

番茄花药培养的影响因素研究

刘晓荣^{1,2}, 陶承光^{2*}, 吕书文², 杨国栋²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 以 4 个番茄 F₁ 代杂种的花药为试材, 通过正交试验设计, 研究不同材料基因型、不同低温处理时间、不同浓度的 2,4-D、蔗糖和硝酸银对番茄花药培养中组织褐化和愈伤组织生成的影响。结果表明: 硝酸银和材料基因型是组织褐化的主要影响因素, 其次是 2,4-D, 而蔗糖和低温处理的影响较弱。06-176 经低温 48h 处理, 培养基中添加 2,4-D 0.1 mg/L、蔗糖 120 g/L 和硝酸银 50 μ mol/L 是减轻组织褐化的最佳培养组合; 而 2,4-D 是愈伤组织生成最主要的影响因素, 其次是材料基因型和低温处理, 蔗糖和硝酸银的影响较弱。06-506 经 24h 低温处理, 培养基中添加 2,4-D 1.0 mg/L、蔗糖 30 g/L 和硝酸银 50 μ mol/L 是提高愈伤组织发生率的最佳培养基组合。

关键词: 番茄; 花药培养; 愈伤组织; 褐化

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)07-0094-04

Studies of Influencing Factors on Anther Culture of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

LIU Xiao-rong^{1,2}, TAO Cheng-guang^{2*}, LÜ Shu-wen², YANG Guo-dong²

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110161, China)

Abstract: Four F₁ hybrids of tomato were used in the experiment with MS as the basal medium to study the effects of genotypes, low temperature, 2,4-D, sucrose and AgNO₃ on the anther culture of tomato through orthogonal tests. The results showed that AgNO₃ and genotypes was the most effective element for browning of the tissues, followed by 2,4-D with the least effective element for sucrose and low temperature. The optimized combination of reduce browning of the tissues was derived with low temperature 48 h, 0.1 mg/L 2,4-D, 120 g/L sucrose and 50 μ mol/L Ag-NO₃ on 06-176; 2,4-D have a higher effect on callus yields, followed by genotypes and low temperature with the least effective element for sucrose and AgNO₃. The optimized combination of improve callus yields was derived with low temperature 24 h, 1.0 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose and 50 μ mol/L AgNO₃ on 06-506.

Key words: Tomato; Anther culture; Callus; Browning

关于番茄花药培养早在 20 世纪 70 年代国外就有报道^[1,2]。近年来, 培养基的组成及培养方法不断得到改进和优化。但是, 番茄花药培养中诸多问题仍未解决: ①组织褐化严重。在花药培养 10 ~

20 d, 由于细胞表面氧化, 以及花药培养中会产生乙烯, 并出现严重的组织褐化现象, 而褐化会严重影响组织活力, 降低出愈率和愈伤分化率; ②愈伤组织诱导率低。目前, 在激素种类和配比上存在较大争

收稿日期: 2008-04-18

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAD01A7)

作者简介: 刘晓荣 (1981-), 女, 内蒙商都人, 在读硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种。

通讯作者: 陶承光 (1955-), 男, 辽宁沈阳人, 研究员, 主要从事园艺作物遗传育种研究。

论^[3~9], 碳源、低温处理等因子对番茄花药培养中愈伤组织诱导的作用和影响程度尚不明确。同时, 硝酸银能有效减轻组织褐化, 促进胚状体的发生, 这在十字花科和禾本科多种作物的花药培养中已得到了证实^[10, 11], 但在番茄花药培养中, 上述因素的作用未见有相关报道。通过正交试验, 针对目前番茄花药培养中存在的问题, 就培养中部分因素对番茄花药培养中组织褐化和愈伤组织诱导率的影响进行了系统研究, 旨在提高番茄花药培养效率, 为提高番茄单倍体育种水平提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为用辽宁省农科院蔬菜所配制的组合 06—174, 06—176 和 06—506, 06—509, 共 4 个 F₁

代杂交种, 于 2006 年 7 月下旬播种, 8 月定植于辽宁省农科院蔬菜研究所日光温室中, 常规田间管理, 花期取材。

1.2 方法

于盛花期上午 8:00—10:00, 取健壮植株上的花蕾, 用流水冲洗 30 min。选择小孢子发育处于单核期(花药长度为 4~6 mm)的花蕾, 用 70% 的乙醇消毒 10~30 s, 0.1% HgCl₂ 处理 5~10 min, 然后无菌水冲洗 3 次, 接种在以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度处理的 2, 4-D 和蔗糖的培养基上, 琼脂 60 g/L, pH 5.8。用 Parafilm 封口膜封口, 25℃ 恒温光照培养。

1.3 试验设计

为了同时考虑多因子、多水平的影响, 采用正交试验 L₁₆(4⁵) 设计^[14], 各因子水平设计如表 1 所示。

表 1 供试因素及水平

因子水平	A(材料)	B(2, 4-D, mg/L)	C(低温处理, h)	D(蔗糖, g/L)	E(硝酸银, μmol/L)
1	06—174	0.1	0	30	0
2	06—176	0.5	24	50	10
3	06—506	1.0	48	80	50
4	06—509	1.5	72	120	100

共 16 组试验, 每组试验接种花药 100 枚。

1.4 数据统计与分析

自接种 10 d 开始, 每 5 d 调查一次褐化指数和愈伤组织发生数, 均调查 4 次。花药褐化等级为, 0 级: 花药不变色; 1 级: 花药略变褐; 2 级: 花药变褐色; 3 级: 花药深褐, 近黑色。褐化指数取平均数, 愈伤组织数取 4 次累计总数。褐化指数= $[\sum(\text{褐化级数} \times \text{褐化花药数}) / \text{总花药数} \times \text{总褐化数}] \times 100$; 愈伤组织诱导率=(产生愈伤组织花药数/接种花药数)×100%。

正交实验数据借助 DPS 系统分析软件分析处理, $R=|k_i - k_j|$, 其中 k_i, k_j 分别是该因子不同水平平均值中的最大值和最小值, R 为极差分析法中平均极差。对各个因子对不同试材花药培养影响的试验结果做极差分析和方差显著性分析, 并对极差分析中前三位因子的各水平的差异显著性进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同处理蕃茄花药褐化指数和愈伤组织诱导率的正交试验结果及极差分析

从表 2 和表 3 可知, 各因子对褐化指数大小影响的顺序是硝酸银> 材料> 2, 4-D> 蔗糖> 低温

表 2 不同处理蕃茄花药褐化指数和愈伤组织诱导率的正交试验结果

处理	A	B	C	D	E	褐化指数	愈伤组织诱导率(%)
1	1	1	1	1	1	1.87	3.21
2	1	2	2	2	2	1.84	30.05
3	1	3	3	3	3	0.87	30.18
4	1	4	4	4	4	0.98	18.66
5	2	1	2	3	4	0.87	0.00
6	2	2	1	4	3	0.73	18.63
7	2	3	4	1	2	1.88	19.42
8	2	4	3	2	1	1.89	16.55
9	3	1	3	4	2	2.04	1.89
10	3	2	4	3	1	2.23	20.98
11	3	3	1	2	4	1.50	29.88
12	3	4	2	1	3	1.21	29.76
13	4	1	4	2	3	1.01	0.00
14	4	2	3	1	4	1.27	25.46
15	4	3	2	4	1	2.23	26.12
16	4	4	1	3	2	2.19	19.69

处理,对愈伤组织诱导率大小影响的顺序是 2, 4—D > 材料> 低温处理> 蔗糖> 硝酸银。从极差分析的结果可知, A₂B₁C₃D₄E₃ 是降低组织褐化的最佳试验组合, A₃B₃C₂D₁E₃ 是提高愈伤组织诱导率的最佳组合。而表 2 试验结果中第 6, 3, 5 处理组合的褐化指数最小, 第 3, 2, 11, 12, 15, 14 处理组合的愈伤组织诱导率最高, 接近最优组合。由于正交设计是一种均一性设计, 不可能含有所有处理组合, 因此最佳组合没有在试验中显示出来。

表 3 不同处理番茄花药褐化指数和愈伤组织诱导率的极差分析

项目	Kij	A	B	C	D	E
褐化指数	K1	5.56	5.79	6.29	6.23	8.22
	K2	5.37	6.07	6.15	6.24	7.95
	K3	6.98	6.48	6.07	6.16	3.82
	K4	6.70	6.27	6.10	5.98	4.62
	R	0.40	0.17	0.06	0.07	1.10
愈伤组织诱导率	K1	82.10	5.10	71.41	77.85	66.86
	K2	54.60	95.12	85.93	76.48	71.05
	K3	82.51	105.60	74.08	70.85	78.57
	K4	71.27	84.66	59.06	65.30	74.00
	R	6.98	25.13	6.72	3.14	2.93

2.2 不同处理番茄花药褐化指数和愈伤组织诱导率的方差分析

为进一步探讨处理间及各因子水平之间的差异,进行方差分析,取显著水平 P=0.05 和 P=0.01,结果列于表 4、表 5。表 4 的方差分析结果表明:硝酸银浓度间和不同材料间存在极显著差异,2, 4—D 浓度间存在显著差异。由此可见,5 种因素中,硝酸银和材料基因型是花药褐化指数大小的主要影响因素,2, 4—D 浓度次之,而蔗糖和低温处理对它影响不大。

表 4 不同处理番茄花药褐化指数的方差分析

变异来源	SS	DF	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
A	0.49	3	0.16	54.15 **	4.76	9.78
B	0.06	3	0.02	7.21 *	4.76	9.78
C	0.01	3	0.00			
D	0.01	3	1.27			
E	3.82	3	0.00	425.15 **	4.76	9.78
误差	0.02	6				
总变异	4.39					

注: *表示差异显著, **表示差异极显著

表 5 不同处理番茄花药愈伤组织诱导率的方差分析

变异来源	SS	DF	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
A	128.56	3	42.85	7.05	9.28	29.46
B	1574.46	3	524.82	86.33 **	9.28	29.46
C	91.16	3	30.39	5.00	9.28	29.46
D	24.74	3	8.25	1.36	9.28	29.46
E	18.24	3	6.08			
误差	18.24	3	6.08			
总变异	1837.15					

注: *表示差异显著, **表示差异极显著

同样,从表 5 的方差分析结果来看,2, 4—D 浓度间存在极显著差异,是花药培养中愈伤组织诱导率的主要影响因素;而材料间、低温处理间和蔗糖浓度间的差异不显著,对愈伤组织诱导率的影响相对较低。

2.3 不同处理番茄花药褐化指数和愈伤组织诱导率的主要影响因子不同水平差异显著性分析

由极差分析和显著性分析的结果进一步对花药褐化、愈伤组织诱导率的主要影响因子各水平差异显著性进行比较(表 6、表 7)。从表 6 中 A、B、E 因子各水平的显著性分析结果可知,A 因子水平 3 与水平 4 之间差异不显著;水平 1 与水平 2 之间差异也不显著;而水平 3, 4 与水平 1, 2 之间差异极显著。B 因子水平 3 与水平 4 之间差异不显著,与水平 2, 1 之间差异显著;水平 4 与水平 2 之间差异不显著,与水平 1 之间差异显著;水平 2 与水平 1 之间差异不显著。E 因子水平 1 与水平 2 之间差异不显著,但与水平 3, 4 之间差异均极显著。因此,在番茄花药培养过程中,硝酸银和材料基因型是影响组织褐化的关键。硝酸银在水平 1, 2 时褐化指数高,浓度为 50~100μmol/L 适宜培养;材料 06—174 和 06—176 较 06—506 和 06—509 褐化程度低,适合花药培养;而 2, 4—D 为 0.1mg/L 时,对减轻组织褐化有利。

同样,由表 7 中的显著性分析可知,A 因子水平 3, 1 与水平 4 差异不显著,而与水平 2 差异显著;B 因子水平 2, 3, 4 之间差异不显著,而与水平 1 之间差异极显著;C 因子水平 2 与水平 4 之间差异显著,而与水平 3, 1 之间差异不显著。因而,材料 06—506 和 06—174 花药培养愈伤组织诱导率高;2, 4—D 0.5~1.5mg/L 愈伤组织诱导率较高,诱导效果最好;而 24~28h 的低温处理对提高愈伤组织诱导效果较好。

表 6 影响褐化指数的 A B E 因子不同水平的差异显著性分析

A (材料)	均值	5%	1%	B(2, 4-D)	均值	5%	1%	E(硝酸银)	均值	5%	1%
3	1. 75	a	A	3	1. 62	a	A	1	2. 06	a	A
4	1. 68	a	A	4	1. 57	ab	AB	2	1. 99	a	A
1	1. 39	b	B	2	1. 52	bc	AB	4	1. 16	b	B
2	1. 34	b	B	1	1. 45	c	B	3	0. 96	c	C

表 7 影响愈伤组织诱导率的 A B C 因子不同水平的差异显著性分析

A (材料)	均值	5%	1%	B(2, 4-D)	均值	5%	1%	C(低温处理)	C 因子	5%	1%
3	20. 63	a	A	3	26. 40	a	A	2	21. 48	a	A
1	20. 53	a	A	2	23. 78	a	A	3	18. 52	ab	A
4	17. 82	ab	A	4	21. 17	a	A	1	17. 85	ab	A
2	13. 65	b	A	1	1. 28	b	B	4	14. 77	b	A

3 结论与讨论

材料的褐化一直是困扰花药培养的一个不利因素。以往在十字花科和禾本科多种作物花药培养中有报道, 硝酸银对减轻组织褐化、促进胚状体和愈伤组织的发生有利^[10, 11]。本试验结果表明: 在番茄的花药培养中, 50~100 μ mol/L 的硝酸银对减轻组织褐化作用显著。另外, 材料基因型也是影响组织褐化的一个重要因子, 同样培养条件下, 不同材料的褐化指数不同。而高浓度的 2, 4-D 对组织褐化也有一定影响, 可能与花药培养中乙烯的产生量有关^[12]。

本研究发现, 0. 5~1. 5 mg/L 的 2, 4-D 有利于愈伤组织诱导率的提高, 这与以往报道高浓度 2, 4-D 有利于愈伤组织诱导的结论一致^[13]。在本试验所研究的几个因子中, 材料基因型也是愈伤组织诱导的重要影响因素, 不同基因型愈伤组织诱导率不同。花蕾进行 24~48 h 的低温处理对愈伤组织发生有很好的促进作用, 这与前人研究结果一致^[15]。其机理可能是, 低温处理可在一定程度上延缓小孢子退化, 提早雄核发育, 并增加参与雄核发育小孢子的比率, 从而有利于愈伤组织的发生。适当的蔗糖浓度可提高愈伤诱导率, 而本试验的结果却不太明显, 这可能与其它因子的交互作用有关。

本研究为减轻番茄花药培养中组织褐化和提高愈伤诱导率, 筛选了一个优化的培养组合。关于因素之间的交互作用对诱导率的影响, 本试验还没有安排。因此, 要清楚各因素间的交互作用, 还必须进一步安排试验。关于雄核发育机理和愈伤组织诱导植株细胞学鉴定有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Gresshoff P M, Doy C H. 番茄单倍体的发育和分化 [M] //中国科学院北京植物研究所. 单倍体育种集(第

2 集). 北京: 科学出版社, 1972: 142—153.
[2] Sharp W R, Dougall D K, Paddock E F. 来自烟草和番茄的未成熟花粉粒的单倍体愈伤组织和小植株[M] //中国科学院北京植物研究所. 单倍体育种集(第 3 集). 北京: 科学出版社, 1977: 246—250.
[3] 卫志明. 农业科学集刊(第十集)[M] //农业科学集刊编辑委员会. 农作物原生质体培养专集. 北京: 农业出版社, 1995: 12.
[4] Gulshan T M V, Sharma D R. Studies on anther cultures of tomato—*Lycopersicon esculentum* Mill. [J]. Biologia Plantarum, 1981, 23: 414—420.
[5] Zamir D, Jones R A, Kedar N. Anther culture of male sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants[J]. Plant Science Letters, 1980, 17: 353—361.
[6] Ma Y H, Kato K, Masuda M. Efficient callus induction and shoot regeneration by anther culture in male sterile mutants of tomato[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1999, 68: 768—773.
[7] Shtereva L, Atanasova B. Callus induction and plant regeneration via anther culture in mutant tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines with anther abnormalities [J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2001, 49: 203—208.
[8] Jose' M, Segu □—Simarro, Fernando Nuez. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58: 1119—1132.
[9] 高秀云, 王纪方, 金波, 等. 番茄花药离体获得植株[J]. 园艺学报, 1980, 7(4): 37—41.
[10] Bidington N L, Sutherland R N, Robinson H T. Silver nitrate increases embryo production in anther culture of Brussels sprouts[J]. Ann Bot, 1988, 62: 181—185.
[11] Chu C C, Hill R D. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of embryos in *Triticum aestivum* L.[J]. Plant, 1988, 58: 239—244.
[12] Beurg S P, Burg E A. Ethylene action and the ripening of fruits[J]. Science, 1995, 148: 1190—1196.
[13] 陈振光. 诱导柑橘花粉植株的研究[J]. 园艺学报, 1983, 10(2): 73—78.
[14] 骆建鑫, 孙建设. 园艺植物科学研究导论[M]. 中国农业出版社, 2002: 369.
[15] 周广栋, 王秀峰, 谢冰, 等. 番茄花药培养中低温预处理对小孢子发育的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 192—195.