

# 新疆甜瓜“伽师”再生体系的建立

杜 姍 姍, 李 思 怡, 王 东, 李 冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:**以厚皮甜瓜“伽师”为试材,研究了 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )对诱导不定芽的影响,建立以子叶为外植体的快速高效再生体系。选取 5 d 的“伽师”无菌苗子叶,在添加了不同浓度 6-BA 的 MSB 培养基中诱导不定芽;并且探讨了在最适 6-BA 浓度的培养基中添加不同浓度  $\text{AgNO}_3$  对诱导不定芽的影响。结果表明:甜瓜子叶外植体接种在  $\text{MSB}+1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 诱导分化培养基上,诱导率可达 75%;添加不同浓度  $\text{AgNO}_3$  诱导不定芽,以  $\text{MSB}+1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  最适,诱导率可达 65%,产生单芽较多,缩短了再生周期。丛生芽或单生不定芽转至  $\text{MSB}+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  的培养基中伸长,不定芽均可伸长且生长状况良好;再将单芽转至  $\text{MSB}+0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 培养基进行生根。

**关键词:**甜瓜;6-苄氨基嘌呤(6-BA);硝酸银( $\text{AgNO}_3$ );再生体系

**中图分类号:**S 652.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)16-0089-04

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属葫芦科甜瓜属甜瓜种一年生蔓生草本植物,不仅高产、优质,而且经济效益高,其市场销售范围也很广,甜瓜香嫩的品质也被广大消费者所接受,是世界重要的经济作物<sup>[1]</sup>。“伽师”甜瓜因其肉质厚细、香甜清脆、浓汁、皮薄无网纹、耐储存等特点,具有“中国瓜王”的称号<sup>[2]</sup>。随着植物基因工程的发展,通过转基因技术改良甜瓜品质成为新的研究热点,这为提高甜瓜品质和抗逆性开辟了更加安全可靠、快捷可行的途径。建立甜瓜高效再生体系是遗传转化的基础<sup>[3]</sup>。在甜瓜组织培养的研究中,不同基因型品种的幼嫩子叶都可以诱导出再生不定芽<sup>[4-5]</sup>,甜瓜组织培养已通过子叶<sup>[6-8]</sup>、真叶<sup>[9]</sup>、下胚轴<sup>[10]</sup>等多种外植体再生出完整的植株。黄东梅等<sup>[11]</sup>以子叶节为外植体,以 6-BA 为主要激素,  $\text{AgNO}_3$ 、ABA 辅之,优化了黄皮的再生体系。王园园等<sup>[12]</sup>使用了添加 6-BA、NAA、KT、 $\text{AgNO}_3$  和活性炭等物质的培养基,筛选出了最适分化的培养基,芽分化率可达 71%,建立了向日葵离体的高效再生体系。周音等<sup>[13]</sup>研究表明,加入  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  可以有效防止生菜玻璃苗的产生。BLEECKER 等<sup>[14]</sup>认为  $\text{AgNO}_3$  是乙烯活性抑制剂,其竞争性作用于乙烯作用部位而促

进器官和体细胞胚胎发生,抑制愈伤组织形成,提高植株再生频率。我国有丰富的甜瓜种质资源,现以“卡拉克赛伽师”瓜为试材,对影响再生的主要因素进行探讨,以期新疆甜瓜作物快速繁殖、种质资源保存和创新提供依据和技术支持,为利用生物技术培育具有抗病虫害、抗逆性等优秀农艺学性状的甜瓜及其它作物品种打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为新疆哈密瓜种业有限公司生产的“卡拉克赛伽师”甜瓜。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 种子去壳,70%的乙醇消毒 30 s, 2%次氯酸钠表面灭菌 8~10 min,无菌水冲洗 5~6 遍,用无菌滤纸吸干,种子于不含任何激素的 MS 培养基上,置于温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 3 000 lx、光周期 16 h/8h 的培养箱中。选取 5 d 的无菌苗。

1.2.2 诱导不定芽 诱导不定芽选用的激素为 6-BA。选取 5 d 的无菌苗切下 2 片子叶,去掉基部和端部部分子叶,再将剩下的中间部分横切一分为二,作为外植体(图 1A)。叶面向上,叶背向培养基,分别接种于  $\text{MSB}+(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1})$  6-BA 激素组合的培养基中,共 6 个处理,每个三角瓶接种 4 块外植体,每个处理 5 个三角瓶,定期观察外植体,28 d 后统计愈伤组织诱导率与不定芽诱导率。

1.2.3  $\text{AgNO}_3$  对不定芽诱导的影响 子叶外植体接种

**第一作者简介:**杜姍姍(1991-),女,硕士研究生,研究方向为植物学。E-mail:915037756@qq.com.

**责任作者:**李冠(1949-),男,教授,博士生导师,研究方向为植物生理生化与分子生物学。E-mail:guanli@xju.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31260258)。

**收稿日期:**2016-04-18

于  $MSB+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+(0,1.0,1.5,2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1})\text{ AgNO}_3$  中,共 4 个处理,每个三角瓶接种 4 块外植体,每个处理 5 个三角瓶,28 d 统计愈伤诱导率与不定芽诱导率。

1.2.4 不定芽伸长 不定芽伸长选用的激素为 6-BA 和  $GA_3$ ,将分化出的不定芽切下,连带一些愈伤组织,转移至  $MSB+0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ GA}_3$  的不定芽伸长培养基上,7 d 后切下单芽继代 1 次,14 d 后观察有效苗的获得情况。

1.2.5 不定芽生根 选用的激素为 NAA,当芽伸长至 3 cm 左右时,选取健壮整齐的无根苗,用解剖刀自基部切下,转至  $MSB+0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$  的生根培养基中,14 d 观察获得有效生根苗的获得情况。

1.2.6 再生植株的驯化及移栽 不定根达到一定数量和长度后,将封口膜取掉加入 30~50 mL 液体 MS 培养基,3 d 后添加少量的自来水,2 d 后将再生苗移栽入高温灭菌的珍珠岩和泥土混合的育苗钵中,用剪开口的矿

泉水瓶罩住,放置到无虫的温室里培养。

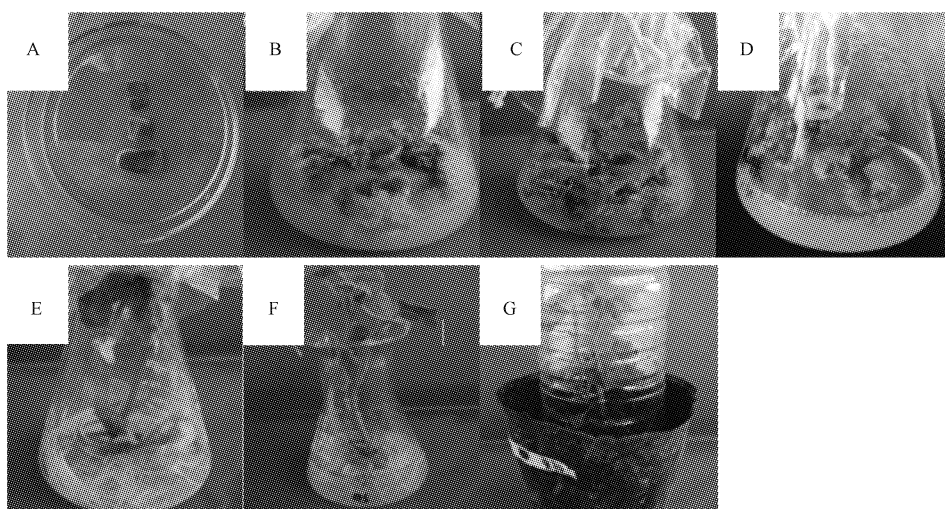
### 1.3 项目测定

愈伤组织诱导率(%)=(愈伤组织数量/植体总数量) $\times 100$ ;不定芽诱导率(%)=(诱导出芽的外植体数量/外植体总数量) $\times 100$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 6-BA 对不定芽诱导的影响

子叶外植体接种后 10 d 左右,切口处形成的愈伤组织开始产生绿色的小突起或是小芽,20 d 左右长成丛生芽(图 1B)。从表 1 可知,培养基中添加不同浓度的 6-BA,不定芽分化率不同,以  $MSB+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$  培养基丛生芽诱导率最高,不定芽诱导率可达 75%,而不添加任何激素的 MSB 培养基中的外植体轻微的膨大,无愈伤组织和不定芽的形成。添加  $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$  培养基中的外植体玻璃化现象严重,产生的不定芽数量也不多,愈伤组织较多且质软疏松。



注:A.子叶外植体;B.外植体诱导 20 d 左右后分化出丛生芽;C.添加  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AgNO}_3+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$  培养基中分化出的单芽;D.不定芽的伸长;E.不定芽的生根;F.再生植株的驯化;G.再生植株移栽至花土中。

Note:A. Cotyledon explants; B. Explants were induced to differentiate into cluster buds after 20 days; C. Explants were cultured in media with  $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AgNO}_3$  and differentiated single adventitious buds; D. The elongation of adventitious buds; E. The rooting of adventitious buds; F. Domestication of regenerated plants; G. Regenerated plants transferred to field.

图 1 甜瓜“伽师”子叶再生过程

Fig.1 Regenerative process of cotyledon of *Cucumis melo* L. cv. 'Jiashi'

表 1

6-BA 对甜瓜品种“伽师”子叶不定芽诱导的影响

Table 1

Effect of 6-BA on inducing adventitious buds of melon cultural 'Jiashi'

| 6-BA 6-Benzylaminopurine/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 外植体数 Number of explants/个 | 愈伤组织数 Number of callus/个 | 出芽数量 Number of shoots/个 | 愈伤组织诱导率 Rate of inducing callus/% | 不定芽诱导率 Rate of inducing buds/% |
|--|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 0.0  | 12                        | 0                        | 0                       | 0                                 | 0                              |
| 0.5  | 20                        | 16                       | 6                       | 80                                | 30                             |
| 1.0  | 20                        | 20                       | 12                      | 100                               | 60                             |
| 1.5  | 20                        | 20                       | 15                      | 100                               | 75                             |
| 2.0  | 20                        | 20                       | 14                      | 100                               | 70                             |
| 5.0  | 12                        | 12                       | 4                       | 100                               | 33                             |

## 2.2 AgNO<sub>3</sub> 对不定芽诱导的影响

从表 2 可以看出,在最适浓度细胞分裂素 6-BA 的培养基中添加 AgNO<sub>3</sub> 对不定芽的诱导与分化会有一定的影响,添加 AgNO<sub>3</sub> 与没有添加 AgNO<sub>3</sub> 培养基中的外植体分化情况比较,玻璃化现象明显减少,而诱导分化出的不定芽多为单芽(图 1C),而不添加 AgNO<sub>3</sub> 培养基中的外植体分化出的不定芽多为丛芽,相比之下,添加适当 AgNO<sub>3</sub> 可以省去再伸长这一步,明显缩短再生周期。

## 2.3 不定芽的伸长和生根

外植体上诱导出的丛芽或单芽长至 0.5 cm 左右后,将其切下接种到伸长培养基上(图 1D),若是丛芽,伸长培养 7 d 后,要将其切成单芽,再次伸长,14 d 后观察伸长情况;若是单芽,就不用二次伸长。在切诱导不定芽时,要留一些愈伤组织。待苗长至 2 cm 时,将其从基部切下,转接到生根培养基上诱导生根。7 d 左右就可以看到细嫩的根,14 d 后根系发达且粗长,数量多,叶片浓绿(图 1E),易移栽成活。

表 2 不同质量浓度 AgNO<sub>3</sub> 对不定芽诱导与分化的影响

Table 2 Effect of different mass concentration of AgNO<sub>3</sub> on induction and differentiation of adventitious buds

| AgNO <sub>3</sub><br>(mg · L <sup>-1</sup> ) | 外植体数<br>Number of<br>explants<br>/个 | 愈伤组织数<br>Number<br>of callus<br>/个 | 出芽数量<br>Number<br>of shoots<br>/个 | 愈伤组织诱导率<br>Rate of inducing<br>callus<br>/% | 不定芽诱导率<br>Rate of<br>inducing buds<br>/% |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| 0.0  | 20                                  | 20                                 | 15                                | 100   | 75                                       |
| 1.0  | 20                                  | 20                                 | 8                                 | 100   | 40                                       |
| 1.5  | 20                                  | 20                                 | 8                                 | 100   | 40                                       |
| 2.0  | 20                                  | 20                                 | 13                                | 100   | 65                                       |

## 2.4 练苗及移栽

选取不定根达到一定数量和长度的再生苗,取开透气封口膜,加入灭菌 MS 液体培养基,3 d 后加入少量的自来水(图 1F),2 d 后移栽入高温灭菌的珍珠岩和泥土混合的育苗钵中,用剪开口的矿泉水瓶子罩住三角瓶(图 1G),放置于无虫的温室里培养。

## 3 讨论与结论

甜瓜离体组织培养中,不定芽的分化率与植物的基因型、外植体类型及生长调节剂配比等因素有关。甜瓜再生分化的关键激素为 6-BA。该试验诱导不定芽最适 6-BA 的质量浓度为 1.5 mg · L<sup>-1</sup>。这与钟俐等<sup>[15]</sup>的研究结果不一致。添加 5.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基,外植体有严重的玻璃化现象且不定芽诱导率很低,而添加 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基,分化出的不定芽多为丛生芽或变态芽,丛生芽要经过再伸长变成单芽,这样会增加再生时间。

AgNO<sub>3</sub> 对植物形态发生具有促进作用,其作用机

理尚不清楚,可能是在培养容器中,离体植物组织或细胞会产生乙烯并积累,而乙烯的积累会影响培养物的分化生长。Ag<sup>+</sup> 是一种较好的乙烯抑制剂,添加不同 AgNO<sub>3</sub> 对分化的影响各有不同,与培养基中没有添加 AgNO<sub>3</sub> 的外植体相比,分化率明显降低了,其中培养基中添加 2.0 mg · L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 的外植体不定芽的分化率最高,产生单芽的数量也最多。根据付秋实等<sup>[16]</sup>研究表明,厚皮甜瓜获得完整再生植株需要 60~75 d,该试验中的厚皮甜瓜“伽师”获得完整再生植株只需 52 d 即可,甚至更少,大大缩短了厚皮甜瓜的离体再生周期。

## 参考文献

- [1] 张铁刚,宁雪飞,王贤磊,等. 新疆甜瓜“皇后”再生体系的建立[J]. 北方园艺,2012(15):122-125.
- [2] 中国农业科学院郑州果树研究所. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京:中国农业出版社,2001:531-532.
- [3] 侯丽霞,何启伟,卜丽霞,等. 甜瓜组织培养及遗传转化研究进展[J]. 中国瓜菜,2007(4):25-28.
- [4] 贾卓男,齐红岩,谢晓雪. 网纹甜瓜离体再生体系的研究[J]. 沈阳农业大学学报,2008(3):354-357.
- [5] REN Y, BANG H, CURTIS I S, et al. Agrobacterium-mediated transformation and shoot regeneration in elite breeding lines of western shipper cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo* L.)[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 108(1):147-158.
- [6] YADAV R C, SALEH M T, GRUMET R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 45(3):207-214.
- [7] AKASAKA-KENNEDY Y, TOMITA K O, EZURA H. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. Plant Science, 2004, 166(3):763-769.
- [8] REN Y, BANG H, GOULD J, et al. Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus)[J]. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2013, 49(2):223-229.
- [9] 冯凤娟,梁东,马锋旺,等. 甜瓜叶片高效再生体系的建立[J]. 西北农业学报,2008,17(5):321-324.
- [10] CURUK S, ANANTHAKRISHNAN G, SINGER S, et al. Regeneration in vitro from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light[J]. Hortscience a Publication of the American Society for Horticultural Science, 2003, 38(1):105-109.
- [11] 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),2012,30(2):41-47.
- [12] 王园园,李彩凤,张翼飞,等. 向日葵离体再生体系的建立[J]. 生物工程学报,2011,27(9):1379-1389.
- [13] 周音,张智奇,张建军,等. 生菜遗传转化过程中克服玻璃苗的研究[J]. 吉林农业大学学报,2000,22(2):62-64.
- [14] BLEECKER A, KENDE H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000, 16(1):1-18.
- [15] 钟俐,钟铃. 新疆优质甜瓜高效离体再生体系的建立[J]. 新疆农业大学学报,2002(1):31-34.
- [16] 付秋实,谭明明,王烨,等. 不同甜瓜品种再生体系的比较研究[J]. 中国瓜菜,2015,28(2):5-8.



DOI:10.11937/bfyy.201616025

# 黄瓜棒孢叶斑病菌的毒力分化及 AFLP 分析

张艳菊<sup>1</sup>, 刘奇<sup>1</sup>, 刘东<sup>1</sup>, 秦智伟<sup>2</sup>, 周秀艳<sup>1</sup>, 刘大伟<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**以 6 个黄瓜品种(系)为试材,以来自山东、辽宁、黑龙江的 200 个黄瓜棒孢叶斑病菌为供试菌株,采用苗期接种鉴定及 AFLP 分子标记技术,研究了黄瓜棒孢叶斑病菌的毒力分化。结果表明:黄瓜棒孢叶斑病菌存在生理小种分化现象,并将 200 个菌株分为 4 个生理小种,初步筛选出 D0330、D1306、D0649 和 D2025 作为研究黄瓜棒孢叶斑病菌生理小种分化的鉴别寄主备选材料;AFLPs 与菌株的地理来源无关,与毒力存在相关性。

**关键词:**黄瓜棒孢叶斑病;多主棒孢霉;毒力分化;AFLP

**中图分类号:**S 436.421.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)16-0092-07

近年来,由多主棒孢霉 *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) 侵染引起的黄瓜棒孢叶斑病已由次级病害上升为主要病害,严重影响黄瓜生产。自发现以来,病情发展迅速,危害十分普遍,尤以保护地受害严重。田间发病一般减产 20%,严重时可达 60%~70%<sup>[1-2]</sup>。20 世纪 60 年代,戚佩坤等<sup>[3]</sup>曾报道该菌可侵染黄瓜,但直至 20 世纪 90 年代后,李宝聚等<sup>[4]</sup>才报道该病在沈阳部分地区造成危害。目前在欧洲、美国、韩国、日本等国家,以及我

国的宁夏、上海、广东、山东、河南、河北、甘肃、黑龙江等地均有黄瓜棒孢叶斑病发生的报道<sup>[5-16]</sup>。

多主棒孢霉的寄主范围广泛,能够侵染橡胶、木瓜、大豆、番茄和黄瓜等 380 个属内的 530 种植物<sup>[17]</sup>。国内外研究学者对来自不同寄主的多主棒孢霉进行了毒力分化的研究,表明多主棒孢霉存在寄主专化性<sup>[5,18-21]</sup>。但针对黄瓜棒孢叶斑病菌对不同黄瓜品系的毒力分化的研究却鲜有报道。黄瓜棒孢叶斑病的防治主要有应用抗病品种、药剂防治及生物防治等措施,其中最经济有效的方法是选育和种植抗病品种。明确病菌的毒力分化及各地优势小种是抗病品种选育和利用的基础,因此,黄瓜棒孢叶斑病菌毒力分化的研究变得尤为重要。

AFLP 技术是基于 PCR 反应的一种选择性扩增限

**第一作者简介:**张艳菊(1968-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物病原生物学及植物病害综合防治。E-mail:zhangyanju1968@163.com.

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金资助项目(C201428)。

**收稿日期:**2016-04-20

## Establishment of Regeneration System for *Cucumis melo* L. cv. 'Jiashi' of Xinjiang Melon

DU Shanshan, LI Siyi, WANG Dong, LI Guan

(College of Life and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** A high efficiency and rapid regeneration system of thick-skinned muskmelon had been set up using cultivars 'Jiashi' cultured in the media with different hormone of 6-Benzolaminopurine(6-BA) and silver nitrate(AgNO<sub>3</sub>). The 5 days sterile cotyledon of 'Jiashi' were cultured in media with different 6-BA concentration. The effect of different AgNO<sub>3</sub> concentration added in media with the most appropriate 6-BA concentration was discussed. The results showed that the MSB medium containing 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA was the most suitable for inducing adventitious buds with an average rate of 75%. The MSB medium containing 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> was the best suitable for inducing adventitious buds with an average rate of 65%, there were most of single adventitious buds, this combination could save time of regeneration system. Adventitious buds were able to elongation on MSB medium with 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, adventitious buds elongated and grew well. Regenerated shoots were rooted on MSB medium with 0.01 mg · L<sup>-1</sup> NAA.

**Keywords:** melon; 6-BA; AgNO<sub>3</sub>; regeneration system