

# 薄皮甜瓜高效再生体系的建立

孔维萍, 程 鸿

(甘肃省农业科学院 蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘 要:**对“G24”和“甘甜一号”薄皮甜瓜材料 5~7 d 苗龄的子叶、下胚轴、根尖、真叶以及不同 6-BA 浓度下不定芽诱导情况进行了研究,建立了高效稳定的再生体系并对生根以及移栽等条件进行了初步研究。结果表明:2 份薄皮甜瓜材料在不定芽的诱导方面差异不大,“G24”不定芽的发生频率达到 97.2%,“甘甜一号”为 91.6%;最适宜作为甜瓜组织培养的外植体材料为子叶近胚轴端,其不定芽诱导率可达 95%以上;不定芽诱导中最适 6-BA 浓度为 1.0 mg/L。

**关键词:**甜瓜;外植体;再生体系

**中图分类号:**S 652.603.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)02-0132-02

建立高效的离体培养再生体系是植物遗传转化成功的基础,该技术可以为进一步开展转基因研究和创造新的种质资源特别是抗性种质资源以及提高育种水平奠定良好的基础。目前,已能通过子叶、真叶、原生质体等多种外植体获得甜瓜再生植株<sup>[1]</sup>。甜瓜组织培养影响因素主要有基因型、外植体、激素种类及浓度<sup>[2]</sup>。基因型对甜瓜不定芽发生和植株再生具有决定性的作用,主要表现在不同品种间不定芽发生和植株再生能力的不同。该试验通过激素浓度和外植体筛选,建立了高效再生体系,为进一步转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试薄皮甜瓜“G24”和“甘甜一号”,均为甘肃省农业科学院蔬菜研究所自育的常规种。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌苗** 甜瓜种子去壳,用无菌水冲洗 2 次,再用 70% 的酒精浸种 30 s,而后用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 浸种 8~10 min,无菌蒸馏水冲洗 4~5 次,置于铺有湿润脱脂棉的无菌三角瓶,先暗培养 2 d,再光照 3~5 d 即可。将外植体置于诱导培养基进行培养,每皿 6 块外植体。20 d 后对纵生芽诱导率进行统计。再将诱导出的纵生芽从外植体上切割下来,置于伸长培养基上继续培养。将长到 2 cm 左右的不定芽自茎基部切下,继续接种到生根培养基上进行培养,待长根后,进行移栽。最后统计成苗率。基本培养基为 MS 培养基,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8。

**第一作者简介:**孔维萍(1975-),女,硕士,现从事蔬菜育种与分子生物学研究工作。E-mail:wpk33@126.com。

**责任作者:**程鸿(1972-),男,博士,副研究员,现主要从事蔬菜育种与分子生物学研究工作。E-mail:chengjin@yeah.net。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30960237);甘肃省生物技术专项资助项目(GNSW-2009-19)。

**收稿日期:**2011-10-16

**1.2.2 6-BA 浓度筛选** 根据 Leshetn<sup>[3]</sup> 和冯凤娟等<sup>[4]</sup> 的研究结果,激素直接选用 6-BA,浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0 mg/L,每处理 6 皿,即 6 次重复。选择 5~7 d 的无菌苗的子叶作为外植体。每片子叶横切为 2 片,取近轴端半片接种。每皿接种 6 片子叶,而后在 26℃,光照强度 3 000 lx,光周期为 16 h/8 h 的培养箱中培养。4 周后统计不同激素浓度下子叶不定芽诱导情况。

**1.2.3 外植体的筛选** 分别将 5~7 d 苗龄甜瓜植株根尖、子叶远胚轴端、子叶近胚轴端、下胚轴、真叶接种至不定芽分化培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L)上培养,筛选容易再分化的组织或器官。培养条件为温度 25℃,光照强度 3 000 lx,光周期为 16 h/d 的培养箱中培养。4 周后统计不同外植体不定芽诱导情况。

**1.2.4 生根及移栽** 待不定芽长到 2 cm 左右时,转接于生根培养基(MS+IAA 0.5 mg/L)上,诱导生根,获得完整再生植株。揭开三角瓶上的封膜,在室温下练苗 3~4 d,洗净根上的培养基,然后直接移栽入基质中或用清水浸泡至植株长出新根后再移栽入已准备好的基质中,基质以蛭石和土为主,比例为 1:2,注意保持湿度和温度。统计 2 种方法移栽植株的成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型差异对甜瓜不定芽和愈伤组织诱导的影响

2 个甜瓜品种的子叶近轴端接种至诱导培养基上(MS+6-BA 1.0 mg/L),约 4 周后统计结果显示,2 份薄皮甜瓜材料在不定芽的诱导方面差异不大,其中“G24”不定芽的发生频率达到 97.2%,“甘甜一号”为 91.6%。

### 2.2 6-BA 浓度对甜瓜子叶不定芽诱导的影响

以薄皮甜瓜“G24”为主对 6-BA 最适浓度进行研究。将“G24”甜瓜子叶近轴端接种至表 1 所列培养基上,约 4 周统计结果。结果显示,在不定芽的诱导分化培养基中添加的 6-BA 浓度对不定芽的诱导率有明显的影响。当 6-BA 的浓度为 1.0 mg/L 是不定芽的诱导率最高,达到 97.2%,且不定芽的伸长生长也较好。当 6-BA 的浓度为 0 时,只产生大量的根,随着 6-BA 的浓度增大,疏松

愈伤组织分化加快。当 6-BA 的浓度达到 2.0 mg/L 时愈伤组织诱导率最高,而当 6-BA 浓度在 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时,只产生少量的愈伤组织,大多数产生不定芽(表 1)。

表 1 6-BA 浓度对甜瓜子叶不定芽诱导率的影响

6-BA 浓度/mg · L <sup>-1</sup>	总外植体数/个	不定芽数/个	不定芽诱导率/%
0	36	0	0
0.5	36	23	63.8
1.0	36	35	97.2
2.0	36	11	30.6

### 2.3 不同外植体对不定芽诱导的影响

将“G24”5~7 d 苗龄的根尖、子叶远胚轴端、子叶进胚轴端、下胚轴和 12 d 苗龄的真叶接种至诱导培养基上(MS+6-BA 1.0 mg/L)。从表 2 可看出,子叶近胚轴最高诱导率可达到 96.7%,而根尖不能诱导愈伤组织形成。不定芽诱导率的高低顺序为:子叶近胚轴>真叶>下胚轴>子叶远胚轴>根尖。结果表明,最适宜作为甜瓜组织培养的外植体材料为子叶近胚轴端。

表 2 不同外植体的不定芽诱导率

外植体	接种外植体数	不定芽块数	不定芽诱导率/%
根尖	30	0	0
子叶远胚轴	30	5	16.7
子叶近胚轴	30	29	96.7
下胚轴	30	11	36.7
真叶	30	12	40.0

### 2.4 不定芽的生根及再生植株移栽

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。待不定芽伸长至 2~3 cm 时,转移到生根培养基中诱导生根。生根培养基为 MS+IAA 0.5 mg/L。培养 7 d 后,可见约 2 cm 长的白色根。约 3 周后可以进进行练苗移栽。结果显示,洗去培养基后直接移栽入基质中的再生苗成活率较低,大概在 50%左右,而泡至清水中直至植株长出新根后再移栽入基质的再生苗的成活率在 90%以上。

## 3 结论与讨论

该试验结果表明,2 份薄皮甜瓜材料在不定芽的诱

导方面差异不大,“G24”不定芽的发生频率达到 97.2%,“甘甜一号”为 91.6%;最适宜作为甜瓜组织培养的外植体材料为子叶近胚轴端,其不定芽诱导率可达 95%以上;不定芽诱导中最适 6-BA 浓度为 1.0 mg/L。

尽管所有的植物细胞都具有全能性,但不是任何细胞都能诱导出不定芽来。外植体的选择是进行组织培养建立无菌体系以及植株再生的关键。接种时应选择容易进行再分化的植株部位作试验材料。该试验结果表明,通过子叶近胚轴端直接诱导不定芽途径,成苗时间短,繁殖系数大,可有效地提高增殖倍数,能快速建立起甜瓜的高频稳定再生体系<sup>[5]</sup>,这与陶兴林等<sup>[1]</sup>的试验结果一致。

在诱导不定芽的增殖生长中,加入较高范围的 6-BA 对芽的分化有促进作用。但若 6-BA 浓度太高则明显抑制芽的分化,且再生芽多为畸形,玻璃化加重,难以发育成正常植株。此外,当 6-BA 浓度较高时,由于它具有后效应,常会抑制根的诱导。因此,芽增殖后期逐渐降低细胞分裂素浓度对根的诱导是有利的,但降低幅度也不能太大,否则会抑制芽丛的生长,并且外植体有黄化现象。同时,还应该及时转移分化完全的不定芽(丛)至伸长培养基上,避免外植体在含有高浓度激素的芽诱导培养基上停留时间过长<sup>[6]</sup>。

### 参考文献

- [1] 陶兴林,黄永红,赵长增,等. 厚皮甜瓜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.
- [2] 孔维萍,程鸿,苏永全,等. 西甜瓜组织培养与遗传转化影响因子研究进展[J]. 长江蔬菜,2010(12):1-4.
- [3] Leshetn B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cured melon cotyledon[J]. Plant Physiol,1989,135:237-239.
- [4] 冯凤娟,梁栋,马锋旺等. 甜瓜叶片高效再生体系的建立[J]. 西北农业学报,2008,17(5):321-324.
- [5] 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.
- [6] 王建设,陈杭. 甜瓜再生芽高效诱导方法的研究[J]. 园艺学报,1999,26(5):339-340.

## Establishment of High Frequency Shoot Regeneration System of *Cucumis melo*

KONG Wei-ping, CHENG Hong

(Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract:** Cotyledon, hypocotyledonary axis, root tip, euphylla and adventitious buds inducement with various concentration of 6-BA of ‘G24’ and ‘Gantian No. 1’ of *Cucumis melo* at the growing stage of 5~7 d were studied in this research, in order to establish stable tissue culture techniques for genetic transformation and to provide technical support. At the meantime, conditions for root growth and transplant were also primarily studied. The results showed that no significant difference on adventitious buds inducement with the two tested material. The adventitious buds inducement rate of ‘G24’ was 97.2%, while ‘Gantian No. 1’ was 91.6%; cotyledon at the hypocotyl side was the optimum explants for tissue culture with over 95% of adventitious buds inducement rate and the optimum concentration of 6-BA was 1.0 mg/L.

**Key words:** *Cucumis melo*; explants; regeneration system