

三倍体薄皮甜瓜未成熟胚子叶诱导不定芽的研究

曹 虹, 金 荣 荣

(哈尔滨市农业科学院 蔬菜花卉分院, 黑龙江 哈尔滨 150028)

摘 要:以三倍体薄皮甜瓜授粉后 30 d 未成熟胚为试材, 采用组织培养的胚培养方法, 对三倍体薄皮甜瓜芽的再生进行了研究。结果表明: 当 TDZ 浓度为 0.04 mg/L 时, 未成熟胚接种第 5 天出芽率就达到最大值, 出芽整齐一致。在 M5 激素配比组合(6-BA 1.0 mg/L, IAA 0.04 mg/L)培养基中, 平均再生芽数最高, 芽的质量最好。在 S2(6-BA 0.05 mg/L)培养基中, 芽伸长量最多, 生长状态最好。

关键词:三倍体薄皮甜瓜; 组织培养; 未成熟胚; 不定芽

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0106-04

三倍体薄皮甜瓜是哈尔滨市农业科学院蔬菜花卉分院西甜瓜研究室选育的甜瓜品种^[1], 其瓜香味浓, 糖度高, 口感甜脆, 倍受好评, 但是三倍体薄皮甜瓜因其为四倍体和二倍体杂交获得, 种胚发育不良, 多为畸形种, 导致三倍体甜瓜的出芽率很低, 严重的影响了三倍体甜瓜的大面积推广产业化发展, 因此, 三倍体薄皮甜瓜的大面积推广必须选择另外一种繁育方法, 提高它的繁殖系数, 来提高该优质品种的经济效益和社会效益。

甜瓜成熟胚来源的外植体主要有萌发幼苗的子叶块、子叶节、茎尖, 还有下胚轴等部位^[2-6], 在甜瓜再生无性繁殖中都有成功的报道。但是三倍体甜瓜由于正常发芽率极低, 大多数成熟胚发育不健全, 不能成苗, 所以, 该试验采用单倍体培养或者远缘杂交中胚不能正常萌发而采用的胚培养方法, 使未成熟胚在含有一定激素的培养基上按正常发育途径分化成苗, 然后取其子叶节进行扩繁, 以期获得大批量的健壮整齐的四倍体甜瓜苗。傅振清^[7]在 1983 年为了探索远缘杂交选育抗病哈密瓜新品种的途径, 采用了幼胚培养技术, 方智远等^[8]、盛慧^[9]、张永兵等^[10]、雷春等^[11]均运用组织培养技术进行了相应的单倍体或者远缘杂交的研究。现以三倍体薄皮甜瓜为试材, 进行不定芽诱导的研究, 以期三倍体薄皮甜瓜的扩繁奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验在哈尔滨市农业科学院蔬菜花卉研究基地大

第一作者简介:曹虹(1982-), 女, 硕士, 农艺师, 现主要从事甜瓜育种等研究工作。E-mail:45823073@qq.com.

基金项目:黑龙江省哈尔滨市青年科技基金资助项目(2012RFQYN043)。

收稿日期:2014-02-10

棚进行, 以四倍体“Sb-1”为母本, “哈甜一号”为父本杂交授粉, 在四倍体开花前 1 d 去雄套袋, 次日采取二倍体“哈甜一号”的花粉与之进行授粉, 然后套袋标注授粉日期。取得的种子即为三倍体甜瓜种子。采集授粉后 30 d 的果实内种胚进行培养。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒与处理 采集授粉后 30 d 的果实进行消毒, 首先在流水中将果实表面洗净, 在无菌操作台上用 95% 酒精反复擦洗消毒, 无菌水冲洗 3 次, 然后放在灭菌的器皿中。

1.2.2 未成熟胚直接分化成苗 用解剖刀小心取出果实中有内含物的种子, 横切两半接种到含有不同 TDZ (0.02、0.04、0.06 mg/L) 浓度的 MS 培养基中。每瓶接种 5 粒种子, 每处理接种 40 粒, 重复 3 次。切开种子的目的是为了种子内含物更好的吸收培养基中的营养, 培养温度 25℃, 暗培养 5 d 后, 统计发芽率。

1.2.3 不定芽的诱导 待子叶展开后, 切取子叶, 用刀片小心刮掉生长点后, 接种到含有不同浓度激素的 MS 培养基中(表 1), 培养基中含有 3.5% 的蔗糖, 0.85% 的琼脂, pH 5.8~6.0。每个培养瓶接种 2 个子叶块, 每个处理接种 10 个子叶块, 3 次重复。30 d 后统计不定芽的个数, 计算平均再生芽数和芽诱导率。接种后的培养瓶放到温度 25~30℃, 在光照强度 1 500 lx, 光照时间

表 1 芽诱导 MS 培养基附加不同 6-BA 和 IAA 的 10 个组合

Table 1 10 mediums add with 6-BA and IAA used to induce adventitious buds

激素	处理 Treatment									
Hormone/mg · L ⁻¹	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
6-BA	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5	2.0
IAA	0.01	0.04	0.10	0.01	0.04	0.10	0.01	0.04	0.10	0

14 h的条件下培养。

1.2.4 芽的伸长培养 将长至 0.3 cm 的丛生芽分接到含不同激素的 MS 伸长培养基中(表 2),其中含 3.5% 的蔗糖,0.85% 的琼脂,pH 5.8~6.0。15 d 后统计芽伸长情况,每个处理接种 10 个外植体,3 次重复。

表 2 芽伸长 MS 培养基附加不同 6-BA 和 IAA 的 5 个组合

Table 2 5 mediums add with 6-BA and IAA used to bud elongation

激素 Hormone/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	处理 Treatment				
	S1	S2	S3	S4	S5
6-BA	0.01	0.05	0.05	0.1	0.1
IAA	0	0	0.01	0	0.01

2 结果与分析

2.1 三倍体甜瓜组培不定芽形成的过程

三倍体甜瓜未成熟胚接种到诱导培养基上后,暗培养 3 d 后子叶明显膨大,向上拱起,呈黄绿色(图 1-A),

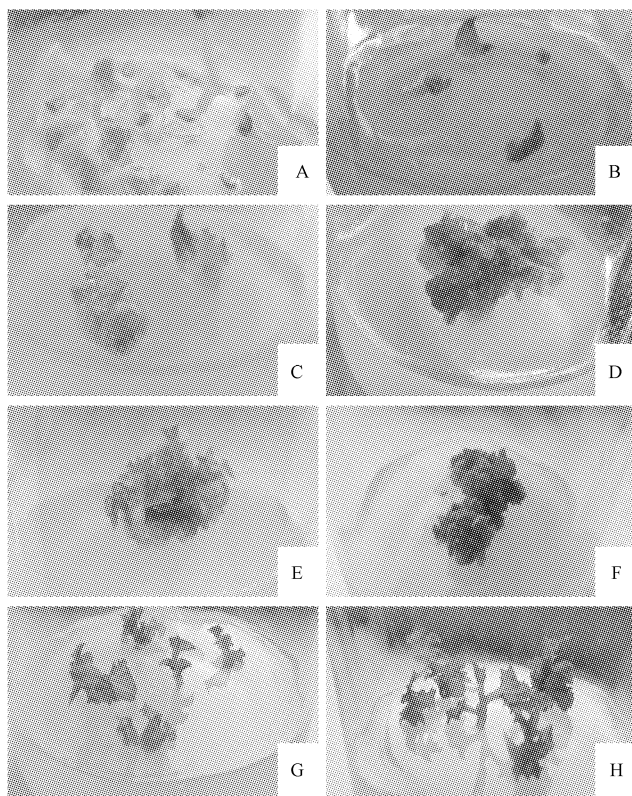


图 1 三倍体薄皮甜瓜芽分化的不同时期

注:A.未成熟胚在萌发培养基 5 d 的出芽情况;B.切取子叶节接种到芽诱导培养基上;C.子叶节明显膨大;D.子叶上出现针尖状芽点;E.芽点分化为芽丛;F.平滑的凸起停止分化的芽;G.分化的小芽转到伸长培养基中;H.伸长苗。

Fig.1 Different periods of triploid muskmelon bud differentiation

Note: A. Immature embryos in the germination medium for 5 d; B. Cotyledon node inoculated into the bud induction medium; C. Cotyledon node expanding obviously; D. Appear buds like needle on the cotyledons; E. Buds differentiation of bud clump; F. Stop the differentiation buds of smooth convex; G. Differentiation of shoots transferred to elongation medium; H. Elongation of muskmelon seedlings.

7 d 后子叶展开,切取子叶节接种到芽诱导培养基上(图 1-B),10 d 后子叶靠近生长点的部位持续膨大,表面变得不平滑(图 1-C),15 d 后子叶块周围开始出现绿色的针尖状的芽点,这种芽点越来越多(图 1-D),之后芽点开始生长,有些芽点分化为芽丛,有些芽点分化为平滑的凸起后停止分化(图 1-E,F),30 d 后长出许多不定芽丛,长到 1 cm 的芽转到伸长培养基上(图 1-G),20 d 后芽伸长量平均达到 3 cm(图 1-H)。

2.2 不同 TDZ 浓度对未成熟胚直接分化成苗的影响

从表 3 可以看出,少量的 TDZ 就可以使三倍体未成熟胚正常发芽,随着 TDZ 浓度的增大,发芽率有所下降,当 TDZ 浓度为 0.04 mg/L 时,接种第 5 天出芽率就达到最大值,发芽势比较好,出芽整齐一致。子叶和下胚轴有愈伤化的趋势,子叶宽大,下胚轴粗壮(图 1-A)。75% 是成熟胚不能到达的发芽率,更是三倍体甜瓜发芽率上的一个突破。

表 3 不同 TDZ 浓度对三倍体甜瓜发芽率的影响

Table 3 Different concentrations of TDZ on germination rate of triploid muskmelon

TDZ 浓度 Concentration of TDZ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种种子数 Number of inoculation seed/个	接种 5 d 发芽数 Number of buds five days/个	接种 7 d 发芽数 Number of buds seven days/个	发芽率 Percentage of germination/%
0.02	100	42	74	74
0.04	100	75	75	75
0.06	100	65	65	65

2.3 不同 6-BA 和 IAA 配比对不定芽诱导的影响

由表 4 可以看出,随着 6-BA 浓度的增加和 IAA 浓度的变化,平均再生芽数呈先上升后下降的趋势,M5 培养基的再生芽数达到最大值。M6~M9 的芽诱导率与 M5 的芽诱导率差异不大,但是 M5 有效平均再生芽数(即 ≥ 0.5 cm 的丛生芽)高于其它培养基,可以看出随着细胞分裂素增多,外植体可以分化的芽点就越多,但是并不是每个芽都可以成为有效芽,有的芽点停止分化变成平滑凸起(图 1-F),另外 M5 的玻璃化率较低,并且随着 6-BA 浓度的增大,玻璃化率也逐渐增大。由此可知,6-BA 是诱导再生芽的主要因素,随着 6-BA 浓度的增长,产生不定芽数逐渐增加,但是要控制玻璃化的比率就必须控制 6-BA 的浓度,另外由 M1~M3、M4~M6、M7~M9 可以看出,添加一定浓度的生长素 IAA 可以促进不定芽的分化,提高平均再生芽数,因此适合的激素配比是子叶再生不定芽的必要条件,M5 培养基(6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.04 mg/L)是子叶不定芽诱导的最佳激素组合。

2.4 激素对三倍体甜瓜不定芽伸长的影响

由表 5 可知,6-BA 浓度较低时,芽伸长值较小,随着 6-BA 浓度增大,芽的伸长值增大,但是当 6-BA 浓度达到 0.1 mg/L 时,玻璃化现象就比较明显了,加入少量的生长素的培养基对苗伸长量的影响不大,但是苗的生长

表 4

不同 6-BA 和 IAA 配比对不定芽诱导的影响

Table 4

Effect of 6-BA and IAA on bud regeneration

培养基	子叶节数	≥0.5 cm 丛生芽数	平均再生芽数	有芽外植体数	芽诱导率	玻璃化苗数	玻璃化率
Medium	Number of cotyledon node	Number of shoots	Average number of buds	Numbers of shoot explants	Bud induction rate/%	Number of vitrification	Vitrification rate/%
M1	28	23	0.8	12	43	0	0
M2	30	40	1.3	16	53	1	2.5
M3	26	19	0.8	9	35	1	5.2
M4	30	41	1.4	20	67	3	7.3
M5	30	73	2.4	24	80	4	5.4
M6	30	55	1.8	23	76	6	10.9
M7	30	58	1.9	23	77	7	12
M8	28	60	2.1	22	78	12	20
M9	30	65	2.2	25	83	15	23
M10	30	22	0.7	10	33	15	68

表 5 不同 6-BA 和 IAA 组合对不定芽伸长的影响

Table 5 Effect of 6-BA and IAA on bud elongation

培养基编号	芽平均伸长值	苗的生长状况
Culture medium number	Average of elongation of shoots/cm	Growing status
S1	1.9	生长矮小,叶片小
S2	2.8	生长快,叶片大而平展
S3	2.9	生长快,节间长,叶片小
S4	2.7	生长较快,节间长,叶片小,玻璃化苗
S5	2.6	生长较快,叶片小,玻璃化苗比例高

状态没有 S2 培养基的好,因此 S2 培养基,即 6-BA 为 0.05 mg/L 为最佳伸长培养基浓度。

3 讨论

由于三倍体种子发芽率极低,该试验首次采用未成熟胚诱导三倍体甜瓜形成不定芽,但是由于其取材受到严格的生长季节限制,只能在特定的时间段取胚,不能应用于实际生产中。因此还要继续进行三倍体成熟胚萌发的研究,以便于随取随用,为生产服务。由于薄皮甜瓜的根系再生能力弱,组培生根也不太容易,苗不容易成活,因此后续将研究伸长苗的嫁接技术,以此获得再生苗。三倍体甜瓜未成熟胚虽然可以诱导出不定芽,再生成苗,但是如果投入生产,应该继续进行倍性鉴定和成苗的移栽成活率,生长状况,产量及果实品质的研究。

玻璃化仍旧是组培再生苗面临的严重问题,如加入激素浓度过高,瓶内空气湿度大,都会导致玻璃化。Ziv 等^[12]、邓向东等^[6]和夏海武等^[13]均指出提高蔗糖浓度可以减少试管苗的玻璃化程度。提高蔗糖浓度和琼脂的硬度,使培养基的衬质势降低,造成细胞吸水阻遏,植物组织吸水少,也能控制玻璃化程度。该试验在诱导不定芽的时候培养基采用 3.5% 的蔗糖,0.85% 的琼脂^[14],虽然可以减少玻璃化出现的几率,但是仍旧出现玻璃化现象,也需要进一步研究如何消除玻璃化苗。

另外该试验发现培养基在高压锅里灭完菌后要及时取出,以免里面的压力和热量影响琼脂的 pH 值得变化,进而影响琼脂凝固。

在不定芽诱导中 6-BA 最适浓度为 0.05 mg/L,与夏

海武等^[13]、陶兴林等^[15]、冯凤娟等^[16]、潘俊松等^[17]研究中 6-BA 所用的浓度相差不大,而与孙天国等^[18] 6-BA 4.0 mg/L 最有利于子叶外植体的分化生芽的结论相差很多,这可能与所用试验材料的基因型不同有很大的关系。

参考文献

- [1] 金荣荣,陈柏杰,汪磊,等.三倍体薄皮甜瓜新品种哈甜 3 号的选育[J].中国蔬菜,2011(10):95-97.
- [2] Niedz R P, Schiller S S, Dunbar K B, et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 18(3): 313-319.
- [3] Kathal R, Bhatnagar S P, Bhojwani S S. Plant re-generation from the callus derived from root ex-plants of *Cucumis melo* L. cv Pusa Sharbati [J]. Plant Science (Limerick), 1994, 96(1-2): 137-142.
- [4] Tabei Y, Nishio T, Kanno T. Shoot regeneration from cotyledonary protoplasts of melon (*Cucumis melo* L. cv Charentais) [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1992, 61(2): 317-322.
- [5] Leshem B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cultured melon cotyledon [J]. Journal of Plant Physiology, 1989, 135(2): 237-239.
- [6] 邓向东,耿玉轩,路子显,等.外植体和培养基因子对哈密瓜不定芽诱导的影响[J].园艺学报,1996(1):57-61.
- [7] 傅振清.哈密瓜幼胚离体培养初报[J].新疆农业科学,1985(3):27-28.
- [8] 方智远,孙培田,刘玉梅.萝卜与甘蓝远缘杂交研究初报[J].园艺学报,1983,10(3):187-191.
- [9] 盛慧.黄瓜单倍体培育及其发育相关基因筛选[D].哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [10] 张永兵,陈劲枫,尹鸿平,等.辐射花粉授粉诱导甜瓜单倍体[J].果树学报,2006,23(6):892-895.
- [11] 雷春,陈劲枫,钱春桃,等.辐射花粉授粉和胚培养诱导产生黄瓜单倍体植株[J].西北植物学报,2004,24(9):1739-1743.
- [12] Ziv M, Meir G, Halevy, A. H. Factors influencing the Production of ardened glaucous camation plantlets *in vitro* [J]. Plant Cell Tissue organ Culture, 1983(2): 55-65.
- [13] 夏海武,吕柳新,夏天,等.弥河银瓜高效植株再生体系的建立[J].植物生理学通讯,2006,42(2):235-238.
- [14] 杨丽琴,李瑞,王俊,等.植物组织培养的三大难题[J].北方园艺,2008(4):104-107.
- [15] 陶兴林,黄永红,陆璐,等.两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.

黄金梨“铁头病”果肉组织切片观察

马春晖, 李鼎立, 王 然

(青岛农业大学 园林园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘 要:以黄金梨为试材,采用显微切片染色技术,对黄金梨“铁头病”发病部位果肉组织成果胶、纤维素、胼胝质、淀粉等物质进行了切片染色观察。结果表明:与正常果相比较,发病果实果肉石细胞密度大、体积大,纤维含量高,而胼胝质无明显差异;淀粉粒增大,果胶含量高,在靠近果皮部形成团块状物质。试验表明,黄金梨“铁头病”的发生与果肉中石细胞大小、果胶含量和纤维素等物质变化相关,纤维素和果胶增多可能是引起果肉硬化的原因之一。

关键词:黄金梨;铁头病;果肉组织;显微观察

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0109-05

黄金梨是我国近年来引进的梨优良新品种之一,由于其外观好、品质优,备受栽培者的欢迎,发展十分迅速,已成为我国梨的主栽品种之一^[1-2]。但随着树龄和产量的增加,在黄金梨果实上出现果肉硬化症状,生产上也叫“铁头病”或“黄头病”,是近年来在黄金梨上发生的一种新的果实生理性病害,危害十分严重,部分产区果实受害率达60%左右,给梨树生产带来惨重的损失,生产上亟须解决该病害问题。因此,及时开展黄金梨“铁头病”方面的研究,有着重要的现实生产意义。

黄金梨“铁头病”主要症状为果实近成熟时果顶部果肉出现硬化现象,严重时硬化部位达赤道部附近,果皮表面粗糙不平,果顶部突出,果实表面呈浅绿色至红褐色,肉质坚硬,口感差,储藏性和商品性低下。该病是新出现的梨果实生理性病害,相关研究较少,但从发病症状来看类似于西洋梨‘Hard-end’和日本梨‘石梨症’^[3-4]。该生理性病害发病机制较为复杂,主要与砧木、土壤理化性质、肥水管理、树体养分供给等相关^[5-6]。目前,一些研究认为,果肉硬化可能与细胞壁强度有关,如果实在初期膨大和后期增大过程中细胞壁间果胶的积累,果实成熟密切相关的淀粉类和多糖类物质的分解也会影响果实硬度^[7-8]。另外,纤维素与组织的木质化相关联,胼胝质会蓄积在细胞壁中,引起细胞壁加厚和强度增加^[9-13]。因此,了解果实自身发育过程中的内部

第一作者简介:马春晖(1966-),男,博士,副教授,现主要从事果树栽培生理等研究工作。E-mail:machunhui2000@163.com.

基金项目:国家现代农业(梨)产业技术体系建设资助项目(Nycyt-29-06);国家科技支撑计划资助项目(2013BAD02B00)。

收稿日期:2014-03-19

[16] 冯凤娟,梁东,马锋旺,等.甜瓜叶片高效再生体系的建立[J].西北农业学报,2008,7(5):321-324.

[17] 潘俊松,蔡润,刘晓,等.甜瓜子叶节培养高效再生体系建立[J].上海

交通大学学报(农业科学版),2003,21(4):295-298.

[18] 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.

Study on Adventitious Bud From Immature Embryo Cotyledon of Triploid Muskmelon

CAO Hong, JIN Rong-rong

(Institute of Vegetable and Flower, Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150028)

Abstract: Taking immature embryos of the triploid muskmelon which grew 30 days after pollination as material, using tissue culture of embryo culture, the regeneration buds of triploid muskmelon were studied. The results showed that in the budding induced immature embryo, the highest seedling rate was obtained on MS medium containing TDZ 0.04 mg/L after five days. The highest frequency shoot regeneration was obtained on MS medium containing 6-BA 1.0 mg/L, IAA 0.04 mg/L. The quality of buds was the best, the adventitious shoots transferred into MS medium containing 6-BA 0.05 mg/L, the buds elongated more and grew best.

Key words: triploid muskmelon; tissue culture; immature embryo; adventitious bud