

薄皮甜瓜子叶组织培养的研究

孙天国, 沙伟, 金忠民

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要:以薄皮甜瓜品种“懒瓜王”子叶为材料, 设置了 15 种激素组合的诱导芽分化培养基, 进行了甜瓜子叶外植体诱导生芽试验和生根试验。结果表明, BA 是甜瓜再生分化的关键物质, 以 BA 浓度为 4.0 mg/L (毫克/升) 时, 最有利于子叶外植体的分化生芽, 在 MS+BA4.0 mg/L+IAA0.3 mg/L (毫克/升) 培养基中, 甜瓜子叶的诱导生芽率高达 93.75%。不定芽经过伸长和生根获得了再生植株。同时又对子叶进行了横纵切的对照试验, 以及芽的着生位置和形态的观察与研究。

关键词:薄皮甜瓜; 子叶; 组织培养; 不定芽

中图分类号: S652.03.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2005)02-0064-02

高效再生系统是建立甜瓜高效遗传转化技术的基础。近 10 年来, 国外主要通过器官和体细胞胚两条途径研究和建立再生系统, 但再生植株的频率、发育状况以及染色体倍性水平依赖于培养基的激素组成、外植体来源和供试材料的基因型。在甜瓜的组织培养方面, 目前已能够通过真叶、子叶等多种外植体再生植株, 有的还建立了比较高效的离体培养再生体系^[4]。有报道表明^[1-3], 不同甜瓜品种的组织培养条件差异极为显著。而近些年又主要以厚皮甜瓜为材料进行研究, 而对薄皮甜瓜的研究却极少。本文以本地特有薄皮甜瓜“懒瓜王”为例研究薄皮甜瓜芽诱导的相关内容, 从而为建立薄皮甜瓜高效遗传转化技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以薄皮甜瓜“懒瓜王”子叶为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的获得及组织培养方法 选取粒大饱满的“懒瓜王”种子, 加入适量水, 在 25℃ 的温箱内暗培养 4 d(天), 待子叶长出并脱去种皮时, 在无菌操作台上将其截取, 并在 0.1% HgCl₂ 中消毒约 1 min(分钟), 用无菌水充分冲洗 5 次后, 用无菌滤纸吸去多余水分, 然后将每片子叶切去其基部和顶部再横切为二, 正面朝上, 背面朝下接种到芽诱导培养基上, 培养条件同上, 即在 (26±1)℃, 光照强度为 3 000 Lx, 16 h/d(小时/天), 诱导叶外植体生芽。

1.2.2 子叶外植体再分化培养 为寻求芽分化的最适培养基的激素组合, 在 MS 培养基上设了 15 种激素组合, 分别对外植体进行芽分化培养。其中 BA 含量(mg/L)为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 共 5 个水平, IAA 含量(mg/L)为 0.1, 0.3, 0.5 共 3 个水平, 共计 15 个处理组合。调节培养基的 pH 值在 5.8 左右。所有组合均在 30 d(天)后统计出芽率(出芽外植体占培养外植体的百分率)。每试验处理组合重复 10 次, 每次移入 4 个外植体, 共计 40 个外植体。

1.2.3 不定芽的伸长 30 d(天)后, 将在诱导培养基上分化出不定芽的外植体切成小块, 转至不定芽伸长培养基上, 两周左右继代一次, 一个月后记录有效苗的获得情况。

1.2.4 再生植株的获得 当芽伸长至 2 cm~3 cm(厘米)左右, 用解剖刀将无根苗切下, 转至含不同激素成分的生根培养基中, 15 d(天)后统计生根率。

2 结果与分析

2.1 芽的诱导

试验选用的培养基是以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 BA 和 IAA 配制而成。将子叶外植体接种到加入 BA 和 IAA 的 MS 培养基中, 开始几天发现培养基中子叶迅速增大: 4 d(天)左右, 在外植体刀切部位的一端长出细小、鲜绿、生长旺盛的愈伤组织; 10 d(天)左右, 另一端也渐长出少量愈伤组织, 但长速缓慢; 15 d(天)左右, 部分培养基上的愈伤组织生长迅速的一端逐渐分化出芽原基, 有些甚至在该端未产生愈伤组织的部位直接长出芽原基突起。此时, 在愈伤组织生长缓慢的一端虽未长芽原基, 但许多外植体在与培养基接触的其它部位长出愈伤组织, 且渐分化出芽原基; 20 d(天)左右, 芽原基上长出小叶芽, 密集着生的部位形成芽丛。30 d(天)后对培养的叶外植体出芽率进行观察统计, 结果(见表)表明, 芽的诱导与 BA 和 IAA 两种激素的配比密切相关。较低浓度的 IAA 与合适浓度的 BA 配比, 有较高的芽分化率。如 IAA 浓度为 0.1 mg/L(毫克/升), BA 浓度为 2.0 mg/L~3.0 mg/L(毫克/升)时, 平均每个外植体上可再生 3.26~3.87 个不定芽, 特别是在 IAA 浓度为 0.3 mg/L(毫克/升), BA 浓度为 4.0 mg/L(毫克/升)的培养基中, 平均每个外植体上可再生出 4.65 个不定芽, 出芽率高达 93.75%。反过来, IAA 相对浓度较高时, 对芽的分化将产生抑制作用。当 IAA 为 0.5 mg/L(毫克/升), BA 浓度在 2.0 mg/L~3.0 mg/L(毫克/升)时, 叶外植体上只是长出愈伤组织, 无芽原基产生, 芽的分化率为 0, 且 BA 浓度达到 4.0 mg/L(毫克/升)时, 外植体在移入培养基上 3 d(天)后全部死亡。但 BA 浓度也不能过高, 过高同样会对芽的诱导产生负面作用。如 BA 浓度为 5.0 mg/L

(毫克/升), IAA 浓度为 0.3 mg/L~0.5 mg/L(毫克/升)时, 无不定芽分化, 只在外植体周围出现大量的愈伤组织, 且愈伤组织颜色较淡, 较疏松。

经过组培实验可见 MS+BA4.0 mg/L+IAA0.3 mg/L(毫克/升)的组合, 不但有较高的不定芽分化率, 而且产生的芽健壮, 长速快。大约在十几天就可生芽, 这样不仅缩短了育种周期, 而且为诱导成苗奠定了良好的基础。

不同组合培养基对芽诱导的影响表

培养基 (mg/L)	再生芽 个数	外植体 个数	再生芽平均数 (个)	芽再生率 (%)
MS+BA _{1.0} +IAA _{0.1}	58	38	1.53	37.50
MS+BA _{1.0} +IAA _{0.3}	94	40	2.35	52.32
MS+BA _{1.0} +IAA _{0.5}	13	38	0.34	10.51
MS+BA _{2.0} +IAA _{0.1}	118	37	3.26	62.51
MS+BA _{2.0} +IAA _{0.3}	49	39	1.25	29.64
MS+BA _{2.0} +IAA _{0.5}	0	40	0	0.00
MS+BA _{3.0} +IAA _{0.1}	155	40	3.87	77.00
MS+BA _{3.0} +IAA _{0.3}	35	39	0.91	22.67
MS+BA _{3.0} +IAA _{0.5}	0	37	0	0
MS+BA _{4.0} +IAA _{0.1}	97	36	2.70	54.20
MS+BA _{4.0} +IAA _{0.3}	181	39	4.65	93.75
MS+BA _{4.0} +IAA _{0.5}	亡	亡	亡	0.00
MS+BA _{5.0} +IAA _{0.1}	29	35	0.84	12.43
MS+BA _{5.0} +IAA _{0.3}	0	33	0	0.00
MS+BA _{5.0} +IAA _{0.5}	0	34	0	0.00

2.2 叶外植体的切割方式对再生芽的影响

对于甜瓜叶外植体芽的诱导而言, 除了不同浓度生长调节物质的影响外, 子叶的切割方式对芽的诱导也有影响。为了进一步研究此方面的内容, 我们对子叶横切为二的同时, 又将部分子叶纵切为二, 且接种到成分相同的培养基中, 将二者进行对照比较, 发现有以下 5 点差异。

2.2.1 愈伤组织生长速度不同 横切子叶外植体在接种后的 4 d(天)左右便开始长出愈伤组织, 而纵切子叶要到 7 d(天)左右才开始长出愈伤组织, 且前者的愈伤组织数量明显多于后者。

2.2.2 愈伤组织着生位置不相同 横切子叶外植体上愈伤组织集中着生在近下胚轴端的切口处。纵切外植体上, 除在近轴端产生愈伤组织外, 在远轴端以及维管束的切口处均有愈伤组织生长, 且没有明显的集中着生部位。

2.2.3 芽原基的生长速度不同 横切子叶外植体上的愈伤组织在 15 d(天)左右就可长出芽原基, 而此时纵切子叶外植体上虽未长芽原基, 却在 MS+BA_{1.0}+IAA_{0.3}和 MS+BA_{1.0}+MS_{0.5}的两培养基中诱导生根, 且生根率达到 100%。20 d(天)左右, 横切子叶外植体上长出叶状芽, 而纵切子叶要到 30 d(天)左右才长出芽原基。

2.2.4 芽原基的分布不同 横切子叶的芽原基多在下胚轴与维管束接近的部位上呈簇状着生, 而纵切子叶外植体上芽原基的分布没有一定的极性, 分布随机且分散。

2.2.5 最适培养基中叶外植体的出芽率不同 横切子叶外植体的最高出芽率高达 93.75%, 而纵切子叶上最高出芽率却只有 10.1%, 差异很大。

2.3 不定芽的伸长

在供试的不定芽伸长培养基上, 不定芽均有不同程度的伸长, 但从不定芽伸长的速度和长成的苗数量两方面看, BA 浓度以 0.1 mg/L~0.3 mg/L(毫克/升)为佳。

2.4 诱导生根

甜瓜试管苗生根很容易, 在不含激素的 MS 培养基中即可见有根长出。但 1/2MS+0.5 mg/L(毫克/升)IBA 的生根培养基更有利于根的生长。将增殖培养 20 d(天)的不定芽移入生根培养基, 一般 13 d(天)左右可见根系的发生。根系粗壮、生长旺盛, 生根率达 100%。

2.5 组织苗的移栽

移栽前 1 周在大棚内炼苗 5 d(天)。移栽时取出试管苗, 用水冲洗根部, 移栽到苗床上, 20 d(天)后长出新根, 开始正常生长, 成活率高达 90%。

3 讨论

本实验芽分化最佳培养基为 MS+BA4.0 mg/L+IAA0.3 mg/L(毫克/升), 与前人有所不同可能是由于种质不同的原因。横纵切结果不同有两种解释: 一种解释可能是由于叶外植体吸收培养基中的生长素和细胞分裂素, 主要是通过叶脉中的维管束进行的。现将子叶纵切, 将其表面上最大的维管束切成两半, 从而影响了其对生长素和细胞分裂素的吸收, 达不到芽诱导所需要的生长调节物质的量和比例, 故分裂素起不到主导作用, 而高浓度的生长素却由于吸收量限制而发挥出主导作用, 在细胞分裂素浓度很低时诱导生根, 故在 MS+BA_{1.0}+IAA_{0.3}和 MS+BA_{1.0}+MS_{0.5}的两个培养基中, 根的诱导率 100%。另一种解释可能是由于内源激素主要分布在甜瓜下胚轴与维管束相近部位, 由于纵切, 使得两半叶外植体内内源激素的量减半, 内外源激素的联合作用减弱, 而使得诱导能力降低, 抑制了芽的诱导与分化。以上只是一些推论, 现因对此方面的研究尚未见详细报道, 故无法做进一步的分析与考证, 还需要通过试验来进一步的检验。

参考文献:

[1] GuisM, et al Melon biotechnology[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Review, 1998, 5: 289~311.
[2] BordasM, MontesionsC, SalvdrA, et al. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to cucumis melo L. Cultivars and in vitro evalation of salt tolerance. Transgenic Research, 1997, 6: 41~50.
[3] Leshem B. Polarity and responsive regions for regeneration in the culture melon cotyledon[J]. Plant phys'ib, 1989, 135: 237~239.
[4] 于喜艳, 何启伟, 孔庆国. 甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 山东农业科学, 2002(2): 22~23.