

番茄的不同基因型对组培植株再生能力的影响^{*}

于惠敏 石 竹 杨俊杰

(山东省教育学院生物科学与技术系, 250013, 济南//第一作者 44岁, 女, 副教授)

摘要 本研究利用番茄的11个不同的基因型品种,进行了组织培养和植株再生的研究.发现不同基因型的植株再生能力存在着明显差异.我们从中筛选出2个具有高再生能力的基因型品种,为进一步开展番茄细胞工程和基因工程研究提供了优良实验材料.

关键词 番茄; 基因型; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q 943.1

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)是一种重要的蔬菜与水果兼用作物,因而受到人们普遍喜爱.美国《时代》杂志曾将包括番茄在内的十种食品列为现代人的最健康食品,其中番茄排在第一位.近几年来,番茄红素被发现具有抗氧化特性并对预防某些类型的癌症有一定效果,使人们更加重视番茄在人体保健中的作用.在西方发达国家,人们对番茄的喜爱程度已经远远超过发展中国家,番茄被当作水果,被加工成番茄酱、番茄汁、脱水番茄片、番茄粉等各种加工食品,成为人们日常饮食生活和保健不可缺少的重要组成部分.然而,目前番茄的杂交育种由于品种单一,遗传背景狭窄,使得高产、优质、抗逆新品种培育受到限制.细胞工程和基因工程等现代生物技术在番茄育种上展示了很大的应用潜力,是其它育种技术难以替代的.通过生物技术手段,例如体细胞杂交、突变体筛选、无性系变异、转基因等可望培育优良的新型番茄.然而,开展这些工作都离不开细胞和组织培养的高频再生体系.目前虽然番茄的多种不同组织均可再生,但番茄在组织培养中的再生能力受基因型影响较大,有的再生频率较低,在一定程度上限制了现代生物技术在不同栽培品种上的普遍应用.为了更好地将细胞工程和基因工程技术应用于育种,应针对不同的基因型,尽快建立高频再生系统,或从中筛选具有高再生能力的基因型.本实验通过番茄的离体器官发生途径,诱导产生愈伤组织,再分化成植株,以研究番茄的不同基因型在组织培养中的植株再生能力,为番茄通过细胞工程手段培育新品种打下基础,同时也为番茄基因工程研究提供了优良实验材料.

1 材料与方法

1.1 实验材料 以番茄品种:合作908、合作906、千红1号、千红2号、樱桃番茄、蕃大茄红、丽多、圣吕美、上海906和中蔬4号共10个品种作为实验材料.材料来自山东省农科院蔬菜研究所和种子公司.

1.2 培养基种类及成分

1.2.1 番茄实生苗培养基 1/2MS培养基

1.2.2 愈伤组织诱导分化培养基 MS, Zt 2 mg/L, IAA 0.2 mg/L, 蔗糖 30 g/L

1.2.3 生根培养基 1/2 MS, IBA 1 mg/L, 蔗糖 30 g/L,

所有培养基均加 30 g/L 蔗糖, 0.66% ~ 0.70% 琼脂(固体培养基),用 0.5 N NaOH 调至 pH5.8,于 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min.

1.3 萌发率的测定 将番茄的10个品种(编号为F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9、F10)分别进行种子消毒后,放在无菌水中浸泡1 d,接种到1/2 ML基本培养基上,在(25±2)℃,培养箱内暗培养3 d,再在25℃~28℃、光照强度1 000~2 000 lx光照培养11 h/d,第8 d和第15 d 2次分别统计种子的发芽率,比较各品种的发芽率的高低.

1.4 番茄再生植株的获得 选择在1/2 MS基本培养基上发芽率较高的6个不同品种的番茄(合作908、上海906、合作906、中蔬4号、蕃大茄红和丽多)作为番茄再生植株的材料.当实生苗长至约5~6 cm高时(约18 d),取其完全展开的子叶,用无菌手术刀在子叶上划些伤口,光照培养(光/暗周期为16/8 h),14 d后可见在切口附近长出愈伤或丛生再生芽^[1].

1.5 生根培养 当再生芽长至2 cm左右时(约两个月),转入生根培养基(即:1/2 ML, IBA mg/L, 蔗糖 30 g/L)培养2~3周.最后将根系发育良好的番茄植株经驯化后,移栽入盆土中.

2 结果与分析

2.1 种子的发芽率 将番茄品种:合作908、合作906、千红1号、千红2号、樱桃番茄、蕃大茄红、丽多、圣吕美、上海906和中蔬4号共10个品种分别消毒、接种到1/2 MS基本培养基上培养.第8 d和第15 d 2次统计的结果见表1,由此可以看出发芽率较高的是合作908、上海906、合作906、中蔬4号、蕃大茄红和丽多6个品种,发芽率分别为95.1%、92.3%、88.3%、88.6%、

^{*} 山东省教育厅计划基金资助项目(H02151)

收稿日期:2007-04-23

85.7%和 62.9%.

表 1 不同品种的番茄的发芽率

编号	品种名称	接种的种子数	培养第 8 d 种子的发 芽数/发芽率 (%)	培养第 15 d 种子的发芽率 (%)	污染率 (%)
F1	合作 908	122	115/94.3	95.1	0
F2	合作 906	128	110/85.9	88.3	0
F3	千红 1 号	114	7/6.1	6.1	0
F4	千红 2 号	103	15/14.6	15.1	0
F5	樱桃番茄	68	17/25.0	27.9	2
F6	蕃大茄红	70	51/72.9	85.7	0
F7	丽多	97	55/56.7	62.9	0
F8	圣吕美	102	47/46.1	49.0	1
F9	上海 906	117	107/91.5	92.3	0
F10	中蔬 4 号	88	73/83.0	88.6	0

2.2 番茄子叶的愈伤组织诱导 分别取发芽率较高的 6 个不同品种的番茄子叶,经刻伤处理后在愈伤组织诱导分化培养基 (MS,6-BA 2 mg/L,IAA 0.2 mg/L)上培养.2 周后发现子叶的边缘开始膨大,外植体的颜色由接种时的嫩绿色变为深绿色,另外,有一部分子叶发生褐化,这些子叶经长期培养,始终未见有再生芽长出.经统计未褐化的子叶占接种子叶总数的 23%.从第 16 d 起在未褐化的子叶外围长出了浅绿色至黄白色的颗粒状愈伤组织,而 28 d 以后,不再有新的愈伤组织形成.在愈伤形成的初期(接种后 16~22 d),不同品种的番茄子叶的愈伤形成率(长出明显愈伤组织的外植体数/接种外植体数)没有明显差异,但是随着培养时间的延长,这种差异越来越明显.从表 2 中可看出:在接种后第 28 d 时,蕃大茄红品种的子叶愈伤组织形成率最高,可达到 38.1%;其次是合作 908 品种,其子叶愈伤组织形成率达 34.2%.

表 2 不同品种番茄子叶外植体在诱导与分化培养基上 28 d 时愈伤组织形成率 %

品种	合作 908	上海 906	合作 906	中蔬 4 号	蕃大茄红	丽多
愈伤组织形成率	34.2	24.1	13.1	2.1	38.1	3.8

2.3 愈伤组织的分化与再生 外植体在诱导分化培养基上培养约 22 d 左右,子叶伤口边缘有绿色的再生芽产生,这时,不同品种的子叶外植体的分化率(分化出芽或芽点的外植体数/接种外植体数)显示出差异:合作 908、上海 906、合作 906、中蔬 4 号、蕃大茄红和丽多子叶的分化率分别为 38.1%、41.1%、8.4%、15.7%、38.1%和 6.9%.而在接种 32 d 以后,这种差异变得十分明显,分化率分别为 38.5%、58.1%、9.9%、21.1%、63.9%和 13.1%(表 3).

表 3 不同品种的番茄在愈伤诱导与分化培养基上子叶外植体的分化率 %

接种天数	合作 908	上海 906	合作 906	中蔬 4 号	蕃大茄红	丽多
22 d	38.1	41.1	8.4	15.7	38.1	6.9
32 d	38.5	58.1	9.9	21.1	63.9	13.1

从表 3 中可看出:蕃大茄红品种的子叶外植体的分化率最高,分化能力最强,可达到 63.9%;其次是上海 906,其子叶外植体的分化率达 58.1%.愈伤组织大多都能分化出芽甚至是丛生芽,只有少数的愈伤组织在相同的时间内仅能长出芽点.在愈伤组织上长的再生芽大多在 50 d 内能长到 2~3 cm 高,从而可以转入生根培养基,约一至两周后再生植株开始生根,继续培养 15 d 左右,可移栽入盆土中.

3 讨 论

目前被广泛种植的番茄一般都是优良的杂交种.由于番茄是自花授粉的植物,在进行杂交育种时,需要人工摘除母本番茄的花药并利用父本的花药进行人工授粉.这种杂交育种的过程费时费力,极大地提高了杂交种子的成本.而且,优良的杂交种只能种植一代,第二代由于发生分离而无法使用,使得烦琐的育种过程需要年年进行.番茄的试管苗大量繁殖系统的建立为解决以上这些问题提供了方便.将优良番茄种子苗通过离体组织培养,即可获得大量的试管苗用于种植,通过这种方法就可以常年供应优良试管苗,省却了年年制种的麻烦,降低了成本.研究发现,番茄在组织培养中的植株再生能力,与番茄的基因型、外植体类型、年龄以及培养基中添加的激素等因素密切相关.基因型对试管苗再生能力的影响比较大,外植体类型对组织培养和试管苗产生的影响也受到了普遍重视.在番茄的大量离体繁殖过程中,目前最常用的外植体是子叶、下胚轴、幼叶、茎段、幼嫩花絮和花梗.一般认为幼嫩的组织比老组织更容易诱导植株再生.在建立番茄离体繁殖体系过程中,另一个不可忽视的关键因素是植物激素,不同的外植体往往需要添加不同的植物激素.例如,培养番茄的叶片,需要在培养基中加入 6-BA 1.5 mg/L 和 IAA 1.5 mg/L^[2];而在培养子叶和下胚轴时,为了得到再生植株,培养基中需要添加 Zeatin 1 mg/L 和 IAA 0.1 mg/L^[3].Cortina 等^[4]最近发现生长素和细胞分裂素处于平衡浓度时(各 0.5 mg/L)可得到最大的苗子再生扩繁率.本实验在添加 6-BA 2 mg/L 和 IAA 0.2 mg/L 的愈伤组织诱导分化培养基^[5],蕃大茄红品种的子叶愈伤组织形成率最高,(下转第 130 页)

从算法的流程可以看出:该算法主要就是一个遍历索引图 IG 和 IH,其时间复杂度为 $O(nIH * \log(nIG))$,这里, nIG 、 nIH 为索引图 IG 和 IH 的节点数.而如果要重建索引的话,时间复杂度将会是 $O(mG' \log(nG'))$,这里, mG' 为删除文档后数据图 G' 的边数, nG' 为其节点数.

下面来说明该算法的正确性.假设原 xml 文档集合对应的数据图 G ,索引图 IG ,要删除的文档对应的数据图 H ,索引图 IH ,更新后的数据图 G' ,索引图 IG' ,算法 3 得到的图 I .我们来说明 $I = IG'$ (这里,图的相等指的是同构).对任意两个数据节点 $u, v \in G$,而不属于 H , u, v 在 IG 中属于同一个等价类,算法 3 的执行并没有破坏这一条件, u, v 在 I 中也属于同一个等价类,而 u, v 在 IG' 中当然也在同一个等价类中,所以, I 是 IG' 的一个细分;反之也成立.因此有 $I = IG'$.这就证明了算法 3 得到的图就是我们所要求的更新后的索引图.

4 参考文献

- [1] Paige R, Tarjan R E. Three Partition Refinement Algorithms [A]. SIAM Journal on Computing, 1987
- [2] Graves 著. XML 数据库设计 [M]. 尹志军译. 北京:机械工业出版社, 2002. 8
- [3] Connolly 著. 数据库系统 - 设计、实现与管理 (第三版) [M]. 宁 洪译. 北京:电子工业出版社, 2004

(上接第 121 页)

可达到 38.1%; 其次是合作 908 品种, 其子叶愈伤组织形成率达 34.2%. 影响番茄大量繁殖的因素很多, 除了上面提到的几点以外, 其它因素例如培养温度、光照、培养基中的碳源种类和浓度等往往也会对培养效率造成影响, 对此澳大利亚学者 Bhatia 等曾做过全面综述^[6].

4 参考文献

- [1] 王清连. 植物组织培养 [W]. 北京:中国农业出版社, 2004. 19 ~ 22, 53 ~ 55
- [2] handel G, Katiyar S K. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) [J]. Adv Plant Sci, 2000, 13: 11 ~ 17
- [3] Ichimura K, Oda M. Stimulation of phenotypically normal shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) by commercial filter paper extract [J]. J Jap Soc Hort Sci, 1998, 67: 378 ~ 380
- [4] Cortina C, Culiáez - Maciá F A. Tomato Transformation and Transgenic Plant Production [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004, 76: 269 ~ 275
- [5] 于惠敏, 霍丽云, 狄焕灵, 等. 低温对君子兰愈伤组织的长期保存作用 [J]. 山东师范大学学报 (自然科学版), 2002, 17(2): 119 ~ 120
- [6] Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004, 78: 1 ~ 21

EFFECTS OF DIFFERENT TOMATO GENOTYPES ON THE PLANT REGENERATION IN TISSUE CULTURE

Yu Huimin Shi Zhu Yang Junjie

(Department of Bioscience and Biotechnology, Shandong Institute of Education, 250013, Jinan, China)

Abstract Eleven genotypes of tomato strains were used to investigate the plant regeneration capacity in tissue culture. Results showed that genotypes had significant effects on plant regeneration. Two genotypes with high regeneration capacity were selected in this study and can be used as excellent experimental materials in further research of cell engineering and gene engineering of tomato.

Key words tomato; genotype; tissue culture; plant regeneration