

番茄高效再生体系的建立

仇 燕,刘红霄,杨松焯

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘 要:以砧木 1 号番茄的子叶和下胚轴为外植体进行离体组织培养,研究了 IAA 和 6-BA 及 NAA 和 6-BA 不同激素配对外植体诱导不定芽及生根的影响。结果表明:培养基 MS+0.2 mg/L IAA+1.0 mg/L 6-BA 为诱导子叶外植体愈伤组织和不定芽的最适培养基,而 MS+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 6-BA 为诱导下胚轴外植体愈伤组织和不定芽的最适培养基;诱导不定芽生根的最佳培养基为 MS+0.1 mg/L IAA。

关键词:番茄;子叶;下胚轴;植株再生

中图分类号:S641.2 文献标志码:A

Establishment of highly efficient regeneration system of tomato

QIU Yan, LIU Hong-xiao, YANG Song-ye

(College of Bioscience and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: The effects of medias containing different concentration of IAA and 6-BA or NAA and 6-BA on tomato callus induction, bud differentiation and rooting were detected in hypocotyl and cotyledon of Zhenmu No. 1. The results show that MS+0.2 mg/L IAA+1.0 mg/L 6-BA is the best medium for callus induction and bud differentiation of cotyledon; MS+0.5 mg/L IAA+1.0 mg/L 6-BA is the optimum medium for callus induction and bud differentiation of hypocotyl; the optimum root induction medium is MS +0.1 mg/L IAA.

Key words: tomato; cotyledon; hypocotyl; plant regeneration

番茄作为一种重要的蔬菜作物和模式经济作物已受到众多研究者的关注,番茄转基因的研究是当前植物基因工程研究的热点之一,番茄的广泛栽培和它在遗传理论上的深入研究,为基因工程拓宽资源打下了坚实基础^[1]。作为影响基因转化成功与否的关键因素之一,建立高频再生体系的研究一直很受重视^[2]。

本试验选用砧木 1 号番茄种子,比较了不同杀菌剂和杀菌时间对番茄种子萌发的影响,确定了最佳杀菌剂及杀菌时间,并且以番茄无菌苗的下胚轴和子叶作为外植体,通过对不同激素浓度配比进行试验,筛选出能够高效诱导番茄外植体直接分化不定芽和诱导不定芽生根的培养基,建立了一套高效的番茄植株再生体系,以期为进一步的番茄转基因和功能基因组学的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与培养基

砧木 1 号番茄种子由本实验室保存。培育无菌苗使用含有去离子水的棉花基质;诱导培养基以 MS 为

收稿日期:2011-05-27;修回日期:2011-11-09;责任编辑:王海云

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2010000860)

作者简介:仇 燕(1977-),女,河北井径人,副教授,博士,主要从事植物种质创新方面的研究。

基本培养基,含有蔗糖质量浓度 30 g/L、琼脂质量浓度 8 g/L,添加不同种类和浓度的激素,调节 pH 值至 5.8。配制好的培养基于 120 °C 高温灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的处理

选取籽粒饱满的健康种子置于锥形瓶中,无菌水冲洗 1 次,70% (体积分数,下同)酒精处理 20 s 后分别用 0.05%~0.1% (质量分数)的氧化汞和 10% (质量分数)的 NaClO 消毒,后用无菌水冲洗种子 7 遍。

1.2.2 无菌苗的培养

灭菌后的种子接种于棉花培养基上,25 °C 条件下(以下试验都是在该温度条件下进行)黑暗培养,5 d 后计算发芽率,然后转至光照周期 14 h/d,光照度为 2 000 lx 的条件下培养,待幼苗子叶完全展开时备用。

1.2.3 外植体的准备

取培养约 10 d 的无菌苗,将子叶两端及叶边缘切除,中间部分横向切成 2 段,再在叶块中间划 2 处伤口;下胚轴剪成 8 mm 左右的切段。将切好的外植体接种在不同质量浓度的附加 IAA(0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.5 mg/L)和 6-BA(0.5 mg/L,1.0 mg/L,2.0 mg/L)及 NAA(0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.5 mg/L)和 6-BA(0.5 mg/L,1.0 mg/L,2.0 mg/L)的 MS 培养基上,每种培养基接种子叶和下胚轴各 10 块,每个处理设 3 个重复。黑暗培养 7 d 后,转移至 14 h/d 光照周期条件下培养,28 d 后统计外植体的出愈率和不定芽的分化率。外植体的出愈率=(诱导愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100%,不定芽的分化率=(分化不定芽的外植体数/接种外植体数)×100%。

1.2.4 生根培养

待不定芽长至 2 cm 左右时,切除不定芽基部的愈伤组织和培养基,将不定芽转接到含有不同质量浓度的 IAA(0.05 mg/L,0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.5 mg/L)或 NAA(0.05 mg/L,0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.5 mg/L)的生根培养基中,进行生根培养。每种培养基中接种不定芽 8 块,每个处理设 3 个重复,10 d 后统计不同质量浓度 IAA 或 NAA 培养基中不定芽的生根率。生根率=(生根幼芽数/接种幼芽数)×100%,同时观察根的形态。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌剂和灭菌时间对番茄种子灭菌及萌发的影响

NaClO 处理过的种子表皮褪色变白,由表 1 可见,不同灭菌时间对种子的萌发影响不大,但是 4~6 min 处理后有少量霉菌污染;氯化汞处理过的种子较 NaClO 处理后的种子萌发晚且萌发率低,并且随着氯化汞杀菌浓度的增大,时间的增长,种子的萌发率明显降低,说明氯化汞处理对种子的萌发有一定的抑制作用。试验表明,最佳灭菌条件为 70%酒精处理 20 s 后 NaClO 处理 7 min。

表 1 不同灭菌条件对种子萌发的影响

Tab. 1 Effects for seeds germination with different sterilization condition

编号	灭菌剂	质量分数/%	处理时间/min	发芽时间/d	发芽率/%
1	NaClO	10	4	3	100
2	NaClO	10	5	3	100
3	NaClO	10	6	2	97
4	NaClO	10	7	3	100
5	HgCl ₂	0.05	1	5	67
6	HgCl ₂	0.05	3	6	47
7	HgCl ₂	0.1	1	5	53
8	HgCl ₂	0.1	3	7	27

2.2 不同激素对比对番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

外植体接种 5 d 后,伤口处膨大,开始形成愈伤组织(见图 1 和图 2);13 d 后,子叶外植体开始出现芽点并逐渐长成不定芽;18 d 后,下胚轴开始出现芽点,不定芽开始生长(见图 3)。本试验选用 NAA 与 6-BA 的激素组合可以诱导外植体愈伤,但是诱导不定芽分化的效率却极低,只能达到 20%左右,且分化形成畸形芽较多,不能生长成完整植株。

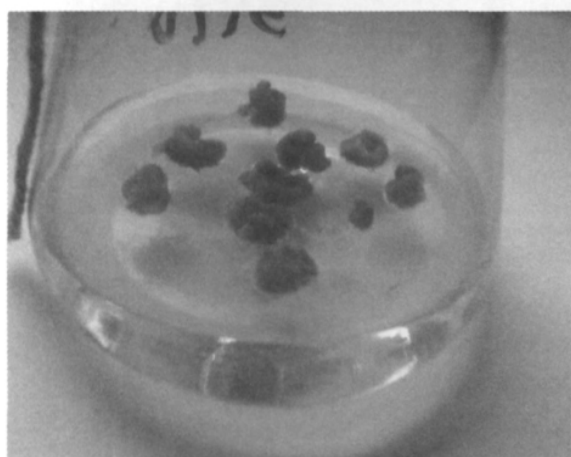


图 1 子叶诱导愈伤组织

Fig.1 Callus induction of cotyledon



图 2 下胚轴诱导愈伤组织

Fig.2 Callus induction of hypocotyl

由表 2 可见,在 IAA 与 6-BA 激素组合中,子叶与下胚轴出愈率相差不大。在不同激素浓度的培养基中,子叶外植体和下胚轴外植体的出愈率都在 90% 以上,下胚轴总体出愈率虽略低于子叶,但差异不明显,在 6-BA 质量浓度为 1.0 mg/L 时,下胚轴和子叶的出愈率都达到 100%,说明该质量浓度的 6-BA 最有利于愈伤的诱导。不同外植体诱导愈伤和不定芽分化的最佳激素配比并不相同:诱导子叶生芽的最佳激素组合是 IAA(0.2 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L),出芽率高达 97%;诱导下胚轴生芽的最佳激素组合是 IAA(0.5 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L),出芽率达到 77%。相同激素组合中,子叶与下胚轴分化不定芽的能力相差甚远,子叶作为外植体均比下胚轴诱导再生芽的效率高,特别是在本试验的最优条件下(子叶在 5 号培养基,下胚轴在 6 号培养基)子叶的出芽率比下胚轴高 20%。

表 2 不同激素对比对番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

Tab.2 Effects of different combination of hormone concentration on tomato callus and buds induction

编号	IAA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	6-BA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	子叶				下胚轴					
			外植体 数/个	出愈数/ 个	出愈率/ %	出芽数/ 个	出芽率/ %	外植体 数/个	出愈数/ 个	出愈率/ %	出芽数/ 个	出芽率/ %
1	0.1	0.5	30	28	93	18	60	30	27	90	16	53
2	0.2	0.5	30	30	100	20	67	30	29	97	19	63
3	0.5	0.5	30	29	97	18	60	30	28	93	21	70
4	0.1	1.0	30	30	100	25	83	30	30	100	19	63
5	0.2	1.0	30	30	100	29	97	30	30	100	21	70
6	0.5	1.0	30	30	100	27	90	30	30	100	23	77
7	0.1	2.0	30	30	100	22	73	30	30	100	17	57
8	0.2	2.0	30	30	100	25	87	30	27	90	19	63
9	0.5	2.0	30	30	100	22	73	30	28	93	20	67

2.3 不同激素及浓度对番茄外植体生根的影响

待培养的幼芽长到 2 cm 左右且具有 2—3 个叶片时,切除不定芽下的愈伤组织,将不定芽转接到不同浓度的 IAA 或 NAA 生根培养基中诱导生根(图 4)。试验发现,加入 IAA 的培养基比加入 NAA 的培养基更有利于番茄不定芽的生根诱导,不仅生根时间短,再生根也比较粗壮。由表 3 可见,当 IAA 质量浓度为 0.05 mg/L 时,诱导的主根较细;质量浓度为 0.1 mg/L 时,诱导的主根较粗且根系发达、须根多,再生苗也较高;质量浓度为 0.2 mg/L 时,根系依旧很发达,但再生苗高度比 0.1 mg/L 时低;质量浓度为 0.5 mg/L 时,根系较弱,基本无须根,并且生根率明显低于其他浓度。这种变化说明适当提高 IAA 浓度有利于不定芽的生根,但是超过一定质量浓度后,反而会抑制根的发生。故笔者认为 0.1 mg/L 为诱导不定芽生根的最佳 IAA 质量浓度。

待番茄幼苗生长到 6~8 cm,根长为 5~6 cm 时,打开锥形瓶封口膜,在锥形瓶中注入约 0.5 cm 水后转移到培养箱中进行驯化培养,培养箱温度为白天 24 ℃ 夜间 18 ℃,光照周期为 14 h/d(见图 5)。2~3 d 后,从锥形瓶中取出小苗洗去根部培养基防止细菌滋生,将再生植株转移到注入 1 cm 水的锥形瓶中,室温(20~25 ℃)下生长。4 d 后,移栽到营养土中(见图 6),移栽成活率达到 100%。



图 3 分化生芽
Fig. 3 Bud differentiation

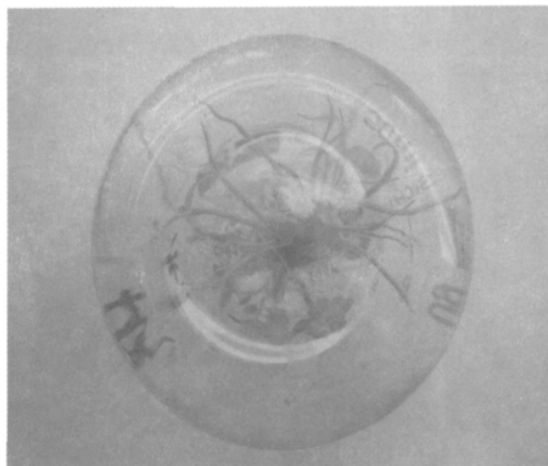


图 4 分化生根
Fig. 4 Root induction



图 5 再生植株的炼苗
Fig. 5 Domestication of regeneration plant



图 6 再生植株的移栽
Fig. 6 Transplantation of regeneration plant

表 3 不同浓度 IAA 对不定芽生根的影响

Tab. 3 Effect of IAA concentration on adventitious buds generating roots

IAA 质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	接种幼芽数/个	生根幼芽数/个	生根率/%	生根时间/d	根形态
0.05	24	21	87	≈15	2-3 主根,须根多
0.1	24	23	96	≈7	5-6 主根,须根多
0.2	24	22	92	≈7	3-4 主根,须根少
0.5	24	11	46	≈9	2-3 主根,基本无须根

3 讨论

3.1 不同灭菌剂对番茄种子发芽的影响

获得无菌苗是植株再生的第1个步骤,以往番茄种子的灭菌主要以氯化汞灭菌法为主,但也有报道指出氯化汞对种子的萌发可能有一定的抑制作用。本试验结果表明,NaClO处理的种子比氯化汞处理的种子发芽时间更短,发芽率更高。氯化汞抑制种子萌发的原因可能在于氯化汞在种子表面的残留不易去除,从而导致种子不能萌发,而次氯酸钠最后分解成氯和氧气排入大气中,灭菌后易于去除^[3],不会再损伤种子。

3.2 不同外植体再生能力的比较

番茄的不同部位外植体再生能力不尽相同,梁美霞发现番茄下胚轴的愈伤组织诱导和不定芽诱导均低于子叶诱导,这与本试验得出的结论是一致的^[4]。而子叶作为外植体比下胚轴更容易形成不定芽的原因可能在于子叶是营养储存器官,可以为芽的生长提供更为充足的营养^[5]。欧阳波等的研究则相反^[6],这可能与不同番茄品种的内源激素的含量和种类有关。陈火英等的实验证明离体培养诱导发生过程中,物理创伤作用对启动愈伤组织有明显的作^[7],故在制备外植体时应尽量多的制造外植体伤口,本试验不仅切除了子叶的边缘同时在子叶切块的中部也划出伤口,以利于外植体的再生培养。

3.3 不同激素配对外植体生芽及生根的影响

不同激素配比是影响番茄外植体再生的重要因素之一,有关番茄离体培养激素调控方面的研究一直在进行。王月等以番茄子叶和下胚轴为外植体进行离体培养,筛选出ZR与IAA的组合最有利于愈伤组织和不定芽的形成,添加IBA的培养基利于诱导不定芽生根^[8];而乔永旭则认为,IAA与6-BA的组合有利于番茄外植体不定芽的生长,而生根培养基中添加的则是IAA^[9],毕建水等的实验得到相同的结论^[10]。本试验的研究中也发现IAA与6-BA的组合比NAA与6-BA的组合更有利于番茄外植体再生芽的诱导,同时,IAA诱导不定芽生根的作用也比NAA更显著。这一现象表明,番茄外植体诱芽的最佳激素组合有基因型依赖性,不同的品种其再生的条件不同。要建立适合当地气候的番茄品种的再生体系,必须对其再生体系进行进一步的探索。

3.4 再生植株的驯化和移栽

如2.3部分中再生植株移栽过程,可有利于保持再生植株的湿度,相对于直接移栽到营养土中的植株更易成活,4d后,再生植株移栽到营养土中。移栽时试管苗的高度一般在6~10cm,过高过低都不适合移栽,根系的发育程度是移栽成功与否的决定因素,移栽时应尽量选择根系较发达的再生植株。

3.5 形成再生植株的周期及效率

本试验诱导愈伤组织和芽分化都在同一培养基中进行,建立了高效的番茄再生体系,子叶在最佳培养基中诱导不定芽和根的效率分别达到了97%和96%。有些报道也可以得到高达95%以上的再生率,但是,这些报道有的是经过愈伤组织诱导不定芽^[9-11],有的统计分化不定芽率时间较长^[8,12],这样从接种外植体到植株移栽大概需要70~85d的时间。本研究中,子叶外植体在最适宜的6-BA和IAA组合上从接种外植体到转移至生根培养基约需35d,芽诱导生根约需15d,再生苗锻炼5~7d后移栽,诱导产生再生植株的整个过程约需55d,加快了再生植株的形成过程缩短了周期,同时提高了再生效率,为番茄快速繁殖和转基因研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 何秀霞,陆一鸣,白杰英,等. 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(Journal of Inner Mongolia University for Nationalities),2003,18(1):30-33.
- [2] 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(Journal of Liaoning Normal University),2003,26(2):178-182.
- [3] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯(Plant Physiology Communications),1996,32(6):444-449.
- [4] 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(Chinese Agricultural Science Bulletin),2010,26(6):47-50.
- [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(Journal of Northwest A&F University),2002,30(5):27-30.
- [6] 欧阳波,李汉霞. 番茄下胚轴转化获得转基因植株[J]. 华中农业大学学报(Journal of Huazhong Agricultural University),2002,21(3):206-209.
- [7] 陈火英,张建华,钟建江,等. 番茄下胚轴离体培养植株再生及其组织学观察[J]. 西北植物学报(Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica),2000,20(5):759-765.

- [8] 王月, 郭凤, 林英. Micro-Tom 番茄离体再生条件的选择[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2010(18):139-141.
- [9] 乔永旭. 番茄再生体系的建立[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2010(17):174-176.
- [10] 毕建水, 李翠翠, 徐丽丽. 培养基和继代时间对番茄叶片愈伤组织诱导和芽分化的影响[J]. 安徽农学通报(Anhui Agricultural Science Bulletin), 2008, 14(13): 41-42.
- [11] 蒋素华, 顾东亚, 崔波, 等. 番茄真叶愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 北方园艺(Northern Horticulture), 2009(10): 113-114.
- [12] 张艳芳, 霍秀文, 苏彩霞, 等. 番茄遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报(Journal of Agricultural Biotechnology), 2008, 24(3): 58-61.

(上接第 35 页)

10, 20, 30, 40, 60 min, 乙醇体积分数分别设定为 30%, 50%, 60%, 75%, 90%。结果表明: 料液比(质量比)为(1:20)~(1:40)时, 总多酚提取率较高且比较稳定; 提取率随提取时间的延长而增加, 在 30 min 时提取率最高; 乙醇体积分数为 50% 时提取率最高。所以在正交试验中选择料液比(质量比)为 1:20, 1:25, 1:30, 提取时间为 25, 30, 35 min, 乙醇体积分数为 45%, 50%, 55%, 进一步考察各因素对提取效果的影响。

表 5 验证性实验结果

Tab. 5 Experimental results of proof test

项 目	序 号			平均值
	1	2	3	
总多酚的提取率/%	5.55	5.56	5.33	5.48
w(总多酚)/%	23.48	23.49	22.53	23.17
干膏中总多酚质量/g	0.1387	0.1390	0.1332	0.1370

3.2 提取次数的选择

单因素实验中提取次数的考察按如下方案进行: 称取东北铁线莲药材粉末约 2.5 g, 量取 20 倍量 50% (体积分数) 的乙醇, 分别提取 1, 2, 3, 4, 5 次, 每次超声(40 °C) 30 min, 过滤。把每次的滤液定容至 50 mL 的容量瓶中, 按“2.1.2”所述方法制备供试品溶液, 按“2.1.5”所述方法测定提取液中总多酚的含量, 进而得出提取的总多酚质量和总多酚提取率。结果表明: 提取 3 次可以将东北铁线莲总多酚提取完全, 其中前 2 次即可提取总量的 89%。

4 结 语

通过正交试验法对东北铁线莲总多酚的超声辅助提取工艺条件进行了优化, 并按最佳工艺进行了验证试验。结果证明, 该工艺提取东北铁线莲总多酚路线简单、提取率高、操作容易控制、稳定性好, 为东北铁线莲总多酚提取的工业生产提供了合理依据。

参考文献:

- [1] 许世泉, 王英平, 邵财, 等. 东北铁线莲最佳采收期的研究[J]. 特产研究(Special Wild Economic Animal and Plant Research), 2007, 29(4): 25-26.
- [2] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1989.
- [3] 方文贤. 实用临床抗衰老中药[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002.
- [4] 章蕴毅. 威灵仙解痉抗炎镇痛[J]. 中成药(Traditional Chinese Medicine Patent Prescription), 2001, 23(11): 808-811.
- [5] 吴依娜, 贺文娟. 中药材威灵仙的化学成分和药理研究概述[J]. 中国医药导报(China Medical Herald), 2008(20): 27-28.
- [6] 徐小云, 王云霞, 李智勇. 威灵仙化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代中医药(Modern Traditional Chinese Medicine), 2003, 15(4): 67-69.
- [7] 常敏毅. 抗癌良方[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993.
- [8] 牛波, 邱海霞, 田景振, 等. 超声强化提取技术[J]. 山东中医杂志(Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine), 2000, 19(10): 629-630.
- [9] 唐前, 罗燕英, 唐玲, 等. 正交实验优选金花茶种子总多酚的最佳提取工艺[J]. 时珍国医国药(Lishizhen Medicine and Materia Medica Research), 2010, 21(4): 792-793.