黄瓜子叶节再生体系优化研究*

范爱丽, 孙 艳, 徐凌飞, 梁 东, 邹志荣
(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了TDZ和IBA浓度、苗态、外植体切割和接种方式及基因型对黄瓜子叶节再生体系建立的影响。结果表明, 最佳芽诱导培养基为MS+0.005 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA; 两片子叶脱离种壳且与下胚轴处于弯曲状态的子叶节再生频率最高; 保留单片子叶、下胚轴纵切、切除此子叶的2/3且竖直插入为最佳切割和接种方式; 农城3号为最佳基因型, 每块外植体再生芽数可达1.89。

[关键词] 黄瓜; 子叶节; 再生体系
[中图分类号] Q943.1; S642.204+.3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)09-0069-05

黄瓜离体繁殖可以利用子叶、真叶、下胚轴、胚根、胚和子叶节等外植体, 通过直接分化再生、愈伤组织再生、胚状体再生和原生质体再生等途径再生植株[1-10], 但均不同程度地存在周期长、方法复杂、出芽率和再生频率低、重复性差等一系列问题。子叶节离体繁殖为器官直接分化途径, 可以直接诱导产生丛生芽, 明显缩短培养周期。关于黄瓜子叶节再生体系建立的研究已有一些报道[1, 8-9], 但报道中芽诱导培养基中的TDZ浓度范围较窄[9], 仅为0.02~0.04 mg/L; 外植体苗龄大小也很不一致[1, 5, 7, 9-10]; 接种方式仅采用了竖直插入[8-9], 未与平放方式进行比较; 且报道中[8-9]再生芽为丛生芽, 未能直接成苗。因此, 本试验以黄瓜子叶节为外植体, 就不同浓度TDZ与IBA组合、苗态、切割和接种方式及基因型对建立快速和高频的黄瓜离体植株再生体系的影响进行了研究, 以期为进一步开展黄瓜转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

根据预备试验的结果, TDZ和IBA浓度的筛选、最佳苗态的筛选、外植体切割和接种方式的筛选、芽伸长培养基的筛选等试验均选取最佳黄瓜品种农城3号为试材。在研究基因型对子叶节再生影响时采用了农城3号、西农58和长春密刺3个黄瓜品种。上述黄瓜品种种子均购自西北农林科技大学农城种业中心。

1.2 方 法

1.2.1 培养基的种类 (1)无菌苗获得培养基。在MS基本培养基中添加蔗糖30 g/L, 琼脂7 g/L, pH 5.8。(2)芽诱导培养基。在MS基本培养基中添加不同浓度的TDZ(0, 0.000 1, 0.000 5, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1和0.5 mg/L)和IBA(0, 0.05和0.1 mg/L)。每瓶接种8~10个子叶节, 每个处理共接12瓶, 分3组(重复)。(3)芽伸长培养基。在MS基本培养基中添加不同浓度的KT(0.0, 0.2, 0.5和1.0 mg/L)。

1.2.2 无菌苗的获得 取籽粒饱满的黄瓜种子, 在超净工作台上先用体积分数70%乙醇浸泡30 s, 再用1 g/L升汞溶液浸泡7~8 min, 然后用无菌水冲洗3~5次, 最后平放于无菌苗获得培养基中。培养温度25 ℃, 光照时间16 h/d, 光照强度2 000 lx。

1.2.3 TDZ和IBA浓度的筛选 无菌条件下切取农城3号苗态为两片子叶脱离种壳且与下胚轴处于弯曲状态时的子叶节, 在芽诱导培养基上培养10 d左右后, 将再生芽转接到芽伸长培养基中, 20 d后统计苗数。根据统计结果筛选出TDZ和IBA的最佳浓度组合, 并确定最优的芽诱导培养基。

1.2.4 苗态种类的筛选 为了获得相同生理状态的外植体, 将农城3号不同苗态状况下的子叶节插入确定的最优芽诱导培养基中, 10 d后转接至芽伸

* [收稿日期] 2005-10-17
[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2003C128); 西北农林科技大学专项重点项目(2003-34)
[作者简介] 范爱丽(1975-), 女, 陕西三原人, 在读硕士, 主要从事蔬菜栽培生理与生物技术研究。
[通讯作者] 孙 艳(1964-), 女, 陕西泾阳人, 教授, 硕士, 主要从事蔬菜栽培生理与生物技术研究。E-mail: sunyanma64@sina.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

长培养基中,20 d 后统计苗数,据此结果筛选出最优的外植体苗态。5 种苗态种类为:(1)子叶未脱壳;(2)两片子叶将要脱离种壳,子叶露出部分为绿色;(3)两片子叶脱离种壳且与下胚轴处于弯曲状态;(4)两片子叶展平,第一片真叶未长出;(5)第一片真叶长出。

1.2.5 外植体的切割与接种方式 无菌条件下切取农城3号处于苗态3的子叶节,竖直向下插入或平放于选择的芽诱导培养基中,10 d 后再转接到芽伸长培养基中,20 d 后统计苗数。根据统计结果筛选出最优的子叶节切割和接种方式。子叶节的切割方式有6种:(1)保留单片子叶,下胚轴纵切,去除顶芽,切除此子叶的1/3;(2)保留单片子叶,下胚轴纵切,去除顶芽,切除此子叶的2/3;(3)保留单片子叶,下胚轴纵切,去除顶芽,保留此完整子叶;(4)保留两片子叶,下胚轴不纵切,去除顶芽,切除两片子叶的1/3;(5)保留两片子叶,下胚轴不纵切,去除顶芽,切除两片子叶的2/3;(6)保留两片子叶,下胚轴不纵切,去除顶芽,保留完整子叶。

子叶节的接种方式有2种,即平放于培养基和以下胚轴的形态学下端竖直向下插入培养基。

1.2.6 基因型对黄瓜子叶节再生的影响 无菌条件下切取农城3号、西农58和长春密刺3个黄瓜品种处于苗态3时的子叶节,竖直插入优选出的芽诱导培养基中,10 d 后转接至芽伸长培养基中,20 d 后统计苗数,根据统计结果筛选出最优的基因型。

1.2.7 芽伸长培养基的筛选 选取1.2.3试验中大小一致的诱导芽,研究不同浓度KT 对芽伸长效果的影响。诱导芽在伸长培养基中生长20 d 后切下,分别统计苗高净伸长量和叶片的增加数量,据此结果筛选出最优的芽伸长培养基。

1.3 再生频率与每块外植体再生芽数的计算

再生频率/% = (再生不定芽的外植体数/接种外植体总数) ×100%;

每块外植体再生芽数= 外植体不定芽总数/再生不定芽的外植体总数。

2 结果与分析

2.1 TDZ 和 BA 对黄瓜子叶节再生的影响

由表1可知,在同一BA 浓度下,TDZ 浓度为0.005 mg/L 时的再生频率最高,每块外植体再生芽数也最多,且与其他浓度间差异显著。在TDZ 浓度为0.005 mg/L 时,BA 浓度为0.1 mg/L 的再生频率低于其浓度为0.00和0.05 mg/L,降低率分别为42.18%和47.39%。BA 浓度为0.05 mg/L 的平均再生频率和每块外植体再生芽数虽然与0.00 mg/L 间差异不显著,但在所有TDZ 和 BA 的浓度组合中是最高的。因此,确定0.005 mg/L TDZ+ 0.05 mg/L BA 为芽诱导的最佳培养基。

表1 TDZ 和 BA 对黄瓜子叶节再生的影响

Table 1 Effects of TDZ and BA concentration on regeneration of cucumber's cotyledonary nodes

处理 Treatments	TDZ/(mg·L⁻¹)	BA/(mg·L⁻¹)	外植体数 No. of explants	再生频率/% Regeneration frequency	每块外植体再生芽数 No. of buds per explants	说明 Notes
1	0	0	30	0.0 o	0.0 d	+
2	0.000 1	0	30	0.0 o	0.0 d	+
3	0.000 5	0	30	6.67 n	1.0 c	+ o
4	0.001	0	30	81.0 c	1.71 ab	+ o
5	0.005	0	30	90.0 ab	1.74 ab	o
6	0.01	0	40	71.6 d	1.57 b	o -
7	0.05	0	40	67.5 e	1.63 ab	o -
8	0.1	0	40	52.5 h	1.0 c	o -
9	0.5	0	40	47.0 j	1.0 c	o -
10	0	0.05	30	0.0 o	0.0 d	+
11	0.000 1	0.05	30	3.33 o	1.0 c	+ o
12	0.000 5	0.05	30	16.7 m	1.0 c	+ o
13	0.001	0.05	30	86.7 b	1.79 a	+ o
14	0.005	0.05	30	93.3 a	1.80 a	o
15	0.01	0.05	40	80.0 c	1.68 ab	o -
16	0.05	0.05	40	70.0 de	1.21 c	o -
17	0.1	0.05	40	55.0 gh	1.09 c	o -
18	0.5	0.05	40	50.0 ij	1.0 c	o -

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

续表1 Continued Table 1

处理 Treatments	TDZ/(mg·L⁻¹)	IBA/(mg·L⁻¹)	外植体数 No. of explants	再生频率/% Regeneration frequency	每块外植体再生芽数 No. of buds per explants	说明 Notes
19	0	0.1	30	0.0 o	0.0 d	+
20	0.0001	0.1	30	0.0 o	0.0 d	+
21	0.0005	0.1	30	0.0 o	0.0 d	+
22	0.001	0.1	30	56.7 g	1.05 c	+ o
23	0.005	0.1	30	63.3 f	1.10 c	+ o
24	0.01	0.1	40	40.0 k	1.0 c	+ o -
25	0.05	0.1	40	27.5 l	1.0 c	+ o -
26	0.1	0.1	40	6.5 n	1.0 c	o -
27	0.5	0.1	40	5.0 n	1.0 c	o -

注: "+ "表示细弱的根; "o "表示直接诱导的健壮再生芽; "- "表示松散的愈伤组织。同列数据后标不同小写字母者表示在5%水平上差异显著, 下同。

Notes: "+ "indicating roots are slender; "o "indicating adventitious buds regeneration are strong; "- "indicating Callus is crumbly texture. The different letters in each column indicated the significant difference at 5% level. The following tables are the same.

2.2 外植体苗态对黄瓜子叶节再生的影响

外植体的大小是影响子叶节再生频率的重要内在因素之一。从表2可看出, 黄瓜外植体苗态较小或过大时的再生频率及每块外植体再生芽数均较低, 以苗态3时的再生频率及每块外植体再生芽数最高, 且显著高于其他苗态。因此, 选择苗态3的子叶节为最佳外植体苗态。

表2 不同外植体苗态对黄瓜子叶节再生的影响

Table 2 Effects of different explants stage on regeneration of cucumber's cotyledonary nodes

苗态代码 No. of stage of cotyledon	外植体数 No. of explants	有芽外植体数 No. of explants with buds	出芽数 No. of buds	再生频率/% Regeneration frequency	每块外植体再生芽数 No. of buds per explants
1	30	26	36	86.7 b	1.38 c
2	30	26	45	86.7 b	1.73 b
3	30	28	53	93.3 a	1.89 a
4	30	19	21	63.3 c	1.11 d
5	30	8	8	26.6 d	1.00 e

2.3 外植体的切割与接种方式对黄瓜子叶节再生的影响

由表3可见, 当采用切割方式(2)竖直向下插入外植体时, 子叶节的再生频率最高, 为93.3%; 每块外植体再生芽数也最多, 达到1.89, 且与其他处理之间差异显著。因此, "保留单片子叶, 下胚轴纵切, 去除顶芽并切除此子叶的2/3"是最佳的切割方式, "竖直向下插入"为最佳的接种方式。

表3 外植体的切割方式与接种方式对黄瓜子叶节再生的影响

Table 3 Effects of different cutting treatments and planting methods on regeneration of cucumber's cotyledonary nodes

接种方式 Planting methods	切割处理代码 No. of cutting treatment	外植体数 No. of explants	有芽外植体数 No. of explants with buds	再生频率/% Regeneration frequency	每块外植体再生芽数 No. of buds per explants
竖直插入 Inserting vertically	(1)	30	16	53.3 c	1.13 b
	(2)	30	28	93.3 a	1.89 a
	(3)	30	23	76.6 b	1.17 b
	(4)	30	10	33.3 e	1.10 b
	(5)	30	15	50.0 c	1.20 b
	(6)	30	13	43.3 d	1.15 b
平放 Lying flat	(1)	30	10	33.3 d	1.0 b
	(2)	30	5	16.7 f	1.0 b
	(3)	30	12	40.0 d	1.0 b
	(4)	30	3	10.0 g	1.0 b
	(5)	30	15	50.0 c	1.0 b
	(6)	30	9	30.0 d	1.0 b

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 基因型对黄瓜子叶节再生的影响

从表4可以看出,农城3号和长春密刺2种基因型的再生频率和每块外植体再生芽数间差异不显著,但显著高于西农58。而农城3号的再生频率和每块外植体再生芽数分别比长春密刺高4.2%和11.73%,故农城3号为最佳品系。

表4 基因型对黄瓜子叶节再生的影响

Table 4 Effects of different genotypes on regeneration of cucumber's cotyledonary nodes

基因型 Genotype	外植体数 No. of explants	有芽外植体数 No. of explants with buds	再生频率/% Regeneration frequency	每块外植体再生芽数 No. of buds per explants
农城3号 Nongcheng No. 3	24	24	100.0 a	1.79 a
长春密刺 Changchun mici	24	23	95.8 a	1.58 a
西农58 Xinong No. 58	24	14	58.3 b	1.14 b

2.5 KT浓度对黄瓜幼芽伸长的影响

由表5可以明显看出,当KT的浓度为1.0 mg/L时,芽的伸长效果及叶片的增加量均显著高于其他3个浓度处理。因此,芽伸长培养基中KT的最佳浓度为1.0 mg/L。

表5 KT浓度对黄瓜诱芽伸长与叶片数的影响

Table 5 Effects of KT on cucumber's buds elongation and leaf number increase

KT浓度/(mg·L^{-1}) Concentrations of KT	芽的伸长值/cm Elongation	增加的叶片数 Increasing leaf number
0.0	3.8 c	4.6 d
0.2	4.1 c	5.0 c
0.5	4.6 b	6.0 b
1.0	5.7 a	7.0 a

3 讨 论

TDZ(噻重氮苯基脲,化学名为N~苯基~N′~1,2,3-噻二唑~5~脲)是一种人工合成的苯基脲衍生物,能有效诱导多种离体材料的再生,活性高,用量微。在本试验中观察到,TDZ进行芽诱导的一个显著特点是,同一浓度的TDZ既可以诱导黄瓜子叶节生根,又可促其形成愈伤组织,也可以诱导其直接生芽。当TDZ浓度低于0.001 mg/L时,出现大量生根现象;高于0.01 mg/L时形成愈伤组织,也有芽点产生,但不能直接诱导出芽;高于0.05 mg/L时主要形成愈伤组织。TDZ浓度为0.005 mg/L可以直接诱导黄瓜子叶节再生芽,但诱导出的芽为点状,未能形成正常的幼苗。为了促进幼苗的形成,本试验中添加了一定浓度的BA。生长素BA和细胞分裂素TDZ结合使用,可以调节芽增殖生长和营养生长之间的平衡,故诱导出的再生芽健壮。经过筛选,BA的最佳浓度为0.05 mg/L。本试验筛选TDZ诱导再生芽的最佳浓度为0.005 mg/L,这与张猛[5]的研究结果一致,而赵隽等[9]则认为最佳浓度是0.02 mg/L,但其再生芽为轴状,无叶产生,未形成正常的苗。侯爱菊等[8]只报道当6-BA浓度为0.5 mg/L时,每块外植体上的平均丛生状芽数为3.1~13.2,并未对产生的再生丛生芽质量进行详细描述和分类。本试验中,每块外植体再生芽数为1.89,虽低于侯爱菊等[8]的研究结果,但幼苗十分健壮,且生长势强。这可能主要与基因型不同和生长调节剂种类不同有关。从本试验中观察到的现象及对其他研究者的结果进行综合分析认为,在黄瓜离体培养中使用TDZ时,浓度要适宜,不宜过高或过低,否则不利于芽的产生,这可能与TDZ的作用机理有关[11-16]。

在进行黄瓜离体繁殖时,外植体大小的选择主要以苗龄为依据,认为最佳苗龄为1~7 d的均有报道[1,5,7,9-10],其中有的试验取掉了黄瓜种壳,有的则未取掉。由于同样苗龄的外植体,其生理状态并不相同,且一般情况下黄瓜种子的发芽率和发芽势也有差异,所以本试验采用不同的苗态,可以使试验更趋合理。

子叶节的不同切割处理方式对不定芽的再生频率也有很大影响。在6种不同切割处理中,保留单片子叶、下胚轴纵切、切除此子叶的2/3处理的每块外植体再生芽数最高,达到1.89。由于转基因效率很低,采用单片子叶这种切割方式可以充分利用材料,节约成本。从操作角度而言,将两片子叶分开可以更完全地去除子叶基部的顶芽,因此采用保留单片子叶的处理就更为合理。而赵隽等[9]的最佳切割处理方式是保留两片子叶并切除1/3,这与本试验的最佳切割方式不同。这可能与基因型不同有关。

赵隽等[9]报道,6-BA可促进幼芽伸长,其浓度为0.05 mg/L,但本研究在预备试验中添加了不同浓度的6-BA,发现其对幼芽伸长的促进作用差于KT。张猛[5]认为,激动素KT使幼芽增高的主要原

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因是促进了节间的伸长, 因此本试验添加了KT, 其最佳浓度为1.0 mg/L, 这与张猛最佳浓度为0.5 mg/L 的研究结果有差异。其原因可能与所选的试材有关。

黄瓜的遗传基础较窄, 基因转化是提供外源基因的有效途径。转基因技术利用DNA 重组可使性状在种间转移, 且受体本身主要性状不被改变, 突破了远缘杂交不亲和的障碍, 开辟了植物育种的新途径, 是现代生物技术改良作物品种的关键技术之一, 在农业生产中有着广泛的应用前景。但由于现行的黄瓜遗传转化基本体系不同程度地存在未能直接成苗、周期长、重复性差、出芽率和再生频率低等一系列问题, 因此, 建立快速和高频的黄瓜离体植株再生体系, 是利用转基因技术进行品种改良的前提。

本试验建立的黄瓜子叶节优化再生体系, 采用直接器官发生途径, 不经过脱分化和再分化的过程, 缩短了再生周期, 避免了体细胞变异, 且再生频率高, 在较短的时间内即可获得大量再生植株, 可以作为利用农杆菌介导或基因枪等方法进行黄瓜遗传转化的基本体系。

[参考文献]

[1] 孙兰英, 卢淑雯. 黄瓜组织培养研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2004(4): 25-27.
[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(1): 39-41.
[3] 鲁旭东, 李顺文. 植物激素对黄瓜下胚轴愈伤组织形成的影响[J]. 农业与技术, 1997(5): 16-17.
[4] 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.
[5] 张 猛. 黄瓜遗传转化体系的建立及*Go* 和*Chi*/*Glu* 基因的导入[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2000.
[6] 杨爱馥, 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): 206-209.
[7] 杨东霞. 黄瓜离体再生系统的建立[J]. 丹东纺专学报, 2004, 11(2): 41-42.
[8] 侯爱菊, 朱延明, 杨爱馥, 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.
[9] 赵 隽, 王 华, 潘俊松, 等. 黄瓜子叶节离体再生体系的研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(1): 43-47, 53.
[10] 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.
[11] 杨业正. TDZ 与植物细胞和组织培养[J]. 贵州农业科学, 1991(6): 43-46.
[12] 苑兆和, 杨世忠, 王家喜. TDZ 在组织培养中的生物学效应[J]. 果树科学, 1995, 12(增刊): 138-140.
[13] 徐华松, 徐九龙, 黄学林. TDZ 在植物组织培养中的作用[J]. 广西植物, 1996, 16(1): 77-80.
[14] 陈肖英, 叶庆生, 刘 伟. TDZ 研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 59-63.
[15] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227-237.
[16] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(2): 19-22.

Optimum study of *in vitro* culture and plantlet regeneration system from cotyledonary nodes of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

FAN Ai-li, SUN Yan, XU Ling-fei, LIANG Dong, ZOU Zhi-rong

(*College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: The main factors influencing the plantlet regeneration system from cotyledonary nodes of cucumber (*Cucumis sativus* L.) were discussed. The results showed that concentration of TDZ and IBA, stage of cotyledonary nodes, types of cutting and implantation of explants, and genotypes had effect on establishing the regeneration system of cucumber. The optimum culture medium to induce buds was the medium of MS+ 0.005 mg/L TDZ+ 0.05 mg/L IBA. Stage three of the cotyledonary nodes, which had two cotyledons separating from its husk and were in bent status with its hypocotyl, gave the maximum number of buds per explant. The best way of cutting was to cut hypocotyl longitudinally cut the cotyledon by 2/3 and insert it vertically. Nongcheng No. 3 was the optimum genotype and the maximum number of buds was 1.89 per explant.

Key words: cucumber (*Cucumis sativus* L.); cotyledonary node; regeneration system

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net