

番茄子叶和下胚轴离体再生体系的建立

李倩, 王滨, 李培环, 王富, 董晓颖, 段艳欣

(青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘要:以‘09-22’番茄无菌苗子叶和下胚轴为外植体,研究了其在 MS 附加不同浓度 6-BA 和 NAA/IAA 的培养基上的诱导分化及不定芽生根情况。结果表明:IAA 比 NAA 更利于该品种子叶的再生;在不同激素组合下,番茄子叶和下胚轴愈伤组织诱导率均达 100%,但子叶的愈伤组织生长状态好于下胚轴,不定芽分化率也略高于下胚轴,然而,下胚轴来源芽的生根较快,且生根效果好于子叶来源芽。该研究筛选出‘09-22’番茄子叶和下胚轴不定芽再生的最佳培养基配方为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L,最佳生根培养基配方为 MS+IAA 0.1 mg/L。

关键词:番茄;愈伤组织;不定芽;再生植株

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0106-05

番茄属茄科(Solanum)番茄属(*Lycopersicon*)一年生或多年生草本植物,具有用途广、适应性强、营养丰富、产量高等特点^[1-2]。番茄转基因研究是植物基因工程研究的热点之一,而高效再生体系的建立则是农杆菌介导转化番茄成功的基础。对于不同品种番茄来说,适宜其再生的激素配比与浓度均不相同,因此,在进行离体培养时选用合适的激素种类与浓度是成功的关键^[3-5]。外植体类型与状态对番茄离体再生的影响也很大,下胚轴、子叶、真叶和子叶节等都可以作为外植体进行再生培养,但它们的再生频率差异很大^[6-7];对于子叶而言,过老或者太嫩都不利于愈伤组织及不定芽的形成^[8],因此选用合适的外植体是影响再生体系建立的重要因素。此外,外植体灭菌时间、蔗糖浓度、暗培养时间等都会影响番茄的再生^[6-10]。

该试验选用‘09-22’番茄自交系为试验材料,以下胚轴与子叶为外植体,通过对不同激素种类与浓度配比进行试验,筛选出适宜诱导番茄外植体再生的培养基,并比较了子叶和下胚轴来源的不定芽的生根情况,建立了番茄高效离体再生体系,以期为进一步研究番茄转基因奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 番茄品种 番茄品种‘09-22’为自交系,由青岛农业大学园艺学院王富课题组提供。

1.1.2 主要试剂 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、3-吲哚乙酸(IAA)购于 SANLAND 公司,MS 培养基购于青岛海博生物。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄无菌苗的获得 挑选饱满的番茄种子,温水浸泡 4 h,用 75%酒精灭菌 30 s,无菌水冲洗 3 遍。在有效氯含量 10%的次氯酸钠灭菌 15 min,无菌水冲洗 3 遍。用无菌滤纸吸干番茄种子表面水分后,放入 1/2MS+1.5%蔗糖+0.7%琼脂培养基中,每瓶接种 5~6 粒种子,先暗培养 3~4 d,待种子发芽后移入光下,以使种子发芽整齐。光照 16 h/d,恒温 25℃培养,待幼苗子叶完全展开时备用^[11-12]。

1.2.2 外植体的获得 取生长约 10 d 的番茄无菌苗,将子叶两端切除,按大小切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,下胚轴切成约 1 cm 长。

1.2.3 培养条件 基本培养基为 MS,蔗糖浓度 30 g/L,固体培养基琼脂浓度 0.7%,pH 5.8~6.2。培养温度 25℃,光照强度 2 000 lx,相对湿度为 50%~70%,光照时间 16 h/d。

1.2.4 外植体诱导分化与再生 将切好的外植体接种在附加不同质量浓度的 6-BA(1.0、2.0 mg/L)、NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)和 IAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)的培养基上,详见表 1~3。每种培养基接种外植体 30 块,3 次

第一作者简介:李倩(1990-),女,大专,现主要从事番茄离体再生等研究工作。E-mail:liqian136youxiang@163.com。

责任作者:段艳欣(1978-),女,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事基因工程等研究工作。E-mail:dyxdyx2007@163.com。

基金项目:国家青年基金资助项目(30900976)。

收稿日期:2014-09-04

重复。先黑暗培养 7 d,再转移至光下培养并统计外植体的出愈率和分化率。并观察外植体的生长状态^[7,13-15]。

1.2.5 生根培养与驯化移栽 待不定芽生长至 2 cm 左右,选取顶芽正常、生长健康的不定芽,切除不定芽基部的愈伤组织及培养基转接到含有不同质量浓度的 IAA (0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L) 的生根培养基上进行生根培养。每瓶接种 1 个不定芽,培养条件同上。当再生植株生根且植株生长正常后,将组培瓶打开瓶盖,倒入少量无菌水(3~5 mL),放置在阴凉通风处练苗 2~3 d,然后洗净根部培养基,将幼苗转入盛有已灭菌的草炭:蛭石=3:1 的基质中,前 7 d 用透明的塑料薄膜罩住小苗,弱光培养,等小苗有新叶长出时,逐渐通风去掉薄膜,观察小苗生长发育状况。

1.3 数据分析

采用 SPSS 软件和 Excel 软件进行数据分析与作图,采用 LSD 法检测显著性差异。统计并计算出愈伤组织诱导率、愈伤组织分化率、正常芽率。愈伤组织诱导率(%)=(诱导愈伤组织个数/接种总个数)×100%,出芽率(%)=(芽点数/接种总个数)×100%,正常芽率(%)=(愈伤组织分化的正常芽个数/愈伤组织分化个数)×100%,生根率(%)=(生根不定芽数/接种总个数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 与 NAA 浓度对比对番茄子叶愈伤组织和不定芽诱导的影响

从表 1 可以看出,番茄子叶外植体在不同 6-BA 和 NAA 浓度组合下,愈伤组织诱导率均达到 100%,出芽率在 30%~58%,但正常芽率低且仅一半组合有正常芽

再生。其中,6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 组合下正常芽率最高,但也仅为 21.05%。此外,在 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 1.0 mg/L、6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 组合下,外植体均有明显的生根现象而无正常芽长出。综上所述,6-BA 与 NAA 激素组合可能不适合该番茄品种子叶的再生。

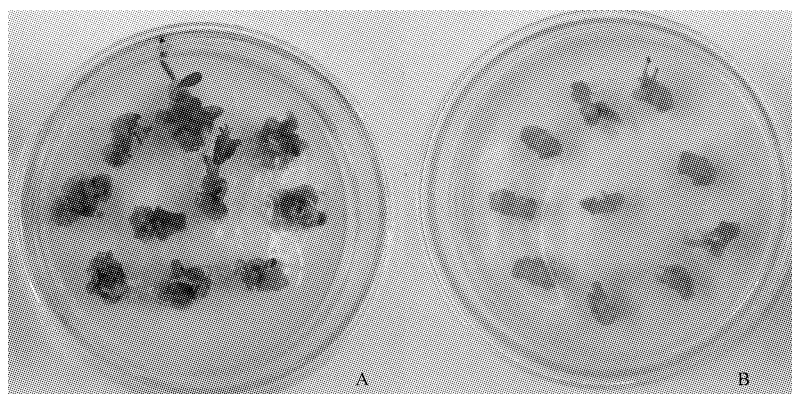
表 1 NAA 对番茄子叶愈伤组织形成及分化的影响

Table 1 Effect of NAA concentration on tomato callus and buds induction

激素种类和浓度 Kinds and concentrations of hormones/(mg·L ⁻¹)		愈伤组织 诱导率 Rate of callus/%	出芽率 Differentiation rate/%	正常芽率 Rate of normal buds/%
6-BA	NAA			
1.0	0.1	100	57.8±4.5A	21.05±1.7A
	0.5	100	21.4±1.3C	0
	1.0	100	30.7±2.1C	0
2.0	0.1	100	52.1±4.14A	4.30±0.06B
	0.5	100	46.1±2.3AB	0
	1.0	100	33.3±1.9BC	4.70±0.2B

2.2 番茄子叶与下胚轴再生的比较

为了测试 6-BA 和 IAA 组合对番茄再生的影响,分别以下胚轴和子叶为外植体进行了试验。研究结果表明,在所试的激素种类与浓度下,所有外植体均能形成愈伤组织,诱导率为 100%,但 2 种类型外植体的愈伤组织生长与分化情况不同,子叶诱导出的愈伤组织浓绿、生长健壮、没有黄化现象(图 2A);而部分下胚轴长出的愈伤组织会表现淡绿色、黄色,进而影响正常芽的发生(图 2B)。因此,对于番茄来说,子叶愈伤组织诱导效果好于下胚轴。



注:A:下胚轴;B:子叶。

Note: A; hypocotyl; B; cotyledon

图 1 不同外植体类型再生的比较

Fig. 1 Plant regeneration *in vitro* from different types of comparison

由表 2 可知,在不同激素浓度下,2 种外植体的出芽率和正常芽率均表现明显差异。当 6-BA 浓度为

1.0 mg/L,IAA 浓度为 0.5 mg/L 时,子叶的出芽率和正常芽率分别达 823.0%和 66.6%,均极显著高于其它组

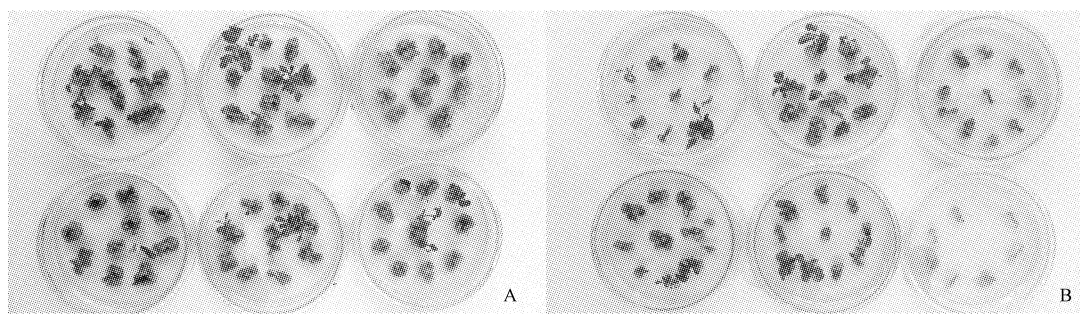
合;下胚轴在该激素组合下,也表现出较高的出芽率和正常芽率,但略低于子叶。综上所述,对于番茄子叶和下胚轴来说,最佳的再生激素组合为 6-BA 1.0 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L,正常芽率均大于 60%;子叶不定芽的分化效果略高于下胚轴(图 2A-B)。

表 2 不同激素配比对番茄子叶和下胚轴愈伤组织形成及分化的影响

Table 2 Effect of different hormone combinations on callus formation of tomato cotyledon and hypocotyl

6-BA (mg · L ⁻¹)	IAA (mg · L ⁻¹)	出愈率		出芽率		正常芽率	
		Rate of callus induction/%		Differentiation rate/%		Rate of normal buds/%	
		子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
1.0	0.1	100	100	560.0±20.2B	216.0±6.2B	30.0±2.1CD	26.6±5.1BC
	0.5	100	100	823.0±40.7A	640.0±38.3A	66.6±6.6A	60.0±4.7A
	1.0	100	100	376.6±11.6D	340.0±28.5B	26.6±2.4D	16.6±3.3C
	0.1	100	100	230.0±15.3E	536.1±66.1A	33.3±3.3BCD	33.3±4.3B
2.0	0.5	100	100	496.6±34.6C	552.5±84.5A	40.0±6.6BC	30.0±1.2B
	1.0	100	100	133.0±5.1F	283.3±81.3B	43.3±5.2B	33.3±1.6B

注:同列不同大写字母表示差异极显著(P<0.01),下同。
Note:Different capital letters in the same column show extremely significant (P<0.01),the same below.



注:A 为子叶,B 为下胚轴,上下两排分别为 6-BA 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L,从左到右依次是添加 IAA 0.1、0.5、1.0 mg/L。
Note:A:cotyledon,B:hypocotyls;the upper and the lower in this two figures represents 1.0 mg/L and 2.0 mg/L of 6-BA,respectively,and IAA was 0.1, 0.5,1.0 mg/L from left to right.

图 2 不同激素配比对番茄子叶和下胚轴分化的影响

Fig.2 Effect of different hormone combinations on differentiation of tomato cotyledon and hypocotyl

2.3 不同来源(子叶和下胚轴)番茄芽的生根比较

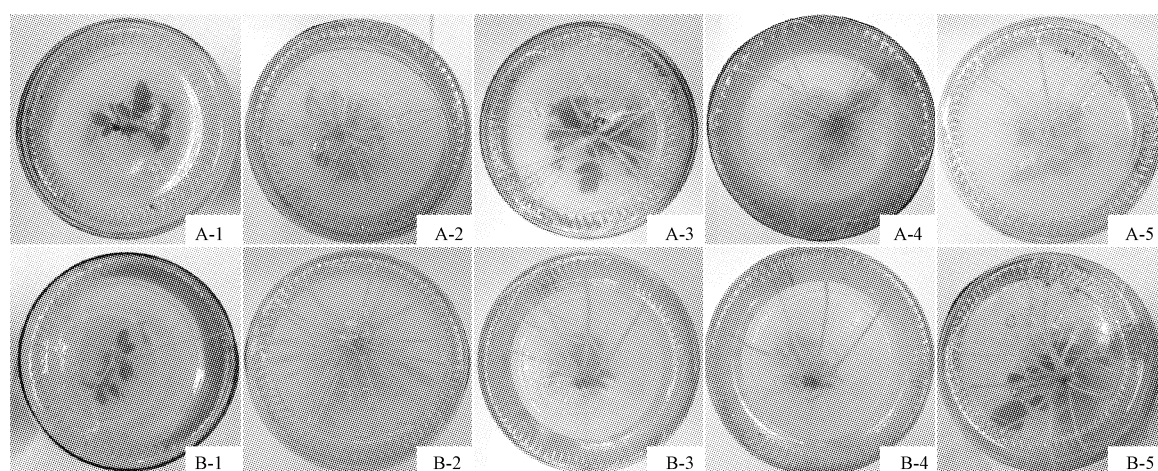
对不同来源(子叶和下胚轴)的芽进行生根诱导比较,发现下胚轴来源的芽生根较快,一般在培养 10 d 左右即可生根,而子叶来源的芽在培养 15 d 以上才会生根,且根系生长较前者慢。不同浓度 IAA 处理下,2 种来源的芽生根率均达到 100%;而相同来源的芽在不同

浓度 IAA 处理下生根情况有明显不同,无论是子叶来源还是下胚轴来源的芽均在 0.1 mg/L IAA 浓度下表现较好的生根效果(表 3,图 3)。综上所述,下胚轴来源的芽更容易生根,对 2 种外植体来说最适宜的生根培养基为 MS+IAA 0.1 mg/L。

表 3 不同 IAA 浓度对不定芽生根的影响

Table 3 Effect of IAA concentration on rooting of adventitious buds

外植体 Explant	IAA (mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Root numbers per explant	生长情况 Plant growth status
子叶 Cotyledon	0	100	2.5±0.29C	植株生长缓慢,生根慢、极少
	0.1	100	9.2±0.17A	植株健壮,生根多,根系粗壮
	0.2	100	4.0±0.57B	植株弱小发黄,生根细少,根系衰弱
	0.5	100	5.4±0.23B	植株弱小淡绿,生根少
	1.0	100	4.2±0.23B	植株健壮,生根较少,分布不均
	0	100	6.4±0.52C	植株浓绿,生根快、少,根系正常
下胚轴 Hypocotyl	0.1	100	11.0±0.58A	植株浓绿健壮,生根快、多,根系发达
	0.2	100	7.4±0.51BC	植株生长良好,根细、少
	0.5	100	8.5±0.86ABC	植株淡绿,根系弱
	1.0	100	10.0±0.57AB	植株健壮,有丛芽长出,根系正常



注:1~5代表 IAA 浓度分别为 0,0.1,0.2,0.5,1.0 mg/L,A-1 到 A-5 是子叶来源芽的生根情况,B-1 到 B-5 是下胚轴来源芽的生根情况。

Note:1—5 represents different concentrations of IAA (0,0.1,0.2,0.5,1.0 mg/L);A-1 to A-5 and B-1 to B-5 refers to shoot rooting from cotyledon, and hypocotyls, respectively.

图 3 不同来源芽在含不同浓度 IAA 培养基中的生根情况

Fig. 3 Shoot rooting from different explants on medium supplemented with different concentrations of IAA

2.4 植株移栽

将经过 2~3 d 练苗锻炼的组培苗移栽至灭菌的基质中,于阴凉通风处生长 7 d 后,转至光照下培养,植株生长健壮(图 4)。



图 4 番茄组培苗的移栽

Fig. 4 Transplantation of regenerated tomato plant

3 讨论

3.1 外源激素对番茄离体再生的影响

番茄再生体系所需的激素种类与浓度不尽相同,目前常用的包括玉米素(ZT)、6-BA、NAA、IAA 等。叶志彪等^[9]认为番茄子叶再生以 ZT 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 效果最好,罗素兰等^[2]研究发现 6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 对愈伤组织诱导不定芽效果最好,梁美霞^[7]则

认为 6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 最适合番茄不定芽分化,孙同虎等^[4]和尹明安等^[5]则认为 6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 效果最好。该研究结果表明 6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 激素组合适合‘09-22’番茄外植体的再生,在该激素组合下盲芽和畸形芽的比率较低,这与其它研究不同,可能与所选试材及品种有关。

3.2 基因型与外植体类型对番茄离体再生的影响

番茄在组织培养中的离体再生能力与番茄的基因型密切相关,在相同的培养条件下,不同番茄品种间存在着不同的分化率^[16-17]。刘炜炜等^[18]研究发现不同激素种类与浓度对‘里格尔 87-5’和‘亚心 98-1’的出愈率无影响,但后者的正常芽率更高。何秀霞等^[10]研究了 11 种番茄栽培品种,发现不同品种不定芽分化率存在明显差异,从 36%到 100%不等,且不同品种在不同培养基上形成的愈伤组织大小及形态也不尽相同。因此,番茄的再生频率受其基因型影响。

除基因型外,外植体类型也是影响番茄离体再生的重要因素。李铁松等^[6]认为番茄外植体再生能力从强到弱依次为下胚轴、子叶、茎段和叶片,而梁美霞^[7]认为子叶优于下胚轴。该研究发现,‘09-22’番茄子叶与下胚轴形成愈伤组织的能力都很强,但子叶诱导的愈伤组织状态更好;同时,子叶不定芽分化率略高于下胚轴,但对于生根环节,下胚轴来源的不定芽生根快且根数多。

3.3 其它因素对番茄离体再生的影响

除上述因素外,还有许多其它因素影响番茄的再生,如苗龄。马杰等^[15]认为苗龄为 4 d 的番茄子叶、茎

段外植体出愈率和诱导率最高,苏彩霞等^[19]采用苗龄8~10 d的无菌苗子叶、下胚轴为外植体,而张录霞等^[20]以7~8 d苗龄的无菌苗为材料。该试验选用生长10 d苗龄的番茄子叶和下胚轴进行诱导再生,获得了较高的不定芽分化率。综上所述,认为应根据番茄品种、生长状况等来确定最佳状态的苗龄。

此外,番茄播种前浸种处理时间^[21-22]、灭菌方法^[2,4,14]及播种后的暗培养^[14]均影响种子的萌发,该研究采用浸种4 h可得到较高的发芽率,75%乙醇处理20~30 s,配合10%次氯酸钠灭菌20 min可达到灭菌的效果而不影响种子萌发,此外,番茄种子播种后进行3~4 d的暗培养再转至光照条件下培养,可提高其发芽整齐度。

参考文献

- [1] 余延年. 番茄遗传学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1999.
- [2] 罗素兰,田嘉璐,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):314-318.
- [3] 王理. 番茄高效离体再生体系的建立及遗传转化初探[D]. 雅安:四川农业大学,2012.
- [4] 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,2007,34(24):6467-6467.
- [5] 尹明安,郭立,刘华伟,等. 番茄 ZF 遗传转化再生体系的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(5):27-30.
- [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] 梁美霞. 番茄子叶和下胚轴离体再生体系建立[J]. 中国农学通报,2010,26(6):47-50.
- [8] 蒋艳萍. 建立番茄转基因离体培养体系的研究[D]. 昆明:广西大学,2003.
- [9] 叶志彪,李汉霞. 番茄子叶离体培养与再生成株[J]. 华中农业大学学报,1994,13(3):291-295.
- [10] 何秀霞,陆一鸣. 番茄组织培养体系的建立及其影响因素的研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2003,18(1):30-33.
- [11] 邹爱兰. 桃 ACC 合成酶基因的分离及桃,番茄离体转化体系的建立[D]. 南京:南京师范大学,2005.
- [12] 孙丽萍. 番茄果实蔗糖磷酸合成酶基因的克隆和番茄遗传转化体系的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2005.
- [13] 曾培洋,杨宗岐,陈集双. 番茄下胚轴和子叶离体诱导成株的激素调控[J]. 安徽农业科学,2010,38(7):3341-3342.
- [14] 石丽. 农杆菌介导 CBF1 基因番茄遗传转化体系初探[D]. 青岛:青岛农业大学,2009.
- [15] 马杰,邱栋梁. 番茄组培再生体系优化研究[J]. 中国农学通报,2011,27(8):185-189.
- [16] 裴丽华,李美琴,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.
- [17] 张玉英,韦正乙,王云鹏,等. 番茄叶片高频再生体系的建立[J]. 吉林农业科学,2014,39(2):78-82,86.
- [18] 刘炜炜,秦荣,张伟,等. 加工番茄离体再生体系的建立[J]. 中国农学通报,2012,28(16):155-160.
- [19] 苏彩霞,霍秀文,堽庆海,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(自然科学版),2007,27(4):91-95.
- [20] 张录霞,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.
- [21] 彭细桥. 番茄高效离体再生体系的建立与番茄 COI1 同源基因的转化[D]. 长沙:湖南农业大学,2005.
- [22] 许云飞,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.

Establishment of Regeneration System of Cotyledon and Hypocotyl *in vitro* of Tomato

LI Qian, WANG Bin, LI Pei-huan, WANG Fu, DONG Xiao-ying, DUAN Yan-xin

(Qingdao Key Lab of Modern Agriculture Quality and Safety Engineering, College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: The cotyledon and hypocotyl from tomato seedlings ‘09-22’ were used to regenerate on the media supplemented with different 6-BA and NAA/IAA concentrations. The results showed that IAA was more favorable for bud regeneration than NAA. Callus induction rate reached up to 100% for both explants, but callus from cotyledon grew better than that from hypocotyl. Furthermore, the rate of adventitious bud differentiation of cotyledon was slightly higher than that of hypocotyl. However, shoots from hypocotyl rooted quicker and better than that from cotyledon. The optimum medium for adventitious bud differentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L. And MS+IAA 0.1 mg/L was the best rooting medium.

Keywords: tomato; callus; adventitious buds; plant regeneration