

# 玉米素和 IAA 对番茄子叶再生的影响

欧阳波\* 李汉霞 叶志彪 (华中农业大学园艺林学学院,作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070)

**提要** 高水平的外源 ZT 抑制番茄子叶不定芽形成,导致畸形芽大量出现,延缓再生芽的生根过程。在低水平的 ZT 和高浓度的 IAA 共同作用下,不定芽的再生速度加快,正常芽比例增加,后期生根过程明显加快。

**关键词** ZT; IAA; 番茄; 子叶; 再生

## Effects of Zeatin and IAA on Plant Regeneration of Tomato Cotyledon Explants

OUYANG Bo\*, LI Han-Xia, YE Zhi-Biao (National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Horticulture-Forestry College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** The results showed that high level of exogenous zeatin inhibited the regeneration of the adventitious buds, led to emergence of large amount of abnormal regenerated buds, and delayed the process of rooting. While under low level of exogenous zeatin used together with high level of exogenous IAA, the regeneration process was accelerated, the ratio of normal buds was raised and the rooting stage was also shortened.

**Key words** zeatin; IAA; tomato; cotyledon; regeneration

番茄已经成为基因工程研究的重要模式植物,其遗传转化研究较多<sup>[1~5]</sup>。转基因研究的重要前提条件是建立简便高效的植株再生体系。在番茄的研究中,多采用玉米素(zeatin, ZT)或 6-BA 进行不定芽的诱导, ZT 的浓度一般为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[1,2,6]</sup>,而 6-BA 的浓度则为  $2 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[7,8]</sup>。在此基础上,有的实验添加低浓度的生长素。在我们的番茄遗传转化实验中,发现添加高浓度 ZT,再生效果并不理想。为进一步提高番茄的转化效率,我们优化了番茄子叶的再生体系,研究了 ZT 与 IAA 对番茄子叶不定芽诱导及再生芽生根的影响。

### 材料与方法

番茄(*Lycopersicon esculentum*)种子 A<sub>53</sub>用 70% 酒精消毒 30 s,而后在 20% 的次氯酸钠(活性氯含量 6%)中消毒 15 min,无菌蒸馏水冲洗数次,接种于 1/2MS<sub>0</sub>培养基(1/2MS 盐类和维生素 +  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 +  $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8)中。25℃ 黑暗中发芽,3 d 后转入光照培养室,幼苗生长条件为 25℃、光照  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光照度 1 800 lx。种子发芽 6 d 后,将带有一小段叶柄的无菌苗子叶剪下,接种于再生培养基中进行培养。待再生芽长至 1 cm 左右时,将芽切下,转入生根培养基(MS 盐类和维生素 +  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA +  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 +  $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8)中生根。

在研究 ZT 对芽再生的影响时,再生培养基中添加不同浓度的 ZT,设置有 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养 40 d,调查统计再生情况。按下列公式计算结果:正常芽再生率 = (分化出正常芽的子叶个体数/子叶外植体总数) × 100%,畸形芽再生率 = (分化出畸形芽的子叶个体数/子叶外植体总数 × 100%)。ZT 与 IAA 组合使用时,在低浓度( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和高浓度( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 IAA 情况下,分别添加不同浓度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的 ZT 培养 40 d,调查统计再生情况。

研究 ZT 和 IAA 对再生苗生根影响时,将高浓度( $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )ZT 与优化后的 ZT/IAA 组合下分化的再生芽,同时转入生根培养基,进行生根速度的比较,于 7 和 14 d 分别调查生根情况,记录结果。

### 实验结果

#### 1 ZT 对再生芽形成的影响

表 1 显示,单独添加 ZT 时,子叶不定芽的再生频率随着 ZT 浓度的增加而增高,但分化出的芽有正常和畸形两种。其中畸形芽为无生长点、生长点坏死或叶状结构的“再生芽”,这些芽失去了分化成植株的能力。同一子叶外植体既可分化出正常芽,也可分化出畸形芽。正常芽频率在 ZT 为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最高(26.10%),与其他处理的差异达到极显著水平。ZT 在高达  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,没有正常芽形成,均为畸形芽。在单独使用 ZT 的情

收稿 2002-06-13 修定 2002-10-21

资助 武汉市科技攻关项目(992002045G)。

\* E-mail: bouy@mail.hzau.edu.cn, Tel: 027-87281679

况下,正常芽的比例不高,而畸形芽的比例随着 ZT 浓度的增加而逐渐提高。在高浓度的 ZT 影响下,子叶褐化和坏死的比例提高。

表1 ZT 对番茄子叶再生的影响

Table 1 Effect of zeatin on the regeneration of tomato cotyledon explants %

ZT 浓度/ mg · L <sup>-1</sup>	正常芽频率		畸形芽频率	
0.1	4.38 ± 2.65	B bc	86.45 ± 1.48	B c
0.2	26.10 ± 5.73	A a	94.15 ± 0.35	AB b
0.5	9.29 ± 0.66	B b	97.05 ± 4.17	A ab
1.0	4.14 ± 2.23	B bc	100.00 ± 0.00	A a
2.0	0.00 ± 0.00	B c	99.30 ± 0.99	A ab

邓肯新复极差测验,不同大写字母为各处理间差异达到极显著水平( $P < 0.01$ ),不同小写字母为差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。表2同。

## 2 低水平 ZT 与高水平 IAA 对再生芽形成的影响

由表2可知,在再生培养基中使用 0.2 mg · L<sup>-1</sup> ZT 和 1.0 mg · L<sup>-1</sup> IAA 的情况下,正常芽的分化比例最高(为 39.65%),与其他处理存在极显著差异,ZT 浓度进一步增高,正常芽的分化频率下降。表明在适当浓度 ZT 的基础上添加高水平的 IAA,有利于再生芽的形成。在低浓度(0.2 mg · L<sup>-1</sup>)的 IAA 下添加 ZT,总体上芽的形成比率明显偏低,均不超过 4%,随着 ZT 浓度的逐步升高,正常芽比例下降。

表2 ZT 和 IAA 对番茄子叶再生的协同作用

Table 2 Combinational effects of zeatin and IAA on the regeneration of tomato cotyledon explants %

ZT 浓度/ mg · L <sup>-1</sup>	正常芽分化频率			
	1.0 mg · L <sup>-1</sup> IAA		0.2 mg · L <sup>-1</sup> IAA	
0.1	24.30 ± 6.08	B b	3.66 ± 1.73	A a
0.2	39.65 ± 0.49	A b	2.47 ± 0.13	A a
0.5	21.90 ± 0.42	B a	1.51 ± 2.14	A a
1.0	17.65 ± 2.62	B b	1.25 ± 1.77	A a
2.0	5.75 ± 0.21	C c	0.00 ± 0.00	A a

## 3 ZT 和 IAA 对再生苗生根的影响

再生过程中添加高浓度 ZT(2.0 mg · L<sup>-1</sup>)再生芽生根缓慢,7 d 内生根极少,只有 2.2%;即使到 14 d,其生根率也只有 15.2%。而在再生时添加 0.2 mg · L<sup>-1</sup> ZT 和 1.0 mg · L<sup>-1</sup> IAA,生根速度快,7 d 即达到 82.5%;14 d 时可达 92.0%(表3)。

表3 ZT 和 IAA 对再生苗生根的影响

Table 3 Effects of zeatin and IAA on rooting of regenerated shoots

生根时间/ d	生根率/%	
	2.0 mg · L <sup>-1</sup> ZT	0.2 mg · L <sup>-1</sup> ZT + 1.0 mg · L <sup>-1</sup> IAA
7	2.2	82.5
14	15.2	92.0

## 讨 论

畸形芽是再生体系评价中应该重视的一个方面。以往报道的番茄子叶再生频率一般在 90% 以上,其中包括了大量的畸形芽,这些芽丧失了分化成正常植株的能力。所以,应以正常芽作为再生体系评价的主要依据。

本文结果表明,ZT 和 IAA 的比例适当,对组培过程中正常芽的获得是重要的。再生过程中积累的过量 ZT 使由芽分化至根形成的转化过程延缓。

本文建立的体系用于番茄转化后再生时,我们发现前期即愈伤组织形成阶段添加高浓度 ZT(2.0 mg · L<sup>-1</sup>)有利于提高番茄子叶转化效率,此阶段一般为 10 d。此后,将其转入到含 0.2 mg · L<sup>-1</sup> ZT 和 1.0 mg · L<sup>-1</sup> IAA 的再生培养基中,能够显著提高番茄子叶正常芽的再生比例,促进正常芽的快速形成,而且后期的生根速度也加快,能很好地解决再生苗生根困难的问题<sup>[9]</sup>。

## 参考文献

- Davis ME, Lineberger RD, Miller AR. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1991, **24**: 115 ~ 121
- van Roekel JSC, Damm B, Melchers LS *et al.* Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep*, 1993, **12**: 644 ~ 647
- Frary A, Earle ED. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep*, 1996, **16**: 235 ~ 240
- Gisbert C, Arrillaga I, Roig LA *et al.* Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with *uidA* and *npt II* marker genes. *J Horti Sci Biotechnol*, 1999, **74**(1): 105 ~ 109
- Pozueta-Romero J, Houlné G, Cañas K *et al.* Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, **67**: 173 ~ 180
- Tabaeizadeh Z, Agharbaoui Z, Harrak H *et al.* Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. *Plant Cell Rep*, 1999, **19**: 197 ~ 202
- Rhim SL, Cho HU, Kim BD *et al.* Development of insect resistance in tomato plants expressing the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Mol Breed*, 1995, **1**: 229 ~ 236
- 美国勇,郭宝太,金德敏等. 番茄高效植株再生体系及基因转化体系的建立. 莱阳农学院学报, 1998, **15**(2): 84 ~ 88
- 贺竹梅,李宝健,张绍松等. 番茄转基因受体系统的研究. 应用与环境生物学报, 1998, **4**(3): 247 ~ 250