DOI:10.11937/bfyy.201611025

两种基因型黄瓜愈伤组织的诱导

都彦伶,赵新涛,宿　烽

(青岛科技大学 化工学院,山东 青岛 266042)

摘　要:以2个黄瓜品种"金谷六号"和"吉列168"的种子为试材,以子叶和下胚轴作为外植体进行离体培养,研究了不同培养基和激素浓度及配比对黄瓜愈伤组织诱导、不定芽分化的影响。结果表明:2种不同基因型的黄瓜均表现出较强的愈伤组织分化能力,下胚轴要优于子叶,不同激素配比组合对愈伤组织的形态影响较大,$AgNO_3$ 能有效抑制愈伤组织的玻璃化。2种黄瓜以子叶为外植体的最佳激素配比均为 MS+0.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$;2种黄瓜以下胚轴为外植体的最佳激素配比均为 MS+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$。该试验条件下不定芽的分化没有形成。

关键词:黄瓜;子叶;下胚轴;愈伤组织;组织培养

中图分类号:S 642.203.6　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2016)11－0096－04

黄瓜又名胡瓜、青瓜,在中国各地普遍栽培,喜温暖,不耐寒冷,为主要的温室作物之一。因其营养丰富,清爽可口,果肉脆甜多汁,具有美白润肤等功效,深受人们喜爱。黄瓜已然发展成为众多栽培品种之一,其栽培面积仅次于番茄[1]。但是黄瓜在生产上病害发生严重且优质黄瓜种苗繁育周期长,因此,植物组织培养技术的应用就显得尤为重要。为了降低引进国外优良品种的成本,进而减少农业生产成本,利用外植体诱导愈伤组织成为植物再生体系建立的关键。目前,肖小君等[2]、秦华伟等[3]、钟惠丽等[4]通过黄瓜愈伤组织培养获得了不同品种黄瓜的体外再生体系。黄瓜愈伤组织的诱导培养有助于研究黄瓜的生长发育、分化机制、遗传变异以及品种改良,并且可以为未来利用愈伤组织分析黄瓜的基因组成、筛选优良基因及基因工程操作等奠定基础[5]。

植物组织培养技术又称为植物克隆技术,是依据植物细胞具有全能性的原理,即任何一个细胞均携带着一套发育成完整植株的全部遗传信息,进行离体培养,可以表达并发育成一个与母体同样的植株[6]。理论上,植物体各部位细胞均具有全能性再生植株,但实际上,不同器官、不同品种分化能力是有差别的[6]。因此,外植体的选择成为影响组培成功与否的重要选择[7]。

植物生长调节剂在培养基中的用量虽然微小,但是发挥的作用却是巨大的[8]。离体植物细胞在开始往往缺乏合成生长素跟细胞分裂素的能力,因此在培养基中需要添加不同浓度不同种类的外源激素诱导形态的发生[9]。

玻璃化、污染和褐化是植物组织培养中的三大难题。玻璃化是指培养过程中组织呈半透明状,组织结构发育畸形,又叫"过度水化"。BLEECKER 等[10]认为 $AgNO_3$ 作为一种乙烯活性抑制剂,能够有效地抑制生物体内乙烯的合成而促进器官跟体细胞胚胎发生,其作用主要表现为抑制愈伤组织形成,增加外植体产生不定芽的数量及提高植株再生率。梅茜等[11]研究认为在培养基中添加 2.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$ 可以促进黄瓜不定芽的再生,比对照组的芽诱导率高出1倍。金宝燕等[12]研究表明,培养基中添加 2.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$ 可以促进黄瓜不定芽的再生。赖来等[13]用黄瓜子叶节作外植体,通过添加 2.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$ 促进再生芽的诱导。韩欣等[14]也认为 $AgNO_3$ 浓度为 2.0 mg·L^{-1} 时是提高黄瓜不定芽分化率的最适浓度。

现以"金谷六号"与"吉列168"2个品种的黄瓜种子为试材,以子叶和下胚轴为外植体,选择外源激素 IAA 和 6-BA 对愈伤组织进行诱导,并对其条件进行了筛选,以期为黄瓜再生体系的建立提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试的"金谷六号""吉列168"黄瓜种子均购自山东

第一作者简介:都彦伶(1990-),女,硕士研究生,研究方向为细胞生物学。E-mail:1220662893@qq.com.

责任作者:宿烽(1965-),女,博士,副教授,研究方向为细胞生物学。E-mail:qdkdsufeng@hotmail.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2012EEL18);山东省高等学校科技计划资助项目(J15LA11)。

收稿日期:2015－12－16

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

省寿光市利源种业有限公司。

供试种子萌发培养基为1/2MS培养基,即在MS培养基的基础上,大量元素减半,其它成分不变。用于诱导愈伤及不定芽的培养基是以MS为基本培养基,添加不同浓度的IAA、6-BA。以上培养基均含3%蔗糖、0.7%琼脂,调整pH 5.8～6.2。

供试植物生长激素为吲哚乙酸、6-苄基氨基嘌呤,另外添加一定浓度的$AgNO_3$调节剂。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的消毒 选取籽粒饱满、大小一致的种子,先用清水浸泡5～6 h,待完全吸涨后去除种皮,然后用75%的酒精消毒30～60 s,无菌水冲洗3次,再用NaClO溶液消毒10～15 min,无菌水冲洗4～5次,最后将种子用无菌滤纸吸干。

1.2.2 无菌苗的获取 将吸干后的种子接种于1/2MS培养基上暗箱培养,待大多数种子发芽露白,将其放置于温度为26～28 ℃、光强度1 800 lx、光照处理16 h、黑暗处理8 h的培养箱中培养。6～8 d后获得无菌苗。

1.2.3 愈伤组织的诱导与不定芽的分化 取6～8 d的无菌苗,以子叶跟下胚轴为外植体,将子叶切成大约0.5 cm×0.5 cm的小块,叶背向下接种于不同浓度、不同配比的诱导愈伤组织分化的培养基中;将下胚轴切成约1 cm的小段,同上述方法接种。将这些外植体先进行暗箱培养,以诱导愈伤组织的发生,然后进行光照培养以诱导不定芽的发生。期间每隔10 d左右继代1次,观察并统计发芽率、愈伤组织诱导率、不定芽诱导率[15-16]。发芽率(%)=(发芽种子总数/接种种子总数)×100;愈伤组织诱导率(%)=(诱导愈伤组织总数/接种外植体总数)×100;不定芽诱导率(%)=(分化出不定芽外植体总数/接种外植体总数)×100。

1.3 数据分析

采用Microsoft Excel进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 消毒剂种类、浓度及消毒时间对种子萌发的影响

植物消毒剂最常用的有2种:$HgCl_2$溶液和NaClO溶液。不同消毒剂消毒效果不同,对种子萌发的影响也不同。课题组通过预试验确定了最佳消毒剂的种类、消毒浓度以及时间范围。由表1可知,"金谷六号"和"吉列168"在0.1% $HgCl_2$中消毒3 min效果最好,但其相对应的种子发芽率与在NaClO中消毒后相比较低,其原因可能是毒性较大,在杀死微生物的同时对种子的伤害也较大,导致了种子萌发率很低。用NaClO消毒时,"金谷六号"和"吉列168"种子发芽率随消毒时间延长呈先增加后减少的变化,可能是由于种子在NaClO溶液中浸泡过长时间导致裸露的种子分成两半泡坏胚芽,影响种子正常的发芽生长。最后"金谷六号"和"吉列168"在10% NaClO中消毒15 min达到最佳发芽率。

表1 消毒剂种类、浓度及消毒时间对种子萌发的影响

Table 1 Effect of sort of disinfectants, concentration and disinfectant time on seed germination

处理 Treatment	品种 Varieties	消毒剂 Disinfectant	浓度 Concentration /%	消毒时间 Disinfectant time/min	污染率 Contamination rate/%	发芽率 Germination rate/%
1	"金谷六号"	$HgCl_2$	0.1	3	5	65
2	"金谷六号"	$HgCl_2$	0.1	5	8	35
3	"吉列168"	$HgCl_2$	0.1	3	3	73
4	"吉列168"	$HgCl_2$	0.1	5	6	55
5	"金谷六号"	NaClO	10	10	17	79
6	"金谷六号"	NaClO	10	15	16	84
7	"金谷六号"	NaClO	10	20	14	67
8	"金谷六号"	NaClO	20	10	15	70
9	"金谷六号"	NaClO	20	15	15	81
10	"金谷六号"	NaClO	20	20	12	56
11	"吉列168"	NaClO	10	10	13	73
12	"吉列168"	NaClO	10	15	18	80
13	"吉列168"	NaClO	10	20	18	71
14	"吉列168"	NaClO	20	10	9	62
15	"吉列168"	NaClO	20	15	16	77
16	"吉列168"	NaClO	20	20	10	71

2.2 不同激素浓度及配比对愈伤组织诱导的影响

由表2可知,2个品种黄瓜的外植体在不同激素浓度及配比的条件下都能分化出愈伤组织,且愈伤组织的诱导率均为100%,说明2种黄瓜的外植体均具有很强的脱分化能力。就外植体的出愈时间来看,下胚轴要优于子叶。并且外植体的出愈时间及出愈率对6-BA、IAA和$AgNO_3$的要求没那么严格。

在诱导过程中,当6-BA浓度为0.5 mg·L^{-1}时愈伤组织有玻璃态形成(图1),经转板再分化后此现象愈发明显,为避免以后影响不定芽的形成,加入促进剂$AgNO_3$,玻璃态现象消失,外植体颜色呈现绿色。

外植体不同,所形成的愈伤组织的形态结构和色泽也不同,表现为紧密型和松散型[17]。由子叶所产生的愈伤组织为紧密型,子叶愈伤组织的发生首先从叶片边缘开始膨大然后向外翻卷成卷曲霉状(图3);完全长成愈伤组织时,愈伤组织成瘤状且结构紧密(图4)。由下胚轴所产生的愈伤组织为松散型,一开始就膨大生长,愈伤组织块上出现很多小瘤状突起,稍微移动就会脱落,经转板再分化后颜色变绿,便于后期诱导芽的形成(图2)。从出愈时间和分化形态综合分析,筛选出"金谷六号"和"吉列168"子叶的最佳培养基均为MS+0.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$;下胚轴最佳培养基为MS+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 2　激素浓度及配比对“金谷六号”和“吉列 168”2 种黄瓜愈伤组织发生率的影响

Table 2　Effect of hormone concentration、hormone ratio on callus formation rates of ‘Jingu six’ and ‘Jilie 168’ cucumber

处理 Treatment	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg·L^{-1})	IAA 浓度 Concentration of IAA /(mg·L^{-1})	$AgNO_3$ 浓度 Concentration of $AgNO_3$ /(mg·L^{-1})	出愈时间(“金谷六号”/“吉列 168”)Time of callus induction(‘Jingu six’/‘Jilie 168’)/d		出愈率(“金谷六号”/“吉列 168”)Rate of callus induction(‘Jingu six’/‘Jilie 168’)/%	
				子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
1	0.5	0.05	—	9/8	8/9	100/100	100/100
2	0.5	0.10	—	6/6	5/5	100/100	100/100
3	0.5	0.20	—	10/11	8/8	100/100	100/100
4	0.5	0.05	1.0	7/9	7/7	100/100	100/100
5	0.5	0.10	1.0	6/6	7/7	100/100	100/100
6	0.5	0.20	1.0	8/11	7/11	100/100	100/100
7	0.5	—	1.0	13/8	9/9	100/100	100/100
8	0.5	—	2.0	13/15	11/11	100/100	100/100
9	2.0	0.05	—	11/10	9/9	100/100	100/100
10	2.0	0.10	—	15/15	10/10	100/100	100/100
11	2.0	0.20	—	10/10	9/9	100/100	100/100
12	2.0	0.05	1.0	8/9	9/9	100/100	100/100
13	2.0	0.10	1.0	7/6	7/7	100/100	100/100
14	2.0	0.20	1.0	7/7	9/9	100/100	100/100
15	2.0	—	1.0	13/15	9/9	100/100	100/100
16	2.0	—	2.0	13/13	11/13	100/100	100/100

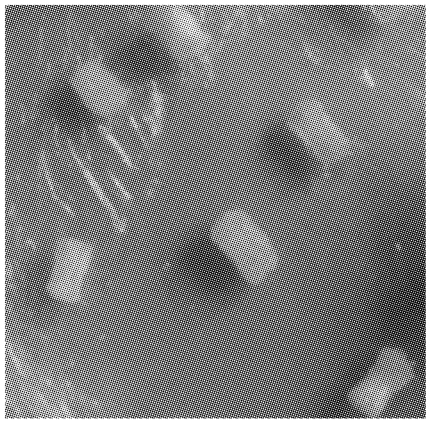

图 1　下胚轴玻璃态愈伤组织

Fig. 1　Vitreous callus of hypocotyl

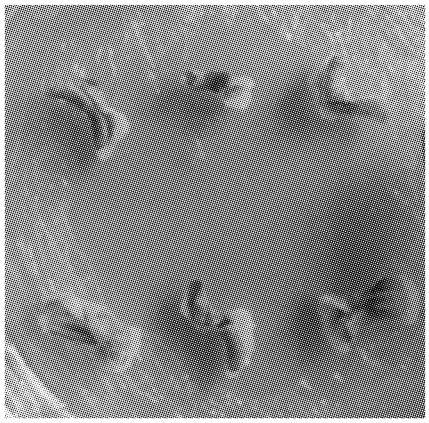

图 3　子叶愈伤组织形成前期

Fig. 3　Early stage of cotyledon callus formation

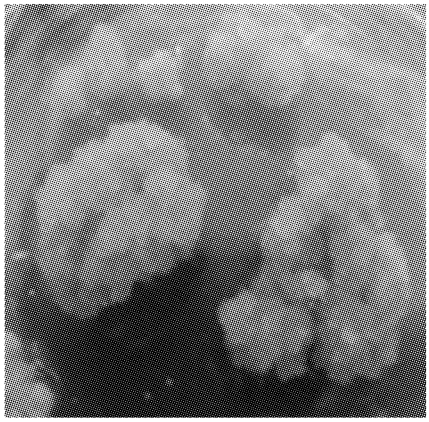

图 2　下胚轴正常态愈伤组织

Fig. 2　Normal callus of hypocotyl

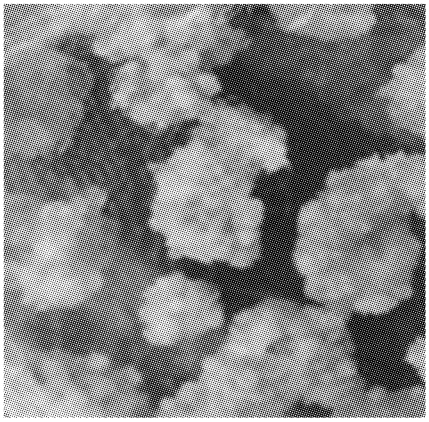

图 4　子叶诱导的愈伤组织

Fig. 4　Cotyledon callus

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.3 不同激素浓度及配比对不定芽诱导的影响

选取长势良好的愈伤组织将其转入诱导不定芽分化的培养基后没有分化出不定芽,在观察过程中发现愈伤组织块没有停止分化,但分化后的大多数组织呈现褐红色斑点并逐渐呈空心状,渐渐失去稳定的形态结构导致愈伤组织死亡。原因可能是与培养基中 $AgNO_3$ 的浓度有关,$AgNO_3$ 可以抑制乙烯的形成。据汤福胜等[18]报道,乙烯合成量与芽分化能力呈负相关。

3 结论与讨论

在植物组织培养的过程中,选择一种合适的消毒剂尤为重要。种子的污染率降低是后续工作可以顺利进行的保障。通常采用 $HgCl_2$ 和 NaClO 消毒,但是 $HgCl_2$ 的毒性比较大,抑制种子的发芽;而 NaClO 的毒性相比于 $HgCl_2$ 较小,在一定浓度下对种子发芽率的影响较小。该试验表明,采用 10%NaClO 消毒 15 min 效果较好,无菌苗的出芽率高。

IAA 和 6-BA 是植物愈伤组织和不定芽形成的常用激素,适量的促进剂 $AgNO_3$ 的加入可以有效阻止玻璃态的发生以及提高转化效率。该试验中,对"金谷六号"和"吉列 168"2 种不同基因型的黄瓜进行组织培养,结果表明,以 2 种黄瓜的子叶和下胚轴为外植体,在不同激素浓度及配比的培养基中均能分化出愈伤组织,且愈伤组织的诱导率均为 100%。当加入促进剂 $AgNO_3$ 后,外植体的玻璃态得到明显的改善,颜色呈现绿色,表现出较好的生长形态。不同外植体诱导出的愈伤组织的形态不同,子叶愈伤组织的发生首先从叶片边缘开始膨大然后向外翻卷成卷曲霉状(图 3);完全长成愈伤组织时,愈伤组织成瘤状且结构紧密(图 4)。下胚轴愈伤组织形成时,一开始就膨大生长,愈伤组织块上出现很多小瘤状突起,稍微移动就会脱落(图 2)。2 种不同基因型的黄瓜均表现出了较强的愈伤组织分化能力,从出愈时间来看,下胚轴要优于子叶。综合分析筛选出 2 种黄瓜以子叶为外植体的最佳激素配比均为 MS+0.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$;2 种黄瓜以下胚轴为外植体的最佳激素配比均为 MS+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$。

参考文献

[1] 李怀智.我国黄瓜栽培的现状及其发展趋势[J].蔬菜,2003,8(3):85-96.

[2] 肖小君,齐泽民,王辉,等.'卡其'水果黄瓜子叶节高频再生体系的研究[J].北方园艺,2011(19):113-115.

[3] 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.

[4] 钟惠丽,李玉红,陈雪琳,等.黄瓜离体器官再生体系的优化[J].中国农学通报,2015,31(10):80-86.

[5] 王蕾,朱寿进,宿烽.影响黄瓜愈伤组织诱导的因素研究[J].山东科学,2014,27(2):47-52.

[6] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2001.

[7] 袁宜如,李晓云.鹤望兰组织培养研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(28):15504-15506.

[8] 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版,2004.

[9] 崔凯荣,刑更生,周功克,等.植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节[J].遗传,2000,22(5):349-354.

[10] BLEECKER A B,KENDE H. Ethylene:a gaseous signal molecule in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology,2000(16):1-18.

[11] 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.

[12] 金宝燕,苏华,任华中.硝酸银等因素对黄瓜直接不定芽诱导的影响[J].中国蔬菜,2006(6):21-22.

[13] 赖来,潘俊松,何欢乐,等.农杆菌介导的 MADS-box 基因转化黄瓜初步研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2007,25(4):374-382.

[14] 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.

[15] 曲雪艳,周庆红.樱桃番茄的组织培养与离体快繁技术研究[J].江西农业大学学报,2006,28(6):962-964.

[16] 孙同虎,孙秀玲,薄鹏飞,等.番茄高效离体再生体系的建立[J].安徽农业科学,2006,34(24):6486-6487.

[17] 肖尊安.植物生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005:34.

[18] 汤福胜,刘愚,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.

Induction of Two Genotypes Cucumber Callus

DU Yanling,ZHAO Xintao,SU Feng

(School of Chemical Engineering,Qingdao University of Technology,Qingdao,Shandong 266042)

Abstract:Two different kinds of cucumbers,'Jingu six' and 'Gillette 168' were selected as the materials,cotyledon and hypocotyl as explants,the effect of culture medium type,hormone concentration,hormone ratio on callus induction and differentiation of adventitious bud were investigated. The results showed that both cucumbers showed the strong callus differentiation ability,and hypocotyl was superior to cotyledon;the shape of the callus was quite different under different hormone ratios. $AgNO_3$ as the additives could commendably restrain the vitrification of the callus induction; both cucumbers had the same best hormone ratio for cotyledon explant MS+0.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$ and for hypocotyl explant MS+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.10 mg·L^{-1} IAA+1.0 mg·L^{-1} $AgNO_3$. The differentiation of adventitious bud was not formed.

Keywords:cucumber;cotyledon;hypocotyl;callus;tissue culture

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn