

文章编号 :1003-8701(2014)02-0078-05

番茄叶片高频再生体系的建立

张玉英^{1,2}, 韦正乙², 王云鹏^{1,2}, 林春晶², 邢少辰^{2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

摘要:以番茄叶片为外植体,比较不同基因型在含有不同激素浓度配比的培养基上的再生能力,目的在于获得某特定番茄品种的高频再生体系,并结合该番茄品种对除草剂的敏感性实验,为建立番茄遗传转化受体系统奠定基础。结果表明,‘绿樱桃’在含有 3.0 mg/L 6-苄基氨基嘌呤(6-benzyl amino purine, 6-BA)和 0.2 mg/L 3-吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的 MS 培养基中再生最好,愈伤组织形成率为 96.88%,不定芽诱导率达 90.63%;每个外植体的平均不定芽诱导率为 252%,其最适的生根培养基为 MS 附加 IAA 0.2 mg/L,除草剂草丁膦的致死浓度为 1.5 mg/L。

关键词:番茄;叶片;再生;组织培养

中图分类号: S641.2

文献标识码: A

Establishment of Leaf-Based High-Frequency Regeneration Procedure for Tomato

ZHANG Yu-ying^{1,2}, WEI Zheng-yi², WANG Yun-peng^{1,2},
LIN Chun-jing², XING Shao-chen^{2*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Tomato leaves were used for explants and regeneration capacity of different genotypes on medium with various hormone combinations was investigated in this study which aimed at developing a high-frequency regeneration system for a certain tomato cultivar. In addition, susceptibility of used specific genotype to herbicide was examined to provide valuable information for establishment of tomato transformation. The results showed that the cultivar 'Green cherry' had the highest regeneration capacity on MS medium supplemented with 3.0 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L IAA. In these conditions callus and shoot induction rates were 96.88% and 90.63%, respectively. The shoot induction rate per explant averaged 252% after 50 days of growth. Furthermore MS medium supplemented with 0.2 mg/L IAA was found to be optimal for rooting of 'Green cherry'. Finally, it was found that phosphinothricin was lethal to 'Green cherry' at concentrations of 1.5 mg/L.

Keywords: Tomato; Leaves; Regeneration; Tissue culture

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)别名西红柿、洋柿子,古名六月柿、喜报三元。番茄果实营养丰富,含有丰富的胡萝卜素、维生素 A 和 C 族

维生素,具特殊风味,为消费者所钟爱。番茄栽培广泛,也是生物学研究中重要的模式植物之一。随着基因工程技术的发展,越来越多的外源基因被转入番茄中。近些年来国内外相继发表关于番茄转基因研究的报道,涉及抗病虫害、抗逆、抗除草剂、耐储运、品质改良、雄性不育等方面^[1-6]。另外,利用转基因番茄作为生物反应器的研究也是热点之一^[7-10]。

收稿日期:2013-10-31

基金项目:吉林省农业科技创新工程优秀团队项目(C2228010205)

作者简介:张玉英(1988-),女,在读硕士,主要研究方向是植物分子生物学和基因工程。

通讯作者:邢少辰,男,研究员,博士,E-mail:xingsc@cjaas.com

植物材料的再生能力对遗传转化的成功进行起着决定性的作用。虽然番茄的组织培养体系已比较成熟,但是基因型以及很多物理化学因素仍然强烈影响番茄的再生途径和再生频率^[11]。Ali 等认为培养基中植物激素的相互协调平衡作用对植物离体组织的形态发生起着显著的影响^[12]。对番茄而言,受体的不同基因型、不同的外植体类型在相同的培养条件下的再生能力和转化效率差异较大^[13-14]。Gubiš 等对 13 个番茄品种的 6 种外植体类型进行再生,认为‘Hana’的子叶和上胚轴再生率可达 100%^[15]。研究较多的外植体类型是子叶和下胚轴^[16],认为子叶和下胚轴的再生能力最好。但是,相对于子叶和下胚轴,叶片作为遗传转化的外植体有其优势所在,例如叶片材料的获得比较容易,有利于遗传转化的重复进行。另外,番茄叶片在组织离体条件下再生所表现出的倍性水平最低^[17]。Koorneef 等的研究结果也证明了这一点,认为来源于二倍体的叶片再生出的植株大多都是二倍体^[18]。因此,以叶片为外植体可以增加外源基因稳定可遗传表达的转化植株的获得率。如果利用叶片再生获得再生能力较好的植株用于遗传转化,也可以增加转基因植株的获得率。

本研究以番茄叶片为外植体,从基因型和植物激素种类及浓度着手,对番茄再生体系进行优化,同时进行番茄抗性筛选试验,为番茄遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试植物材料为‘绿樱桃’、‘贼不偷’、‘五彩罗成’和‘金龙粉王’,购自哈尔滨金龙农业有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄无菌苗和外植体的获得

在对番茄种子消毒前,先将种子浸泡在无菌水中 28℃ 温浴 1~2 h,设置不进行温浴的对照组。随后用 75% 酒精消毒番茄种子 30 s,弃去酒精快速用无菌水洗一次,倒掉无菌水,然后加入 0.1% HgCl_2 溶液至浸没消毒 3 min,期间稍作晃动,倒掉 HgCl_2 溶液,用无菌水冲洗 5 次,每次漂洗 3 min,最后接种于培养瓶(1/2MS 培养基)中,每瓶 10 粒种子,每个处理 3 瓶。置于恒温培养室暗条件下(26±1)℃ 培养,发芽后置于光下培养,培养室温度为 25~27℃,各阶段均在光下培养,光照强度为 1 500~2 000 lx,光周期为 16/8 h。在确

定是否进行温浴的基础上,对使用 HgCl_2 溶液消毒时间分别设定为 1 min、2 min、3 min,过程同上。观察种子发芽情况,计算发芽率(发芽率=发芽种子数/接种种子数)。

取完全展开且健康的叶片为外植体,切成 3 mm×3 mm 大小的方块接种于含有 2.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上。每个培养皿(高 2 cm,直径 9 cm)20 个外植体,每次两皿,3 次重复。

1.2.2 诱导愈伤组织形成和不定芽培养基激素浓度配比

以 MS 培养基为基础,设计 6-BA 的浓度梯度为 2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L,IAA 的浓度梯度为 0.1 mg/L、0.2 mg/L。将叶切片分别接种于不同组合的培养基中。30~50 d 统计外植体的愈伤组织形成情况和不定芽诱导情况,计算出愈率(出愈率=诱导愈伤组织外植体数/接种外植体数)和不定芽的诱导率(诱导率=分化不定芽的外植体数/接种外植体数)。统计获得最高不定芽诱导率的培养基中形成完整幼芽的不定芽数,计算每个外植体的平均不定芽的诱导率(平均不定芽的诱导率=形成完整幼芽的不定芽数/接种外植体数)。

1.2.3 不定芽生根培养和培养基激素浓度配比

将长至 2 cm 左右的幼芽接种于 MS 培养基和附加 IAA 的 MS 培养基中,IAA 浓度梯度为 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.3 mg/L,培养瓶规格为高 10 cm,直径 7.0 cm,每个瓶内分装培养基 50 mL。记录生根起始时间,统计生根结果,同时观察根的形态。

1.2.4 草丁膦浓度的确定

选择再生最好的番茄品种进行抗性筛选实验。将此品种叶切片分别接种于加有草丁膦(Basta)的最适再生培养基中,草丁膦浓度梯度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L,分别命名为 B0.5、B1.0、B1.5、B2.0、B3.0,设置对照组未加草丁膦的培养基,记作 B0。

2 结果与分析

2.1 番茄种子消毒前处理和升汞消毒时间对种子发芽率的影响

将‘绿樱桃’、‘贼不偷’、‘五彩罗成’和‘金龙粉王’种子分别进行温浴后消毒和直接消毒,5 d 后进行温浴的种子开始发芽,且在时间上发芽较齐,而未进行温浴的种子 8 d 后才开始发芽,发芽不齐。因此,种子的温浴处理可以提高发芽效率。

在进行温浴处理的条件下, 升汞消毒时间对种子的发芽率有明显的影响。如表 1 所示, 消毒 1 min 灭菌不彻底, 发生霉菌或细菌污染; 消毒 2 min ‘绿樱桃’发芽率达到 86.63%, ‘贼不偷’、‘五彩罗成’和‘金龙粉王’发芽率分别为 76.67%、80.00%、66.67%, 且无污染; 消毒 3 min 发芽率明显降低。

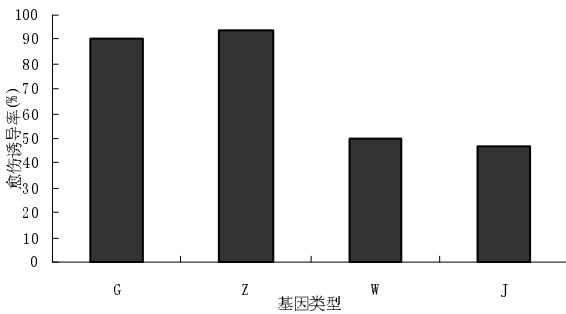
表 1 升汞消毒时间对种子发芽的影响 %

基因型	消毒时间		
	1 min	2 min	3 min
‘绿樱桃’	污染	86.63	73.33
‘贼不偷’	污染	76.67	70.00
‘五彩罗成’	污染	80.00	56.67
‘金龙粉王’	污染	66.67	63.33

注: 表中除时间以外的数字为发芽率。

2.2 番茄基因型对再生的影响

将 4 个品种的番茄叶切片接种于含有 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上, 结果显示 ‘绿樱桃’和 ‘贼不偷’愈伤组织形成率分别为 90.63%和 93.33%; ‘五彩罗成’和 ‘金龙粉王’的出愈率为 50.00%和 46.88%, 见图 1。综合 4 个品种番茄的种子发芽率和愈伤组织形成率, 选定 ‘绿樱桃’和 ‘贼不偷’进行后续的再生体系优化工作。



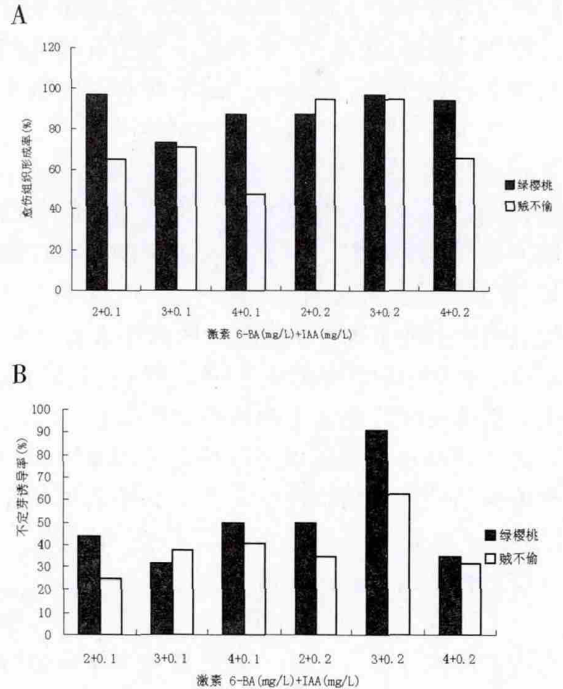
G, ‘绿樱桃’; Z, ‘贼不偷’; W, ‘五彩罗成’; J, ‘金龙粉王’

图 1 基因型对番茄叶片再生的影响

2.3 激素浓度对比对叶片再生的影响

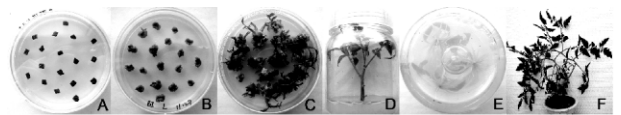
结果表明, 不同激素浓度对比对番茄叶片的再生影响较大, 不同基因型的不同再生阶段对激素的要求差异也很明显。如图 2A、B 所示, ‘绿樱桃’和 ‘贼不偷’愈伤组织形成率都很高。‘绿樱桃’愈伤组织形成率最高可达 96.88%; ‘贼不偷’最高可达 95.00%。‘绿樱桃’不定芽诱导率在含有 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上最高, 可达 90.63%, 最低为 31.25%; ‘贼不偷’不定芽诱导率在不同的激素组合下都较低, 最高

才为 62.50%。将 ‘绿樱桃’叶切片接种到含有 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上, 50d 后统计不定芽数, 计算每个外植体的平均不定芽的诱导率为 252%。图 3 所示为 ‘绿樱桃’在含有 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 诱导培养基和在加有 0.2 mg/L IAA 的生根培养基中的再生过程。



A、B 分别为激素组合对番茄愈伤组织和不定芽诱导的影响。

图 2 不同激素浓度对比对番茄叶片愈伤组织和不定芽诱导的影响



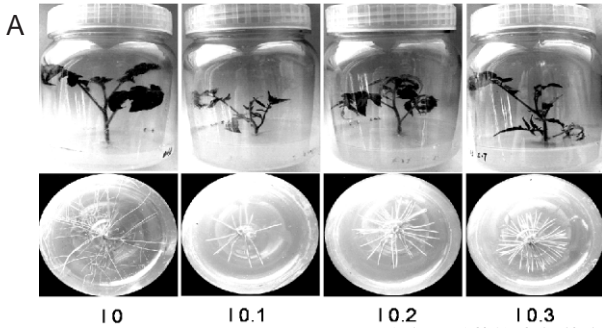
A. 接种于含有 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上的 ‘绿樱桃’叶片; B. 叶片分化出愈伤组织; C. 诱导出的不定芽; D. 再生出的番茄植株; E. 生根培养; F. 移入盆中的番茄植株。

图 3 ‘绿樱桃’叶片的再生过程

2.4 激素对生根的影响

选择 ‘绿樱桃’进行生根培养, 结果表明生根培养基中无论加激素与否, 都可生根。不定芽接种到生根培养基上 5 d 后开始生根, 根的形态差异很大。如图 4A 所示, 在不加激素 MS 培养基中生出的根数量较少、纤细、分支较多、伸长较快、番茄植株长势好; 添加有 IAA 的培养基中生出的根数量较多且粗壮。番茄植株在加有 0.1 mg/L IAA 的培养基中与在加有 0.2 mg/L IAA 的培养基中相比生根数量多少不一, 且植株生长缓慢; 番茄植株

在加有 0.3 mg/L IAA 的培养基中生根与在加有 0.2 mg/L IAA 的培养基中生根相比数量较多,但番茄植株长势不好,叶片卷曲;在加有 0.2 mg/L IAA 的培养基中生出的根数量均匀,植株长势好。



A. 不同 IAA 浓度下番茄的生长状态; B. 不同 IAA 浓度下番茄根的数量和长度。

图 4B 所示为番茄植株在 4 种培养基上平均生根数量和根的平均长度。综合植株的长势、生根数量和根长度可见,‘绿樱桃’生根的最适激素浓度为 IAA 0.2 mg/L。

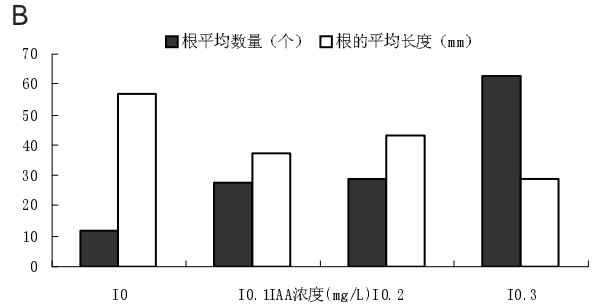


图 4 激素对生根的影响

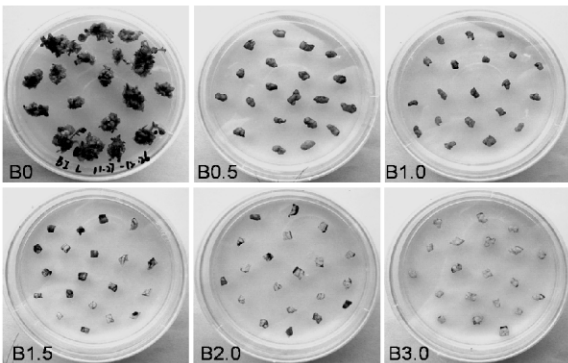


图 5 ‘绿樱桃’叶片对草丁膦的敏感性试验

2.5 草丁膦的抗性筛选浓度确定

如前所述,‘绿樱桃’在含有 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基中再生最好。因此,选择‘绿樱桃’进行抗性筛选试验。15 d 后, B0 中番茄叶片开始形成愈伤组织,加有草丁膦的培养基中番茄叶片都有相应变化:在 B0.5 中叶片变大, B1.0 中叶片也变大,但叶片边缘褐化; B1.5 中叶片大部分出现褐化,部分开始枯黄; B2.0 中仅有少部分存有绿色,大部分枯黄,甚至开始透明化; B3.0 中叶片几乎全部枯死。如图 5 所示, 30 d 后, B0 中已经形成不定芽; B0.5 中叶片边缘褐化,未形成愈伤组织; B1.0 中叶片褐化更严重,但还存有绿色; B1.5 中叶片只有极少数有点绿色,其余都透明化; B2.0、B3.0 中叶片几乎全部枯死透明化。因此,草丁膦对‘绿樱桃’致死浓度为 1.5 mg/L。

3 结论与讨论

将番茄种子进行 28℃ 温浴 1~2 h 处理对种

子萌发有明显的促进作用,能提高种子发芽的整齐度。有研究认为苗龄是影响番茄组织培养再生的主要因素之一^[19],提高种子萌发的整齐度对于外植体取材是有利的。利用 0.1% 的升汞消毒的时间对番茄种子的发芽影响也很大,消毒时间长,发芽率降低。试验结果显示,消毒 2 min 种子的发芽率最高可达 86.63%。Parmar 等比较了升汞、漂白剂和酒精的消毒效果,认为用 0.1% 的升汞消毒 2 min 效果最佳^[20]。

基因型对番茄的再生有重要影响。Tezuka 等对 4 个品种的番茄进行再生,其中‘Petit’获得 78.5% 的再生率,而‘Momotaro’再生率却只有 12.1%^[21]。Mamidala and Nanna 对 5 个番茄品种进行再生研究,结果表明,不同的基因型获得不同的再生频率,其中‘PKM-1’每个外植体诱导出的不定芽最多^[22]。本试验在添加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上,‘绿樱桃’、‘贼不偷’、‘五彩罗成’和‘金龙粉王’4 个品种的叶片再生能力表现出明显的差异,最高出愈率达到 93.33%,最低为 46.88%。由此可见,基因型是影响组织再生体系建立的最重要因素之一,这同其他研究者的结论一致。

外源激素是影响组织再生体系建立的另一重要因素。Parmar 等选用 IAA、3- 吲哚丁酸 (Indole-3-butyric acid, IBA)、6-BA、激动素 (Kinetin, KN)、 α -萘乙酸 (α -Naphthalene acetic acid, NAA) 和 2, 4-D (2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid) 等不同植物生长调节物,进行不同浓度和不同种类的配比,进而获得了适合外植体生长分化的最优激素组合^[20]。Rizwan 等以‘Punjab Upma’和

‘IPA-3’的叶片为外植体进行离体再生,结果在添加 0.5 mg/L 玉米素 (Zeatin, ZT) 和 0.5 mg/L 6-BA 的培养基中,再生率分别为 86.89%和 76.78%^[23]。本试验以 6-BA 和 IAA 进行组合,发现‘绿樱桃’叶片再生的最适激素组合是 3.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA,在此条件下其愈伤组织形成率为 96.88%,不定芽诱导率为 90.63%。‘贼不偷’叶片再生的愈伤组织形成率最高为 95.00%,但是不定芽诱导率却只达到 62.50%,可能是因为 6-BA 和 IAA 的激素组合不适合其不定芽诱导。

在生根过程中,不同的研究者对于外源激素的种类和最适浓度的观点不一致^[19-24]。本试验将‘绿樱桃’在未添加任何激素和添加 IAA 的培养基中的生根情况进行对比,发现激素浓度过大和过小均影响植株的生长,笔者认为选择 IAA 浓度为 0.2 mg/L 最为理想,生根数量较多且粗壮,适宜移栽,但如果目的是为了保留无菌苗,可以直接用不添加激素的 MS 基本培养基进行继代培养。

在遗传转化过程中,选择试剂的浓度对获得理想的转基因植株十分重要。选择筛选浓度的原则是,既不能对转基因细胞造成损伤,也要尽量抑制非转基因植株的生长。Van 等在确定草丁膦最佳筛选浓度过程中,选用野生型番茄叶片和经农杆菌侵染后的番茄叶片进行草丁膦浓度梯度筛选,根据半致死性原则,认为番茄遗传转化不定芽诱导阶段所使用的草丁膦浓度为 1.5 mg/L^[17]。本文利用非转化的‘绿樱桃’植株进行试验,确定的草丁膦致死浓度为 1.5 mg/L。但是,应用于转化体系最有效的草丁膦浓度还需在转化过程中进一步确定。

参考文献:

- [1] Khuong T T, Cr  t   P, Robaglia C, et al. Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number[J]. *Plant Cell Report*, 2013, 32(9):1441-1454.
- [2] Kumar H, Kumar V. Tomato expressing Cry1A (b) insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (H.ubner) (Lepidoptera: Noctuidae) damage in the laboratory, greenhouse and field[J]. *Crop Protection*, 2004, 23(2): 135-139.
- [3] Rugkong A, Mc Quinn R, Giovannoni J J, et al. Expression of ripening-related genes in cold-stored tomato fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1):1-14.
- [4] G  lvez F J, Baghour M, Hao G P, et al. Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012(51):109-115.
- [5] Kim H S, Youm J W, Moon K B, et al. Expression analysis of human β -secretase in transgenic tomato fruits [J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 82(1):125-131.
- [6] Nagar M M E1. Genetic engineering for increasing salinity tolerance in tomato [J]. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2013, 7(1):433-440.
- [7] Ruf S, Hermann M, Berger I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. *Nature biotechnology*, 2001, 19(9):870-875.
- [8] Jiang X L, He Z M, Peng Z Q, et al. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice [J]. *Transgenic Research*, 2007, 16(2):169-175.
- [9] Wurds D, Ruf S, Bock R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(2):276-288.
- [10] Apel W, Bock R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(1):59-66.
- [11] Trujillo-Moya C, Gisbert C, Vilanova S, et al. Localization of QTLs for in vitro plant regeneration in tomato [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11(140):1-12.
- [12] Ali A A, Yossef T R, E1-Banna A. Cytokinin-cytokinin interaction ameliorates the calli induction and plant regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) [J]. *Acta Agronomica Hungarica*, 2012, 60(1):47-55.
- [13] Raziuddin, Shah S S, Chaudhary H J, et al. Hormonal effect on calli induction in tomato [J]. *Sarhad Journal of Agriculture*, 2004, 20(2):223-225.
- [14] Liza L N, Nasar A N M, Zinnah K M A, et al. In Vitro growth media effect for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Evaluation of the salt tolerance activity of callus [J]. *Journal Agriculture Sustainability*, 2013, 3(2):132-143.
- [15] Gubiř J, Lajchov   Z, Farag    J, et al. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro [J]. *Czech Journal Genetic Plant Breed*, 2003, 39(1):9-14.
- [16] Vikram G, Madhusudhan K, Srikanth K, et al. Effect of plant growth regulators on in vitro organogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. *Journal of Research in Biology*, 2011, 1(4):263-268.
- [17] Van D T, Ferro N, Jacobsen H J. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars [J]. *GM Crops*, 2010, 1(5):312-321.
- [18] Koornneef M, Hanhart C, Jongsma M, et al. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation [J]. *Plant Science*, 1986, 45(3):201-208.
- [19] Ma J, Qiu D L. Study on Tissue Culture and Regenerative System of Tomato[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(8): 185-189.

毛木耳栽培原料的丰富度和产品的不同用途选择适合的栽培原料,以产量和功能食品为目的(如降压、减肥、防癌等)可以选用复合料栽培,以提取多糖为目的可以选用木屑栽培,毛木耳作为原料用作吸附剂与栽培原料之间的关系有待进一步深入研究^[3]。

3.2.2 不同的出耳方式对毛木耳的产量、耳片性状及营养品质均有一定的差异。垛式栽培比夹袋墙式栽培总体上具有一定的优势,但三角垛式栽培占地面积较大,可根据毛木耳栽培量、大棚温

度、管理等选择出耳方式。三角垛式栽培耳片粗纤维较夹袋墙式高,而粗蛋白含量较低,两者之间是否有一定的相关性还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 汤春燕. 不同栽培料对毛木耳生长、品质的影响及综合效益评价[D]. 贵州大学, 2008.
- [2] 谭伟,郭勇,周洁,等. 毛木耳栽培基质替代原料初步筛选研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(3):1043-1049.
- [3] 莫瑜,潘蓉,黄海伟,等. 毛木耳和白木耳子实体对 Cd(),Cu(),Pb()和 Zn()的吸附特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(7):1566-1574.

(上接第 82 页)

- [20] Parmar P, Subramanian R B, Achakzai A K K. Optimization of growth regulators for shoot induction and regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)[J]. Academic Journal of Plant Sciences, 2012, 5(4):114-118.
- [21] Tezuka T, Harada M, Johkan M, et al. Effects of auxin and cytokinin on in vivo adventitious shoot regeneration from decapitated tomato plants[J]. HortScience, 2011, 46(12):1661-1665.
- [22] Mamidala P, Nanna R S. Effect of genotype, explant source

- and medium on in vitro regeneration of tomato[J]. Journal of Genetics and Molecular Biology, 2011, 3(3):45-50.
- [23] Rizwan R, Bal S S, Bhat J A, et al. Effect of hormones on direct shoot regeneration in tomato[J]. Crop Improvement, 2011, 38(1):31-34.
- [24] Zhang L M. Inducing adventitious buds from tomato callus and their rooting[J]. Agricultural Biotechnology, 2012, 1(1):27-28.