

番茄离体培养及快繁殖技术研究

黄 刚, 孙光英, 郑晓峰, 李竹莹

(黔东南民族职业技术学院, 贵州 凯里 556000)

摘 要:以番茄种子为试材, 采用正交实验方法配制不同的培养基, 研究不同浓度的 6-BA、NAA、IBA 对不定芽诱导及丛生芽增殖的影响。结果表明:愈伤组织诱导的适宜培养基为:MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L;不定芽诱导适宜培养基为:MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L;丛生芽增殖的适宜培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L;生根培养基为:1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+蔗糖 30 g/L。

关键词:番茄;组织培养;快速繁殖;正交实验

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0149-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)属茄科番茄属,具有很高的经济价值及广泛的市场前景^[1]。目前我国种植优良番茄品种大多数从国外引进,进口种子价格昂贵,自制种子难以保证原种的优良特性,而利用组织培养技术繁殖番茄既可保证原种优良特性,又可以在短期内获得大量种苗^[2]。现以番茄的种子作为外

植体,获得无菌苗,再利用无菌苗的子叶进行离体培养,研究不同激素组合对番茄子叶愈伤组织诱导及不定芽诱导的影响,并且在此基础上筛选出了进行快速繁殖的最佳培养基。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄种子为市场销售种子“以色列 198”。

1.2 试验方法

该试验基本培养基为 MS,附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。用 0.4% 琼脂粉固化,蔗糖浓度 3.0%,培养基 pH 5.8~6.0,培养温度(25±1)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.1 无菌苗的获取 取番茄种子先用洗涤剂浸泡

第一作者简介:黄刚(1976-),男,湖南隆回人,本科,讲师,现主要从事植物组织培养教学及研究工作。E-mail: huanggang. n@163.com。

基金项目:贵州省黔东南州科技局 2007 年度州级科技三项费专项经费资助项目(20070023)。

收稿日期:2011-09-14

[22] Conner J P, Brown S K, Weeden N F. Randomly amplified polymorphic DNA ~ based genetic linkage maps of three apple cultivars [J]. J. Amer. 1997, 22: 350-359.

[23] Seglias N P, Gessler C. Genetic of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi*(PI2) integrated control of pome fruit diseases[J]. IOBC/WPRS Bulletin, 1997, 20: 195-208.

Genetic Mapping and Localization of the Early Deciduous Disease Resistant Gene in Apple

LI Shuang, ZHANG Jun-ke, DANG Wei-feng

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: With the material of apple cultivar ‘Qinguan’ as the maternal parent, ‘Fuji’ as male parent and their F₁ 158 progenies, an optimized PCR reaction system for SSR were obtained: in a 20 μL total volume, Taq DNA polymerase 0.5 U, primer 0.1 μmol/L, dNTPs 0.3 mmol/L, template DNA 15 ng/μL and Mg²⁺ 1.8 mmol/L. A consensus genetic map from ‘Qinguan’ × ‘Fuji’ was constructed by JoinMap 3.0 with SSR markers. The results showed that 340 SSR primer pairs, 49 were proved having polymorphism between father and mother parents, and 75 SSR markers were acquired by the polymorphic primer pairs. Among these SSR markers, 17 were distorted from the Mendelin ratio, 27 were located on the genetic linkage map composed by 10 linkage groups and early deciduous disease resistance gene location to the tenth linkage groups, compared with the already published apple genetic linkage: early deciduous disease resistant gene was positioned in published maps of the eighth linkage groups.

Key words: apple; SSR; genetic mapping; system optimization; gene localization

泡 5 min, 再用自来水冲洗 30 min, 后用 70% 的酒精浸泡 20 s, 再用 0.1% 的升汞消毒 1~2 min, 然后用无菌水反复冲洗数次, 洗净后, 接种于不附加激素的 MS 培养基上, 培养 15~20 d, 直至子叶露出。

1.2.2 愈伤组织的诱导 在无菌条件下, 分别剪取无菌苗的子叶, 将子叶切成 5 mm×5 mm 的小块, 接种到愈伤组织诱导培养基上, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 2 片小块子叶, 定期观察记录, 30 d 后分析统计结果。

1.2.3 不定芽的诱导 将淡绿色、结构较致密的愈伤组织用刀切成小块, 接种于 MS 培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA、IBA, 该试验采用三因素、三水平的 $L_9(3^3)$ 正交实验方案配制培养基, 蔗糖 30 g/L, 每种处理接种 10 瓶, 每瓶接种 2 小块愈伤组织, 定期观察记录, 35 d 后分析统计结果。

1.2.4 丛生芽的增殖 将诱导出的不定芽, 接种在附

加不同浓度的 6-BA、NAA、IBA 培养基上, 采用三因素、三水平的 $L_9(3^3)$ 正交实验方案配制培养基, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 2 苗, 定期观察记录, 30 d 后分析统计试验结果。

1.2.5 不定根的诱导 将生长健壮的小苗, 接种于以 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 NAA 和 6-BA, 诱导番茄试管苗生根。每种配方接种 5 瓶, 每瓶接种 8 苗, 定期观察记录, 25 d 后分析统计结果。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

外植体接种 15 d 左右, 愈伤组织开始形成。由表 1 可知, 在各种培养基中, 以 6 号培养基对子叶外植体形成愈伤组织的诱导率最高, 4 号培养基次之, 4、6 之间无显著差异, 与其它培养基之间差异显著。4 号培养基的愈伤组织呈淡绿色或绿色, 结构致密, 有利于不定芽的分化, 因此 4 号是最佳的愈伤诱导培养基。

表 1 不同激素组合对番茄子叶愈伤组织诱导的影响

培养基 编号	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	接种的子 叶数/块	形成愈伤 组织数	诱导率 /%	愈伤组织的性状
1	1.00	0.20	0.00	20	5	25	呈淡绿色, 结构比较疏松
2	1.00	0.00	0.10	20	7	35	呈淡绿色或绿色, 结构比较疏松
3	2.00	0.20	0.00	20	10	50	呈霜状, 淡绿色, 呈易散的水渍状小颗粒
4	2.00	0.00	0.30	20	13	65	呈淡绿色或绿色, 结构致密
5	3.00	0.50	0.00	20	8	40	呈灰白色或灰褐色, 松软湿润
6	3.00	0.00	0.50	20	15	75	呈霜状, 淡绿色, 呈易散的水渍状小颗粒

2.2 不定芽的诱导

愈伤组织接种 30 d 左右, 不定芽开始形成, 由表 2 可知, 最优组合是 $A_2B_1C_1$, 即 6-BA 3.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L, 从 R 值上看, 其值越大, 表示该因素起的作用越大, 对试验的影响也最大, 在各因素中, 影响不定芽分化的主要因素是 6-BA, 最适宜的浓度 3.0 mg/L, 其次是 NAA, 加入适当的 NAA 0.1 mg/L 可促进不定芽的分化。

2.3 丛生芽的增殖

将不定芽接种 22 d 左右, 开始形成丛生芽。由表 3 可知, 增殖倍数最高的组合是 $A_3B_2C_1$, 即 6-BA 3.0 mg/L, NAA 0.05 mg/L。从 R 值上看, 其值越大, 表示该因素起的作用越大, 对试验的影响也最大, 这几个因素中, 影响不定芽分化的主要因素是 6-BA, 增殖倍数最高的浓度是 3.0 mg/L, 其次是 NAA, 增殖倍数最高的浓度是 NAA 0.05 mg/L。用该组合进行进一步试验, 发现诱导出来的丛生芽长势很弱, 大部分丛生芽都是水渍状, 不适合以后的增殖。由表 3 还可知, 增殖倍数一般的组合 $A_1B_1C_1$ 诱导出来的丛生芽, 芽生长比较壮, 生长良好, 无水渍状, 因此, 诱导丛生芽最佳的组合是 $A_1B_1C_1$, 即 6-BA 1.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L。

2.4 不定根的诱导

由表 4 可知, 6 个不同激素组合都能诱导出不定根, 但不同激素组合对不定根的诱导影响较大, 以单一用

NAA 0.6 mg/L 的配方, 诱根率达 87.5%。即处理 3, 1/2MS+NAA 0.6 mg/L 为最适宜的生根培养基配方。

表 2 不同激素组合对不定芽诱导的影响

培养基 编号	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	诱导率 /%
$A_1B_1C_1$	2.0	0.1	0.0	38.7
$A_1B_2C_2$	2.0	0.2	0.1	32.8
$A_1B_3C_3$	2.0	0.3	0.2	31.5
$A_2B_1C_2$	2.0	0.1	0.2	51.4
$A_2B_2C_3$	3.0	0.2	0.2	49.1
$A_2B_3C_1$	3.0	0.3	0.0	56.3
$A_3B_1C_3$	3.0	0.1	0.2	46.2
$A_3B_2C_1$	4.0	0.2	0.0	37.7
$A_3B_3C_2$	4.0	0.3	0.1	48.1
K_1	34.33	45.43	44.23	
K_2	52.27	39.87	44.10	
K_3	44.00	45.30	42.26	
R	17.94	5.56	1.97	

2.5 试管苗的驯化移栽

试管苗生根后, 可转到移栽扦插室进行练苗驯化, 练苗 2 d 后, 洗掉琼脂, 再用 50% 多菌灵可湿性粉剂 500 倍液浸泡 30 min, 移入以腐质土: 珍珠岩=3:1 的移栽基质中, 移栽 1 周后喷施营养液 1 次, 2 周后, 可用 0.1% 磷酸二氢钾+尿素进行叶面喷施, 每周 2 次, 成活率达 90% 以上。

表 3 不同激素组合对丛生芽增殖的影响

培养基编号	激素组合			增殖倍数	丛生芽的生长状况
	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹		
A ₁ B ₁ C ₁	1.0	0.01	0.0	6.6	芽壮,生长良好
A ₁ B ₂ C ₂	1.0	0.05	0.05	6.5	芽长势一般,基部长愈伤
A ₁ B ₃ C ₃	1.0	0.1	0.1	7.4	芽长势差,基部长大量愈伤
A ₂ B ₁ C ₂	2.0	0.01	0.05	6.9	芽长势较弱,有一点水渍状
A ₂ B ₂ C ₃	2.0	0.05	0.1	7.6	芽长势较弱,有一点水渍状,基部长愈伤
A ₂ B ₃ C ₁	2.0	0.1	0.0	7.0	芽长势较弱,有一点水渍状,基部长大量愈伤
A ₃ B ₁ C ₃	3.0	0.01	0.1	7.2	芽长势弱,有大量水渍状,基部长大量愈伤
A ₃ B ₂ C ₁	3.0	0.05	0.0	8.8	芽长势弱,有大量水渍状
A ₃ B ₃ C ₂	3.0	0.1	0.05	8.0	芽长势弱,有大量水渍状,基部长愈伤
K ₁	6.83	6.90	7.47		
K ₂	7.17	7.63	7.13		
K ₃	8.00	7.46	7.40		
R	1.17	0.73	0.34		

表 4 不同激素组合对不定根诱导的影响

培养基编号	激素组合		接种苗数/株	生根株数/株	诱根率/%
	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹			
1	0.00	0.2	40	26	65.0
2	0.00	0.4	40	29	72.5
3	0.00	0.6	40	35	87.5
4	0.02	0.2	40	18	45.0
5	0.02	0.4	40	19	47.5
6	0.02	0.6	40	21	52.5

3 结论与讨论

在离体培养条件下,植物激素对番茄子叶诱导愈伤组织、不定芽的诱导、丛生芽增殖以及不定根的诱导起着重要的作用。该研究结果表明,高浓度的 6-BA 和 IBA 相结合,有利于番茄愈伤组织的诱导,在 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L 培养基中能形成分化能力很强的愈伤组织;以 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为番茄通过愈伤组织诱导不定芽的适宜培养基;以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L 为番茄丛生芽增殖的适宜培养基;以 1/2MS+NAA 0.6 mg/L 为番茄不定根诱导的适宜培养基。由愈伤组织形成不定芽体细胞机制,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 肖日新. 辣椒、茄子和番茄栽培技术[M]. 海口:海南出版社,1998.
- [2] 曲雪艳,周庆红. 樱桃番茄的组织培养与离体快繁技术研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(6):962-964.
- [3] 卫志明,许智宏. 番茄叶组织培养中植株再生的初步研究[J]. 植物生理学通讯,1979(1):10-11.
- [4] 刘克斌,李曙轩,裴文达. 番茄幼胚的离体培养[J]. 植物生理学通讯,1986(5):48-49.
- [5] 梁美霞,李景富,谢立波,等. 番茄组织培养存在的问题及对策[J]. 北方园艺,2004(3):74-75.
- [6] 吴志刚,宋明,王志敏,等. 番茄组织培养中无菌苗培养条件的优化[J]. 中国农学通报,2006,22(4):335-337.
- [7] 陈火英,张建华,庄天明. 番茄下胚轴离体诱导成株的激素调控[J]. 上海农业学报,1999,15(2):26-29.
- [8] 佟新苹. 番茄幼叶愈伤组织诱导与植株再生[J]. 植物生理学通讯,1993,29(3):190-192.
- [9] 孙莉娜. 樱桃番茄的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2000,36(2):135.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1998.

Study on the Technology Isolated Culture and Rapid Propagation of Tomato

HUANG Gang,SUN Guang-ying,ZHENG Xiao-feng,LI Zhu-ying
(College of Qiongzongnan Nation Vocational Technical ,Kaili,Guizhou 556000)

Abstract: Tomato seeds chosen as test material,by the method of orthogonal test of preparation of different media,the effect of different concentrations of 6-BA,NAA,IBA on adventitious bud induction and proliferation of multiple shoot clumps were studied. The results showed that optimum medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+ IBA 0.3 mg/L+sucrose 30 g/L;optimum medium for adventitious bud induction was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sucrose 30 g/L;suitable medium for the proliferation buds was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+sucrose 30 g/L;suitable medium for rooting medium was 1/2MS+NAA 0.6 mg/L+sucrose 30 g/L.

Key words: tomato;tissue culture;rapid propagation;orthogonal test