

农艺与调制

云烟 87 烤烟品种突变株的离体快繁技术

吴艺飞^{1,2}, 张战泓^{1,2}, 周晓波^{1,2}, 巢进³, 田茂成³,
田峰³, 朱三荣³, 欧阳娴^{1,2}, 白占兵^{1,2}

1 湖南省蔬菜研究所 长沙 410125;

2 湖南省蔬菜工程技术研究中心 长沙 410125;

3 湖南省烟草公司湘西自治州公司 吉首 416000

摘要: 为探讨特定条件下离体快繁对一些重要材料的优良性状进行迅速固定和繁殖的技术。以云烟 87 烤烟品种突变巨型株的休眠芽为试材, 对其进行了打破休眠促使萌芽、愈伤组织诱导、丛生芽增殖和生根培养的研究。结果表明: 打破休眠促使其萌芽的最佳培养基配方为 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA; 诱导产生愈伤组织效果最佳的培养基配方为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA; 丛生芽增殖效果最佳的培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA; MS+0.6 mg/L NAA 对根系的生长最为有利。

关键词: 烤烟; 突变株; 离体快繁

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2014.04.008

中图分类号: S572.03

文献标志码: A

文章编号: 1004-5708 (2014) 04-0037-04

In vitro rapid propagation of mutant strain of flue-cured tobacco cv. Yunyan 87

WU Yifei^{1,2}, ZHANG Zhanhong^{1,2}, ZHOU Xiaobo^{1,2}, CHAO Jin³, TIAN Maocheng³,
TIAN Feng³, ZHU Sanrong³, OUYANG Xian^{1,2}, BAI Zhanbing^{1,2}

1 Hunan Vegetable Research Institute, Changsha 410125, China;

2 Hunan Vegetable Research and Development Center, Changsha 410125, China;

3 Xiangxi Autonomous Prefecture Tobacco Company, Jishou 416000, Hunan, China

Abstract: Mutant giant strains of Yunyan 87 dormant buds were tested for breaking of dormancy to germination, callus induction, shoot proliferation and rooting cultivation. Results showed that: the optimum medium for breaking dormancy to germination was MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA; the optimum medium for callus induction was MS+3.0mg/L 6-BA+0.3mg/L NAA; the medium with optimum shoot proliferation effect was MS+1.0mg/L 6-BA+0.3mg/L NAA; MS+0.6mg/L NAA was the best condition for root growth.

Keywords: flue-cured tobacco; mutant strain; *in vitro* rapid propagation

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 属茄科 (*Solanaceae*) 烟草属 (*Nicotiana*) 一年生草本植物。自 1973 年基因工程诞生以来, 烟草以其易于进行组织培养, 容易得到再生的转化植株而成为典型的基因工程模式植物,

被誉为植物界的“果蝇”^[1]。早在 1950 年初 Skoog 和崔澄等对烟草根、茎、叶进行了离体培养^[2-3]。潘战生等 1989 年研究了光和激素两个因素对烟草叶片组织培养的调节作用^[4]。随后, 很多学者进行了相关研究并取得了良好进展^[5-10]。但他们所取的外植体材料均为幼嫩叶片, 而本试验材料为田间突变巨型株, 取材时已值深冬, 植株已经老化无幼嫩叶片可以采用, 因此取其已经进入休眠的芽进行组织培养。本试验旨在通过对烟草休眠芽进行组织培养, 探讨特定条件下, 通过离体快繁对一些重要材料的优良性状进行迅速固定和繁殖的技术。

基金项目: 湖南省烟草公司湘西自治州公司技术研究项目“利用嫁接技术和光合细菌菌剂防治烟草根茎病害的技术研究”(2013-15Aa01)

作者简介: 吴艺飞 (1982—), 硕士, 从事植物组织培养和菜菔遗传育种工作, Email:406522996@qq.com

通讯作者: 田峰 (1963—), 大学, 从事烟草技术与推广, Email:hvizhanhong@163.com

收稿日期: 2013-08-05

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于2013年7月在湖南省蔬菜研究所重点实验室完成。供试材料为烤烟品种云烟87,由湖南省烟草公司湘西自治州公司提供,于2013年1月采自湘西自治州保靖县烟草公司试验田中的突变巨型株,其生长势极旺盛,株型比其它正常植株大2倍以上,株高2~4 m,烟叶130余片,而正常云烟87株高1.7~1.8 m,烟叶30余片。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的采集和灭菌

于2013年1月从湘西带土采集烟草突变株植株,喷上少量水后带回实验室,用解剖刀将茎上的休眠芽快速切下,为减少芽伤口褐化造成成活率低,切下后马上放入纯水中备用。将切下的烟草芽先用75%酒精表面消毒30 s,再用0.1%升汞灭菌处理12 min,倒去废液后,用无菌水冲洗4次,洗净升汞残液备用。

1.2.2 外植体接种和预培养

将灭菌处理后的外植体置于无菌纸上,用解剖刀快速切去已经发褐的伤口表面,马上将外植体接入萌芽培养基中,促进休眠芽的萌发。萌芽培养基以MS为基础培养基,添加不同浓度的6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)和1.0 mg/L NAA,每处理接种10瓶,每瓶2个芽,培养30 d后,统计芽萌发情况,筛选出最佳萌芽培养基配方。

1.2.3 愈伤组织的诱导

休眠芽在萌芽培养基中培养30 d左右,待新芽萌发出新叶后,将细嫩的新叶切成5 mm×5 mm大小,接种在新的愈伤组织诱导培养基中,诱导愈伤组织的发生。愈伤组织培养基为MS培养基添加不同浓度的6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)和NAA(0.3、0.6

mg/L),每处理接种5瓶,每瓶4个叶片,培养30 d后,记录愈伤组织发生情况,筛选出最佳愈伤组织诱导培养基配方。

1.2.4 丛生芽的诱导

在愈伤组织诱导培养基中培养30 d左右,待愈伤组织长至2~3 cm²大小时转出,将愈伤组织切成1 cm²大小,转至丛生芽诱导培养基中,诱导愈伤组织产生新芽。丛生芽诱导培养基为MS培养基添加不同浓度的6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)和0.3 mg/L NAA,每处理接种5瓶,每瓶6个愈伤组织,培养30 d后,记录丛生芽发生情况,筛选出最佳丛生芽诱导培养基配方。

1.2.5 生根培养

在丛生芽诱导培养基中培养30 d左右,待新芽长至2 cm左右高,有3~4片新叶时,将幼芽切下,切除基部的愈伤组织,转入生根培养基中诱导新根的发生。生根培养基为MS培养基添加不同浓度的NAA(0、0.3、0.6 mg/L),每处理接种5瓶,每瓶4株,培养25 d后,统计根系生长情况,筛选出最佳烟草生根培养基配方。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对促进休眠芽萌发的影响

通过表1,可以看出,添加不同激素浓度的各处理萌芽率均不是很高,各处理间差异较显著,其中萌芽效果最好的是处理2,接种20个芽,有10个萌发长出了叶片,萌芽率达50%,处理3次之,为25%,效果最差的是处理1,接种的20个芽中,仅3个萌芽,萌芽率为15%。因此,最佳的诱导休眠芽萌发的培养基组合为MS添加2.0 mg/L 6-BA和1.0 mg/L NAA。

表1 不同激素浓度的配比对休眠芽萌发的影响

Tab. 1 Effect of different hormone concentrations on the germination of dormant buds

编号	处 理	接种个数	萌芽个数	萌芽率/%
1	MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA	20	3b	15
2	MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA	20	10a	50
3	MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA	20	5b	25

2.2 不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响

将新长出的幼嫩新叶切成5 mm×5 mm大小,接至愈伤组织诱导培养基中,培养10 d左右可见叶周

开始膨大,愈伤组织陆续产生,培养30 d左右增长至最大,统计愈伤组织发生情况,见表2和图1。通过表2可知,添加不同浓度的激素种类的配比对愈伤

组织的产生影响较大。随着 6-BA 和 NAA 浓度的升高, 愈伤组织产生的量呈上升趋势, 但浓度过高会出现玻璃化现象, 表现为产生的愈伤组织为白色透明状, 这种愈伤组织分化芽的能力较低, 产生的芽质量差。以

处理 3, 即 MS 添加 3.0 mg/L 6-BA 和 0.3mg/L NAA 的培养基诱导愈伤组织的效果最好, 产生的愈伤组织多, 质地疏松, 色泽呈浅绿色, 分化芽的能力强。

表 2 不同激素浓度对诱导愈伤组织的影响

Tab. 2 Effect of different hormone concentrations on callus induction

处理编号	6-BA 浓度 / (mg/L)	NAA 浓度 / (mg/L)	愈伤组织发生情况
1	1.0	0.3	叶片四周愈伤组织产生量少, 质地较硬
2	2.0	0.3	叶片四周膨大至 2~3 cm ² , 愈伤组织产生量中等, 质地较疏松, 色泽浅绿
3	3.0	0.3	叶片四周膨大至 4~5 cm ² , 产生愈伤组织多, 质地较疏松, 呈浅绿色, 芽点多
4	1.0	0.6	叶片四周产生愈伤组织量较少, 部分未膨大, 质地较硬
5	2.0	0.6	叶片四周膨大至 3~4 cm ² , 愈伤组织产生量较多, 但质地较疏松透明, 颜色发白
6	3.0	0.6	叶片四周膨大至 5~6 cm ² , 愈伤组织产生量多, 质地较疏松透明, 颜色发白

2.3 不同激素浓度对丛生芽诱导的影响

将颜色浅绿, 质地较疏松的愈伤组织切成 1 cm² 大小, 转至丛生芽增殖培养基中, 诱导产生丛生芽。培养 7 d 左右可见愈伤组织上陆续分化出很多芽点, 随着时间的推移, 培养 15~20 d, 部分芽点开始膨大, 分化出茎、叶, 长成植株, 培养 30 d 后统计愈伤组织分化丛生芽长成植株情况见表 3 和图 2。由表 3 可

知, 6-BA 浓度在一定范围内与愈伤组织产生芽点的数量呈正相关; 但同时, 随着 6-BA 浓度的升高, 玻璃化现象也愈严重, 分化成苗的效率反而下降。以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA 为最佳的愈伤组织诱导丛生芽培养基, 产生的芽点较多, 分化成苗的效率最高, 产生的植株最为健壮。

表 3 不同激素浓度对丛生芽诱导的影响

Tab. 3 Effect of different hormone concentrations on shoot proliferation

处理编号	6-BA 浓度 / mg/L	NAA 浓度 / mg/L	丛生芽生长情况
1	1.0	0.3	产生芽点 10~20 个, 繁殖系数 5.15, 幼苗颜色浅绿, 有 3~5 片叶, 茎秆粗, 植株健壮
2	2.0	0.3	产生芽点 15~20 个, 繁殖系数 4.01, 幼苗颜色浅绿略带白色, 部分出现玻璃化现象
3	3.0	0.3	产生芽点 25~30 个, 繁殖系数 3.24, 幼苗颜色发白, 大部分出现玻璃化现象

2.4 不同激素浓度对烟草生根的影响

当分化的植株长至 2~3 cm, 有 3~4 片叶时, 将其从基部切下, 转入生根培养基中培养, 培养 7~10 d 可见基部出现根尖突起, 逐渐伸长, 10~15 d 可长至 1~2 cm, 培养 25 d 左右可成苗, 统计生根情况见表

4 和图 3。通过表 4 可知, NAA 的浓度对植株生根的影响比较大, 部分植株不添加 NAA 也能生根, 但生根的效率不高, 产生的根系细, 根毛少, 移栽成活率低; 以添加 0.6 mg/L NAA 的培养基生根效果最好, 产生的根系多而粗, 根毛多, 移栽容易成活。

表4 不同激素浓度对生根的影响

Tab. 4 Effect of different hormone concentrations on rooting

处理编号	NAA 浓度 mg/L	根系生长情况
1	0	50% 植株生根, 平均 2~3 条 / 株, 根系细长, 根毛少, 移栽成活率低
2	0.3	80% 植株生根, 平均 4~6 条 / 株, 根系短粗, 根毛较多, 移栽成活率中等
3	0.6	100% 植株生根, 平均 4~8 条 / 株, 根系粗壮, 根毛多, 移栽成活率高

3 讨论与结论

试验结果表明, 打破休眠促使其萌芽的最佳培养基配方为 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA; 诱导产生愈伤组织效果最佳的培养基配方为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA; 丛生芽增殖效果最佳的培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA; MS+0.6 mg/L NAA 对根系的生长最为有利。

由于所取的材料为田间突变巨型株, 只有通过无性繁殖才能将其优良的性状保留下来, 但发现它时已是冬季, 植株已值老年期且已进入休眠, 无幼嫩的叶片和茎段可供培养, 因此取其休眠芽进行组织培养成为必然。在添加了一定的 6-BA 和 NAA 后, 休眠芽

的萌芽势仍然不高, 效果最好的也只有 50%, 大部分幼芽出现了不同程度的褐化或者不萌动的现象, 这种现象在一定程度上抑制了幼芽的萌发^[11]。因此下一阶段可以采取添加防褐化剂等方法来减少褐化, 提高培养效率, 具体防褐化剂种类和浓度有待进一步研究。

植株培养过程中出现玻璃化现象很严重, 部分甚至达到 50%。玻璃化现象在很多其它植物组织培养中也普遍存在, 是制约组培效率的因素之一。我们在组培过程中发现一些措施可以缓解这种现象: 接种前将培养瓶倒置一会, 把里面多余的水分倒掉再接种, 以减少培养过程中的湿度过大造成玻璃化; 培养室的温度不宜过高, 在 25℃~28℃为宜; 继代周期不能太长, 一般 20~30 d 为宜, 最多不能超过 2 个月。

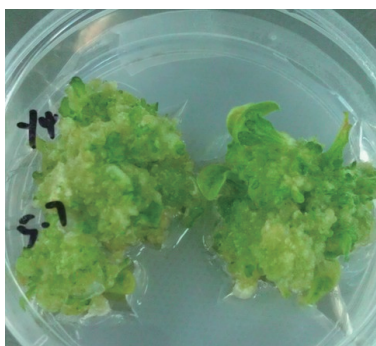


图1 愈伤组织发生情况

Fig. 1 Callus condition

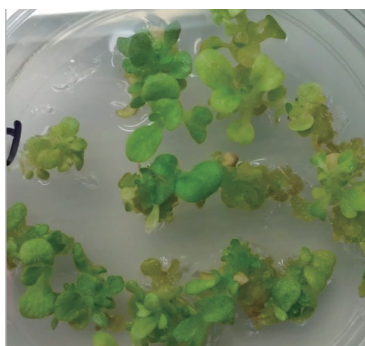


图2 丛生芽发生情况

Fig. 2 Shoot proliferation condition



图3 培养 30 天后生根效果

Fig. 3 Rooting condition 30 days after cultivation

参考文献

- [1] 焦滇, 秦广雍, 霍裕平. 烟草叶片愈伤组织诱导及真空耐受性研究[J]. 郑州大学学报(理学版), 2003, 35(1): 46-48.
- [2] 曹孜义. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 305-318.
- [3] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译. 植物组织和细胞培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978: 150-189.
- [4] 潘战生, 陈暨耀, 蔡怀新. 烟草叶组织培养中光与激素对形态发生的调节作用[J]. 实验生物学报, 1989, 22(3): 279-282.
- [5] 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): 27-29.
- [6] 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.
- [7] 周仕顺, 掏志章. 烟草的组织培养[J]. 云南农业科技, 2005(1): 22.
- [8] 陈名红, 陈学军, 吴渝生, 等. 烟草 K326 叶肉原生质体培养再生植株及影响因素的研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2006, 15(4): 328-331.
- [9] 邹永梅, 黄雪方. “烟草组织培养”的技术探讨[J]. 江苏教育学报(自然科学版), 2007, 24(3): 28-29.
- [10] 詹虹, 康永利, 李洁, 等. 烟草叶片再生芽器官组织培养研究[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(12): 81-83.
- [11] 王颖, 刘仁祥, 聂琼, 等. 不同防褐化剂对烟草愈伤组织培养褐化现象的抑制效应[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(1): 26-27.