DOI：10.19789/j.1004-9398.2025.04.013
文献引用：门淑珍，王文慧，宋洁琼．本科教学开设拟南芥愈伤组织诱导实验的可行性分析[J]．首都师范大学学报（自然科学版），2025，46（4）：91-96. MEN S Z，WANG W H，SONG J Q. Feasibility study on the opening of an experimental course on *Arabidopsis thaliana* callus induction for undergraduate students［J］. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2025，46（4）：91-96.

本科教学开设拟南芥愈伤组织诱导实验的可行性分析*

门淑珍**，王文慧，宋洁琼

（南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系，天津　300071）

摘要：植物组织培养技术是一种无性繁殖技术，基于植物细胞具有全能性的原理，广泛用于植物扩繁、育种和基因工程。虽然一些高校在本科实验教学中开设了植物组织培养的实验内容，但实验材料多局限于烟草等株高>60 cm的较大型植物，实验周期较长。模式植物拟南芥的根段既易于诱导愈伤组织，又易于观察。因此，本文探讨了在本科阶段的实验教学中开设拟南芥愈伤组织诱导实验的可行性。经本实验室数名本科生和研究生的多次实践表明，该实验易于操作和观察、周期短、重复性好；通过设置不同的生长素和细胞分裂素配比，能使学生更好地体会植物激素在该过程中的重要作用。

关键词：愈伤组织；植物组织培养；生长素；细胞分裂素；拟南芥
中图分类号：G642　　**文献标志码**：A

Feasibility study on the opening of an experimental course on *Arabidopsis thaliana* callus induction for undergraduate students*

MEN Shuzhen**，WANG Wenhui，SONG Jieqiong

（Department of Plant Biology and Ecology，College of Life Sciences，Nankai University，Tianjin　300071）

Abstract：Plant tissue culture is an asexual propagation technique based on the principle that plant cells are totipotent. This technique is widely used in plant propagation，breeding and genetic engineering. Although many colleges and universities offer plant tissue culture experiments in undergraduate experimental courses，the plant materials used are usually limited to larger plants such as tobacco，which are over 60 cm tall，and the experimental period is long. The root segments of the model plant *Arabidopsis thaliana* are easy to induce callus and easy to observe. Therefore，this paper investigates the feasibility of opening *A. thaliana* tissue culture experiments in undergraduate experimental teaching. As demonstrated by several undergraduate and graduate students in our laboratory，the experiment is easy to operate and observe，requires a short time to obtain results and has good reproducibility. And by setting different ratios of auxin and cytokinin，it can help students better understand the important role of plant hormones in plant tissue culture.

收稿日期：2024-09-18
*国家自然科学基金项目（32070281，32370271）
**通信作者：shuzhenmen@nankai.edu.cn

Keywords:callus;plant tissue culture;auxin;cytokinin;*Arabidopsis thaliana*
CLC:G642 **DC**:A

0 引 言

植物组织培养技术是基于植物细胞具有全能性(totipotency)的一种无性繁殖技术,包括愈伤组织的诱导、形成与分化3个主要的阶段[1-4]。该技术具有繁殖效率高、不受季节限制、能够保持亲本优良性状等优点,在植物扩繁、育种、基因工程以及细胞培养等方面有重要应用[5-8]。生长素和细胞分裂素是诱导愈伤组织形成与分化的关键植物激素,其浓度与比例会影响细胞的发育方向[3,9-11]。植物细胞的全能性原理与植物激素的作用是植物学教学中的重要知识点。基于学习产出的教育理念(outcome based education,OBE)倡导以学生为中心,"从做中学",追求理论与实践相结合,在实际操作中应用所学的理论知识,掌握相关的实验技能[12-14]。因此,在本科实验教学中开设植物组织培养实验,可以帮助学生对植物细胞的全能性和植物激素的作用有更加直观的学习与更加深刻的体会。目前,虽然一些高校在本科实验教学中开设了植物组织培养的实验内容,但实验材料多局限于烟草(*Nicotiana tabacum*)、水稻(*Oryza sativa*)和大豆(*Glycine max*)等株高>60 cm的较大型草本植物或者杨树等木本植物[15]。以烟草叶片作为外植体进行愈伤组织诱导时,2~3周后才能观察到愈伤组织的形成,实验周期较长[16],学生若进行全流程实验,会导致学生课时与实验需求问题突出。因此,基于目前的学时要求,在满足实验要求、培养学生实验素养的前提下,尝试新的替换教学实验。

模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)具有生长周期短(约3个月)、植株小(高25~40 cm)、易脱分化和再生等特点,是研究植物组织培养的良好材料[17]。本文拟探讨在本科实验教学中开设拟南芥愈伤组织诱导实验的可行性。设计了以拟南芥幼苗的根段为外植体的组织培养实验,将根段培养在不同生长素和细胞分裂素浓度配比的培养基上,定期观察和统计愈伤组织诱导情况,并由本实验室3名本科生和5名研究生分别进行了可行性实验探索。

1 实验原理

植物组织培养技术是基于植物细胞全能性的原理,将外植体(离体的植物器官、组织或细胞等)培养在人工培养基上,给予适宜的培养条件,诱导其脱分化、增殖及再分化,从而形成完整植物个体的技术[2,18-19]。植物组织需要在无菌的条件下培养,必须对实验材料和试剂等消毒或灭菌[2,5]。

外植体在适宜的培养条件下,能够产生不定形的、活跃分裂的细胞团,称为愈伤组织,该过程称为脱分化。愈伤组织在植物激素的刺激下,又能重新分化出芽或者根等器官,该过程称为再分化(或再生)[5,9,20]。生长素和细胞分裂素在上述过程中起着十分关键的作用,高浓度的生长素诱导根的发生,高浓度的细胞分裂素诱导芽的发生,而2种激素的合适配比则会诱导愈伤组织的形成[3,9,20-22]。愈伤组织起源于中柱鞘细胞(pericycle cell),其发生类似于侧根原基的发育过程[20,23]。遗传学、分子生物学、转录组和单细胞测序分析等的研究结果显示,高浓度的外源生长素促进生长素合成通路基因、侧根原基发育关键基因、根分生组织调控基因、细胞周期调控基因及染色质表观遗传修饰基因的表达,从而启动愈伤组织的形成[23-25]。此外,生长素还会抑制细胞分裂素信号通路负调控基因的表达,增强愈伤组织细胞对细胞分裂素的敏感性[24]。细胞分裂素信号通路的各种正、负调控因子之间的适当平衡对胚性愈伤组织的形成至关重要[11]。将胚性愈伤组织转移到含有高浓度细胞分裂素的芽诱导培养基上后,细胞分裂素会快速下调生长素信号通路基因的表达,从而使根发育相关基因的表达下调,抑制根的发生;细胞分裂素信号还会抑制芽发生部位生长素合成路径基因的表达,促进芽发育关键基因的表达,最终促进芽的形成[11]。

植物组织培养中常用生长素包括吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid,IAA),吲哚-3-丁酸(indole-3-butyric acid,IBA),2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid,2,4-D),萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid,NAA)和3,4-二氯苯乙酸(3,4-dichlorophenylaceticacid,Dcaa)等[3,26]。其中,2,4-D

常用于诱导愈伤组织和体细胞胚(somatic embryo)的形成和增殖[3,10,19-20]。常用细胞分裂素包括6-苄胺基嘌呤(6-benzylaminopurine,6-BA)、N^6-异戊烯基腺嘌呤(isopentenyl adenine,iP)、激动素(kinetin,KT)、反式玉米素(trans-zeatin,tZ)和顺式玉米素(cis-zeatin,cZ)等[3]。本实验以2,4-D和KT诱导愈伤组织的形成,通过2种激素的不同配比探究其在愈伤组织诱导中的关键作用。

2 教学设计

2.1 开设该实验的意义

植物细胞的全能性与植物激素的作用是植物学教学中的重要知识点,而植物组织培养技术是植物基因功能研究和植物基因工程的重要实验技能。开设植物组织培养的实验课程可以将二者有效结合:一方面通过实验加强学生对理论知识的理解;另一方面锻炼学生的动手能力,为将来从事科学研究或者生产实践打下基础。该实验以模式植物拟南芥幼苗根段为外植体,通过设计不同的生长素和细胞分裂素浓度配比,培养外植体材料,定期观察和统计愈伤组织诱导情况,实现在缩短实验周期目的同时,帮助学生进一步认识植物激素在植物组织培养中的关键作用,提升科学思维与探究能力。在实验技能层面,实验教学中涉及灭菌锅、超净工作台以及显微镜等仪器的使用,要求学生熟练掌握常用仪器的操作规范及无菌操作技术,进一步掌握基本实验技能,提升实践动手能力。

2.2 该实验课程的教学定位

若实验面向一、二年级的本科生开设,仅开展培养基的配制、拟南芥根段的切割及接种、愈伤组织的观察实验即可。另外,为节约课堂时间,学生只需掌握拟南芥种子的消毒与播种方法,无须待拟南芥幼苗长大后再进行愈伤组织的诱导,指导教师或助教可提前准备实验所需的拟南芥幼苗。

若实验面向三、四年级的本科生开设,建议以“综合性实验”完成完整实验课程。学生2~4人/组开展实验,由小组成员合作完成,教师给予及时的指导与帮助。

2.3 教学目的、重点和难点

教学目的:学习和掌握植物愈伤组织诱导的实验技术,通过不同浓度的激素配比诱导愈伤组织形成,领悟植物激素(生长素和细胞分裂素)在该过程中的关键作用,熟练掌握无菌操作技术。

教学重点:明确植物组织培养的原理,掌握植物组织培养的技术与方法。

教学难点:理解生长素和细胞分裂素合适浓度配比在愈伤组织诱导过程中的关键作用。

3 实验部分

3.1 实验试剂与材料

Murashige and Skoog Basal Salt Mixture(MS)培养基粉末购自武汉伯远生物科技有限公司;植物培养用琼脂粉(Plant Agar)购自荷兰Duchefa Biochemie公司;蔗糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司;KOH粉末购自天津科密欧化学试剂有限公司;无水乙醇购自天津广顺达试剂公司;NaClO溶液购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2,4-D和KT粉末购自希格玛奥德里奇(上海)高技术有限公司;NaOH粉末购自天津市江天化工技术有限公司。实验用水均为去离子水。

野生型拟南芥Landsberg *erecta*(L*er*)生态型由本实验室保存。

3.2 实验仪器

使用日本TOMY公司生产的SX-500型高压蒸汽灭菌锅灭菌处理锥形瓶和去离子水,灭菌条件为121 ℃、20 min;使用德国Sartorius公司生产的CPA2202S型电子天平称样品质量;使用苏州安泰空气技术有限公司生产的SW-CJ-1FD型超净工作台进行无菌操作;使用美国Percival公司生产的GR36L型植物光照培养箱培养拟南芥幼苗与愈伤组织,光周期为16 h光照/8 h黑暗、光照强度为100 μmol/(m^2·s)、温度为(22±1) ℃;使用德国Leica公司生产的M165FC型体式显微镜观察愈伤组织;使用上海仪电科学仪器股份有限公司生产的PHS-2F型pH计调节MS培养基的pH。

3.3 溶液配制

(1)在超净工作台中,向无菌锥形瓶中加入30 mL无菌去离子水和70 mL无水乙醇,混匀后得到70%酒精溶液,备用。

(2)在超净工作台中,向无菌锥形瓶中加入99 mL无菌去离子水和1 mL NaClO溶液,混匀后得到1% NaClO溶液,备用。

(3)称取0.56 g KOH和3.20 g NaOH粉末,加去离子水定容至10 mL,分别得到1 mol/L KOH

和8 mol/L NaOH溶液,备用。

(4)称取2.21 g 2,4-D粉末,溶于1 mL 8 mol/L NaOH溶液中,加去离子水定容至10 mL,过滤除菌后得到1 mol/L 2,4-D溶液;取一定体积上述溶液,加无菌去离子水稀释,分别得到物质的量浓度为100、450、500、2 000和4 000 nmol/L的2,4-D溶液,备用。

(5)称取2.15 g KT粉末,溶于1 mL 8 mol/L NaOH溶液中,加入去离子水定容至10 mL,过滤除菌后得到1 mol/L KT溶液;取一定体积上述溶液,加无菌去离子水稀释,分别得到物质的量浓度为100、450、500、2 000和4 000 nmol/L的KT溶液,备用。

3.4 配制MS培养基

分别称取4.40 g MS培养基粉末、10.00 g蔗糖置于烧杯中,加入适量去离子水,用玻璃棒搅拌至固体基质完全溶解;加去离子水定容至1 L,用1 mol/L KOH溶液调溶液的酸碱度至pH 5.8;锥形瓶分装,每瓶100~200 mL,再加入8‰的植物培养用琼脂粉;灭菌,同时培养皿、移液器枪头、镊子和刀片等一并灭菌;灭菌后,待培养基冷却至60 ℃左右时,于超净工作台上在培养基中分别加入不同物质的量浓度的2,4-D和KT溶液,使培养基中植物激素的物质的量浓度如表1所示,每个培养皿溶液约20 mL,编号为1~10,待冷却凝固后备用。

表1 拟南芥愈伤组织诱导培养基的激素配比 单位:nmol/L

编号	2,4-二氯苯氧基乙酸	激动素
1	450	0
2	450	100
3	450	500
4	450	2 000
5	450	4 000
6	0	450
7	100	450
8	500	450
9	2 000	450
10	4 000	450

3.5 消毒和播种

在超净工作台消毒和播种拟南芥种子。(1)消毒。将拟南芥种子(体积约40~50 μL)置于1.5 mL离心管中,加入1 mL 70% 酒精溶液,混匀,室温放置4 min,期间颠倒混匀1~2次;弃去溶液后,加入1 mL 1% NaClO,混匀,室温放置10 min,期间颠倒混匀几次;弃去溶液后,用1 mL无菌水洗3~5次,最后加入500 μL无菌水。(2)播种。用胶头滴管将消毒后的种子吸入到蓝枪头中,然后整齐地播种于MS固体培养基表面,封口膜密封;为使拟南芥种子萌发整齐一致,密封后的培养皿置于4 ℃冰箱低温冷藏2~3 d后,光照培养箱中垂直培养7 d。拟南芥种子播种及幼苗生长情况如图1所示。

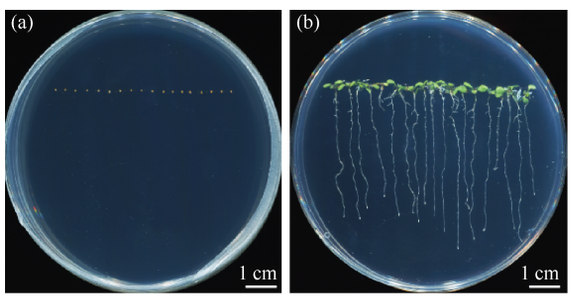


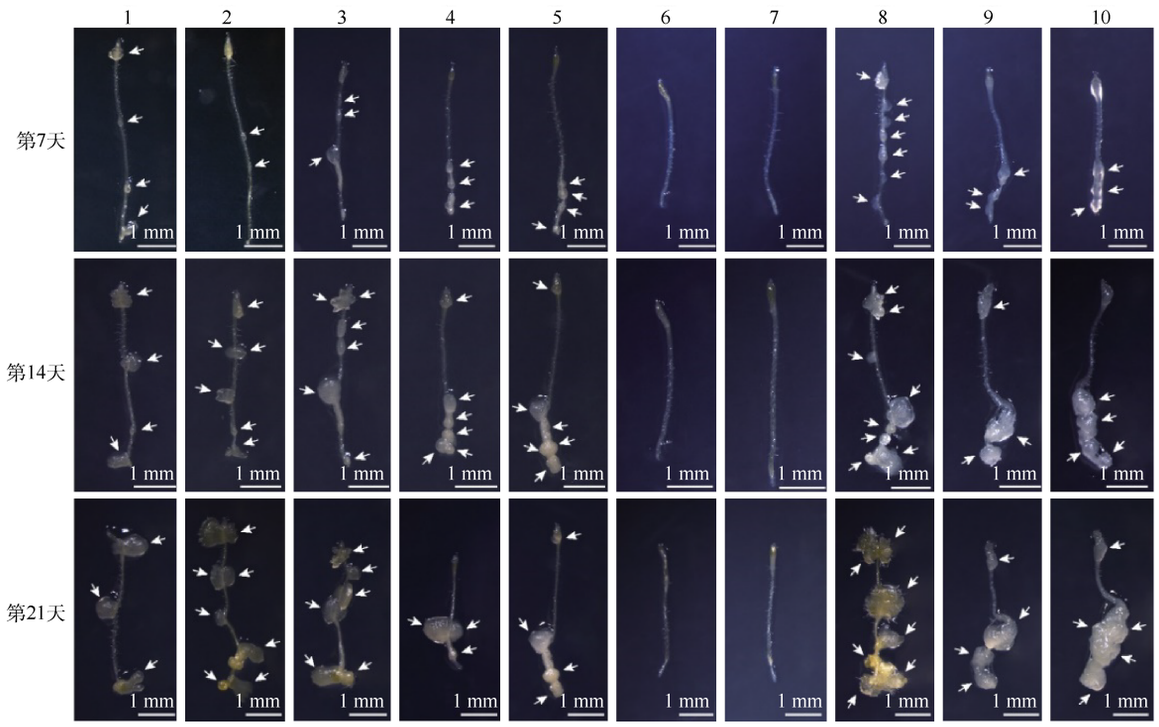
图1 拟南芥种子播种及幼苗生长情况
(a)刚播种时;(b)7日龄幼苗

3.6 诱导及培养

在超净工作台中,切下拟南芥幼苗的根尖长度约1 cm,用镊子转移至愈伤组织诱导培养基中继续培养,每个培养皿中至少放置6个根尖作为外植体,每种培养基做3个重复。封口膜密封培养皿后,培养箱中平放培养。每天观察外植体(根段)的生长情况,在培养第7、14和21天,拍照记录培养基中愈伤组织诱导情况。

4 实验结果

在不同激素配比的培养基培养7~21 d后,拟南芥根段愈伤组织诱导生长情况如图2所示。培养第7天时,根段已不同程度地产生了不规则的团块,即愈伤组织。1~5号培养基中,随着KT溶液物质的量浓度的增高,愈伤组织的诱导率增加,且在3号培养基(500 nmol/L KT)中达到高峰。6~10号培养基中,随着2,4-D溶液物质的量浓度的增加,愈伤组织的诱导率不同:当2,4-D溶液物质的量浓度为0(6号培养基)和100 nmol/L(7号培养基)时,绝大多数的根段未产生愈伤组织;当2,4-D的浓度为500 nmol/L(8号)时,愈伤组织的诱导效果最佳。培养第14天时,愈伤组织团块明显增大。1~5号培养基中,KT溶液物质的量浓度与愈伤组织生长速率呈现一定的正相关,同样在500 nmol/L(3号培养基)时诱导效果最佳。6~10号培养基中,亦是当2,4-D浓度达到一定值时才能诱导形成愈伤组织,同样在500 nmol/L(8号培养基)时诱导效果最佳。培养第21天时,愈伤组织团块进一步增大,愈伤组织诱导情况基本与第7、14天时一致。



注:图中白色箭头指示诱导出的愈伤组织团块。

图2　10个培养皿中拟南芥根段培养第7~21天时的愈伤组织生长情况

5　讨　论

拟南芥愈伤组织的诱导效果与生长素和细胞分裂素的浓度有着密切关系。以上实验结果表明:仅有2,4-D时,可以诱导形成愈伤组织,而在此基础上添加KT,低浓度的KT可以促进形成愈伤组织,高浓度则会表现出一定的抑制作用。但是,仅有KT则无法诱导形成愈伤组织,只有添加一定量的2,4-D后才能诱导形成愈伤组织。综上所述,生长素对于愈伤组织的诱导形成是必需的,一定浓度的细胞分裂素可以促进植物组织脱分化的进程。

上述实验方案经过本实验室3名本科生和5名研究生进行了多次实验,表明实验操作简单易行,实验材料易于获取,实验结果直观明了,实验周期短、重复性好,适用于本科生实验教学。本科生在理论学习中,已完成植物组织培养相关知识的学习,对于愈伤组织诱导的原理已有初步认识,具备了实验操作的能力。

上述实验可以伴随“植物生理学”或“植物基因工程”理论课开设,学时安排为8学时。具体安排为:(1)愈伤组织诱导培养基的配制,2学时;(2)拟南芥幼苗根段的切割和接种到愈伤组织诱导培养基,2学时;(3)愈伤组织的观察、拍照和统计,4学时。其中(1)和(2)可在一个连续课时进行,实验指导教师需要提前准备拟南芥幼苗;(3)在1~3周后进行后续实验。如果为高年级的本科生开设该实验,则以“综合性实验”的形式进行。实验前,指导教师进行详细的讲解,或者安排学生检索一些相关文献及尝试设计实验方案,然后学生利用课余时间开展实验,指导教师随时给予指导。要求学生完成实验后以科研论文的形式提交实验报告,结果部分除了展示愈伤组织的照片,还要有对愈伤组织诱导结果的统计分析,比较组间数据差异性等。

对于喜欢探索的学生,还可以鼓励其选用拟南芥幼苗根的不同部位、下胚轴和子叶等不同组织进行愈伤组织诱导实验,对实验结果统计分析,探究植物体不同组织再生能力的高低,以及利用拟南芥生长素和细胞分裂素相关突变体幼苗为实验材料,进一步探究生长素与细胞分裂素在愈伤组织诱导和形成过程中的作用。

6　结束语

本文设计了以拟南芥幼苗根段为外植体的愈伤组织诱导的可行性实验,表明该实验结果易于观察、周期短、重复性高,适于在本科教学中开设。该实验还可以拓展成综合实验课,鼓励学生通过查阅文献和与指导教师讨论,设计相应的实验内容,探

究植物体不同组织再生能力的高低;通过利用拟南芥生长素和细胞分裂素相关突变体进行组织培养实验,深入理解植物激素在组织培养中的重要作用。本文设计的实验内容安排实验室的研究生和进行科研训练的本科生进行了相关的实际操作,获得了理想的实验结果,不足之处是未在本科实验教学中进行实际的教学实践。下一步将申请学校的教改项目,在本科实验教学和综合性实验课中开展该实验,以便获得更多的教改数据和经验。

参 考 文 献

[1] 张宝华.植物组织培养技术及应用探究[J].现代农业研究,2023,29(12):90-93.

[2] 唐链,田爽琪.植物组织培养技术的应用进展[J].现代园艺,2022,45(18):24-26.

[3] PASTERNAK T P, STEINMACHER D. Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro [J]. Plants (Basel),2024,13(2):327.

[4] 刘艺冉,孙晓菲,门淑珍.二穗短柄草愈伤组织的诱导及农杆菌介导的遗传转化技术在本科实验教学中的应用[J].中国细胞生物学学报,2016,38(10):1252-1259.

[5] 陈铭秋,刘果,林彦,等.木本植物组织培养及器官从头再生的研究进展[J].桉树科技,2023,40(4):85-96.

[6] LAKSHMANAN P,LEE C L,GOH C J. An efficient in vitro method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L.[J]. Plant Cell Reports, 1997,16(8):572-577.

[7] PATHI K M,SPRINK T. From petri dish to field:plant tissue culture and genetic engineering of oats for improved agricultural outcomes [J]. Plants (Basel), 2023,12(21):3782.

[8] 王誉诺,闫冰洁,李佳璇,等.植物组织培养在作物新品种选育与后代繁育上的应用[J].陕西农业科学,2023,69(11):24-30+41.

[9] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro [J]. Symposia of the Society for Experimental Biology,1957,11:118-130.

[10] KARAMI O, DE JONG H, SOMOVILLA V J, et al. Structure-activity relationship of 2,4-D correlates auxinic activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2023, 116 (5):1355-1369.

[11] ŠMERINGAI J, SCHRUMPFOVÁ P P, PERNISOVÁ M. Cytokinins-regulators of de novo shoot organogenesis [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1239133.

[12] 廖飞.OBE理念下研究型大学物理实验教学改革[J].科技风,2024(25):92-94.

[13] 邓春萍,胡国军,李玲丽,等.基于OBE理念的环境经济学课程教学改革探索[J].甘肃教育研究,2024(14):77-79.

[14] 王岩.OBE理念下的高职学前教育专业“课赛融合”实践教学探索[J].科技风,2024(26):54-56.

[15] 郑冬超,王甜,解丽芳,等.在本科生物教学中开设毛白杨组培实验的探索[J].实验科学与技术,2016,14(6):159-161+185.

[16] 陈辉,姚志恒.烟草叶片愈伤组织诱导及分化培养的验证[J].安徽农业科学,2009,37(14):6333-6334.

[17] 李俊华,张艳春,徐云远,等.拟南芥室内培养技术[J].植物学通报,2004(2):201-204.

[18] KAREEM A, RADHAKRISHNAN D, SONDHI Y, et al. De novo assembly of plant body plan:a step ahead of deadpool [J]. Regeneration (Oxf),2016,3(4):182-197.

[19] IKEUCHI M, OGAWA Y, IWASE A, et al. Plant regeneration:cellular origins and molecular mechanisms [J]. Development,2016,143(9):1442-1451.

[20] IKEUCHI M, SUGIMOTO K, IWASE A. Plant callus: mechanisms of induction and repression [J]. The Plant Cell,2013,25(9):3159-3173.

[21] RASPOR M, MOTYKA V, KALERI A R, et al. Integrating the roles for cytokinin and auxin in de novo shoot organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021,22(16):8554.

[22] BUSTILLO-AVENDAÑO E, IBÁÑEZ S, SANZ O, et al. Regulation of hormonal control, cell reprogramming, and patterning during de novo root organogenesis [J]. Plant Physiology,2018,176(2):1709-1727.

[23] SUGIMOTO K, JIAO Y L, MEYEROWITZ E M. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway [J]. Developmental Cell,2010,18(3):463-471.

[24] ZHAI N, XU L. Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration [J]. Nature Plants,2021,7(11):1453-1460.

[25] LI J W, ZHANG Q Y, WANG Z J, et al. The roles of epigenetic regulators in plant regeneration: exploring patterns amidst complex conditions [J]. Plant Physiology,2024,194(4):2022-2038.

[26] TAN C, LI S, SONG J, et al.3, 4-Dichlorophenylacetic acid acts as an auxin analog and induces beneficial effects in various crops [J]. Communications Biology, 2024,7(1):161.

(责任编辑:王 媛)