

番茄再生体系的建立

乔永旭

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

摘要:以“田园6号”番茄子叶和下胚轴为试材,研究激素的种类和浓度对愈伤组织诱导、愈伤组织继代、不定芽分化及生根的影响,并研究了各因素对番茄愈伤组织褐变的影响。结果表明:MS+IBA 0.8 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 诱导所得愈伤最好,MS+IBA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 最适于愈伤组织的继代,MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 和 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 分别在诱导外质体直接分化不定芽和愈伤组织分化不定芽上效果最佳,MS+IAA 0.5 mg/L 是诱导不定芽生根的理想培养基。外植体种类和光照强度均对愈伤组织的褐化有一定的影响,10 mg/L 的 VC 和 0.3% 的活性炭则能减缓愈伤组织的褐化。

关键词:番茄;愈伤组织;不定芽;生根;褐化

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0174-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)是我国重要的栽培蔬菜。其果实富含多种维生素、糖类、有机酸和无机盐^[1-2],有预防动脉硬化和清热解毒等功效,深受人们喜爱。生产上种子的繁殖存在着易混杂等缺点,随着植物组织培养技术的发展,以子叶、下胚轴和叶片为外植体,建立番茄高频再生系统已取得成功^[3],但同时也发现番茄再生体系具有基因型依赖性,不同的品种其再生的条件不同^[4]。要建立适合当地气候的番茄品种的再生体系,单单套用他人的结论是难以做到的,必须对其进行探索。该试验选用“田园6号”番茄为材料,用不同浓度的激素以优化培养基配方,建立番茄再生体系,为番茄的遗传育种提供技术参考。

作者简介:乔永旭(1978-),男,硕士,讲师,现研究方向为植物细胞工程和植物资源开发与利用。E-mail:qiaoyx123@163.com。

收稿日期:2010-04-27

1 材料与方法

1.1 试验材料

“田园6号”番茄种子由唐山市农业科学院提供。将其无菌条件下接种到 MS 基本培养基上(含有蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8。下同),培养条件为光照 12 h,光照强度 2 000 lx,培养温度(25±1)℃(培养条件下同)。待幼苗子叶完全展开时备用。

1.2 试验方法

1.2.1 再生体系的建立 将子叶切成 0.5 cm² 的叶块,下胚轴切成 0.5 cm 的茎段分别接种到诱导培养基中(表 1,基本培养基为 MS,下同)。每瓶接种 3 块(段),每个处理 10 瓶。待愈伤组织生长到 15 d 时,取生长良好的绿色愈伤继代和分化生芽(表 2),每种处理 5 瓶。待不定芽长至 1~2 cm 时,接种于生根培养基中(表 3),统计生根率。生根率%=(生根幼芽数/接种幼芽数)×100%;同时观察根的形态。

Properties and Measurement of Polyphenol Oxidase in Flesh of Miyou Pomelo Fruits

JI Shu-juan¹, YIN Jing-nan^{1,2}, LI Jia-zheng²

(1. Food College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Tianjin Key Laboratory of Postharvest Physiology and Storage of Agricultural Products, National Engineering and Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products, Tianjin 300384)

Abstract: The activity of polyphenol oxidase(PPO) in flesh of Miyou pomelo fruits was measured with spectrophotometer at 420 nm using catechol as substrate. The effects of the different substrate concentration, temperature, pH, substrate concentration on PPO activity were studied and the reaction kinetic equation was established. The results showed that the optimum temperature and pH were 10℃ and pH 6.4, respectively. The reaction kinetic of enzymatic reaction in this experiment was built according to Michaelis equation. The Vmax and Km were 22.452 U/min and 128.2 mmol/L, respectively. The average activity of PPO at different time decreases continuously.

Key words: pomelo; polyphenol oxidase; enzymatic properties; measurement

表 1 愈伤组织诱导培养基的激素配比

培养基 /mg·L ⁻¹	编号						
	1	2	3	4	5	6	7
IAA	0.2	0.5	0.8	—	—	—	—
IBA	—	—	—	0.2	0.5	0.8	—
6-BA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

表 2 继代和分化生芽培养基的激素配比

培养基 /mg·L ⁻¹	编号					
	1	2	3	4	5	6
6-BA	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0
IAA	1.0	1.0	0.5	0	0	0
IBA	0	0	0	1.0	1.0	0.5

表 3 生根培养基的激素配比

培养基/mg·L ⁻¹	编号			
	1	2	3	4
IAA	0	0.3	0.5	0.7

1.2.2 愈伤组织褐变的防治 选取愈伤组织诱导的最佳培养基,将番茄子叶和下胚轴接种于该培养基中。采用 3 种方法处理,①分别置于较强光照(2 000 lx),弱光(1 000 lx)与黑暗中进行培养;②分别在培养基中添加 0、1、10、50 mg/L 浓度的 VC;③分别添加 0%、0.1%、0.3%、0.5%的活性炭。观察愈伤组织褐化情况。

2 结果与分析

2.1 再生体系的建立

2.1.1 外植体的选择 不同外植体诱导愈伤和分化生

表 4 不同激素配比的诱导培养基对番茄诱导愈伤及芽分化的影响

编号	子叶				下胚轴			
	出愈时间/d	出愈率/%	芽分化时间/d		出愈时间/d	出愈率/%	芽分化时间/d	
1	18	60	25	53.8	23	42	—	—
2	16	83.3	23	73.3	22	56	27	50
3	16	80	25	63.3	22	46.7	12	22.2
4	16	40	20	38.9	22	33.3	—	—
5	15	76.7	—	—	20	60	—	—
6	15	86.7	—	—	20	63	—	—
7	23	6.7	—	—	—	—	—	—

芽的能力不同(图 1、2)。接种 3~4 d 后子叶的边缘呈黄绿色,下胚轴水渍程度增高。7~8 d 后子叶切口边缘膨大卷起,下胚轴膨大也较快,不如子叶明显,但膨大位置在下胚轴上部。10 d 后子叶厚度明显增加,下胚轴缓慢膨胀。15 d 子叶边缘出现愈伤组织,20 d 时下胚轴表面出现少量白色愈伤,同时产生了丛生芽,子叶的出芽率明显高于下胚轴。子叶较下胚轴易产生愈伤组织,且所生成的愈伤组织分化生芽率较高;而下胚轴的下部较难诱导出愈伤组织,上部虽能产生愈伤,但不易分化生芽。可见子叶为愈伤组织诱导和芽分化适宜的外植体。

2.1.2 愈伤组织的诱导及丛生芽的再生 如表 4 所示,在 7 种不同激素组合的培养基上能不同程度地诱导出愈伤组织,有的愈伤组织还能进一步分化出不定芽(图 3)。但以 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.8 mg/L 诱导愈伤组织形成率最高,而愈伤组织的继代则以 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L 为最好。结果表明 6-BA 浓度对愈伤组织分化不定芽有较大的影响。各个处理组诱导出芽的百分率存在较大的差异,在激素组合不太合适的培养基上,愈伤组织不能分化,甚至难以生长。最后发现 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 诱导外质体直接分化不定芽率最高,MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 诱导愈伤组织分化不定芽率最高。



图1 子叶诱导愈伤组织

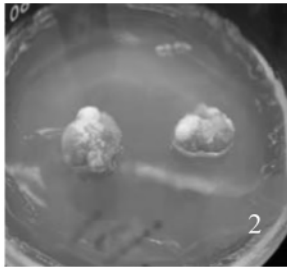


图2 下胚轴诱导愈伤组织

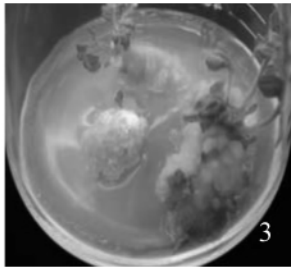


图3 分化生芽

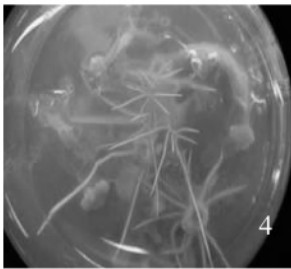


图4 诱导生根

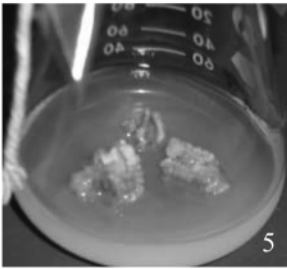


图5 褐化的愈伤组织

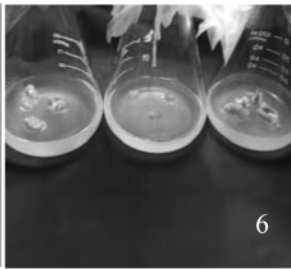


图6 褐化组与正常组对比

2.1.3 植株生根 如表 5 所示,添加 IAA 后在生根时间、平均根数、植株生长势等方面具有明显的优势,不同浓度的 IAA 对根的生长也不同。1 周左右均可生根,但对根长势的影响差异比较明显,以 IAA 0.5 mg/L 浓度的生根培养基作用效果最理想(图 4)。

2.2 愈伤组织褐变的防治

2.2.1 外植体种类对褐变的影响 子叶在 15 d 时诱导出愈伤,愈伤组织生长 10 d 后开始褐变,12 d 后褐化严重并且有死亡现象(图 5)。下胚轴在 20 d 时诱导出愈伤,40 d 后愈伤组织开始褐变,因此下胚轴产生的愈伤组织不易褐变。

表 5 不同 IAA 浓度的生根培养基对番茄再生植株生根的影响

IAA 浓度 /mg · L ⁻¹	生根率 /%	生根时间	平均根数 /条	根生长状况
0	23.3	2 周左右	1.3	少量细根
0.3	53.3	1 周左右	2.4	细长,须根少
0.5	83.3	1 周以内	5.8	粗壮,须根多
0.7	76.6	1 周以内	3.1	主根少,须根多

2.2.2 光照条件对褐化的影响 黑暗条件下 15 d 后开始褐化,1 000 lx 则在 13 d 后褐化。而 2 000 lx 下的愈伤在 10 d 时就开始褐化。因此适度黑暗和弱光有利于减轻褐变。

2.2.3 VC 对褐化的影响 VC 对愈伤组织的褐变影响明显,不添加 VC 时,愈伤组织 10 d 后开始出现褐化现象;添加 VC 后,愈伤组织在 12~20 d 才相继出现褐化。当 VC 浓度为 10 mg/L 时,外植体的褐化程度最低,褐化率也最低(图 6)。

2.2.4 活性炭对褐化的影响 没有活性炭时,愈伤组织易褐化死亡,添加后褐变程度明显减轻。随着其浓度的增加,褐变程度越来越低,但同时愈伤组织的生长速度也越来越慢。试验表明,0.3% 的活性炭既能明显减轻褐变又能保持愈伤组织的快速生长,为适宜的浓度。

3 结论与讨论

张艳芳等^[5]以茎段为材料,愈伤组织诱导和芽分化都在一种培养基上进行,加快了再生植株的形成过程。但其不能将愈伤诱导和分化生芽分开,无法为育种提供生长均一的愈伤组织。研究表明不同番茄品种需要的激素种类和浓度不同,其中以 ZT 和 IAA 较为常见^[6]。研究发现 6-BA 能明显促进愈伤组织的诱导和不定芽的分化,这与任春梅^[7]的研究相一致。不同的外植体诱导愈伤组织的能力不同,子叶诱导愈伤组织的能力明显强于下胚轴,欧阳波^[6]的研究则相反,这可能与不同品种的内源激素的含量和种类有关。褐变严重影响细胞生长和分化,研究表明强光照能降低愈伤组织的褐化率,另外培养基中添加抗氧化剂或吸附剂也可以减缓愈伤组织褐变程度。该研究发现,VC 10 mg/L 和 0.3% 的活性炭能明显抑制褐变发生的速度,但是过量的活性炭通过吸附培养基中的生长物质和营养物质,反而抑制愈伤组织的生长,因此适宜浓度的活性炭对于防止愈伤组织褐变是非常有必要的。

参考文献

- [1] 余诞年,吴定华,陈竹君. 番茄遗传学[M]. 湖南:科学技术出版社,1999:235-234.
- [2] 霍建勇,刘静,冯辉,等. 番茄果实风味品质研究进展[J]. 中国蔬菜,2005(2):34-36.
- [3] 李铁松,王关林. 番茄外植体诱导直接分化不定芽建立高频再生系统[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版),2003,26(2):178-182.
- [4] 苏彩霞,霍秀文,庆海,等. 番茄子叶、下胚轴植株再生体系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报,2006,27(4):91-95.
- [5] 张艳芳,霍秀文,苏彩霞,等. 番茄遗传转化体系的建立[J]. 中国农学通报,2008,24(3):58-61.
- [6] 欧阳波,李汉霞. 番茄下胚轴转化获得转基因植株[J]. 华中农业大学学报,2002,21(3):206-209.
- [7] 任春梅,高必达. 番茄子叶的离体再生与移栽[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(3):214-217.

Study on Regeneration System of *Lycopersicon esculintum* Mill

QIAO Yong-xu

(Department of Life Science, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: The cotyledons and hypocotyls of Tianyuan No. 6 tomato were used as explants to study the effects of the kind of different hormones and their combinations on callus induction, callus subculture, differentiation of adventitious buds and roots and the impact of factors on the tomato callus browning. The results showed that medium of MS+IBA 0.8 mg/L+6-BA 2.0 mg/L could induce the best callus, the medium of MS+IBA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L was most suitable for callus subculture, the mediums of MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L and MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L were the best mediums respectively for inducing buds from explants directly and callus, and the medium of MS+IAA 0.5 mg/L was the ideal medium for the induced rooting from adventitious buds. Then kind of explants and illumination would affect the browning of the callus in some way. But the 10 mg/L VC and 0.3 activated carbon could slow it.

Key words: tomato; callus; adventitious buds; rooting; browning