

野生番茄愈伤生长特性研究

石颖¹, 王桂英¹, 王长娜², 刘侠¹, 阚玉文¹, 郜秋华¹, 张恭¹, 车文利¹, 庞国新¹

(1. 廊坊市农林科学院, 河北廊坊 065000; 2. 廊坊职业技术学院城建工程系, 河北廊坊 065000)

摘要 以秘鲁野生细叶番茄为试材, 采用不同植物激素组合及不同光照对比培养方法, 对野生番茄愈伤组织诱导及愈伤生长特性进行了研究。结果表明, MS+6-BA (0.05~2.0) mg/L+NAA 0.5 mg/L、MS+NAA 0.5 mg/L 或 2,4-D 0.5 mg/L 均可诱导叶片及茎段愈伤。不同光照条件(强光、弱光及黑暗培养)下愈伤发生颜色变化。无论光照或暗培养, 愈伤组织增生速度均较快, 20 d 生长量为原来的 3~14 倍。根据定性和定量调查确定 MS+NAA 0.5 mg/L 为秘鲁野生细叶番茄愈伤光培养或暗培养的适宜培养基。该研究为野生番茄在基因工程上的利用奠定了技术基础。

关键词 秘鲁野生细叶番茄; 愈伤组织; 植物激素; 生长特性

中图分类号 S641.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)35-0047-03

Study of Callus Growth Characteristics of Wild Tomato

SHI Ying¹, WANG Gui-ying¹, WANG Chang-na² et al (Langfang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Langfang, Hebei 065000; 2. Langfang Vocational and Technical College, Department of Urban Construction Engineering, Langfang, Hebei 065000)

Abstract Taking a wild tomato variety *Solanum pimpinellifolium* as experiment material, the effect of different phytohormone combination and different light intensity on callus growth were studied. The results showed that the medium MS+6-BA (0.05-2.0) mg/L+NAA 0.5 mg/L, MS+NAA 0.5 mg/L (or 2,4-D 0.5 mg/L) were all suitable for leaf and shoot callus induction. The callus changed its color under different light (strong light, low light and dark). No matter what kind of light, the callus can grow very fast with the speed of 3-14 times of the original weight. According to qualitative and quantitative investigation, MS+NAA 0.5 mg/L was assured as the suitable medium for *S. pimpinellifolium* callus culture under light or dark condition. This research laid a technological foundation for the genetic engineering of wild tomato.

Key words *S. pimpinellifolium*; Callus; Plant phytohormone; Growth characteristics

番茄(*Solanum lycopersicum* L.)作为重要的蔬菜作物和模式植物,在诸多方面已有研究报道,如在生理生化上对于野生与栽培番茄的耐盐性研究^[1-3];利用子叶和下胚轴等外植体诱导植株再生^[4-5];在基因工程方面抗逆、抗病、耐储藏等基因的遗传定位、克隆^[6-9];以及农杆菌介导的抗病、抗虫、耐盐、耐除草剂等基因的遗传转化^[10-13]。栽培番茄通常具有较高的商品性状,但易受逆境胁迫和病虫害侵害。而野生番茄则是抗病、耐盐、耐冷、耐贮藏等抗逆基因及抗线虫、晚疫病、病毒病等抗病虫基因的主要来源^[7-8]。目前野生番茄的种类较多,如细叶番茄(*S. pimpinellifolium*)、秘鲁番茄(*S. peruvianum*)、多毛番茄(*S. habrochaites*)、潘那利番茄(*S. pennellii*)、小花番茄(*S. neorickii*)等^[14],其中细叶番茄生长于秘鲁,它和栽培番茄可以相互杂交,亲缘非常接近,是惟一表现出与栽培番茄有天然渐渗现象的野生种。该研究对秘鲁野生细叶番茄(*S. pimpinellifolium*)的愈伤组织培养特性进行研究,以期对野生番茄基因工程中的利用提供基础性资料。

1 材料与与方法

1.1 植物材料 秘鲁野生细叶番茄(*S. pimpinellifolium*),来源于廊坊市农林科学院作物研究所。

1.2 培养基 愈伤诱导培养基参照文献[15-16]及多年组培经验设计,以MS为基本培养基,每升添加琼脂粉5.5~6.0 g,白糖30 g,调pH至5.8~6.0。愈伤组织诱导激素为6-BA、NAA和2,4-D。培养基编号及配方如下:① MS+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.5 mg/L;② MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L;③ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L;④ MS+NAA

0.5 mg/L;⑤ MS+2,4-D 0.5 mg/L。

1.3 方法 愈伤组织诱导培养基确立:利用野生细叶番茄组培苗叶片和茎段等外植体,放置于添加不同激素的培养基上,观察愈伤诱导及继代生长情况,筛选确立出愈伤培养的适宜培养基。

野生细叶番茄愈伤细胞生长速度量化调查:将番茄愈伤接种时先称重,接种到④和⑤中,每种培养基各接种4瓶,每瓶4团愈伤,接种后将愈伤团按重量由轻到重分别编号为1~16号。光照下(2 000 lx, 12 h/d)培养20 d后再次称重,数据录入到Excel中进行分析,明确野生番茄固体培养的生长速度。

愈伤在不同光照条件下的生长特性研究:选择在同一培养基上(MS+6-BA 0.05 mg/L+NAA 0.5 mg/L)多次继代、颜色质地均匀的愈伤,接种到培养基④上,进行光照培养(2 000 lx, 12 h/d)、弱光培养(500 lx, 8 h/d)和暗培养(全天无光照)。培养20 d时,观察记录愈伤细胞颜色变化,接种后和调查时均拍照。

2 结果与分析

2.1 不同培养基愈伤诱导 叶片和茎段等外植体在上述培养基中会逐渐愈伤化,经在相同培养基上继代转接,①~⑤号培养基均可诱导愈伤组织产生(表1)。其中①和②③对比,①中的愈伤生长速度较快,细胞相对疏松,颜色为米黄色,②号淡绿色,③号愈伤最绿。④和⑤培养基对比,④上诱导的愈伤颜色为白绿色,生长速度相对较快。

在①~③中继代转接,14d后愈伤即长满瓶。①号中愈伤越来越疏松,颜色变浅,③号中愈伤较为致密、硬。这3种培养均添加NAA 0.5 mg/L,差别是6-BA浓度由0.05 mg/L→0.5 mg/L→2 mg/L。愈伤组织在④号和⑤培养基中继代转接,④号愈伤白中带绿;⑤号愈伤也微有绿色,有暗色细胞出

现,表现水渍状(图1)。图中⑥是接种初愈伤形态及颜色。

2.2 野生细叶番茄愈伤细胞生长速度 光照下培养20 d后见图2,1~16号愈伤团均按照接种初愈伤重量由轻到重排列。由图中数据分析可看出:不同愈伤团的净增长量存在差别,按照接种初重量由低到高升序排列,20 d后的重量却没有出现规则的升序排列状态。总体是:④生长量是原来的3~14倍,⑤生长量是原来的3~10倍。

取出愈伤破坏性调查:⑤上的愈伤水分含量高,水渍状;④相对较干,为湿沙状。从颜色看:⑤上的愈伤有较多变黑细胞;④细胞色浅,米白色,颜色相对均匀(图3)。综合分析,

选择④作为番茄愈伤继代培养的适宜培养基。

表1 不同培养基愈伤组织生长状况

Table 1 Callus growth status on different medium

培养基编号 Medium number	培养基 Medium	愈伤生长状况 Callus growth status
①	MS+6BA 0.05 mg/L+NAA 0.5 mg/L	愈伤色浅,疏松,生长快
②	MS+6BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L	愈伤淡绿色,生长较快
③	MS+6BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L	愈伤绿色,生长较快
④	MS+NAA 0.5 mg/L	愈伤多白色,生长较快
⑤	MS+2,4-D 0.5 mg/L	生长速度比④号慢

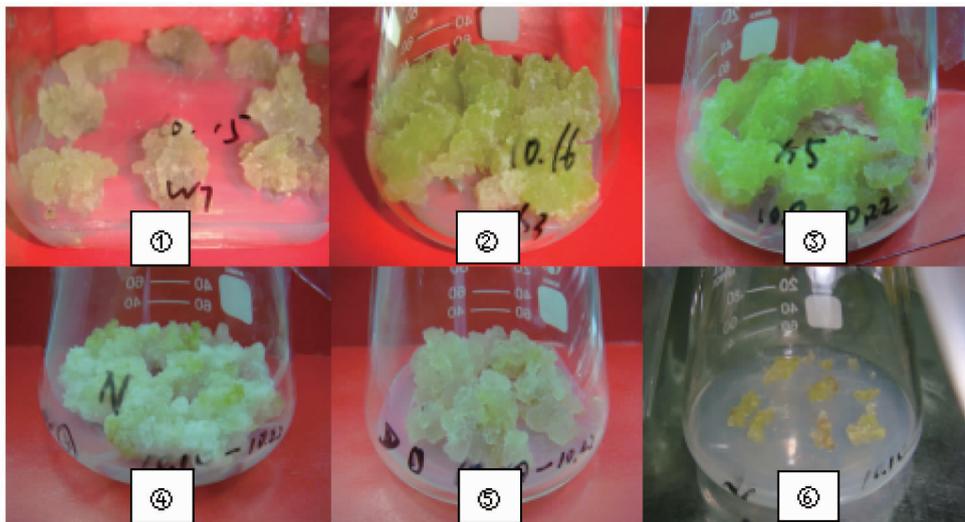


图1 在①-⑤号培养基生长14 d后愈伤状况

Fig. 1 Callus growth status on medium ①~⑤ after cultured 14 d

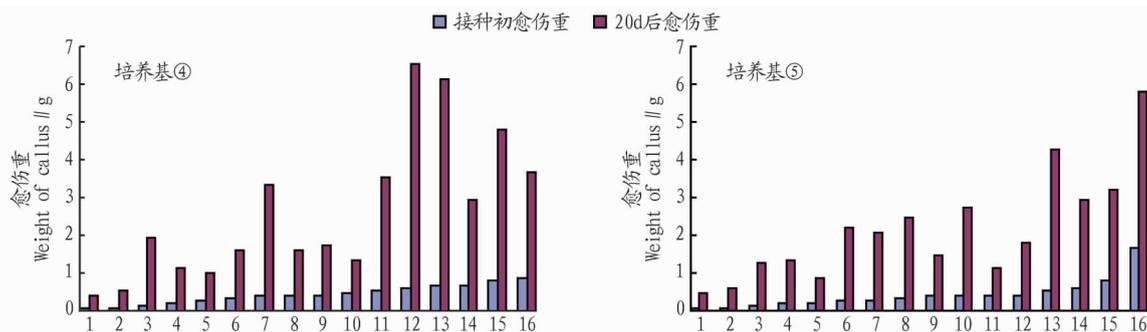


图2 不同愈伤团在培养基④和⑤中生长速度

Fig. 2 Different callus growth rate on medium ④ and ⑤

2.3 不同光照下愈伤生长对比 愈伤组织在强光、弱光及完全黑暗培养20 d时调查,最初接种的浅白愈伤团表现出3种颜色:浅白色、暗黑色和黄褐色。变黑及褐化程度上:强光>弱光>全黑暗(图4)。强光下多数愈伤为白色,呈现黑色的极少,有个别愈伤团为微黄色。弱光及全黑暗白色愈伤相对少,黑化及褐化较多。3种光照条件下继续培养30 d,黑色及黄褐色进一步加深,有的整瓶愈伤变黑色或黄褐色。黑暗培养的愈伤挑选其中的浅色细胞转接继续暗培养,细胞生长出现好转,浅色多,也有微黑出现。

由不同光照下愈伤培养变化可以看出:经过20 d的培

养,番茄愈伤在光照下培养,新生组织多为白色,少数出现黑色和乳黄色。在弱光或完全黑暗下,新生细胞黑色与浅色混杂,且黑色细胞较多,也有不发黑但为乳黄色的细胞团。挑选浅色细胞黑暗继代培养,经多次继代后可获得稳定的白色愈伤,不再发生颜色改变。

3 结论与讨论

秘鲁野生细叶番茄外植体愈伤诱导较易,NAA 0.5 mg/L单独使用或配合6-BA (0.05~2.0 mg/L)均可使叶片茎段等材料愈伤化,但随着6-BA浓度的升高,愈伤由松散变得致密,颜色由淡绿变为浓绿。

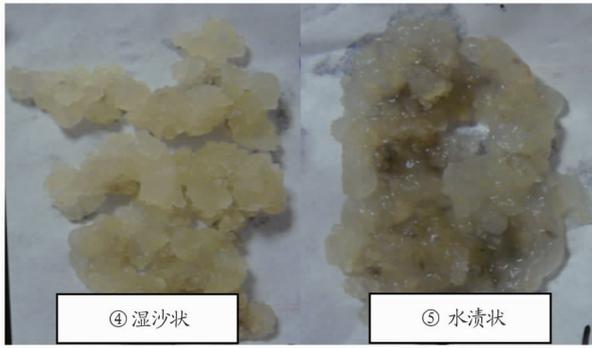


图3 培养基④和⑤中愈伤组织调查情况

Fig. 3 Callus investigation from medium (4) and (5)



图4 不同光照下愈伤生长及颜色变化(20 d)

Fig. 4 Callus growth and color variation under different light (20 d)

愈伤在增生速度与颜色上出现的变化及差异,原因在于番茄愈伤由不同组织诱导出,细胞也处于混杂状态,因此,继代转接时需要进行筛选淘汰。经过筛选可获得增生稳定、颜色均一的愈伤。无论是光照培养或暗培养,细胞增生速度均很快,所以转接周期不宜太长,以15~20 d一个周期为宜。

参考文献

- [1] 陈火英,张建华,钟建江,等. 番茄愈伤组织和植株耐盐性的比较研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2001,19(1):49-54.
- [2] 张建华,刘凤荣,陈火英. 野生番茄和栽培番茄的耐盐差异性比较研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(6):533-536,540.
- [3] 敖雁,管永祥,孙贺,等. 基于离子稳态的野生与栽培番茄及其杂交F₁的耐盐性差异[J]. 土壤学报,2016,53(4):1065-1073.
- [4] GUBIŠ J, LAJCHOVÁ Z, FARAGÓ J, et al. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*[J]. Czech J Genet Plant Breed,2003,39(1):9-14.
- [5] 梁美霞. 番茄子叶和下胚轴离体再生体系建立[J]. 中国农学通报,2010,26(6):47-50.
- [6] 李广存,毕玉平,李杰文,等. 番茄乙烯形成酶基因的克隆及其反义基因的表达载体构建[J]. 山东农业科学,1999,22(3):19-22.

愈伤组织无论光照或暗培养,细胞增生速度均很快,20 d生长量为原来的3~14倍。根据定性和定量调查确定MS+NAA 0.5 mg/L为秘鲁野生细叶番茄愈伤光或暗培养的适宜培养基。光照条件下培养,新生组织多为白色,少数细胞团整体表现乳黄色。在弱光或完全黑暗条件下,新生细胞黑色与浅色混杂,也有不发黑但整体为乳黄色的细胞团。挑选浅色细胞团继代培养变黑现象减轻。白色和乳黄色细胞团为颗粒状,用镊子碰触有沙沙音;黑色细胞团为絮状,碰触无声音,初步判断细胞已死。细胞团出现整体而不是部分黑化及乳黄色,应该与某种物质的产生及传递有关,具体机制及原因不明。

- [7] 刘冰. 野生醋栗番茄耐冷基因的渗入及遗传定位[D]. 北京:中国农业科学院,2009.
- [8] 程希. 番茄野生种及栽培种抗病同源基因的克隆与分析[D]. 武汉:华中农业大学,2010.
- [9] 余庆辉. 利用野生番茄 *Solanum pennellii* LA716 渐渗系群体进行番茄耐盐相关 QTLs 定位[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [10] FILLATTI J J, KISER J, ROSE R, et al. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector[J]. Bio/Technol,1987,5(7):726-730.
- [11] FISCHHOFF D A, BOWDISH K S, PERLAK F J, et al. Insect tolerant transgenic tomato plants[J]. Bio/Technol,1987,5(8):807-813.
- [12] GIBBERT C, RUS M A, BOLARÍN C M, et al. The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato[J]. Plant Physiol,2000,123(1):393-402.
- [13] JIA G X, ZHU Z Q, CHANG F Q, et al. Transformation of tomato with the *BADH* gene from *Atriplex* improves salt tolerance[J]. Plant Cell Rep,2000,21(2):141-146.
- [14] 赵凌侠. 番茄野生资源[M]. 上海:上海交通大学出版社,2012.
- [15] 周金梅,官敬利. 不同培养基配方对L-402番茄愈伤组织的诱导研究[J]. 北方园艺,2010(21):158-160.
- [16] 马义勇,颜雪芬,刘思言,等. 番茄愈伤组织诱导的初步研究[J]. 北方园艺,2012(6):106-108.

(上接第43页)

参考文献

- [1] 樊园芳. 120万株古茶树将纳入保护性开发[N]. 贵州日报,2017-06-01(002).
- [2] 温顺位,徐代刚,刘学,等. 铜仁市古茶树和野生茶树资源调查与保护利用[J]. 贵州农业科学,2014,42(7):145-149.
- [3] 许玫,王平盛,唐一春,等. 中国云南古茶树群落的分布和多样性[J]. 西南农业学报,2006,19(1):123-136.
- [4] 陈理华. 云南古茶树的分布与保护[C]//黄桂枢. 中国普洱茶文化研究. 昆明:云南科技出版社,1994.
- [5] 宋永全,苏祝成. 云南古茶树资源现状与保护对策[J]. 林业调查规划,2005,30(5):108-111.
- [6] 李兰东,贺永龙,杨娅玲. 沿河古茶树育苗试验[J]. 贵州茶叶,2015,43

(1):22-23.

- [7] 牛素贞,樊卫国. 喀斯特地区古茶树幼苗对干旱胁迫的生理响应及其抗旱性综合评价[J]. 园艺学报,2013,40(8):1541-1552.
- [8] 牛素贞,宋勤飞,尹杰. 不同剪穗处理对野生茶树无性繁殖的影响[J]. 浙江农业学报,2011,23(5):905-909.
- [9] 李振屏. 浅谈古茶树种子育苗与造林种植技术[J]. 农民致富之友,2017(2):103,105.
- [10] 张明泽,尹晓爱,杨小礼,等. 外源刺激物质对茶树扦插繁殖的影响研究[J]. 湖南农业科学,2016(12):51-54.
- [11] 薛克娜,殷爱华,张学平,等. 生长激素对杜鹃红山茶扦插效果的影响[J]. 林业科技开发,2011,25(1):109-111.
- [12] 廖婷婷,邓荫伟,张昌福,等. 不同激素处理插穗对油茶扦插繁殖的影响[J]. 安徽农业科学,2013,41(2):664-665,770.