

# Effect Sensitivity of Hygromycin and Kanamycin on Tissue Culture Protocorms of *Dendrobium officinale*

Yuhong Liu<sup>1</sup>, Fengmei He<sup>2</sup>, Yongping Zhu<sup>2</sup>, Jiaqing Zhao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Honghe Bangda Industrial Co., Ltd., Honghe Yunnan

<sup>2</sup>Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

Email: 2310734369@qq.com, \*605384495@qq.com

Received: Oct. 18<sup>th</sup>, 2019; accepted: Nov. 14<sup>th</sup>, 2019; published: Nov. 21<sup>st</sup>, 2019

## Abstract

For exploring the resistance of *Dendrobium officinale* to antibiotics in the process of agrobacterium-mediated genetic transformation, in this experiment, Protocorms of *D. officinale*, used as the raw material, were cultured on the medium which Hygromycin and Kanamycin with different concentrations were added respectively to the basic medium for selecting the best antibiotics and its concentrations in genetic transformation of *D. officinale*. The results showed that Hygromycin concentrations of 400 mg/L are as critical concentration in which plant became yellow after inoculated one week; a number of them died after two weeks and died totally after 17 weeks. The higher the concentration of Hygromycin is, the higher the rate of browning and yellowing is, and finally it can speed the higher mortality of *D. officinale*. When the Hygromycin concentrations are below 400 mg/L, there is still small amount survival rate, 15%. When Kanamycin's concentrations were 600 mg/L, the yellow and brown phenomenon presented after inoculated three weeks. When the concentration of Hygromycin was 200 mg/L, 400 mg/L, and 600 mg/L, the mortality was 72%, 68% and 78% after 17 weeks, respectively. After that, no death phenomenon appeared again. The experimental results show that *D. officinale* is more sensitive to hygromycin than to kanamycin. It is noted that Hygromycin is subjected to be selected as antibiotics and its concentration should be above 40 mg/L, and Kanamycin cannot be used as antibiotics in genetic transformation of *D. officinale*.

## Keywords

*Dendrobium officinale*, Hygromycin, Kanamycin, Mortality, Protocorm

# 铁皮石斛原球茎对潮霉素及卡那霉素的敏感性研究

刘玉红<sup>1</sup>, 和凤美<sup>2</sup>, 朱永平<sup>2</sup>, 赵家清<sup>1\*</sup>

\*通讯作者。

<sup>1</sup>红河帮达实业有限公司, 云南 红河

<sup>2</sup>云南农业大学, 云南 昆明

Email: 2310734369@qq.com, \*605384495@qq.com

收稿日期: 2019年10月18日; 录用日期: 2019年11月14日; 发布日期: 2019年11月21日

## 摘要

为了探索农杆菌介导的遗传转化中铁皮石斛对抗生素的耐性, 本试验以铁皮石斛原球茎为原材料, 在培养基中分别添加不同浓度潮霉素和卡那霉素进行培养, 筛选出最适合铁皮石斛遗传转化的抗生素种类和浓度。研究表明: 潮霉素浓度为40 mg/L时为临界浓度, 接种一周后, 植株出现黄化现象, 2周后, 出现死亡植株, 培养17周后, 铁皮石斛完全死亡。潮霉素浓度越大, 铁皮石斛褐化和黄化速率增加, 死亡速率越快, 浓度低于40 mg/L, 铁皮石斛则拥有一定的存活率, 为15%左右。当卡那霉素浓度为600 mg/L, 铁皮石斛的褐化和黄化现象出现在培养后第3周, 培养17周后, 浓度为200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L卡那霉素, 铁皮石斛原球茎死亡率依次为72%、68%、78%, 之后仍保持一定的存活量。实验结果表明, 铁皮石斛对潮霉素敏感性远大于卡那霉素, 由此说明, 铁皮石斛遗传转化中应选用潮霉素作为抗生素, 而且使用浓度应在40 mg/L以上, 卡那霉素不能用于铁皮石斛遗传转化。

## 关键词

铁皮石斛, 潮霉素, 卡那霉素, 死亡率, 原球茎

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

铁皮石斛为兰科石斛属多年生草本植物, 其生长受环境限制, 繁殖周期长, 存活率低, 但最近几年来, 兰科植物利用种子进行的组织培养已获得成功[1], 铁皮石斛组织培养也已成熟, 成为许多兰科植物重要基因遗传转化研究的重要模式植物[2]。遗传转化过程中抗生素类主要有卡那霉素、潮霉素 B、头孢和特美汀(Timentin)等[3], 卡那霉素在小麦、大豆、烟草中运用广泛, 潮霉素在水稻、小麦、甘蔗等农作物中运用频繁, 除草剂类主要有绿黄隆粉剂、2,4-D 等[4], 除草剂在各类农作物, 如大豆、玉米等中被频繁使用, 近几年出现了以糖类为筛选剂的方法, 主要有甘露糖、木糖, 其中在甘蔗、拟南芥、棉花中使用了甘露糖[5], 木糖则在辣椒、番茄、马铃薯等运用较多[6], 所以高效的筛选体系是快速获得大量转化子的必要条件之一, 合适的筛选剂对高效筛选体系的建立至关重要[7]。

不同物种对卡那霉素的抗性不一样, 刘玉汇等[8]研究了卡那霉素对烟草4个品种叶芽分化和根再生的影响, 结果发现 CV87 品种对卡那霉素非常敏感, 在4 mg/L 或6 mg/L 浓度下, 叶片芽分化或茎段存活率为零, 而品种 T12 却对卡那霉素具有很高耐性, 在300 mg/L 时叶片才失去分化能力, 而茎段再生受阻的卡那霉素浓度则为400 mg/L。在不同物种对潮霉素的抗性研究中, 蒋苏[9]等以5个栽培小麦品种诱导而来的成熟胚愈伤组织为外植体, 研究了潮霉素浓度对不同阶段成熟胚愈伤组织分化的影响, 研究结果表明: 5个不同小麦品种分化阶段进行潮霉素筛选具有明显的效果, 但不同品种之间存在一定差异, 其中宁麦13的适宜潮霉素浓度为20 mg/L, 花培1号和扬麦158的适宜潮霉素浓度约为30 mg/L, 宁麦9

和宁麦 16 的适宜潮霉素浓度在 30~40 mg/L 左右, 在花培 1 号愈伤组织的诱导阶段进行潮霉素抗性筛选是不适合的。

目前在兰花转基因研究中, 研究者选用筛选剂的种类, 浓度不尽相同, 找到适宜的筛选剂和筛选浓度对于转基因试验的目的基因能否成功侵染具有重要意义。目前在兰科植物的转基因研究中, 大多数研究者采用卡那霉素和潮霉素作筛选剂, 但不同品种所使用的筛选剂和浓度也不尽相同。

为了探索农杆菌介导的遗传转化中抗生素对铁皮石斛的影响, 本试验以铁皮石斛原球茎为原材料, 在培养基中分别添加不同浓度潮霉素和卡那霉素进行实验, 从中筛选出最适合铁皮石斛生长的抗生素种类和浓度。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

云南农业大学园林园艺学院组织培养室利用种子组织培养获得的铁皮石斛原球茎。

### 2.2. 培养条件

培养室的光照强度为 2000 lx, 温度为 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , 每天光照 12 h。

### 2.3. 试验设计与统计方法

培养基为 MS + 0.56-BA + 6.8 g/L Agar + 30 g/L 蔗糖, 灭菌冷却至  $60^{\circ}\text{C}$  左右时, 在超净工作台上依次加入浓度梯度为 5 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L、60 mg/L 潮霉素和浓度梯度为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L 卡那霉素, 设置三个重复。选择同一生长水平且生长正常的铁皮石斛原球茎, 每瓶接入 60 棵。见表 1 和表 2。

**Table 1.** Concentrations of hygromycin

**表 1.** 潮霉素抗性浓度筛选

编号 Number	浓度(mg/L) Concentration	接种总数(颗) Number of incubation	重复 repeat
H0	0.00	60.00	3.00
H1	5.00	60.00	3.00
H2	20.00	60.00	3.00
H3	30.00	60.00	3.00
H4	40.00	60.00	3.00
H5	50.00	60.00	3.00
H6	60.00	60.00	3.00

**Table 2.** Concentrations of kanamycin

**表 2.** 卡那霉素抗性浓度筛选表格

编号 Number	浓度(mg/L) Concentration	接种总数(颗) Number of incubation	重复 repeat
K0	0.00	60.00	3.00
K1	50.00	60.00	3.00
K2	100.00	60.00	3.00
K3	200.00	60.00	3.00
K4	400.00	60.00	3.00
K5	600.00	60.00	3.00

每周观察记录生长状况，记录死亡时间，死亡个数。计算每个浓度死亡速率，死亡率，最终死亡个数及平均死亡数。

## 2.4. 数据分析方法

死亡率为最终死亡总数与接种总数之比。

统计分析方法则采用 DPS 软件 Duncan 多重比较法，先求出各个处理的死亡率均值，同时进行处理间显著性差异分析。大写字母不同，表示有极显著差异，小写字母不同代表有显著差异，相同字母代表其对应处理没有显著差异。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 潮霉素 B 对铁皮石斛致死浓度筛选

#### 3.1.1. 不同潮霉素 B 浓度下铁皮石斛死亡率随培养时间的变化

对不同潮霉素 B 浓度下铁皮石斛原球茎死亡率随时间变化的跟踪统计，图 1 表明：随着培养时间的增加，铁皮石斛原球茎死亡速度表现出慢 - 快 - 平稳的规律。浓度越高，开始死亡时间越提前，最终死亡时间也提前，死亡速度加快。培养在 60 mg/L 浓度下的原球茎在 84 天后死亡率达 100%，50 mg/L 浓度下 90 天死亡达 100%，40 mg/L 浓度下稍微滞后，直到第 98 周时死亡率达 100%，而 20 mg/L、30 mg/L 浓度下的原球茎没有完全死亡，死亡率达到 85% 后不再增加，既成活率保持在 15% 左右。

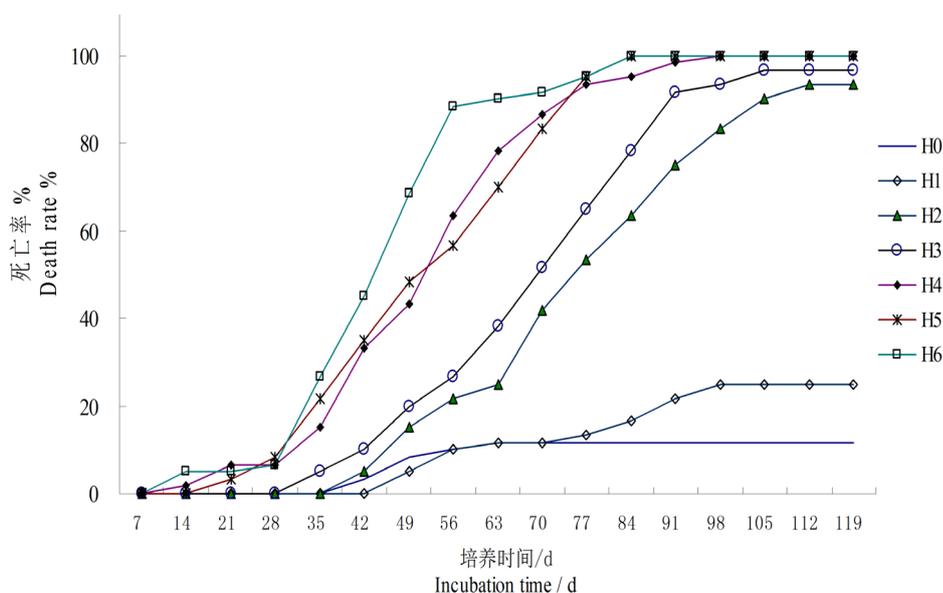


Figure 1. Dynamic change of mortality in *D. officinale* with different hygromycin concentrations during incubation time  
图 1. 不同潮霉素浓度下铁皮石斛死亡率随培养时间的动态变化

#### 3.1.2. 潮霉素 B 浓度对铁皮石斛死亡率影响

由下表 3 可见，在设置的 6 个潮霉素 B 浓度梯度中，铁皮石斛原球茎死亡率随着潮霉素 B 浓度逐渐变大而升高。5 mg/L 浓度下的原球茎成活率稳定保持在 80% 左右，而没有任何抗生索的情况下，成活率达 95% 以上。浓度 0 mg/L 与浓度 5 mg/L 的死亡率相对于其它几组极显著。由此说明，潮霉素浓度越低对铁皮石斛原球茎的死亡速度影响越小。临界浓度为 30~40 mg/L，即今后在遗传转化时，潮霉素 B 浓度必须在临界浓度以上，才能筛选到阳性转基因植株。

**Table 3.** Effects of different concentrations of hygromycin on mortality of *D. officinale*  
**表 3.** 不同浓度潮霉素对铁皮石斛死亡率影响

浓度 mg/L Concentration mg/L	接种数 Inoculation number	死亡数 Number of deaths	死亡率% Mortality%
0	60	7	11.67Aa
5	60	15	25.00Aa
20	60	50	93.33Aa
30	60	56	96.67Aab
40	60	60	100.00Ab
50	60	60	100.00Bc
60	60	60	100.00Bc

Note: Capital letter means significant at 1%. Small letter means significant at 5%. Different letters indicate significant differences between treatments. The same letters indicate same significant differences between treatments.

注: 大写字母表示 1% 极显著水平, 小写字母表示 5% 显著水平, 不同的字母表示处理间差异显著, 相同字母表示处理间差异不显著。

### 3.1.3. 不同潮霉素 B 浓度对铁皮石斛生长状态的影响

高浓度的潮霉素 B 对植物起到致死作用, 低浓度的潮霉素会抑制植物生长。随着潮霉素浓度的增加, 植物生长受到抑制程度就越大, 当超过 40 mg/L 的浓度, 培养时间达 17 周时, 对铁皮石斛原球茎生长状态进行观察, 发现原球茎失绿, 变白色, 几乎死亡, 而对照组的铁皮石斛多数生长正常, 逐渐分化成完整植株。5 mg/L 浓度下生长受到一定抑制, 有部分原球茎能分化形成较弱的小苗, 另一部分依旧保持着原球茎的状态, 且呈现出浅绿色, 颜色不均匀, 分化的真叶叶尖偏白。当浓度达到 20 mg/L 时, 多数接种的原球茎死亡, 剩余的无法分化出植株, 一直保持着原球茎的状态且原球茎未见增大, 浓度为 30 mg/L 的情况和 20 mg/L 相似, 浓度为 40 mg/L 以上, 植株白化, 全部死亡, 见表 4、图 2 和图 3。

**Table 4.** Effects of different concentrations of hygromycin on the growth of *D. officinale*  
**表 4.** 不同浓度潮霉素对铁皮石斛生长的影响(17 周)

不同潮霉素浓度(mg/L) Different hygromycin concentration	生长情况 Growth	死亡率% Mortality	原球茎颜色 Protocorm color	原球茎状态 Protocorm state
0	+++++	5Aa	绿色	全部分化、正常生长
5	++++	25.00Bb	浅绿, 部分褐化	部分分化、缓慢生长
20	+++	73.33Cc	黄绿, 部分褐化	部分分化、缓慢生长甚至停滞生长
30	+	96.67Dd	黄绿, 部分褐化	仅有少量分化、缓慢生长甚至停滞生长
40	-	100.00Dd	白化	死亡
50	-	100.00Dd	白化	死亡
60	-	100.00Dd	白化	死亡

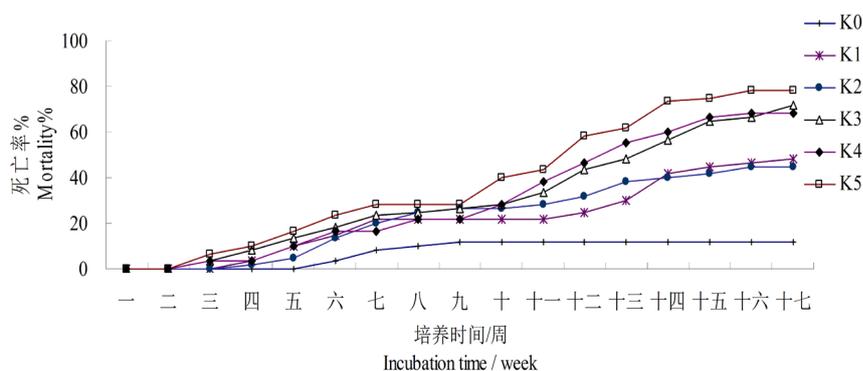
注: “-”代表死亡; “+”代表停滞生长, 和接种时大小(5 mm)同等水平; “+++”代表平均高度为 5~10 mm, 缓慢生长; “+++++”代表正常生长, 平均高度 10 mm 以上。



**Figure 2.** Protocorm growth's situation when concentrations of hygromycin are 40 mg/L  
**图 2.** 潮霉素浓度为 40 mg/L 原球茎生长情况



**Figure 3.** Protocorm growth's situation when concentrations of hygromycin are 30 mg/L  
**图 3.** 潮霉素浓度为 30 mg/L 原球茎生长情况



**Figure 4.** The variety of mortality in *D. officinale* with different kanamycin concentrations during incubation time  
**图 4.** 卡那霉素不同浓度下铁皮石斛死亡率随筛选时间的变化

## 3.2. 卡那霉素在抗性筛选中的作用

### 3.2.1. 不同培养时间下，卡那霉素浓度对铁皮石斛死亡率变化的影响

由图 4 可知，铁皮石斛对卡那霉素的敏感性较弱，培养至第三周才有极少量的植物材料死亡，随着培养时间的增加，死亡率有所增加，但增加速度平缓，之后保持平稳。没有加卡那霉素的对照，第 8 周

前有少量死亡, 死亡率达到 10%左右, 之后保持平稳, 不再有死亡发生。当浓度在 600 mg/L 时, 培养 17 周, 死亡率最高, 达 78%, 之后一直保持在 78%。浓度在 600 mg/L 以下时, 都有一定死亡率, 在 50 mg/L 时, 培养 17 周时, 死亡率达 45%, 之后不再出现死亡。

### 3.2.2. 不同浓度卡那霉素对铁皮石斛死亡数影响

由下表 5 可见, 在设置的 6 个卡那霉素浓度梯度中, 随着卡那霉素浓度增加, 铁皮石斛死亡率不断升高。当浓度为 600 mg/L、400 mg/L、200 mg/L, 培养 17 周后, 死亡率不显著, 但与浓度 100 mg/L、50 mg/L 相比时, 死亡率达极显著, 不加卡那霉素的, 死亡率最低。说明卡那霉素对铁皮石斛的生长有明显的抑制作用。卡那霉素对铁皮石斛生长没有临界值, 由此可见, 卡那霉素不能用于铁皮石斛遗传转化筛选。

**Table 5.** Effects of different kanamycin concentrations on mortality of *D. officinale*

**表 5.** 不同浓度卡那霉素对铁皮石斛死亡数影响(17 周)

浓度 mg/L Concentration mg/L	接种数 Inoculation number	死亡数 Number of deaths	死亡率% Mortality%
600	60.00	47.00	78Aa
400	60.00	41.00	74Aa
200	60.00	43.00	72Aa
100	60.00	27.00	48Bb
50	60.00	29.00	45Bb
0	60.00	7.00	12Cc

Note: Capital letter means significant at 1%. Small letter means significant at 5%. Different letters indicate significant differences between treatments. The same letters indicate same significant differences between treatments.

注: 大写字母表示 1%极显著水平, 小写字母表示 5%显著水平, 不同的字母表示处理间差异显著, 相同字母表示处理间差异不显著。

### 3.2.3. 不同卡那霉素浓度对铁皮石斛生长状态的影响

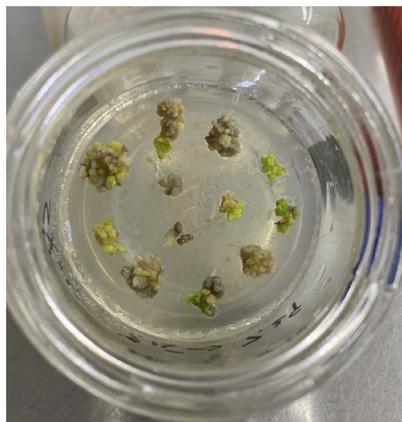
高浓度的卡那霉素对铁皮石斛没有起到完全致死作用, 既仍有部分存活植株, 低浓度的卡那霉素会抑制植物生长, 随着潮霉素浓度的增加, 植物生长受到抑制程度就越大。从表 6、图 5 和图 6 可知, 当 200~600 mg/L 的浓度, 培养时间达 17 周时, 对铁皮石斛原球茎生长状态进行观察, 发现原球茎黄绿, 部分褐化, 少量分化、缓慢生长, 而对照组的铁皮石斛多数生长正常, 逐渐分化成完整植株。50~100 mg/L 浓度下生长受到一定抑制, 有部分原球茎能分化形成较弱的小苗, 另一部分依旧保持着原球茎的状态, 且呈现出浅绿色, 颜色不均匀, 缓慢生长。

**Table 6.** Effects of different kanamycin concentrations on the growth of *D. officinale*

**表 6.** 不同浓度卡那霉素对铁皮石斛生长的影响(17 周)

不同卡那素浓度(mg/L) Different kanamycin concentration	生长情况 Growth	死亡率% Mortality	植株颜色 Plant color	植株状态 Plant state
0	+++++	12Aa	绿色	全部分化、正常生长
50	+++	45Aab	浅绿, 部分褐化	部分分化、缓慢生长
100	+++	48Aab	浅绿, 部分褐化	部分分化、缓慢生长
200	++	72ABab	黄绿, 部分褐化	少量分化、缓慢生长
400	++	74ABb	黄绿, 部分褐化	少量分化、缓慢生长
600	++	78Bc	黄绿, 部分褐化	少量分化、缓慢生长

注: “-”代表死亡; “+”代表原球茎停滞生长, 为接种时大小(5 mm); “++”代表原球茎缓慢生长, 平均大小为 5~10 mm; “+++”代表原球茎正常生长, 平均大小 10 mm 以上。“++++”代表原球茎正常生长, 平均大小 15 mm 以上。



**Figure 5.** Protocorm growth's situation when concentrations of kanamycin are 400 mg/L  
**图 5.** 卡那霉素浓度为 400 mg/L 原球茎生长情况



**Figure 6.** Protocorm growth's situation when concentrations of kanamycin are 600 mg/L  
**图 6.** 卡那霉素浓度为 600 mg/L 原球茎生长情况

#### 4. 讨论与结论

一般说来, 单子叶植物对卡那霉素的敏感程度较双子叶弱, 因此, 在筛选过程中, 单子叶植物的筛选浓度要高于双子叶植物[10]。如水稻, 在遗传转化过程中卡那霉素对水稻愈伤组织的筛选浓度达到了 500 mg/L, 由于卡那霉素毒性太高会对转化细胞造成伤害, 所以卡那霉素一般在单子叶植物中应用较少, 而双子叶植物中要相对较多。有关铁皮石斛遗传转化的报导不多, 其筛选剂及浓度的使用需要探索。本研究的结果与多数单子叶植物的报导一致。而石彩娟[11]将预培养 2 d 的 1 mm 铁皮石斛原球茎接种到筛选培养基配方为 1/2MS + 2.0 mg/L 6-BA + (0~300 mg/L) Kan + 2%蔗糖 + 0.55%琼脂, pH 5.8 中, 培养 30 d 得到的卡那霉素筛选浓度为 200 g/L, 其研究结果与本实验差别很大, 原因有待进一步研究。对于潮霉素的筛选压, 刘建华[12]等人研究了中华结缕草 3 种不同外植体对不同潮霉素浓度的敏感性。结果表明: 不同外植体的敏感性存在差异, 中华结缕草的种子、愈伤组织、离体叶片在遗传转化中的适宜筛选浓度分别为 50、20、50 mg/L。在铁皮石斛对潮霉素的敏感性研究中, 尤超[13]以铁皮石斛愈伤组织诱导的类原球茎为材料, 筛选培养基: 1/2MS + 0.2 mg/L NAA + Hyg + 2%蔗糖 + 0.55%琼脂, pH 5.8。通过 PLBs 对潮霉素敏感性实验确定选择压, 结果发现, 10 mg/L 潮霉素能够有效抑制 PLBs 的增值和分化并完全死亡, 而本实验研究认为 30~40 mg/L 潮霉素为临界剂量。实验结果出现差异, 可能与培养基配方有关系, 本实验的培养基配方采用的是 MS + 0.56-BA + 6.8 g/L Agar + 30 g/L 蔗糖, 与上述研究不同, 培养时间较上述研究长, 得到的筛选压也偏高。

从本实验的研究结果得出, 潮霉素可以用于铁皮石斛的遗传筛选, 而且, 在采用本培养基配方的情况下, 筛选浓度应高于 30~40 g/L。铁皮石斛为单子叶植物, 对卡那霉素的敏感性很低, 在以原球茎为接种材料的培养基中, 卡那霉素对铁皮石斛的影响极低, 卡那霉素不适合作为本培养基配方下和培养材料的筛选剂。

## 基金项目

科技部“三区”科技人才项目(A3008798)。

## 参考文献

- [1] 刘思思, 陈娟, 郭顺星. 兰科植物种子萌发的研究进展[J]. 种子, 2015, 34(6): 43-49.
- [2] 张志勇, 齐泽民, 黄作喜, 等. 铁皮石斛生物技术研究进展[J]. 核农学报, 2014, 28(4): 605-610.
- [3] 徐敏, 夏丽琼, 黄鹏, 等. 博落回抗生素敏感度筛选与植物表达载体构建[J]. 分子植物育种, 2017, 16(4): 1133-1137.
- [4] 李国圣, 杨爱芳, 张举仁, 等. 玉米愈伤组织的遗传转化及除草剂植株再生[J]. 科学通报, 2000, 45(20): 2181-2182.
- [5] 岳建雄, 孟钊红, 张炼辉, 等. 以甘露糖作为筛选剂的棉花遗传转化[J]. 棉花学报, 2005, 17(1): 3-7.
- [6] 王秀峰, 王学国, 马艺莽, 等. 木糖筛选剂在辣椒遗传转化上的应用[J]. 辣椒杂志, 2014, 24(1): 30-33.
- [7] 王坚, 李咏玲, 刘炜, 等. 潮霉素 B 在遗传转化中应用的研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2017, 58(12): 36-43.
- [8] 刘玉汇, 张俊莲, 王蒂, 等. 不同烟草品种对卡那霉素抗性耐盐性的差异[J]. 中国农学通报, 2008, 24(3): 180-185.
- [9] 蒋苏, 马鸿翔, 魏芳, 等. NAA 或潮霉素对小麦成熟胚愈伤组织分化的影响[J]. 分子植物育种, 2012, 10(1): 35-44.
- [10] 王紫宣, 易自立. 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, 2003, 23(6): 10-11.
- [11] 石彩娟. 铁皮石斛 NAC 基因的遗传转化[D]: [硕士学位论文]. 成都: 西南交通大学, 2013.
- [12] 刘建华, 裴福云, 宋凤鸣, 等. 中华结缕草对潮霉素的敏感性研究[J]. 江西农业学报, 2017, 29(9): 41-44.
- [13] 尤超. SAAT 法介导铁皮石斛遗传转化及 NAC 启动子的克隆与载体构建[D]: [硕士学位论文]. 成都: 西南交通大学, 2011.