

番茄真叶愈伤组织诱导及植株再生研究

蒋素华¹, 顾东亚¹, 崔波^{1,2}, 马杰², 叶永忠¹

(1. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州师范高等专科学校, 河南 郑州 450044)

摘要: 对番茄外植体诱导愈伤组织、愈伤组织分化和根的诱导条件进行研究。结果表明: 适合外植体形成愈伤组织的培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 适合愈伤分化的培养基为 MS+BA 3.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L; 适合生根的培养基为 1/2MS+IAA 0.1 mg/L。

关键词: 愈伤组织; 植株再生; 番茄

中图分类号: S 641.203.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)10-0113-02

随着现代生物工程技术的发展, 对植物再生体系建立及外源基因在植物细胞中的表达研究的不断深入^[1]。番茄已经成为基因工程研究的重要模式植物, 其遗传转化研究较多。转基因研究的重要前提是建立简便、高效的植株再生体系, 过去曾有关于番茄子叶^[2,3]、茎^[4]、下胚轴^[5]、茎尖分生组织^[6]、花药^[7]等作为外植体进行组织培养获得再生苗的研究报道。作为转基因研究的受体部分, 该试验成功地以真叶建立了稳定、快速和高频的番茄离体植株再生体系, 为进一步研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄品种“正粉一号”, 购自河南省农业科学院。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄无菌苗的培养 将种子于温水中浸泡 1 h, 然后在无菌操作台上用 75% 的酒精表面消毒 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次。然后播于盛有湿润脱脂棉的三角瓶中, 放入隔水式恒温培养箱中 25℃ 暗培养。

1.2.2 外植体诱导愈伤 在超净工作台上, 取番茄的第 3~4 片真叶为试材, 切成约 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶片块(即叶盘), 将叶背面平放于表 1 培养基中。观察外植体诱导愈伤的情况, 筛选出适宜的外植体诱导愈伤的培养基。

1.2.3 不同浓度的激素组合对愈伤组织分化的影响 在超净工作台上, 将诱导出来的愈伤组织切成块状体, 除去表面的褐色部分和疏松的愈伤组织, 接种于表 2 培

养基中, 筛选出适合愈伤分化的激素组合。

1.2.4 不定根诱导 将 3~4 cm 的不定芽分成单个植株, 接种于表 3 的培养基中, 观察不定根生长情况。

1.3 培养条件

外植体诱导愈伤、愈伤分化的基本培养基为 MS, 根诱导的基本培养基为 1/2MS, 所有培养基均附加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L, pH 5.8~5.9, 120℃ 灭菌 30 min, 所有的培养温度均为 (24±2)℃, 光照 2 500~3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 外植体愈伤的诱导

不同浓度 BA 和 NAA 组合对番茄外植体愈伤诱导的影响见表 1。BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合外植体的愈伤诱导率最高, 为 85% 并且出愈量多, 愈伤呈青绿色、紧实 但是无芽或很少有芽的分化(图 1)。大部分愈伤组织需转移至分化培养基进一步分化培养。从表 1 还可以看出, NAA 的浓度越高, 越有利于愈伤的形成。

表 1 不同激素配比对外植体愈伤组织形成的影响

BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	外植体数量	愈伤发生率/%	出愈量
1.0	0.01	32	68	+
1.0	0.05	30	74	++
1.0	0.1	32	85	+++
2.0	0.01	32	70	+
2.0	0.05	28	76	+
2.0	0.1	30	80	++

注: +++ 表示出愈量最多。

2.2 番茄愈伤不定芽的诱导

愈伤组织置分化培养基上培养, 最初为深绿色小点, 之后慢慢形成不定芽(图 2), 20 d 左右表现出不同程度的分化。除 BA+KT 0.5 mg/L 外, 其余激素组合完全可以满足愈伤分化的需求, 但各个激素组合间, 每块愈伤平均出芽率差别较大(见表 2)。总体来说, IAA 和 NAA 的愈伤出芽效果要好于 KT, 在所有的激素组合中以 BA 3.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的分化效率最高。表 2 结果还表明, BA 的浓度越高越有利于不定芽的分化,

第一作者简介: 蒋素华(1983-), 女, 河南郾城区人, 硕士, 现主要从事植物生物技术研究。E-mail: jiangsuhua2006@163.com。

通讯作者: 叶永忠(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 现从事植物资源与生物多样性方面研究工作。

基金项目: 郑州市科技攻关资助项目(083STRF40346-2)。

收稿日期: 2009-05-20

在培养基中添加 IAA 也可以明显提高愈伤组织的分化。

表 2 不同培养基对愈伤组织诱导不定芽的影响

培养基/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					试验结果		
BA	IAA	NAA	KT		愈伤分 化芽数	愈伤平均 出芽率/块	愈伤分化芽 生长情况
1.0	-	0.1	-		46	1.92	愈伤分化芽较多 叶大而绿, 茎无明显伸长
2.0	-	-	-		62	2.60	愈伤分化芽较多 叶小而绿 茎伸长 2~3 cm
2.0	0.3	-	-		29	1.20	愈伤分化芽少, 叶大而绿 茎伸长 3~4 cm
2.0	-	-	0.5		0	0.00	愈伤无芽的分化
2.0	-	0.2	-		52	2.17	愈伤分化芽较多 叶小而黄绿 茎无伸长,
3.0	-	0.1	-		33	1.40	愈伤分化芽较少 叶大而黄绿 茎无伸长
3.0	0.2	-	-		72	3.00	愈伤分化芽多, 叶大而绿 茎伸长 3~4 cm

注:表中数据为接种 24 个愈伤组织培养 20d 后的统计结果

不定芽转入生根培养基中, 经过 10 d 左右的时间, 已有 2 cm 左右的呈辐射状的不定根(图 3), 从不定根在生根培养基上的生根情况看(表 3), 3 种培养基上形成的不定根的数量及速度大致相同, 但是在 IAA 的浓度为 0.1 mg/L 时生根情况最好, 根粗白。但是在根茎交界处形成愈伤组织对移栽成活会造成困难。

表 3 IAA 浓度对番茄生根的影响

IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根数/棵	根生长状态
0	3~4	根较粗, 呈辐射状, 侧根较少
0.1	3~5	根粗, 呈辐射状, 侧根少
0.2	4~5	根细, 呈辐射状, 根上有很多浅红褐色绒毛

2.3 不定芽的生根培养

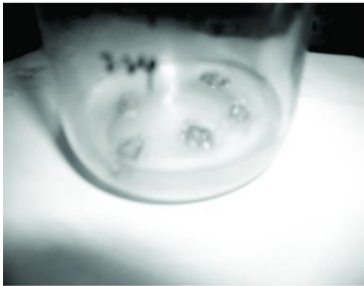


图 1 外植体诱导的愈伤组织



图 2 愈伤组织不定芽的诱导



图 3 不定根的诱导

3 讨论

该试验曾尝试用较大真叶做外植体水平放在愈伤诱导培养基中, 几天后真叶膨大变形呈弓形, 将真叶的中间部分高高翘起, 无法接触到培养基。因而外植体形成愈伤少且长势缓慢。

该试验比较了 10 余种培养基的效果, 根据已有的培养结果分析, 细胞分裂素用量在 0.1~0.3 之间都能利于愈伤组织和不定芽的形成。但是用真叶作为外植体时, 大多只能形成愈伤组织, 且愈伤组织的质量较差, 即使转移到分化培养基上分花苗的效率也不是很高。愈伤组织容易变褐, 使愈伤组织过早的死亡, 这可能是酚类物质氧化所引起的, 这与孟祥栋的报道是一致的。在培养基中添加 KT 时, 诱导效果很差, 但是 IAA 的诱导效果要优于 NAA, 这与卫志明^[4]在以番茄叶片作为外植体的试验中观察到 IAA 的效果优于 NAA 是一致的。该试验建立的番茄组织培养体系, 为下一步的植物遗传转

化研究奠定了基础。

参考文献

[1] 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.
[2] 叶志彪, 李汉露, 周国林. 番茄子叶离体培养与再生植株[J]. 华中农业大学学报, 1991, 13(3): 291-295.
[3] 许煌泉, 史益敏, 尹协芬. 番茄离体子叶培养的形态发生及过氧化物酶的动态[J]. 上海农学院学报, 1992, 10(2): 121-126.
[4] 卫志明, 许智宏. 番茄叶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.
[5] 乐锦华, Read P E, 杨国臣. BA 和激素对试管苗番茄愈伤组织形态发生的影响[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 44-48.
[6] Kartha K K, Cham poux S, Gamborg O L, et al. In vitro propagation of tomato by shoot apical meristem culture[J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1977, 102(3): 346-349.
[7] Gulshan T, Varghese M, Sharma P R. Studies on anther culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) [J]. Biologia Plantarum (PRAHA), 1981, 23(6): 414-420.

Callus Formation and Plantlet Regeneration from Leaf of Tomato

JIANG Su-hua¹, GU Ya-dong¹, CUI Bo^{1,2}, MA Jie², YE Yong-zhong¹

(1. College of Life Sciences Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Zhengzhou Teacher Training College, Zhengzhou, Henan 450044, China)

Abstract: In this paper the rapid propagation of tomato was studied. Because leaf was very difficult to forming shoots, this experiment consists of explants inducing callus, callus differentiation of shoots and forming roots. The results showed that the optimum medium for callus culture was MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The optimum medium for callus differentiation was MS+BA 3.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L. The rooting medium was MS+IAA 0.1 mg/L+AC 2 g/L.

Key words: Callus; Plant regeneration; Tomato