

红茄子叶的不定芽诱导及植株再生

方岩岩^{1,2,3}, 王益奎^{2,3}, 王 红^{1,3}, 李文嘉^{2*}, 黎 炎²

¹广西大学农学院, 南宁 530004; ²广西农业科学院蔬菜研究所, 南宁 530007; ³广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007

摘要:【目的】研究不同激素浓度和组合对红茄不定芽及根诱导的影响,建立红茄的高频再生体系,为开展茄子的遗传转化研究奠定基础。【方法】以红茄子叶为外植体,采用0.5~2.0 mg/L 6-BA、0.1~0.5 mg/L IAA激素组合对不定芽进行诱导,采用0~0.5 mg/L IAA对根进行诱导,筛选出最佳的分化培养基和生根培养基。【结果】在不定芽诱导培养基中,当6-BA浓度在0.5~2.0 mg/L时,随着浓度增加,不定芽分化率逐渐升高;当IAA浓度在0.1~0.5 mg/L时,随着IAA浓度的增加,不定芽萌发率先增加后降低趋势,其中以添加6-BA 2.0 mg/L、IAA 0.3 mg/L的诱导效果最好,分化率高达86%。在根诱导培养基中,随着IAA浓度的增加,根诱导率先降低后升高趋势,诱导率可达100.0%。【结论】红茄子叶不定芽诱导最佳培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA;不定芽生根最佳培养基为MS+0.1 mg/L IAA。

关键词: 红茄; 子叶; 不定芽诱导; 植株再生; 培养基筛选

中图分类号: S641.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2013)05-0751-04

Adventitious bud induction of *S. integrifolium* cotyledon and plantlet regeneration

FANG Yan-yan^{1,2,3}, WANG Yi-kui^{2,3}, WANG Hong^{1,3}, LI Wen-jia^{2*}, LI Yan²

¹Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China; ²Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ³Guangxi Crops Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007, China)

Abstract: 【Objective】The present experiment was performed to study the effects of different hormone concentrations and combinations on induction of adventitious bud and root with the aim of establishing a highly efficient regeneration system of *S. integrifolium* to provide references for the research of eggplant genetic transformation. 【Method】With the cotyledon of *S. integrifolium* as explants, the different hormone combinations (0.5–2.0 mg/L 6-BA, 0.1–0.5 mg/L IAA and 0–0.5 mg/L IAA) were added in MS medium to induce the adventitious bud and root, respectively. Subsequently the optimal differential medium and rooting medium were screened. 【Result】The germination rate of adventitious buds increased with the increase in 6-BA concentration from 0.5 mg/L to 2.0 mg/L in MS medium. The germination rate of adventitious buds increased initially with IAA concentration increasing from 0.1 mg/L to 0.5 mg/L in MS medium, followed by a decrease. However, 2.0 mg/L 6-BA plus 0.3 mg/L IAA showed ideal induction effects on adventitious buds with 86% germination rate. As the IAA concentration in MS medium increased, the rooting rate decreased at first, then increased. The highest germination rate reached 100%. 【Conclusion】The best medium for initiation of adventitious bud of cotyledon was MS+2.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA, and the optimal rooting medium was MS+0.1 mg/L IAA.

Key words: *S. integrifolium*; cotyledon; induction of adventitious bud; plantlet regeneration

0 引言

【研究意义】红茄(*S. integrifolium*)原产于南美的巴西、秘鲁等地,是茄科的一个野生变种,在中国主要分布于河南嵩县及云南昆明、西双版纳等地。红茄具有极强的观赏性和较高的药用价值,并具有许多优良

抗性基因,如抗青枯病、根结线虫、果蚜钻心虫及小叶病,对黄萎病、褐纹病免疫,故常被用作茄子和番茄的砧木(Shishido et al., 1995; 黄树增等, 2009; Gisbert et al., 2011)。通过遗传转化可将红茄的优良抗性基因导入栽培茄中,提高栽培茄的抗性,进而提高其品质与

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018025); 广西农业科学院基本科研业务专项项目[200816(基)]; 广西农业科学院科技发展基金项目(200904Z, 桂农科2011JM15)

作者简介: *为通讯作者, 李文嘉(1962-), 研究员, 主要从事蔬菜新品种选育与示范推广研究工作, E-mail: lwj@gxaas.net。方岩岩(1987-), 主要从事蔬菜资源创新与遗传育种研究工作, E-mail: fangyanyan5566@sina.com

产量。高效的外植体再生体系是进行基因工程改良作物的前提,故建立一套红茄的高效再生体系,对较好地开展转基因研究具有重要意义。【前人研究进展】国外对红茄的研究主要集中在对其利用方面,如Tamura等(2002)研究了红茄与栽培茄的原生质体融合,结果显示融合的部分后代抗青枯病的特性优于亲本;Iwamoto等(2007)将红茄与栽培茄进行原生质体融合,克服了茄子与其近缘野生种杂交后代不育现象。国内在红茄的观赏性和抗旱性等方面也有报道,但对红茄植株再生研究的报道较少。郝爱平等(2009)进行了非洲红茄组培快繁技术研究,发现叶片愈伤组织诱导的最适培养基为MS+BA 2.5 mg/L+IAA0.5 mg/L。【本研究切入点】目前国内对红茄的组培技术研究较少。本文主要研究红茄子叶的组织培养和植株再生,并优化了其再生体系,此体系可以用于茄子野生近缘种基因的遗传转化研究,为抗性基因聚合做准备。【拟解决的关键问题】以红茄子叶为外植体,研究不同激素浓度和组合在不定芽和根诱导中的效果,筛选出最佳培养基,为开展茄子的遗传转化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为红茄,由广西农业科学院蔬菜研究所提供。其茄果小圆球形,火红色,果面光滑明亮,色泽艳丽。

1.2 试验方法

1.2.1 种子处理 选取粒大且饱满的种子,将种子浸入自来水中10~12 h,取出再浸入400 mg/L赤霉素溶液中12 h,自来水冲洗干净后用75%酒精浸泡30 s,0.1% HgCl₂消毒5~7 min,然后用无菌水冲洗3~5次,接种于MS+30 g/L蔗糖+7 g/L琼脂基本培养基上(pH 5.8),培养条件为光照强度2000 lx,光照时间16 h/d,温度25℃。

1.2.2 愈伤组织诱导和不定芽分化 以种子萌发得到的无菌苗的子叶为外植体,子叶剪成0.5 cm×0.5 cm的小块,接种于添加有不同浓度6-BA、IAA的MS培养基上诱导,子叶的正面向上放置。设9个不同分化培养基配方处理,详见表1,每处理接10瓶,每瓶接5块,共50块。接种后15 d统计愈伤组织诱导情况,20 d后统

计不定芽诱导情况。

$$\text{出愈率}(\%) = \frac{\text{愈伤数}}{\text{接种外植体数}} \times 100$$

$$\text{分化率}(\%) = \frac{\text{出芽愈伤数}}{\text{愈伤数}} \times 100$$

表 1 分化培养基配方

Tab.1 Differential medium formula

处理 Treatment	6-BA(mg/L)	IAA(mg/L)
1	0.5	0.1
2	0.5	0.3
3	0.5	0.5
4	1.0	0.1
5	1.0	0.3
6	1.0	0.5
7	2.0	0.1
8	2.0	0.3
9	2.0	0.5

1.2.3 不定根诱导 生根培养基设3个处理,A:MS; B:MS+0.1 mg/L IAA;C:MS+0.5 mg/L IAA。将长至1.5~2.0 cm的不定芽自基部切下,接入生根培养基中培养,15 d后统计生根情况。

$$\text{生根率}(\%) = \frac{\text{生根幼苗数}}{\text{接种幼苗数}} \times 100$$

1.2.4 移栽与驯化 将长根的小苗开瓶练苗2 d后,移至基质中保湿培养10~15 d,然后移栽大田,进行正常的栽培管理。

1.3 统计分析

试验数据用Excel 2003软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对红茄愈伤组织诱导的影响

由表2可知,不用浓度配比的6-BA和IAA处理对外植体出愈率的影响差异不明显。以子叶为外植体接种到诱导愈伤组织的培养基上,4 d后子叶开始膨大,叶片增厚,同时发生卷曲,8 d后开始出现少量淡黄色的愈伤组织,随后,愈伤组织数量逐渐增加,颜色多数为淡黄色至淡黄绿色(图1)。9种激素配比出愈率均达到100%,当MS培养基中添加6-BA浓度为0.5~2.0 mg/L、IAA浓度为0.1~0.5 mg/L时,红茄子叶的出愈效果最好。

2.2 不同激素对比对红茄不定芽诱导的影响

将愈伤组织转接到相同的培养基上,不同激素配比的出芽时间不同。13 d开始出现肉眼可辨的芽点,颜色为绿色,质地较致密;16 d芽点逐渐开始分化为幼芽,不断长大(图2);到22 d可长成小苗(图3)。由表2

表 2 不同激素对比对外植体不定芽分化的影响

Tab.2 Effect of hormone combination on shoot differentiation rate of explant

处理 Treatment	接种外植体数(个) Inoculated explants	愈伤数(块) Callus	出愈率(%) Callus induction rate	出芽愈伤数(块) Differentiation callus	分化率(%) Differentiation rate	叶盘芽数(个) Adventitious buds	平均芽数(个) Average adventitious buds
1	50	50	100	3	6	3	0.06
2	50	50	100	0	0	0	0
3	50	50	100	3	6	3	0.06
4	50	50	100	15	30	48	0.96
5	50	50	100	17	34	66	1.32
6	50	50	100	20	40	62	1.24
7	50	50	100	38	76	82	1.64
8	50	50	100	43	86	146	2.92
9	50	50	100	36	72	111	2.22

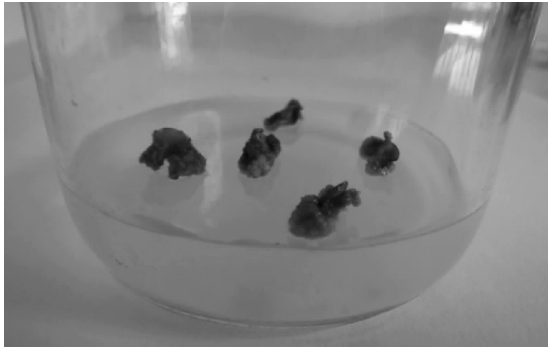


图 1 红茄愈伤组织
Fig.1 Callus of cotyledon of *S. integrifolium*

可知,6-BA浓度在0.5~2.0 mg/L范围内,随着浓度的升高,红茄不定芽的分化率也随之增加,在6-BA浓度为2.0 mg/L时,不定芽的分化率最高,且出芽时间相对较短。当 IAA浓度在0.1~0.5 mg/L 时,随着IAA浓度的增加,不定芽分化率呈先增加后降低趋势。6-BA浓度为2.0 mg/L、IAA浓度为0.1~0.5 mg/L时,诱导出的芽点较多且颜色为嫩绿色,随后芽点不断分化逐渐长成不定芽;当6-BA浓度为2.0 mg/L、IAA浓度为0.3 mg/L时,红茄不定芽分化率最高,且诱导芽所需时间最短,13 d即开始出现绿色芽点,分化率达86%,每个愈伤约分化出3个芽。因此,选取2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA为诱导不定芽的培养基比较适宜。



图 2 愈伤组织分化出的芽
Fig.2 Adventitious bud of callus



图 3 愈伤组织分化出的小苗
Fig.3 Plantlet induced from callus

2.3 不同激素对比对红茄生根的影响

由表3可知,3种培养基均可诱导生根,表现为随

着IAA浓度增加,根诱导率呈先降低后升高趋势,各处理在生根时间、数量和质量有差异。在生根时间方面,处理B最早生根,培养4 d后即有根长出,而处理A、C在培养7 d后生根;在平均生根数方面,以处理B最多,生根数接近9条,处理A生根数最少,接近6条;在根的生长速度方面也以处理B表现最好。由此看出,在MS培养基中添加低浓度的IAA(0.1 mg/L)有利于红茄根的诱导。图4为不定芽在最佳生根培养基MS+0.1 mg/L IAA上的生根状况。

表 3 不同激素对比对红茄生根的影响

Tab.3 Effect of hormone combination on generating root of *S. integrifolium*

处理 Treatment	接种幼 苗数(株) Inoculated plantlets	生根时间 (d) Rooting day	生根率 (%) Rooting rate	平均生根数 Average rooting quantity
A	7	7	100.0	6.2
B	8	4	87.5	8.6
C	7	7	100.0	7.1

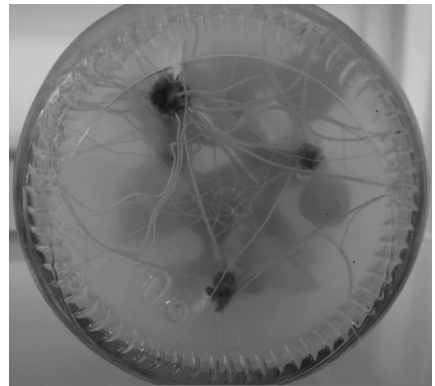


图 4 根的分化
Fig.4 Differentiation of root

2.4 移栽

将长根的小苗开瓶练苗2 d,洗去根部粘着的培养基,尽可能避免伤害幼根,移入育苗室中进行栽植,保湿3 d左右,结果生长形成健壮幼苗,移栽成活率在95%以上。炼苗后的再生植株如图5。

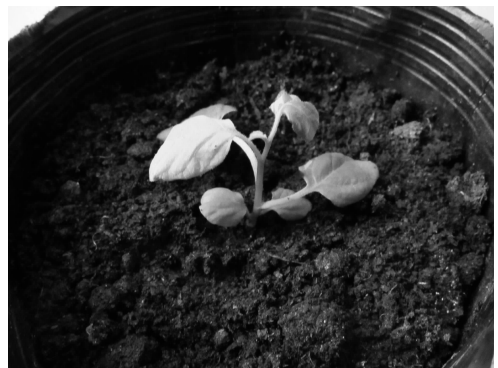


图 5 再生植株
Fig.5 Regenerative plantlets

3 讨论

建立一个适合的高频再生系统,不仅为快速无性繁殖试管苗、保存名优品种提供可靠的途径,还是实现植物转基因操作的先决条件之一,直接关系到基因转化的成功与否。因此,植物高频再生系统建立的研究一直受到高度重视。

Kamega等(1990)认为在培养红茄与栽培茄原生质体杂交后代时的最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA。Rotino等(1992)用农杆菌介导的方法研究红茄的遗传转化,结果表明,以红茄子叶诱导不定芽培养基以MS+0.5 mg/L ZT的效果最好,此培养基不仅提高不定芽的分化率,还促进茎的伸长。本研究筛选出的一组培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA)既可诱导红茄愈伤组织,又能诱导出不定芽,这组培养基诱导出的愈伤组织和不定芽的颜色均呈嫩绿色,质地致密,愈伤组织的诱导率达100%,不定芽的诱导率达86%。该培养基配方与郝爱平等(2009)诱导非洲红茄愈伤组织所用的培养基激素组合一致,但激素的质量浓度不同。本研究筛选出的这组培养基在诱导愈伤组织和不定芽时可省去转接步骤的繁琐,又能降低污染率和实验成本,提高诱导效率,但诱导出的不定芽在生长过程中个别叶片会出现黄化现象,有可能是后期光照不足或此激素配比对后期小苗的生长有影响所造成,但具体原因有待进一步探究。

IAA的浓度不同,诱导红茄生根的效果也不同。本研究中,随着IAA浓度增加,根诱导率呈先下降后上升的趋势,当IAA浓度为0.5 mg/L时,根诱导率虽为100.0%,但须根较少,即根的总表面积小,当IAA浓度为0.1 mg/L时,根诱导率为87.5%,但须根较多,即根的总表面积大,相对吸收率较高,综合考虑,以处理B(MS+0.1 mg/L IAA)的诱导效果较好。苏彩霞等(2006)研究不同激素配比对番茄子叶、下胚轴植株再生的影响,结果表明,当IAA浓度为0.5 mg/L时根诱导率最高,但本研究在此浓度下诱导出的须根较少,可能是不同材料对IAA敏感性存在差异所致。

红茄的应用范围较广泛,如可作为观果花卉,是盆花及插花配景难得的珍品;红茄做砧木与番茄嫁接可防治根结线虫(黄树增等,2009);与栽培茄杂交,其F₁植株在抗病性、抗逆性等方面均较栽培品种明显增强(柳李旺等,2004);通过转基因的手段将红茄中优良的抗性基因转入栽培茄中以提高栽培茄的抗性(Rotino et al., 1992)。

本研究较系统地探讨了红茄子叶的组织培养及植株再生,在此基础上建立的外植体再生体系可为茄子遗传转化研究奠定一定的基础。

4 结论

本研究结果表明,红茄子叶不定芽诱导最佳培养

基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA;不定芽生根最佳培养基为MS+0.1 mg/L IAA。

参考文献:

- 郝爱平,魏继承,国会艳. 2009. 非洲红茄组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, (12):112-113.
- Hao A P, Wei J C, Guo H Y. 2009. Study on tissue culture technology of *Solana integrifolium* Poir[J]. Northern Horticulture, (12):112-113.
- 黄树增,段杰珠,杜全丽. 2009. 用喀西茄、红茄嫁接番茄防治根结线虫技术初探[J]. 云南农业科技, (1):48.
- Huang S Z, Duan J Z, Du Q L. 2009. Studies on resistance to root-knot nematodes for grafted tomato via *Solanum khasianum* and *S. integrifolium*[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, (1):48.
- 柳李旺,龚义勤,汪隆植,黄浩,曾晓萍,卢昆光. 2004. 栽培茄与红茄种间杂交及其杂种的特性分析[J]. 南京农业大学学报, 27(1):6-10.
- Liu L W, Gong Y Q, Wang L Z, Huang H, Zeng X P, Lu K G. 2004. Interspecific hybridization and characters of interspecific hybrid between *S. integrifolium* and *S. melongena*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 27(1):6-10.
- 苏彩霞,霍秀文,堃庆海,刘杰才. 2006. 番茄子叶、下胚轴植株再生体系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报, 27(4):91-95.
- Su C X, Huo X W, Tan Q H, Liu J C. 2006. The establishment of plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 27(4):91-95.
- Gisbert C, Prohens J, Raigón M D, Stommel J R, Nuez F. 2011. Eggplant relatives as sources of variation for developing new rootstocks: Effects of grafting on eggplant yield and fruit apparent quality and composition[J]. Scientia Horticulturae, 128(1):14-22.
- Rotino G L, Perrone D, Ajmone-Marsan P, Lupotto E. 1992. Transformation of *Solanum integrifolium* Poir via *Agrobacterium tumefaciens*: Plant regeneration and progeny analysis[J]. Plant Cell Reports, 11:11-15.
- Shishido Y, Zhang X, Kumakura H. 1995. Effects of rootstock varieties, leaves and grafting conditions on scion growth in eggplant (*Solanum melongena*)[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 64(3):581-588.
- Tamura N, Murata Y, Mukaiharu T. 2002. A somatic hybrid between *Solanum integrifolium* and *Solanum violaceum* that is resistant to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Plant Cell Reports, 21:353-358.
- Kameya T, Miyazawa N, Toki S. 1990. Production of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. Integrifolium* Poir.[J]. Japanese Journal of Breeding, 40:429-434.
- Iwamoto Y, Hirai M, Ohmido N, Fukui K, Ezura H. 2007. Fertile somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitswongsei* (syn. *S. kurzii*) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant[J]. Plant Biotechnology, 24:179-184.

(责任编辑 麻小燕)