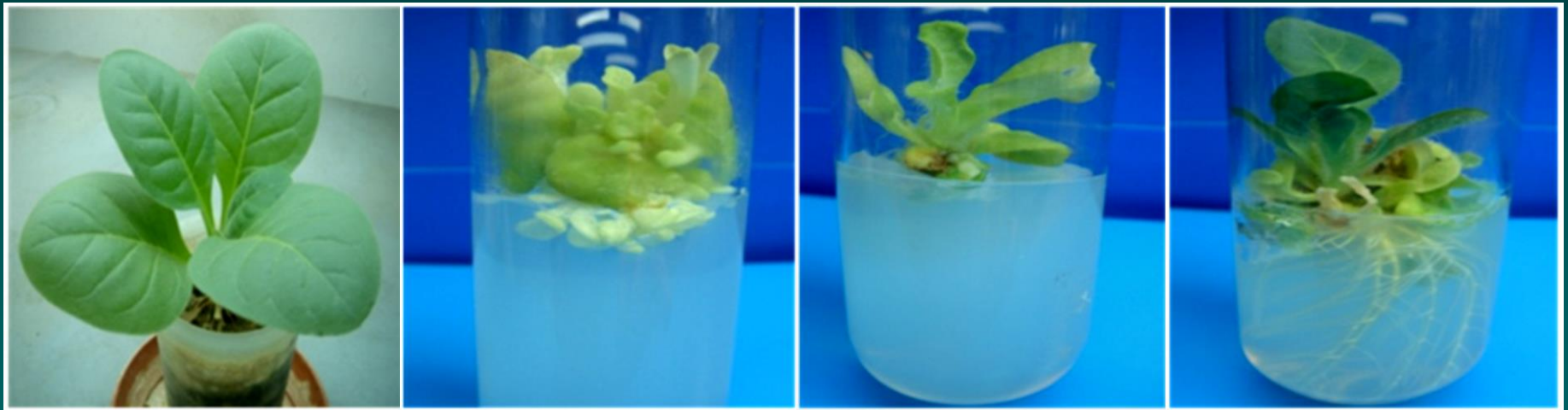


烟草组织培养与植株再生



【实验目的】

1、掌握烟草组织培养愈伤组织诱导和植株再生的方法。

2、学习不同植物激素比例对植物组织愈伤组织诱导和器官分化的作用。



【实验原理】

组织培养不仅是一种植物快速繁殖的手段，同时也是植物改良、种质保存和次生物质生产的理想途径。**烟草**是典型的基因工程模式植物，易于进行组织培养，容易得到再生的转化植株。植物细胞具有“**全能性**”，即植物细胞具有该植物体全部遗传的可能性，在一定条件下具有发育成完整植物体的潜在能力。以植物离体细胞或组织为培养材料，可以诱导脱分化形成愈伤组织，并通过再分化诱导形成芽、根等器官并再生成完整植物体。

本实验通过配制培养基和接种培养来实现烟草幼苗叶片愈伤组织诱导、分化及植株再生，了解不同植物激素比例对植物组织愈伤组织诱导和器官分化和植株再生的作用。



植物组织培养(plant tissue culture) 指植物的任何器官、组织或细胞，在人工预知的控制条件下，放在含有营养物质和植物生长调节物质等组成的培养基中，使其生长、分化形成完整植株的过程。其定义又有广义和狭义之分。

狭义的植物组织培养
对植物小块组织的培养。

广义的植物组织培养
泛指将植物体的各种结构成分（如植物细胞、植物原生质体、植物组织以及植物器官）放在离体的、无菌的人工环境中让其生长发育的方法。

由于培养的对象大多是脱离母体的外植体，所以植物组织培养也叫**离体（体外）培养**。



植物组织培养的理论依据是植物细胞具有全能性(totipotency)。

所谓细胞全能性是指任何一个细胞都携带着一套发育成完整个体的全部遗传信息，细胞或组织在离体培养情况下，这些信息可以表达，再生成为整个体。





一、试剂与器材

1. 试剂:

- 1) MS培养基固体复合试剂
- 2) 蔗糖
- 3) 琼脂粉
- 4) 6-BA
- 5) NAA
- 6) NaOH
- 7) HCl
- 8) pH试纸 (pH5-7)

2. 器材:

天平、烧杯，量筒，蓝口试剂瓶，灭菌锅、培养皿、滤纸、解剖剪、解剖刀、封口膜、光照恒温培养箱等。



二、实验方法

1. 培养基的配制

(1) 愈伤组织诱导及幼芽分化培养基:

MS+ NAA 0.1 mg/L +6-BA 1.0 mg/L;

(2) 生根培养基: MS+NAA 0.2 mg/L。

上述培养基均附加3%蔗糖, 0.7 %琼脂, pH5.8。

培养温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度 2 000 lx。

2. 培养基的灭菌

高压蒸汽灭菌 (湿热灭菌法), 使用自动高压灭菌锅, 121°C , 15min。



3. 烟草叶片愈伤诱导及不定芽分化

取烟草苗幼嫩叶片1 ~ 2片，70%酒精表面快速消毒30s，在超净工作台上用10% Bleach消毒10min，无菌水清洗3-4次，于无菌培养皿中，将叶片切成1.0~1.5平方厘米的小方块，接入愈伤组织诱导及幼芽分化培养基中培养。约2~3d后，叶片外植体卷曲、增厚、膨胀，15d后外植体脱分化形成疏松浅黄绿色的愈伤组织。

20-30d后，从叶片外植体产生的疏松愈伤组织上分化出浅黄绿色芽点。

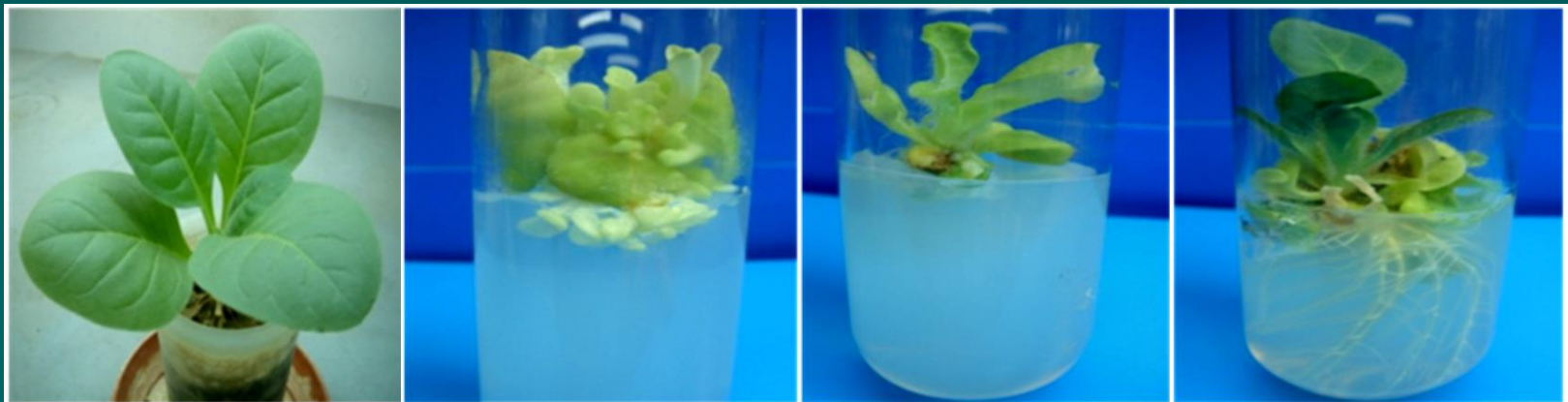


4. 幼芽的增殖

将幼芽切下，转接至新鲜的愈伤组织诱导及幼芽分化培养基上，可不断增殖，发育成绿色健壮的小苗。光照时间8~12小时，温度通常在23~28℃之间。

5. 诱导生根及移栽

截取约3~4cm长的无根小苗接种于生根培养基中，约7~14d后，小苗基部产生白色幼根。当试管苗长至5~6cm高时，打开瓶口，在散射光下放置2d后取出，洗去根部残留培养基，种植于经过消毒的珍珠岩、泥炭土和菜园土等量混合的基质中。



附 培养基配方:

MS培养基 mg/L

大量元素: NH_4NO_3	1 650
KNO_3	1 900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	700

微量元素: KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27.8) + $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (37.3)	

有机成分: 肌醇 100

烟酸 0.5

盐酸吡哆醇 (维生素B6) 0.5

盐酸硫胺素 (维生素B1) 0.5

甘氨酸 2

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-497.



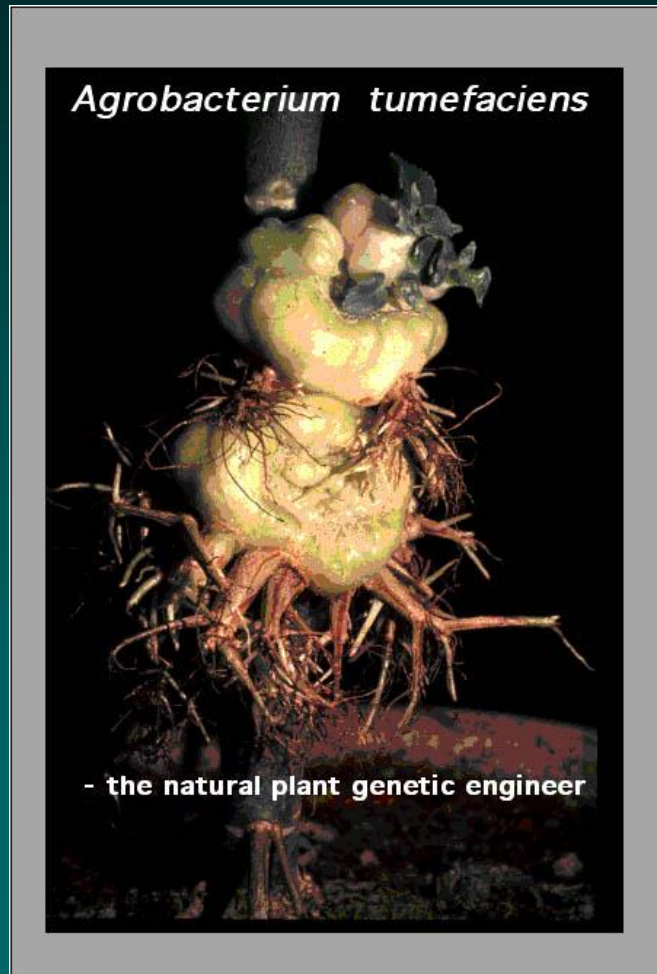
根癌农杆菌介导外源基因 转化烟草

***Agrobacterium* –mediated gene
transformation of tobacco**



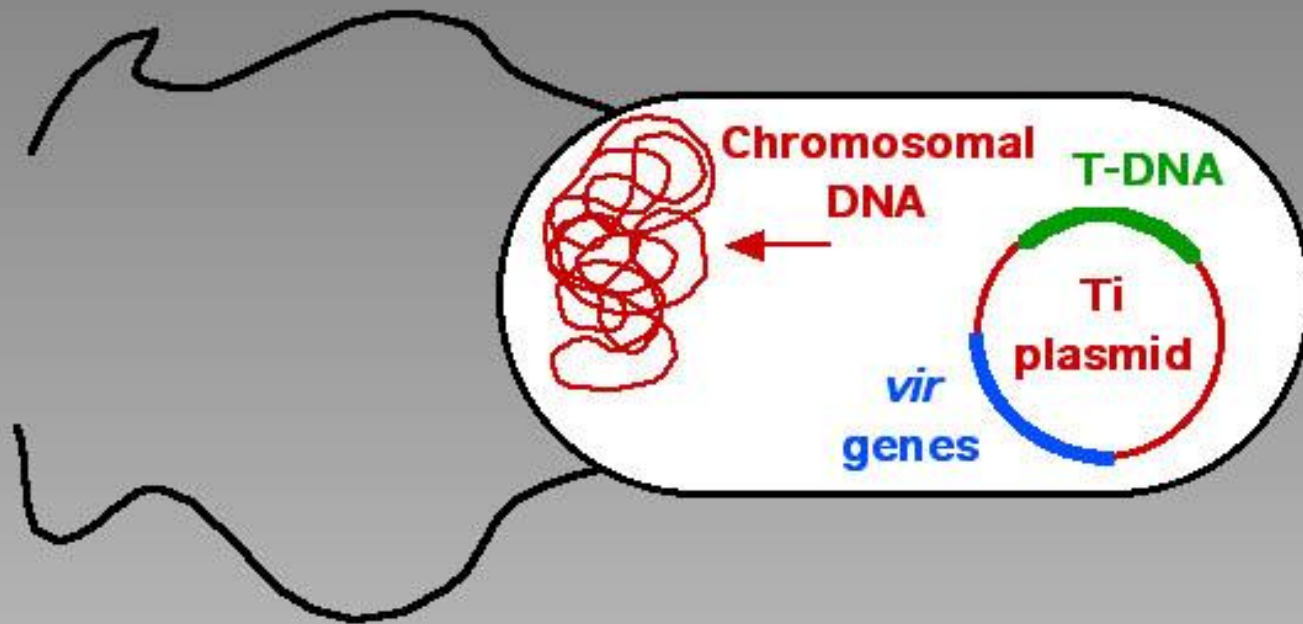
根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)

介导转化的原理

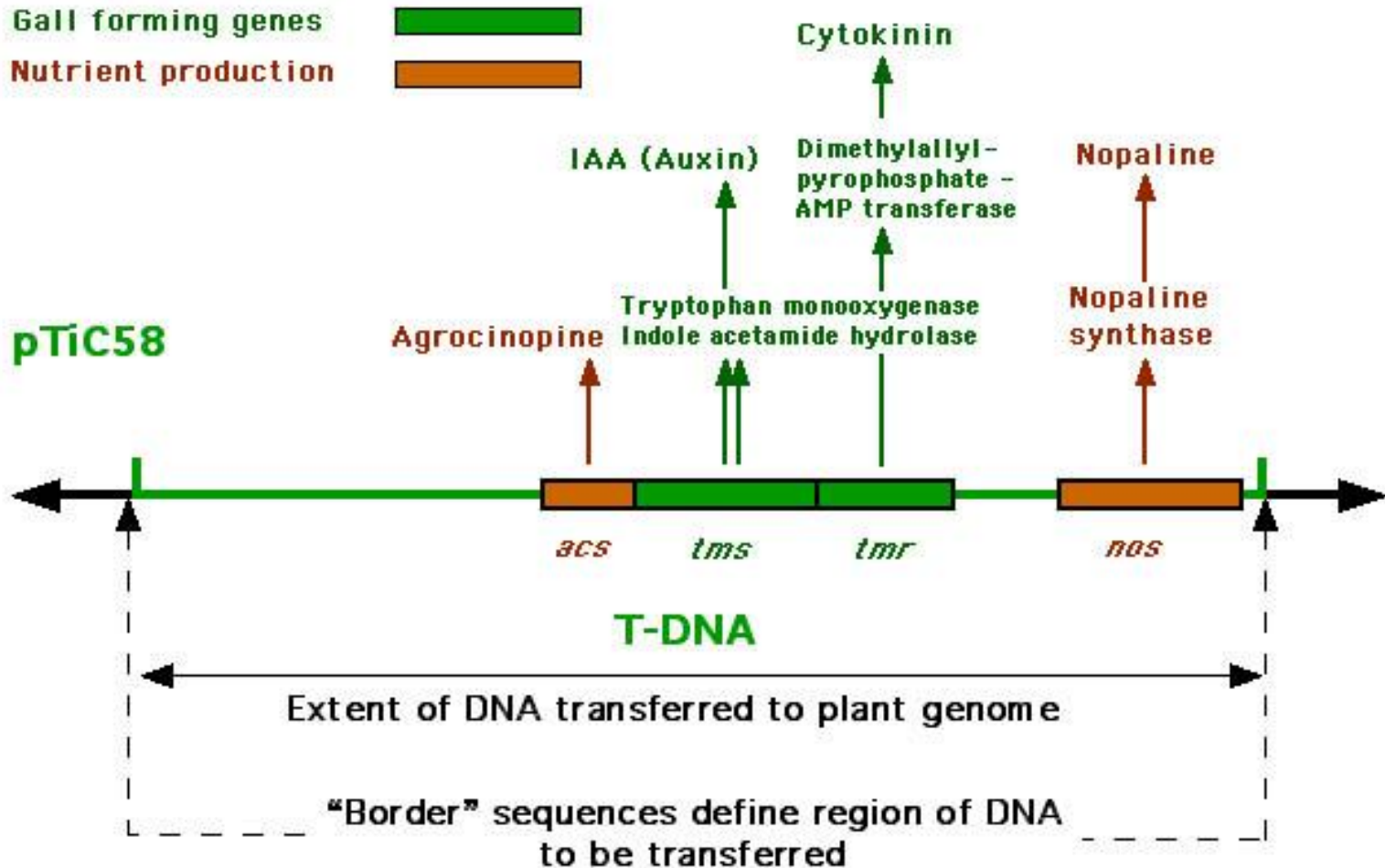


Ti-Plasmid

Agrobacterium tumefaciens is a naturally occurring soil bacterium. Most strains carry a plasmid (the **Ti plasmid**) which gives the bacterium the capacity to transfer part of the plasmid (the **T-DNA**) to a plant.



The T-DNA contains genes which function *only* in the plant cell; they cause the formation of galls and the production of nutrients utilised by *Agrobacterium*.

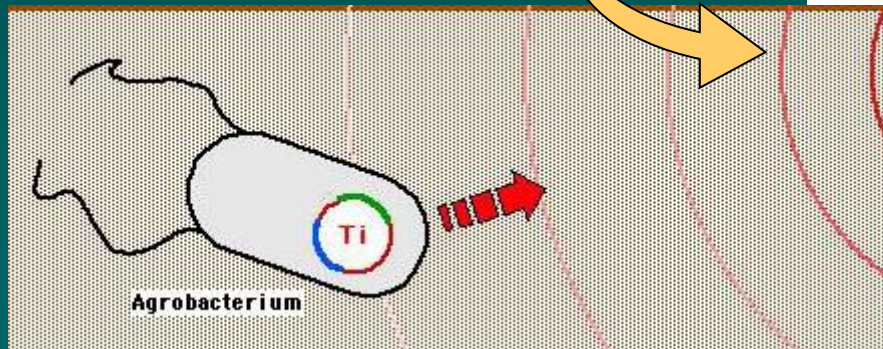
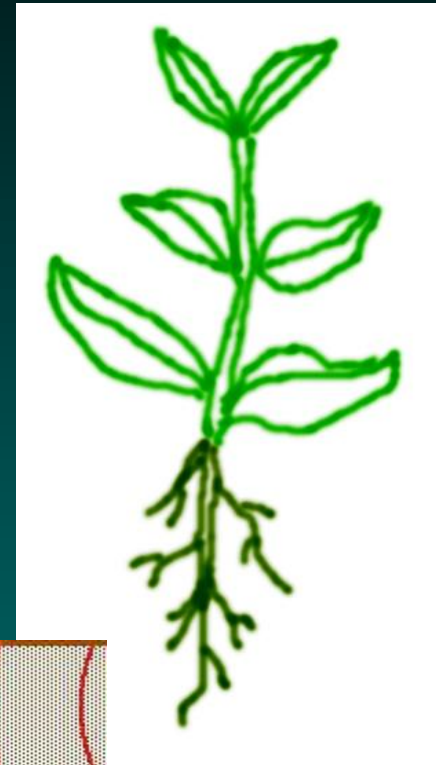
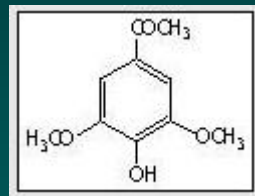


植物伤口组织释放的化学物质可诱导农杆菌的附着和T-DNA转移相关基因的活化

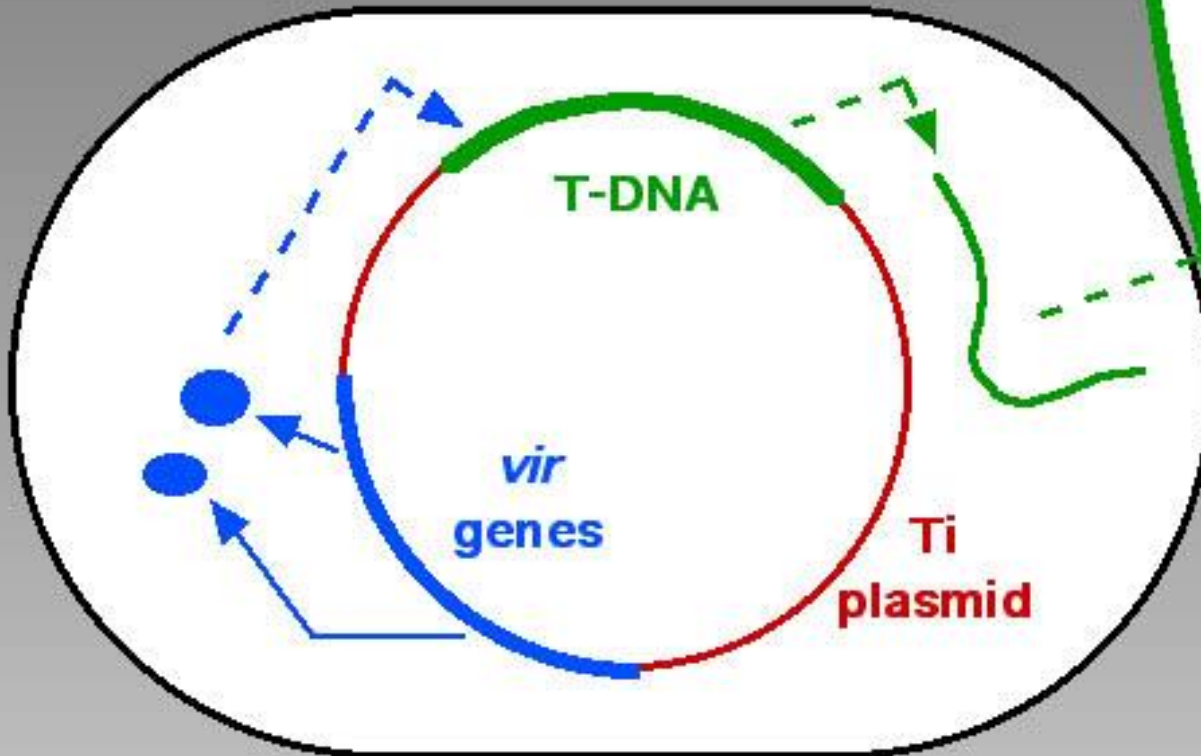
Concentration of acetosyringone

$10^{-8}M$ Chemotactic response

$10^{-5}M$ vir genes activate



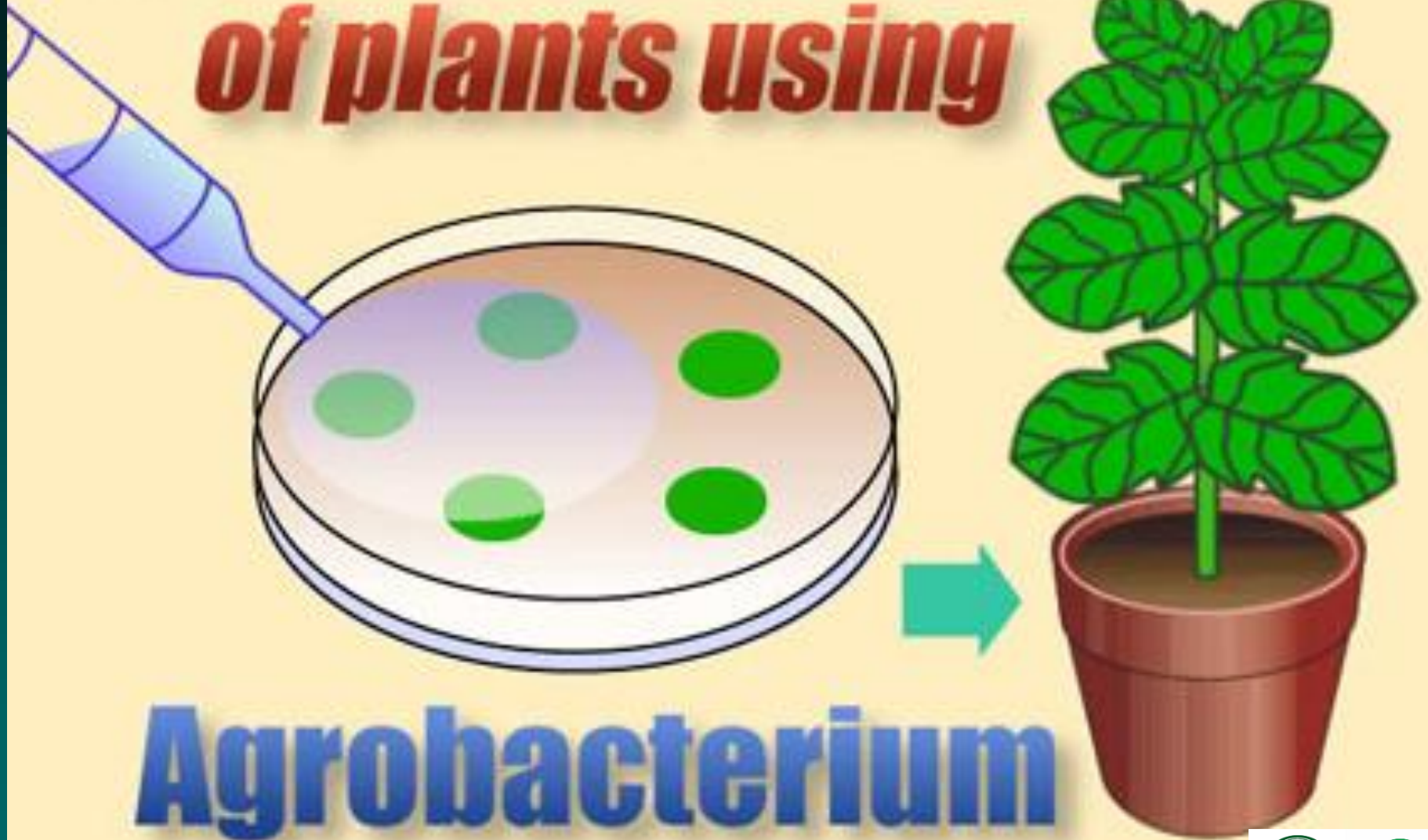
Proteins produced by the *vir* genes cause a strand of T-DNA to be copied and transferred to the plant cell.



PLANT
CELL

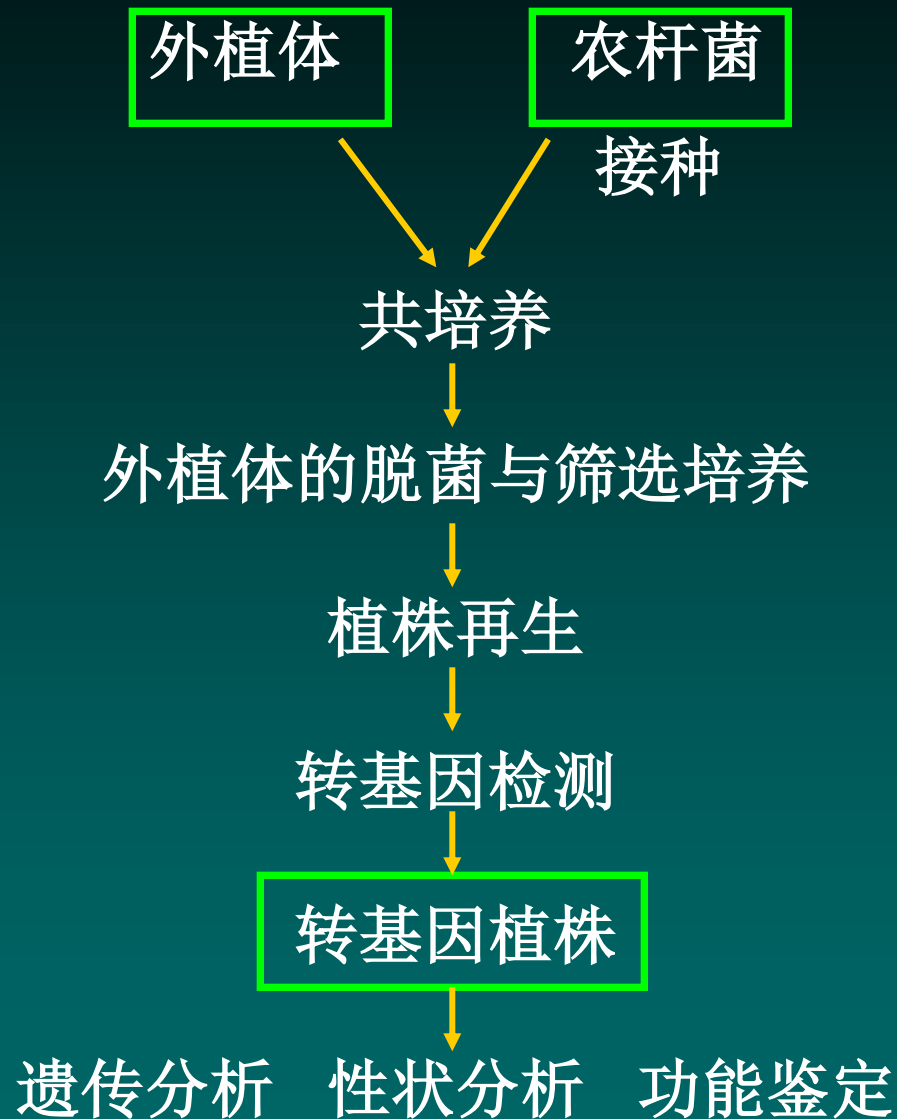
T-DNA
integrates
into plant
genome

The transformation of plants using

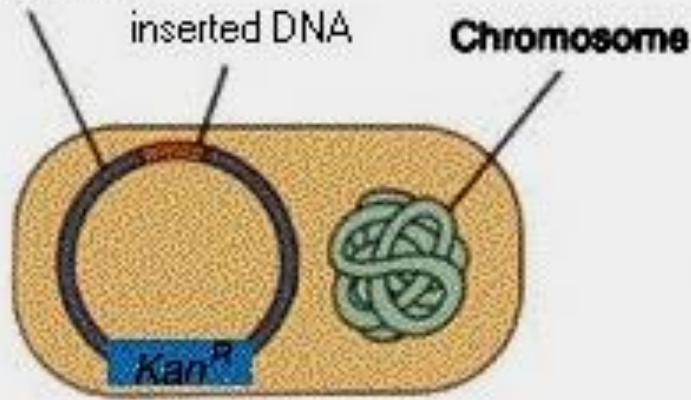


Agrobacterium

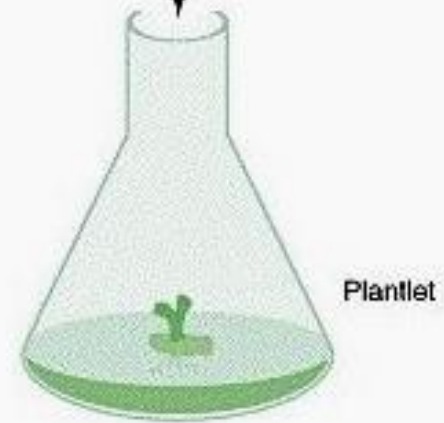
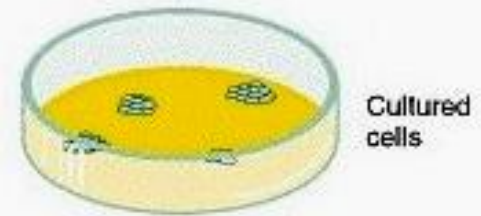
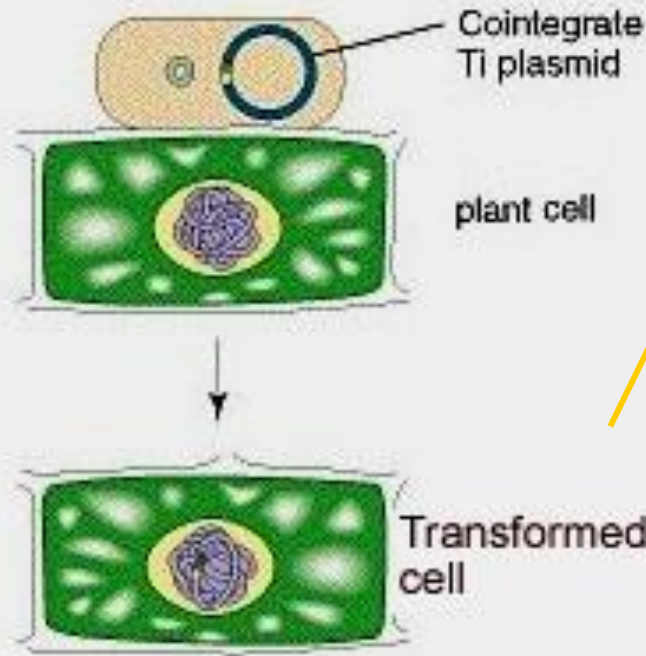
农杆菌Ti质粒介导基因转化程序



Ti plasmid



A. tumefaciens



一、实验原理

二、仪器与试剂

1. 主要仪器

普通天平、分析天平、恒温光照培养箱、恒温摇床、离心机、超净工作台、高压灭菌锅

2. 实验用品

酒精灯、剪刀、镊子、打孔器、塑料小离心管、带盖试管、培养皿、三角瓶、培养瓶、滤纸



3. 主要试剂及配制

1) MS母液A (10×): 1000mL

KNO_3	19.00 (g)
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.70
NH_4NO_3	16.50
KH_2PO_4	1.7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.40
(CaCl_2	3.321)

3) MS母液C (100×): 500mL

Glycine (甘氨酸)	100mg
Thiamine HCl (盐酸硫胺素)	20mg
Pyridoxine HCl (盐酸吡哆素)	25mg
Nicotinic Acid (烟酸)	25mg
myo-inositol (肌醇)	5g

4) MS母液D(200×): 500mL

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.73 (g)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78

2) MS母液B (100×): 1000mL

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23 (g)
($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86
H_3BO_3	0.62
KI	0.083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025

5) IAA (100×): 0.05g/L

6) 6-BA (100×): 0.2g/L

7) NaOH : 1 mol/L



8) 烟草愈伤组织诱导与分化培养基(1000mL)

MS母液

A 100 mL

B 10 mL

C 10 mL

D 5 mL

IAA 0.5 mg/L

6-BA 2.0 mg/L

Sucrose 30g /L

PH 5.8

Agar 1% (液体培养基不加Agar)



三、操作步骤

1. 烟草叶片组织培养与芽的再生

- 1) 无菌试管苗叶片剪成的小块或用打孔器凿成圆盘，接种在愈伤组织诱导与分化培养基上，注意近轴面向下。
- 2) 用封口膜封平板，置恒温光照培养箱中培养， 25°C ，2000-10000 lx，16/8h光暗周期。培养30-50天，观察愈伤组织和再生芽的形成。

2. 农杆菌培养

- 1) 平板上挑取单菌落，接种到3mL附加相应抗生素的LB培养基中，恒温摇床 28°C ，180rpm培养至 OD_{600} 为0.6-0.8。
- 2) 按1-2%比例转入新鲜无抗生素LB中，加入0.1mol/L的AS，相同条件培养至 OD_{600} 为0.2-0.5用于转化。



3. 侵染与共培养

1) 于超净台上将菌液倒入无菌培养皿，可根据情况稀释无菌试管苗叶片剪成的小块或用打孔器凿成圆盘，在菌液中浸泡**0.5 - 5 min**。

2) 无菌滤纸吸干，接种在愈伤组织诱导与分化培养基上，**25°C**暗培养**2-3d**。

4. 转化植物的筛选与培养

将共培养结束的外植体在超净台上转入筛选培养基（含筛选抗生素与杀菌抗生素）。待抗性芽长到一定大小时转入生根培养基获得拟转化植株。拟转化植株需要进行后续的筛选和分子生物学鉴定。



农杆菌转化植物的实验操作视频:

https://mp.weixin.qq.com/s/9zZAZi18v9kUSCy1PF_kfA

