

黄瓜再生体系的建立

薛丹丹, 张凤生, 王保菊, 李建红, 赵娜, 武斌

(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 以津研4号为试材, 利用组织培养技术探讨黄瓜子叶离体培养技术, 建立高频的黄瓜再生体系; 以MS为基本培养基, 附加不同浓度和不同种类的激素, 探讨影响黄瓜离体组织培养的诸多因素。结果表明: 以黄瓜5~6 d苗龄无菌苗子叶作外植体, 愈伤组织生长旺盛, 芽诱导率高; 7~8 d的外植体则生长势弱, 不利再生芽的分化。6-BA 4.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L, 芽分化频率较高, 芽的分化率可达83%; 待再生芽长至2~3 cm时移入生根培养基(1/2MS+0.3 mg/L NAA), 生根率可达88%, 30~50 d可得到完整再生植株。

关键词: 黄瓜; 再生体系; 子叶; 不定芽

中图分类号: S 242.204⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0119-03

当前利用组织和细胞培养进行黄瓜植株再生研究已在我国取得了很大进展, 但多处于试验阶段, 未真正应用于黄瓜育种中, 建立稳定的子叶及下胚轴离体培养体系, 对于开展黄瓜转基因研究, 创造新的黄瓜种质资源特别是抗性种质资源, 提高黄瓜育种水平具有重要意义。目前国外已有一些关于黄瓜子叶离体培养及植株再生特别是通过胚壮体再生植株的成功报导, 但黄瓜属于难再生植株, 不同品种及外植体之间植株之间再生能力差异很大, 因此, 进一步研究不同品种、不同外植体的子叶离体培养和植株再生条件仍是必要的。该试验旨在建立高效的黄瓜再生体系, 为黄瓜基因转化奠定基础。

1 材料与方

1.1 试验材料

津研4号由哈尔滨市农业科学院提供。

1.2 试验方法

外植体的获得: 挑选黄瓜饱满种子在自来水中浸泡30 min左右剥掉种皮, 用70%的酒精和次氯酸钠(10%)浸泡5~10 min, 再用0.1%氯化汞消毒1 min左右, 后用无菌水冲洗3~5次。

在无菌的条件下, 把黄瓜种子接种到MS培养基上。暗箱培养1~2 d后, 温度是25℃左右, 光照2500 lx, 光照时间为16 h/d。待长2~3 d, 子叶完全展开, 在无菌操作台切取0.5 cm左右带子叶柄的子叶。将2片子叶从中间分开, 小心去除子叶基部已经长出的顶芽。切去每片子叶的上半部分接入培养基中。有微有下翘的; 上翘趋势; 一侧上翘, 另一侧平展; 还有平展的等。3

周后观察并统计其形成外植体的不定芽发生情况。根据不同的苗龄, 不同切割方式, 进行再生培养的比较。

1.2.1 子叶外植体再分化培养 在分化过程中, 为寻求分化的最适合的培养基。在MS培养基上设计了3组不同激素不同浓度之间的配比, 分别为: 1组: 6-BA 含量为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L, 共5个水平, IAA 含量为0.1、0.3、0.5 mg/L共3个水平, 计15个组合; 2组: 6-BA 含量为1.0、2.0、3.0 mg/L, 共3个水平, NAA 含量为0.1、0.2、0.3 mg/L, 共3个水平, 计9个组合; 3组: 2,4-D含量为1.0、2.0 mg/L, 共2个水平, NAA 含量为0.2、0.3、0.5 mg/L, 共3个水平, 计6个组合。30 d后, 将在诱导培养基分化出不定芽的外植体切成小块, 转至不定芽生长培养基上, 2周左右继代1次, 1个月记录有效的获得情况。

1.2.2 生根诱导 生根培养基: (1)1/2MS+NAA 0.2 mg/L; (2)1/2MS+NAA 0.3 mg/L; (3)1/2MS+NAA 0.5 mg/L; (4)1/2MS+NAA 1.0 mg/L。扩繁芽长至2~3 cm时, 将其分支切下接种于生根培养基上诱导生根, 培养条件与芽诱导条件相同。

2 结果与分析

2.1 芽的诱导

选用MS为培养基, 附加不同激素的种类与含量对愈伤组织有较大影响。2,4-D加入后愈伤组织黄化和玻璃化严重, 加入IAA组的愈伤组织生长较好, NAA组的愈伤组织生长也有少部分发生玻璃化, 不及IAA组。从愈伤组织的生长情况看出, MS+6-BA 4.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L培养基中芽的诱导较好, 褐变的情况较少。子叶接入培养基中1~2 d开始增大。4~5 d左右, 外植体形成鲜嫩愈伤组织, 外植体与培养基接触处长出愈伤组织且渐分化出芽原基。20 d芽原基上长出小芽。30 d后对出芽率进行统计, 结果表明, 芽的诱导与BA和IAA

第一作者简介: 薛丹丹(1982-), 女, 本科, 助理农艺师, 现主要从事组织培养方面的研究工作。

收稿日期: 2010-01-04

的浓度有密切关系。较低浓度的 IAA 与合适的 BA 配比, 有较高的出芽率。反过来 IAA 相对浓度较高时, 对芽的分化将产生抑制作用。但 BA 浓度也不能太高, 过高同样会对芽的诱导产生抑制作用。如 BA 浓度为 5.0 mg/L, IAA 浓度为 0.3~0.5 mg/L, 无不定芽产生分化, 只在外植体周围出现大量愈伤组织, 组织颜色较暗, 较疏松。由试验可知, MS+6-BA 4.0 g/L+IAA 0.3 mg/L 的组合, 有较高的不定芽分化率, 长出的芽健壮。

芽再生率最高, 不定芽分化率为 83%, 这种培养基下生长的不定芽健壮, 培养过程中未观察到任何形态的胚状体。有丛芽, 茎生长粗壮, 叶为深绿色。6-BA 与 IAA 组的其它浓度的培养基中芽的再生率稍微低一些, 浅黄绿色, 茎纤细。而 NAA 组和 2,4-D 组尽管激素浓度改变, 不定芽的再生率仍比较低, 不宜做黄瓜子叶的再生培养。由表 3 可见 2,4-D 与 NAA 组合芽再生率最低, 且玻璃化现象严重。

表 1 6-BA 与 IAA 组合对芽诱导的影响

| 培养基/ mg · L ⁻¹ | 外植体数/个 | 再生芽数 个 | 芽再生率/% |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| MS+BA 1.0+IAA 0.1 | 40 | 15 | 38 |
| MS+BA 1.0+IAA 0.3 | 40 | 17 | 43 |
| MS+BA 1.0+IAA 0.5 | 40 | 21 | 53 |
| MS+BA 2.0+IAA 0.1 | 39 | 13 | 33 |
| MS+BA 2.0+IAA 0.3 | 40 | 15 | 38 |
| MS+BA 2.0+IAA 0.5 | 40 | 16 | 40 |
| MS+BA 3.0+IAA 0.1 | 38 | 25 | 66 |
| MS+BA 3.0+IAA 0.3 | 39 | 19 | 49 |
| MS+BA 3.0+IAA 0.5 | 40 | 21 | 53 |
| MS+BA 4.0+IAA 0.1 | 40 | 23 | 58 |
| MS+BA 4.0+IAA 0.3 | 40 | 33 | 83 |
| MS+BA 4.0+IAA 0.5 | 40 | 26 | 65 |
| MS+BA 5.0+IAA 0.1 | 40 | 11 | 28 |
| MS+BA 5.0+IAA 0.3 | 40 | 0 | 0 |
| MS+BA 5.0+IAA 0.5 | 40 | 0 | 0 |

表 2 6-BA 与 NAA 组合对芽诱导的影响

| 培养基/ mg · L ⁻¹ | 外植体数/个 | 再生芽数 个 | 芽再生率/% |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| MS+6-BA 1.0+NAA 0.1 | 30 | 6 | 20 |
| MS+6-BA 1.0+NAA 0.2 | 30 | 5 | 17 |
| MS+6-BA 1.0+NAA 0.3 | 30 | 5 | 17 |
| MS+6-BA 2.0+NAA 0.1 | 30 | 6 | 20 |
| MS+6-BA 2.0+NAA 0.2 | 30 | 4 | 13 |
| MS+6-BA 2.0+NAA 0.3 | 29 | 3 | 10 |
| MS+6-BA 3.0+NAA 0.1 | 29 | 1 | 3 |
| MS+6-BA 3.0+NAA 0.2 | 28 | 0 | 0 |
| MS+6-BA 3.0+NAA 0.3 | 27 | 0 | 0 |

表 3 2,4-D 与 NAA 组合对芽诱导的影响

| 培养基/ mg · L ⁻¹ | 外植体数/个 | 再生芽数 个 | 芽再生率/% |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| MS+2,4D 1.0+NAA 0.2 | 28 | 3 | 11 |
| MS+2,4D 1.0+NAA 0.3 | 28 | 2 | 7 |
| MS+2,4D 1.0+NAA 0.5 | 30 | 0 | 0 |
| MS+2,4D 2.0+NAA 0.2 | 29 | 1 | 3 |
| MS+2,4D 2.0+NAA 0.3 | 30 | 1 | 3 |
| MS+2,4D 2.0+NAA 0.5 | 28 | 2 | 7 |

2.2 外植体的切割方式对芽的影响

对于黄瓜子叶外植体芽的诱导而言, 除了不同浓度

生长调节物质的影响外, 子叶的切割方式对芽的诱导也有影响。为了进一步研究此方面的内容, 试验对子叶横切为 2 的同时, 又将部分子叶纵切为 2, 接种到相同的培养基中, 将二者进行不同的比较发现有很多差异。由表 4 可以看出, 首先是愈伤生长速度不同; 其次是愈伤组织生长位置不同; 再次是芽原基的生长速度不同; 第四是芽原基分布不同; 第五是最适培养基中子叶外植体的出芽率不同。

表 4 外植体不同切割处理对出芽率影响

| 切割处理 | 接种外植体数/个 | 有芽外植体数 个 | 出芽数/个 | 每个外植体出芽数/个 |
|-------------|----------|----------|-------|------------|
| 完整单片子叶数 | 30 | 30 | 85 | 2.83 |
| 单片子叶切除 1/3 | 20 | 19 | 33 | 1.65 |
| 单片子叶切除 2/3 | 20 | 20 | 50 | 2.5 |
| 完整 2 片子叶 | 20 | 20 | 47 | 2.35 |
| 2 片子叶切除 1/3 | 20 | 20 | 63 | 3.15 |
| 2 片子叶切除 2/3 | 20 | 20 | 51 | 2.55 |

2.3 苗龄对黄瓜愈伤组织芽再生率的影响

子叶的苗龄是植株再生能否成功的关键因素之一。3~4 d 苗龄的子叶愈伤组织生长情况较差, 此时子叶刚刚长大但还被外面的薄膜包着, 呈黄绿色; 正常发育的无菌苗 5 d 左右子叶刚由黄变绿, 此时的愈伤组织诱导效果最好, 愈伤组织质地致密, 芽再生率较高, 达到 83%, 且随着苗龄的不断增加, 愈伤的诱导较慢, 芽再生率逐渐下降 7~8 d 苗龄的芽再生率很低, 只有 30%, 结果见表 5。

表 5 外植体苗龄对黄瓜离体再生的影响

| 苗龄/d | 愈伤组织状态 | 芽再生率/% |
|------|---------------------------|--------|
| 3 | 外植体本身不健壮, 愈伤组织弱, 生长快 | 52 |
| 5 | 形成较早, 健壮, 生长旺盛, 色深绿 | 83 |
| 7 | 形成较晚, 边缘发黄, 长势弱, 色浅, 生长缓慢 | 30 |

从生长速度看, 5~6 d 苗龄接种的子叶, 在光照培养箱中, 第 3 天可见明显膨大, 1 周后, 可见伤口处开始形成愈伤组织, 2 周后见愈伤表面有瘤状突起形成, 且芽再生也较早, 再生频率高。

2.4 激素对不定芽生根诱导的影响

为了获得完整植株, 必须进行根的诱导, 将长有 2~3 片子叶的小苗, 自基部切下, 在无菌的条件下接种到不同激素的生根培养基中, 20 d 左右观察黄瓜生根情况。

表 6 NAA 不同浓度对不定芽生根诱导的影响

| 培养基 | NAA | 瓶数/瓶 | 根数/瓶 | 生根率/% |
|-------|-----|------|------|-------|
| 1/2MS | 0.2 | 8 | 6 | 75 |
| 1/2MS | 0.3 | 8 | 7 | 88 |
| 1/2MS | 0.5 | 8 | 4 | 50 |
| 1/2MS | 1 | 8 | 5 | 63 |

根据经验, 诱导生根培养基一般用低盐培养基, 该试验选用 1/2MS 培养基, 附加 NAA (0.2, 0.3, 0.5, 1.0) mg/L, 4 个水平, 把不定芽接入培养基中, 其它生长条件与基本培养条件对不定芽促根的影响保持一致。结果表明: 在 1/2MS+NAA 0.3 mg/L 的培养基中, 不定芽生根率最高, 根系壮, 生长旺盛, 生根达到 88%。因此,

该试验选用 1/2MS+NAA 0.3 mg/L 为生根培养基。

3 组培苗的移植

3.1 出瓶后的管理

移栽前把生根苗练苗 5~7 d, 再从瓶中取出, 取苗时动作要轻, 避免根苗受伤, 取出后用清水除去根部的培养基。在高为 4 cm 的育苗盘中装入草炭:蛭石=2:1, 栽培温度 25℃左右, 湿度在 80%~90%。栽培后要遮荫和保温, 为确保组培苗的成活率, 定植后 1 周是关键时期, 此时幼苗非常细弱, 从培养基到土壤中, 环境条件变化大, 光照、温度和湿度都与此前不同, 植株形成自养, 根系不发达, 稍不留心就可能造成死苗。这段时期的管理工作主要是防风蔽荫, 防晒晒, 保持膜内湿度, 并注意防霉, 4~5 d 后打开薄膜。适量的施一些营养液。1 个月左右, 见苗长的绿、粗壮、挺拔后, 即可移栽到花盆或露地。

3.2 露地的栽培方法

要选取土层较厚, 排水良好, 疏松肥沃, 阳光充足的壤土, 沙壤土或腐殖土为宜。选好土后, 要及耕翻 30 cm 以上, 把组培苗移栽在选好的露地上。

4 讨论与结论

4.1 黄瓜不定芽分化频率及再生途径

由试验可知 MS+BA 4.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L 的组合, 有较高的不定芽分化率, 产生的芽健壮。1/2MS+NAA 0.3 mg/L 的生根的培养基有利于根的生长, 根系壮, 生长旺盛, 生根率达到 88%。对黄瓜离体培养的主要影响因素是基因型, 苗龄, 外植体大小和部位, 培养基成分, 碳源, 激素, 其它添加物, 培养方法等等。该实验主要对激素、外植体大小和放置方法进行了探讨。由于切割方式的不同对芽的出芽率有一定的影响, 首先是愈伤生长速度不同; 其次是愈伤组织生长位置不同; 再次是芽原基的生长速度不同; 第四是芽原基分布不同; 第五是最适培养基中子叶外植体的出芽率不同。

4.2 苗龄对不定芽诱导的影响

子叶的苗龄是植株再生能否成功的关键因素之一。正常发育的无菌苗 5 d 左右子叶刚由黄变绿, 此时的分化效果最好。在黄瓜中也发现, 5~6 d 苗龄的芽再生率较高, 达到 83%, 且随着苗龄的不断增加, 愈伤的诱导较慢, 芽再生率逐渐下降, 7~8 d 苗龄的芽再生率很低, 甚至不能再生。这表明, 处于幼态的外植体分化能力较强, 再生植株的频率也较高。因此, 在材料的选择上要尽量选用苗龄较小和分化能力较强的外植体。

4.3 激素对黄瓜不定芽诱导的影响

在做黄瓜试验时, 生长素一直采用 IAA, 细胞分裂素用 6-BA, 并设定了多个浓度, 发现 6-BA 对芽的再生影响较大, 在高于 1.0 mg/L 的较大浓度范围内都有较高的芽分化率。单独使用生长素 2,4-D 愈伤的诱导率和分化率较低。这有可能是 6-BA 和 IAA 处理下黄瓜愈伤组织的内源激素原有的平衡遭到破坏, 一定浓度的细胞分裂素促进了细胞的分化, 同时 6-BA 还可提高培养物的转化酶, 超氧化物歧化酶, 过氧化物酶, 过氧化氢酶的活性, 增强呼吸速率, 促进了生长。

参考文献

- [1] 王慧中, 赵培洁, 周小云. 转 WMV-2 CP 基因黄瓜植株的再生[J]. 植物生理学报, 2000(3): 267-272.
- [2] 任春梅, 董延瑜, 洪亚辉, 等. 西瓜组织培养的研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000(1): 50-53.
- [3] 孙勇如, 李向辉, 孙宝林, 等. 新疆黄瓜子叶原生质体的培养和植株再生[J]. 植物学报, 1989(12): 916-922.
- [4] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 黄瓜组织培养再生体系的比较研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1998(3): 9-11.
- [5] 王果萍. 西瓜高效组织培养技术体系研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 1-3.
- [6] 余俊杰, 朱其杰. 西瓜成熟胚离体培养中的胚状体诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1992(1): 37-39.
- [7] 李仁敬, 孙勇如. 西瓜子叶原生质体再生愈伤组织的获得[J]. 新疆农业科学, 1992(5): 218-220.
- [8] 李继红, 邵寒霜, 李小娟. 西瓜遗传转化体系优化的研究[J]. 华南热带农业大学学报, 1999(2): 5-9.

The Regeneration System of Cucumber

XUE Dan-dan, ZHANG Feng-sheng, WANG Bao-ju, LI Jian-sheng, ZHAO Na, WU Bin
(Harbin Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: In this study, Heilongjiang Cucumber Varieties Yan jing Four Number for test material, investigate cucumber cotyledons *in vitro* culture technique with tissue culture, and construct cucumber high-frequency regeneration system. The basic medium was MS, affixed different concentrations and different types of PGRs, and to explore the impact of cucumber many factors *in vitro* tissue culture. The results showed that 5~6 days in sterile cucumber cotyledons as explants, callus growth exuberant and the rate of bud inducted was high; 7~8 days in sterile cucumber cotyledons as explants, growth potential was weak and go against the differentiation of adventitious buds. When MS affix 0.4 mg/L 6-BA and 0.3 mg/L IAA, the frequency of adventitious bud differentiation was high and bud differentiation rate up to 83%; To be adventitious buds grows to 2~3 cm into the rooting medium, which was 1/2MS affix 0.3 mg/L NAA. Rooting rate was 88% and 30~50 days can be a complete plant.

Key words: cucumber; regeneration system; cotyledons; adventitious buds