

影响组织培养诱导四倍体小果型西瓜三种因素的研究

石晓云^{1,2}, 申书兴¹, 陈雪平¹, 张成合¹

(1. 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省邢台学院, 河北 邢台 054001)

摘要: 以二倍体小果型西瓜自交系 21, 90, 141, 149, 157 的授粉后 20~25 d 的未成熟种子中的子叶为材料, 进行离体组织培养诱导四倍体, 研究了不同的秋水仙素浓度、处理时间对组织再生, 不同的秋水仙素浓度、处理时间与再生途径对加倍率的影响。结果表明, 未成熟子叶组织再生有产生单芽、芽丛、愈伤组织 3 种方式; 不经秋水仙素诱导处理, 直接进行组织再生时, 直接再生不定芽能力强; 经秋水仙素诱导处理后, 进行组织再生时不定芽产生受到抑制, 愈伤组织发生数多于单芽或芽丛数; 基因型不同, 处理的秋水仙素浓度与时间不同, 再生的组织类型与数量不同; 还发现经一定时间的适宜浓度的秋水仙素处理后, 有利于产生的愈伤组织分化成苗; 对再生植株鉴定可知, 0.03% 秋水仙素处理 9 d 或 0.05% 秋水仙素处理 7 d 可诱导出较高比例的四倍体植株, 并且通过愈伤组织途径的加倍率高于通过单芽和芽丛途径。

关键词: 小果型西瓜; 组织培养; 诱变; 四倍体

中图分类号: S651.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0103-04

Study on Three Factors of Inducing Tetraploid Mini-watermelon by Tissue Culture

SHI Xiao-yun^{1,2}, SHEN Shu-xing¹, CHEN Xue-ping¹, ZHANG Cheng-he¹

(1. College of Horticulture, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Xingtai College of Hebei, Xingtai 054001, China)

Abstract: Immature cotyledons of diploid mini-watermelon inbred-line 21, 90, 141, 149, 157 were used for inducing tetraploid by tissue culture. The effects on double rate treated by different colchicine concentration, treating time and regenerate ways were studied. Results indicated that: the tissue could regenerate single bud, crowded buds or callus. Without colchicine inducing the tissue had high ability of regenerating buds directly. Otherwise the buds were restrict, and the numbers of calluses were more than that of buds. The tissue type and quantities were related to gene type, colchicine concentration and treating time. The calluses were easy to different plants induced by suitable colchicine concentration. To identify the plants, we got rather high proportion of tetraploid induced by 0.03% colchicine in 9 days or by 0.05% colchicine in 7 days, and high double rate by way of callus.

Key words: Mini-watermelon; Tissue culture; Induction; Tetraploid

小果型西瓜小巧秀美, 肉质细嫩, 汁多味甜, 生育期短, 适合现代家庭消费, 近年来在国内外发展相当迅速。我国有黑美人、红小玉、黄小玉、小兰、特小凤等小果型西瓜品种, 但目前国内外培育的小果型西瓜大都是有籽品种, 仅有雪峰小玉红、绿龄童、黑龄童、黄肉无籽金凤等新育成的小果型无籽西瓜品种。由于我国四倍体小果型西瓜种质资源相对匮乏, 限制了其三倍体无籽西瓜育种工作的开展。本

试验是在前人研究的基础上, 探索小果型西瓜离体组织培养中秋水仙素浓度与处理时间及再生途径对诱变率的影响, 创造出新的四倍体小果型西瓜种质资源, 进而培育出高档优质的三倍体小果型无籽西瓜新品种。

1 材料和方法

根据二倍体西瓜加倍成四倍体后一般表现为生

收稿日期: 2007-09-20

作者简介: 石晓云(1979-), 女, 河北柏乡人, 硕士, 主要从事植物生物技术研究工作

通讯作者: 申书兴(1964-), 男, 河北滦南人, 博士生导师, 主要从事蔬菜作物的细胞学与生物技术研究。

育期延长,果皮变厚,品质提高,抗性增强的特点,结合市场的需要,选用外观漂亮、生育期短、皮薄、品质好、综合性状优良的小果型西瓜二倍体自交系 21, 90, 141, 149, 157 为诱变材料。其中 21, 90 为黄肉西瓜, 141, 149 为粉肉西瓜, 157 为红肉西瓜。

将二倍体小果型西瓜自交系 21, 90, 141, 149, 157 于 2004 年 3 月 24~ 28 日温室内育苗, 4 月 23~ 28 日种植于大棚内, 按常规种植管理, 6 月 15~ 20 日从优良单株上采收授粉后 20 d 成熟果实。在无菌条件下取出种子, 切取近胚轴端未成熟子叶中部组织作为外植体, 子叶以背面接种在诱导加倍的培养基上(MS+ 2 mg/L BA + 不同浓度的秋水仙素), 秋水仙素浓度与处理时间采用二元二次正交旋转组

合设计(表 1), 每处理接种 30 个外植体, 置于弱散射光条件下培养^[1,2]。诱导后再转到 MS+ 2 mg/L BA 组织再生培养基上。大约培养 35 d 后, 未成熟胚子叶再生出单芽、芽丛和愈伤组织。将单芽接种到继代和扩繁培养基上(MS+ 0.3 mg/L BA + 0.2 mg/L IBA); 将芽丛及时切成小块转至 1/2MS+ 0.2 mg/L IBA 培养基上以促进不定芽伸长; 将愈伤组织接种到 MS+ 2 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA 不定芽再生培养基上, 2 个月后再生出不定芽。培养基附加 3% 蔗糖, 0.7% 琼脂, pH 5.8 左右。以上各培养基均是在预备试验的基础上筛选出来的。培养条件: 温度 (25+ 2)℃, 每日光照 16 h, 光照强度 2 000 lx 左右。

表 1 秋水仙素浓度与处理时间

Tab. 1 Concentration of colchicines and treating time

处理 Treatment	CK	1	2	3	4	5	6	7	8	9
浓度/% Concentration	0	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.08
时间/d Time	0	7	5	9	4	7	10	5	9	7

2 结果与分析

2.1 不同的秋水仙素浓度与处理时间对组织再生的影响

经过不同浓度的秋水仙素, 进行不同时间的诱导加倍培养后, 再转到组织再生培养基上进行培养。结果表明: 未成熟子叶组织再生有产生单芽、芽丛、愈伤组织 3 种方式。各诱导处理后的未成熟子叶组织再生方式和再生率不同(表 2)。经过秋水仙素诱导后的外植体转接于再生培养基后, 子叶组织近胚轴端的切口处易发生组织再生, 其次是子叶中部。某些子叶可以同时再生出单芽、芽丛、愈伤组织, 也可以再生出其中一种或两种组织。从再生的组织形态情况看, 对照再生的单芽数多于芽丛数多于愈伤

组织数; 经 1, 2, 3, 4, 5, 7 处理后多数情况是再生的愈伤组织数多于单芽或芽丛数, 并且在这几种处理的秋水仙素浓度与处理时间范围里, 同一秋水仙素浓度, 处理时间越长, 组织再生越受到抑制, 0.03% 的秋水仙素处理 5 d 的再生组织数高于处理 9 d; 0.05% 的秋水仙素处理 4 d 的再生组织数高于处理 7 d 与 10 d。由此可见, 不经秋水仙素处理, 未成熟胚子叶具有直接再生出完整植株的能力, 经过秋水仙素处理抑制不定芽的直接再生, 导致愈伤组织发生。0.05% 秋水仙素处理 10 d, 0.08% 秋水仙素处理 7 d, 5 个自交系均无组织再生; 0.07% 秋水仙素处理 9 d, 仅 157 有少量组织再生。由此可见, 高浓度的秋水仙素处理过长时间会严重抑制组织分化再生。

表 2 未成熟胚经不同处理诱导后组织再生情况

Tab. 2 Tissue regeneration from immature cotyledons by different treatments

处理 Treatment	浓度/% Concentration	时间/d Time	外植体 Explant	21			90			141			149			157		
				B	CB	C	B	CB	C	B	CB	C	B	CB	C	B	CB	C
CK	0	0	30	13	7	2	17	6	1	13	3	2	13	5	0	8	7	3
1	0.02	7	30	0	5	10	3	0	5	0	0	4	0	2	5	5	0	9
2	0.03	5	30	0	4	5	5	0	8	0	0	5	5	0	9	2	0	10
3	0.03	9	30	0	0	0	0	9	5	0	0	4	4	0	5	3	0	7
4	0.05	4	30	11	5	16	6	2	2	3	0	0	3	0	0	13	3	15
5	0.05	7	30	3	2	6	0	0	0	2	0	9	2	0	3	5	3	11
6	0.05	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0.07	5	30	5	5	9	0	0	0	10	0	7	5	0	4	5	4	12
8	0.07	9	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5
9	0.08	7	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: B. 代表单芽数; CB. 代表芽丛数; C. 代表愈伤组织数
Note : B. Indicates No. of buds; CB. Indicates No. of crowed buds; C. Indicates No. of calluses

2.2 基因型对组织再生类型与数目的影响

试验表明: 基因型不同, 处理的秋水仙素浓度与时间不同, 再生的组织类型与数量也不同。以自交系 90 为例, 对照再生的单芽数最多, 0. 03% 的秋水仙素处理 9 d 再生的芽丛数最多, 0. 03% 的秋水仙素处理 5 d 再生的愈伤组织最多。总的来说, 自交系 21, 157 经 0. 05% 的秋水仙素处理 4 d, 自交系 90 经 0. 03% 的秋水仙素处理 9 d, 自交系 141 经 0. 07% 的秋水仙素处理 5 d, 自交系 149 经 0. 03% 的秋水仙素处理 5 d 再生组织数目最多。

2.3 秋水仙素浓度与处理时间对愈伤组织分化成苗的影响

未经秋水仙素处理(对照) 的未成熟胚子叶经培养再生的愈伤组织少, 形态一般为绿色紧实的愈伤组织。将其接种到成芽培养基上长到大约 0. 5 cm³ 时开始分化不定芽; 经适宜浓度的秋水仙素处理后,

再生的愈伤组织较多, 某些子叶可长出 1~ 2 个愈伤组织, 且愈伤组织有两种形态, 一种为绿色紧实的, 占愈伤组织总数的 85%, 接种到成芽培养基上长到大约 1 cm³ 时开始分化不定芽; 一种为乳白色或淡黄色松散的愈伤组织, 占愈伤组织总数的 15%, 经过培养不再生不定芽。各试材及各处理诱导的绿色愈伤组织进一步分化成苗情况见表 3。

从表 3 可见: 不同的秋水仙素浓度预处理时间对愈伤组织进一步分化成苗率影响也不同, 而且这种影响在基因型间表现也不同。总的看来, 对不同自交系的未成熟子叶进行一定时间的适宜浓度的秋水仙素处理有利于愈伤组织分化成苗。自交系 21, 141, 149, 157 经 0. 05% 秋水仙素处理 7 d 愈伤组织成苗率最高, 分别为 217%, 200%, 600%, 409%; 自交系 90 经 0. 03% 秋水仙素处理 9 d 愈伤组织成苗率最高为 200%。

表 3 绿色紧实的愈伤组织分化成苗情况

处理 Treatment	浓度/ % Concentration	时间/d Time	外植体 Explant	21			90			141			149			157		
				C	S	S%	C	S	S%	C	S	S%	C	S	S%	C	S	S%
CK	0	0	30	2	2	100	1	1	100	2	2	100	0	0	0	3	3	100
1	0. 02	7	30	10	15	150	5	8	160	4	6	150	5	7	140	9	14	156
2	0. 03	5	30	5	10	200	8	15	186	5	9	180	9	12	133	10	20	200
3	0. 03	9	30	0	0	0	5	10	200	4	5	125	5	10	200	7	15	214
4	0. 05	4	30	16	23	144	2	3	150	0	0	0	0	0	0	15	39	260
5	0. 05	7	30	6	13	217	0	0	0	9	18	200	3	18	600	11	45	409
6	0. 05	10	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0. 07	5	30	9	15	167	0	0	0	7	12	171	4	6	150	12	26	217
8	0. 07	9	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	9	180
9	0. 08	7	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注: C 代表接种绿色紧实的愈伤组织块数; S 代表愈伤组织分化的苗数; S% 代表愈伤组织成苗率(S/ C × 100%)
Note: C. indicates No. of green and solid calluses; S. Indicates No. of shoots; S%. Indicates Calluses to Shoots rate(S/ C × 100%)

表 4 不同处理与再生途径组培苗加倍效果比较

Tab.4 Comparison of doubling effect in different treatments and regeneration ways																	
浓度/ % Concentration	时间/ d Time	21			90			141			149			157			
		B ₂ / B ₄	CB ₂ / CB ₄	C ₂ / C ₄	B ₂ / B ₄	CB ₂ / CB ₄	C ₂ / C ₄	B ₂ / B ₄	CB ₂ / CB ₄	C ₂ / C ₄	B ₂ / B ₄	CB ₂ / CB ₄	C ₂ / C ₄	B ₂ / B ₄	CB ₂ / CB ₄	C ₂ / C ₄	
0	0	13/0	17/0	2/0	17/0	14/0	1/0	13/0	8/0	2/0	13/0	12/0	0	8/0	16/0	3/0	
0.02	7	0	18/0	12/0	3/0	0	8/0	0	0	6/0	0	5/0	7/0	5/0	0	11/0	
0.03	5	0	9/0	8/0	5/0	0	13/0	0	0	7/0	5/0	0	9/0	2/0	0	12/0	
0.03	9	0	0	0	0	8/13	6/2	0	0	1/4	4/0	0	2/6	1/2	0	15/0	
0.05	4	11/0	13/0	18/0	6/0	5/0	3/0	3/0	0	0	3/0	0	0	11/0	6/0	26/0	
0.05	7	3/0	1/5	7/6	0	0	0	2/0	0	7/5	2/0	0	5/13	5/0	4/3	29/8	
0.05	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.07	5	5/0	5/0	7/5	0	0	0	10/0	0	10/0	5/0	0	6/0	5/0	8/2	24/0	
0.07	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/0	9/0	
0.08	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

注: B₂. 代表从单芽获得的二倍体数; B₄. 代表从单芽获得的四倍体数; CB₂. 代表从芽丛获得的二倍体数; CB₄. 代表从芽丛获得的四倍体数; C₂. 代表从愈伤组织获得的二倍体数; C₄. 代表从愈伤组织获得的四倍体数
Note: B₂. Indicates No. of diploids from buds; B₄. Indicates No. of tetraploids from buds; CB₂. Indicates No. of diploids from crowed buds; CB₄. Indicates No. of tetraploids from crowed buds; C₂. Indicates No. of diploids from calluses; C₄. Indicates No. of tetraploids from calluses

2.4 不同处理、不同再生途径加倍效果的比较

对从单芽、芽丛、愈伤组织分化成的组培苗通过

形态观察与根尖染色体计数相结合的方法进行倍性鉴定^[3, 4]。由表 4 可以看出: 随秋水仙素处理不同,

基因型不同,组培苗再生途径不同,四倍体加倍率也不同。总的来说,0.03%秋水仙素处理 9 d 或 0.05%的秋水仙素处理 7 d 可获得较高比例的四倍体;一般从愈伤组织途径获得的四倍体数多于从单芽和芽丛获得的四倍体数。

为了进一步了解加倍组培苗的纯合性,是否有嵌合体现象。对 21, 90, 141 四倍体试管苗各 5 株, 149, 157 四倍体试管苗各 6 株,逐一检测各侧芽及顶芽的倍性,没有发现嵌合体。

3 讨论

3.1 组织培养技术是诱导小果型西瓜四倍体的有效途径

近年来,随着植物组织培养技术的成熟,我国利用组织培养方法获得了一些西瓜多倍体材料。张兴平^[1]等用 0.05%的秋水仙素处理 7 d 诱导未成熟胚子叶获得了 40% 以上的加倍率,育成了近 20 个四倍体西瓜品系;马国斌等^[5]用 0.1%秋水仙素处理 24~48 h 诱导 10 个成熟胚茎尖获得 1~2 个四倍体植株。根据市场对西瓜品种多样化的需求,本试验特别选择了小果型黄瓢、粉瓢、红瓢西瓜,并在建立了西瓜组织培养高效再生体系的基础上,进行组织培养离体诱导西瓜四倍体。本试验可以同时诱导大量未成熟胚子叶,而且在实验室环境中条件容易控制,重复性好,诱导率高,得到的四倍体植株当年就可以大量扩繁。这预示着利用组织培养离体诱导多倍体,有可能广泛适用于其他已建立高效组织培养再生体系的各种作物,从而在染色体工程中具有广泛的应用前景。为了优化处理,减少工作量,本试验采用二元二次正交旋转组合设计,以最少的处理可以获取最大的信息。

3.2 秋水仙素对组织再生的影响

在西瓜离体组织培养再生体系中研究最多的是从子叶等外植体中直接分化出不定芽,对愈伤组织的分化成芽情况报道很少。张孝祺等^[6]对不同基因型材料的西瓜进行离体培养,从根段或下胚轴诱导出愈伤组织,但进一步诱导成苗比较困难。宋道军等^[7]认为改良的 MS 培养基是西瓜诱导愈伤组织的最适培养基,但愈伤组织分化芽的能力很难超过 10%;通过对愈伤组织用离子束、液体放电处理,刺激愈伤组织芽的分化,提高到 20% 左右;通过加入适量的 AgNO_3 也可把不定芽的分化能力提高到 20%。由于从外植体诱导的愈伤组织分化不定芽这

一过程没有取得突破性的进展,所以在西瓜组织培养再生体系研究中一般绕开愈伤组织,研究如何直接用外植体诱导不定芽的分化。通过本试验可以看出未成熟胚子叶经适宜浓度的秋水仙素处理不但可以促进愈伤组织的形成,还可以极大的提高愈伤组织分化成苗率,开辟出一条通过愈伤组织进行高效组织培养的途径,满足通过愈伤组织进行植物遗传转化工作的需要。但秋水仙素在此过程中的作用机理还有待于研究。

3.3 再生组织途经对加倍率的影响

从四倍体植株发生情况来看,通过愈伤组织产生的四倍体最多,其次是芽丛,最少是单芽。这可能是由于经秋水仙素处理后加倍的细胞或组织暂时受到抑制,难以直接再生,而形成愈伤组织,再通过愈伤组织分化出四倍体植株;也可能是通过愈伤组织途径时,细胞易发生变异,倍性增加,从而得到四倍体植株。本研究表明通过组织培养进行四倍体诱导时最好通过愈伤组织途径,可以获得高频率的四倍体材料。通过愈伤组织分化不定芽的这种方式要经历强烈的脱分化与再分化过程,组培苗可能存在较大的变异^[9],尚需将再生植株移栽于大田进行鉴定,选择适合育种目标的植株。

参考文献:

- [1] 张兴平. 生物技术在西瓜甜瓜遗传改良中的应用[J]. 园艺学年评, 1996, 2: 107-129.
- [2] HANSEN N T P, ERSEN S B. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin and APM in Brassicanapus microspore culture[J]. Physiologia Plantarum, 1995, 95(2): 304-309.
- [3] 刘文革, 王 鸣. 西瓜甜瓜育种中的染色体倍性操作及倍性鉴定[J]. 果树学报, 2002, 19(2): 132-135.
- [4] 李 , 石荫坪, 束怀瑞, 等. 应用气孔性状对苹果与梨的倍性判别分析[J]. 果树科学, 1999, 16(1): 9-13.
- [5] 马国斌, 王 鸣. 西瓜和甜瓜茎尖离体诱导四倍体[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(1): 4-5.
- [6] 张孝祺, 魏振承, 黄河勋, 等. 西瓜离体培养技术的研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1996(2): 13-16.
- [7] 宋道军, 陈若雷, 尹若春, 等. 西瓜高效组织培养再生体系的初步研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2000(4): 8-11.
- [8] 房 超, 林德佩, 张兴平, 等. 西瓜多倍体育种新方法—利用组织培养诱导四倍体西瓜[J]. 中国西瓜甜瓜, 1996(4): 7-9.
- [9] 费水草, 周维燕. 切花再生株的形态和细胞学变异的探究[J]. 园艺学报, 1994, 21(2): 193-198.