

中蔬 6 号番茄高频再生体系的研究

于明礼, 张柱岐, 张法琴

(山东滨州职业学院, 山东 滨州 256624)

摘要: 通过对中蔬 6 号番茄高频再生体系的研究, 确定中蔬 6 号种子消毒方法为先酒精处理 30 s, 再用 0.7% NaClO(有效氯含量)处理 20 min; 最佳的愈伤组织诱导及不定芽分化培养基为 MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L; 最佳的生根壮苗培养基为 MS+IAA 0.5 mg/L。卡那霉素的最终筛选浓度为 50 mg/L。

关键词: 番茄; 中蔬 6 号; 再生体系

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)04-0091-03

高效再生体系的建立是用农杆菌介导转化植株成功的基础, 筛选合适的分化培养基配方和适宜的抗生素使用浓度是提高遗传转化率的关键。番茄组织培养的研究工作一直在进行^[1~5], 但是由于品种、外植体间的差异及激素种类及配组上的不同, 结果都不尽相同。在进行遗传转化前, 需要对所用植物材料的再生体系进行优化, 才有可能转化成功。为此, 以中蔬 6 号番茄为试材, 对其种子表面消毒方法、愈伤组织的诱导和分化、生根、移栽和子叶对卡那霉素的敏感性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 无菌苗的获得

选取饱满新鲜的种子, 用 70% 酒精处理 30 s, 倒掉酒精, 用无菌水冲洗 1 次, 再分别按表 1 的 6 种方式进行表面消毒, 然后用无菌水冲洗 4 次后接入 MS 培养基中。1 周后统计出苗率、污染率, 10 d 后观察苗的长势。

表 1 中蔬 6 号番茄种子表面消毒处理

处理号	灭菌剂的种类及浓度	消毒时间 (min)
S1	0.7% NaClO	15
S2	0.7% NaClO	20
S3	0.7% NaClO	25
S4	0.1% HgCl ₂	4
S5	0.1% HgCl ₂	6
S6	0.1% HgCl ₂	8

1.2 分化培养基的优化

不同番茄品种由于内源激素含量不同, 诱导分化的最适培养基配方也不同。在借鉴前人研究成果的基础上, 由 MS 基本培养基加入一定浓度的 6-BA、IAA 及 ZT, 共设计 8 个激素配方(表 2)。外植体接种后, 每 3~4 d 观察统计 1 次, 记录不同分化培养基上的诱导及分化情况。取播种后 10~12 d 苗的子叶, 切去叶尖及叶柄部分, 再在中间一分为二, 近轴面向下接种于分化培养基上。

表 2 不定芽分化培养基激素配比 (mg/L)

培养基编号	6-BA	ZT	IAA
C1	0.5	-	0.2
C2	1.0	-	0.2
C3	2.0	-	0.2
C4	3.0	-	0.2
C5	-	2.0	-
C6	-	2.0	0.5
C7	-	1.0	0.5
C8	-	0.5	0.25

注: 基本培养基为 MS, 下同

1.3 培养条件

发芽阶段: 先置于 25℃ 下暗培养 7~8 d, 待种子开始发芽后马上移入光照条件下培养。光照时间为每天 10~12 h, 光照强度为 1 500~2 000 lx, 温度控制在 24~26℃。

愈伤组织及不定芽的诱导、分化、继代及生根壮苗阶段, 均将材料置于温度 24~26℃ 和 1 500~

收稿日期: 2005-11-28

作者简介: 于明礼(1973-), 男, 山东莱阳人, 讲师, 本科, 主要从事生物技术与蔬菜育种研究。

2 000 lx 光照下,每天照光 10~12 h。

1.4 生根培养基的筛选

将高 3~4 cm,带 2~3 片叶,生长健壮的再生植株,从外植体上剥离,分别插入 7 种不同激素浓度的生根培养基中(表 3),2 周后,开始进行观察统计。

表 3 生根培养基激素配比 (mg/L)

培养基编号	IAA	NAA
R1	0	0
R2	0.2	0
R3	0.5	0
R4	1.0	0
R5	0	0.2
R6	0	0.5
R7	0	1.0

1.5 再生植株驯化移栽

待形成根系发达、生长茁壮的再生苗时,将三角瓶移入温室中,让其适应温室环境 4~5 d,然后逐渐打开瓶膜进行通风,3 d 后,将小苗取出,洗净根部残余的培养基,移栽于草炭和蛭石混合(草炭与蛭石的比例为 3:1)基质中,外面扣膜保湿,1 周后,等小苗有新叶长出时,逐渐通风去掉薄膜,小苗即可正常生长发育。

1.6 卡那霉素敏感性试验

根据再生体系优化的结果,用子叶作外植体,选用 MS+ZT 2.0mg/L+IAA 0.5mg/L 为不定芽诱导培养基,在上述培养基上分别添加 0(ck),12.5,25,50,75 mg/L 的卡那霉素(Kan),试验中蔬 6 号番茄对卡那霉素的敏感性,以培养 6 周后的愈伤组织分化率和不定芽分化率为指标来测定子叶对卡那霉素的天然抗性,从而确定中蔬 6 号番茄适合的筛选压。

2 结果与分析

2.1 不同表面消毒处理对中蔬 6 号番茄种子灭菌及萌发的影响

从表 4 可以看出,不同表面消毒处理对中蔬 6 号番茄种子灭菌和萌发的影响有所不同。灭菌效果方面,用 NaClO 和 HgCl₂ 差别不大,但是从种子发芽率及幼苗的长势来看,用 NaClO 明显好于 HgCl₂。对种子杀伤力要小,幼苗健壮,颜色正常绿色。综合灭菌效果和萌发情况,以 0.7% NaClO 处理 20 min 消毒效果最好,发芽率高,污染率小于 5%。

表 4 不同消毒处理对种子的灭菌效果

处理代号	污染率 (%)	发芽率 (%)	幼苗长势
S1	40	96	健壮,子叶厚、大、浓绿
S2	3	92	健壮,子叶厚、大、浓绿
S3	0	30	较弱,子叶薄、大、稍发黄
S4	62	81	较弱,子叶薄、小、绿色
S5	15	56	较弱,子叶薄、小、稍发黄
S6	0	25	弱,子叶薄、小、稍发黄

2.2 不同的激素对比对愈伤组织的诱导及不定芽分化的影响

IAA、6-BA 和 ZT 是目前番茄组织培养中常用的 3 种激素,由于品种的差异,其配组方式和作用效果很不相同。不同激素对比对中蔬 6 号番茄愈伤组织诱导及不定芽分化的影响结果见表 5。从中可以看出,各激素对比对愈伤组织的诱导相差不大,但就所诱导出的愈伤组织的状态、不定芽的发生则差异很大。总体上看,ZT 和 IAA 配组明显优于 6-BA 与 IAA 的配组,具体表现在 ZT 和 IAA 的组合,芽分化时间较早,出芽率、正常芽率和增殖系数明显高于 6-BA 与 IAA 的组合。C5 和 C6 两种培养基

表 5 不同的激素对比对愈伤组织诱导及不定芽分化的影响

培养基编号	外植体数量(块)	出愈时间(d)	出愈率 (%)	芽分化时间(d)	出芽率 (%)	正常芽率 (%)	增殖系数
C1	60	6.6	83	30	16	34	0.8
C2	60	5.8	96	24	59	62	1.6
C3	60	5.2	94	23	52	48	1.4
C4	60	4.9	93	25	36	32	0.6
C5	60	4.5	99	20	82	78	4.8
C6	60	4.6	99	19	86	80	5.6
C7	60	5.0	98	23	74	62	2.6
C8	60	6.4	95	25	59	57	1.9

差异不大,但 C6 稍好。综合各项指标,确定 C6 即 MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 为中蔬 6 号番茄的最佳诱导分化培养基。

2.3 再生植株生根

将 3~4 cm 高的不定芽接种到生根培养基,2 周后的结果见表 6。从中可以看出,与空白 MS 培

培养基相比,添加 NAA 或 IAA 的培养基能显著提高生根率和生根数。从根的形态上看,空白 MS 培养基上,不定芽基部不膨大,形成的根白色,较长,有须根,叶色正常,为深绿色。添加 NAA 的 3 个培养基,从总体上看,不定芽基部膨大,长根率高,根多数短粗,灰色,无须根,不健壮,伸长速度慢,苗比空白 MS 上的苗矮,但不健壮,因此,对中蔬 6 号番茄来说,添加 NAA 效果不理想。添加 IAA 的 3 个培养基,从总体上看,不定芽基部稍膨大但不形成愈伤组织,根白色,较长,根多,叶色浓绿,苗粗壮;就添加 IAA 的浓度来看,在 IAA 为 0.5 mg/L 时,综合生根效果最好。故确定 MS + IAA 0.5 mg/L 为中蔬 6 号番茄最佳的生根培养基。

表 6 不同的生根培养基对生根效果的影响

处理代号	生根率 (%)	平均根数 (条)	根形态	根长度 (cm)	苗长势
R1	68.2	3.6	白、细	5.1	壮
R2	75.1	6.4	白、细	7.3	壮
R3	86.2	9.1	白、细	10.1	壮
R4	96.4	7.2	白、细	8.2	壮
R5	72.6	4.7	灰、短	1.2	弱
R6	80.1	5.9	灰、短	1.4	弱
R7	86.6	5.1	灰、短	0.8	弱

2.4 再生植株的驯化移栽

将生根苗先进行驯化,移栽于草炭与蛭石的混合基质中后加强管理,成活率可达 92%。

2.5 筛选压的确定

不同浓度的 Kan 对中蔬 6 号番茄未转化的子叶具有不同程度的抑制作用,随着 Kan 浓度的增加,愈伤组织分化率逐渐下降。由表 7 可以看出,培养 6 周后,当 Kan 浓度为 25 mg/L 时,绿色愈伤率为 11%,不定芽分化率为 6%;当 Kan 浓度为 50 mg/L 时,子叶萎缩变黄,无不定芽分化。所以选择 50 mg/L 的 Kan 作为选择未转化子叶已经足够。

表 7 不同 Kan 浓度对愈伤及不定芽诱导的抑制作用

Kan 浓度 (mg/L)	对子叶的影响	出愈率 (%)	不定芽诱导率 (%)
0	生长旺盛、色泽鲜绿,有大量愈伤组织和不定芽	99	90
12.5	子叶保持绿色,生长减慢	76	54
25	少数子叶绿色	11	6
50	子叶黄化死亡	0	0
75	子叶黄化死亡	0	0

3 讨论

3.1 关于子叶离体培养过程中产生的畸形芽、盲芽的问题

在番茄子叶的培养过程中,常见到一些仅长出 1 片粗壮的叶片而没有顶芽或有的虽有顶芽但叶片及顶芽均很肥厚、矮壮,且叶片畸形卷曲的现象,这就是所说的畸形芽和盲芽。畸形芽和盲芽发生的原因,一般认为是因为番茄子叶产生愈伤组织的分裂方式很不规则,另外与激素种类及浓度、继代培养代数、温度和光照等也有很大的关系。在本试验过程中,也发现了畸形芽和盲芽,影响再生频率,应加强这方面的研究。

3.2 关于生根壮苗的问题

生根壮苗是植物组织培养的一个极其重要的环节。根系发达、生长健壮是再生苗移栽成活的基础。生根壮苗在番茄离体培养研究中起着举足轻重的作用,也是番茄基因工程育种成功获得转基因植株的关键一环。在试验中发现,在 MS 基本培养基中添加一定量的生长激素,能显著促进生根和壮苗,但因为所用植物材料的基因型的差异,不同材料的生根培养基需要通过试验确定。

3.3 未转化细胞对卡那霉素的抗性

npt II (新霉素磷酸转移酶 II) 是基因工程中常用的选择标记基因,但不同品种(基因型)对卡那霉素的天然抗性不同。因此,在作转化前,针对不同品种作对卡那霉素的预备试验很有必要。

参考文献:

- [1] 孟祥栋,张卫华,马红,等. 番茄子叶下胚轴植株再生技术的研究[J]. 山东农业大学学报,1998,29(1):101-104.
- [2] 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):214-217.
- [3] 杨学习,张振臣,蒋士君. 番茄子叶再生系统的初步研究[J]. 河南农业科学,2003(3):26-28.
- [4] 叶志彪,李汉霞,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,1994,13(3):291-295.
- [5] 江晓玲,俞宗义,贺竹梅,等. 番茄子叶外植体转化系统的优化[J]. 云南植物研究,2004,26(1):118-120.