

甜瓜“黄旦子”再生体系的建立

田芳, 姚兆群, 陈美秀, 许瑛, 赵思峰

(石河子大学农学院, 绿洲农作物病害治理与植保资源利用自治区高校重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要:以甜瓜品种“黄旦子”的子叶为试材, 采用组织培养的方法, 研究了子叶日龄、不同浓度 6-BA、IAA 和头孢霉素对不定芽的影响。结果表明: 子叶日龄对其不定芽的诱导具有较大影响, 最佳诱导时间为子叶光照下培养 2 d, 不定芽诱导率达 80%; MS+6-BA 1.2 mg · L⁻¹ 为最佳诱导培养基, 诱导率达 67%。此外, 500 mg · L⁻¹ 头孢霉素可作为脱菌和抑菌过程的最佳浓度, 最佳卡那霉素浓度为 25 mg · L⁻¹。

关键词:甜瓜; “黄旦子”; 组织培养; 不定芽; 再生体系

中图分类号:S 652.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0085-04

甜瓜(*Cucumis melon* L.) 属葫芦科(Cucurbitaceae) 甜瓜属, 其果实营养丰富, 甘甜美爽, 风味独特, 是世界公认的十大健康水果之一^[1]。近年来甜瓜种植在我国发展迅速, 中国的甜瓜产量已接近世界产量的 50%^[2-3]。然而甜瓜种植过程中易受到病毒^[4]、寄生性种子植物^[5] 以及菌物病害^[6] 感染, 尤其是病毒病感染甜瓜后常造成巨大的经济损失^[4]。随着植物生物技术的迅速发展, 运用生物技术手段提高甜瓜产量、品质、抗病性以及获得脱毒种子已成为甜瓜遗传育种研究的新热点^[7]。目前甜瓜已通过真叶、子叶、下胚轴等多种外植体再生完整植株, 有的还建立了高效的离体培养再生体系^[8]。但由于不同甜瓜品种依基因型而再生潜力存在明显差异, 更换品种后存在不定芽发生及再生频率低、重复性较差等问题^[9]。该试验以甜瓜品种“黄旦子”为研究对象, 旨在研究建立该品种的高效再生体系, 为进一步通过转化培育优良的甜瓜品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试甜瓜“黄旦子”种子由新疆昌吉市新科种子有限责任公司生产, 购买于石河子市种子市场。

第一作者简介:田芳(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: 1372059240@qq.com.

责任作者:赵思峰(1975-), 男, 博士, 教授, 现主要从事植物病害生物防治教学与科研等工作。E-mail: Zhsf_agr@shzu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460467)。

收稿日期:2017-02-03

植物生长调节剂吲哚乙酸(IAA)和 6-苄基嘌呤(6-BA)预先配成 1 mg · mL⁻¹ 的母液, -20 °C 保存。抗生素卡那霉素(kanamycin, kan)和头孢霉素(cefotaxime sodium salt, cef)预先配成 100 mg · mL⁻¹ 的母液, -20 °C 保存, 激素及抗生素均购自 Sigma 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。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的培养 挑选成熟饱满的甜瓜种子去除外壳后, 在无菌条件下首先用 70% 乙醇消毒 1 min, 再用 0.1% 升汞消毒 8 min, 用无菌水冲洗 3~5 次后用无菌滤纸吸掉多余水分, 接种于 MS 基本培养基(蔗糖 30 g · L⁻¹, 琼脂粉 8 g · L⁻¹, pH 6.0)上, 放置于温度为(28±2)°C 条件下培养。先在黑暗条件下培养 2 d, 然后转至 16 h 光照/8 h 黑暗交替培养。

1.2.2 外植体子叶的日龄 取不同日龄(转至光照培养后 2、4、6、8、10 d)无菌苗的子叶, 在无菌条件下切取子叶块, 切时尽量保留子叶基部, 将 10 片子叶表皮向上放置于芽诱导培养基上, 28 d 后观察不定芽诱导情况并统计结果。每处理 3 次重复。

1.2.3 激素浓度的配比 为了比较不同激素种类及不同浓度配比对不定芽诱导的效果, 分别将 1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹ 浓度的 6-BA 与 0.1、0.5、1.0 mg · L⁻¹ 浓度的 IAA 进行组合加入 MS 基本培养基中作为诱导培养基, 将子叶块分别接种于各不定芽诱导培养基上, 观察统计不同培养基上的不定芽诱导率。根据上一步不定芽诱导率结果, 设计 1.0、1.2、1.3、1.5 mg · L⁻¹ 4 个浓度梯度的 6-BA 与 0.5 mg · L⁻¹ 浓度的 IAA 进行组合配制不定芽诱导

培养基,对 6-BA 的浓度进一步进行优化,方法同上。每处理 3 次重复。

1.2.4 抗生素的种类及浓度 因采用农杆菌介导法将相关功能基因转入外植体时,通常需采用卡那霉素及头孢霉素对农杆菌进行灭活,为了评价不同浓度抗生素对不定芽诱导的影响,分别配制 25、50、75、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度卡那霉素和 100、200、300、400、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度头孢霉素加入优化后的不定芽诱导培养基上,以不加抗生素的诱导培养基作为对照,每处理 3 次重复,测定不同抗生素种类、浓度对子叶分化的影响。

2 结果与分析

2.1 不同日龄子叶对不定芽诱导率的影响

从图 1 可以看出,不同日龄的子叶对不定芽诱导率有明显的影响,其中 2~8 d 的子叶基部均能诱导出不定芽,其中 2 d 的子叶诱导率最高,达到了 80%,而随着日龄的增加,诱导率逐渐降低,第 10 天时的子叶则完全不能诱导产生不定芽,因此确定 2 d 龄时由黄变绿的子叶为最佳外植体。

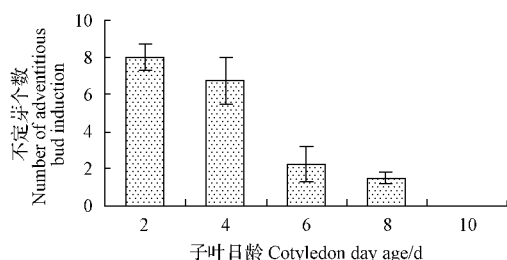


图 1 不同苗龄子叶对不定芽诱导率的影响

Fig. 1 Effect of different day age of cotyledon on adventitious bud induction rate

2.2 不同激素浓度对比对不定芽诱导率的影响

不同浓度的 IAA 和 6-BA 加入到诱导培养基中后,对不定芽分化和愈伤组织的形成均有影响(表 1),其中 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 6-BA 与 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 IAA 组合时,再生频率可以达到 65%,而当 IAA 浓度增加到 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导频率下降为 50%,因此确定以 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 IAA 为基础,对 6-BA 浓度进一步优化。

适量的激素 6-BA 对不定芽分化是必需的(图 2),当培养基中不添加 6-BA 时,诱导不出来不定芽,但在不含 6-BA 激素的 MS 培养基中外植体基部产生许多不定根(图 3A),有少量愈伤但无芽丛的分化。当 6-BA 浓度在 1.0~1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可获得较高的芽诱导率,在浓度为 1.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导率最高可达到 67%(图 3B),且将不定芽置于生根培养基中后,可以成功获得生根植株(图 3C、D)。

表 1 不同激素浓度对比对不定芽诱导率的影响

Table 1 Effect of different ratio of hormone concentration on adventitious bud induction rate

激素浓度 Hormone concentration/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		不定芽再生频率 Adventitious bud regeneration frequency/%
6-BA	IAA	
0.1	0.1	20
0.1	0.5	35
0.1	1.0	10
0.5	0.1	45
0.5	0.5	60
0.5	1.0	45
1.0	0.1	65
1.0	0.5	65
1.0	1.0	50

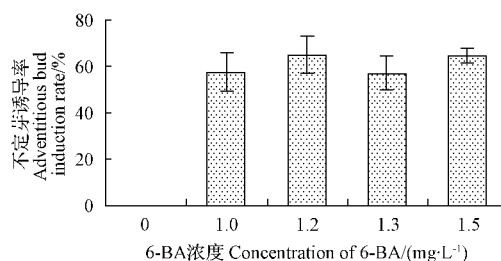
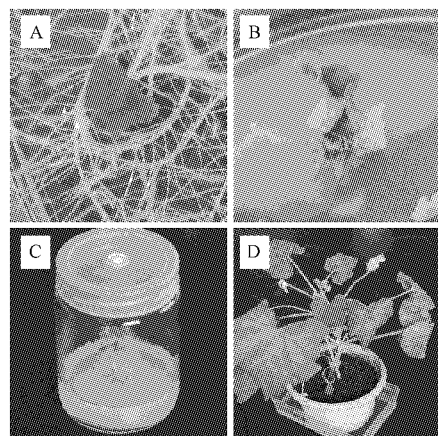


图 2 不同浓度 6-BA 对不定芽诱导率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of 6-BA on adventitious bud induction rate



注:A. 子叶培养与未加激素 MS 培养基;B. 诱导产生的不定芽;C. 不定芽置于生根培养基;D. 移栽后植株。

Note: A. Cotyledon culture and MS medium without hormone; B. Induced adventitious bud; C. Adventitious bud rooting medium; D. After transplanting plant.

图 3 甜瓜再生体系过程

Fig. 3 Melon regeneration system process

2.3 抗生素敏感性测验

从图 4 可以看出,不同浓度头孢霉素对“黄旦

子”不定芽的诱导率有一定影响,200 mg · L⁻¹和400 mg · L⁻¹时,不定芽诱导率最高,但抑菌效果不理想。500 mg · L⁻¹时的不定芽诱导率虽稍低,但可达到完全抑菌,已有文献报道头孢霉素浓度为500 mg · L⁻¹时对农杆菌生长抑制效果较好^[10],因此可将头孢霉素500 mg · L⁻¹为最佳浓度用于农杆菌侵染后的脱菌和抑菌过程。

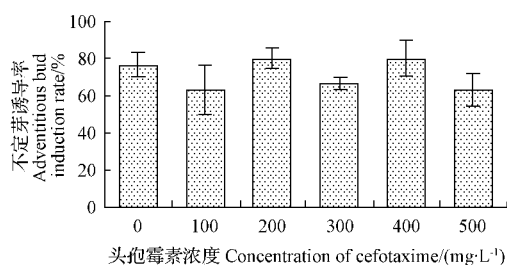


图4 头孢霉素对不定芽诱导率的影响

Fig. 4 Effect of cefotaxime on adventitious bud induction rate

图5表明,不定芽对卡那霉素比较敏感,浓度为25 mg · L⁻¹培养基上,诱导率就由原来的76.0%下降至29.0%,且各浓度的卡那霉素均对子叶块外植体有一定毒害作用,浓度越高毒害作用越强烈,当浓度达到100 mg · L⁻¹时,子叶不能诱导产生不定芽,外植体边缘易褐化或呈水浸状,以后逐渐死亡。

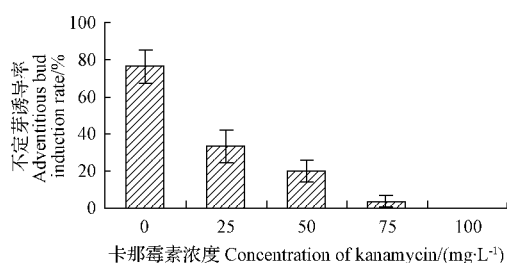


图5 卡那霉素对不定芽诱导率的影响

Fig. 5 Effect of kanamycin on adventitious bud induction rate

3 结论与讨论

该研究通过对甜瓜品种“黄旦子”再生体系进行优化,再生频率可以达到76%,远超过陆璐等^[11]44.8%的平均再生频率。通过研究发现外植体苗龄

对甜瓜品种“黄旦子”不定芽诱导有较大影响,在子叶日龄为2 d时,即甜瓜子叶颜色由淡黄色转为淡绿色时分化率最高,易于获得成功,这与肖守华等^[12]研究结果一致。激素6-BA是诱导甜瓜外植体分化的关键,附加浓度的IAA对分化产生影响较小。单独添加1.2~1.5 mg · L⁻¹浓度的6-BA时,不定芽诱导率最高,但由于高浓度的6-BA诱导产生的不定芽会使染色体加倍^[13],因此推荐1.2 mg · L⁻¹的6-BA为最佳诱导浓度。该研究中还对农杆菌介导转基因方法中常用的2种抗生素头孢霉素和卡那霉素的最适浓度进行了筛选,为基因工程改良甜瓜品种提供了进一步的技术支持。

参考文献

- [1] 陈波浪,吴海华,曹公利,等.不同肥力水平下立架栽培甜瓜干物质累计和氮、磷、钾养分吸收特性[J].植物营养与肥料学报,2013,19(1):142-149.
- [2] 宋海斌,崔喜波,马鸿艳,等.基于SSR标记的甜瓜品种(系)DNA指纹图谱库的构建[J].中国农业科学,2012,45(13):2676-2689.
- [3] 王志丹,赵姜,毛世平,等.中国甜瓜产业区域优势布局研究[J].中国农业资源与区划,2014,35(1):128-133.
- [4] 李继洋,杨渡,韩盛,等.基于多重RT-PCR技术检测新疆甜瓜主栽区3种病毒病及其分布[J].西北农业学报,2015,24(8):123-130.
- [5] 张学坤,姚兆群,赵思峰,等.分枝(瓜)列当在分布、危害及其风险评估[J].植物检疫,2012,26(6):31-33.
- [6] 张龔,王宣仓,李麻华,等.新疆甜瓜地方品种资源蔓枯病抗性鉴定[J].新疆农业科学,2011,48(10):1841-1845.
- [7] 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.
- [8] 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,2008,17(5):321-324.
- [9] 孔维萍,程鸿.薄皮甜瓜高效再生体系的建立[J].北方园艺,2012(2):132-133.
- [10] 杨兰,张宝燕.不同的抗生素对农杆菌EHA105(codA)和农杆菌EHA105(betA)的抑制作用[J].山东林业科技,2011(2):9-13.
- [11] 陆璐,赵长增,陆婷.甜瓜‘黄旦子’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.
- [12] 肖守华,赵善仓,王崇启,等.厚皮甜瓜高效再生体系的建立[J].山东农业科学,2007(4):35-39.
- [13] REN Y, BANG H, GOULD J, et al. Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus)[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2013, 49(2): 223-229.

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

TIAN Fang, YAO Zhaoqun, CHEN Meixiu, XU Ying, ZHAO Sifeng

(College of Agriculture, Shihezi University/Key Laboratory at the Universities of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resource Utilization, Shihezi, Xinjiang 832003)

DOI:10.11937/bfyy.201709019

“嘎拉”苹果叶片愈伤组织的诱导

高 兵^{1,2}, 孙 俊^{1,3}

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 山西林业职业技术学院 园艺系, 山西 太原 030009;

3. 安徽农业大学 园艺学院, 安徽 合肥 230036)

摘 要:以“嘎拉”苹果单芽系组培苗叶片为外植体诱导愈伤组织,研究了愈伤组织诱导过程中植物生长调节剂种类及浓度配比、光照和黑暗条件以及继代天数对其形成及生长的影响。结果表明:各组合均能比较高效地诱导愈伤组织的形成,以 MS+蔗糖 30 g·L⁻¹+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+BA 2.0 mg·L⁻¹诱导效率最佳;愈伤组织的形成需要14~21 d的暗培养,继代周期以15~30 d为宜。

关键词:苹果;叶片;愈伤组织;生长调节剂;暗培养;继代周期

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0088-05

苹果(*Malus pumila* Mill.)属蔷薇科苹果属植物,作为当今世界栽培最广泛的落叶果树^[1],苹果在国内外无论栽培面积和产量都位居水果前列,中国已经成为世界最大的苹果生产国,其生产正朝着基地化、良种化、优质化的方向发展,但也存在许多亟待解决的问题,这些问题需要通过生产管理、更多是依靠培育新品种来解决^[2]。当前,苹果组培快繁和原生质培养的报道较多^[3-7],其分子机理方面的研究,愈伤组织是常用的试验材料,同时也是基因工程中进行基因转化必需的试验材料^[8-10]。因此,研究不同品种苹果愈伤组织的诱导培养,对于利用愈伤组织研究苹果遗传转化奠定基础,也为进一步研究苹果组培快繁、种质保存和品质改良提供参考和实践基础。

第一作者简介:高兵(1979-),女,山西太原人,硕士,讲师,现主要从事园艺教学等工作。E-mail:754025816@qq.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200190)。

收稿日期:2017-02-07

愈伤组织的形成过程受植物基因型、外植体类型及理化状态、培养基成分、光照条件、糖源浓度等诸因素互动作用的影响^[11]。其中,生长调节物质的种类、含量及组成比例是调控植物器官产生愈伤组织的主导因素。该试验以“嘎拉”苹果单芽系组培苗叶片为外植体诱导愈伤组织,对影响愈伤组织诱导的因素进行了探讨,以期可以根据需要培育目的愈伤组织。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料均选取“嘎拉”苹果单芽系组培苗的叶片,且叶片生长势好,大而舒展、翠绿。

供试培养基及试剂:以 MS 作为基本培养基,琼脂 6.5 g·L⁻¹,pH 5.8~6.0,附加不同浓度的蔗糖和植物生长调节剂 BA、NAA、2,4-D。

培养室条件:培养室温度(25±1)℃;光照强度 2 000 lx;光照时间 12 h 光/12 h 暗。

Abstract: *Cucumis melon* L. cv. 'Huangdanzi' cotyledon were used as test materials, using the method of tissue culture, effects of the cotyledon day age, different concentrations of 6-BA, IAA and cefotaxime on adventitious buds were studies. The results showed that the cotyledon age played an important role in inducing adventitious buds, the optimal induction time was two days after cotyledon cultured under light, the regeneration rate was 80%. In addition, MS+6-BA 1.2 mg·L⁻¹ was the best induction medium, the regeneration rate was 67%. Furthermore, 500 mg·L⁻¹ cefotaxime was the best concentration that could be used to eradicate agrobacterium, 25 mg·L⁻¹ kanamycin was the best screening concentration.

Keywords: melon; 'Huangdanzi'; tissue culture; adventitious buds; regeneration system