

中蔬四号番茄高效再生体系的建立^①

高南^{1,2}, 吴香玉³, 施卫明^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3 武汉大学, 武汉 430072)

摘要: 本试验建立了中蔬四号番茄的再生频率高、所需时间短、试管苗状态好的高效再生体系。具体培养流程如下: 以下胚轴为外植体, 在 Murashige 和 Skoog (MS) + 1.0 mg/L 玉米素 (ZT) + 0.1 mg/L 3-吲哚乙酸 (IAA) 或 MS + 2.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤 (BA) + 0.2 mg/L IAA 上进行不定芽诱导培养 21 天后, 继代一次, 转接到 MS + 0.1 mg/L IAA 中进行生根; 炼苗 2~3 天, 移栽至蛭石中, 最后移栽到菜园土中培养。

关键词: 中蔬四号; 组织培养; 激素浓度; 培养时间; 遗传转化

中图分类号: S641.2; Q945.39

近年来, 我国设施农业快速发展, 给农民带来了显著的经济效益。但是设施农业在迅速发展的同时, 也出现了一系列问题, 如引起土壤酸化、次生盐渍化、养分不平衡等, 从而引起作物生长不良与农产品品质下降^[1-4]。尽管设施农业土壤本身的养分含量很高, 但在这些土壤化学逆境条件下, 番茄等蔬菜的生长仍需投入大量的肥料^[1, 3], 容易引起环境污染^[1]。番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 是全世界栽培最为普遍的果菜之一。中蔬四号番茄在我国大部分地区种植, 产量高、品质好、抗病性强, 但是喜肥水^[5]、耐盐性差^[6], 不适合在含化学逆境的土壤上种植。目前, 充分利用基因工程手段创造番茄新品种受到了极大的重视^[6-10]。如能对中蔬四号番茄进行遗传改造, 提高养分的利用率并提高番茄的抗逆性, 则可更广泛地应用于生产中。虽然番茄的再生体系研究较多, 但是不同基因型番茄的再生条件有很大的差异^[8-17]; 我国主要的番茄栽培品种, 尤其是纯合体栽培品种的再生条件的报道极少^[12], 并且番茄组织培养中存在极易出现外植体褐变^[12, 18]和产生玻璃化苗^[18]以及所需培养时间普遍较长等问题^[12-14]。这些问题的存在影响了如中蔬四号这样一类优秀的番茄品种在基于组织培养体系研究的展开, 影响了通过基因工程育种来提高番茄对土壤化学胁迫耐受和养分利用率等方面的研究。建立番茄再生体系是番茄基因工程育种的前提, 因此, 本研究以中蔬四号番茄为试验材料, 通过对子叶和下胚轴进行离体培养,

不经过愈伤组织阶段, 直接诱导分化不定芽, 优化生根培养基, 以期建立再生频率高、培养时间短的高效再生体系, 为通过基因工程手段进行番茄遗传转化、创造适应我国设施农业土壤现状的养分高效利用和抗逆性强的新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

1.1.1 种子 中蔬四号番茄种子购自南京市金祥种业有限公司。

1.1.2 无菌苗的获得 番茄种子在自来水下冲洗 15 min, 转移至超净工作台。用无菌水冲洗 4 次, 先用 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 4 次; 再用 2% (W/V) 的 NaClO 溶液剧烈振荡灭菌 15~20 min, 无菌水冲洗 8 次且持续时间不少于 30 min。光照 16 h/d, 光照强度为 2000~3000 Lx, 培养温度为 23℃ ± 1℃。

1.1.3 外植体的准备 将培养 6~7 天的苗态正常的无菌苗的子叶剪成约 25 mm² 的块状, 将下胚轴剪成约 5 mm 的切段, 接种至不定芽诱导培养基中进行不定芽的诱导。诱导不定芽时每个培养皿中接种 10 个外植体, 每个处理 3 次重复。诱导不定芽生根时每个培养皿中接种 4 个外植体, 每个处理 5 次重复。

1.2 培养条件

采用 MS (蔗糖 30 g/L, 琼脂 8 g/L, pH 5.8) 基本培养基, 121℃ 灭菌 20 min。附加不同浓度的 6-苄基

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40671100) 和国家 973 项目 (2007CB109303) 资助。

* 通讯作者 (wmshi@mail.issas.ac.cn)

作者简介: 高南 (1981—), 女, 辽宁黑山人, 博士研究生, 主要从事分子植物营养和植物逆境生理方面的研究。E-mail: springgn@163.com

腺嘌呤 (BA) 或玉米素 (ZT) 和 3-吲哚乙酸 (IAA)。光照 16 h/d, 光照强度为 3000 ~ 4000 Lx, 培养温度为 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 数据处理和计算公式

采用 Microsoft Excel 与 SPSS 分析软件进行数据统计分析, 应用 LSD 法进行显著差异性检验。

不定芽诱导率 = 分化的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$ 。

分化不定芽的数目 = 诱导得到的不定芽数/接种的外植体数。

2 试验结果

2.1 不定芽的诱导

2.1.1 不同浓度的 BA 对不定芽诱导的影响 将子叶和下胚轴分别接种到附加不同浓度 BA 的 MS + 0.2 mg/L IAA 培养基中进行不定芽的诱导。21 天后统计出

芽数, 计算出芽率。由表 1 可见, 在 IAA 浓度一定的情况下, 不论是下胚轴还是子叶, 不定芽的诱导率都随着 BA 浓度的提高先增高后降低; 平均每个外植体分化出不定芽的数目也随着 BA 浓度的提高先增加后减少。下胚轴在 BA 浓度为 2.0 mg/L 和 1.0 mg/L 时, 不定芽的诱导率可达到 100%, 即接种的每个下胚轴上均被诱导出不定芽; 在 BA 浓度为 2.0 mg/L 时, 平均每个外植体分化出不定芽的数目为 4.2 个, 显著高于其他 BA 浓度水平的诱导率, 且不定芽的叶片伸展, 生长点清晰, 状态很好。子叶在 BA 浓度为 3.0 mg/L 时, 不定芽的诱导率可达到 100%, 平均每个外植体分化出不定芽的数目为 2.9 个, 高于子叶在其他 BA 浓度水平下的不定芽数目, 但是不定芽的叶片有部分弯曲, 可能是 BA 的浓度过高; 当 BA 浓度为 2.0 mg/L 时, 不定芽的诱导率可达到 96.7%, 平均每个外植体分化出不定芽的数目为 2.6 个, 不定芽的叶片伸展, 生长点清晰, 状态好。

表 1 不同浓度 BA 对不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of BA concentration on inducing adventitious buds

外植体	BA (mg/L)	接种的外植体数	分化的外植体数	不定芽诱导率 (%)	分化不定芽的数目	芽的状态
下胚轴	0.5	30	29	96.7	2.0 cd	++
	1.0	30	30	100	3.0 b	++
	2.0	30	30	100	4.2 a	+++
	3.0	30	29	96.7	3.1 b	+
	5.0	30	29	96.7	2.7 bc	+
子叶	0.5	30	22	73.3	1.8 d	+
	1.0	30	27	90.0	2.5 bcd	+
	2.0	30	29	96.7	2.6 bcd	+++
	3.0	30	30	100	2.9 bc	++
	5.0	30	27	90.0	2.6 bcd	+

注: 同一列中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$); 芽的状态: + 差, ++ 较好, +++ 好, 下表同。

2.1.2 BA 与不同浓度的 IAA 对不定芽诱导的影响

将子叶和下胚轴接种到附加不同浓度 IAA 的 MS + 2.0 mg/L BA 培养基中进行不定芽的诱导。21 天后统计出芽数, 计算出芽率。由表 2 可见, 在 BA 浓度一定的情况下, 不论是下胚轴还是子叶, 不定芽的诱导率都随着 IAA 浓度的升高先增高后降低; 平均每个外植体分化出不定芽的数目也随着 IAA 浓度的提高先增加后减少。下胚轴在 IAA 浓度为 0.2 mg/L 时, 不定芽的诱导率可达到 100%, 平均每个外植体分化出不定芽的数目为 4.2 个, 显著高于其他 IAA 浓度水平的诱导率, 且不定芽的叶片伸展, 生长点清

晰, 状态好。子叶在 IAA 浓度为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mg/L 时, 不定芽的诱导率均可达 80% 以上; 当 IAA 浓度为 0.2 mg/L 时, 不定芽的诱导率为 96.7%, 平均每个外植体分化出不定芽的数目为 2.6 个, 不定芽的叶片伸展, 生长点清晰, 状态好; 当 IAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 虽然平均每个外植体分化出不定芽的数目为 2.7 个, 但是不定芽的叶片较 IAA 浓度为 0.2 mg/L 时得到的不定芽的叶片小; 当 IAA 浓度为 1.0 mg/L 时, 平均每个外植体分化出不定芽的数目也可达到 2.7 个, 但是同时也诱导出了一些没有生长中心的叶片。

表 2 相同 BA 水平下不同浓度的 IAA 对不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of IAA concentration on inducing adventitious buds under the same BA concentration

外植体	IAA (mg/L)	接种的外植体数	分化的外植体数	不定芽诱导率 (%)	分化不定芽的数目	芽的状态
下胚轴	0	30	26	86.7	1.6 d	+
	0.1	30	28	93.3	2.8 bc	++
	0.2	30	30	100	4.2 a	+++
	0.5	30	28	93.3	2.6 bc	+
	1.0	30	28	93.3	3.3 b	+
子叶	0	30	14	46.7	0.8 e	+
	0.1	30	25	83.3	2.7 bc	++
	0.2	30	29	96.7	2.6 bc	+++
	0.5	30	27	90.0	2.3 cd	++
	1.0	30	26	86.7	2.7 bc	+

2.1.3 不同浓度的 ZT 对下胚轴不定芽诱导的影响

将下胚轴接种到附加不同浓度 ZT 的 MS + 0.1 mg/L IAA 培养基中进行不定芽的诱导。21 天后统计出芽数, 计算出芽率。由表 3 可见, 在 IAA 浓度一定的情况下, ZT 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时, 下胚轴不定芽的诱导率均可达到 100%, 且不定芽的叶片伸

展, 生长点清晰, 状态很好, 平均每个下胚轴分化出不定芽的数目随着 ZT 浓度的提高先增加后减少; 在 ZT 浓度为 3.0 和 4.0 mg/L 时, 下胚轴不定芽的诱导率逐渐降低, 但平均每个下胚轴分化出不定芽的数目仍然大于 4.2 个, 明显多于选用 BA 作为细胞分裂素时外植体分化出的不定芽的数目。

表 3 不同浓度的 ZT 对下胚轴不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of ZT concentration on inducing adventitious buds

ZT (mg/L)	接种的下胚轴数	分化的外植体数	不定芽诱导率 (%)	分化不定芽的数目	芽的状态
0.5	30	30	100	6.2 b	+++
1.0	30	30	100	8.4 a	+++
2.0	30	30	100	6.7 b	+++
3.0	30	28	93.3	6.3 b	++
4.0	30	24	80.0	5.6 b	+

2.1.4 ZT 与不同浓度的 IAA 对不定芽诱导的影响

将下胚轴接种到附加不同浓度 IAA 的 MS + 1.0 mg/L ZT 培养基中进行不定芽的诱导。21 天后统计出芽数, 计算出芽率。由表 4 可见, 在 ZT 浓度一定的情况下, IAA 浓度为 0、0.05、0.10 mg/L 时, 下胚轴不定芽的诱导率均可达到 100%, 并且不定芽的叶片伸

展, 生长点清晰, 状态好; 但平均每个下胚轴分化出不定芽的数目在 IAA 浓度为 0.10 mg/L 时达到 8.4 个, 显著高于其他 IAA 浓度水平下的诱导率; IAA 浓度超过 0.10 mg/L 后, 下胚轴不定芽的诱导率逐渐降低, 并且平均每个下胚轴分化出不定芽的数目也同时急剧下降, 不定芽的状态也逐渐变差。

表 4 相同 ZT 水平下不同浓度的 IAA 对不定芽诱导的影响

Table 4 Effect of IAA concentration on inducing adventitious buds under the same ZT concentration

IAA (mg/L)	接种的下胚轴数	分化的外植体数	不定芽诱导率 (%)	分化不定芽的数目	芽的状态
0	30	30	100	7.3 b	+++
0.05	30	30	100	6.2 c	+++
0.10	30	30	100	8.4 a	+++
0.20	30	16	53.3	4.0 d	++
0.50	30	13	43.3	2.0 e	+
1.00	30	30	100	1.5 e	+

2.2 不定芽生根

将诱导得到的不定芽状态好的外植体转接至新的含有相同激素的培养基上，培养至约 1 cm 高时（约需 7 天）由外植体上切下，接种至附加不同浓度 IAA 的 MS 培养基中进行生根培养，14 天后统计生根率。由表 5 可见，随着 IAA 浓度的增加，不定芽的生根率先增加后降低。当 IAA 浓度为 0.10 mg/L 时，不定芽的生根率最高可达 100%，且根数较多，根系发达；不添加 IAA 或添加过量的 IAA（如 0.50 mg/L），不定芽的生根率均降低，并且根数也会减少。

2.3 炼苗及移栽

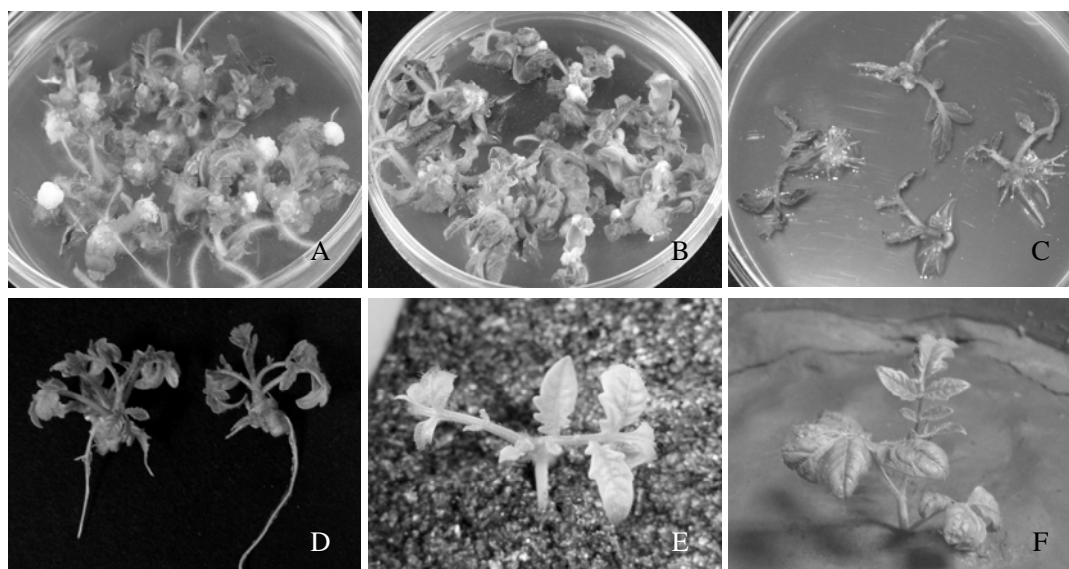
当试管苗长至约 2 cm 时，打开培养皿盖并加入约 0.5 cm 高的水，在温室中炼苗 2~3 天，然后取出，洗去根部残留的培养基，移栽到预先用 MS 培养液（不

含有机成分）浸泡过的蛭石中培养 3~7 天，即可移栽到菜园土中，5~7 天即可成活，之后进行常规的水肥管理。移栽的成活率可以达到 100%。图 1 为番茄高效再生体系的各阶段生长情况。

表 5 不同浓度的 IAA 对不定芽生根的影响

Table 5 Effect of IAA concentration on inducing roots

IAA (mg/L)	接种的不定芽数	生根的不定芽数	生根率 (%)	根的状态
0	20	8	40	+
0.01	20	11	55	+
0.05	20	12	60	++
0.10	20	20	100	+++
0.20	20	19	95	+++
0.50	20	16	80	++



A. 下胚轴诱导不定芽；B. 子叶诱导不定芽；C. 不定芽生根；D. 试管苗移栽前；E. 试管苗在蛭石中成活；F. 试管苗移栽成活

图 1 番茄高效再生体系

Fig. 1 High efficient regeneration system for tomato

3 讨论

本研究通过直接诱导外植体分化不定芽的途径，建立了再生率高达 100% 的番茄再生体系。利用番茄的子叶和下胚轴作为外植体建立再生系，有报道可以获得高达 95% 以上或是 100% 的再生率。但是，已报道的番茄再生体系要么培养较长时间后（如 35 天）统计不定芽的诱导率^[13-15]，要么是经过愈伤组织诱导不定芽^[16-17]，并且不定芽需要长至 1~3 cm 才进行生根培养，试管苗需要长至 3~8 cm 时移栽，这样从无菌苗开始到试管苗移栽成活的全过程至少需要 75 天

（直接诱导不定芽）~90 天（经过愈伤组织诱导不定芽）。在本研究中，统计不定芽诱导率时外植体仅培养 21 天，且不定芽高约 1 cm 时即进行生根培养；生根培养时，6 天时即有肉眼可见的根（约 0.2 cm）出现，生根培养 14 天后根长可长至 1 cm 以上，不定芽可继续长高达到约 2 cm；经过炼苗，移栽至蛭石后，番茄试管苗迅速生长，培养 3~7 天后的试管苗可高达 3~8 cm，最后移栽至菜园土中成活率高达 100%。从无菌苗开始到试管苗移栽成活的全过程只需要 58 天，比已经报道的再生体系所需时间至少可以节省 17 天

(22%)。该体系是一个高频省时的再生体系。

BA是植物组织培养常用的细胞分裂素,广泛应用于番茄再生体系的建立^[10, 12-13, 16]。在本研究中,我们通过BA和IAA的配合使用,在诱导 21 天后统计了不定芽的数目,尽管与李铁松和王关林^[12]报道的数目比较少,但是他们的结果是在诱导培养进行了 35 天后统计得到的。我们发现,随着培养时间的延长,诱导得到的不定芽数目会增多,丧失了分化能力的畸形芽的数目也会增多,并且接种的外植体会部分变褐或试管苗部分成为玻璃化苗。外植体变褐以后,不定芽的叶片也会有一些黄化,这样的不定芽生长缓慢,不易生根;试管苗玻璃化以后,分化能力降低,移栽难以成活。导致玻璃化的因素之一是诱导不定芽和生根时的培养条件,如培养基的成分、光照、湿度和透气性^[18]等。缩短不定芽在诱导培养基上的生长时间,尽快将不定芽转接至生根培养基中,并在生根后移栽至蛭石中培养,使试管苗在蛭石中迅速生长,最后移栽至菜园土中。这样不仅缩短了不定芽和试管苗在培养基中的培养时间,而且避免了外植体褐化和试管苗玻璃化的现象。该体系得到的试管苗状态好,移栽易成活。

近年来,ZT在番茄的再生体系和遗传转化中得到了广泛的应用^[8, 10, 15],但是价格比较昂贵。我们的研究也发现在ZT和IAA的配合使用对下胚轴的诱导得到的不定芽的个数明显高于BA与IAA的配合使用。ZT的使用浓度范围较广,在 0.5 ~ 2.0 mg/L时,均可以得到 100% 的诱导率,并且诱导得到的不定芽数目也较高。进行番茄再生体系建立时,如不考虑价格因素,选择ZT作为细胞分裂素也是非常合适的。

4 结论

本试验以中蔬四号番茄为试验材料,研究了影响番茄组织培养的激素因子,并通过对培养时间的控制,建立了一个再生频率高、所需时间短、试管苗状态好的高效再生体系。具体培养流程如下:选择生长 6~7 天的无菌苗的下胚轴为外植体,在 MS + 1.0 mg/L ZT + 0.1 mg/L IAA 或 MS + 2.0 mg/L BA + 0.2 mg/L IAA 诱导不定芽培养基上进行不定芽的诱导,在培养 21 天后,继代到相同的培养基上培养 7 天,将分化好的高约 1 cm 的不定芽由下胚轴切下,转接到生根培养基 MS + 0.1 mg/L IAA 中生根培养,根长约 1 cm 时,炼苗 2~3 天,移栽至蛭石中培养 3~7 天,最后移栽到菜园土中。优化后的培养流程已成功应用于番茄的遗

传转化研究,为创造适应我国设施农业土壤现状的养分高效利用和抗逆性强的番茄新品种提供基础。

参考文献:

- [1] Gao C, Sun B, Zhang TL. Sustainable nutrient management in Chinese agriculture: Challenges and perspective. *Pedosphere*, 2006, 16(2): 253-263
- [2] Debouba M, Gouia H, Suzuki A, Ghorbel MH. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *J. Plant Physiol.*, 2006, 163: 1247-1258
- [3] 潘可可, 潘琇, 王亮, 刘恩玲. 温州市设施蔬菜土壤主要障碍因子及防治措施. *浙江农业科学*, 2007 (2): 231-232
- [4] 吴忠红. 山西设施土壤养分盐分特征研究. *农业与技术*, 2007, 27(1): 81-84
- [5] 王金池. 番茄新品种—中蔬 4 号. *长江蔬菜*, 1988 (2): 29
- [6] 吴雪霞, 朱月林, 朱为民, 陈建林, 李浩宇. 组织培养条件下不同番茄品种幼苗期的耐盐性比较. *上海农业学报*, 2006, 22(3): 59-62
- [7] 王军, 邹志荣. 转基因番茄育种和产业化研究进展. *中国农学通报*, 2004, 20(3): 22-25
- [8] Jia GX, Zhu ZQ, Chang FQ, Li YX. Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Rep.*, 2002, 21: 141-146
- [9] Park S, Li JS, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang HB, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102(52): 18830-18835
- [10] Qiu DL, Diretto G, Tavarza R, Giuliana G. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*. *Sci. Hortic.*, 2007, 112: 172-175
- [11] 卫志明, 许智宏. 番茄叶组织培养中植株再生的初步研究. *植物生理学通讯*, 1979 (1): 101
- [12] 孙同虎, 孙秀玲, 薄鹏飞, 杜希华. 番茄高效离体再生体系的建立. *安徽农业科学*, 2006, 34(24): 6467, 6487
- [13] 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. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 26(2): 178-182
- [14] 罗素兰, 田嘉璐, 长孙东亭. 番茄高效再生体系的建立. *海南大学学报(自然科学版)*, 2003, 20(4): 314-316, 323
- [15] 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪. ZT 和 IAA 对番茄子叶再生的影响. *植物生理学通讯*, 2003, 39(3): 217-218
- [16] 陆瑞菊, 黄剑华, 孙月芳, 周润梅. 番茄下胚轴愈伤组织高频

- 率诱导与植株再生. 上海农业学报, 1997, 13(2): 16-18
- [17] 何秀霞, 陆一鸣, 白杰英, 李彦舫. 番茄组织培养体系的建立及其影响因素的研究. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2003, 18(1): 30-33
- [18] 刘士勇, 刘守伟. 番茄组织培养中应注意的问题. 北方园艺, 2006 (2): 119-120

Development of High Efficient Regeneration System for Tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Zhongshu No. 4)

GAO Nan^{1,2}, WU Xiang-yu³, SHI Wei-ming¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A high efficient tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Zhongshu No. 4) regeneration system with high frequency regeneration ratio, time-saving and good tube seedlings was developed. Detailed protocols were as follows: Hypocotyls were placed on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg/L zeatin (ZT) and 0.1 mg/L indole-3-acetic acid (IAA) or 2.0 mg/L 6-benzyladenine (BA) and 0.2 mg/L IAA for inducing adventitious buds; after being cultured for 21 d, hypocotyls were sub-cultured to fresh medium once, and then the buds were cut and induced roots on MS medium supplemented with 0.1 mg/L IAA; well-rooting buds were acclimated to greenhouse conditions for 2-3 d, and then transplanted to well-watered vermiculite for 3-7 d, finally transplanted to vegetable garden soil.

Key words: Zhongshu No. 4, Tissue culture, Hormone concentration, Culture time, Genetic transformation

《土壤》期刊在线投稿系统开通启事

为了提高办公效率, 适应网络时代期刊的发展趋势, 《土壤》期刊于 2009 年 1 月 1 日起将正式启动新的网络在线投稿系统, 届时, 纸质及邮件投稿将不再受理, 敬请各位作者登录<http://soils.issas.ac.cn>进行网络在线投稿, 谢谢配合!

《土壤》编辑部