

# 不同激素组合对黄瓜“露地二号”离体子叶再生芽诱导的影响

鲍林文, 陈哲皓, 钟丹, 王利琳

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036)

**摘要:**以黄瓜品种“露地二号”为试材,以 MS 为基本培养基,以 3 d 苗龄的子叶为外植体,研究比较了不同植物激素组合以及  $\text{AgNO}_3$  对离体子叶再生芽诱导的影响。结果表明:在 6-BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+ $\text{AgNO}_3$  2.0 mg/L 的组合下,黄瓜离体子叶再生芽的分化率最高可达 76.67%,该项研究为优化黄瓜离体子叶再生芽诱导体系及进一步建立快速、稳定、高效的黄瓜离体植株再生体系,开展黄瓜转基因工作奠定了基础。

**关键词:**黄瓜子叶;激素;再生芽;影响

**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0100-04

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是国内外广泛种植的一类重要的经济作物,同时也是人们非常喜爱的蔬菜作物。但是生产中黄瓜抗旱性能较差,易感染病虫害,其产量和品质往往不佳。随着分子生物学研究的深入发展,基因工程手段被越来越多地运用于黄瓜育种工作。目前黄瓜的离体再生还比较困难,所以建立一个高效的再生系统来实现黄瓜的稳定遗传转化显得非常重要<sup>[1]</sup>。针对黄瓜组织培养的研究显示,选用的外植体主要包括子叶、子叶节、下胚轴、胚、胚根以及原生质体,不同外植体的离体分化能力差别很大。Chee<sup>[2]</sup>研究认为,黄瓜的子叶比下胚轴容易分化出胚状体。赵军良等<sup>[3]</sup>发现在含有 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上,子叶外植体能够直接分化出再生芽,而下胚轴不具备这种能力。杜胜利等<sup>[4]</sup>认为离体条件下黄瓜子叶、下胚轴、胚根和真叶均有较高的愈伤组织分化率,但仅有子叶外植体能够诱导产生再生芽。为进一步优化黄瓜离体组织再生芽的诱导体系,该试验以子叶为外植体,研究了不同激素配比和浓度条件对黄瓜离体子叶再生的影响,以期找到最佳的配比组合,为优化离体子叶直接再生芽的诱导培养基,进一步建立快速高效的黄瓜离体植株再生体系以及开展黄瓜转基因工作奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄瓜品种“露地二号”由辽宁省农业科学院提供,属华北类型。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将“露地二号”黄瓜种子在清水中浸泡 15 min,剔除漂浮的种子。70%的酒精消毒 30 s,再用 0.1%升汞溶液表面消毒 15 min,无菌蒸馏水冲洗 4 次,每次 2~3 min,无菌滤纸上吸干多余的水分。pH 5.7 的 MS 培养基灭菌后分装于组培瓶,每瓶接种经表面消毒的黄瓜种子 8~9 粒。置于 28℃暗培养 2 d,再放至 25℃、光照强度为 2 500 lx,12 h 光/12h 暗的光周期下培养获取无菌苗。

1.2.2 外植体的获取 无菌环境下切取 3 d 苗龄的完整黄瓜子叶,在子叶中部横切成上、下半叶,弃去上半叶,将下半叶从中部纵切平分为二,每半片下半叶为一块外植体材料。

1.2.3 再生芽的诱导 按照上述方法获得的外植体,以 MS 为基础培养基,添加不同浓度的 KT、6-BA、NAA、ABA 以及  $\text{AgNO}_3$ ,培养条件如前,培养基 14 d 时继代 1 次,45 d 后统计出现再生芽的子叶外植体数目,计算芽分化率,诱导的再生芽以肉眼清晰可辨为标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 KT 对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

从表 1 可以看出,随着 KT 浓度的增加,再生芽分化率明显升高,KT 浓度为 4.0 mg/L 时,分化率最高,达到 40.00%,但 KT 浓度进一步提高至 5.0 mg/L 时,再生芽的分化率又降低。

**第一作者简介:**鲍林文(1987-),女,硕士研究生,现主要从事植物发育与基因工程等研究工作。E-mail:jessirybao@163.com.

**责任作者:**王利琳(1965-),男,博士,教授,现主要从事植物发育与基因工程等研究工作。E-mail:wang\_208@163.com.

**收稿日期:**2013-03-04

表1 KT对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

Table 1 Effect of different concentrations of KT on the buds induction of cotyledons of cucumber

KT/mg · L <sup>-1</sup>	接种数	芽分化数	分化率/%
1.0	30	1	3.33
2.0	30	3	10.00
3.0	30	7	23.30
4.0	30	12	40.00
5.0	30	6	20.00

## 2.2 KT、6-BA 和 NAA 组合对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

从表2可以看出,KT与6-BA联合使用时再生芽分化率在33.33%~36.67%左右,略低于单独使用KT。若在此基础上添加NAA,再生芽分化率则显著下降,说明KT、6-BA和NAA联用组合在黄瓜子叶再生芽诱导中效果不佳。

表2 KT、6-BA、NAA组合对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different concentrations of KT, 6-BA and NAA combinations on the buds induction of cotyledons of cucumber

激素/mg · L <sup>-1</sup>	接种数	芽分化数	分化率/%
KT 3.0+6-BA 0.5	30	11	36.67
KT 4.0+6-BA 0.5	30	10	33.33
KT 3.0+6-BA 0.5+NAA 0.1	30	2	6.67
KT 4.0+6-BA 0.5+NAA 0.1	30	5	16.67

## 2.3 6-BA 和 ABA 组合对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

由表3可知,在添加了3.0 mg/L的6-BA和1.0 mg/L ABA的培养基上,黄瓜子叶再生芽分化率显著高于其它浓度组合,达到43.33%。说明细胞分裂素与脱落酸联用组合在黄瓜子叶再生芽诱导中有较高的效用。

表3 6-BA 和 ABA 组合对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different concentrations of BA and ABA combinations on the buds induction of cotyledons of cucumber

激素/mg · L <sup>-1</sup>	接种数	出现芽分化外植体数	分化率/%
6-BA 1.0+ABA 0.5	30	4	13.33
6-BA 1.5+ABA 0.5	30	5	16.67
6-BA 2.0+ABA 0.5	30	1	3.33
6-BA 3.0+ABA 0.5	30	2	6.67
6-BA 1.0+ABA 1.0	30	5	16.67
6-BA 1.5+ABA 1.0	30	2	6.67
6-BA 2.0+ABA 1.0	30	2	6.67
6-BA 3.0+ABA 1.0	30	13	43.33

2.4 AgNO<sub>3</sub>对黄瓜子叶再生芽诱导的影响

由表4可知,AgNO<sub>3</sub>的添加可以显著提升再生芽的分化率,达到未添加条件下的10倍左右(9:1,23:2),其中6-BA 2.0 mg/L + ABA 1.0 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L组合下的再生芽分化率高达76.67%。

表4 AgNO<sub>3</sub>对黄瓜子叶再生芽诱导的影响Table 4 Effect of AgNO<sub>3</sub> on the buds induction of cotyledons of cucumber

激素/mg · L <sup>-1</sup>	接种数	出现芽分化外植体数	分化率/%
6-BA 2.0+ABA 0.5	30	1	3.33
6-BA 2.0+ABA 0.5+AgNO <sub>3</sub> 2.0	30	9	30.00
6-BA 2.0+ABA 1.0	30	2	6.67
6-BA 2.0+ABA 1.0+AgNO <sub>3</sub> 2.0	30	23	76.67

## 2.5 不同激素组合对黄瓜子叶再生芽形态和数量的影响

从图1可以看出,在单独使用细胞分裂素,细胞分裂素与生长素联合使用,细胞分裂素与脱落酸联合使用,细胞分裂素与脱落酸、AgNO<sub>3</sub>联合使用4种不同培养条件下,培养45 d后的再生芽生长情况不同。单独使用细胞分裂素KT时再生芽相对其它3种组合生长更缓慢(图1A),未添加AgNO<sub>3</sub>的组合下每个外植体上均只有1个再生芽产生,而添加AgNO<sub>3</sub>后每个外植体上的再生芽的数量明显增加(图1D)。该结果表明,细胞分裂素与脱落酸、AgNO<sub>3</sub>联用的组合最适合再生芽的诱导。

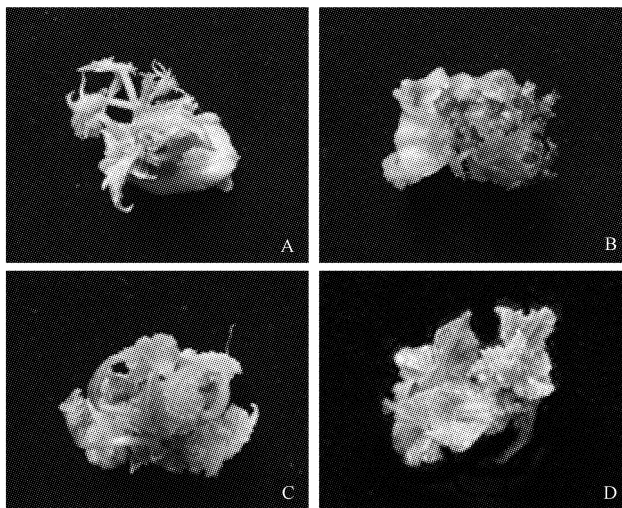


图1 不同激素组合对黄瓜子叶再生芽形态和数量的影响(45 d)

注:A:KT 4.0 mg/L; B:KT 4.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; C:6-BA 3.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L; D:6-BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L。

Fig. 1 Effect of different phytohormone combinations on the buds induction of cotyledons of cucumber(45 d)

Note: A:KT 4.0 mg/L; B:KT 4.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L; C:6-BA 3.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L; D:6-BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L。

## 3 讨论与结论

为优化黄瓜离体组织再生芽的诱导体系,该试验研究比较了不同激素配比和浓度下黄瓜“露地2号”离子子叶直接诱导再生芽的分化率。

细胞分裂素对细胞的分裂与分化作用明显,在组织

培养中常被用于通过促进细胞分裂和分化来诱导再生芽的形成<sup>[13]</sup>,其中 KT 与 6-BA 作用相近<sup>[14]</sup>,但也有报道发现单独使用 KT 比单独使用 6-BA 在扇蕨组培中可获得更高的再生芽分化率<sup>[8]</sup>,而目前还没有单独使用 KT 诱导黄瓜再生芽的报道。该试验结果表明,KT 同样可以促进黄瓜再生芽的分化,单独使用 4.0 mg/L KT 可获得最高 40%的再生芽分化率。

秦华伟等<sup>[9]</sup>研究指出,生长素 IAA、NAA 和细胞分裂素 KT、6-BA 混合使用在黄瓜组培再生中起作用。细胞分裂素/生长素比值在组织培养中调控了不同器官的分化,比值高有利于芽的分化,比值低有利于根的分化。该试验研究了不添加任何生长素条件下再生芽的分化率,也进一步考察了 KT、6-BA 和低浓度 NAA 组合对黄瓜子叶再生芽诱导的影响。结果表明,KT 与 6-BA 联用下再生芽分化率略低于单独使用 KT,而 KT 与 6-BA、NAA 的联合使用下再生芽分化率显著降低,说明 KT、6-BA 和 NAA 联用组合在黄瓜子叶再生芽诱导中效果不如单独使用细胞分裂素。

ABA(脱落酸)是一种促进植物叶片脱落、抑制生长的激素,但是将其与合适的细胞分裂素组合,使植物体内激素水平维持平衡,从而可以提高植物离体培养的再生频率。梅茜等<sup>[10]</sup>研究表明,ABA、6-BA 的组合能够明显抑制愈伤组织,直接分化再生芽。贾士荣等<sup>[15]</sup>研究发现,1.0 mg/L ABA 可以显著减少培养物的愈伤组织化,并可以控制胚状体处于球形胚或球形胚后期,与梅茜等<sup>[10]</sup>研究结果相一致。该试验研究了不同浓度 ABA 和 6-BA 联用下再生芽的分化率,发现 3.0 mg/L 6-BA 与 1.0 mg/L ABA 的联用组合获得了最高为 43.33%的再生芽分化率。因此认为适量 ABA 对离体组织芽再生过程有促进作用。

该试验结果表明,AgNO<sub>3</sub>可以显著提升再生芽的分化率,达到未添加条件下的 10 倍左右,究其原因可能是乙烯合成量与芽分化能力呈负相关<sup>[16-17]</sup>,AgNO<sub>3</sub>通过竞争性地作用于乙烯作用部位来抑制乙烯活性,从而促进植物器官发生和体细胞胚胎发生<sup>[18-19]</sup>。其中 6-BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L 组合下的再生芽分化率高达 76.67%。在黄瓜组织培养和再生过程中,再生芽的数量与再生芽的分化率同样重要,该结果表明,培养基中添加 2.0 mg/L 硝酸银可使每个外植体上的再生芽数目明显提高,显著高于其它几种激素配比组合,说明乙烯对黄瓜“露地 2 号”的离体子叶再生

芽系统最为关键,抑制乙烯的作用既有利于提高芽分化率,也有利于提高外植体上的再生芽数量。认为 MS+BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 2.0 mg/L 的培养条件下离体子叶再生芽的效果最好,为建立高效的黄瓜离体植株再生体系提供了实践经验。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Chee P P. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants[J]. Hort Science, 1990, 25: 792-793.
- [3] 赵军良,马蓉丽,李昌华. 黄瓜子叶组织培养再生植株[J]. 山西农业科学, 1996, 24(1): 39-41.
- [4] 杜胜利,魏惠军,魏爱民,等. 苗龄、基因型和外植体类型对黄瓜离体器官发生的影响[J]. 天津农业科学, 2000, 6(4): 1-5.
- [5] 侯爱菊,朱延明,杨爱馥,等. 诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 101-103.
- [6] 冯嘉骊,邹志荣,秦胜华,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.
- [7] 张若伟,顾兴芳,王烨,等. 基因型和 6-BA 对黄瓜子叶节再生频率的影响[J]. 中国蔬菜, 2009(22): 45-48.
- [8] 叶晓青,余建明,邓衍明,等. 不同类型细胞分裂素对扇蕨再生芽诱导和植株再生的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 172-175.
- [9] 秦华伟,徐跃进,何丹,等. 不同因素对黄瓜子叶再生植株影响的研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(7): 1548-1550.
- [10] 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.
- [11] 曹利仙,赵鹏,唐宇力,等. 硝酸银对黄瓜离体子叶培养芽再生的促进效应[J]. 甘肃农业大学学报, 2001, 6(2): 168-171.
- [12] 金宝燕,苏华,任华中. 硝酸银等因素对黄瓜直接再生芽诱导的影响[J]. 中国蔬菜, 2006(6): 21-22.
- [13] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中再生芽不定根的作用[J]. 辽宁师专学报, 2000(2): 97-99.
- [14] 余如刚,杜雪玲,宋运贤. 不同浓度 6-BA 及 KT 对马铃薯无菌苗诱导的影响[J]. 亚热带植物科学, 2012, 41(2): 19-22.
- [15] 贾士荣,罗美中,林云. 黄瓜胚性细胞悬浮培养及原生质体的植株再生[J]. 植物学报, 1988, 30(5): 463-467.
- [16] Chi G L, Pua E C. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* (Chinese cabbage) *in vitro*[J]. Plant Science, 1989, 64: 243-250.
- [17] 汤福强,刘恩,施教耐,等. 番茄子叶外植体芽的分化过程与乙烯释放的关系[J]. 植物生理学报, 1996, 22(2): 152-156.
- [18] Khalid M, Chraïbi B, Alain Latche, et al. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt[J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 204-207.
- [19] 张鹏,傅爱根,王爱国. AgNO<sub>3</sub>在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理通讯, 1997, 33(5): 376-379.

## Effects of Different Hormones on Buds Regeneration Induction from Cotyledons in Cucumber ‘Ludi No. 2’

BAO Lin-wen, CHEN Zhe-hao, ZHONG Dan, WANG Li-lin

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)



# 山茶花中多酚提取的方法及其抗氧化活性测定研究

邹家丽<sup>1</sup>, 邓骛远<sup>2</sup>, 和七一<sup>1</sup>, 邓可宣<sup>1</sup>, 罗通<sup>2</sup>, 余晓东<sup>1</sup>

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 401331;

2. 宜宾学院 生物研究所, 四川 宜宾 644000)

**摘要:**以山茶花为试材, 采用有机溶剂法和大孔树脂吸附法提取茶多酚, 研究比较了 2 种提取方法的多酚得率及纯度, 测定其清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、抗超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )和总抗氧化能力, 为山茶多酚抗氧化活性物的鉴定和综合利用提供参考。结果表明:大孔树脂吸附法提取多酚(89.34%)纯度比有机溶剂提取多酚(72.28%)纯度高。以大孔树脂吸附法提取的茶多酚做抗氧化活性试验表明, 茶多酚对 DPPH 的最大清除率达到 92.86%, 对  $\cdot\text{OH}$  的最大清除率为 90.77%, 对  $\text{O}_2^-$  的最大清除率仅为 47.79%, 0.5 mg/mL 茶多酚的总抗氧化能力为 17.35 U/mg。

**关键词:**山茶花;多酚;提取;抗氧化

**中图分类号:**Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0103-05

山茶花(*Camellia japonica*)是山茶科山茶属植物的通称, 为常绿灌木或小乔木, 在中国西南地区广泛种植, 常用于城市景观绿化供人们观赏, 但对其综合开发利用还有所欠缺。山茶花与传统的茶同属一个科, 而从绿茶、红茶、乌龙茶等茶叶中提取茶多酚已有较多研究<sup>[1-6]</sup>, 研究表明茶花中也富含多酚<sup>[7]</sup>。植物多酚是指分子结构中含有若干酚性羟基的活性成分, 包括黄酮类、单宁类、酚酸类以及花色苷类等。作为植物体内一种重要的次级代谢产物, 其主要存在于皮、根、叶、花和果实中<sup>[8-15]</sup>。多酚对微生物具有广谱抗性, 能有效抑制革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌的生长<sup>[16-23]</sup>。同时, 多酚可以抑制恶性细胞的增殖<sup>[24-29]</sup>, 有效降低诱变剂的致癌作用<sup>[30]</sup>, 抑制相关肿瘤基因的表达<sup>[31]</sup>。且多酚具有抗氧化的作用<sup>[10-12, 20, 32, 33]</sup>。以其酚羟基作为氢供体, 与多种活性氧作用, 可将高活性物质还原成较稳定的物质,

减少氧自由基的产生<sup>[23]</sup>;多酚还能抑制氧化酶活性, 激活抗氧化酶体系<sup>[34]</sup>。最新研究表明, 绿茶多酚能清除体内的 NO 和活性氧(ROS)自由基, 从而达到预防和治疗帕金森病的目的<sup>[35-36]</sup>。由于具有以上独特的生理功能, 多酚在油脂、食品、医药、化工等领域具有广阔的应用前景, 因此对它的提取和应用研究也越来越多。其提取方法主要有溶剂萃取法<sup>[37-38]</sup>、离子沉淀法<sup>[39-40]</sup>、柱层析分离法<sup>[39, 41]</sup>、超临界流体萃取法<sup>[42]</sup>等。体外抗氧化活性的测定方法主要有抗  $\text{O}_2^-$  的产生<sup>[43]</sup>, 总抗氧化能力的测定<sup>[44-45]</sup>, 清除自由基<sup>[44-46]</sup>, 抗油脂自动氧化<sup>[11, 22, 47]</sup>等。该试验采用有机溶剂法和大孔树脂吸附法提取山茶花中的多酚, 对 2 种方法提取所得的多酚得率及纯度进行比较。通过测定山茶花多酚清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、抗超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )和总抗氧化能力来评价其抗氧化活性, 以期为山茶花多酚抗氧化活性物的鉴定及综合利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试山茶花采自四川宜宾。采摘新鲜的山茶花用蒸馏水洗净, 冷冻干燥后粉碎, 过 18 目筛,  $-20^\circ\text{C}$  密封保存。4802S UV/VIS 分光光度计(美国 UNIC 公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵、RE-52A 旋转蒸发器(上海

**第一作者简介:**邹家丽(1987-), 女, 硕士, 现主要从事植物生物化学研究工作。E-mail: zoujiali19@163.com.

**责任作者:**余晓东(1964-), 男, 博士, 教授, 现主要从事蛋白质化学研究工作。E-mail: yxd@cqu.edu.cn.

**基金项目:**宜宾市科技计划资助项目(2011Z27); 宜宾学院科研基金资助项目(2012S13)。

**收稿日期:**2013-03-07

**Abstract:** Taking *Cucumis sativus* 'Ludi No. 2' as material, MS as basic medium, 3-day-old cotyledons cucumber as explants, the effect of different concentrations of hormones and  $\text{AgNO}_3$  combinations on buds regeneration induction were studied. The results showed that the best condition for buds induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+ABA 1.0 mg/L+ $\text{AgNO}_3$  2.0 mg/L with the regeneration rate of 76.67%, which would contribute to a refined buds regeneration system and would contribute to the further work of cucumber transgenic and a more stable and effective plants regeneration system.

**Key words:** cucumber cotyledons; hormones; regeneration buds; effect