

甜瓜的组织培养现状及其应用前景

齐红岩, 卓男

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 辽宁省工厂化高效农业工程技术研究中心, 沈阳 110161)

摘要:综述了国内外甜瓜组织培养的现状,对影响甜瓜组织培养的主要因素,组织培养中出现的染色体数目的变异,玻璃化现象以及在育种和转基因方面的应用进行了阐述,提出了目前甜瓜组织培养中存在的问题并展望了组织培养技术应用的前景。

关键词:甜瓜;组织培养;影响因素;应用前景

中图分类号:S 652.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)04-0078-04

甜瓜(*Cucumis melo* L.)的组织培养研究始于20世纪70年代末,20多年来,甜瓜组织培养和植株再生研究已取得了很大的进展^[1-3]。建立高效的离体培养再生体系是植物遗传转化成功的基础,已建立的甜瓜离体再生体系包括从子叶、真叶、下胚轴、根等外植体培养获得再生植株^[2,4]。现在,人们已开始利用遗传工程方法改良甜瓜种质,如转化病毒的外壳蛋白基因、耐盐基因和ACC氧化酶反义基因等^[5]。现就近年来甜瓜组织培养中的影响因素、染色体变异、玻璃化和组培技术的应用以及存在的问题和将来的工作方向作以介绍。

1 外植体

1.1 外植体的基因型

第一作者简介:齐红岩(1971-),女,教授,主要从事设施蔬菜栽培与生理方面的研究。

收稿日期:2007-10-12

外植体的基因型是影响离体培养再生的内在因素。不同品种甜瓜的组培情况差异极大,植株再生潜力随基因型的不同而不同^[6]。潘俊松等^[7]对8个品种甜瓜子叶节离体培养的结果表明,基因型对子叶节丛生芽的诱导有较大影响,其中再生不定芽数最高的为12.5,最低为7.2。于喜艳等^[4]的研究表明,不同品种甜瓜在同一培养基上得到的不定芽诱导率不一致,薄皮甜瓜的子叶组织培养再生能力比厚皮甜瓜容易得多。葛屹松等^[8]也得出了相同的结果,并认为杂交种的芽诱导率高于新疆当地品种“皇后”。Galperin等^[6]选用了30份材料研究,表明甜瓜器官的再生能力因基因型的不同而不同,有2个不完全显性位点决定着器官发生能力。

1.2 外植体的生理年龄

外植体的生理年龄是决定离体培养能否成功的关键因素之一。马国斌等^[9]的研究表明,“皇后”等4个甜瓜品种子叶均以2d苗龄的子叶不定芽分化频率为最

[38] Tashiro S, Isshiki, Miyazaki S. Successful interspecific hybridization between *cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr[J]. *Euphytica*, 1997(96): 413-419.

[39] 曹清河,陈劲枫,钱春桃. 黄瓜抗霜霉病源易位系CT-01的筛选与鉴定[J]. *园艺学报*, 2005, 32(6): 1098-1101.

[40] 曹清河. 黄瓜抗霜霉病源易位系选育、相关基础研究及育种应用[D]. 南京:南京农业大学, 2006: 83-99.

[41] Palti J, Cohen Y. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*). The fungus and its hosts, distribution, epidemiology, and control[J].

phytoparasitica, 1980, 8: 109-147.

[42] Cohen Y, Downy mildew of cucurbits[M]. New York. In: D. M. Spencer (ed.). *The doeny mildew*. Academic Press, 1981: 341-354.

[43] 吕淑珍, 霍振荣, 陈正武, 等. 黄瓜霜霉病、白粉病抗性遗传规律研究初报[M]//李树德主编. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995: 436-438.

[44] 赵培洁, 王慧中, 赵波. 植物药对黄瓜霜霉病的抑制作用研究[J]. *浙江农业科学*, 2002(6): 295-297.

Progress of Study on Downy Mildew in Cucumber

ZHU Jin-ying, WANG You-ping, GUO Ping-ying, GAO Feng-ju

(Agricultural Academy of Dezhou City, Dezhou, Shandong 253015, China)

Abstract: Downy mildew is a major foliage disease of cucurbit crops in the world. It is a regular serious disease in the production of cucumber. In order to provide reference for the study of the disease, germination, symptom, invading rule, resistance and prevention were introduced.

Key words: Cucumber; Downy mildew; Resistance

高。葛屹松等^[8]报道,3 d 苗龄无菌甜瓜子叶的不定芽分化频率最高。邓向东等^[1]在不同日龄的网纹香瓜子叶柄的培养中发现5~8 d 苗龄的不定芽诱导率较高,到10 d 时诱导率已降至0%,不能产生不定芽。夏海武等^[10]认为诱导不定芽的形成以生长5 d 由黄变绿的甜瓜子叶为最佳,苗龄高于此时,芽的分化率迅速下降,10 d 龄的无菌甜瓜子叶已不能形成再生芽。因此,选择试材应尽量选用苗龄较小和分化能力较强的外植体。

1.3 外植体的部位

外植体的部位也是甜瓜离体培养中提高不定芽丛生率的关键因素之一。有报道称,不仅不同外植体之间的再生能力差异很大,而且同一外植体不同部位的再生能力也有很大差异^[11-12]。马国斌^[9]、李晓荣^[13]等的研究表明:子叶和真叶的近胚轴端是最先形成愈伤组织和分化出芽的器官,远离胚轴端很少或几乎不形成愈伤组织和芽,且不受子叶切割方式和切块大小的影响。张竞秋^[14]等的研究表明:甜瓜子叶近轴部位的芽诱导率显著高于远轴端。于为常^[15]等认为这是内源 IAA 含量不同导致的。因此,甜瓜离体培养时应用子叶或真叶叶柄端块为外植体,这样不定芽发生频率相对较高,能获得较多的再生植株。

1.4 外植体的切割方式

外植体的部位也是甜瓜离体培养中提高不定芽丛生率的关键因素之一。潘俊松^[7]等的结果表明,3种切割方法均能获得较多丛生芽,但先切顶芽的后期成苗时出现畸形苗,切割1/3子叶的诱导率不如后切顶芽的,子叶老化快,产生黄化和萎缩等现象。孙天国^[16]等研究不同切割方式影响甜瓜品种“懒瓜王”分化出芽的结果表明:横、纵切子叶外植体的愈伤组织生长速度、着生位置、芽原基的分布和生长速度均不同,出芽率差异也很大,认为纵切破坏了子叶表面最大的维管束,使植物体内内源激素的量减半,内外源激素的联合作用减弱,而使得诱导能力降低,抑制了芽的诱导与分化。

2 培养基成分

2.1 培养基的类型

甜瓜组织培养最常用的基本培养基为MS,不同外植体选用相同的基本培养基,或同一外植体选用不同的基本培养基的不定芽诱导率均不同。于喜艳^[4]等研究表明,改良的Miller培养基获得的不定芽诱导率较高。马国斌^[9]等报道,改良的MS培养基也可得到较好的不定芽分化效果。王建设^[2]等直接将子叶接种到Bordas等的诱导培养基上,可诱导出丛生芽。邓向东^[1]等的研究表明,LS培养基对哈密瓜的不定芽诱导效果较好,有提高不定芽生活力、增加不定芽数量的作用。可见,不同培养基均可诱导出不定芽但不同品种甜瓜的适合培养基不同。

2.2 碳源

在甜瓜离体培养研究中,关于糖的种类和浓度的报道甚少,大多数试验均以3%的蔗糖为碳源。邓向东^[1]等试验结果表明,提高培养基中蔗糖浓度可提高哈密瓜的不定芽诱导率,但其效果因哈密瓜品种的不同而异,并有导致不定芽过早老化的趋势。尹俊^[17]等在培养河套蜜瓜子叶时用3%葡萄糖的效果也较好。Hideki Nakagawa^[18]等采用不同浓度的蔗糖和甘露糖醇组合,研究糖影响体细胞胚形成的结果表明,蔗糖能诱导体细胞胚的形成,甘露糖醇则不能。以200 mmol 蔗糖处理的最好,较高或较低浓度的蔗糖均减少体细胞胚的形成率。

2.3 生长调节物质的种类和浓度

在甜瓜组织培养中,常用的细胞分裂素的类似物是6-BA和KT,生长素的类似物中常用的是IAA、NAA和IBA。添加不同的植物生长调节物质或组合的组培效应不相同^[19]。邓向东^[1]等在以6-BA、ZT、KT、2iP和2,4-D诱导哈密瓜不定芽的试验中观察到,6-BA的诱导效果最好,其最适浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,低于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和高于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均不能产生不定芽。而夏海武^[10]等和谢泽君^[20]等的研究表明,较低的IBA与合适的6-BA浓度配比诱导甜瓜的芽分化率较高。于喜艳^[4]等用6-BA和IAA组合诱导的结果表明,低浓度的IAA($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)有利于厚皮甜瓜子叶的分化,而对薄皮甜瓜几乎没有影响。此外,ABA对子叶诱导不定芽也有一定的作用,邓向东^[1]等的研究表明,高浓度的ABA($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可以提高网纹哈密瓜的诱导率,张竞秋^[14]等通过多NAA、6-BA、KT、ZT、IAA和ABA的结果表明, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT对河套蜜瓜的芽诱导率最高。

3 试管苗生根

生根和移栽成活率都是组织培养中的主要环节,生根与甜瓜移栽成活率的关系密切,所以研究试管苗的生根很重要。试管苗生根一般要求培养基中含有相对较高的生长素类物质。马国斌^[9]等认为IAA对甜瓜试管苗生根最有效,其次为IBA。孙天国^[16]等则认为,IBA对薄皮甜瓜的生根作用强于IAA,而且低无机盐和低糖的培养基的生根效果明显优于高无机盐和高糖的培养基。谢泽君^[20]等工作表明,IBA诱导的开始时间比NAA短,且生根率达到100%。潘俊松^[7]等的研究表明,黑暗条件下3 d 的甜瓜子叶节再转入光条件下培养后,生根率上升,且早,数量也多。李晓荣^[13]等先将哈密瓜转化植株根系于暗中水培,其移栽成活率可提高,并对后期生长有促进作用,而侯丽霞^[21]等的研究则认为,生根前期进行短时间的暗培养不能提高试管苗的生根率。

4 甜瓜组织培养中染色体的变异

一般认为,在组培过程中,通过诱导愈伤组织脱分化形成再生植株的途径常发生染色体变异。芽生芽的

方法虽不发生变异,但其繁殖系数太低。而不定胚诱导再生植株过程中也有变异^[22]。甜瓜再生植株中四倍体的频率较高,一般在 30% 左右。这方面的研究已不少^[23-25]。Adelberg^[26-27]等在研究甜瓜子叶再生四倍体时观察到,幼胚子叶形成的植株中四倍体率高达 50%,远高于成熟胚子叶的四倍体率(仅为 7%),他们还观察到,从子叶近胚轴端组织再生四倍体的频率显著高于其他部位的。谢丽琼^[28]等的研究表明,继培养时间每增加一代,染色体数目的变异幅度和变异频率就随之增加;不同品种之间的染色体数目变异即存在区别,又存在共同的变化趋势,即染色体数的变异率和变异幅度均随着继代次数的增加而增加,并认为细胞的不正常分裂是导致染色体变异的直接原因,而激素的使用、培养时间和继代次数的增加,也会使染色体变异程度加大。因此,育种者可以利用四倍体无性系变异进行快速繁殖,加快育种进程,而强调保持品种的优良形状不发生变异的时候,就要缩短继代次数,并切除愈伤组织,减少发生变异的可能性。

5 玻璃化现象

玻璃化现象是植物组织培养中常见的现象,甜瓜离体培养中也容易产生玻璃化现象,从而严重影响了成苗率。一般认为,不同的植物材料、外植体类型、生理状况和大小均与玻璃化的发生有关^[29-30]。郭启高等^[29]都在实验中观察到培养皿内结露、培养基质软、外植体侵入培养基的深浅、光照弱、湿度高、培养密度大等都会引发玻璃化现象的产生。褚剑峰^[31]等的研究表明,高浓度的盐酸盐是造成甜瓜子叶离体再生出现玻璃化的原因之一。金波^[30]等观察到,甜瓜种子在萌发后逐渐大量释放乙烯,2 d 时可达 $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,他们认为这也可能是甜瓜易发生玻璃化的原因之一。潘俊松^[7]等报道,适当提高糖浓度可有效减少甜瓜离体培养中的玻璃化现象。黄海良^[32]等的研究表明,培养基中浓度过高的 6-BA 可导致甜瓜组培中高频率的玻璃苗发生。目前对玻璃化发生的直接原因还没有明确的结论,一般的倾向认为是组培中的各种内外在因素引起的生理失调现象,对此问题还应深入研究。

6 甜瓜组织培养在生产中的应用

目前,甜瓜的组织培养主要应用于优良品种的快速繁殖以及运用生物技术手段进行种质创新,培育优质、高产的抗病新品种等遗传转化方面的研究。

6.1 优良品种快速繁殖及多倍体育种

近年来人们对甜瓜的要求逐渐提高,引进了一些国外优良品种如伊丽莎白、西博洛托等,但进口种子的昂贵价格等原因严重影响着优质甜瓜的生产。随着组织培养技术的日益成熟,人们已经用组织培养的方法来固定杂种优势,大量繁殖优质甜瓜种苗,现在已经建立了

许多优质甜瓜的高效离体再生体系^[2,4,21]。四倍体甜瓜具有许多优越性,诸如果实大、含糖量增加、果肉增厚等,而且甜瓜在离体培养中的四倍体变异率很高,因此可利用所获得的四倍体无性系变异进行快速繁殖,获得四倍体甜瓜^[9]。也可以将秋水仙素与组织培养相结合培育甜瓜四倍体,容易控制实验条件,同时可以提高诱导的成功率,减少嵌合体的现象,进一步发挥组织培养的优势,进行工厂化生产,满足市场需求。

6.2 遗传转化的研究

近年来,甜瓜病虫害日趋严重,尤其是病毒病,因而通过转基因技术增强植物抗性和改善植物品质是非常必要的。而经离体培养建立的高效再生体系有利于甜瓜的遗传转化和良种纯化等研究。甜瓜的基因遗传转化研究始于 20 世纪 80 年代末,Michigan 州立大学的 Fang 和 Grumet^[33]是最早报道用根癌农杆菌改良株系 LBA4404,并成功地将 NPTII 基因(抗卡那霉素基因)转入甜瓜品种。王慧中^[34]等以含选择标记基因 NPTII 和 WMV-1CP(西瓜花叶病毒)基因双元载体 pBEWMV 的根癌农杆菌 LBA4404 感染甜瓜子叶外植体,获得可育的转基因甜瓜植株。葛屹松^[8]等用根癌农杆菌将几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因导入新疆甜瓜子叶外植体中获得转基因甜瓜。张智俊^[35]等成功获得哈密瓜转 ACC 脱氨酶基因的再生植株。甜瓜中转入 ACC 合酶反义基因以抑制乙烯生成也已有成功的报道^[36]。

7 结语

经过 20 多年的发展,甜瓜的组织培养和植株再生的研究已取得了很大的进展^[1-3],高效的甜瓜离体培养再生体系对生产和未来育种工作来说,都有广阔的应用前景。同时,甜瓜离体培养技术也有待发展,不同基因型的高频再生体系的建立仍是研究的重要领域,而且目前仍存在一些问题:如何进一步提高甜瓜试管苗的繁殖系数和繁殖速度,以及如何降低繁殖的成本,将要进一步采取措施;在组培过程中,外植体的极性现象和敏感部位的差异虽然已有所研究,但其中的深层次原因尚待探讨;探明甜瓜四倍体和二倍体再生芽在形态或细胞学上的差异后,即可在早期确定四倍体再生芽,从而极大的提高鉴别四倍体的效率;甜瓜试管苗玻璃化现象也是一个有待解决的问题,应从其发病机理入手,使控制措施从治标走向治本;在遗传转化的研究上多选用的是哈密瓜和新疆甜瓜的生产用杂交种,材料范围较窄,外源基因种类少,应扩大试材和优良性状的目的基因,促进甜瓜转基因研究的深入和发展。相信随着研究者的不懈努力和探索,甜瓜的组织培养技术会更加成熟,应用前景会更加广阔。

参考文献

- [1] 邓向东,耿玉轩,路子显,等. 外植体和培养因子对哈密瓜不定芽诱

- 导的影响[J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 57-61.
- [2] 王建设, 陈杭. 甜瓜再生芽高效诱导方法的研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 339-340.
- [3] 陶兴林, 黄永红, 赵长增, 等. 厚皮甜瓜品种离体培养再生植株能力的基因型差异研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 252-255.
- [4] 于喜艳, 何启伟, 孔庆国. 甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 山东农业科学, 2002(2): 22-23.
- [5] Guis M, Roustan J P, Dogimont C, et al. Melon biotechnology[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1998, 15: 289-311.
- [6] Galperin M, Zelcer A, Kenigsbuch D. High competence for adventitious regeneration in the BU-21/3 melon genotypes controlled by a single dominant locus[J]. HortScience, 2003, 6: 1167-1168.
- [7] 潘俊松, 蔡润, 刘晓, 等. 甜瓜子叶节培养高效再生体系建立[J]. 上海交通大学学报(农业科学版) 2003, 21(4): 295-298.
- [8] 葛屹松, 赵晓琴, 李冠. 新疆甜瓜组培体系的优化及抗病转基因研究[J]. 新疆大学学报(自然科学), 2003, 20(1): 55-58.
- [9] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生体系的比较研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1999(2): 2-6.
- [10] 夏海武, 吕柳新, 夏天. “弥河银瓜”高效植株再生体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 235-238.
- [11] Leshem B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cultured melon cotyledon [J]. Journal of Plant Physiology, 1989, 135(2): 237-239.
- [12] Gray DJ, McColley DW, Compton ME, et al. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of Cucumis melo cultivars[J]. Amer Soc HortSci, 1993, 118(3): 425-432.
- [13] 李晓荣, 廖康, 王惠, 等. 哈密瓜转化植株的获得及移栽研究[J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(2): 29-33.
- [14] 张竞秋, 郝金凤, 方天祺, 等. 河套蜜瓜组织培养和再生植株比较研究[J]. 北方园艺, 2003(1): 52-53.
- [15] 于为常. 哈密瓜内源激素 IAA 的测定[R]. 中国科学院遗传研究所研究工作年报, 1990: 40-41.
- [16] 孙天国, 沙伟, 金忠民. 薄皮甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 北方园艺, 2005(2): 64-65.
- [17] 尹俊, 徐妙云, 贾小平, 等. 河套蜜瓜体胚发生及植株再生的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(6): 455-457.
- [18] Nakagawa H, Saijyo T, Yamauchi N, et al. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90 (1): 85-92.
- [19] Kintzios S, Sereti E, Bluchos P, et al. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2002, 21(1): 1-8.
- [20] 谢泽君, 林文丽. 海蜜 2 号厚皮甜瓜的组织培养和快速繁殖[J]. 中国蔬菜, 2003(6): 39-40.
- [21] 侯丽霞, 何启伟, 赵双宜, 等. 薄皮甜瓜自交系高效组织培养技术的研究[J]. 山东农业科学, 2006(3): 7-10.
- [22] Ezura H, Amagai H, Yoshioka K, et al. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant science, 1992, 85(2): 209-213.
- [23] Ezura H, Amagai H, Oosawa K. Efficient production of triploid melon plants by in vitro culture of abnormal embryos excised from dried seeds of diploid × tetraploid crosses and their characteristics[J]. Japan J breed, 1993, 43 (2): 193-199.
- [24] Ezura H, Kikuta I, Oosawa K. Production of aneuploid melon plants following in vitro culture of seeds from a triploid × diploid cross[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 38(1): 61-63.
- [25] Ezura H, Oosawa K. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1994, 14(2-3): 107-111.
- [26] Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT. Generating tetraploid watermelon and melon from tissue culture[J]. HortScience. 1990, 25(9): 73.
- [27] Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue culture of melons[J]. HortScience, 1994, 29: 689-692.
- [28] 谢丽琼, 王咏星, 刘晓颖, 等. 甜瓜组织培养过程中的染色体数目变异[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 59-62.
- [29] 郭启高, 宋明, 梁国鲁. 我国关于试管苗玻璃化现象的研究进展[J]. 西南园艺, 1999, 27(3): 3-5.
- [30] 金波, 东惠茹, 杨孝汗. 气体环境和光照对香石竹试管苗生长的影响[J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 389-393.
- [31] 褚剑峰, 郑琪, 林国美. 西瓜和甜瓜的组织培养技术研究. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1169-1170.
- [32] 黄海良, 赵国良, 高建刚. 杂种甜瓜组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2001(6): 57-59.
- [33] Fang G, Grumet R. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation and regeneration of muskmelon plants[J]. Plant Cell Rep. 1990, 9(3): 160-164.
- [34] 王慧中, 李亚南, 赵培洁. 根瘤农杆菌介导的甜瓜基因转化及其转基因植株的再生[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(3): 287-290.
- [35] 张智俊, 罗叔萍, 廖康. 抗生素对甜瓜植株再生的影响[J]. 中国西瓜和甜瓜 2002(1): 6-7.
- [36] 黄永红, 陶兴林, 陆璐, 等. 甜瓜 ACC 氧化酶反义基因植物表达载体的构建及转化烟草的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 262-268.

The Research Progress of Melon in Tissue Culture and the Application Prospect

QI Hong-Yan, JIA Zhuo-Nan

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, Engineering and Technology Center of Efficient Protected Agriculture, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: This paper introduced the latest achievements on tissue culture of melon domestic and abroad. The influence factors of tissue culture of melon, the phenomenon of variation of chromosomal number, vitrification, application of breeding and transgenic were summarized. Meanwhile, some problems have posed in this field and give a review on application prospect of tissue culture.

Key words: Melon (*Cucumis melo* L.); Tissue culture; Influence factor; Application prospect