

# 转基因烟草抗性外植体培育的研究

沙琰琰, 刘 品, 史团省\*, 张志杰, 赵 青

( 郑州大学 生物工程系 生物多样性与生态学研究所, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 研究了不同培养方法、激素种类及质量浓度、抗生素种类及质量浓度对转基因烟草 K326 外植体分化的影响, 并分别对其进行比较。结果表明: 在培育转基因烟草 K326 抗性外植体的不同时期, 依次选用最佳配方的烟草叶盘共培养基培养基 MS+1 mg/L 6 BA + 0.1 mg/L NAA、烟草滤菌培养基 MS+1 mg/L 6 BA + 0.1 mg/L NAA+500 mg/L Carb、烟草筛选培养基 MS+100 mg/L Kan、烟草继代培养基 MS+80 mg/L Kan+300 mg/L Carb、烟草生根培养基 MS+0.1 mg/L NAA+300 mg/L Carb 对转基因烟草外植体进行培育, 可使转基因烟草外植体分化迅速, 获得质量优良的试验材料, 为进一步培育得到理想的转基因烟草 K326 完整植株奠定了工作基础。不同培养条件对外植体分化有较显著的影响, 28℃、16h 光照最利于转基因烟草 K326 的外植体分化生长。

**关键词:** 转基因烟草; 外植体; 培养基; 转化; 共培养

**中图分类号:** S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)10-0052-04

## Research on Cultivation of Transgenic Tobacco's Explant

SHA Yan yan, LIU Pin, SHI Tuan sheng\*, ZHANG Zhi jie, ZHAO Qing

( The Research Institute of Biodiversity and Ecology, Department of Bioengineering,

Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** This research was to study the influence of different cultivation methods, hormones and antibiotics on explant differentiation of transgenic tobacco. There were five different culture media for the research, including MS+1 mg/L 6 BA + 0.1 mg/L NAA for co cultivation, MS+1 mg/L 6 BA+0.1 mg/L NAA+500 mg/L Carb for sterilization cultivation, MS+100 mg/L Kan for screening, MS+80 mg/L Kan+300 mg/L Carb for subculture, and MS+0.1 mg/L NAA+300 mg/L Carb for root induction. With these mediums the explant of transgenic tobacco K326 could differentiate rapidly, which laid the basis for further cultivation of the whole plants of transgenic tobacco K326.

**Key words:** Transgenic tobacco; Explant; Culture medium; Transformation; Co cultivation

烟草作为重要的经济作物, 不仅对国民经济的发展起着重要作用, 而且作为模式植物在植物研究中得到广泛应用。培育优良抗性烟草品种, 增加烟草品种及种类直接关系着烟草业的发展进程。烟草在植物组织分化研究中占据了重要的地位, 由于其易进行组织培养得到再生植株, 被广大学者誉为植物组织培养的理想植物, 也是研究植物细胞分化和

脱分化的理想材料<sup>[1-2]</sup>。近年来, 通过植物基因工程方法培育出大量转基因烟草新品种, 大大提高了烟草的抗病性和抗寒性。许多学者在烟草外植体再生植株的研究方面取得了显著的成果, 这些成果不仅对改进烟叶的品质、产量以及农业经济技术发展发挥了重要作用, 同时也为开展烟草试验奠定了重要的理论基础<sup>[3-5]</sup>。在转基因烟草 K326 抗性外植体

收稿日期: 2011-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771301); 教育部留学回国人员科研启动基金项目

作者简介: 沙琰琰(1985), 女, 河南桐柏人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物生理与分子生物学。E-mail: 165669487@qq.com

\*通讯作者: 史团省(1962), 女, 河南桐柏人, 教授, 博士, 主要从事植物生理营养与保护研究。E-mail: sts@zzu.edu.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分化的不同时期采用不同激素和抗生素配比的培养基进行培养, 目的是为了使转基因烟草外植体得到很好的分化, 获得质量优良的试验材料, 为进一步得到转基因烟草新品种 K326 的研究工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试材料为烟草品种 K326, 种子由河南农业大学烟草学院实验室保存, 取其 1 个月大无菌苗叶片为转化外植体。

1.1.2 菌株和质粒 植物表达载体 pBI12t-SHN1 /WIN1 和根癌农杆菌均由郑州大学生物工程系植物生理与营养实验室构建和保存。植物表达载体 pBI12t-SHN1 /WIN1 带有 *Npt II* 抗 Kan(卡那霉素)基因<sup>[9]</sup>。

1.1.3 主要试剂 琼脂、蛋白胨、酵母提取物、抗生素均为 Solarbio 公司分装; 其他生化试剂和常规试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 转基因烟草外植体培育方法

1.2.1 培养基配制方法 (1)YEB 培养基: 牛肉膏(5 g/L)、酵母抽提物(1 g/L)、蛋白胨(5 g/L)、蔗糖(5 g/L)、MgSO<sub>4</sub>(2 mmol/L), pH 值 7.2, 固体培养基含琼脂 15 g/L<sup>[7 8]</sup>; (2)烟草基本培养基 T0: MS; (3)烟草叶盘共培养培养基 T1 有以下几种配方: MS+6 BA+NAA; MS+6 BA+2, 4 D; MS+IAA+KT; (4)烟草滤菌培养基 T2 有以下几种配方: MS+适量激素+Carb+Kan; MS+适量激素+Carb; (5)烟草筛选培养基 T3 有以下几种配方: MS+Carb+Kan; MS+Kan; (6)烟草继代培养基 T4 有以下几种配方: MS+Carb+Kan; MS+Kan; (7)烟草生根培养基 T5: MS+0.1 mg/L NAA+Carb; MS+0.1 mg/L NAA+Kan。

1.2.2 外植体的侵染及共培养 烟草品种 K326 的种子经消毒铺于 MS 培养基上, 取萌发后生长 1 个月的叶片作材料<sup>[9 11]</sup>。剪取 1 cm<sup>2</sup> 的叶盘放在铺有滤纸的 T0 基本培养基上, 弱光预培养 1~2 d。将叶盘外植体取出浸入制备好的农杆菌菌液中, 感染 5 min<sup>[12 13]</sup>, 取出外植体用无菌滤纸吸去表面多余的菌液, 放入 T1 培养基上, 培养 2~4 d。将外植体从 T1 转移到 T2 培养基上, 培养 3~7 d。将外植体从 T2 转移到 T3 培养基上, 光照培养 20 d 左右, 将长出大量愈伤组织的抗性外植体分割成小块后转入 T4 培养基。待筛选的抗性芽长至 1~1.5 cm 时, 切下并转入生根培养基 T5 上, 最终获得具有卡那霉素抗性的转基因烟草植株。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对烟草抗性外植体分化的影响

2.1.1 激素配比对转基因烟草 K326 外植体分化的影响 本试验选取了 5 种外源激素 6 BA、NAA、2, 4 D、IAA 和 KT, 采用不同激素种类和质量浓度对转基因烟草 K326 外植体进行培育, 结果显示, 不同激素对转基因烟草 K326 外植体分化的影响差异较大。选取 6 BA 和 NAA 两种激素组合对转基因烟草 K326 外植体进行培养得出结果: 1 mg/L 6 BA 和 0.1 mg/L NAA 组合培育转基因烟草 K326 外植体, 愈伤组织易形成且量大、出芽量和生根量多。1 mg/L 6 BA 和 0.1 mg/L NAA 激素组合能够很好诱导转基因烟草外植体分化, 可以作为诱导转基因烟草外植体分化的外源激素(表 1)。选取 6 BA 和 2, 4 D 两种激素组合对转基因烟草 K326 外植体进行培养时, 较高质量浓度的 2, 4 D 能够杀死外植体, 较低质量浓度的 2, 4 D 对外植体分化的诱导效果不好, 2, 4 D 不适合作为诱导转基因烟草外植体分化的外源激素(表 2)。选取 1 mg/L KT 和 0.5 mg/L IAA 组合培育外植体, 愈伤组织量、出芽量和生根量较多, 较高质量浓度的 IAA 抑制了外植体出芽量和生根量, 较高质量浓度的 KT 对愈伤组织的形成和生根量也产生抑制(表 3)。

表 1 6 BA 和 NAA 不同质量浓度配比对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养基组合	6 BA / (mg/L)	NAA / (mg/L)	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	1	0.1	+++	+++	+++
2	2	0.1	/	+++	+
3	2	0.2	/	+++	/
4	2	0.5	/	+++	+
5	2.5	0.1	+++	/	+
6	2.5	0.2	+++	/	+

注: /表示无, +表示少, ++表示一般, +++表示多, 下同

表 2 2, 4 D 和 6 BA 不同质量浓度配比对转基因烟草外植体分化的影响

培养基组合	6 BA / (mg/L)	2, 4 D / (mg/L)	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	0.5	1	/	+	+
2	1	1	+	+	+
3	0.5	1.5	+	+	/
4	1	1.5	/	+	/
5	0.5	2	/	/	/
6	0.5	2.5	/	/	/

表 3 IAA 和 KT 不同质量浓度度配比对转基因烟草外植体分化的影响

培养基组合	KT / (mg/L)	IAA / (mg/L)	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	1	0.5	++	++	++
2	1	1.5	+	+	+
3	2	0.5	+	+++	+
4	2	1.5	+	++	+

2.1.2 不同抗生素对转基因烟草 K326 外植体分化的影响 试验证实, T2、T3、T4 培养基中加入不同种类和用量的抗生素对烟草外植体分化的影响较大, 对农杆菌的控制能力也有较大的差异。T2 中加入 500mg/L Carb, 外植体分化较好, 农杆菌得到有效抑制(表 4)。T3 中加入 100mg/L Kan, 能很好地抑制农杆菌污染, 同时愈伤组织的形成、出芽量、生根量较多(表 5)。T4 中加入 80mg/L Kan 和 300mg/L Carb 可以很好抑制农杆菌二次泛滥, 同时不影响外植体后期分化生长(表 6)。T5 中加入 300mg/L Carb 和 100mg/L Carb 外植体生根量大(表 7)。

表 4 T2 培养基中加入不同抗生素对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养基组合	Carb / (mg/L)	Kan / (mg/L)	农杆菌泛滥程度	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	500	100	/	/	/	/
2	500	0	/	+++	+++	++
3	200	100	+	++	++	++
4	300	100	/	+	+	+

表 5 T3 培养基中加入不同抗生素对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养基组合	Carb / (mg/L)	Kan / (mg/L)	农杆菌泛滥程度	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	500	100	/	/	/	/
2	200	100	/	++	++	++
3	0	100	/	++	+++	+++
4	0	80	/	++	+++	++
5	0	60	+	+++	+++	+++

表 6 T4 培养基中加入不同抗生素对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养基组合	Carb / (mg/L)	Kan / (mg/L)	农杆菌泛滥程度	愈伤组织量	出芽量	生根量
1	300	80	/	++	+++	++
2	100	80	+	++	++	++
3	/	100	+++	+	+	+
4	/	80	+++	++	+++	+++

表 7 T5 培养基中加入不同抗生素对转基因烟草 K326 生根培养的影响

培养基组合	Carb / (mg/L)	Kan / (mg/L)	生根量
1	300	0	++
2	100	0	++
3	0	100	+
4	0	80	+

2.2 培养时间对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养时间长短对转基因烟草外植体分化和农杆菌泛滥程度控制尤为显著。在 T1 培养基中培养 3d 既能够有效诱导愈伤组织的形成, 同时又能够避免培养基受农杆菌污染。在 T2 培养基中培养 5d 移入 T3 培养基, Carb 对农杆菌抑制效果很好, 外植体健康, 移入 T3 培养基后农杆菌无泛滥现象, 外植体正常分化。在 T3 培养基中培育 3 周左右, 转基因烟草外植体会出现大量绿色小芽。

2.3 温度和光照时间对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

用 22℃、28℃、32℃ 3 个温度梯度分别对转基因烟草 K326 外植体进行 16h 和 20h 的光照培养试验。结果显示, 外植体在 28℃、16h 光照条件下分化速度快, 质地好(表 8)。

表 8 温度和光照时间对转基因烟草 K326 外植体分化的影响

培养条件组合	温度 /℃	光照/h	外植体分化程度
1	32	20	++
2	32	16	++
3	28	20	++
4	28	16	+++
5	22	20	+
6	22	16	+

3 结论与讨论

外源激素对转基因烟草外植体分化有着至关重要的影响。适量的外源激素能够在外植体分化初期和内源激素相互作用诱导外植体分化, 外源激素量过高或者过低都能阻碍转基因烟草外植体分化。本试验选取 6BA 和 NAA、6BA 和 2,4-D、IAA 和 KT 3 组激素组合分别对转基因烟草 K326 外植体进行培育, 结果表明, 1mg/L 6BA 和 0.1mg/L NAA 组合培育出的外植体数量最多且质地最好。

抗生素对转基因烟草外植体分化影响也较大。在诱导转基因烟草外植体分化过程中 Carb 是一种

良好的抑菌抗生素。在滤菌培养期加入 500mg/L Carb 能够很好的抑制农杆菌污染, 同时不影响外植体分化。在筛选培养期加入 100mg/L Kan 能够有效筛选出转基因烟草 K326 抗性外植体。在继代培养期加入 80mg/L Kan 和 300mg/L Carb 可防止农杆菌二次污染及其他杂菌污染培养基。

不同培养条件对外植体分化也有一定影响, 28℃、16h 光照最利于转基因烟草 K326 的外植体分化生长。外植体在含水量较高、质地较软的培养基中易于存活分化。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [ M ]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [ 2 ] 王荔, 杨艳琼, 杨德, 等. 不同激素浓度及培养基对烟草愈伤组织分化的影响 [ J ]. 云南农业大学学报, 1999, 14 (4): 374 375.
- [ 3 ] 慕平利, 崔红. 烟草叶片直接再生——基因转化体系的建立 [ J ]. 河南农业科学, 2005( 4 ): 27 29.
- [ 4 ] 郭晓才, 吴伯骥. *Gus* 基因转入烟草细胞通过科间细胞共培养在胡萝卜再生植株中的表达 [ J ]. 山西农业科学, 1995, 23( 4 ): 3 9.
- [ 5 ] 彭剑涛, 向结. 利用组织培养技术获得烟草抗性材料的研究 [ J ]. 种子, 2002( 3 ): 26 27.
- [ 6 ] 柴凌燕, 翁海波, 王冰. 蜡质相关转录因子 SHN1/ WIN1 基因的克隆和植物表达载体的构建 [ J ]. 贵州农业科学, 2010, 38( 4 ): 26 29.
- [ 7 ] Kyoizuka J, McElroy D, Hayakawa T, *et al.* Light regulated and cell specific expression of tomato *rbcS gusA* and rice *rbcS gusA* fusion genes in transgenic rice [ J ]. Plant Physiol, 1993, 102( 3 ): 994 1000.
- [ 8 ] Taylor D, Katavic V, Zou J, *et al.* Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn 2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield [ J ]. Mol Breed, 2002, 8: 317 322.
- [ 9 ] 刘涤, 迟静芬, 刘桂云. 6 BA 对烟草愈伤组织芽器官分化过程的调节作用 [ J ]. 实验生物学报, 1980, 13( 2 ): 223 226.
- [ 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 ] 杨万年, 张秀红, 熊永华, 等. 2, 4-D 和激动素对烟草愈伤组织 IAA 氧化酶和细胞分裂素氧化酶活性的影响 [ J ]. 植物生理学通讯, 2003, 39( 6 ): 589 591.
- [ 12 ] Zhang G, Chen M, Li L C, *et al.* Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [ J ]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60( 13 ): 3784 3796.
- [ 13 ] Wang H Z, Chen X W, Xing X G, *et al.* Transgenic tobacco plants expressing *atzA* exhibit resistance and strong ability to degrade atrazine [ J ]. Plant Cell Rep, 2010, 29: 1394 1399.