

# 小果型西瓜离体诱导四倍体的初步研究

袁建民<sup>1,2</sup>, 詹园凤<sup>1</sup>, 党选民<sup>1</sup> (1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南儋州 571737; 2. 海南大学, 海南儋州 571737)

**摘要** [目的] 为小果型西瓜三倍体的育种奠定基础。[方法] 以二倍体小果型西瓜优良自交系 MH-39-1 的子叶为外植体进行离体诱导四倍体的研究。[结果] 100 mg/L 秋水仙素处理子叶的不定芽分化率达 66.7%, 平均分化不定芽 6.7 个。400 mg/L 秋水仙素处理的四倍体诱导率为 20.0%。秋水仙素处理 12 h 的不定芽分化率为 83.3%, 处理 48 h 的不定芽分化率为 16.7%。秋水仙素处理 24~36 h 的四倍体诱导率为 16.7%。4.0 mg/L 6-BA 处理的不定芽分化率为 83.3%, 1.0 mg/L 6-BA 处理的不定芽分化率为 58.3%。再生芽在 4 种生根培养基上的生根率均在 90% 以上, 在不添加植物生长调节剂的培养基上再生苗的平均生根数仅为 6.5 条, 添加 NAA 的培养基上再生苗的平均生根数在 10 条以上, 但根短而粗。[结论] 初步确定秋水仙素离体诱导小果型西瓜四倍体的适宜浓度和处理时间为 400 mg/L 和 24 h。

**关键词** 西瓜; 四倍体; 离体诱导

**中图分类号** S651 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)16-07438-03

## Preliminary Study on the Induction *in vitro* of Tetraploid Mini-watermelon

YUAN Jian-min et al (Institute of Tropical Crops Genetic Resources in Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key and Open Laboratory for Tropical Crops Germplasm Utilization of Agricultural Ministry, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract** [Objective] The study aimed to lay a foundation for breeding the triploid mini-watermelon. [Method] With the cotyledons of good inbred line MH-39-1 in diploid mini-watermelon as explants, the induction *in vitro* of tetraploid mini-watermelon was studied. [Result] The differentiation rate of adventitious buds from its cotyledons treated with 100 mg/L colchicine was up to 66.7% and the average number of adventitious buds differentiated from its cotyledons was 6.7. The induction rate of tetraploid in treatment with 400 mg/L colchicine was 20.0%. The differentiation rate of adventitious buds was 83.3% in treatment with colchicine for 12 h and 16.7% in treatment with colchicine for 48 h. The induction rate of tetraploid in treatment with colchicine for 24-36 h was 16.7%. The differentiation rate of adventitious buds was 83.3% in treatment with 4.0 mg/L BA and 58.3% in treatment with 1.0 mg/L BA. The rooting rates of regenerated buds on the 4 rooting media were higher than 90%, the average rooting number of regenerated seedlings on the media without plant growth regulator was only 6.5, that on the media with NAA was more than 10 and the roots were short and thick. [Conclusion] It was preliminarily determined that the suitable concn. and treatment time for inducing tetraploid mini-watermelon *in vitro* with colchicine were 400 mg/L and 24 h.

**Key words** Watermelon; Tetraploid; Induction *in vitro*

西瓜汁多味甘, 性凉爽口, 是广大城乡居民喜食的消暑解渴佳品<sup>[1]</sup>。近年来, 随着人们生活水平的提高, 小果型西瓜由于外观小巧玲珑、品质优良而受到消费者青睐, 在国内发展相当迅速。我国选育的小型西瓜品种十几个但多数为有籽西瓜品种, 无籽西瓜品种还很少。这是由于我国小型西瓜种质资源相对较少, 影响了三倍体小型无籽西瓜的发展。

四倍体西瓜材料的获得是三倍体无籽西瓜育种成功的关键。传统的西瓜四倍体育种方法具有诱导率低, 部分是嵌合体的缺点。利用离体组织培养方法诱导四倍体可以诱变大量的亲本材料, 培养条件容易控制, 诱导率高, 重复性好, 不易产生嵌合体<sup>[2]</sup>。因此, 笔者预利用化学诱变剂结合组织培养技术创造新的小型西瓜四倍体种质材料, 以期小型西瓜三倍体育种奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 供试的西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunberg) Matsumura et Nakai] 材料为中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所选育的二倍体小果型西瓜优良自交系 MH-39-1。

## 1.2 试验方 法

**1.2.1 无菌苗的获得。** 将种子浸泡 6 h; 小心剥去种壳, 用

70% 的乙醇表面消毒 30 s; 1 g/L 的升汞 (HgCl<sub>2</sub>) 溶液灭菌处理 10 min; 无菌水清洗 5 遍; 将种子平放接种于 MS + 20 g/L 蔗糖 + 6.5 g/L 琼脂培养基上培养 7 d, 使其发芽长成无菌苗。

**1.2.2 秋水仙素对四倍体诱导效果的影响。**

**1.2.2.1 秋水仙素浓度对四倍体诱导效果的影响。** 切取 4 d 苗龄的近轴端子叶, 接种于含 0、100、200、400 和 600 mg/L 的秋水仙素的液体培养基 (MS + 6-BA 2.0 mg/L) 培养 24 h; 转接到添加 6-BA 2.0 mg/L 的固体培养基上进行分化诱导。每个处理 15 个外植体。

**1.2.2.2 秋水仙素处理时间对四倍体诱导效果的影响。** 将子叶接种于含 100 mg/L 的秋水仙素的液体培养基 (MS + 6-BA 2.0 mg/L) 中, 分别处理 12、24、36 和 48 h; 转接到添加 6-BA 2.0 mg/L 的固体培养基上进行分化诱导。每个处理 24 个外植体。

**1.2.3 6-BA 浓度对不定芽诱导效果的影响。** 将子叶接种于含 100 mg/L 秋水仙素的液体培养基 (MS + 6-BA 2.0 mg/L) 中培养 24 h, 接种到含有不同浓度 6-BA (1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L) 的 MS 培养基上进行不定芽分化诱导。

**1.2.4 植株生根诱导。** 采用 MS 分别添加 NAA 0.05 mg/L, NAA 0.10 mg/L, IAA 0.10 mg/L, 对照为不添加任何激素的固体培养基中诱导生根。

**1.2.5 培养环境。** 液体培养均为暗培养, 摇床转速为 90 r/min; 固体培养光照时间为 16 h/d, 光照强度为 30~40 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。培养基的 pH 值均为 5.8, 培养温度均为 (25 ± 1) °C。

**基金项目** 海南省自然科学基金项目 (80647); 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所研究生基金 (YJS-2008-S039); 海南省重点科技计划项目 (080117)。

**作者简介** 袁建民 (1984 - ), 男, 福建建宁人, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种及生物技术。\* 通讯作者, 詹园凤, E-mail: zyf74216@163.com; 党选民, E-mail: dxmin2002@yahoo.com。

**收稿日期** 2009-03-09

$$\text{分化率}(\%) = \frac{\text{分化不定芽的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100$$

$$\text{四倍体诱导率}(\%) = \frac{\text{形成四倍体的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100$$

1.2.6 倍性鉴定方法。切取 0.5 cm 长的根尖放入 2 mmol/L 的 8-羟基喹啉预处理 3 h; 甲醇:冰醋酸 (3:1) 固定液固定 4 h; 1 mol/L 的盐酸于 60 °C 恒温解离 10 min; 固定液固定 30 min 并制作涂片, Giemsa 染液染色; Olympus DH-70 显微镜观察染色体数。

## 2 结果与分析

2.1 秋水仙素浓度对四倍体诱导效果的影响 表 1 表明, 添加不同浓度的秋水仙素, 对不定芽的分化诱导及四倍体的诱导均有一定的影响。低浓度的秋水仙素对子叶分化不定芽的影响较小, 不定芽的分化率较高, 达 66.7%, 分化不定芽的平均数为 6.7 个, 与不添加秋水仙素的处理效果较接近; 但当秋水仙素浓度升高时, 西瓜子叶不定芽分化率下降, 分化不定芽的平均数也呈下降趋势。添加秋水仙素均能诱导形成四倍体植株, 但是 400 mg/L 秋水仙素浓度的诱导率相对较高, 100 mg/L 秋水仙素浓度的诱导率较低, 不添加秋水仙素处理的外植体未能诱导形成四倍体。

表 1 秋水仙素浓度对小果型西瓜四倍体诱导效果的影响

Table 1 The effect of colchicine concentrations on induction of tetraploid mini-watermelon

秋水仙素浓度 ρ/mg/L Colchicine concentration	外植体分化 率//% Differentiation rate of explant	分化不定芽 数//个 Adventitious bud number	四倍体诱导率//% Induction rate of tetraplant
0	73.3	6.7	0
100	66.7	6.0	6.7
200	53.3	4.8	13.3
400	46.7	5.2	20.0
600	46.7	4.7	13.3

2.2 秋水仙素处理时间对四倍体诱导效果的影响 由表 2 可知, 随着秋水仙素处理时间的延长, 西瓜子叶不定芽的分化率明显下降, 由 12 h 的 83.3% 诱导率下降为 48 h 的 16.7%, 且秋水仙素处理 12 h 的子叶分化形成的不定芽生长良好 (图 1A、B), 而处理 48 h 的子叶分化形成的不定芽相对较难, 且不定芽容易产生玻璃化 (图 1C)。秋水仙素不同处理时间对四倍体诱导率也有一定的影响, 其中处理 24~36 h 的四倍体诱导效果较好, 诱导率为 16.7%, 而处理 48 h 的因不定芽分化受抑制而导致四倍体诱导率下降。

表 2 秋水仙素处理时间对小果型西瓜四倍体诱导效果的影响

Table 2 The effect of colchicine treated time on induction of tetraploid mini-watermelon

处理时间//h Treatment time	外植体分化 率//% Differentiation rate of explant	四倍体诱导率 //% Induction rate of tetraplant
12	83.3	8.3
24	58.3	16.7
36	50.0	16.7
48	16.7	8.3

2.3 6-BA 浓度对不定芽诱导效果的影响 添加 6-BA 的浓度不同, 小果型西瓜不定芽的分化率存在差异。由表 3

可知, 当 6-BA 浓度为 2.0~4.0 mg/L 时, 不定芽分化率较高, 其中 4.0 mg/L 的不定芽分化率最高, 为 83.3%; 而当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时, 不定芽分化率较低, 仅为 58.3%。据观察, 经诱变处理后的子叶在分化培养基上培养 3 d 开始膨大, 7 d 左右就可见在近轴端切口处形成少量愈伤组织, 10 d 左右便见不定芽形成, 随后在芽周围继续分化出不定芽。

表 3 6-BA 浓度对不定芽诱导效果的影响

Table 3 The effect of BA concentrations on induction of adventitious bud

6-BA 浓度 ρ//mg/ L 6-BA concentration	外植体数//个 Number of explant	外植体分化率//% Differentiation rate of explant
1.0	12	58.3
2.0	16	81.3
3.0	12	75.0
4.0	12	83.3

2.4 不同生长调节剂对不定芽生根诱导效果的影响 表 4 表明, 再生芽在 4 种生根培养基上培养都能形成根, 并且生根率均在 90% 以上, 但是在不添加植物生长调节剂的培养基上, 再生苗的生根数少且根细长须根很少, 添加 NAA 培养基的植株平均生根达 10 条以上且须根很多, 但根生长不正常, 短而粗, 并在茎基部形成愈伤组织 (图 1D), 添加 IAA 培养基的植株生根数也较多, 根生长正常, 根长且有较多须根。

表 4 不同生长调节剂对不定根诱导效果的影响

Table 4 The effect of different plant growth regulators on induction of adventitious root

处理 Treatments	浓度 ρ mg/L Concentrations	接种数//个 Inoculation number	生根率//% Rooting rate	株生根数//条 Rooting number per plant
对照 CK	0	24	100.0	6.5
NAA	0.05	20	95.0	10.5
NAA	0.1	20	100.0	11.0
IAA	0.1	24	91.7	7.4

2.5 植株倍性检测 再生植株的不同倍性水平生长状况略有不同, 二倍体植株茎生长较快, 节间长, 株型分散 (如图 1E); 而四倍体植株生长较慢, 节间短, 株型紧凑 (图 1F)。再生植株根尖染色体观察结果二倍体植株的染色体数为  $2n = 22$  (图 1G), 四倍体植株染色体数为  $2n = 44$  (图 1H)。

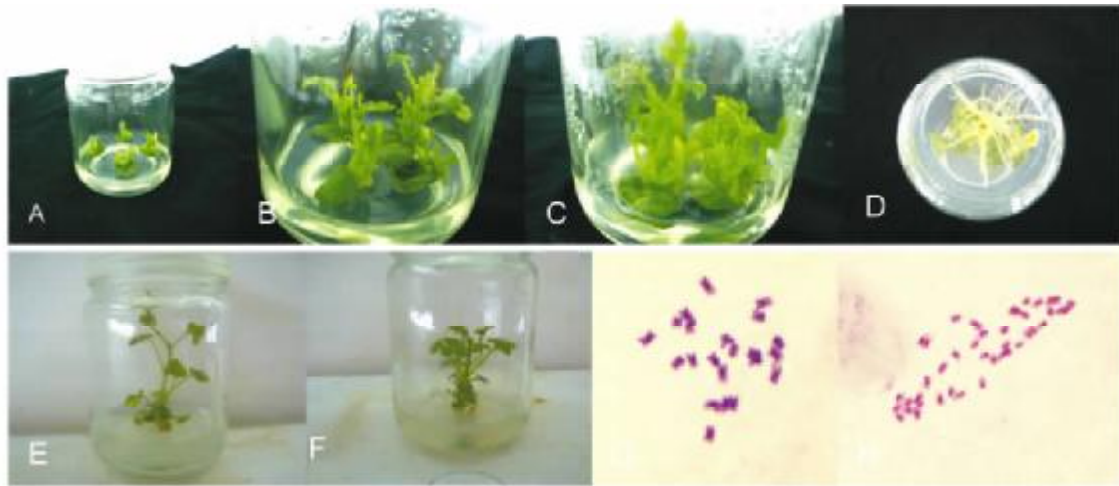
## 3 结论与讨论

诱导剂对西瓜不定芽的分化有一定的抑制作用, 且浓度越高、处理时间越长抑制作用越明显, 有的甚至失去再生能力, 从而影响四倍体的诱导率<sup>[2-4]</sup>。研究结果表明, 秋水仙素不同浓度及不同处理时间对小型西瓜材料 MH-39-1 的不定芽分化及四倍体诱导率均有影响, 初步确定秋水仙素适宜浓度为 400 mg/L; 合适的秋水仙素处理时间为 24 h。张全美研究认为, 将秋水仙素采用液体培养方式对京欣母本进行四倍体诱导, 处理 36 h 的四倍体诱导率最高, 可达 54.3%; 秋水仙素浓度以 200 mg/L 最佳, 四倍体诱导率可达 56.3%<sup>[5]</sup>。这与该试验结果不同, 可能是诱导剂作用效果跟材料的基因型有关。

许智宏等进行不同生长激素 (IAA、IBA、NAA) 对生根影

响研究认为,加入 0.2 mg/L IAA 的生根效果最好;IBA 和 NAA 也能促进根的形成,但形成的根往往表现不正常,短而粗,并常在茎基部形成愈伤组织<sup>[6]</sup>。在该研究中,不同生长

调节剂对不定芽生根影响试验结果也认为,IAA 比 NAA 更适合用于诱导根的形成,但是 IAA 促进生根的最适浓度还有待于进一步研究。



注:A、B,再生芽;C,玻璃化再生芽;D,再生根;E,二倍体再生植株;F,四倍体再生植株;G,二倍体染色体( $2n=22$ );H,四倍体染色体( $2n=44$ )。

Note:A, B. Regeneration buds; C. Vitrification buds; D. Regeneration roots; E. Diploid plant regeneration; F. Tetraploid plant regeneration; G. Diploid chromosome ( $2n=22$ ); H. Tetraploid chromosome ( $2n=44$ ).

图1 小果型西瓜四倍体诱导及再生植株

Fig. 1 Induction of tetraploid mini-watermelon and plant regeneration

#### 参考文献

- [1] 王坚,蒋有条,林德佩,等. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京:中国农业出版社, 2000: 1-3.
- [2] YETISIR, SARI NEBAHAT. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melon* L.) dihaploidization [J]. Scientia Horticulturae, 2003, 98 (3): 277-283.
- [3] 石晓云,申书兴,陈雪平,等. 影响组织培养诱导四倍体小果型西瓜三

种因素的研究[J]. 华北农学报,2007,22 (S2): 103-106.

- [4] 阎志红,刘文革,赵胜杰,等. 利用二硝基苯胺类除草剂离体诱导西瓜四倍体[J]. 园艺学报,2008,35 (11): 1621-1626.
- [5] 张全美. 西瓜高效植株再生体系建立及四倍体离体诱导研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [6] 许智宏,卫志明,刘桂云,等. 用离体培养无性繁殖三倍体无籽西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad.) [J]. 植物生理学报,1979,5 (3): 245-25.

(上接第 7437 页)

的高叶绿素含量延长了旗叶的光合作用时间,增加了碳水化合物的供应量,从而增加了小麦籽粒产量。该试验中,抗衰老型小麦与非抗衰老型小麦相比并未表现出千粒重优势,主要原因是抗衰老型小麦在灌浆后期受到高温逼热及鸟害的严重影响,千粒重未能达到最大值。若在灌浆后期及时补充水分并注意防治鸟害,抗衰老型小麦必然能发挥出增产优势,而培育抗衰老品种将是获得高产小麦的有效、经济和环保的途径。

顾自奋等<sup>[12]</sup>分析小麦灌浆持续期与粒重的关系时指出,灌浆受地域生态条件的支配,其中温度的作用最明显。蔡庆生等<sup>[13]</sup>认为,小麦灌浆速率与粒重呈正相关,而灌浆持续天数与粒重关系不大。而该研究结果表明,小麦灌浆速率与千粒重呈显著正相关,与灌浆持续天数呈正相关。

小麦灌浆期干旱胁迫、高温逼熟现象十分严重,灌浆缓增期时间和灌浆速率的变异系数和变幅较大是旱地小麦粒重低而不稳的内在原因,抗衰老型小麦 xks004、xks005 后期绿叶面积过大,贪青晚熟,虽可增加灌浆期持续天数,但却降低了平均灌浆速率,从而使小麦粒重下降。灌浆后期叶面积不足,或绿叶面积下降过快,也会导致小麦粒重降低。因此,灌浆后期适当的绿叶面积,对维持适宜的灌浆速率和灌浆时间,保证大粒形成至关重要。采取相应的栽培措施,协调小

麦灌浆速率与持续期的矛盾,降低缓增期时间和缓增期速率年度间变幅,对保证小麦灌浆顺利进行、增加小麦粒重,进而提高小麦产量具有十分重要的意义。

#### 参考文献

- [1] 王宏广. 我国农业可持续发展的对策[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1995.
- [2] ROSENOW D T, QUISENBERRY J E, WENDT C W, et al. Drought tolerant sorghum and cotton germplasm [J]. Agric Water Manag, 1983, 7: 207-222.
- [3] 刘道宏. 植物叶片的衰老[J]. 植物生理学通讯, 1983 (2): 14-19.
- [4] 房稳静,张雪芬,郑有飞. 冬小麦灌浆期干旱对灌浆速率的影响[J]. 中国农业气象, 2006, 27 (2): 98-101.
- [5] 刘明学,李邦发,王小飞,等. 干旱条件下绵阳 26 小麦籽粒灌浆特性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (16): 6708-6710.
- [6] 吴少辉,高海涛,王书子,等. 干旱对冬小麦粒重形成的影响及灌浆特性分析[J]. 干旱地区农业研究, 2002, 20 (2): 49-52.
- [7] 冯伟,郭天财,李晓,等. 不同降雨年型下水分处理对大穗型小麦品种籽粒灌浆及产量的影响[J]. 水土保持学报, 2005, 19 (1): 192-195.
- [8] 吴纪民,魏燮中,潘杰华,等. 小麦灌浆期的生长研究[J]. 江苏农业科学, 1992 (2): 1-4.
- [9] 上官周平,陈培元,李英. 氮肥和底墒对小麦籽粒灌浆过程的调节效应分析[J]. 西北植物学报, 1994, 14 (2): 107-116.
- [10] 周竹青,朱旭彤. 不同粒重小麦品种(系)籽粒灌浆特性分析[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18 (2): 107-110.
- [11] 罗培高,任正隆,吴先华,等. 延缓小麦衰老的结构和生物化学机制[J]. 科学通报, 2006, 51 (18): 2154-2160.
- [12] 顾自奋,李金诚,翁训珠. 灌浆强度和um对大麦籽粒增重的影响[J]. 作物学报, 1987, 13 (4): 288-295.
- [13] 蔡庆生,吴兆苏. 小麦籽粒生长各阶段干物质积累量与粒重的关系[J]. 南京农业大学学报, 1993, 16 (1): 27-32.