

# 茄子子叶下胚轴离体再生体系建立

龚 静<sup>1</sup>, 褚云霞<sup>2,3</sup>, 许 爽<sup>1</sup>, 查丁石<sup>1</sup>

(1. 上海市农业科学院 园艺研究所, 上海 201106; 2. 上海市农业科学院 农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403;

3. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

**摘 要:**以 3 份茄子材料无菌苗子叶和下胚轴为外植体, 研究其在 MS 附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基上的分化情况。结果表明: 在不同培养基上, 茄子子叶和下胚轴均能诱导愈伤组织和分化形成不定芽, 但不定芽诱导率存在明显差别, 诱导 3 份材料下胚轴愈伤组织形成和芽分化的最佳培养基均为: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 子叶因品种不同有较大差异, 紫色长棒茄芽分化最佳生长调节物质组合是 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 紫红线茄是 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 紫黑短棒茄是 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

**关键词:**茄子; 愈伤组织; 芽分化; 再生植株

**中图分类号:**S 641.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0151-04

茄子(*Solanum melongena* L.)是亚洲的重要蔬菜品种之一, 其营养价值丰富, 为加快育种进程, 国外已先后从花药培养<sup>[1]</sup>、器官分化<sup>[2-3]</sup>、胚状体诱导<sup>[4]</sup>、原生质体培养<sup>[5]</sup>、体细胞融合<sup>[6]</sup>、小孢子培养<sup>[7]</sup>等多方面进行了茄子离体再生研究。我国在这一领域中也进行了一些研究, 最早报道的是吴耀武等<sup>[8]</sup>以茄子茎段为外植体获得愈伤组织并分化出植株, 随后张兰英和李耿光<sup>[9-10]</sup>在胚状体, 原生质体培养方面都获得了成功, 多位科学家在小孢子培养方面也作了不懈努力<sup>[11-13]</sup>得到单倍体植株。自 Guri A 等<sup>[14]</sup>首先获得了农杆菌介导的转基因茄子后, 多位科学家进行了抗虫、抗病等多方面的转基因研究<sup>[15-20]</sup>。我国的研究者也以不同茄子品种的子叶和下胚轴为外植体进行了再生体系研究<sup>[21-23]</sup>。该试验在前人的基础上研究了上海市农业科学院园艺所茄子课题组 3 份优良育种材料的子叶和下胚轴的再生体系, 为后期的农杆菌介导的茄子转基因研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试茄子材料均为上海市农业科学院园艺研究所育种材料, 分别为紫色长棒茄(材料 1)、紫红线茄(材料 2)和紫黑短棒茄(材料 3)。

### 1.2 试验方法

室温条件下用水浸泡过夜的成熟种子先用 70% 酒精浸泡 30 s, 再以 10% 次氯酸钠灭菌 30 min, 无菌水漂洗 5 次后用滤纸吸干水分, 分别接种在无激素的 MS、1/2MS 加 30 g/L 糖及 1/2MS 不加糖培养基上, 置于光照条件下发芽。从种子露白时起计算苗龄, 选取即将长出真叶的无菌苗, 切取下胚轴和子叶为外植体, 其中下胚轴切成长约 1 cm 的小段, 子叶去除两端后剪成(0.5~1) cm×1 cm 的小块, 分别接种到不同的诱导愈伤组织培养基上, 下胚轴横向放置, 子叶正面向下平放于培养基上, 每种外植体在不同培养基上均接种 30 个, 3 次重复。

表 1 诱导分化培养基

Table 1 Medium for bud differentiation		
代号 Symbol	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	NAA 浓度 Concentration of NAA/mg · L <sup>-1</sup>
A	1.0	0.1
B	1.0	0.3
C	1.0	0.5
D	2.0	0.1
E	2.0	0.3
F	2.0	0.5
G	3.0	0.1
H	3.0	0.3
I	3.0	0.5

愈伤组织诱导、分化培养基以 MS 为基本培养基, 含琼脂 0.74%, 蔗糖 3%, pH 值调为 5.8, 采用完全组合设计(表 1), 添加的 6-BA 浓度分别为 1.0、2.0、3.0 mg/L, NAA 浓度为 0.1、0.3、0.5 mg/L, 培养条件为光照时间 16 h/d, 温度(25±2)℃。2 周左右继代 1 次, 8 周后统计分化结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 萌发培养基筛选

第一作者简介: 龚静(1972-), 女, 本科, 农艺师, 研究方向为蔬菜育种及推广。E-mail: Gongjing@saas.sh.cn。

责任作者: 褚云霞(1975-), 女, 在读博士, 副研究员, 研究方向为园艺植物生物技术及新品种 DUS 测试。E-mail: yy4@saas.sh.cn。

基金项目: 上海市农业科学院科学技术发展基金资助项目。

收稿日期: 2011-05-03

高质量的无菌苗是愈伤诱导的前提, 无菌萌发培养基对种子的发芽率有影响, 较高的无机盐浓度不利于种子萌发, 而蔗糖的添加对种子萌发基本无影响, 从经济角度选择不加糖的 1/2MS 为茄子的萌发培养基。

表 2 萌发培养基对种子发芽的影响

Table 2 The effect of medium on germinate of the eggplant seed

培养基 Medium	接种数 Num of seed	接种 5 d 后发芽数 Num of germinated seed after 5 days	接种 13 d 后发芽数 Num of germinated seed after 13 days	发芽率 Germination rate/%
A	90	1	78	86.6
B	90	32	86	95.5
C	109	63	104	95.4

## 2.2 不同品种再生能力的比较

在该试验中, 不同 6-BA 和 NAA 浓度主要影响着愈伤组织的颜色。3 份材料形成的愈伤组织可分为 6 种类型(表 3), 不同材料的外植体均可 100% 形成愈伤组织, 但其形态差异较大, 其中紫红线茄为致密型, 而另外 2 份材料大部分表现为疏松型(表 4)。

表 3 茄子愈伤组织类型及其特征

Table 3 The type and characteristic of callus

愈伤组织类型 Type	颜色 Colour	质地 Character	形态 Form	生长状态 Growth state
C1	白	疏松柔软	团状	生长快
C2	淡黄、黄绿	疏松	团状	生长快
C3	黄	疏松	团状	生长快
C4	褐	致密	块状	生长慢
C5	淡绿、绿	致密	块状	生长快
C6	淡黄	致密	块状	生长快

表 4 不同诱导培养基下 3 份材料的愈伤组织类型

Table 4 Main types of callus of different explants

培养基代号 Symbol of medium	材料 1 Sample 1		材料 2 Sample 2		材料 3 Sample 3	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
A	C2	C1	C4	C5	C2	C1
B	C1	C1	C5	C5	C3	C3
C	C2	C2	C5	C6	C2	C2
D	C5	C1	C5	C5	C2	C2
E	C3	C1	C4	C6	C2	C2
F	C2	C2	C4	C6	C2	C2
G	C2	C1	C5	C4	C2	C2
H	C2	C2	C4	C5	C2	C2
I	C2	C2	C4	C4	C2	C2

## 2.3 不同激素浓度组合诱导外植体分化的比较

不同品种的子叶和下胚轴诱导愈伤及分化均有不同的最佳激素组合(表 5)。但下胚轴受品种影响相对较小, 虽然在各培养基上分化率有差异, 芽分化的最佳组合均是 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。而子叶表现出的差异更明显, 紫色长棒茄芽分化最佳激素组合是 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 紫红线茄是 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 紫黑短棒茄是 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。紫黑短棒茄较容易诱导出芽分化, 而紫红线茄、紫色长棒茄分化能力较差。3 个品种的分化能力不同, 子叶与下胚轴的分化率均有较大差异(表 6)。6 种类型的愈伤组织都可以诱导芽

分化。不同激素组合诱导芽分化的结果统计(表 5)表明, 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 诱导子叶、下胚轴芽分化效果较好; 芽诱导率随 6-BA 浓度从 1.0 mg/L 增加到 2.0 mg/L 而升高, 但浓度过高(3.0 mg/L)愈伤组织后期褐化, 反而降低了芽分化率。NAA 对子叶愈伤组织芽分化起抑制作用, 但可以缓解高浓度 6-BA 对分化的抑制作用, 但是浓度高到 0.5 mg/L 后即因根分化明显而不利于芽分化。

## 2.4 不同外植体再生能力的比较

在相同诱导培养基中, 相同材料的子叶和下胚轴诱导出的愈伤组织类型大多不同, 芽分化率也不相同(表 5)。3 份材料的下胚轴均在 6-BA 2.0 mg/L 浓度下获得最大分化率, 在各自的最适条件下, 下胚轴芽分化率都高于子叶(表 5), 表明 3 份材料的下胚轴分化能力都超过了子叶。紫红线茄、紫黑短棒茄子叶和下胚轴在相同的培养基上获得最大分化率, 而紫色长棒茄在相同 6-BA 浓度不同 NAA 浓度下分别获最大分化率。

表 5 不同 6-BA 与 NAA 组合诱导外植体平均分化率

Table 5 The shoot differentiation rates from xytoledon and hypocotyl on different medium

培养基代号 Symbol of medium	子叶平均芽分化率 Shoot differentiation rate from cytoledon/%	下胚轴平均芽分化率 Shoot differentiation rate from hypocotyls/%
A	11	4
B	7	3
C	0	6
D	15	24
E	9	3
F	4	2
G	3	7
H	7	11
I	4	0

表 6 不同培养基诱导 3 种茄子不同外植体的芽分化率

Table 6 Shoot differentiation rates of different regulating substance combination of three eggplant explants %

培养基代号 Symbol of medium	材料 1 Sample 1		材料 2 Sample 2		材料 3 Sample 3	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
A	0	13	13	0	20	0
B	10	0	0	0	12	8
C	0	7	0	10	0	0
D	0	22	20	21	24	30
E	7	0	0	0	20	10
F	13	0	0	0	0	7
G	0	0	0	0	8	22
H	10	13	0	0	10	20
I	0	0	0	0	12	0

## 2.5 再生植株的生根

茄子的生根较容易, 当不定芽长出 2~4 片真叶后, 即可将其从基部切下, 接入到无激素的 MS 培养基上进行生根培养, 约 2 周即可生根。

## 3 结论与讨论

与番茄等蔬菜相比, 我国茄子的基因工程研究相

对落后,见报道的仅有许勇等<sup>[24]</sup>利用花粉管通道法将野生茄总 DNA 导入栽培种中、胡晓琴等<sup>[25]</sup>将水稻疏基蛋白酶抑制剂基因导入茄子和张兴国等<sup>[26]</sup>用三叶茄的下胚轴进行遗传转化获得能表达绿色荧光蛋白的转基因茄子。茄子转基因研究中面临的一个难题是目前茄子芽分化率不够高,虽然现在转基因的方法有很多,但转化率都还较低,为获得转基因植株,受体系统必须具有较高的再生频率。近年来关于茄子再生系统的研究较多<sup>[21-23]</sup>,但是受基因型影响,报道的最适培养基差异较大,基因型对外植体的再生影响在许多作物上得到了证实,包括大麦、甘蓝、玉米、牵牛花、棉花等<sup>[27]</sup>,因此需要进行更多品种的再生体系研究,从中寻找规律,以获取适应性更广的茄子再生体系。

细胞全能性是植物组织培养的理论基础,但体细胞脱分化受多种因素影响,使所有体细胞都再生成植株仍有许多困难要克服,体细胞分化程度对脱分化能力的影响很大。目前茄子的离体培养多采用子叶和下胚轴作为外植体,下胚轴的芽分化能力均超过子叶,该试验结果也证明了这一点,这与余波澜等<sup>[21]</sup>的研究结果一致。而 Franklin 等<sup>[28]</sup>将根培养在含 TDZ 和 BA 的培养基中获得了极高的芽分化率,在今后的研究中,应该寻找更适于茄子离体诱导的外植体。

激素对外植体不定芽分化起决定性作用,俞琼等<sup>[29]</sup>的研究表明,下胚轴不定芽诱导的最适培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.5 mg/L,子叶不定芽诱导的最适培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+KT 2.0 mg/L;王凤华<sup>[23]</sup>则认为一定质量浓度的 6-BA 和 NAA 组合能诱导茄子的子叶和下胚轴进行不定芽分化;余波澜等<sup>[21]</sup>则以 6-BA 与 IAA 配合诱导不定芽的分化,但分化率都偏低,新型激素的使用有可能提高茄子的芽分化率,如洪晓华等<sup>[22]</sup>单独采用 4-PU 也能诱导茄子不定芽分化,最佳浓度为 0.1 mg/L,此时红茄不定芽的分化率最高可达 73.96%。因此,今后的研究除了继续寻找适宜不同品种茄子芽分化激素浓度组合外,寻找适宜的新型生长调节物质也是提高诱导分化率的有效途径之一。

#### 参考文献

- [1] Raina S K, Iyer R D. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. [J]. Beiträge zur Pflanzenzucht, 1973, 70: 275.
- [2] Kamat M G, Rao P S. Vegetative multiplication of eggplants (*Solanum melongena*) using tissue culture techniques [J]. Plant science letters, 1978, 13: 57-65.
- [3] Matsuoka H, Hinata K. NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* [J]. Journal of Experimental Botany, 1979, 30: 363-370.
- [4] Gleddie S, Keller W, Setterfield G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant) [J]. Canadian Journal of Botany, 1983, 61: 656-666.
- [5] Guri A, Volokita M, Sink K C. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum* [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 302-304.
- [6] Guri A, Sink C. Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum* [J]. Theoretical and applied genetics, 1988, 76: 490-496.
- [7] Kazumitsu M. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 391-395.
- [8] 吴耀武, 马彩萍. 茄子茎愈伤组织的产生与植株的再生 [J]. 西北植物研究, 1981(2): 52-54.
- [9] 张英兰, 李耿光. 两种茄子子叶诱导胚状体和植株再生 [J]. 植物生理学报, 1987, 23(4): 56.
- [10] 李耿光, 张英兰. 茄子子叶原生质体再生植株 [J]. 遗传学报, 1988, 15(3): 181-184.
- [11] 连勇, 刘富中, 陈钰辉, 等. 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株 [J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 233-235.
- [12] 宋彦平, 申书兴, 王彦华, 等. 茄子游离小孢子培养获得愈伤组织的研究 [J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(3): 32-35.
- [13] 刘独臣, 房超, 李跃建, 等. 茄子花药培养诱导胚状体成苗 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(6): 1643-1646.
- [14] Guri A, Sink C. Agrobacterium transformation of eggplant [J]. Journal of Plant Physiology, 1988, 133: 52-55.
- [15] Filippone E, Lurquin P F. Stable transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) by cocultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8: 370-373.
- [16] Rotino G L, Gleddie S. Transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 26-29.
- [17] Fari M, Nagy I, Csanyi M, et al. Agrobacterium mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1995, 15: 82-86.
- [18] Arpaia S, Mennella G, Onofaro V, et al. Production of transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 329-334.
- [19] Polmetla A, Ajin M, Karra S, et al. Insect-resistant transgenic brinjal plants [J]. Molecular Breeding, 1998, 4: 33-37.
- [20] Hanyu H, Murata A, Park E Y, et al. Stability of luciferase gene expression in a long term period in transgenic eggplant, *Solanum melongena* [J]. Plant Biotechnology, 1999, 16: 403-407.
- [21] 余波澜, 张利明, 孙勇如, 等. 茄子子叶和下胚轴的组织培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 317-320.
- [22] 洪晓华, 王瑛华, 陈刚, 等. 茄子的组织培养和植株再生体系研究 [J]. 北方园艺, 2009(6): 63-65.
- [23] 王凤华, 李光远, 潘莎莎. 茄子下胚轴和子叶离体培养研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(4): 389-393.
- [24] 许勇, 王福钧, 周长久. 粘毛茄子子叶原生质体的培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1990(4): 27-29.
- [25] 胡晓琴, 贾士荣. 水稻疏基蛋白酶抑制剂基因导入马铃薯和茄子 [J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 65-69.
- [26] 张兴国, 刘元清, 杨正安, 等. 茄子遗传体系的建立 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(3): 233-234.
- [27] Chakravarthi D V N, Rao Y V, Rao M V S, et al. Genetic analysis of *in vitro* callus and production of multiple shoots in eggplant [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 102: 87-97.
- [28] Franklin G, Sheeba C J, Lakshmi S G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant, 2004, 40: 188-191.
- [29] 俞琼, 陈利, 刘鹏, 等. 茄子组织培养再生体系研究初报 [J]. 广东农业科学, 2007(2): 24-26.

# “爱神玫瑰”葡萄杂交胚 胚性愈伤组织诱导与保持的研究

闫爱玲, 张国军, 孙 磊, 徐海英

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

**摘 要:**以无核葡萄“爱神玫瑰”的杂交胚为试材,通过试验筛选出了胚性愈伤诱导基本培养基:NN<sub>69</sub>;胚性愈伤组织诱导培养基:NN<sub>69</sub>+TDZ 0.05 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L;胚性愈伤组织长期保持与增殖培养基:NN<sub>69</sub>+6-BA 0.2 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 和 NN<sub>69</sub>+2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 0.1 mg/L 为“爱神玫瑰”较适宜的培养基。

**关键词:**无核葡萄;胚性愈伤诱导;保持

**中图分类号:**S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0154-03

近年来,随着生活水平的提高和社会的发展,人们对果品的要求越来越高,无核葡萄作为重要的鲜食和制干品种,深受人们的喜爱,其遗传改良、品种更新成为无核葡萄发展的主要方向。葡萄品种“爱神玫瑰”,北京地区陆地栽培条件下7月中旬浆果成熟,成熟期极早,而且果粒为红紫或紫黑色,具有较浓郁的玫瑰香

味,可溶性固形物含量也很高,为17%~19%,是优良的极早熟无核鲜食品种。但存在果粒偏小的问题,为了得到大粒无核品种,对其进行了杂交育种。但由于无核葡萄间杂交时合子胚未发育成熟就中途败育,无法得到杂交后代,给育种工作带来很大困难。为了解决败育问题,采用了未成熟合子胚胚性愈伤组织诱导及胚状体产生和植株再生的方法。该试验就是对该品种的杂交胚的胚性愈伤组织的诱导及保存进行了研究,为无核葡萄通过体胚发生途径再生的顺利进行奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材取自北京市农林科学院林业果树研究所内生

第一作者简介:闫爱玲(1972-),女,硕士,副研究员,现从事葡萄育种与栽培研究工作。E-mail:lgsyal@sina.com。

责任作者:徐海英(1963-),女,硕士,研究员,研究方向为葡萄育种。E-mail:haiyingxu63@sina.com。

基金项目:北京市科技新星计划资助项目(2007B043)。

收稿日期:2011-05-04

## Establishment of Regeneration System of Cotyledon and Hypocotyl *in vitro* of Eggplant

GONG Jing<sup>1</sup>, CHU Yun-xia<sup>2,3</sup>, XU Shuang<sup>1</sup>, ZHA Ding-shi<sup>1</sup>

(1. Horticultural Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 2. Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403; 3. School of Agricultural and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract:** The cotyledon and hypocotyl from three eggplant aseptis seedlings were cultured on the medium with different 6-BA and NAA concentrations to study their effects on the callus induction and shoot differentiation. The results indicated that some callus could be induced and adventitious buds could be differentiated in all kinds of medium, but there were obvious different in different medium. The optimum medium for eggplant callus formation and bud differentiation from hypocotyls was MS+6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L and the best medium for bud differentiation from cotyledon was different between different samples, there were MS+6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L for sample 1 (purple, long clavate eggplant), MS+6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L for sample 2 (mauve, line shape eggplant) and MS+6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L for sample 3 (modena, short clavate eggplant) respective.

**Key words:** eggplant; callus; bud differentiation; plant regeneration