



郝诗璇, 祁宏英, 张全, 等. 西瓜愈伤组织诱导研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(9):25-27, 32.

# 西瓜愈伤组织诱导研究

郝诗璇, 祁宏英, 张全, 于海洋

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院/抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**为促进西瓜离体快繁和工厂化育苗,以西瓜无菌苗为试验材料,研究影响西瓜愈伤组织形成的条件因素。结果表明:在 25 ℃暗培养条件下,西瓜子叶节最适合进行愈伤组织诱导培养,西瓜子叶节外植体愈伤组织诱导率最高,为 87.55%。7 d 龄期西瓜无菌苗子叶节诱导出的愈伤组织,诱导率最高,达到 89.62%,状态良好。西瓜子叶节诱导愈伤组织适宜激素浓度配比为 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA。因此,西瓜愈伤组织形成的最佳条件为选用 7 d 龄期西瓜无菌苗子叶节为外植体,在 MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基上进行诱导。

**关键词:**西瓜;组织培养;外植体;愈伤组织

西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] 是葫芦科西瓜属植物,起源于非洲。西瓜是一种重要的园艺作物,占全球蔬菜生产面积的 7%,每年世界西瓜产量约为 9 000 万 t,使其成为消费量最大的新鲜水果之一<sup>[1]</sup>。植物组织培养技术是现代生物技术的重要组成部分,植物组织培养作为一种有效的技术手段已被广泛应用于生产实践的各个领域<sup>[2]</sup>。近年来植物组织和细胞培养技术已经广泛用于西瓜离体快速繁殖<sup>[2-8]</sup>、目的基因的遗传转化<sup>[9-11]</sup>和突变体诱导与筛选<sup>[12-14]</sup>等方面。高效组织培养和植株再生体系的建立是西瓜在生物技术研究领域的基础,利用组织培养的方法诱导愈伤组织是实现快速繁殖的重要手段,同时愈伤组织也可以作为细胞悬浮培养的材料。近年来不少研究者针对西瓜的愈伤组织再生途径展开了研究<sup>[13,15-17]</sup>,在西瓜愈伤组织诱导过程中存在着诱导率低、状态差、容易褐化和不易分化等问题。该研究以西瓜幼苗不同部位为试验材料,以 MS 为基本培养基,添加不同种类、不同浓度的激素,研究西瓜愈伤组织诱导最适条件,以期西瓜的离体快繁和工厂化育苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用小果型西瓜早佳 8424 种子。

### 1.2 方法

1.2.1 种子处理及无菌萌发 将种子先浸种 6 h,去除种皮后,清洗干净,在无菌工作台上先用 70% 酒精消毒 30 s,再用 3% NaClO 浸种消毒 20 min,无菌水清洗 3~4 次。直接接种于无激素的 1/2 MS 培养基上。先进行 3 d 的暗培养,之后再行光培养,观察其生长情况<sup>[8]</sup>。

1.2.2 外植体的获取和愈伤组织诱导 挑选生长一致符合条件的无菌苗,设置不同苗龄(5, 7 和 9 d),在无菌条件下切割不同部位(子叶节、子叶和胚轴)。以 MS 为基本培养基,蔗糖 30%, pH 5.8,用 0.9% 琼脂。设置不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 的培养基(表 3),诱导外植体产生愈伤组织。培养 21 d 后调查结果。

1.2.3 培养条件 培养温度为 25 ℃,相对湿度约 80%,暗培养。

1.2.4 数据分析 采用 Microsoft Excel 2013 整理数据。愈伤组织诱导率(%)=(诱导愈伤组织的外植体数/接种的外植体数)×100。褐化率(%)=(褐化数/接种的外植体数)×100。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

在 25 ℃暗培养条件下,在 MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基上,西瓜不同外植体的愈伤组织的状态有明显不同(表 1)。由

收稿日期:2019-04-01

基金项目:2018 年黑龙江省大学生创新创业训练计划(2018 10232097);齐齐哈尔大学教育科学研究项目(2017039);黑龙江省自然科学基金(C2017067);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(135209263);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(YSTSXX201883)。

第一作者简介:郝诗璇(1998-),女,在读学士,专业为园艺。E-mail:1659557664@qq.com。

通讯作者:祁宏英(1976-),女,硕士,副教授,从事园艺植物遗传育种研究。E-mail:qihongying1976@163.com。

西瓜子叶诱导愈伤组织形成从边缘开始,愈伤组织生长快,状态呈乳白色紧凑的颗粒状。由西瓜子叶节培养愈伤组织量比较丰富,愈伤组织生长快,浅黄色、疏松,呈颗粒状。由西瓜胚轴切口有较少愈伤组织形成,愈伤组织生长慢,诱导的愈伤组织量大并呈褐色或淡褐色,质地较脆且紧凑。

从上述外植体诱导的情况来看,子叶愈伤组织诱导率是 67.57%,子叶节的诱导率是 87.55%,胚轴的诱导率是 45.06%。子叶节的愈伤组织诱导率最高,呈乳浅黄色疏松颗粒状,褐化率较低,是较好的诱导愈伤组织的材料。

表 1 不同外植体对西瓜愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of explant on callus induction of watermelon

编号 No.	外植体 Explant	愈伤组织的诱导率 Callus induction rate/%	褐化率 Browning rate/%	愈伤组织生长状态 Growth status of callus
1	子叶	67.57	10.51	愈伤组织呈黄色或淡黄色紧凑,质地较脆无光泽
2	子叶节	87.55	6.67	愈伤组织生长快,浅黄色、疏松,呈颗粒状
3	胚轴	45.06	20.00	愈伤组织呈黄色或淡黄色紧凑,质地较脆无光泽

2.2 不同龄期的子叶节对愈伤组织诱导的影响

在 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基上,不同龄期的子叶节诱导的愈伤组织的状态有明显不同,7 d 龄期的子叶节愈伤组织生长快,浅黄色、疏松,呈颗粒状,5 和 9 d 龄期的子叶节愈伤组织呈黄色或淡黄色紧凑,质地

较脆无光泽。由表 2 可知,由 7 d 龄期的子叶节的愈伤组织诱导率为 89.62%,显著高于 5 和 9 d 龄期的子叶节。并且 7 d 龄期的子叶节诱导的愈伤组织褐化率低、生长快、浅黄色、疏松,呈颗粒状,对于西瓜愈伤组织诱导来说无菌苗 7 d 龄期是较好的选择。

表 2 外植体苗龄对西瓜愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of seedling age on callus induction of watermelon

编号 No.	苗龄 Seedling age/d	愈伤组织的诱导率 Callus induction rate/%	褐化率 Browning rate/%	愈伤组织生长状态 Growth status of callus
1	5	77.65 b	14.55	愈伤组织呈黄色或淡黄色紧凑,质地较脆无光泽
2	7	89.62 a	3.67	愈伤组织生长快,浅黄色、疏松,呈颗粒状
3	9	55.83 c	15.45	愈伤组织呈黄色或淡黄色紧凑,质地较脆无光泽

2.3 不同激素浓度对比对西瓜愈伤组织诱导的影响

以西瓜子叶节为外植体,不同激素浓度对比对其愈伤组织的诱导及生长状态有明显不同。由表 3 可知,4 号培养基的诱导率为 87.50%,5 号培养基的诱导率为 90.60%,可以知道 2,4-D 浓

度较高时对于子叶节愈伤组织的诱导较好。并且由 5 号培养基诱导的愈伤组织呈淡黄色,量大,生长较快,疏松,呈颗粒状,MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 诱导子叶节的愈伤组织是较好的选择。

表 3 不同浓度激素组合对西瓜愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of hormone combinations on callus induction of watermelon

编号 No	激素组合 Hormone combination/ (mg·L <sup>-1</sup> )	愈伤组织的诱导率 Callus induction rate/%	褐变率 Browning rate/%	愈伤组织生长状态 Growth status of callus
1	2,4-D 1.0+6-BA 0.1	62.50	18.46	呈乳白色,量较少质地较疏松
2	2,4-D 1.0+6-BA 1.0	77.50	26.67	淡黄色质地紧,量较少,质地较疏松
3	2,4-D 1.0+6-BA 2.0	75.00	28.18	黄色,质地较紧凑,量适中,有光泽
4	2,4-D 2.0+6-BA 0.1	87.50	37.03	淡黄色,量大,质地较软,没有光泽
5	2,4-D 2.0+6-BA 1.0	90.60	9.28	淡黄色,量大,生长较快,疏松,呈颗粒状
6	2,4-D 2.0+6-BA 2.0	77.50	10.00	黄色质地较紧凑,量适中,表面光滑

### 3 结论与讨论

影响西瓜愈伤组织诱导的一个重要因素是外植体的类型。大部分研究者选用子叶作外植体。本试验用下胚轴和子叶作外植体诱导过愈伤组织,但都没有用子叶节作外植体效果好。原因可能是子叶节靠近分生组织,细胞分裂增生能力较强,在植物组织培养过程中,外源激素起着传递遗传物质的脱分化、再分化等发育信号的作用,而外源激素的作用效果与外植体以及愈伤组织本身内源激素的种类和水平有密切关系,外源激素必须通过与内源激素的平衡才能发挥其作用,而子叶节内源激素相对丰富,更易进行脱分化<sup>[18]</sup>。

外植体的发育时期也会影响西瓜的脱分化能力。西瓜无菌苗龄期的选择对诱导愈伤组织非常重要,对是否可以成功诱导及导致诱导频率高低的重要原因之一,这与能否形成较高质量的愈伤组织有关,进而也与其培养效果有关。多数作物的愈伤组织诱导中,都会采用龄期较短的无菌苗进行培养<sup>[19-20]</sup>。在本试验中,选择了两个变量进行比较,包括 5、7 和 9 d 龄期 3 组,分别在同样的培养条件下进行培养,使用相同条件的子叶节和激素组合的培养基。结果发现 7 d 龄期的无菌苗愈伤组织诱导率较高,为 87.50%,明显比另二组高。

外源激素是植物叶片组织培养成功的关键因子。不同激素对植物外植体诱导愈伤组织的影响不同,同一激素不同浓度对植物外植体诱导愈伤组织的影响也不同。一般来说,高生长素和低细胞分裂素有利于愈伤组织的诱导及生长,但生长素和细胞分裂素是愈伤组织的形成所必需的。2,4-D 与 BA 的配合有利于西瓜不同外植体愈伤组织的形成,2,4-D 是生长素类似物,主要起促进愈伤组织生长的作用,2,4-D 对西瓜叶片愈伤组织的诱导和愈伤组织的生长状态效果较好,培养基中添加  $2,4-D\ 2.0\ mg\cdot L^{-1} + 6-BA\ 1.0\ mg\cdot L^{-1}$  诱导的愈伤组织多,质地疏松,愈伤组织为浅黄色。

#### 参考文献:

[1] FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate

Statistical Database[EB/OL]. [2019-04-01]. <http://www.fao.org/>.

- [2] 王秀丽,杨煜,徐平丽,等. 植物组织培养的应用及进展[J]. 山东农业科学,2005(3): 78-80.
- [3] Compton M E, Gray D J. Micropropagation as a means of rapidly propagating triploid and tetraploid watermelon[J]. The Journal of the Florida State Dental Society, 1992, 105(6): 352-354.
- [4] Gnamien Y G, Irié Arsène Zoro Bi, Kouadio Y J, et al. Medium effects on micropropagation and genetic stability of *Citrullus lanatus* oleaginous type[J]. Agricultural Sciences, 2013, 4(7): 32-44.
- [5] Levi A, Thomas C E, Keinath A P, et al. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2001, 48(6): 559-566.
- [6] 莫饶,黄东益,韩平原. 西瓜离体快速繁殖的研究[J]. 热带生物学报, 2002, 8(2): 8-10.
- [7] 邵宏波,初立业. 特大“新红宝”西瓜的快速繁殖研究[J]. 生物技术, 1994(5): 31-33.
- [8] 宣杨,徐洪国,仲娟娟,等. 小果型西瓜快速繁殖技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2017(11): 45-47.
- [9] Cho M A, Moon C Y, Liu J R, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrullus lanatus*[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(2): 365-369.
- [10] 张明方,于天祥,杨景华,等. 农杆菌介导西瓜转葡聚糖酶及几丁质酶双基因[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 475-478.
- [11] 张志忠,吴菁华,吕柳新. 根癌农杆菌介导的西瓜遗传转化研究[J]. 果树学报, 2005, 22(2): 134-137.
- [12] 程永强. 西瓜种质 SRAP 分析及离体诱变突变体的分子检测[D]. 保定:河北农业大学, 2009.
- [13] 闫静. 西瓜愈伤组织分化不定芽体系的建立及耐冷体细胞无性系变异研究[D]. 杭州:浙江大学, 2005.
- [14] 方再光. 西瓜体细胞无性系突变体的筛选及 AFLP 分析[D]. 海口:华南热带农业大学, 2001.
- [15] 郑先波. 无籽西瓜愈伤组织诱导及植株再生的研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2003.
- [16] 张莉. 西瓜愈伤组织诱导及体细胞胚胎发生的研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2014.
- [17] 朱迎春,刘君璞,邓云,等. 不同因素对西瓜花药愈伤组织诱导的影响[J]. 河南农业科学, 2015, 44(12): 104-111.
- [18] 张守杰,王秀峰,杨小华,等. 黄瓜子叶节离体再生过程中内源激素变化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(5): 153-157.
- [19] 谢礼洋,匡华琴,赖钟雄,等. 辣椒愈伤组织诱导的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2013(11): 17-20.
- [20] 张大力,林娟,刘璐,等. 蚕豆愈伤组织的诱导、培养和染色体畸变[J]. 遗传学报, 1986(6): 423-429, 484.

## Study on Callus Induction of Watermelon

HAO Shi-xuan, QI Hong-ying, ZHANG Quan, YU Hai-yang

(Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas in Heilongjiang Province, College of Life Science and Agriculture, Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

(下转第 32 页)

# Optimization on Tissue Culture System of *Pinellia ternata*

FANG Hai-yue<sup>1,2</sup>

(1. Baiquan Industrial Project Service Center, Baiquan 164700, China; 2. Qiqihar Northern Herbal Economic Plants Research Institute, Baiquan 161000, China)

**Abstract:** In order to study the optimal hormone ratio of tissue culture system of *Pinellia ternata*, the experiment used tuber of *Pinellia ternata* as material, MS as base medium, 6-BA and NAA hormones of different concentration were added, and 9 treatments were set up to screen the best medium for inducing callus, adventitious bud differentiation and rooting. The effects of different hormones and concentrations on tissue culture of *Pinellia ternata* were studied. The results showed that both 6-BA and NAA hormones and their ratios at different concentrations had significant effects on callus induction, adventitious bud differentiation and rooting of *Pinellia ternata*. Among them,  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA had the highest number of buds and 90% of buds, and  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA had the highest number of roots and the average length of roots in rooting culture. Therefore, the optimum conditions for callus induction and adventitious bud differentiation of *Pinellia ternata* were  $\text{MS} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, and the optimum rooting medium was  $1/2 \text{ MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA.

**Keywords:** *Pinellia ternata*; callus; differentiation; induce

(上接第 27 页)

**Abstract:** In order to promote rapid propagation in vitro and industrialized seedling raising of watermelon, the MS medium was chosen as the basic culture medium, the cotyledon, cotyledon node and hypocotyl were used as explants, factors affecting callus formation in watermelon were studied. The results showed that under the dark culture condition of  $25^\circ\text{C}$ , the cotyledon node of watermelon was most suitable for callus induction. The callus induction rate of cotyledon node was 87.55%, 7 d was the most suitable seedling age for callus induction, which had the highest induction rate of 89.62%, and the state of callus was good. The appropriate hormone concentration ratio for watermelon callus induction was  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA. Therefore, the optimal conditions for the formation of callus are as follows: cotyledon nodes of 7d-age watermelon seedling were used as explants, and cultured in MS basic medium with  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA.

**Keywords:** watermelon; tissue culture; explant; callus

## 《黑龙江农业科学》加入开放科学计划(OSID)

《黑龙江农业科学》于 2019 年 8 月起正式加入 OSID(Open Science Identity)开放科学标识计划。将尝试通过在文章上添加开放科学二维标识码(OSID 码),突破纸刊的局限性,立体展示科研成果,为读者和作者提供更广阔的成果展示和学术交流平台。OSID 开放科学计划,是国家新闻出版署出版融合发展(武汉)重点实验室发起的一项针对中国学术期刊的公益计划,旨在促进学术交流、扩大科研成果影响力、推进科研诚信建设、传播开放科学及融合出版理念。