

# 番茄两种外植体对氯化钠胁迫耐性的研究

王 罡<sup>1</sup>, 周 蓉<sup>2</sup>, 王 萍<sup>2</sup>, 季 静<sup>1</sup>

(1. 天津大学 环境科学与工程学院, 天津 300072; 2. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

**摘 要:**以番茄下胚轴和子叶为外植体,在培养基中添加不同浓度的 NaCl,研究了番茄 2 个品种、2 种外植体在愈伤组织和不定芽诱导过程中对 NaCl 胁迫的耐性。结果表明:随着 NaCl 胁迫浓度的增加抑制愈伤组织和不定芽的产生,形成愈伤组织和不定芽所需要的时间延长,番茄 2 个品种、2 种外植体在 NaCl 浓度为 100~125 mmol/L 时愈伤组织诱导率显著地低于对照,NaCl 浓度在 50~75 mmol/L 时不定芽诱导率显著地低于对照,不定芽形成比愈伤组织形成过程对 NaCl 的耐性差。

**关键词:**番茄;品种;外植体;NaCl 胁迫

**中图分类号:**S 641.203.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0123-04

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 属茄科 (Solanaceae) 番茄属 (*Lycopersicon*) 一年生或多年生植物,是我国主要的栽培蔬菜之一。近年来,设施蔬菜不断发展,设施内土壤次生盐渍化程度不断加重,导致蔬菜产量和品质下降,已成为设施栽培的限制性因素和设施生产可持续发展的严重障碍<sup>[1]</sup>。此外,我国有广大的沿海滩涂和盐碱土,对作物进行抗盐性的遗传改良具有不可低估的应用前景,选育耐盐性强的番茄品种是番茄育种的重要目标之一<sup>[2]</sup>。随着近年生物技术的发展,越来越多的研究者利用遗传转化的方法将各种有用基因转入到番茄中。番茄遗传转化的筛选常使用抗生素<sup>[3]</sup>,在目的基因转化过程中,载体常携带一些针对某些作物较敏感的选择剂作为标记基因,转化的细胞获得筛选剂抗性能在一定浓度的选择培养基上存活,而非转化的细胞则被抑制或杀死<sup>[4]</sup>。理论上筛选剂的浓度越高,选择效率越高,但如果浓度过高,也会导致组织细胞的生长受到一定程度的抑制。因此,适宜筛选浓度的确定对植物遗传转化的成功至关重要。以抗生素作为筛选标记使人们担心转基因产品的安全性。在遗传转化耐盐基因过程中,如果采用对人体及环境没有毒害作用的 NaCl 代替抗生素作为转化耐盐基因的筛选剂则可以避免人们的这些担心。现选用番茄“上海 903”和“白果强丰”2 个品种,以在番茄组织培养中最常用的 2 种外植体下胚轴和子叶<sup>[5-10]</sup>为试材,在培养基中添加不同浓度的 NaCl,评价番茄 2 个品种、2 种外植体在诱导愈伤组织、

不定芽形成过程中对 NaCl 胁迫的耐性,以期能为番茄转化耐盐基因用 NaCl 对目的基因进行直接筛选时确定适宜的筛选浓度提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试番茄品种为“上海 903”和“白果强丰”,以下胚轴和子叶为外植体。

### 1.2 试验方法

取饱满且无病斑的番茄种子,浸泡在 75% 的乙醇中 30 s,用无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 7~8 min,无菌水冲洗,浸于无菌水中 12 h 后取出萌动的种子,在超净工作台中接种到 1/2MS 培养基上,温度(25±1)℃,光培养获得无菌苗。取 2 片子叶刚刚展开的番茄无菌苗<sup>[11]</sup>在超净工作台中将下胚轴和子叶接种至添加不同浓度 NaCl 的愈伤组织诱导培养基<sup>[12]</sup>中,暗培养 10 d 后转入光照培养箱中,(25±1)℃。28 d 后将愈伤组织切成约 5 mm 大小转入添加不同浓度 NaCl 的不定芽分化培养基诱导不定芽的产生。采用完全随机试验设计,设 0、25、50、75、100、125、150 mmol/L 6 个 NaCl 浓度,3 次重复。记录形成愈伤组织所需要的时间、有愈伤组织的外植体数、形成不定芽所需要的时间、不定芽数,并计算愈伤组织诱导率、不定芽诱导率。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 进行处理与统计分析。

## 2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对番茄 2 种外植体愈伤组织形成的影响  
在添加不同浓度 NaCl 的培养基中,分别以番茄下胚轴和子叶为外植体诱导愈伤组织,“上海 903”和“白果强丰”2 个品种的 2 种外植体形成愈伤组织所需要时间见表 1。

**第一作者简介:**王罡(1964-),男,博士,教授,现主要从事植物基因工程与分子生物学研究工作。E-mail: wanggangtjdx@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31271419)。

**收稿日期:**2014-07-14

由表 1 可以看出,番茄 2 个品种、2 种外植体形成愈伤组织所需要的天数不同,随着 NaCl 浓度的升高,愈伤组织形成时间延迟。“白果强丰”形成愈伤组织所需要的时间较“上海 903”长,在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时

没有出现愈伤组织,而“上海 903”在 NaCl 各浓度胁迫下均有愈伤组织产生;从外植体看,子叶比下胚轴更晚出现愈伤组织。

表 1 在 NaCl 胁迫下番茄下胚轴和子叶形成愈伤组织所需要时间

Table 1 Time needed for callus formation under the NaCl stress in hypocotyls and cotyledon of tomato

品种 Variety	外植体 Explants	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol · L <sup>-1</sup> )						
		0	25	50	75	100	125	150
“上海 903”“Shanghai 903”	下胚轴 Hypocotyls	9	9	9	9	12	12	12
	子叶 Cotyledon	9	10	13	13	13	13	13
“白果强丰”“Baiguo Qiangfeng”	下胚轴 Hypocotyls	10	10	10	10	13	14	无愈伤
	子叶 Cotyledon	12	12	12	12	13	14	无愈伤

由表 2 可以看出,番茄 2 个品种的 2 种外植体在 NaCl 不同浓度胁迫下愈伤组织诱导率存在显著性差异。番茄 2 个品种的愈伤组织诱导率均随 NaCl 浓度的增加而降低。“上海 903”下胚轴和子叶 NaCl 浓度在 0~75 mmol/L 时愈伤组织诱导率在 90.00%~100.00%,各浓度间没有显著差异;当浓度达 100 mmol/L 时,下胚轴和子叶的愈伤组织诱导率分别降低到 60.00% 和 73.33%,显著地低于对照(0 mmol/L)。“白果强丰”下胚轴的愈伤组织诱导率在 NaCl 浓度在 0~75 mmol/L 时均为 100.00%,当浓度增加到 100 mmol/L 时,下胚轴愈伤组织诱导率下降到 55.00%,显著地低于对照

(0 mmol/L);在 NaCl 浓度 0~100 mmol/L 时,“白果强丰”子叶的愈伤组织诱导率在 73.33%~100.00%,NaCl 浓度间无显著差异,当 NaCl 浓度增加到 125 mmol/L 时,子叶的愈伤组织诱导率为 50.00%,显著低于对照。NaCl 浓度为 150 mmol/L 时,“白果强丰”的下胚轴和子叶均没有形成愈伤组织。总体上看,番茄 2 个品种的 2 种外植体在 NaCl 胁迫下,除“白果强丰”子叶形成愈伤组织时对 NaCl 胁迫的耐性略高(125 mmol/L)外,其它均为在培养基添加 100 mmol/L NaCl 时显著地抑制愈伤组织的形成。

表 2 番茄下胚轴和子叶在 NaCl 胁迫下愈伤组织诱导率

Table 2 Rate of callus induction under the NaCl stress in hypocotyls and cotyledon of tomato

品种 Variety	外植体 Explants	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol · L <sup>-1</sup> )						
		0	25	50	75	100	125	150
“上海 903” “Shanghai 903”	下胚轴 Hypocotyls	100.00a	100.00a	95.00a	95.00a	60.00b	46.67b	40.00b
	子叶 Cotyledon	100.00a	96.67a	90.00a	90.00a	73.33b	70.00b	70.00b
“白果强丰” “Baiguo Qiangfeng”	下胚轴 Hypocotyls	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	55.00b	15.00c	0.00d
	子叶 Cotyledon	100.00a	100.00a	75.00ab	75.00ab	73.33ab	50.00b	0.00c

## 2.2 NaCl 胁迫对番茄 2 种外植体不定芽形成的影响

将番茄 2 个品种的下胚轴和子叶诱导形成的愈伤组织转接到添加不同浓度 NaCl 的不定芽诱导培养基中,培养 10 d 时开始出现不定芽。从表 3 可知,番茄 2 个品种、2 种外植体形成不定芽所需要的时间不同。番茄 2 个品种的 2 种外植体在 NaCl 浓度升高到 75 mmol/L 时不定芽形成受到抑制,推迟了形成不定芽时间,尤其是下胚轴受抑制更加明显。随着 NaCl 浓度的升高形成不定芽所需要的时间在延长,“白果强丰”下胚轴的愈伤组织在 NaCl 浓度为 125 mmol/L 时没有产生不定芽。

从表 4 可以看出,NaCl 浓度在 0~25 mmol/L 时番茄 2 个品种、2 种外植体的不定芽诱导率除“上海 903”子叶不定芽诱导率为 96.67% 外,其它均为 100.00%,均随着 NaCl 浓度的增加不定芽诱导率下降。“上海 903”下胚轴和子叶分别在 NaCl 浓度为 75 mmol/L 和 50 mmol/L 时不定芽诱导率降低到 50.00% 以下,显著地低于对照。“白果强丰”下胚轴和子叶在 NaCl 浓度为 75 mmol/L 时不定芽诱导率分别为 56.67% 和 80.00%,显著地低于对照。

表 3 在 NaCl 胁迫下番茄下胚轴和子叶愈伤组织形成不定芽所需要时间

Table 3 Time needed for adventitious bud formation under the NaCl stress in hypocotyls and cotyledon of tomato

d

品种 Variety	外植体 Explants	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol • L <sup>-1</sup> )						
		0	25	50	75	100	125	150
“上海 903” ‘Shanghai 903’	下胚轴 Hypocotyls	10	10	10	16	16	16	20
	子叶 Cotyledon	15	15	15	16	16	17	21
“白果强丰” ‘Baiguo Qiangfeng’	下胚轴 Hypocotyls	11	11	11	14	14	无芽	—
	子叶 Cotyledon	11	11	11	11	12	12	—

表 4 番茄下胚轴和子叶在 NaCl 胁迫下不定芽诱导率

Table 4 Rate of adventitious bud induction under the NaCl stress in hypocotyls and cotyledonary of tomato

%

品 种 Variety	外植体 Explants	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol • L <sup>-1</sup> )						
		0	25	50	75	100	125	150
“上海 903” ‘Shanghai 903’	下胚轴 Hypocotyls	100.00a	100.00a	73.33ab	50.00bc	26.37cd	26.67cd	6.67d
	子叶 Cotyledon	100.00a	96.67a	46.67b	23.33bc	13.33bc	23.33bc	3.33c
	下胚轴 Hypocotyls	100.00a	100.00a	73.33ab	56.67b	33.33b	0.00c	0.00c
“白果强丰” ‘Baiguo Qiangfeng’	子叶 Cotyledon	100.00a	100.00a	100.00a	80.00b	33.33c	3.33d	0.00d

### 3 讨论

郑艳红等<sup>[6]</sup>在 MS 培养基中添加 0.7 mg/L 6-BA + 0.7 mg/L 或 1.3 mg/L NAA 时,“Liger”和“LA2711”2 个番茄品种的子叶和下胚轴培养 20 d 愈伤组织诱导率均为 100%。在该研究中“上海 903”和“白果强丰”的子叶和下胚轴 2 种外植体在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA 中培养 14 d 的愈伤组织诱导率也均为 100%。

当在培养基中添加不同浓度 NaCl 胁迫时,随着 NaCl 浓度的增加,2 种外植体形成愈伤组织和不定芽所需要的时间延长,愈伤组织诱导率、不定芽诱导率均有不同程度地下降。比如“上海 903”当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,下胚轴形成愈伤组织和不定芽分别需要 9 d 和 10 d,而子叶分别需要 13 d 和 15 d。此时下胚轴的不定芽诱导率为 73.33%,与对照无显著性差异;子叶不定芽诱导率却较低,为 46.67%,显著地低于对照。子叶对 NaCl 的耐性比下胚轴差,这与 Bourgeais 等<sup>[13]</sup>和 Garcia 等<sup>[14]</sup>认为番茄愈伤组织的耐盐性与外植体的来源有关的结论是一致的。

番茄 2 个品种、2 种外植体在 NaCl 浓度为 100~125 mmol/L 时愈伤组织诱导率显著地低于对照,NaCl 浓度在 50~75 mmol/L 时不定芽诱导率显著地低于对照,不定芽形成比愈伤组织形成过程对 NaCl 的耐性差。该研究为番茄转化耐盐基因用 NaCl 对目的基因进行直接筛选时确定适宜的筛选浓度提供了参考依据。

### 参考文献

[1] 吴雪霞,朱月林,朱为民,等.组织培养条件下不同番茄品种幼苗期

的耐盐性比较[J].上海农业学报,2006,22(3):59-62.

[2] 陈火英,张建华,钟建江,等.野生番茄耐盐性研究及其利用[J].华东理工大学学报,2001,27(1):51-55.

[3] Ruma D, Dhaliwal M S, Kaur A. Transformation of tomato using biolistic gun for transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2009, 8: 363-369.

[4] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998:168-188.

[5] 韩美丽,陆荣生,杜晓莉.番茄品种“加州红”子叶离体培养影响因素研究[J].广西农业科学,2004,35(5):349-351.

[6] 郑艳红,王姝,刘仲齐.番茄下胚轴和子叶组织培养及植株再生的研究[J].天津农业科学,2012,18(1):16-18.

[7] 赵琴,鲁黎明.白果强丰番茄高效再生体系的建立[J].作物杂志,2010(6):42-45.

[8] 裴华丽,李美芹,刘永光,等.不同基因型番茄高效组培再生体系的建立[J].北方园艺,2013(3):119-121.

[9] 银利辉,侯雷平,王婷婷,等.番茄子叶再生相关因素的优化研究[J].北方园艺,2013(8):93-96.

[10] 郭俊亚,曲俊民.番茄子叶愈伤组织及不定芽诱导[J].山西农业科学,2013,41(10):1058-1059,1066.

[11] 韩美丽,陆荣生,杜晓莉.番茄品种“加州红”子叶离体培养影响因素研究[J].西北农业科学,2004,35(5):349-351.

[12] 任永霞,王昱,郭郁频,等.番茄组织培养及其农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因 LycB 的遗传转化[J].北方园艺,2006(1):98-100.

[13] Bourgeais P, Guerrier G, Strullu D G. Adaption to NaCl of *Lycopersicon esculentum*[J]. Canadian Journal of Botany, 1987, 65: 1987-1997.

[14] Garcia R G, Moreno V, Luque A. Selection for NaCl tolerance in cell culture of three Canary Island tomato land races. Recovery of tolerant plantlets from NaCl tolerant cell strains [J]. Journal of Plant Physiology, 1988, 133: 1-6.

## Characterization of Stress-tolerance on NaCl of Two Kinds of Tomato Explants

WANG Gang<sup>1</sup>, ZHOU Rong<sup>2</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>, JI Jing<sup>1</sup>

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072; 2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005)

**Abstract:** Using hypocotyl and cotyledon as explants, stress-tolerance on NaCl of the 2 kinds of explants in 2 tomato varieties were investigated in the process of callus and adventitious bud induction by adding different concentration of NaCl in the media. The results indicated that induction of callus and appearance of adventitious bud would be suppressed with the increase of concentration of NaCl stress. Time needed for the formation of callus and adventitious bud would also be extended. When the stress of NaCl reached to 100—125 mmol/L, rate of callus induction from 2 tomato varieties, as well as 2 kinds of explants were observed to be lower significantly than those in control. Under the stress of 50—75 mmol/L of NaCl, induction rates of adventitious buds showed to be significantly lower than those in control. Adventitious bud formation was affected more sensitive than callus formation under the NaCl stress.

**Keywords:** tomato; variety; explant; NaCl stress

## 欢迎订阅 2015 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版是由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办的综合性学术期刊。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;贮藏·保鲜·加工;畜牧·兽医·资源昆虫等栏目。读者对象为国内外农业科研院(所)、大专院校的科研、教学与管理人员。

《中国农业科学》中文版为半月刊,影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。为北京大学图书馆 1992—2011 年连续 6 次遴选的核心期刊,位居《中文核心期刊要目总览》“农业综合类核心期刊表”的首位。1999—2008、2013—2014 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助。1999 年获“首届国家期刊奖”,2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”;2002—2013 年先后 11 次被中国科学技术信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号;2009 年获中国期刊协会/中国出版科学研究院“新中国 60 年有影响力的期刊”称号;2010、2013 年荣获“第二、三届中国出版政府奖期刊提名奖”,2013 年获新闻出版广电总局“百强科技期刊”称号;2012、2013 年获清华大学图书馆等“2012、2013 中国最具国际影响力学术期刊”称号。

《中国农业科学》中文版大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发行人。每期 208 页,定价 49.50 元,全年定价 1 188.00 元。国内统一连续出版物号:CN 11-1328/S,国际标准连续出版物号:ISSN 0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China, ASA),2002 年创刊,月刊。2012 年更名为《农业科学学报》(Journal of Integrative Agriculture, JIA)。2006 年 1 月起与国际著名出版集团 Elsevier 合作,全文数据在 Science Direct 平台面向世界发行。2009 年被 SCI 收录,2013 年 JIA 影响因子为 0.625。

JIA 大 16 开,每月 20 日出版,国内外公开发行人。每期 180 页,国内订价 80.00 元,全年 960.00 元。国内统一连续出版物号:CN 10-1039/S,国际标准连续出版物号:ISSN 2095-3119,邮发代号:2-851,国外代号:1591M。

《中国农业科学》中、英文版均可通过全国各地邮局订阅,也可向编辑部直接订购。

地 址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

邮编:100081

电 话:010-82109808,82106281,82105098

传真:010-82106247

网 址:www.ChinaAgriSci.com

E-mail:zgnykx@caas.cn

联系人:林鉴非