

三个基因型黄瓜品种未授粉子房胚状体诱导及植株再生研究

李建欣, 葛桂民, 庞淑敏, 方贯娜, 吴小波, 周海霞

(郑州市蔬菜研究所, 河南 郑州 450015)

摘要:以3个品种黄瓜的未授粉子房为外植体,进行胚状体诱导和植株再生研究。结果表明:3个品种都获得了再生植株。不同品种、不同热处理时间和不同TDZ浓度以及外植体的切割方式对胚状体诱导率都有影响。不同品种及不同6-BA和NAA浓度组合对植株的再生率有影响。热处理3 d,外植体为条状,TDZ浓度在0.06~0.08 mg/L时这3个品种的胚状体诱导率较高。NAA浓度为0.05 mg/L,6-BA浓度为0.4~0.6 mg/L时有利于胚状体分化植株。

关键词:黄瓜;未授粉子房;胚状体;再生植株

中图分类号:S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0131-04

在黄瓜常规杂交育种中,杂交后代自交系的纯合往往需要5~7 a,而利用未授粉子房培养快速获得纯系是加速黄瓜育种的有效途径。对黄瓜未授粉子房培养的研究国内外已有成功的报道。Gémes-Juhász等^[1]研究表明,35℃热激处理有利于胚状体的发生,并得到了再生单倍体植株。杜胜利等^[2]研究认为黄瓜未授粉子房培养体系单倍体植株的再生频率为25%。陈小鹏等^[3]报道了黄瓜未授粉子房培养的一些影响因素,如蔗糖浓度、取样时间和TDZ浓度对胚状体发生的影响。刁卫平等^[4]研究结果表明处于开花前2~3 d的子房胚发生

率相对较高,达到83.8%,对子房进行35℃热激处理3 d的胚状体的发生率较高,诱导培养基中添加AgNO₃可以提高胚发生率,并获得了单倍体植株。王璐等^[5]研究认为25℃下启动雌核发育的最适TDZ浓度为0.02 mg/L,反应率可达90.1%,该试验在以上研究的基础上对黄瓜未授粉子房胚状体的诱导和植株的再生进行研究,以期为其在育种上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为3个黄瓜杂交种:“津优3号”、“津绿21”、“夏炎”,均由郑州市蔬菜研究所黄瓜课题组提供。

1.2 试验方法

试验于2011年春季和秋季在郑州市蔬菜研究所内进行。

1.2.1 外植体的准备与培养 黄瓜为异花授粉作物,花朵开放之前处于闭合状态,开花前1~3 d的雌花绝少有

第一作者简介:李建欣(1975-),女,硕士,助理研究员,现主要从事蔬菜生物技术育种研究工作。E-mail:lijianxin1007@163.com.

责任作者:庞淑敏(1964-),女,硕士,研究员,现主要从事马铃薯脱毒与生物技术研究工作。E-mail:psmm9508@126.com.

基金项目:郑州市科技创新团队资助项目(096SYJH17093)。

收稿日期:2012-07-20

Study on Influence and Effect of Microwave Sterilization on MS Medium

GAO Yue, ZHU Xu-dong, SI Wen-hui, QUE Xiao-feng

(Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008)

Abstract: The effect of different microwave sterilizations on the temperature, water loss rate, pH of MS medium were detected, and the sterilization effect was compared to investigate sterilization effect of MS medium. The results showed that with the increase of sterilization time, MS medium temperature and water loss rate rised, pH value reduced. When sterilization time reached 2 min, MS medium was thoroughly sterilization. There was no bacterial growth, and the pH value changed small, the nutrients of MS medium were damaged a little.

Key words: MS medium; microwave sterilization; pH value; sterilization effect

授粉机会,根据前人研究经验,开花前 1~3 d 的胚珠发育处于单倍体诱导的理想时期,因此,在盛花期取长势旺盛植株上开花前 1~3 d 的未授粉雌花瓜条为外植体。雌花瓜条的灭菌方法为超净工作台上 75%乙醇表面消毒 30 s,5%次氯酸钠灭菌 20 min,无菌水冲洗 4 次。用手术刀片将灭好菌的瓜条削去表皮,切成 0.3 cm 厚的薄片或 1 cm 长的瓜条,使子房暴露,接种到诱导培养基上黑暗条件下热激处理。每个雌花瓜条接种 1~2 个培养皿(规格:6 cm×1.5 cm),2~7 d 后可观察到切成条状或片状的外植体上有球形突起,并将其转到分化培养基上进行胚的分化和植株的再生,最后对再生植株驯化和移栽。胚状体的诱导和植株再生采用 CBM 培养基^[1],诱导培养基添加蔗糖 40 g/L,植株再生培养基添加蔗糖 30 g/L,琼脂粉均为 5 g/L,pH 5.8~6.0。

1.2.2 试验设计 35℃热激处理时间分别为 2、3、4、5 d;胚状体诱导培养基中添加 TDZ 的浓度处理分别为 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 mg/L;胚状体分化培养基 5 种:1. CBM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.2 mg/L;2. CBM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.4 mg/L;3. CBM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.6 mg/L;4. CBM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.8 mg/L;5. CBM+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

2 结果与分析

2.1 再生植株的获得

35℃热处理 2~5 d 后可观察到片状和条状外植体上有类似胚状体结构的突起物,将外植体转接到分化培养基上,每 2 周转接 1 次,在 25℃下暗培养 40~50 d 后,胚状体分化为幼苗,将幼苗转接到 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 2%+Agar 5 g/L 培养基上 25℃光周期培养(光照 14 h/黑暗 10 h,光照强度 3 000 lx),25~30 d 后长成 4~6 cm 的小植株,将植株进行切段继代和扩繁,可以获得较多的幼苗。

2.2 热激处理对胚状体诱导率的影响

TDZ 质量浓度为 0.06 mg/L 时,热激处理 2、3、4、5 d 时,3 个材料的胚状体诱导率统计结果见表 1。由表 1 可知,3 个材料在处理 3 d 的胚诱导率达到最大值,显著高于 2、4 和 5 d,处理 4 d 的胚诱导率明显下降,处理 5 d 的胚诱导率最小,这与陈小鹏等^[3]报道的结论一致。不同品种间胚状体的胚平均发生率有差异,处理 3 d 时胚平均发生率最高的是“夏炎”,为 89.0%;“津优 3 号”次之,最低的是“津绿 21”,为 78.0%。原因可能是外植体长期处于高温下,而且 TDZ 具备细胞分裂素和生长素的双重作用,外植体上部的愈伤组织生长较快,覆盖了球形突起,并抑制球形突起生长,使胚状体诱导率明显下降。

表 1 不同热激处理时间胚诱导率的影响(35℃)

Table 1 Embryo formation frequency in different time of the heating shock treatment

材料 Materials	35℃热激时间 Time of 35℃ heat shock treatment/d	培养外植体 总数 Number of cultured explants	有胚形成外植体数 Number of explants with embryo	平均胚诱导率 Frequency of embryo formation /%
“津优 3 号”	2	102	63	61.8b
	3	100	85	85.0a
	4	90	52	57.8c
	5	100	7	7.0d
“津绿 21”	2	103	60	58.3b
	3	100	78	78.0a
	4	80	20	25.0c
	5	90	10	11.1c
“夏炎”	2	89	70	78.7b
	3	100	89	89.0a
	4	100	9	9.0c
	5	90	2	2.2d

2.3 TDZ 质量浓度对胚诱导率的影响

将 3 个材料的外植体在不同 TDZ 质量浓度下热处理 3 d,观察胚状体的诱导率。由表 2 可知,3 个供试材料胚诱导率在 0.06~0.08 mg/L TDZ 水平达到最大值;胚的诱导率随 TDZ 质量浓度升高而增加,达到一定水平后下降。“夏炎”的胚状体诱导率最高,在 TDZ 浓度为 0.06 mg/L 达到 90.0%,其次为“津优 3 号”,为 85.2%,而“津绿 21”的诱导率在 TDZ 浓度为 0.08 mg/L 时达到最高,为 85.2%。在胚状体诱导中,不同基因型的最适 TDZ 浓度不同,这与不同材料的内源激素及调控水平不同有关。

表 2 不同质量浓度 TDZ 处理对胚诱导率的影响

Table 2 Effect of different concentration of TDZ on embryo formation frequency

材料 Materials	TDZ 浓度 TDZ concentration /mg·L ⁻¹	培养外植体总数 Number of cultured explants	有胚形成外植体数 Number of explants with embryo	平均胚诱导率 Frequency of embryo formation/%
“津优 3 号”	0.02	60	21	35.0d
	0.04	56	22	39.3c
	0.06	54	46	85.2a
	0.08	60	31	51.7b
	0.10	50	20	40.0c
“津绿 21”	0.02	55	9	16.4d
	0.04	60	11	18.3d
	0.06	62	49	79.0b
	0.08	52	43	82.7a
	0.10	50	21	42.0c
“夏炎”	0.02	56	2	3.6d
	0.04	61	22	36.1b
	0.06	60	54	90.0a
	0.08	50	15	30.0c
	0.10	52	1	1.9e

2.4 外植体的切割方式对胚状体诱导率的影响

热处理 3 d 后,TDZ 质量浓度为 0.06 mg/L 时,3 个供试材料不同切割方式胚状体诱导率见表 3。由表 3 可

知,3个供试材料的黄瓜未授粉子房被切成条状时胚状体的诱导率均显著高于片状。可能因为条状的外植体更充分的提供了胚珠发育的理想环境,因而使胚状体的诱导率明显提高。但后期的成苗率却不高,这可能与密集的胚状体相互争夺营养有关。

表3 外植体不同切割方式对胚诱导率的影响

Table 3 Effect of different shape of explants on embryo formation frequency

材料 Materials	外植体形状 Shape of explants	外植体块数 Number of explants	有胚形成外植体数 Number of explants with embryo	胚诱导率 Frequency of embryo formation/%
“津优3号”	片状	50	38	76.0b
	条状	50	42	84.0a
“津绿21”	片状	53	20	37.7b
	条状	50	39	78.0a
“夏炎”	片状	50	35	70.0b
	条状	48	43	89.6a

2.5 分化培养基中添加不同浓度的 NAA 与 6-BA 对幼苗再生的影响

3个供试材料的未授粉瓜条纵切为条状,在 TDZ 质量浓度为 0.06 mg/L 时热处理 3 d 后转入添加不同质量浓度的 NAA 与 6-BA 的分化培养基中,40 d 后统计幼苗再生情况。由表 4 可以看出,3个材料的胚状体分化为幼苗的频率均随着 6-BA 浓度的增加而增加,达到一定值后下降。“津优3号”的胚状体的幼苗分化率在 6-BA 浓度为 0.6 mg/L 时达到 10.0% 的最高值;“津绿21”在 6-BA 浓度为 0.4 mg/L 时达到 6.0% 的最高值;“夏炎”在 6-BA 浓度为 0.6 mg/L 时达到 8.0% 的最高值。不同材料的幼苗分化率不同,在相同 NAA 浓度下(0.05 mg/L)适宜的 6-BA 浓度也不同。

表4 分化培养基中添加不同浓度的 NAA 与 6-BA 对胚状体分化为幼苗的影响

Table 4 Effect of different concentrations of NAA and 6-BA on frequency of seedling formation from embryos

材料 Materials	培养基编号 No. of mediums	外植体总数 Number of explants	有幼苗形成外植体数 Number of explants with seedling	幼苗分化率 Frequency of seedling formation/%
“津优3号”	1	45	1	2.2
	2	46	4	8.7
	3	50	5	10.0
	4	55	1	1.8
	5	52	0	0
“津绿21”	1	48	1	2.1
	2	50	3	6.0
	3	56	1	1.8
	4	51	0	0
	5	40	0	0
“夏炎”	1	42	0	0
	2	53	1	1.9
	3	50	4	8.0
	4	40	0	0
	5	44	0	0

3 讨论

通过对未授粉子房或胚珠培养,获得单倍体植株,预处理是一个重要的步骤。Gémes-Juhász 等^[1]在黄瓜未授粉子房培养的研究中发现,35℃ 高温预处理可以提高单倍体胚发生率。刁卫平等^[4]研究也表明,经过 35℃ 高温热激处理后,6个试验材料都得到了较高的胚状体发生率,热激处理的有效性是公认的。该研究对 35℃ 高温热激处理的天数进行了研究,进一步发现 3 d 的热激处理 3个材料的胚状体诱导率均达到最高值,处理 4 d 开始下降,5 d 最低。其原因可能是,随着热处理天数的增加,长期处于高温下,外植体上部的愈伤组织生长较快,覆盖了球形突起,并抑制其生长,使胚状体诱导率明显下降,长时间的高温处理,在培养后期更容易使材料褐化而影响胚状体的诱导。

TDZ 具有生长素和细胞分裂素的双重作用的特殊功能^[6]。所以,TDZ 可以用来启动黄瓜未授粉子房的雌核发育。该研究表明热处理温度在 35℃ 时,其浓度为 0.06~0.08 mg/L 胚状体的诱导率较高。

外植体的切割方式也影响到了胚状体的诱导率。未授粉雌花瓜条被纵切成条状,侧放于培养基上,胚状体的诱导率要高于横切成片状平放于培养基上的诱导率。条状的外植体由于未授粉雌花瓜条切割的体积较大,胎座及着生部位保存相对完好,更接近幼胚发育的自然环境,可以为胚胎发育提供较全面的营养物质,因此容易诱导出胚状体,但其后期胚状体分化为幼苗的频率较低,这可能与密集的胚状体相互争夺营养有关。后续试验表明,胚状体发育到一定时期时,将条状外植体及时分割转接,可提高胚状体的分化为幼苗的频率。

在试验中还发现,在只含有一种激素 TDZ 的培养基中胚状体很难分化为幼苗,应及时将外植体转接到一定浓度 6-BA 和 NAA 的培养基中,在该试验中具体的时间为热处理后 1~3 d,具体的激素浓度为 0.05 mg/L NAA 和 0.06~0.08 mg/L 6-BA。该试验也尝试了只添加 6-BA,不添加 NAA 的处理,结果证明胚状体分化为幼苗的频率更低,这与王璐等^[5]的研究结果不同,原因可能是试验材料不同。

胚状体分化为再生植株是单倍体育种的关键,黄瓜未授粉子房培养胚状体的诱导率较高,最高达 87.5%,而分化为再生植株的频率却很低,最高的只有 10.0%,胚状体分化为正常再生植株的频率低在其它作物中也普遍存在如辣椒^[7]。其原因非常复杂,主要是成熟胚状体的诱导频率较低,而次生胚状体的诱导频率较高,从而导致培养后期胚状体分化为再生植株的频率极低。因此,黄瓜未授粉子房培养胚状体分化成苗的调控机制和条件仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Gémes-Juhász A, Balogh P, Ferenzy A, et al. Effect of optimum stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2002, 21 (2): 105-111.
- [2] 杜胜利, 魏爱民, 魏惠军, 等. 利用生物技术创造黄瓜育种新材料方法研究[J]. 天津科技, 2001(2): 627.
- [3] 陈小鹏, 刘栓桃, 孙小镭, 等. 黄瓜未授粉子房的胚状体诱导研究初报[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 148-151.
- [4] 刁卫平, 陈劲枫, 雷春, 等. 影响黄瓜未授粉子房培养胚发生因素的研究[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(1): 137-140.
- [5] 王璐, 陈小燕, 张力, 等. 不同因素对黄瓜未授粉子房胚状体诱导的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 267-270.
- [6] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227-237.
- [7] 李建欣, 庞淑敏, 方贯娜, 等. 辣椒花药培养的胚状体分化及其与成苗率的关系[J]. 植物生理学通讯, 2009(8): 794-796.

Study on *in vitro* Culture and Plantlet Regeneration from Unpollinated Ovary of *Cucumis sativus* L.

LI Jian-xin, GE Gui-min, PANG Shu-min, FANG Guan-na, WU Xiao-bo, ZHOU Hai-xia
(Zhengzhou Vegetable Research Institute, Zhengzhou, Zhengzhou 450015)

Abstract: Taking the unpollinated ovaries of them Henan *Cucumis sativus* L. as explant, the induction of embryoid and plant regeneration of three varieties of were studied. The results showed that regenerated plants were obtained in three varieties of cucumber. Different varieties, heat-treated time, concentration of TDZ and shape of explants affected the frequency of embryoid induction. Different varieties and concentration combinations of 6-BA and NAA affected the frequency of plant regeneration. Heat-treated for three days, sticks of explants and 0.06~0.08 mg/L of TDZ had high frequency of embryoid induction. 0.05 mg/L of NAA and 0.4~0.6 mg/L of 6-BA could facilitate seedlings regeneration from embryoid.

Key words: *Cucumis sativus* L.; unpollinated ovaries; embryoid; regenerated plant

棚室蔬菜应严防冷风为害

在华北地区秋冬交替季节,棚室蔬菜问题逐渐增多。棚室的黄瓜下部叶片白干,心叶发黄腐烂,生长点坏死。棚室前底窗侧现象较重,这主要是棚室中进入冷风后造成的,用菜农的话说就是“被风扑了”,一开始上部心叶呈水浸状,就像是开水烫过一样,慢慢黄化,致使生长点坏死。其发生原因有以下几方面。

一是幼苗长势偏弱。育苗场为了避免种苗徒长,使用的植物生长调节剂较多,造成秧苗长势偏弱,再加上育苗穴盘很小,营养供应不足,尤其是微量元素硼、锌、钙等补充不足,心叶组织偏薄,受到冷风侵袭后,很容易出现失水萎蔫现象,造成无头苗出现。

二是定植后前期棚温过高。黄瓜是在9月底定植的,当时外界温度较高,棚中温度最高达到35℃以上。前期棚室温度偏高,也是后期冷害发生的一个诱因,因为温度较高时,植株迅速生长,叶片偏大偏薄,抗逆能力下降。菜农应注意这一时期棚室温度的调控,缓苗后要加大温差培育适龄壮苗。定植缓苗后,白天温度保持在28℃左右,夜间温度12~15℃,利用较低的夜温来培育壮苗。

三是放风方法不当。前期棚室全面关闭风口,棚内夜温偏高,营养消耗大,植株抗逆性减弱,若早上外界温度偏低时拉开风口,冷风直吹蔬菜幼苗,就很容易造成冷害发生。这种危害短时间内就能发生,所以菜农应特别注意风口的开放;缓慢放风,逐渐调整棚内温度,也可以在风口处设置挡风膜,避免冷风从底部直接侵袭蔬菜叶片。

防止措施

第一,慢放风、慢提温。蔬菜遭遇冷风扑苗后,第2天早晨先不要急于放风,要先把温度慢慢地提高到蔬菜生长最适宜的范围内。棚内温度过高必须放风时,一定要注意放风口不要一次拉得过大,要缓慢地把温度降下来,以防放风过急,造成更大危害。

第二,适时采用以水调温的方法。蔬菜受害后应浇水1次,因浇水能增加土壤热容量,稳定地表大气温度,有利于气温平稳上升,使受伤组织恢复机能。也可采用人工喷水的方法,来增加棚内空气湿度,稳定棚温,减弱蒸腾作用,促使组织吸水,防止萎蔫。

第三,受冷风影响的植株要适当遮阴,适时喷施叶面肥。植株受冷后,天气晴好时,若直接让强光照射,极易发生组织迅速失水、干缩萎蔫现象,情况严重时,植株便会死亡。因此要对其进行遮挡,减轻阳光照射强度,避免升温过快。然后对受冷植株及时合理喷施叶面肥,如氨基酸、甲壳素等配合芸苔素内酯,既能改善作物的营养状况,又能增加细胞组织液的浓度,增强植株耐寒抗冻能力,促进恢复生长。