

不同激素配比对番茄叶片外植体分化的影响

蒋有绎 周 枫 彭朝华

(北京市植物细胞工程实验室, 北京)

摘 要

培养基是调控番茄叶片外植体分化途径的一个重要因素, 用不同激素配比的培养基比较其对番茄叶片外植体分化的影响, 结果是在MS基本培养基中附加BA和IAA, 外植体主要向叶、芽原基方向分化; 附加KT和NAA, 则有利于根原基的形成; 附加BA和NAA, 外植体形成丰满的愈伤组织。此外还比较了13种番茄基因型的叶片外植体分化能力的强弱。

关键词 番茄 外植体 愈伤组织

前 言

自1974年V. Padmanabhan用番茄叶片外植体进行离体培养获得再生植株以来^[1], 国内外又有不少这方面的研究报道。通过研究发现番茄叶片外植体离体培养的分化途径明显受到激素的影响^[2, 3, 4], 而且不同基因型的番茄其叶片外植体分化能力在相同的培养基条件下差异是比较大的^[3, 4, 5], 但是已有的报道对激素的种类和水平如何影响番茄叶片外植体的分化途径阐述得还不十分清楚, 也未能对不同基因型的番茄其不同的器官分化能力进行比较。本文旨在通过试验能筛选出控制番茄叶片外植体不同器官分化途径的培养基, 并筛选出适宜于建立番茄组织培养体系的有效基因型, 为进一步开展番茄体细胞无性系变异的研究打下基础。

材料和方法

一、不同激素配比对番茄叶片外植体器官分化途径的影响 (试验一)

用佳粉1号作试材, 种子均匀播种在盆内, 待出苗后, 剪下第4、5片真叶, 清水冲洗后, 用0.1% H_2Cl_2 消毒10分钟, 再用无菌水冲洗4遍, 剪成小片接入装有不同培养基的三角瓶中, 每瓶接6小片, 操作均在超净工作台内进行。接种的三角瓶置于培养间培养, 温度 $26 \pm 2^\circ C$, 光照10小时, 光强3000 Lux。

以MS为基本培养基, 加蔗糖30 g/l和琼脂粉7 g/l, 配制成下列不同激素的培养基 (pH5.8):

1. 固定BA浓度 (1 mg/l), 调整2, 4-D的浓度 (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/l), 共6个处理, 5次重复。

2. 固定BA浓度 (1 mg/l), 调整IAA的浓度 (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/l), 共6个

注: 本实验所用的番茄种子全部由北京市农林科学院蔬菜研究所张环副研究员提供, 在此表示感谢。

处理, 5 次重复。

3. 固定 BA 浓度 (1 mg/l), 调整 2, 4-D 和 IAA 的浓度 (2 种生长素各半, 合并后的浓度为 $0, 1, 1.5, 2.2.5 \text{ mg/l}$), 共 6 个处理, 5 次重复。

4. 固定 KT 浓度 (1 mg/l), 调整 NAA 的浓度 ($0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ mg/l}$), 共 7 个处理, 5 次重复。

5. 固定 KT 浓度 (1 mg/l), 调整 IAA 的浓度 ($0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ mg/l}$), 共 7 个处理, 5 次重复。

6. 固定 BA 浓度 (1 mg/l), 调整 NAA 的浓度 ($0, 1, 2 \text{ mg/l}$), 共 3 个处理, 8 次重复。

对 6 组试验定期进行观察记载, 培养至 1 个月时进行记录和照相。

二、不同基因型番茄叶片外植体分化能力的比较 (试验二)

选用 13 个基因型作试材, 其中包括品种、杂交种和自交系。这 13 个基因型是: ①佳红; ②强力; ③西农 72-4; ④ 72-5; ⑤ WV63; ⑥ 晚霞; ⑦ 86-83; ⑧ 84-47; ⑨ 强 62; ⑩ 9-6-23; ⑪ PI385935; ⑫ PI390510; ⑬ PI298943。

把这 13 种材料的叶片外植体接入①诱导芽分化的培养基中 ($\text{MS} + \text{BA } 1 \text{ mg/l} + \text{IAA } 1 \text{ mg/l}$); ②诱导根分化的培养基中 ($\text{MS} + \text{KT } 1 \text{ mg/l} + \text{NAA } 2 \text{ mg/l}$)。培养 1 个月后, 对愈伤组织生长和根、芽分化情况进行调查。具体接种方法和培养条件均同试验一。

结果与讨论

一、试验一 6 组试验的观察结果

1. BA + 2, 4-D 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体略有弯曲、膨大, 但不再继续分化。即使 2, 4-D 浓度最低的处理, 叶片外植体切口边缘也不形成愈伤组织。随着 2, 4-D 浓度的增加, 外植体在叶脉处出现褐化的时间也愈早。培养至 1 个月, 6 个处理的叶片外植体均发生不同程度的褐化、死亡。看来 BA + 2, 4-D 的组合对番茄叶片外植体分化是极其不利的。

2. BA + IAA 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体明显膨大、弯曲。2 周后, 切口边缘处形成淡绿或浅黄色的愈伤组织; 3 周后在愈伤组织上出现绿色芽点; 到第 4 周, 芽点分化成单叶、叶簇或小苗。这一组合能诱导叶片外植体分化出叶、芽原基, 并直接长成绿苗。IAA 的浓度在 $0.5 - 2.5 \text{ mg/l}$ 的范围内, 并不影响分化途径, 但以 1 和 1.5 这两种浓度成苗率较高, 平均每个外植体形成的愈伤组织上可以长出绿苗 1—2 棵。

表 1 不同 NAA 浓度对愈伤组织长根的影响 (mg/l)

处理浓度	NAA 1	NAA 2	NAA 3	NAA 4	NAA 5	NAA 6
愈伤组织数	20	25	20	30	15	25
总根数	164	171	84	15	17	0
平均每个愈伤组织的根数	8.2	6.8	4.2	0.5	1.1	0

3. BA + 2,4-D 和 IAA 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体边缘开始膨大、弯曲; 2 周后, 边缘处长出白色愈伤组织; 3 周后, 愈伤组织长大, 紧实且白, 不再继续分化。2,4-D 和 IAA 的浓度愈大, 愈伤组织发育也愈差, 颜色偏褐, 浓度最高的处理只是在切口边缘形成白色和褐色的点状愈伤组织, 叶组织不久便褐化、死亡。

4. KT + NAA 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体边缘切口部位开始形成浅黄色的愈伤组织; 2 周后, 愈伤组织长得比较丰满、疏松, 浅黄色; 3 周左右在愈伤组织上长出带有根毛的细根。NAA 的浓度明显影响愈伤组织的发育和细根的数量, 当浓度为 1—3 mg/l 时, 愈伤组织丰满多根, 4—5 mg/l 时, 愈伤组织发育较差, 细根也少, NAA 为 6 mg/l 时, 愈伤组织呈褐色, 不长根 (见表 1)。

5. KT + IAA 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体边缘切口处形成浅绿色的愈伤组织; 2 周后长成丰满、紧实、淡绿色的愈伤组织; 3 周左右在愈伤组织上长出一些细根, 再过 3、4 天, 又在同一愈伤组织上长出一些绿色芽点, 并能分化成单叶或绿苗。IAA 浓度愈高, 细根出现的时间愈早, 数量也愈多, 但绿芽的数目比较少 (见表 2)。

表 2 不同 IAA 浓度对愈伤组织长根、长芽的影响 (mg/l)

处 理 浓 度	IAA 1	IAA 2	IAA 3	IAA 4	IAA 5	IAA 6
愈 伤 组 织 数	20	30	30	20	25	25
总 根 数	10	45	34	36	34	48
平均每个愈伤组织的根数	0.5	1.5	1.1	1.8	1.4	1.9
总 芽 数	27	40	42	25	21	12
平均每个愈伤组织的芽数	1.4	1.3	1.4	1.3	0.8	0.5

6. BA + NAA 的组合, 培养 1 周后, 叶片外植体边缘弯曲、膨大, 接着在切口边缘处形成黄绿色愈伤组织; 2 周后愈伤组织长得较为丰满、紧实, 颜色浅黄绿。两种 NAA 浓度对愈伤组织的分化、发育没有明显影响, 培养到 4 周以后, 在愈伤组织上都会长出白色带根毛的细根。

综上所述, 激素配比的不同, 可以诱导叶片外植体形成叶、芽原基或根原基, 愈伤组织发育的情况也有很大差异 (见表 3)。因此在体细胞无性系变异的研究工作中, 可以根据需要采用不同的培养基配方, 建立所需要的组织培养体系。

二、试验二 对不同基因型叶片外植体培养结果

培养到 1 个月时进行观察比较, 结果是在 MS + BA 1 + IAA 1 培养基上, 13 种基因型的外植体均分化成呈不规则弯曲状的愈伤组织, 在愈伤组织上形成绿色的叶、芽原基。1、2、4、7、9 号这 5 种基因型叶、芽原基分化数量较多, 有的已长成单片小叶、叶簇或绿色小苗, 而 3、5、12、13 号这 4 种基因型的愈伤组织发育较差, 上面的芽点分化也较少, 不少愈伤组织块上还保留了原来叶片组织。如果把每块愈伤组织上平均有 1.5 个芽的作为分化能力强的类型; 有 1—1.5 个芽的作为中等类型; 不到 1 个芽的作为差的类型。从表 4 可以看出 1、2、4、7、9 号属强型; 8、10、11 号属中型; 3、5、6、12、13 号则为差型。从形态观察和统计结果都表明在诱导芽分化的培养基上, 愈伤组织发育的好坏直接影响到芽分化的能力。

表 3 不同激素组合对番茄叶片外植体分化的影响

激素组合	分化途径	愈伤组织的特征	分化特点
BA + 2,4-D	基本上不分化	不形成愈伤组织	外植体逐渐褐化死亡, 生长素浓度愈高, 抑制作用愈强
BA + IAA	愈伤组织与叶、芽原基同时分化	不规则弯曲状, 发育较差, 浅绿色	培养后期, 在愈伤组织上直接形成叶簇或绿苗。生长素浓度的影响不大
BA + 2,4-D + IAA	形成愈伤组织	近似圆形, 紧实, 白色	形成愈伤组织后不再分化, 逐渐褐化。生长素浓度愈高, 愈伤组织发育愈差
KT + NAA	愈伤组织与根原基同时分化	近似圆形、丰满、较疏松、浅黄色	培养过程中, 在愈伤组织上长出大量细根 生长素浓度愈高, 根量愈少
KT + IAA	愈伤组织与根、芽原基同时分化	近似圆形、丰满、较紧实、浅绿色	培养后期在愈伤组织上长出绿芽及白根, 生长素浓度愈高, 根多芽少
BA + NAA	形成愈伤组织	近似圆形、丰满、紧实、浅黄绿色	培养时间过长, 在愈伤组织上会长出较多细根

表 4 不同基因型分化芽能力的比较

试 材 编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
愈 伤 组 织 数	18	24	28	24	24	24	24	30	24	24	12	30	30
总 芽 数	30	36	8	37	3	19	41	33	43	32	13	14	4
平均每个愈伤组织上的芽数	1.67	1.50	0.29	1.54	0.13	0.79	1.71	1.10	1.79	1.33	1.08	0.47	0.13
分化芽的能力	强	强	差	强	差	差	强	中	强	中	中	差	差

在MS + KT₁ + NAA 2 的培养基上,13 种基因型的叶片外植体经 1 个月的培养均分化成近似圆形, 浅黄色的愈伤组织, 而且上面长了不少白色细根, 基因型之间的差异表现在愈伤组织的大小、色泽的深浅和细根的多少有所不同。愈伤组织发育的好坏与根的多少根据观察似乎无直接关系, 譬如 9 号的愈伤组织发育最丰满, 但根却短而少。由于调查时间偏迟, 不少愈伤组织上的根相互缠绕, 无法数清根数。因此只能通过统计长根的愈伤组织数来进行比较, 如果把全部愈伤组织块上都能长根的基因型作为分化根能力强的类型, 则 90 % 以上愈伤组织能长根的为中等类型; 90 % 以下的属差的类型。从表 5 可以看出 13 种基因型中 1、4、10、11 号这 4 种为强; 2、3、5、8、13 号为中等; 6、7、9、12 号为差。与表 4 相联比较, 可以看出分化芽能力强的基因型, 其分化根的能力不一定也强, 反之亦然。在 13 种基因型中, 只有 1、4 号这二种基因型芽和根的分化能力都强; 6、12 号这二种基因型芽和根的分化能力都差。

表 5 不同基因型分化根能力的比较

试 材 编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
愈 伤 组 织 数	30	18	36	36	30	24	30	36	36	18	12	36	24
长根的愈伤组织数	30	17	35	36	28	20	26	35	32	18	12	24	23
长根愈伤组织 (%)	100	94	97	100	93	83	86	97	89	100	100	67	96
分化根的能力	强	中	中	强	中	差	差	中	差	强	强	差	中

小 结

1. 同一种基因型的叶片外植体在含不同激素的 MS 培养基中其分化途径是不一样的,

含BA + IAA 主要向叶、芽原基形成的方向分化；含KT + NAA 有利于根原基的分化；含BA + NAA 则能形成比较丰满的愈伤组织。

2. 不同基因型的叶片外植体其分化芽和分化根的能力是不一样的，即使同一种基因型在特定的培养基诱导下，其分化芽和分化根的能力也是不一样的。

3. 在13种基因型中，佳红、72—5 这二种基因型芽和根的分化能力都强，晚霞、PI 390510 这二种基因型芽和根的分化能力都差。

参 考 文 献

- (1) Padmanabhan, V. et al: Plantlet formation from lycopersicon esculentum leaf callus CAN. J. BOT. Vol. 52, 1974: 1429—1431
- (2) Kartha, K. K. et al: Morphogenetic investigations on in vitro leaf culture of tomato and high frequency plant regeneration Z. Pflanzephysiol. Bd. 77. 1976: 292—301
- (3) Behki R. M. et al: In vitro plant regeneration from leaf explants of lycopersicon esculentum (tomato) CAN. J. BOT. Vol. 54, 1976: 2409—2414
- (4) Meredith, C. p. Shoot development in established callus cultures of cultivated tomato. Z. Pflanzephysiol. Bd. 95, 1979: 405—411
- (5) 刘克斌等：番茄叶片、子叶、下胚轴离体培养再生植株的研究，《浙江农业科学》，(1)1987: 43—46

The Influence of the Different Hormones on the Leaf Explant Differentiation of Tomato

Jiang Youyi, Zhou Feng, Peng Zhaohua

(Beijing Laboratory of Plant Cell Engineering, Beijing)

Abstract

The culture medium is the principal factor controlling the induction and development of tomato leaf explants, several culture media which contain different kinds and levels of hormones give rise to influence on the differentiation of tomato explants. MS medium with BA and IAA induces the leaf and shoot primordia; with KT and NAA induces root primordia; with BA and NAA induces full-grown calli. In addition, the differential ability of leaf explants among 13 tomato genotypes have been compared.

Key words: Tomato (*Lycopersicon esculentum*); Explant; Callus