

加工番茄离体再生体系研究

孙秀霞,于 超,赖黎丽,薛 琳

(新疆石河子蔬菜研究所,新疆 石河子 832000)

摘要:为建立一套优化的适于加工番茄遗传转化的高效离体再生体系,以加工番茄石红 303 的子叶、下胚轴、叶片作为外植体,研究了不同激素及浓度、不同外植体材料对愈伤组织诱导、不定芽分化及生根的影响。结果表明:激素的种类和浓度对加工番茄外植体出愈率的影响没有差异,但是诱导形成的愈伤组织形态和不定芽存在差异。选取子叶作为外植体,培养基组成为 $MS+6-BA3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+IAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最有利于愈伤组织和不定芽的形成;不定芽在生根培养基 $1/2MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} IAA$ 上生根效果最佳,并能发育成完整的小植株。

关键词:加工番茄;再生体系;子叶;愈伤组织;不定芽分化

中图分类号:S641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)11-0011-05 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.11.0011

加工番茄是世界上许多国家和地区人们日常生活中的传统食品,是番茄食品工业的基础原料,具有适应性广、栽培容易、产量高等特点,因其营养丰富、风味独特、加工制品种类繁多、番茄红素含量高,已成为重要的功能食品,在世界蔬菜的生产和消费中位居首位^[1]。我国加工番茄主要集中在新疆、甘肃、宁夏、内蒙古等地,其中新疆地区光热资源丰富、昼夜温差大、气候干燥,十分适宜加工番茄的生长发育,已发展成为全球第二大番茄主产区。新疆的加工番茄产业以制酱为主,生产的番茄酱以番茄红素高、黏度高、可溶性固形物高、霉菌含量低而闻名于世,已成为新疆特色型“红色”支柱产业^[2-3]。

相对于鲜食番茄,加工番茄的研究起步较晚,生产用品种单一且经过多年种植已出现抗病虫、品质严重下降的趋势,遗传背景狭窄,新品种培育受到限制,与国外存在很大差距^[4-5]。随着现代生物技术的发展,细胞工程和基因工程技术为品种改良和突破性育种开辟了新途径,甚至加速了新品种选育进程^[6]。开展这些工作都离不开高效的离体再生条件,其作为离体培养和转基因操作的重要技术基础,离体再生体系已成为基因工程育

种、杂种优势固定和优异种质保存的前提。当前加工番茄离体再生体系研究还较少,且主要集中在 B02、B04、里格尔 87-5 和亚心 98-1 等老品种之间^[7-9],不能满足当前开展遗传转化的需求。本研究选用品质好、产量高、深受消费者喜爱的石红 303 为材料,分别以下胚轴、子叶和叶片作为外植体,系统地研究了不同外植体和激素种类对加工番茄再生体系的影响,以期建立高效的离体再生体系,为进一步快速繁殖、固定杂种优势和遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种为石红 303,由新疆石河子蔬菜研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制 种子发芽培养基为 $1/2 MS$ 培养基。愈伤和不定芽诱导培养基以 MS 为基本培养基,添加不同种类和浓度的激素配比(见表 1)。生根培养基以 $1/2MS$ 为基本培养基,添加不同种类和浓度的激素(见表 2)。以上培养基均添加 $7.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, $pH5.8$,于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 20 min ,放置 $1\sim 2\text{ d}$ 后使用。

1.2.2 外植体的制备及后续培养 (1)无菌苗:取健康、饱满的种子浸于 10% 的次氯酸钠溶液中灭菌 20 min ,无菌水冲洗 3 次,灭菌的干燥滤纸吸干残液,接种于 $1/2MS$ 培养基上。前 $4\sim 7\text{ d}$ 暗培养,待大部分种子发芽转至光下培养,每天光照 16 h ,培养温度为 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。取培养约 10 d 无菌苗,子叶去除叶尖和叶柄,剩余部分切成

收稿日期:2016-08-04

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2012BAD02B04);农业部公益性行业科研专项资助项目(201303115);兵团应用基础研究计划资助项目(2015AG008)

第一作者简介:孙秀霞(1985-),女,甘肃省天水市人,硕士,助理研究员,从事加工番茄遗传育种研究。E-mail:sunxiuxia1983@sina.com。

通讯作者:薛琳(1964-),男,陕西省神木县人,学士,研究员,从事蔬菜育种与栽培技术研究。E-mail:xuelin1806@163.com。

0.5 cm×0.5 cm 大小叶盘,下胚轴切为长约 0.5 cm 的切段。(2)叶片:选取在田间正常生长的健康植株的幼嫩叶片,自来水冲洗 30 min,转入超净工作台,75%酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,0.2%氯化汞溶液中轻摇 5 min 后,无菌水冲洗 3 次,无菌滤纸吸干残液,去除叶尖和叶柄,剩余部分切成 0.5 cm×0.5 cm 大小叶盘。

将处理好的子叶、下胚轴和叶片分别接种于愈伤和不定芽诱导培养基上,每个培养皿中接种 15~20 个,每个处理 3 次重复,在温度(25±1)℃,光照 16 h,光照强度 1 500 lx 培养条件下培养。培养约 20 d 时统计愈伤组织诱导率,35 d 时统计不定芽诱导率,其中:愈伤组织诱导率(%)=有愈伤组织形成的外植体数/接种外植体数×100;不定芽诱导率(%)=分化出不定芽的愈伤组织数/接种总外植体数×100。

1.2.3 生根培养 选取顶芽正常、生长健壮的再生幼芽(≥2.0 cm),将基部愈伤组织及培养基完全切除,转接到生根培养基上培养,其中每个处理接种 20 个芽,培养条件同上。培养 20 d 后观察根生长状况,统计生根率,其中:生根率(%)=有根形成的芽数/接种芽数×100。

1.2.4 炼苗及移栽 当幼苗根的长度达到 6~9 cm,须根较多时,将封口膜打开炼苗 2~3 d,取

出小苗洗掉根部的培养基,移入高压灭菌后的基质中(蛭石:草炭=1:2)并覆膜保湿,7~10 d 后,可逐步放风,最后除去塑料薄膜,让其继续生长发育至开花结果。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对加工番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响

植物的组织培养通常需要细胞分裂素和生长素配合使用,本试验选取 6-BA 作为细胞分裂素,配合使用的生长素有 NAA、IAA 和 IBA,从表 1 看出,6-BA 和 NAA 搭配使用,可获得最高的愈伤组织诱导率(98.0%~100.0%),但大都为黄白色的愈伤组织,体积大且松软湿润,多伴有不定根的生成(见图 1B),不定芽分化率非常低(4.1%~8.0%)。6-BA 和 IAA 搭配使用,可获得较高的愈伤组织诱导率(67.0%~92.4%),且诱导的愈伤组织呈淡绿色或绿色,结构致密,绿色芽点多且分生能力强,具有最高的不定芽分化率(21.0%~96.0%)。6-BA 与 IBA 组合时,愈伤组织诱导率介于 54.4 与 85.8 之间,愈伤组织大都为淡绿色、易散的水渍状小颗粒,生长速度慢,分生能力差,不定芽分化率较低(14.8%~66.3%)。即当细胞分裂素固定为 6-BA 时,3 种生长素的综合诱导效果为 IAA>IBA>NAA。

表 1 不同激素组合对愈伤组织和不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different hormones and concentrations on callus and bud induction

编号 No.	激素/mg·L ⁻¹ Hormone					愈伤组织诱导率/% The rate of the callus induction			不定芽诱导率/% The rate of adventitious buds induction		
	6-BA	ZT	NAA	IAA	IBA	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	叶片 Leaf	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	叶片 Leaf
1	1.0	/	0.1	/	/	100.0	100.0	98.0	8.0	4.1	6.3
2	/	1.0	/	1.0	/	100.0	91.3	82.8	81.5	45.5	50.0
3	3.0	/	/	0.2	/	92.4	67.0	85.0	96.0	21.0	58.2
4	1.5	/	/	/	0.2	85.8	78.7	54.4	66.3	14.8	32.9

近年来,ZT 在番茄的再生体系和遗传转化中得到广泛的应用。将 ZT 与 IAA 搭配使用,结果显示可获得较高的愈伤组织诱导率(82.8%~100.0%),诱导的愈伤组织呈淡绿色或绿色,结构致密,绿色芽点多且分生能力强,具有较高的不定芽分化率(45.5%~81.5%)。当生长素固定为 IAA 时,6-BA 的综合诱导效果优于 ZT,即最适合石红 303 的愈伤和不定芽诱导培养基是:MS+6-BA3.0 mg·L⁻¹+IAA0.2 mg·L⁻¹。分析 4 个不

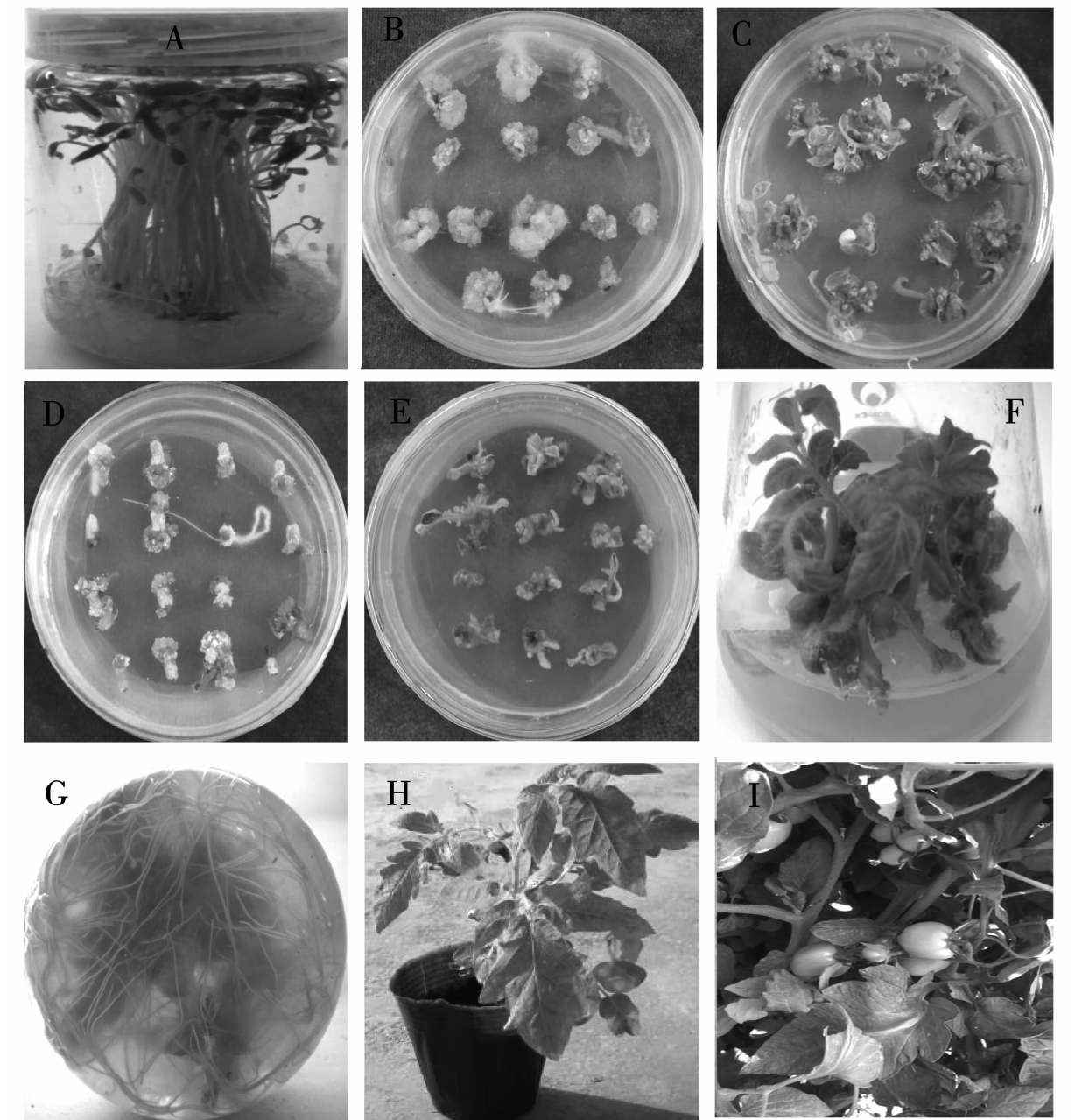
同激素组合的愈伤组织和不定芽诱导效率,结果显示不同激素配比浓度对外植体愈伤组织的诱导影响不大,但对不定芽分化影响较大,存在较大的差异。

2.2 外植体类型对愈伤诱导和芽分化的影响

接种 7 d 后,子叶和叶片的切口处开始卷起,叶片膨大,边缘或者下部开始形成愈伤组织;下胚轴开始肿胀,两端形成肉眼可见的愈伤组织,外形呈哑铃状,培养约 20 d 时,愈伤组织诱导均出现

高峰。接种约 14 d 时,外植体上开始陆续分化出芽点,这些芽点能进一步发育成苗或叶,培养约 35 d 时,不定芽分化出现高峰。分别统计三类外植体的愈伤组织和不定芽诱导率,结果显示同一

品种的不同外植体愈伤组织诱导率差异不明显,不定芽分化率差异较大,且外植体分化率最高的是子叶,其次是叶片,最后是下胚轴。



A: 无菌苗;B:6-BA+NAA 诱导的愈伤组织;C:子叶诱导愈伤与不定芽;D:下胚轴诱导愈伤与不定芽;E:叶片诱导愈伤与不定芽;F:继代培养;G:不定芽生根;H:再生苗移栽;I:再生苗开花结果
A:sterile seedling;B:callus induced by 6-BA and NAA;C:callus and adventitious bud induced from cotyledon;D:callus and adventitious bud induced from hypocotyl;E:callus and adventitious bud induced from leaf;F:subculture;G:rooting of adventitious bud;H: transplant of the regrowth;I: blossom and yield fruit of the regenerated plant

图 1 加工番茄的离体再生体系

Fig. 1 *In vitro* regeneration system for processing tomato

2.3 不同激素种类对不定芽生根的诱导

将不定芽转入附加不同生长素的山根培养基上培养,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小侧根,进而发育成完整的小植株。培养 20 d 统计生根率,结果显示(见表 2):NAA 诱导的山根比较粗壮稀少,但愈伤化极其严重,芽苗生根后生长缓慢,甚至死亡;IAA 和 IBA 诱导生根能力明显好于 NAA,生成的山根细长盘曲,须根较多。其中加入 0.1 mg·L⁻¹ IAA 的培养基生根速度快,再生苗茎粗、叶多、生长势强,非常适合用于加工番茄离体再生体系中不定芽的山根诱导。

表 2 不同激素种类对不定芽生根的影响

Table 2 Effects of different hormones on rooting of adventitious bud

编号 No.	激素 Hormone	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentrations	不定芽生根率/% The rate of rooting of adventitious bud
1	NAA	0.1	93.0
2	IBA	0.2	99.0
3	IAA	0.1	100.0

2.4 再生苗移栽

移栽成活是再生苗的难关之一,待再生试管苗根系发达、茎秆粗壮后,进行驯化移栽。打开封口膜,将其放置在待移栽的环境中炼苗 2~3 d,取出并洗掉根部的培养基,移栽到盛有灭菌基质的营养钵中覆膜保湿,7~10 d 后,可逐步放风,最后除去塑料薄膜。对基质进行灭菌处理,有效防止了土传细菌和真菌的感染,利用此种方法,移栽成活率高达 90%,定植后可正常发育至开花结果。

3 结论与讨论

在植物组织培养中,外源激素的使用是必不可少的,其种类和浓度是影响植物离体再生能力的关键因素。本研究对细胞分裂素 6-BA、ZT,生长素 IAA、IBA、NAA 进行了筛选,结果显示激素的种类和浓度对加工番茄外植体出愈率的影响没有差异,但是诱导形成的愈伤组织形态和不定芽存在差异。根据愈伤组织的形态和结构,可分为 3 类:I 型呈淡绿色或绿色,结构致密,生长速度快,分生能力强;Ⅱ型呈淡绿色,霜状或易散的水渍状颗粒,生长速度慢,分生能力差;Ⅲ型呈灰白

色或灰褐色,松软湿润,生长速度最快,分生能力极差。本研究中,当生长素为 NAA 时,大都产生Ⅲ型愈伤组织,不定芽分化率非常低(4.1%~8.0%);生长素为 IAA 时,大都产生 I 型愈伤组织,不定芽分化率最高(21%~96%);生长素为 IBA 时,大都产生Ⅱ型愈伤组织,不定芽分化率较低(14.8%~66.3%),其综合诱导效果为 IAA>IBA>NAA,这与孟祥栋^[10]、陈丽萍^[8]等在番茄中研究结果一致。比较 6-BA 和 ZT 的诱导效果,结果显示:都可获得较高的愈伤组织诱导率,大都为 I 型愈伤组织,不定芽分化率较高,且差异不明显。选取子叶和真叶作为外植体,6-BA 的诱导效果略高于 ZT;选取下胚轴作为外植体,ZT 的诱导效果略高于 6-BA,这与高南^[11]等的研究结果一致。有研究表明,IAA 和 6-BA 结合使用会提高番茄外植体的再生频率^[12-13],也有研究表明 ZT 诱导番茄再生的效率高于 6-BA^[14-15],造成这种差异的主要原因在于激素诱导愈伤和不定芽分化有一定的基因型依赖性^[16]。

植物组织培养中使用的外植体种类很多,有花药、叶片、原生质体、子叶和下胚轴,在以往的研究中,对番茄外植体的选择各有不同,其中以下胚轴和子叶为外植体再生植株的报道较多。已有研究表明,番茄的植株再生能力一般为叶片>子叶>下胚轴,不同品种、不同外植体的再生频率各不相同^[17-18]。以加工番茄石红 303 的子叶、下胚轴、叶片作为外植体进行离体再生,结果显示同一品种不同外植体愈伤组织诱导率差异不明显,不定芽分化率差异较大,其离体再生能力为子叶>叶片>下胚轴。子叶的再生频率高于下胚轴,这与张丽华、陈丽萍等人在加工番茄中的研究结果一致^[7-8];子叶的再生频率高于叶片,这与人研究结果不同,造成这种差异的主要原因在于叶片的来源与处理不同。在本研究中,叶片来源于田间,后期的灭菌处理中使用了氯化汞,其抑制了 IAA 对细胞壁的影响和幼苗生长^[19-20]。通过此种来源的叶片离体再生,可以解决育种上一些特殊可贵材料的保存与繁殖问题。加工番茄离体再生受到内因和外因的共同影响,内因包括植物组织的基因型、生理状态和发育时期等,而外因则包括培养基、培养条件、继代时间和接种方式等。本研究通过选择最佳的外植体及发育时期、激素种

类及配比、培养条件及炼苗移栽途径,建立了高效的离体再生体系,为加工番茄细胞工程和基因工程的研究与开发提供了可靠的理论依据和相应的技术保障。

参考文献:

- [1] 李君明,徐合金,周永健. 加工番茄生产的现状及品种遗传改良浅析[J]. 中国蔬菜, 2001(6):52-53.
- [2] 庞胜群,王祯丽,张润,等. 新疆加工番茄产业现状及发展前景[J]. 中国蔬菜, 2005(2):39-41.
- [3] 陈兵. 中国新疆番茄产业发展现状分析[J]. 新疆财经大学学报, 2011, 48(3):16-20.
- [4] 齐士发,石强,王新燕,等. 新疆加工番茄产业原料生产中存在的问题与对策[J]. 农业科技通讯, 2008(11):81-85.
- [5] 庞胜群,王祯丽,张润. 对新疆加工番茄新品种研发的思考[J]. 长江蔬菜, 2005(6):53-54.
- [6] 赵开平,周雪梅,唐有万,等. 生物技术在蔬菜育种上的应用现状及研究方向[J]. 西昌学院学报:自然科学版, 2008, 22(4):15-17.
- [7] 张丽华,程智慧,李海燕,等. 加工番茄子叶和下胚轴离体植株再生的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(7):106-110.
- [8] 陈丽萍,张丽华,程智慧. 加工番茄离体再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2007, 16(1):162-167.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 高南,吴香玉,施卫明. 中蔬四号番茄高效再生体系的建立[J]. 土壤, 2008, 40(6):1002-1007.
- [12] Rick C M. The potential of exotic germplasm for tomato improvement[M]//Vasil I K, Seowcrofl W R, Frey K J. Plant improvement, somatic cell genetics. New York: Academic Press, 1982; 1-28.
- [13] Qiu D L, Diretto G, Tavarza R, et al. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*[J]. *Sci Hort.* , 2007, 112:172-175.
- [14] Jia GX, Zhu ZQ, Chang FQ, et al. Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance[J]. *Plant Cell Rep.* , 2002, 21:141-146.
- [15] 欧阳波,李汉霞,叶志彪. ZT 和 IAA 对番茄子叶再生的影响[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3):217-218.
- [16] Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, et al. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent[J]. *Tag Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(2):231-238.
- [17] 罗素兰,田嘉祺,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, 2003, 20(4):314-316, 323.
- [18] 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.
- [19] Inouhe M, Nevius D J. Auxin-enhanced glucan autohydrolysis in maize coleoptile cell walls[J]. *Plant Physiol.* , 1991, 96(1):285.
- [20] Kiyosue T, Kamada H, Harada H. Induction of somatic embryogenesis from carrot seeds by hypochlorite treatment[J]. *Plant Tissue Culture Letters*, 1989, 6(3):138-143.

Study on Regeneration System of Processing Tomato *in vitro*

SUN Xiu-xia, YU Chao, LAI Li-li, XUE Lin

(Vegetable Research Institute of Xinjiang Shihezi, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: In order to establish a good kind of system suitable for the hereditary and translation of the processing tomato, cotyledons, hypocotyls and true leaf of processing tomato cultivar Shihong303 were used as explants and cultured on the medium with different hormones and concentrations to study their effect on callus induction, bud differentiation and radication. The results showed that callus could be induced in all kinds medium, but there were obvious differences on callus configuration and bud differentiation. Taking cotyledons as explant, $MS+6-BA3.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}+IAA0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ was suitable for callus induction and adventitious bud differentiation; The regenerated buds could develop normally after roots induced on $1/2MS+IAA 0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$.

Keywords: processing tomato; regeneration system; cotyledon; callus; bud differentiation