

单倍体甜瓜离体繁殖的方法

张永兵^{1,2}, 伊鸿平², 贾媛媛¹, 冯炯鑫², 吴明珠², 陈劲枫^{1*}

(¹作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²新疆农业科学院哈密瓜研究中心, 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 以单倍体甜瓜无菌苗的顶芽和腋芽为外植体进行离体繁殖研究。结果表明: 单倍体甜瓜最佳增殖培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹, 最适生根培养基为 1/2 MS + BA 0.5 mg · L⁻¹, 增殖系数为 3.57。染色体计数表明没有倍性变化发生。

关键词: 甜瓜; 单倍体; 离体繁殖

中图分类号: S 652 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0497-04

Propagation of Haploid Melon (*Cucumis melo* L.) in Vitro

ZHANG Yong-bing^{1,2}, YI Hong-ping², JIA Yuan-yuan¹, FENG Jiong-xin², WU Ming-zhu², and CHEN Jin-feng^{1*}

(¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Research Center of Hami Melon, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: The propagation *in vitro* of haploid melon was investigated using shoot-tips and lateral buds from haploid melon plantlets. The results indicated that the optimal media for shoot proliferation was MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ and the optimal media for rooting was 1/2 MS + BA 0.5 mg · L⁻¹. The multiplication coefficient was 3.57. The chromosome number was checked and no ploidy variation occurred among these plants.

Key words: Melon; Haploid; Propagation *in vitro*

作者利用辐射花粉授粉及胚胎培养技术, 得到了甜瓜 (*Cucumis melo* L., 2n = 24) 单倍体植株 (张永兵 等, 2006)。单倍体的获得对甜瓜遗传育种研究具有重要意义。

由于单倍体甜瓜的雌花和雄花不能正常开放, 雌、雄蕊均败育, 所以无法进行有性繁殖。而通过组织培养快繁技术, 可以在短期内快速大量繁殖甜瓜单倍体材料, 供甜瓜遗传转化及双单倍体合成等研究。迄今对二倍体甜瓜离体快繁研究的报道较多 (赵月玲和夏海武, 1999; 赵建萍 等, 2002; 庄志鸿 等, 2003), 但有关单倍体甜瓜离体繁殖的研究仍未见报道。

作者以单倍体甜瓜无菌苗的顶芽或腋芽为试材, 研究其无性繁殖能力及所需的最适增殖培养基植物生长调节剂配比, 旨在建立单倍体甜瓜的离体繁殖体系以获得大量的单倍体材料。

1 材料与方法

所用单倍体来自于厚皮类型甜瓜 4810 (张永兵 等, 2006)。

取单倍体无菌苗的顶芽或腋芽 (0.5 ~ 1.0 cm) 进行增殖培养, 以 MS 为基本培养基, 添加不

收稿日期: 2006 - 11 - 16; 修回日期: 2007 - 03 - 12

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2005088); 新疆自治区高新技术研究发展计划项目 (200511106)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

同的植物生长调节剂 (表 1), 琼脂 0.8%, 蔗糖 3%, pH 5.8; 培养温度 (26 ± 1) ; 光照强度 2 000 ~ 2 500 lx, 光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每个处理 5 个三角瓶, 每个三角瓶接 8 个芽, 试验重复 2 次。

2~4 周后调查统计芽的增殖系数, 长度小于 0.5 cm 的芽不计。

不定芽在 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上伸长至 1.5 ~ 2.0 cm 时, 取大小一致的芽接种在 $1/2\text{MS} + \text{BA } 0, 0.2, 0.5, 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 种培养基中进行生根培养, 培养基基本成分及培养条件与增殖培养相同。每个处理 5 个三角瓶, 每个三角瓶接 5 个芽, 试验重复 2 次。

2 周后统计生根率及根系生长情况。揭开瓶盖适应 2~3 d, 用自来水洗净琼脂后移栽入育苗穴盘。将穴盘苗置于小拱棚中驯化, 相对湿度 80% ~ 90%, 温度 20 ~ 25 。5~7 d 后揭开小拱棚, 组培苗驯化 2 周后定植在南京农业大学园艺学院实验农场。

参照陈劲枫和钱春桃 (2002) 的卷须制片方法, 随机检测再生植株的体细胞染色体数目, 并观察部分形态学性状。采用 SPSS 12.0 软件统计处理数据。

2 结果与分析

2.1 不定芽的再生

将单倍体的芽接种在增殖培养基上, 一周后开始萌发, 继而在芽的基部分化出不定芽丛 (图 1, A)。

如表 1 所示, 在不同浓度的 6-BA 以及 6-BA 和 NAA 的组合条件下, 不定芽的增殖生长情况不同。6-BA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 而 NAA 浓度为 0 的培养基的增殖系数最高, 不定芽生长健壮而且长度适中。随着 6-BA 浓度的增高, 不定芽的诱导频率也逐渐增高。但是当 6-BA 的浓度大于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽挤在一起成簇状而不能伸长。6-BA 浓度升至 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织化的程度严重。

此外, 6-BA 和 NAA 的组合效果不及单独使用 6-BA 效果好, 组合条件下芽的玻璃化程度也较严重。

因此, 单倍体甜瓜的最适增殖培养基为 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 增殖系数达 3.57。

2.2 生根和驯化

培养约 10 d 后, 生根培养基上单倍体芽的基部开始萌发生根。不同处理的驯化苗生长情况不同 (图 1, B)。

在 $1/2\text{MS}$ (对照) 和 $1/2\text{MS} + \text{BA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上, 虽有近一半的芽生根, 但每个芽只萌发出 1~2 条细小的根, 驯化成活率约为 12%。BA 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生根率最高, 芽的基部形成 4~6 条白色健壮的根, 组培苗粗壮, 驯化后成活率达 80% 以上。BA 为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率为 86.7%, 但萌发的根发黄老化, 芽苗的生长缓慢, 驯化成活率仅为 36%。因此, 单倍体甜瓜再生芽的最佳生根培养基为 $1/2\text{MS} + \text{BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率达 100%。

表 1 6-BA 和 NAA 对单倍体不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of 6-BA and NAA on shoot induction of haploid

| 代号 Code | 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 增殖系数 Multiplication coefficient |
|----------------|---|--|---------------------------------------|
| M ₁ | 0 | 0 | 1.21 ef |
| M ₂ | 0.5 | 0 | 3.57 a |
| M ₃ | 1.0 | 0 | 2.85 b |
| M ₄ | 1.5 | 0 | 2.23 bc |
| M ₅ | 2.0 | 0 | 2.01 cd |
| M ₆ | 1.0 | 0.02 | 1.79 cde |
| M ₇ | 1.0 | 0.04 | 1.56 def |
| M ₈ | 1.0 | 0.06 | 1.07 f |
| M ₉ | 1.0 | 0.10 | 1.16 ef |

注: 不同字母表示在 5% 水平上差异显著。

Note: Different letter indicated significant difference at 5% level

2.3 形态学观察和细胞学鉴定

驯化成活的单倍体甜瓜再生植株在田间生长缓慢，长势较弱，基部分支较多，整体株形矮小，节间较短（图 1，E），与正常二倍体植株的形态学特征差异明显，很容易区分（图 1，D）。单倍体再生植株的叶片形状与二倍体的相似，但叶片变小、叶色加深、叶片厚度增加（图 1，F）。单倍体再生植株的雄花和雌花均不能正常开放，花蕾均逐渐变黄萎缩后脱落。

单倍体甜瓜再生植株群体的形态表现整齐一致，即使增殖多代后也未发现形态性状上的变化。

随机选取 5 株进行体细胞染色体鉴定，每株都观察 20 个以上分散良好的卷须分生细胞，结果所有体细胞染色体均为 $n = 12$ （图 1，C），表明离体繁殖的再生植株倍性稳定，未发生变异。

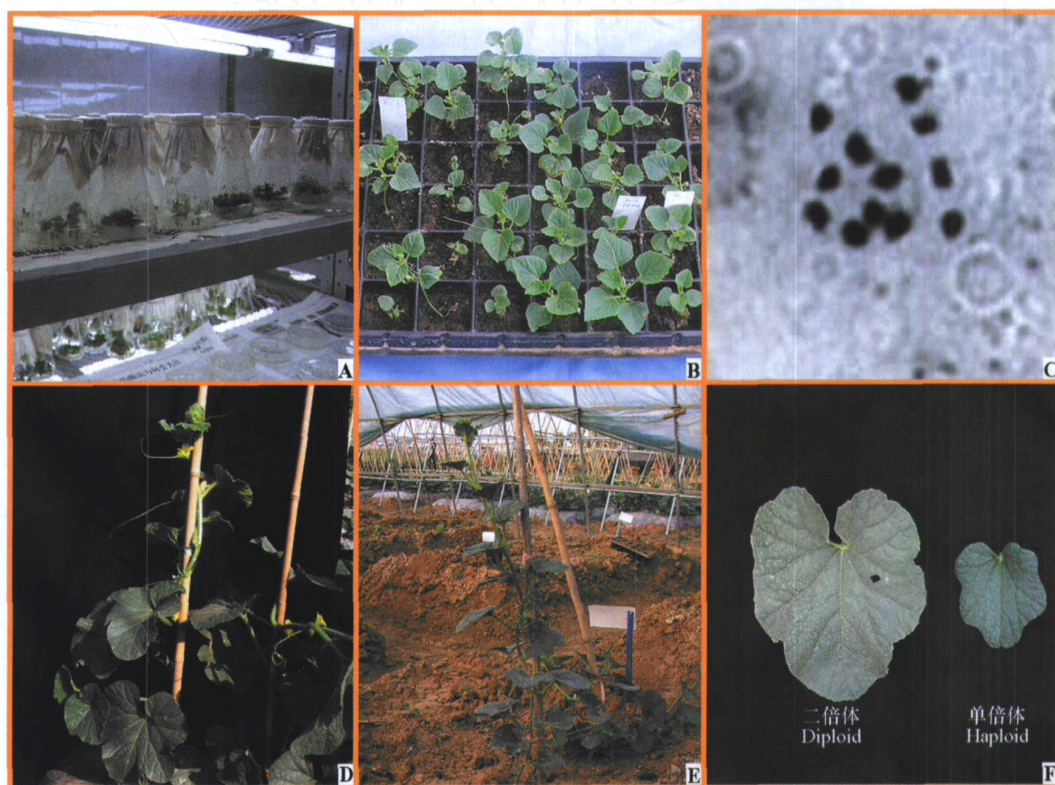


图 1 单倍体甜瓜离体繁殖

A. 增殖培养；B. 驯化苗；C. 染色体计数；D. 二倍体植株；E. 单倍体植株；F. 二倍体和单倍体叶片。

Fig 1 Propagation of haploid melon (*Cucumis melo* L.) in vitro

A. Multiplication; B. Acclimatization; C. Chromosome count;

D. Diploid plant; E. Haploid plant; F. Leaves of diploid and haploid plant

3 讨论

有研究表明， $6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合对二倍体甜瓜 ($2n = 24$) 不定芽的增殖效果明显，增殖系数可达 11 以上（赵月玲和夏海武，1999；赵建萍等，2002）。

与二倍体甜瓜相比，单倍体甜瓜 ($n = 12$) 的增殖能力较弱，最适增殖培养基植物生长调节剂配比及浓度不同。一方面可能是由于试验材料的基因型不同所造成；另一方面也可能是由于单倍体与二倍体甜瓜的基因组拷贝数不同，导致不同倍性材料本身所具有的内源激素水平不同。

本试验建立的单倍体甜瓜离体繁殖体系, 将为甜瓜遗传转化及双单倍体合成等研究, 提供特殊的试材。这不仅能推动甜瓜的理论基础研究, 还能加速甜瓜育种纯合系的选育, 大大提高甜瓜的育种效率。

References

- Chen Jin-feng, Qian Chun-tao. 2002. Studies on chromosome preparations using plant tendril as source tissue. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (4): 378 - 380. (in Chinese)
- 陈劲枫, 钱春桃. 2002. 利用几种园艺作物卷须制片鉴定染色体数目的研究. *园艺学报*, 29 (4): 378 - 380.
- Zhang Yong-bing, Chen Jin-feng, Yi Hong-ping, Lei Chun, Wu Ming-zhu. 2006. Induction of haploid melon (*Cucumis melo* L.) plants by pollination with irradiated pollens. *Journal of Fruit Science*, 23 (6): 892 - 895. (in Chinese)
- 张永兵, 陈劲枫, 伊鸿平, 雷 春, 吴明珠. 2006. 辐射花粉授粉诱导甜瓜单倍体. *果树学报*, 23 (6): 892 - 895.
- Zhao Jian-ping, Bai Xin-fu, Jiang Xiaoman, Bi Ke-hua. 2002. Stem-segment culture and rapid propagation of *Cucumis melo* var. *reliculatus*. *Chinese Bulletin of Botany*, 19 (6): 734 - 738. (in Chinese)
- 赵建萍, 柏新富, 蒋小满, 毕可华. 2002. 厚皮甜瓜 (*Cucumis melo* var. *reliculatus*) 的快速繁殖. *植物学通报*, 19 (6): 734 - 738.
- Zhao Yue-ling, Xia Hai-wu. 1999. Tissue culture and rapid propagation of *Cucumis melo*. *Plant Physiology Communications*, 35 (5): 377. (in Chinese)
- 赵月玲, 夏海武. 1999. 甜瓜的组织培养与快速繁殖. *植物生理学通讯*, 35 (5): 377.
- Zhuang Zhi-hong, Liu Jian, Zheng Wei-wen. 2003. Tissue culture and rapid propagation of muskmelon. *Plant Physiology Communications*, 39 (2): 140. (in Chinese)
- 庄志鸿, 刘 建, 郑伟文. 2003. 朱丽亚甜瓜的组织培养和快速繁殖. *植物生理学通讯*, 39 (2): 140.

(上接 460 页)

CNKI中国引文数据库 《园艺学报》高被引频次论文

(截至 2007年 4月)

| 序号 | 被引文献题名 | 被引文献作者 | 被引文献来源 | 被引频次 |
|----|-------------------------------|-----------------------------------|---------------|------|
| 71 | 1-甲基环丙烯对采后猕猴桃果实生理效应的影响 | 樊秀彩, 张继澍 | 园艺学报 /2001/05 | 46 |
| 72 | 萝卜胞质大白菜雄性不育系的生化分析 | 孙日飞, 方智远, 张淑江, 李菲, 钮心恪, 吴飞燕 | 园艺学报 /2000/03 | 46 |
| 73 | 番茄育种研究主要进展——文献综述 | 杜永臣, 严准, 王孝宣, 李树德, 朱德蔚 | 园艺学报 /1999/03 | 46 |
| 74 | 草莓主栽品种再生和转化的研究 | 张志宏, 吴禄平, 代红艳, 王国英, 赵天永, 毕晓颖, 杜国栋 | 园艺学报 /2001/03 | 46 |
| 75 | RAPD 标记在苹果属种间杂交一代的分离方式 | 刘孟军 | 园艺学报 /1998/03 | 46 |
| 76 | 红富士苹果套袋果实色泽与激素含量的变化 | 李秀菊, 刘用生, 束怀瑞 | 园艺学报 /1998/03 | 45 |
| 77 | 青椒子叶培养及植株再生 | 曹冬孙, 贾士荣 | 园艺学报 /1993/02 | 45 |
| 78 | 鸭梨酶促褐变的生化机制及底物鉴定 | 吴耕西, 周宏伟, 汪建民 | 园艺学报 /1992/03 | 45 |
| 79 | 脂氧合酶与果实的成熟衰老——文献综述 | 陈昆松, 张上隆 | 园艺学报 /1998/04 | 45 |
| 80 | 榨菜胞质雄性不育及其农艺性状的研究 | 陈竹君, 张明方, 汪炳良, 董伟敏, 黄素青 | 园艺学报 /1995/01 | 45 |
| 81 | 根据花粉形态探讨梨属植物的亲缘关系 | 邹乐敏, 张西民, 张志德, 宋保邦, 郭绍仙 | 园艺学报 /1986/04 | 45 |
| 82 | 弱光对甜椒不同品种光合特性的影响 | 睦晓蕾, 蒋健箴, 王志源, 朱雨杰 | 园艺学报 /1999/05 | 45 |
| 83 | 设施栽培油桃光合特性研究 | 王志强, 何方, 牛良, 刘淑娥 | 园艺学报 /2000/04 | 45 |
| 84 | 桃果实发育中褐变因子变化规律的研究 | 陈秀芳, 王坤范 | 园艺学报 /1995/03 | 45 |
| 85 | 遮荫对匙叶天南星生长及光合特性的影响 | 范燕萍, 余让才, 郭志华 | 园艺学报 /1998/03 | 45 |
| 86 | 柑桔原生质体分离及再生植株的研究 | 邓秀新, 章文才, 万蜀渊 | 园艺学报 /1988/02 | 45 |
| 87 | 玫红百合为亲本育成百合种间杂种 | 黄济明, 赵晓艺, 张国民, 倪跃元 | 园艺学报 /1990/02 | 45 |
| 88 | 低温弱光对不同黄瓜品种幼苗光合作用的影响 | 王永健, 张海英, 张峰, 许勇, 曹婉虹, 康国斌 | 园艺学报 /2001/03 | 45 |
| 89 | 辣椒子叶离体培养和植株再生体系的建立 | 余小林, 李乃坚, 黄自然, 李颖 | 园艺学报 /2000/01 | 44 |
| 90 | 大白菜异源胞质雄性不育系 CMS3411-7 的选育及应用 | 柯桂兰, 赵稚雅, 宋胭脂, 张鲁刚, 赵利民 | 园艺学报 /1992/04 | 44 |

(下转 524 页)