

小型西瓜离体器官再生的影响因素

王玉书¹, 高美玲¹, 王欢², 范震宇¹, 郭宇¹

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以3种基因型的小型西瓜无菌苗为试材,采用体外培养的方法,研究了外植体类型、激素组合、继代生根培养对离体器官再生的影响。结果表明:以子叶节为外植体的不定芽再生效果好于子叶;不同基因型最适的激素组合不同,W1的最适诱导培养基是MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为20.00%,W2的最适诱导培养基是MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为30.00%,W3的最适诱导培养基是MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,再生频率为24.00%;最佳生根培养基为MS+NAA 0.5 mg/L。

关键词:小型西瓜;离体器官再生;不定芽分化

中图分类号:S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0125-03

小型西瓜又名迷你西瓜,因其果型小、品质优,十分迎合当前群众消费习惯,具广阔市场潜力,已成为一种高档礼品。小型西瓜作为一种新兴的西瓜优良新品种,现已经成为高效农业项目之一^[1]。目前,小西瓜品种依然大量进口,种子价格很高,采用离体培养诱导多倍体小型西瓜,受到越来越多人认同^[2]。20世纪70年代,Andrus等^[3]首次建立了无籽西瓜的无性繁殖体系。随后,研究者利用子叶等外植体,在一些基因型西瓜材料上诱导形成不定芽,获得了再生植株^[4-6]。然而,关于小

型西瓜离体培养技术的报道还很少。该试验以小型西瓜为试材,对取材部位、激素配比及继代生根进行探讨,以期完善西瓜组织培养再生体系、西瓜基因工程育种的进一步发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为齐齐哈尔大学生命科学与农林学院园艺系培育的小型西瓜自交系,编号为W1、W2和W3。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗培养 首先清水搓洗小型西瓜种子,然后用0.1%升汞(HgCl₂)消毒5min,无菌水漂洗3次,每次5min,之后置于无菌水中浸泡10h,将种子去壳(于超净工作台上操作),并将种子用滤纸吸干水后,5粒/瓶接种到MS(30%蔗糖,0.75%琼脂)发芽培养基上,置于25℃、

第一作者简介:王玉书(1985-),女,黑龙江富锦人,博士,讲师,现主要从事园艺植物遗传育种等研究工作。E-mail:wangys1019@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31401908);黑龙江省教育厅科学研究资助项目(12541881)。

收稿日期:2015-01-23

Abstract: Taking different maturities of leaves from peach progenies population as material, commercial kit was experimented as control group. The effect of the parameters of retsch about the grinding bead sizes, the frequency and time of vibration on yield and quality of DNA were investigated by the method of high-throughput extracting DNA. The results showed that adding 0.3% ascorbic acid, increasing the concentration of PVP to 4% and soaring the concentration of NaCl to 12% at the base of usual CTAB extraction buffer, the pigment and protein, polysaccharide were eliminated, and the problem appeared in the process of extracting DNA by the kits were effectively solved. Combining with the modified extraction method, the grinding pretreatment was screened. With the vibration frequency of 30 times/sec in 60 seconds by 5 mm grinding bead or the vibration frequency of 25 times/sec in 60 seconds by 5 mm grinding bead, a high throughput approach for DNA isolation from different maturity of leaves were acquired. It is not only considered to be a good ways to save time and dispense with much labor at extracting DNA, but also it was applied to extracting DNA from different maturity of peach leaves. More importantly, it could get high yield, reliable quality DNA for the genome sequencing. This study would provide guidance for technology of high performance DNA isolation.

Keywords: peach; leaf; high throughput; genome DNA

1 500 lx 的条件下暗培养 2~3 d, 胚根伸出约 0.5 cm 转光照培养。

1.2.2 不定芽的诱导 取苗龄 5~6 d 的试管苗, 分别切取 3 mm 左右见方的子叶和子叶节部位, 分别接种于 MS 培养基上(琼脂 0.75%, 蔗糖 30%, pH 5.8), 每个培养瓶接种 5 个外植体, 每个处理接种 5 瓶。培养 30 d 后, 调查不定芽再生数。

1.2.3 6-BA 和 NAA 对外植体再生的影响 选取幼嫩的西瓜无菌苗子叶节, 接种于添加不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和 α -萘乙酸(NAA)培养基上(培养基配方见表 1), 以不添加任何激素, 其它条件相同的 MS 培养基作为对照, 培养条件同无菌苗培养。每种培养基处理 10 个外植体, 重复 3 次, 培养 25 d 后统计外植体不定芽数。

表 1 不同激素浓度组合培养基

Table 1 The combination of different hormone concentration in culture medium

培养基编号 Code of medium	激素浓度 Concentration of hormone/(mg · L ⁻¹)	
	6-BA	NAA
I1	1.0	0
I2	2.0	0
I3	3.0	0
I4	1.0	0.5
I5	2.0	0.5
I6	3.0	0.5

1.2.4 继代和生根培养 获得的不定芽接种于 MS 培养基进行继代培养, 继代时间为 20 d。继代 3 次后, 将不定芽切下, 转入 MS 生根培养基上(30 g/L 蔗糖, 0.8% 琼脂, pH 5.8), 添加 NAA 浓度为 0.3、0.5、0.8 mg/L, 每种生根培养基接种 20 个不定芽。

1.3 数据分析

不定芽诱导率(%) = (形成不定芽的外植体数/接种外植体数) × 100%; 外植体再生芽数 = 不定芽总数/形成不定芽的外植体数; 生根率(%) = (已生根的不定芽数/生根培养的不定芽数) × 100%;

试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同部位外植体对不定芽诱导的影响

不同部位外植体诱导愈伤组织差异较大。表 2 表明, 3 个供试材料子叶节再生频率分别为 20.00%、18.00% 和 12.00%, 明显高于子叶再生芽诱导频率, 分化出的不定芽呈绿色, 有些叶片微微张开, 说明西瓜组培苗子叶节部位适合作为离体再生材料。在 W1 和 W2 2 个基因型材料子叶再生过程中, 也可看到个别突起, 但最终不能分化成芽, 说明子叶不适宜离体培养再生。因此, 在后续试验中均采用子叶节进行诱导。

2.2 基因型及激素对子叶节不定芽诱导的影响

不同基因型材料分别接种于不同激素的培养基中

表 2 西瓜无菌苗不同外植体对再生的影响

Table 2 Comparison of different explants on regeneration of *Citrullus lanatus*

外植体 Explant	再生频率 Regeneration frequency/%			每块外植体再生芽数 No. of regeneration bud		
	W1	W2	W3	W1	W2	W3
子叶节 Cotyledonary node	20.0	18.0	12.0	1.16	1.41	1.25
子叶 Cotyledon	0	0	8.0	0	0	1.04

诱导, 从表 3 可以看出, 不同基因型不定芽诱导率存在一定差异, 各个基因型的最佳的激素组合也不同。W1 的最适诱导培养基是 I4, 诱导率为 20.00%; W2 的最适诱导培养基是 I6, 诱导率为 30.00%; W3 的最适诱导培养基是 I5, 诱导率为 24.00%。试验表明, 适当浓度 6-BA 与 NAA 对不定芽诱导中起着重要作用。

表 3 不同培养基对子叶节不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of different medium on cotyledonary node regeneration of *Citrullus lanatus*

培养基代号 Code of medium	不定芽诱导率 Induction frequency/%			每块外植体再生芽数 No. of regeneration bud		
	W1	W2	W3	W1	W2	W3
I1	10.00dE	20.00dD	6.67eDE	1.01bB	1.16bB	1.24bB
I2	13.33cD	16.67eE	10.00dCA	1.21bB	1.06bB	2.21aA
I3	16.67bBC	23.33cC	16.67bAB	1.67aA	1.20bB	1.15bB
I4	20.00aA	23.33cC	16.67bAB	1.17bB	1.54aA	1.02bB
I5	17.33bB	26.67bB	24.00aA	1.06bB	1.20bB	1.30bB
I6	14.67cCD	30.00aA	13.33cBA	1.19bB	1.04bB	1.14bB
CK	13.33cD	20.00dD	3.33fE	1.06bB	1.21bB	1.16bB

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著($\alpha=0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($\alpha=0.01$)

Note: The different small letters in the same column indicated significant difference at the 0.05 level; the different capital letters indicated significant difference at the 0.01 level.

2.3 不定芽继代、生根和移栽

由于丛生芽比较弱小, 生根较困难, 且生根后移栽成活率较低, 因此, 丛生芽形成后, 需要继代培养 3~5 次, 待其长到 1 cm 左右, 生长健壮时, 切取接种于 3 种不同 NAA 浓度的生根培养基中。从表 4 可以看出, 0.5 mg/L NAA 的生根培养基适于幼苗生根, 生根率为 91.67%。转入生根培养基的试管苗 1 周后即有白色根毛生成, 之后开始形成不定根, 20 d 左右能够形成较粗壮根系。之后将试管苗移入装有灭菌草炭和蛭石(1:1)的营养钵中, 先放入培养室培养 7 d, 缓苗后, 将营养钵移到室外栽培。

表 4 不同培养基对丛生芽生根的影响

Table 4 Effect of different media on rooting of small watermelon buds

NAA 浓度 Concentration of NAA /(mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate /%	根系长势 Roots growth vigor
0.3	83.33	白色, 主根短, 须根少
0.5	91.67	白色, 主根粗且长, 须根较多
0.8	75.00	乳白色, 主根细弱, 须根少

3 讨论与结论

离体器官再生的前提条件是要选择适当的基因型和外植体。该试验中,3种试材的再生频率之间存在着显著差异。以W3的不定芽诱导率最高,为30.00%,其次是W2,诱导率最低的基因型W1,仅为20.00%。这与之前关于不同基因型材料的再生能力有较大差异的论断相符^[7]。因此,筛选高频再生的基因型材料是提高再生植株频率的关键。不同的外植体的不定芽诱导率差异也十分明显。何晓明等^[8]利用黄瓜的子叶和下胚轴部分作为外植体进行再生植株诱导,结果表明下胚轴诱导效果明显不如子叶。而在甜瓜组织培养研究中,幼嫩子叶均能得到较高频率的再生不定芽^[9-11],而下胚轴、真叶、茎尖等其它部位再生频率很低,甚至不能再生。在瓜类蔬菜离体培养中多采用子叶、子叶节或者子叶柄作为外植体。该试验中,采用小型西瓜无菌苗的子叶和子叶节部位进行离体再生培养,结果发现子叶节的再生芽频率明显高于子叶。这与周林等^[12]报道一致。

组织离体诱导时多采用一定浓度的不同激素配合使用^[13]。该研究采用的6-BA和NAA激素组合对西瓜的丛生芽诱导具有较好的作用,但不同基因型的西瓜试材,其最佳的诱导激素组合有差异,W1在MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA培养基上,不定芽诱导率最高,W2在MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA培养基上,诱导效果最好,W3在MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA培养基上获得最高的诱导频率。由此可见,适当浓度的6-BA和NAA配合可以显著提高不定芽的诱导频率。MS培养基中添加0.5 mg/L NAA处理下形成的主根较粗壮,且有较多须根,诱导根系效果要好于其它浓度处理。而较高浓度NAA形成的主根呈乳白色,主

根细弱,且须根少,这可能与再生芽中内源激素含量较高有关。

参考文献

- [1] 徐满君,蒋有条.小西瓜的生育特性及其栽培技术[J].浙江农业科学,2000(6):293-296.
- [2] 李步勋,陶抵辉,阮万辉.西瓜离体组织细胞染色体加倍技术的研究和应用[J].陕西农业科学,1999(3):21-23.
- [3] Andrus C F, Seshadri V S, Grimbail P C. Production of seedless watermelon [M]. Washington: United States Department of Agriculture Technical Bulletin, 1971:1452.
- [4] 万勇,张铮,刘红梅,等.西瓜组织培养快速繁殖的初步研究[J].江西农业学报,2002,14(4):47-50.
- [5] 任春梅,董廷瑜,洪亚辉,等.西瓜组织培养研究[J].湖南农业大学学报,2000,26(1):50-53.
- [6] 刘敬梅,刘玲,陈杭.西瓜的快速高效植株再生[J].植物生理学通讯,2000,36(1):46.
- [7] 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.
- [8] 何晓明,林毓娥.黄瓜子叶和下胚轴的离体培养[J].植物生理学通讯,2001(5):423-424.
- [9] Compton M E. Interaction between explant size and cultivar impacts shoot organogenic competence of watermelon cotyledons [J]. Hort Science, 2000,35:749-750.
- [10] Homma Y, Sugiyama K, Oosawa K. Improvement in production and regeneration of somatic embryos from mature seed of melon (*Cucumis melo* L.) on solid medium [J]. Japanese Journal of Breeding, 1991,41:543-551.
- [11] Card G, Xue B D. Transformation cucumber mosaic virus white leaf strain protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluation transgenic plants for protection against infection [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994,119(2):345-355.
- [12] 周林,黄金艳,覃斯华,等.诱导西瓜离体器官再生的主要影响因素[J].中国蔬菜,2009(18):64-67.
- [13] 陈继峰.黄瓜离体器官再生植株研究进展[J].上海农业学报,2007,23(1):114-118.

The Factors in Fluencing Organogenesis of the Mini Watermelon *in vitro*

WANG Yushu¹, GAO Meiling¹, WANG Huan², FAN Zhenyu¹, GUO Yu¹

(1. Department of Life Sciences, Agriculture and Forestry, Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang 161006, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang 161006)

Abstract: Three genotypes of mini watermelon test-tube plantlets were used to study the effect of explants types, hormone combinations, subculture and rooting culture on isolated organ regeneration with the method of the *in vitro* culture. The results showed that the cotyledonary node was an ideal material for adventitious bud induction, when compared to cotyledon. The optimal hormone combination was different for the three genotypes, the optimal culture medium for W1 was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, induction rate was 20.00%, for W2 was MS+3.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, induction rate reached 30.00%, for W3 was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA induction rate reached 20.00%. The best rooting medium was MS+NAA 0.5 mg/L.

Keywords: mini watermelon; organogenesis *in vitro*; adventitious bud differentiation