

黄瓜子叶外植体组培成株研究

汪祖程, 何 丹, 徐跃进

(国家蔬菜改良中心华中分中心; 园艺植物生物学教育部重点实验室; 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 采用正交试验设计, 研究了不同激素浓度组合对黄瓜子叶离体再生的影响。结果表明: 愈伤组织诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+(1.0~1.5)mg/L KT+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D; 不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 再生芽移入生根培养基(MS+0.1 mg/L NAA)生根培养, 40~60 d 可得到完整再生植株。另外, 在所有组合中, 6-BA 浓度 1.5 mg/L 时, 愈伤组织诱导率低, 并且出现了愈伤化现象, 引起器官直接分化。

关键词: 黄瓜; 子叶; 植株再生; 正交设计

中图分类号: S 642.201 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0187-03

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是一种重要蔬菜。由于其遗传基础较狭窄, 利用基因工程将是今后黄瓜品种改良中重组远缘有用基因的有效手段。成功地进行组织培养, 对于黄瓜转基因等研究十分必要。目前, 对黄瓜再生体系的研究已有一些成功的报道^[1-8], 但再生仍相对较难, 不仅基因型影响较大, 不同的激素组合对再生频率也有影响, 并且重复性也较差。试验以黄瓜为材料, 采用正交设计法, 旨在明确不同植物激素及其不同浓度的组合对黄瓜愈伤组织诱导和生长的影响, 对黄瓜愈伤组织诱导和生长的条件进行筛选, 为今后黄瓜遗传转化体系的建立提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料及外植体的选择

黄瓜品系为 XCC-6, 由华中农业大学黄瓜课题组提供。外植体为种子萌发的无菌苗子叶。将种子去皮后, 用 75%酒精消毒 60 s, 升汞灭菌 7~8 min, 无菌水冲洗 3~5 次后, 接种到固体 1/2 MS 培养基(加 30%蔗糖+0.8%琼脂, pH 值为 5.8), 先置于组培室内(25℃)暗培养 1~2 d, 然后光下培养(昼、夜 16 h/8 h, 25℃), 3 d 后子叶展开并由黄转绿, 子叶包被的薄膜褪去的时候开始接种, 将子叶切成 0.5 cm×0.5 cm 方形, 叶背朝下接种于愈伤组织诱导培养基中培养。

1.2 愈伤组织诱导

愈伤诱导培养基采用正交设计, 正交表选用 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$, 各因素的不同水平见表 1。

1.3 愈伤组织分化

愈伤组织分化培养基采用 MS 基本培养基, 分别添加 NAA (0.1、0.2、0.3 mg/L)和 6-BA (1.5、2.0、2.5 mg/L)共 9 个处理, 培养条件相同。

表 1		试验因子及水平			
		因子种类及代号			
因子水平		A	B	C	D
		6 BA	2 4-D	NAA	KT
1		0.5	0.1	0.1	0.5
2		1.0	0.3	0.3	1.0
3		1.5	0.5	0.5	1.5

1.4 生根诱导

将不定芽从外植体上切下转接于伸长培养基 MS+BA 0.05 mg/L, 再将长至 1~2 cm 的小植株分开, 转接于生根培养基上, 生根培养基采用 MS 和 MS+NAA 0.1 mg/L。约 7~10 d, 植株有根长出, 7 d 后根系分支较多, 即可练苗移栽。

1.5 小苗的移栽

当小苗根系发育到一定程度后, 将三角瓶打开, 取出小苗, 洗净根部培养基, 小心移植于小花盆灭菌土中(泥炭和蛭石 2:1 混合), 浇透水后, 罩上透明纸袋, 保持较高的湿度, 过几天后, 放在弱光下, 待新叶逐渐长出, 说明已有新根生成, 即已成活。

2 结果与分析

2.1 激素对黄瓜愈伤组织诱导的影响

5~6 d 苗龄接种的子叶, 第 3 天可见明显膨大, 1 周后可见伤口处开始形成愈伤组织, 子叶的四周均有愈伤组织的生成, 且在接触到培养基的部位愈伤组织生长较快。2 周以后见愈伤表面有瘤状突起形成。15~20 d 后可转接至分化培养基中。

黄瓜愈伤组织诱导正交试验 $L_9(3^4)$ 的试验结果表

第一作者简介: 汪祖程(1983-), 男, 硕士, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: mechal727@126.com。
通讯作者: 徐跃进。E-mail: xyjo@hzaui.edu.cn。
收稿日期: 2008-02-30

明(表 2), 在各试验条件下外植体均有愈伤组织生成。

正交试验中, 因素不同水平间的极差越大, 表明该因素越重要。试验结果的直观分析表明(见表 3), A 因素的极差最大, D 因素、B 因素次之, C 因素最小。因此, 试验结果表明, 参试的 4 个因素中 6-BA 的影响最大, 其次是 KT, 而 2, 4-D 的影响最弱。试验中发现, 6-BA 浓

度由 0.5 mg/L 增至 1.0 mg/L 时, 黄瓜愈伤组织诱导率增加明显, 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时, 愈伤组织含量较低, 并且有的出现了愈伤化, 器官直接分化成芽, 见图 VIII。根据经济原则, 认为比较适合于黄瓜愈伤组织诱导的培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+(1.0~1.5)mg/L KT+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L 2, 4-D。

表 2 激素对黄瓜愈伤组织诱导的影响

因子水平	因子种类及代号				愈伤组织诱导率/%	接种 15 d 后观察愈伤诱导情况
	A 6-BA/ mg ° L ⁻¹	B NAA/ mg ° L ⁻¹	C 2,4-D/ mg ° L ⁻¹	D KT/ mg ° L ⁻¹		
1	0.5	0.1	0.1	1.0	63.8	黄绿色, 较疏松, 数量少
2	0.5	0.3	0.3	1.5	87.3	绿色, 数量较多, 较疏松, 少量白点
3	0.5	0.5	0.5	2.0	90.0	黄白色, 数量较多, 疏松
4	1.0	0.1	0.3	2.0	92.7	黄绿色, 数量多, 紧密
5	1.0	0.3	0.5	1.0	95.0	黄绿色, 数量多, 紧密
6	1.0	0.5	0.1	1.5	98.5	黄绿色, 数量多, 紧密
7	1.5	0.1	0.5	1.5	90.6	黄绿色, 数量多, 紧密
8	1.5	0.3	0.1	2.0	89.6	黄绿色, 数量较多, 较紧密
9	1.5	0.5	0.3	1.0	87.4	黄绿色, 数量较多, 较紧密

表 3 黄瓜愈伤组织诱导率试验结果的直观分析

因素	A	B	C	D	平均值	A	B	C	D
K ₁	241.1	247.1	251.9	246.2	X ₁	80.37	82.37	83.97	82.07
K ₂	286.2	271.9	267.4	276.4	X ₂	95.40	90.63	89.13	92.13
K ₃	267.6	275.9	275.6	272.3	X ₃	89.20	91.97	91.87	90.77
R(极差)	45.1	28.8	23.7	30.2	R'(极差)	15.03	9.60	7.90	10.06

2.2 激素对黄瓜愈伤组织分化的影响

该试验黄瓜愈伤组织分化培养基为 MS+6-BA+NAA, 不同浓度组合下都能诱发不定芽, 见表 4。以 NAA 0.3 mg/L+6-BA (1.5~2.5) mg/L 芽再生率较高, 这种培养基下生长的不定芽健壮, 芽丛较多, 茎生长

粗壮, 叶色深绿; 而 NAA 0.1 mg/L+6-BA (1.5~2.5) mg/L 芽再生率虽然高, 但这种培养基下生长的不定芽浅黄绿色, 容易褐化。可见, MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 为诱导不定芽比较理想的培养基。

表 4 激素对黄瓜愈伤组织分化的影响

因子水平	因子种类及代号		接种愈伤数	出芽丛愈伤数	芽诱导率/%	接种 10 d 后观察结果
	A NAA/ mg ° L ⁻¹	B 6-BA/ mg ° L ⁻¹				
1	0.1	1.5	37	6	16.22	黄绿色, 较松散
2	0.1	2.0	35	12	34.29	黄绿色和绿色各半, 较松散
3	0.1	2.5	34	12	35.29	出现较多褐化
4	0.2	1.5	34	7	20.59	黄绿色, 出现一些白化
5	0.2	2.0	37	9	24.32	黄绿色, 较紧密
6	0.2	2.5	39	8	20.51	黄绿色, 较紧密
7	0.3	1.5	35	11	31.43	黄绿色, 较紧密
8	0.3	2.0	34	8	23.53	黄绿色, 较松散
9	0.3	2.5	35	10	28.57	黄绿色, 较紧密

2.3 激素对黄瓜不定芽生根诱导的影响

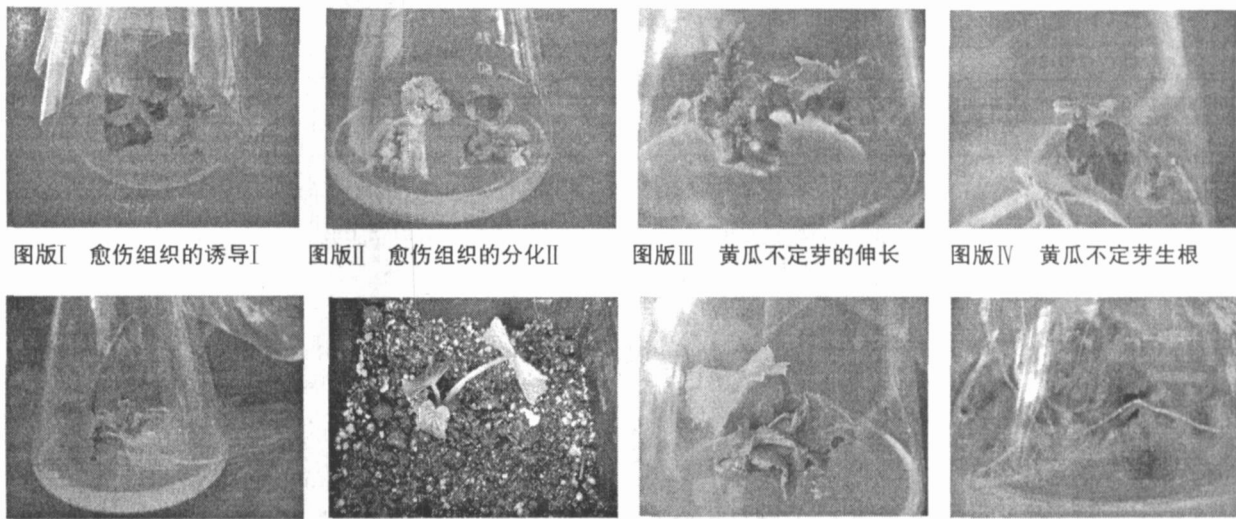
试验生根培养基选用 MS 和 MS+0.1 mg/L NAA 2 种培养基, 把不定芽接入这 2 种培养基中, 其它生长条件与基本培养条件对不定芽促根的影响保持一致。其结果如下: 在附加有 0.1 mg/L NAA 的培养基中, 接种 1 周后, 芽基部有绿色愈伤组织长出, 10 d 后从愈伤处长出白色不定根, 以后根慢慢伸长变粗, 至此完整植株形成, 见附图 ~ VI。

3 小结与讨论

6-BA 浓度由 0.5 mg/L 增至 1.0 mg/L 时, 黄瓜愈伤组织诱导率增加明显, 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时, 愈伤组织含量较低, 并且有的出现了愈伤化, 器官直接分化成芽。黄瓜分化出不定芽后, 再转移到生根培养基中, 经过一段时间后即可生根。向培养基中添加低浓度的 NAA 与不添加 NAA, 都能生根^[4]。但是在该试验中, 没有添加 NAA 的培养基不定芽没有生根(见附图

VII, 可能是基因型的缘故。
在培养过程中, 还发现黄瓜成苗后极易开花, 这可

能与前期培养的激素浓度有关, 前人也有相关报道^[9]。



图版I 愈伤组织的诱导I 图版II 愈伤组织的分化II 图版III 黄瓜不定芽的伸长 图版IV 黄瓜不定芽生根
图版V 黄瓜组培成苗 图版VI 黄瓜组培苗移栽 图版VII 黄瓜不定芽不生根 图版VIII 愈伤组织直接分化形成的苗

参考文献

[1] 朱其杰, 许勇, 宋鹏飞. 黄瓜的组织培养与植株再生[J]. 北京农业大学学报 1990 16(2): 142.
[2] 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(10): 39-41.
[3] 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.
[4] 赵泓, 刘凡, 姚磊. 简单快捷建立黄瓜子叶离体再生体系[J]. 生物技术, 2000, 10(2): 9-11.
[5] 王利琳, 梁海曼. 激动素在黄瓜子叶器官分化中的作用[J]. 云南植物研究 2000 22(2): 175-180.
[6] 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.
[7] 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.
[8] 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, 164.
[9] 周俊辉, 周家容, 林毕成, 等. 6-BA 和氨基酸对黄瓜子叶离体培养成花的影响[J]. 植物生理学通讯 2004 40(2): 171-174.

Research on Using Cotolydon as Explant in Vitro for Regeneration in Cucumber

WANG Zhi-cheng, HE Dan, XU Yue-jin

(National Center for Vegetable Improvement (Central China); Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education; College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Effects of different plant hormone on callus induction and callus growth in cucumber were investigated by Orthogonal design. The main results that the medium for callus induction was MS+1.0 mg/L 6-BA+(1.0~1.5) mg/L KT+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L 2, 4-D. The results also showed that the medium for callus growth was MS+6-BA1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L. The adventitious shoots were placed on medium (MS+0.1 mg/L NAA) for root regeneration. The whole regenerated plants could be obtained in 40~60 days. In addition, some adventitious- buds were accompanied with the growth of callus.

Key words: Cucumber; Cotyledon; Plant regeneration; Orthogonal design