

本生烟组织培养及遗传转化体系的建立

崔海涛¹, 李春霞¹, 王红艳¹, 陈红运², 竺晓平¹, 时呈奎¹, 李向东^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 国家质检总局动植物检疫实验所, 北京 100029)

摘要: 本文研究了通过农杆菌侵染获得本生烟 (*Nicotiana benthamiana*) 转基因植株的方法。将本生烟中上部叶片消毒后切成 5mm × 5mm 左右的小块作为外植体, 在含有 6-BA (3mg/L) 和 NAA (0.2mg/L) 的 MS 培养基中培养 2~3d, 用含有表达载体的农杆菌侵染后共培养 3~4d, 转入含有 6-BA (3mg/L)、NAA (0.2mg/L) 和卡那霉素 (100mg/L) 的 MS 培养基中培养 2~3 周。将外植体边缘产生的愈伤组织和芽点转移到只含有卡那霉素 (100mg/L) 的 MS 培养基中继续培养, 2 周后分化出大量不定芽。继续培养 2 周, 当芽长 1~3cm 时, 将芽转移到含 IBA (0.1mg/L) 的 MS 培养基中分化生根, 得到再生植株。当再生植株高 8~10cm、根长 4~5cm 以上时, 移栽到经过灭菌的营养土中。通过实时荧光 PCR 扩增, 从获得的植株中检测 35S 启动子和 NOS 终止子外源基因片段, 判定所得的植株的确为转基因植株。最后对本生烟组织培养中应该注意的问题进行了讨论。

关键词: 本生烟; 组织培养; MS 培养基; 实时荧光 PCR

中图分类号: S572.035.3

文献标识码: A

在研究植物病毒基因功能、致病机理和转基因植物抗病毒机制等过程中, 烟草是重要的模式植物^[1-5]。目前, 国内烟草转基因研究一般用普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 作为受体植物, 而国外多用本生烟 (*N. benthamiana*)^[4, 5]。本生烟具有生长速度快, 生命周期短的优点, 但完全按照普通烟的组培条件培养本生烟, 容易出现外植体褐化、玻璃化严重等现象, 很难得到再生植株。为解决上述问题, 我们研究了在培养基中加入不同种类和浓度的激素对本生烟叶组织器官分化的影响, 探讨了能形成大量不定芽、促进生根以及再生植株向土壤移栽的条件, 为本生烟的转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 本生烟 (*Nicotiana benthamiana*) 组培体系的建立

1.1.1 烟草

本生烟种子由中国农业大学植物病毒研究室惠赠。

1.1.2 培养基

以 MS 为基本培养基, 设以下处理: ① MS + 6-BA (3mg/L) + NAA (0.2mg/L); ② MS + 6-BA (1mg/L) + NAA (0.1mg/L); ③ MS + IBA (0.1mg/L); ④ MS。以上培养基 pH 值调至 5.8, 在 121~126℃ 恒温下灭菌 20min 后使用。

1.1.3 处理

(1) 取营养生长时期的植株中上部叶片, 用自来水冲洗干净, 吸干叶面多余的水分, 先在 70% 乙醇中消毒 30s, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 8~10min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次, 除去叶片的边缘和主脉, 切成 0.5cm ×

收稿日期: 2005-06-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30100117); 山东省优秀中青年科学家奖励基金 (2004BS06002)

作者简介: 崔海涛 (1979-), 男, 山东农业大学 2005 届硕士毕业生。崔海涛和李春霞贡献相同。

* 通讯作者: 李向东, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物病毒学。E-mail: xdongli@sdaa.edu.cn

0.5cm左右小块。

(2) 将剪好的叶盘平放于①号培养基中,使其下表皮与培养基接触。预培养 2~3d。培养条件为每天光照 16h, 22℃, 黑暗 8h, 20℃, 光照强度 2000 Lux。

(3) 生芽期设 3 个处理:

(a) 叶片放在①号培养基中,每 2~3 周更换一次新的培养基;(b) 叶片放在①号培养基中,待外植体边缘产生大量愈伤组织和芽点后,将其转入②号培养基中继续培养;(c) 叶片放在①号培养基中,待外植体边缘产生大量愈伤组织和芽点后,将其转入④号培养基中继续培养。

(4) 当培养皿内外植体边缘生出不定芽,芽长 1~3cm 时,将芽掰下转入生根罐中继续培养生根,设 2 个处理:(d) 芽放在④号培养基中培养;(e) 芽放在③号培养基中培养。

(5) 待根系发育后,移入盛有无菌土的花盆中,用塑料薄膜保湿 6~10d,室温常规管理。

1.2 本生烟遗传转化体系的建立及实时荧光 PCR 检测 35S 启动子及 NOS 终止子

1.2.1 本生烟遗传转化体系的建立

叶片的消毒及预培养同前。携带 pROKII(带有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和卡那霉素抗性基因)载体的农杆菌接种于含有卡那霉素(100mg/L)的 LB 液体培养基中,28℃,220r/min,震荡培养约 48h,至对数生长期;将菌液用 MS 培养液稀释 10 倍。将预培养后的烟草叶片浸入准备好的菌液中 10min,取出后用灭菌的吸滤纸吸干多余菌液,接入④号培养基,弱光下 22℃共培养 3~4d。共培养后按所建立的组培体系培养(培养基中加 100mg/L 卡那霉素选择培养),得到 pROKII 转化的植株。

1.2.2 植株总 DNA 的提取

称取 100mg 叶片至 Eppendorf 管中,加入石英砂用研棒磨碎后加入 500μL 2% CTAB 提取溶液,混匀后于 65℃孵育 30min;用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提匀浆液,颠倒使之充分混合;4℃,12000r/min 离心 10min,吸取水相;在回收的水相中加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液,颠倒混匀,室温放置 60min;4℃下 12000 r/min 离心 10min,弃上清;500μL NaCl (1.2mol/L) 缓冲液重悬沉淀;加入 500μL 氯仿,混匀;12000r/min 离心 10min;吸取水相,加 0.6 倍体积的异丙醇,充分混匀;12000r/min 离心 10min,弃上清;用 70%乙醇洗涤沉淀,室温干燥后,将 DNA 溶于 50μL 灭菌双蒸水中。

1.2.3 35S 启动子或 NOS 终止子基因的 PCR 扩增反应

20μL 扩增反应体系中含 10X PCR 缓冲液 2.0 μL, Mg²⁺ 终浓度 2.5 mmol/L, dNTP 终浓度 0.2 mmol/L, 0.2U Taq 酶, 0.2 μmol/L 35S 启动子基因的引物(或 0.2 μmol/L NOS 终止子基因的引物), 0.1 μmol/L 35S 启动子荧光双链探针(或 0.1 μmol/L NOS 终止子荧光双链探针), 5 μL 模板 DNA。引物和探针^[6]分别由上海生工生物工程有限公司和上海博亚生物技术有限公司合成。

扩增反应条件均为 95℃预变性 10min, 95℃变性 15s, 60℃ 1min 运行 40 个循环。荧光信号收集温度为 60℃。ABI PRISM 7700 型荧光定量 PCR 仪检测荧光。

实验中以非转基因植株和双蒸水分别做阴性对照和空白对照,以含有 35S 启动子和 NOS 终止子的质粒为阳性对照。

2 结果

2.1 本生烟组培体系的建立

2.1.1 芽分化

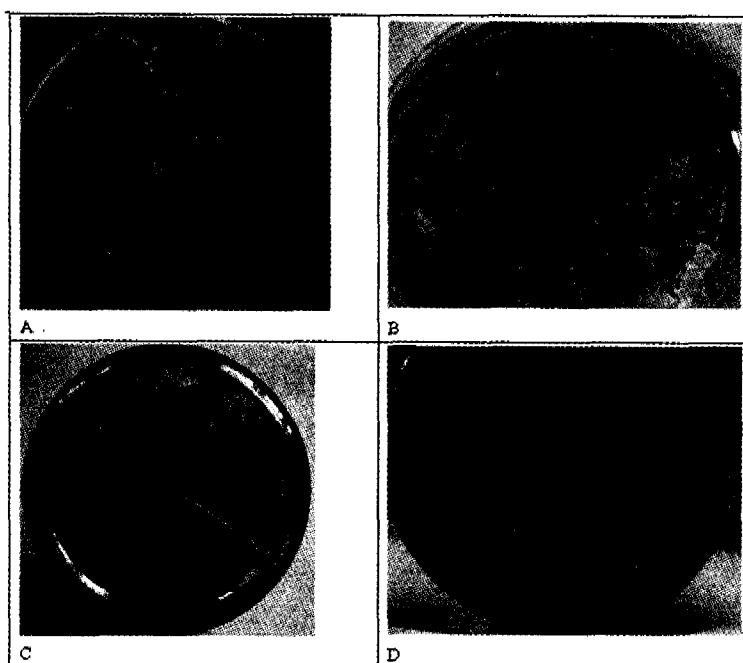
经过 2~3 周的培养,所设的 3 个处理中外植体的边缘都由少到多出现愈伤组织和芽点。继续培养一段时间,在处理 a 中,大量外植体慢慢变褐,玻璃化现象严重,只有少量的愈伤组织产生 1~2 株不定芽,大部分的愈伤组织均不分化(见图 1A);在处理(b)中,玻璃化现象明显减轻,大部分的愈伤组织可以分化,但芽分化率仍然很低,每一愈伤组织只产生 1~2 株不定芽,且芽生长缓慢;在处理(c)中,分化出较多的丛生芽,绝大

多数愈伤组织能够产生3株以上不定芽,几乎没有玻璃化现象(见图1B)。

2.1.2 生根

在处理(d)中,再生苗生根缓慢,约4~5周后才长出稀疏幼根,生根率60%。根的生长较为缓慢,约8周后可出罐移苗(见图1C)。而在处理(e)中,再生苗约2周便可生根,生根率90%,根生长较快,约4~5周后就可出罐移苗(见图1D)。

在此过程中,幼苗基部若产生愈伤组织,要及时切除,重新放在培养基内,可加快生根的速度。



A:愈伤组织在含有3mg/L 6-BA, 0.2mg/L NAA 和100mg/L 卡那霉素的MS培养基中的芽分化情况;

B:在上述培养基中生长2周后转移到只含100mg/L 卡那霉素培养基中的芽分化情况;

C:在固体MS培养基中的生根情况; D:在含有0.1mg/L IBA 的固体MS培养基中的生根情况。

图1 本生烟在培养基中的芽分化和诱导生根

2.1.3 移栽

在生根培养罐中,注意观察再生苗根的生长状况。当根布满罐底,幼苗高8~10 cm时,移栽。移苗后,由于本生烟苗柔弱,要先放在室内罩上塑料膜保湿6~10 d,然后方可移到温室内生长。若是在夏季,温度较高,湿度大,易生腐霉,幼苗根茎交接处易腐烂,严重影响成活率,这时,一定要控制育苗基质的湿度,仔细管理,及时在叶面喷水。

2.2 实时荧光PCR检测转基因植株

2.2.1 35S启动子基因检测结果

利用实时荧光PCR技术对农杆菌侵染得到的再生植株中有无35S启动子基因进行了检测,结果如图2所示。空白对照及阴性对照未见增长信号,而阳性对照信号较强。一共检测了94株再生植株,其中91株的荧光曲线呈S型增长,信号积累量较强,证明组培植株中35S外源基因确已整合到染色体上。图2中列出了再生植株prok1、prok2、prok3和prok4的检测曲线。

2.2.2 NOS终止子基因检测结果

利用同样方法检测组培植株中NOS终止子基因的有无。空白对照及阴性对照未见增长信号,而阳性对照信号较强。94株再生植株中有91个样品的荧光曲线呈S型增长,荧光信号积累量较强,说明NOS外源基因确已整合到所获组培植株的染色体上。图3列出了再生植株prok1、prok2、prok3、prok4的检测曲线。

对35S启动子基因及NOS终止子基因的检测结果表明我们获得的再生植株中转基因植物的阳性率为96.8%。

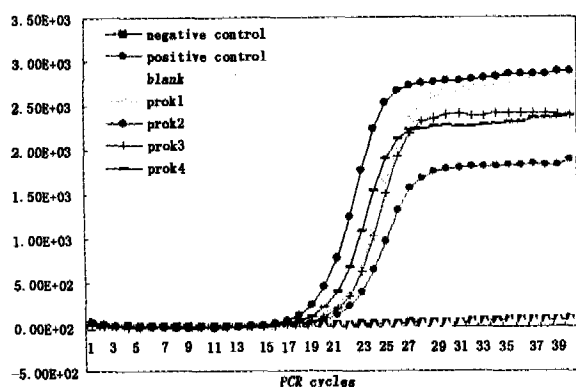


图2 利用实时荧光 PCR 检测
转基因本生烟植株中的 35S 启动子

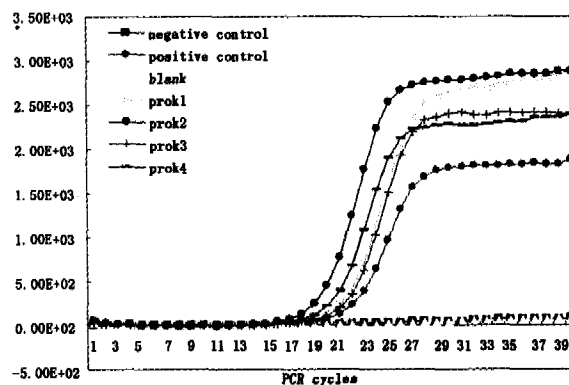


图3 利用实时荧光 PCR 检测
转基因本生烟植株中的 NOS 终止子

3 结论与讨论

本试验以本生烟叶片为外植体材料,建立了本生烟的愈伤组织再生系统。本生烟叶盘在含有 6-BA (3mg/L) 和 NAA (0.2mg/L) 的 MS 培养基中培养 2~3d,用含有表达载体的农杆菌侵染后共培养 3~4d,转入含有 6-BA (3mg/L)、NAA (0.2mg/L) 和卡那霉素 (100mg/L) 的 MS 培养基中培养 2~3 周后在外植体的边缘产生愈伤组织和芽点,这时将其转移到 MS 培养基(不含激素)中继续培养。当分化出的不定芽长 1~3cm 时,将芽转移到含 IBA (0.1mg/L) 的 MS 培养基中分化生根,形成完整的再生植株。再生植株移栽到经过灭菌的营养土中,并在温室中继续生长。

实时荧光 PCR 检测结果表明,我们已经获得了转化空载体的本生烟植株,建立了本生烟的遗传转化体系。

在整个培养过程中激素的使用起到非常关键的作用^[7-9]。在本生烟不定芽的分化过程中,高浓度激素水平下诱导外植体脱分化形成愈伤组织,然后降低激素水平至不加激素,控制了外植体的玻璃化现象,成功地得到了大量的不定芽。若激素浓度一直为 6-BA (3mg/L) + NAA (0.2mg/L),则再生组织褐化或玻璃化现象严重。但若激素浓度一直较低,则不定芽的分化受到影响,分化率低。这与普通烟组织培养中激素的使用不同。我们在普通烟组培不定芽的诱导过程中,所用激素一直为 6-BA (3mg/L) + NAA (0.2mg/L)。在本生烟的芽生根时,加入低浓度的生长素 IBA,能够解决本生烟生根速度慢的问题,而普通烟不需加入激素生根速度即可较快,生长势强。

幼苗的苗龄对移苗(幼苗从育苗罐移到花盆)的成活率影响较大。本生烟再生植株生长势较弱时移苗的死亡率较高。苗龄过大时,移苗的死亡率也会增大。在其主茎没有分叉且较为强壮时(约 10cm)移苗,再生植株的成活率较高。

在移苗过程中,温度对幼苗的成活率影响也很大。在湿热的夏天移苗,组培苗的成活率较低。春秋季节移苗时,成活率则较高。另外,在将幼苗移到温室中之前,需要在室内放置 6~10d(可根据再生植株的生长势确定),并罩有塑料薄膜保湿,根据湿度定期喷水。本生烟喜强光,生长适温约 22℃,在光照培养箱中生长最佳。

本实验虽获得了本生烟组织培养的初步培养条件,但仍存在问题与不足。不定芽的分化率与普通烟相比较低,这可能与本生烟自身的生长因素有关。移苗的成活率与普通烟相比也较低,应该在以后的试验中加以改进。

参考文献:

- [1] Toth R L, Chapman S, Carr F, Santa Cruz, S. A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors[J]. FEBS

- Letters, 2001, (489): 215 – 219.
- [2] Qu F, Ren T, Morris T J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step[J]. Journal of Virology, 2003, 77(1): 511 – 522.
- [3] Iyer L M, Hall T C. Virus recovery is induced in *Brome mosaic virus* p2 transgenic plants showing synchronous complementation and RNA-2-specific silencing[J]. MPMI, 2000, 13(3): 247 – 258.
- [4] van den Boogaart T, Wen F, Davies J W, Lomonosoff G P. Replicase-derived resistance against *Pea early browning virus* in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon posttranscriptional gene silencing[J]. MPMI, 2001, 14(2): 196 – 203.
- [5] Savenkov E I, Valkonen J P T. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants[J]. Journal of General Virology, 2002, 83: 2325 – 2335.
- [6] 陈红运, 黄文胜, 赵文军, 朱水芳, 陈洪俊. 应用实时荧光 PCR 方法检测转基因植物产品[A]. 中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004. 503 – 507.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 李凌明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992.
- [9] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78 – 84.

Construction of tissue culture and genetic transformation systems of *Nicotiana benthamiana*

CUI Hai-tao¹, LI Chun-xia¹, WANG Hong-yan¹, CHEN Hong-yun², ZHU Xiao-ping¹, SHI Cheng-kui¹, LI Xiang-dong¹

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Institute of Animal and Plant Quarantine, AQSIQ, Beijing 100029, China)

Abstract: The procedure to obtain regenerated *Nicotiana benthamiana* plants was explored in this paper. About 5mm × 5mm tobacco leaf discs were excised and inoculated to solid MS medium containing 6-BA (3mg/L) and NAA (0.2mg/L) for 2 ~ 3 days, then co-cultivated in dark for 3 ~ 4 days with agrobacterium strain LBA4404 harboring the plasmid pROK II that carrying 35S promoter, NOS terminator and kanamycin resistant genes. The leaf discs were transferred to solid MS medium that contained 6-BA (3mg/L), NAA (0.2mg/L) and kanamycin (100mg/L) as selective markers for transgenic plants. After ca. 2 ~ 3 weeks, resistant calli could be obtained. They were further transferred to solid MS medium that only contained kanamycin (100mg/L). The calli were expected to become shoots. Two weeks later, the shoots that were 1 ~ 3cm long were transferred to MS rooting medium that contained IBA (0.1mg/L). Those shoots usually developed roots in 2 weeks. When the plantlets were about 8 ~ 10cm high and had 4 ~ 5cm long roots, they were transferred into pots filled with sterilized nutrient soil. Through amplification of 35S promoter and NOS terminator genes by Real-time fluorescent PCR, the regenerated *N. benthamiana* were confirmed to be transgenic ones. Some considerations on the key steps in regenerating *N. benthamiana* plants were discussed.

Key words: *Nicotiana benthamiana*; tissue culture; MS media, real-time fluorescent PCR;

* The first two authors contribute equally to this research