

番茄材料“0946”和“0949”再生体系的研究

张洪岩¹, 陈秀玲¹, 李景富¹, 王傲雪^{1,2}

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以番茄材料‘0946’、‘0949’为试材,用 MS 做基本培养基,研究不同外植体、不同激素组合对愈伤组织诱导、芽体分化、生根情况的影响,以建立一套适合的番茄再生体系。结果表明:诱导愈伤组织及不定芽分化的最佳培养基为 2.0 mg/L 6-BA+(0.1~0.2)mg/L IAA;以 0.2 mg/L IAA 诱生生根效果最好。该研究不仅针对该材料建立了番茄再生体系,同时也为利用番茄进行遗传转化奠定了技术基础。

关键词:番茄;子叶;茎段;组织培养

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0125-03

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 属茄科番茄属的 1 a 生或多年生双子叶植物,其果实营养丰富,味道佳,栽培技术成熟,是重要的世界性蔬菜之一。植物组织培养是其进行遗传改良特别是遗传转化的重要基础。目前利用番茄子叶、下胚轴、叶片获得再生体系的研究比较多,大多数都获得了良好的结果。但是由于番茄组培再生受基因型的限制,不同种类的激素及浓度配比和培养条件等都会影响再生植株的获得^[1-3]。该试验在前人研究的基础上^[4-7],选择杂交材料‘0946’、‘0949’的子叶和茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,添加 6-BA、IAA 诱导愈伤组织和不定芽分化,添加 IAA 诱导不定芽生根,对不同品种、不同浓度激素配比对番茄组织培养的影响进行了系统的研究,以期获得高效的再生体系和完整的组培体系,为今后基因工程中番茄遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:番茄材料“0946”、“0949”由东北农业大学园艺学院番茄研究所提供。药品:MS 粉为荷兰 Duchefa 公司产品,蔗糖、琼脂粉、植物激素等为伊事达公司产品。无菌苗播种使用培养基:1/2MS+20%蔗糖+0.7%琼脂,其它阶段均使用培养基:MS+30%蔗糖+0.7%琼脂。

第一作者简介:张洪岩(1985-),女,硕士,研究方向为蔬菜分子生物学与生物技术。E-mail:yyhappy_2005@sina.com。

责任作者:王傲雪(1973-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物生物技术。E-mail:wangaixue@yahoo.com。

基金项目:教育部高校博士点专项科研基金资助项目(20092325110001);教育部科学技术研究重点资助项目;黑龙江省教育厅新世纪优秀人才资助项目(1251-NCET-004)。

收稿日期:2012-03-15

1.2 试验方法

1.2.1 番茄无菌苗及外植体的获得 挑选番茄籽粒大且饱满的种子,用 70%无水乙醇浸泡 30 s,然后用 10%次氯酸钠消毒 15 min,期间不断摇动,再用无菌水清洗 4~5 次后,接种于 1/2MS+20%蔗糖+0.7%琼脂(pH 5.8)培养基上,每瓶 20~25 粒,先黑暗培养 3~4 d,待种子发芽后,置于正常条件下培养。8~9 d 后,待子叶展开时,切下子叶,将两端切掉,留子叶中间部分,面积约占整个子叶的 1/2,较大的子叶可横向切成 2 块,背面朝上放到培养基上。将茎切掉上端的生长点,下端切去根,中间茎部分切成约 1 cm 小段,用于再生材料。

1.2.2 培养条件 切好的外植体先经弱光培养 3 d,再进行正常光照条件培养,白天 25℃,夜晚 20℃,16 h 光周期,光照强度 1 800 lx,每隔 2 周继代培养 1 次。

1.2.3 诱导愈伤组织及芽体不同激素组合的筛选 设置不同浓度的 6-BA、IAA 组合,每个平板放置 60 个外植体,设 3 次重复,每个组合选择子叶和茎段各 60 块外植体,2、3、4 周后统计愈伤率和出芽率。愈伤诱导率/%=(诱导出愈伤组织的块数/外植体总块数)×100,不定芽分化率/%=(分化芽的外植体数/外植体总数)×100,愈伤组织及不定芽诱导选择的不同激素组合见表 1。

表 1 激素组合

培养基编号	激素种类和浓度/mg·L ⁻¹	
	6-BA	IAA
1	1.5	0.05
2	1.5	0.1
3	1.5	0.15
4	1.5	0.2
5	2.0	0.05
6	2.0	0.1
7	2.0	0.15
8	2.0	0.2
9	2.0	0.25

1.2.4 诱导生根不同激素浓度的筛选 当有生长点的芽体长到2~4 cm长时,从基部切离外植体愈伤组织,放入生根培养基中,进行生根培养。选择单一生长激素 IAA 作为生根诱导激素,添加到培养基中的浓度 0.1、0.2、0.3 mg/L,3 次重复。15~20 d 后统计生根结果。

2 结果与分析

2.1 不同浓度激素组合对愈伤组织及芽分化的影响

18 d 以后产生愈伤组织,子叶和茎段膨大,切口处产生黄绿色、质地致密愈伤组织,与培养基接触面出现不规则瘤状愈伤组织。在相同的 6-BA 浓度下,IAA 浓度高的先产生愈伤组织,直到 6-BA、IAA 达到相适合的配比浓度,即 2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IAA 出愈伤较快。2 周后统计时 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA 配比组合明显比 2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA 出愈伤数目多,组织膨大,形成黄绿色结构致密的愈伤组织,变化明显。而组合 2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L IAA 则愈伤组织质量差,且容易出现畸形芽,盲芽。2 周后统计‘0946’和‘0949’愈伤组织诱导率,比较培养基 5 和 8 对愈伤诱导影响。

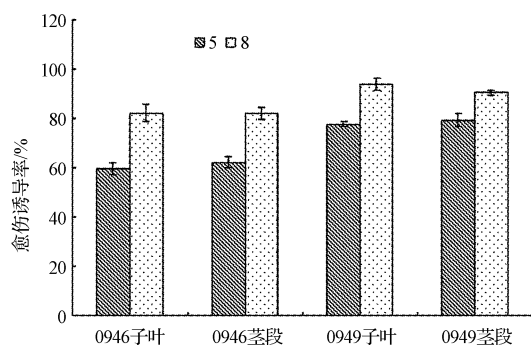


图1 组合5与8对愈伤诱导影响

由表 3、4 可知,不同 6-BA、IAA 激素组合对杂交材料‘0946’和‘0949’诱导愈伤组织及不定芽有差异,在相同激素浓度配比情况下,‘0949’比‘0946’愈伤组织及不定芽诱导率高。同一浓度的 6-BA、IAA 配比,对同一品种的子叶和茎段愈伤组织及不定芽诱导结果相似。但是子叶产生的不定芽数量大于茎段产生的不定芽数量,随着不定芽的生长,子叶分化的丛生芽呈现多而密的生长形态,茎段分化的不定芽少而疏,芽体较壮。每个外植体上分化出的不定芽数目情况见表 2。

表2 平均每个外植体上分化不定芽个数

	‘0946’	‘0949’
子叶分化芽个数	5~6	8~9
茎段分化芽个数	3~4	4~5

试验中设置的激素组合均可以诱导愈伤组织及不定芽的分化,结果显示,2.0 mg/L 6-BA 和 0.1~0.2 mg/L IAA 添加到培养基中的浓度适合诱导愈伤组织及不定芽分化。‘0946’子叶和茎段诱导愈伤组织率分别是:

76.67%、80.00%、82.22%、75.56%、78.33%、82.22%,诱导不定芽分化率是:63.33%、70.00%、67.22%、57.78%、63.89%、70.00%。‘0949’子叶和茎段诱导愈伤组织率是:81.67%、88.89%、93.89%、86.11%、93.33%、90.56%,诱导不定芽分化率是:75.00%、83.33%、88.89%、82.78%、86.67%、81.66%。

表3 不同激素组合对子叶愈伤组织及芽诱导影响

编号	‘0946’愈伤诱导率/%	‘0946’不定芽分化率/%	‘0949’愈伤诱导率/%	‘0949’不定芽分化率/%
1	62.78±1.92deDE	49.44±3.47deD	70.56±5.36dEF	61.11±6.74eDE
2	66.11±3.47deCDE	48.33±7.26eD	75.00±3.33cdDE	62.78±6.31eDE
3	67.78±2.54dCD	56.11±2.54cdBCD	72.22±3.85dE	66.11±2.54deCD
4	61.67±1.67efDE	53.33±4.41deCD	64.44±2.54eF	53.33±7.26fE
5	59.44±2.54fE	50.56±1.92deD	77.78±0.96bcDE	71.11±0.96cdCD
6	76.67±1.67bcAB	63.33±3.33abAB	81.67±2.89bBCD	75.00±0.00bC
7	80.00±4.41abA	70.00±2.89aA	88.89±1.92aAB	83.33±4.41abAB
8	82.22±3.47aA	67.22±2.54abA	93.89±2.54aA	88.89±3.47aA
9	72.78±2.54cBC	61.11±2.54bcABC	82.78±1.92bBC	76.11±2.54bcBC

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($\alpha=0.05$);不同大写字母表示差异极显著($\alpha=0.01$)。下同。

表4 不同激素比对茎段愈伤组织及芽诱导影响

编号	‘0946’愈伤诱导率/%	‘0946’不定芽分化率/%	‘0949’愈伤诱导率/%	‘0949’不定芽分化率/%
1	57.78±2.54eD	48.89±6.94defCDE	66.11±5.09fE	59.44±3.85eC
2	61.67±4.41deD	52.78±3.47edeCD	72.78±2.54deCDE	61.67±1.67eC
3	64.44±0.96dCD	46.11±2.54efDE	75.00±1.67cdCD	57.78±2.54eC
4	60.00±2.89deD	41.67±1.67fE	68.89±4.19efDE	58.33±1.67eC
5	62.22±2.54deD	56.11±3.47cdBCD	79.44±2.54cBC	74.44±2.54cB
6	75.56±1.92bcAB	57.78±6.31bcBC	86.11±1.92bAB	82.78±2.54abA
7	78.33±4.41abA	63.89±0.96abAB	93.33±2.89aA	86.67±1.67aA
8	82.22±2.54aA	70.00±2.89aA	90.56±0.96abA	81.66±3.33bA
9	71.11±2.54cBC	64.44±4.19abAB	78.33±2.89cC	69.44±2.54dB

2.2 不同浓度 IAA 对生根的影响

经过试验比较‘0946’和‘0949’适合生根的激素浓度均为 IAA 0.2 mg/L。由表 5 可知,经过 20 d 左右的生根培养,根系粗壮,数目多的,植株生长到 8~10 cm,叶片较多,生长势强,即可移栽到土里进行正常室外栽培管理。移栽后的第 1 周要保持湿度在 60%~70%,可以在植株外罩透明的塑料薄膜保湿,待苗正常生长后可放入温室中正常栽培管理,成活率达 100%。

表5 不同浓度 IAA 对生根诱导结果

IAA/mg·L ⁻¹	‘0946’	‘0949’
0.1	根系较细,弱	根系细长,数目少
0.2	根系粗壮,有须根 4 条以上	根系粗壮,数目多,8 条以上
0.3	根系较粗,数目少	根系较粗,数目少

3 讨论与结论

不同部位组织培养诱导结果也有差异,这与苏彩霞等^[8]、马杰等^[9]的研究结果相似。该试验采用的外植体是番茄子叶和茎段,平均水平上,6-BA、IAA 组合对子叶的愈伤组织诱导率和不定芽诱导率高于茎段,这与李铁松等^[10]报道的番茄外植体再生能力强弱顺序相符,即下

胚轴>子叶>茎段>叶片。但最佳组合中,子叶和茎段的愈伤组织和不定芽诱导率最大值相似,‘0946’子叶和茎段愈伤组织诱导率均为 82.22%,不定芽诱导率均为 70.00%,‘0949’子叶和茎段愈伤组织诱导率分别为 93.89%、93.33%,不定芽诱导率分别是:88.89%、86.67%。愈伤组织生长形态也基本相同,但不定芽生长形态有差异,子叶诱导出的不定芽密集,数量多,生长旺盛,畸形芽、盲芽很少。茎段诱导出的不定芽稀疏,数量少,且畸形芽、盲芽多。综合 2 个品种的愈伤组织和不定芽诱导率及生长状况,认为选择 2.0 mg/L 6-BA+0.1~0.2 mg/L IAA 组合适合‘0946’、‘0949’番茄组织培养愈伤组织和不定芽诱导。李峰等^[11]以番茄子叶为外植体确定的诱导激素组合也为 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA。陈火英等^[12]、宗宪春等^[13]以不同激素配比对番茄下胚轴诱导与分化,结果在 2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA 水平下也获得了最高效率,赵明珠等^[14]选择 3 种番茄品种为材料,子叶和胚轴为外植体,确定适宜分化的激素为:6-BA 1.0~2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L。而宗宪春等^[15]以潘那利番茄叶片为外植体进行组培,结果 6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 获得高愈伤组织诱导率和不定芽分化率。

赵慧等^[16]研究认为,植物生根大多数是用生长素单独实现的,该试验中使用 IAA 作为生根促进剂,调节生根效率,在生根培养基中添加 0.2 mg/L IAA,‘0946’和‘0949’生根效果好,根系吸收能力强,移栽成活率高,可达 100%。

该研究以番茄材料‘0946’和‘0949’为试材,利用子叶和茎段为外植体,在不同激素配比下进行组织培养,结果表明,适合‘0946’和‘0949’愈伤组织诱导和不定芽分化的培养基为:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1~0.2 mg/L IAA+30%蔗糖,适合根诱导的培养为:MS+0.2

mg/L IAA+30%蔗糖,移栽成活率可达 100%。‘0949’材料组织培养优于‘0946’,诱导率和分化率高,适合今后用于番茄组织培养等研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 王金杰,王志英,徐香玲.影响番茄离体培养再生的主要因素探讨[J].东北农业大学学报,2009,40(11):28-32.
- [3] 张微,侯雷平,赵慧,等.影响番茄子叶再生的因素[J].分子植物育种,2010,8(5):913-919.
- [4] 叶志彪,李汉霞,周国林.番茄子叶离体培养与再生成株[J].华中农业大学学报,1994,13(3):291-295.
- [5] 任春梅,高必达.番茄子叶的离体再生与移栽[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(3):214-217.
- [6] 张艳芳,霍秀文,苏彩霞,等.番茄遗传转化体系的建立[J].中国农学通报,2008,24(3):58-61.
- [7] 乔永旭.番茄再生体系的建立[J].北方园艺,2010(17):174-176.
- [8] 苏彩霞,霍秀文,庆海,等.番茄子叶、下胚轴植株再生体系的建立[J].内蒙古农业大学学报,2006,27(4):91-95.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 李峰,曹刚强,梁秋霞,等.番茄 06P28 子叶受体系统建立的研究[J].北方园艺,2007(11):7-9.
- [12] 陈火英,张建华.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.
- [13] 宗宪春,许向阳,王傲雪,等.不同激素比对番茄下胚轴诱导与分化的影响[J].安徽农业科学,2010,38(35):19927-19928.
- [14] 赵明珠,张美萍.不同番茄品种再生体系的比较[J].北方园艺,2011(9):127-129.
- [15] 宗宪春,许向阳,张贺,等.潘那利番茄叶片组织培养及植株再生研究[J].东北农业大学学报,2011,42(4):62-65.
- [16] 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.

Study on Regeneration System of Tomato Accessions ‘0946’ and ‘0949’

ZHANG Hong-yan¹, CHEN Xiu-ling¹, LI Jing-fu¹, WANG Ao-xue^{1,2}

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Tomato accessions ‘0946’, ‘0949’ were used as test materials for establishing tomato veyeneration system, MS media was used as basic media, calli induction, shoot differentiation and rooting condition of different explants and different hormone combinations were investigated. The results showed that MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1~0.2 mg/L IAA was the optimal medium for calli induction and adventitious bud differentiation, MS+0.2 mg/L IAA was the optimal medium for rooting. This study not only establish the regeneration system for tomato accessions ‘0946’ and ‘0949’, but also provide technological basis for tomato genetic transformation.

Key words: tomato; cotyledon; stem; tissue culture