

番茄组织培养中无菌苗培养条件的优化

吴志刚, 宋明, 王志敏, 牛义

(西南大学园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716)

摘要:对番茄组织培养中种子的消毒方法和无菌苗培养条件进行了优化。经过对五种消毒方法的消毒效果比较, 以10%的 NaClO 溶液 + 土温 1 滴 30min 和 10%NaClO 溶液 20 min + 0.1%HgCl₂ 3 min 消毒效果最佳, 对种子发芽抑制作用较小。同时, 通过对无菌苗生理指标的测定, 添加 1%蔗糖的 1/2MS 培养基有利于壮苗的形成。

关键词:番茄; 组织培养; 无菌苗

中图分类号:S641.2 **文献标识码:**A

Condition Optimization for Culturing Sterile Tomato Plants In Tissue Culture (*Lycopersicon esculentum* Miller)

Wu Zhigang, Song Ming, Wang Zhimin, Niu Yi

(Key Lab in Vegetable Research of Chongqing, College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: In this paper, the method of seed sterilization and culture condition of sterile tomato plants are optimized. The better sterilization method with little restrain to germination is 10%NaClO + Tween one drop 30minutes or 10%NaClO 20 min + 0.1%HgCl₂ 3 min; And the sterile plants in the 1/2 MS medium with 1% sucrose are more healthy by comparing their physiological index.

Key words: Tomato, Tissue culture, Sterile Plant

番茄是一种重要的世界性蔬菜^[1,2], 具有很高的经济价值和科学价值, 对番茄的研究广泛而深入。在番茄杂种优势固定、优良品种快速繁殖、突变体保存利用及转基因等生物技术领域的研究中, 番茄的组织培养发挥了重要作用^[3]。建立高效的组织培养体系是进行相关研究的基础。

番茄组织培养的外植体^[4]通常是无菌苗的子叶、胚轴、或真叶, 高效的获得健康无菌苗是番茄组织培养的前提。番茄种子的消毒发法通常是 10%的 NaClO 溶液消毒 30min 或 0.1%的 HgCl₂ 5~8min^[4-6]。笔者在实验中发现, 由于番茄种子表面有绒毛, 单纯的使用 NaClO 溶液不能达到最佳的消毒效果, 尤其是国产番茄种子, 往往带菌较多, 培养过程中内源性污染较为严重; 而 HgCl₂ 对种子的毒害大, 往往会严重抑制种子的发芽, 影响了组织培养工作的顺利进行。此外培养基中不同糖含量对番茄种子发芽情况以及秧苗素

质也有一定影响。笔者对番茄种子的消毒方法以及培养基中蔗糖浓度进行了初步筛选。试验于 2005 年 7 月—11 月在西南大学蔬菜学实验室进行。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄品种中蔬 4 号 (购于中国农业科学研究院蔬菜花卉研究所), 合作 903、红博士, 渝粉 109 (购于重庆南平种子分公司)

1.2 消毒方法

用洗衣粉水浸泡种子 30min, 冲洗干净后, 于超净工作台上用 75%酒精浸泡 30s, 然后采用以下五种消毒方法 (以中蔬 4 号为例):

处理 1: 10%的 NaClO 溶液消毒 30 min

处理 2: 10%的 NaClO 溶液 30min+ 土温 1 滴

处理 3: 10%的 NaClO 溶液 20min+0.1%的 HgCl₂ 3min

处理 4: 10% 的 NaClO 溶液 15min+0.1% 的 HgCl₂ 5min

处理 5: 0.1% 的 HgCl₂ 8min

消毒后用无菌水冲洗 3~5 次, 接种到添加了 0.8% 的卡拉胶固体培养基上, 每瓶培养基接 100 粒种子, 重复 4 次, 置于 28℃ 的温箱中进行暗培养。10d 后统计种子污染情况, 6d 测定发芽势, 12d 测定发芽率^[7], 发芽指数 = $\sum (G_t/D_t)$, 其中 G_t 为 t 天发芽数, D_t 为发芽天数^[8]。以未进行消毒处理的种子发芽情况为对照, 纸床保湿培养。

1.3 无菌苗培养

基于优化后的消毒方法: 10% 的 NaClO 溶液 + 土温 1 滴, 消毒 30min, 然后将种子接种在不同蔗糖含量的 1/2MS 培养基中, 蔗糖浓度分别为 0、0.5%、1%、2%、3%, 培养方法及发芽势、发芽率、发芽指数测定方法同上。种子发芽后进性光照培养, 子叶平展期对无菌苗的叶绿素含量^[9]以及 SOD、POD、CAT^[10]含量进行测定, 从而比较筛选有利于培养壮苗的培养基。

2 结果分析

2.1 五种消毒方法效果比较

五种消毒方法中, 除单独使用 NaClO 溶液的消毒效果不理想外, 其他方法均可有效控制种子污染, 但是对种子的发芽率和发芽势及发芽指数的影响存在非常显著的差异。单纯使用 NaClO 溶液消毒不彻底, 有接近 20% 的种子污染, 而仅使用 0.1% 的 HgCl₂ 虽然可有效控制种子污染的情况发生, 但是对种子的毒害比较严重, 12d 时仅有 8% 的种子发芽, 发芽率过低, 会延误组织培养的进行。在 NaClO 溶液中加入 1 滴土温可以改善消毒效果, 并且对种子的发芽率、发芽势和发芽指数影响较小。而采用 NaClO 溶液与 0.1% HgCl₂ 相结合, 同样能达到较好的消毒效果。随着 HgCl₂ 处理时间加长, 对种子的毒害也明显增加, 其毒害作用明显大于 NaClO 溶液。以上处理方法中, 10% NaClO 溶液 + 土温 1 滴消毒 30min 和 10% NaClO 溶液 20min+0.1% HgCl₂ 3min 两种消毒方法较好, 对其他品种种子消毒的效果均表现理想。(见表 1、表 2)

表 1 五种消毒方法的效果比较

处理	污染率 (%)	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数
未处理	—	76a	84a	27.00a
10% NaClO 30min	19	72b	82ab	26.33ab
10% NaClO 30min+土温 1 滴	0	73ab	83a	26.66a
10% NaClO+HgCl ₂ 3 min	0	68c	79b	25.12b
10% NaClO +HgCl ₂ 5 min	0	49d	61c	19.48c
0.1% HgCl ₂ 8 min	0	0c	8d	2.64d

注: 数据处理采用 Duncan 新复极差法, 显著水平 P=0.05。以下同。

表 2 不同番茄品种消毒效果

品种	处理	污染率 (%)	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数
合作 903	未处理	—	81a	86a	27.70a
	处理 3	0	78a	85a	27.24a
	处理 4	0	74b	83a	26.63a
红博士	未处理	—	79a	86a	27.70a
	处理 3	0	79a	87a	28.06a
	处理 4	0	72b	76b	24.45b
渝粉 109	未处理	—	84a	92a	29.06a
	处理 3	0	81a	91a	29.03a
	处理 4	0	77b	86b	27.10b

2.2 不同蔗糖浓度对种子发芽的影响

从表 3 可以看出, 随着蔗糖浓度的提高, 种子的发芽势、发芽率和发芽指数逐渐下降。不添加蔗糖和蔗糖浓度为 0.5% 时, 对种子的发芽几乎无影响; 当蔗糖浓度达到 3% 时, 种子发芽明显受抑, 发芽率和发芽

势大副降低, 发芽率仅为 16%。种子发芽率随蔗糖浓度增加而降低, 可能因为蔗糖浓度增加, 引起渗透势提高, 种子吸水困难, 从而抑制种子发芽。

此外, 蔗糖浓度不同对无菌苗的素质也有一定影响。不添加蔗糖时, 无菌苗比较瘦弱, 颜色浅绿, 而添

表 3 不同蔗糖浓度对种子发芽的影响

蔗糖浓度 (%)	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数	生长状况
0	71a	81a	27.00a	长势齐, 纤弱, 子叶薄、浅绿
0.5%	71a	80a	26.46a	长势整齐, 健壮, 子叶较厚, 颜色深
1%	68ab	75ab	25.30ab	长势较整齐, 健壮, 子叶较厚
2%	42b	56b	17.70b	长势不整齐, 颜色深绿
3%	4c	16c	5.33c	长势不整齐, 颜色深绿

加蔗糖后, 无菌苗健壮, 子叶较厚, 颜色深。

2.3 无菌苗生理指标测定结果

外植体的生理年龄和生理状态对组织培养有很大影响, 通过对以下生理指标的测定, 选择有利于形

成良好素质无菌苗的培养基是必要的。在不同蔗糖浓度的培养基中,不添加蔗糖的无菌苗,四个生理指标均显著低于培养基中填加了蔗糖的无菌苗。而且各生理指标随蔗糖浓度的增加呈上升趋势。除 CAT 含量外,

0.5%和 1%的无菌苗素质无显著差异,2%和 3%中生理指标值较高,但种子的发芽势和发芽率过低,因此考虑到对发芽势和发芽率的影响,培养番茄无菌苗,选择含蔗糖 0.5%和 1%的 1/2MS 均可。(结果见表 4)

表 4 无菌苗生理指标测定结果

蔗糖浓度 (%)	叶绿素 (mg/g)	SOD (mmol/g)	POD (mmol/g)	CAT (mg/(<min · g>))
0	1.096c	153.4b	13.20b	20.56c
0.5	1.333b	185.6a	18.23a	23.26b
1	1.415b	185.8a	19.60a	26.13a
2	1.562a	186.3a	18.90a	23.90b
3	1.637a	187.0a	18.36a	23.76b

3 结论

经过对五种消毒方法和不同蔗糖浓度的培养基的比较筛选,10%的 NaClO 溶液 + 土温 1 滴 30min 可以获得比 10%NaClO 溶液 20 min +0.1% HgCl₂ 3min 更高的发芽势和发芽率,但二者发芽率绝对值相差不大,而且后者灭菌效果更加稳定,因此,选择其中任何一种进行种子消毒都是可行的。用 1/2MS+1%蔗糖培养无菌苗,种子发芽快速整齐,秧苗健壮,10d 左右,子叶平展,即可挑选大而舒展的子叶进行剪切,用以分化诱导。高效的消毒方法及无菌壮苗的培养,为组织培养工作的顺利进展打下了良好的基础。

参考文献

- 1 余诞年,吴定华,陈竹军.番茄遗传学[M].湖南:湖南科学技术出版社,1999.1-3

- 2 周长鸣.现代蔬菜育种学[M].北京:科学技术文献出版社,1999.2-3
- 3 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004.64-65
- 4 何秀霞,陆一鸣.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(自然科学版),2003,(18):30-33
- 5 王立君,应成波,严成其.番茄组织培养和绿苗分化[J].宁波农业科技,1997(2):8-9
- 6 梁美霞,李景富等.番茄组织培养存在的问题及对策[J].北方园艺,2004(3):74-75
- 7 国家技术监督局.GB/T 3543.4-1995,农作物种子检验规程.北京:中国标准出版社.1995.1
- 8 International Seed Testing Association.1999. International Rules for Seed Testing.Sci & Technol,27(supplemet): 27-32
- 9 邹琦.植物生理学实验指南[M].北京:中国农业出版社,2000.72-76
- 10 李合生.植物生理生化实验原理和技术 [M]. 高等教育出版社,2001.164-165

(责任编辑:回文广)