

陆玉建, 刘俊华, 王书平, 等. 本生烟草愈伤组织的诱导和再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 52–54.

# 本生烟草愈伤组织的诱导和再生体系的建立

陆玉建<sup>1</sup>, 刘俊华<sup>1</sup>, 王书平<sup>1</sup>, 高春明<sup>1</sup>, 刘晓君<sup>2</sup>, 任宇灵<sup>3</sup>

(1. 滨州学院生命科学系/山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 山东滨州 256603;

2. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610065; 3. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

**摘要:**以本生烟草为材料, 研究了不同激素组合对本生烟草愈伤组织诱导和植株再生的影响。结果表明: 当本生烟草叶片在 MS + 1.0 mg/L 2, 4-D + 0.2 mg/L KT 培养基中培养时, 其出愈率最高, 愈伤组织生长状况最好; 在 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中不定芽生长最快, 但存在一定程度的玻璃化现象; MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中不定芽长势较慢, 但玻璃化程度较轻; 对于生根诱导, MS、1/2MS 培养基都可诱导不定根的产生, 但 NAA 对根的生长更有效。

**关键词:**本生烟草; 愈伤组织; 不定芽; 诱导; 再生体系

**中图分类号:** S572.043; Q943.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2014)01-0052-03

烟草是重要的经济作物, 常被作为基因工程和分子生物学研究中重要的模式植物<sup>[1-5]</sup>。目前烟草遗传转化研究多用普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 作为受体, 而对本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 的研究相对较少。本生烟草和普通烟草有密切的亲缘关系<sup>[6-7]</sup>, 由于其植株矮小, 生长速度快, 生命周期短, 对植物病毒非常敏感, 所以是基因功能分析和植物病害研究的重要工具<sup>[4-8]</sup>。有关本生烟草转基因的研究也

见诸报道, 通过在本生烟草中瞬时表达促红细胞生成素基因, 能够生产重组蛋白-促红细胞生成素<sup>[9]</sup>。利用本生烟草建立的质体转化系统, 可以用来研究质体和细胞核基因间的相互作用, 以及检测质体中相关基因的表达情况<sup>[7]</sup>。研究表明, 不同烟草品种的组织培养条件有所区别, 如果完全按照普通烟草的培养方法培养本生烟草, 容易出现外植体褐化、不定芽玻璃化等现象, 并且很难获得再生植株<sup>[4-5]</sup>。激素是植物组织培养中的关键因素, 在建立本生烟草再生体系的整个培养过程中, 激素的使用起到了非常重要的作用<sup>[4-5, 10]</sup>。因此, 如何获得最佳的激素组合, 成为建立本生烟草高效再生体系的关键。本研究探索了本生烟草愈伤组织诱导和植株再生的最佳条件, 旨在为建立高效的本生烟草悬浮细胞培养体系和遗传转化体系奠定基础。

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 山东省自然科学基金(编号: ZR2012CL14); 滨州学院博士基金(编号: 2010Y08)。

作者简介: 陆玉建(1979—), 男, 河南南阳人, 博士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。Tel: (0543)3190096; E-mail: luyujian79@163.com。

种抗生素对所有细菌都有效, 即使有效, 抗生素消除植物组织培养污染的方法也是暂时解决方案, 如果为消除污染而长期使用抗生素, 必然对组织培养苗的生长、分化、生根产生一定影响。随着科学技术不断发展和进步, 将会出现更高效、节能的新设备、新技术、新方法应用于组织培养技术, 从而有效控制污染发生。

## 参考文献:

- [1] 叶添谋. 植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J]. 韶关学院学报, 2010, 31(3): 84–90.
- [2] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 130–134.
- [3] 李 云. 林果花菜组织培养快速育苗技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001.
- [4] Reed B M, Mentzer J, Tanprasert P, et al. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment[J]. Plant Cell, 2004, 87(1): 171–176.
- [5] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组培苗继代培养过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究[J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16–19.
- [6] 翟建中, 顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染菌的防除[J]. 森林病

虫通讯, 1999(4): 30–32.

- [7] 于福科, 张广军. 玫瑰组织培养污染控制技术措施[J]. 陕西农业科学, 2002(11): 47–48.
- [8] 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41–47.
- [9] 王利民, 周 毅, 陈龙友, 等. 植物组织培养中消毒剂的运用[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2002, 20(1): 15–17.
- [10] 王黎波, 李晓燕. 抗生素在植物组织培养中控制污染的应用[J]. 辽宁农业科学, 2007(3): 69–70.
- [11] 纪纯阳, 矫丽曼, 刘 巍, 等. 植物组织培养中污染产生的原因及防止措施[J]. 辽宁林业科技, 2011(2): 40–44.
- [12] 郝云凤, 李可伟, 张培宏, 等. 植物组织培养操作过程中常见的污染问题及解决办法[J]. 内蒙古农业科技, 2004(增刊): 156–158.
- [13] 宋锋惠, 李 康, 史彦江. 阿月浑子组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 新疆农业科学, 2002, 39(6): 343–345.
- [14] 肖玉兰. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 1–4.
- [15] 李春燕, 李 颖. 组织培养中青霉素对细菌污染的抑制作用[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(5): 97–98.
- [16] 李 颖, 李春燕. 多菌灵和青霉素在组培污染中的应用[J]. 林业科技, 2002, 27(1): 6–8.

1 材料与方法

1.1 材料和生长条件

本生烟草种子由滨州学院生命科学系实验室保存,本生烟草生长条件为:每天 16 h 光照、8 h 黑暗,湿度保持在 60%~70%,温度控制在 25℃左右,光照强度为 2 200 lx。

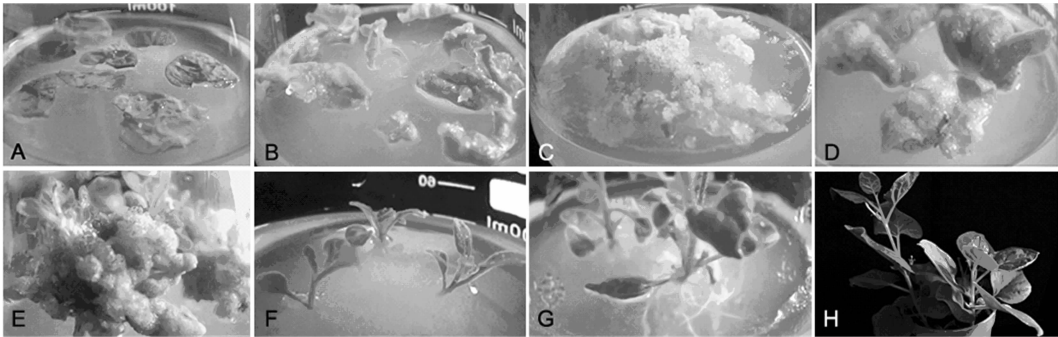
1.2 方法

1.2.1 种子消毒和无菌苗获得 将本生烟草种子用 0.1% 氯化汞溶液消毒 10 min,无菌水漂洗 5~6 次,接种到 MS 基本培养基中培养。

1.2.2 培养基配制 培养基的配制方法见表 1。所有培养基中均添加 3% 蔗糖和 0.8% 琼脂。不定芽增殖培养基为 MS 基本培养基。

表 1 不同培养基的组成

培养基类型	编号	激素组合
愈伤组织诱导	R1	MS + 1.0 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L KT
	R2	MS + 2.0 mg/L 2,4 - D + 0.2 mg/L KT
	R3	MS + 1.0 mg/L 2,4 - D + 0.2 mg/L KT
	R4	MS + 2.0 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L KT
不定芽诱导	y <sub>1</sub>	MS + 1.5 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA
	y <sub>2</sub>	MS + 3.0 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA
	y <sub>3</sub>	MS + 1.5 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA
	y <sub>4</sub>	MS + 3.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA
生根诱导	yc <sub>1</sub>	1/2MS + 0.1 mg/L IBA
	yc <sub>2</sub>	MS + 0.1 mg/L IBA
	yc <sub>3</sub>	1/2MS + 0.1 mg/L NAA
	yc <sub>4</sub>	MS + 0.1 mg/L NAA



A—接种在培养基中的本生烟草叶片; B—在愈伤组织诱导培养基中培养 10 d, 叶片边缘产生明显的愈伤组织; C—在愈伤组织诱导培养基中培养 22 d, 叶片上生长旺盛的愈伤组织; D—在不定芽诱导培养基中培养 12 d, 叶片表面产生的绿色芽点; E—在不定芽诱导培养基中培养 26 d, 叶片上形成的成簇分布的不定芽; F—刚接种到生根培养基中的不定芽; G—生根诱导 12 d, 有大量根产生; H—试管苗的驯化与移栽

图1 本生烟草的组织培养过程

2.4 激素对愈伤组织诱导的影响

为了研究不同激素组合对本生烟草愈伤组织诱导的影响,分别对不同诱导培养基中叶片愈伤组织的生长情况进行观察分析。结果显示,在叶片接种后的第 30 天,虽然这 4 种培养基均可诱导叶片产生愈伤组织,并且诱导率几乎都为 100%,但产生愈伤组织的数量和质量存在差异。R3 培养基中产生愈伤组织的质量最好,愈伤组织色泽均匀而透明,生长迅速,堆积的团块明显较大(图 2 - C);虽然 R4 培养基中产生愈伤组织的数量较多,但质量有所下降(图 2 - D);R1、R2 培养基也能诱导叶片产生愈伤组织,但愈伤组织的诱导效果相对较差,尤以 R1 表现的更为明显(图 2 - A、图 2 - B)。上述结果表明,1 mg/L 2,4 - D 和 0.2 mg/L KT 为诱导本生烟

1.2.3 结果观测与统计方法 外植体接种 30 d 后进行增殖培养,并统计出愈率、不定芽分化率、生根率。有关计算公式如下:

出愈率 = (产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数) × 100% ;

不定芽分化率 = (产生不定芽的外植体数/接种的外植体数) × 100% ;

生根率 = (产生不定根的外植体数/接种的外植体数) × 100% 。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

以生长 30 d 的无菌苗叶片为外植体,接种到愈伤组织诱导培养基中(图 1 - A)。在接种后第 10 天可以观察到本生烟草叶片发生明显卷曲,在叶片边缘产生肉眼可见的乳白色颗粒状愈伤组织(图 1 - B)。继续培养至 22 d 时,在叶片上形成了成团的愈伤组织,结构疏松,生长十分旺盛(图 1 - C)。

2.2 不定芽的形成

本生烟草叶片接种到不定芽诱导培养基中 12 d 后,叶片边缘出现少量深绿色芽点(图 1 - D)。接种后第 26 天芽点已经形成明显的不定芽(图 1 - E)。

2.3 生根诱导

切取不定芽,接种到生根培养基中培养(图 1 - F)。在生根诱导的第 12 天可以看到不定芽基部已形成明显的根(图 1 - G)。最后选取生长旺盛的试管苗进行驯化和移栽(图 1 - H)。

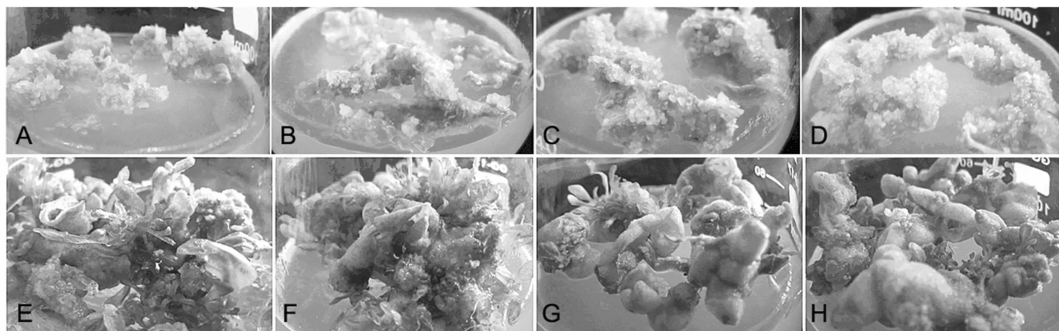
草愈伤组织的最佳激素组合,这时本生烟草叶片细胞脱分化的能力最强,细胞分裂最为旺盛。

2.5 激素对不定芽诱导的影响

为了获得本生烟草不定芽诱导的最佳激素组合,分别对不同诱导培养基中叶片不定芽的生长情况进行观察分析。结果显示,在叶片接种后第 30 天,虽然这 4 种培养基均可诱导叶片产生不定芽,但不定芽产生的数量和速度存在差异。y<sub>1</sub> 培养基中不定芽产生最早、生长最快、数量最多(图 2 - E);与 y<sub>1</sub> 培养基相比,y<sub>2</sub> 培养基诱导产生不定芽的时间有所延长,不定芽生长速度稍慢,数量略有下降(图 2 - F)。在 y<sub>1</sub>、y<sub>2</sub> 培养基中,不定芽分化率都在 90% 以上。y<sub>4</sub> 培养基中不定芽生长较为缓慢(图 2 - H),不定芽分化率大概为 80%;y<sub>3</sub> 培养基

中不定芽长势最差(图 2-G),不定芽分化率仅为 60% 左右。此外观察发现,在  $y_1$ 、 $y_2$  培养基中许多不定芽呈半透明的水浸状,表现出明显的玻璃化现象,并且培养时间越长,这种现象越明显。但在  $y_4$  培养基中不定芽并没有表现出明显的玻

璃化。根据以上结果,可以认为不定芽诱导最适培养基为  $y_1$  培养基,但须要在不定芽产生早期进行增殖培养,以减少玻璃化的发生; $y_4$  培养基则适于不定芽的长期培养。



A、B、C、D 分别为 R1、R2、R3、R4 培养基中愈伤组织的诱导; E、F、G、H 分别为  $y_1$ 、 $y_2$ 、 $y_3$ 、 $y_4$  培养基中不定芽的诱导。

图2 不同诱导培养基中本生烟草愈伤组织和不定芽的生长情况

### 3 结论与讨论

植物激素是植物细胞生长最适宜的调节物质<sup>[11]</sup>。生长素常用来诱导愈伤组织的形成和根的分化<sup>[11-13]</sup>;细胞分裂素的主要生理作用是促进细胞分裂、诱导芽的形成、促进芽的生长<sup>[11,13]</sup>。2,4-D 对启动植物细胞脱分化十分重要,研究表明随着 2,4-D 浓度的增大,植物愈伤组织的诱导能力逐渐增强,但超过一定浓度时,反而对愈伤组织的诱导起抑制作用。本研究表明,本生烟草愈伤组织诱导的最适 2,4-D 浓度为 1 mg/L,该条件下本生烟草叶片细胞脱分化的能力最强,细胞分裂最为旺盛。

KT 是一种细胞分裂素,能促进脱分化的细胞保持旺盛的分裂能力,因此在培养基中添加低浓度 KT 有助于愈伤组织生长和增殖,但 KT 浓度不宜过高,否则会对细胞分裂起抑制作用。对于本生烟草而言,比较合适的 KT 浓度为 0.2 mg/L。在不定芽诱导过程中,6-BA 和 NAA 是 2 种关键成分,它们之间必须维持一个合适比例。当 6-BA、NAA 浓度分别为 1.5、0.1 mg/L 时,不定芽产生较多,生长速度较快,但存在一定程度的玻璃化现象;当 6-BA 浓度达到 3.0 mg/L,不定芽长势较慢,但玻璃化程度较轻。可见,适当提高 6-BA 浓度在一定程度上可减少不定芽玻璃化的产生,这和苏上等的研究结果一致<sup>[4]</sup>,而和崔海涛等的研究结果稍有不同<sup>[5]</sup>。在本生烟草培养过程中,极易产生玻璃化现象,导致试管苗分化能力降低<sup>[14-15]</sup>。为了减少试管苗的玻璃化,一种方法是适当提高 6-BA 浓度,但不定芽产生数量较少;另一种方法是在 6-BA 浓度较低的情况下,先诱导产生较多的不定芽,然后在不含激素的培养基中及时进行继代增殖培养,这样可以降低不定芽出现玻璃化的概率。综上,为了得到更多的不定芽,比较适宜的激素组合为 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,但须要在不定芽形成早期及时进行增殖培养。

对于生根诱导,无论是 MS 培养基还是 1/2MS 培养基,都可诱导不定根的产生;相比之下,在含 0.1 mg/L NAA 的培养基中,不定根长势相对较好,根系比较旺盛。

本生烟草具有普通烟草无可比拟的优点,已成为生命科学基础理论研究中十分重要的模式植物。本研究探索了本生

烟草愈伤组织诱导和再生体系建立的最适条件,对于今后进行单细胞培养和次生代谢物生产,植物遗传转化和性状改良都具有一定参考价值。

### 参考文献:

- [1] 肖军,张云霄,刘伯峰. 烟草的组织培养技术研究[J]. 泰山学院学报,2009,31(6):94-98.
- [2] 周仕顺,掏志章. 烟草的组织培养[J]. 云南农业科技,2005(1):22.
- [3] 朱生伟,徐仲,朱祥春,等. 烟草叶组织培养再生系统的建立[J]. 吉林农业大学学报,1998,20(1):30-32.
- [4] 苏上,张旋,冯思思,等. 本生烟草组培再生及遗传转化的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(20):10530-10531,10607.
- [5] 崔海涛,李春霞,王红艳,等. 本生烟组织培养及遗传转化体系的建立[J]. 山东科学,2006,19(1):23-27.
- [6] Goodin M M, Zaitlin D, Naidu R A, et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2008, 21(8):1015-1026.
- [7] Davarpanah S J, Jung S H, Kim Y J, et al. Stable plastid transformation in *Nicotiana benthamiana*[J]. Journal of Plant Biology, 2009, 52(3):244-250.
- [8] Baulcombe D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(2):109-113.
- [9] Moon K B, Jeon J H, Lee W S, et al. Transient erythropoietin overexpression with cucumber Mosaic virus suppressor 2b in *Nicotiana benthamiana*[J]. Hort Environ Biotechnol, 2012, 53(5):434-440.
- [10] 陈名红,李天飞,陈学军. 培养基及植物激素对烟草原生质体再生植株的影响[J]. 种子,2005,24(9):76-79.
- [11] 杨淑慎. 细胞工程[M]. 北京:科学出版社,2009:23-28.
- [12] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师专学报:自然科学版,2000(2):97-99.
- [13] 王慧英. 影响植物愈伤组织形成的因素研究[J]. 聊城大学学报:自然科学版,2010,23(2):51-53.
- [14] 陈兵先,黄宝灵,吕成群,等. 植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 林业科技开发,2011,25(1):1-5.
- [15] 郭艳茹,詹亚光. 植物离体快繁中的常见问题及防止措施[J]. 黑龙江农业科学,2008(1):19-21.