

西瓜再生系统的建立

郝立新 王怀名
 (北京蔬菜研究中心, 北京 100081)

摘 要 以京欣一号、查理斯顿、巨人、井神小西瓜、黑崩筋 5个品种苗龄 6d的子叶为外植体,建立了西瓜品种无性繁殖系和高效的培养体系,在 $MS+BA\ 5mg/L+IAA\ 0.5mg/L$ 培养基上,芽诱导率为 46.6%~94%,转接到附加 $KT\ 0.2mg/L$ 的 MS 培养基上进行再生芽的伸长培养后,在 $MS+NAA\ 0.5mg/L$ 的根诱导培养基上的诱导率达 96.2%。
 关键词 西瓜 子叶 组织培养 植株再生

西瓜 (*Citrullus vulgaris*)是葫芦科 (Cucurbitaceae)西瓜属中栽培种,它起源于非洲南部卡拉哈里沙漠,是一年生蔓性草本植物。成熟果实的果肉含大量水分和丰富矿物盐及多种维生素,为夏季主要果蔬。其种子含油量可达 50%,可榨油、炒食或作糕点配料。果皮可制蜜饯、果酱或作饲料。因此,西瓜作为一种高产值的经济作物在世界各地被广泛种植。现代细胞和组织培养技术的有效应用,通常要依赖于高效的植物离体再生系统。本研究旨在建立适于遗传转化的西瓜品种快速高效的再生系统,为遗传转化的研究及育种提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以 5种西瓜品种 (表 1)的种子作供试材料。

1.2 试验方法

- 1.2.1 无菌苗的培养
- 1.2.2 不定芽的诱导以及伸长培养
- 取 5个品种的种子,剥去种皮,放入 42℃ 恒温箱中半天取出,在超净工作台上用 75%酒精预消毒 30s,无菌水冲洗 3次,再用 2.5%次氯酸钠浸泡 20min,无菌水冲洗 3~4次,取出用无菌滤纸吸干材料上的水分。接种在盛有 1/2 MS 基本培养基的锥形瓶中。接种后,置于 32℃连续黑暗的条件下,培养 3d,再置于 16h光照,8h黑暗的条件下培养。当子叶变绿未完全展开时可将其取出作为供试籽苗。
- 从供试籽苗上取子叶,将其切成 $0.5\times 0.5cm$ 的小块,将子叶柄、胚轴、根切成 0.5cm 长的小段接种于附加不同激素 MS 培养基上进行芽诱导培养。

2周后, 将产生不定芽的外植体转入附加不同生长调节剂的MS培养基上进行再生芽的伸长培养。为探讨不同激素对生芽的影响, 设计在MS培养基中分别附加 3mg/L 的6BA、2,4-D、KT、Zt, 为获得最适当激素配比浓度, 设计了6BA与IAA十个不同浓度配比组合(表2)。切取苗龄为3d、5d、6d、7d、8d籽苗的子叶作外植体^[1~3], 探讨苗龄对芽再生的影响。在MS培养基中分别加入 0.2mg/L 的 GA_3 、KT和BA, 探讨最适芽伸长培养基。

1.2.3 诱导生根 再生芽在伸长培养基上长到 3cm 左右从基部切下, 分别扦插于附加不同浓度NAA(0.2 、 0.5 、 1.0mg/L)生根培养基上培养^[1,2]。所有MS培养基均加入3%蔗糖和0.8%琼脂, 所有试验重复处理3次, 每次重复至少10个外植体。

1.2.4 再生植株的移栽 当再生植株根长至 2cm 左右可向培养瓶中注入清水, 用镊子将生根苗取出, 流动水冲洗净根部培养基, 移栽于装有蛭石的育苗钵中, 用透明塑料薄膜覆盖保温。室温下培养2周左右, 揭开薄膜, 3d后可进行室外锻炼, 5d后进行第二次移栽。

2 结果与分析

2.1 外植体种类对不定芽诱导的影响

将巨人西瓜的不同外植体接种于附加6BA 5mg/L 和IAA 0.5mg/L 的MS培养基上, 2周后调查, 结果表明: 各外植体均能诱导出愈伤组织, 但除子叶可诱导出不定芽以外(图1), 其它外植体未能诱导出不定芽。切取子叶部位不同诱导频率相差很大。整片子叶、靠近顶端的半片子叶和靠近子叶节的半片子叶的再生芽诱导率分别为57%、8%和94%, 而且靠子叶节的每块外植体上可形成多个不定芽。它们以单个或成簇状分布在外植体正反两面, 这与以往报道“西瓜子叶顶端不能诱导出再生芽”不同^[1]。

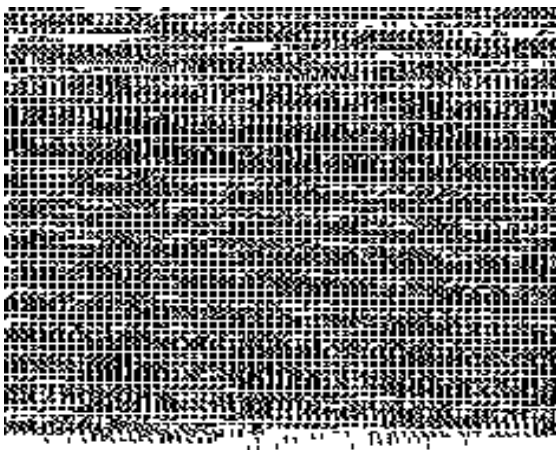


图1 从西瓜子叶诱导出再生不定芽



图2 西瓜再生植株

2.2 不同西瓜品种及籽苗苗龄对不定芽诱导的影响

以苗龄为3d、5d、6d、7d、8d的黑崩筋无菌籽苗的子叶为外植体的再生芽诱导率分别为18%、44%、89%、77%、53%。以苗龄6d的籽苗子叶诱导效果最好。

5种不同西瓜品种在附加了 6BA 5mg/L 和 IAA 0.5mg/L 的 MS 培养基上,不需先经过愈伤组织阶段,可直接诱导出不定芽(表 1)。再生芽多发生在靠近子叶节部位及切口边缘与维管束的交接处,发生和生长方向不定,这与以往报道“再生芽生长方向向下伸入培养基”有所不同^[1,2]。

2.3 外源激素对不定芽诱导的影响

将 6 日龄井神小西瓜子叶分别放在附加 3mg/L 的 6BA、2.4-D、ZT、KT 及无激素的 MS 培养基上,结果在不含激素的培养基上既不生长愈伤组织也不发生不定芽。在附加 2.4-D、KT、ZT、6BA 的培养基上都能诱导出愈伤组织,但只有附加 6BA 和 ZT 的可诱导出不定芽,诱导率分别为 70.6% 和 21.4%。因此,在所有的 4 种激素中以 6BA 的诱导效果最好,这与以往报道“仅含低浓度 6BA (1~3mg/L) 的培养基对西瓜子叶再生芽诱导无效”不同^[1]。

2.4 IAA 对不定芽诱导的影响

据报道附加适当 IAA 可大大提高再生芽的诱导率。用井神小西瓜子叶为外植体,在 MS 基本培养基上设置了 10 个激素浓度配比组合,以探讨最适芽分化培养基。

表 2 6BA 和 IAA 不同浓度组合的芽诱导率 (%)

项 目	IAA (mg/L)				
	0	0.2	0.5	1	2
6BA (mg/L)	3	70.6	63.6	77.1	68.9
	5	80.0	77.5	90.6	89.4

由表 2 看出: 6BA 5mg/L 与 IAA 0.5mg/L 的浓度组合的芽诱导率 (90.6%) 最高, 附加不适当浓度的 IAA 只能增加愈伤组织的形成, 对芽分化有抑制作用。

2.5 不同外源激素对再生芽伸长培养的影响

在分别附加 0.2mg/L 的 KT、GA₃、6BA 的培养基上进行再生芽伸长培养, 2 周后可观察到在含 KT 的培养基上再生芽可正常伸长。含 6BA 的培养基上再生芽虽有一些伸长, 但其茎叶形态不正常, 趋于脆化和黄化, 并且外植体上的愈伤组织有所增长, 而含 GA₃ 的基本无效。

2.6 不同培养基对无菌苗生根的影响

据报道, 低浓度 NAA 和 IAA 均可诱导无菌苗生根, 但经实验发现 IAA 较 NAA 诱导的根细弱。在 3 个含不同 NAA 浓度的 MS 培养基上, 都能诱导出根, 形成再生植株 (图 2), 根诱导率分别为 96.2%、83.9%、81.5% (表 3), 当 NAA 浓度超过 1mg/L 时将影响新根的生长速度。

3 结论与讨论

芽的诱导是进行无性系快速繁殖的关键环节, 不同品种的组培条件存在很大差异。本实验

表 1 不同西瓜品种对芽诱导率的影响

品 种	外植体 (块)	有芽外植体 (块)	再生率 (%)
黑崩筋	48	43	89.6
井神小西瓜	53	48	90.6
查理斯顿	58	27	46.6
巨人	50	47	94.0
京欣一号	52	40	76.9

表 3 不同培养基对无菌苗生根的影响

编号	NAA (mg/L)	接种芽数 (个)	生根芽数 (个)	根诱导率 (%)
R ₁	0.2	31	26	83.9
R ₂	0.5	26	25	96.2
R ₃	1.0	27	22	81.5

5个品种在同一培养基上诱导频率从 46.6%到 94.0% (表 1), 而同一品种的外植体选取部位不同, 诱导效果也相差很大, 以靠近子叶节部分子叶再生率最高。这说明材料本身的基因型以及内源激素水平的含量及分布影响了它对外源激素诱导作用的敏感性。外源激素的种类、含量以及配比浓度是诱导能否成功的决定因素。具有细胞分裂素活性的 6BA 可有效地诱导芽的分化, 添加一定量的生长素可提高西瓜子叶再生芽的诱导率。试验表明, 6BA 5mg/L 和 IAA 0.5/L 的配比浓度为供试的 5个西瓜品种的最适芽诱导激素配比组合。

西瓜子叶再生对苗龄的要求在以往的报道中各不相同^[1-3], 短到 2d 长到 10d。我们实验得出最适苗龄为 6d, 这可能与供试品种不同有关。

高频率西瓜再生系统的建立对加速西瓜无性系的繁殖以及转基因的研究有很重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Dong Jin-zhuo, Jia Shi-rong. High Efficiency Plant Regeneration from cotyledons of watermelon. Plant Cell Reports, 1991, 9: 559~ 562
- 2 Strivasava DR, Andrianor VM, Piuzean ES. Tissue culture and plant regeneration of watermelon. Plant Cell Reports, 1989, 8: 300~ 302
- 3 Blacmon W J, Reynolds BD. *In vitro* Shoot regeneration of *Hibiscus acetosella*, muskmelon, watermelon, winged bean. Hortscience, 1982, 17(4): 588~ 589

A Study on Building up the Regenerate System of Watermelon

Hao Lixin Wang Huaming

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100081)

Abstract An effective system for vegetative propagation and culture has been successfully set up by using cotyledons from five watermelon (*Citrullus vulgaris*) cultivars. High frequency shoot regeneration (46.6~94%) was obtained from 6-day-old cotyledons of cultivars cultured on medium containing MS+BA 5mg/L+IAA 0.5mg/L. Buds elongated on MS medium containing KT 0.2mg/L. The MS medium with 0.1mg/L NAA was used for rooting and the rate of root induction was also above 80%.

Key words Watermelon; Cotyledon; Tissue culture; Plant regeneration