

番茄子叶不定芽分化的初探

赵 歌¹, 王 谨², 储荣华¹, 陆小平¹

(1. 苏州大学 金螳螂建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州工业园区白塘植物生态园, 江苏 苏州 215123)

摘 要: 对番茄子叶不定芽分化进行了探讨。结果表明: 在番茄子叶(或子叶切段)离体培养中, 以 2/3 子叶片处切取子叶所获得的外植体, 用于子叶不定芽分化的起始材料最好; 利用番茄种子的胚体直接进行组培, 再从胚体上切取子叶作为外植体进一步培养可有效缩短组织培养周期。

关键词: 番茄子叶; 组织培养; 定芽分化

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0150-04

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)是世界上最重要的蔬菜之一, 它是茄科(Solanaceae)番茄属(*Lycopersicon*)的 1 a 生或多年生草本或半灌木草本植物。原产于南美热带地区, 具有适应范围广、产量高、营养丰富、用途广泛等优点。传统的番茄改良技术主要采用有性杂交和在大田条件下的大面积选择。自 20 世纪 80 年代初以来, 植物基因工程的发展为番茄育种开拓了新的途径。番茄的组织培养自 1922 年 Robbins 首次报道离体根尖培养成功以来, 国内外相继有利用不同番茄的外植体(如胚、茎段、茎尖、花药及原生质体等)组培成功的报道。McCormick 等首次报道番茄基因转化的成功, 继后又有许多关于在不同番茄品种中利用农杆菌进行遗传转化获得成功的报道, 但至今番茄基因转化仍然未能达到完善的地步。当前, 在植物基因工程技术中, 多数成功的转化体系都是建立在良好的再生系统上^[1]。自人类首次利用根诱导培养出的愈伤组织获得再生植株以来, 国内外研究者便相继对番茄的组织培养体系进行了研究, 但这些报道中, 有的培养周期长, 有的培养基复杂、操作繁琐, 有的外植体取材受季节限制。植物基因工程经过 20 多年的发展, 实验操作技术日臻完善, 利用分子生物学手段对植物遗传性状进行分子改良, 取得了卓越成效, 其成功得益于植物离体培养的再生体系。可以认为, 植物组织培养技术及成熟的再生体系为植物基因工程建立了研究平台, 而植物基因工程的研究是组织培养的纵深发展。为了开展植物抗冻蛋白基因对喜温

蔬菜的遗传转化研究, 试验采用番茄作材料, 对番茄子叶的再生进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

市售“合作 908 粉红”番茄种子。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制^[2] 发芽培养基: 1/2MS+蔗糖3%+琼脂 0.8%, pH 5.8; 分化培养基 MS+BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.8%, pH 5.8。

1.2.2 种子处理 处理 1: 将番茄种子在流水中浸种 2 h, 无菌操作台下用 70%酒精消毒 1 min 再用 0.1%升汞消毒 8~10 min。用无菌水洗 3~5 次后, 将种子播入发芽培养基中, 置于 25℃条件下培养, 在 1 500 lx、12 h/d 光强的日光灯从顶部提供 12 h 光周期的光照。2 周后将子叶切下备用。处理 2: 将番茄种子用温水浸种 48 h, 无菌操作台下 70%酒精消毒 1 min 再用 0.1%升汞消毒 10 min。用清水清洗 3~5 次后切开种皮取出完整胚体备用(如图 1)。

1.2.3 无菌苗的培养 将处理 1 得到的种子接种于发芽培养基上, 在 25/23℃(白天/夜晚)、1 500 lx、12 h/d 的光照条件下的培养箱中培养, 2 周后种子萌发, 得到具 2 片子叶的无菌幼苗(以下简称实生苗); 将处理 2 得到的无菌番茄胚直接接种于分化培养基上, 在 25/23℃(白天/夜晚)、1 500 lx、12 h/d 的光照条件下培养, 1 周后由幼胚直接长大得到具 2 片子叶的无菌番茄幼苗(以下简称胚苗)。

1.2.4 外植体的切取 取上述萌发的番茄幼苗(处理 1: 10~14 d, 处理 2: 6~7 d), 分下列不同外植体进行再生分化能力的比较试验, 外植体切取(如图 2、3)。实生苗外植体切割方式(Sa~Sf): Sa, 带柄完整子叶(从切口 1 在子叶柄与下胚轴交界处切下子叶, 仔细去顶芽); Sb, 不带柄完整子叶(从切口 3 在子叶与叶柄交界处切下子

第一作者简介: 赵歌(1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: xiaoge7908@163.com。

通讯作者: 陆小平(1958-), 男, 博士, 教授, 现主要从事植物生理生化方面研究工作。E-mail: szlxp@yahoo.com.cn。

基金项目: 苏州市科技支撑(农业)资助项目(SNG0908)。

收稿日期: 2009-10-20

叶); Sc, 二分切子叶(从切口 1, 6 处将子叶分成 2 段); Sd, 三分切子叶(从切口 1, 4, 5 处将子叶分成 3 段); Se, 下胚轴(从切口 1, 2 切取下胚轴, 不带顶芽); Sf, 2/3 子叶(从切口 4 处切下子叶片); 胚苗外植体切割方式(Pa ~ Pd); Pa, 二分切子叶(从切口 1, 3 处将子叶分成 2 段);

Pb, 三分切子叶(从切口 1, 4 5 处将子叶分成 3 段); Pc, 胚轴(从切口 1, 2 切取胚轴); Pd, 2/3 子叶(从切口 4 处切下子叶片)。以上子叶均为完全展开的生长健全子叶, 采用 2 种外植体在培养基上的放置方式, 即将外植体平卧于培养基表面或垂直插入培养基中。

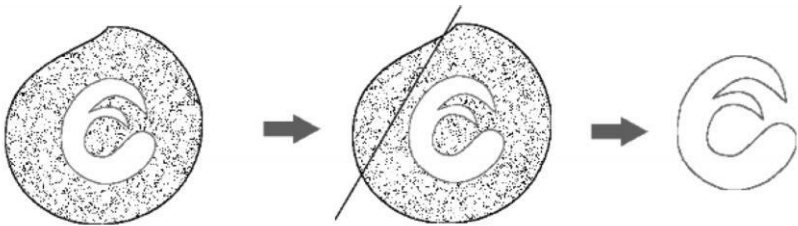


图 1 胚的取得

2 结果与分析

2.1 种胚外植体组培

如图 2 所示对实生苗进行切割, 得到不同类型外植体并接种于分化培养基中, 3 周内对其生长分化进行调查, 结果如表 1。

从表 2 的分化率看, 二分切子叶外植体的分化率最高, 胚轴的分化率最低, 而 2/3 子叶的分化率处于中等偏上的水平; 从每个外植体上平均芽个数来看, 带叶柄子叶和胚轴的不定芽分化数量都较少, 二分、三分切子叶以及 2/3 子叶的不定芽分化能力都很强。

表 1 实生苗不同类型外植体对不定芽分化的影响

| 外植类型 | | 带柄完整子叶 | | | 不带柄完整子叶 | | | 二分切子叶 | | | 三分切子叶 | | | 胚 轴 | | | 2/3 子叶 | | |
|------|---------|--------|----|-----|---------|----|-----|-------|----|-----|-------|----|-----|-----|----|-----|--------|----|-----|
| 总接种数 | | 19 | | | 21 | | | 20 | | | 18 | | | 20 | | | 22 | | |
| 培养天数 | | 愈 | 不 | 不定 | 愈 | 不 | 不定 | 愈 | 不 | 不定 | 愈 | 不 | 不定 | 愈 | 不 | 不定 | 愈 | 不 | 不定 |
| | | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 |
| 7 d | 计数百分比/% | 13 | 11 | 20 | 11 | 8 | 9 | 12 | 10 | 35 | 11 | 9 | 30 | 12 | 5 | 7 | 16 | 10 | 23 |
| | | 68 | 58 | 181 | 52 | 38 | 113 | 60 | 50 | 350 | 61 | 50 | 333 | 60 | 25 | 104 | 72 | 45 | 230 |
| 14 d | 计数百分比/% | 17 | 15 | 33 | 15 | 13 | 15 | 17 | 16 | 64 | 15 | 10 | 42 | 18 | 8 | 13 | 20 | 14 | 57 |
| | | 89 | 79 | 220 | 71 | 62 | 115 | 85 | 80 | 400 | 83 | 56 | 420 | 90 | 40 | 163 | 90 | 64 | 407 |
| 21 d | 计数百分比/% | 18 | 16 | 43 | 18 | 16 | 19 | 19 | 18 | 73 | 17 | 14 | 63 | 18 | 11 | 16 | 21 | 19 | 80 |
| | | 94 | 84 | 269 | 85 | 76 | 119 | 95 | 90 | 406 | 94 | 78 | 450 | 90 | 55 | 145 | 95 | 86 | 421 |

注: 百分比栏分别指: 愈伤组织/总接种数、不定愈伤/总接种数、不定芽/不定愈伤的比值; 不定愈伤是指有不定芽分化的愈伤组织 外植体类型 见图 2。由于操作问题导致的外植体死亡或不分化均不计入数据。

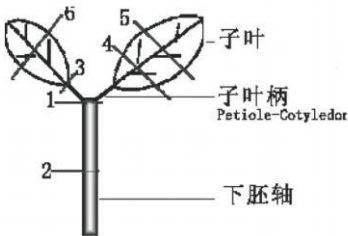


图 2 实生苗外植体的切割方式

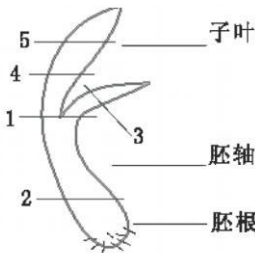


图 3 胚苗外植体的切割方式

2.2 胚苗的外植体组培

如图 3 所示对无菌培养得到的胚苗进行切割(由于胚苗较小操作水平有限, 只切得二分切子叶、三分切子

叶、胚轴以及 2/3 子叶进行培养), 得到不同类型外植体并接种于分化培养基中, 15 d 内对其生长分化进行调查, 记录数据见表 3。

表 2 实生苗不同类型外植体对不定芽分化的影响统计

| 外植类型 | 带柄完整子叶 | 不带柄完整子叶 | 二分切子叶 | 三分切子叶 | 胚 轴 | 2/ 3子叶 |
|-------------|--------|---------|-------|-------|------|--------|
| 分化率/ % | 84 | 76 | 90 | 78 | 55 | 86 |
| 每个外植体上的平均芽数 | 2~ 3 | 1~ 2 | 4~ 5 | 4~ 5 | 1~ 2 | 4~ 5 |

注: 每种类型外植体分化率= 产生芽的外植体/ 总外植体数, 培养 3 周统计结果。

表 3 实生苗不同类型外植体对不定芽分化的影响

| 外植类型 | | 二分切子叶 | | | 三分切子叶 | | | 胚轴 | | | 2/ 3子叶 | | |
|------|--------|-------|----|-----|-------|----|-----|----|----|-----|--------|----|-----|
| 总接种数 | | 16 | | | 19 | | | 15 | | | 17 | | |
| 培养天数 | | 愈 | 不 | 不 | 愈 | 不 | 不 | 愈 | 不 | 不 | 愈 | 不 | 不 |
| | | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 | 伤 | 定 | 定 |
| | | 组 | 愈 | 芽 | 组 | 愈 | 芽 | 组 | 愈 | 芽 | 组 | 愈 | 芽 |
| | | 织 | 伤 | | 织 | 伤 | | 织 | 伤 | | 织 | 伤 | |
| 5 d | 计数 | 10 | 9 | 10 | 11 | 9 | 12 | 9 | 4 | 5 | 13 | 9 | 16 |
| | 百分比/ % | 63 | 56 | 111 | 58 | 47 | 133 | 60 | 27 | 125 | 76 | 53 | 178 |
| 10 d | 计数 | 13 | 12 | 30 | 15 | 10 | 37 | 13 | 6 | 8 | 16 | 11 | 40 |
| | 百分比/ % | 81 | 75 | 250 | 79 | 53 | 370 | 87 | 40 | 133 | 94 | 65 | 364 |
| 15 d | 计数 | 15 | 15 | 61 | 17 | 13 | 64 | 14 | 9 | 17 | 16 | 15 | 70 |
| | 百分比/ % | 94 | 94 | 406 | 89 | 76 | 461 | 93 | 60 | 188 | 94 | 88 | 467 |

注: 说明同表 1, 外植体类型, 见图 3。

由表 4 可知, 15 d 后胚苗外植体的不定芽分化情况与实生苗各外植体的分化情况及其相似且分化率略高。

2.3 外植体不定芽的分化

外植体分化出不定芽后, 对其不定芽的生长情况进行调查, 发现对于来源相同的外植体(实生苗或胚苗), 二分切子叶和三分切子叶的子叶片下端切口处均产生大量愈伤组织和不定芽, 且发生的芽数较多; 虽然不带柄完整子叶和带柄完整子叶的分化率较高, 但不定芽生长较差, 切口附近发生的不定芽亦较少; 胚轴的分化效率最低, 且芽小数目少。总体而言, 番茄离体培养的分

化率子叶高于下胚轴, 从子叶片获得的大切口外植体高于从子叶柄任一端切割所获得的小切口外植体。2/3 子叶的分化率虽并不是最高, 但由其分化的不定芽生长较为健壮, 生长速度也较快。

表 4 实生苗不同类型外植体对不定芽分化的影响统计

| 外植类型 | 二分切子叶 | 三分切子叶 | 胚轴 | 2/ 3子叶 |
|----------------|-------|-------|------|--------|
| 分化率/ % | 94 | 76 | 60 | 88 |
| 每个外植体上的平均芽数/ 个 | 4~ 5 | 4~ 5 | 1~ 2 | 4~ 5 |

注: 每个类型外植体分化率= 产生芽的外植体/ 总外植体数, 培养 15 d 统计结果。



图 4 胚轴的畸形分化



图 5 子叶的畸形分化

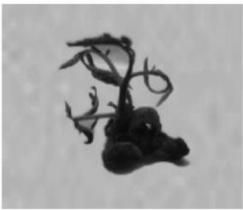


图 6 子叶的正常不定芽分化



图 7 番茄胚子叶愈伤组织



图 8 番茄胚子叶健壮组培苗

子叶的畸形分化现象: 在实生苗子叶的组培试验中发现, 部分子叶和胚轴脱分化后的愈伤组织并不能再分化出完整的不定芽, 而是分化到某一阶段(如肥厚叶)便不再继续(图 4~ 6)。

3 讨论

3.1 畸形分化原因及防止措施

与玻璃化苗和外植体褐化一样, 畸形分化是植物组织培养中常见的问题之一, 也是植物组织培养的严重障碍。有学者认为, 畸形分化与玻璃化苗的发生机理相似, 与培养基渗透势不当、培养基中植物激素水平和培养瓶内气体环境有关^[4]。在该试验中, 畸形分化现象多发生在琼脂含量少的培养基中, 另外胚轴愈伤组织分化不定芽出现畸形苗较子叶严重。

当培养基中琼脂或蔗糖浓度越高, 越影响其衬质势和水分状况, 从而组织培养中畸形分化现象越低; 当采用胚轴(或茎段)作为外植体时, 由于其组织细胞分化较深, 脱分化和再分化能力较弱较易发生畸形分化现象。另外, 激素水平和光照、空气等环境因素与畸形分化的关系有待进一步的探讨和研究^[9]。其防止措施则是在适当条件下采用较高浓度的琼脂或蔗糖培养基进行试验, 对于番茄而言采用子叶作外植体较好。

3.2 2/3 子叶不定芽分化的优越性

就相同来源(实生苗或胚苗)的外植体而言, 2/3 子叶的不定芽分化最为稳定且获得的新植株最为健壮。二分切子叶和三分切子叶的子叶片下端(近端)切口处均产生大量愈伤组织和不定芽, 且发生的芽数较多; 虽

然不带柄完整子叶和带柄完整子叶的分化率并不低,但芽生长较差,切口上发生的芽数亦较少,这可能是由于切口创伤相对较小,使得创伤组织所产生的激素相应减少,从而使切口处的细胞在脱分化与再分化的过程中就显得不很活跃。同时也注意到2种外植体切口周际的愈伤组织明显减少,此结果与张鹏等^[6]对菜心的培养不同,菜心子叶柄的器官发生能力最强,他们认为这与子叶子叶柄受到外界伤害较子叶块和下胚轴小有关;无论是实生苗的下胚轴还是胚苗的胚轴其分化率均在60%以下,且芽的数目也较少。对于番茄离体组培芽的分化率来说,子叶高于胚轴,从子叶片获得的大切口外植体高于从子叶柄任一端切割所获得的小切口外植体。

由于该试验是番茄转基因研究的前期准备,所以还要考虑到不同方式所获得外植体对农杆菌感染后芽再生能力的影响。试验表明,带柄完整子叶的分化率虽然最高,但在进行农杆菌转化试验中发现,由于带柄子叶在切割时难免会带入腋芽原基而产生假阳性,这对转化体的后期筛选带来不便。因此,采用不带叶柄的子叶作为转基因受体较为合适。对三分切子叶及更小分切子叶进行的农杆菌感染后再生能力试验表明,其绝大部分外植体在培养后不久即褐变死亡,这可能是由于外植体小,易于受到菌体的刺激的缘故,最终导致死亡。总之,试验表明,以2/3子叶作为外植体不但再生能力强,而且不定芽分化率高。

3.3 利用胚苗快速获得优良组培苗

在组培实验中如何有效缩短组培时间是试验探讨的重要因素之一,一般在较短时间内获得的再生体具有更高再生能力和更好的生活力^[7]。剥取番茄的胚代替种子直接进行培养让这一设想得以完美实现。试验表明,通过胚的培养不但可以有效缩短获得原实生苗的时

间,且由其切割得到的外植体再生和分化能力都更强,从而可以在更短时间内获得优良组培苗,这一点无论对组培育苗或对转基因试验都具有很高的应用价值。

组培相关资料报道,作为外植体的器官,其生理状态和发育年龄直接影响形态发生^[8]。一般认为,沿植物的主轴,越向上的部分所形成的器官的生长时间越短,幼年组织比老年组织具有较高的形态发生能力,如黄瓜子叶随着年龄增长,其器官再生能力逐渐减弱甚至完全失去再生能力^[9]。试验中所使用的番茄胚的培养方法则有效地避免了组织老化情况的发生,将培养周期由原来的7d缩短为5d,从种子到获得再生植株所需时间比原来缩短2d,且组培苗生长健壮,为后期的进一步试验提供了素材。

参考文献

[1] 贺竹梅,李宝健,张绍松,等.番茄撞基因受体系统的研究[J].应用与环境生物学报,1998(4): 247-250.
[2] 潘瑞炽.植物组织培养[M].3版.北京:高等教育出版社,2003.
[3] 卢其能.樱桃番茄的组织培养与快速繁殖研究[J].宜春学院学报(自然科学版),2001,23: 48-50.
[4] 何秀霞,陆一鸣,白杰英,等.番茄组织培养体系的建立及其影响因素的研究[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2003,18: 16-18.
[5] 罗素兰,陈若,长孙东亭.番茄组培苗的不同阶段对抗生素和PPT的抗性筛选试验[J].海南大学学报(自然科学版),2003,21: 24-29.
[6] 张鹏,凌定厚.提高菜心离体植株再生频率的研究[J].植物学报,1995,37: 902-908.
[7] 贺竹梅,杨貌仙.秃杉组织培养研究[J].广西植物,1991(11): 316-323.
[8] 周黎军,魏琴,曹有龙.樱桃番茄的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2002,38: 356-357.
[9] Kazuo I, Toshiko U, Kenkou T, et al. Shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in tissue culture using several kinds of supporting material[J]. Plant Science, 1995, 108: 93-100.

The Investigation of The Shoot Regeneration of Tomato Cotyledon

ZHAO Ge¹, WANG Jin², CHU Rong-hua², LU Xiaoping¹

(1. Gold Mantis School Architecture and Urban Environment, Soochow University, Soochow, Jiangsu 215123; 2. Baitang Ecological Garden of Plant, Suzhou Industrial Park, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: The shoot regeneration of tomato cotyledon was studied. The result indicated that, 2/3-cut cotyledon was the best recipient for tomato tissue culture among various explants, including petiole-cotyledon and multicutting cotyledon. The embryo of tomato was cultured in the MS agar medium, then the explants which were cutted from those cultured-embryos were planted for tissue culture. By this way, we can shorten the tissue period for tomato culture, and the more vigorous plants can be obtained.

Key words: tomato cotyledon segments; tissue culture; shoot regeneration