

西瓜高效离体培养再生植株的研究

刘 静, 赵 强, 王 旭 英, 郑 晓 彬

(济宁学院 生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155)

摘 要:以“荣誉 4010”西瓜为试材,研究了不同外植体类型、激素配比和苗龄对西瓜植株再生频率的影响。结果表明:以 MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为培养基,3 d 苗龄的子叶为外植体不定芽诱导率达 96.7%,最佳生根培养基为 1/2MS+IBA 0.4 mg/L,生根率可达 100.0%。

关键词:西瓜;子叶;离体再生;不定芽

中图分类号:S 651.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0108-03

西瓜[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.]汁多味甜,营养丰富,是我国各地大众化的消暑佳品。西瓜的常规遗传育种周期长、难度大、遗传性状不稳定,在很大程度上限制了西瓜在生产上的推广与发展。西瓜的组织培养始于 20 世纪 70 年代,Andrus 等^[1]于 1971 年首次对无籽西瓜下胚轴进行培养,诱导形成了芽丛,建立了无籽西瓜的无性繁殖体系。之后,一些学者采用西瓜顶芽^[2-3]、子叶^[4-5]、花药^[6-7]、原生质体^[8]等进行研究,建立了一些外植体的高效再生体系^[4,9],并进行西瓜的遗传转化,获得了性状优良的转基因植株^[10-11]。然而,西瓜的遗传转化效率相对较低,建立高效离体再生体系是西瓜转基因成功的关键。为此,该研究以“荣誉 4010”西瓜为试材,系统地研究了外植体的类型、激素配比和苗龄对西瓜植株再生频率的影响,旨在建立一套适宜西瓜的高效离体再生体系,为西瓜的快速繁殖和遗传转化的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“荣誉 4010”西瓜种子(寿光市中植种业有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将西瓜种子于 25℃ 的温水中浸泡 24 h 后,用湿润的棉布包裹,置于 25℃ 生化培养箱中培养,每隔 4 h 检查 1 次种子的露白情况。在种子露白时,将其用 75% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 5 次,再用 0.1% HgCl₂ 处理 20 min,无菌水冲洗 3~5 次,无菌滤纸吸干水分,接种 MS 培养基中培养。培养基中添加白砂糖 30 g/L,琼脂 7 g/L, pH 5.8 左右。培养温度

(25±2)℃,光照时间 14 h/d,光照强度 2 000 lx。

1.2.2 不定芽的诱导 待种子萌发至子叶展开时切取子叶、下胚轴作为外植体进行培养。子叶切去叶尖、叶柄,并横切 2 刀,下胚轴切成 0.5 cm 左右的段,接种于含有不同激素配比的诱导培养基中,每个处理接种 30 个外植体,3 次重复(下同),培养 25 d 后统计不定芽的再生情况。

1.2.3 苗龄对不定芽再生的影响 将苗龄 3、5、7 和 9 d 的子叶,切割后接种于不定芽诱导培养基中培养,25 d 后统计不定芽的再生情况。

1.2.4 试管苗的生根培养 取 2~3 cm 高的试管苗,分别接种于含有 IBA 0、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mg/L 的 1/2MS 培养基中,培养 25 d 后统计试管苗的生根情况。

1.3 数据处理方法

试验结果采用 Duncan's 检验方法进行统计分析。

污染率(%)=(污染外植体数/总外植体数)×100,
不定芽诱导率(%)=(分化不定芽的外植体数/总外植体数)×100,出芽数(个/外植体)=再生芽数/出芽的外植体总数,生根数(条/外植体)=总生根数/生根外植体总数。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对不定芽再生的影响

由表 1 可知,不同外植体的再生能力有很大的差异。在 2 种激素组合处理中,西瓜子叶的不定芽诱导率和出芽数高于下胚轴的不定芽诱导率和出芽数。在所设的激素浓度范围内,刚展开子叶不定芽诱导率和出芽数最高值分别为 96.7% 和 7.2,产生的不定芽密集、健壮,呈鲜绿色,而下胚轴的不定芽诱导率仅为 61.1%,且出芽数较少仅为 3.2,不定芽纤细、淡绿。结果表明,子叶作为外植体更利于西瓜不定芽的再生。

第一作者简介:刘静(1980-),女,河北沧州人,硕士,讲师,现主要从事果蔬生物技术方面的教学与研究工作。E-mail:liujingpretty@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-10-08

表 1 不同激素配比对西瓜子叶和下胚轴不定芽再生的影响

Table 1 Effects of different hormone concentration on shoot regeneration of cotyledons and hypocotyls from watermelon

激素浓度 Concentration of hormone/mg · L ⁻¹		不定芽诱导率 Rate of regeneration/%		外植体出芽数 No. of the buds per explant/个	
BA	NAA	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
0	0.1	0h	0g	0e	0d
1.0	0.1	40.0g	31.6f	1.2d	1.0c
2.0	0.1	60.0e	41.7d	3.2b	1.5c
4.0	0.1	96.7a	50.0bc	7.2a	2.3b
6.0	0.1	73.3c	48.3c	2.9bc	1.6c
1.0	0.2	48.3f	38.3e	3.1b	1.1c
2.0	0.2	76.7c	43.3d	1.7d	1.5c
4.0	0.2	86.6b	61.1a	2.4c	3.2a
6.0	0.2	66.7d	36.7e	2.9bc	2.3b

注:试验结果采用 Duncan's 方法检验,表中小写字母为差异达显著水平 $\alpha=0.05$,下同。

Note: The lowercase indicated significantly different at $\alpha=0.05$ level to test with Dunance. The same as blow.

2.2 激素配比对再生的影响

由表 1 可知,对照处理子叶未分化,而各处理接种 2 d 后子叶由黄转绿,体积明显增大,7 d 后切口处出现少量愈伤组织。在一定 BA 浓度范围内,随其浓度增加诱导率增加;当 BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 时,不定芽诱导率为 40.0%,出芽数较少;当 BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 时,不定芽诱导率为 96.7%,子叶基部分化较多的丛芽,出芽数为 7.2,与其它处理间差异显著。随着 BA 浓度的继续增加,不定芽的诱导率有所降低,当 BA 6.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 时,不定芽诱导率为 73.3%,产生大量愈伤组织,分化较少的丛芽,出芽数 2.9,出现了一定量的玻璃化苗。当培养基中 NAA 浓度增加时并未显著提高不定芽诱导率;当 BA 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 时,不定芽诱导率为 86.6%,外植体产生大量愈伤组织,而不定芽分化较少,出芽数仅为 2.4。因此,细胞分裂素 BA 对西瓜子叶不定芽的诱导非常重要,但浓度不能太高,以 4.0 mg/L 为宜;西瓜子叶再生不定芽时,以 MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 做为诱导培养基较好。

2.3 不同苗龄的子叶对再生的影响

由表 2 可知,3 d 苗龄的子叶不定芽诱导率 and 不定芽的数量明显高于其它处理。3 d 苗龄子叶不定芽诱导率为 96.7%,出芽数为 7.2。随着苗龄的增加,子叶不定芽的诱导率逐步降低,且每个外植体所分化的不定芽数目也逐步减少。这可能是随着苗龄的增加,子叶趋于衰老,再生能力下降所致。因此,应在种子发芽后 3 d 时选取刚展开的子叶对其进行不定芽的诱导。

表 2 不同苗龄的子叶对再生的影响

Table 2 Effects of different seeding age on the regeneration of cotyledon

苗龄 Seeding age/d	接种数 No. of explants inoculated	不定芽诱导率 Rate of regeneration /%	外植体出芽数 No. of the buds per explant/个
3	90	96.7a	7.2 a
5	90	85.0b	4.1 b
7	90	58.3c	3.0c
9	90	16.7d	1.2d

注:培养基为 MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+白砂糖 30 g/L+琼脂 7 g/L。

Note: The medium was MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+Sugar 30 g/L+Agar 7 g/L.

2.4 试管苗的生根培养

由表 3 可知,健壮的芽可以在不含生长调节剂的 1/2MS 培养基中生根,生根率可达 10.0%。添加不同浓度 IBA 的处理,培养 3 d 时不定芽基部切口处出现膨大,7 d 左右出现不定根,在一定 IBA 浓度范围内,不定根的诱导率和生根数随其浓度的增加而显著增加,当 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时,不定根的诱导率为 63.3%,生根数为 4.1,根系较粗;浓度为 0.4 mg/L 时,不定根的诱导率为 100.0%,生根数为 8.2,根系粗细均匀,须根较多(图 1b~c);随着 IBA 浓度的升高,不定根的数量逐步减少,同时切口处愈伤组织增多,且所发生的根较细(图 1d)。因此,1/2MS+IBA 0.4 mg/L 可用于试管苗的生根培养。

表 3 IBA 对试管苗生根的影响

Table 3 Effects of IBA on the rooting of tube-shoots

IBA 浓度 /mg · L ⁻¹	接种数 No. of explants inoculate/个	生根率 Rate of rooting/ %	单株生根数 No. of the roots per shoot/条
0	90	10.0e	1.0e
0.2	90	63.3c	4.1c
0.4	90	100.0a	8.2a
0.6	90	75.0b	7.4b
0.8	90	68.3d	6.5d

3 结论与讨论

该试验从外植体的类型、激素配比和苗龄 3 个方面探索西瓜有效的不定芽再生体系,以建立西瓜高效的离体植株再生体系。结果表明,“荣誉 4010”的植株再生频率主要取决于外植体类型,子叶的再生能力高于下胚轴的再生能力,激素浓度配比明显影响了再生不定芽数,这与 Nandariyah 等^[6]研究结果一致。西瓜不定芽生根培养中发现,健壮的芽可以在不含生长调节剂的 1/2MS 培养基中生根,但生根率较低为 10.0%。肖守华^[12]研究表明,在不含任何植物生长调节物质条件下,西瓜“京欣 1 号”外植体可以从基部丛生出不定根,但无不定芽的分化,说明植物生长调节物质对西瓜组织再生的影响较大。

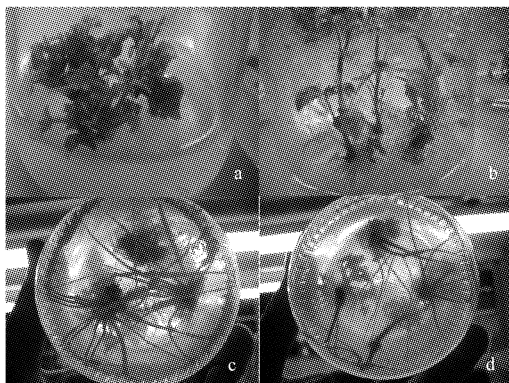


图1 西瓜子叶离体培养再生情况

注:a;子叶在MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基中不定芽再生情况;b,c;试管苗在1/2MS+IBA 0.4 mg/L培养基中生根情况;d;试管苗在1/2MS+IBA 0.8 mg/L培养基中生根情况。

Fig. 1 Regeneration of cotyledon of watermelon *in vitro*

Note:a; Regeneration of adventitious shoots on medium with MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L from cotyledon, b,c; Rooting of tube-shoots on medium with 1/2MS+IBA 0.4 mg/L; d; Rooting of tube-shoots on medium with 1/2MS+IBA 0.8 mg/L.

不同苗龄的子叶对不定芽再生影响较大。有关不同苗龄对西瓜子叶诱导分化的试验报道不一,Compton等^[13]的研究认为5 d苗龄幼苗子叶的不定芽发生频率最高;宋道军等^[14]研究认为3 d苗龄左右的西瓜基端子叶最易于再生;张志忠等^[15]认为5 d苗龄对于子叶分化影响较大,但由于培养条件和基因型等差异导致不同品种的种子发育快慢不同,不宜以天数来确定苗龄,而以子叶颜色判断可能更有效。而该试验结果表明,种子发芽后3 d时选取刚展开子叶,在MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L的诱导培养基上,不定芽的分化率最高达96.7%,这可能是由于不同苗龄的子叶其内在的生理生化状态、分化再生能力等方面存在差异所致,这种现象是否可以在进行子叶诱导不定芽时以子叶的生理生化指标和外观形态综合判断其最佳的选取时期,还有待于进一步试验研究。

High Frequency Plantlet Regeneration of Watermelon *in vitro*

LIU Jing,ZHAO Qiang,WANG Xu-ying,ZHENG Xiao-bin

(Department of Life Science and Engineering,Jining University,Qufu,Shandong 273155)

Abstract: The effects of different explants, different concentration of the hormone and different seeding age on the regeneration of watermelon were studied using 'honor 4010' watermelon as materials. The results showed that the cotyledon cultured for 3 days had the highest regeneration frequency of 96.7%, when it was placed in the MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The optimum rooting medium was 1/2MS+IBA 0.4 mg/L and the rate of inducement arrived at 100.0%.

Key words: watermelon; cotyledon; *in vitro* regeneration; adventitious shoot

参考文献

- [1] Andrus C F, Seshadri V S, Grimball C. Production of seedless watermelon [J]. USA Tech. Bull, 1971, 21(3): 293-301.
- [2] 刘独臣, 房超, 刘小俊, 等. 小西瓜茎尖离体再生体系的建立[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 1373-1377.
- [3] 万勇, 张铮, 刘红梅, 等. 西瓜组织培养快速繁殖的初步研究[J]. 江西农业学报, 2002, 14(4): 47-50.
- [4] Rakhi C, Bhatnagar S P, Chaturvedi R. High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2001, 37(2): 255-258.
- [5] Nandariyah, Gunarto, Walluyo D D, et al. *In vitro* effect of auxin and cytokinin type on the growth and ploidy level of watermelon[J]. *Breeding to Increase Competitiveness of Indonesian Agriculture Commodities*, 1997, 20: 498-503.
- [6] 薛光荣, 余文炎, 费开伟, 等. 西瓜花药离体培养获得花粉植株[J]. 植物生理学通讯, 1983(4): 40-42.
- [7] 魏跃, 龚义勤, 邓波, 等. 西瓜花药愈伤组织的诱导[J]. 湖北农业科学, 2005(5): 93-95.
- [8] 李仁敬, 孙勇如. 西瓜子叶原生质体再生愈伤组织的获得[J]. 新疆农业科学, 1992(5): 218-220.
- [9] 赵彩萍, 王荣华, 张治平, 等. 西瓜植株再生优化体系的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(2): 303-308.
- [10] 刘丽锋, 古勤生, 胡京昂, 等. 小西葫芦黄花叶病毒外壳蛋白基因导入西瓜的遗传转化[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 496-501.
- [11] Sang M P, Jung S L, Sung J, et al. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 350-356.
- [12] 肖守华. 西瓜、甜瓜遗传转化体系的建立及转基因植株的抗病性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [13] Compton M E, Gray D J, Elmstrom G W. A simple protocol for micro-propagating diploid and tetraploid watermelon using shoot-tip explants[J]. *Plant Cell Tissue*, 1993, 33(2): 211-217.
- [14] 宋道军, 陈若雷, 王浩波, 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.
- [15] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新. 西瓜高频再生系统研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 151-153.