

无籽西瓜组培脱毒与离体嫁接技术研究

杨玉, 王杰* (安徽农业大学植物保护学院, 安徽合肥 230036)

摘要 利用无籽西瓜种胚进行组培脱毒与西葫芦离体嫁接研究。结果表明:不同消毒剂对种胚萌发有一定影响,其中消毒剂二氧化氯 250 mg/L 处理有利于种胚萌芽,萌发率达 86.7%。6-BA 对茎尖分化有促进作用,浓度 0.2 mg/L 对芽分化有显著作用;不同激素浓度对芽丛增殖和单芽生根也有一定影响,其中 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 1 mg/L 继代培养增殖率最高;MS+NAA 0.2 mg/L 生根率最高(83.9%)。采用无菌嫁接成活率(77.5%)高于开放式嫁接成活率(37.5%);经 ELISA 检测,对 WMV-2(西瓜花叶病毒 2 号)、ZYMV(小西葫芦黄化花叶病毒)的脱毒率分别为 75% 和 80%。

关键词 无籽西瓜;组织培养;脱毒;嫁接

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)11-2373-02

Studies on The Virus-free Tissue Culture and Vitro-grafting Technology in Seedless Watermelon

YANG Yu et al (Department of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract In this paper, studies on virus-free tissue culture and Vitro-grafting of vegetable marrow in Seedless Watermelon are carried though. The results showed that different disinfectors have definite effects on bourgeon of watermelon embryo. In which, disinfectant of Chlorine Dioxide(250 mg/L) used to treat watermelon embryo have advantages in germination of watermelon embryo. 6-BA has accelerated effects on stem-tip differentiation, and the consistency of 0.2 mg/L has prominence effect; different consistencies of incretion have also definite effects on multiplication of acerate buds, and the succeed culture medium of MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L can obtain the most multiplying rate; The result of study on different consistencies of NAA in rooting of single bud showed that the culture medium of MS+NAA 0.2 mg/L have the most rooting rate(83.9%); the survival rate(77.5%) of germless grafting is higher than the survival rate(37.5%) of open grafting. The virus-free rates of WMV-2 and ZYMV were 75% and 80% respectively, using the detecting method of ELISA.

Key words Seedless Watermelon; Tissue cultures; Virus-free; Grafting

目前生产的无籽西瓜均为三倍体无籽西瓜,它是三倍体水平的杂交一代西瓜,具有多倍体和杂交一代的双重优势,加之它的无籽性,无论是在果实发育过程中,还是在贮运过程中,均可减少营养物质和能量的消耗^[1]。许志宏^[2]等最先获得无籽西瓜试管苗,随后王玉英^[3]等在组培的基础上,结合嫁接技术,初步实现了无毒试管苗的大田栽培,通过嫁接可以减轻土传病害的发生,增强无籽西瓜的抗逆性,提高其产量和品质等。笔者利用组培脱毒和嫁接技术,通过无性系的途径来繁殖无籽西瓜的无毒嫁接苗。

1 材料与方法

1.1 材料 供试西瓜品种为兴科无籽 2 号,砧木为西葫芦,均由安徽省无籽西瓜研究所提供。

以 MS 为基本培养基。生长素:吲哚乙酸(IAA);吲哚丁酸(IBA);萘乙酸(NAA);6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)及其他化学试剂。

西瓜花叶病毒 2 号(WMV-2),小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV),抗血清,均由安徽农业大学植物保护学院提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的处理。将无籽西瓜种子置于 55~60℃温水中浸泡 2~3 h 后,取种胚,使用不同消毒剂对种胚进行消毒处理:处理①为 250 mg/L 的二氧化氯+0.15% 的升汞;处理②为 75% 乙醇+0.15% 升汞;处理③为 250 mg/L 二氧化氯+2% 的次氯酸钠。

1.2.2 培养基的制备。方法略。

1.2.3 接种与培养。

1.2.3.1 分化培养:将消毒后的种胚接种到种胚培养基 MS 上,pH 值为 5.8。培养条件为:温度 28℃左右,光照强度

2000~4000 lx,光照时间 10~12 h/d。约 2 周后种胚萌发子叶转绿,切取带子叶的胚芽和茎尖接种到芽团培养基 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 上进行分化培养,pH 值为 5.8,培养条件同上。

1.2.3.2 继代培养:当分化培养 20~30 d 后无茵苗增殖 2 个芽以上时,经 ELISA 法检测无病毒,将芽丛切块转入芽团培养基 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 上进行继代培养,扩大繁殖,培养条件同“1.2.3.1”。

1.2.3.3 生根培养:当继代培养的芽苗高 3 cm 时,切下芽苗接种到生根培养基 MS+IBA 1.0 mg/L 上,pH 值为 5.8。培养条件为:昼温 25~30℃,夜温 15~20℃,光照强度 5000 lx,光照时间 10~12 h/d。当生出不定根 5 cm 时,即可嫁接。

1.2.4 嫁接及管理。采用顶插接法进行嫁接。刚嫁接的苗置于防虫网室中,前 2 d 湿度保持 100%,以后保持 85%~95%;白天温度保持在 26~28℃并遮光,夜间温度保持在 24~25℃,3~4 d 后逐渐增加通风,降低温度,1 周后白天温度保持在 23~24℃,夜间 18~20℃,定植前 7 d 可降到 15~20℃。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂对种胚萌发的影响(表 1) 由表 1 可见,处理③对种胚的萌芽较有利,这与在消毒中采用温和的、易于去除的次氯酸钠有很大关系,该试剂消毒效果较好且不影响外植体生长。

表 1 不同消毒剂处理对种胚萌发的影响

处理	种胚数//个	萌发数//个	萌芽率//%
①	30	23	76.7
②	30	22	73.3
③	30	26	86.7

2.2 茎尖分化情况 表 2 表明:6-BA 对芽分化有着极显著作用,而对照所有外植体均只进行芽的抽长生长,而未有芽

基金项目 安徽省自然科学基金资助项目。

作者简介 杨玉(1981-),男,安徽定远人,从事棉花制种技术研究。
* 通讯作者,副教授, Tel: 13956938303。

收稿日期 2005-09-09

体分化,同时其基部也不产生愈伤组织。在芽的分化上,各处理间差异显著,在0~0.2 mg/L范围内,此差异与浓度呈正相关,在6-BA浓度为2.5 mg/L的处理中,由于使用浓度过高,这种作用反而减弱。观察还发现,浓度2.0和2.5 mg/L 6-BA处理外植体在4周后均呈芽丛状。

表2 不同浓度6-BA对茎尖分化的影响(培养4周)

浓度//mg/L	芽数//个	最高芽长//cm	平均芽长//cm	外植体鲜重//g
0	1.0	3.3	3.3	0.09
0.5	2.1	4.1	3.5	0.65
1.0	3.3	4.5	3.7	0.78
1.5	4.2	2.7	2.4	0.86
2.0	4.1	1.1	1.0	0.95
2.5	3.0	0.9	0.7	0.80

注:表中数据为20个重复的平均数,处理间差异经邓肯氏多重差异范围测定,0.05水平。下同。

表3表明:一定浓度范围的IBA对茎尖外植体培养过程中的芽分化无影响,在0~1.5 mg/L 4个处理间其差异并不显著,但当浓度为2.0 mg/L时,则表现出强烈的抑制作用。IBA对芽苗的生长有促进作用,以浓度1.0 mg/L处理为最佳,超过这一浓度促进作用反而减弱。IBA对外植体培养后鲜重的影响较小,实验观察也表明其不同处理间外植体基部愈伤组织大小并无明显差异。

表3 不同浓度IBA对茎尖分化影响(培养4周)

浓度//mg/L	芽数//个	最高芽长//cm	平均芽长//cm	外植体鲜重//g
0	2.7	4.2	3.3	0.59
0.5	2.8	5.0	4.1	0.81
1.0	3.3	5.6	4.4	0.01
1.5	3.2	4.6	3.8	0.77
2.0	1.6	4.6	3.5	0.57

2.3 不同激素对比对继代增殖的影响 将丛芽切块转入芽团培养基进行增殖培养,结果见表4。

表4 不同浓度激素对比对丛芽增殖的影响

培养基	激素配比//mg/L			增殖率	玻璃化率//%
	6-BA	IAA	IBA		
S1	0.5		0.5	3.0	25
S2	1.0		1.0	8.0	25
S3	0.5	1.0		9.5	0
S4	2.0			1.0	50
S5	5.0	1.0		3.75	0
S6	2.0			3.75	25

表4表明:增殖率较好的继代培养基为S3,增殖率达9.5;其次是S2,增殖率为8.0,但有25%的玻璃化;培养基S3与S5上则没有玻璃化产生;而S4上没有不定芽增殖,且有一半玻璃化;S1上的增殖率仅为3.0。

2.4 脱毒率(病毒WMV-2、ZYMV) 采用ELISA对芽苗进行检测,结果见表5。由表5可见,WMV-2、ZYMV的脱毒率分别为75%、80%。病毒在植物体内分布是越接近生长点,病毒浓度越小,另一方面分生组织细胞分裂速度比病毒复制和传递速度快,因此采用旺盛分裂的离体培养可以有效地脱除

植物病毒。

表5 病毒检测结果

	检测芽苗数//个	脱毒芽苗数//个	脱毒率//%
WMV-2	20	15	75
ZYMV	20	16	80

2.5 不同浓度NAA对生根的影响 低浓度NAA和IAA均可诱导无菌生根,IAA较NAA诱导的根细弱。表6表明:3个含不同浓度NAA的MS培养基上,都能诱导出根,形成再生植株,根诱导率分别为96.2%、83.9%、81.5%。当NAA浓度超过1.0 mg/L时,将影响新根的生长速度。

表6 不同浓度NAA对单芽生根的影响

培养基	NAA//mg/L	接种芽数//个	生根芽数//个	根诱导率//%
R1	0.2	31	26	83.9
R2	0.5	26	25	96.2
R3	1.0	27	22	81.5

2.6 嫁接苗的成活率 表7表明:常规嫁接苗的成活率为37.5%,而无菌嫁接苗的成活率为77.5%。因此,在生产条件允许的情况下应尽可能在无菌环境中进行嫁接,以最大程度地保证嫁接苗成活。

表7 不同嫁接方式对嫁接苗成活率的影响

	嫁接株数//个	成活株数//个	成活率//%
常规嫁接	40	15	37.5
无菌嫁接	40	31	77.5

3 讨论

(1)在研究过程中发现,无论是从茎尖诱导不定芽,还是进行继代培养或生根诱导,所需的生长调节剂浓度是非常低的,不同水平的细胞分裂素均能诱导其产生不定芽,而且MS培养基能使试管苗生长良好,并能诱导生根。因此,通过降低生长调节剂浓度、增加琼脂含量和缩短继代时间获得了生长良好的西瓜组培试管苗,这样可以很好地解决老化问题。

(2)生长素为植物组织培养中外源激素的重要来源,IBA的发根作用很弱,但不易被过氧化酶分解。低浓度时能够促进生根,高浓度时抑制根的生长,但显著促进芽的生长,因此在实践中必须考虑两者的优缺点及功效,适当适量使用。

(3)采用组织培养及嫁接技术较好地解决了无籽西瓜生产过程中出现的“三低”和制种难等问题,但应注意用此法进行繁殖存在成本高、技术性强、稳定性差等缺点,尤其是组培苗有时赶不上农时,制约了组培苗的生产应用。

参考文献

- [1] 全国无籽西瓜科研协作组. 无籽西瓜栽培与育种[M]. 北京:中国农业出版社,2001:2-3,221-222.
- [2] 许智宏,卫志明,刘桂云. 用离体培养无性繁殖三倍体无籽西瓜[J]. 植物生理学报,1979,5(3):245-251.
- [3] 王玉英,李春铃,蒋钟仁,等. 无籽西瓜无性系繁殖的研究[J]. 园艺学报,1980,7(4):64.
- [4] 王杰. 侵染西瓜的烟草花叶病毒(TMV)的生物学鉴定[J]. 安徽农业科学,2003(6):972-974.
- [5] 裘文达. 园艺植物组织培养[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:42.