

番茄“嘉宝”子叶再生体系的建立

王娟, 程籍, 李立芹

(四川农业大学 农学院 四川 雅安 625014)

摘要:以番茄品种‘嘉宝’为试材,研究了20%次氯酸钠和0.1%升汞处理不同时间对番茄种子表面消毒和萌发的影响,同时研究不同的激素组合对再生芽形成和生根的影响。结果表明:用20%次氯酸钠对番茄种子进行消毒15 min,可获得较多的无菌苗;IAA浓度为0.2 mg/L和6-BA浓度为2 mg/L组合时,外植体再生芽频率较高为86.3%,促进不定芽生根最佳激素浓度为MS培养基中添加IAA 0.2 mg/L;再生苗移栽到灭菌处理后土壤中成活率较高,可达90%。

关键词:番茄;子叶;再生

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)20-0130-03

番茄因其果实营养丰富,加工方便而成为全世界栽培最为普遍的果菜之一^[1]。近年来随植物转基因技术影响的不断扩大,番茄因其遗传和生理基础研究较多,已经成为基因工程领域重要的模式植物。众所周知建立高效的再生体系是基因遗传转化的基础。关于番茄的再生体系报道虽然很多,但依然存在基因型依赖型、再生效率低,生根困难和幼苗存活率低等问题^[2-3]。近年来以番茄为外植体,已进行很多遗传转化的研究^[2-3]。番茄“嘉宝”品种熟期早,果实大红色,抗逆性好,成熟果着色一致;果肉厚,不易裂果,耐贮运性好,品质优;坐果率高。但其再生体系未见报道,现对其无菌苗的获得、子叶再生体系进行了系统的研究和分析,为优良的外源基因导入该品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄“嘉宝”种子购置中国农业博通农艺科技中心。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 番茄种子用自来水浸泡12 h后,用0.1%升汞和20%次氯酸钠溶液进行消毒,不同处理时间组合见表1,无菌水中洗5次,并用无菌吸水纸略微吸干,按20粒/瓶播于MS+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L(pH 5.8)的培养基上,3次重复。常温暗培养出芽后,在温度(25±1)℃,光照强度1600 lx,光照时间16 h/d条件下进

行培养。

1.2.2 子叶再生体系建立 在超净工作台上将萌发7 d的无菌苗取出,将每片子叶切除叶尖和叶柄后,剪成约5 mm×5 mm的小块,叶面向上放入含有6-BA、IAA和NAA的2种浓度组合(表2)的MS培养基上(附加蔗糖30 g/L和琼脂8 g/L,pH 5.8)。培养基经0.1 MPa高压灭菌20 min后进行分装。每瓶外植体接种数不少于25片子叶,3次重复。外植体接种后,直接放在光下培养,培养条件同上。

1.2.3 生根培养基的筛选与驯化移栽 将带2~3片子叶、生长健壮的再生芽苗,从外植体基部剥离,插入不同生根培养基中(表3),待生根小苗长至6~8 cm左右将培养瓶的瓶口打开,加水少许,练苗3 d后取出,洗去根部培养基残渣,将幼苗移栽至经高温灭菌的营养土中,盖塑料薄膜保湿,在25~27℃条件下光照培养。待小苗有新叶长出时,可去掉塑料薄膜。

1.3 统计分析

种子在MS基本培养基上暗培养3 d后,统计种子污染率及发芽率;子叶在再生培养基上培养3周后,统计外植体的愈伤组织诱导率、外植体再生频率、每个外植体平均再生芽数和外植体褐化率。移栽20 d后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对番茄种子萌发的影响

将番茄种子用20%的次氯酸钠和0.1%升汞溶液分别消毒10、15、20 min,用无菌水冲洗后接种到MS培养基上,光照培养5 d后观察统计结果(表1)。用20%次氯酸钠消毒15 min所得无菌苗污染率为0,出苗率为97%,出苗整齐,幼苗较健壮,叶片颜色嫩绿;消毒10 min所得无菌苗的杂菌污染率高达5%,达不到消毒效果,且无菌苗出苗率也较低仅有88%;消毒20 min的番茄种

第一作者简介:王娟(1987-),女,在读本科,研究方向为植物基因工程。E-mail: wangjuan_up@qq.com.

通讯作者:李立芹(1974-),女,博士,讲师,研究方向为植物基因工程。E-mail: liliqin@sicau.edu.cn.

基金项目:四川农业大学优秀学士学位论文资助项目(00109062)。

收稿日期:2010-06-30

子不易萌发,出苗率仅78%。用0.1%升汞浸泡10 min的番茄种子消毒不够彻底,有杂菌污染现象,但其出苗率可达到82%;浸泡15、20 min的番茄种子虽然消毒彻底,但其出苗率非常低。因此用20%的次氯酸钠消毒对番茄种子的伤害较小,种子出苗率较高,但需要较长消毒时间才能彻底灭菌,而0.1%升汞需要的消毒时间较短,杀菌力强,但其刺激性和腐蚀性大,毒性也大,因此采用20%次氯酸钠对番茄种子进行消毒15 min,可获得较多的无菌苗。试验中20%的次氯酸钠的消毒效果优于0.1%升汞,这与张录霞等的研究结果一致⁷。但是20%次氯酸钠处理时间过长,也会影响种子的萌发,可能残留在种子表面消毒剂不容易洗去⁸。

表1 不同消毒方法对种子出苗的影响

消毒试剂	消毒时间 / min	接种 粒数	无菌苗 数量	发芽率 / %	污染率 / %
20%次氯酸钠	10	60	53	85	5
	15	60	58	97	0
	20	60	47	73	0
0.1%升汞	10	60	49	82	1.67
	15	60	46	77	0
	20	60	35	58	0

2.2 子叶再生体系建立的研究

2.2.1 不同生长素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响 从表2可知,在6-BA固定浓度为1 mg/L时,与3种浓度的IAA(0.1、0.2、0.5 mg/L)和3种浓度的NAA(0.1、0.2、0.3 mg/L)组合对愈伤组织的诱导率都为100%。当IAA的浓度为0.1 mg/L时,外植体再生率为85.5%,而且每个外植体平均再生芽数达到2.3个;随着IAA浓度的升高,即IAA浓度为0.2 mg/L和0.5 mg/L时,外植体再生频率与第一组相比分别降为61.2%和52.2%,每个外植体平均再生芽数降为1.6和1.3个;当NAA的浓度为0.1 mg/L时,外植体再生频率为76.6%,而且每个外植体平均再生芽数达到1.8个。随着NAA浓度的升高,即NAA浓度为0.2和0.5 mg/L时,外植体再生频率与第一组相比分别降为53.4%和48.1%,每个外植体平均再生芽数降为1.4和1.1个。因此在这种处理条件下6-BA浓度的1 mg/L,IAA的浓度为0.1 mg/L的组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化是最优激素组合。

表2 不同生长素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

处理	6-BA 1 mg/L	愈伤组织诱 导率/ %	外植体再 生频率/ %	每个外植体 平均再生芽数/ 个
IAA	0.1 mg/L	100	85.5	2.3
	0.2 mg/L	100	61.2	1.6
	0.5 mg/L	100	52.2	1.3
NAA	0.1 mg/L	100	76.6	1.8
	0.2 mg/L	100	53.4	1.4
	0.5 mg/L	100	48.1	1.1

2.2.2 不同细胞分裂素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响 从表3可知,在IAA浓度固

定为0.2 mg/L时,与3种浓度的6-BA(0.5、1、2 mg/L)和3种浓度的ZT(0.5、1、2 mg/L)的组合对愈伤组织的诱导率都为100%。当6-BA的浓度为0.5 mg/L时,外植体再生频率为63.5%,而且每个外植体平均再生芽数达到1.2个。随着6-BA浓度的升高,即6-BA浓度为1和2 mg/L时,外植体再生频率分别为75.4%和86.3%,每个外植体平均再生芽数为1.8和2.8个。当ZT浓度为0.5 mg/L时,外植体再生频率为49.1%,每个外植体平均再生芽数升为1.6,随着ZT浓度的升高,即ZT浓度为1和2 mg/L时,外植体再生频率分别为46.6%和35.3%,每个外植体平均再生芽数为1.8和2.2个。因此在这种处理条件下6-BA浓度为2 mg/L,IAA的浓度为0.2 mg/L的组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化是最优激素组合。

表3 不同细胞分裂素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

处理	IAA 0.2 mg/L	愈伤组织 诱导率/ %	外植体再 生频率/ %	每个外植体平 均再生芽数/ 个
6-BA	0.5 mg/L	100	63.5	1.2
	1 mg/L	100	75.4	1.8
	2 mg/L	100	86.3	2.8
ZT	0.5 mg/L	100	49.1	1.6
	1 mg/L	100	46.6	1.8
	2 mg/L	100	35.3	2.2

2.3 生根培养基的筛选与驯化移栽

从表4可看出,MS基本培养基添加NAA或IAA能促进不定芽生根。在培养基中添加0.2 mg/L IAA时,生根率可达100%,而且根的状态较好,数量多、较粗壮。在培养基中添加0.1 mg/L NAA时,生根率可达60%,根的状态一般,较细、数目较少。随着NAA浓度的提高,生根率略有提高,但差别不大,但根的状态可达到中等水平,主根粗壮,须根少。因此在MS培养基中添加浓度为0.2 mg/L IAA是促进不定芽生根最佳培养基。

表4 不同浓度生长素对番茄子叶再生苗诱根效果

处理	MS	接种的 不定芽	生根的 不定芽	生根率 / %	根的状态
IAA	0.1 mg/L	20	11	55	+
	0.2 mg/L	20	20	100	+++
	0.5 mg/L	20	15	75	++
NAA	0.1 mg/L	20	12	60	+
	0.2 mg/L	20	15	75	++
	0.5 mg/L	20	16	80	++

3 结论与讨论

目前大量的研究表明,基因型是影响番茄高效再生体系建立的重要因素,在相同的培育条件下,不同的番茄品种间存在着截然不同的分化率。近年来利用番茄叶片作为外植体进行离体培养获得再生植株研究报道较多⁸⁻¹⁰,对于某一特定的基因型番茄来说,不定芽的再生依赖于培养基中细胞分裂素和生长素的种类及其比值,因此不同品种番茄的叶片在离体培养过程中需要探索不同植物生长物质的种类^[11-12]。

试验采用不同配比的 6-BA、ZT、IAA 和 NAA 4 种植物生长调节物质研究对番茄子叶外植体进行愈伤组织的诱导及不定芽的分化的影响。结果表明 当研究不同生长素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响时, MS 基本培养基中添加 6-BA 1.0 mg/L 和 IAA 0.1 mg/L 诱导子叶形成芽再生频率较高, 为 85.5%。所形成的愈伤组织结构疏松、呈浅绿色、绿色芽点较多, 芽分化速度较快, 其再生频率和平均每个外植体再生芽数均显著高于 NAA 处理($P < 0.01$)。

当研究不同细胞分裂素浓度组合对番茄子叶愈伤组织诱导和不定芽分化的影响时, 在 MS 基本培养基中添加 6-BA 浓度为 2 mg/L, IAA 的浓度为 0.2 mg/L 的组合对番茄子叶愈伤组织诱导芽再生频率较高, 为 86.3%。这与于惠敏等研究一致^[7]。6-BA 与 IAA 组合对芽再生的效率显著高于 ZT 组合。与尹明安研究结果一致^[13]。MS 基本培养基中添加 6-BA 浓度为 2 mg/L 和 IAA 的浓度为 0.2 mg/L 番茄子叶的不定芽诱导过程中, 随继代培养时间的延长产生了少量的畸形芽与盲芽, 有些仅长出一片粗壮的叶片而没有顶芽, 原因可能是与添加激素的种类及继代培养代数有关, 这与于明礼研究一致^[14]。在植物生长发育过程中, 任何一种生理反应都不是单一激素作用的结果, 而是各种激素相互作用的结果, 各种激素间的相互作用是很复杂的, 有时表现为增效作用, 有时表现为拮抗作用。因此试验中 6-BA 和 IAA 浓度都过高或都过低时表现为拮抗作用, 一高一低时表现为增效作用, 这时候外植体愈伤组织长的较好, 出愈率较高。在番茄再生体系中激素 6-BA 和 IAA 一高一低组合有利于愈伤组织及芽的诱导, 这与李铁松^[15]、姜国勇^[16]的研究结果类似。

当研究不同浓度的生长素对番茄子叶再生苗的诱导生根时, 发现 MS 基本培养基中添加 IAA 的浓度为 0.2 mg/L 时, 可显著促进不定芽生根, 生根率可达 100%。但是一些研究发现在 MS 基本培养基中添加 IAA 的浓度为 0.1 mg/L 时, 可显著促进不定芽生根^[17-18]。这可能是由于基因型的差异造成的。该试验建立起高

效的番茄“嘉宝”子叶的离体再生体系, 为优良的外源基因导入该品种奠定了坚实基础。

参考文献

- [1] 卫志明, 许智宏. 番茄叶片组织培养中植株再生的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 1979(1): 10-17.
- [2] 李伟明, 王双双, 姚玉新, 等. 转基因苹果 MdFT 基因对番茄的遗传转化[J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1255-1260.
- [3] 贾芝琪, 崔艳红, 李颖, 等. 马铃薯抗晚疫病基因 R3a、R1 和 RB 在番茄中的表达[J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1153-1160.
- [4] 李明山, 宋秀英, 赵晓明, 等. 温光条件和激素配比对番茄叶组织培养的影响[J]. 山西农业大学学报, 1993, 13(4): 337-338.
- [5] 江晓玲, 俞守义, 贺竹梅, 等. 番茄子叶外植体转化系统的优化[J]. 云南植物研究, 2004, 26(1): 118-120.
- [6] Blatias P, Ashwath N, Senarama T, et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004, 78: 1-21.
- [7] 张录霞, 郝青南, 马超, 等. 加工番茄遗传转化再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 236-241.
- [8] 于惠敏, 石竹, 杨俊杰. 番茄的不同基因型对组培植株再生能力的影响[J]. 山东师范大学学报, 2007, 22(4): 120-121, 130.
- [9] 叶志彪, 李汉露, 周国林. 番茄子叶离体培养与再生植株[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(3): 290-295.
- [10] 陈火英, 翁新华. 番茄子叶离体培养的植株再生[J]. 上海蔬菜, 1993(2): 21-22.
- [11] 凡超, 佟兆国, 蔡斌华, 等. 江蔬 1 号番茄子叶离体再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2007(6): 131-134.
- [12] 欧阳波, 李汉露, 叶志彪, 等. 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.
- [13] 乐锦华, 杨国成. BA 和激素对试管番茄愈伤组织形态发生的影响[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 44-48.
- [14] 尹明安, 郭立, 刘华群, 等. 番茄 ZF 遗传转化再生体系的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(5): 27-30.
- [15] 于明礼, 张术岐, 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.
- [16] 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体系[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2003, 26(2): 178-182.
- [17] 姜国勇, 郭宝太. 番茄高效植株再生体系及基因转化体系的建立[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(2): 84-88.
- [18] 罗素兰, 田嘉瑶, 长孙东亭. 番茄高效再生体系的建立[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2002, 20(4): 314-323.
- [19] 蒋素华, 顾东亚, 崔波. 番茄真叶愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 北方园艺, 2009(10): 113-114.

Study on Regenerative System of Tomato ‘Jiabao’

WANG Juan, CHENG Ji, LI Li-qin

(College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: The 20% sodium hypochlorite and 0.1% mercuric chloride were studied to tomato seed surface sterilization and germination with different time, at the same time, different hormone combinations were studied to effect of cotyledon regeneration and root formation. The results showed that with 20% sodium hypochlorite sterilization for 15 min, more sterilized seeding could be get, we also found that IAA concentration 0.2 mg/L combined with 6-BA concentration 2 mg/L could induce more regeneration bud, the rate of regeneration bud could get 86.3%, the root could be induced on the MS medium containing 0.2 mg/L IAA. After transplanted into sterilized soil, the survival rate of regeneration seeding was 90%.

Key words: tomato; cotyledons; regeneration