

甜瓜子叶组织培养与植株再生体系建立的研究

施先锋, 孙玉宏, 陈 钢, 李煜华, 曾红霞, 张 娜

(武汉市农业科学研究所, 湖北 武汉 430051)

摘 要:以厚皮甜瓜 WT-1 的子叶为外植体, 对离体培养和植株再生进行了研究。结果表明: 4 d 苗龄的子叶诱导不定芽效果最佳; 子叶近轴端不定芽诱导率为 96.7%, 明显高于远轴端; 不同激素配比中添加 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基诱导率高达 91.7%, 转接 MS 培养基上进行再生芽的伸长培养后, 在 1/2MS+IAA 1.0 mg/L 的培养基中诱导生根, 试验建立了甜瓜遗传转化和快繁的子叶再生体系。

关键词:甜瓜; 子叶; 组织培养

中图分类号: S 652.04⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0133-03

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是葫芦科植物中重要的经济作物。近年来, 随着工程技术的迅速发展, 采用转基因技术将目的基因导入甜瓜已成为可能, 这为提高甜瓜的抗逆性和改良其品质提供了快捷可行的新途径^[1]。而在甜瓜的遗传转化方法中, 农杆菌介导和基因枪法均建立在细胞和组织能够再生完整植株的基础上^[2]。因此, 组织培养是甜瓜育种新方法的重要内容之一。目前甜瓜已能够通过真叶、子叶、下胚轴等多种外植体再生完整植株, 有的还建立了比较高效的离体培养再生体系^[3,5]。但不同甜瓜品种的组织培养条件差异极为显著, 再生潜力依基因型而明显不同^[6]。为此, 试验以厚皮甜瓜品种 WT-1 为材料, 对影响组织再生的各因素进行研究, 将各因素对不定芽的诱导情况进行分析和筛选, 以期建立该品种的高效再生体系, 为农杆菌介导的基因转化及种质系统介导的基因转化作准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甜瓜品种编号为 WT-1, 由武汉市农业科学研究所西甜瓜研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获取 选取粒大饱满的 WT-1 种子, 剥去外壳, 放入无菌水中浸泡 3~4 h, 经 70%酒精表面消毒 10 s 再用无菌水洗净酒精, 放入 0.1%升汞中消毒 7 min, 冲洗 4 次, 洗去残留的升汞, 然后接种于 MS 固体

培养基(3%的蔗糖 0.8%的琼脂, 不添加激素)上诱导发芽。培养条件: 温度 25℃左右, 光照强度 3 000 lx, 每日光照 24 h。

1.2.2 苗龄对不定芽诱导的影响 在无菌条件下, 分别选取 3、4、5、6 及 7 d 不同苗龄的幼苗, 置于培养皿上, 切下子叶, 截去顶部和底部, 再将子叶横切为 2 部分, 将近轴端部分横切或纵切为 2~3 块, 接种于诱导培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L)中, 每盒培养基接种 6 块外植体, 每个苗龄子叶 6 盒。

1.2.3 子叶不同部位对不定芽诱导的影响 选取 1.2.2 试验筛选出最佳苗龄的子叶为外植体, 置于培养皿上, 切下子叶, 将子叶近轴端和远轴端部分切为 2~3 块, 分别接种于诱导培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L; MS+6-BA 2.0 mg/L)中, 每盒培养基接种 6 块外植体, 每处理 5 盒, 30 d 后统计出芽率。

1.2.4 不同浓度的 6-BA 对甜瓜不定芽诱导的影响 选取 1.2.2 试验筛选出最佳苗龄的子叶为外植体, 置于培养皿上, 切下子叶, 切去近轴端 1~2 mm, 再横切为二, 取近轴端部分横切或纵切为 2~3 块, 然后接种于诱导不定芽的培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L; MS+6-BA 1.0 mg/L; MS+6-BA 2.0 mg/L; MS+6-BA 3.0 mg/L; MS+6-BA 4.0 mg/L)中, 每盒培养基接种 6 块外植体, 每个处理 6 盒。观察产生不定芽时间, 15 d 后统计出芽率。然后将不定芽切下转入伸长培养(MS 固体培养基)基中, 再转移到生根培养基(1/2MS+IAA 1.0 mg/L)中诱导生根, 观察幼苗质量。

1.2.5 再生体系建立 选取上述试验中最佳子叶苗龄、部位和 6-BA 浓度等试验条件下, 接种子叶 90 枚, 3 次重复, 15 d 后统计不定芽数。不定芽伸长和生根方法同上。待白色根长满培养盒, 进行移栽, 统计成活率。

第一作者简介: 施先锋(1981-), 男, 硕士, 研究方向为西甜瓜育种及栽培技术推广。E-mail: shixf124@163.com。

通讯作者: 孙玉宏(1968-), 女, 硕士, 研究员, 现从事西甜瓜栽培育种工作。E-mail: sunyuh68@163.com。

收稿日期: 2010-06-22

1.3 数据处理

图表制作和部分数据处理在 Excel 2003 上完成。

2 结果与分析

2.1 苗龄对不定芽诱导的影响

苗龄是甜瓜子叶能否诱导出不定芽关键因素之一。由图 1 可看出, 在相同的诱导培养基中, 不同苗龄子叶对甜瓜诱导不定芽有不同程度的影响。从 3 d 苗龄和 7 d 苗龄的子叶诱导不定芽数目表现为先升高后降低的趋势, 其中 4 d 苗龄的子叶诱导不定芽数目最多, 为 33 株。4 d 之后的芽诱导数开始下降, 7 d 苗龄的子叶诱导不定芽最少, 为 27 株。因此, 在综合考虑出芽整齐度和出芽质量等因素, 选择 4 d 苗龄的子叶诱导不定芽为最佳。

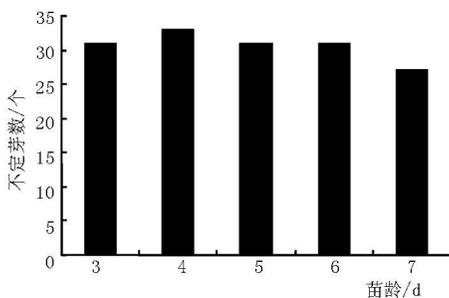


图 1 不同苗龄子叶对甜瓜诱导不定芽的影响

2.2 子叶不同部位对不定芽诱导的影响

外植体的子叶的大小和部位也是离体培养时的关键因素。由表 1 表明, 近轴端的子叶块与远轴端的子叶块均能够诱导不定芽, 但诱导率差别较大。子叶近轴端出芽数明显高于远轴端, 近轴端诱导率为 96.7%, 而远轴端仅为 55.0%。观察发现, 在出芽率较高的近轴端子叶中, 不定芽多发生在其自身的近轴端; 而远轴端很少, 多为愈伤组织(图 2-1)。子叶近轴端诱导不定芽数目在 2 种 6-BA 浓度下相同, 而较高浓度的 6-BA 对子叶远轴端诱导不定芽数有一定的提高。

表 1 子叶不同部位对不定芽诱导的影响

6-BA 浓度 /mg · L ⁻¹	接种子叶数 /个	近轴端 出芽数/个	远轴端 出芽数/个
1.0	30	29	13
2.0	30	29	20
平均诱导率/%	—	96.7	55.0

2.3 不同激素浓度对不定芽诱导率的影响

随着添加 6-BA 浓度的不断升高, 产生不定芽时间先较慢、后迅速、再变慢的趋势, 说明较低和较高 6-BA 浓度均会延缓不定芽的产生。由表 2 表明, 随着 6-BA 浓度的不断升高, 出芽的外植体数先升高后降低, 在添加 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基中, 诱导子叶出芽数最多, 为 33 个, 比诱导出芽数最少的(添加 6-BA 4.0 mg/L 的 MS 培养基)高 57.1%, 诱导率达 91.7%; 同时产生不定芽的时间较短, 培养的幼苗植株健壮, 生长迅速, 易生根。而添加其它浓度 6-BA 的出芽率较低, 出芽质量参差不齐, 芽诱导需要的时间长, 浪费药品, 不具有实用性。所以, 添加 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基诱导不定芽效果最佳。

表 2 不同 6-BA 浓度对甜瓜子叶诱导不定芽影响

6-BA 浓度 /mg · L ⁻¹	产生不定芽时间	出芽外植体数/个	幼苗质量	诱导率/%
0.5	较晚	23	健壮, 易生根	63.8
1.0	迅速	33	健壮, 易生根	91.7
2.0	迅速	25	易生根	69.4
3.0	较晚	24	较难生根	66.7
4.0	较晚	21	难生根	58.3

2.4 再生体系的建立

2.4.1 不定芽诱导 在添加 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基中, 15 d 后, 4 d 苗龄的子叶近轴端诱导不定芽数为 95 个(图 2-2), 不定芽诱导率高达 105.56%。

2.4.2 不定芽继代与生根 将外植体上的丛生或单生不定芽切下, 将其转入继代培养基中。待不定芽伸长至 3~5 cm 时, 转移到生根培养基中诱导生根。培养 5 d 后, 可以看见约 2 cm 长的白色根(图 2-3)。20 d 后, 白色根长满培养盒, 此时可以进行移栽。

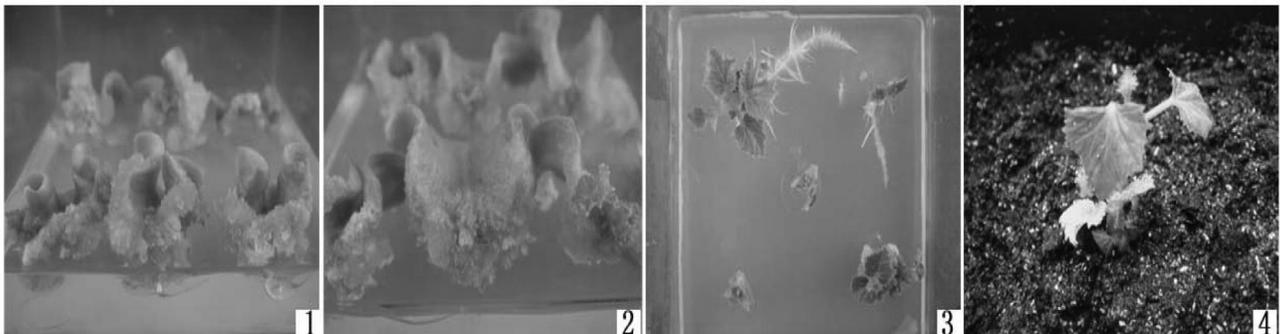


图 2 子叶诱导及再生体系建立过程

注: 1. 远轴端产生的愈伤组织; 2. 诱导产生的不定芽; 3. 不定芽诱导生根; 4. 再生植株移栽到营养钵中。

2.4.3 再生植株移栽 将培养盒封膜打开, 取出再生苗, 洗去根上的培养基, 栽入基质以 1:3 比例混合的蛭石和草炭的培养钵中(图 2-4), 用霍格兰营养液浇 1~2 次。注意保持湿度和温度, 但要防止湿度过大导致的霉菌污染。在温室中练苗 5~7 d, 前期遮荫, 逐渐加强光照, 再移栽到大棚或大田中生长, 成活率在 85% 以上。

3 结论与讨论

大多数甜瓜品种在不定芽诱导时均具有极性现象, 不同品种的极性现象的相关因素不尽相同。师桂英等⁷研究表明, 厚皮甜瓜黄河蜜的极性现象不受外植体切割方式和切块大小的影响, 而与子叶外植体的切口位置有关。该试验发现, 近胚轴部位的子叶块不定芽的诱导率高于远离胚轴端的子叶块, 多数不定芽都是在靠近胚轴端的子叶块中产生, 且在每个子叶块中也存在这种极性现象, 即子叶块的 4 个切口中, 靠近胚轴的切口容易产生不定芽, 远离胚轴的切口难以形成不定芽。因此, 在甜瓜组织培养中, 应选择近胚轴部位作为外植体。这一试验结果与王志强等⁸的报道一致。

子叶苗龄和激素的浓度是子叶能否诱导出不定芽的 2 个关键因素。该试验结果表明, 4 d 苗龄的子叶对厚皮甜瓜品种 WT-1 诱导不定芽效果最好。而马国斌等⁹研究认为, 2 d 苗龄子叶的不定芽分化率最高, 这可能是由于研究的品种不同所致。孙天国等¹⁰研究表明, BA 是甜瓜再生分化的关键物质, 以 BA 浓度为 4.0 mg/L 时, 最有利于子叶外植体的分化生芽。该试验发现, 添加 6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基是诱导不定芽最佳培

养基, 诱导率达 91.7%, 产生不定芽的时间较短, 不定芽转接 MS 培养基上进行再生芽的生长, 幼苗植株健壮, 且在 1/2MS+IAA 1.0 mg/L 的培养基中易生根, 基本建立了甜瓜遗传转化和快繁的子叶再生体系。

参考文献

- [1] Guis M, Latche A, Roustan J P, et al. Melon biotechnology [J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 1998, 15(5): 289-311.
- [2] 陶兴林, 黄永红, 赵长增. 厚皮甜瓜品种离体培养再生植株能力的基因型差异研究 [J]. *果树学报*, 2005, 22(3): 252-255.
- [3] 夏海武, 马秀兰, 万永霞, 等. 甜瓜组织培养与快速繁殖的研究 [J]. *山东农业科学*, 2001(2): 23-24.
- [4] 邓向东, 耿玉轩, 路子显, 等. 外植体和培养因子对哈密瓜不定芽诱导的影响 [J]. *园艺学报*, 1996, 23(1): 57-61.
- [5] Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, et al. Regeneration in vitro from the hypocotyl of Cucumis species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light [J]. *HortScience*, 2003, 38(1): 105-109.
- [6] Galperin M, Zelcer A, Kenigsbuch D. High competence for adventitious regeneration in the BU-21/3 melon genotype is controlled by a single dominant locus [J]. *HortScience*, 2003, 38(6): 167-168.
- [7] 师桂英, 徐秉良, 薛应钰. 厚皮甜瓜黄河蜜植株再生研究 [J]. *兰州大学学报*, 2006, 42(5): 48-50.
- [8] 王志强, 王惠林, 廖新福, 等. 新疆哈密瓜子叶不定芽诱导与植株再生 [J]. *新疆农业大学学报*, 2005, 28(3): 79-81.
- [9] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生体系的比较研究 [J]. *中国西瓜甜瓜*, 1999(2): 2-6.
- [10] 孙天国, 沙伟, 金忠民. 薄皮甜瓜子叶组织培养的研究 [J]. *北方园艺*, 2005(2): 64-65.

(该文作者还有毕秋荣, 单位: 武汉市农业科学研究所, 430051.)

Study on Tissue Culture and Plantlet Regeneration from the Cotyledon of Melon

SHI Xian-feng, SUN Yu-hong, CHEN Gang, LI Yu-hua, ZENG Hong-xia, ZHANG Na
(Wuhan Agricultural and Science Institute, Wuhan, Hubei 430051)

Abstract: The plantlet regeneration from cotyledon of WT-1 was studied. The results showed that 4 days old seedlings cotyledon for inducing buds was best; The rate of inducing near shaft cotyledon arrived at 96.7%, which was significantly higher than the far shaft; The most suitable medium for bud induction from cotyledon of melon was MS+6-BA 1.0 mg/L and the rate of inducement arrived at 91.7%. Buds elongated at MS. Then the rooting media were 1/2MS+IAA 1.0 mg/L. The system of genetic transformation and quick propagation for cotyledon of watermelon was established preliminarily.

Key words: melon; cotyledon; tissue culture