

黄瓜子叶节离体体细胞再生体系研究

魏爱民 杜胜利 赵 晶 韩毅科 刘 楠 张桂华 崔兴华

(天津科润黄瓜研究所 300192)

摘要:以华北类型自交系 L04-203 为材料,通过对外植体类型、不定芽诱导培养基、芽伸长培养基等进行研究,建立了以子叶节为外植体通过器官发生方式的黄瓜离体体细胞再生体系。研究表明:附带短下胚轴子叶节为最适外植体;BA/NAA 比例对愈伤形成和再生频率有直接影响,NAA 为零或低浓度时,在外植体切口处直接形成再生芽,随着 NAA 浓度增加,切口处愈伤量增大,最佳芽诱导培养基为 MS + BA/NAA(2/0.2 mg/L),每外植体出芽数可达 3.8;芽伸长培养基为 MS + BA 0.5 mg/L。该体系可用于相关转基因研究。

关键词:黄瓜;子叶节;再生体系

中图分类号:S642.2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)增刊-0020-04

Study on Cucumber Somatic Regeneration System via *in vitro* Cotyledonary Node Culture

WEI Ai-min, DU Sheng-li, ZHAO Jing, HAN Yi-ke, LIU Nan, ZHANG Gui-hua, CUI Xing-hua
(Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: A Northern China cucumber inbred line L04-203 was used as plant material. Through systematic study on explant type, adventitious shoot induction medium and shoot elongation medium, an efficient cucumber somatic regeneration system was established. The results indicated that cotyledonary node with a little bit of hypocotyl was the best explants. Ratio of BA/NAA in the medium has a remarkable influence on regeneration rate and callus induction. Shoots were directly initiated in the incision when NAA concentration was 0 or very low, callus in the incision increased as NAA concentration increased. The optimum induction medium was MS + BA/NAA(2/0.2 mg/L), 3.8 shoots can be obtained per explant. The optimum shoot elongation medium was MS + BA 0.5 mg/L.

Key words: Cucumber(*Cucumis sativus* L.); Cotyledonary node; Regeneration system

黄瓜是栽培面积最大的蔬菜作物之一,黄瓜选育种的重要目标是选育高产、抗病、抗逆等性状的优良品种。应用转基因技术导入外源目的基因,对于应用常规育种技术很难取得突破的目标性状研究,具有重要意义。建立高效稳定的黄瓜离体体细胞再生体系是进行转基因研究的重要前提。

关于黄瓜离体体细胞再生体系研究已有许多报道,研究者通过子叶^[1,2]、子叶节^[3]、下胚轴^[4]、真叶^[5]等外植体建立了多个再生体系,其中子叶节外植体再生能力最强,被认为是最佳外植体,侯爱菊等^[3]建立的以长春密刺为材料,子叶节为外植体体细胞再生体系,再生频率及每外植体出芽数高,分别

为 93.2% 和 13.2。但是,黄瓜子叶节外植体再生过程中,依然存在基因型差异明显、丛生叶较多、节间及顶部簇生雄花等问题。本研究在基因型筛选试验的基础上,以华北类型黄瓜 L04-203 为材料,研究比较了不同子叶节外植体、不同芽诱导培养基、芽伸长培养基对再生频率的影响,以期建立华北类型黄瓜材料的离体体细胞再生体系研究,为进一步的转基因研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

华北类型自交系材料 L04-203。

收稿日期:2011-10-11

基金项目:天津市农科院院长基金项目(08011);天津市滨海新区科技计划项目(2010-BK120038)

作者简介:魏爱民(1972-),女,天津人,副研究员,硕士,主要从事黄瓜生物技术研究。

通讯作者:杜胜利(1963-),男,陕西人,研究员,博士,主要从事黄瓜生物技术及遗传育种研究。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养 挑选籽粒饱满、表面干净的黄瓜种子,在超净工作台上灭菌:75%酒精浸泡1 min,8% NaClO 溶液灭菌15 min,无菌水冲洗3次后,以无菌水浸泡20 min。种子灭菌后接种于1/2MS播种培养基(大量元素减半,其余同MS培养基,附加蔗糖30 g/L、琼脂7 g/L,pH值5.8),放于组培室,暗培养2~3 d,种子出芽后转至光下培养。组培室条件为:(26±2)℃,光照16 h/d,黑暗8 h/d,光照强度为2 000 lx。

1.2.2 子叶及不同子叶节外植体再生频率比较 子叶及子叶节外植体制备:取苗龄4~5 d,种皮未完全脱落,子叶上部黄白色,或种皮脱落,子叶未展开、绿色的无菌苗,按下列方法分别切取外植体:

C1、子叶外植体:切去子叶上端1/2,切去基部子叶,保留中部子叶;

C2、无下胚轴子叶节外植体:切去子叶上端1/2,自子叶基部切去下胚轴,自无菌苗中心部位一分为二,去除生长点;

C3、短下胚轴子叶节外植体:切去子叶上端1/2,自无菌苗中心部位纵切至下胚轴,去除生长点部位,保留1~2 mm下胚轴;

C4、长下胚轴子叶节外植体:切法同C3,但保留下胚轴为3~4 mm。

以上切法每粒种子保留2个外植体。

将不同的外植体接种于相同的不定芽诱导培养基Y0:外植体C1平铺于培养基,其他外植体直立插入培养基,接种后放于组培室内(26±2)℃下培养,前14 d为黑暗培养,后转至光下培养。接种于不定芽诱导培养基30 d后,统计愈伤组织生长、分化情况,同时将丛生芽继代于芽延长培养基S0,培养条件相同,芽长大于1.5 cm时,统计芽再生数量。每处理分3次重复,每次重复接种15个外植体。

1.2.3 不同芽诱导培养基黄瓜离体细胞再生频率比较 研究不同芽诱导培养基对黄瓜离体细胞再生的影响。以C3为外植体,不定芽诱导培养基以MS为基本培养基,蔗糖浓度为30 g/L,琼脂浓度为6 g/L,添加不同浓度的6-BA和NAA,共配制9种不定芽诱导培养基,具体配方见表2,每处理分3次重复,每次重复接种15个外植体,芽延长培养基为S0,培养方法同上。观察和统计愈伤组织量及不定芽分化情况,方法同上。

1.2.4 芽延长培养基的筛选 以C3为外植体,芽诱导培养基为Y0,外植体诱导形成芽丛后,挑选大小近等的芽丛块,继代于不同芽延长培养基,培养

10 d后,统计芽长大于1.5 cm的再生芽,比较其对不定芽伸长的影响。每处理8个外植体,分3次重复。芽延长培养基为MS+BA 0.5 mg/L,蔗糖浓度为30 g/L,琼脂浓度为7 g/L,附加不同浓度的GA₃,具体配方见表3。

1.2.5 生根培养及再生植株驯化、移栽 生根培养基:1/2MS基本培养基,蔗糖浓度为20 g/L,琼脂浓度为7 g/L。

切取长度大于2 cm的不定芽,接种于生根培养基,于培养室光下正常培养。待幼苗根系完整后,取出小植株,洗净根系,移栽到蛭石中,缓苗生长14 d后,移栽下地。

数据统计及分析:依据统计数据,分别计算愈伤诱导率、再生频率、每外植体出芽数。愈伤诱导率=形成愈伤外植体块数/外植体总数×100%,再生频率=出芽外植体块数/外植体总数×100%,每外植体出芽数=总芽数/外植体总数。试验数据采用Duncan新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对黄瓜离体细胞再生的影响

附带较长下胚轴的子叶节外植体,下胚轴伸长生长明显,使外植体受培养基影响较小,不形成愈伤组织,在子叶基部,以直接出芽方式形成不定芽,再生频率较高,但每外植体出芽数低,为1.5,形成的再生苗较细弱;以子叶、无下胚轴子叶节、短下胚轴子叶节为外植体,不定芽分化过程中形成愈伤组织,再生频率低于长胚轴子叶节外植体,但每外植体出芽数高于长胚轴子叶节外植体,其中短下胚轴子叶节外植体每外植体出芽数最高为3.2,再生苗健壮。以子叶为外植体不定芽分化时间较长,统计出芽时间为50 d,需要在原培养基继代一次;而其他3种子叶节外植体不定芽分化时间短,仅需25~30 d,不需要在原培养基重复继代,可统计后直接转入芽伸长培养基培养(表1)。综合比较后认为短下胚轴子叶节为最适外植体。

2.2 不同芽诱导培养基对黄瓜离体细胞再生的影响

由表2可见,NAA浓度为0时,外植体切口不产生愈伤组织,不定芽再生方式为直接器官发生,再生频率较高,但每外植体出芽数较低;随着NAA浓度的提高,外植体切口愈伤量逐渐增加,NAA为0.5 mg/L时,形成较大团块愈伤,但再生频率明显降低,NAA为0.2 mg/L,再生频率及每外植体出芽数均较高,因此认为NAA 0.2 mg/L,为诱导黄瓜离体

体细胞再生的适宜浓度。

表 1 不同外植体类型对离体体细胞再生的影响

Tab. 1 Effects of explant type on cucumber somatic regeneration

外植体编号 Explant code	外植体 Explant type	外植体数 Explant number	愈伤诱导率/% Callus induction rate	再生频率/% Regeneration rate	每外植体出芽数 Shoots per explant	出芽时间/d Days of shoot formation
C1	子叶	45	98	88d	1.8c	50
C2	无下胚轴子叶节	45	100	90c	2.8b	30
C3	短下胚轴子叶节	45	100	92b	3.2a	30
C4	长下胚轴子叶节	45	0	96a	1.5d	30

注: 英文小写字母表示处理间在 0.05 水平上的差异显著性。
Note: Letters within the same row indicate significant difference at 0.05 level.

表 2 不同芽诱导培养基对离体体细胞再生的影响

Tab. 2 Effects of shoot induction medium on cucumber somatic regeneration

诱导培养基 Induction medium	BA /(mg/L)	NAA /(mg/L)	愈伤组织量 Callus amount	愈伤诱导率/% Callus rate	再生频率/% Regeneration rate	每外植体出芽数/个 Shoots per explant
Y1	1	0	-	0	93b	1.0de
Y2	2	0	-	0	98a	0.9ef
Y3	4	0	-	0	97a	0.5f
Y4	1	0.05	+	96	98a	1.4cd
Y5	2	0.05	+	100	90c	1.6c
Y6	4	0.05	+	99	85d	0.6ef
Y7	1	0.2	++	100	92b	2.8b
Y0	2	0.2	++	100	90c	3.8a
Y8	4	0.2	++	100	79e	1.7c
Y9	1	0.5	+++	100	68g	3.4a
Y10	2	0.5	+++	100	70f	1.8c
Y11	4	0.5	+++	100	52h	0.6ef

注: 愈伤量多少以 + 或 - 表示, 其中 - 表示无愈伤, + 表示愈伤量较少, ++ 表示愈伤量中等大小, +++ 表示愈伤团较大。英文小写字母表示处理间在 0.05 水平上的差异显著性。
Note: Amount of callus were indicated by + or -. - indicate no callus; + indicate less callus; ++ indicate medium size callus; +++ indicates large callus. Letters within the same row indicate significant difference at 0.05 level.

BA 浓度为 1 2 mg/L 时,与不同浓度 NAA(0 , 0.05 0.2 0.5 mg/L) 配合组成的诱导培养基,每外植体出芽数明显高于 BA 浓度为 4 mg/L 时,同时, BA 浓度为 1 2 mg/L ,NAA 浓度为(0.05 0.2 0.5 mg/L) 时,平均再生频率也明显高于 BA 浓度为 4 mg/L 时。因此认为 BA 浓度过大(4 mg/L) ,诱导黄瓜离体体细胞再生效果较差。

综上所述认为: NAA 与愈伤组织的形成密切相

关,形成中等量愈伤有利于愈伤组织的继续分化及不定芽的形成,适宜浓度为 0.2 mg/L; BA 是影响不定芽形成的关键因素,BA 浓度过大(4 mg/L) ,诱导黄瓜离体体细胞再生效果较差,适宜浓度为 1 或 2 mg/L。综合分析本试验结果,筛选出诱导黄瓜离体体细胞再生的最适芽诱导培养基为 Y0 ,每外植体最高出芽数为 3.8。

表 3 不同芽延长培养基不定芽伸长的影响

Tab. 3 Effects of different shoot elongation medium

芽伸长培养基 Shoot elongation medium	BA /(mg/L)	GA ₃ /(mg/L)	继代芽丛数 Shoot cluster	每芽丛出芽数/个 Shoots per shoot cluster	再生苗的生长情况 Plantlet growth
S0	0.5	0	24	3.9a	生长较快,叶片舒展
S1	0.5	0.5	24	1.8b	生长较慢,叶片小
S2	0.5	1	24	1.2b	生长慢,叶片小

注: 英文小写字母表示处理间在 0.05 水平上的差异显著性。
Note: Letters within the same row indicate significant difference at 0.05 level.

2.3 不同芽延长培养基对不定芽伸长的影响

相同大小的芽丛,随机采用不同芽延长培养基继代后,每外植体出芽数差异显著:不添加 GA_3 的 S0 培养基每芽丛出芽数最高,为 3.9,同时,再生苗生长较快,叶片较大、舒展;添加 GA_3 后,每芽丛出芽数明显降低,且再生苗生长慢。因此认为在离体细胞培养中, GA_3 并非促进芽伸长的必要因素(表 3)。

3 结论与讨论

外植体是影响黄瓜离体细胞再生频率高低的重要因素。赵隽等^[6]比较了保留单片、两片不同大小子叶的共六种子叶节外植体切割方式对不定芽诱导的影响,认为采用单片完整子叶的处理每外植体出芽数较高,且更为合理。范爱丽等^[7]比较了子叶保留数量、大小、下胚轴是否纵切的子叶节外植体切割方式对不定芽再生频率的影响,认为保留单片子叶、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。研究子叶节外植体细胞再生体系时,子叶节切法大都为切取子叶节并保留 2 mm 左右下胚轴,本研究进一步细化了子叶节外植体切取时附带下胚轴的长度对不定芽再生的影响,表明不带下胚轴与短下胚轴子叶节外植体每外植体出芽数较高,附带较长下胚轴时下胚轴伸长明显,每外植体出芽数较低。

诱导培养基是影响黄瓜离体细胞再生频率高低的关键因素。一般研究认为在培养基中仅添加细胞分裂素或极少量生长素时,外植体以直接器官发生方式形成不定芽,研究者分别建立了多个以子叶节为外植体,芽诱导培养基为不添加生长素的黄瓜离体细胞体系^[8,9]。本研究进一步证实:当 NAA 浓度为 0 时,BA 浓度在 1~4 mg/L 较宽范围内,子叶节外植体不形成愈伤,直接分化不定芽,外植体分化率较高,但每外植体出芽数较低。本研究还发现:不定芽基部形成的愈伤量随 NAA 浓度的增加而增加,愈伤量为中等大小时,每外植体出芽数较高;NAA 浓度较高,愈伤量较大时,内部愈伤容易黄褐化,再生频率较低。在本试验基因型条件下,最佳芽诱导培养基为 MS + BA/NAA(2/0.2 mg/L)。应用该诱导培养基进行不定芽诱导,出芽快,芽健壮,经芽延长培养基培养,70% 可顺利成苗,这与当前研究者建立的子叶节外植体直接不定芽诱导培养结果相同^[3,8]。

芽延长培养基是黄瓜离体细胞再生体系的一

个重要组成, GA_3 常被添加于芽伸长培养基中,认为有利于再生芽伸长生长^[10,11],而本研究添加 GA_3 后,每外植体出芽数降低,再生苗生长减缓,分析原因可能为基因型、芽诱导培养基差异等原因引起不定芽内源激素不同。

张若纬等^[8]以子叶节为外植体,比较了 8 个类型黄瓜自交系材料的再生频率差异,发现华北类型自交系再生频率处在较低水平。本研究以华北类型自交系为材料,经调整细胞分裂素与生长素浓度后,建立黄瓜子叶节离体细胞再生体系,再生频率及每外植体出芽数均较高,分别为 90% 和 3.8,这进一步说明针对不同基因型材料,对黄瓜离体细胞再生体系做适当调整是十分必要的。

参考文献:

- [1] 杜胜利,魏慧军,魏爱民,等.苗龄、基因型和外植体类型对黄瓜离体器官发生的影响[J].天津农业科学,2000,6(4):1-5.
- [2] 王艳蓉,陈丽梅,潘俊松,等.黄瓜子叶高效再生体系得建立与遗传转化[J].上海交通大学学报:农业科学版,2006,24(2):152-156.
- [3] 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.
- [4] Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, et al. In vitro organogenesis and plant formation in cucumber[J]. Biologia Plantarum, 2006, 50: 1, 123-126, 20.
- [5] Burza W, Malepszy S. Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber(*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation[J]. Plant Breeding, 1995, 114(4): 341-345.
- [6] 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.
- [7] 范爱丽,孙艳丽,徐凌飞,等.黄瓜子叶节再生体系优化研究[J].西北农林科技大学学报,2006,34(9):69-73.
- [8] 张若纬,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.
- [9] 冯嘉玥,邹志荣,秦胜华,等.陈修斌.黄瓜子叶节高频再生体系建立及再生植株倍性观察[J].西北植物学报,2008,28(5):956-962.
- [10] 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.
- [11] 贾金生,司龙亭,韩贵超,等.不同基因型黄瓜离体再生及其影响因素的研究[J].河南农业科学,2008,6:99-102.