

Micro-Tom 番茄离体再生条件的选择

王 月, 郭 凤, 林 英

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以 Micro-Tom 番茄子叶和下胚轴为外植体进行离体组织培养, 研究了不同激素及浓度对愈伤组织诱导、不定芽分化及生根的影响。结果表明:培养基组成为 MS+2.0 mg/L ZR+0.5 mg/L IAA+3%蔗糖最有利于愈伤组织和不定芽的形成;诱导不定芽生根的理想培养基为 1/2MS+1.5%蔗糖+0.2 mg/L IBA。

关键词:Micro-Tom 番茄; 下胚轴; 子叶; 愈伤; 不定芽分化

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0139-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)为茄科番茄亚属 1a 生草本植物。番茄的果实为 1a 生蔬菜,据联合国粮农组织 2007 年的统计资料,世界番茄的总产量超过了 1 亿 t,价值大概 240 亿美元,番茄已经成为蔬菜类中产量最高的蔬菜品种,中国的番茄产量占世界总产量的 30%以上,番茄具有很高的营养价值和经济价值。番茄是典型的双子叶植物,具有自花授粉、易杂交性、繁殖系数高、丰富的遗传资源、大量的 EST 序列、商业化的番茄芯片的开发等特性,使番茄已经成为当之无愧的作物研究中的模式植物。Micro-Tom 番茄是一种番茄突变体,它保留了普通番茄作为模式植物的基本特征,但植株矮小、生命周期更短,具有节省研究空间、缩短研究时间的巨大优势。因此, Micro-Tom 番茄比普通番茄更适合应用于功能基因组学研究^[1]。高效的 Micro-Tom 番茄离体再生条件是进行番茄离体培养和转基因操作的重要技术基础。因此,该研究结果可为番茄基因功能等相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Micro-Tom 番茄种子购自南京市丰泰园艺种业有限公司。

1.2 培养基

以 MS 为基本培养基,添加不同种类和浓度的激素配成诱导培养基。诱导培养基均含 3%蔗糖,调节 pH

值至 5.8,添加 0.5%琼脂粉固化。培养基分装后,在 0.1 MPa 高压条件下灭菌 20 min。ZR、IBA 和 IAA 等不耐高温的激素需经微孔滤器灭菌,待培养基高压灭菌降温后再添加到基本培养基里。

1.3 种子的处理

选取籽粒饱满、大小一致、无病虫害种子放于小烧杯中,在自来水下重复冲洗 3 次,转移至超净工作台上。先用无菌水冲洗 2 次,然后种子用 75%酒精浸泡 30 s,倒掉酒精再次用无菌水冲洗 2 次;接下来将种子放入盛有 10%(W/V)的 NaClO 溶液的无菌小烧杯里,封好口后,放到摇床 100 r/min 振荡灭菌 20 min 后,倒掉消毒液用无菌水冲洗 2 次,再用无菌水浸泡 5 min,继续用无菌水冲洗 2 次。

1.4 无菌苗的培养

将灭过菌的种子,接种到 MS 培养基中,在(24±1)℃条件下暗培养 5~6 d,然后转至光照强度为 2 000~3 000 lx 光照 16 h/d 培养,备用。

1.5 外植体的准备

取培养约 10 d 的幼苗,用镊子取下子叶,用刀片将子叶两端切掉并垂直于叶脉将其平均分成两半。下胚轴的选取将幼苗根切掉后,继续切下约 5 mm 的切段即可。将切好的外植体接种在不含有浓度 ZR 的 MS 培养基,于 24℃,16 h/d 光周期条件下培养。每处理 30 个外植体,3 次重复,分别于 10、20、30、40 d 后统计不定芽和愈伤组织的再生频率。最佳 ZR 浓度筛选好后,在 MS 基本培养基中添加最佳浓度的 ZR 后,加入不同浓度的 IAA,在相同条件下培养。每处理 30 个外植体,3 次重复,分别于 10、20、30、40 d 后统计不定芽和愈伤组织的再生频率。

1.6 生根培养

选取顶芽正常、生长健壮的再生幼芽(12 cm),将基部愈伤组织及培养基完全切除,转接到生根培养基上培

第一作者简介:王月(1987-),女,本科,研究方向为微生物。
E-mail:wangyue-163@126.com。

通讯作者:林英(1975-),女,博士,讲师,现从事设施园艺学方向研究工作。

基金项目:沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目(20070113);
沈阳农业大学大学生科技创新资助项目。

收稿日期:2010-05-19

养,使其形成完整植株^[2]。生根采用 1/2MS 培养基,每瓶接种 1~2 个幼芽。待幼苗生出侧根后,选取健壮苗移栽至育苗有机土中。育苗有机土采用 2 种处理,一种经高压灭菌 30 min 后使用,一种不做无菌处理。移栽前洗净根部培养基以防生菌污染。幼苗第 1 周套袋弱光培养,之后室温自然光照培养。

1.7 数据处理

愈伤组织形成率=产生愈伤组织的外植体块数/接种总外植体块数×100%;不定芽的诱导率=分化出不定芽的愈伤组织数/接种总外植体数×100%;分化不定芽率=分化的不定芽数/接种的总外植体数×100%;正常出芽率=正常的芽个数/出芽的愈伤组织数×100%;生根率=生根数/不定芽数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的玉米素对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

在不同浓度 ZR 诱导愈伤组织的研究中,不添加 ZR 的对照组在培养 40 d 后观察到叶片有的变成了黄白色,还有的为绿色,并且没有观察到愈伤组织和不定芽长出。由表 1 可知,其余各组总的趋势是随着 ZR 添加浓度的升高,生长的愈伤组织和不定芽数量也随之递增。其中在添加 ZR 浓度为 1.5、2.0 和 2.5 mg/L 的诱导培养基中愈伤组织的长势都很好,3 个浓度之间愈伤组织生长情况差异不是非常明显。在添加 ZR 浓度为 2.0 mg/L 的诱导培养基中子叶的不定芽数量最多且芽的生长状况最佳,高于此浓度愈伤组织容易发生褐变且不定芽诱导率开始下降,这与缪耀梅关于褐变的研究结果一致^[3]。

表 1 ZR 浓度对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导

ZR 浓度 /mg·L ⁻¹	愈伤组织 形成率/%	不定芽 诱导率/%	分化不定 芽率/%
0	0	0	0
0.5	59.5	21.6	5.4
1.0	82.8	45.8	12.7
1.5	100	76.4	38.7
2.0	100	91.2	79.8
2.5	100	80.3	68.4

2.2 诱导培养基中 IAA 浓度对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

以添加浓度为 2.0 mg/L 玉米素的 MS 为后续研究的基础培养基,分别加入不同浓度 IAA,研究 2 种激素的不同配比对愈伤组织和不定芽诱导的影响。由表 2 可见,随着 IAA 浓度的增加 Micro-Tom 子叶愈伤组织形成率都为 100%,愈伤组织呈浅黄绿色,愈伤质量好。随着 IAA 浓度的增加 Micro-Tom 不定芽诱导率和分化不定芽率却是下降的趋势。当 IAA 浓度为 0.5 mg/L 时,Micro-Tom 的不定芽诱导率和分化不定芽率都较理

想。因此,选用激素为 2.0 mg/L 玉米素和 0.5 mg/L IAA 进行 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导最为合适。

表 2 IAA 浓度对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导

IAA 浓度 /mg·L ⁻¹	愈伤组织形成率 /%	不定芽诱导率 /%	分化不定芽率 /%
0	0	0	0
0.5	100	100	90.1
1.0	100	87.4	78.5
1.5	100	56.7	14.3

2.3 不同外植体对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

应用前面的研究结果,选取不同外植体进行愈伤组织诱导 10 d 后,子叶和外植体均形成愈伤组织。培养 20 d 后,子叶长出大量的不定芽,而只有部分下胚轴形成不定芽。培养 30 d 后,子叶作为外植体诱导 Micro-Tom 不定芽的生成数量远大于下胚轴,下胚轴不定芽数量较少,但是下胚轴的再生芽叶片呈深绿色。因此,为提高 Micro-Tom 番茄再生成功率选用子叶作为外植体进行组织培养最为合适。

表 3 不同外植体对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽的诱导

外植体	愈伤组织形成率 /%	不定芽再生率 /%	分化不定芽率 /%
子叶	100	97.8	95.7
下胚轴	100	60.4	29.4

2.4 不同 IBA 浓度对不定芽生根的诱导

待培养的幼芽长到 1.5 cm 且具 2~3 个叶片时,选取其中较为健壮的芽体,将不定芽下的愈伤组织切除干净,插入不同浓度的 IBA 生根培养基中诱导生根,生根培养基中的蔗糖浓度为 1.5%。表 4 的研究结果表明,不同 IBA 浓度生根情况完全不同,其中以 0.2 mg/L 的 IBA 诱导生根效果最好。待根长到 2 cm 左右时,将试管苗转到有机土中培养。经过高压灭菌的有机土中栽培的幼苗成活率为 100%,而未经无菌处理的有机土中栽培的幼苗成活率不到 20%。因此,生根培养基激素水平应选取 0.2 mg/L 的 IBA,并待根长好后转移到经高压灭菌后的有机土中生长。

表 4 不同浓度 IBA 对不定芽生根的诱导

IBA/mg·L ⁻¹	4 d	5 d	6 d	7 d
0.1	0	44.2	44.5	45.6
0.2	40.5	88.4	100	100
0.3	0	34.5	56.4	84.5
0.4	0	42.7	67.8	87.4

3 讨论

番茄已经成为基因工程研究的重要模式植物之一,其离体再生和遗传转化研究报道也相对较多。但是,不同基因型番茄的再生条件有很大的差异^[4-9]。并且转基

因研究需要的是简便、高效、稳定的植株再生体系。建立一个好的高频再生系统,它不仅可为快速无性繁殖试管苗提供可靠途径,还是实现基因转化的先决条件之一,直接关系到基因转化的成败。因此,该文对 Micro-Tom 番茄这一基因工程研究主要品种的离体再生条件进行了研究。

激素诱导愈伤和不定芽分化有一定的基因型依赖性。近年来,ZR 在番茄的再生体系和遗传转化中得到广泛的应用^[9-11]。有研究表明,ZR 和 IAA 组合诱导番茄不定芽分化优于 IAA 和 BA 的组合。因此,该研究进行了玉米素对 Micro-Tom 番茄愈伤组织和不定芽的诱导研究,并在此基础上添加不同浓度的 IAA 提高对愈伤组织和不定芽的诱导。该研究表明,MS+2.0 mg/L ZR+0.5 mg/L IAA+3%蔗糖最有利于愈伤组织和不定芽的形成。不同的外植体类型在进行离体培养研究时发现它们的再生频率也不同。已有研究表明,番茄的植株再生能力一般为叶片>子叶>下胚轴^[6]。王慧中等用番茄下胚轴和子叶进行遗传转化时发现,子叶的转化率比下胚轴高^[7]。但欧阳波等报道番茄下胚轴是良好的转化受体^[9]。该研究表明 Micro-Tom 番茄子叶的再生率要明显高于下胚轴,因此选用 Micro-Tom 番茄子叶进行组织培养。由于较高的无机盐含量不利于不定芽生根,该研究以 1/2MS 为基础培养基用不同浓度 IBA 对不定芽生根情况进行了研究,获得了理想的生根培养基为 1/2MS+1.5%蔗糖+0.2mg/L IBA。该研究获得

的 Micro-Tom 番茄再生体系具有简便、快捷、再生率高等优点,可为进一步的基因功能学研究提高技术保障。

参考文献

- [1] 刘小花,张岚岚,朱长青,等. Micro-Tom 番茄矮化微型机制及其在植物功能基因组研究中的应用[J]. 遗传,2008,30(10):1257-1264.
- [2] 刘士勇,刘守伟. 番茄组织培养中应注意的问题[J]. 北方园艺,2006(2):119-120.
- [3] 缪耀梅,李开彪,叶添谋. 组织培养过程中污染和褐化的防治[J]. 韶关学院学报,2003,24(6):101-103.
- [4] 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,2003,20(2):178-182.
- [5] 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,2003,18(1):30-33,178-182.
- [6] 罗素兰,田嘉瑞,孙东亭. 番茄高效再生体系的建立[J]. 海南大学学报(自然科学版),2003,20(4):314-316,323.
- [7] 陆瑞菊,黄剑华,孙月芳,等. 番茄下胚轴愈伤组织高频率诱导与植株再生[J]. 上海农业学报,1997,13(2):16-18.
- [8] 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(1):30-33.
- [9] 欧阳波,李汉霞,叶志彪. 玉米素和 IAA 对番茄子叶再生的影响[J]. 植物生理学通讯,2003,39(3):217-218.
- [10] Jia G X,Zhu Z Q,Chang F Q,et al. Transformation of tomato with the BADH gene from Atriplex improves salt tolerance [J]. Plant Cell Rep.,2002,21:141-146.
- [11] Qiu D L,Diretto G,Tavarza R,et al. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD [J]. Sci. Hortic.,2007,112:172-175.

Establishment of High Efficient Regeneration System of Micro-Tom Tomato

WANG Yue, GUO Feng, LIN Ying

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110166)

Abstract: The effects of different media with various hormone concentrations on Micro-Tom tomato callus induction, adventitious bud differentiation and rooting were detected in hypocotyl and cotyledon. The results showed that MS+2.0 mg/L ZR+0.5 mg/L IAA+3% sugar were the best mediums for callus induction and adventitious bud differentiation; 1/2MS+0.2 mg/L IBA+1.5% sugar were the best mediums for root induction, root induction, respectively.

Key words: Micro-Tom tomato; hypocotyl; cotyledon; callus; adventitious bud differentiation