

甜瓜‘黄蛋子’子叶再生完整植株研究^{*}

陆璐^{1,2}, 赵长增², 陆婷³

(1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101;

2 甘肃农业大学 农学院 园艺系, 甘肃 兰州 730070; 3 新疆农业大学 园艺系, 新疆 乌鲁木齐 830052)

[摘 要] 为了通过不定芽发生途径建立甜瓜‘黄蛋子’体细胞再生完整植株的技术体系, 并了解掌握该品种的再生能力和再生特点, 以‘黄蛋子’的幼龄子叶作为外植体, 进行了组织培养条件下的再生试验。试验结果表明, 在MS+ 6-BA 2.0 mg/L 不定芽诱导培养基上外植体发出的再生芽(丛)为不定芽来源。58块外植体的不定芽分化频率平均为44.8%, 并产生质地、数量不等的愈伤组织。在MS+ 6-BA 0.05 mg/L 不定芽伸长培养基上, 分化的不定芽(丛)能够伸长长大, 但存在程度不同的玻璃化现象。在1/2MS+ IAA 0.5 mg/L 生根培养基上无根苗发根, 生根率可达99%。与相关文献中报道过的其他甜瓜厚皮品种相比较, ‘黄蛋子’属再生能力弱的品种, 但品种内个体之间存在再生能力上的明显差异, 通过选择自交技术有可能获得再生能力得到提高的纯化株系。

[关键词] 甜瓜; ‘黄蛋子’; 子叶; 不定芽; 再生

[中图分类号] S652

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0081-05

‘黄蛋子’(Cucumis melo L. convar. ‘Huangdanzhi’)是20世纪30年代我国从前苏联引进的一个著名甜瓜厚皮品种, 原名直译是‘公社女庄员’。该品种适应性强, 果实美观, 品质好, 在我国甜瓜生产中发挥过重要作用。同时, ‘黄蛋子’也是甜瓜育种的重要材料, 如甘肃的‘铁蛋子’和内蒙古的‘河套蜜瓜’都是对‘黄蛋子’后代进行长期实生选种形成的优良地方品种^[1]。

应用组织培养技术创造作物新种质, 如获得四倍体或其他类型突变体等^[2,3], 已成为作物育种的有效新方法。农杆菌介导和基因枪转基因方法也是建立在寄主植物的组织或细胞能够再生完整植株的基础上^[4,5]。因此, 组织培养是甜瓜育种新方法研究的重要内容之一。1989年Dirks等^[6]成功诱导了5个甜瓜杂交种的子叶再生植株; 同年, Niedz等^[7]诱导了另外4个甜瓜品种, 包括著名的‘Hales Best Jubo’的子叶再生完整植株; 1991年Chee^[8]以甜瓜‘Topmark’的子叶块为外植体诱导出再生植株, 再生频率最高达到80%。以后, 国外Gonsalves等^[9]、Ezura等^[10]、Jeffrey等^[11]、Gauperin等^[12]的研究涉及更多的甜瓜基因型, 有的基因型的不定芽诱导频率最高达到100%。在国内, 马国斌等^[3,13]、尹俊等^[14]对我国主栽的一些甜瓜重要品种进行了植株

再生方面的研究, 但未见对‘黄蛋子’品种再生研究的报道。本研究通过不定芽发生途径建立了甜瓜‘黄蛋子’子叶外植体再生完整植株的技术体系, 同时对该品种的再生能力、再生特点及涉及的组织培养技术进行了分析, 为创造‘黄蛋子’类型甜瓜新种质以及发展甜瓜育种新方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料为甜瓜‘黄蛋子’品种的成熟种子。

植物生长调节剂6-BA(6-苄基氨基嘌呤)和IAA(3-吲哚乙酸)购自SIGMA公司, 琼脂为日本SERVA公司生产, 其他试剂均为广州化学试剂厂生产。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得^[3] 将脱壳的‘黄蛋子’甜瓜种子, 用体积分数70%乙醇浸泡60 s, 0.1%升汞浸泡30 min, 无菌水漂洗4次后, 置于无菌滤纸上吸去多余水分, 接种于发芽培养基上。培养条件为: 温度(28±1)℃, 光照强度3 000 lx, 16 h光照/8 h黑暗。

当无菌苗长至第5天时, 从距离胚轴约2 mm处剪下2片子叶, 再横切为2片, 取近轴端的半片作

* [收稿日期] 2004-11-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30160055); 甘肃省自然科学基金项目(ZS001-A 22-028-N)

[作者简介] 陆璐(1963-), 女, 江苏镇江人, 副教授, 博士, 主要从事园艺作物基因工程技术育种研究。

为外植体,接种于不定芽诱导培养基上。被剪去 2 片子叶的无菌苗留在原培养容器中继续生长,以观察其胚芽及子叶基部的侧芽是否完好。

1.2.2 培养基配方^[3,6-14] 发芽培养基(GM)为大量元素减半的 1/2 MS 培养基;不定芽诱导培养基(BM)为 MS+6-BA 2.0 mg/L;不定芽伸长培养基(EM)为 MS+6-BA 0.05 mg/L;生根培养基(RM)为大量元素减半的 1/2 MS 固体培养基附加 3-吲哚乙酸 0.5 mg/L (1/2 MS+IAA 0.5 mg/L)。每 L 培养基中均添加蔗糖 30 g,琼脂 6.5 g。

1.2.3 诱导不定芽 诱导不定芽的培养容器是 Φ9 cm 培养皿,每皿中倒入 BM 培养基 33 mL。将准备好的子叶外植体正面向上接种在已固化的 BM 平板上,每皿接种 5~6 块外植体,设置 10 次重复。培养条件为: (27±1)℃;光照强度 3 000 lx;16 h 光照/8 h 黑暗。以后的培养条件均与此相同。

21 d 后统计发生不定芽的外植体数和愈伤组织的发生情况。用解剖刀将不定芽(丛)连带其基部的母体外植体组织切下,接种到 EM 培养基上进行不定芽伸长培养。剩下的外植体被适当分割后重新

接种于新鲜的 BM 培养基上继续培养,诱导出芽。42 d 时进行第 2 次统计,并再次切割发生的不定芽(丛)转接到 EM 培养基上。

1.2.4 不定芽伸长培养和无根苗发根形成完整植株 不定芽伸长和诱导无根苗发根均以 100 mL 玻璃三角瓶为培养容器。将从子叶外植体上切割下来的丛生或单生不定芽,接种到 EM 培养基上进行继代伸长培养。待不定芽长成约 2 cm 高的无根苗时,自其茎基部切下,扦插到 RM 培养基上。无根苗在生根培养基上发根,再生成完整植株。

2 结果与分析

2.1 外植体准备

图 1 是被剪去 2 片子叶的无菌苗在原培养容器中继续生长 1 周时的照片。由图 1 可以看出,幼苗的胚芽和 2 片子叶的子叶柄保留完好,这说明在剪取外植体时,只剪取子叶的叶身部分,未涉及其基部的潜伏侧芽和中间的胚芽。因此,子叶外植体上经诱导后再生出的芽(丛)可以被确认是不定芽。

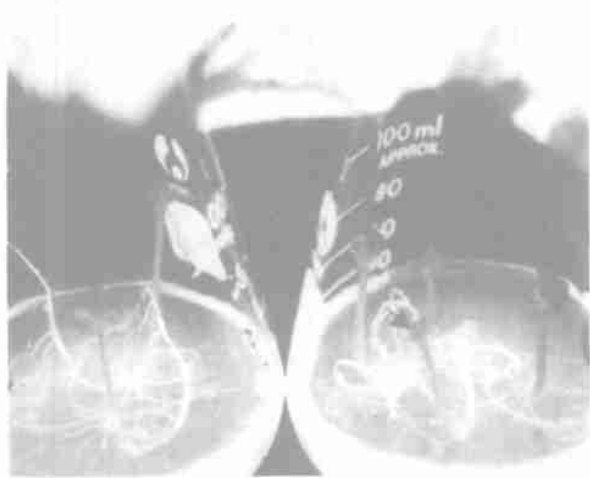


图 1 外植体准备——剪去 2 片子叶后留下完好子叶柄和胚芽(箭头所示)

Fig 1 Explants preparing- stem apex and petiole of cotyledon left completely after abscised cotyledon explants (indicated as arrows)

2.2 不定芽和愈伤组织诱导

外植体接种到不定芽诱导培养基上一昼夜后,就可观察到有明显的增大反应。3~5 d 后近轴端切口明显肿大,10~13 d 时一部分外植体的近轴端切口长出肉眼可分辨的不定芽(丛),而远轴端很少有不定芽生成。随着培养天数的增加,发生的芽(丛)数增加,但大多数外植体切口处都长出数量不等的愈

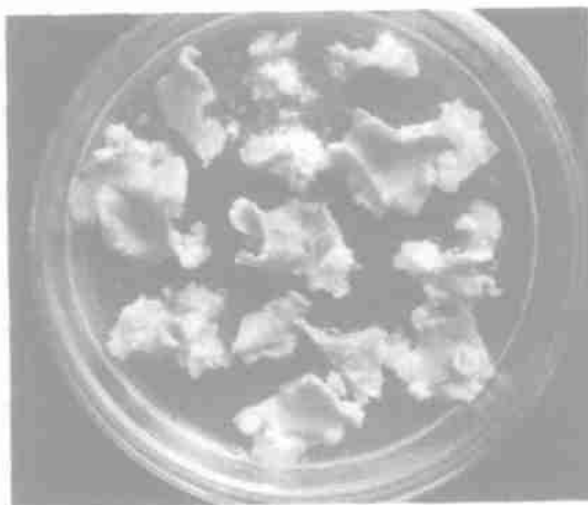


图 2 '黄旦子'子叶外植体在芽诱导培养基上发生不定芽和愈伤组织(箭头示发生的不定芽)

Fig 2 Cotyledon explants from 'Huangdanzi' regenerated adventitious buds and calli on BM medium (arrow show adventitious buds)

伤组织。愈伤组织大多表现为白色疏松状或霜花样,有的呈水浸状(玻璃化)(图 2)。继续培养后,发现玻璃化的愈伤组织先发生褐化。

表 1 是 58 个'黄旦子'近轴端子叶外植体在 BM 培养基上的分化情况,平均不定芽分化频率为 44.8%。从表 1 还可以看出,不同重复之间不定芽分化和愈伤组织的生长情况差别很大,第 4 号平皿

(重复 4) 的 6 块外植体中, 5 块上都有不定芽发生, 不定芽分化频率为 83.3%; 而重复 7 和 9, 每平皿中
都只有 1 块外植体上有不定芽分化, 不定芽分化频率仅有 16.7%。另外, 即使是同一培养容器中的几
块外植体, 分化生长情况也有明显差异: 一块外植体自身增大至原来大小的十几倍, 不出芽也很少发生愈伤组织; 而另一块发生致密的芽丛。

表 1 58 个‘黄蛋子’近轴端子叶外植体在 BM 培养基上的分化情况统计

Table 1 Differentiation of 58 explants from a melon cultivar ‘Huangdanzi’ on BM medium				
重复编号 (平皿编号) Repetition	接种 外植体数 No. of total explants	出芽 外植体数 No. of explants with buds	外植体、不定芽和愈伤组织形态 Description of buds and calli	不定芽分化 频率/% Rate of inducing adventitious buds
1	5	1	外植体黄绿色, 子叶背面贴培养基处有疏松愈伤组织 Green and yellow explants, loosen callus formed at the undersurface of cotyledons	20
2	5	1	只有 1 个不定芽, 外植体黄绿色, 子叶背面贴培养基处有疏松愈伤组织 Only one bud formed, green and yellow explants, loosen callus formed at the undersurface of cotyledons	20
3	6	4	不定芽数目少, 外植体切口处有大量白色疏松愈伤组织 Few buds formed, a lot of white loosen calli arise from cuts of the explants	66.7
4	6	5	仅 1 个外植体上分化较多数目的不定芽, 外植体近轴端切口处有大量白色疏松愈伤组织 Only one explant had more buds, another explants had fewer, a lot of white loosen calli arise from the adaxial cuts of the explants	83.3
5	6	3	不定芽数目少, 1 个外植体的近轴端和远轴端切口都有一小丛芽, 近轴端切口产生大量疏松愈伤组织 The total quantity of adventitious buds are few, both adaxial and distal edges had 1 cluster small buds, respectively, a lot of loosen calli arise at the adaxial cuts of the explants	50
6	6	3	1 块外植体的近轴端和远轴端切口都有 1 个芽丛, 但不定芽数目少, 有 1 个绿色瘤状肿物, 愈伤组织轻度玻璃化 Both adaxial and distal edges had a cluster adventitious buds, but the quantity of buds were few. There had a green tumor. The calli were vitrification slightly	50
7	6	1	只有 1 个不定芽, 2 块外植体除了略有增大外, 无分化反应, 有 5 团水浸状愈伤组织 Only 1 adventitious bud; 2 explants except for had enlarged themselves little, hadn't any reaction to inducing at all 5 pieces of callus presented vitrification	16.7
8	6	3	不定芽数目少, 1 块外植体除自身略有增大外, 无分化反应, 愈伤组织污白色, 轻度玻璃化或褐化 Few adventitious buds, one explant except for had enlarged itself little, hadn't any reaction to inducing Calli were presented dirty white, and vitrification or brown slightly	50
9	6	1	外植体表现黄化, 6 块外植体都产生疏松水浸样愈伤组织, 轻度褐化 Explants occurred yellowish All of 6 pieces of cotyledon generated puff callus, and the callus presented brown and water-soaked subsequently	16.7
10	6	4	不定芽数目少, 1 芽丛表现水浸样, 愈伤组织量中等, 疏松 Few adventitious buds, a cluster buds presented water-soaked The quantity of calli was in middle level, and presented loosen	66.7
总和 Total	58	26		平均 Average 44.8%

注: 不定芽分化频率/% = (有不定芽发生的外植体数/接种的外植体数) × 100。
Note: Rate of inducing adventitious buds/% = (No. of explants with adventitious buds/No. of total explants) × 100

试验中还观察到, 最早一批不定芽主要以直接出芽方式发生, 没有明显的愈伤化过程。继续培养后, 从外植体切口和与培养基贴近的一面长出愈伤组织, 但愈伤组织多呈疏松霜花状, 白色或淡绿色, 少数疏松愈伤组织中长绿色小瘤状物, 小瘤状物以后可分化出不定芽。有不定芽分化的外植体之间, 在不定芽形成数目上也有较大差异。分化较多数目不定芽的外植体往往自身增大不多, 愈伤组织的发生量也小。而过度肿大的外植体和产生大量愈伤组织的外植体都不能分化出较多的不定芽。除了近轴端切口容易发生不定芽和愈伤组织外, 子叶切块两

侧边向下翻卷扎入培养基的部位也容易分化出芽或长出愈伤组织。

2.3 不定芽伸长

转接到 EM 培养基上的不定芽(丛)大多数能够迅速伸长长大(图 3), 但存在不同程度的玻璃化现象, 有的接种约 1 周后, 整瓶材料都出现严重的玻璃化(图 4)。越是先发出的大芽, 越容易发生玻璃化, 这可能是由于其吸收了较多的植物生长调节剂 6-BA 的缘故。但若为了减轻玻璃化的发生而过早将不定芽转至低质量浓度植物激素的 EM 培养基上, 则芽丛中一些尚未分化完全的小芽不能伸长长大。



图 3 “黄蛋子”子叶外植体发生的不定芽被切割后转移到不定芽伸长培养基上继代

Fig 3 Incised buds cut from cotyledon explants were transferred on EM medium for subculture



图 4 “黄蛋子”不定芽的玻璃化现象

Fig 4 Vitrification of adventitious buds

2.4 无根苗发根再生完整植株

甜瓜组培苗容易发根。较大的无根苗转接于 RM 培养基上约 10 d 后即发出白色不定根,再生成完整植株。随着根系的扩大,再生小植株生长量迅速增加,约 15 d 后可移入温室做炼苗和移栽入土准备。2 cm 以上高度的无根苗转移至发根培养基上,生根率可达 99%。从外植体培养到获得完整再生植株一般需 45~60 d。

即使是玻璃化的芽丛,被移至 RM 培养基上,大多数也能发根。随着根系的扩大,无根苗玻璃化程度逐渐减轻,长出恢复正常绿色的新叶(图 5)。



图 5 “黄蛋子”子叶外植体再生完整植株

Fig 5 Regenerated plantlet from 'Huangdanzi' cotyledon explant

3 讨 论

1989 年 Dirks 等^[6]用甜瓜真叶和子叶作为外植体进行甜瓜再生试验,结果表明 MS + 6-BA 1.0

mg/L 培养基配方能够诱导甜瓜幼龄子叶高频率发生不定芽。Niedz 等^[7]研究结果也表明,以甜瓜幼龄子叶为外植体,MS 培养基中只添加适量 6-BA,可获得 3 个厚皮甜瓜基因型 65%~75% 的不定芽分化频率。以后 Gonsalves 等^[9]将甜瓜基因型扩大到 5 个厚皮甜瓜杂交种,得到 89% 的最高不定芽分化频率,并认为 MS 基本培养基附加 6-BA 1~2 mg/L 可广泛适合各种甜瓜基因型的不定芽诱导。陆璐^[15]曾比较了 ZT(玉米素)、KT(植物激动素)和 6-BA 3 种植物细胞分裂素单独和配合 IAA、2,4-D 等的诱导分化效果,发现再生频率高的品种在不同配方的培养基上始终能获得较高的分化频率,因此认为,不同品种在再生能力上存在遗传上的本质差异。Galperin 等^[12]的最新研究结果表明,在甜瓜器官的再生能力上存在基因型差异,有 2 个不完全显性位点决定着器官发生的能力。

虽然厚皮甜瓜的再生频率普遍较薄皮甜瓜的低,但本研究获得的“黄蛋子”不定芽分化频率平均为 44.8%,在厚皮甜瓜中亦属于分化频率较低。因此可以认为甜瓜“黄蛋子”是不易再生的品种,不适合进行以细胞或组织再生完整植株为基础的,如农杆菌或基因枪介导的转基因操作。

但是实验中还发现,从不同个体上切取的外植体,即便在同一培养容器中也表现出分化上的明显差异,这可能是由于育种工作者在育种过程中只对目标农艺性状,如产量、品质等进行选择和纯化所致。所谓的纯,只是就所选择的育种性状而言的,而其他未被列入选择项目的性状,如再生能力、某些内源激素含量等,仍然以杂合基因状态存在于研究群

体中。据此分析,可以在组织培养条件下选择出再生能力强的个体,通过育种中的自交技术对其进行纯化,以改良‘黄蛋子’品种的再生能力,并揭示甜瓜植株再生能力方面的遗传机理。

[参考文献]

- [1] 中国农业科学院郑州果树研究所,中国园艺学会西甜瓜专业委员会,中国园艺学会西甜瓜协会.中国西瓜甜瓜[M].北京:中国农业出版社,2000 506- 532
- [2] 朱至清.体细胞无性系变异与植物改良[J].植物学通报,1991,8(增刊): 1- 8
- [3] 马国斌.西瓜甜瓜体细胞无性系的发生、变异与遗传转化研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,1997. 13- 35
- [4] 吴明珠.当前西瓜甜瓜育种主要动态及今后育种目标研讨[J].中国西瓜甜瓜,2003,(3): 1- 3
- [5] 杨健.转基因技术及其在西瓜甜瓜上的应用[J].中国西瓜甜瓜,1998,(4): 22- 24
- [6] Dirks R, Van B M. *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. [J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 626- 627.
- [7] Niedz R P, Schiller S S, Dunbar K B, et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 18(3): 313- 319
- [8] Chee P P. Plant regeneration from cotyledons of *Cucumis melo* L. ‘Topmark’ [J]. Hort Science, 1991, 26(7): 908- 910
- [9] Gonsalves C, Xue B D, Yepes M, et al. Transforming cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluation transgenic plants for protection against infection[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(2): 345- 355
- [10] Ezura H, Oosawa K. Selective regeneration of plants from diploid and tetraploid cells in adventitious shoot cultures of melon[J]. Plant Tissue Culture Letters, 1994, 11(1): 26- 33
- [11] Jeffrey W A, Rhodes B B. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue culture of melon[J]. Hort Science, 1994, 29(6): 689- 692
- [12] Galperin M, Zelcer A, Kenigsbuch D. High competence for adventitious regeneration in the BU-21/3 melon genotype is controlled by a single dominant locus[J]. Hort Science, 2003, 36(6): 1167- 1168
- [13] 马国斌,王鸣,郑学勤.甜瓜组织培养再生植株中的四倍体变异[J].园艺学报,1999,26(2): 128- 130
- [14] 尹俊,徐妙云,贾小平,等.河套蜜瓜体胚发生及植株再生的研究[J].园艺学报,2000,27(6): 455- 457
- [15] 陆璐.甜瓜ACC氧化酶反义基因植物表达载体构建及转化甜瓜栽培品种[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,1999 21- 27

Study on plant regeneration from cotyledon explants of a melon cultivar ‘Huangdanzi’

LU Lu^{1,2}, ZHAO Chang-zeng², LU Ting³

(1 Institute of Bioscience and Biotechnology, State Key Lab for Tropical Crops Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Science, Haikou, Hainan 571101, China;

2 Department of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3 Department of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: To establish plant regeneration technique system of a melon cultivar ‘Huangdanzi’, and to realize its genetic ability and character in regeneration, cotyledon pieces from young seedling of ‘Huangdanzi’ were inoculated on bud inducing medium MS+ 6-BA 2.0 mg/L. It proved that the inducing bud(s) from cotyledon explants were adventitious bud(s) source. 58 pieces of cotyledon explants regenerated adventitious buds at an average frequency of 44.8%, and produced calli in different characters and amounts. On medium MS+ 6-BA 0.05 mg/L, the adventitious buds elongated, but part of them exhibited vitrification. In the medium 1/2 MS+ IAA 0.5 mg/L, the elongated shoots rooted at the rate of 99%. Compared with other thick-skin melon cultivars in relative reports, ‘Huangdanzi’ does not regenerate easily, but obvious differences existed between individuals in regenerative rate and characters. Probably we can select individuals with higher regenerative ability from ‘Huangdanzi’, and breed them to new lines with better regeneration ability.

Key words: melon; ‘Huangdanzi’; cotyledon; adventitious bud; regeneration