

番茄 06P28 子叶受体系统建立的研究

李 峰¹, 曹刚强^{1,2}, 梁秋霞³, 应芳卿⁴, 申 娟¹

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 中国农业科学院 作物研究所, 北京 100081;

3. 郑州大学 离子束生物工程重点实验室 河南 郑州 450052; 4. 郑州市蔬菜研究所, 河南 郑州 450015)

摘 要:以番茄 06P28 为试材, 对其子叶分化培养基及该材料对潮霉素和羧苄青霉素的天然耐性进行了研究。结果表明: 适宜的分化培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L, 潮霉素的筛选浓度和羧苄青霉素的抑菌浓度分别以 10 mg/L、350 mg/L 为宜。

关键词: 番茄; 子叶; 组织培养; 基因转化; 受体系统

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0007-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)原产于南美洲的秘鲁、厄瓜多尔、玻利维亚等地, 是茄科番茄属的 1 a 生或多年生草本植物。由于番茄栽培广泛, 需求量大, 对其遗传理论的研究又较为深入, 因此成为最早进行基因转化研究的高等植物之一。目前, 番茄的转基因主要采用农杆菌介导叶盘转化的方法, 并且已经获得了各种各样的转基因植株^[1,2]。

建立高效的再生系统是进行基因转化的前提基础, 筛选合适的分化培养基和抗生素浓度是提高基因转化效率的关键^[3]。因此, 以番茄 06P28 为试验材料, 对其分化培养基以及该材料对潮霉素(Hyg)和羧苄青霉素(Carb)的天然耐性进行了研究, 以其为下一步农杆菌介导的遗传转化奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄材料为 06P28, 由河南省郑州市蔬菜研究所培育并提供。潮霉素(Hyg)和羧苄青霉素(Carb)分别为 Solarbio 公司和 Amresco 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄无菌苗的获得 将番茄种子用 70% 的乙醇浸泡约 30 s, 再用 10% 的次氯酸钠(市售安福替民)浸泡 10~15 min, 无菌水冲洗 5 次后将其均匀地点播于

1/2 MS 固体培养基上。将种子 26℃ 暗培养 3 d 后, 置于 26℃、光照强度 2 000 lx 及光照时间 16 h/d 的条件下进行培养。

1.2.2 外植体的制备 取 6~8 d 苗龄的番茄无菌苗子叶, 去除叶柄 1~2 mm 和叶尖 1~2 mm 后, 取其中间部分即为试验所用外植体。

1.2.3 分化培养基的筛选 基本培养基为 MS, 附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 0.8%。将上述子叶外植体近轴面向上放入添加有不同质量浓度植物激素 6-BA 和 IAA 的分化培养基上, 置于 24℃、光照强度 2 000 lx 及光照时间 16 h/d 的条件下进行培养, 培养过程中每隔 2~3 周继代 1 次。

1.2.4 潮霉素筛选压力的确定 以上述筛选出的分化培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 为基本培养基, 分别添加 0.5、10、15、20、25 mg/L 的潮霉素(Hyg)后即为潮霉素(Hyg)浓度筛选所用培养基。将子叶外植体放在添加有不同浓度潮霉素(Hyg)的培养基上, 置于 24℃、光照强度 2 000 lx 及光照时间 16 h/d 的条件下进行培养, 2 周后继代一次。以培养 4 周后的愈伤组织分化率和芽分化率为指标, 检测子叶外植体对潮霉素(Hyg)的耐受性。

1.2.5 羧苄青霉素对番茄子叶分化影响 以上述筛选出的分化培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 为基本培养基, 添加 350 mg/L 的羧苄青霉素(Carb)后即为羧苄青霉素抑菌浓度所用培养基。将子叶外植体放在添加有羧苄青霉素(Carb)的培养基上, 置于 24℃、光照强度 2 000 lx 及光照时间 16 h/d 的条件下进行培养, 2 周后继代 1 次。以培养 4 周后的愈伤组织分化率和芽分化率为指标, 检测子叶外植体对羧苄青霉素(Carb)的敏感性。

2 结果与分析

2.1 分化培养基的筛选

第一作者简介: 李峰(1980), 男, 在读硕士, 主要从事植物细胞工程与遗传改良方向的研究。E-mail: lifeng19801029@yahoo.com.cn

通讯作者: 曹刚强(1972-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物细胞工程与遗传改良方向的研究。E-mail: caogangqiang126@126.com

基金项目: 郑州市重点科技攻关资助项目(04BA30AANC06); 河南省重大科技攻关资助项目(0522010420)。

收稿日期: 2007-07-21

由表 1 可以看出, 无论那种激素组合, 愈伤组织的出愈率均无明显差异, 都接近或达到 100%, 然而, 当 IAA 或 6-BA 浓度一定情况下, 随着 IAA 或 6-BA 浓度的增加, 出芽率均呈现先增加再减少的趋势, 其中以 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的出芽率最高。因此, 适宜的分化培养基应为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L, 并且在确定潮霉素和羧苄青霉素浓度时, 也均选用此培养基作为基本培养基。

表 1 不同浓度 6-BA 与 IAA 组合对外植体愈伤组织及不定芽形成的影响

激素组合 /mg·L ⁻¹	外植体	形成愈伤 组织个数	出愈率 / %	出芽数	出芽率 / %
BA1.0+IAA0.1	120	110	91.6	50	45.4
BA2.0+IAA0.1	120	112	93.3	76	67.8
BA3.0+IAA0.1	120	108	90.0	46	42.6
BA1.0+IAA0.2	120	116	96.7	60	51.7
BA2.0+IAA0.2	120	118	98.3	98	81.6
BA3.0+IAA0.2	120	120	100.0	56	46.7
BA1.0+IAA0.5	120	116	96.7	36	31.0
BA2.0+IAA0.5	120	114	95.5	30	26.3
BA3.0+IAA0.5	120	120	100.0	20	16.7

2.2 不同的潮霉素浓度对番茄子叶分化的影响

转化细胞的筛选是获得转基因植株的关键。如果选择压力过高, 则已转化的细胞也会死亡, 但是如果选择压力太小, 又会出现大量逃逸芽(escaped bud), 给筛选带来很多麻烦, 所以, 检测试验材料对选择试剂的敏感性是十分重要的。

由表 2 可见, 番茄子叶对潮霉素(Hyg)极为敏感, 当潮霉素(Hyg)的质量浓度为 5 mg/L 时, 就能够完全抑制愈伤组织的分化, 使不定芽的形成率为 0; 当潮霉素(Hyg)的质量浓度为 10 mg/L 时, 愈伤组织的形成率就降为 8.3%。试验也发现, 当潮霉素(Hyg)的质量浓度达到 15 mg/L 时, 子叶外植体就不再形成愈伤组织, 随着培养时间的延长, 逐渐褐化死亡。由于高质量浓度的抗生素能够迅速杀死细胞, 而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用, 不利于转化细胞的生长, 因此, 试验结果显示潮霉素(Hyg)的筛选浓度以亚致死浓度 10 mg/L 较为适宜。

表 2 不同的潮霉素浓度对番茄子叶分化的影响

Hyg 浓度 /mg·L ⁻¹	培养子叶 个数	形成愈伤 组织个数	出愈率 / %	分化外 植体个数	分化率 / %
0	120	28	23.3	0	0.0
10	120	10	8.3	0	0.0
15	120	0	0.0	0	0.0
20	120	0	0.0	0	0.0
25	120	0	0.0	0	0.0

2.3 羧苄青霉素抑菌浓度的确定

基因转化中常使用一种抗生素来抑制农杆菌生长, 防止因农杆菌的过度生长而导致培养基和外植体的污染, 甚至对外植体产生毒害, 因此, 应在培养基中加入对

植物细胞无毒害作用或毒性较小的抑菌性抗生素。适当的抑菌性抗生素既能有效地抑制农杆菌的生长, 又不影响植物细胞的正常生长。目前, 应用最多的是头孢霉素(Cef)和羧苄青霉素(Carb)。前人研究发现, 在番茄的遗传转化中, 羧苄青霉素(Carb)与头孢霉素(Cef)相比, 利于子叶外植体形成不定芽, 因此, 试验参考前人的研究结果^[4], 结合经济方面的考虑, 选用 350 mg/L 的羧苄青霉素(Carb)来抑制农杆菌的生长。结果显示, 350 mg/L 的羧苄青霉素(Carb)对番茄子叶外植体愈伤组织的形成率和芽分化率与对照相比均无明显差异, 子叶外植体愈伤组织的形成率为 97.3%, 愈伤组织的分化率达到 80.6%。

3 讨论

目前, 番茄上已有利用根、下胚轴、子叶、花药、种胚等进行离体培养获得再生植株的报道, 但是在番茄的遗传转化方面利用较多的则是子叶和下胚轴, 并且前人对子叶和下胚轴离体培养适宜的培养基也进行了大量的探讨, 建立了成熟的离体培养再生系统。叶志彪等^[5]对不同激素组合进行比较试验表明, 番茄子叶诱芽培养基以 MS+ZT 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 效果最好, MS+ZT 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 次之。申琳等^[6]在研究番茄子叶转化系统时发现 MS+ZT 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的生芽率最高。陈火英等^[7]认为, MS+IAA 0.2 mg/L+BA 2.0 mg/L 的培养基对番茄子叶和下胚轴愈伤组织芽的诱导有较好的效果。试验研究结果也表明, 对番茄材料 06P28 以子叶作为外植体时, 适宜的分化培养基应为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L。

在番茄子叶外植体的培养过程中, 常见到一些仅长出 1 片粗壮的叶片而没有顶芽或有的虽有顶芽但叶片及顶芽均很肥厚、矮壮, 且叶片呈畸形卷曲的现象, 这就是所说的畸形芽和盲芽。畸形芽和盲芽发生的原因, 一般认为是因为番茄子叶产生愈伤组织的分裂方式很不规则, 并且也与激素种类及浓度、继代培养代数、温度和光照等有很大的关系^[3]。在试验过程中, 也出现了畸形芽和盲芽, 其影响了再生频率, 计划以后加强这方面的研究。

在番茄的组织培养过程中, 外植体的褐变也是比较常见的。褐变的发生与外植体组织中所含的酚类物质的多少及多酚氧化酶活性有直接关系^[8]。番茄含有较多的酚类物质, 这些酚类物质在完整的植物组织和细胞中与多酚氧化酶并不同时存在, 因此不会发生氧化作用。但是, 在组织培养过程中, 不可避免的会形成伤口, 使得酚类物质溢出, 并与多酚氧化酶相接触, 迅速氧化成褐色的醌类物质。醌类物质易与组织中的蛋白质发生聚合反应, 使酶系统失活, 进而导致组织中代谢的紊乱, 最终使组织衰老死亡。

影响褐变的因素很多,其中外植体的基因型、受伤程度、培养基中无机盐、激素等成分,材料的苗龄、所处部位和大小等生理状态,以及材料转移时间等都会直接影响外植体的褐变。因此,在试验的过程中,切割外植体时应尽可能使伤口平滑,并且缩短切口暴露在空气中的时间,或在切割外植体时在培养皿中加入少量无菌水;在培养基中加入抗氧化剂或活性炭,以及选择适宜的外植体、缩短继代周期等措施都可以有效地防止外植体的褐变。

参考文献

[1] Thonzik J Z. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomato conditions resistance against phytophthorainfestans [J]. Physiol Mol Plant Pathol. 1997. 51(4):265-270.
[2] Sandhu J S, Krasnyanski S F, Domier L L. Oral immunization of mice

with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response[J]. Transgenic Research, 2000. 9(2): 127-135.
[3] 于明礼, 张柱岐, 张法琴. 中蔬 6 号番茄高频再生体系的研究[J]. 河南农业科学. 2006(4):91-93.
[4] 梁美露, 徐向阳, 李景富. 抗生素对番茄愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 东北农业大学学报. 2005. 36(1): 19-22.
[5] 叶志彪, 李汉露, 周国林. 番茄子叶离体培养与再生成株[J]. 华中农业大学学报. 1994(13): 291-295.
[6] 申琳, 生吉萍, 罗云波. 番茄外源基因转化系统的研究[J]. 中国农业大学学报. 1998(3): 101-105.
[7] 陈火英, 张建华, 俞俊棠, 等. 番茄离体培养的形态发生[J]. 华东理工大学学报. 2001. 27(2): 139-142.
[8] 梁美露, 李景富, 谢立波, 等. 番茄组织培养存在的问题及对策[J]. 北方园艺, 2004(3): 74-75.

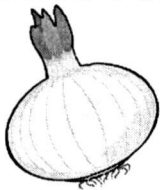
Research of Tomato 06P28 Cotyledon on the Establishment of Acceptor System

LI Feng¹, CAO Gang-qiang^{1,2}, LIANG Qiu-xia³, YING Fang-qing⁴, SHEN Juan¹

(1. Bioengineering Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China; 3. The Key Lab of Ion Beam Bioengineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 4. Zhengzhou Institution of Vegetable, Zhengzhou 450015, China)

Abstract: Took tomato 06P28 as experimental material, studied its cotyledon differentiation medium and its natural patience to Hygromycin and Carbentcillin. The results showed: the suitable differentiation medium was MS + 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L, and the perfect concentration of Hygromycin and Carbentcillin was 10 mg/L, 350 mg/L respectively.

Key words: Tomato; Cotyledon; Tissue culture; Gene transformation; Acceptor system



大蒜在农业上的应用

大蒜含有丰富的天然抗菌物质,其主要成分为大蒜素。将大蒜浸提液应用于作物栽培方面,不但可防治病虫害,而且还有利于促进作物的生长发育;应用于植物组织培养方面,则可有效地防止组培物受污染;应用于农产品防腐保鲜,既可靠,又安全。现将其应用方法及效果介绍如下。

1 大蒜浸提液的制备方法

将大蒜去皮捣烂,按上述不同应用浓度加入适量清水,浸泡数小时后,再经煮沸、冷却、过滤即成。

将去皮大蒜捣成糊状,用适量清水

浸泡,并经压榨、过滤,制成大蒜原汁;应用时,再加入清水配成所需浓度便可。

在大蒜浸提液中,加入适量乙醇,制成 40%乙醇大蒜原液,其应用效果尤佳。

2 大蒜浸提液在农业上的应用

防治农作物病虫害 用于西瓜浸种处理,防治枯萎病及锈病的效果,优于萎锈灵等化学农药。用于西红柿种苗浸根处理经过 5 min 左右,能有效地防治根线虫等危害。

促进作物生长发育 采用 2%大蒜

液,进行黄瓜种子浸种处理,可以显著地促进黄瓜种子胚根伸长生长,其胚根长度比对照高出 23.7%~43.1%。

防止组培物受污染 通过对百合组织培养的试验证明,在其培养基中添加 2%大蒜液,可以抑杀培养物上的有害杂菌、真菌及细菌,从而可有效地避免组培物受污染,提高组培成功率。

农产品的防腐保鲜 大蒜浸提液是一种无化学污染的天然防腐剂,其所含的大蒜素,对多种腐败细菌或真菌,均具有强抑杀力。