

网络出版时间:2014-07-09 11:51 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.08.016
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.08.016.html

黄瓜高频再生体系的建立

万旭花,陈书霞,申晓青,陈为峰,张然然,成思琼

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**建立黄瓜的高频再生体系,为黄瓜种质的遗传转化奠定基础。**【方法】**分别以华北型黄瓜种质 26 号、欧洲型黄瓜种质 14-1 为材料,研究不同激素组合、 AgNO_3 质量浓度、苗龄、子叶切割方式及外植体接种方式对黄瓜子叶节不定芽诱导的影响。**【结果】**华北型黄瓜种质 26 号再生的最适激素组合为 4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+1.0 mg/L AgNO_3 ,再生率与再生系数分别可达 85.00%和 2.51;欧洲型黄瓜种质 14-1 再生的最适激素组合为 3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO_3 ,再生率与再生系数分别可达 86.70%和 2.77;5 d 苗龄的黄瓜子叶作为外植体时诱导不定芽的状态最佳;切除子叶端部 2/3 且基部附带有 1 mm 子叶柄、以叶背向下子叶柄微插入的方式进行接种再生效率最高。**【结论】**建立了黄瓜种质 14-1 和 26 号材料的高频再生体系,再生率均可达 85%以上。

[关键词] 黄瓜;再生体系;6-BA;ABA;IAA
[中图分类号] S642.203.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2014)08-0162-07

Establishment of a high-frequency regeneration system for cucumber

WAN Xu-hua, CHEN Shu-xia, SHEN Xiao-qing, CHEN Wei-feng,
ZHANG Ran-ran, CHENG Si-qiong

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

Abstract: **【Objective】** This study aimed to establish a high frequency and rapid regeneration system for cucumber. **【Method】** Using inbred lines of North China type 26 and Europe type 14-1, the effects of hormone combination, AgNO_3 mass concentration, seedling age, cutting way and inoculation way on regeneration rate of cucumber cotyledonary node were studied. **【Result】** The optimum hormone combination for regeneration of North China type 26 was 4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+1.0 mg/L AgNO_3 , with regeneration rate of 85.00% and regeneration coefficient of 2.51. The best hormone combination for regeneration of Europe type 14-1 was 3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO_3 , with regeneration rate of 86.70% and regeneration coefficient of 2.77. The optimal seedling age for cotyledons regeneration was 5 d, and the best inoculation method was cutting two-thirds of front-end with 1 mm cotyledonary petiole and inserting it to the medium with leaf back down. **【Conclusion】** A regeneration system with rate of >85% was established for North China type 26 and Europe type 14-1.

Key words: cucumber; *in vitro* regeneration system; 6-BA; ABA; IAA

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科黄瓜属 1 年生草本植物,具有较高的营养价值和食疗作用,尤

[收稿日期] 2013-05-15
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31071813);陕西省留学人员优先资助项目(A289021202);西北农林科技大学高校基本科研业务费(QN2011088);西北农林科技大学国际合作基金项目(A213021102)
[作者简介] 万旭花(1988—),女,甘肃平凉人,硕士,主要从事蔬菜生理与生物技术研究。E-mail:wanxh@nwsuaf.edu.cn
[通信作者] 陈书霞(1971—),女,河南临颍人,副教授,博士,博士生导师,主要从事蔬菜生理与生物技术研究。
E-mail:shuxiachen@nwsuaf.edu.cn

其是具有独特的清香风味,广受消费者喜爱。在长期的定向选择和育种实践中,人们倾向于选择抗病优质的黄瓜品种,这造成黄瓜遗传基础狭窄,因此常规育种的发展面临着桎梏。利用基因工程进行黄瓜新种质创制已成为重要的手段之一^[1-2],其中通过遗传转化途径进行新种质创制的前提是建立黄瓜的高频再生体系^[3-4]。

关于黄瓜离体再生已有许多报道。前人从不同外植体类型如子叶^[5-6]、子叶节^[7-8]、下胚轴^[9]、真叶^[10],不同的激素组合^[11-14]和苗龄^[15-16]等方面,研究了不同因素对黄瓜再生体系建立的影响,结果表明,不同基因型黄瓜适宜的激素组合及浓度不同^[13-17],子叶切割及接种方式会对黄瓜再生效率产生重要影响^[7-8],由此可见,不同因素对再生频率的影响很大^[17-20]。在具体实践中,仍存在黄瓜再生率较低、重复性差、培养周期长等问题。因此,在实际操作中,需要进一步对上述影响因素进行优化和探索。本试验在前人研究的基础上,对影响欧洲型黄瓜和华北型黄瓜种质再生体系的因素进行了优化研究,以为黄瓜种质的遗传转化奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

华北型黄瓜 26 号种质、欧洲型黄瓜 14-1 种质,均由西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组提供。

1.2 方法

试验在西北农林科技大学园艺学院农业部西北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室进行。

1.2.1 黄瓜无菌苗的获得 挑选颗粒饱满一致的黄瓜种子,用体积分数 75% 的乙醇消毒 90 s,再用体积分数 30% 的次氯酸钠消毒 25 min,期间不断摇动,消毒后用无菌水冲洗 4~5 次,无菌滤纸吸干水分后,接种于装有 MS 培养基的三角瓶中,每瓶接种 8 粒种子,遮光培养 2~3 d 后,置于室温 22~25 ℃、光照时间 16 h/d、光照强度 2 000 lx 条件下培养 5 d,即可获得无菌苗。

1.2.2 黄瓜芽诱导培养基的激素配比 芽诱导培养基为:MS 附加不同质量浓度的 6-BA(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L)和 IAA(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L),MS 附加不同质量浓度的 6-BA(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L)和 ABA(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L),另附加 7 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖,pH 5.8。在上述添加不同激素配比的 MS 培养基上进行芽诱导,每处理接种 30 个外植体,重复 3 次。培

养条件同 1.2.1。芽诱导 10~15 d 后,统计各处理丛生芽诱导及芽生长情况,确定最适宜的芽诱导培养基。

1.2.3 AgNO₃ 质量浓度对黄瓜芽诱导的影响 为了研究 AgNO₃ 质量浓度对黄瓜芽诱导及生长的影响,在筛选出的芽诱导培养基中,分别附加不同质量浓度的 AgNO₃ (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/L),培养条件同 1.2.1。每处理接种 30 个外植体,重复 3 次。培养 2 周后观察统计不定芽数目及生长情况。

1.2.4 苗龄对黄瓜芽诱导的影响 分别以培养 4, 5, 6, 7 d 的 14-1 无菌苗为材料,切去子叶端部 2/3 并附带 1 mm 的子叶柄,采用竖直方式插入 MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO₃ 培养基中,培养条件同 1.2.1。每处理接种 30 个外植体,重复 3 次。培养 2 周后观察统计不定芽数目及生长情况。

1.2.5 子叶切割方式对黄瓜芽诱导的影响 对无菌条件下培养 5 d 的 14-1 无菌苗进行不同方式切割试验,各处理方式如下:完整单片子叶(a1)、切除叶片端部 1/4 子叶(a2)、切除叶片端部 1/2 子叶(a3)、切除叶片端部 2/3 子叶(a4)、切除叶片端部 3/4 子叶(a5),所有处理都附带 1 mm 子叶柄。采用竖直插入方式将上述外植体接种在 MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO₃ 培养基中,培养条件同 1.2.1。培养 2 周后观察并统计不定芽数目及生长情况。

1.2.6 接种方式对黄瓜芽诱导的影响 以 5 d 苗龄的 14-1 无菌苗为材料,切除子叶端部 2/3 并附带 1 mm 的子叶柄,以此为外植体分别以竖直插入(b1)、叶背向下平接(b2)、叶背向下子叶柄微插入(b3)的方式,接种于 MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO₃ 培养基中,培养条件同 1.2.1。培养 2 周后观察并统计再生芽。

1.2.7 黄瓜不定芽的伸长及生根培养 芽伸长培养按照金宝燕等^[21]的方法进行。切取再生芽转入含有 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中进行芽伸长培养,待芽伸长到 1.5 cm 左右,从主茎基部切取伸长的芽转入 1/2 MS 培养基中进行生根培养。

1.2.8 数据调查与统计 接种外植体后进行出芽率及出芽系数的统计^[8]。

再生率 = 出芽外植体数/接种总外植体数 × 100%;

再生系数 = 出芽总数/接种总外植体数。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对黄瓜再生的影响

2.1.1 6-BA 和 IAA 不同质量浓度组合对黄瓜子叶节再生的影响 由表 1 可知,适宜的 6-BA 和 IAA 激素配比能够诱导 14-1 和 26 号黄瓜种质子叶节芽的再生,但不同的激素组合对芽的再生效率不同。随着 6-BA 质量浓度的增大,黄瓜子叶芽再生率和再生系数呈增大趋势,但在一定质量浓度(≥ 2.0 mg/L)的 6-BA 下,芽再生率和再生系数随着 IAA 质量浓度的增大先增加后减小。较低的

6-BA 质量浓度(0.5~1.0 mg/L)及较高的 IAA 质量浓度(0.3~0.5 mg/L)组合时,不能有效地诱导不定芽的产生。在激素组合为 4.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA 的 MS 培养基上,14-1 的子叶节不定芽的再生效果较好,再生率可达 76.70%,再生系数可达 2.08(图 1B)。26 号子叶节的再生随激素质量浓度的变化趋势同 14-1,但其在激素组合为 4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA 的 MS 培养基上再生效率较高,再生芽的生长状态良好,再生率和再生系数分别可达78.67%和 2.10。

表 1 6-BA 和 IAA 不同质量浓度组合对黄瓜子叶节再生的影响

Table 1 Effects of 6-BA and IAA combination on cotyledonary node regeneration of cucumber

6-BA/(mg·L ⁻¹)	IAA/(mg·L ⁻¹)	再生率/% Regeneration rate		再生系数 Regeneration coefficient	
		14-1	26	14-1	26
0.5	0.1	10.00 q	6.70 n	1.00 m	1.00 m
	0.2	6.67 r	0.00 p	1.00 m	0.00 n
	0.3	0.00 s	0.00 p	0.00 n	0.00 n
	0.4	0.00 s	0.00 p	0.00 n	0.00 n
	0.5	0.00 s	0.00 p	0.00 n	0.00 n
1.0	0.1	26.67 n	33.33 i	1.50 f	1.70 d
	0.2	17.24 p	0.00 p	1.40 i	0.00 n
	0.3	0.00 s	0.00 p	0.00 n	0.00 n
	0.4	0.00 s	0.00 p	0.00 n	0.00 n
	0.5	37.93 l	0.00 p	1.34 j	0.00 n
2.0	0.1	50.00 k	6.67 o	1.27 k	1.50 g
	0.2	61.43 g	40.00 g	1.42 h	1.50 g
	0.3	63.33 f	60.00 e	1.52 ef	1.61 e
	0.4	53.33 j	66.67 c	1.25 k	2.10 a
	0.5	20.00 o	10.00 m	1.17 l	1.33 j
3.0	0.1	50.00 k	36.67 h	1.53 e	1.36 i
	0.2	76.67 b	56.67 f	2.09 a	1.24 k
	0.3	75.00 c	26.67 j	2.05 b	1.38 h
	0.4	58.62 i	60.00 e	1.82 d	1.56 f
	0.5	33.33 m	16.67 l	1.50 f	1.00 m
4.0	0.1	50.00 k	63.33 d	1.47 g	1.11 l
	0.2	76.70 a	73.33 b	2.08 a	2.02 b
	0.3	73.33 d	78.67 a	2.04 c	2.10 a
	0.4	65.52 e	66.67 c	1.83 d	1.79 c
	0.5	60.00 h	23.33 k	1.25 k	1.00 m

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异达到显著水平($P<0.05$)。下表同。

Note: Different lowercase letters in each column indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

2.1.2 6-BA 和 ABA 不同质量浓度组合对黄瓜子叶节再生的影响 分别对 14-1 和 26 号黄瓜种质的子叶节进行 6-BA 和 ABA 组合的芽诱导试验,10 d 后可见 2 份种质的子叶节处都有芽点出现。在芽诱导培养基上继续培养到 15~18 d 后,子叶节部位有大量丛生芽点出现,且芽点略有伸长。由表 2 可知,不同激素组合对不同基因型黄瓜芽再生率的影响不同。较低质量浓度的 6-BA (0.5~1.0 mg/L)与较高质量

浓度的 ABA(2.0 mg/L)组合时,14-1 种质的子叶节不能诱导出不定芽;而在较低质量浓度的 6-BA (0.5~1.0 mg/L)下,26 号种质的子叶节芽再生率高于 14-1。14-1 种质的子叶节在 3.0 mg/L 6-BA与 2.0 mg/L ABA 组合时再生效果较好,再生率为 78.30%,再生系数为 2.14(图 1C);而 26 号种质的子叶节则在 4.0 mg/L 6-BA 与 1.5 mg/L ABA 组合时再生效果较好,再生率可达 73.33%,再生系数可达 2.08。

表 2 6-BA 和 ABA 不同质量浓度组合对黄瓜子叶节再生的影响

Table 2 Effects of 6-BA and ABA combination on cotyledonary node regeneration of cucumber

6-BA/(mg · L ⁻¹)	ABA/(mg · L ⁻¹)	再生率/% Regeneration rate		再生系数 Regeneration coefficient	
		14-1	26	14-1	26
0.5	0.1	23.30 l	46.67 h	1.29 k	1.21 l
	0.5	13.30 n	53.33 f	1.00 o	1.00 n
	1.0	16.70 m	36.67 i	1.20 l	1.00 n
	1.5	10.00 o	23.33 l	1.33 j	1.14 m
	2.0	0.00 t	13.33 m	0.00 p	1.25 k
1.0	0.1	23.30 l	6.67 n	1.43 i	1.00 n
	0.5	2.00 r	33.33 j	1.17 m	1.70 e
	1.0	36.70 j	60.00 d	1.18 m	1.89 c
	1.5	3.00 q	53.33 f	1.11 n	1.88 c
	2.0	1.00 s	56.67 e	1.00 o	1.71 e
2.0	0.1	33.30 k	30.00 k	1.50 h	1.22 l
	0.5	43.30 h	33.33 j	1.31 jk	1.60 g
	1.0	53.30 f	66.67 c	1.53 f	2.10 b
	1.5	56.70 e	66.67 c	1.73 d	1.65 f
	2.0	40.00 i	56.67 e	1.58 f	2.18 a
3.0	0.1	4.00 p	40.00 i	1.33 j	1.50 i
	0.5	46.70 g	23.33 l	1.21 h	1.43 j
	1.0	53.30 f	70.00 b	1.87 c	1.86 c
	1.5	73.30 b	50.00 g	2.08 b	1.20 l
	2.0	78.30 a	60.00 d	2.14 a	1.83 d
4.0	0.1	40.00 i	60.00 d	1.50 h	1.67 f
	0.5	33.30 k	36.67 i	1.30 k	1.55 h
	1.0	43.30 h	66.67 c	1.54 g	1.55 h
	1.5	60.00 d	73.33 a	2.00 b	2.08 b
	2.0	63.30 c	50.00 g	1.70 e	1.27 k

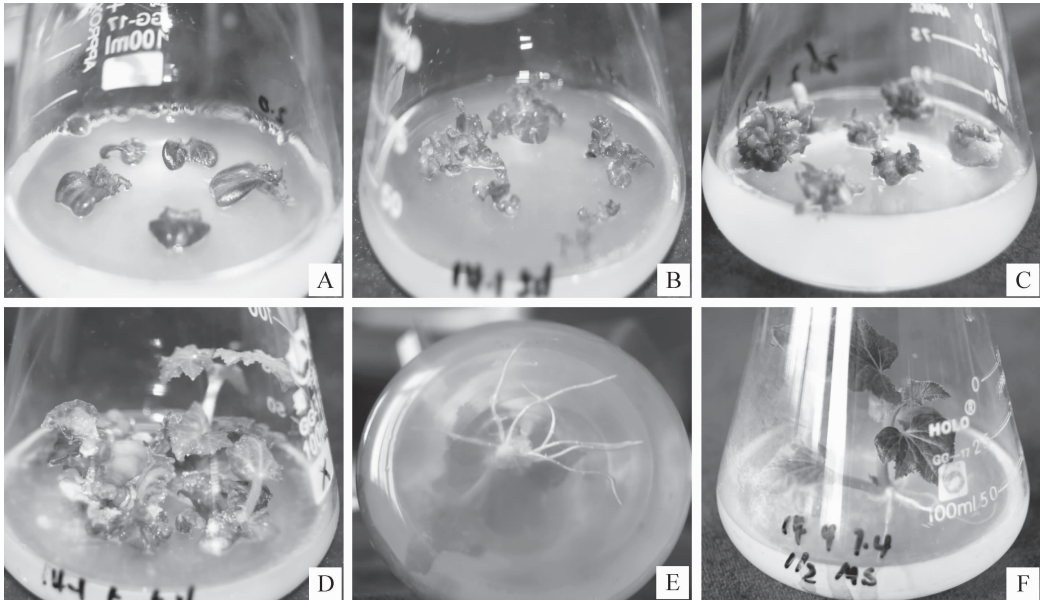


图 1 黄瓜种质 14-1 子叶节芽的再生过程

A. 子叶节开始产生不定芽;B. 6-BA 与 IAA 组合诱导产生的不定芽;C. 6-BA 与 ABA 组合诱导产生的不定芽;
D. 不定芽的伸长;E. 生根;F. 黄瓜再生植株

Fig. 1 Regeneration process of adventitious buds from cotyledonary node of cucumber 14-1

A. Cotyledon nodes started to generate adventitious buds;B. Adventitious buds induced by 6-BA and IAA combination;
C. Adventitious buds induced by 6-BA and ABA combination;D. Elongation of adventitious buds;
E. Regenerated roots;F. Regenerated cucumber plants

2.2 AgNO₃ 质量浓度对黄瓜子叶节再生的影响

14-1 和 26 号黄瓜种质的子叶节分别在添加 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L ABA、4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA 的 MS 培养基上,进行不同 AgNO₃ 质量浓度对黄瓜子叶节再生的影响试验,结果见表 3。由表 3 可知,0.5~1.5 mg/L 的 AgNO₃

对黄瓜子叶节不定芽的生成都有促进作用,且与不加 AgNO₃ 时相比差异显著,其中以 AgNO₃ 为 1.0 mg/L 时再生效果最好,14-1 和 26 号的再生率分别达到 86.70%和 85.00%,再生系数分别达到 2.77 和 2.51;当 AgNO₃ 质量浓度≥2.0 mg/L 时芽的再生受到抑制,再生率和再生系数降低。

表 3 AgNO₃ 质量浓度对黄瓜子叶节再生的影响

Table 3 Effects of AgNO₃ mass concentration on cotyledonary node regeneration of cucumber

AgNO ₃ /(mg·L ⁻¹)	再生率/% Regeneration rate		再生系数 Regeneration coefficient	
	14-1	26	14-1	26
0	78.33 d	78.67 d	2.14 d	2.10 d
0.5	79.21 c	81.33 b	2.17 c	2.12 c
1.0	86.70 a	85.00 a	2.77 a	2.51 a
1.5	82.00 b	81.10 c	2.50 c	2.34 b
2.0	66.70 e	75.30 e	2.62 b	1.71 e
2.5	65.10 f	70.50 f	2.05 e	1.55 f
3.0	43.33 g	44.30 g	1.75 f	1.51 f

2.3 苗龄对黄瓜子叶节再生的影响

在 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L ABA + 1.0 mg/L AgNO₃ 的 MS 培养基上,进行不同苗龄对 14-1 黄瓜种质子叶节再生的影响试验,结果见表 4。由表 4 可知,4 d 和 7 d 苗龄黄瓜无菌苗子叶节的再生率和再生系数都较低,4 d 的无菌苗子叶呈黄绿色,极其幼嫩,子叶节不能再生;7 d 的无菌苗 2 片子叶已完全展开,呈深绿色且生长点较大,但子叶节的再生率仅有 51.00%;5 d 苗龄的子叶节再生能力最强,再生率可达 87.35%,再生系数可达 3.38。说明外植体的生理状态对子叶节再生至关重要。

表 4 苗龄对黄瓜 14-1 种质子叶节再生的影响

Table 4 Effects of seeding age on cotyledonary node regeneration of cucumber

苗龄/d Seeding age	再生率/% Regeneration rate	再生系数 Regeneration coefficient
4	0.00 d	0.00 d
5	87.35 a	3.38 a
6	70.93 b	2.95 b
7	51.00 c	1.13 c

2.4 子叶切割方式对黄瓜子叶节再生的影响

在 MS 培养基中附加 3.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L ABA + 1.0 mg/L AgNO₃,对 5 d 苗龄的 14-1 黄瓜种质进行子叶切割方式试验,结果(表 5)表明,黄瓜子叶节的大小和部位对再生都有影响,以 a4 再生力最强,即切除子叶端部 2/3 且带有 1 mm 子叶柄时,再生率达 81.53%,再生系数达 2.09。

表 5 子叶切割方式对黄瓜 14-1 种质子叶节再生的影响

Table 5 Effects of cutting way on cotyledonary node regeneration of cucumber

子叶切割方式 Cutting way of cotyledons	再生率/% Regeneration rate	再生系数 Regeneration coefficient
a1	10.00 e	1.00 d
a2	63.33 c	1.51 c
a3	76.70 b	1.95 b
a4	81.53 a	2.09 a
a5	52.00 d	1.47 c

注:子叶切割方式 a1~a5 与 1.2.5 节一致。

Note:The cutting ways (a1—a5) were described in section 1.2.5.

2.5 接种方式对黄瓜子叶节再生的影响

接种方式对黄瓜子叶节再生也有一定的影响。接种方式对黄瓜种质 14-1 子叶节再生的影响见表 6。

表 6 接种方式对黄瓜种质 14-1 子叶节再生的影响

Table 6 Effects of inoculation way on cotyledonary node regeneration of cucumber

接种方式 The inoculation of cotyledon	再生率/% Regeneration rate	再生系数 Regeneration coefficient
b1	83.33 b	2.28 b
b2	78.75 c	2.09 c
b3	86.13 a	2.34 a

注:接种方式 b1~b3 与 1.2.6 节一致。

Note:The inoculation ways (b1—b3) were described in section 1.2.6.

由表 6 可知,接种方式对黄瓜子叶节不定芽再生的影响没有其他因素明显,不同接种方式下再生率均可达 80%左右,再生系数可达 2.00 以上,但 3

种接种方式对子叶再生影响仍存在显著差异,以叶背向下子叶柄微插入的接种方式(b3)较其他2种方式的再生力强,再生率可达86.13%,再生系数可达2.34;竖直插入方式(b1)再生力强于叶背向下平接方式(b2)。

2.6 黄瓜再生芽的伸长及生根

将再生的不定芽转入加有0.5 mg/L 6-BA的MS培养基中,10 d左右芽伸长至1.5 cm(图1D),将其从基部切下转入1/2 MS培养基中,5~7 d后有白色的根形成(图1E),10 d左右大量根产生,形成生理状态良好的再生植株(图1F)。

3 讨 论

黄瓜再生能力弱,且不同基因型、外植体类型对其再生的影响都有很大差异^[22]。何晓明等^[5]、侯爱菊等^[19]研究表明,黄瓜可通过直接分化再生、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,而子叶一般作为黄瓜再生较理想的外植体,可直接通过器官分化途径诱导产生丛生芽,缩短培养周期。本研究以欧洲型黄瓜14-1和华北型黄瓜26号为试验材料,以子叶为外植体分析了多个因素对黄瓜子叶节再生的影响,建立了黄瓜14-1和26号种质材料的高频再生体系,为外源基因的遗传转化奠定了基础。

本研究结果表明,对于欧洲水果型黄瓜材料14-1最适的激素配比是3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L ABA+1.0 mg/L AgNO₃,在此诱导条件下再生率可达86.70%,再生系数可达2.77,与其他激素组合有显著差异。由于是通过器官直接发生途径,因此此过程中最好不要产生过多的愈伤组织,而6-BA和ABA组合可抑制愈伤组织的形成,提高芽分化率。王艳蓉等^[11]对S05和S06 2个黄瓜基因型的芽诱导试验也得出了相似的结论,但其试验中6-BA质量浓度是3.0 mg/L,ABA的质量浓度为0.5~1.0 mg/L。华北型自交系黄瓜材料26号适宜的芽诱导激素组合是4.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+1.0 mg/L AgNO₃,在此诱导条件下再生率可达到85.00%,再生系数可达到2.51。薛丹丹等^[12]对津研4号芽的诱导试验表明,在激素组合未加AgNO₃的条件下,同为华北型的津研4号出芽率和出芽系数分别为85.00%和2.51。此外,赵隽等^[7]和赵宇瑛等^[13]的研究也表明,华北型黄瓜较适宜的激素组合是6-BA和IAA。14-1和26号黄瓜材料的最适芽诱导激素组合不同,这主要是由于基

因型不同所致。

研究表明,AgNO₃可有效促进器官发生^[23],在芽诱导培养基中添加一定质量浓度的AgNO₃,对不定芽的诱导有促进作用。本试验结果也表明,未加AgNO₃时,6-BA+IAA组合子叶切口处产生的愈伤组织较6-BA+ABA组合多,添加AgNO₃后则不易产生愈伤组织,说明AgNO₃抑制了愈伤组织的形成。本研究中1.0 mg/L的AgNO₃对芽诱导效果最好,这与李建欣等^[24]的结果一致。还有研究表明,促进黄瓜不定芽再生的AgNO₃质量浓度为2.0 mg/L^[11-20],这可能是由于所使用材料的基因型及其生理状态等因素不同所致。遗传转化相关研究也表明,向黄瓜再生和筛选培养基中添加一定质量浓度的AgNO₃能够有效促进抗性芽的再生,说明AgNO₃在遗传转化中对于抗性芽的再生具有关键作用^[25-27]。

苗龄是影响黄瓜再生的关键因子之一,不同苗龄的子叶再生能力是不同的。Colijn-Hooymans等^[15]报道,再生能力与无菌苗的发育阶段有关,当子叶处于垂直生长阶段,其再生频率较高,而当子叶处于水平生长(2片子叶张开)阶段时,其再生能力显著降低。本研究表明,5 d苗龄的无菌苗,子叶全部转绿,2片子叶呈竖直状态且微分开时芽的再生效果最好,随着苗龄的增大,其再生率降低。这与韩欣等^[16]、薛丹丹等^[12]的研究结果一致;而赵隽等^[7]研究认为,10 d苗龄的黄瓜子叶再生效果较好,Colijn-Hooymans等^[15]发现苗龄为3~5 d的子叶外植体的不定芽发生率最高,梅茜等^[14]则认为1~2 d苗龄的芽再生率较高。上述研究结果的差异,主要是由基因型、生理状态、培养条件等因素造成的。

黄瓜再生可通过子叶、真叶、下胚轴、胚根、胚和子叶节等外植体进行,但较为理想的再生方式是子叶再生,其子叶的大小和部位又是影响再生的关键因素。赵隽等^[7]研究表明,保留2片子叶,且各切除子叶的1/3时外植体出芽最好;范爱丽等^[8]认为,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。本研究结果表明,切除子叶端部2/3并带有1 mm子叶柄时再生率可达81.53%,再生系数可达2.09,且以叶背向下子叶柄微插入的方式接种,其不定芽的再生最好。

黄瓜再生体系研究中关于外植体具体的接种方式目前没有详细的阐述,大多数研究是以平铺方式进行的,范爱丽等^[8]认为竖直插入为最佳的接种方式,本试验以叶背向下子叶柄微插入培养基的方式

接种芽的再生最佳。外植体的接种方式对不定芽再生造成的影响可能与植物体的极性有关,具体机理还需进一步探究。

[参考文献]

[1] Liu L Y,Duan L S,Zhang J C,et al. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) over-expressing cold-induced transcriptome regulator ICE1 exhibits changed morphological characters and enhances chilling tolerance [J]. *Scientia Horticulturae*,2010,124:29-33.

[2] Tabei Y,Kitade S,Nishizawa Y. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. *Plant Cell Reports*,1998,17:159-164.

[3] Kielkiewicz M,Gajc-Wolska J,Slusarz S,et al. Growth development and yield of transgenic 35S-thaumatin II-expressing cucumber plants-open field evaluation [J]. *Scientia Horticulturae*,2012,143:82-91.

[4] 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.

Zhang R W,Gu X F,Wang Y,et al. Effects of genotypes and 6-BA on regeneration frequency of cotyledonary nodes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *China Vegetables*,2009(22):45-48. (in Chinese)

[5] 何晓明,林毓娥. 黄瓜子叶和下胚轴的离体培养 [J]. *植物生理学通讯*,2001,37(5):423-424.

He X M,Lin Y E. *In vitro* culture of cotyledon and hypocotyl in *Cucumis sativus* [J]. *Plant Physiology Communications*,2001,37(5):423-424. (in Chinese)

[6] 杜胜利,魏惠军,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.

Du S L,Wei H J,Wei A M,et al. Effects of seedling stage, genotype and explant type on *in vitro* somatic organogenesis of cucumber [J]. *Tianjin Agricultural Science*,2000,6(4):1-5. (in Chinese)

[7] 赵 隼,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):43-53.

Zhao J,Wang H,Pan J S,et al. *In vitro* culture and plantlet regeneration from cotyledonary nodes of cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition*,2004,22(1):43-53. (in Chinese)

[8] 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:自然科学版*,2006,34(9):69-73.

Fan A L,Sun Y L,Xu L F,et al. Optimum study of *in vitro* culture and plantlet regeneration system from cotyledonary nodes of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*,2006,34(9):69-73. (in Chinese)

[9] 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.

Zhao X J,Wu D H. Tissue culture of cucumber [J]. *Journal of South China Agricultural University*,1998,19(4):125-126. (in

Chinese)

[10] 董灵迪. 黄瓜组织培养研究 [J]. *西南农业大学学报*,2000,22(1):23.

Dong L D. Studies on tissue culture cucumber [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*,2000,22(1):23. (in Chinese)

[11] 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.

Wang Y R,Chen L M,Pan J S,et al. Establishment of high effective regeneration system in cucumber(*Cucumis sativus* L.) and agrobacterium tumefaciens mediated genetic transformation [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition*,2006,24(2):152-156. (in Chinese)

[12] 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.

Xue D D,Zhang F S,Wang B J,et al. The regeneration system of cucumber [J]. *Northern Horticulture*,2010(7):119-121. (in Chinese)

[13] 赵宇瑛,李永辉,李丛玉,等. 6-BA、NAA 和 IAA 对黄瓜子叶离体培养分化的影响 [J]. *长江大学学报:自然科学版*,2007,4(3):26-28.

Zhao Y Y,Li Y H,Li C Y,et al. Influences of 6-BA,NAA and IAA on cotyledons differentiation of cucumber *in vitro* [J]. *Journal of Yangtze University: Natural Science Edition*,2007,4(3):26-28. (in Chinese)

[14] 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.

Mei Q,Zhang X G. Studies on tissue culture cucumber [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*,2002,24(3):266-267. (in Chinese)

[15] Colijn-Hooymans C M,Hakkert J C,Jansen J J. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages [J]. *Plant Cell,Tissue and Organ Culture*,1994,39:211-217.

[16] 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.

Han X,Zhang W H,Cao Q W,et al. The establishment of regeneration system from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L. [J]. *Jilin Vegetables*,2009(2):86-87. (in Chinese)

[17] 张卫华,朱妍妍,王志峰,等. 三个不同基因型黄瓜再生体系的优化研究 [J]. *山东农业科学*,2007(6):5-7.

Zhang W H,Zhu Y Y,Wang Z F,et al. Studies on optimizing cucumber regeneration system of three different genotypes [J]. *Shandong Agricultural Sciences*,2007(6):5-7. (in Chinese)

[18] 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.

Yu Y J,Zhu Q J. Embryoid induction aud plantlet regeneration in mature embryos of cucumber *in vitro* [J]. *Plant Physiology Communications*,1992,28(1):37-39. (in Chinese)

Chinese)

[25] Kim J H, Kim S G, Kim M S, et al. Different structural modifications associated with development of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans* [J]. Plant Pathol J, 2009, 25(1): 1-5.

[26] 周志权, 廖永梅, 林敏敏. 银杏疫病原种的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(1): 30-34.

Zhou Z Q, Liao Y M, Lin M M. Identification of *Phytophthora species* causing ginkgo wilt [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(1): 30-34. (in Chinese)

[27] 王爱英, 楼兵干, 徐 同. 寡雄腐霉分泌物对植物病原真菌的抑制作用及其对番茄灰霉病的防治效果 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(1): 57-60.

Wang A Y, Lou B G, Xu T. Inhibitory effect of the secretion of *Pythium oligandrum* on plant pathogenic fungi and the control effect against tomato gray mould [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 34(1): 57-60. (in Chinese)

[28] 朱云枝, 强 胜. 马唐生防真菌弯孢霉菌株一的生物学特性研究 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 524-529.

Zhu Y Z, Qiang S. The biological characteristics of strain QZ-200 of *Curvularia* sp. for controlling *Digitaria sanguinalis* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(6): 524-529. (in Chinese)

[29] 罗利娟, 习平根, 姜子德, 等. 纯培养下拟茎点霉分生孢子的形成及意义 [J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 375-380.

Luo L J, Xi P G, Jiang Z D, et al. Taxonomic significance of conidial formation of *Phomopsis* in pure culture [J]. Mycosystema, 2004, 23(2): 375-380. (in Chinese)

[30] 陈中坚, 王 勇, 曾 江, 等. 三七植株的性状差异及其对三七产量和质量影响的调查研究 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 357-359.

Chen Z J, Wang Y, Zeng J, et al. Studies on characteristic distinction and its affect on yield and quality of *Panax notoginseng* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001, 32(4): 357-359. (in Chinese)

[31] Lee C, Kim K Y, Lee J E, et al. Enzymes hydrolyzing structural components and ferrous ion cause rusty-root symptom on ginseng (*Panax ginseng*) [J]. J Microbiol Biotechnol, 2011, 21(2): 192-196.

[32] Morris L L, Mann L K. Wound healing, keeping quality, and compositional changes during curing and storage of sweet potatoes [J]. Hilgardia, 1955, 24: 143-183.

(上接第 168 页)

[19] 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.

Hou A J, Zhu Y M, Yang A F, et al. Main factors influencing the frequency of direct organogenesis of cucumber *in vitro* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(1): 101-103. (in Chinese)

[20] 张若纬, 顾兴芳, 王 烨, 等. 不同黄瓜基因型子叶再生体系的建立 [J]. 华北农学报, 2010, 25(增刊): 50-54.

Zhang R W, Gu X F, Wang Y, et al. Regeneration system establishment from cotyledons in different cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(Suppl.): 50-54. (in Chinese)

[21] 金宝燕, 苏 华, 任华中. 影响黄瓜直接不定芽诱导的品种等因素研究 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 45-48.

Jin B Y, Su H, Ren H Z. Effects of cultivar etc on direct shoot induction from cotyledonary nodes of cucumber [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(6): 45-48. (in Chinese)

[22] Sarmiento G S, Alpert K, Tang F A. Factors influencing agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and expression of kanamycin resistance in Pickling cucumber [J]. Plant Cell Organ Cult, 1992, 31: 185-193.

[23] 张 鹏, 凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究 [J]. 植物学报, 1995, 37(11): 902-908.

Zhang P, Ling D H. Enhancement of plant regeneration rate of *Brassica parachinensis* cultured *in vitro* [J]. Acta Botanica Sinica, 1995, 37(11): 902-908. (in Chinese)

[24] 李建欣, 李建吾, 葛桂民. 黄瓜子叶离体再生体系研究 [J]. 长江蔬菜, 2008(1): 44-46.

Li J X, Li J W, Ge G M. *In vitro* culture and plantlet regeneration from cotyledon of *Cucumis sativus* L. [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2008(1): 44-46. (in Chinese)

[25] 赖 来, 潘俊松, 何欢乐, 等. 农杆菌介导的 *MADS-box* 基因转化黄瓜初步研究 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2007, 25(4): 374-382.

Lai L, Pan J S, He H L, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with *MADS-box* like gene [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science Edition, 2007, 25(4): 374-382. (in Chinese)

[26] Perl A, Aviv D, Galun E. Ethylene and *in vitro* culture of potato: Suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, planting efficiency and transient expression of an alien gene [J]. Plant Cell Rep, 1988, 7: 403-406.

[27] DeBlock M, DeByouwer D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica deracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants [J]. Plant Physiol, 1989, 91: 694-701.