

黄瓜矮化突变体再生体系的建立

黄 莎 莎, 王 多 佳, 李 凤 兰, 胡 宝 忠

(东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以黄瓜矮化突变体 D0462 子叶为外植体, 以 MS 为基本培养基, 建立黄瓜矮化突变体再生体系。结果表明:不定芽诱导最适培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA;芽伸长最适培养基为 MS+0.1 mg/L 6-BA;再生植株生根培养基为 1/2MS。为了控制芽伸长阶段出现的开花现象, 选用 6-BA 浓度 0.1 mg/L, 光照时间 8 h/d, 尽可能抑制开花。

关键词:黄瓜;矮化突变体;再生体系;不定芽;光照

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)19-0110-03

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科黄瓜属植物, 也称胡瓜, 是世界性主要蔬菜作物。黄瓜清爽可口, 营养丰富, 食用方便, 为提高人民生活水平发挥了巨大作用^[1]。我国黄瓜的种植面积大, 产量高, 由于黄瓜是蔓生植物, 种植时需要搭架, 这就降低了它的种植密度, 影响了黄瓜的生产效益。而植物的矮生性状是高等作物理想株型性状的一个重要方面, 矮化(杆)品种抗倒伏能力强, 群体光能利用率高, 适宜高度密植^[2]。因此选育与人工培育黄瓜等瓜类蔬菜矮生品种具有重要的生产应用价值。近年来, 矮化突变体的获得为分子生物学极其相关学科的发展提供了良好的遗传材料。在瓜类作物中, 仅发现了西瓜和南瓜^[3]等的矮化突变体, 关于黄瓜矮化突变体的研究报道鲜见。该试验所采用的材料为黄瓜矮化突变体 D0462, 其表现型为植株矮小, 节间缩短。建立黄瓜矮化突变体的再生体系是实现基因转化的先决条件, 对于分析基因的功能也是十分必要的。该研究进行了丛生芽诱导、不定芽伸长及再生植株生根等试验, 基本建立了黄瓜矮化突变体 D0462 的再生体系, 为今后的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 D0462 黄瓜品种作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 首先将黄瓜种子经水漂洗后, 浸泡 20 min, 剥去种壳。在无菌条件下, 用 70% 的酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 10% 的次氯酸钠消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 接种在发苗培养基上(0.8%

琼脂, pH 5.8)。培养温度为(26±1)℃, 黑暗条件下培养 48 h 后转至光下培养, 光照 16 h/d。

1.2.2 外植体的选择 根据无菌苗的发育阶段来选取最佳的外植体。无菌苗的发育分为 3 个阶段: 阶段 I, 子叶仍重叠在一起, 颜色为浅绿; 阶段 II, 子叶呈直立状态但未展平, 颜色为绿色; 阶段 III, 子叶展开呈水平状态。选取处于 II 阶段的无菌苗为最佳的外植体苗龄^[5](图 1)。

1.2.3 不定芽的诱导 在无菌条件下, 从阶段 II 无菌苗上切取子叶节作为外植体。首先切取带 0.3 cm 左右子叶柄的子叶, 再将 2 片子叶从中间分开, 小心刮去生长点, 然后切去每片子叶的上半部分, 大约 2/3 部分。最后插入芽诱导培养基。由于细胞分裂素 6-BA 单独存在时即能诱导丛生芽的发生, 当 6-BA 的浓度为 1 mg/L 时, 诱导效率较高; 当 6-BA 的浓度大于 1 mg/L 时, 不仅会使芽的分化率降低, 同时也会使外植体上的出芽数明显减少^[5]。因此该试验芽诱导培养基采用 MS+1.0 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+0.8% 琼脂, pH 5.8。培养温度为(26±1)℃, 光照 16 h/d。2 周后观察并统计不定芽的发生情况。

1.2.4 不定芽的伸长 待不定芽长至 2 cm 左右时, 将不定芽转移到不定芽伸长培养基(表 1)。培养基中激素的浓度直接影响着芽的生长。诱导培养基采用 MS+30 g/L 蔗糖+0.8% 琼脂, pH 5.8。培养温度为(26±1)℃, 光照 16 h/d。培养温度为(26±1)℃, 光照 16 h/d。

表 1 不定芽伸长培养基编号

Table 1 Number of shoot elongation medium

培养基序号 Number of medium	6-BA 浓度 6-BA concentration/mg · L ⁻¹
1	0
2	0.01
3	0.1
4	0.5
5	1

第一作者简介:黄莎莎(1986-),女,在读硕士,研究方向为植物生殖生物学与分子生物学。E-mail:agshasha@163.com。

责任作者:胡宝忠(1962-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物学。

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(230340);高等学校博士点专项科研基金资助项目(200802240008)。

收稿日期:2011-06-28



图1 无菌苗发育的3个阶段

Fig. 1 Three phases of aseptic seedling development

1.2.5 再生植株的生根 待不定芽长到4~5 cm时,从基部剪下接种到生根培养基上。生根培养基为不添加任何生长调节物质的1/2MS培养基+30 g/L蔗糖+0.8%琼脂,pH 5.8。培养温度为(26±1)℃,光照16 h/d。

1.2.6 再生植株的驯化、移栽 待再生植株的根系比较发达后,便可进行驯化和移栽。首先在培养室中将瓶口打开,练苗4~7 d,然后将苗小心取出,避免根苗受损。之后将根部的培养基轻轻用清水冲去,防止烂根。移栽至装有草炭土:蛭石=2:1的营养钵中。培养条件为室温,16 h/d光照,湿度为75%~90%。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

植物生长调节剂的种类和浓度对于不定芽的诱导至关重要^[4]。该试验的丛生芽诱导培养基中激素添加为1.0 mg/L 6-BA,并成功地得到了大量的丛生芽,诱导效率95%以上(图2)。



图2 子叶节丛生芽诱导情况
Fig. 2 The inducing conditions of cotyledonary node buds



图3 丛生芽培养15 d情况
Fig. 3 The conditions of buds cultured for 15 days

2.2 不定芽的伸长

当子叶节在芽诱导培养基上分化出丛生芽后,若继续用芽诱导培养基进行继代,则芽生长缓慢;如果继代到6-BA浓度减半的MS培养基上,则芽生长较快^[5]。该试验最初采用的芽伸长培养基是6-BA浓度减半的MS培养基,虽然芽能伸长,但在芽长到3 cm左右时,植株会长出许多雌花(图4)。这可能是由于该试验所选取的黄瓜品种为矮化品种,它的内源激素含量与正常的黄瓜品种有所不同:其GA与IAA的激素水平较低,ABA含量较高。各种激素调节植物生命过程不是单一的,而是形成相互交织的网^[6]。因此附加

不同浓度的6-BA对植株伸长和开花有较大影响。分别将丛生芽接种到6-BA浓度不同的芽伸长培养基上,在细胞分裂素6-BA浓度为0.01~0.1 mg/L时(表2),植株开花明显减少(图5)。



图4 在芽伸长培养基上培养12 d情况

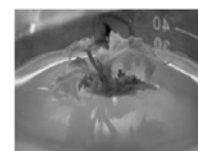


图5 在6-BA浓度为0.1 mg/L的芽伸长培养基上的培养情况

Fig. 4 The conditions of cultured buds for 12 days on shoot elongation medium

Fig. 5 The cultured conditions on shoot elongation medium containing 6-BA (0.1 mg/L)

由表2可知,2号(6-BA浓度为0.01 mg/L)和3号(6-BA浓度为0.1 mg/L)培养基的激素浓度比较理想,降低了开花率。因此可以选用2号或3号作为不定芽伸长的培养基。由于黄瓜属短日照植物,而且该试验选用的品种为矮化品种,其内源激素和其它特性与正常品种有所不同,因此对光照的需求也会不同。为了尽可能地抑制花芽的产生,该试验缩短植株的光照时间,由原来的16 h/d光照缩短为8 h/d光照,光强也适当减小。在改变了光照时间的条件下,利用伸长培养基培养黄瓜植株,则黄瓜植株的时间由10 d开花延迟到25 d,且开花的个数也明显减少。说明光照可能影响植株内源激素的含量变化而起了一定的抑制花芽发生的作用。

表2 6-BA浓度对不定芽伸长的影响

Table 2 Effect of 6-BA on shoot elongation

培养基序号 Number of medium	外植体个数 Number of explant/个	雌花个数 Number of female flower/个	开花率 Rate of flower/%
1	30	15	50
2	30	7	23
3	40	5	12.5
4	25	18	72
5	30	21	70

2.3 再生植株的生根和移栽

再生植株的生根是获得完整植株的关键步骤。根据经验,低盐培养基更适合用来诱导生根。该试验选用不添加任何生长调节物质的 1/2MS 培养基进行生根,10 d 后观察到有细小的白色根系,15 d 后根系变长变粗(图 6)。根系粗壮后便可以进行驯化、移栽。小心将根部培养基洗净,移栽至事先灭过菌的栽培土中(图 7)。移栽后要遮阴和保湿,确保组培苗的成活率^[7]。

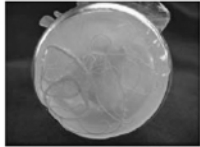


图 6 再生植株生根

Fig. 6 The root regeneration



图 7 移栽

Fig. 7 Transplantation

3 讨论

3.1 外植体的选择

在黄瓜再生体系研究过程中,子叶、下胚轴及子叶节都曾被当作为外植体进行培养。且子叶节在芽诱导培养基上能形成大量的丛生芽。无菌苗的发育分为 3 个阶段,当子叶处于Ⅱ阶段时,即垂直生长时,其再生能力较高;而当子叶处于Ⅲ阶段时,即 2 片子叶张开时,其分化能力降低。无菌苗的苗龄对丛生芽的诱导率有很大影响,随着苗龄的增加,愈伤的诱导较慢,芽再生率逐渐下降^[7]。该试验选取处于Ⅱ阶段的子叶节在芽诱导培养基上进行培养,能诱导大量的丛生芽,诱导率达 95%。

3.2 不定芽的诱导

植物器官的分化主要受到植物生长调节剂的调控,取决于生长素和细胞分裂素的浓度配比。当细胞分裂素浓度较高时促进芽的形成;而当生长素浓度较高时则促进根的形成。目前用于黄瓜不定芽诱导的植物生长调节剂主要有 6-BA、IAA、NAA、2-ip、KT 等。Ganapathi A 等^[8]采用 1.0 mg/L 6-BA 可以诱导较多的丛生芽。苏绍坤^[5]通过试验证明单独使用 1.0 mg/L 6-BA,能得到最好的效果。该研究选择附加 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基作为丛生芽诱导培养基,

同样获得了大量丛生芽,且分化率较高。细胞分裂素的主要作用是引起细胞分裂,诱导芽的形成和促进芽的生长。因此丛生芽的分化主要取决于细胞分裂素。

3.3 不定芽的伸长

由于该试验所选用的材料为矮化品种,它内源激素的含量与正常品种有所差别,这可能是导致它在不定芽伸长过程时提早开花的原因,且雌花较多。这就影响了再生植株的正常发育,不利于后期试验的进行。细胞分裂素能够影响植物开花,如 BA 促进山桔枝节和风信子成花^[10-11],该研究摸索出较佳的 6-BA 浓度,并配合缩短光照长度来达到抑制开花的效果。生长素是影响成花的重要激素,但其作用规律和机理仍不明确^[12]。激素对植物开花有重要影响,值得进一步探讨研究。

参考文献

- [1] 黄金. 黄瓜 D0462 品种与 129 品种形态解剖比较研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [2] 孟婧,李凤兰,胡宝忠,等. 矮化黄瓜幼苗对外源 GA 处理的生理反应[J]. 东北农业大学学报,2009,40(11):60-64.
- [3] 周祥麟,李海真. 中国南瓜无蔓形状的遗传性及其生产利用的研究[J]. 山西农业科学,1991(1):1-6.
- [4] 佟新萍. 黄瓜子叶下胚轴愈伤组织诱导及植株再生试验[J]. 石河子科技,1996(4):11-12.
- [5] 苏绍坤. 农杆菌介导 *iaaM* 基因创造单性结实黄瓜种质资源[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2005.
- [6] 孟婧. 黄瓜矮化突变体矮化的生理生化机制研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [7] 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.
- [8] Ganapathi A, Perl-treves R. *Agrobacterium*-mediated transformation in *Cucumis sativus* via direct organogenesis[J]. Acta Horticulturae, 2000, 510:405~407.
- [9] Cade R M, Wehner T C, Blazich F A. Effect of explant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cotyledonary tissue of cucumber[J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 1990, 115:691-696.
- [10] Jumin H B, Nito N. *In vitro* flowering of *Fortnuella hindei* (Cmp.) Swingle[J]. Plant Cell Rept, 1996, 15:484-88.
- [11] 夏小娣, 陆文梁. 外源激素对诱导风信子 (*Hyacinthus orientalis* L.) 同一花被外植体不同部位细胞分化花芽的影响[J]. 植物生理学报, 1995, 21(1):8-14.
- [12] 王利琳. 黄瓜离体子叶节花分化的生理和分子基础研究[D]. 杭州:浙江大学,2003.

Construction of Dwarf Cucumber Regeneration System

HUANG Sha-sha, WANG Duo-jia, LI Feng-lan, HU Bao-zhong

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking cotyledon of dwarf cucumber 'D0462' as explants, using MS medium as the basic medium, regeneration system of dwarf cucumber mutant were established. The results showed that the best medium for induced adventitious bud was MS + 1.0 mg/L 6-BA; optimization medium for shoots elongation were MS + 0.1 mg/L 6-BA; roots regeneration medium was 1/2MS; In order to control the flowering during bud elongation, by alter 6-BA hormone concentration 0.1 mg/L and illumination time 8 h/d, inhibition explode as much as possible.

Key words: cucumber; dwarfed mutant; regeneration system; adventitious shoot; illumination