

# 培养基和继代时间对番茄叶片愈伤组织诱导和芽分化的影响

毕建水<sup>1</sup> 李翠翠<sup>2</sup> 徐丽丽<sup>3\*</sup>

(1 莱阳市农业局, 山东莱阳 265200; 2 青岛农业大学生命科学院, 山东青岛 266109;

3 青岛农业大学植物保护学院, 山东青岛 266109)

**摘要:**对两种番茄品种樱红和 J07 进行了筛选最佳培养基和培养条件的研究结果表明:樱红的叶片外植体在附加激素 6-BA 1.0mg/L + IAA 0.1mg/L 的改良 MS 培养基中诱导直接分化芽的能力最强,继代时间为 12d 时褐化最轻;而最适合 J07 叶片外植体分化的培养基为附加激素 6-BA 1.0mg/L + IAA 0.2mg/L 的改良 MS 培养基,最佳继代时间为 20d。

**关键词:**番茄;组织培养;继代;褐化

中图分类号 S641.12 文献标识码 A 文章编号 1007-7731(2008)13-41-02

## Effect of Mediums and subculture time on callus induction and bud differentiation of tomato leaf

BI Jan-shui<sup>1</sup>, LI Cui-cui<sup>2</sup>, XU Li-li<sup>3</sup> (1 Laiyang Agricultural Bureau, Laiyang 265200, China; 2 School of life science, QAU; 3 School of Plant Protection, QAU, 266109)

**Abstract:** The optimal mediums and subculture time of two tomatoes species (yinghong, J07) for tissue culture were studied in this article. The result indicated that the explants of yinghong leaf blade were induced to buds directly stronger in modified MS medium adding 1.0mg/L 6-BA and 0.1mg/L IAA than other mediums and browning was lighter taking 12d as subculture time; the optimal medium for explants differentiation of J07 leaf blade was modified MS medium adding 1.0mg/L 6-BA and 0.2mg/L IAA and optimal subculture time was 20d.

**Key words:** tomato; tissue culture; subculture; browning

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 又称西红柿, 属茄科 (Solanaceae) 番茄属 (*Lycopersicum*) 草本双子叶植物, 生长周期短。番茄品种多样, 果实富含多种维生素和糖类以及丰富的无机盐类<sup>[1]</sup>, 此外它还含有柠檬酸和苹果酸, 有预防动脉硬化、治疗高血压、清热解毒等药用功能<sup>[2]</sup>, 故深受人们喜爱。本文探讨培养基中不同激素组合对两种番茄外植体愈伤组织诱导和芽分化的影响, 为番茄的遗传育种、基因转化和品质改良等工作提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 植物材料** 番茄普通栽培品种“樱红”、“J07”种子由莱阳农学院姜国勇教授惠赠。

**1.2 药品与主要试剂** 试验所用 IAA、生物素、蔗糖、琼脂等购自上海生工; 植物激素 6-BA、叶酸等购自北京拜尔迪公司。

**1.3 番茄无菌材料的获得** 将测定种子活力正常的番茄种子在 40℃ 水温下浸泡 2h, 分别用 0.05% - 0.1% 的升汞和 10% 的 NaClO 消毒, 无菌蒸馏水冲洗 3 - 5 次, 接种于 MS 培养基和铺有湿润滤纸的无菌培养皿上, 25℃ 黑暗中发芽, 2d 后开始计算发芽率, 并将发芽种子转入光照培养室中培养获得无菌苗。

**1.4 番茄叶片愈伤组织的诱导** 以改良的 MS 培养基 (MS 大量元素和铁盐 + H 微量元素和有机成分) 为基本培养基, 参考相关文献内容<sup>[3,4]</sup>, 附加 6-BA 的质量浓度

水平为 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L, 2.5 mg/L, IAA 质量浓度水平为 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 设计不同激素组合。取无菌苗幼嫩叶片, 切成 0.5cm<sup>2</sup> 见方的叶盘, 在超净工作台上接种到相应培养基上, 并在相同培养基上继代。培养条件为: 25 ± 1℃, 光照时间 14h/d, 光照强度 3000 lux。

**1.5 统计分析** 各品种每个处理重复三次, 随时观察愈伤组织和芽的分化情况。计算愈伤率 (%) = 再生愈伤组织的外植体数/接种外植体数 × 100; 分化率 (%) = 再生正常不定芽的外植体数/接种外植体数 × 100; 褐化率 (%) = 出现褐化的外植体数/接种外植体数 × 100。

## 2 结果与分析

**2.1 不同灭菌剂对番茄种子灭菌及萌发的影响** 结果表明, 采用不同的表面灭菌剂对番茄种子的灭菌和萌发有不同的影响, 而且接种于湿润滤纸上的种子比培养基上的发芽时间普遍提前。以次氯酸钠处理的种子表皮退色变白, 不同的处理时间下番茄种子的发芽率都为 100% (表 1), 发芽时间甚至略短于自来水处理的种子, 但当灭菌时间低于 20min 时, 种子污染较重, 所以理想的灭菌效果是采用 10% 的 NaClO 灭菌 25 - 30min。以升汞处理的种子颜色变深, 随升汞浓度的增大, 种子发芽率明显降低, 发芽时间延长, 当升汞浓度不变, 灭菌时间降低时, 种子发芽率又升高, 但全部污染, 说明升汞对番茄种子萌发确实有一定的

**作者简介:** 毕建水 (1964 -), 女, 山东文登人, 高级农艺师, 学士, 研究方向为农业技术推广。\* 通讯作者

**收稿日期:** 2008 - 05 - 28

抑制作用。

表1 不同灭菌剂对番茄种子灭菌及萌发的影响

处理	灭菌剂	浓度 (%)	处理时间 (min)	发芽时间 (d)	污染率 (%)	发芽率 (%)
1	NaClO	10	25-30	3	0	100
2	NaClO	10	15-20	2	60	100
3	HgCl <sub>2</sub>	0.05	10-15	6	30	30
4	HgCl <sub>2</sub>	0.1	10-15	7	0	15
5	HgCl <sub>2</sub>	0.1	3-5	7	100	20

2.2 不同激素浓度组合对番茄叶片愈伤组织诱导分化的影响

叶片外植体接种7d后,大部分组织叶缘发白卷曲,有的出现淡黄绿色愈伤组织,继续培养两周,部分愈伤组织开始有再分化芽生成,也有部分组织出现褐化现象或生成畸形芽。就品种基因型而言,樱红比97-2愈伤组织分化时间较晚,但后期生成的不定芽多,分化率普遍较高,说明不同激素浓度组合对不同基因型的番茄叶片外植体愈伤组织的脱分化影响不大,但对其再分化能力影响较大。番茄两个品种在多种培养基中的愈伤率相差不大,但樱红的叶片外植体在附加激素6-BA 1.0mg/L + IAA 0.1mg/L的改良MS培养基中诱导直接分化芽的再生能力最强,而J07的叶片外植体在附加激素6-BA 1.0mg/L + IAA 0.2mg/L的改良MS培养基中诱导直接分化芽的再生能力最强,其次是附加6-BA 2.0mg/L + IAA 0.2mg/L的培养基(表2)。

表2 不同激素浓度组合对番茄品种樱红和J07外植体分化的影响

处理	激素质量浓度(mg/L)		接种叶盘数(块)	樱红			J07		
	IAA	6-BA		愈伤率 (%)	分化率 (%)	褐化率 (%)	愈伤率 (%)	分化率 (%)	褐化率 (%)
1	0.1	0.5	40	92.5	50.0	7.5	82.5	32.5	17.5
2	0.1	1.0	40	100	100.0	0.0	100	95	0.0
3	0.1	1.5	40	97.5	67.5	17.5	92.5	45.0	27.5
4	0.1	2.0	40	100	50.0	27.5	100	50.0	27.5
5	0.1	2.5	40	100	82.5	0.0	100	67.5	32.5
6	0.2	0.5	40	100	67.5	22.5	100	82.5	0.0
7	0.2	1.0	40	85.0	82.5	5.0	100	100.0	0.0
8	0.2	1.5	40	100	92.5	0.0	100	35.0	7.5
9	0.2	2.0	40	100	97.5	0.0	100	92.5	7.5
10	0.2	2.5	40	100	82.5	7.5	100	50.0	22.5

2.3 继代时间对番茄叶片愈伤组织诱导和分化的影响

继代时间对不同基因型的番茄外植体愈伤组织的诱导和分化有明显影响。由图1、图2可知,不经继代培养的外植体褐化现象非常严重,褐化率都在80%以上;樱红在以12d为继代周期时几乎没有组织发生褐化,愈伤组织分化快,生成正常不定芽多,畸形芽少;J07在以20d为继代周期时褐化最轻,12d时稍差。

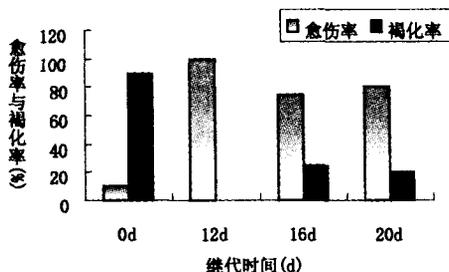


图1 继代时间对番茄品种樱红愈伤率的影响

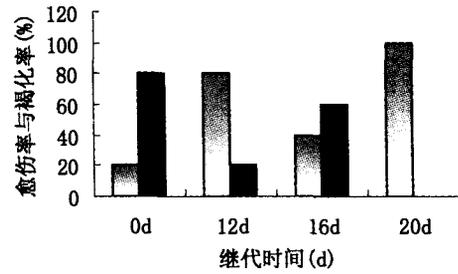


图2 继代时间对番茄品种J07愈伤率的影响

3 讨论

3.1 番茄无菌苗的获得 相关资料表明,以往对番茄无菌苗的获得大多采用单一的升汞灭菌法,但也有报道指出,升汞对种子的萌发可能具有一定的抑制作用<sup>[5]</sup>。本试验结果表明,采用次氯酸钠为表面灭菌剂,可能会促进种子提前萌发,而升汞虽然灭菌效果好,但对番茄种子萌发有较大的抑制作用。分析原因也许是因为不同基因型的番茄种子对升汞的敏感性存在差异,或者重金属汞使番茄种子中的某种物质发生改变或损伤,从而致使种子萌发受阻,而次氯酸钠可能破坏了种皮中的某种物质,打破了番茄种子的休眠,致使其萌发提前。具体原因有待进一步验证。

3.2 影响番茄离体再生的一些主要因素 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,其中培养基中外源激素的种类、浓度和组合是最重要的条件,它直接影响着外植体的脱分化和再分化过程,本试验表明,在同种培养基上,附加相同浓度的激素组合,不同基因型的番茄存在不同的愈伤率和分化率,同一种番茄在不同浓度激素组合中再生率相差也很大,对外植体的选择、操作时间的长短以及合适的光照和温度对番茄离体再生过程也有一定影响。

3.3 褐化对番茄外植体分化的影响 植物组织的褐化多是通过含铜的氧化酶如多酚氧化酶和酪氨酸酶的作用所致,当酚被氧化时便形成深色化合物,导致材料变褐死亡<sup>[6]</sup>。褐化发生的因素与组培植物品种、取样外植体年龄、取样时间、培养基、温度和光照等都可能有关。要防止褐化的产生,关键要减少氧化的机会,或者降低酶的活性。因此,应尽可能地减少新鲜外植体材料切割和接种操作过程中在空气中暴露的时间,还可在培养基中加入一定的抗氧化剂,如维生素C、柠檬酸、半胱氨酸盐酸盐、谷胱甘肽和巯基乙醇等。另外,试验中还发现,培养基的pH值降低和一段时间的暗培养可以有效减少褐化的发生。培养基中的细胞分裂素,不仅能促进酚类化合物的合成,而且还能刺激多酚氧化酶的活性<sup>[7]</sup>,试验中随着6-BA浓度逐渐增大,番茄外植体的褐化程度基本上逐渐增加,而在附加IAA浓度为0.2mg/L的培养基上的褐化程度似乎要比附加0.1mg/L的要略小一点,因此选择合适的培养基也是减少褐化的有效途径。(下转124页)

- 1982, 24: 388 - 391
- [7] 郝秉中, 吴继林, 云翠英. 排胶对橡胶乳管分化的促进作用. 热带作物学报, 1984, 5(2): 19 - 23
- [8] 张蔚春, 李汉怀. 胶树预割对产量及副性状的初步影响的研究. 热带作物研究, 1982(1): 11 - 12
- [9] Kush A. Isoprenoid biosynthesis: the Hevea factory! Plant Physiol Biochem, 1994, 32: 761 - 767
- [10] Tupy J. Nucleic acid in latex and production of rubber in Hevea brasiliensis. 1969: RRIM
- [11] Tupy J, Stanley RG, Linskens HF. Stimulation of pollen tube growth in vitro by thiouracil and other antimetabolites of nucleic acid bases. Acta botan. neerl. 1965, 14: 148 - 154
- [12] 曾日中. 巴西橡胶树胶乳核酸含量与产量及死皮关系的研究. 热带作物学报, 1997, 18(1): 10 - 15
- [13] Reid M S, Pratt H K. Effects of ethylene on potato tuber respiration. Plant Physiol. 1972, 49: 252 - 255
- [14] 肖敬平: 乙烯利刺激橡胶树产胶的原理——一项整体水平的综合探讨, 热带作物科技, 1981(5): 1 - 8
- [15] 肖敬平: 乙烯利刺激巴西橡胶树排胶的机理. 中国植物生理学会第二次全国会议论文摘要. 1978
- [16] Xiao J P, Xu W X, Yang S Q et al. Wound response during exploitation of rubber trees and role of ethylene involved. C. R. Coll. Expl. Physiol. Am. Hevea, IRRDB, 1984, Montpellier, 239 - 248
- [17] 许闻献, 潘衍庆. 橡胶树产胶生理的研究进展——1988年国际采胶生理学术讨论会综述之一. 热带作物研究. 1990(1): 79 - 84
- [18] J M Eschbach(董婉秋译). 胶乳产量和无性系生理特性之间的关系. Physiologie Vegetale. 1984, 22(8): 127 - 134
- [19] D' Auzac J. Transmembrane transport mechanism application to the laticiferous system. In: Compte - rendu du colloque exploitation - physiologie et amelioration del' Hevea. IRCA - CIRAD 1988: 2 - 7
- [20] Jacob, J L, Eschbach, J M. Physiological basis for latex diagnosis of the functioning of the laticiferous system in rubber tree. In: Int Rubber Conf. Rubber Research Institute Malaysia. Kuala Lampar, 1985: 38 - 60
- [21] Jalob I L, Serres E. Development of the Hevea Latex diagnosis. Agritrop, 1988, 12(2): 95 - 115
- [22] 杨少琼等. 割胶对胶乳硫醇影响的初步研究. 热带作物研究, 1994(4): 7 - 11
- [23] Chrestin H. Biochemical basis of bark dryness. Proc coll expl physiol am hevea, IRRDB, Montpellier, 1984: 273 - 293
- [24] 杨少琼, 范思伟. 胶乳诊断及其初步应用(一). 热带作物科技, 1993(4): 14 - 16
- [25] 杨少琼, 范思伟. 胶乳诊断及其初步应用(二). 热带作物科技, 1993(5): 21 - 23
- [26] Jacob, 等(吴恭恒译). 胶乳生理生化研究综述. 科技情报研究论丛, 1983
- [27] Silpi U. 割制和乙烯利刺激对橡胶树的影响. IRRDB. 2004
- [28] J L Jacob. 胶树乳管系统功能的胶乳诊断的生理基础. 热带作物译丛. 1987
- [29] Hao B Z, Wu J L, Meng C X et al. Laticifer Wound Plugging in Hevea brasiliensis—The role of a Protein—network with Rubber Particle Aggregations in Stopping Latex Flow and Protecting Wounded Laticifers. J. Rubb. Res. 2004, 7(4): 281 - 299
- [30] 黎瑜, 白先权, 曾日中. 割胶和水杨酸刺激对胶乳中蛋白质代谢及  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性的影响. 热带农业科学. 2004, 24(5): 1 - 4
- [31] Adiwilaga K, Kush A. Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree(Hevea brasiliensis). Plant Molecular Biology, 1996, 30(5): 935 - 946
- [32] Dennis M S, Light D R. Rubber elongation factor from Hevea brasiliensis Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(31): 18 608 - 18617
- [33] Sookmark U, Pujode - Renaud V, Chrestin H et al. Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber tree affected by the tapping panel dryness syndrome. Plant Cell Physiol. 2002, 43: 1323 - 1333
- [34] Broeckaert W F, Lee H I, Chua N H, et al. Wound - induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (Hevea brasiliensis). Proceeding National Academy science, 1990, 87: 7633 - 7637
- [35] d' Auzac J, Prvot J C, Jacob J L. What's new about lutoids? A vacuolar system model from Hevea latex. Plant Physiol. Biochem, 1995, 33: 765 - 777
- [36] S K Oh, H Kang, D H Shin et al. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from Hevea brasiliensis[J]. J. Biol. Chem., 1999, 274: 17132 - 17138
- [37] Pakianathan SW, Tata SJ, Low FC. Certain aspects of physiology and biochemistry of latex production. In Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology (sethuraj MR, Mathew NM eds.). Amsterdam; ELSEVIER. 1992. 298 - 323
- [38] Xiao J - P, Liang A - L, Zhang W - C, Xu W - X, Hao B - Z, Yang S - Q, Hong G - G, Bkin H - X, Ho D - Q, Chen D - S. Reliable use of ethephon stimulation in long term rubber tree production and its physiological basis. Int Rubber Res Devol Board Symposium Beijing, 1983
- [39] Chrestin H. Biochemical aspect of bark dryness induced by over - stimulation of rubber trees with ethrel. In Physiology of Rubber Tree Latex (d' Auzac J, Jacob JL and Chrestin H. eds.). Boca Raton, FL; CRC Press, 1989. 431 - 44

(责编:陶学军)

**(上接 42 页)参考文献**

- [1] 余诞年, 吴定华, 陈竹君. 番茄遗传学[M]. 湖南: 科学技术出版社, 1999: 235 - 234
- [2] Ammirato PV, Evance DA, Sharp WR, et al. Handbook of plant cell culture[M]. New York: Macmilan Pub. Co., 1983: 82
- [3] 魏琴, 周黎军, 周锦霞等. 激素对樱桃番茄两种外植体诱导再生植株的影响[J]. 广西植物, 2002, 22(5): 441 - 443
- [4] 尹明安, 郭立, 刘华伟等. 番茄 ZF 遗传转化再生体系的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(5): 27 - 30
- [5] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444 - 449
- [6] 刘士勇, 刘守伟. 番茄组织培养中应注意的问题[J]. 北方园艺, 2006(2): 119 - 120
- [7] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003: 4 - 6

(责编:张琪琪、陆艾五)