

黄瓜高效再生体系的建立

李文璐, 姜守阳, 张楠, 成晓静, 李翔, 杨正安

(云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要:以黄瓜 20 个栽培品种的子叶、子叶节和下胚轴为试材, 进行发芽、分化和诱导分化不定芽试验, 建立最适于黄瓜品种的再生体系。结果表明: 供试的 20 个黄瓜品种中, “农家乐”、“神农春四 F1” 2 个品种的发芽情况显著优于其它品种, 发芽率分别为 66.7% 和 83.3%; 在 MS+0.5 mg/mL 6-BA 培养基中, 20 个黄瓜品种不同类型外植体的分化效率以子叶节最佳; “农家乐”、“神农春四 F1” 使用 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L AgNO₃ 培养基, 芽的增殖系数最高, 诱导率分别为 50.0%、56.3%。该试验根据不同品种的发芽率以及诱导愈伤组织和芽的分化, 建立了黄瓜快速、高频再生体系, 为进一步研究黄瓜的遗传转化和基因工程育种提供参考依据。

关键词: 黄瓜; 子叶节; 不定芽; 再生体系

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)20-0096-05

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 属葫芦科甜瓜属, 其鲜果脆嫩多汁, 营养丰富, 清香可口, 深受人们喜爱, 在蔬菜周年供应上占有重要地位, 是重要的蔬菜作物之一。但黄瓜在生长过程中极易遭受各种病虫害及不利环境的影响, 使黄瓜的产量和品质大大降低。选育优良品种是有效解决这一问题的方法。基因工程和分子生物学的飞速发展提供了新型、快速的育种平台, 可以利用基因工程创造黄瓜育种新种质, 为黄瓜育种技术的创新提供新的途径。而建立黄瓜高效再生体系是基因工程研究的基础和前提。

近年来, 黄瓜离体器官培养应用越来越广泛, 至今人们已对黄瓜子叶、真叶、下胚轴、胚根等进行了植株再生体系的研究^[1-10], 由于黄瓜体细胞离体培养相对较为困难, 黄瓜组织培养具有很强的基因型特异性, 并且各研究者的研究报告不尽相同^[1-14], 基因型、激素种类及配比、外植体类型、苗龄、添加 AgNO₃ 等被认为是影响黄瓜离体体细胞再生的关键因素。激素对黄瓜的再生有很大的影响, 据报道, IBA(吲哚丁酸)、IAA(吲哚乙酸)、6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)、KT(激动素)等多种植株激素已被应用到黄瓜再生的研究中, 在未添加激素的培养基中外植体很难再分化出不定芽或分化不定芽的频率极

小^[15-17]; 当培养基中加入激素后, 合适的激素种类和用量才能使得再生频率提高。该试验在前人研究基础上, 以 20 种黄瓜栽培品种为试材, 对不同品种、不同类型外植体及激素诱导进行了研究, 以期为进一步优化黄瓜再生体系, 促进黄瓜遗传转化技术的提高提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 20 个黄瓜品种种子由云南农业大学园林园艺学院实验室提供(表 1)。基本培养基为 MS, 含蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, pH 5.8。

表 1 黄瓜品种

序号 No.	名称 Name	产地、来源 The place of production
1	“999 密刺”	山东省新泰市, 长利种苗
2	“翠冠四号”	河北省唐山市新马蔬菜研究所
3	“春夏秋冬王”	山东省新泰市, 长利种苗
4	“李氏 2000”	山东省新泰市, 长利种苗
5	“改良李氏二十一”	山东省新泰市, 长利种苗
6	“清泰一号”黄瓜	日本, 大和农园种苗贩卖部
7	“辽研翠玉”	辽宁省辽阳市园艺科学研究所
8	“新世纪花青吊瓜”	福建厦门市金绿蔬菜种苗有限公司
9	“精选百丰”	辽宁省辽阳市园艺花卉科学研究所
10	“特选灰青大吊瓜种”	广东汕头市澄海区泰丰种子贸易商行
11	“农家乐”	天津神农种业有限责任公司
12	“玉竹黄瓜”	辽宁省鞍山市科丰种业有限公司
13	“李氏世纪王”	山东省新泰市, 长利种苗
14	“唐山绿宝”	河南新乡市华盛种业有限公司
15	“绿宝(兔子腿)”	河北省唐山市新马蔬菜研究所
16	“秋研一号”	河北省唐山市新马蔬菜研究所
17	“翠冠二号”	河北省唐山市新马蔬菜研究所
18	“翠冠三号”	河北省唐山市新马蔬菜研究所
19	“棚宝”	山东省新泰市, 长利种苗
20	“神农春四 F1”	天津神农种业有限责任公司

第一作者简介: 李文璐(1988-), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: wenlujiayou@126.com.

责任作者: 杨正安(1974-), 男, 云南建水人, 博士, 副教授, 现主要从事蔬菜生物学及生物技术等的教学与科研工作。E-mail: dyan-gza@aliyun.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972012; 31260481); 云南省自然科学基金资助项目(2011FB049)。

收稿日期: 2014-05-14

1.2 试验方法

1.2.1 不同品种发芽率的比较 挑选籽粒饱满的黄瓜种子,常温下清水浸泡 30 min,无菌水冲洗 2~3 次,无菌环境下用 75% 的酒精表面消毒 30 s,再用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液浸泡 4 min,无菌水冲洗 3~5 次,每次 1~2 min^[1]。将消毒过的种子接种于 1/2MS 固体培养基中,每瓶培养基播种 6 粒种子,3 次重复,25~28℃,2 000 lx,16 h/d 光照条件培养。1~2 d 后种子萌发,3 d 后统计品种间的发芽情况。发芽率(%)=发芽种子数/播种数×100%。

1.2.2 不同外植体分化率的比较 待子叶完全展开,取子叶呈直立状态 3~5 d 苗龄的无菌苗。分别取 5 mm² 的子叶、子叶节(子叶尚未完全脱离种壳的无菌苗,切除子叶上部的 2/3,把生长点剔除,剩余部分即为子叶节)和 2~3 mm 长的下胚轴接种于愈伤组织诱导培养基(MS+6-BA 0.5 mg/mL)中。每瓶 6 个外植体,3 次重复,15 d 继代 1 次,3 周后统计结果,分化率(%)=分化愈伤数/外植体总数×100%。

1.2.3 不定芽的诱导研究 40 d 后,将生长良好的愈伤组织转接到诱导愈伤组织分化培养基(采用 MS 基本培养基,分别添加 NAA 0.3 mg/L、6-BA 0.5 mg/L、6-BA

2.0 mg/L 和 AgNO₃ 1.0 mg/L),诱导其分化出不定芽。2 周继代 1 次,1 个月记录分化结果,不定芽分化率(%)=分化不定芽数/接种愈伤组织数×100%。

1.2.4 不同类型的外植体分化不定芽的比较 以“农家乐”、“神农春四 F1”2 个品种的愈伤组织为试材,分别转接于诱导培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L 中,比较不同类型的外植体对不定芽分化的影响。

1.3 数据分析

采用 Excel 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同品种的发芽率和分化率比较分析

将 20 个不同品种的黄瓜种子接种于 1/2MS 固体培养基上。由表 2 可知,“农家乐”、“神农春四 F1”2 个品种的黄瓜发芽率显著高于其它品种,分别为 66.7% 和 83.3%。“农家乐”、“神农春四 F1”2 个品种的子叶、子叶节和下胚轴的平均分化率均高于其它品种,分别为 63.3% 和 68.3%。且 50% 的品种显示,不同类型外植体分化率:子叶节>下胚轴>子叶,以子叶节的再生效率最佳。综合分析发芽率和愈伤组织分化率,选用“农家乐”、“神农春四 F1”2 个品种为下一步诱导不定芽分化的试材。

表 2 20 个黄瓜品种的发芽率及分化率

Table 2 Germination rate and differentiation rate of 20 cucumber cultivars

序号 No.	名称 Name	播种数 Sowing number	发芽数 Germination seeds number	发芽率 Germination rate/%	外植体类型 Explant types	外植体总数 The total number of explant	分化愈伤数 The number of callus differentiation	分化率 Differentiation rate/%	平均分化率 The average differentiation rate/%
1	“999 密刺”	18	8	44.5	子叶	20	9	45.0	60.8
					子叶节	16	10	62.5	
					下胚轴	20	15	75.0	
2	“翠冠四号”	18	10	55.6	子叶	20	8	40.0	53.3
					子叶节	20	12	60.0	
					下胚轴	20	12	60.0	
3	“春夏秋王”	18	7	38.9	子叶	20	10	50.0	54.0
					子叶节	14	8	57.1	
					下胚轴	20	11	55.0	
4	“李氏 2000”	18	10	55.6	子叶	20	7	35.0	35.0
					子叶节	20	12	60.0	
					下胚轴	20	9	45.0	
5	“改良李氏二十一”	18	6	33.3	子叶	20	8	40.0	49.4
					子叶节	12	7	58.3	
					下胚轴	20	10	50.0	
6	“清泰一号”黄瓜	18	6	33.3	子叶	20	5	25.0	38.3
					子叶节	12	6	50.0	
					下胚轴	20	8	40.0	
7	“辽研翠玉”	18	7	38.9	子叶	20	10	50.0	49.0
					子叶节	14	8	57.1	
					下胚轴	20	8	40.0	
8	“新世纪花青吊瓜”	18	8	44.5	子叶	20	7	35.0	47.1
					子叶节	16	9	56.3	
					下胚轴	20	10	50.0	
9	“精选百丰”	18	9	50.0	子叶	20	9	45.0	40.0
					子叶节	10	4	40.0	
					下胚轴	20	7	35.0	

续表 2

序号 No.	名称 Name	播种数 Sowing number	发芽数 Germination seeds number	发芽率 Germination rate/%	外植体类型 Explant types	外植体总数 The total number of explant	分化愈伤数 The number of callus differentiation	分化率 Differentiation rate/%	平均分化率 The average differentiation rate/%
10	“特选灰青大吊瓜种”	18	8	44.5	子叶	20	12	60.0	54.4
					子叶节	12	7	58.3	
					下胚轴	20	9	45.0	
11	“农家乐”	18	12	66.7	子叶	20	13	65.0	63.3
					子叶节	20	14	70.0	
					下胚轴	20	11	55.0	
12	“玉竹黄瓜”	18	7	38.9	子叶	20	8	40.0	49.8
					子叶节	14	9	64.3	
					下胚轴	20	9	45.0	
13	“李氏世纪王”	18	7	38.9	子叶	20	10	50.0	53.1
					子叶节	14	9	64.3	
					下胚轴	20	9	45.0	
14	“唐山绿宝”	18	6	33.3	子叶	20	7	35.0	40.6
					子叶节	12	5	41.7	
					下胚轴	20	9	45.0	
15	“绿宝(兔子腿)”	18	8	44.5	子叶	20	5	25.0	38.3
					子叶节	16	8	50.0	
					下胚轴	20	8	40.0	
16	“秋研一号”	18	7	38.9	子叶	20	10	50.0	41.9
					子叶节	14	5	35.7	
					下胚轴	20	8	40.0	
17	“翠冠三号”	18	7	38.9	子叶	20	9	45.0	41.0
					子叶节	14	6	42.9	
					下胚轴	20	7	35.0	
18	“翠冠三号”	18	8	44.5	子叶	20	9	45.0	38.8
					子叶节	16	5	31.3	
					下胚轴	20	8	40.0	
19	“棚宝”	18	10	55.6	子叶	20	9	45.0	40.0
					子叶节	20	8	40.0	
					下胚轴	20	7	35.0	
20	“神农春四 F1”	18	15	83.3	子叶	20	13	65.0	68.3
					子叶节	20	16	80.0	
					下胚轴	20	12	60.0	

2.2 不同类型的外植体分化不定芽的比较

由表 3 可知,不同的外植体类型其不定芽分化率有很大差异。从图 1、2 可以看出,子叶节分化出的愈伤组织经诱导培养基的激素刺激后,“农家乐”和“神农春四 F1”均能形成大量丛生芽,2 个品种的分化率分别高达

50.0%和 56.3%。子叶在诱导培养基中仅能看到类似芽点的球形突起,但没有分化形成芽,下胚轴亦没有分化出芽。因此,愈伤组织诱导不定芽最适宜的外植体为子叶节。

表 3 “农家乐”、“神农春四 F1”
外植体类型对芽分化率的影响

Table 3 Effect of the kinds of explant for
bud differentiation ratio of ‘Nongjiale’ and
‘Shennongchunsi F1’ cucumber

品种 Variety	外植体 Explant	愈伤组织数 The number of callus	分化芽体数 The number of buds differentiated	分化率 Differentiation rate/%
“农家乐”	子叶	13	0	0
	子叶节	14	7	50.0
	下胚轴	11	0	0
“神农春四 F1”	子叶	13	0	0
	子叶节	16	9	56.3
	下胚轴	12	0	0

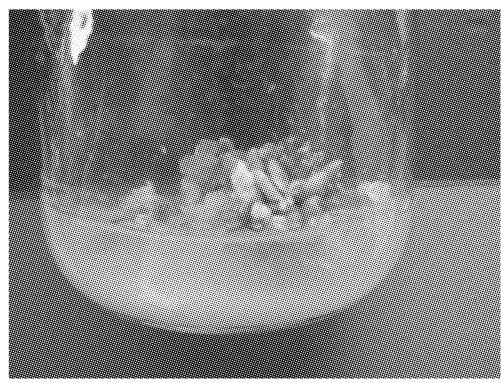


图 1 “农家乐”分化的不定芽
Fig. 1 The adventitious bud of ‘Nongjiale’ cucumber

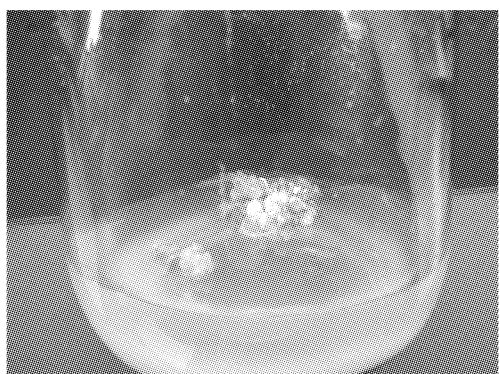


图2 “神农春四 F1”分化的不定芽

Fig. 2 The adventitious bud of ‘Shennongchunsi F1’ cucumber

3 讨论与结论

供试的 20 个黄瓜品种中,“农家乐”、“神农春四 F1”2 个品种的发芽情况显著优于其它品种,发芽率分别为 66.7%和 83.3%;该结果可能受到品种基因型、种子生活力和环境条件的影响。

该研究中不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L。在诱导培养基配方筛选过程中发现添加 1.0 mg/L AgNO₃ 时显著促进黄瓜子叶节芽的再生,不添加 AgNO₃ 只加 6-BA 时,外植体发黄变褐。曹利仙等^[18]、梅茜等^[19]在研究 AgNO₃ 对黄瓜离体子叶再生植株的试验中也发现,在培养基中添加适量的 AgNO₃ 能极显著促进芽的再生,比对照的芽诱导率高出 1 倍。已有研究表明在芸薹属作物组织培养时,发现外植体会产生大量乙烯,并抑制芽的诱导,适量 AgNO₃ 可以促进不定芽的发生。其作用机理一般认为 Ag⁺ 是乙烯合成的抑制剂,AgNO₃ 的加入使乙烯合成的量减少。但也有人认为可能是 Ag⁺ 可以竞争性的作用于乙烯的受体蛋白,从而阻止或降低乙烯的毒害作用,进而提高离体培养的不定芽诱导频率。Ag⁺ 在组织培养过程中对芽分化的影响,有待进一步的研究验证。

在分化培养试验阶段,选用分化培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L,多个品种的分化结果可以看出,不同类型的外植体的分化效率为子叶节>下胚轴>子叶,以子叶节的再生效率最高,同前人的研究结果相同^[14]。该试验从品种的准备到诱导出明显的不定芽,共需 12 周时间。由于该试验设计筛选品种较多,且激素添加的种类、配

比不同,筛选最适品种和最佳诱导培养基的过程工作量较大,该试验截止到分化出的不定芽,后续的工作还有待进一步的试验分析。

(致谢:该试验历时 3 个月左右,感谢张应华教授对试验的指导和支持。)

参考文献

- [1] 黄作喜,周钰,周玲玲,等. 黄瓜无茵苗的培养技术[J]. 内江师范学院学报,2006,21(6):61-62.
- [2] 汪祖程,何丹,徐跃进. 黄瓜子叶外植体组培成株研究[J]. 北方园艺,2008(6):187-189.
- [3] 李晓丹,司龙亭,刘志勇,等. 黄瓜组织培养中外植体的选择及播种方式[J]. 蔬菜,2004(7):30-31.
- [4] 赵军粮,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(10):39-41.
- [5] 孙兰英,卢淑雯. 黄瓜组织培养研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2004(4):25-27.
- [6] 叶永亮,杜波. 黄瓜再生体系和遗传转化的建立[J]. 黑龙江农业科学,2009(5):5-6.
- [7] 王艳蓉,陈丽梅,潘俊松,等. 黄瓜子叶高效再生体系的建立与遗传转化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(2):152-156.
- [8] 崔波,梁芳,程喜梅,等. 黄瓜子叶节离体再生体系的建立[J]. 河南科学,2008,26(3):288-290.
- [9] 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.
- [10] 韩欣,张卫华,曹齐卫,等. 黄瓜子叶节再生体系的建立[J]. 吉林蔬菜,2009(2):86-87.
- [11] 张文珠,魏爱民,杜胜利,等. 黄瓜农杆菌介导法与花粉管通道法转基因技术[J]. 西北农业学报,2009,18(1):217-220.
- [12] 张卫华,朱妍妍,王志峰,等. 三个不同基因型黄瓜再生体系的优化研究[J]. 山东农业科学,2007(6):5-7.
- [13] 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.
- [14] 刘冰,林毓娥. 黄瓜再生体系和除草剂抗性筛选体系的建立[J]. 中国瓜菜,2012,25(3):37-39.
- [15] Li L, Deng X W. It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(6): 266-268.
- [16] Joshua M G, Wang Z Y. Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10: 436-441.
- [17] 欧阳波,李汉霞. 番茄下胚轴转化获得转基因植株[J]. 华中农业大学学报,2002,21(3):206-209.
- [18] 曹利仙,赵鹏,唐宁力,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,2001,36(2):168-171.
- [19] 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.
- [20] 赵泓,刘凡,姚磊,等. 简单快捷建立高频黄瓜子叶离体再生体系[J]. 生物技术,2000,10(2):9-11.

Establishment of the Efficient Regeneration System of Cucumber

LI Wen-lu, JIANG Shou-yang, ZHANG Nan, CHENG Xiao-jing, LI Xiang, YANG Zheng-an, ZHANG Ying-hua

(College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Zalerion varium 接种对蓝莓扦插苗生根及生长的影响

刘凤红¹, 程显好², 顾亮³

(1. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 鲁东大学 农学院, 山东省食用菌技术重点实验室, 山东 烟台 264025;

3. 烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 264025)

摘要:在温室营养穴盘栽培条件下,以蓝莓“杜克”品种的无根扦插苗和真菌 *Zalerion varium* 液体培养物为试材,采用3种接种方法(基部接种、浸泡接种和喷雾接种),研究了不同接种方法处理下接种真菌 *Zalerion varium* 和未接种之间“杜克”蓝莓扦插苗的根系菌根侵染率、地上部分鲜重、根系总长、根表面积、叶绿素荧光参数等特征的差异。结果表明:采用3种接种方法, *Zalerion varium* 均可不同程度地定殖与侵染蓝莓扦插苗的根系;接种 *Zalerion varium* 真菌显著促进宿主蓝莓扦插苗的生根和生长,与未接种对照相比,接种“杜克”蓝莓扦插苗的地上部分鲜重、根系总长和根系表面积以及叶绿素荧光参数 Fv/Fo 和 Fv/Fm 均显著提高;接种 *Zalerion varium* 真菌后,可显著促进蓝莓扦插苗的生根和生长,但3种接种方法有显著差异,其中基部接种和浸泡接种2种方法比喷雾接种方法更为有效。

关键词: *Zalerion varium*; 接种方法; “杜克”蓝莓扦插苗; 生根; 生长

中图分类号: S 663. 915 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)20-0100-05

蓝莓属杜鹃花科越桔属(*Vaccinium*)多年生灌木类小浆果果树,学名越桔^[1]。其果实为蓝色或红色,因其具有极高的营养价值和医疗保健作用,近年来种植面积迅速扩大^[2],特别是北高丛越桔中的“杜克”品种因其果实大、口感好、鲜食保质期长等优点而深受市场和种植户的青睐^[3]。由于蓝莓苗木繁育条件要求苛刻,离体培

养和快速繁殖技术因其复杂的程序很难在一般种植户中推广,只能由专业育苗机构通过繁杂的育苗技术得到,这一特点造成了成品苗价格昂贵的现状,限制了蓝莓行业的发展。

菌根是植物和微生物所建立的互惠共同体,是生物界最重要、最广泛的一类共生现象,在对协调生态系统中各生物之间的物质交换、能量流动、信息传递等方面具有深远的经济、社会和生态意义^[4]。野生蓝莓能与欧石楠菌根真菌(Ericoid mycorrhizas, ERM)和深色有隔内生真菌(Dark septate endophytes, DSE)形成共生关系^[5]。大量的研究证实,ERM可以产生将土壤中的有机质分解为氨基酸和氨基糖的酶,这些小分子物质为蓝莓的正常生长提供充足的营养^[6]。Scagel等^[7]通过对蓝莓扦插苗接种菌根真菌,提高了根系菌根侵染率,为菌根真菌

第一作者简介:刘凤红(1987-),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为微生物资源与开发。E-mail:lfh, happy. liu@163. com.

责任作者:程显好(1966-),男,山东平度人,教授,硕士生导师,现主要从事菌物资源与开发等研究工作。E-mail:chengxianhao@sohu. com.

基金项目:山东省科技发展计划资助项目(ZR2012GSF12110);山东省科技发展计划资助项目(2012YD11009)。

收稿日期:2014-06-10

Abstract: Taking cotyledons, cotyledon node and hypocotyl of 20 kinds of cucumber cultivated cultivars as material, the germination rate, callus and induced differentiation of adventitious buds were tested, the most suitable for cucumber varieties of regeneration system was established. The results showed that the highest germination rate were 66.7% and 83.3% for ‘Nongjiale’ and ‘Shennongchunsi F1’ cucumber; the cotyledon node germination rate was the best in the medium of MS+0.5 mg/mL 6-BA for different type explants; ‘Nongjiale’ and ‘Shennongchunsi F1’ cucumber in the medium of MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L AgNO₃ got the highest bud value-added factor and the induction rate were 50.0% and 56.3%. According to the germination rate, callus induction and bud differentiation in different varieties, the fast and high frequency regeneration system in cucumber was established. The study would provide the technological basis for the gene engineering of cucumber.

Keywords: cucumber; cotyledon node; adventitious buds; regeneration system