

利用秋水仙素组培技术诱导四倍体西瓜的研究

周谟兵 林友毫 彭金光 孙玉宏 曾红霞

目前,国内外育种家就无籽西瓜育种进行过多方面的探索,但最常用且可行的技术仍然是用二倍体西瓜诱变出四倍体后再与二倍体杂交形成三倍体无籽西瓜。目前选育四倍体西瓜的方法主要有两种:一是利用二倍体西瓜诱变四倍体,其方法有物理的(包括各种射线、异常温度、高速离心、高压等)和化学的(利用药剂如秋水仙素、吲哚乙酸、有机磷制剂等)。最有效且经常被采用的是秋水仙素,目前在西瓜上主要采用浸种法、滴苗法、涂抹法以及芽苗倒浸法等,但这几种诱变方法成功率低,一般为1%左右,且易形成嵌合体。二是通过四倍体品种间的杂交选择优良四倍体,但四倍体杂种的稳定需较多的年限和较大的群体,耗费大量的人力、物力和土地资源。本试验旨在通过利用秋水仙素组培来探索诱导西瓜四倍体的高效方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

二倍体西瓜品种黑皮红肉 D2001(A)和克伦生花皮红肉(B),由本所西甜瓜研究室提供。

1.2 试验方法

①外植体的准备 将二倍体西瓜种子去壳,种胚经消毒后接种到 1/2 MS 培养基中培养无菌苗。取培养 5 天左右的无菌苗,距子叶约 0.5 cm 处切去下胚轴,保留带子叶的上胚作为外植体。

②秋水仙素处理 秋水仙素加入培养基处理法:将外植体转入含秋水仙素浓度分别为 100,500,1 000,1 500,2 000 mg/L 的诱导培养基中,分别处理 2,4,6,8,10 天。处理完毕后,转入不含秋水仙素的分化培养基 MS+3.0 mg/L 6-BA+250 mg/L LH 中进行分化培养。

秋水仙素溶液浸泡处理法:将上述外植体放入 100,500,1 000,1 500,2 000 mg/L 的秋水仙素水溶液中分别处理 24 h,48 h,72 h 取出,无菌水冲洗 3~5 次后转入不含秋水仙素的分化培养基 MS+3.0 mg/L 6-BA+250 mg/L LH 中进行分化培养。

③倍性鉴定和诱导率的统计 将上述分化的不定芽丛切成单芽,转入生根培养基中诱导生根,待根长为 0.5~1 cm 时,取根尖用无菌水冲洗 3~4 次后再用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理 3 h,再用卡诺氏固定液(乙醇:冰乙酸=3:1)室温下固定 24 h,经蒸馏水洗涤后,用 1 mol/L 的盐酸在 60℃恒温水解 10~12 min,蒸馏水洗净后用卡宝品红染色 5 min 后压片,显微镜检、拍照,观察其中含四倍体的株数,计算诱导率(诱导率=四倍体株数/外植体数×100%)。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素加入培养基对四倍体诱导的影响

由表 1 可知,培养基中添加不同浓度的秋水仙素和处理不同的时间对西瓜四倍体的诱导均有一定的效果,其中 500 mg/L 处理 10 天,1 000 mg/L 处理 6 天、8 天,1 500 mg/L 处理 4 天、6 天、8 天,6 个组合均能得到较高的诱导率,以 1 000 mg/L 处理 6 天的诱导率最高,为 55%。

秋水仙素浓度为 1 000~1 500 mg/L 时,诱导率随着剂量的升高而增加,秋水仙素浓度超过 1 500 mg/L 时,诱导率反而有所下降,而且随着秋水仙素浓度的增长,对细胞的伤害也增加,对不定芽的分化影响非常大。

秋水仙素浓度为 100~500 mg/L 时,随着处理时间的延长,诱导率逐渐升高,但是秋水仙素浓度达到 1 000~2 000 mg/L 时,随着时间的延长,诱导率反而降低。因为在低浓度的秋水仙素处理下,由于对细胞的伤害作用不严重,所以诱导率逐渐升高;而在高浓度的秋水仙素处理下,细胞受毒害的

周谟兵,武汉市农业科学研究所,湖北武汉,430051

林友毫,彭金光,孙玉宏,曾红霞,武汉市农业科学研究所

收稿日期:2007-01-05

表 1 秋水仙素加入培养基处理对西瓜四倍体诱导的影响

处理浓度 mg/L	处理时 间/天	处理外 植体数	受害外 植体数	四倍体株数		平均诱 导率/%
100	2	100	0	13	11	12
	4	100	0	23	27	25
	6	100	0	30	32	31
	8	100	1	33	35	34
	10	100	1	34	36	35
500	2	100	0	33	31	32
	4	100	0	38	34	36
	6	100	0	42	36	39
	8	100	1	40	38	39
	10	100	1	43	41	42
1 000	2	100	0	39	31	35
	4	100	1	50	50	50
	6	100	2	55	55	55
	8	100	3	48	50	49
	10	100	3	38	42	40
1 500	2	100	0	41	45	43
	4	100	3	52	53	52.5
	6	100	4	46	47	46.5
	8	100	4	49	49	49
	10	100	5	46	48	47
2 000	2	100	1	43	45	44
	4	100	3	46	44	45
	6	100	5	39	38	38.5
	8	100	5	37	35	36
	10	100	6	35	34	34.5

表 2 秋水仙素浸泡处理对西瓜四倍体诱导的影响

处理浓度 mg/L	处理时间/ h	处理外 植体数	受害外 植体数	四倍体 株数	诱导率 %
100	24	200	0	28	14
	48	200	4	32	16
	72	200	5	40	20
500	24	200	3	38	19
	48	200	6	44	22
	72	200	7	56	28
1 000	24	200	5	64	32
	48	200	8	70	35
	72	200	12	66	33
1 500	24	200	9	58	29
	48	200	11	50	25
	72	200	14	48	24
2 000	24	200	10	42	21
	48	200	14	52	26
	72	200	16	38	19

作用严重,时间的延长,更加剧这种伤害程度,从而导致诱导率降低。

2.2 秋水仙素液浸泡对西瓜四倍体诱导的影响

秋水仙素溶液浸泡处理法也可以得到一定频率的四倍体,由表 2 可知,四倍体出现的频率随处理浓度的升高和处理时间的延长而增加,但诱导率较秋水仙素加入培养基处理法低。以处理浓度为 1 000 mg/L、处理时间 24 h 的组合效果最好,能得到 35% 的诱导率。继续升高浓度和延长时间时加倍效果呈下降趋势。秋水仙素溶液浸泡处理对细胞组织的伤害更大,以致转接到不定芽分化培养基中培养时更难获得不定芽。

3 讨论

利用秋水仙素进行染色体加倍具有经济、方便、诱导作用专一性强的特点。但是,人们在研究中发现,以往采用浸种和滴涂生长点的方法,是在整体水平上染色体加倍的诱导,受环境干扰大,易产生嵌合体,并可能发生回复突变,随着组培技术的发展,很多物种通过组培再生植株,已经不存在障碍。因此应用组培技术进行多倍体育种成为可能,且具有容易控制实验条件和重复实验结果、提高工作效率、减少嵌合体三大优势。

经细胞染色体鉴定表明:采用秋水仙素加入培养基处理法和秋水仙素溶液浸泡处理法都可获得一定频率的四倍体。从试验结果看,诱导西瓜四倍体较好的方法是将浓度为 1 000 mg/L 的秋水仙素加入到培养基中处理 6 天,再接种到不含秋水仙素的培养基中使其分化成苗,四倍体的诱导率平均可达到 55%。

参考文献

- [1] 谭素英,黄秀强,刘济伟.提高西瓜四倍体诱导率的研究.华北农学报,1993,8(4):12~15
- [2] 房超,林德佩,张兴平,等.西瓜多倍体育种新方法.中国西瓜,1996(4):12~15
- [3] Compton ME, D J Gray G W Elmstrom. A simple protocol for micropagating diploid and tetraploid watermelon using shootip explant[J]. Plant Cell ,Tissue and Organ Culture , 1993(33): 211~217
- [4] Zhang XP, Rhodes B B, Adelberg J W. Shoot regeneration from immature cotyledons of watermelon. Cucurbit Genet Coop Rep.,1994(17): 111~115
- [5] 秦金山,王莉,牛德水,等.枸杞同源四倍体新物种类型的建立.遗传学报,1985,62(3):200~203