

信息与资料 **Information and Data****刺槐对3种抗生素敏感性的测定**牛正田^{1*} 张秀海² 罗晓芳¹¹北京林业大学科学研究院, 北京 100083; ²北京农业生物技术研究中心, 北京 100089**Determination for the Sensitivity of Black Locust to Three Antibiotics**NIU Zheng-Tian^{1*}, ZHANG Xiu-Hai², LUO Xiao-Fang¹¹Institute of Science Research, Beijing Forestry University, Beijing 100083; ²Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing 100089

提要 匈牙利刺槐对卡那霉素不敏感, 对G418敏感, 而对潮霉素极为敏感。如以NPTII基因为刺槐基因工程的选择性标记基因, 则G418是理想的抗生素抗性选择试剂; 如用HPT基因, 则潮霉素是合适的抗生素抗性选择试剂。

关键词 刺槐; 基因工程; G418; 卡那霉素; 潮霉素

刺槐又名洋槐, 具有很高的经济、社会和生态效益, 是重要的速生用材树种和优良的薪碳树种。目前, 基因工程已成为定向改良刺槐、提高刺槐抗逆能力的新途径。为了获得稳定的转基因刺槐, 必须利用选择标记基因对转化与未转化的细胞加以区分。刺槐的基因工程国内尚未见报道, 国外仅有两例文献。Han等^[1]研究发根农杆菌介导的刺槐遗传转化, 所用抗生素是卡那霉素, 质量浓度100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Igasaki等^[2]报道根癌农杆菌介导的刺槐遗传转化, 预实验结果表明刺槐茎段对卡那霉素不敏感, 对潮霉素敏感, 筛选浓度为20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此, 研究刺槐对一些遗传转化中常用的选择性标记试剂的敏感性, 以确定适合刺槐的选择标记基因, 是今后建立刺槐遗传转化系统, 使外源目的基因在其中稳定表达的前提条件, 对刺槐的遗传改良有十分重要的意义。本文检测了刺槐对3种常用的基因工程抗生素的敏感性, 以期今后刺槐遗传转化系统的进一步完善提供参考。

材料与方

刺槐 (*Robinia pseudoacacia*) 是北京林业大学良种繁育研究中心从匈牙利引进的优良无性系。培养基成分为: MS+6-BA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +3%糖+0.6%琼脂 (pH 6.0)。培养温度为25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为75%, 光照16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照

度为2 000 lx。共取390个茎段作实验, 每个茎段长5 mm左右。

G418、卡那霉素、潮霉素3种常用抗生素的配制参考 Sambrook等^[3]的方法, 母液质量浓度G418、卡那霉素为100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 潮霉素为50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

刺槐对抗生素敏感性测定: 配制含有不同抗生素浓度 (表1) 的刺槐培养基, 放入直径为9 cm的培养皿中。每种处理设3次重复, 以不加抗生素为对照。接种刺槐茎段于培养基上, 每皿接种10个刺槐茎段, 置于上述光温湿条件的培养室中培养。

表1 3种抗生素的质量浓度表

抗生素	质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
卡那霉素	0	20	50	100	200
潮霉素	0	5	10	20	40
G418	0	20	50	100	200

结果与讨论

从表2可见:

(1) 卡那霉素 (kanamycin, Kan 或 Km) 是目

收稿 2003-12-12

* 现工作单位: 河南省林业技术推广站 (郑州 450008)。

E-mail:hnsljzh@vip.371.net, Tel:0371-5921652。

前转化报道中用得最多的一种。已成功地应用于马铃薯、大豆、番茄、向日葵、棉花、烟草、拟南芥、菊花等几十种双子叶植物以及玉米等少数单子叶植物中^[4]。但是,卡那霉素在单子叶植物中的表现远不如在双子叶植物中表现得那么有效。单子叶植物特别是禾谷类作物常表现出天然抗性,以致出现了大量未转化细胞再生植株。本文的结果表明,刺槐对卡那霉素不敏感。

(2)潮霉素(hygromycin, Hyg或Hm)竞争植物叶绿体和线粒体中的核糖体与因子EF-2的结

合位点,因而肽链延伸受抑。本文表明刺槐对潮霉素很敏感。

(3)G418即庆大霉素的衍生物geneticin。它与卡那霉素和新霉素都是氨基糖苷抗生素,抗性基因及解毒机理相同,都与植物细胞叶绿体和线粒体中的核糖体30S亚基结合,阻止翻译过程,干扰蛋白质合成,结果植物细胞死亡^[5]。本文结果表明,刺槐对G418敏感。至于刺槐对同为氨基糖苷类抗生素的卡那霉素和G418的敏感性差别为何如此之大,尚待进一步研究。

根据上述,我们认为,如果以NPTII基因作为刺槐基因工程的选择标记基因,G418较卡那霉素更适宜;如用HPT基因,则潮霉素是适宜的抗生素选择试剂。

表2 抗生素影响下的刺槐茎段成活

抗生素	质量浓度/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	茎段成活率/%
卡那霉素	0	100
	20	80
	50	65
	100	51
	200	46
潮霉素	0	100
	5	20
	10	13
	20	10
	40	0
G418	0	100
	20	25
	50	5
	100	0
	200	0

参考文献

- 1 Han K, Keathley DE, Davis JM et al. Regeneration of transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia*) and morphological alternations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Sci*, 1993, 88:149~157
- 2 Igasaki T, Mohri T, Ichikawa T et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(5):448~453
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁译. 分子克隆试验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 912~913
- 4 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣等. 植物遗传转化手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 125~127
- 5 Fuchs RL, Ream JE, Hammond BG et al. Safety assessment of the neomycin phototransferase II (NPTII). *Bio/technol*, 1994, 11:1543~1547