

樱桃番茄再生系统的研究^{*}

李晓东¹, 刘 玲², 陈 杭², 程智慧¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 北京市蔬菜研究中心, 北京 100089)

[摘 要] 研究了“美味樱桃番茄”的再生系统, 以子叶盘和下胚轴切段为外植体, 分析了不同激素及其质量浓度对外植体诱芽和诱根的影响, 以及外植体对抗生素卡那霉素的敏感性。结果表明, 适宜的诱芽培养基为MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L, 生根培养基均为MS+IAA 0.1 mg/L; 卡那霉素筛选质量浓度为50 mg/L。

[关键词] 樱桃番茄; 再生系统; 子叶; 下胚轴

[中图分类号] S641.204⁺.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0057-04

番茄的遗传资源非常丰富, 在蔬菜作物的遗传、育种以及生理等学科的研究中, 番茄是研究最广泛、最深入的材料之一。近来发现番茄中的番茄红素和胡萝卜素具有抗氧化功能及预防衰老和癌症等功能, 因而其食用价值和经济价值更受关注, 形式多样的转基因番茄陆续问世, 例如, 耐储运的番茄品种或植株^[1~3], 抗TMV^[4]、番茄黄曲叶病毒(TVLCV)^[5]、CMV^[6]、苜蓿花叶病毒(ALMV)^[7]等病毒病的番茄植株, 抗虫的番茄植株^[8,9]以及抗草甘膦(glyphosate)^[10]等除草剂的番茄植株。但是不同番茄品种再生系统是有差异的, 特别是近年来, 转基因植物疫苗研究的兴起和发展, 目标植物初步局限在可生食的植物。樱桃番茄作为近年新兴的、广受欢迎的鲜食番茄品种, 对其再生系统的研究还很少, 它的建立将为以后转基因疫苗的应用打下基础。

1 材料与方法

本试验在北京市蔬菜研究中心营养品质实验室进行。供试番茄品种为美味樱桃番茄, 购自中国农科院蔬菜花卉研究所。基本培养基为MS, 蔗糖含量30 g/L, 琼脂用量9 g/L; 1/2 MS培养基除琼脂用量外, 其余成分均为MS培养基用量的一半。普通化学药品购自北京市化学药剂公司, 琼脂购自鼎国生物公司。

1.1 番茄无菌苗的获得

将番茄种子浸于1 g/L的次氯酸钠溶液中30 min, 用无菌水漂洗种子4~6次, 用无菌吸水纸吸

干种子上的水分, 均匀播放于已灭菌的1/2 MS培养基上, 28℃暗培养3 d, 移至光下继续培养, 每天光照16 h, 光照强度1 600~1 800 lx, 培养温度为(25±1)℃, 培养5~7 d后获得无菌苗。

1.2 外植体的切取

取无菌苗的子叶、下胚轴作为外植体, 采用叶盘法培养。子叶切去叶尖和叶柄, 剩余部分切成约0.5 cm×0.5 cm大小的子叶块(即叶盘), 下胚轴切去胚根与上部, 其余部分切为长度约0.5 cm的切段。

2 结果与分析

2.1 诱芽培养基的筛选

芽的诱导主要决定于培养基中细胞分裂素与生长素的比例, 本研究所用的细胞分裂素是BA、ZT, 生长素为IAA, 在参考前人研究^[11~14]的基础上, 共设计20多种不同激素及其质量浓度组合, 观察记录子叶盘和下胚轴切段在不同培养基上分化愈伤组织及芽的情况。结果(表1)表明, 在激素组合不太合适的培养基上, 外植体生长较差, 生长速度较慢, 甚至不生长, BA质量浓度达到25 mg/L时, 培养基诱芽的能力很差, 外植体生长很少, 绝大多数发黄或发白, 结构很松散; 在激素组合合适的培养基中, 外植体逐渐膨大, 叶盘成倍增大, 切口边缘膨大卷起, 1~2周后, 边缘卷起处可见绿色或浅黄色小突起, 即为潜在的芽点, 约3~4周后部分芽点开始分化芽; 下胚轴切段培养初期膨大也较快, 两端切口处膨大尤为突出, 使下胚轴切段呈哑铃状, 突起处也着生很多

* [收稿日期] 2001-03-07

[基金项目] 北京市科委重点实验室资助项目(951890211)

[作者简介] 李晓东(1969-), 男, 陕西安康人, 助理研究员, 博士, 现在华南师范大学从事植物生理与分子生物学博士后研究。

绿色或淡黄色小芽突,随着培养时间的推移,部分芽根培养基。ZT 2 0mg/L + IAA 0 05mg/L 激素组合的诱芽率最高。

表 1 不同激素组合对“美味樱桃番茄”品种外植体分化芽的影响

Fig 1 The effect of different constitution of hormone on shoot differentiation from explants of cherry tomato (cv. Delicious Cherry)

激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone concentration			子叶 Cotyledons			下胚轴 Hypocotyls		
BA	ZT	IAA	叶盘数 No. of leaf disc	生芽外植体数 No. of explants inducing shoot	生芽率/% Shoot percentage	下胚轴切段数 No. of hypocotyl segments	生芽外植体数 No. of explants inducing shoot	生芽率/% Shoot percentage
0 2		0	120	13	10 8	120	43	35 8
		0 2	120	27	22 5	120	55	45 8
		0	120	60	50 0	120	69	57 5
		0 2	120	69	57 5	120	82	68 3
		1 0	120	53	44 2	120	58	48 3
5 0		0	120	48	40 0	120	53	44 2
		0 2	120	41	34 2	120	50	41 7
		1 0	120	43	35 8	120	47	39 2
		5 0	120	38	31 7	120	45	37 5
		0	120	0	0	120	0	0
25		0 2	120	40	33 3	120	42	35 0
		1 0	120	38	31 7	120	45	37 5
		5 0	120	30	25 0	120	37	30 8
		25	120	0	0	120	3	2 5
		0 2	120	62	51 7	120	71	59 2
2 0	2 0	0 05	120	96	80 0	120	99	82 5
		0 2	120	68	56 7	120	78	65 0
		0 5	120	58	48 3	120	66	55 0

2 2 诱根培养基的筛选

子叶盘与下胚轴切段在诱芽培养基中诱导出芽体,待到幼芽 1~ 2 cm 长时,切下小幼芽,尽量将愈伤组织去除干净,否则有可能影响幼芽的生根及幼苗的生长,将切取的幼芽移入生根培养基培养。本试验设计了 4 种生根培养基,比较其诱根效果。幼芽经 2 周培养后生出新叶,转入新鲜的相同培养基中继续生长 3 周,统计幼苗的生根情况。

在幼芽转入生根培养基后,逐渐生出新叶成为小幼苗,在此期间个别小幼苗从基部边缘首先长出若干主根,转入新鲜培养基继续培养一段时间后,在主根上进一步长出长短不一的小侧根,在主根或侧根上还可能长有白色纤细小毛根。从表 2 可知,是否

添加 IAA 对根的诱导影响较大,添加 IAA 的培养基诱根作用明显大于未添加 IAA 的培养基; 1/2 MS 与 MS 的诱根效果均相差不大;从诱根的速度看,添加 IAA,幼苗生长较未添加 IAA 的快且生根早,大约在转入生根培养基 2 周左右就有小短根出现,培养于添加 0 1mg/L IAA 培养基的幼苗生根最快,生根后更加促进了幼苗的生长。

当小苗在生根培养基中根系较发达后,可以移栽至温室。首先揭去三角瓶封口膜,使幼苗在室温下适应 24 h,然后洗净根系上的培养基,将幼苗栽于蛭石中,用烧杯或其他器皿罩住幼苗以防过度失水,大约 1 周左右可去掉覆盖物,移栽至温室。

表 2 不同培养基的诱根效果

Fig 2 The effect of different medium on root induction

培养基 Medium	培养幼苗数 No. of seedlings cultured	生根幼苗数 No. of seedlings inducing root	生根率/% Percentage of root induction	培养基 Medium	培养幼苗数 No. of seedlings cultured	生根幼苗数 No. of seedlings root inducing	生根率/% Percentage of root induction
1/2 MS	30	21	70 0	MS+ IAA 0 05	30	25	83 3
MS	30	21	70 0	MS+ IAA 0 1	30	27	90 0

2 3 番茄外植体对卡那霉素浓度敏感性的筛选

在分子生物学中筛选标记基因很重要,利用标

记基因可以自然淘汰非转基因植株,很方便地初步鉴定出非转基因植株,省事、省时、省力。由于多数试

验构建的植物表达载体均包含 NPT II 基因, 该基因可使转化植株对卡那霉素产生抗性, 非转基因植株因不抗卡那霉素, 培养过程中会逐渐黄化死亡, 由此初步筛选出转基因植株。因此, 为了以后研究的顺利进行, 有必要研究樱桃番茄对卡那霉素的天然耐性, 以便获得较准确的质量浓度。本试验以不同外植体, 在含 10, 30, 50, 70, 90 mg/L 卡那霉素的培养基中培养 5 周后形成愈伤的数目来研究其对卡那霉素的

天然耐性。
由表 3 可知, 在卡那霉素的质量浓度达到 50 mg/L 以后, 外植体没有愈伤形成, 随着培养时间的增长, 这些外植体逐渐由绿变黄, 最终黄化死亡, 即使有个别分化愈伤也是淡黄色, 继续生芽的几率很小。因此, 在以后的转化试验中, 樱桃番茄卡那霉素的适宜筛选质量浓度为 50 mg/L。

表 3 卡那霉素的质量浓度对番茄外植体分化愈伤的影响

Fig 3 The effect of kanamycin concentration on calli differentiation from different explants of tomato

卡那霉素质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of kanamycin	子叶 Cotyledon		下胚轴 Hypocotyl	
	外植体数 No. of explants	愈伤数 No. of calli	外植体数 No. of explants	愈伤数 No. of calli
10	40	29	40	29
30	40	23	40	25
50	40	12	40	15
70	40	0	40	0
90	40	0	40	0

3 讨论与结论

作为植物转基因工作的基础, 再生系统的建立至关重要, 与一般的组织培养是有区别的。首先, 芽的诱导是关键的第一步, 芽的诱导是外源基因转化的前提和基础, 迄今为止外源基因的转化频率一直比较低, 因此, 必须保证培养的外植体能诱导出足够的芽, 才有可能得到转基因幼苗; 其次, 因为组织培养的变异比较常见, 因此, 最好是从外植体直接诱芽, 以减少变异几率。另外, 筛选抗生素质量浓度的工作也很重要, 可以减少很多工作量, 节省很多时

间, 特别要注意的是, 抗生素一般是不耐热的, 不能随培养基高压灭菌, 一定要等到培养基温度降下来后, 才能将无菌的抗生素加入。
“美味樱桃番茄”种子用 100 g/L 的次氯酸钠消毒 30 min, 无菌水冲洗 4~ 6 次, 播种于 1/2 MS 培养基上, 5~ 7 d 可得无菌苗。以子叶和下胚轴为外植体进行培养, 在本试验设置的组合内较适宜的诱芽培养基为 MS+ ZT 2.0 mg/L + IAA 0.05 mg/L, 较适宜的诱根培养基为 MS+ IAA 0.1 mg/L, 较适宜的卡那霉素质量浓度为 50 mg/L。

[参考文献]

[1] 汤福强, 刘 愚, 施教耐, 等. ACC 合酶基因及其反义基因转化番茄获得转基因植株[J]. 科学通报, 1994, 39(4): 2280- 2283
[2] 宋俊岐, 邱井生, 王 荣, 等. 通过表达 ACC 脱氢酶基因控制番茄果实的成熟[J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 33- 38
[3] 鞠 戎, 田颖川, 沈全光, 等. 番茄多聚半乳糖醛酶 dDNA 的克隆及其对番茄 PG 表达的反义抑制[J]. 生物工程学报, 1994, 10(2): 96- 102
[4] Powell Abel P. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232: 738- 743
[5] Kunik T. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus[J]. Bio/Technology, 1994, 12(5): 500- 504
[6] 杨荣昌, 徐鹤林, 龙明生, 等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄及其对 CMV 的抗性[J]. 江苏农业学报, 1995, 11(1): 40- 44
[7] Tumer N E. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confer cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants[J]. EMBO J, 1987, (6): 1181- 1188
[8] Delannay X. Field performance of transgenic tomato plants expression the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein[J]. Bio/Technology, 1987, 7(12): 1265- 1269
[9] Fischhoff D. Insect tolerant transgenic tomato plants[J]. Bio/Technology, 1987 (5): 803- 813
[10] Fillatti J J. Efficient transfer of glyphosate tolerance genetic tomato using a binary Agrobacterium tumefaciens vector[J]. Bio/Technology, 1987, (5): 726- 730

- [11] 杨增海 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987.
- [12] 刘克斌, 李曙轩, 裴文达 番茄叶片、子叶、下胚轴离体培养再生植株的研究[J]. 浙江农业科学, 1987, (1): 43- 46, 42
- [13] 蒋有绎, 周 枫, 彭朝华 不同激素配比对番茄叶片外植体分化的影响[J]. 华北农学报, 1988, (1): 111- 115
- [14] 佟新萍 番茄幼叶愈伤组织诱导与再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 190- 192

Construction of regeneration system of cherry tomato (*L. esculentum* var. *cerasiforme* Alef.)

L I X i a o - d o n g¹, L I U L i n g², C H E N H a n g², C H E N G Z h i - h u i¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

Abstract: The regeneration system of cherry tomato (cv. Delicious Cherry), cotyledons and hypocotyls used for explants, were examined. The result showed that the plant regulator played an important role in tissue culture. MS medium with ZT 2.0 mg/L + IAA 0.05 mg/L had great effects on the formation of shooting. The medium inducing root was MS + IAA 0.1 mg/L, and the concentration of kanamycin for selecting transgenic tissue was 50 mg/L.

Key words: cherry tomato; regeneration system; cotyledons; hypocotyls

· 简 讯 ·

“黄土区水分-养分-小麦生长及水分有效性研究”获 2000 年陕西省科技进步一等奖

由西北农林科技大学、中国科学院、水利部水土保持研究所邵明安研究员等完成的“黄土区水分-养分-小麦生长及水分有效性研究”获 2000 年陕西省科技进步一等奖。

该研究取得的成果有: (1) 系统地研究了黄土区土壤水分的多种农业和生态属性, 揭示了一系列新规律。厚层壤质土壤形成高持水能力。研究发现 2 m 深层主要作物用水层可储存 400~ 600 mm 水分, 其中有效水分占 60%~ 70%; 明确了土壤储水稳定性。夏秋休闲期储水可以保持到来年春早期使用, 关中西部水分保持率可达到 75% (60 cm 以上土层) 和 90% (1 m 以下土层); 降水入渗深度和储水可恢复性。指出黄土高原从北到南年降水最大入渗深度为 1.4~ 2 m, 南部丰水年达到 3~ 5 m; 明确了作物对土壤储水具有很大的利用能力。由此, 系统阐明了黄土区土壤对水分的入渗、保存和利用的基本规律, 提出“土壤水库效应”理论, 这种水库效应具有缓和气候干旱的功能。(2) 明确了土壤深层储水对作物产量形成的供水作用, 一般年份对旱地小麦供水量达到 100~ 200 mm, 占耗水量的 30%~ 50%, 与生育期降水共同组成了小麦需水来源。对 0~ 250 cm 土层有效储水利用率达到 78%~ 100%, 具有稳定作物产量的作用。并进一步发现轮作增强土壤肥力和施肥是调用土壤深层储水的有效手段。由此提出“以肥调水”的生产应用性概念, 被我国旱地农业广泛应用。(3) 首先在渭北台塬发现土壤下伏干层, 并证实普遍存在于黄土高原。下伏干层是指在降水入渗层以下, 直到 5~ 10 m, 甚至更深土层, 存在一个低于田间最大持水量的干燥化土层, 这是因植物蒸散形成的土壤水循环平衡所造成的。在研究下伏干层分类和产生机制的基础上, 提出了生物成因说。随着生长年限延长, 下伏干层逐渐形成并日益严重, 而且有可能中断地表径流向地下径流的转化。据此认为, 在黄土区水分条件不太具备的地区, 大面积植被建设和旱作高产田增多, 可对农业持续发展产生不良影响。(4) 从作物根系吸水过程出发, 在大量观测和深入分析的基础上建立了黄土区土壤水分有效性的动力学模型, 揭示了该区土壤水分对作物有效性的动态特性, 认为水分含量接近田间持水量时土壤水分有效性下降较快, 而在 40%~ 80% 田间持水量范围内其有效性下降非常缓慢, 这一研究结果填补了该领域的空白, 在旱地农业和节水灌溉方面有较大的指导意义。(5) 提高作物自身的水分利用能力是节水农业的突破口。随着小麦染色体倍数由 $2n \rightarrow 4n \rightarrow 6n$ 的递增, 叶片水分利用效率在抽穗-开花期呈递增趋势。随着由野生种到栽培种的进化, 叶片水分利用效率有递增的趋势。在黄土旱塬不同气候条件下, 明确了小麦生产环境条件-措施-生长-产量-水分利用效率之间的定量转化关系, 提出了小麦对有限水的高效利用和高经济效益的优化技术。

该课题组的科研人员针对该项研究成果在国内外核心刊物上共发表论文 41 篇, 其中被 SCI 收录 5 篇。成果得到学术界的普遍认可, 先后被引用 105 次, 其中 SCI 刊物引用 7 次, 中国科学引文数据库刊物引用 63 次, 学术专著引用 35 次。

(窦春蕊 供稿)