

DOI:10.11937/bfyy.201708020

不同激素对“五彩珍珠”番茄再生体系的影响

孙祥科, 李媛媛, 刘雪, 李荣烨, 宿峰

(青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要:以“五彩珍珠”番茄为试材,选取6 d苗龄无菌苗的子叶和下胚轴为外植体,研究了不同激素浓度及对比对番茄愈伤组织的诱导、不定芽分化及生根的影响,以建立番茄再生体系。结果表明:诱导“五彩珍珠”番茄愈伤组织的最佳培养基为MS+0.4 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA,其子叶的诱导率为100%,下胚轴的诱导率为95%;不定芽分化的最佳培养基为MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+(1.0~3.0)mg·L⁻¹ 6-BA;诱导生根的最佳培养基为1/2MS+0.10 mg·L⁻¹ NAA。子叶为最佳外植体,其不定芽的分化率及生长情况均优于下胚轴。

关键词:“五彩珍珠”番茄;子叶;下胚轴;再生体系

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0085-05

番茄(*Solanum lycopersicum*)属茄科(Solanaceae)双子叶植物,是一种重要的蔬菜作物^[1]。“五彩珍

第一作者简介:孙祥科(1992-),男,山东泰安人,硕士研究生,研究方向为生物材料的生物相容性。E-mail:578412902@qq.com.

责任作者:宿峰(1965-),女,山东青岛人,博士,副教授,研究方向为生物材料的生物相容性。E-mail:sufengvip@126.com.

基金项目:青岛市民生科技计划资助项目(16-6-2-17-nsh);青岛科技大学“大学生创新创业训练计划”资助项目(201501004,201601007)。

收稿日期:2016-12-12

珠”番茄口味清甜,营养价值高且风味独特,兼具食用与观赏价值,深受广大消费者青睐。近年来,植物组织培养技术在番茄幼苗生产、品种改良以及基因工程等工作上得到了广泛应用。许多科研工作者利用番茄的子叶、真叶、下胚轴均获得了良好的番茄再生体系^[2-9]。同时研究表明,番茄再生体系的建立因基因型、外植体及激素的种类、浓度和配比而异^[2-9]。

番茄再生体系的建立至关重要,它是成功进行遗传转化的前提和保障。该试验以“五彩珍珠”番茄为试材,番茄的子叶和下胚轴为外植体,研究激素的

leaf gas exchange of *Anthurium scherzerianum* were examined with changing the concentration of Ca(NO₃)₂ by 0 (CK), 2, 4, 6, 8 mmol·L⁻¹ in the nutrition medium to study effects of exogenous Ca²⁺ on the stomatal traits and gas exchange parameters of *Anthurium scherzerianum*. The results showed that the stomatal perimeter reached its maximum and the stomata characterized the most prolate shape under the Ca²⁺ of 4 mmol·L⁻¹. Meanwhile, the stomatal aperture width of 8 mmol·L⁻¹ was significantly increased by 10% relative to that of CK. The leaves featured with the most of stomata per millimeter leaf area and the highly irregular spatial distribution pattern under the treatment of 6 mmol·L⁻¹. However, the stomatal aperture area was not significantly changed by all the Ca²⁺ treatments ($P < 0.05$). Moreover, the net photosynthetic rate (P_n) was gradually increased with the increase of Ca²⁺, whereas the P_n of CK was higher than those of four Ca²⁺ treatments, and no significant difference on P_n was found among the CK and the four Ca²⁺ treatments. In addition, we also found that Ca²⁺ barely affected the leaf stomatal conductance (G_s) and transpiration rate (E) of *Anthurium scherzerianum*. These results suggested that Ca²⁺ had little impact on the stomatal traits and physiological processes might due mainly to the offset on the gas exchange from the positive effects by increasing stomatal density and the negative effects by declining the regularity of stomatal spatial distribution pattern.

Keywords: Ca²⁺; photosynthesis; transpiration rate; stomatal conductance; spatial distribution pattern

种类、浓度及对比对番茄再生体系的影响,并将苗龄作为番茄再生体系的影响因素之一进行相关研究,以期筛选出适合番茄离体培养的最佳时期,进一步为番茄再生体系的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄品种“五彩珍珠”种子购自长春市鑫硕种业有限公司。

供试种子萌发培养基:1/2MS 培养基。愈伤组织诱导及不定芽分化的培养基:以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 IAA (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg · L⁻¹)、6-BA(1、2、3、4、5 mg · L⁻¹)。诱导生根培养基:以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的单一激素 NAA(0.00、0.05、0.10、0.30、0.50 mg · L⁻¹)、IAA(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg · L⁻¹)。以上培养基均含 3%蔗糖,0.7%琼脂,pH 5.8~6.2。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的消毒 选取籽粒饱满、大小均一的番茄种子,用清水浸泡 4~6 h,待种子完全吸涨后用 75%的酒精消毒 30~60 s,然后用无菌水冲洗 3~4 次,再用 10%的 NaClO 溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 5~6 次,最后将种子用无菌滤纸吸干。

1.2.2 无菌苗的获取 将吸干后的种子接种于 1/2MS 培养基上暗箱培养,待大多数种子发芽露白,将其放置于温度为(27±1)℃、光照强度 1 800 lx、光照处理 16 h、黑暗处理 8 h 的培养箱中培养。6~8 d 后获得无菌苗。

1.2.3 愈伤组织的诱导及不定芽的分化 选取生长 6 d 的无菌苗,分别以子叶和下胚轴为外植体进行

培养。将子叶切去叶尖与叶柄,然后切成约 0.5 cm × 0.5 cm 大小的叶块,叶背向下接种于不同浓度、不同配比的培养基中,每个培养皿接种 10 块。下胚轴切成约 1 cm 的小段,同上方法接种。首先将这些外植体进行暗培养以诱导愈伤组织的发生,然后进行光照培养诱导不定芽的产生。期间每隔 10 d 左右进行一次继代培养,观察并记录试验结果^[10-12]。愈伤组织诱导率(%)=(诱导愈伤组织总数/接种外植体总数)×100;不定芽诱导率(%)=(分化出不定芽外植体总数/接种外植体总数)×100。

1.2.4 诱导生根 选取生长健康、长度 2~4 cm^[14]的不定芽,将其基部的愈伤组织与培养基完全清除后转移至生根培养基中诱导生根。记录根产生的时间以及根的生长状况。根诱导率(%)=(产生根外植体总数/接种外植体总数)×100。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 软件进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对番茄愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,25 种不同激素浓度的培养基均能诱导番茄的子叶和下胚轴产生愈伤组织,且愈伤组织诱导率较高,说明“五彩珍珠”番茄的子叶和下胚轴均具有较强的脱分化能力。但同等浓度的激素对子叶的诱导率要高于下胚轴,比较可得,“五彩珍珠”番茄愈伤组织的最适激素浓度是 0.4 mg · L⁻¹ IAA+2.0 mg · L⁻¹ 6-BA,其子叶的诱导率为 100%,下胚轴的诱导率为 95%。

表 1 激素浓度及对比对愈伤组织诱导及不定芽分化的影响

Table 1 Effect of hormone concentration and ratio on callus induction and adventitious bud differentiation

编号 No.	IAA 浓度 Concentration of IAA /(mg · L ⁻¹)	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg · L ⁻¹)	出愈时间		诱导率		不定芽诱导率	
			Time of callus induction/d		Rate of callus induction/%		Adventitious bud induction rate/%	
			子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls
1	0.1	1.0	7~9	5~8	80	73	78.2	38.3
2	0.1	2.0	7~9	5~8	81	75	75.4	35.4
3	0.1	3.0	7~9	5~8	83	76	77.3	37.2
4	0.1	4.0	7~9	5~8	91	83	44.8	21.2
5	0.1	5.0	7~9	5~8	85	78	21.3	11.3
6	0.2	1.0	7~9	5~8	80	73	85.6	70.1
7	0.2	2.0	7~9	5~8	79	73	83.3	70.5
8	0.2	3.0	7~9	5~8	82	76	82.9	70.7
9	0.2	4.0	7~9	5~8	83	77	61.8	36.9
10	0.2	5.0	7~9	5~8	85	80	30.7	10.4
11	0.3	1.0	7~9	5~8	79	73	68.4	28.5
12	0.3	2.0	7~9	5~8	83	77	75.6	30.2
13	0.3	3.0	7~9	5~8	82	75	78.7	32.3
14	0.3	4.0	7~9	5~8	89	83	66.6	26.5

表 1(续)

Table 1(Continued)

编号 No.	IAA 浓度 Concentration of IAA /(mg · L ⁻¹)	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg · L ⁻¹)	出愈时间		诱导率		不定芽诱导率	
			Time of callus induction/d		Rate of callus induction/%		Adventitious bud induction rate/%	
			子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls	子叶 Cotyledons	下胚轴 Hypocotyls
15	0.3	5.0	7~9	5~8	88	82	67.8	37.3
16	0.4	1.0	7~9	5~8	95	90	59.6	21.2
17	0.4	2.0	7~9	5~8	100	95	70.2	31.7
18	0.4	3.0	7~9	5~8	92	86	69.6	29.5
19	0.4	4.0	7~9	5~8	89	83	52.3	12.3
20	0.4	5.0	7~9	5~8	88	81	58.9	18.9
21	0.5	1.0	7~9	5~8	89	80	62.4	22.6
22	0.5	2.0	7~9	5~8	88	80	70.2	30.7
23	0.5	3.0	7~9	5~8	85	78	68.4	28.7
24	0.5	4.0	7~9	5~8	81	75	44.3	6.1
25	0.5	5.0	7~9	5~8	80	74	40.1	7.8

以“五彩珍珠”番茄的子叶和下胚轴为外植体时,愈伤组织发生的时间不同,子叶接种 7 d 时切口附近开始卷曲膨胀,伴随有大量的绿色胚状体产生(图 1);下胚轴接种 5 d 时两端切口处开始肿胀形成肉眼可见的愈伤组织(图 2)。



图 1 子叶形成的愈伤组织

Fig. 1 Callus formed by cotyledons

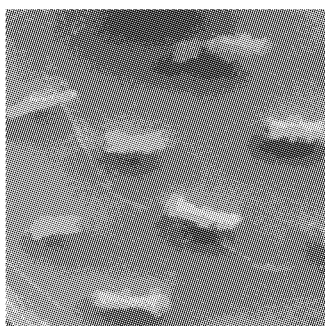


图 2 下胚轴开始形成愈伤组织

Fig. 2 Callus formed by hypocotyls

2.2 不同激素浓度对番茄不定芽诱导的影响

由表 1 还可知,当 IAA 的浓度为 0.2 mg · L⁻¹、6-BA 的浓度为 1.0~3.0 mg · L⁻¹ 时,由子叶和下胚轴的愈伤组织产生的不定芽诱导率较高,可以达到 70% 以上。但随着 IAA 与 6-BA 浓度的升高,畸形

芽的比例升高。因此,“五彩珍珠”番茄愈伤组织分化形成不定芽的适宜培养基为 MS+0.2 mg · L⁻¹ IAA+(1.0~3.0)mg · L⁻¹ 6-BA,在此培养基中不定芽生长健壮、数目较多。在最适激素浓度的培养基上诱导出的愈伤组织结构致密,体积大,生长速度快。在原培养基上继续培养,愈伤组织可分化出不定芽(图 3、4),大约 2 周后长成有茎叶的苗(图 5、6)。

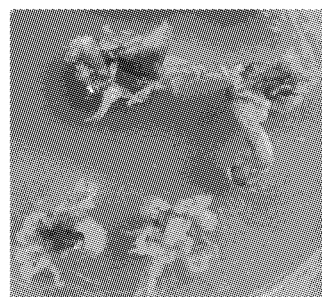


图 3 子叶不定芽的分化

Fig. 3 Differentiation of cotyledon adventitious buds

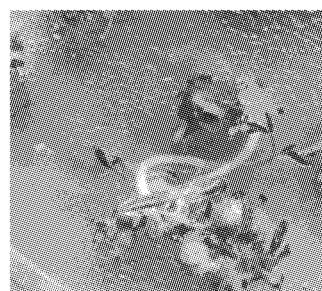


图 4 下胚轴不定芽的分化

Fig. 4 Differentiation of adventitious buds of hypocotyl

2.3 番茄苗龄对愈伤组织诱导的影响

在最佳激素浓度下,对不同苗龄番茄的子叶与下胚轴进行愈伤组织诱导,研究不同苗龄与愈伤组织诱导率之间的关系。由表 2 可知,番茄苗龄在 6 d 和 8 d 时子叶和下胚轴的诱导率最高,但是在 8 d 时



图5 子叶不定芽长成的苗

Fig. 5 Seedlings grew from adventitious buds



图6 下胚轴不定芽长成的苗

Fig. 6 Seedlings grew from hypocotyl adventitious buds

表2 不同苗龄番茄愈伤组织的诱导

Table 2 Induction of tomato callus of different seedling ages

苗龄 Seedling age/d	外植体 Explant	愈伤组织诱导率 Rate of callus induction/%	愈伤组织形态特征 Callus morphological characteristics
1	子叶	0	无
	下胚轴	0	
3	子叶	30	松散的哑铃状
	下胚轴	27	
6	子叶	100	呈淡绿色紧密的瘤状
	下胚轴	95	
8	子叶	100	呈瘤状,褐化
	下胚轴	95	
10	子叶	80	呈瘤状,严重褐化
	下胚轴	76	

愈伤组织出现褐化现象,所以番茄苗龄6 d为最佳。

2.4 不同激素浓度对番茄不定芽生根的影响

选取生长健康、长度2~4 cm的不定芽,将其基部的愈伤组织与培养基完全清除而后转移至培养基中培养。由表3可知,随着IAA浓度的增加,根的数量增加,根系也变得粗壮,但当IAA的浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根的长度变短。综合考虑,不定芽在 $1/2\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA培养基上生根效果好(图7)。

由表4可知,在没有添加激素的 $1/2\text{MS}$ 培养基上也可以产生较少的根,王傲雪等^[13]研究表明,不定芽生长过程中可以产生促进根生长的激素。随着NAA浓度的增加,根的数量先增加后减少,当NAA

浓度为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根数量最多,根系粗长并伴有须根。继续增加NAA浓度时,根长度变短、数量变少。综合考虑,不定芽在 $1/2\text{MS} + 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA培养基上生根效果好(图8)。

表3 不同浓度IAA对番茄不定芽生根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of IAA on adventitious shoot initiation of tomato rooting

编号 No.	IAA浓度 Concentration of IAA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根时间 Root of time/d	20 d后根的长势 Growth of root after 20 days
1	0.1	7	生根数较少且长
2	0.2	8	生根数较多且长
3	0.3	8	生根数较多粗而长
4	0.4	9	生根数较多粗而长
5	0.5	9	生根数较多粗但短

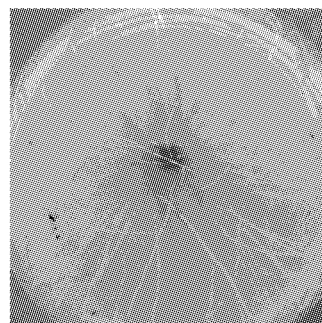


图7 $1/2\text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA培养基番茄生根效果

Fig. 7 Effect of tomato rooting in $1/2 \text{MS} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA medium

表4 不同浓度NAA对番茄不定芽生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of NAA on adventitious shoot initiation of tomato rooting

编号 No.	NAA浓度 Concentration of NAA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根时间 Root of time /d	20 d后根的长势 Growth of root after 20 days
1	0.00	6	生根数较少且长
2	0.05	7	生根数较多且长伴有须根
3	0.10	7	生根数较多粗且长伴有须根
4	0.30	8	生根数较多粗但短
5	0.50	9	生根数少

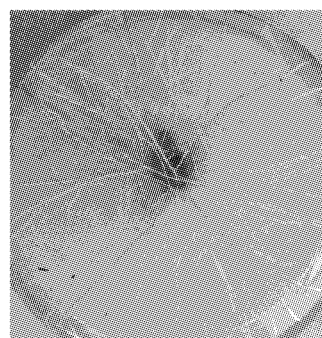


图8 $1/2\text{MS} + 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA培养基番茄生根效果

Fig. 8 Effect of tomato rooting in $1/2 \text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA medium

3 结论与讨论

该试验成功建立了“五彩珍珠”番茄的体外再生体系,为对其它品种体外繁殖系统的建立提供了有力的支持,也降低了番茄品种栽种的成本,同时为番茄的转基因研究提供了帮助。

外植体不同,愈伤组织的诱导及不定芽分化的能力不同。该试验中,以子叶为外植体诱导出不定芽的效率明显高于下胚轴,分化出的不定芽生长速度快,分化系数高,畸形芽率也比较低。因此,子叶为“五彩珍珠”番茄组织培养的最佳外植体。

IAA 与 6-BA 是植物愈伤组织和不定芽形成的常用激素^[15-16]。该试验结果表明,诱导“五彩珍珠”番茄愈伤组织最佳培养基为 MS+0.4 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA,其子叶的诱导率为 100%,下胚轴的诱导率为 95%。在此培养基上诱导出的愈伤组织体积大,生长速度快且结构致密。在 MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+(1.0~3.0)mg·L⁻¹ 6-BA 培养基上不定芽的诱导效果最好,为不定芽分化的最佳培养基。诱导生根的最佳培养基为 1/2MS+0.10 mg·L⁻¹ NAA。

参考文献

[1] ABU-EL-HEBA G A, HUSSEIN G M, ABDALLA N A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system[J]. Agriculture and Forestry Research, 2008, 58(1/2): 103-110.
[2] 许飞云, 张赵男, 侯雨辰, 等. ‘黑珍珠’番茄植株再生体系的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 144-149.

[3] 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.
[4] 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.
[5] 谢雯琦, 苏慧慧, 黎振兴, 等. 番茄‘黄樱桃-2 号’再生体系研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 129-134.
[6] 植爽, 吴钰祥, 王玉杰, 等. 番茄高频再生体系的建立[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(23): 5880-5883.
[7] 李倩, 王滨, 李培环, 等. 番茄子叶和下胚轴立体再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2015(1): 106-110.
[8] 乔亚红, 郑银英, 李诗林, 等. 红番 3 号加工番茄遗传转化再生体系的建立[J]. 核农学报, 2013, 27(11): 1636-1643.
[9] 李文枫, 李景富, 许向阳, 等. 耐贮藏型番茄子叶再生体系建立及优化[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(2): 24-28.
[10] IBRAHIM I O, MEMET V K, OZGEN E. 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.
[11] 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): 6486-6487.
[12] 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.
[13] 王傲雪, 赵越, 陈秀玲, 等. 不同激素组合对番茄芽分化率的影响[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 85-90.
[14] 赵新涛, 宿烽, 都彦伶. 圣女樱桃番茄再生体系的研究[J]. 山东农业科学, 2015, 47(3): 13-17.
[15] 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.
[16] 范锡麟, 王少岭, 肖应辉, 等. 番茄突变体 jail-1 高效筛选: 再生体系的建立[J]. 作物研究, 2013, 27(3): 224-228.

Effects of Different Hormones on Regeneration System of ‘Colorful pearl’ Tomato

SUN Xiangke, LI Yuanyuan, LIU Xue, LI Rongye, SU Feng

(School of Chemical Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao, Shandong 266042)

Abstract: ‘Colorful pearl’ tomato was used as the test material, cotyledon and hypocotyledonary axis of 6 day-old sterile seedlings were used as explants to study the effect of different hormone concentration and hormone ratio on induction of tomato callus, differentiation of adventitious buds and rooting induction in order to establish regeneration system for tomato. The results showed that the optimum culture medium for induction of tomato callus was MS+0.4 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA, in which the induction rate of cotyledon and hypocotyledonary axis was 100% and 95%, respectively. The optimum culture medium for differentiation of adventitious buds was MS+0.2 mg·L⁻¹ IAA+(1.0~3.0)mg·L⁻¹ 6-BA; the optimum culture medium for rooting induction was 1/2MS+0.10 mg·L⁻¹ NAA. It concluded that cotyledon was the optimal explant. Its adventitious bud differentiation and growth rates were better than those of hypocotyledonary axis.

Keywords: *Solanum lycopersicum* ‘Colorful pearl’; cotyledon; hypocotyledonary axis; regeneration system