

# 无籽西瓜“蜜童”子叶再生体系的建立

张 娜<sup>1,2</sup>, 彭定祥<sup>2</sup>, 孙玉宏<sup>1</sup>, 曾红霞<sup>1</sup>, 施先锋<sup>1</sup>, 任 俭<sup>1</sup>

(1. 武汉市农业科学研究所, 湖北 武汉 430345; 2. 华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:**以无籽西瓜“蜜童”无菌苗子叶为外植体,建立了高效的组培再生体系。结果表明:不定芽诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,诱导率达 88.33%,最佳伸长培养基为 MS+0.2 mg/L 6-BA,最佳生根培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IBA,生根率达 90%。

**关键词:**无籽西瓜;子叶;再生体系

**中图分类号:**S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0100-03

“蜜童”西瓜是先正达公司的优质礼品西瓜品种,因高产、抗病、耐贮运、商品性好等优点受到生产者和消费者的广泛青睐<sup>[1]</sup>。但因其种子价格较高,加之对生产者的育苗技术也有较高要求<sup>[2]</sup>,影响了在生产上的广泛应用。现以“蜜童”西瓜子叶为外植体,建立其组培再生体系,以期在保证品种纯度基础上,在较短时间内获得大量健壮整齐的无籽西瓜瓶苗,为其种苗工厂化、规模化生产提供技术支持,同时为其遗传转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

“蜜童”西瓜种子购自先正达公司。基本培养基 MS、1/2MS,植物生长调节物质 6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、激动素(KT)均购自武汉友援生物公司。

**第一作者简介:**张娜(1980-),女,在读博士,农艺师,研究方向为西瓜栽培与育种。E-mail:zn800329@163.com.

**责任作者:**彭定祥(1957-),男,硕士,教授,博士生导师,研究方向为苤蓝栽培与育种。E-mail:pdxiang@mail.hzau.edu.cn.

**基金项目:**武汉市科技攻关资助项目(201021112428-9);武汉市农业科学技术研究院创新资助项目。

**收稿日期:**2012-06-11

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的获得** 将无籽西瓜“蜜童”种子去壳后,在 10%的次氯酸钠溶液中浸泡 5 min,用无菌水彻底清洗干净,而后以无菌滤纸吸干种子表面水分,接种于 MS 培养基,蔗糖 30.0 g/L,琼脂粉 8.0 g/L,pH 5.8,置于温度 26℃,光照强度 2 500~3 000 lx、16 h/8h(光照/黑暗)光周期条件下培养。

**1.2.2 不定芽的诱导与增殖** 种子培养 7 d 左右,子叶转绿时切取子叶近轴端<sup>[3]</sup>,接种于不同培养基(表 1)。每处理接种 20 个外植体,3 次重复,进行不定芽诱导培养,培养条件同上。30 d 后观察不定芽的诱导情况,计算诱导率。不定芽诱导率=产生不定芽的外植体数/接种外植体总数×100%,将芽丛继代于相同培养基上增殖,继续培养 25 d 左右,观察增殖情况,计算增殖系数。增殖系数=全部外植体总芽数/接种外植体总数,培养条件同上。

**1.2.3 伸长培养** 增殖培养一段时间后,将长度 1 cm 及以上,有明显顶芽的幼芽轻轻剥离芽丛,接种于伸长培养基(表 2),150 mL 三角瓶每瓶接种 6 株,21 d 后统计伸长情况,培养条件同上。

**1.2.4 生根培养** 植株长至 3.5 cm 左右时接种于生根

## *In vitro* Rapid Propagation of *Rhododendron dauricum* Leaf

ZHOU Jin-mei, YE Fei, JIAN De-feng

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

**Abstract:** Taking the leaves as material, the rapid propagation culture *in vitro* of *Rhododendron dauricum* were studied. The results showed that the best callus induction medium was 1/4Anderson+2,4-D 1 mg/L+TDZ 0.1 mg/L; the best bud induction medium was 1/4Anderson+IBA 0.1 mg/L+TDZ 1 mg/L+2-IP 0.5 mg/L; the best rooting culture medium was 1/4Anderson+IBA 2 mg/L or the medium of 1/4Anderson+NAA 0.1 mg/L.

**Key words:** *Rhododendron dauricum* L.; leaf; medium; culture *in vitro*

培养基(表 3),150 mL 三角瓶每瓶接种 2 株,进行生根培养,观察生根情况,培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对“蜜童”西瓜外植体芽诱导的影响

由表 1、图 1A 可知,含有不同浓度 6-BA 的培养基均可产生不定芽,1.0 mg/L 浓度的培养基  $Y_a$  和  $Y_b$  较  $Y_c$  和  $Y_d$  无论对不定芽诱导还是继代增殖的效果均更为明显。原因可能是  $Y_c$  中较高含量的 NAA,有利于愈伤组织的产生而抑制了不定芽的分化, $Y_d$  中因 6-BA 含量较高,不定芽过多且短小细弱,不易自芽丛分离,外植体也出现褐化现象,影响了不定芽的质量。试验发现,虽然  $Y_a$  的不定芽诱导率可高达 93.33%,但经继代出现玻璃化和叶片畸形现象及叶状芽,与  $Y_a$  相比, $Y_b$  诱导获得的不定芽生长状况更好。因而, $Y_b$  为“蜜童”西瓜子叶不定芽诱导的最佳培养基。

2.2 不同培养基对“蜜童”西瓜不定芽伸长的影响

伸长培养阶段是使不定芽健壮整齐长高的过程,伸长后试管苗的质量关系到后续生根情况。参考相关研究<sup>[4-5,7]</sup>,筛选出 2 组培养基进行伸长培养试验,二者对“蜜童”西瓜不定芽伸长的影响见表 2。由表 2、图 1B 可知,经  $S_a$  伸长培养基培养,不定芽在 3 周时间内可伸长

4 cm 左右,且生长情况正常, $S_b$  却使不定芽的叶片优先生长,主茎伸长缓慢,而且叶片叶尖出现黄化。由此可见,0.2 mg/L 6-BA 可使“蜜童”西瓜不定芽正常伸长,而 0.2 mg/L KT 则不适合作为其伸长培养基。

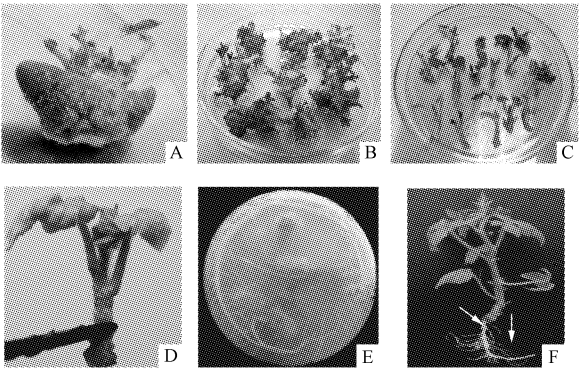


图 1 “蜜童”西瓜子叶再生体系不同培养阶段

A:子叶诱导不定芽;B:增殖培养;C:用于伸长培养的芽;D:伸长培养后用于生根的再生植株;E:生根培养;F:再生苗自培养基取出后根发生断裂。

Fig.1 Different stages of ‘Mitong’ cotyledon regeneration system

Note: A: Adventitious shoots induction from cotyledon; B: Adventitious shoots proliferation culture; C: Shoots for elongation culture; D: Plantlets for rooting; E: Rooting culture; F: Roots fractured when being removed from medium.

表 1 不同培养基对“蜜童”西瓜子叶芽诱导的影响

Table 1 Effects of different medium on adventitious shoots induction of ‘Mitong’ cotyledon

培养基 Medium	接种外植体数 No. of explants /个	产生不定芽的外植体数 No. of explants having adventitious shoots/个	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious shoots/%	不定芽生长情况 Growth of adventitious shoots	平均增殖系数 The average K-factor
$Y_a$ :MS+6-BA 1.0 mg/L	60	56	93.33	芽长 0.8 cm,出现玻璃化现象和肥大叶片,停留在叶状体状态,顶芽不明显	7.54
$Y_b$ :MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	60	53	88.33	芽长 1.0 cm,正常,出现明显顶芽	7.11
$Y_c$ :MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L	60	27	45.00	芽长 0.4 cm,未诱导出芽的外植体褐化或表面白色愈伤	3.26
$Y_d$ :MS+6-BA 3.0 mg/L	60	34	56.67	芽长 0.4 cm,丛生芽过多、细弱,叶色发白,外植体与培养基接触面有褐化现象	9.50

表 2 不同培养基对“蜜童”西瓜不定芽伸长的影响

Table 2 Effects of different medium on elongation culture of ‘Mitong’ cotyledon

培养基 Medium	芽数 No. of shoots/个	培养 21 d 后平均株高 The plants' mean height after 21 days culture/cm	再生植株生长情况 Growth conditions of regeneration plants
$S_a$ :MS+6-BA 0.2 mg/L	60	4.50	顶芽明显,主茎伸长,生长健壮,叶色正常
$S_b$ :MS+KT 0.2 mg/L	60	3.60	顶芽生长缓慢,叶柄过长,叶片过大,高于顶芽,主茎伸长缓慢,新生叶叶尖发黄

2.3 不同培养基对“蜜童”西瓜试管苗生根的影响

由表 3 可知,生长调剂 NAA 和 IBA 对“蜜童”子叶诱导试管苗生根均比较有效。NAA 和 IBA 浓度在 0.1~0.5 mg/L 范围内,生根率随浓度升高而升高(最高可达 90.00%,图 1E)。生根所需天数相应缩短,平均生根数和平均根长也随之升高,这与郑先波等<sup>[8]</sup>的研究结果相似。

而相同浓度的 IBA 和 NAA 比较,IBA 在各项考察指标上表现都稍优于 NAA,且根色白、生长旺盛,须根较多。观察发现,添加 NAA 的培养基不同程度地出现愈伤组织,与阎志红等<sup>[9]</sup>研究结果相似。因此,实际生产中, $SG_e$  可作为“蜜童”西瓜试管苗生根的理想培养基。

表 3

不同培养基对“蜜童”西瓜试管苗生根的影响

Table 3

Effects of different mediums on root culture of 'Mitong' cotyledon

培养基 Medium	接种苗数 No. of plantlets/株	生根苗数 No. of rooting plantlets/株	生根时间 Root induction period/d	生根率 Rooting rate/%	平均生根数 Root number/条	培养 21 d 后平均根长 Average root length after 21 days/cm
SG <sub>a</sub> :1/2MS+NAA 0.1 mg/L	30	19	14	63.33	3.36	6.20
SG <sub>b</sub> :1/2MS+NAA 0.2 mg/L	30	21	12	70.00	4.08	7.56
SG <sub>c</sub> :1/2MS+NAA 0.5mg/L	30	26	11	86.67	5.50	10.07
SG <sub>d</sub> :1/2MS+IBA 0.2 mg/L	30	22	11	73.33	4.50	8.43
SG <sub>e</sub> :1/2MS+IBA 0.5 mg/L	30	27	10	90.00	5.56	11.12

## 3 讨论

在无茵苗获得过程中,省略了传统方法 75%酒精表面灭菌的环节,在保证灭菌效果的基础上简化了种子灭菌操作步骤,降低了外界环境对裸露种子可能造成的伤害。适宜的外植体是影响再生体系的关键因素之一,试验发现,“蜜童”西瓜种子灭菌后培养 6~7 d,子叶刚刚转绿时进行接种最利于不定芽的分化,应对发芽培养的种子进行实时观察,而不能单以苗龄为标准。6-BA 是葫芦科植物组织培养诱导不定芽分化的关键激素<sup>[10]</sup>。较高浓度的 6-BA 虽然能提高不定芽的诱导和增殖,但同时也会引起玻璃化苗和畸形苗的产生,这与郑先波等<sup>[8]</sup>、张爱加等<sup>[11]</sup>研究结果一致。但郑先波等<sup>[8]</sup>研究发现,无籽西瓜“黑蜜 5 号”子叶为外植体,6-BA 在低浓度下(<2.5 mg/L)不能诱导芽的产生,达到 2.5 mg/L 才有芽的出现,当浓度达 5.0 mg/L 时芽出现畸形及玻璃化。阎志红等<sup>[9]</sup>则证明西瓜四倍体品系 ZM 和 XQ 子叶不定芽的分化中 6-BA 以 2.0 mg/L 为宜,达到 3.0 mg/L 出现玻璃化现象。而该试验用 1.0 mg/L 6-BA 就对“蜜童”西瓜子叶不定芽的诱导达到了很好的效果,可能是供试品种不同的原因。可见,对于不同材料而言,植物生长调节物质浓度高与低的标准会有差异,但总体来讲,应尽量在低浓度范围内保证诱导率和增殖率。

该研究还发现,继代和伸长培养时间以 3 周较好,超过 25 d 黄化明显,这可能与西瓜再生苗生长消耗水分、养分较多有关。另外,试管苗生根后,根盘绕于固体培养基中,使其在与培养基分离过程中易受伤甚至折断(图 1F),影响移栽成活率。可采用液体培养方法解决根易受伤的问题<sup>[12]</sup>,还可以节约人力物力,该方法正在试验阶段。有研究表明<sup>[13-14]</sup>,无籽西瓜再生试管苗嫁接后移栽比生根苗直接移栽成活率高。

## 参考文献

- [1] 许文婷. 礼品西瓜新品种-蜜童[J]. 西北园艺,2007(11):33.
- [2] 李敏华,张洪溢. 无籽西瓜无茵萌发条件的研究[J]. 海南师范学院学报(自然科学版),2001,14(1):82-85.
- [3] Ananthakrishnan G, Xia X, Elman C, et al. Gaba. Shoot production in squash(*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21:739-746.
- [4] Chaturvedi R, Bhatnagar S P. High-Frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. sugar baby[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2001, 37:255-258.
- [5] Compton Michael E, Gray D J, Gaba Victor P. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 77:231-243.
- [6] Yu T A, Chiang C H, Wu H W, et al. Generation of transgenic watermelon resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* and *Papaya ringspot virus* type W[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30:359-371.
- [7] 孙玉宏,韩长磊,张椿雨,等. 根癌农杆菌介导获得转基因西瓜植株[J]. 华中农业大学学报,2007,26(5):684-688.
- [8] 郑先波,栗燕,张恒涛,等. 无籽西瓜子叶离体培养及植株再生研究[J]. 中国农学通报,2005,21(8):43-45.
- [9] 阎志红,刘文革,赵胜杰,等. 四倍体西瓜子叶植株再生试验[J]. 中国果树,2007(6):28-31.
- [10] 肖守华,李国生,焦自高,等. 西瓜高效再生体系的建立[J]. 中国瓜菜,2010,23(3):11-14.
- [11] 张爱加,方金强,邱金海,等. 三倍体西瓜组培快繁研究[J]. 福建果树,2003,126(3):9-11.
- [12] Pati P K, Kaur J, Singh P. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 105:299-307.
- [13] 贾德新,刘志敏,崔德珍,等. 不同因子对无籽西瓜组培快繁的影响研究[J]. 农业与技术,2006,26(4):87-89.
- [14] 王闯,李中勇,刘敏,等. 无籽西瓜茎段组织培养与嫁接育苗技术研究[J]. 中国农学通报,2010,26(5):189-192.

(该文作者还有蒋卉、安霞,工作单位为华中农业大学植物科学技术学院。)

## Establishment of Cotyledon Explants Regeneration System in Seedless Watermelon 'Mitong'

ZHANG Na<sup>1,2</sup>, PENG Ding-xiang<sup>2</sup>, SUN Yu-hong<sup>1</sup>, ZENG Hong-xia<sup>1</sup>, SHI Xian-feng<sup>1</sup>, REN Jian<sup>1</sup>, JIANG Hu<sup>2</sup>, AN Xia<sup>2</sup>

(1. Wuhan Agricultural and Sciences Institute, Wuhan, Hubei 430345; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract:** Cotyledon excised from seedlings of watermelon 'Hitong' were used as explants, an efficient plant regeneration system via organogenesis was established in triploid watermelon 'Mitong'. The results showed that 88.33% explants could regenerate to adventitious shoots on MS medium with 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA. The elongation media was MS+0.2 mg/L 6-BA. 90% adventitious shoots were successfully rooted on a 1/2MS medium with 0.5 mg/L IBA.

**Key words:** seedless watermelon; cotyledon; regeneration system