

# 番茄植株再生体系的建立

赵 燕, 刘清波, 杜元正, 任春梅

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 选用杂交番茄早丰(07-13)为材料, 以下胚轴、子叶作为外植体, 根据控制单一变量与多重比较的原则, 设计添加不同种类和不同浓度的植物生长物质的培养基配方, 建立了一套简便有效地番茄再生体系。结果表明: 愈伤组织的诱导及增殖, 以配方 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L 为佳; 诱导不定芽的分化, 以培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 为佳; 生根培养基以 MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.1 mg/L 为佳, 生根率高且根粗壮。

**关键词:** 番茄; 植株再生体系; 植物生长物质

**中图分类号:** S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)23—0129—04

番茄是一种重要的世界性蔬菜, 具有很高的经济价值, 有关番茄组培的研究, 国内外已有较多的报道<sup>[1-3]</sup>。在番茄杂种优势固定、优良品种快速繁殖、突变体保存利用及转基因等生物技术领域的研究中, 番茄的组织培养发挥了重要作用, 建立高效的组织培养体系是进行相关研究的基础<sup>[3,4]</sup>。该试验选用杂交番茄早丰(07-13)为材料, 以子叶、下胚轴作为外植体, 在不同组织培养阶段添加不同种类和不同浓度的植物生长调节剂以优化培

养基配方, 建立简单有效的再生体系, 以期能用于番茄的遗传转化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试番茄材料为杂交番茄早丰(07-13), 由湖南农业大学生物科学技术学院任春梅教授提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基 以 MS 为基本培养基, 在愈伤诱导阶段, 设置 NAA、IAA、6-BA 等 3 种植物生长物质的不同浓度梯度组合, 进行愈伤的诱导和增殖。在分化阶段设置 6-BA、IAA、NAA、KT 和 2, 4-D 等 5 种植物生长调节物质的不同浓度梯度组合, 诱导分化。在生根阶段设置 IAA 或 NAA 的不同浓度梯度组合, 诱导生根。

1.2.2 无菌苗的获得和外植体的接种 将番茄种子用 70%酒精消毒 1 min, 无菌水清洗, 再用 10% NaClO 浸泡 20 min, 用无菌水冲洗 4~5 次。接种于 M1(MS+蔗

第一作者简介: 赵燕(1964), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为植物基因工程。E-mail: zhaoyan0585@163.com。  
通讯作者: 任春梅(1962), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物基因工程及信号传导。E-mail: rencm66@163.com。  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770195)。  
收稿日期: 2010-09-06

## Study on Tissue Culture of *Lonicera japonica* Thunb. ‘Jinfeng-1’

CHEN Ming-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1,2</sup>, GONG Yu-jia<sup>1</sup>, LIU Wen-ying<sup>1</sup>, ZHAO Xi-ting<sup>1,2</sup>, LI Ming-jun<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007; 2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, Henan University, Xinxiang, Henan 453007)

**Abstract:** We studied the *in vitro* culture systematically on *Lonicera japonica* of this eximious varietal ‘Jinfeng-1’ for the first time. The results showed that dip the apical buds with two leaves from farmland in the ethanol of 75% for 30 s at first, then in the HgCl<sub>2</sub> of 0.1% for 15 minutes, and inoculated on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L after washed in the germfree water for 5~6. According to these steps, we could get plantlets and the yield of vaccine was up to 78.90%; The best medium for rapid propagation of *Lonicera japonica* Thunb. was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+biotin-D 2 mg/L with agar in can bottle of 500 mL, and the propagation coefficient could reach 7.37 by 28 days. The best rooting medium was 1/2MS+IBA 3 mg/L, and the rooting rate could reach to 100%.

**Key words:** *Lonicera japonica* Thunb.; tissue culture; rapid propagation

糖 30 g/L), pH 5.8 培养基中, 置于 (23~25℃) 暗培养 2 d, 再置相同温度光照培养箱培养, 使其发芽, 并获得无菌苗。取番茄的子叶和下胚轴为外植体, 子叶切割成 1 cm×1 cm 切块, 下胚轴切割成 0.5~0.8 cm 切段, 接种于不同的培养基中, 诱导愈伤; 将生长良好的愈伤组织转移至不同的分化培养基诱导不定芽分化, 再将分化生长的无根苗接种在不同生根培养基中, 记录并统计出愈数、芽分化数、生根率及平均生根个数。

1.2.3 培养条件 培养温度为 (25±2)℃, 每日光照 10~12 h, 光照强度为 1 500~2 000 lx, 每个处理接种 6 瓶, 每瓶接种 4~6 块外植体。

1.3 数据分析

观察测量相应的出愈数、分化苗数、生根数, 并对有关数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

根据控制单一变量与多重比较的原则, 将植物生长物质种类及浓度作为单一变量, 建立植物生长调节物质

不同浓度梯度组合的诱导愈伤的培养基。

从表 1 可知, 上述培养基均能诱导外植体(子叶或下胚轴)形成愈伤。以子叶作为外植体诱导愈伤, 3~5 d 后子叶明显增大, 叶片增厚, 为原来的 2~3 倍左右, 同时发生卷曲, 叶脉处颜色变淡。第 8 天, 8 号培养基首先形成愈伤, 愈伤组织为乳白色(图 1), 其上布有许多淡绿或绿色突起, 结构致密, 生长速度快, 分生能力强, 此种愈伤组织为 I 型愈伤组织, 是番茄遗传转化的首选材料。第 9~10 天, 在 3 号、4 号和 9 号培养基上陆续有愈伤形成, 其色泽仍为乳白色, 其上绿色突起较少, 颜色浅淡呈霜状, 是易散的水渍状小颗粒, 其生长速度慢, 分生能力较差, 从形态结构和质地的疏密判断为 II 型愈伤组织, 1 号、5 号、6 号和 10 号培养基出愈较晚, 直到 2 周之后才有愈伤组织形成, 其色泽呈白色、灰白色或灰褐色, 松软湿润、生长速度较快, 体积较大, 属于 II 型愈伤组织。II 型愈伤由于其没有胚性细胞, 继代后极易褐化死亡。因此, 进行番茄遗传转化时所需要的愈伤组织是 I 型和 II 型, 其中又以 I 型为最佳。



图 1 子叶诱导的愈伤

图 2、3 下胚轴诱导的愈伤

表 1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

编号	基本培养基	6-BA	NAA	IAA	接种外植体块数 (子叶/下胚轴)	诱导愈伤 组织总块数	总诱导率 / %	愈伤组织	出愈时间 / d
		/ mg · L <sup>-1</sup>	/ mg · L <sup>-1</sup>	/ mg · L <sup>-1</sup>				颜色	
1	MS	2.0	0.5	0	30/ 30	58	96.7	灰白色	14
2	MS	2.0	0.4	0	30/ 28	56	96.5	白色	11
3	MS	2.0	0.3	0	30/ 30	60	100	乳白色, 有一些绿色突起	9
4	MS	2.0	0.2	0	30/ 28	56	96.6	乳白色, 有少量绿色突起	10
5	MS	2.0	0.1	0	28/ 28	54	96.4	乳白色	13
6	MS	2.0	0	0.5	29/ 29	58	100	灰白色	13
7	MS	2.0	0	0.4	30/ 30	58	96.7	乳白色	11
8	MS	2.0	0	0.3	30/ 30	60	100	乳白色, 有许多绿色突起	8
9	MS	2.0	0	0.2	30/ 28	56	96.6	乳白色, 有一些绿色突起	10
10	MS	2.0	0	0.1	30/ 30	56	93.3	灰白色	14

若以下胚轴作为外植体, 2 d 左右, 下胚轴变粗、变长, 切面变钝(图 2), 培养 8 d 左右, 下胚轴的两端, 叶片边缘出现深绿色针尖状小点, 以后在小点部位长出绿色芽点。其形成的愈伤组织的情况与子叶相似, 只是时间略有后移。表 2、3 为 3、4、8、9 号培养基子叶和下胚轴作为外植体诱导愈伤的情况统计。

表 2 子叶作为外植体诱导愈伤组织情况

编号	接种子 叶个数	形成愈 伤个数	诱导率 / %	出愈时间 / d
3	30	30	100	9
4	30	28	93.3	10
8	30	30	100	8
9	30	30	100	10

表 3 下胚轴作为外植体诱导愈伤组织情况

编号	接种下胚轴个数	形成愈伤个数	诱导率/ %	出愈时间/ d
3	30	30	100	11
4	28	28	100	11
8	30	30	100	9
9	28	26	92. 9	11

由表 3 可知, 子叶和下胚轴作为外植体诱导愈伤的频率都很高, 只是后者的出愈时间较前者为晚。这表明, 子叶和下胚轴都是诱导愈伤的良好材料, 所生成的愈伤组织的特点与外植体本身关系不大, 主要是受到其接种的培养基配方和培养条件的影响。试验中, 因培养条件相同, 故培养基中植物生长物质种类及浓度差异成为愈伤组织诱导情况的限制因素, 有利于比较分析。

2.2 不定芽的分化

将愈伤组织转移到分化培养基上, 让其绿色的胚性细胞继续增长, 10 d 左右其上布满了许多小突点, 15 d 后小突点变成小芽群(图 4), 分化 20 d 后, 统计愈伤组织

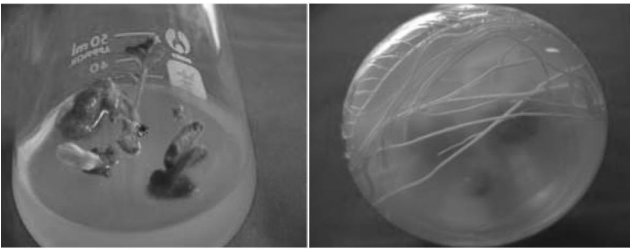


图 4 不定芽的分化                      图 5 不定根的分化

表面丛生芽的数量, 并进行记录, 结果如表 4 所示。

对平均芽数应用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 结果表明,  $F_1(1, 15, 0.05) = 4.543$ ,  $F_2(1, 15, 0.01) = 8.683$ , 该试验  $F = 241.174$ ,  $F > F_1$ ,  $F > F_2$ 。由此可见, 由于培养基的不同造成的分生芽的数量差异极显著。这说明植物生长物质种类和浓度的不同对不定芽分化的影响有统计学意义, 是影响不定芽分化的一个关键因素。

表 4 不同培养基对番茄外植体不定芽分化的影响

编号	基本培养基	6-BA / mg · L <sup>-1</sup>	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	IAA / mg · L <sup>-1</sup>	KT / mg · L <sup>-1</sup>	2,4-D / mg · L <sup>-1</sup>	接种愈 伤块数	出芽愈 伤块数	出芽率 / %	平均芽数株 / 块
1	MS	2.0	0.05	0	0	0	24	9	37.5	2.2
2	MS	2.0	0.1	0	0	0	24	10	41.7	2.5
3	MS	2.0	0.3	0	0	0	22	8	36.4	2.1
4	MS	2.0	0.5	0	0	0	23	3	13.0	1.3
5	MS	2.0	0	0.05	0	0	24	9	37.5	2.4
6	MS	2.0	0	0.1	0	0	23	11	47.8	3.2
7	MS	2.0	0	0.3	0	0	24	7	29.2	2.3
8	MS	2.0	0	0.5	0	0	21	3	14.3	1.7
9	MS	2.0	0	0	0.05	0	22	8	36.4	2.0
10	MS	2.0	0	0	0.1	0	22	9	40.9	2.3
11	MS	2.0	0	0	0.3	0	21	6	28.6	2.7
12	MS	2.0	0	0	0.5	0	23	4	17.4	1.5
13	MS	2.0	0	0	0	0.05	22	7	31.8	2.6
14	MS	2.0	0	0	0	0.1	21	8	38.1	2.4
15	MS	2.0	0	0	0	0.3	23	4	17.4	2.2
16	MS	2.0	0	0	0	0.5	20	3	15.0	1.0

由出芽率和平均每块愈伤的出芽数等因素综合考虑, 配方 6 即 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L 为最佳。配方 2, 即 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L 次之。在表 4 中还可以发现当采用相同植物生长物质不同浓度的组合时, 各组的出芽率均以第 2 组浓度搭配, 即 6-BA 2.0 mg/L+xx 0.1 mg/L 的配比为最高(xx 代表 IAA、NAA、KT、2,4-D 中的某一激素), 而平均出芽数也基本符合这一规律。只是在 KT 和 2,4-D 的组合中分别以配方 11, 即 MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L 和配方 13, 即 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L 的平均出芽数为最高。

另外, 从表 4 中 4、8、12、16 这 4 组配方的培养基分发芽的情况看, 出芽率都很低, 且平均出芽数也很少。实际上, 这几组培养基上愈伤组织的生长状况良好, 生

长速度也快, 尤其是配方 8, 即 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L, 愈伤组织的体积最大, 但少有芽的形成, 其愈伤组织随培养时间延长逐渐向 II 型愈伤组织转化, 失去分化能力, 这也说明, 愈伤组织的质地和色泽是影响不定芽分化的重要因素。

2.3 幼苗的生根

将分化生长的无根幼苗分别接种在 4 种生根培养基中, 观察测量其生根率及平均生根数。由表 5 可知 4 种培养基都可诱导生根, 只是生根时间和数量有差异。配方 4 即 MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.1 mg/L 作为生根培养基为较佳选择, 生根率高且根粗壮, 同时平均生根个数也要高。当将幼苗接种于此培养基中时, 第 6 天便有根的出现(图 5), 再过 3~4 d 根的数量增多, 根系增长且粗壮。配方 1, 即 MS+NAA 0.05 mg/L+IAA 0.05 mg/L 的诱导生根效率低, 可能是浓度偏低, 作用效

表 5 不同培养基对番茄外植体幼苗生根的影响

编号	基本培养基	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	IAA / mg · L <sup>-1</sup>	接种幼苗个数	生根幼苗个数	生根率 / %	平均生根个数 / 根 · 株 <sup>-1</sup>
1	MS	0.05	0.05	12	3	25	6.8
2	MS	0.05	0.10	10	4	40	8.8
3	MS	0.10	0.05	10	6	60	8.8
4	MS	0.10	0.10	11	7	63.6	10.4

注 生根培养 12 d 后统计。

果不明显,影响激素的效果,从而降低了对生根的促进作用。

3 讨论

建立一个合适的高频再生系统,不仅为快速无性繁殖试管苗,保存名优品种提供可靠的途径,还是实现植物转基因操作的先决条件之一,直接关系到基因转化的成功与否<sup>[3]</sup>。因此,植物高频再生系统建立的研究一直被十分重视。

李铁松等<sup>[9]</sup>报道,番茄外植体再生能力从强到弱顺序为下胚轴、子叶、茎段和叶片。外植体再生不定芽的诱导能力与外植体组织内部,特别是不定芽再生部位的生长调节剂的平衡有关。B5 培养基优于 MS 培养基。而在番茄的遗传转化方面利用子叶和下胚轴进行离体培养相关报道最多。赵歌<sup>[7]</sup>认为对于番茄离体组培芽的分化率来说,子叶高于胚轴,且以 2/3 子叶片处切取子叶所获得的外植体,用于子叶不定芽分化的起始材料最好;利用番茄种子的胚体直接进行组培,再从胚体上切取子叶作为外植体进一步培养可有效缩短组织培养周期,这与该研究结果相符。在植物组织培养中,外源激素的使用是必不可少的,已有的许多的研究证明,IAA 和 6-BA 结合使用会提高番茄外植体的再生频率,但由

于所选材料用品种不同,其用量也有很大差别。陈火英等<sup>[8]</sup>认为,MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mL 的培养基对番茄子叶和下胚轴愈伤组织芽的诱导有较好的效果。李峰等<sup>[9]</sup>表明,对番茄材料 06P28,以子叶作为外植体时,适宜的分化培养基应为 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L。均与该试验所选用的植物生长物质组合和浓度相似。但与姜云斌等<sup>[10]</sup>试验所使用的激素种类和浓度有一定差异。通过该试验研究可看出,对于不同材料品种,只要达到细胞分裂素—生长素平衡,且在适宜的培养条件下进行培养均能使其正常分化成苗,建立优化的再生体系,为进一步进行番茄的遗传转化研究提供基础。

参考文献

[ 1 ] 刘清波,赵燕,蔡能.珍珠番茄快速繁殖技术[ J ].湖南农业大学学报 2003, 29(2): 124-126.  
[ 2 ] 吴志刚,宋明,王志敏,等.番茄组织培养中无菌苗培养条件的优化[ J ].中国农学通报 2006 22(4): 335-337.  
[ 3 ] 刘晓荣,陶承光,吕书文,等.番茄花药培养愈伤组织诱导及植株再生的研究[ J ].沈阳农业大学学报. 2008, 39(4): 476-478.  
[ 4 ] 罗素兰,田嘉瑶,长孙东亭.番茄高效再生体系的建立[ J ].海南大学学报 2002 20(4): 314-315.  
[ 5 ] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[ M ].北京:科学技术出版社,1998.  
[ 6 ] 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.  
[ 7 ] 赵歌,王谨,储荣华,等.番茄子叶不定芽分化的初探[ J ].北方园艺 2010(4): 150-153.  
[ 8 ] 陈火英,张建华,俞俊棠,等.番茄离体培养的形态发生[ J ].华东理工大学学报, 2001, 27(2): 139-142.  
[ 9 ] 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.  
[ 10 ] 姜云斌,郭红莲,陈嘉,等.番茄愈伤组织诱导与细胞悬浮培养方法的改良[ J ].安徽农业科学, 2008, 36(8): 3134-3135.

Primary Establishment of Plant Regeneration System of Tomato

ZHAO Yan, LIU Qing-bo, DU Yuan-zheng, REN Chun-mei

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128)

**Abstract:** A protocol of regeneration *in vitro* of tomato Zaofeng(07-13) was developed by using hypocotyl and cotyledon from sterile seedles as explants. The effects of different kinds and different concentration of plant growth substances on the regeneration of tomato were studied. The results showed that the stage of induce the callus, the suitable medium was MS with 2.0 mg/L 6-BA and 0.3 mg/L IAA; The suitable differentiation medium was MS with 2.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L IAA; The suitable rooting mudium was MS with NAA 0.1 mg/L and IAA 0.1 mg/L, which was with high rooting rate and thickly and strong rots.

**Key words:** tomato; plant regeneration system; plant-growth substances