

番茄子叶再生相关因素的优化研究

银利辉¹, 侯雷平¹, 王婷婷¹, 高行英¹, 张彦良², 李梅兰¹

(1. 山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西省种子总站, 山西 太原 030006)

摘要:以“中蔬四号”番茄品种为试材,研究了不同苗龄和不同有机添加物对番茄愈伤组织诱导及芽分化的影响,并筛选了不定芽伸长和生根的最佳培养基。结果表明:子叶苗龄在 8~9 d 时再生率较高;有机添加物为 0.07% MES 的 MS 培养基+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 比 N+N 有机更有利于番茄子叶的再生;不定芽伸长的最佳培养基组合为 MS+ZT 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L;而生根的培养基组合为 1/2MS+IAA 0.3 mg/L。该研究为今后采用基因工程技术改良番茄性状奠定了基础。

关键词:番茄;子叶;再生;伸长

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0093-04

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)属茄科番茄属植物,又名西红柿、番柿,其营养丰富,风味香郁,深受人们喜爱,在全球食物供给中占有重要地位。目前基因工程技术已成为番茄育种的重要手段^[1],利用转基因技术已经获得了抗虫、抗病和耐储藏的番茄^[2-4]。我国学者从 1990 年开始研究,也获得了转基因耐贮藏的番茄^[5]。番茄转基因中目前采用的方法多是农杆菌介导转化的方法。从首次报道获得番茄转基因植株以来^[6],迄今为止获得的近 200 种转基因植株中有 80% 以上是通过根瘤农杆菌介导完成的。而番茄高效离体再生体系的建立是农杆菌介导进行基因工程育种、快速育苗、优质种质保存等工作的重要前提。番茄组织培养最早开始于 1944 年,Smith 采用番茄胚培养,获得了栽培番茄与秘鲁番茄的杂交种。我国自 1975 年以来,卫志明等^[7]开展了

番茄花药培养方面的研究工作。高秀云^[8]于 1980 年通过诱导花粉愈伤组织获得了植株。此后,研究人员做了大量的试验,番茄组织培养技术得到了迅速的发展,分别成功地用根、叶、花药和种胚等进行离体培养并获得再生植株^[9-10],该课题组此前也已经做了大量研究,并获得成功^[11],但在番茄组培研究中,因激素种类及配比差别较大,结果亦不尽一致^[12-14]。尽管研究者们近年来在番茄子叶、下胚轴离体培养再生植株上取得了可喜的进展,但由于番茄子叶、下胚轴外植体离体培养能力明显受到基因型、激素种类及配比等诸多因素的影响,其培养效果与效率往往很不稳定。为了将番茄组织培养的研究结果应用于遗传改良和育种实践,所以该试验进一步优化和完善番茄的再生体系,优中择优,以期提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄品种“中蔬四号”购自山西省农业科学研究院。

1.2 试验方法

1.2.1 不同苗龄对芽分化的影响 将番茄种子用清水冲洗干净,放入 75% 的乙醇中浸泡 30 s,用无菌水冲洗

第一作者简介:银利辉(1985-),女,硕士,研究方向为蔬菜育种及生物技术。E-mail:yinlihui258258@126.com

责任作者:李梅兰(1964-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为蔬菜育种及生物技术。E-mail:limeilan2@hotmail.com

基金项目:山西省农业与社会发展科技攻关计划资助项目(20090311022;20110311015-1);山西省人事厅引进人才资助项目。

收稿日期:2012-12-13

Abstract: On the basis of functional analysis of bryophytes including environment protection, landscaping, environmental directives and green features and so on, species of bryophytes garden developing products, such as bryophytes park, bryophyte LED aquarium, bryophyte bottle garden, bryophyte ecological restoration and bryophyte landscape products were put forward according to the characters of bryophytes. The key technology of tissue culture and bryophytes carpet technology in developing these products were discussed.

Key words: bryophytes; function analysis; gardening products; development

3次;接着放入20%次氯酸钠中浸泡20 min后,再用无菌水冲洗3次。将消毒后的种子接种在1/2MS培养基中即可获得无菌苗。当幼苗长至6、7、8、9、10、11 d苗龄时分别将子叶切成0.5 cm×0.5 cm的方块作为外植体接种于MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L培养基中,比较不同苗龄植株子叶外植体芽的分化状况。每个处理接种40个外植体,重复3次,培养20 d后观察结果。

1.2.2 不同有机添加物对芽分化的影响 参照以前的配方^[1],将番茄无菌苗完全展开的子叶切成0.5 cm×0.5 cm的方块接种于含不同有机添加物的MS(A:普通有机;B:0.07%乙磺酸(MES);C:L+S有机;D:N+N有机)+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L培养基上,比较添加不同有机物配方的芽分化状况。每个处理接种40个外植体,重复3次,培养20 d后观察结果。

1.2.3 不同激素对比对再生芽伸长的影响 待子叶愈伤组织和再生芽诱导后,继代培养接种在加入不同浓度的ZT、IAA和GA激素组合的培养基里,每个处理接种

20个外植体,重复3次,观察其对芽伸长的影响。

1.2.4 不同激素对不定芽生根的影响 当再生芽长至2 cm左右时,自芽基部切下分别插入到含不同浓度IAA(0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L)、IBA(0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L)的1/2MS培养基中,每个处理接6个再生芽,重复3次,培养2周左右,观察生根情况。

2 结果与分析

2.1 不同苗龄对芽分化的影响

种子接种后3 d左右开始萌发,当幼苗的胚轴长至1 cm长时,子叶还未展开,切取时比较困难,会影响到再生频率。8 d后番茄幼苗的胚轴长至3 cm长,子叶完全展开,此时较易操作,可用于分化组织培养,10 d后不少幼苗已长出第1片真叶。对不同苗龄子叶分化能力比较的结果表明,子叶在8~9 d时再生频率较高,10 d以后逐渐降低(表1)。

表1 不同苗龄对番茄芽分化的影响

Table 1 Effects of different seeding ages on induction of adventitious buds

不同苗龄 Age of different seedlings/d	平均诱愈数 Average numbers of callus	诱愈率 Ratio of callus induction/%	平均诱芽数 Average numbers of buds induction	诱芽率 Ratio of buds induction/%
6	35.00±1.00cE	87.50±2.50cE	34.00±1.00 cC	85.00±2.50cC
7	37.33±0.58bBC	93.33±1.44bBC	36.33±1.15 bB	90.83±2.89bB
8	39.00±0.00aAB	97.50±0.00aAB	38.33±0.58 aA	95.83±1.44aA
9	39.67±0.58aA	99.17±1.44aA	39.00±0.00 aA	97.50±0.00aA
10	37.00±0.00bCD	92.50±0.00bCD	35.67±0.58 bBC	89.17±1.44bBC
11	35.33±1.15cDE	88.33±2.89cDE	34.33±0.58 cC	85.83±1.44cC

注:以上数据为3次重复的平均值±SD,采用邓肯氏新复极差法检测显著性差异(下同)。

Note: The datas were means±SD of three repeats and the significant difference was tested by Duncan's test (The same below).

2.2 不同有机添加物对不定芽生成的影响

由表2可知,不同有机添加物直接影响芽的分化,在采用0.07% MES的诱芽培养基中芽分化的效果最

好,诱愈率和诱芽率分别达到了96.67%和95.00%,且再生芽也比较壮(图1),采用N+N有机芽分化的效果次之,其余2种明显低于前二者。

表2 不同有机添加物对不定芽生成的影响

Table 2 Effects of different organic additives on adventitious buds generation

处理 Treatments	平均诱愈数 Average numbers of callus	诱愈率 Ratio of callus induction/%	平均诱芽数 Average numbers of buds induction	诱芽率 Ratio of buds induction/%
普通有机	23.00±1.00dD	57.50±2.50dD	22.67±0.58dD	56.67±1.44dD
0.07% MES	38.67±0.58aA	96.67±1.44aA	38.00±0.00aA	95.00±1.44aA
L+S有机	27.33±0.58cC	68.33±1.44cC	26.33±0.58cC	65.83±1.44cC
N+N有机	36.67±0.58bB	91.67±1.44bB	35.67±0.58bB	89.17±1.44bB

2.3 不同激素对比对再生芽伸长的影响

在诱芽培养基MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L中,由于ZT浓度(2.0 mg/L)较高,因此一直进行芽的分化,在再生芽形成后,容易丛生而不伸长,不利于再生苗的快速生长。由表3可知,当ZT浓度从2.0 mg/L降为

0.5 mg/L时,加入GA的组合即ZT 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L和组合ZT 0.5 mg/L+GA 1.0 mg/L促进再生芽的平均增加量都高于加入IAA的组合。所以,以组合ZT 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L最有利于再生芽的伸长,10 d芽的平均增加量达到0.84 cm。

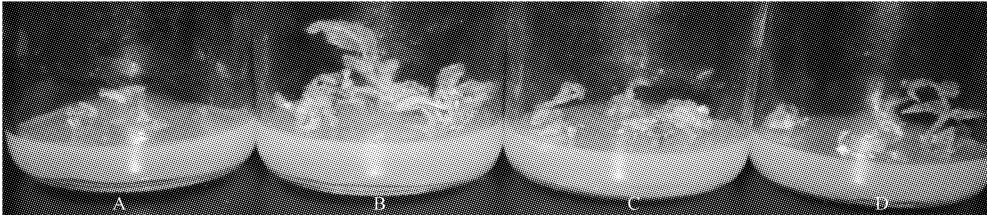


图 1 不同有机添加物对不定芽生成的影响

注:A:普通有机;B:0.07% MES;C:L+S有机;D:N+N有机。

Fig. 1 Effects of different organic additives on adventitious buds generation

Note:A;organic matter;B;0.07% MES;C;L+S organic matter;D;N+N organic matter.

表 3 不同激素组合对再生芽伸长的影响

Table 3 Effects of different hormone combinations on shoot elongation

激素组合 Hormone combination /mg · L ⁻¹			再生芽平均的高度 Average height of regenerated shoots/cm		平均增加量 The average increase /cm
ZT	IAA	GA	15 d	25 d	
—	—	—	0.38	0.89	0.51 ± 0.02dCD
0.5	0.1	—	0.34	0.99	0.65 ± 0.07bcBC
0.5	—	1	0.36	1.10	0.74 ± 0.06abAB
1	0.1	—	0.38	0.92	0.54 ± 0.04cdCD
1	—	1	0.32	1.16	0.84 ± 0.10aA
2	0.1	—	0.35	0.79	0.45 ± 0.06dD

2.4 不同激素对不定芽生根的影响

将 1~2 cm 高度的不定芽转接到生根培养基上,加入 IAA 的培养基 3~6 d 后就会产生根系,而加入 IBA 的培养基晚于加入 IAA 的培养基,4~7 d 后产生根系,15 d 后比较各配方的生根效果,加入 IAA 的培养基中诱导的每株根系发达,有许多侧根,根的平均长度也相对较长,其中以加入 IAA 0.3 mg/L 为最适宜番茄生根培养基;而加入 IBA 的培养基诱导的植株每株生根数少,侧根也少,根系不发达,不适宜番茄的生根生长;对照培养基中,前期几乎不产生根,只在长时间培养后才出现极少量的根(图 2)。说明生根培养的最佳培养基为 1/2MS+IAA 0.3 mg/L。

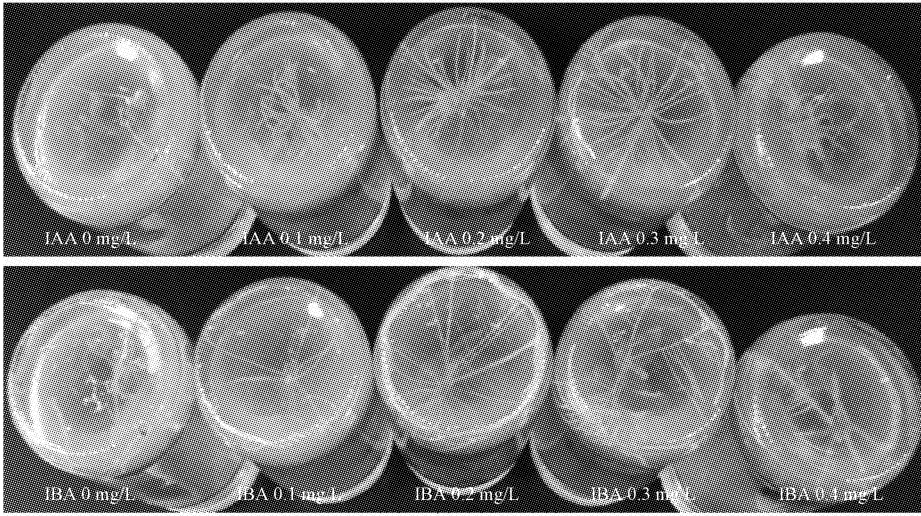


图 2 添加不同浓度 IAA 和 IBA 对不定芽生根的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of IAA and IBA on rooting of adventitious buds

3 结论与讨论

该试验以“中蔬四号”番茄品种为试材,以子叶为外植体诱导芽分化时,发现 8~9 d 的苗龄最为适宜,苗龄过短,子叶发育不成熟,叶片面积也小,不易于取材;太大,再生能力下降。植物激素的种类很多,其中生长素类和细胞分裂素类是最常用的激素类型,也是培养基中不可缺少的关键物质。在番茄的再生中,一些研究表明

ZT 和 IAA 组合对番茄愈伤组织诱芽的效果比其它组合都好,相同培养条件下,ZT 和 IAA 组合的出芽至少早 2~5 d,出芽也较多^[15]。还有的在研究番茄子叶转化系统时发现生芽率最高的是 MS+ZT 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L^[16],在前期的试验中发现番茄诱芽最好的培养基配方为 MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L^[11],但是在培养过程中发现,由于细胞分裂素促进芽的分化,容易产生芽体太密、不伸长的现象,这样就影响再生芽

的生长速度。为了使再生芽快速长高,在诱导芽产生后,继代时将其转入细胞分裂素 ZT 浓度适量降低并加入了赤霉素的培养基中,证明有利于芽的伸长,以 ZT 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L 配方最为适宜。有机物在组织培养中具有非常重要的作用,根据配方的不同分为几种基本培养基,在番茄的再生中,大多采用 N+N 有机,该试验添加 MES 作为有机物,发现更适合番茄芽的分化。植物组织培养过程中,不定芽生根是再生体系成功建立的关键,而植物的生根大多数是通过生长素单独处理实现的^[17]。孙同虎等^[18]研究表明 1/2MS 培养基要比 MS 培养基更适合番茄诱导生根,而 MS 培养基诱导生根慢,不定根数目少,细弱,侧根数目也很少,幼苗生长很缓慢,易黄化。这表明培养基中较低的盐离子浓度有利于番茄不定芽生根。因此该试验也采用 1/2MS 培养基为诱导生根的基本培养基,发现最适宜生根的培养基为 1/2MS+IAA 0.3 mg/L。

参考文献

- [1] 高志永. 番茄的应用价值及其转基因工程研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1864-1865.
- [2] Vander S T, Bosch D, Honee G, et al. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) and CryIIc genes: a resistance management strategy[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(1): 51-59.
- [3] Powell A P, Nelson R S. Delay of disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein genes [J]. Science, 1986, 232(4751): 738-743.
- [4] Oeller P W, Tanlor M L. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA[J]. Science, 1991, 254: 437-439.
- [5] 叶志彪, 李汉霞, 刘勋甲. 利用转基因技术育成耐贮藏番茄-华番 1 号[J]. 中国蔬菜, 1999(1): 6-10.
- [6] McCormick S, Niedermeyer J. Leaf disc transformation of cultivated tomato using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Report, 1986(5): 81-84.
- [7] 卫志明, 许智宏. 番茄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.
- [8] 高秀云. 番茄下胚轴原生质体培养[J]. 园艺学报, 1980, 7(4): 37-41.
- [9] 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.
- [10] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 54-60.
- [11] 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.
- [12] Okhi S, Bigot C, Mousse J. Analysis of shoot-forming capacity in two lines of tomato and their hybrids[J]. Plant and Cell Physiology, 1978, 19: 27-42.
- [13] Locky R D. Callus formation and organogenesis by explants of six lycopersicon species[J]. Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique, 1983, 61: 1072-1079.
- [14] Zeleer A S, Sofermans O, Lahar S. An in vitro screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration[J]. Plant Physiology, 1984, 116: 211-215.
- [15] 王全华, 葛晨辉, 曹守军. 番茄组织再生及其遗传转化体系的优化[J]. 青岛农业大学学报, 2007, 24(1): 24-27.
- [16] 申琳, 生吉萍, 罗云波. 番茄外源基因转化系统的研究[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(5): 101-105.
- [17] 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.
- [18] 孙同虎, 孙秀玲, 薄鹏飞, 等. 番茄高效离体再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6467-6487.

Study on Optimization of Factors Related to Regeneration of the Tomato

YIN Li-hui¹, HOU Lei-ping¹, WANG Ting-ting¹, GAO Xing-ying¹, ZHANG Yan-liang², LI Mei-lan¹

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801; 2. Shanxi Province Seeds Master Station, Taiyuan, Shanxi 030006)

Abstract: Taking *Lycopersicon esculentum* 'Zhongshu No. 4' as test material, the effects of different seedling ages and different organic additives on callus induction and bud differentiation were studied. The best medium for adventitious shoot elongation and rooting were screened. The results showed that the regeneration rate was high when the seedling was in the age of 8~9 d; regeneration from the cotyledon cultured in MS with 0.07% EMS as the organic matter+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L was better than in MS with N+N organic matter; the best medium for adventitious shoot elongation was MS+ZT 1.0 mg/L+GA 1.0 mg/L, while for rooting was 1/2MS+IAA 0.3 mg/L. This research facilitated the modification of tomato traits by genetic engineering technology in the future.

Key words: tomato; cotyledon; regeneration; elongation