

苗龄与基质对黄瓜转基因组培苗驯化成活率的影响

缪旻珉 徐冉 郑丽娟 周红莲

摘要 以黄瓜转基因组培苗为材料,研究了不同苗龄、栽培基质和移栽前培养基中的蔗糖浓度对组培苗根系发育及驯化成活率的影响。结果表明:将转基因组培苗置于蔗糖浓度为6%的1/2 MS培养基中生长28 d,随后移至蔗糖浓度为3%的培养基中培养7 d,在组培苗六叶一心时,移栽于草炭:珍珠岩:河沙=1 V:1 V:1 V的基质中驯化,最有利于组培苗根系的发育,驯化成活率可达98.7%,且经驯化成活的植株均能正常开花结果。

关键词 黄瓜 组培苗 驯化成活率 苗龄 基质 蔗糖浓度

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)栽培资源的遗传背景十分狭窄,依赖传统育种方法进一步提高现有品种对生物与非生物胁迫的抗性受到了很大的限制^[1]。而利用转基因技术,引入现有栽培资源中不具备的抗性基因,创造黄瓜新种质,是解决这一瓶颈问题的有效途径之一。大多数转基因操作都要使用组织培养技术,而移栽驯化是组织培养的最后环节,如这一环节的成活率较低,将会导致一些已获得目的基因、有应用前景的转基因植株死亡。黄瓜叶片较大,蒸腾旺盛,根系再生能力差;加上转基因组培苗因长期在抑菌抗生素和筛选抗生素下生长,长势较弱。因此,在对黄瓜转基因组培苗进行移栽驯化的过程中,获得接近100%的成活率有一定的难度。为此,笔者利用本课题组获得的黄瓜转基因组培苗,对影响其驯化成活率的主要因素进行了分析,以期对黄瓜转基因育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

本课题组以天津科润黄瓜研究所津研4号为材料,用含有双元载体 pCambia1303[含有 β -葡萄糖醛酸酶基因(*GUS*)]的农杆菌(菌株为GV31030)

转化,获得了大量具有潮霉素抗性的组培苗。从中选择经PCR法和GUS染色检验呈阳性、生长整齐一致的黄瓜转基因组培苗为材料,于2007年4~6月在扬州大学蔬菜试验温室开展驯化试验。

1.2 方法

转基因组培苗移栽前的生根培养基为1/2 MS固体培养基,蔗糖浓度为3%,不含植物激素,用作筛选的潮霉素浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以常规500 mL三角瓶为容器,每瓶含培养基100 mL。驯化时先将不同苗龄的组培苗置于温室自然光照条件下闭瓶锻炼2 d,然后逐步开瓶锻炼,2 d后完全开瓶,将开瓶锻炼后的苗取出,仔细洗去根部培养基后移栽。温室温度保持白天22~28℃,夜间15~18℃。成活前保持接近100%的空气相对湿度,每天用1/4 MS大量元素营养液浇灌根系,植株缓苗后按普通黄瓜正常栽培管理直至开花结果。

苗龄(因素A)设置3个水平:A1,四叶一心;A2,六叶一心;A3,八叶一心。基质(因素B)设置3个处理:B1,草炭:珍珠岩=1 V:1 V;B2,草炭:珍珠岩:河沙=1 V:1 V:1 V;B3,瓜类专用育苗基质(淮安柴米河基质肥料有限公司)。共2因素9个处理组合,每处理组合共20株苗,2次重复,2因素随机区组设计。调查各处理转基因组培苗的驯化成活率,以移栽后能生长至正常开花结果作为成活的标准。

在探明对驯化成活有利的苗龄和基质配方后,选择六叶一心时的转基因组培苗移栽至草炭:珍

缪旻珉,博士,副教授,扬州大学园艺与植物保护学院,扬州市大学南路88号,225009, E-mail: mmmiao@yzu.edu.cn

徐冉,郑丽娟,周红莲,扬州大学园艺与植物保护学院

收稿日期:2008-03-27;修回日期:2008-05-13

基金项目:江苏省高校自然科学基金重点项目(04KJA210158)

珠岩:河沙=1 V:1 V:1 V的基质中。移栽前的生根培养基为1/2 MS培养基,设置蔗糖浓度3%、6%、9%,以及先将组培苗置于蔗糖浓度为6%的生根培养基中生长28 d、随后移至蔗糖浓度为3%的培养基中培养7 d,共4个处理。每处理50株,2次重复。移栽时调查组培苗的根长、单株根数,并采用TTC法测定组培苗根系活力^[2]。调查各处理的驯化成活率。

试验数据分析均采用PLSD法,驯化成活率数据经反正弦转换后再进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 苗龄和基质组合对转基因组培苗驯化成活率的影响

由表1、2可知,移栽时的苗龄和驯化基质对黄瓜转基因组培苗的驯化成活率均有极显著的影响,但两因素之间无明显互作效应。3种苗龄中以六叶一心时移栽为最佳,3种基质中以草炭:珍珠岩:河沙=1 V:1 V:1 V的驯化成活率最高。各处理组合以A2B2为最佳。

表1 苗龄与基质对组培苗驯化成活率影响的方差分析

变异来源	df	SS	MS	F _{0.01}
区组间	1	18.727	18.727	
处理间	8	1 664.841		
苗龄间(A)	2	959.787	479.894	94.37**
基质间(B)	2	636.026	318.013	62.54**
A×B	4	69.027	17.257	3.39
试验误差	8	40.679	5.085	
总变异	17			

注:**表示差异极显著(α=0.01)。

表2 苗龄和基质组合对组培苗驯化成活率的影响

处理	驯化成活率/%	处理	驯化成活率/%
A2B2	92.5 aA	A3B2	67.5 cdCD
A1B2	87.5 abAB	A1B1	62.5 dD
A2B3	82.5 bB	A3B1	52.5 eE
A1B3	72.5 cC	A3B3	47.5 eE
A2B1	72.5 cC		

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(α=0.05),不同大写字母表示差异极显著(α=0.01),下表同。

2.2 生根培养基蔗糖浓度对转基因组培苗驯化成活率的影响

由表3可知,4种蔗糖浓度处理中,以先将组培苗置于蔗糖浓度为6%的生根培养基中生长28 d、随后移至蔗糖浓度为3%的培养基中培养7 d最有利于组培苗根系的发育,并能提高移栽驯化的成活率。

表3 蔗糖浓度对组培苗发育及驯化成活率的影响

蔗糖浓度	平均根长	单株根数	根系活力	驯化成活率
	cm	根	mg·g ⁻¹ ·h ⁻¹	%
3%	3.6 a	5 a	3.67 b	92.5 a
6%	3.5 a	7 b	3.86 b	94.3 b
9%	3.5 a	5 a	2.45 a	91.6 a
6%→3%	3.7 a	10 c	5.76 c	98.7 c

3 结论与讨论

本试验中,处于四叶一心期的组培苗单株根数尚少,出瓶后的适应能力较差;处于八叶一心期的组培苗通常已在三角瓶中生长2个月左右,植株已充满培养容器,生长受到一定的限制,且培养基中的养分消耗较多,根系老化,新根发生能力下降,同样也不利于驯化成活;而六叶一心则为比较合适的移栽苗龄。本试验中,经驯化成活的植株,均能正常开花结果,其表型与未经转化的津研4号黄瓜一致,并未发现生长异常现象。基质试验中,由于草炭、珍珠岩等基质价格较高,因此,拟用较便宜的瓜类育苗专用基质替代,但黄瓜转基因组培苗在育苗专用基质上成活率较低,并未达到预期效果。

蔗糖浓度如何影响组培苗根系发育则存在两种观点:一是驯化前应减小蔗糖浓度,使之更接近出瓶后的自然环境,有利于成活^[3];二是让幼苗生长在较高浓度的蔗糖环境中,使幼苗积累更多的养分,有利于适应自然环境^[4]。本试验结果表明,生根培养基中先高后低的蔗糖浓度最有利于黄瓜组培苗根系的生长,这可能是由于前期较高的蔗糖浓度使幼苗积累了较多的养分,而后期较低的蔗糖浓度有利于组培苗由人工培养环境向自然环境过渡。

参考文献

- [1] Qian C T, Jahn M M, Staub J E, Luo X D, Chen J F. Meiotic chromosome behavior in an allotriploid derived from an amphidiploid × diploid mating in *Cucumis* [J]. *Plant Breeding*, 2005, 124:272-276.
- [2] 赵世杰,刘华山,董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [3] Kozai T, Kubota C, Jeong B R. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51:49-56.
- [4] van Huylenbroeck J M, Debergh P C. Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlet [J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 96:298-304.

丝瓜种质资源遗传多样性的形态和 RAPD 标记分析

夏军辉 向长萍

摘要 应用形态标记和 RAPD 标记对 26 份丝瓜种质材料进行遗传多样性和亲缘关系分析。所观察的 44 个形态性状变异系数为 5.27%~107.00%，平均变异系数为 32.75%。从 200 个随机引物中筛选出 16 个引物，共扩增出 145 条带，多态性带有 125 条，多态性比率为 86.21%，平均 Shannon 多样性信息指数为 0.325。基于形态标记的聚类分析将 26 份丝瓜种质分为普通丝瓜和有棱丝瓜两大类。基于 RAPD 标记的聚类分析将 26 份丝瓜种质也分为两大类，但有 2 份有棱丝瓜种质和普通丝瓜聚为了一类，与形态标记聚类结果不一致。

关键词 丝瓜 遗传多样性 形态标记 RAPD 标记

丝瓜为葫芦科丝瓜属一年生攀缘性草本植物，起源于亚洲热带地区，染色体数 $2n=2x=26$ ，栽培种丝瓜分为普通丝瓜 [*Luffa cylindrica* (L.) M. J. Roem.] 和有棱丝瓜 [*L. acutangula* (L.) Roxb.] 两个种。

我国丝瓜育种起步较晚，对各种丝瓜种质资源的遗传背景及亲缘关系不太清楚，丝瓜杂种优势利

用方面的工作开展得较少，大部分地区生产上仍以栽培常规种为主。目前，RAPD 标记已广泛应用于各种蔬菜种质的遗传多样性研究^[1-9]。本试验选取了来源于国内外的 26 份丝瓜种质(21 份普通丝瓜、5 份有棱丝瓜)，应用形态标记和 RAPD 标记相结合的方法研究种质间遗传多样性和亲缘关系，并对其综合客观评价，以期对丝瓜种质的收集、保存、鉴定、创新、利用以及杂交育种中的亲本选择、选配提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 26 份丝瓜种质中 14 份引自中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家种质资源中期库；12 份

夏军辉，男，华中农业大学园艺林学学院，园艺植物生物学教育部重点实验室，国家蔬菜改良中心华中分中心，武汉 430070，E-mail: xiajh@mail.hzau.edu.cn

向长萍(通讯作者)，华中农业大学园艺林学学院，园艺植物生物学教育部重点实验室，国家蔬菜改良中心华中分中心，武汉 430070，E-mail: chpxiang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2008-01-07;修回日期:2008-04-01

基金项目:三峡库区移民科研项目[(2005)139]

Impacts of Plantlet Age and Cultivation Substrates on Domestication Survival Rate of Transgenic Plantlets of *Cucumis sativus* L.

Miao Minmin, Xu Ran, Zheng Lijuan, et al. (College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Jiangsu 225009)

Abstract Taking transgenic plantlets of *Cucumis sativus* L. as material, we studied the impacts of plantlet age, cultivation substrates and sucrose concentration in rooting media on root development and domestication survival rate of *Cucumis sativus* L. transgenic *in vitro* culture plantlets. The results showed that the best root development and the highest survival rate can be obtained when the plantlets were rooted in 1/2 MS media with 6% sucrose for 28 days and transformed to the same media with 3% sucrose for 7 days, then transplanted in the cultivation substrates of peat: perlite: river sand = 1 V: 1 V: 1 V at 6-true leaf stage.

Key words Cucumber, *in vitro* culture plantlet, Domestication survival rate, Plantlet age, Substrates, Sucrose concentration