卉改良的主要手段,本试验确定了非洲紫罗兰组培体系中的卡那霉素抗性筛选浓度,为进一步的转基因研究提供依据,并为花卉品种的改良提供全新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

非洲紫罗兰组培苗(组培室培养)、卡那霉素、6-BA、NAA。生芽培养基配方为:MS、0.5 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA。生根培养基配方为:1/2MS、0.01 mg/L NAA。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 配制诱导愈伤组织的培养基时,分别加入浓度为20、40、60、80、100 mg/L的Kan,同一浓度至少配制6瓶培养基。挑选生命力强的组培苗叶片,将其切成小方块并接种至不同Kan浓度的培养基中,各瓶接种相同数量的外植体。置于组培室中,在25℃下光照培养约20 d,定期观察并记录。

1.2.2 芽的分化 配制芽分化培养基时,分别加入浓度为20、40、60、80、100 mg/L的Kan,同一浓度至少配制6瓶培养基。将非洲紫罗兰的不定芽接种至不同Kan浓度的芽增殖培养基中,各瓶接种相同数量的芽体。置于组培室中,在25℃下光照培养约20 d,定期观察并记录。

1.2.3 根的生长 配制生根培养基时,分别加入浓度为60、80、100、120 mg/L的Kan,同一浓度至少配制6瓶培养基。将非洲紫罗兰的不定芽接种至不同Kan浓度的生根培养基中,各瓶接种相同数量的芽体。置于组培室中,在25℃下光照培养约20 d,定期观察并记录。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导阶段 Kan 浓度的筛选

Kan浓度为20(图1-A)、40 mg/L(图1-B)时非洲紫罗兰外植体颜色较绿;Kan浓度为60 mg/L(图1-C)时外植体发黄;Kan浓度为80(图1-D)、100 mg/L(图1-E)时外植体失绿褐化。可见,愈伤组织诱导阶段的Kan浓度为

收稿日期:2015-03-28

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(编号:11551517);牡丹江师范学院博士科研启动基金(编号:MSB201320);沙参繁殖生物学及人工繁殖的研究(编号:Z2013n020);牡丹江师范学院青年学术骨干(编号:G200901);黑龙江省牡丹江市科技攻关项目(编号:G200920065)。

作者简介:国会艳(1978—),女,黑龙江七台河人,博士,讲师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:wsghy1307@126.com。

通信作者:任如意,教授,硕士生导师,主要从事植物分子遗传的研究。E-mail:swxry@126.com。

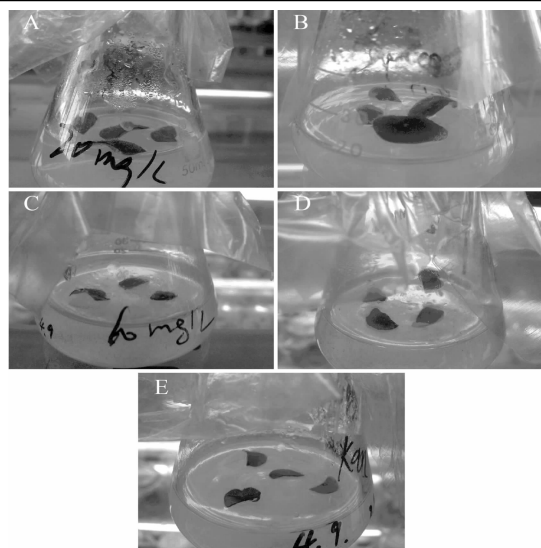


图1 愈伤组织诱导阶段Kan浓度的筛选

60 mg/L 时,愈伤组织的诱导受到抑制。

2.2 芽分化阶段 Kan 浓度的筛选

在 Kan 浓度为 20 (图 2 - A)、40 (图 2 - B)、60 mg/L (图 2 - C) 的芽增殖培养基中,外植体生长良好,叶片颜色较绿;Kan 浓度为 80 (图 2 - D)、100 mg/L (图 2 - E) 时芽体枯黄,失去芽增殖能力。可见,芽分化阶段的 Kan 浓度为 80 mg/L 时,芽的分化受到抑制。

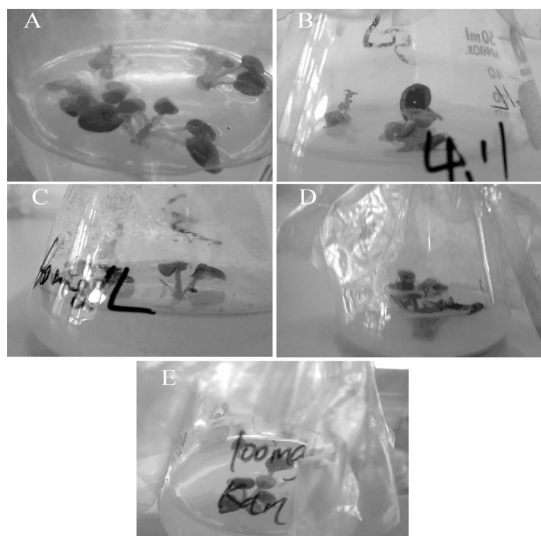


图2 芽分化阶段 Kan 浓度的筛选

2.3 生根阶段 Kan 浓度的筛选

在 Kan 浓度为 60 (图 3 - A)、80 mg/L (图 3 - B) 的生根培养基中,植株可正常生根;Kan 浓度为 100 mg/L (图 3 - C) 时,仅部分植株能够生根,其余植株无根生长;Kan 浓度为 120 mg/L (图 3 - D) 时,植株的生根完全被抑制。可见,生根阶段的 Kan 浓度为 120 mg/L 时,植株完全丧失生根能力,后续试验可用此浓度筛选去除转基因阴性株系。

3 结论与讨论

本试验利用组织培养的方法,将非洲紫罗兰的外植体接

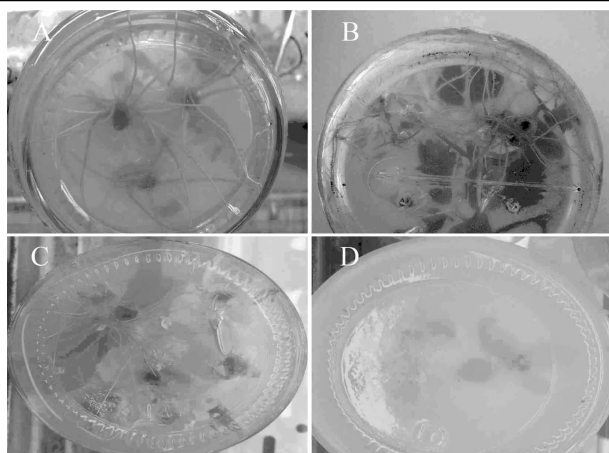


图3 生根阶段 Kan 浓度的筛选

种于不同 Kan 浓度的培养基中进行培养。结果表明,在愈伤组织诱导阶段,Kan 浓度为 60 mg/L 时外植体的愈伤诱导受到抑制;在芽的分化阶段,Kan 浓度为 80 mg/L 时芽的增殖受到抑制;在生根阶段,Kan 浓度为 120 mg/L 时根的生长受到抑制。

在植物转化过程中,必须通过筛选才能获得转基因成功的植株,将卡那霉素作为一种筛选剂加入选择培养基中,以便对转化植株进行筛选。卡那霉素浓度的高低直接影响转化细胞的生长^[11]。不同植物、同一植物不同外植体对卡那霉素的敏感性均可能存在差异,因此筛选浓度各不相同。转化前应设置不同的卡那霉素浓度梯度,找到植物最为敏感的卡那霉素浓度,以便在适当条件下有效抑制非转化细胞的生长并使其缓慢死亡,从而准确筛选出转基因阳性株系。

参考文献:

- [1] 陈光中. 安全性的争议[J]. 预防医学杂志, 2001, 3(9): 405 - 406.
- [2] 杜建中, 孙毅, 王景雪, 等. 转基因玉米中目的基因的遗传表达及其抗病性研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1720 - 1727.
- [3] 李剑芳, 邬敏辰, 王琴. 基因食品机器安全性研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2003(3): 8 - 12.
- [4] Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002: 527 - 606.
- [5] 姚春馨, 许明辉, 李进斌, 等. 转几丁质酶-葡聚糖酶双价基因水稻毒理试验[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(4): 18 - 23.
- [6] 赵爽, 雷建军, 陈国菊, 等. 卡那霉素在转基因芥菜中的应用[J]. 遗传, 2008, 30(4): 501 - 507.
- [7] 欧阳波, 龙芳, 张扬勇, 等. 利用转基因标记 NPT II 快速、规模化纯合转基因番茄[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 12 - 16.
- [8] 景岚, 孙燕飞, 张岗, 等. 油菜遗传转化体系中卡那霉素浓度的筛选及抑菌剂的选择[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 102 - 105.
- [9] 裴仁济, 陈小强, 孙宁, 等. 花色模式植物——非洲紫罗兰[J]. 北方园艺, 2010(11): 219 - 222.
- [10] 陆帅, 董永辉, 陈佳. 非洲紫罗兰形态特征及繁殖技术[J]. 现代农村科技, 2009, 43(6): 39.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 527 - 528.