

文章编号:1001-4829(2008)05-1373-05

小西瓜茎尖离体再生体系的建立

刘独臣,房超,刘小俊,梁根云,李跃进*

(四川省农科院园艺研究所,四川 成都 610066)

摘要:以茎尖为外植体,进行小西瓜离体快繁研究,建立了小西瓜茎尖再生体系。结果表明:小西瓜种子发芽的最适培养基为 2FeMS;最适茎尖丛芽诱导培养基为 $MS_1 + BA 1 \sim 2 \text{ mg/L} + IAA 0.01 \text{ mg/L}$,增殖系数高;最适继代培养基为 $MS_4 + BA 0.2 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L}$;不定芽在培养基 $1/2MS + 0.05 \text{ mg/L IAA}$ 上生根良好。

关键词:小西瓜;组织培养;快繁

中图分类号:S651 **文献标识码:**A

Establishment of the shoot-tip culture system in vitro in miniwatermelon

LIU Du-chen, FANG Chao, LIU Xiao-jun, LIANG Gen-yun, LI Yue-jian*

(Horticulture Research, Institute; Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China)

Abstract: The techniques of tissue culture and rapid propagation in vitro on miniwatermelon were studied by using shoot-tip as explants. A good culture system for miniwatermelon was established. The results showed the optimal germination medium was 2FeMS, the optimized induction medium for shoot-tip was $MS_1 + BA 1 \sim 2 \text{ mg/L} + IAA 0.01 \text{ mg/L}$, in which the propagation ratio was high. The suitable medium of subculture was $MS_4 + BA 0.2 \text{ mg/L} + NAA 0.05 \text{ mg/L}$, and the rooting medium was $1/2MS + 0.05 \text{ mg/L IAA}$.

Key words: small-sized watermelon; shoot-tip culture in vitro; regrowth system

小西瓜又称袖珍西瓜、迷你西瓜,是夏季高档礼品瓜,果型美观小巧,肉质细嫩多汁,薄皮少纤维,含糖量高达 11% 以上。近年来,随着人们生活水平的提高以及家庭小型化和旅游业的发展,小西瓜作为一种新颖的西瓜优良新品种,因为其个小,携带方便,适合一次性食用的突出优点,逐渐被广大消费者接受,市场前景广阔,经济效益可观,现已经成为高效农业项目之一^[1]。但目前小西瓜品种主要依赖进口,种子价格很高,有籽食用不便,所以育成无籽小西瓜是目前育种单位的一个重要目标,采用离体诱变西瓜四倍体因处理对象增殖迅速,容易控制实验条件和诱变率高,能使加倍、选择、快繁同时进行,可克服细胞嵌和体现象等优点^[2],受到越来越多人认同。目前小西瓜组织培养快繁技术研究的报道还很少。本试验通过对小西瓜茎尖离体培养的一系列

影响因子进行了较为系统和全面的研究,旨在通过小西瓜茎尖再生体系的建立,为组织培养诱导四倍体,育成无籽小西瓜提供基础条件和方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

四川省农科院园艺研究所蔬菜室培育的小西瓜杂交组合品系,品种编号为 W2、W3。

1.2 方法

1.2.1 外植体的获得 先用清水搓洗小西瓜种子,然后用 2.5% 次氯酸钠 ($NaClO$) 溶液加 1 滴 Triton X-100 表面消毒 30 min,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,无菌水浸泡 10 h,超净工作台上去壳后,用 75% 酒精消毒 0.5 min,转入 0.5% 的 $NaClO$ 溶液加 1 滴 Triton X-100 表面消毒 10 min,无菌水洗 5 ~ 6 次,将种子用滤纸吸干水后,9 粒/瓶接种到 4 种 ($1/2MS$ 、 MS_2 、 $2FeMS$ 、0.6% 琼脂) 发芽培养基上,暗培养 2 ~ 3 d,胚根伸出约 0.5 cm 转光照培养,取 8 d 左右苗龄的茎尖为外植体。

1.2.2 不定芽的诱导 将外植体茎尖接种到诱导

收稿日期:2008-02-28

基金项目:四川省财政育种攻关资金项目(2006YZGG05-10)资助

作者简介:刘独臣(1977-),女,四川达县人,硕士,主要从事蔬菜遗传育种工作,*为通讯作者。

表 1 外植体萌发的情况
Table 1 Germination of explants

品种编号 Varitey No.	培养基 Media	发芽率(%) Germination rate	8 d 苗龄无菌苗形态描述 Morphology of aseptic seedling on 8 d
W2	1/2MS	80.0	子叶半展开,未见新叶
	MS	75.0	子叶半展开,未见新叶
	2FeMS	89.0	子叶平展,一片新叶
	0.6% 琼脂	94.5	子叶未展开
W3	1/2MS	90.7	子叶展开,未见新叶
	MS	80.0	子叶展开,未见新叶
	2FeMS	92.0	子叶平展,一片新叶
	0.6% 琼脂	100.0	子叶未展开

培养基(d1~d8)上,诱导培养以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、吲哚乙酸(IAA)、硫酸腺嘌呤(Ad),琼脂 0.6%,蔗糖 3%。培养温度为(25±2)℃,光照强度 1500~2000 lx,光照 14 h·d⁻¹。每处理接种 45 个外植体,3 次重复,培养 15 d 后统计外植体丛芽诱导率,观察不定芽诱导的分化情况。

1.2.3 丛芽继代培养 获得的不定芽接种于继代增殖培养基(C1~C3)上培养,继代培养以改良 MS 为基本培养基添加不同浓度的 BA 和 NAA。每个处理接种 30 个外植体,继代时间 15 d,继代 3 次后统计增殖倍数。

1.2.4 伸长培养 生根前,将从生苗接种于伸长培养基(L1、L2)上,每个处理接种 30 个,培养 12 d 后

统计有效伸长苗数。
1.2.5 生根和移栽 将生长健壮的芽苗切割接入生根培养基(R1~R5)中,每处理接种 60 个无根单苗,15 d 后统计生根率,观察生根情况。将生根良好的壮苗开瓶炼苗 1~2 d,洗净根系培养基,移栽到营养钵中。

2 结果与分析

2.1 发芽培养基的选择

W2 和 W3 在 1/2MS、MS、2FeMS、0.6% 琼脂 4 种发芽培养基中暗培养 1 d 后在 0.6% 琼脂上最先萌发,依次为 1/2MS、MS、2FeMS。

从表 1 可以看出,W2、W3 在 0.6% 琼脂上发芽率最高,可达 94.5%、100%。但是转到光照培养

表 2 不同培养基对茎尖丛生芽诱导和增殖的影响
Table 2 Effects of different media on bud induction and multiplication of stem tip

品种编号 Variety No.	代号 Code	基本培养基 Basic media	植物生长调节剂(mg·L ⁻¹) Plant growth regulators			诱导率(%) Induction rate of bud	增殖率(%) Multiplication rate of bud
			BA	IAA	Ad		
W2	d1	MS	1	0.01		70.3	1.5
	d2	MS	2		5	73.5	3.2
	d3	MS	2	0.01		71.6	4.3
	d4	MS	3	0.01		80.1	3.4
	d5	MS	5		5	81.0	2.0
	d6	MS1	1	0.01		97.5	5.8
	d7	MS1	2		5	98.1	5.4
	d8	MS1	2	0.01		100.0	6.2
W3	d1	MS	1	0.01		73.6	3.0
	d2	MS	2		5	88.3	4.2
	d3	MS	2	0.01		90.9	3.7
	d4	MS	3	0.01		89.1	3.5
	d5	MS	5		5	76.4	2.6
	d6	MS1	2	0.01		98.2	6.5
	d7	MS1	2		5	100.0	5.9
	d8	MS1	1	0.01		100.0	5.6

表 3 不同培养基对 W2 丛生芽继代和伸长的影响
Table 3 Effects of different media on bud subculture and elongation

代号 Code	基本培养基 Basic media	植物生长调节剂 Plant growth regulators (mg · L ⁻¹)				增殖率 (%) Multiplication rate of bud	伸长率 (%) Elongation rate of bud
		KT	BA	IAA	NAA		
C1	MS ₂		0.2		0.05	5.5	
C2	MS ₃		0.5		0.05	5.3	
C3	MS ₄		0.2		0.05	6.5	
L1	MS	0.2		0.01			54
L2	MS ₄	0.2		0.01			97

后,材料在 0.6 % 琼脂上生长缓慢,子叶展开困难,新叶生长缓慢,在分化培养基上分化丛芽的能力差。在 2FeMS 培养基上种子发芽率不及在 0.6 % 琼脂上,只有 89.0 % 和 92.0 %,但是培养 7 ~ 8 d 后,无菌苗子叶平展,有一片新叶出现,生长势旺盛,在分化培养基上丛生芽诱导效果最好。

2.2 丛生芽的诱导与增殖

取 7 ~ 8 d 苗龄,子叶刚刚转绿的茎尖,带子叶接种到不同的丛生芽诱导培养基中进行丛生芽的诱导。试验表明,在以 MS 为基本培养基的诱导培养基上,W2、W3 的诱导率和增殖率都很低,而且丛生芽很容易玻璃化。试验中对 MS 进行改良,把氮素含量降低 1/3,铁盐提高到 1.5 倍,形成改良 MS₁,诱导率和增殖率都大大提高。接种后一周后,去除子叶转接 1 次,分化才能正常进行,否则外植体愈伤化,增殖率很低。

从表 2 可以看出,基因型不同,不定芽诱导率存在差异,各基因型最适诱导培养基也不同,W2 的最适诱导培养基是 d8,增殖率为 6.2。W3 的最适诱导培养基是 d6,增殖率为 6.5。试验表明,BA 是在小西瓜丛生芽诱导中不可缺少,BA 浓度过高会促进试管苗的玻璃化,BA 与 IAA 的配合使用对促进不定芽的产生有促进作用,BA 和 IAA 的有效作用浓度

为 1 ~ 3 和 0.01 mg/L。添加 Ad 对丛生芽诱导用不明显。这与前人在研究三倍体无籽西瓜离体培养时硫酸腺嘌呤对 BA 诱导丛生芽有增效作用的实验结果不符^[3]。

2.3 丛生芽继代和伸长

W2 在芽诱导培养基上培养 4 代后,丛生芽的增殖能力下降,基部容易出现大团愈伤,芽分化能力减弱,玻璃化现象严重。这时及时转接到继代培养基 C 系列上,可以有效防止丛生芽玻璃化,使其恢复增殖能力。从表 3 可以看出,小西瓜在继代培养基 C3 (改良 MS₄ + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.05 mg/L) 上,增殖倍数可达 6.5,与诱导培养基的作用基本相当。试验表明,最佳继代时间为 15,15 d 后不及时继代,试管苗玻璃化和黄化率都有所提高。

切取丛生芽直接生根,由于丛生芽比较弱小,不易直接生根,生根后移栽成活率也很低。在丛生芽长到 1 cm 左右,选择生长正常健壮的单芽,接种到伸长培养基 L1 和 L2 上,在 L1 上,伸长率只有 54 %,这同已报道的 0.2 mg/L KT 能有效地使芽伸长的结果不符合^[4]。在 L2 (改良的 MS₄ + KT 0.2 mg/L + IAA 0.01 mg/L) 上,两周后可伸长到 2 ~ 3 cm,伸长率达到 97 %,而且玻璃化现象少,壮苗多。



图 1 小西瓜丛生芽诱导
Fig. 1 Induction of bud

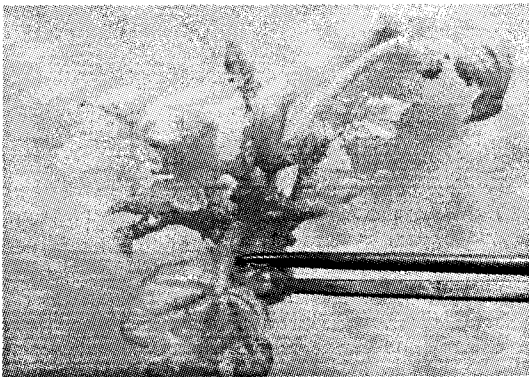


图 2 小西瓜丛生芽增殖
Fig. 2 Multiplication of bud

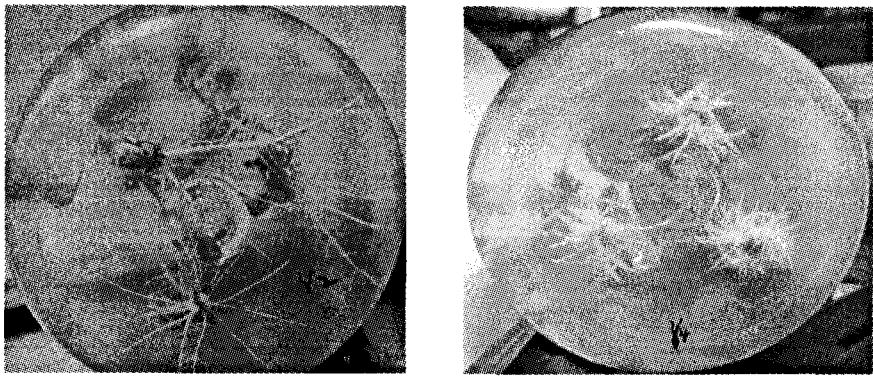


图3 小西瓜生根情况(左图为 R2 培养基,右图为 R4 培养基)

Fig.3 Rooting seedlings



图4 小西瓜移栽后生长情况

Fig.4 The growth after transplanting

3 讨 论

3.1 小西瓜发芽培养基的选择

不同发芽培养基对小西瓜发芽率有极大影响,据报道,在无籽西瓜上用 MS 琼脂培养基,发芽率较低,只有 30 %,蛭石加等体积 MS 液体培养基,发芽率可以提高到 70 % 左右^[2];还有用成分减半的 MS 固体培养基上培养无茵苗^[6]。培养基 2FeMS 诱导成芽效果明显高于培养基 MS,出芽率提高一倍以上^[7]。在本实验中,在 2FeMS 培养基上种子发芽率略低于在 0.6 % 琼脂上,但在分化培养基上丛芽诱导效果更好,可能因为在发芽初期,培养基不需要为种子提供营养,但后期因小西瓜种子小(29 ~ 31 g),贮藏养分较少,子叶小,体内营养供给不够,需要培养基及时补给提供营养,增加铁盐的浓度对于细胞的正常生长有促进作用^[1,8]。

3.2 玻璃化的现象

一般认为,高浓度的硝酸盐是造成玻璃化的原因之一,增加磷酸盐和铁盐的浓度很大程度上可以克服玻璃化现象产生^[8]。据报道,无籽西瓜试管苗增殖时 0.8 % 以上的琼脂浓度和 4 % 以上的蔗糖浓度对消除玻璃苗产生减少黄化苗效果较明显;调整培养基中 $\text{NH}_4^+ \text{N}/\text{NO}_3^- \text{N}$ 比例至 0.3 ~ 0.5 之间,增加了 KH_2PO_4 和 FeSO_4 的浓度,pH 值提高到 6.0,都能有效减少玻璃化程度。采用 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 温度,

2.4 生根与移栽

选择伸长的壮苗,接种到生根培养基上,试验表明,IAA 和 NAA 都能诱导小西瓜试管苗生根,IAA 诱导效果更好,根系健壮,形态正常,基部愈伤少,移栽存活率高。从表 4 可以看出,R2 (1/2 MS + IAA 0.05 mg/L)生根率为 95 %,是本试验中最适合小西瓜试管苗生根的培养基。试验中提高 IAA 的浓度,生根率下降,基部形成愈伤。NAA 诱导生根率普遍比 IAA 诱导率高,但是根多而短,粗而易脆,无正常根毛,基部愈伤多,移栽存活率低(图 3)与前人的报道结果是一致的^[5]。在保湿保温的条件下,将生根好的试管苗瓶口打开,炼苗 2 ~ 3 d,然后移栽到草炭:蛭石 1:1 的营养钵,总存活率只有 50 % 左右。

表 4 不同生根培养基对 W3 丛生芽生根的影响

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

代号 Code	基本培养基 Basic media	植物生长调节剂(mg · L ⁻¹) Plant growth regulators		生根率(%) Induction rate
		IAA	NAA	
R1	1/2 MS	0.1		20
R2	1/2 MS	0.05		95
R3	1/2 MS		1	47
R4	1/2 MS		0.1	100
R5	1/2 MS		0.5	58

2500 ~ 3000 lx 光照培养,缩短继代时间,及时转接试管苗,可以有效的促进正常苗的形成^[8-10]。在本试验中,小西瓜试管苗在丛芽诱导和继代过程中,玻璃化现象严重,提高琼脂、磷酸盐和铁盐的浓度,降低硝酸盐浓度都能一定程度缓解。其中特别对培养温度和继代时间尤其敏感,温度高于 25 ℃ 时,继代时间超过 15 d,玻璃化和黄化现象都很严重,值得特别注意。

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] 许智宏,卫志明,刘桂云. 用离体培养无性系繁殖三倍体无籽西瓜[J]. 植物生理学报,1979,5(3):245-251.
- [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] 张志忠,吴菁华,吕柳新. 西瓜高频再生系统的研究[J]. 中国农学通报,2004,20(2):151-153.
- [6] 汤绍虎,廖映粉,徐荣灿. 无籽西瓜培养基的选择及培养条[J]. 西南农业大学学报,1994,16(6):540-542.
- [7] 孙光英. 无籽西瓜离体培养及再生植株的快速繁殖技术分析[J]. 耕作与栽培,2004(4):39-40.
- [8] 褚剑峰,郑 琪,林国美. 西瓜和甜瓜的组织培养技术研究[J]. 安徽农业科学,2004,32(6):1169-1170.
- [9] 黄荣韶,覃 伟. 无籽西瓜离体培养中玻璃化现象的研究[J]. 广西农业大学学报,1998,17(3):266-270.
- [10] 陶燕敏,章志刚,叶 健,等. 几种理化因子对无籽西瓜无性系增殖的影响[J]. 上海农学院学报,1994,12(1):48-51.

(责任编辑 李 洁)