

薄皮甜瓜自交系高效组织培养技术的研究

侯丽霞^{1,2}, 何启伟^{2*}, 赵双宜³, 王崇启², 董玉梅²

(1. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院蔬菜研究所, 山东 济南 250100;
3. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100)

摘要:以薄皮甜瓜自交系为试材,探讨了不同部位外植体、苗龄、激素组合等因素对植株离体再生的影响。其结果是以4~6日龄的无菌苗的子叶柄、下胚轴上端外植体适于不定芽的较高频率分化;两种外植体分化存在明显极性现象,近生长点处为感受外源激素的敏感部位;MS、6-BA 1.5~2.5 mg/L、ZT 1.0~3.0 mg/L、NAA 0.1~0.2 mg/L之间配比适于不定芽的分化,分化率达60%~70%;MS+KT 1.5~2.5 mg/L+GA 2.0 mg/L利于丛生芽的伸长生长;高效生根培养基为MS+IBA 1.0 mg/L。

关键词:薄皮甜瓜;自交系;组织培养

中图分类号:S652;Q813.1+2 文献标识码:A 文章编号:1001-4942(2006)03-0007-04

Study on Efficacious Tissue Culture Techniques of Thin-skin Muskmelon Inbred Line

HOU Li-xia^{1,2}, HE Qi-wei^{2*}, ZHAO Shuang-yi³, WANG Chong-qi², DONG Yu-mei²

(1. Horticulture College of Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. Vegetable Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

3. Life Science College of Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract The thin-skin muskmelon inbred lines were used to study the effects of explants, seedling age, and hormones on plant in vitro regeneration. The results showed that the cotyledon petiole and hypocotyls of 4~6 days seedlings had higher differentiation frequency of adventitious buds. And polarity occurred obviously during explants differentiation, the sensitive regions were near the growing point. The MS media with 6-BA 1.5~2.5 mg/L, ZT 1.0~3.0 mg/L, NAA 0.1~0.2 mg/L was suitable for differentiation of adventitious buds, with the differentiation rate 60%~70%. And the better enlongation media was MS+KT 1.5~2.5 mg/L+GA 2.0 mg/L while the high efficiency rooting media was MS+IBA 1.0 mg/L.

Key words Thin-skin muskmelon; Inbred line; Tissue culture

植物组织培养技术是植物细胞工程和基因工程的关键技术之一,在科学研究和农业生产中已广泛应用。甜瓜(*Cucumis melo* L.)作为葫芦科(Cucurbitaceae)植物中一种重要的园艺作物,其离体培养的再生体系研究较多^[1],目前已经能够通过子叶、真叶、带芽茎段、茎尖、胚轴等多种外植体诱导出再生植株^[2~4]。从有关报道来看,成功建立再生体系的甜瓜材料多为厚皮甜瓜杂交种^[5~8],且不同品种、不同部位、不同培养条件下

外植体再生能力、频率存在很大差异^[9,10]。本试验以薄皮甜瓜自交系为材料,对影响组织再生的主要因素进行深入研究,建立适于薄皮甜瓜自交系遗传转化的快速高效再生系统,为瓜类作物快速繁殖、种质资源保存和创新等提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2006-02-21

作者简介:侯丽霞(1970-),女,博士研究生,研究方向:蔬菜育种。*通讯作者

“鲁薄1号”(自交系),山东省农业科学院蔬菜研究所甜瓜课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 分别挑选100粒饱满、芽率高的甜瓜种子消毒:流水冲洗1~1.5 h,无菌条件下用70%酒精浸泡1 min,0.1%升汞消毒10 min,无菌水冲洗4~5次。基本培养基为MS(蔗糖30 g/L,琼脂8.5~9.0 g/L,pH=5.8,以下同),灭菌后使用。

培养方法:A种子消毒后接种;B种子剥去种皮后消毒接种;C种子消毒后转入灭菌平皿,封口后置于30℃恒温催芽箱2~3天,萌发后剥去种壳接种。

培养条件:光照强度为2500 lx,温度(25±0.2)℃,光照时数14 h/d。

1.2.2 外植体的制备 选取不同日龄生长正常、大小一致的无菌苗,外植体为1/4子叶柄、2/3子叶块并切除子叶块边缘、下胚轴(自上而下按0.5~0.8 cm切段,分别为下胚轴1、下胚轴2、下胚轴3、下胚轴4)。子叶、子叶柄表面上接种,胚轴两端斜切接种。

1.2.3 培养基组成 基本培养基为MS、Miller,根据不同培养阶段需要分别添加6-BA、NAA、ZT、KT、2,4-D、GA。灭菌后接种,培养条件同无菌苗培养,10~12天继代1次。筛选适于愈伤诱导、不定芽分化及伸长生长的培养基。

1.2.4 试管苗的生根与移栽 生根基本培养基为MS₀、MS₁(MS+IAA 1.0 mg/L)、MS₂(MS+IBA 1.0 mg/L)、MS₃(MS+NAA 1.0 mg/L)。试管苗3~4片叶时转入生根培养基,一部分置于暗条件,25℃培养3天,移到正常光照条件下培养;一部分正常光条件下培养。2周后调查生根情况。生根植株开瓶在培养箱内炼苗2天,室内炼苗2天,小心冲洗干净根部培养基,移到灭菌的蛭石中,保湿培养。一周后移到定植场所炼苗7天,然后定植,进入正常田间管理。

2 结果与分析

2.1 不同培养方法对无菌苗生长质量的影响

利用A、B、C三种培养方法获得了质量、数量不同的无菌苗,提供的外植体在培养过程中愈伤分化率存在差异。方法A:种子发芽慢,芽率低。在培养过程中“戴帽”现象严重,培养时间过长,污染严重,无菌苗可利用率为28%,愈伤诱导率为44.8%,且愈伤组织发生晚、膨大速度慢、易褐化。

方法B:发芽较快,芽率较高,但种膜包裹子叶,子叶不能充分展开,叶面不平,无菌苗易徒长,可利用率为64.0%,愈伤诱导率为63.1%。方法C:催芽播种,无菌苗生长快速、整齐,叶片平展、肥厚,下胚轴粗壮,优良无菌苗利用率93%,愈伤诱导率为90.3%,且愈伤质量好,组织紧密,颜色绿,较易产生不定芽。

2.2 不同日龄无菌苗对丛生芽诱导分化的影响

无菌苗苗龄是外植体再生分化的关键因素之一。分别制备2、3、4、5、6、7、8、9、10日龄的子叶柄、下胚轴1,子叶柄接种在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上,下胚轴1接种在Miller+ZT 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基上,结果见图1、2。

不同日龄子叶柄、下胚轴1愈伤组织诱导率均很高,达96%~100%,而不定芽的分化率存在较大差异。子叶柄均能分化不定芽,但日龄不同影响其分化能力。4、5日龄子叶柄不定芽分化率最高,接近70%,6日龄不定芽分化率为47.6%,其他日龄无菌苗的子叶柄分化率低于20%。下胚轴1的不定芽分化率明显低于子叶柄,4、6日龄的下胚轴分化率为13.3%、12.4%,其次为5日龄分化率10.7%,7日龄分化率6.3%,其他日龄下胚轴均不能进行不定芽的分化。由此可见,日龄对外植体愈伤组织的诱导影响不明显,选择4~6日龄的无菌苗子叶柄是较为理想的外植体。

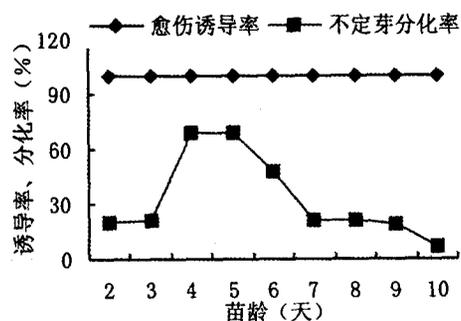


图1 苗龄对薄皮甜瓜子叶柄愈伤诱导率和不定芽分化率的影响

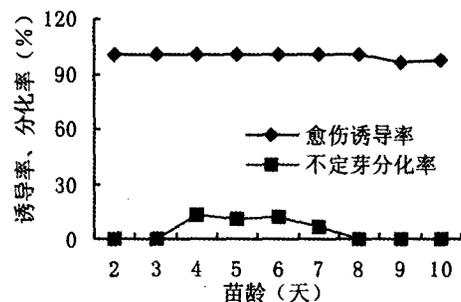


图2 苗龄对薄皮甜瓜下胚轴1愈伤诱导率和不定芽分化率的影响

2.3 外植体培养过程中的极性分化

研究表明,甜瓜无菌幼苗任何部位都可作为外植体进行诱导分化,但不同外植体分化诱导结果差别很大^[3]。通过对4日龄无菌苗不同部位外植体培养,结果(表1)表明:各部分外植体均能高频率地诱导出愈伤组织,诱导率达96%~100%,但愈伤组织发生早晚、大小不同,发生快慢依次为子叶柄→子叶→下胚轴1→下胚轴4→下胚轴2→下胚轴3。且子叶、子叶柄下端愈伤发生比上端快、早,胚轴1、2、3上端愈伤膨大早,胚轴4下端愈伤发生早、膨大快,且有不定根发生。

各种外植体均能诱导愈伤,但不定芽的分化存在较大差异,只有部分子叶柄和下胚轴1能产生不定芽,分化率分别为63.3%、11.3%。其他部分愈伤逐渐褐化、玻璃化,最终不能继续分化而死亡。另外,子叶柄和下胚轴1不定芽分化存在明显的极性,只有在近生长点部位能脱分化产生不定芽,而远生长点端只能生成愈伤组织。

表1 不同部位外植体的愈伤组织和不定芽诱导率 (%)

外植体	接种块数	愈伤块数	愈伤组织诱导率	不定芽数	不定芽分化率	不定芽产生部位
子叶	200	200	100.0	0	0	
子叶柄	200	200	100.0	82	63.3	下端,近生长点
下胚轴1	100	98	98.0	9	11.3	上端,近生长点
下胚轴2	100	98	98.0	0	0	
下胚轴3	100	98	98.0	0	0	
下胚轴4	100	96	96.0	0	0	

2.4 激素及其配比对愈伤及不定芽分化的影响

培养基组成直接影响外植体分化、脱分化,决定愈伤发生时间、生理状态、外观质量及以后的发育方向。将子叶柄、下胚轴1接种在添加不同浓度、不同组合的6-BA(0~5.0 mg/L)、ZT(0~5.0 mg/L)、KT(0~5.0 mg/L)、2,4-D(0~5.0 mg/L)、NAA(0~0.2 mg/L)培养基中。调查结果发现,以MS、Miller为基本培养基,添加以上不同浓度的激素时,均能诱导2种外植体发生愈伤组织。添加2,4-D愈伤组织易生根,生根率为44%,浓度达3.0 mg/L以上时明显促进发根,且不定芽发生晚,生长缓慢。若继续在添加2,4-D的培养基中生长时,愈伤组织褐化,不定芽失绿死亡。添加KT少量愈伤组织生根,生根率为9.3%,不定芽发生早,生长速度快。接种10天左右,叶柄近生长点部位可见大量绿色小突起(芽点),20~22天有大量真叶分化。KT浓度高

于1.5 mg/L诱导不定芽,植株发育畸形,多茎并生、扁宽,生长点、茎节不明显,KT 0.5~1.5 mg/L较适于薄皮甜瓜不定芽的分化。ZT诱导愈伤组织生长良好,无生根现象,但高于3.5 mg/L易导致愈伤玻璃化。ZT 1.0~3.0 mg/L培养基愈伤组织紧密、鲜绿,不定芽分化率为57.3%。6-BA 1.5~2.5 mg/L或与NAA组合的培养基外植体生长良好,子叶柄不定芽分化率为65.8%。Miller+ZT 2.5~3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L适于下胚轴1不定芽的分化,其分化率为9.7%。

2.5 激素对丛生芽伸长生长的影响

通过子叶柄诱导的不定芽丛较密集,由于个体分化早晚和长势强弱不同,使一部分不定芽不能正常伸长,最终玻璃化或污染死亡,大大降低了不定芽的成苗率。因此,将不定芽及时切下,转入到适宜的培养基中,可以提高成苗率,获得质量高的试管苗,缩短培养时间,促进其他不定芽的正常生长。

由表2可以看出,不定芽在高浓度的6-BA中生长较快,14天左右可进行生根培养,成苗率30%左右,试管苗易玻璃化。低浓度6-BA的培养基不定芽生长速度慢,成苗率较高,可达到45.2%,但试管苗老化,发根晚,生长缓慢。添加KT有利于不定芽的生长,成苗率高达70%左右,成苗天数略有延迟,约17~23天。低浓度(0.5 mg/L)KT中不定芽生长较慢,植株趋向老化。高浓度(3.5 mg/L)KT危害植株,生长点及新生叶变褐、枯萎。KT 1.5~2.5 mg/L适于不定芽伸长生长,试管苗生长健壮,易于生根驯化,成活率较高。

表2 不同培养基对不定芽伸长生长的影响

基本培养基	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	GA (mg/L)	成苗天数(天)	成苗率(%)	外部形态
MS	0.5		2.0	21	45.2	茎粗,叶浓绿、厚,节间短
MS	1.5		2.0	19	33.3	茎较粗,叶微黄绿,节间适中
MS	2.5		2.0	14	33.8	玻璃化
MS	3.5		2.0	14	30.4	全株玻璃化
MS		0.5	2.0	23	70	茎粗,叶浓绿、厚,叶片数多,节间短
MS		1.5	2.0	19	63.8	茎粗,叶绿,节间适中
MS		2.5	2.0	17	65.3	茎粗,叶绿,节间适中
MS		3.5	2.0	17	73.5	生长点、新生叶变褐、枯萎

2.6 薄皮甜瓜瓶苗的生根及移栽

薄皮甜瓜再生植株较易生根,且生根速度快,10天左右肉眼可见,但不同培养基发根快慢不同,以IAA最快,其次是IBA、NAA、MS₀。由图3可以看出,试管苗在MS₀培养基中生根率较

低,添加生长素可提高试管苗的生根率。生根培养前期进行短时间的暗培养,不能提高试管苗生根率,这与柏新福^[10]等人的研究结果不一致。但在添加 IAA 的培养基中,暗培养后略提高了试管苗的生根率,可能受到 IAA 极性运输的影响。不同生长素对薄皮甜瓜瓶苗生根影响较大,添加 IAA 1.0 mg/L 的培养基中植株根系发生最早,第 8 天可见细嫩的幼根。而移栽时 IAA 培养基中根系细长、根量少、根毛较短。IBA 1.0 mg/L 生根效果最好,暗处理和正常培养条件下生根率均最高,分别达到 87% 和 73%。且植株根系发达、粗壮,根量多,叶片浓绿,茎较粗,生长势强。添加 NAA 1.0 mg/L 培养基植株下端易形成愈伤组织,在膨大的愈伤周围发根,不利于试管苗的驯化移栽,成活率低。

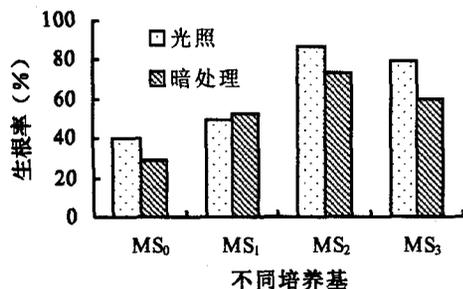


图 3 不同处理、不同培养基对试管苗生根的影响

3 讨论

薄皮甜瓜自交系外植体诱导愈伤和不定芽分化的过程中,无菌苗质量、苗龄、外植体部位、培养基组成、环境条件等均为影响因素。

3.1 外植体的生理状态影响着内部细胞的分裂分化方向,优良无菌苗可提供好的外植体,有利于后期愈伤和不定芽的高频率分化。本研究利用 3 种方法培养无菌苗,以种子消毒—无菌暗催芽—播种—无菌苗为最好,更适合一些种子稀少、珍贵的植物组织培养利用。

3.2 通过对 2~10 日龄无菌甜瓜苗的子叶柄、下胚轴 1 的研究,苗龄对外植体的愈伤诱导率影响较小,而对不定芽分化影响较明显。4~6 日龄无菌苗子叶柄、下胚轴不定芽的分化率最高,幼龄无菌苗的外植体分化率高于大龄苗。另外,通过对子叶、子叶柄、下胚轴 1、2、3、4 的诱导培养发现,只有在近生长点部位能得到不定芽,且子叶比胚轴更容易诱导愈伤和不定芽。这说明,薄皮甜瓜外植体的生理状态决定芽分化的敏感程度,生长旺盛部位敏感度深。极性分化可能是因此部位内源激素物质含量丰富,自身细胞分裂能力强,它

们易与外源激素共同作用,利于细胞全能性的充分发挥。

3.3 对甜瓜外植体再生培养中附加激素组合及配比有较多研究,但不同试验结论不完全一致,重复性较差。通过对薄皮甜瓜自交系不同部位外植体适宜的培养基筛选发现,基本培养基对甜瓜再生的影响不大,激素种类、浓度及激素间的组合决定外植体的分化再生。培养前期可选用低浓度的 2,4-D,当发生愈伤和不定芽点后,应及时更换无 2,4-D 培养基。KT 分裂能力较强,促进外植体分化过程中易发生多茎共生,但当不定芽分化完成以后,可添加 1.5~2.5 mg/L 的 KT 促进不定芽的伸长生长。6-BA、ZT、NAA 是薄皮甜瓜较为理想的选择激素。

3.4 在进行甜瓜离体再生研究过程中,作者同时对 2 个厚皮甜瓜自交系材料进行了试验,只获得了大量的愈伤组织,没有继续分化得到不定芽。而一些对厚皮甜瓜成功的再生研究选用的多为杂交种,这充分说明了甜瓜植株诱导再生受到外植体基因型的显著影响。对厚皮甜瓜自交系的组织培养技术,将继续开展研究,以便为建立厚皮甜瓜再生和遗传转化体系奠定理论基础。

参 考 文 献:

- [1] Guis M, Roustan J P, Dogimont C, et al. Melon biotechnology[J]. Biotech. Genet. Eng. Rev., 1998, 15: 289-311.
- [2] 夏海武, 马秀兰, 万永霞. 甜瓜组织培养与快速繁殖的研究[J]. 山东农业科学, 2001, 2: 23-24.
- [3] 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.
- [4] 赵月玲, 夏海武. 甜瓜组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1999, 10: 377.
- [5] 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.
- [6] 殷丽青, 张建军, 张智奇, 等. 杂种甜瓜的离体快速繁殖[J]. 上海农业学报, 1999, 15(3): 28-31.
- [7] 朱新霞, 乐锦华. 厚皮甜瓜的离体培养植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(2): 131.
- [8] 周素平, 王广东, 王湘军, 等. “春丰 1 号”厚皮甜瓜的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 301-302.
- [9] 马国斌, 王 鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 128-130.
- [10] 柏新富, 赵建萍, 孙红梅, 等. 厚皮甜瓜试管苗生根技术研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2001, 3: 14-16
- [11] 宋莉英, 谭 净, 高 峰, 等. 我国葫芦科植物离体培养研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(3): 360-366
- [12] 马国斌, 王 鸣, 郑学勤. 西瓜和甜瓜组织培养中外植体的极化现象和敏感部位[J]. 果树科学, 1999, 16(3): 232-234.
- [13] Leshem B. Polarity and responsive regions for regeneration in the cultured melon cotyledon[J]. Journal of Plant Physiology, 1989, 135(2): 237-239.