

植物激素对黄瓜愈伤组织形成与芽分化的影响

王 萍¹, 沈 晓 婷², 王 昱³, 季 静³

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 古蔺县职业高级中学, 四川 古蔺 646500;

3. 天津大学 环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘 要:以黄瓜“津研四号”子叶节为外植体, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 在 MS 基本培养基中添加 6-BA、IAA、ABA、KT 4 种植物激素, 研究不同激素组合对黄瓜子叶节组织培养芽分化与伸长的影响。结果表明: 在 MS 培养基中添加 4 种激素中的任何 3 种均能形成愈伤组织, 添加 1~2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ABA+4 mg/L KT(或 0.050 mg/L IAA)有利于芽分化, 添加 2 mg/L 6-BA+0.025 mg/L IAA+4 mg/L KT 可促进芽的伸长; 在培养 2 周时 6-BA、IAA、ABA 对再生频率、芽数、芽长的作用值相似, 均大于 KT 的作用; 在培养 6 周时对再生频率、芽数、芽长影响较大的激素是 6-BA 和 ABA; ABA 可促进黄瓜芽分化, 但在培养 6 周时抑制芽的伸长。

关键词: 黄瓜; 植物激素; 子叶节; 组织培养

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)24-0084-04

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 属葫芦科(Cucurbitaceae) 黄瓜属(*Cucumis*) 1 a 生蔓生草本植物, 是人们喜食的重要果菜之一。为了不断改善其品质, 从 20 世纪 80 年代以来, 人们相继应用生物技术开展黄瓜组织培养和遗传转化的研究, 主要围绕黄瓜的基因型及外植体类型、诱导培养基的激素种类及浓度等方面进行。前人研究表明, 不同基因型间胚性愈伤及胚胎发生能力差异显著^[1-6], 使用的外植体种类主要有下胚轴、真叶、子叶、子叶节等^[7-8], 关于植物激素的研究多是在黄瓜组织培养的培养基中添加 1 种植物激素或者 2 种激素组合^[9-10], 而探讨 3 种或 3 种以上植物激素对黄瓜组织培养影响的研究较少^[11-12]。韩欣等^[13]研究了在培养基中添加 ABA 对提高黄瓜芽再生能力的作用。该试验以黄瓜无菌苗子叶节为外植体, 采用正交实验设计, 在培养基中添加 6-BA、IAA、ABA、KT 4 种植物激素, 研究了不同激素种类与浓度组合对诱导黄瓜子叶节愈伤组织形成与芽分化的影响, 以期进一步优化黄瓜组织培养体系, 为黄瓜的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜品种“津研四号”种子, 由江苏省连云港市农业科学院赠送。

第一作者简介: 王萍(1957-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物基因工程与分子生物学研究工作。E-mail: y_pwang@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271419); 中央财政支持地方高校发展专项资金资助项目(CXTD07)。

收稿日期: 2013-10-24

1.2 试验方法

挑选饱满的“津研四号”黄瓜种子用自来水洗去包衣, 在无茵条件下, 用 75% 乙醇处理 90 s, 0.1% 升汞消毒 8 min 进行种子消毒处理, 无菌水冲洗 3~5 次后将种子接种在 MS 培养基中, 放置在 25℃、16 h 光照培养箱中培养 5~7 d 获得无菌苗。切取黄瓜无菌苗子叶节接种于 MS 基本培养基添加不同激素组合的 9 种培养基(表 1)中, 放置在 25℃、16 h 光照培养箱中培养, 诱导愈伤组织产生、芽分化与伸长, 2 周继代 1 次。

表 1 子叶节培养基的 $L_9(3^4)$ 正交实验设计

Table 1 The $L_9(3^4)$ orthogonal experiment design of medium for cotyledonary nodes

培养基 Medium	6-BA /mg · L ⁻¹	IAA /mg · L ⁻¹	ABA /mg · L ⁻¹	KT /mg · L ⁻¹
L ₁	1(0)	1(0)	1(0)	1(0)
L ₂	1	2(0.025)	2(0.5)	2(2)
L ₃	1	3(0.050)	3(1.0)	3(4)
L ₄	2(1)	1	2	3
L ₅	2	2	3	1
L ₆	2	3	1	2
L ₇	3(2)	1	3	2
L ₈	3	2	1	3
L ₉	3	3	2	1

采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 6-BA、IAA、KT、ABA 4 种植物激素各设 3 个浓度。6-BA 浓度为 0、1、2 mg/L; IAA 浓度为 0、0.025、0.050 mg/L; ABA 浓度为 0、0.5、1.0 mg/L; KT 浓度为 0、2、4 mg/L, 3 次重复。记录各种培养基出现愈伤组织的外植体数、分化出芽的子叶节数、每个子叶节的芽数及芽长。再生频率=有芽外植体数/外植体总数×100%; 芽数=芽总数/有芽外植体数;

芽长=芽总长/有芽外植体数。

1.3 数据分析

试验数据利用 Microsoft Office Excel 2010 软件进行处理,采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析及显著性检验。

2 结果与分析

2.1 9种植物激素组合对黄瓜子叶节愈伤组织形成与芽分化的影响

由表 2 可知,培养 2 周和 6 周时,黄瓜子叶节的再生频率、芽数、芽长在 9 种激素组合间均存在极显著差异。

表 2 黄瓜子叶节不定芽分化性状的 F 值及显著性

Table 2 F value and significance of traits for differentiation of adventitious buds from cotyledonary nodes in cucumber

培养时间 Time of culture/周	再生频率 Regeneration rates/%	芽数 Buds number	芽长 Buds length
2	10.09**	3.98**	5.02**
6	12.19**	16.84**	16.14**

注:“**”表示 0.01 水平上差异显著,下同。

Note:“**”indicates the significance at 0.01 level,the same as below.

从表 3 可以看出,在培养 2 周时,再生频率变化在 0~36.67%, L_7 、 L_5 、 L_4 组合显著地高于其它组合。在培养 6 周时,各激素组合的再生频率都显著升高,变化在 0~100.00%, L_1 仍没有分化出芽, L_9 、 L_7 、 L_4 的再生频率显著地高于 L_6 、 L_2 和 L_1 。在培养 2 周时,芽数变化在 0~1.61 个, L_7 和 L_5 的芽数较多,显著地高于 L_9 、 L_2 、 L_6 、 L_3 、 L_1 。在培养 6 周时,芽数为 0~4.82 个, L_4 芽数最多,与 L_9 间差异不显著,但显著地高于其它 7 个组合。在培养 2 周时,芽生长缓慢,随着培养时间的推移,芽的增长速度加快,其中 L_8 芽长为 2.17 cm,显著地高于其它 8 个组合的芽长。从以上试验结果可知, L_9 、 L_7 、 L_4 、 L_3 、 L_5 、 L_8 培养基有利于芽分化, L_4 、 L_9 的芽数较多,

表 3 黄瓜子叶节不定芽的分化性状
平均值及显著性

Table 3 Mean value and significance of traits for differentiation of adventitious buds from cotyledonary nodes in cucumber

培养基 Medium	再生频率		芽数		芽长	
	Regeneration rates/%		Buds number/个		Buds length/cm	
	2 周	6 周	2 周	6 周	2 周	6 周
L_1	0.00 b	0.00 d	0.00 b	0.00 f	0.00 c	0.00 d
L_2	3.33 b	33.33 c	0.33 b	1.00 ef	0.00 c	0.00 d
L_3	0.00 b	83.33 ab	0.00 b	1.13 ef	0.00 c	0.00 d
L_4	33.33 a	90.00 a	1.00 ab	4.82 a	0.12 bc	0.80 c
L_5	36.67 a	83.33 ab	1.47 a	3.19 bc	0.22 ab	0.63 c
L_6	0.00 b	53.33 bc	0.00 b	1.97 de	0.00 c	1.47 b
L_7	36.67 a	90.00 a	1.61 a	3.41 bc	0.40 a	0.47 cd
L_8	6.67 b	80.00 ab	0.83 ab	2.87 cd	0.10 bc	2.17 a
L_9	3.33 b	100.00 a	0.33 b	4.07 ab	0.01 c	0.47 cd

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

Note:The same column different small letters indicate the significance at 0.05 level, the same as below.

L_8 、 L_6 可促进芽的伸长。综合芽分化、增殖、伸长考虑, L_4 (MS+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ABA+4 mg/L KT)、 L_6 (MS+2 mg/L 6-BA+0.025 mg/L IAA+4 mg/L KT) 和 L_9 (MS+2 mg/L 6-BA+0.050 mg/L IAA+0.5 mg/L ABA) 为较适宜的培养基。

2.2 4种植物激素对黄瓜子叶节愈伤组织形成与芽分化的影响

从表 4 可以看出,培养 1 周时,愈伤组织诱导率仅在 6-BA 浓度间存在极显著差异。培养 2 周时,除在 KT 浓度间外,再生频率、芽数、芽长在其它 3 种激素浓度间均存在显著或极显著差异;培养 6 周时,除芽数在 IAA 浓度间、KT 浓度间差异不显著外,其余 3 个性状在 4 种激素的浓度间均存在显著或极显著差异。

表 4 黄瓜子叶节组织培养各性状的 F 值及显著性

Table 4 F value and significance of several traits for tissue culture from cotyledonary nodes in cucumber

性状 Traits	培养时间 Time of culture/周	6-BA	IAA	ABA	KT
愈伤组织诱导率 Induce rate of callus	1	11.44**	2.97	2.39	2.76
再生频率 Regeneration rates	2	13.73**	13.64**	12.98**	0.001
芽数 Buds number	2	5.86*	5.78*	4.28*	0.02
芽长 Buds length	2	5.73*	5.79*	7.48**	1.08
再生频率 Regeneration rates	6	21.65**	5.31*	16.22**	5.58*
芽数 Buds number	6	48.23**	1.01	14.86**	3.27
芽长 Buds length	6	29.98**	5.89*	19.99**	8.71**

注:“*”表示 0.05 水平上差异显著。

Note:“*”indicates the significance at 0.05 level.

由表 5 可知,在培养基中添加 6-BA 有利于芽分化。培养 2 周,当 6-BA 浓度为 1 mg/L 和 2 mg/L 时,再生频率均极显著地高于不添加 6-BA 的处理。培养 6 周,6-BA 的浓度为 2 mg/L 的再生频率显著高于 1 mg/L,6-BA 浓度为 1 mg/L 时再生频率极显著高于 0 mg/L。芽数和芽长在培养 2 周,6-BA 浓度为 1 mg/L 和 2 mg/L 时显著高于 0 mg/L,在培养 6 周时极显著地高于 0 mg/L。由此可见,6-BA 对诱导黄瓜子叶节芽分化起着非常重要的作用,而且随着培养时间的延长,作用效果增加。

由表 6 可知,在不同培养时间,培养基中添加 IAA 对芽分化有不同的作用。当培养 2 周时,0.025 mg/L IAA 与不添加 IAA 处理间差异不显著,但添加 0.050 mg/L IAA 时显著地降低再生频率、芽数和芽长。在培养 6 周时,添加 0.050 mg/L IAA 时可显著地提高芽分化能力,添加 0.025 mg/L IAA 时可显著地增加芽长,在培养基中添加 IAA 对芽数没有显著影响。

表 5 黄瓜子叶节组织培养各性状在 6-BA 浓度间的差异显著性

Table 5 Significance of traits for several tissue culture from cotyledonary nodes among concentrations of 6-BA in cucumber

6-BA 浓度 Concentrations of 6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率 Regeneration rates/%		芽数 Buds number/个		芽长 Buds length/cm	
	2 周	6 周	2 周	6 周	2 周	6 周
2	15.56 aA	90.00 aA	0.92 aA	3.43 aA	0.17 aA	1.03 aA
1	23.33 aA	75.56 bA	0.82 aA	3.32 aA	0.11 aA	0.97 aA
0	1.11 bB	38.89 cB	0.11 bA	0.71 bB	0.004 bA	0.00 bB

注:同列不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著,下同。
Note: The different capital letters in the same column indicates the significance at 0.01 level, the same as below.

表 6 黄瓜子叶节组织培养各性状在 IAA 浓度间的差异显著性

Table 6 Significance of several traits for tissue culture from cotyledonary nodes among concentrations of IAA in cucumber

IAA 浓度 Concentrations of IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率 Regeneration rates/%		芽数 Buds number/个		芽长 Buds length/cm	
	2 周	6 周	2 周	6 周	2 周	6 周
0.050	1.11 bB	78.89 aA	0.11 bA	2.39 aA	0.003 bB	0.64 abAB
0.025	15.56 aA	65.56 bA	0.88 aA	2.23 aA	0.11 aAB	0.93 aA
0	23.33 aA	60.00 bA	0.87 aA	2.74 aA	0.17 aA	0.42 bB

由表 7 可知,在培养基中添加 0.5、1.0 mg/L ABA 间有关,当培养 2 周时对芽的伸长有促进作用,而在培养 6 周时芽的伸长有抑制作用。

表 7 黄瓜子叶节组织培养各性状在 ABA 浓度间的差异显著性

Table 7 Significance of several traits for tissue culture from cotyledonary nodes among concentrations of ABA in cucumber

ABA 浓度 Concentrations of ABA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率 Regeneration rates/%		芽数 Buds number/个		芽长 Buds length/cm	
	2 周	6 周	2 周	6 周	2 周	6 周
1.0	24.44 aA	85.56 aA	1.03 aA	2.58 bA	0.21 aA	0.37 bB
0.5	13.33 aA	74.44 aA	0.56 abA	3.29 aA	0.05 bB	0.42 bB
0.0	2.22 bB	44.44 bB	0.28 bA	1.59 cB	0.04 bB	1.21 aA

由表 8 可知,在培养 2 周时,添加 2、4 mg/L KT 与 著;培养 6 周时,添加 4 mg/L KT 对芽的分化与伸长有显著的促进作用。

表 8 黄瓜子叶节组织培养各性状在 KT 浓度间的差异显著性

Table 8 Significance of several traits for tissue culture from cotyledonary nodes among concentrations of KT in cucumber

KT 浓度 Concentrations of KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率 Regeneration rates/%		芽数 Buds number/个		芽长 Buds length/cm	
	2 周	6 周	2 周	6 周	2 周	6 周
4	13.33 aA	84.44 aA	0.61 aA	2.92 aA	0.07 aA	0.99 aA
2	13.33 aA	58.89 bA	0.64 aA	2.13 bA	0.14 aA	0.64 bAB
0	13.33 aA	61.11 bA	0.60 aA	2.42 abA	0.07 aA	0.37 bB

3 讨论与结论

植物的组织培养与植株再生主要有 2 个途径,即器官发生途径与体细胞胚胎发生途径^[14]。黄瓜的组织培养与植株再生也有这 2 种途径^[15-17],其中,器官发生途径在不定芽再生过程中外植体不产生或只产生少量的愈伤组织,短时间内迅速再生不定芽,与胚胎发生途径相比大大缩短组织培养时间^[8]。该研究以黄瓜子叶节为外植体,经器官发生途径诱导不定芽。当在培养基中分别加入 9 种不同植物激素组合时,L₄、L₉ 培养基有利于芽分化,再生频率较高、芽数较多,但芽伸长效果不是很好。从培养基中添加激素种类及浓度分析可知 L₄ 培养基芽数最多,即 MS+1 mg/L 6-BA+0.5 mg ABA+4 mg/L KT,这与韩欣等^[13]的研究结果相似,说明 6-BA

和 ABA 有利于黄瓜芽的分化与增殖,不利于芽的伸长。梅茜等^[9]以子叶为外植体时,在培养基中添加 1.0 mg/L ABA 时明显提高了黄瓜芽的再生能力,认为其原因可能是由于黄瓜愈伤组织中各种激素水平的不协调,尤其可能是内源生长素的含量偏高,而外源 ABA 可能通过参与调控黄瓜愈伤组织的内源激素代谢和抑制愈伤组织生长来促进芽的形成。王艳蓉等^[5]认为,ABA 与 BA 组合能有效地抑制子叶愈伤组织的形成,促进芽的发生。值得注意的是,以上研究只考察了芽的分化与增殖,没有注意到芽的伸长,而诱导形成的不定芽是否能够伸长在植株再生中尤为重要。该研究中 L₈ 培养基(MS+2 mg/L 6-BA+0.025 mg/L IAA+4 mg/L KT)虽然再生频率和芽数不是最高的,但 L₈ 对芽伸长的效果是最好

的,这个培养基与 L_4 、 L_9 相比,只是没有添加 ABA,说明 ABA 与 6-BA 的作用方式相似,即在对芽的分化与增殖有促进作用的同时,对不定芽的伸长有一定的抑制作用。因此建议在植物组织培养过程中芽诱导阶段添加 ABA,在伸长阶段减少或不添加 ABA。

在植物组织培养过程中,外植体的各种变化与内源激素的种类、水平及比例关系密切^[18]。张守杰等^[19]在研究黄瓜子叶节再生阶段内源激素含量的变化时发现,不同培养阶段内源激素含量呈现不同变化。该研究采用正交设计方法,在培养基中添加 4 种植物激素,当用直观法分析正交实验结果时发现,在培养 2 周时,6-BA、IAA、ABA 对再生频率、芽数、芽长的作用值相似,均大于 KT 的作用;添加 6-BA、ABA 能够促进芽分化与伸长,而 IAA 的作用与前二者相反。在培养 6 周时对再生频率、芽数、芽长影响较大的激素是 6-BA 和 ABA,培养基中添加 6-BA 和 ABA 时,可促进芽的分化,但在培养 6 周时添加 ABA 对芽的伸长有抑制作用,这可能与黄瓜体内 ABA 含量在培养后期升高有关。

参考文献

- [1] Todd C W, Robert D L. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L[J]. Hortscience, 1981, 16(6): 759-760.
- [2] 余阳俊,朱其杰. 黄瓜成熟胚离体培养中的胚状体诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(1): 37-39.
- [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] 侯爱菊,朱延明,杨爱菊,等. 诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 101-103.
- [5] 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.

- [6] 张若伟,顾兴芳,王烨,等. 基因型和 6-BA 对黄瓜子叶节再生频率的影响[J]. 中国蔬菜, 2009(22): 45-48.
- [7] Punja Z K. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii* C. *melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 21(2): 93-102.
- [8] Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, et al. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(1): 2-8.
- [9] 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.
- [10] 刘春香,赵俊利,王海霞,等. 黄瓜再生体系的建立[J]. 潍坊学院学报, 2006, 6(4): 82-84.
- [11] 杨爱菊,朱延明,侯爱菊. 几个影响黄瓜子叶体细胞胚胎发生的因素[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 206-208.
- [12] 张文勤,李进,顾绘,等. 绿箭水果黄瓜离体快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2004(5): 78-79.
- [13] 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.
- [14] 刘庆昌,吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 41-55.
- [15] Ladyman J A R, Girard B. Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources[J]. Hortscience, 1992, 27(2): 164-165.
- [16] Lou H. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber[J]. Hort Science, 1994, 29(8): 906-909.
- [17] Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, et al. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber[J]. J Biologia Plantarum, 2006, 50(1): 123-126.
- [18] 肖关丽,杨清辉. 植物组织培养过程中内源激素研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(2): 136-138.
- [19] 张守杰,王秀峰,杨小华,等. 黄瓜子叶节离体再生过程中内源激素变化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(5): 153-157.

Effects of Phytohormones on Callus Formation and Buds Differentiation of Cucumber

WANG Ping¹, SHEN Xiao-ting², WANG Gang³, JI Jing³

(1. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005; 2. Gulin County Vocational High School, Gulin, Sichuan 646500; 3. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: Using cotyledonary nodes of 'Jinyan 4' as explants, the orthogonal experiment design $L_9(3^4)$ was applied to investigate the effects of phytohormones combination on differentiation and elongation of buds with MS basic medium plus 4 phytohormones (6-BA, IAA, ABA, KT) in cucumber. The results showed that MS medium plus any three of four phytohormones could form callus, MS medium plus 1~2 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L ABA and 4 mg/L KT (or 0.050 mg/L IAA) could facilitate the differentiation of adventitious buds obviously in cucumber, whereas, MS medium plus 2 mg/L 6-BA, 0.025 mg/L IAA and 4 mg/L KT was beneficial for the elongation of buds. The effects of 6-BA, IAA, ABA on regeneration rates, number of buds and length of buds were similar and more evident than those of KT when the explants were cultured for 2 weeks. Among these 4 phytohormones, 6-BA and ABA were demonstrated to be more effective on regeneration rates, number of buds and length of buds relatively when the explants were cultured for 6 weeks. Although ABA could promote the differentiation of adventitious buds in cucumber, it could suppress the elongation of buds when the explants were cultured for 6 weeks.

Key words: cucumber; phytohormones; cotyledonary nodes; tissue culture