

番茄叶片离体再生的影响因素及其评价

韩 笑, 栾雨时

(大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘 要: 番茄高效、稳定再生体系的建立是进行番茄细胞工程和基因工程研究的基础。现对影响番茄叶片离体再生的主要因素进行分析, 得出激素是影响番茄叶片再生的首要因素, 多数以 BA 0.5 ~ 2.0 mg/L + IAA 0.05 ~ 1.0 mg/L 组合为最佳; 外植体基因型及叶片成熟度、培养条件等也对再生有较大的影响, 一般选择 8 ~ 20 d 无菌苗或 18 ~ 20 d 实生苗叶片, 在 20 ~ 28 °C、14 ~ 16 h/d 光照条件下培养再生率较高。此外, 提出了该领域研究中存在的问题及发展趋势。

关键词: 番茄; 叶片; 离体再生; 组织培养

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0105-03

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 作为一种重要的果菜, 深受人们喜爱。长期以来研究人员通过有性杂交、远缘杂交等技术手段培育出了众多各具特色的品种, 丰富了市场, 也增加了生产者的收入。近年来, 随着基因工程技术的发展, 抗病^[1]、抗逆^[2]、耐储运^[3]、富含花青素^[4] 乃至具有疫苗作用^[5] 的番茄先后被研制出来, 有些已经在生产上推广应用, 呈现出诱人的发展前景。最近, 袁隆平等^[6] 10 位院士提议大力发展转基因技术^[6], 受到广泛关注。

据张启发^[7] 院士的报道, 外源基因导入植物的主要方法有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法。其中农杆菌介导的叶盘转化法在番茄转化上被广泛使用, 它简单、快速、多为单拷贝插入, 遗传稳定性好^[8]。但必须事先建立叶片的高频再生系统^[9]。

以往的研究发现, 番茄叶片外植体在离体再生过程中, 明显受到多种因素的影响。其中, 不同基因型的再生能力差异较大^[10]; 不同激素配比对番茄外植体分化再生有重大影响^[11]; 培养条件、叶片成熟度等也是影响叶片再生的因素。该研究整理了近年来番茄叶片离体培养再生的研究成果, 分析评价了主要的影响因素, 旨在为基因工程育种提供技术参考。

1 外植体

1.1 品种基因型

陆云华等^[12] 对不同品种番茄叶片再生条件所做

的研究中发现, 在相同培养条件下樱桃红、五彩、上海 903、中杂 9 号 4 个品种的愈伤组织形成率及不定芽诱导率有明显差异; 王丹等^[13] 研究表明, BD、T4、MFg、Polish 等品种番茄在再生能力、再生速度以及再生芽形态等方面存在一定的差异; 罗素兰^[14] 等的试验发现, T79 的分化率明显高于 T151, 且分化速度快。大量研究证明, 基因型是影响番茄组培再生的重要因素, 在相同培养基上不同番茄品种的分化率各异^[11, 13, 15]。所以, 适用于某一品种叶片再生的条件不一定适用于其它品种, 这说明品种基因型对番茄再生有较大影响。综上所述, 番茄基因型与叶片外植体再生关系很大。总体而言, 番茄叶片再生较容易, 至今尚未见到不能再生的基因型。但不同品种番茄再生时仍应摸索寻找最适合该品种的再生条件, 以得到较高再生率。

1.2 叶片成熟度、尺寸及接种方式

研究表明, 外植体成熟程度会影响再生率, 幼嫩组织一般较敏感。王金杰等^[16] 报导, 随着苗龄增加分化率呈现先上升后下降的趋势。还有报告指出, 在一定时间内, 随着外植体成熟度的增加番茄再生能力增强^[17]。由表 1 可知, 番茄叶片再生多选用 8 ~ 20 d 无菌苗的叶片或者实生苗 18 ~ 20 d 的叶片, 再生率较高。

此外, 外植体尺寸与再生存在密切的关系^[17], 每 0.5 cm² 的叶片最为理想^[18]。有研究指出, 就切段和子叶的平均出芽数而言, 子叶横切 2 次较好, 既可获得较多的再生芽, 又便于操作, 减少工作量^[19]。叶片接种方式对再生情况也有较大影响^[17], 水平放置出芽率及生根率要明显高于竖直放置。因此, 叶片成熟程度、尺寸大小及接种方式都是影响再生的因素。试验时应根据实际情况选择较为有利的条件。

第一作者简介: 韩笑(1989-), 女, 在读本科, 现从事番茄基因工程育种研究工作。E-mail: wzzl.ckr.xx@qq.com.
责任作者: 栾雨时(1962-), 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 现主要从事植物生物技术研究工作。E-mail: luanyush@dlut.edu.cn.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972001); 大连理工大学大学生创新实验计划资助项目。
收稿日期: 2011-04-11

表 1		番茄叶片再生的主要影响因素				
外植体	品种	叶龄及状态	激素种类及浓度	光照时间, 温度	再生率/ %	参考文献
子叶	F4 号	12 d 的无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.05	14 h (25±2)℃	92.5	[11]
	特选 28	1 片真叶	BA 2.0+ IAA 0.5	16 h, 26℃	86.8	[8]
	太原 823	1 片新叶	BA 2.0+ IAA 0.5	16 h, 26℃	88.9	
	-	10 d 的无菌苗	ZT 2.0+ IAA 0.5	16 h	66.5	[9]
	合作 906	18 d 的实生苗	ZT 2.0+ IAA 0.2	16 h	9.9	[10]
	蕃大茄红	18 d 的实生苗	ZT 2.0+ IAA 0.2	16 h	63.9	
	-	9~15 d 的无菌苗	ZT 1.0+ IAA 1.0	—	95.9	[16]
	合作 908	8~10 d 的无菌苗	BA 0.5+ IBA 0.5	0 h 25~28℃	80	[20]
	合作 908	8~10 d 的无菌苗	BA 1.0+ IBA 0.2	0 h 25~28℃	27	
	毛粉 802	8~10 d 的无菌苗	BA 1.0+ IBA 0.2	0 h 25~28℃	100	[15]
	里格儿 87-5	7~8 d 的无菌苗	BA 2.0+ IAA 1.0	16 h (25±2)℃	89.7	
	TM-Cherry-94-引	10~12 d 的无菌苗	BA 1.0+ IAA 0.2	14 h (25±2)℃	100	[22]
	中蔬四号	7~13 d 的无菌苗	ZT 1.0+ IAA 0.1	—	58.4	[23]
	T 03	7~13 d 的无菌苗	ZT 1.0+ IAA 0.1	—	28.2	[24]
	中蔬四号	6~7 d 的无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.2	16 h (23±1)℃	96.7	
	中蔬四号	6~7 d 的无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.5	16 h (23±1)℃	90	[14]
	T79	无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.1	10~12 h (25±2)℃	67	
	中蔬 5 号	刚出叶的无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.2	10 h (25±2)℃	86.3	[19]
	樱桃番茄	5~7 d 的无菌苗	BA 1.0+ IAA 0.2	16 h (25±1)℃	57.5	[25]
	樱桃番茄	5~7 d 的无菌苗	ZT 2.0+ IAA 0.05	16 h (25±1)℃	80	
真叶	丽春	8~10 d 无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.4	16 h, 28℃	—	[2]
	F4 号番茄	18 d 的无菌苗	BA 2.0+ IAA 0.05	14 h (25±2)℃	76.2	[11]
	樱桃红	30 d 的无菌苗	BA 3.0+ IAA 0.2	—	41.3	[12]
	五彩	30 d 的无菌苗	BA 3.0+ IAA 0.2	—	36.7	
	上海 903	30 d 的无菌苗	BA 3.0+ IAA 0.2	—	33.3	[26]
	樱桃番茄	3~4 叶期的无菌苗	BA 1.0	16 h (25±2)℃	96	
	樱桃番茄	3~4 叶期的无菌苗	BA 1.0+ IAA 0.1	16 h (25±2)℃	100	

2 培养基与其添加物

2.1 基本培养基

叶片离体再生时普遍使用 MS 基本培养基。

2.2 植物激素组成

在植物组织培养及再生的研究中, 外源激素的使用是十分必要的。植物激素对提高外植体再生频率、愈伤组织出芽率及生根率有很大作用。许多研究表明, 诱导番茄叶片再生时, 多采用细胞分裂素和生长素组合。其中以 BA+IAA 组合使用的最为普遍^[12]; 少数研究者认为 ZT+IAA^[9]、BA+IBA^[20] 组合效果显著, BA+NAA 有一定作用^[13]。然而, 在不同浓度的 IAA、IBA、NAA 与 6-BA 2.0 mg/L 组合中, IAA 明显优于另外二者^[15]。BA 2.0 mg/L+IAA 0.02 mg/L 的组合生芽最佳^[11]; BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的组合获得的 不定芽率较高^[8]; BA 0.6 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的组合生根率较高^[20]; BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的组合芽分化率较高^[22]。

由表 1 可知, 中蔬四号番茄在 ZT 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 与 BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 组合时的再生率分别为 58.4%与 96.7%^[23-24]; 合作 908 番茄在 BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L 和 BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 时的再生率分别为 80%和 27%^[20]; 而樱桃番茄在 BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 与 ZT 2.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L 时的再生率分别为 57.5%和 80%^[25], 由此可见, 激素的配对外植体再生影响甚大。

综上所述, 不同品种甚至同一品种培养的不同阶段对不同激素要求各异。寻求最适的激素配比对叶片高频再生至关重要。综合各试验结果认为, 细胞分裂素在 0.5~2.0 mg/L、生长素在 0.05~1.0 mg/L 的组合诱导番茄叶片再生效果最好, 尤以 BA 0.5~2.0 mg/L+IAA 0.05~1.0 mg/L 为最佳。对于不同基因型品种在选择上略有差异。

2.3 培养条件

在完全光照条件下, 培养番茄外植体只能诱导出少量愈伤组织, 且它们累积的淀粉量很低, 有的甚至无法启动其分化, 所以完全光照条件下诱导的愈伤组织分化率很低^[12]。而暗培养时间过长, 虽然能够使愈伤组织大量生长, 但由于大部分糖都用于愈伤组织的增殖, 即使转入光照条件, 也只能使很少的愈伤产生芽原基, 分化率仍很低。可见, 光照时间的选择对番茄外植体的分化也非常重要^[12-13, 21]。在不同基因型的番茄组织培养中对培养条件的要求也略有差异^[14]。番茄再生体系的建立一般多采用 20~28℃; 光、暗周期分别是 14~16 h、10~8 h。

3 问题与展望

番茄叶片再生相对较为容易。迄今为止, 尚未见到有关某品种不能再生的报道, 只是再生频率存在较大的差异。除上述影响因素外, 一些培养基添加物(如无机盐、维生素等)可能也会对外植体再生产生一定的影响, 但在番茄上, 也未见这方面的报道。以后有必要在此方面做些研究工作, 以进一步提高番茄叶片离体

培养的再生频率。

影响番茄叶片离体再生的多种因素之间是相互作用的,通过选择最佳的叶龄,寻找适宜的激素种类及配比,选择最佳培养条件等措施,可以建立最高效的再生系统,为番茄细胞工程与基因工程的研究与开发提供最有利条件。虽然从总体研究来看,番茄叶片再生体系的建立已经趋于完善,但不同品种的再生条件还存在一些差异,对未曾报道过的品种材料依然需要研究者们仔细摸索,以建立更完善的体系,为番茄转化研究打下坚实的基础。

随着番茄叶片离体培养再生频率的提高,可以将各具特色的功能基因转化到番茄中,培育出丰富多彩的资源材料和品种,在增加产量、改善品质的同时,有望为研发者和生产者带来可观的经济效益。

参考文献

[1] 贾芝琪,崔艳红,李颖.等.马铃薯抗晚疫病基因 R3a, R1 和 RB 在番茄中的表达[J].园艺学报,2009,36(8):1153-1160.
[2] 张春秋,郭振川,杨宇红,等.辣椒 WRKY 转录因子基因 CaRKNI F1 植物表达载体构建及番茄转化[J].分子植物育种,2010,8(4):713-718.
[3] 叶志彪,李汉霞,刘助甲,等.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.
[4] Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al. Enrichment of tomato fruit with health promoting anthocyanins by expression of select transcription factors [J]. Nature biotechnology, 2008(4): 1-8.
[5] 郑卿,郭书巧,葛才林,等.转基因番茄口服疫苗的研究进展[J].中国医药生物技术,2010(1):57-60.
[6] 新华社.袁隆平等 10 院士提议大力发展转基因技术. [http://finance. ifeng. com/ new/ s/ special/ lianghui2010/ industry/ 20100306/ 1894972. shtml](http://finance.ifeng.com/new/s/special/lianghui2010/industry/20100306/1894972.shtml) [cited 2010 Dec 13].
[7] 张启发.大力发展转基因作物[J].华中农业大学学报(社会科学版),2010,85(1):1-6.
[8] 梁超,王景雪,裴雁曦,等.根癌农杆菌介导的番茄高效遗传转化体系的研究[J].华北农学报,2009,24(2):71-74.

[9] 王全华,葛晨辉,曹守军,等.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.
[10] 于惠敏,石竹,杨俊杰.番茄的不同基因型对组培植株再生能力的影响[J].山东师范大学学报,2007,12,4(22):120-122.
[11] 彭细桥,戴良英,刘红艳.番茄离体再生体系优化研究[J].湖南农业大学学报,2004,30(6):506-509.
[12] 陆云华,张新,马立新.番茄叶片再生系统建立的研究[J].江西农业学报,2005,17(4):40-43.
[13] 王丹,付丽娅,董荣,等.抗生素敏感性番茄转化及再生体系的建立[J].南开大学学报,2007,40(5):108-111.
[14] 罗素兰,田嘉瑞,长孙东亭.番茄高效再生体系的建立[J].海南大学学报(自然科学版),2002,20(4):314-323.
[15] 张录露,牛建新,马兵钢.根癌农杆菌介导转化番茄的影响因素[J].生物技术通报,2008(1):10-14.
[16] 王金杰,王志英,徐香玲.影响番茄离体培养再生的主要因素探讨[J].东北农业大学学报,2009,40(11):28-32.
[17] Poonam Bhatia, Nanjappa Ashwath, Tissa Senaratna, et al. Tissue culture studies of tomato(*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2004, 78: 1-21.
[18] Chandel G, Katiyar S K. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato(*Lycopersicon esculantum* Mill) [J]. Adv. Plant Sci, 2000, 13: 11-17.
[19] 任春梅,高必达.番茄子叶离体再生与移栽[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(3):241-217.
[20] 苏彩露,霍秀文,谭庆海,等.番茄子叶下胚轴植株再生体系的建立[J].内蒙古农业大学学报,2006,27(4):91-95.
[21] 张录露,郝青南,马超,等.加工番茄遗传转化再生体系的建立[J].西北农业学报,2008,17(3):236-241.
[22] 胡艳,陈国祥,李朝军,等.农杆菌介导 IPT 和 etr1-1 双基因转化番茄及转基因植株再生[J].南京师范大学学报,2004,27(3):83-87.
[23] 陈珍,朱诚.农杆菌介导的番茄遗传转化体系优化研究[J].浙江大学学报,2008,34(6):615-620.
[24] 高南,吴香玉,施卫明.中疏四号番茄高效再生体系的建立[J].土壤,2008,40(6):1002-1007.
[25] 李晓东,刘玲,陈航,等.樱桃番茄再生系统的研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(1):57-60.
[26] 魏琴,周黎军,周锦霞,等.激素对樱桃番茄两种外植体诱导再生植株的影响[J].广西植物,2002,22(5):441-443.

Influence Factors of Regeneration for Tomato Leaves *in vitro* and the Evaluation

HAN Xiao, LUAN Yu-shi

(College of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024)

Abstract: An efficient and stable regeneration system of tomato leaves *in vitro* was the basis of tomato cell engineering and genetic engineering. This article analyzed the main factor of the tomato leaves *in vitro* regeneration, summed up the research results. Overall the most important factor was the hormone. General BA 0.5 ~ 2.0 mg/L + IAA 0.05 ~ 1.0 mg/L was the optimal combination. At the same time, explant genotype and leaf maturity, cultivation condition also had certain effect. Usually chose 8 ~ 20 d sterile seedlings or 18 ~ 20 d seedlings, under 20 ~ 28℃, 14 ~ 16 h/d lighting conditions cultivate. And then put forward the problems and development trend in the field.

Key words: tomato; leaf; *in vitro* regeneration; tissue culture