

西瓜子叶再生体系的初步建立

陈克农, 朱子成, 王 欣, 栾非时, 王学征

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以西瓜品种‘华抗王’无菌苗子叶作为外植体,以 MS 为基本培养基,对西瓜植株再生的条件进行了研究。结果表明:子叶芽诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;最佳伸长培养基为 MS+IBA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;最适宜的生根培养基为 1/2MS+IAA 0.4 mg/L。试验初步建立了适用于西瓜遗传转化的子叶再生体系。

关键词:西瓜;子叶;再生体系

中图分类号:S 651.603.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)06-0156-03

西瓜 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld var. *citroides*) 属葫芦科植物,在世界范围内分布广泛,种类繁多,栽培面积大,经济价值高,在人类的日常生活中起到了十分重要的作用。但病虫害、逆境等因素对西瓜的产量及品质影响很大。由于其遗传基础十分狭窄,野生种及近缘物种的相关收集整理工作较少^[1]。通过常规育种方法对品种进行更新较为困难,开展西瓜转基因研究、创造新的种质资源特别是抗性种质资源,对西瓜进行改良实属必然。

西瓜的再生能力与大多数植物相比,为较弱水平,国内外虽然有一些成功的西瓜再生报道^[2-4],但几乎都缺乏可重复性。试验针对西瓜的高效再生体系的建立进行研究,为提高西瓜育种水平奠定基础,也为西瓜转基因工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

西瓜品种‘华抗王’由东北农业大学西甜瓜遗传育种研究室提供。

1.2 培养基与激素

以 MS 为基本培养基,植物激素包括 IAA、NAA、6-BA 等,配成 50 mg/mL 的母液,4℃保存。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的获得 取 60 粒饱满的‘华抗王’种子用纱布包好,在 50~60℃的温水中温汤浸种 24 h,然后将种子取出,在超净工作台精心去壳,用 0.1% HgCl₂ 溶液

消毒 8~10 min,用无菌水冲洗 3 次。再将种子浸泡在 70% 的酒精中 1 min,用无菌水冲洗 3 次。将已消毒的种子接种于 MS+1.5% 蔗糖+0.7% 琼脂的固体培养基上,在 28℃生长箱中暗培养 3 d 后移到光周期为 16 h 光照、8 h 黑暗,光照强度为 2 200 lx 的培养室中继续培养。温度为 (28±1)℃,子叶长出后,在超净工作台上取下 4~6 龄子叶待用。

1.3.2 子叶外植体再分化的芽诱导 将取下的子叶用 70% 的酒精擦拭其表面再用清水冲洗,然后用滤纸将其表面吸干,弃远轴端,近轴端子叶切去顶部和基部,再横切为二,面积约为 0.3 cm²,表面朝上接种于诱导培养基上,每瓶接 3~4 块。在 MS 培养基上设了 6 种激素组合,分别对外植体进行芽分化培养。其中 6-BA 含量为 2.5、3.0 mg/L,共 2 个水平, NAA 含量为 0.1、0.3、0.5 mg/L 共 3 个水平,共计 6 个处理组合。每处理接 5 瓶,16 个子叶块。6 个处理共需要 96 个子叶块。调节培养基的 pH5.8 左右。光周期为 16 h 光照、8 h 黑暗,温度为 28℃,光照强度为 2 500 lx。所有组合均在 30 d 后统计出芽率(出芽外植体占培养外植体的百分率)。

1.3.3 不定芽的伸长 4 周后,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,MS 为基本培养基;IBA 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L;6-BA 为 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L,并记录有效苗的获得情况。

1.3.4 再生植株的获得 当芽伸长至 1.5~2.5 cm 时,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,1/2MS+IAA 浓度分别为 0.2 mg/L 和 0.4 mg/L,3 周后统计生根率。

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 6-BA 和 NAA 配制而成。将子叶外植体接种

第一作者简介:陈克农(1963-),男,高级实验师,现从事园艺学实验教学工作。E-mail:chenkenong@163.com.

通讯作者:王学征(1978-),女,博士,副教授,现从事西甜瓜分子遗传育种工作。E-mail:xzwang620@yahoo.com.cn.

基金项目:东北农业大学博士启动基金资助项目。

收稿日期:2009-12-25

后,开始几天发现培养基中子叶变大,7 d 以后,在外植体刀切部位长出膨大、黄绿的愈伤组织,随着时间而扩大。2 周左右,部分培养基上的愈伤组织逐渐分化出芽原基。28 d 后对培养的子叶外植体出芽率进行统计,结果见表 1。

表 1 不同植物生长调节剂配比组合对出芽率的影响

培养基 /mg · L ⁻¹	再生芽数/个	外植体数/个	出芽率/%
MS+6-BA 2.5+NAA 0.1	2	16	12.5
MS+6-BA 2.5+NAA 0.3	3	16	18.7
MS+6-BA 2.5+NAA 0.5	1	16	6.3
MS+6-BA 3.0+NAA 0.1	4	16	25
MS+6-BA 3.0+NAA 0.3	3	16	18.7
MS+6-BA 3.0+NAA 0.5	2	16	12.5

由表 1 中可知,芽的诱导与 6-BA 和 NAA 2 种激素的配比密切相关。在 6 种组合中均能产生不定芽,合适浓度的 6-BA 与较低浓度的 NAA 配比,芽分化率会相对高一些。如 NAA 浓度为 0.1 mg/L,6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,16 个外植体上可再生 4 个不定芽,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,6-BA 浓度在 2.5 mg/L 时,叶外植体上很难产生不定芽,只是长出愈伤组织,无芽原基产生,出芽率为 6.3%。结果表明,MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的组合,有较高的不定芽分化率,且产生的芽相对健壮。

2.2 不定芽的伸长

切取培养的不定芽接到伸长培养基上,每瓶接 2 个,观察不定芽的伸长。培养基如下表所示,其中,培养基 3(MS+IBA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L)为最佳伸长培养基。

表 2 不同培养基配比组合

培养基编号	IBA /mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹
1	0.5	0.5
2	1.0	1.0
3	0.5	1.0
4	1.0	0.5

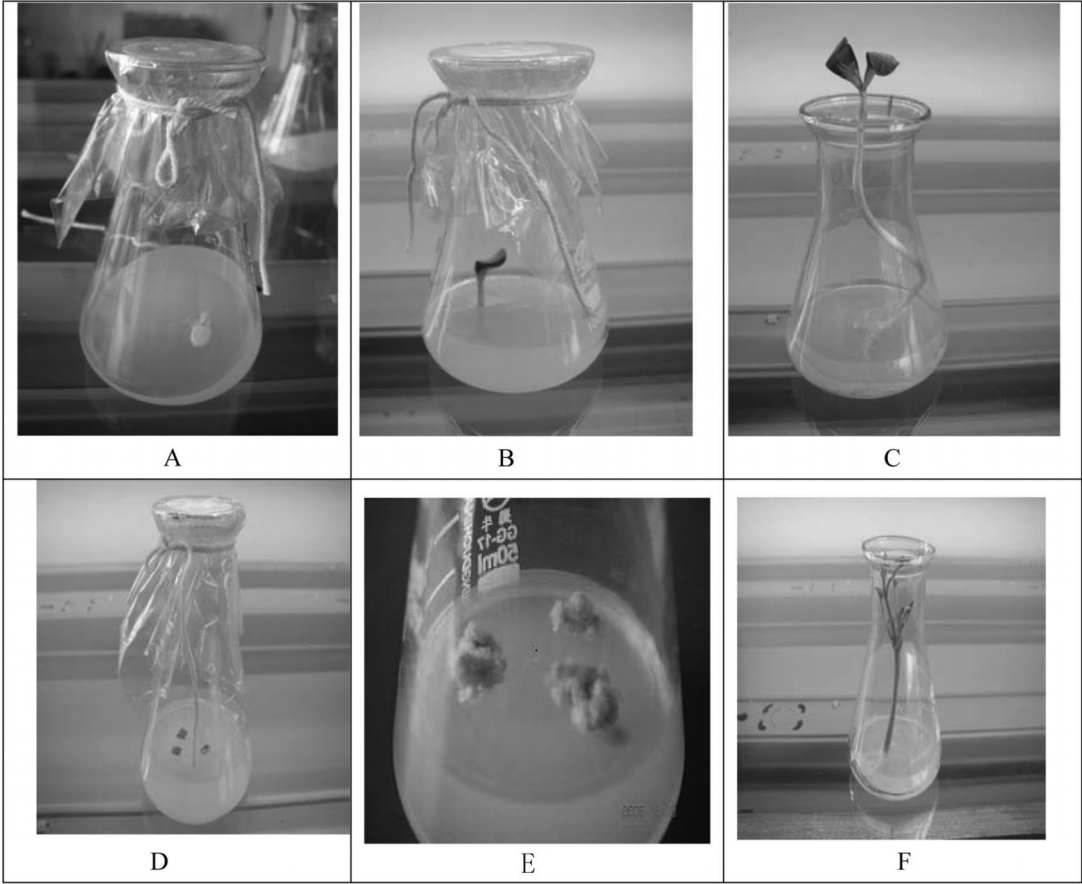


图 1 西瓜子叶再生体系的初步建立

2.3 再生植株的获得

试验选用的生根培养基是以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 IAA 配制而成。西瓜苗生根比较困难,在

IAA 含量不同的 MS 培养基中即可见有根长出,结果见表 3。其中以 1/2MS+IAA 0.4 mg/L 组合为最好,将增殖培养 20 d 的不定芽移入生根培养基,一般在 16 d 左

右可见根系的发生。根系粗壮、生长旺盛,生根率近达75%。

表3 不同植物生长调节剂配比
组合对生根率的影响

培养基/ mg · L ⁻¹	生根数/ 条	外植体数/ 个	生根率/ %
1/ 2MS+ IAA 0.2	2	4	50
1/ 2MS+ IAA 0.4	3	4	75

3 讨论

基因工程的快速发展,使人们有可能通过转基因途径较快地获得优质、高产、抗病虫害以及抗逆的农作物新品种。而利用基因工程手段来改良农作物,首先需要建立一个高效的再生系统^[5]。在植物组织培养中,激素的配比对器官发生有重大影响^[6]。适宜浓度的激素配比,促使西瓜有较高的不定芽分化率,且生长健壮,生根率也较高,可以满足西瓜转基因工作的进一步需要。

西瓜的组织培养研究已有多年的历史,但迄今为止文献报道的结果差异较大,重复性差。激素对于不定芽的分化有重要作用, Szalai^[7]发现无激素培养基也会导致外植体发生分化,只是时间相对较长,并指出再生能力决定于基因型而非激素含量,但该试验发现长时间培养于无激素培养基上的外植体并不会分化不定芽。一定浓度的6-BA是诱导西瓜外植体分化的关键,附加低浓度的IAA则有利于这种分化的发生。

4 结论

以西瓜品种‘华抗王’无菌苗子叶作为外植体,以MS为基本培养基,对西瓜植株再生的条件进行了研究。结果表明:子叶芽诱导的最佳培养基为MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;最佳伸长培养基为MS+IBA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;最适宜的生根培养基为1/2MS+IAA 0.4 mg/L。该试验初步建立了适用于西瓜遗传转化子叶再生体系。

参考文献

- [1] Zhang X, Prodes B B. RAPD molecular marker in watermelon[J]. Hortscience, 1993, 28(5): 223.
- [2] Srinastava D R, Andrianov V M, Piruzian E S. Tissue culture and plant regeneration of watermelon(*Citrullus Vulgaris* Schrad. cv. Melitoposki)[J]. Plant cell Reports 1989(8): 300-302.
- [3] 张孝祺,魏振承,黄河勋等.西瓜离体培养技术研究[J].中国西瓜甜瓜, 1996(2): 13-16.
- [4] 刘敬梅,刘玲,陈杭.西瓜的快速高效植株再生[J].植物生理学通讯, 2000, 36(1): 46
- [5] 马国斌,王鸣,郑学勤.西瓜组织培养再生体系的比较研究[J].中国西瓜甜瓜, 1998(3): 9-11.
- [6] 宋道军,陈若雷,尹若春等.西瓜高效组织培养再生体系的初步研究[J].中国西瓜甜瓜, 2000(4): 8-11.
- [7] Szalai J. The micropropagation of watermelon[J]. Kerteszeti Tudomany, 1995, 27(4): 111-113

Establishment of High Effective Regeneration System in Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld var. *citroides*)

CHEN Ke-nong, ZHU Zi-cheng, WANG Xin, LUAN Fei-shi, WANG Xue-zheng

(Department of Horticulture Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: In this experiment, we chose cotyledon of anti-hua Wang (watermelon line) as explants, and researched MS medium containing different concentration growth hormone. The results showed that the callus induction medium was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The shoot induction medium was MS+IBA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L. The root induction medium was 1/2MS+IAA 0.4 mg/L and the differentiation rate reached 75%.

Key words: watermelon; cotyledon; regeneration system