

黄瓜离体子叶再生体系的建立

刘玉霞¹, 叶德友², 欧巧明³, 李敏权^{1,4}

(1. 甘肃农业大学 草业学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院 蔬菜研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制西北地区科学观测实验站, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省农业科学院 生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070; 4. 甘肃省农业科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以3份不同生态型黄瓜品种为试材,研究了外植体类型、激素配比和基因型对黄瓜离体再生能力的影响。结果表明:3种外植体材料形成愈伤组织的难易程度依次为子叶>下胚轴>根尖。3份不同生态型黄瓜品种均在M10(MS+1.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L AgNO₃)培养基上表现出较高的不定芽再生诱导率,欧洲温室型黄瓜品种“优秀”为最佳基因型,在M10培养基上再生频率为14.71%,平均每外植体再生芽数为2.0,S2(MS+0.1 mg/L 6-BA)培养基能明显促进不定芽的伸长,MS培养基添加0.15 mg/L IBA可以使再生植株生根。

关键词:黄瓜;离体;子叶;再生

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0113-05

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是我国重要的蔬菜作物,传统的黄瓜育种技术存在育种周期长、基因重组范围小等方面的局限性,近年来生物技术更多地被用于黄瓜遗传育种研究,高效、稳定再生体系的建立是黄瓜生物技术育种的基础。目前,国内外关于黄瓜组织培养方面的研究较多,多数研究者认为基因型对黄瓜离体再生影响显著^[1-2],外植体类型^[3]、培养基^[4]、激素配比^[5]等对黄瓜离体再生也有一定程度的影响。尽管黄瓜离体再生体系的建立已有诸多报道,但仍然存在基因型差异大、再生频率低、畸形芽多、重复性差^[6]等问题,这些问题的存在说明黄瓜再生体系尚有待于进一步优化。鉴于此,现通过不同生态型黄瓜品种离体再生体系的优化探索,研究了外植体类型、激素配比、基因型对黄瓜离体再生能力的影响,旨在建立一套高效、稳定的离体再生体系,为下一步的黄瓜转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为3份不同生态型黄瓜品种,分别为华北型黄瓜“津绿3号”、欧洲温室型黄瓜“优秀”和华南型黄瓜“白如玉”,均由甘肃省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体获取

选取籽粒饱满、大小一致的黄瓜种

籽数粒,浸泡于自来水中约2~10 h,待种皮变软后剥去种皮,用纱布包裹浸于75%的酒精中处理30 s,无菌水冲洗后浸于0.1%升汞中8~12 min,期间轻轻摇晃,最后用无菌水冲洗4~6遍。将灭好菌的种子平放接种到MS培养基上发芽,并置于(26±1)℃光照培养箱内培养,光周期为8 h黑暗/16 h光照。待无菌苗长至4~6 d时,即当子叶变绿但尚未完全展开前,在无菌条件下切取长均为3~6 mm的下胚轴和根尖,获得无菌外植体;同样的条件下,切去子叶的上半部分,并将生长点切除,四周创伤,保留子叶5 mm²左右,获得子叶无菌外植体。培养温度(26±1)℃,光周期为8 h黑暗/16 h光照。

1.2.2 愈伤组织诱导 将上述切取好的子叶(子叶块表面朝上)、下胚轴和根尖无菌外植体依次排列置于诱导愈伤组织培养基上(培养基配方见表1)。每个处理设3次重复,每次重复21个外植体。先黑暗处理24 h,后转至光下培养,温度(26±1)℃,光周期为8 h黑暗/16 h光照,每7~10 d继代1次,20 d后统计出愈率及愈伤组织发生情况。出愈率(%)=长出愈伤组织的外植体个数/接种外植体总数×100%。

表1 诱导愈伤组织培养基

Table 1		Callus inducing medium	
培养基编号	基本培养基	激素浓度及配比	
Medium code	Basic medium	The hormone combination and concentration/(mg·L ⁻¹)	
		6-BA	NAA
A1	MS	1.00	0.10
A2	MS	1.00	0.50
A3	MS	2.00	0.10
A4	MS	2.00	0.50
A5	MS	2.00	1.00

第一作者简介:刘玉霞(1990-),女,硕士研究生,研究方向为植物保护。E-mail:lyxxx90@126.com.

责任作者:叶德友(1972-),男,副研究员,现主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究工作。E-mail:ydy287@sina.com.

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(1208RJZA116)。

收稿日期:2014-05-04

1.2.3 不定芽再生与生根 将形成情况较好的愈伤组织继代转入不定芽再生培养基中(培养基配方见表3)。每个处理设3次重复,每次重复12个外植体。培养条件为温度(26±1)℃,光周期为8h黑暗/16h光照,每7~10d继代1次,30d后统计不定芽的发生情况,计算再生频率和每外植体再生芽数。再生频率(%)=分化外植体数/外植体总数×100%,每外植体再生芽数=芽数/分化外植体总数。将分化出的丛生芽切下,接种于芽伸长培养基上,培养基配方为S1(MS+0.05 mg/L 6-BA)、S2(MS+0.1 mg/L 6-BA),待7~10d后芽伸长至1.5~2.0 cm时将生长健壮的不定芽从基部切下,转接到生根培养基(MS+0.15 mg/L IBA)上培养,培养条件同上。

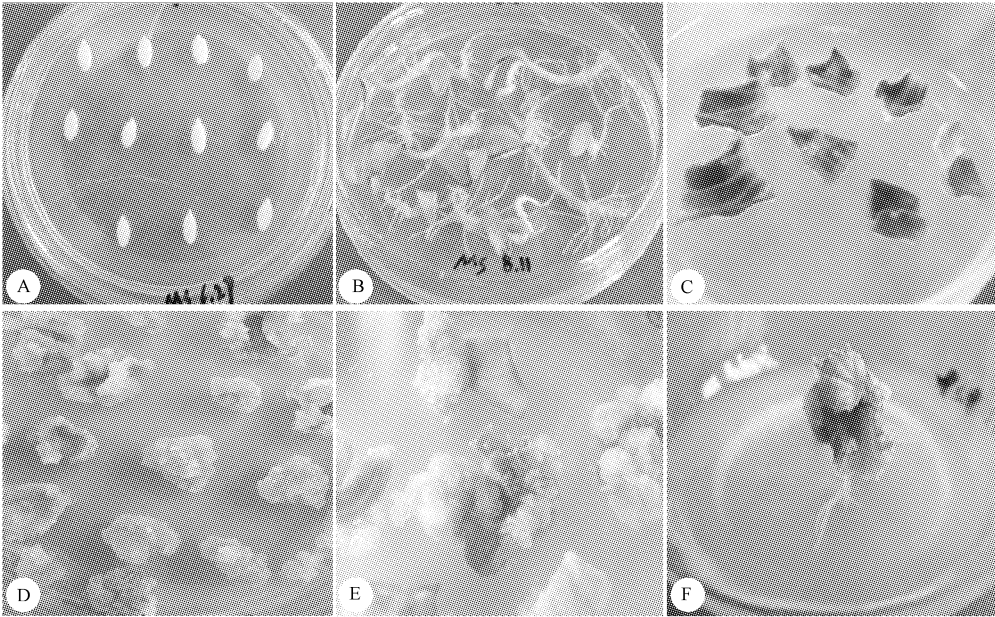
1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(ANOVA)和最小显著(P≤0.05)比较差异性,试验结果均为3次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 不同外植体形成黄瓜愈伤组织的差异

该试验采用子叶、下胚轴、根尖等黄瓜无菌外植体,愈伤组织形成情况见表2。黄瓜子叶接种1d外植体就发生明显变化,首先表现为子叶面积迅速增加至原来的1~3倍,4~5d时达到最大值;同时子叶厚度也明显增加,两端向上翘卷并逐渐形成愈伤组织,子叶及愈伤组织均表现为翠绿色-墨绿色(图1)。子叶比下胚轴较晚形成愈伤,但子叶愈伤在后期生长状态较好,而下胚轴愈伤过早老化而不发生分化。3种外植体材料从优到劣依次为子叶>下胚轴>根尖。5种培养基均能诱导愈伤组织的形成,其中以A2和A3培养基诱导子叶形成的愈伤组织呈翠绿色,有利于不定芽的分化,而A1和A4培养基愈伤组织沙化或黄白化,不易分化不定芽,A5培养基形成的愈伤组织太硬,呈墨绿色,也不易分化不定芽。



注:A. 无菌籽粒;B. 即将展开子叶的无菌苗;C. 子叶外植体;D. 愈伤组织;E. 再生不定芽;F. 再生植株。

Note: A. Sterile grain; B. Aseptic seedling will soon expansion cotyledons; C. Cotyledon explants; D. Callus; E. Regeneration of adventitious buds; F. Regenerated plants.

图1 黄瓜再生体系的建立过程
Fig. 1 The process of establish cucumber regeneration system

表2 不同外植体愈伤组织形成情况
Table 2 Different explants callus formation

外植体类型 Explant type	培养基编号 Medium code	愈伤组织描述 Callus description	出愈率 Callus induction/%
子叶 Cotyledons	A1	愈伤沙化,生长有极性,沿两端生长出翠绿色愈伤组织,尤其是靠近下胚轴的部位,多个深绿色的突起,生长速度++	100.00
	A2	生长有极性,愈伤组织翠绿色,尤其是靠近下胚轴的部位,多个深绿色的突起,生长速度++	100.00
	A3	有翠绿色愈伤组织,尤其是近下胚轴的部位,生长速度++	98.00
	A4	有鲜绿色愈伤组织,尤其是靠近下胚轴的部位,生长速度++,有黄白化愈伤产生	100.00
	A5	有墨绿色愈伤组织,生长速度+	100.00

续表 2

外植体类型	培养基编号	愈伤组织描述	出愈率
Explant type	Medium code	Callus description	Callus induction/%
下胚轴 Hypocotyl	A1	1 d 开始变粗,生长速度++++,5 d 后愈伤松散,鲜绿色,15 d 后生长变慢,呈沙化状态,顶端白化	96.89
	A2	愈伤松散,鲜绿色,生长速度++++,后几天生长变慢,呈沙化状态	91.67
	A3	愈伤松散,黄绿色,生长速度++++,愈伤黄白化	100.00
	A4	愈伤松散,黄绿色,生长速度++++,后几天生长变慢,呈沙化状态	100.00
	A5	愈伤部分较紧实,鲜绿色,生长速度++++,部分白沙化	93.33
根尖 Root tip	A1	无愈伤	0.00
	A2	愈伤色白,长势较弱,生长速度+	10.00
	A3	愈伤色白,组织松散,长势弱	65.00
	A4	无愈伤	0.00
	A5	无愈伤	0.00

注:表中“+”数愈多,表明其生长愈快,表中按绿色深浅程度排列,墨绿色>翠绿色>鲜绿色>黄绿色。

Note: The more “+” in the table, it shows the faster of the growth, in green shades order row in the table for dark green>emerald>bright green>yellow-green.

2.2 不同激素配比对黄瓜不定芽再生形成的影响

由表 3 可知,芽的再生频率随激素配比的不同而表现出差异性,其中“优秀”、“津绿 3 号”和“白如玉”均在 M10 培养基上的再生频率达到最高,分别达 14.71%、5.37%、4.20%,均显著高于其它培养基组合;其中“优秀”在培养基 M9 上的再生频率次之,为 7.84%,与 M10 培养基差异显著,其它培养基组合再生频率较低。“白

如玉”在 M1、M2、M3、M4、M7、M8、M9 和 M11 培养基中的再生频率次之,且它们之间不存在显著性差异。“津绿 3 号”在培养基 M3、M9 中的再生频率次之,分别为 3.03%、2.69%,明显高于其它培养基组合,但 M9 与 M2 和 M11 之间无显著性差异,其它培养基组合再生频率较低,且差异不显著。

表 3 3 个黄瓜品种在 20 种不定芽再生培养基上的再生频率

Table 3 The shoot regeneration frequency of 3 different cucumber varieties in 20 kinds of bud induction medium

培养基编号 Medium code	基本培养基 Basic medium	激素浓度及配比 The hormone combination and concentration /(mg·L ⁻¹)			“优秀” Shoot per Regeneration explant/个 frequency/%		“津绿 3 号” Shoot per Regeneration explant/个 frequency/%		“白如玉” Shoot per Regeneration explant/个 frequency/%	
		6-BA	NAA	AgNO ₃						
M1	MS	0.5	0	0	0	0.00 d	2	0.30 d	0	0.67 bc
M2	MS	1	0	0	5.7	1.56 cd	2	0.90 cd	3.1	1.52 bc
M3	MS	1.5	0	0	3.8	2.99 cd	2.3	3.03 b	2.4	2.73 b
M4	MS	2	0	0	2.1	0.61 d	1.5	0.60 d	2	1.21 bc
M5	MS	1.5	0.1	0	2.2	1.75 cd	1	0.30 d	1	0.30 c
M6	MS	1.5	0.2	0	0	0.00 d	0	0.00 d	1	0.30 c
M7	MS	2	0.2	0	1	0.93 d	0	0.00 d	1	0.60 bc
M8	MS	0.5	0	2	4.1	1.96 cd	1.3	0.90 cd	2.5	1.20 bc
M9	MS	1	0	2	6.4	7.84 b	3.2	2.69 bc	3.7	2.40 bc
M10	MS	1.5	0	2	2	14.71 a	3.2	5.37 a	4.1	4.20 a
M11	MS	2	0	2	1	3.92 cd	1.7	1.34 cd	1	0.60 bc
		KT	NAA	AgNO ₃						
M12	MS	1	0.1	0	1	0.46 d	1	0.30 d	0	0.00 c
M13	MS	0.2	0.2	0	0	0.00 d	1.5	0.90 cd	0	0.00 c
M14	MS	0.5	0.5	0	0	0.00 d	1	0.30 d	0	0.30 c
M15	MS	0.2	0.2	2	1	0.48 d	2.7	0.67 d	1	0.60 bc

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(α=0.05)。下同。

Note: The different lowercase letters in the same column show significant difference at 0.05 level. The same below.

2.3 不同基因型对黄瓜离体再生能力的影响

在 M10(MS+1.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L AgNO₃) 培养基中,不同基因型黄瓜子叶再生频率分析见表 4。在同一种培养基上,各基因型间存在较大的差异,“优秀”的再生能力最强,其次是“津绿 3 号”,“白如玉”最弱,三者的再生频率分别为 14.71%、5.37%、4.20%。“优秀”的再生频率显著高于“白如玉”、“津绿 3 号”,而“白如

玉”、“津绿 3 号”二者之间差异不显著。

2.4 不定芽伸长与再生植株生根

据试验观察,不定芽在 S1(MS+0.05 mg/L 6-BA) 培养基上生长较为缓慢,而在 S2(MS+0.1 mg/L 6-BA) 培养基上伸长培养较好,但随 6-BA 浓度继续增大,不定芽表现为徒长,这样不利于后期的生根。再生植株在生根培养基 MS+0.15 mg/L IBA 上,其生根率为 100%。

表 4 不同基因型黄瓜在 M10 培养基上的再生频率

Table 4 The shoot regeneration frequency of different cucumber genotypes in M10 medium

基因型 Genotype	外植体数 Number of explants/个	分化外植体数 Number of different-iated explants/个	再生频率 Regeneration frequency/%	每外植体 再生芽数 Shoot per explant/个
“优秀”	102	15.0	14.71 a	2.0
“白如玉”	333	14.0	4.20 b	4.1
“津绿 3 号”	298	16.0	5.37 b	3.2

试验发现,培养 5~10 d 左右,再生植株的茎基部切口处出现白色不定根,随着时间的延长,不定根长度增加很快,但根的数量增加缓慢。

3 讨论

在黄瓜再生体系的建立中,采用不同类型外植体研究的有很多,见于报道的有下胚轴^[7]、原生质体^[8]、叶柄^[9]、真叶^[10]、子叶^[11-12]、子叶节^[13-14]等。该研究采用子叶、下胚轴、根尖 3 种外植体,首次报道了根尖形成的愈伤组织状态,其愈伤组织呈黄白色,组织松散,长势弱,未见不定芽分化。愈伤材料最多转接 1~2 次为宜,如果转接次数太多,就会变得枯黄,停滞生长。而且转接次数愈多,培养时间愈长,黄瓜自身的 DNA 变异可能性较大,后续试验可同时对再生植株的遗传稳定性进行初步检测,以确保下一步转基因工作的顺利进行。

基因型是影响黄瓜离体再生的重要因素之一,选择合适的基因型有利于建立高效、稳定的再生体系。赵秀娟等^[15]用 10 份黄瓜材料为研究对象,发现不同基因型的黄瓜再生能力差别较大,低的不定芽再生率仅有 10%,高的可达 80%。朱其杰等^[16]对黄瓜品种“津研 4 号”和“长春密刺”的真叶、子叶、下胚轴进行组织培养,但结果只有“长春密刺”诱导出芽,且芽再生率仅为 20%。该试验中,欧洲温室型黄瓜“优秀”为最佳基因型,其再生能力最强。在侯爱菊等^[17]、Wang 等^[18]研究指出 6-BA 可以使子叶再生率达到 90%以上,而该研究中最高再生率仅有 14.71%,这可能与黄瓜基因型有关。因此,选择合适的基因型是获得黄瓜较高再生频率的重要条件。在后期的转基因工作中,应选择易再生且再生植株健壮的黄瓜品种,这样更有利于转基因工作的进行。

另外,该研究中丛生芽和畸形芽问题的出现严重影响了黄瓜的再生频率。在分化培养过程中,部分外植体产生大量丛生叶片和畸形芽,其无生长点和再生的下胚轴,无法形成完整的再生芽。刘娟旭等^[19]在辣椒上提出不定芽伸长培养时激素种类及浓度组合影响不定芽伸长为茎芽,而非停留在叶状体状态。这是否可以解决黄瓜丛生叶片问题有待进一步研究。黄莎莎等^[20]在研究

中也提出同样的问题,且提出瓶内开花的现象,该研究中未见到此现象。这可能与外植体类型或激素配比有关,尚待进一步研究探索。

参考文献

- [1] Todd C W, Robert D L. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivar and lines of *Cucumis sativus* L. [J]. Hortscience, 1981, 16(6): 759-760.
- [2] Sarmiento G G, Alpert K, Tang F A, et al. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 31(3): 185-193.
- [3] 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): 266-266.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 张若伟, 顾兴芳, 王烨. 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.
- [7] 佐腾正孝. 黄瓜下胚轴诱导分化再生体[J]. 育种学杂志, 1979, 23(3): 230-238.
- [8] 吕德扬, Cocking E C. 黄瓜子叶原生质体苗的再生[J]. 科学通报, 1984(7): 434-436.
- [9] Punja Z K, Tang F A, Sarmiento G G. Isolation, culture and plantlet regeneration from cotyledon and mesophyll protoplasts of two pickling cucumber (*C. sativus* L.) genotype [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(2): 61-64.
- [10] Burza W, Malepszy S. Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation [J]. Plant Breeding, 1995, 114(4): 341-345.
- [11] 王艳蓉, 陈丽梅, 潘俊松, 等. 黄瓜子叶高效再生体系得建立与遗传转化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2006, 24(2): 152-156.
- [12] 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.
- [13] 冯嘉羽, 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.
- [14] 黄东梅, 别蓓蓓, 潘俊松, 等. 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 离体再生和转化体系的优化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 29(2): 41-47.
- [15] 赵秀娟, 吴定华. 黄瓜的组织培养[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 125-126.
- [16] 朱其杰, 许勇, 宋鹏飞. 黄瓜的组织培养与植株再生(简报)[J]. 北京农业大学学报, 1990, 16(2): 142.
- [17] 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.
- [18] Wang J, Zhang S J, Wang X, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using a sense mitogen-activated protein kinase gene (*CsNMAPK*) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2013, 113(2): 269-277.
- [19] 刘娟旭, 余义勋, 雷建军, 等. 提高辣椒离体再生不定芽伸长率的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 93-97.
- [20] 黄莎莎, 王多佳, 李凤兰, 等. 黄瓜矮化突变体再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2011(19): 110-112.

引致桂花叶斑病的葡萄座腔菌生物学特性及药剂毒力测定

李永丽, 周 洲, 源春彦, 段佩林

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以桂花为试材,利用组织分离法分离桂花叶斑病菌,并对其进行形态特征鉴定和 rDNA-ITS 序列分析,研究了该病原菌的生物学特性及其对 9 种杀菌剂的敏感性。结果表明:该病原菌为葡萄座腔菌;光照对病原菌的生长无明显影响;菌丝生长的最适温度 20~30℃;最适 pH 6~9;最适碳源为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖;最适氮源为硝酸钾和天冬酰胺。9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌的生长均表现出抑制作用,其中苯醚甲环唑、戊唑醇和氟硅唑的毒力最强,EC₅₀ 分别为 0.6839、0.8754、1.2236 μg/mL;百菌清毒力最弱,EC₅₀ 为 57.0778 μg/mL。

关键词:葡萄座腔菌;桂花叶斑病;生物学特性;毒力

中图分类号:S 432.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0117-04

近几年,在洛阳市种植的桂花上发生一种较为严重的叶斑病,造成桂花叶片干枯脱落,树势明显衰落,严重影响其观赏价值。桂花叶斑病是一类桂花常见病害的

总称,如由链格孢属(*Alternaria*)真菌引起的桂花叶枯病^[1-4];由木樨生尾孢(*Cerospora osmanthicola* P. K. Chiet et Pai)引起的桂花褐斑病^[5];由变叶木叶点霉(*Phyllosticta ghaesembillae* Koorders)引起的桂花叶斑病^[6];由木樨生叶点霉(*P. osmanthicola* Train.)引起的桂花枯斑病^[6];由葡萄座腔菌(*B. dothidea*)引起的桂花叶斑病^[7]等。对洛阳市桂花叶斑病病原菌鉴定、生物学特性及不同杀菌剂对其抑制作用的研究,是明确该病发生规律和指导其防治的基础性工作。该研究从桂花叶斑病菌的分离鉴定入手,通过对其生物学特性的研究和 9 种杀

第一作者简介:李永丽(1978-),女,博士,讲师,研究方向为分子植物病理学。E-mail:yonglili1978@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(U1204324);河南科技大学青年基金资助项目(2011QN42);河南科技大学 SRTP 资助项目(2013256)。

收稿日期:2014-04-29

Regeneration System Establishment from Cotyledons *in vitro* of *Cucumis sativus* L.

LIU Yu-xia¹, YE De-you², OU Qiao-ming³, LI Min-quan^{1,4}

(1. Grassland College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; 2. Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Scientific Observations Experiment Station of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture in the Northwest, Lanzhou, Gansu 730070; 3. Institute of Biotechnology Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070; 4. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: Using three different ecotype cucumber varieties as experiment materials, the effect of explant types, combination of hormones in the medium and genotypes on cucumber plantlet regeneration were studied. The results showed that the ability of differentiation buds was cotyledon > hypocotyl > root. In the medium of M10 (MS + 1.5 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L AgNO₃), three different ecotype cucumber varieties were shown a higher regeneration rate of adventitious buds. Among of the three varieties, european greenhouse cucumber "Excellent" had the highest shoot regeneration frequency which reached 14.71% and 2.0 shoots per explant cultured in M10 medium. S2 (MS + 0.1 mg/L 6-BA) medium could significantly promote the elongation of adventitious buds, MS medium supplemented with 0.15 mg/L IBA also could greatly make the regeneration of plant roots.

Keywords: cucumber; *in vitro*; cotyledon; regeneration