

番茄子叶再生体系的建立

张渝洁^{1,2,3}, 李新国^{2*} (1. 山东师范大学生命科学学院, 山东济南 250014; 2. 山东省农业科学院高新技术研究中心, 山东济南 250100; 3. 山东临沂师范学院生命科学院, 山东临沂 276000)

摘要 以番茄栽培品种甲农年丰为实验材料, 以 10 d 的无菌苗子叶为外植体, 通过对不同激素、不同浓度等培养条件的研究, 建立了一套优化的适于番茄遗传转化的组织培养与再生体系, 总结了诱导番茄再生体系的有效方法及其注意事项。

关键词 番茄; 子叶; 再生体系

中图分类号 S641.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)13-3020-01

随着生物技术的发展, 利用基因工程技术改良番茄性状已成为当前的研究热点之一, 作为植物转基因工作的基础, 番茄再生系统的建立至关重要, 它是遗传转化成功的前提和保障。当前, 在植物基因工程技术中, 多数成功的转化体系都是建立在良好的组织培养系统基础之上的。国内外研究者从各个不同角度对番茄的组织培养体系进行了研究, 但有些报道中, 有的培养周期长, 有的培养基复杂, 有的外植体取材受季节限制。笔者在遗传转化过程中掌握了一套简单有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 番茄一代杂种甲农年丰的子叶作为外植体。

1.2 培养基成分 ①种子培养基: 1/2MS。②愈伤组织诱导分化培养基: MS + 6-BA + IAA; MS + 6-BA + ZT; MS + ZT。③壮苗培养基: MS + 0.1 mg/L ZT。④生根培养基: 1/2MS + 0.10 mg/L NAA; 1/2MS + 0.20 mg/L NAA; 1/2MS + 10 mg/L IBA; 1/2MS。每种培养基附加蔗糖 3%, 琼脂 0.75%, pH 值 5.8, 在 121 ℃ 温度下高压灭菌 21 min, 放置 1~2 d 后使用。培养室温度 28 ℃ 左右, 光照 12 h/d, 光照度 1 500 lx。

1.3 种子消毒、接种及外植体的获得 将番茄种子用 70% 酒精浸泡 1 min, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.3% NaClO 溶液浸泡 20 min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 接种到 1/2 MS 培养基上, 28 ℃ 温室培养, 约 7 d 后 2 片子叶完全展开。在无菌条件下, 剪取无菌苗的子叶切成 5 mm × 5 mm 的小块, 接种到愈伤组织诱导培养基上。约 3 周长出淡绿色、结构较致密的愈伤组织。

1.4 幼苗生根和移栽 当幼苗长 1~2 片真叶时, 切下移至壮苗培养基中, 长出 4~6 片真叶时转入生根培养基中, 10~15 d 后生成根。待无菌苗长至 8 cm 左右时将培养瓶的瓶口打开, 加入少许水, 炼苗 3 d 后取出, 洗去根部培养基残渣, 将幼苗移栽到培养基中, 浇透水, 钵外套塑料袋保湿, 在 25~27 ℃ 条件下光照培养, 1 周后去掉塑料袋使其正常生长。

2 结果与讨论

2.1 消毒剂种类、浓度和消毒时间对消毒效果的影响 采用 0.1% HgCl₂ 和 NaClO 进行消毒, 结果表明(表 1): 0.1% HgCl₂ 是常用的消毒剂, 但因其表面残留不易去除, 往往会导致种子不能萌发, 经多次试验发现在用 0.1% HgCl₂ 消毒后加入少许吐温试剂进行清洗效果很好。而 NaClO 表面残留易

于冲洗, 便于操作, 性质柔和, 不易杀死种子。由表 1 可见, 3%~4% 的 NaClO 消毒 30 min 效果最好, 且发芽较快。

表 1 消毒剂种类、浓度和消毒时间对种子消毒效果的影响

消毒剂	浓度 %	处理时间 min	种子数 个	萌发天数 d	萌发率 %	平均污染率 %
HgCl ₂	0.1	8	60	3 周末见发芽	0	
NaClO	2	15	40	10	70	17.0
		20	30	9~10	85	15.0
		25	45	9~10	83	16.0
		30	60	7	95	11.0
NaClO	3	15	40	7	76	16.0
		20	30	6	88	15.0
		25	45	6	88	16.0
		30	60	5	100	8.0
		35	30	9	70	6.0
NaClO	4	15	40	7	70	17.0
		20	30	6	85	15.0
		25	45	6	88	16.0
		30	60	6	100	8.6
		35	30	8	72	8.0

2.2 外植体愈伤组织的诱导 以子叶为外植体。以 2 d 苗龄的子叶最好, 太小不易形成愈伤, 且在浸染时易发生褐变; 太大, 则形成愈伤较晚, 2 d 苗龄的子叶约 3 周出现愈伤, 而较大的子叶, 则 2 个月才可偶见愈伤。经过试验观察, 取 2 d 苗龄且未长出真叶的子叶最好。切取子叶时应注意取子叶最宽处, 要切除叶尖, 否则不形成愈伤(图 1)。



图 1 愈伤分化

表 2 不同培养基组合对愈伤、分化发生的影响

培养基组成//mg/L			外植体数 个	出愈伤 时间//d	诱导率 %
6-BA	IAA	ZT			
2	0.50		40	14	80
1		1	50	10	86
		1	60	14	86
		1.5	60	7	90
		2	50	7	92
2			30	16	82

基金项目 国家自然科学基金项目(30571126); 山东省中青年科学家奖励基金项目(2005BS06003)。

作者简介 张渝洁(1968-), 女, 山东临沂人, 在读硕士, 讲师, 从事植物发育生物学教学和研究工作。* 通讯作者, E-mail: lixinguo@tom.com。

收稿日期 2006-03-31

(下转第 3022 页)

景观的塑造也十分重要。道路类型主要包括主干道、支干道和游道,皆选用自然材料进行铺设,石板、自然石、甚至废弃的枕木都是良好的材料。在临水和架空与水面的区域采用木质栈道的方式,不妨碍植物自由生长,有效地限制行人线路,良好的弹性使公众获得愉悦的亲水体验。

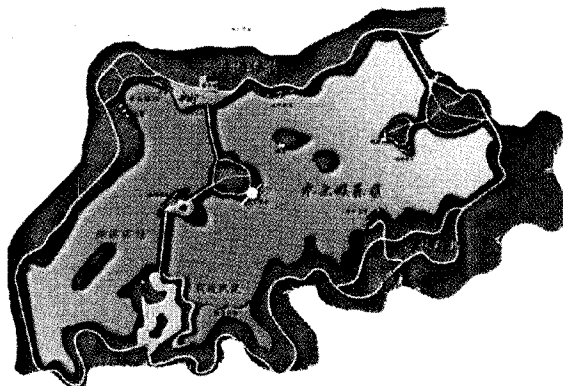


图2 峡山湖景观规划

4.3 景观空间规划 空间是景区规划的根本。尽管空间只有2种类型,旷空间和奥空间即开放空间和封闭空间,但是空间的形式、质地和组合可以产生各种各样的空间,公众也就具有了各种各样的空间感受。水域、密林、疏林、草地、湿地、栈台、果园、农舍给人不同的空间质感。或山巅俯视、或水岸平视、或水中仰视、或乘舟动观、或休憩静观,位置不同,体验不同。时而疏、时而密、时而狭长、时而方阔,体验丰富。

4.4 景观设施规划 完善供水、排水、电力、通信等基础设施,为景区的发展打下良好的基础。建设餐饮、茶室、零售、管理、厕所等服务设施,提供便利的优质服务。建设景观亭、景观廊等庇护景观设施,使公众即便是在阴雨天气和强烈的日光下也能安然享受别致的美景,景观建筑巧于因借,精于体宜,结合地形,随基势高下,注重建筑造型与环境融合的综合效果,要求体量轻巧,简洁活泼,空透明快。建设探险、极限运动等游憩设施提供刺激、有吸引力的活动。建设路灯、

园椅、踏步、挡土墙、驳岸、果壳箱、指路牌、汀步、小桥等风景设施,提供全面、周道的服务。

4.5 景观游憩规划 峡山湖风景区提供丰富的水上活动,主要有:划船,在水岸设置泊位,满足游客享受湖上划船和探索的要求,当地的赛龙舟等活动也可以在这里进行;游泳,天然辽阔并且碧波荡漾的清澈湖水将激起游泳的欲望,公众可以在炎热的夏季一泳为快;浅水区,在受保护的浅水区,儿童可以在这里涉水、捉鱼;教育活动,可以在家长和老师的指导下开展自然学习活动,潜在的项目有花草与动物、天然湿地、水文等。亲水规划由横跨水面的栈桥,邻近水边的平台和滨水观演广场,层叠设计适应不同水位的浅滩等提供充分的接触水的机会。

4.6 景观艺术规划 统一的基调是任何景观规划所必须遵循的首要原则,在峡山湖景区中表现为,所有的建筑均使用适合于环境的灰色或者暗色调,人工建设部分不应成为吸引公众视线的主流。利用当地的任何可以利用的乡土材料进行建造,例如石块、原木、朽木、石子、泥土、苇草、竹竿等材料,大胆地进行艺术创作,使公众产生艺术作品就像从土地中生长出来或者原本就在那里感觉,增加景区的艺术品质和增加公众对乡土文化的认同。零星的小品均应统一设计,做到制作规范、功能合理、式样美观,并与环境协调。

4.7 景观植被规划 在保护原有生态平衡的前提下,进行造林、育林、护林,促进植被的更替。适当进行风景林相改造,增加阔叶林所占比例。增加树木种类促进生物多样性的提高,增加林冠层次,增添下木及色叶树群,根据生态结构布置景观层次。植物景观规划设计应因地制宜,因时制宜,因材制宜,力求体现意境上的诗情画意,功能上的综合性、生态上的科学性、配置上的艺术性、经济上的合理性和风格上的地方性。加强水岸植物种植,营造岸边水杉林,融合优美的天际线。加强湿地植物的种植和造景,可以起到净化水质和增加景观自然古朴的特色。

(上接第3020页)

由表2可见,在愈伤组织诱导分化培养基中加适量玉米素效果较好。

2.3 生根培养 在生根阶段,要尽量切除愈伤组织,否则会影响生根。用 $1/2MS + 0.1 \text{ mg/L NAA}$ 效果最好(图2)。

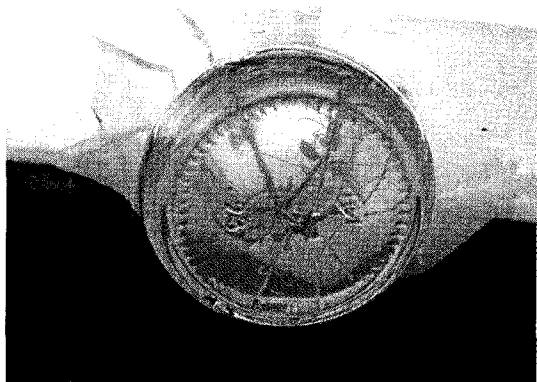


图2 生根

2.4 试管苗的移栽 移栽是试管苗成活的关键之一,成活与否取决于根系是否发达。经试验观察,苗高8 cm左右时最适宜移栽,苗过高、过矮移栽都不易成活。移栽时应注意洗净根部培养基残渣,注意保湿,在 $25 \sim 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下光照培养,1周后去掉塑料袋使其正常生长。

参考文献

- [1] 刘艳梅,张喜春,薛玲霞. F₁ 代杂种番茄的组织培养与植株再生[J]. 蔬菜, 2005(5): 44-45.
- [2] 梁美霞,李景富,谢立波,等. 番茄组织培养存在的问题及对策[J]. 北方园艺, 2004(3): 74-75.
- [3] 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, 2003(1): 31-32.
- [4] 董衍奎,李亚贤. 以色列番茄的组织培养和快速繁殖[J]. 中国林副特产, 2002(2): 12-13.
- [5] 周黎军,魏琴,曹有龙. 樱桃番茄的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002(4): 356-357.
- [6] 赵春梅. 内质网小分子热激蛋白基因导入番茄的研究[D]. 济南: 山东师范大学生命科学学院, 2003.