

激素配比对不同基因型番茄再生体系的调控

孙靖棣, 未晓巍, 蔡蕊, 周晓馥

(吉林师范大学 生物资源与环境信息吉林省高校重点实验室, 吉林 四平 136000)

摘要:以“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮粉”、“红润”5种基因型番茄品种为试材,取7 d的无菌苗子叶作为外植体,研究不同激素配比对不同基因型番茄愈伤组织、不定芽及根诱导的影响。结果表明:不同基因型番茄再生体系受不同激素配比的调控差异显著。筛选得出愈伤组织诱导最佳培养基为:MSB₅+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2~0.5 mg/L;不定芽诱导最佳培养基为:MSB₅+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.15~0.50 mg/L;不定芽生根最佳培养基为:1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

关键词:番茄;基因型;激素配比;再生体系

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0115-04

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 系茄科 (Solanaceae) 番茄属 (*Lycopersicon*) 1 a 生或多年生草本双子叶植物,具有营养丰富,生长周期短,遗传背景较清楚等优点,是基因工程研究中重要的模式植物。

番茄再生体系的建立是成功进行遗传转化的前提和保障。据国内外研究报道,番茄外植体离体培养受到

激素及基因型^[1]的影响,在相同的培养基上不同基因型的番茄生长状态存在差异^[2-4]。也有研究发现,番茄外植体的选择与再生体系的建立也存在着密切的关系^[5]。为了使番茄植株再生体系得到进一步的优化,该研究以“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮粉”、“红润”为试材,选取番茄子叶为外植体,系统地研究了供体基因型以及植物激素浓度配比对番茄再生体系的影响,以期建立一套优化的组织培养和再生体系,为进一步的番茄基因工程提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以番茄基因型“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮

第一作者简介:孙靖棣(1981-),女,在读硕士,研究方向为番茄遗传转化。E-mail: wxw0610616@126.com。

责任作者:周晓馥(1964-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事植物基因工程的研究工作。E-mail: zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30970219)。

收稿日期:2011-12-08

[5] 魏国芹,戴洪义,孙玉刚,等. 椴椴离体培养繁殖的研究[J]. 山东农业科学, 2010(1): 5-9.

[6] 秦伟,韩晶,马生军,等. 椴椴子叶不定芽再生研究初报[J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(5): 28-30.

[7] 徐凌飞,刘亚杰,李慧,等. 梨矮化砧木云南椴椴硬枝扦插繁殖试验

[J]. 北方园艺, 2011(17): 54-55.

[8] 李凌明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

[9] 李云,田砚亭,钱永强,等. NAA 和 IBA 对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J]. 林业科学, 2004, 40(3): 75-79.

Study on *in vitro* Propagation of Yunnan Quince as a Dwarf Rootstock of Pear

XU Ling-fei, LI Zhi-hui, JIA Dong-feng, LI Hui

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

Abstract: The stem segments with axillary buds of Yunnan quince were used as the explants to develop *in vitro* propagation protocol. The results indicated that the optimal shoot multiplication medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L or MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the multiplication rate was 3.65 and 3.58, and the new shoot was strong. The suitable rooting medium was 1/2MS+NAA 0.3 mg/L. The survival percentage was 92% when rooting plantlets were transplanted in soil.

Key words: pear; dwarf rootstock; Yunnan quince; *in vitro* propagation

粉”、“红润”为试材,购自四平市神农种业有限公司。MSB₅培养基、蔗糖、琼脂为北京鼎国生物制品公司产品。IAA、6-BA、IBA为Genview公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取新鲜饱满的番茄种子,无菌水浸泡90 min左右,取出种子,无菌滤纸吸干种子表面水分,放入含有氯气(25 mL NaClO和1 mL浓HCl反应生成)的密闭容器内,消毒20 min后,无菌水冲洗3~5次,无菌滤纸吸干水分,在无菌条件下播种于1/2MSB₅培养基上。在(25±3)℃黑暗条件下萌发种子,种子发芽后放入人工气候箱内培养,培养温度为(25±3)℃,光周期为16 h光照,8 h黑暗。

1.2.2 愈伤组织及不定芽的诱导 在种子苗生长5、7、9 d时,选取外植体,将子叶切成0.5 cm×1 cm的小块,接种于愈伤组织及不定芽诱导培养基中,每10 d继代1次,28 d后统计出愈率、不定芽分化率及平均芽点数,观察并记录愈伤组织及不定芽的生长情况。

1.2.3 生根培养 待不定芽生长至1~2 cm时,在无菌条件下将芽切下,转入生根培养基中。20 d左右出现不定根,40 d时统计生根率,并观察根的形态。

1.2.4 练苗移栽 再生植株生长至8 cm左右时,打开培养瓶,练苗7 d,洗去根部培养基,将幼苗移栽到培养基质中,保湿,在(25±3)℃条件下温室培养。

2 结果与分析

2.1 激素配比对不同基因型番茄愈伤组织诱导的影响

由表1可知,不同浓度配比的6-BA和IAA处理对外植体出愈率的影响差异不明显,6-BA浓度为2.0 mg/L,IAA浓度为0.20~0.50 mg/L处理时,7 d左右外植体颜色变淡且表面变得粗糙,个别外植体边缘卷曲,开始膨大、弯曲、产生愈伤组织,5种基因型出愈率均达100%,且番茄子叶分化能力较强。因此,应选取6-BA 2.0 mg/L,IAA 0.20~0.50 mg/L为“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮粉”、“红润”5种基因型番茄愈伤组织诱导的植物激素浓度。

表1 激素配比对不同基因型番茄愈伤组织诱导的影响

%

激素浓度 /mg·L ⁻¹	“齐研矮粉”		“中蔬四号”		“红润”		“春秀”		“粉桃”	
	出愈率	形态	出愈率	形态	出愈率	形态	出愈率	形态	出愈率	形态
6-BA 1.0+IAA 0.10	100	+	100	+	100	+	100	+	85.7	+
6-BA 1.0+IAA 0.25	100	++	100	+	100	+	100	+++	100	+
6-BA 2.0+IAA 0.15	100	+	100	+	100	+	100	+	90.0	+
6-BA 2.0+IAA 0.20	100	+	100	+++	100	+++	100	++	85.7	+
6-BA 2.0+IAA 0.50	100	++	92.9	++	100	+	100	+	100	+++
6-BA 3.0+IAA 0.50	100	+	90.9	+	100	++	100	+	100	+

注:出愈率=形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%;+++愈伤组织呈淡绿色,结构均匀、致密,不定芽多;++愈伤组织呈黄白色,致密,不定芽较多;+愈伤组织呈黄色或褐色,结构疏松,不定芽少。

2.2 激素配比对不同基因型番茄不定芽诱导的影响

由表2可知,6-BA浓度在1.0~3.0 mg/L范围内变化时,随着浓度的升高,番茄外植体的出愈率和诱导率均整体呈现先升高后降低的趋势,6-BA浓度增加到3.0 mg/L时,芽点不能正常生长,导致正常芽的诱导率下降。6-BA浓度为2.0 mg/L,IAA浓度为0.15~0.50 mg/L处理时,15 d左右开始出现绿色芽点,芽点不断分

化逐渐长成不定芽,且不定芽生长形态较佳,诱导芽点较多,“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮粉”、“红润”不定芽诱导率最高,分别为100%、50.0%、71.4%、50.0%、100%。该研究中,在不同激素配比对不同基因型番茄平均芽点数的影响方面进行了对比(图1),综合分析,选取6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.15~0.50 mg/L为不定芽诱导的植物激素浓度比较适宜。

表2 激素配比对不同基因型番茄芽分化的影响

%

激素浓度 /mg·L ⁻¹	“齐研矮粉”		“中蔬四号”		“红润”		“春秀”		“粉桃”	
	出芽率	形态	出芽率	形态	出芽率	形态	出芽率	形态	出芽率	形态
6-BA 1.0+IAA 0.10	28.6	+	42.3	+	40.0	+	38.5	+	60.0	+
6-BA 1.0+IAA 0.25	14.3	++	65.0	+	46.7	+	50.0	+++	100	+
6-BA 2.0+IAA 0.15	16.7	++	57.1	+++	100	+++	50.0	++	65.0	+
6-BA 2.0+IAA 0.20	50.0	+	71.4	++	80.0	+++	38.5	+	57.1	+
6-BA 2.0+IAA 0.50	28.6	+	57.1	+	40.0	+	20.0	+	100	+++
6-BA 3.0+IAA 0.50	14.3	+	36.4	+	60.0	+	53.9	+	100	++

注:不定芽分化率=分化不定芽的外植体数/接种外植体数×100%;+++生长迅速,极少有畸形芽;++生长较为迅速,畸形芽较少;+生长较慢,畸形芽多。

2.3 激素配比对不同基因型番茄生根的影响

切取1~2 cm的不定芽,转接于生根培养基中,28 d统计生根情况。由表3可知,IBA或NAA浓度不同对番茄再生植株影响不同。在NAA培养基中生根效果并

不理想,诱导生根较慢,根系较短,植株较矮。而添加IBA的培养基生根效果较为理想,生根数较多,根系发达,侧根多且长,植株粗壮且高。因此,最佳生根培养基为1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

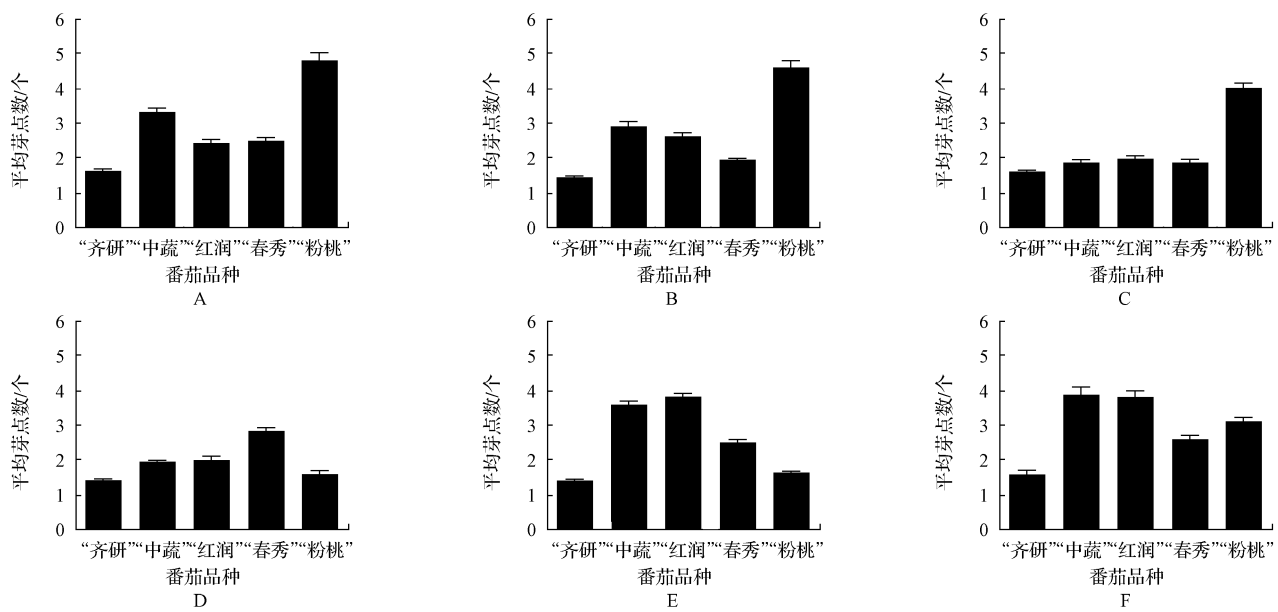


图1 不同激素配比对不同基因型番茄平均芽点数的影响

注:A.激素配比为6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.10 mg/L;B.激素配比为6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.25 mg/L;C.激素配比为6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.15 mg/L;D.激素配比为6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.20 mg/L;E.激素配比为6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.50 mg/L;F.激素配比为6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.50 mg/L。

表3 激素配比对不同基因型番茄生根的影响 %

激素浓度 /mg · L ⁻¹	“中蔬四号”		“春秀”		“粉桃”		“红润”		
	生根率	形态	生根率	形态	生根率	形态	生根率	形态	
NAA	0.1	33.3	+++	0	—	25.0	+	50.0	++
	0.2	0	—	28.6	+	8.3	+	25.0	+
	0.5	0	—	42.9	+	58.3	+	12.5	+
	1.0	16.7	+	0	—	16.7	+	0	—
IBA	0.1	33.3	++	0	—	8.3	+	0	—
	0.2	0	—	0	—	25.0	+	25.0	+
	0.5	16.7	+	42.9	+++	33.3	+++	25.0	+++
	1.0	0	—	28.6	++	41.7	++	0	—

注:生根率=生根幼苗数/接种幼苗数×100%;+++根数量多,侧根多,较长,适合移栽;++根数量较多,侧根较多,适合移栽;+根数量少,侧根少且短,不适合移栽。

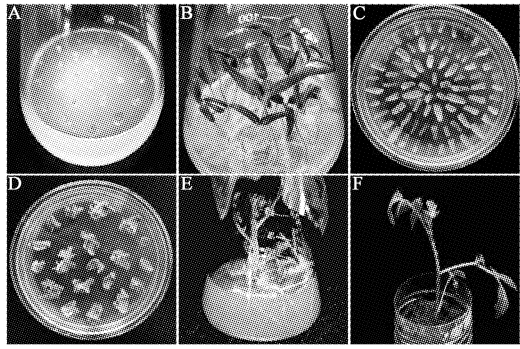


图2 番茄(粉桃)再生体系的建立

注:A.种子播种于1/2MS培养基中;B.7 d苗龄的无菌苗;C.愈伤组织的诱导;D.不定芽的诱导;E.再生植株根系的诱导;F.再生植株的移栽。

3 讨论与结论

番茄种子表面被有绒毛,内生菌较多,培养过程中内源性污染较为严重。番茄种子的消毒方法通常是

NaClO或 HgCl₂ 溶液消毒,但 HgCl₂ 为重金属对种子的毒害较大,会有所残留,甚至抑制种子发芽。研究中发现,使用 NaClO 溶液番茄种子污染率较高,不能达到最佳的消毒效果。该研究首次将氯气消毒的方法应用到番茄种子消毒上来,在无菌水浸泡 90 min 左右,氯气消毒 20 min 时,获得了较为理想的消毒效果。

基因型是影响番茄组织培养效果的重要因素。在相同培养基上,“粉桃”、“春秀”、“中蔬四号”、“齐研矮粉”、“红润”5 个不同品种番茄不定芽诱导率差异较大,表明不同基因型番茄品种其再生能力不同,与马杰等^[6]、何秀霞等^[7] 研究结果相似。在愈伤组织诱导时,选择适宜的外植体的苗龄^[8] 是很关键的一步,该研究中,选取培养 5、7、9 d 的番茄种子苗子叶做外植体,进行比较,发现 5 d 的种子苗长势较弱,不易成活;选取 7 d 子叶展平时切去外植体,保持叶片良好的分生能力;9 d 的由于有其它子叶长出,叶片老化较明显,不适宜做外植体。

在番茄的组织培养中,外源激素的使用是必不可少的。有研究者指出基因型的差异反映出品种间内源激素水平的不同^[9]。很多学者对不同激素配比和浓度进行了研究。但使用激素种类和配比差异较大,且结果不尽一致。该研究筛选了番茄组织培养的最佳激素配比培养基(表 1、2)。从该研究结果看,6-BA 和 IAA 的不同浓度配比对番茄子叶外植体的愈伤组织诱导影响不大,对不定芽诱导的影响差异较大,与陈火英等^[10] 报道结果相同。6-BA 浓度在 1.0~3.0 mg/L 范围内变化时,随着浓度的提高,番茄外植体的出愈率和诱导率均整体呈现

先升高后降低的趋势,6-BA 浓度增加到3.0 mg/L时,芽点不能正常生长,导致正常芽的诱导率下降,在李桂兰等^[11]、张丽华等^[12]、于明礼等^[13]、欧阳波等^[14]的研究中也有类似的现象,可见细胞分裂素的使用浓度直接影响番茄外植体的再生能力。该研究中,6-BA 浓度为 2.0 mg/L,IAA 浓度为 0.2~0.5 mg/L 时诱导愈伤组织效果最佳,6-BA 浓度为 2.0 mg/L,IAA 浓度为 0.15~0.50 mg/L 时诱导不定芽效果最佳。周金梅等^[15]认为诱导愈伤组织过程中 6-BA 的用量一般不宜超过2.0 mg/L,IAA 0.2 mg/L 时诱导愈伤组织效果最佳;曾培洋等^[16]认为,6-BA 浓度为 2.0 mg/L,IAA 浓度低于 0.5 mg/L 时,形成的愈伤组织相对较大,较容易分化成为不定芽;毕建水等^[17]认为,附加 6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的培养基诱导不定芽的再生能力较强,与该研究结果类似。

植物组织培养中,生根也是再生体系建立的关键。影响生根的因素很多,其中植物激素是重要的体内调节因子,植物的生根大多数是用生长素单独实现的^[18],该研究发现,1/2MS+IBA 0.5 mg/L 能够起到很好的根诱导效果,而且根系粗壮,适合移栽。

影响番茄子叶离体再生的多种因素之间是相互联系的,基因型及激素配比都是影响番茄组织培养的关键因素,虽然番茄叶片的离体再生体系日趋完善,但是不同基因型之间仍存在差异,需要进一步拓展研究。该研究成功的建立了“中蔬四号”、“春秀”、“粉桃”、“红润”的叶片离体再生体系,且再生植株生长状态良好,该研究以番茄基因型“粉桃”为例(图 2),展示所建立的番茄离体体系。

参考文献

[1] 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(自然科学版),2007,22(4):120-121.

- [2] Chandel G, Katiyar S K. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) [J]. Adv. Plant Sci, 2000, 13: 11-17.
- [3] 彭细桥,戴良英,刘红艳.番茄离体再生体系优化的研究[J]. 江西农业学报, 2005, 17(4): 40-43.
- [4] 罗素兰,田嘉珺,长孙东亭.番茄高效再生体系建立[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2002, 20(4): 314-323.
- [5] Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculantum*) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2004, 78: 1-21.
- [6] 马杰,邱栋梁.番茄组培再生体系优化研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 185-189.
- [7] 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.
- [8] Ozyigit I I, Kahraman M V, Ercan O. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2007, 6(1): 3-8.
- [9] 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.
- [10] 陈火英,张建华,庄天明,等.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.
- [11] 李桂兰,乔亚科,武宝悦,等.番茄子叶离体培养中激素的优化[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(5): 27-30.
- [12] 张丽华,程智慧,李海燕,等.加工番茄子叶和下胚轴离体植株再生的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(7): 106-109.
- [13] 于明礼,张柱岐,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.
- [14] 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.
- [15] 周金梅,宫敬利.不同培养基配方对 L-402 番茄愈伤组织的诱导研究[J]. 北方园艺, 2010(21): 158-160.
- [16] 曾培洋,杨宗岐.番茄下胚轴和子叶离体诱导成株的激素调控[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3341-3342.
- [17] 毕建水,李翠翠,徐丽丽.培养基和继代时间对番茄叶片愈伤组织诱导和芽分化的影响[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(13): 41-43.
- [18] 赵慧,侯雷平,王慧,等影响小白菜子叶再生的因素[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 972-977.

The Regulation of Regeneration on Tomato Genotypes by Different Hormone Combinations

SUN Jing-di, WEI Xiao-wei, CAI Rui, ZHOU Xiao-fu

(Key Laboratory for Biological Resources and Environmental Information, Jilin Normal University, Siping, Jilin 136000)

Abstract: Taking five genotypes of tomato: 'Pink peach', 'Chunxiu', 'Zhongshu IV', 'Qiyanaifen', 'Red moist' as materials, with cotyledons were cultured 7 days as explants, the effect on different hormone combinations of different genotypes of tomato callus, adventitious bud and root-induced were studied. The results showed that the best medium for callus induction MSB₅ + 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.2~0.5 mg/L; the best medium for adventitious bud induction: MSB₅ + 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.15~0.50 mg/L; the best medium for rooting shoots 1/2MS+IBA 0.5 mg/L. Obtained through this research comparing different genotypes of tomato regeneration subject to regulation significantly by different of hormone ratio.

Key words: tomato; genotype; hormone combinations; regeneration