

河套蜜瓜子叶诱导形成体细胞胚的研究

韩红岩 李连国* 贾宇臣 张清梅

(内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

摘要: 以河套蜜瓜成熟种子子叶为外植体, 研究体细胞胚途径再生培养的主要影响因素, 并对体胚发生过程进行了观察。结果表明: 体细胞胚发生对培养基糖源浓度要求较高, MS附加 60 g/L 的糖源效果最好; 最佳植物生长调节剂组合为 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L; 1日苗龄子叶为最佳外植体源; 在诱导培养基上经暗培养 1周、光培养 1周, 再转入胚发育培养基, 有利于成熟胚的产生; 体细胞胚可产生在愈伤组织内部或表面、外植体表面、不定根上及外植体维管束的束中分生组织等部位。

关键词: 甜瓜; 体细胞胚; 再生植株

中图分类号: S 652 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1108-03

Studies of Somatic Embryo via Cotyledon Induction in *Cucumis melon* L. 'Hetao'

Han Hongyan, Li Lianguo*, Jia Yuchen, and Zhang Qingmei

(Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: The main factors of somatic embryo on *Cucumis melon* L. 'Hetao' from cotyledon explants were studied and embryogenesis was observed. The results indicate that the highest regeneration was occurred on MS medium containing 60 g/L sugar and supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA. Daily cotyledon explants were cultured one week in darkness, followed by another week photoperiod before transferring to embryos development medium, produced more mature embryos. Somatic embryos were formed from the inside or the surface of callus, the surface of explant, adventitious root and meristem of explant vascular.

Key words: *Cucumis melon* L.; Somatic embryo; Regeneration plant

1 目的、材料与方法

河套蜜瓜主要分布在内蒙古河套平原地区, 其风味浓香、甘甜爽口, 但成熟后易迅速软化腐烂, 仅能贮放 1周时间, 用减压、低湿、真空等各种保鲜方法都难以遏止软化。现代生物技术的研究为解决这一问题开辟了广阔前景。研究表明, 体细胞胚是由具有卵细胞特性的胚性细胞发育而来, 而胚性细胞具有很强的接受外源 DNA 的能力, 是理想的基因转化感受细胞^[1]。作者进行河套蜜瓜体胚再生的研究, 是要建立高效的再生系统, 为开展保鲜基因的遗传转化打下基础。

选择成熟饱满的河套蜜瓜种子, 去种皮后用 0.1% 的升汞溶液消毒 7 min, 用无菌水冲洗 4 ~ 6 次, 在无菌水中浸泡 6 ~ 8 h, 切除种胚, 去种膜, 将单片子叶横切成基部、顶部两部分作为外植体, 以远轴面接触培养基, 诱导培养 2周 (暗培养、光培养各 1周), 温度 (25 ± 1) °C, 光照时间 16 h/d, 光强 2 400 lx。期间定期取样, 用 FAA 液固定, 作常规石蜡切片, 切片厚 8 μm, 番红 - 固绿染色, 观察照相。筛选最适的植物生长调节剂、糖源、最佳暗培养时间, 以培养 1 d 的子叶为外植体。为确定最佳培养时期, 取 0 ~ 2 d 的子叶为外植体。

基本培养基 MS (除糖源试验外, 均采用浓度为 6% 蔗糖), 琼脂 0.8%, pH 5.8, 所用植物生长调节剂为 2,4-D、6-BA, 糖源分别为 3%、6%、9% 的蔗糖、葡萄糖, 培养基在 121 °C 高压灭菌 20 min。

经 2周体胚诱导培养, 3周体胚发育培养之后, 调查统计外植体响应率 (分化体细胞胚的外植体数/诱导处理的总外植体数) 和平均体胚数 (诱导产生的体细胞胚总数/产生体胚的外植体数)。

收稿日期: 2005 - 01 - 11; 修回日期: 2005 - 05 - 10

基金项目: 内蒙古农业大学博士基金项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: nmndllg@yahoo.com.cn)

2 结果与分析

2.1 体胚发生发育过程的形态学观察

将河套蜜瓜子叶外植体接种于诱导培养基上，经 1 周暗培养，子叶明显膨大，切口处产生乳白色愈伤组织。进入光培养阶段后，愈伤组织逐渐转为黄绿色并不断增加。第 3 周转到成熟培养基，培养 12 d，外植体表面产生致密光滑胚状体（图版，1），继续培养陆续有不同形态体胚发生。将成熟胚（图版，2）剥离并转到萌发培养基上，胚状体逐渐长大，根芽萌动（图版，3），形成完整植株（图版，4）。也可不剥离体胚，让其原位萌发成植株（图版，5）。多数植物脱分化需要较高浓度的 2,4-D，继而必须降低其浓度，才能使胚性细胞正常发育^[2]。作者在河套蜜瓜体胚诱导中采用三步法，首先采用较高浓度 2,4-D（2.0 mg/L）配合 6-BA（1.0 mg/L）诱导出光滑致密的球形胚，之后在去除植物生长调节剂的 MS 培养基上球形胚进一步发育成心形胚至子叶胚，最后成熟胚在萌发培养基上形成再生体胚植株。

本研究观察到，在愈伤组织表面（图版，6）及内部、子叶外植体表面、维管束束中分生组织（图版，7）均有体胚发生。另外，在外植体形成的不定根表面也有少量体细胞胚发生（图版，8）。

2.2 体胚诱导和发育培养基糖源种类及浓度的优化

由表 1 可见，河套蜜瓜子叶外植体体胚发生，对培养基糖源种类变化不敏感。蔗糖和葡萄糖均能诱导体胚发生。而糖源浓度的变化对子叶外植体体胚发生影响很大。两种糖源均以 60 g/L 的浓度对体细胞胚诱导效果最好。

2.3 体胚诱导培养基植物生长调节剂种类及浓度的优化

由表 2 可见，2,4-D 和 6-BA 单独使用时，虽然能促进外植体形成愈伤组织，但未能诱导外植体产生体细胞胚。当两种植物生长调节剂配合使用时，才能诱导体细胞胚产生。不同浓度及配比诱导效果不同，2,4-D 为 2.0 mg/L 配合 6-BA 1.0 mg/L 的组合效果最好，外植体响应率、平均体胚数均明显高于其它处理。

2.4 不同子叶外植体对体细胞胚诱导的影响

所有外植体经暗培养、光培养各 1 周后，在近轴端都产生黄绿色愈伤组织，转入胚发育培养基，在 1~2 周内，外植体近轴端边缘陆续产生绿色可见的成熟胚。0、1 和 2 d 子叶外植体再生率分别为 46%、62% 和 34%，平均体胚数分别为 7、9 和 4 个，因此利用子叶诱导不定胚时，子叶的时期也很重要。

无论何种外植体，它们所处的发育状态与其来源均影响体胚发生^[3]。不同培养天数的子叶体胚发生率均以子叶基部为外植体的远远高于以子叶顶部为外植体的，而且同一外植体形态学下端的体胚发生率远远多于形态学上端的。鉴于此，以子叶基部为接种材料最适合河套蜜瓜体细胞胚诱导。

表 1 糖源种类及浓度对体细胞胚发生的影响
Table 1 Effect of kinds and concentration of sugar on explant regeneration

糖源种类	糖源浓度	外植体响应率	平均体胚数
Kinds of Sugar(g/L)	Concentration sugar(g/L)	Rate of responded explants(%)	Average number of somatic embryos
蔗糖 Sucrose	30	8.45b	4.56b
	60	23.56a	11.67a
	90	6.56b	6.67b
葡萄糖 Glucose	30	7.21b	4.11b
	60	23.15a	12.35a
	90	6.35b	5.11b

注：采用邓肯氏新复极差法进行差异显著性检验， $\alpha=0.05$ 。下表同。

Note: By Duncan's test, $\alpha=0.05$. The same below.

表 2 不同植物生长调节剂种类及浓度对比对体细胞胚发生的影响
Table 2 Effect of concentration and hormone on regeneration of explants

2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	外植体响应率	平均体胚数	愈伤组织多或少
(mg/L)	(mg/L)	Rate of responded explants(%)	Average number of somatic embryos	Amount of callus
0	0	0d	0c	**
1.0	0	0d	0c	***
2.0	0	0d	0c	*****
3.0	0	0d	0c	***
0	0.5	0d	0c	***
0	1.0	0d	0c	***
0	1.5	0d	0c	***
1.0	0.5	7.45c	6.32b	***
1.0	1.0	6.75c	5.25b	***
1.0	1.5	4.56c	6.02b	***
2.0	0.5	12.86b	6.75b	****
2.0	1.0	23.56a	12.25a	*****
2.0	1.5	14.22b	7.22b	*****
3.0	0.5	5.65c	6.51b	***
3.0	1.0	7.82c	6.11b	***
3.0	1.5	11.92b	6.01b	***

注：“*”号的多少代表愈伤组织的多少。下表同。

Note: “*” number means the volume callus. The same below.

2.5 暗培养时间对体细胞胚诱导的影响

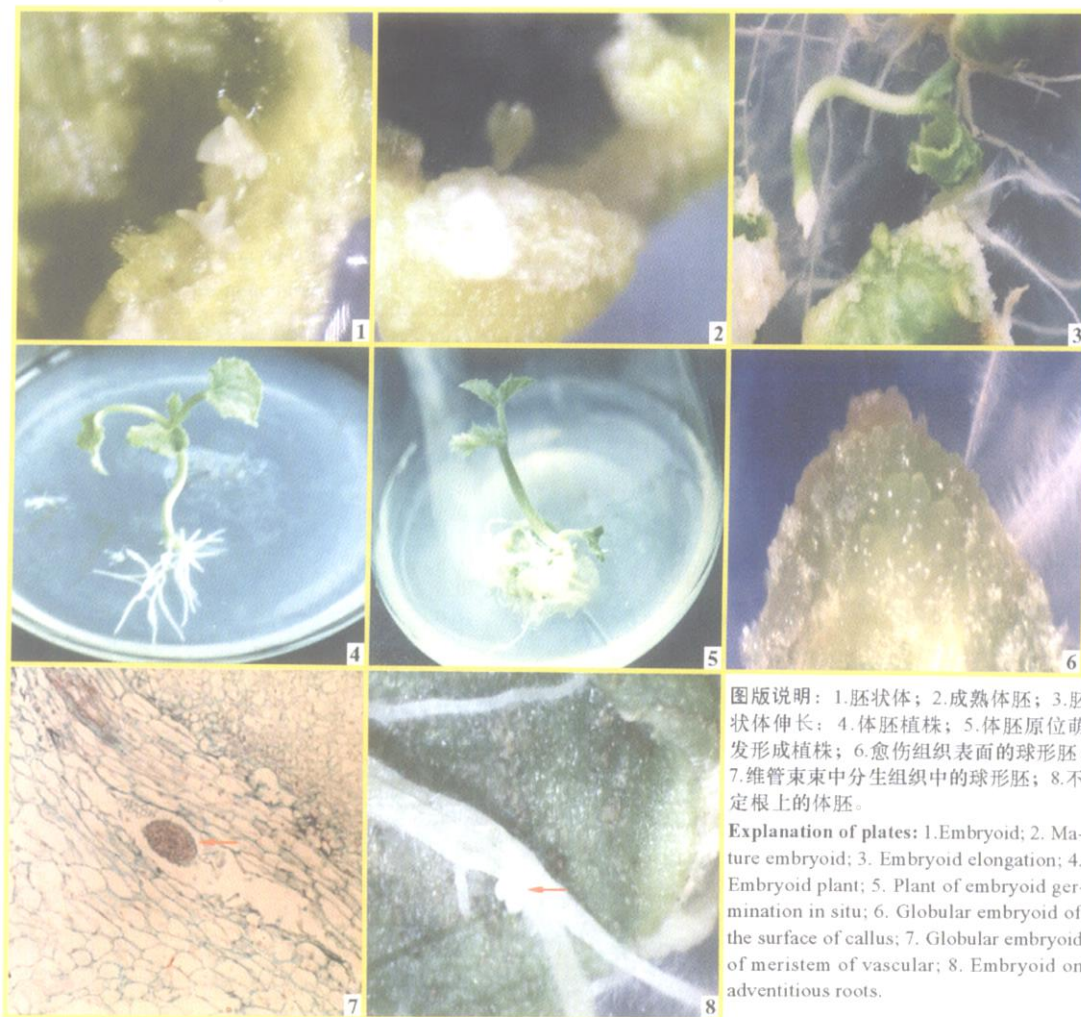
由表 3 可见, 接种于诱导培养基的外植体, 完全光照培养 2 周或暗培养 2 周、3 周后转入胚发育培养基, 均只产生少量愈伤组织, 最终无成熟胚; 而经暗培养、光培养各 1 周后再转入胚发育培养基, 则 1~2 周内陆续产生成熟胚, 且绿色正常, 外植体响应率为 54%。可见, 在诱导培养基上暗培养 1 周、光培养 1 周后转入胚发育培养基能获得较好效果。

表 3 暗培养时间对体细胞胚发生的影响

黑暗周数 Dark weeks	见光周数 Light weeks	外植体响应率 Rate of responded explants(%)	愈伤组织多少 Amount of callus
0	2	0	* *
1	1	54	* * * *
2	0	0	* *
3	0	0	* *

参考文献:

- 1 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 黄敏仁. 植物体细胞胚发生机理的研究进展. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2003, 27 (1): 75~80
Chen J H, Shi J S, Zhuge Q, Huang M R. Progress on the mechanism of somatic embryogenesis of plants and research trends Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2003, 27 (1): 75~80 (in Chinese)
- 2 Kwack S N, Fujieda K. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata*. J. pn Soc Hort Sci, 1988, (57): 34~42
- 3 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 果树的体细胞胚发生. 四川农业大学学报, 1999, 17 (1): 69~79
Tang H R, Wang Y Q, Ren Z L. Somatic embryogenesis in fruit crops Journal of Sichuan Agricultural University, 1999, 17 (1): 69~79 (in Chinese)



图版说明: 1. 胚状体; 2. 成熟胚状体; 3. 胚状体伸长; 4. 体胚植株; 5. 体胚原位萌发形成植株; 6. 愈伤组织表面的球形胚; 7. 维管束束中分生组织中的球形胚; 8. 不定根上的体胚。

Explanation of plates: 1. Embryoid; 2. Mature embryoid; 3. Embryoid elongation; 4. Embryoid plant; 5. Plant of embryoid germination in situ; 6. Globular embryo of the surface of callus; 7. Globular embryo of meristem of vascular; 8. Embryoid on adventitious roots.