

# 无籽西瓜子叶诱导不定芽的影响因子研究

张 娜<sup>1,2</sup>, 曾 红 霞<sup>1</sup>, 蒋 卉<sup>2</sup>, 安 霞<sup>2</sup>, 施 先 锋<sup>1</sup>, 孙 玉 宏<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,研究了种子灭菌方法、子叶的取材部位、黑暗培养等不同条件对其不定芽诱导的影响。结果表明:相同培养条件下,“蜜童”无菌苗子叶不定芽的分化能力由近轴端至远轴端逐渐降低,外植体的离体黑暗培养不能促进不定芽的诱导,相反具有一定抑制作用。

**关键词:**无籽西瓜;灭菌方法;子叶;取材部位;暗培养

**中图分类号:**S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0103-03

无籽西瓜具有高产、抗病、耐贮运、商品性好等优点,市场前景广阔,但是因其传统制种程序繁琐,造成种子价格较高,加之自身存在的“三低问题”,在实际生产中对生产者的育苗技术要求也较高,影响了其在生产上的应用<sup>[1]</sup>。利用现代组培技术可在保证品种纯度的基础上,快速获得大量健壮整齐的无籽西瓜瓶苗,进行种苗工厂化、规模化生产。该试验以先正达公司的无籽西瓜“蜜童”为试材,从种子灭菌方法的简化、子叶取材部位、黑暗培养几方面入手,研究其离体再生的影响因素,为其组织快繁体系的建立奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试二倍体西瓜种子 A6、A7、A8 以及购自先正达公司的无籽西瓜“蜜童”种子,由武汉市农业科学研究所西甜瓜研究室提供。

植物生长调节物质 6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)及其它化学试剂由武汉市农业科学研究所和华中农业大学植物科学技术学院苎麻课题组共同提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子灭菌 预备试验: A6、A7、A8 种子剥除种壳,按照不同方法进行灭菌前处理,再以 10%次氯酸钠溶液灭菌 5 min,用无菌水洗净,接种于 MS 培养基发芽(不同处理见表 1),每处理 20 粒为 1 次重复,设 3 次重

复,5 d 后统计污染率(表 3)。污染率(%)=污染的种子数/灭菌种子总数×100%。“蜜童”种子灭菌试验:将“蜜童”种子剥壳后,在超净工作台上用 NaClO 溶液进行灭菌,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,接种发芽(不同灭菌处理及培养方法见表 2),每处理 10 粒种子为 1 次重复,设 3 次重复。5 d 后统计种子发芽情况(表 4)。萌发率(%)=萌发种子数/灭菌种子总数×100%;子叶可用率(%)=可供诱导不定芽的子叶数/萌发种子的子叶总数×100%。

表 1 西瓜种子灭菌前及接种前处理方法

Table 1 Processing method before sterilization and inoculation of watermelon seed

处理	灭菌前处理	接种前处理
1	以 75%酒精表面灭菌 30 s	直接接种
2	以 75%酒精表面灭菌 30 s	无菌滤纸吸干表面水分接种
3	不进行表面灭菌	直接接种
4	不进行表面灭菌	无菌滤纸吸干表面水分接种

表 2 “蜜童”种子的不同灭菌处理及发芽培养方法

Table 2 Seeds sterilization methods and germination cultivation methods of ‘Mitong’

处理	灭菌处理		发芽培养
	NaClO 溶液浓度/%	灭菌时间/min	
5	5	4	MS
6	5	4	无菌水加滤纸
7	5	5	MS
8	5	5	无菌水加滤纸
9	10	4	MS
10	10	4	无菌水加滤纸
11	10	5	MS
12	10	5	无菌水加滤纸

1.2.2 外植体预处理及取材 种子发芽培养 6 d 左右,子叶转绿时切取子叶的不同部位作为外植体(图 1),接

**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:**孙玉宏(1968-),女,正高级农艺师,研究方向为西甜瓜栽培与育种。E-mail:sunyuh68@163.com.

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

**收稿日期:**2012-11-19

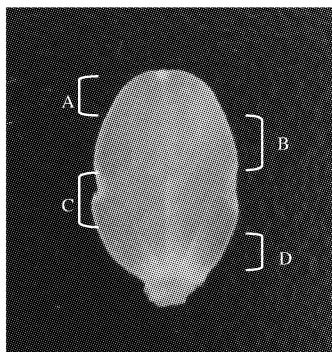


图1 “蜜童”子叶为外植体的不同取材部位

Fig. 1 Sampling areas of 'Mitong' cotyledon

种于不定芽诱导培养基:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。黑暗条件下分别预培养 48、72 h,再正常光周期培养。每处理接种 20 个外植体为 1 次重复,设 3 次重复。30 d 后统计不定芽诱导率,不定芽诱导率(%)=产生不定芽的外植体数/接种外植体总数×100%。

1.2.3 培养条件 试验材料均置于(26±1)℃,2 500~3 000 lx,16 h/8h(光照/黑暗)光周期条件下培养(暗培养阶段除外)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌方法对外植体质量的影响

2.1.1 灭菌前及接种前处理对种子污染率的影响 各处理种子经培养萌发正常。由表 3 可知,3 个材料在处理 2 和处理 4 条件下均达到零污染,效果较处理 1 和处理 3 好,说明西瓜种子灭菌后表面的水分会增加其污染率,原因可能是由于水的表面张力增加了种子与外界接触机会而导致其受污染的几率增大。另一方面,处理 1 和处理 3 之间、处理 2 和处理 4 之间污染率差距不明显,说明是否用 75%酒精进行种子表面灭菌不是影响其污染率的决定性因素,10%次氯酸钠溶液 5 min 灭菌即可达到获得无菌种子的目的。

表 3 二倍体西瓜种子灭菌前及接种前  
处理方法对污染率的影响

Table 3 Effects of sterilization and inoculation treatment methods on contamination rate in diploid watermelon seeds

材料	污染率/%			
	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4
A6	3.33±2.89ab	0b	3.33±2.89ab	0b
A7	3.33±2.89ab	0b	6.67±2.89 a	0b
A8	6.67±2.89a	0b	3.33±5.77ab	0b

注:表中同行的不同字母表示在  $P>0.05$  水平下有显著性差异。下同。

2.1.2 灭菌及发芽培养方法对三倍体种子灭菌效果的影响 由表 4 可知,5%NaClO 溶液处理后种子萌发率高于 10%NaClO 溶液处理的种子,而处理 5 和处理 6 有污染,说明较高浓度(10%及以上)的 NaClO 和相对长时

间(5 min 及以上)的灭菌对无籽西瓜种子的萌发有抑制作用,低浓度 NaClO 处理时间低于 5 min 也影响灭菌效果。试验发现,MS 培养基培养的无菌种子发芽正常,而经无菌水加滤纸的方法培养种子萌发率降低,且子叶可用率也不足 25%,可能因为西瓜本身较耐旱,加之水分过多会导致水势过高,氧气缺乏,呼吸作用降低,不仅影响种子发芽率,还使子叶脆硬甚至玻璃化,从而影响了不定芽的分化,而琼脂的加入改变了衬质势、改善了水分状况,适合西瓜种子正常萌发。因而,将处理 7 确定为“蜜童”获得无菌种子和无菌幼苗的最佳灭菌及培养方法。

表 4 不同灭菌及发芽培养方法对  
“蜜童”发芽率和子叶可用率的影响

Table 4 Effects of sterilization and cultivation methods on seeds germination rate and cotyledon availability rate in 'Mitong'

处理	污染率/%	萌发率/%	子叶可用率/%
5	0.67±0.057a	100±0a	100±0a
6	0.33±0.057ab	66.7±5.77b	50±0b
7	0b	100±0a	100±0a
8	0b	100±0a	20±0c
9	0b	60±10.0b	100±0a
10	0b	56.6±4.67b	33.3±2.89c
11	0b	36.7±3.12bc	100±0a
12	0b	20±0c	0±0d

### 2.2 不同取材部位及黑暗预处理对子叶不定芽诱导的影响

由图 2 可知,相同培养条件下,取材部位对“蜜童”子叶不定芽的诱导影响很大,子叶近轴端(D 区域)诱导

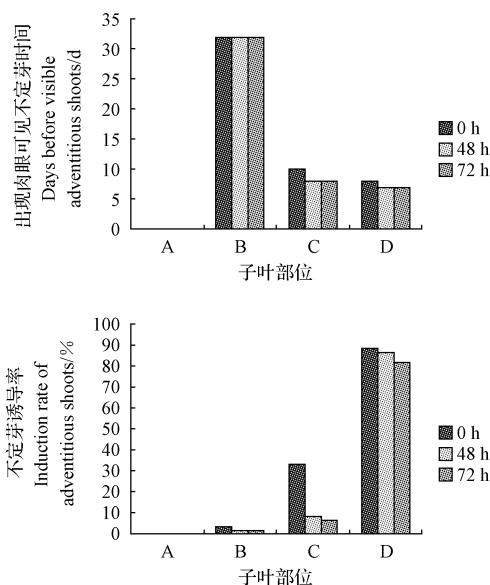


图2 不同取材部位及黑暗预处理时间对不定芽诱导的影响

Fig. 2 Effects of sampling areas and dark culture on adventitious shoots induction of 'Mitong' cotyledon

率明显高于其它部位,无需暗培养可达 88.33%,诱导不定芽所需时间也较短,在 1 周左右;不定芽诱导的难度由子叶近轴端向远轴端(D→A)逐渐增大,这与众多学者<sup>[2-4]</sup>的研究结果一致。外植体接种后的黑暗培养可使“蜜童”子叶不定芽诱导时间相对缩短 1~2 d,但促使外植体产生了更多的浅色透明愈伤组织,对不定芽诱导率并无提高,相反有一定抑制作用。

### 3 讨论

“蜜童”种子剥壳后直接用 5% NaClO 溶液灭菌 5 min,无菌水洗净后用无菌滤纸吸干种子表面水分,接种于 MS 培养基培养,是获得“蜜童”无菌苗子叶的最佳方法。试验过程省去了传统种子灭菌方法<sup>[5]</sup>中的 75% 酒精表面灭菌这一步骤,这样也就不必进行无菌水清洗酒精的步骤,不仅可节省时间、节约成本,更重要的是可降低外界因素对裸露种子可能带来的破坏作用。拟希望以无菌水加滤纸的方法来节约种子发芽操作时间和成本,但试验证明该方法极易造成子叶玻璃化,因而并不可行。西瓜不定芽的产生由子叶近轴端向顶端(图 1 中 D→A)依次降低,原因可能是由于植物激素在外植体中发生极性运输造成不同部位间的激素含量不同所致<sup>[6-8]</sup>。不定芽诱导前的黑暗培养,并不能提高“蜜童”子叶不定芽诱导率,甚至还会降低,与 Curuk 等<sup>[9]</sup>和金宝燕等<sup>[10]</sup>对葫芦科黄瓜属作物子叶下胚轴和子叶再生方面的研究结果一致,而 Compton<sup>[11]</sup>对二倍体西瓜子叶离体再生的研究发现,种子萌发时进行黑暗预培养可提高其不定芽诱导率,周林<sup>[8]</sup>研究表明,暗培养可明显提高西瓜花药愈伤组织的诱导率,而 4℃的预处理 72 h 能提高未受精子房诱导愈伤组织的培养。以上研究者们从不同角度开展研究并得出了结论,由于基因型和外植体

类型不同而有所差异,可以初步概括为黑暗处理的时期影响其对葫芦科子叶不定芽再生,种子萌发时的暗处理有利于不定芽再生,而在外植体离体培养时则无作用,甚至有相反效果;外植体离体培养时的黑暗处理对提高西瓜愈伤组织的诱导率有促进作用,该结果为通过愈伤组织途径建立西瓜再生体系提供了思路与借鉴。

### 参考文献

- [1] 李敏华,张洪溢.无籽西瓜无菌萌发条件的研究[J].海南师范学院学报,2001,14(3):80-83.
- [2] 王果萍.西瓜高效组织培养技术体系研究[J].中国西瓜甜瓜,2002(2):1-3.
- [3] 贾勇炯,刘天伦,高茂国,等.由三倍体西瓜下胚轴诱导植株再生的研究[J].四川大学学报(自然科学版),1991,28(1):93-97.
- [4] Compton M E. Interaction between explant size and cultivar impacts shoot organogenic competence of watermelon cotyledons[J]. Hort Science, 2000,35:749-750.
- [5] 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(3):9-11.
- [6] 任春梅,董延瑜,洪亚辉,等.西瓜组织培养的研究[J].湖南农业大学学报,2000,26(2):50-53.
- [7] Ananthakrishnan G, Xia X, Elman C, et al. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 739-746.
- [8] 周林.西瓜花药、子房和子叶离体培养影响因素的研究[M].南宁:广西大学,2009.
- [9] Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, et al. Regeneration *in vitro* from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light[J]. Hort Science, 2003, 38(1):105-109.
- [10] 金宝燕,苏华,任华中.硝酸银等因素对黄瓜直接不定芽诱导的影响[J].中国蔬菜,2006(6):21-22.
- [11] Compton M E. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 58:185-188.

## Study on Influence Factors of Adventitious Buds Inducing from Cotyledon in Triploid Watermelon

ZHANG Na<sup>1,2</sup>, ZENG Hong-xia<sup>1</sup>, JIANG Hui<sup>2</sup>, AN Xia<sup>2</sup>, SHI Xian-feng<sup>1</sup>, SUN Yu-hong<sup>1</sup>

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

**Abstract:** Using seedling-derived cotyledon of triploid watermelon ‘Mitong’ as explants, the influences of sterilization method of seed sterilization, different sampling areas and dark culture on adventitious shoots induction were studied. The results showed that under the same cultivation condition, the differentiation of adventitious shoots from proximal cotyledon was more easily than from other areas of cotyledon, and adventitious shoots’ differentiation ability reduced gradually from the nearly hypocotyl area to the distal end. The study indicated that dark culturing could not improve (sometimes reduces) the cotyledon adventitious shoot induction of triploid watermelon.

**Key words:** triploid watermelon; sterilization method; cotyledon; sampling area; dark culture