

茄子高频再生体系的建立与优化

李 焱¹,金丹丹²,谢立波³,李景富²

(1. 哈尔滨市农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150001;2. 东北农业大学,黑龙江 哈尔滨 150030;
3. 黑龙江省农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为建立并优化茄子高频再生体系,研究以茄子品种哈农杂茄2号和哈农杂茄3号为材料,利用不同的外植体和植物生长调节剂组合,探讨影响茄子再生频率的主要因素。结果表明:茄子最佳再生子叶最适分化培养基为MS 0+6-BA 1 mg·L⁻¹+KT 2 mg·L⁻¹;下胚轴最适分化培养基为MS 0+KT 2 mg·L⁻¹,再生苗最佳生根培养基为1/2MS+IAA 0.1 mg·L⁻¹,且下胚轴的分化效率高于子叶。

关键词:茄子;外植体;再生

中图分类号:S641.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)09-0048-05

茄子是一种重要的蔬菜,营养价值丰富,还可以用作药物,防止人体的动脉硬化。因此,茄子生产具有重大的理论和实践意义。目前由于茄子生产呈产业化、规模化发展,大面积栽培使品种单一化和高度设施化,过度连作及设施栽培的不良环境,使茄子病害迅速蔓延,危害严重,急需抗病新品种。但传统抗病育种存在栽培品种中缺乏具有抗病基因的种质资源,野生种虽具有抗病基因,但与栽培品种有性杂交困难,即使能有性杂交,也会引起杂种不育等问题;另外用传统育种方法转育抗病基因,转育时间较长,效率较低,这就使传统育种方法在茄子抗病育种方面的应用受到了很大的限制^[1-3]。

近年来,随着植物组织培养、遗传转化、抗病基因的分离克隆和植物基因工程等方面技术的进步和成熟,为茄子抗病育种提供了一条新的、更有效的途径。农杆菌介导的转基因手段已经成为基因组研究和植物育种的重要手段之一。高频再生体系的建立是农杆菌介导的转化体系的前期工作,也一直是众多研究者开展的工作之一。

该试验探讨了影响茄子再生频率和遗传转化效率的主要因素,确定茄子最佳再生和遗传转化条件,为今后茄子育种工作提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试茄子品种为哈农杂茄2号和哈农杂茄3号,由哈尔滨市农业科学院茄子研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 茄子无菌苗的获得 茄子种子经流水冲洗后,30℃水中浸泡2 d。用70%酒精消毒10 s,然后放在10% NaClO中浸泡10 min左右,期间不断摇动,用无菌蒸馏水冲洗3~4遍,再用无菌铝制吸干水分。接种在MS培养基上(0.8%琼脂,30 g·L⁻¹蔗糖,pH5.8)。培养温度为26℃。先放在黑暗条件下培养至露白,然后转至光照条件下培养,光照为16 h·d⁻¹^[2-3]。

1.2.2 不定芽的诱导 外植体的获得:选取12 d 妙龄的茄子无菌苗的子叶和下胚轴为外植体,子叶切成5 mm×5 mm的叶块,下胚轴切成6~8 mm的切段,接种到不同分化培养基上,26℃,16 h·d⁻¹光照,诱导愈伤组织和不定芽的分化,每个处理组合接种30块外植体,试验设3次重复,15 d继代1次,40 d后统计出愈率和分化率,确定最适用的分化培养基^[4]。

培养基:以MS0(MS无机+B5有机+蔗糖 g·L⁻¹+pH5.8+琼脂0.8%)为基本培养基,附加不同浓度的激素,共9个处理(见表1)。

6-BA和KT对不定芽分化的影响:将6-BA设了3个浓度,分别为1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹,KT浓度为2.0 mg·L⁻¹,对外植体在各个激素浓度下的分化率(IAA浓度为0 mg·L⁻¹)进行分析;此外,通过两个品种的子叶与下胚轴在9种诱导培养基上的平均分化率分析外植体类型对不定芽分

收稿日期:2014-04-16

第一作者简介:李焱(1972-),女,黑龙江省绥化市人,硕士,研究员,从事蔬菜作物遗传育种研究。E-mail:eggplant_2010@163.com。

通讯作者:李景富(1942-),男,黑龙江省绥化市人,学士,教授,从事蔬菜作物遗传育种研究。E-mail:Ljif_2005@126.com。

化的影响。

表 1 不定芽诱导培养基中的激素组成
Table 1 Different concentration of PGR in adventitious shoots inducing medium

培养基编号 No.	激素浓度/mg·L ⁻¹ Concentration of hormone		
	6-BA	IAA	KT
F1	0	0	2.0
F2	0	0.1	2.0
F3	1.0	0	0
F4	1.0	0.1	0
F5	2.0	0	0
F6	2.0	0.1	0
F7	3.0	0	0
F8	3.0	0.1	0
F9	1.0	0	2.0

1.2.3 不定芽的生根培养 待不定芽长到 3~4 cm 时,取生长健壮的再生植株,切除基部的愈伤组织,转至诱导生根的培养基上,试验设计 4 种生根培养基,以 1/2MS 为基本培养基,激素及其配比分别为 NAA(0 和 0.1 mg·L⁻¹), IAA(0、0.1、0.2 mg·L⁻¹),每个处理接种 30 株,20 d 后调查生根率,比较不同培养基的诱根效果,确定最适合根分化培养基^[3-5]。

1.2.4 再生植株驯化移栽 待再生植株根系发达后,进行驯化移栽。打开瓶膜炼苗 7 d 左右,然后取出,洗干净琼脂,移栽到盛幼灭菌土的营养钵中。在苗的上面套袋保湿,每天叶面喷雾。待新叶长出后,撤掉袋,放到温室进行管理。

表 3 不同激素组合对子叶外植体愈伤组织及分化芽的影响

Table 3 The effect of different constitution of hormone on callus and shoot differentiation from cotyledons

培养基编号 No.	接种外植体数 Number of explant inoculated	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	分化率/%Differentiation rate	
			哈农杂茄 2 号 Hanongzaqie 2	哈农杂茄 3 号 Hanongzaqie 3
F1	90	100	16.67 c	23.33 c
F2	90	100	25.56 c	27.78 bc
F3	90	100	17.78 c	22.22 c
F4	90	100	16.67 c	20.00 cd
F5	90	100	47.78 a	38.89 b
F6	90	100	35.56 b	27.78 bc
F7	90	100	6.67 d	10.00 de
F8	90	100	5.56 d	7.78 e
F9	90	100	50.00 a	56.67 a

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对茄种子叶愈伤组织和不定芽分化的影响

子叶接种在培养基上,其边缘慢慢上卷,接种 10 d 后开始出现愈伤组织,所设计的 9 种培养基,出愈率均可达 100%。随着时间的推移,愈伤组织的生长和分化出现差异。愈伤组织可以分为 3 种类型(见表 2),其中只有 I 型具有较高的分化能力,不定芽可以直接从愈伤组织上分化出来;II 型愈伤组织疯长,抑制了芽的分化,分化出的不定芽往往畸形化;III 型愈伤组织没有分化能力。

由表 3 可以看出,不同培养基上的芽分化率不同;在 F8 培养基上,其分化率最低,只有 5.56%和 7.78%。而在 F9 培养基上,2 个茄子品种的子叶外植体均达到了最大分化率,分别为 50.00%和 56.67%。因此确定最佳子叶诱导分化培养基为 F9,即 MS0+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹。此外,试验结果还表明,子叶的再生存在极性,靠近子叶柄的部位较其它部位容易再生成芽。

表 2 愈伤组织类型以及形态特征
Table 2 Types and characters of callus

类型 Types	颜色 Color	大小 Size	状态 State	生长速度 Growth speed
I	淡绿色	小	紧密	慢
II	绿色至深绿色	大	松软水浸状	快
III	白色或灰褐色	大	团状	较快

2.2 不同激素组合对茄子下胚轴愈伤组织和不定芽分化的影响

下胚轴接种在不同培养基上,出现不同的分化状态:(1)下胚轴保持绿色,两端切口处膨大后出现硬实愈伤,进一步培养,一端可分化出芽,但是由于愈伤组织生长过旺,芽的生长速度受到抑制;(2)下胚轴两端切口愈伤很少,一端可直接经少量愈伤组织分化成芽,芽的生长速度快,质量好;(3)膨大很快的下胚轴,随着时间的推移,逐渐

透明、水浸化,没有分化能力。接种在 F1 培养基上的下胚轴大都呈第二类状态,不定芽的分化率也最高(见表 4)。哈农杂茄 2 号为 65.56%,哈农杂茄 3 号为 60.00%。因此确定下胚轴最佳诱导分化培养基为 F1,即 MS 0+KT 2.0 mg·L⁻¹。试验中还发现,下胚轴的再生也具有极性,即下胚轴的上端比下端容易诱导出芽。因此以下胚轴为外植体建立再生体系时,应选取下胚轴上端即靠近子叶的茎段,舍弃下胚轴的中间和下端部位。

表 4 不同激素组合对下胚轴外植体愈伤组织及分化芽的影响

Table 4 The effect of different constitution of hormone on callus and shoot differentiation from hypocotyls

培养基编号 No.	接种外植体数 Number of explant inoculated	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	分化率/% Differentiation rate	
			哈农杂茄 2 号 Hanongzaqie 2	哈农杂茄 3 号 Hanongzaqie 3
F1	90	100	65.56 a	60.00 a
F2	90	100	58.89 a	54.44 a
F3	90	100	31.11 b	28.89 b
F4	90	100	24.44 bc	31.11 b
F5	90	100	18.89 bcd	23.33 bc
F6	90	100	20.00 bcd	15.56 cde
F7	90	100	12.22 cd	10.00 de
F8	90	100	6.67 d	7.78 e
F9	90	100	26.67 bc	21.11 bcd

2.3 细胞分裂素对不定芽分化的影响

由图 1 和图 2 可以看出,6-BA 和 KT 都能诱导不定芽的分化,但对不同外植体的诱导效率有一定的差异。6-BA 诱导子叶分化效果明显,随着 6-BA 浓度的增加,芽分化率升高,但是浓度过高(3.0 mg·L⁻¹),愈伤组织生长过旺,抑制芽分化,导致芽分化率急剧下降。因此选用 6-BA 诱

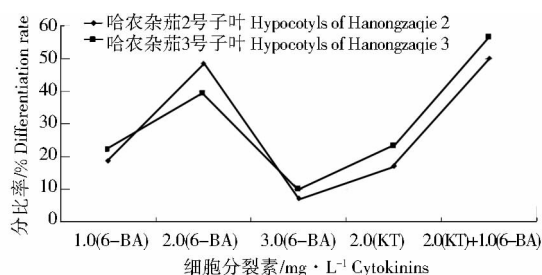


图 1 不同细胞分裂素种类和浓度对子叶不定芽分化的影响

Fig. 1 The effect of different cytokinins and concentration on shoots regeneration in cotyledons

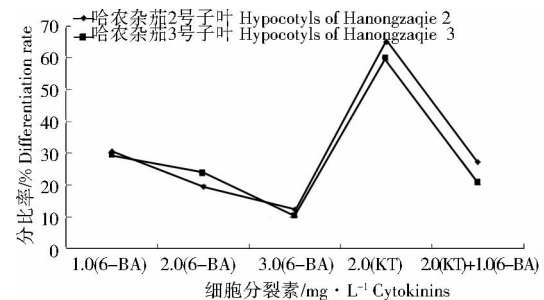


图 2 不同细胞分裂素种类和浓度对下胚轴不定芽分化的影响

Fig. 2 The effect of different cytokinins and concentration on shoots regeneration in hypocotyls

导子叶芽分化时要适当降低其浓度,试验采用低浓度的 6-BA 配合施用诱导活性稍弱的 KT,收到良好效果,子叶芽分化率达到所有组合中的最高值。

6-BA 也可以诱导下胚轴芽分化,但是诱导率较低,而用 KT 诱导,则可明显提高芽分化率。试验表明 6-BA 适宜用作子叶的诱导,而 KT 适宜

用作下胚轴的诱导。此外,选用不同的细胞分裂素时要考虑所使用的外植体类型。

2.4 外植体类型对不定芽分化的影响

两个品种的子叶和下胚轴在 F9 诱导培养基上的平均分化率见图 3,从中可以看出,同一品种的不同外植体其不定芽分化率有一定的差异,两个品种均表现为下胚轴比子叶外植体有更高的芽分化率。试验中观察到,下胚轴的愈伤组织和不定芽的分化均早于子叶,所分化形成的不定芽多是单生芽,芽的生长速度快、长势好。而子叶分化形成的不定芽多是丛生芽,丛生芽间的生长竞争,限制了各个芽的生长,使长成正常植株几率较低、时间延长。此外,子叶和下胚轴均表现为极性再生,即子叶的叶柄部位比其它部位更容易诱导出芽;下胚轴接近子叶端容易诱导出芽,而另一端只诱导出愈伤组织。

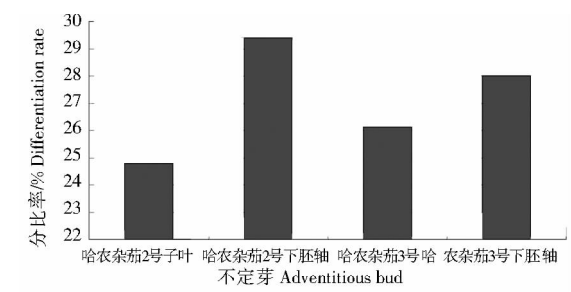


图 3 不同外植体对不定芽分化的影响
Fig. 3 The effect of different types of explants on shoots regeneration

2.5 生根培养基的筛选

将幼苗转入生根培养基后 7 d 左右即可生根,从基部边缘首先长出主根,在主根上进一步长出长短不一的愈伤组织,从而抑制了根的形成。由表 5 可以看出,IAA 对根的形成表现明显的促

表 5 不同培养基的诱根效果

Table 5 The effect of different mediums on root induction			
培养基编号 No.	NAA 浓度/ mg·L ⁻¹ Concentration of NAA	IAA 浓度/ mg·L ⁻¹ Concentration of IAA	生根率/% Percentage of root induction
R1	0	0	66.7
R2	0.1	0	46.7
R3	0	0.1	100
R4	0	0.2	80

进作用,但是要控制其浓度,IAA 为 0.1 mg·L⁻¹ 时生根率可达 100%,生根质量好,浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 以上时,出现愈伤组织生根率反而下降。

2.6 再生植株的驯化移栽

待小植株根系发达后,进行驯化移栽,放到温室中进行正常管理,从调查结果可知,成活率达 95%。

3 结论与讨论

3.1 结论

研究表明,最佳子叶诱导分化培养基为 MS 0+BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 2.0 mg·L⁻¹;下胚轴最佳诱导分化培养基为 MS 0+KT 2.0 mg·L⁻¹;以下胚轴为外植体建立再生体系时,应选取下胚轴上端靠近子叶的茎段;6-BA 适宜用作子叶的诱导,随着 6-BA 浓度的增加,其诱导子叶的分化效率增高,但是浓度高到 3 mg·L⁻¹ 时,愈伤组织生长过旺,抑制芽分化,导致芽分化率急剧下降,因此选用 6-BA 诱导子叶芽分化时要适当降低其浓度。KT 的诱导效果不如 6-BA 和 ZT 强,可防止诱导后期的愈伤组织疯长,适宜用作下胚轴的诱导,低浓度的 6-BA 配合施用诱导活性稍弱的 KT,子叶芽最高分化率可达 70% 以上;综合考虑,不定芽分化率和不定芽生长状态两方面的因素,下胚轴为茄子再生体系建立的最适外植体。该试验还确定了茄子再生苗生根培养基为 1/2 MS+IAA 0.1 mg·L⁻¹。再生根要控制愈伤组织的生成,根部带有愈伤组织的再生苗,移栽后不易成活,再生植株的驯化移栽成活率达 95%。

3.2 讨论

3.2.1 外植体的选择与分化 不同外植体再生能力的不同是组织培养中常见现象。理论上讲,每一个植物细胞都有全能性,但并不是所有体细胞都能够再生植株,不同组织由于分化程度和生理状态等不同,其脱分化的能力不同,即使是同一组织器官的不同部位也有明显差异。目前人们已先后从器官分化、胚状体诱导、花药培养以及原生质体培养等多方面着手研究茄子的再生^[6-9],其中通过子叶、下胚轴诱导再生芽,具有再生周期短,变异低的优势。有研究报道,下胚轴的再生能力优于子叶^[10],与该试验结论相一致。试验中两个茄子品种,下胚轴的再生能力均优于子叶,而且出芽时间短,再生芽健壮,很少有畸形芽的发生。因此,试验确定 12 d 苗龄的下胚轴为转化受体

材料。

3.2.2 激素对再生的影响 不同种类的激素组合及配比对同一植物的组织培养有不同的效果,选用适合的激素组合和适宜的浓度对植物的再生非常重要。目前经常使用的激素有 ZT、6-BA、IAA、NAA、和 KT。6-BA 和 ZT 是组织培养中广泛应用的生长调节物质,尤其是 6-BA 在茄科植物如辣椒^[11]和番茄中应用都有良好的效果。IAA 和 NAA 则能促进细胞的生长和分化,促进愈伤的形成和诱导根的分化。目前茄子离体培养多数采用 MS 培养基,也有采用 MS 大量元素 + B5 微量元素^[12]基本培养基中附加的激素种类或不同激素配比以及其它生长因子,对茄子再生有较大影响。茄子离体培养常用的激素有 6-BA、KT、IAA、ZT 和 NAA,愈伤组织的诱导、器官的分化和胚状体对激素不同组合和比例的要求决定了分化的方向。其中器官发生主要受到细胞分裂素的刺激,从而提高诱导频率。余波澜等^[10]在 MS 中分别添加 6-BA、IAA、ZT 及其组合研究表明,芽诱导率随 6-BA 浓度的增加而升高,但浓度过高愈伤组织生长过旺,会大大降低芽分化。

参考文献:

- [1] 程继鸿,赵福宽.弱光条件下茄子花药培养与再生体系的建立[J].北京农学院学报,2000,16(2):22-26.
- [2] 张英兰,李耿光.两种茄子子叶诱导胚状体和植株再生[J].植物生理学通讯,1987(4):56.
- [3] Gleddie S, Keller W, Setterfield G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant) [J]. Canadian Journal of Botany, 1983, 61: 656-666.
- [4] Kamat MG, Rao PS. Vegetative multiplication of eggplants (*Solanum melongena*) using tissue culture techniques [J]. Plant Science Letters, 1978, 13: 57-65.
- [5] 许勇,王福钧,周长久.粘毛茄子紫叶原生质体的培养及植株再生[J].植物生理学报,1990(4):27-29.
- [6] Alicchio R, Antonioli C, Palenzona D. Karyotypic variability in plants of *Solanum melongena* regenerated from callus grown in presence of culture filtrate of *Verticillium dahlia* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1984, 67: 267-271.
- [7] Matsuoka H, Hinata K. NAA-Induced Organogenesis and Embryogenesis in Hypocotyl Callus of *Solanum melongena* L. [J]. Journal of Experimental Botany, 1979, 30: 363-370.
- [8] 颜敬昌.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1989:289-292.
- [9] Saxena PK, Gill R, Rashid A. Plantlet formation from isolated protoplasts of *Solanum melongena* L. [J]. Protoplasma, 1981, 106: 355-359.
- [10] 余波澜,张利明,孙勇如,等.茄子子叶和下胚轴的组织培养和植株再生[J].植物生理学通讯,2003,39(4):317-320.
- [11] 黎定军,张宝玺,赵开军,等.辣椒子叶高效植株再生体系的建立[J].园艺学报,2002,9(1):25-29.
- [12] 邹克勤,张银东.几丁质酶和抗菌肽 D 双价基因转化茄子的研究[J].热带作物学报,2001,34(2):57-61.

Establishment and Optimization of High-frequency Regeneration System of Eggplant

LI Ye¹, JIN Dan-dan², XIE Li-bo³, LI Jing-fu²

(1. Harbin Academy of Agriculture Sciences, Harbin, Heilongjiang 150001; 2. Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030; 3. Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin, Heilongjiang 150023)

Abstract: In order to establish and optimize the high-frequency regeneration system of eggplant, taking cotyledonary petiole and hypocotyl explants of Hanongzaqie 2 and Hanongzaqie 3 as materials, the shoot regeneration frequencies of two eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars were examined to discuss the factors affecting regeneration rate. The results showed that the optimum shoot inducing mediums for cotyledons was MS 0 + 6-BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; the optimum shoot inducing mediums for hypocotyls was MS 0 + KT $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the best rooting medium for regeneration seedling was $1/2\text{MS} + \text{IAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. And the differentiation of hypocotyls was higher than that of cotyledons.

Key words: eggplant; explants; regeneration