

‘卡其’水果黄瓜子叶节高频再生体系的研究

肖小君^{1,2}, 齐泽民^{1,2}, 王 辉^{1,2}, 黄作喜^{1,2}, 王 芳^{1,2}, 张 霞¹

(1. 内江师范学院 生命科学学院, 四川 内江 641112; 2. 四川省高等学校特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川 内江 641112)

摘 要:以‘卡其 01’水果黄瓜为试材, 研究不同苗龄、不同激素浓度对其子叶节再生体系建立的影响。结果表明: 4 d 苗龄的子叶节不定芽再生频率达 100%, 随苗龄增加, 再生率显著下降, 8 d 的外植体生长势弱, 不利不定芽的分化; 最佳不定芽诱导和增殖培养基分别为 6-BA 0.2 mg/L+IAA 0.05 mg/L, 6-BA 0.1 mg/L+IAA 0.02 mg/L; 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 对‘卡其 01’的生根效果较好, 生根率为 83%, 40~50 d 即可得到完整再生植株。

关键词:水果黄瓜; 子叶节; 再生体系; 不定芽

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)19-0113-03

水果黄瓜属葫芦科 1 a 生蔓生植物, 瓜长 12~15 cm, 直径约 3 cm, 瓜型短小、无刺易清洗、口感清香脆甜, 商品性好, 已成为餐桌上的新宠。由于其生长势旺, 坐果能力强, 丰产潜力很大, 从播种到商品瓜采摘约 50 d 左右, 每年可种植 2~3 茬, 经济效益显著, 如北京密云县菜农裴希荣种植的日光温室荷兰‘尼罗’水果黄瓜折合 667 m² 产量达 14 311 kg, 产值 11.8507 万元^[1], 受到农民的普遍欢迎。但目前进口的水果黄瓜种子成本太高, 虽然我国自主选育的水果黄瓜品种近年来有一定进展^[2-3], 但由于黄瓜遗传背景狭窄, 选育过程漫长, 杂交后代易出现性状分离, 常规育种很难获得突破性进展。因此利用基因工程进行品种改良和种质创新为黄瓜育种开辟了一条新的途径, 但实现成功转化的前提是建立高效的再生体系^[4]。目前关于水果黄瓜的组织培养报道较少^[5-6], 黄瓜属于难再生植物, 不同品种及外植体之间植株再生能力差别很大^[7]。该试验对建立快速和高频的水果黄瓜离体植株再生体系进行了系统研究, 为进一步开展转基因及黄瓜育种等相关工作奠定基础, 同时对降低水果黄瓜成本、工厂化大规模生产具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以‘卡其 01’水果黄瓜种子为试材, 购于山东寿光种子贸易中心。取籽粒饱满、均匀健壮的黄瓜种子, 剥离外种皮后, 用 0.1% HgCl₂ 灭菌 4 min, 无菌水清洗 4~5 次, 平放于 MS 培养基(pH 5.8、琼脂 7 g/L、蔗糖 30 g/L)

上获得无菌苗。培养条件是: 白天 24℃、夜间 20℃左右, 光照时间为 13.5 h/d, 光照强度为 2 000~2 500 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 苗龄及子叶节不定芽诱导培养基筛选 分别取苗龄为 4、6、8 d 的黄瓜子叶节, 将 2 片子叶从中间分开, 用弯头镊小心去除子叶基部已经长出的顶芽, 再纵切下胚轴 1~2 mm, 保留 1/2 单片子叶竖直向下插入以下诱导培养基: ①6-BA 0.2 mg/L(单位下同)+IAA 0.05, ②6-BA 0.5+IAA 0.05, ③6-BA 1.0+IAA 0.1, ④6-BA 2.0+IAA 0.1 中, 3 次重复, 每次重复 12 个外植体, 20 d 后统计不定芽及愈伤组织的生长情况, 10 d 后再继代 1 次, 统计不定芽总数, 计算芽再生率和每块外植体再生芽数。芽再生率(%)=(有芽外植体数/外植体总数)×100%; 每块外植体再生芽数=外植体不定芽总数/再生不定芽的外植体数。

1.2.2 再生芽增殖培养基筛选 为获得相同生理状态的外植体, 根据 1.2.1 结论选取最佳苗龄的子叶节和诱导培养基进行接种, 20 d 后将诱导培养基分化出的芽丛切成 4 mm×4 mm 左右的小块, 转至再生芽增殖培养基: (1)6-BA 0.05+IAA 0.02, (2)6-BA 0.1+IAA 0.02, (3)6-BA 0.2+IAA 0.02, (4)6-BA 0.05+IAA 0.05, (5)6-BA 0.1+IAA 0.05, (6)6-BA 0.2+IAA 0.05, 3 次重复, 每次重复 18 个芽丛, 10 d 左右继代 1 次, 30 d 后记录再生芽数及生长情况。增殖倍数=(再生芽总数/接种芽数)×100%

1.2.3 激素对再生芽生根的影响 选取 1.2.2 试验中长约 2 cm 大小一致的健壮单芽, 将其从基部切下, 接入以下不同激素的生根培养基: 1/2MS、1/2MS+NAA(0.01、0.05、0.1)、1/2MS+IBA(0.05、0.1、0.3)、1/2MS+IAA(0.05、0.1、0.3), 3 次重复, 每次重复 12 苗, 10 d 后统计生根情况。

1.3 数据分析

所有的数据用 Excel 与 Dps v 7.05 软件进行统计分析。

第一作者简介: 肖小君(1982-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为植物组织培养。E-mail: qianqianxxj@126.com。

责任作者: 齐泽民(1971-), 男, 教授, 研究方向为植物生态及土壤生态。E-mail: zmin918@sina.com。

基金项目: 四川省教育厅科研资助项目(10ZA014)。

收稿日期: 2011-06-20

2 结果与分析

2.1 不同苗龄与激素浓度对‘卡其 01’水果黄瓜不定芽诱导的影响

由表 1 可知,不同苗龄与激素浓度对黄瓜不定芽的诱导差异显著。4~6 d 苗龄的子叶节在低浓度的培养基中不定芽再生率较高,每块外植体再生芽数最多为 1.83 个,与 8 d 龄的差异极显著($P<0.01$),且 8 d 龄的愈伤组织较多,上有分散的绿点,转接到新的培养基后,长势弱,不能成活。

低浓度 6-BA 与 IAA 配比有利于黄瓜子叶节不定

芽的分化,芽再生率最高达 100%,且不定芽健壮,长势强,愈伤组织紧密,绿色。随着二者浓度升高,芽再生率和每块外植体再生芽数显著下降,不定芽短小,长势弱,愈伤组织增多,黄色或褐色,疏松,子叶畸形变黄。据后期观察,6-BA 浓度在 1.0 及以上的培养基诱导下的不定芽转接后生长势弱,最终不能成苗,愈伤组织亦没有诱导出不定芽。该试验研究认为,‘卡其’水果黄瓜对 6-BA 十分敏感,低浓度(6-BA 0.2 mg/L+IAA 0.05 mg/L)处理下直接诱导不定芽是较好的再生途径。

表 1 不同苗龄与激素浓度对‘卡其 01’水果黄瓜不定芽诱导的影响

苗龄/d	培养基类型	接种外植体数 /个	有芽外植体数 /个	芽再生率 /%	每块外植体再生芽数/个	生长情况
4	①	36	36	100	1.83aA	不定芽生长健壮,愈伤极少,紧密,出现不定根
	②	36	33	92	1.67abA	不定芽健壮,长势强,愈伤组织较小,绿色
	③	36	15	42	0.83cdBC	不定芽少,愈伤组织较多,上有绿色点状突起
	④	36	6	17	0.25eCD	不定芽极少,愈伤黄色或白色,子叶边缘发黄
6	①	36	34	94	1.61abA	不定芽健壮,长势强,愈伤较少,绿色,疏松
	②	36	27	75	1.25bcAB	不定芽长势弱,愈伤黄绿色,较疏松,子叶变黄
	③	36	12	33	0.42deCD	不定芽短小,愈伤较多,黄绿色,上有少量绿点
	④	36	3	8	0.08eD	不定芽长势极弱,愈伤褐色,疏松,子叶严重变黄
8	①	36	10	28	0.36eCD	不定芽短小,长势弱,愈伤上有绿点,子叶变黄
	②	36	2	6	0.17eD	不定芽长势极弱,愈伤褐色,疏松,子叶严重变黄
	③	36	0	0	0.00eD	无不定芽,愈伤多,褐色,疏松,子叶外卷变黄
	④	36	0	0	0.00eD	无不定芽,愈伤多,褐色或白色,子叶外卷变黄

注:同列数据后小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),大写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$)。下同

2.2 不同激素浓度配比对‘卡其 01’水果黄瓜再生芽增殖的影响

由表 2 可看出,当 IAA 浓度为 0.2 mg/L 时,6-BA 0.1 mg/L 处理下的再生芽最多,与其它 2 种处理差异极显著,增殖倍数达 4.76,再生芽长势强,叶色绿。当 IAA 浓度为 0.5 mg/L 时,再生芽数显著下降,愈伤组织增多,白色或淡黄色,说明较低浓度的 IAA 有利于‘卡其 01’水果黄瓜的再生芽增殖。随着 6-BA 浓度的升高,再生芽数呈先增加后减少的趋势,且 6-BA 0.2 mg/L 时再生芽长势差,叶片变黄,植株老化。说明适宜浓度的 6-BA 有利于再生芽增殖,过低对芽的增殖效果不明显,过高则会对再生芽产生毒害,植株老化严重。

表 2 不同激素浓度配比对‘卡其 01’水果黄瓜再生芽增殖的影响

培养基配方	接种芽数/个	培养 30 d 后再生芽数/个	增殖倍数	再生芽生长情况
(1)	54	183 bB	3.38	生长快,叶片浓绿,出现少数不定根
(2)	54	257 aA	4.76	再生芽较多,长势强,叶色绿,
(3)	54	95 cdC	1.76	长势弱,叶缘黄化,植株老化
(4)	54	100 cdC	1.86	长势较弱,部分叶尖变黄
(5)	54	116 cC	2.14	长势较弱,少数叶片变黄
(6)	54	82 dC	1.52	长势极差,叶片严重变黄,植株老化明显

2.3 激素对‘卡其 01’水果黄瓜再生芽生根的影响

由表 3 可知,不同激素对再生芽生根诱导差异显

著。IBA 最好,IAA 次之,NAA 最差。且在 IBA 和 IAA 诱导下,植株 1 周左右均可直接生根,尤其是 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 培养基中生根率最高,达 83%,与其它培养基中的生根数差异极显著,植株长势旺盛,叶片大而浓绿。NAA 处理下‘卡其 01’水果黄瓜再生芽生根率低,根粗而短,植株长势差,叶片开始老化。不添加任何激素的 1/2MS 培养基生根慢,生根率低,根系极细,植株长势弱,不利于移栽成活,这与崔波等^[8]的研究结果不一致。分析认为可能与黄瓜的基因型不同有关。

3 讨论与结论

在黄瓜离体繁殖过程中,子叶的苗龄对不定芽的再生有重要的影响。前人研究认为 1~10 d 龄的子叶节均可诱导出不定芽^[9-13],但多数学者报道 4~6 d 龄的无菌苗不定芽再生率较高^[10-12],且芽健壮,生长旺盛,这与该试验的研究结果一致,原因可能是无菌苗在 4~6 d 时子叶刚由黄转绿,其生理状态最有利于分化,说明幼嫩外植体的再生率较强,分化的效率也较高^[11]。

6-BA 作为一种细胞分裂素,在促进细胞分裂和不定芽发生方面具有很好的效果,且作用稳定、成本低廉^[4]。该研究表明,6-BA 0.2 mg/L+IAA 0.05 mg/L 最适宜‘卡其 01’不定芽诱导,诱导率最高可达 100%,继代后发现大部分不定芽均能成苗,随 6-BA 及 IAA 浓度升高,诱导率显著下降,出现大量黄色或白色愈伤

组织,外植体畸形,这与赵宇瑛等^[14]的观点一致。同时研究发现降低二者浓度有利于不定芽的增殖,分析原因可能是激素浓度在芽内不断累积,多次继代后累积的高浓度 6-BA 对不定芽产生毒害,使植株老化,此时与不含任何激素的 MS 培养基交替培养效果

更好。前人研究认为,激素配比对黄瓜再生频率和抗氧化酶活性有重要影响^[15],而抗氧化酶活性在一定程度上反映植物的生理活动状态^[16]。该试验结果表明,高 6-BA 与低 IAA 浓度处理下,不定芽分化较快,且生长旺盛,叶色浓绿。

表 3 激素对‘卡其 01’水果黄瓜再生芽生根的影响

培养基类型	总苗数/个	生根数/个	生根率/%	根系外观	生长情况
1/2MS	36	6 fgDEF	17	极细、长	生根慢,长势一般,叶色淡绿
1/2MS+NAA 0.01	36	8 efCDEF	22	粗短、极少	生根慢,长势差,部分叶片发黄
1/2MS+NAA 0.05	36	5 fgEF	14	粗短、极少	生根慢,长势差,叶片老化
1/2MS+NAA 0.1	36	1 gF	3	极粗、短	生根极慢,长势极差,叶片老化
1/2MS+IBA 0.05	36	22 bB	61	细长、多	生根较快,长势强,叶色绿
1/2MS+IBA 0.1	36	30 aA	83	细长、极多	生根快,长势强,叶色绿
1/2MS+IBA 0.3	36	16 cdBC	44	较粗、较长	生根较快,长势一般,叶色淡绿
1/2MS+IAA 0.05	36	14 dBCD	39	细长、较多	生根较快,长势强,叶色绿
1/2MS+IAA 0.1	36	21 bcB	58	细长、多	生根较快,长势强,叶色淡绿
1/2MS+IAA 0.3	36	12 dcDE	33	较粗、长	生根较快,长势一般,叶色淡绿

该试验以水果黄瓜‘卡其 01’为研究对象,采用直接诱导不定芽的器官发生途径,建立子叶高频再生体系,周期短,再生频率高,有效地避免了体细胞变异^[17]。为水果黄瓜规模化生产及转基因研究等相关工作提供参考依据。

参考文献

- [1] 李春伶,贾冬珍,肖长涛.日光温室水果型黄瓜产值超过 10 万元[J].中国蔬菜,2010(7):37-38.
- [2] 周秀艳,秦智伟,张艳菊,等.水果型黄瓜新品种东农 804[J].中国蔬菜,2009(23):26-27.
- [3] 张丽蓉,毛爱军,王永健,等.水果型黄瓜京研迷你 4 号[J].中国蔬菜,2007(4):56-57.
- [4] 张若纬,顾兴芳,王焯,等.不同黄瓜基因型子叶再生体系的建立[J].华北农学报,2010,25(增刊):50-54.
- [5] 张文勤,李进,顾绘,等.绿箭水果黄瓜离体快繁技术[J].江苏农业科学,2004(5):78-79.
- [6] 葛双桃,顾玉成,万进,等.水果型黄瓜的离体快繁及大田对比试验[J].西南园艺,2005,33(2):5-6.
- [7] 何晓明,林毓毓.黄瓜子叶和下胚轴的离体培养[J].植物生理学通讯,2001,37(5):423-424.

- [8] 崔波,梁芳,程喜梅,等.黄瓜子叶离体再生体系的建立[J].河南科学,2008,26(3):287-290.
- [9] 梅茜,张兴国.黄瓜组织培养研究[J].西南农业大学学报,2002,24(3):266-267.
- [10] 冯嘉玥,邹志荣,秦盛华,等.黄瓜子叶节高频再生体系建立及再生植株倍性观察[J].西北植物学报,2008,28(5):956-962.
- [11] 薛丹丹,张凤生,王保菊,等.黄瓜再生体系的建立[J].北方园艺,2010(7):119-121.
- [12] 刘春香,赵俊利,王海霞,等.黄瓜再生体系的建立[J].潍坊学院学报,2006,6(4):82-84.
- [13] 赵隽,王华,潘俊松,等.黄瓜子叶节离体再生体系的研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(1):43-47.
- [14] 赵宇瑛,李永辉,李丛玉,等.6-BA、NAA 和 IAA 对黄瓜子叶离体培养分化的影响[J].长江大学学报,2007,4(3):26-28.
- [15] 朱妍妍,张卫华,于玉梅,等.激素配比对黄瓜子叶再生和抗氧化酶活性的影响[J].山东农业科学,2008(2):36-38.
- [16] 王俊刚,陈国良,张承烈.水分胁迫对两种生态型芦苇(*Phragmites communis*)可溶性蛋白含量、SOD、POD、CAT 活性的影响[J].西北植物学报,2002,22(3):561-565.
- [17] 范爱丽,孙艳,徐凌飞,等.黄瓜子叶节再生体系优化研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(9):69-73.

Study on High-Frequency Regeneration System from Cotyledon Nodes of Fruit Cucumber ‘Kaqi’

XIAO Xiao-jun^{1,2}, QI Ze-min^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, HUANG Zuo-xi^{1,2}, WANG Fang^{1,2}, ZHANG Xia¹

(1. School of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641112; 2. Key Laboratory of Colleges and Universities in Sichuan for Research and Utilization of Distinctive Agricultural Undertakings, Neijiang, Sichuan 641112)

Abstract: Fruit cucumber ‘Kaqi01’ was used as test material, the effects of different seedling ages and hormones concentration on cotyledon nodes regeneration system establishment of cucumber (cultivar ‘Kaqi01’) were studied. The results showed that 4 days cotyledons as explants, the regeneration rates of adventitious buds were 100%, and the regeneration rates decreased significantly with the increasing seedling ages, while for 8 days, the explants were weak and bad for regeneration buds differentiation. The positive mediums of buds induction and multiplication were 6-BA 0.2 mg/L+IAA 0.05 mg/L and 6-BA 0.1 mg/L+IAA 0.02 mg/L respectively. While the better medium of roots induction for ‘Kaqi01’ was 1/2MS+IBA 0.1 mg/L, and rooting rates were up to 83%, complete regenerative plants can be got after 40~50 days.

Key words: fruit cucumber; cotyledon nodes; regeneration system; adventitious buds