

# 西瓜花药离体培养影响因素研究

缙艳霞<sup>1</sup>, 张明方<sup>2</sup>

(1. 呼和浩特职业学院 生物化学工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010051; 2. 浙江大学 园艺系, 浙江 杭州 310029)

**摘要:**以具有较多优良性状的 F<sub>1</sub> 代西瓜品种“春光”、“拿比特”和“喜都”的花药为试材, 研究了影响西瓜花药愈伤组织诱导率的因素。结果表明: 西瓜花药在 MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L 上诱导率最高; 固体培养时蔗糖浓度以 6% 效果较好; 4℃ 下低温预处理 72 h 可以提高西瓜花药愈伤组织的诱导率; 30℃ 下高温预培养 72 h 后置于 25℃ 低温下培养也可提高西瓜花药愈伤组织的诱导率; 黑暗条件下比较容易诱导出质地良好的西瓜花药愈伤组织。

**关键词:**西瓜; 花药培养; 愈伤组织诱导

**中图分类号:**S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)10-0117-04

西瓜(*Citrullus lanatus*)属葫芦科西瓜属 1a 生草本植物, 是重要的经济作物之一, 也是世界十大水果之一。西瓜除了常规杂交育种外, 以 F<sub>1</sub> 代为材料, 利用单倍体植株诱导可以快速有效地获得真正纯合的育种材料, 然后再进行加倍, 不但可以获得较多的基因型植株, 筛选到符合目标性状的材料, 而且大大缩短纯合的时间, 节省人力和物力。从 20 世纪 80 年代初, 薛光荣等<sup>[1-2]</sup>、袁万良等<sup>[3]</sup>、魏瑛等<sup>[4-5]</sup>相继开展了西瓜花药培养的研究, 且大都偏向于一个或几个影响因素的作用, 缺少比较系统的西瓜花药培养再生体系研究。该试验对影响西瓜花药愈伤组织诱导率的若干因素进行了系统的研究, 以便提高西瓜花药愈伤组织的诱导率。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的 3 个西瓜品种都是杂交一代, 其名称分别为:“春光”、“拿比特”和“喜都”。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料的预处理** 在西瓜植株进入盛花期时, 采集小孢子发育至单核期的花蕾(花蕾直径约为

4.5~5.5 mm), 用湿纱布包裹, 放入塑料袋中, 进行低温预处理。处理结束后, 用无菌水先将花蕾冲洗 3 遍, 再用 10%(W/V)饱和次氯酸钠溶液表面消毒 15 min, 最后无菌条件下用无菌水冲洗 5 遍, 然后剥取花药接种于诱导培养基上。

**1.2.2 蔗糖浓度的筛选** 采集“春光”花药, 针对花药固体培养培养方式, 低温处理后, 分别培养在 3 种不同激素配比和浓度的培养基(MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L, MS+KT 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L)上, 设计 3%、6% 和 8% 3 种浓度蔗糖液, 共 9 个处理, 每个处理接种 4 瓶, 培养 20 d 后, 观察产生的愈伤组织的大小、颜色并统计数目。

**1.2.3 植物激素的筛选** 采集“拿比特”和“喜都”花药, 采用以下 15 种激素处理。愈伤诱导培养基: MS+60 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂培养基附加以下激素, 1.0~2.0 mg/L NAA, 0.5~2.0 mg/L BA 和 0.5~1.5 mg/L KT, 0.05~0.5 mg/L 2,4-D, 0.1~1.0 mg/L IAA, pH 调至 5.8。激素共 15 个组合(表 1)。设 4 次重复, 20 d 后统计愈伤组织数目。接种花药后在 30℃ 进行高温预培养 72 h, 然后再置于 25℃、黑暗条件下培养。20 d 后统计愈伤组织诱导频率和愈伤组织生长情况, 并根据其色泽、质地等按优、良、一般和差 4 个等级将 15 种添加不同

**第一作者简介:**缙艳霞(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为西甜瓜遗传育种改良。

**收稿日期:**2013-01-16

**Abstract:** Taking *Cymbidium hybridum* ‘Fukunokam’ as material, the effect of different concentrations of NAA, BA, different additions, combination of NAA, GA<sub>3</sub> and potato juice, on seedlings and rooting of *Cymbidium hybridum* were studied by orthogonal experiment. The results showed that the best medium for promoting seedlings and rooting of *Cymbidium hybridum* was 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+GA<sub>3</sub> 1.0 mg/L+Mashed potatoes 150 g/L+Agar 8 g/L+Sugar 20 g/L+Carbon 2.0 g/L, pH 5.4.

**Key words:** factors; *Cymbidium hybridum*; seedlings and rooting

激素的培养基诱导的愈伤组织分类。

1.2.4 花药的低温预处理 采用“拿比特”的花药,分别进行 4、10℃ 的低温预处理,处理时间分别为 0、24、48、72 和 96 h,接种于诱导培养基中,培养基为 MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L,设置 9 个处理,每个处理接种 4 瓶,20 d 后统计愈伤组织数目。

1.2.5 高温预培养 采集处于同一生理状态下的“拿比特”西瓜花药接种于 3 种不同培养基(MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L,MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L,MS+KT 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L)上,分别以不变的低温、先高温后低温的变温处理和一直高温,共 9 个处理,试验设置 4 次重复,20 d 后统计愈伤组织的诱导率。

表 1 诱导培养基选用的 15 种激素组合

Table 1 Fifteen combinations of hormones used inducing watermelon callus

培养基编号 Medium No.	激素浓度 Hormones concentration/mg · L <sup>-1</sup>				
	NAA	BA	KT	2,4-D	IAA
P1	1.0	0.5	0.5	—	—
P2	1.0	1.5	1.0	—	—
P3	1.0	2.0	1.5	—	—
P4	1.5	0.5	0.5	—	—
P5	1.5	1.5	1.0	—	—
P6	1.5	2.0	1.5	—	—
P7	2.0	0.5	0.5	—	—
P8	2.0	1.5	1.0	—	—
P9	2.0	2.0	1.5	—	—
P10	2.0	—	—1.0	—	—0.1
P11	2.0	—	—1.0	—	—0.5
P12	2.0	—	—1.0	—	—1.0
P13	2.0	—	—1.0	0.05	—
P14	2.0	—	—1.0	0.1	—
P15	2.0	—	1.0	0.5	—

1.2.6 培养光照条件 以“喜都”西瓜花药接种于 3 种不同的培养基(MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L,MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L,MS+KT 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L)上,分别置于 25℃、黑暗和 25℃、3 000 lx 光照 2 种不同光照条件下培养,共 6 个处理,试验设置 4 次重复,20 d 后统计产生愈伤组织的诱导率。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔗糖浓度对花药愈伤组织诱导的影响

在培养前期,高浓度的蔗糖不仅可诱导花粉胚的形成,而且由于花粉细胞的渗透压比体细胞渗透压高,在一定浓度范围内能降低花丝等愈伤组织的发生,而提高花粉愈伤组织发生的比例;在中后期,降低蔗糖浓度可提高培养基水势,促进单倍体细胞的生长与繁殖,有利于愈伤组织和胚状体的发育和分化。从表 2 可以看出,固体培养时,当蔗糖浓度为 6%时,花药愈伤组织诱导率较高。

表 2 不同蔗糖浓度对“春光”花药愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different sucrose levels on anther callus induction

培养基编号 Medium No.	蔗糖浓度 Sucrose concentration /%	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage/%	褐变率 Browning percentage /%
P3	3	31.1±4.9	27.8±5.2
	6	47.2±9.1	23.7±6.3
	8	40.5±3.5	34.6±5.8
P6	3	39.2±10.7	28.2±1.9
	6	40.0±8.7	35.2±12.9
	8	35.3±7.5	25.3±8.2
P7	3	41.4±9.0	36.1±12.3
	6	46.9±1.6	29.9±5.8
	8	38.9±2.1	31.2±4.3

### 2.2 不同激素对比对花药愈伤组织诱导的影响

由表 3 可知,15 种激素组合能诱导出“拿比特”和“喜都”2 种基因型的西瓜花药愈伤组织,而且“拿比特”的花药愈伤组织诱导率较高,达到了 48.2%。同时,15 种激素组合诱导西瓜愈伤组织的频率和质量存在一定的差异。P6 号培养基诱导“拿比特”和“喜都”西瓜花药愈伤组织频率最高而且质量最好,外植体褐化率也较低,所以诱导花药愈伤组织的最佳培养基为 MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L。花药接种后,愈伤组织出现的时间早晚不一,形态学特征也不同,主要有二大类:第一类是松散型愈伤组织,特点是质地疏松,绿色或者白色;第二类为致密型愈伤组织,其质地紧密、色嫩绿,有光泽,愈伤组织多由花药顶端及中部由里往外长。在试验中发现,IAA、2,4-D 和 NAA 的诱导

表 3 不同激素组合对花药愈伤组织诱导率及质量影响

Table 3 The frequency and quality of callus induced in different combinations of hormones

培养基编号 Medium No.	愈伤频率 Frequency of callus induction/%		外植体褐化频率 Frequency of explants browning/%		愈伤质量 (优、良、一般、差) Quality of induced callus	
	“拿比特”	“喜都”	“拿比特”	“喜都”	“拿比特”	“喜都”
P1	12.8±5.7	9.8±4.5	35.7±14.5	68.2±9.1	*	*
P2	23.2±3.3	2.2±3.9	36.2±22.4	70.7±3.6	**	*
P3	13.9±8.8	9.4±4.2	24.4±1.3	36.1±12.7	***	**
P4	7.3±8.5	5.5±0.67	41.3±21.5	77.5±14.8	*	*
P5	9.1±2.5	3.5±3.0	29.4±3.8	61.8±21.7	**	**
P6	48.2±4.1	17.7±12.5	14.5±10.8	40.1±16.0	****	****
P7	38.4±10.8	12.1±3.2	37.3±10.2	70.8±11.6	***	**
P8	6.7±6.3	8.3±7.6	41.4±2.7	58.3±16.1	**	*
P9	17.4±11.6	3.5±3.1	29.4±5.3	38.7±26.4	***	**
P10	1.7±2.9	0.0±0.0	57.1±24.5	84.6±1.8	**	*
P11	2.0±3.4	0.0±0.0	53.3±15.8	87.2±8.6	**	*
P12	0.0±0.0	0.0±0.0	52.2±16.5	95.6±4.0	*	*
P13	39.8±4.7	5.9±0.4	34.4±5.1	68.9±7.1	****	**
P14	33.2±11.9	10.5±5.1	26.9±12.9	33.3±7.7	****	**
P15	41.9±11.1	11.0±4.6	38.4±5.6	45.5±6.8	***	**

注: \* 表示愈伤组织质量差; \*\* 一般; \*\*\* 良; \*\*\*\* 优。

Note: \* mean callus quality was poor; \*\* means general; \*\*\* means good; \*\*\*\* means excellent.

花药愈伤组织的作用不同,IAA 对诱导西瓜花药愈伤组织的作用不大,愈伤诱导率很低,诱导出的愈伤质地也不好;2,4-D 主要作用于产生愈伤组织,而且诱导率相对较高,但是发现当其浓度较高,尤其超过 0.5 mg/L 时,生成的愈伤组织比较疏松白化,分化培养时容易褐化死亡,当其浓度为 0.1 mg/L 时形成的愈伤组织质量最好;NAA 的作用比较稳定且生成的愈伤质地致密,色泽亮绿,质量较好。

### 2.3 低温预处理对花药愈伤组织诱导的影响

据文献资料,西瓜花药经过低温预处理后培养效果比较好,低温预处理的作用主要是能够提供一个更适合的环境以利于诱导并在诱导期能够存活。经试验观察发现 3 个西瓜品种在 10℃ 处理 72 h 后的褐变率高于在 4℃ 下处理 72 h 的褐变率;“拿比特”处理 96 h 的褐变率显著高于 72 h 的褐变率,“春光”处理 72 h 的褐变率显著高于 48 h 的褐变率;从品种看,“喜都”的花药褐变率显著的高于“拿比特”和“春光”的褐变率。从表 4 可以看出,“拿比特”在 4℃ 条件下处理 72 h 效果最佳。

表 4 花药预处理的温度和时间对“拿比特”花药愈伤诱导培养的影响

Table 4 Effects of temperature and time of anther pre-disposal of different cultivars on anther callus induction

处理号 Treatment No.	处理温度 Temperature /℃	处理时间 Duration /h	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage/%	褐变率 Browning percentage /%
1	4	96	35.4±5.4	47.4±4.6
2	4	72	51.7±0.8	20.35±5.0
3	4	48	45.0±5.0	33.4±4.8
4	4	24	40.0±5.0	36.7±20.2
5	4	0	22.1±15.7	33.3±7.6
6	10	24	30.7±14.1	33.3±10.4
7	10	48	12.1±8.1	61.8±17.4
8	10	72	10.3±4.8	77.5±6.5
9	10	96	2.6±4.1	78.2±25.6

### 2.4 培养温度对花药愈伤组织诱导的影响

一般培养温度为 25~28℃,温度过低或过高都不利于愈伤组织的产生。如当番茄花培的温度超过 30℃,花药会很快死亡,花丝和花药均不能产生愈伤组织<sup>[6]</sup>。该试验以“拿比特”为材料,由表 5 可知,接种到诱导培养上后,在 30℃ 下高温预培养 0、48、72 和 96 h,然后转移到 25℃ 下培养。当以 MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为诱导花药愈伤培养基时,“拿比特”在高温 30℃ 条件下培养 72 h 然后再在 25℃ 下培养和一直处于低温下形成愈伤组织的频率分别为 50.4% 和 5.0%,变温培养中形成花药愈伤组织的频率较高,质量也较好,一直处于高温条件下形成的愈伤组织颜色淡黄,质量较差,易形成表面粘状的愈伤组织,转入愈伤增殖培养基易褐化死亡,不易分化形成绿苗。凡经过高温预培养的花药,诱导频率均高于未经处理的,可见西瓜花药培养过程中的变温处理能显著提高愈伤组织诱导频率。

表 5 高温预培养对“拿比特”花药愈伤组织诱导率的影响

Table 5 Influence of high temperature on callus induction frequency of ‘Nabite’

培养基 Medium	处理时间 Duration/h	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage/%	外植体褐化频率 Browning percentage/%
P3	0	5.0±0.25	50.8±3.9
	48	13.9±8.8	24.4±1.3
	72	50.4±0.08	24.5±0.05
	96	20.7±19.2	27.2±10.7
P6	0	21.1±12.2	26.8±14.1
	48	35.5±4.2	33.4±4.8
	72	41.7±5.7	37.3±10.2
	96	31.3±14.4	31.5±10.5
P7	0	0.0±0.0	39.6±5.8
	48	18.3±9.6	26.1±4.9
	72	38.4±10.8	14.5±10.8
	96	20.4±10.6	22.7±8.2

### 2.5 光照条件对花药愈伤组织诱导的影响

由表 6 可知,在 3 000 lx 光照条件下,外植体诱导的愈伤组织质量很差,褐化严重,而且完全脱分化愈伤组织诱导频率也较低(几乎没有质量好的完全脱分化愈伤组织)。在黑暗条件下诱导的愈伤组织呈淡黄色颗粒状,有光泽,而且完全脱分化愈伤组织诱导率也较高,与光照条件下培养存在着显著差异。光照并非是愈伤组织发育和分化的必要条件,虽然黑暗有利于愈伤组织的生长,但长时期的黑暗培养会明显降低愈伤组织的品质和外观,所以应适当补充光照。

表 6 不同光照条件对“喜都”花药愈伤组织诱导的影响

Table 6 Influence of culture conditions on callus induction frequency of ‘Xidu’

培养基序号 Medium No.	光照/黑暗 Illumination/Dark	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage/%	褐变率 Browning percentage /%
P3	光照	5.9±6.3	94.1±6.3
	黑暗	9.4±4.2	36.1±12.7
P6	光照	5.2±5.3	54.9±13.1
	黑暗	17.7±12.5	59.1±16.0
P7	光照	2.5±3.6	73.3±24.7
	黑暗	12.1±3.2	70.8±11.6

### 2.6 绿色组织诱导试验

接种花药经过 20 d 培养后,有的愈伤组织分生旺盛,特别 2,4-D 诱导形成的愈伤组织,但是很少有绿色组织形成,据有关参考资料报道<sup>[2]</sup>,三十烷醇在适宜浓度下有促进叶绿体形成的作用。为此作了 2 个试验处理,对照为同一批材料的愈伤组织增殖处理,使用不含三十烷醇的培养基,新配方在原培养基上加 3 mg/L 三十烷醇。培养几天后,发现加入三十烷醇的培养基上个别花药愈伤组织切块上形成深绿色点状组织,可成功的诱导出绿色组织;而对照的花药愈伤组织培养一段时间后就



会褐化,很少有绿色组织形成。

### 3 讨论

花药培养技术已作为一种常规手段应用于育种工作中。但是,花药培养技术仍有待于改进,未来的研究应设法进一步改进培养条件(包括供体植株)和培养基(如液体培养基)以拓宽基因型的实用范围并进一步提高诱导效率;加强小孢子发育机理的研究以实现对小孢子发育的主动调控;加强游离小孢子培养技术的研究以便利用小孢子来进行遗传转化和离体选择等。培养西瓜的基础培养基以 MS 为主,适当的调节蔗糖的浓度,可提高愈伤组织诱导率,培养基中的蔗糖浓度、激素种类、用量与愈伤组织诱导率密切相关。适当提高培养基中蔗糖浓度和降低 2,4-D 的用量(一般不超过 0.5 mg/L),可提高愈伤组织的诱导频率;西瓜花药愈伤组织诱导培养基为 MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L 时,较易诱导愈伤组织。针对不同的品种进行不同时间的低温处理,可使绝大多数小孢子保持活力,花粉退化速度减慢,提高花药愈伤组织诱导率。该研究发现在 4℃ 低温预处理 72 h 可以明显提高“拿比特”愈伤组织的诱导率,而“春光”在 4℃ 低温预处理 48 h 可以明显提高其花药愈伤组织的诱导率。不同基因型材料对愈伤组织诱导频率有显著差异,供体植株的基因型是影响花药培养的关键因素。在供试的 3 个杂交一代品种中,“拿比特”的愈伤组织诱导率最高,而“喜都”的诱导率最差;如何使愈伤组织诱导率极低的某一基因型材料,通过大田育种技术和生化监测技术提高它的诱导率,是下一步需要研究的课题。小孢子形成时的生理生态因素对花药培养的影响很大。一般处于单核靠边期的西瓜花药的愈伤组织诱导率最高,开花前期比中后期的花药具有较好的培养效果。高温减小了小孢子之间的竞争,促使小孢子发育同步化;一直处于高温处理下的愈伤组织较易失去形成绿苗的能力,变温处理中当在

30℃ 下处理 72 h 时愈伤组织诱导率较高。在花药固体培养中,以 4 个花蕾/瓶(20 枚花药)的密度较好,密度不宜太高,这样可以减少在诱导愈伤中营养不足和空间障碍等问题的发生,并利于愈伤组织发生的同步性。不同的材料对活性炭的反应不同,而该试验的 3 个基因型西瓜当加入活性炭时花药都易褐化,愈伤组织诱导率极低。加入三十烷醇能够提高绿色组织的产率,为以后愈伤组织的质量和分化奠定基础。

花药培养的应用范围也在不断扩大,除了可快速获得高度纯化的自交系、提高选择效果等以外,其在植物新品种改良上最诱人的莫过于利用单倍体系统来进行抗病虫、抗除草剂、抗逆性、耐盐碱等的变异诱导和筛选。对于低遗传力性状(如数量性状)的稳定,该项技术也显得特别有价值。此外,花药培养技术在分子标记、基因导入、基因组图谱描绘等方面也都有重要的应用价值。随着分子生物学基础研究的进展和基因转化技术及西瓜再生方法的不断更新、改进和完善,相信在不久的将来,西瓜花药离体培养技术能够逐步完善,为西瓜的遗传改良做贡献。

### 参考文献

- [1] 薛光荣,余文炎,费开伟,等.西瓜花药离体培养获得花粉植株[J].植物生理学通讯,1983(4):40-42.
- [2] 薛光荣,费开伟.西瓜花药培养获得花粉植株简报[J].中国果树,1982(2):51-52.
- [3] 袁万良,付润民,雷保林,等.西瓜花培试验初报[J].陕西农业科学,1995(1):29-30.
- [4] 魏琰.低温预处理对西瓜花药愈伤组织诱导的影响[J].甘肃农业科技,1999(5):34-36.
- [5] 魏琰,张俊莲,陈年来,等.西瓜花药愈伤组织的诱导[J].甘肃农业大学学报,1998,33(专辑):127-130.
- [6] Gambley R L, Dodd W A. The influence of cotyledons in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodule of *Cucumis sativus* L. [J]. J Exp Bot, 1991, 42: 1131-1135.

## Study on Factors Affecting Anther Culture *in vitro* of *Citrullus lanatus*

GOU Yan-xia<sup>1</sup>, ZHANG Ming-fang<sup>2</sup>

(1. College of Biochemical Engineering, Hohhot Vocational College, Hohhot, Inner Mongolia 010051; 2. Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029)

**Abstract:** Using three *Citrullus lanatus* cultivars of F<sub>1</sub> generation ‘Chunguang’, ‘Nabite’, ‘Xidu’ which including lots of merits as materials, the technology of anther culture were studied. The results showed that more callus were formed on MS+KT 1.5 mg/L+BA 2.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L; the best concentration of sucrose for callus induction was 6%; the results indicated that the treating of 4℃, 72 hours was the proper condition that make the frequencies of callus induction; the studying of culture conditions and culture means indicated that callus inducement was better when it was cultured at 30℃ for 72 h and then cultured at 25℃. The quality of watermelon callus induced in dark was much better than in light.

**Key words:** *Citrullus lanatus*; anther culture; callus induction