

新疆甜瓜“皇后”再生体系的建立

张铁刚, 宁雪飞, 王贤磊, 李冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 生物工程研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:以厚皮甜瓜“皇后”为试材,研究了 6-BA 及其与 NAA、GA₃ 组合对植株离体再生的影响,以期建立以子叶为外植体的快速高效再生体系。结果表明:甜瓜子叶用 MSB+1.0 mg/L 6-BA 诱导分化培养基,不定芽诱导率可达 86% 以上;培养基中添加 NAA 不利于“皇后”子叶不定芽的产生;产生的不定芽丛或单芽转至 MSB+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA₃ 培养基,不定芽均可伸长,且生长状况良好;再生苗转至不添加任何激素的 MS 培养基生根,生根率达 99%。

关键词:甜瓜“皇后”;子叶;不定芽;再生体系

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0122-04

新疆是厚皮甜瓜次生起源中心之一,品种多,品质佳,栽培面积广,是我国厚皮甜瓜种植面积最大和种质资源最丰富的地区,也是新疆重要经济作物之一,其独特的品质享誉海内外^[1]。随着植物基因工程的兴起和发展,尤其是无选择标记转基因技术的产生和不断完善,使得通过转基因技术改良甜瓜品质成为新的研究热点,这为提高甜瓜品质和抗逆性开辟了更加安全可靠、快捷可行的途径。而建立高效离体培养再生体系是通

过转基因技术改良甜瓜品质的基础。

目前甜瓜组织培养再生方面,已能通过子叶、下胚轴、真叶等外植体再生出完整植株^[2-6]。但甜瓜再生周期较长,影响因素多,即使不同基因型甜瓜在再生效率上也存在差异。此外,培养基种类以及生长调节物质的种类和浓度等因素均会影响甜瓜再生效率^[7-10]。目前关于甜瓜离体培养再生体系的报道较多,但再生效率多不稳定、再生体系不通用,限制了通过转基因技术改良新疆厚皮甜瓜品质的研究,因此急需建立适宜的高效离体培养再生体系。

该研究以新疆优质厚皮甜瓜“皇后”为试材,系统研究厚皮甜瓜再生体系,旨在建立厚皮甜瓜快速高频再生系统,为遗传转化改良厚皮甜瓜品质奠定基础。“皇后”是吴明珠院士等采用远生态、远地域、多亲复合杂交、回交等技术选育出的优良品种,它不仅质优美观而且抗病能力强,是新疆甜瓜的主栽品种之一,累计种植面积达 6.7 万 hm²,畅销海内外。该研究的成功开展也将为厚

第一作者简介:张铁刚(1985-),男,硕士,现主要从事植物生物学研究工作。E-mail:zhangtiegang02@163.com.

责任作者:李冠(1949-),男,教授,博士生导师,研究方向为植物生理生化与分子生物学。E-mail:guanli@xju.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060148;31150004);新疆高新技术研究发展基金资助项目(201111120);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2011211B09)。

收稿日期:2012-04-26

Comparison of Three Optimized Method for Isolating Total RNA from Grapevine Tissues

SONG Yang-bo, LIU Yan-lin, GENG Wan-gang

(College of Enology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: In order to choose the best optimized method for isolating total RNA from grapevine tissues, the effects of optimized SDS-phenol method, optimized CTAB method and optimized Trizol method were compared by isolating total RNA from the grapevine buds, leaves and ripe berry skins. The results showed that quality and high concentration RNA were harvested by the optimized SDS-phenol method and the optimized CTAB method and the two methods are more suitable for RNA isolation from leaves and buds. At the same time, quality but less concentration RNA were gotten by the optimized Trizol method, while the total RNA was still enough for further research.

Key words: grapevine; total RNA; isolation; optimized SDS-phenol method; optimized CTAB method; optimized Trizol method

皮甜瓜“皇后”的进一步改良提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试厚皮甜瓜品种为“皇后”。植物生长调节剂 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、赤霉素(GA_3)和萘乙酸(NAA)购自上海蓝季科技发展有限公司,琼脂粉等购自北京鼎国生物技术有限责任公司(Japan 分装),其它试剂和药品均为国产分析纯。

1.1.2 培养基 基本培养基为 MSB 培养基(MS 盐溶液和 B5 培养基的有机成分,含蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L, pH 5.8),不定芽诱导培养基为 MSB 添加不同浓度的 6-BA(0、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/L)与 NAA(0.5、1.0 和 1.5 mg/L),设 21 个组合,3 次重复;伸长培养基为 MSB+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L GA_3 ;生根培养基为不添加激素的 MSB 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 培育无菌苗 种子去壳,70%乙醇浸泡 30 s,2%次氯酸钠、0.1%升汞和 15%过氧化氢分别处理表面灭菌 10 min,无菌水冲洗 4~5 次,无菌滤纸吸干表面水分,然后接种于萌发培养基(MS 培养基,不含激素),培养条件为(27±1)℃,光照强度 3 000 lx,光周期 16 h/8h。每个处理 40 粒种子,3 次重复。

1.2.2 诱导不定芽分化 选择 3~5 d 苗龄的无菌苗作为外植体,于超净工作台中切取无菌苗子叶,首先切去子叶顶部和基部,再纵切为二,移入芽诱导培养基上诱导不定芽分化。定期观察外植体,统计不定芽分化率。

1.2.3 诱导不定芽伸长和生根 将外植体上的丛生或单生不定芽切下,接种到不定芽伸长培养基上继续培养。待无菌苗长至 3~5 cm 时,自其基部切下,转接到生根培养基上,培养条件为(27±1)℃,光照强度 3 000 lx,光周期 16 h/8h。2 周后统计生根情况。

1.2.4 再生植株的驯化及移栽 待不定根达到一定数量和长度后,去掉封口膜,取出组培苗,用自来水将根上培养基冲洗干净,浸于自来水中培养 3~5 d,移栽到高压灭菌的蛭石和珍珠岩 3:1(V/V)混合基质中,于温室培养,最后将成活的再生苗移栽至大田。利用 IBM SPSS statistics 19.0 软件,采用 Duncan 和 LSD 对种子消毒和不定芽诱导结果进行单因素方差分析(ANOVA),差异显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 种子消毒

由表 1 可知,3 种消毒剂处理下的外植体均无污染。其中 15% H_2O_2 处理后种子发芽率为 92.26%;2% NaClO 处理后发芽率为 91.77%;0.1% $HgCl_2$ 对种子的伤害较大,发芽率最低,为 90.21%。不同消毒剂对甜瓜种

子的消毒效果存在差异,其中,15% H_2O_2 处理和 2% NaClO 处理差异不显著;0.1% $HgCl_2$ 处理与 15% H_2O_2 处理、2% NaClO 处理差异显著。在消毒过程中发现,15% H_2O_2 消毒时甜瓜种子漂浮在消毒剂表面,不便操作,故选择 2% NaClO 作为消毒剂,具体消毒条件为 70%乙醇 30 s+2% NaClO 10 min+无菌水冲洗 4~5 次。

表 1 3 种消毒试剂对甜瓜“皇后”种子消毒效果的比较

Table 1 Comparison of seed sterilization of melon cultural 'Queen' by three kinds of reagents

试剂 Reagent	发芽率 Germination percentage/ %	污染率 Pollute rate/ %
0.1% $HgCl_2$	90.21±0.62b	0
2% NaClO	91.77±0.80a	0
15% H_2O_2	92.26±0.82a	0

注:不同字母表示在 5%水平上差异。下同。

Note: Different letter indicated significant difference at 5% level. The same below.

2.2 细胞分裂素 6-BA 对不定芽诱导的影响

该研究发现,子叶外植体接种 9~10 d 后,切口处开始产生亮绿色的小突起或小芽,20 d 左右在此处长出丛生芽(图 1 B)。由表 2 可知,添加不同浓度 6-BA,子叶不定芽诱导率在 $P<0.05$ 水平上差异显著,不同浓度 6-BA 的培养基上不定芽分化情况不同。以 MSB+1 mg/L 6-BA 培养基丛生芽诱导率最高,达 86%。在不添加任何激素的 MSB 培养基中,子叶外植体在靠近胚轴一端可以发出许多根,并且根生长较长,呈丛生状,无不定芽产生,这表明 6-BA 对诱导胚性愈伤和不定芽分化是必需的。但当 6-BA 浓度过高时,玻璃化现象严重,产生的不定芽数量相对较少,愈伤组织较多并呈质软疏松状。

子叶脱分化及再分化表现明显的极性现象,子叶外植体切块近轴端(靠近叶柄端)切口处首先大量发生愈伤组织及不定芽,每一块发生不定芽的外植体均在近轴端有不定芽发生,而远轴端很少或几乎不产生愈伤组织和不定芽。

表 2 6-BA 对甜瓜品种“皇后”的子叶不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of inducing buds by 6-BA from cotyledon of melon cultural 'Queen'

培养基编号 Number of medium	6-BA 6-Benzylaminopurine /mg · L ⁻¹	不定芽诱导率 Percentage of shoot induction/ %	平均出芽数/外植体 Average number of shoots/explants/ %
1	0.0	0.00±0.00e	0.00±0.00g
2	0.1	35.00±4.08c	42.92±2.13e
3	0.2	41.67±1.89b	51.98±1.84d
4	0.5	75.00±4.08b	88.14±2.15b
5	1.0	86.00±5.35a	106.01±3.43a
6	1.5	68.00±2.16b	78.03±4.78c
7	2.0	25.00±4.08d	33.33±2.90f

2.3 NAA 与 6-BA 组合对不定芽诱导的影响

由表 3 可知, NAA 促进愈伤组织的形成, 但随着 NAA 浓度的增加, 玻璃化现象严重, 并抑制不定芽的产生。通过对不同 6-BA 和 NAA 配比进行方差分析, 结果表明, 交互作用不显著, $P>0.05$ 。添加 NAA 后, 不定芽的诱导率均降低。无论添加 NAA 与否, 1 mg/L 6-BA 培养基上的不定芽丛发生率最高, 达 90%。当 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时, 不定芽的诱导频率最低, 在 3.00%~5.67%。

表 3 6-BA 与 NAA 组合对甜瓜“皇后”子叶不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of inducing buds by the combination of 6-BA and NAA from cotyledon of melon cultivar ‘Queen’

培养基编号 Number of medium	6-BA	NAA	不定芽诱导频率 Rate of inducing buds/%
	6-Benzylaminopurine /mg · L ⁻¹	1-naphthacetic acid /mg · L ⁻¹	
1	0.5	0	76.67±7.64b
2	0.5	0.01	66.67±2.89bcde
3	0.5	0.02	70.00±5.00bcd
4	0.5	0.05	60.00±5.00def
5	0.5	0.1	40.00±10.00hi
6	0.5	0.2	48.33±17.56fgh
7	0.5	0.5	5.00±5.00j
8	1.0	0	90.67±5.13a
9	1.0	0.01	76.33±5.51b
10	1.0	0.02	76.00±1.73b
11	1.0	0.05	73.00±3.46bc
12	1.0	0.1	66.67±5.77bcde
13	1.0	0.2	60.00±10.00def
14	1.0	0.5	5.67±5.13j
15	1.5	0	67.67±4.04bcde
16	1.5	0.01	63.33±5.57cde
17	1.5	0.02	61.00±3.61cde
18	1.5	0.05	56.67±2.89efg
19	1.5	0.1	46.67±5.77gh
20	1.5	0.2	34.33±5.13i
21	1.5	0.5	3.00±2.65j

可见, NAA 对甜瓜不定芽分化具有明显的抑制作用, 使甜瓜子叶块的诱导率明显下降。因此, 甜瓜品种“皇后”子叶诱导不定芽的最适培养基 6-BA 质量浓度为 1 mg/L, 不添加 NAA。

2.4 不定芽的伸长和生根

待外植体上的丛生芽或单生不定芽长至 0.5 cm 左右时, 切下接种到伸长培养基上, 2 周后, 不定芽明显伸长(图 1 C)。待苗长至 2 cm 高时, 从其基部切下, 转接到生根培养基上诱导生根。1 周后, 可看到细嫩的幼根, 2 周后, 生根率可达 99%, 且根系发达, 粗长, 数量多, 根毛浓密, 叶片浓绿, 茎粗壮(图 1 D 和 E), 易移栽成活。

2.5 再生苗的移栽

根长超过 2 cm 时, 移栽到预先高压灭菌的蛭石和珍珠岩 1:1(V/V)混合基质中(图 1 F)中后发现, 移栽苗处于非高湿环境也能正常生长, 待苗成活后, 移栽于花土基质中(图 1 G)或移栽至大田(图 1 H)。

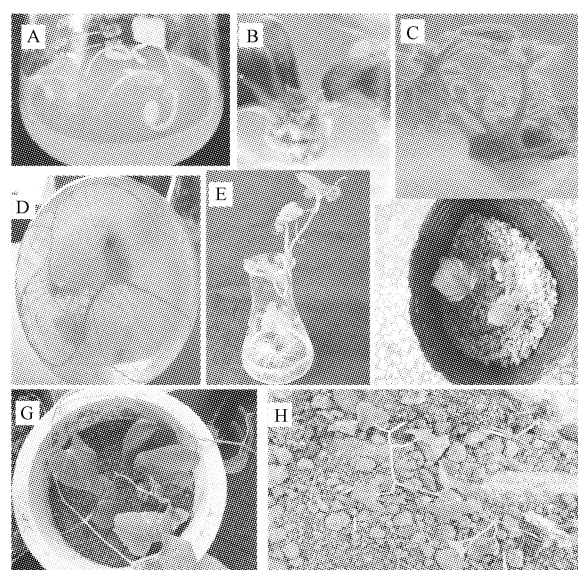


图 1 甜瓜“皇后”子叶再生过程

注: A. 无菌苗; B. 培养 3~4 周时不定芽诱导培养基中产生的丛生芽; C. 伸长培养基中培养 1 周时的不定芽; D、E. 生根培养基中培养 2 周时的生根苗; F. 生根苗转至预先高压灭菌的蛭石和珍珠岩混合基质中; G. 生根苗成活后移栽至花土中; H. 移栽至大田的再生植株。

Fig. 1 Regenerative process of cotyledon of *C. melo* L. cv. ‘Queen’

Note: A. seeds in the 1/2MS medium; B. Regenerated shoots after 3 to 4 weeks in regeneration medium; C. Elongated shoots after 1 week in elongate medium; D and E. rooted shoots after 2 weeks in rooting medium; F and G. regenerated plants transferred to perlite and vermiculite or soil; H. regenerated plants transferred to field.

3 讨论与结论

植物组织培养中, 外植体的消毒十分重要, 但往往容易被忽略, 消毒的效果对工作量及后续的试验进程具有重要影响。甜瓜种子有许多内生菌, 消毒不彻底污染再生苗后期的生长, 不仅浪费外植体材料, 而且成倍地增加工作量。该研究发现, 70%酒精 30 s+2% NaClO 10 min+无菌水冲洗 4~5 次为最佳消毒条件, 消毒结果无季节性差异, 这与方丽等^[11]不同季节应采用不同消毒方式的结果存在差异。

其次, 确立最佳诱导条件是十分必要的, 尤其是植物激素的浓度。Dirks 等^[12]用甜瓜真叶和子叶作为外植体进行甜瓜再生试验, 结果表明, MS+1.0 mg/L 6-BA 培养基最适于甜瓜幼龄子叶高频率发生不定芽。这与该试验确定的 6-BA 最佳浓度 1.0 mg/L 完全一致, 黄海良等^[13]进行不定芽诱导的最佳培养基为 MS+(0.3~0.5) mg/L 6-BA+(0.1~0.2) mg/L NAA, 而该试验结果表明, 附加 NAA 不利于“皇后”子叶的分化, 这也与师桂英等^[14]的结论不同。

该试验还发现,在甜瓜“皇后”组织培养过程中出现极性现象,与其它甜瓜品种中出现的极性现象一样,不受外植体切割方式和切块大小的影响,不定芽总是在近轴端切口处产生。发生这种现象的原因可能是由植物激素在外植体中发生极性运输所致^[15],其进一步原因尚待研究,了解这一现象对外植体的选择以及建立高效再生体系具有重要的指导意义,对开展甜瓜遗传转化研究也具有价值。

再生苗移栽至大田后,苗早期生长势弱,但缓苗后,完全保持原植株的优良性状,无退化现象发生。如果能根据组培苗的特点注意苗期管理,对特优单株进行快繁的效益会特别明显。这与夏海武等^[16]的结论相同。该试验建立了子叶快速高频再生系统,为遗传转化的研究及生物技术育种提供一个平台。拟在后续工作中通过根癌农杆菌浸染甜瓜子叶进行转化。

参考文献

- [1] 王坚. 中国蔬菜栽培学[M]. 北京:农业出版社,1987.
- [2] 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.
- [3] 陶兴林,黄永红,赵长增,等. 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.
- [4] 陆璐,赵长增,陆婷. 甜瓜‘黄蛋子’子叶再生完整植株研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(8):81-85.
- [5] 毛娟,陈大鹏,赵长增. ‘黄河蜜3号’高效再生体系的建立[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(2):63-68.
- [6] 施先锋,孙玉宏,陈钢,等. 甜瓜子叶组织培养与植株再生体系建立的研究[J]. 北方园艺,2010(20):133-135.
- [7] Ananthakrishnan G, Xia X D, Amutha S, et al. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro* [J]. Plant Cell Rep,2007,26:267-276.
- [8] Zhang H J, Gao P, Luan F S. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L. [J]. African Journal of Biotechnology, 2011,10(35):6757-6761.
- [9] Li J, Li X M, Qin Y G, et al. Optimized system for plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thumb.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2011,10(48):9760-9765.
- [10] Ren Y, Bang H, Curtis I S, et al. Agrobacterium-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2012,108:147-158.
- [11] 方丽,任海英,茹水江,等. 根癌农杆菌介导的甜瓜遗传转化[J]. 浙江农业学报,2009,21(3):211-214.
- [12] Dirks R, Van B M. *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. [J]. Plant Cell Reports,1989,7:626-627.
- [13] 黄海良,赵国良,高建刚. 杂种甜瓜组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2001(6):57-59.
- [14] 师桂英,徐秉良,薛应旺. 厚皮甜瓜黄河蜜植株再生研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2006,42(5):48-51.
- [15] 陶兴林,黄永红,陆璐,等. 2个甜瓜品种高效再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2005,25(4):806-811.
- [16] 夏海武,马秀兰,万永霞. 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.

Establishment of Regeneration System for *Cucumis melo* L. cv. ‘Queen’ of Xinjiang Melon

ZHANG Tie-gang, NING Xue-fei, WANG Xian-lei, LI Guan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: An efficient and rapid regeneration system of thick-skinned muskmelon had been set up using cultivars ‘Queen’ cultured in the mediums with different hormone combination of 6-BA and NAA, GA₃ or only 6-BA. The results showed that the MSB medium containing 1 mg/L 6-BA was the most suitable for inducing adventitious buds with a average rate of 86%. The medium containing NAA was not favorable for the induction of adventitious bus. Adventitious buds were able to enlongate on MSB medium with 0.1 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L GA₃. Regenerated shoots were rooted on MS medium without plant grows regulators with 99% success rate.

Key words: *Cucumis melo* L. cv. ‘Queen’; cotyledonary; adventitious buds; regeneration system