黄瓜无菌苗雌花诱导体系的建立

黄作喜[1,2]，王 芳[1]，邱 超[1]，陈 熠[1]，田生辉[1]，徐海英[1]

（1.内江师范学院"特色农业资源研究与利用"高校重点实验室，四川 内江 641112；2.内江师范学院 花卉研究所，四川 内江 641112）

摘 要：研究 Spm 和 IAA 对无菌黄瓜苗雌花诱导的协同作用，及不同外植体、培养基中琼脂含量和 KH_2PO_4 含量对雌花诱导的影响，由此建立了有效的雌花诱导体系。黄瓜去根苗接种在 MS 培养基上，单独添加 Spm、IAA 时的雌花诱导率、雌花数偏低或为 0，同时添加 12 mg·L^{-1} Spm 与 0.01 mg·L^{-1} IAA 时达 21%、29 枚，对照组未见雌花，说明 Spm 和 IAA 对雌花诱导的协同作用显著。实验证明，在全苗、去根苗、去根去顶苗、顶芽四种外植体中，及在 0.5%～0.9%琼脂含量和 1.0～2.0 mmol·L^{-1} KH_2PO_4 含量的培养条件下，采用 0.7%琼脂含量和 1.75 mmol·L^{-1} KH_2PO_4 含量培养黄瓜去根去顶苗的雌花诱导效果最好，其诱导率和雌花数分别达 46%、54 枚。

关键词：黄瓜；无菌苗；雌花；诱导体系

中图分类号：Q943.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-3142(2010)02-0242-04

Establishment for induction system of female flowers in steriled seedlings of *Cucumis sativus*

HUANG Zuo-Xi[1,2], WANG Fang[1], QIU Chao[1], CHEN Yi[1], TIAN Sheng-Hui[1], XU Hai-Ying[1]

(1. *Key Laboratory of Colleges and Universities for Research and Utilization of Distinctive agricultural Undertakings*, *Neijiang Normal University*, Neijiang 641112, China; 2. *Flower Research Institute of Neijiang Teachers College*, Neijiang 641112, China)

Abstract: The synergistic effect of Spm and IAA, and the effects of agar concentration, KH_2PO_4 concentration on the induction of female flowers in steriled seedlings of *Cucumis sativus* for the establishment of an induction system of female flowers were reported. It was found that the induction rate and the amount of female flower in every trial were considerably low and even down to zero when Spm or IAA was respectively added to derooted seedlings cultured on MS basal medium, while the induction effect were obviously higher when 12 mg·L^{-1} Spm and 0.01 mg·L^{-1} IAA were added simultaneously, and no female flowers could be observed on the control medium, which showed that Spm and IAA had an significant synergistic effect on the induction of female flowers. Experiment was done with different explant of whole seedlings, derooted seedlings, detoped seedlings without root, top shoots or with agar concentration of 0.5%－0.9%, and with KH_2PO_4 concentration of 1.0－2.0 mmol·L^{-1}, the highest induction effect for female flowers was achieved on medium of agar 0.7%, KH_2PO_4 1.75mmol·L^{-1} and from detoped seedlings without root, its induction rate and amount of female flower reched to 46%, 54 respectively.

Key words: *Cucumis sativus*; steriled seedlings; female flowers; induction system

花芽性别分化作为雌雄同株异花植物的一个特殊发育阶段与形态建成过程，实质上是特定基因在内、外因素作用下，依时间和空间顺序特异表达的结果。这种特异基因的表达及调控极其复杂，要想最

收稿日期：2009-03-20 **修回日期**：2009-07-28

基金项目：四川省教育厅自然科学基金重点项目(ZA174)；内江师范学院生态学重点建设学科基金(内师科字[2007]24 号)[Supported by the Nature Science Foundation of Education Department of Sichuan Province (ZA174) and the Key Discipline of Ecology for Neijiang Normal University(2007-24)]

作者简介：黄作喜(1966-)，男，四川安岳人，教授，从事植物开花生理研究，(E-mail)huangzx118@126.com。

终从分子水平上揭示其机理，必须建立稳定、高效的实验研究体系（汪俏梅等，1996）。前人对大田整株植物雌花分化的研究较多（金晓霞等，2007；Yamasaki 等，2003），但因受环境因素干扰及不同器官之间的影响，所得结果往往不能直接反映诱导信号对雌花分化的真实作用（寿森炎等，2000；Lerkindale 等，2002）。本实验探索在无菌培养条件下 Spm 与 IAA 对黄瓜苗雌花分化的协同作用，并选择出较合适的外植体材料、培养基琼脂含量和 KH_2PO_4 含量，由此建立了黄瓜去根去顶苗无菌培养诱导雌花的实验体系。该体系培养周期短、诱导途径简捷，性别分化各时期的演变特征易把握，可为雌雄同株异花植物花芽性别分化的内在机理研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1 无菌苗的培养

黄瓜在自然条件下一般表现为雌雄同株异花植物，本实验选用天津农科院产黄瓜（*Cucumis sativus*）品种“津青春四”为试材。取健壮无病的种子，剥离外种皮后，于超净工作台用 0.1% $HgCl_2$ 灭菌 3～4 min，用无菌水清洗 3～4 次，播种于 MS 固体培养基（pH5.8、琼脂 0.8%、蔗糖 3%）表面。培养条件是：白天 24～25 ℃、晚间 20 ℃，光照 13.5 h/d、光强 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$。培养 8 d 时，取不同部位的外植体接种。

1.2 Spm 和 IAA 处理

将 8 d 龄带 1/4 下胚轴的去根苗直插于 MS 培养基（含 KH_2PO_4 为 1.25 $mmol \cdot L^{-1}$）上，以 0、0.005、0.01、0.05、0.1 $mg \cdot L^{-1}$ IAA（成都科龙集团提供，纯度 98.0%）分别与 0、6、12、24、48 $mg \cdot L^{-1}$ Spm（Simga 公司提供，纯度 99.0%）进行正交组合，其中不添加 Spm 和 IAA 的培养基做对照，检验 Spm 和 IAA 对雌花诱导的增效作用，并筛选合适的离体黄瓜去根苗雌花诱导的激素组合。

1.3 不同外植体无菌培养诱导雌花

将 8 d 龄全苗，去根苗、去根去顶苗（均带 1/4 下胚轴），顶芽直插于 MS 培养基上。以添加 IAA 0.01 $mg \cdot L^{-1}$ + Spm 12 $mg \cdot L^{-1}$ 的 MS 培养基诱导培养，选择较合适的黄瓜无菌培养诱导雌花的外植体材料。

1.4 培养基中的不同琼脂含量水平处理

设置 MS 培养基的琼脂含量为 0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%5 个浓度梯度，以带 1/4 下胚轴的去根去顶苗为外植体，IAA 0.01 $mg \cdot L^{-1}$ + Spm 12 $mg \cdot L^{-1}$ 为诱导剂，选择较合适的雌花诱导培养基的琼脂含量水平。

1.5 培养基中的不同 KH_2PO_4 含量水平处理

设置 MS 培养基中 KH_2PO_4 含量依次为 1.0、1.25、1.50、1.75、2.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 5 个浓度梯度，琼脂含量为 0.7%，其它营养元素与 MS 培养基相同。以带 1/4 下胚轴的去根去顶苗为外植体，IAA 0.01 $mg \cdot L^{-1}$ + Spm 12 $mg \cdot L^{-1}$ 为诱导剂，选择较合适的黄瓜去根去顶苗雌花诱导的 KH_2PO_4 含量水平。

1.6 培养条件

以上各诱导实验的光照为 13.5h/d、光强 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，温度白天 24～25 ℃、晚间 18 ℃。除 KH_2PO_4 试验外，其它各处理的 KH_2PO_4 含量均为 1.25 $mmol \cdot L^{-1}$。不同处理的蔗糖含量和 pH 值与育苗培养相同。以 150 mL 广口瓶作诱导培养容器，聚丙烯膜封口，每瓶盛固体培养基 30 mL，于超净工作台接种 2 枚外植体，每实验 40 枚，3 次重复。

1.7 数据收集与统计分析

外植体（图版Ⅰ：1）接种后，25 d 时去根去顶苗 0～3 节位的叶腋处花芽（中性花或雄花）出现（图版Ⅰ：2），30 d 时雌花的子房初始膨大（图版Ⅰ：3），35～40 d 时肉眼可见成形的小黄瓜（图版Ⅰ：4）。接种后 40 d 时，统计雌花诱导率和雌花数。雌花诱导率（%）为每实验中肉眼可见雌花的外植体数占接种外植体总数的百分比，雌花数（枚）指每实验中外植体所生雌花数的总和。用 SPSS11.0 软件分析观测数据。

2　结果

2.1 Spm 和 IAA 处理对雌花诱导率和雌花数的影响

表 1 显示，不添加 Spm 和 IAA 的对照组无雌花出现，单用 Spm、IAA 时的离体黄瓜去根苗的雌花诱导率和雌花数为 0 或偏低，而 Spm 和 IAA 配合处理的诱导率和雌花数最高分别达 21%、29 枚。表明 Spm 和 IAA 对离体黄瓜去根苗的雌花诱导具有明显的协同作用。Spm 和 IAA 的各浓度组合中，IAA 0.01 $mg \cdot L^{-1}$ + Spm 12 $mg \cdot L^{-1}$ 的诱导效果好

于其它组合，其雌花诱导率和雌花数与对照的比均差异极显著($P<0.01$, df=2)。因此，IAA 0.01 mg·L^{-1}+Spm 12 mg·L^{-1}是较合适的离体黄瓜去根苗雌花诱导的激素组合。

图版Ⅰ IAA和Spm处理黄瓜去根去顶苗的雌花分化过程 1. 去根去顶苗(左三)；2. 培养25 d；3. 培养30 d；4. 培养40 d。
Plate Ⅰ Differentiation process of cucumber detoped seedlings without root *in vitro* under the synergistic treatments of Spm and IAA 1. detoped seedlings without root(Third left)；2. on day 25；3. on day 30；4. on day 40.

表1 不同浓度的Spm和IAA配合对黄瓜去根苗雌花诱导率(%)和雌花数量(枚)的影响
Table 1 Effects of different combining concentrations for Spm and IAA on induction rate and induction amount of female flowers in derooted seedlings of *Cucumis sativus*

Spm (mg·L^{-1})	雌花诱导率(%)Induction rate of female flowers					雌花数(枚)Amount of female flower				
	IAA0 (mg·L^{-1})	IAA0.005 (mg·L^{-1})	IAA0.01 (mg·L^{-1})	IAA0.05 (mg·L^{-1})	IAA0.10 (mg·L^{-1})	IAA0 (mg·L^{-1})	IAA0.005 (mg·L^{-1})	IAA0.01 (mg·L^{-1})	IAA0.05 (mg·L^{-1})	IAA0.10 (mg·L^{-1})
0	0.0	0.0	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	2.2	2.3	2.2
6	2.7	7.2*	12.2**	3.9*	2.3	3.2	10.0*	15.3**	4.2*	2.1
12	12.3**	14.3*	21.0**	16.4**	5.4	11.8*	16.8**	29.0**	18.3**	6.0
24	12.2*	8.0*	9.7**	6.2*	0.0	13.4*	10.4*	12.3**	6.2*	0.0
48	3.3	8.4*	4.3*	2.1	0.0	3.2	10.0*	4.1*	2.1	0.0

注："*"表示处理与对照的差异显著，$P<0.05$；"**"表示处理与对照的差异极显著，$P<0.01$。
Note："*"means significant difference ($P<0.05$) from control；"**"means significant difference ($P<0.01$) from control.

2.2 不同外植体无菌培养对雌花诱导率和雌花数的影响

不同的外植体无菌培养诱导雌花的效果差别明显，去根去顶苗的雌花诱导率和雌花数分别达31%、38.6枚，而全苗培养的未见雌花分化。四种外植体的雌花诱导率和雌花数高低顺序是：去根去顶苗>去根苗>顶芽>全苗(图1)。

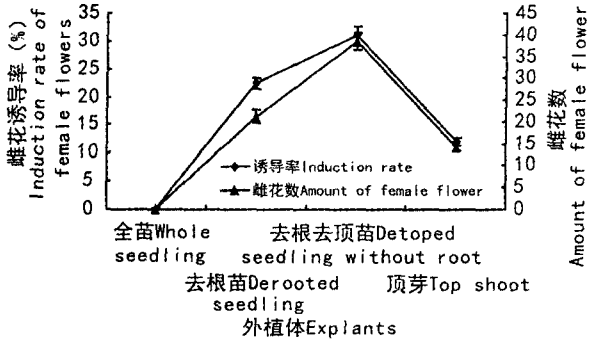

图1 不同外植体对雌花诱导率和雌花数的影响
Fig. 1 Effects of different explants on the induction rate of female flowers and on the amount of female flower

2.3 培养基中琼脂含量对雌花诱导率和雌花数的影响

在培养基琼脂含量0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%5个浓度梯度中，含量为0.7%时黄瓜去根去顶苗的雌花诱导效果高于0.8%及其它各浓度的，其雌花诱导率和雌花数分别达38%、43枚(图2)。

2.4 培养基中KH_2PO_4含量对雌花诱导率和雌花数的影响

无菌培养黄瓜去根去顶苗的雌花诱导效果随培养基中KH_2PO_4含量上升而提高，含量达1.75 mmol·L^{-1}时诱导率开始下降，此时的雌花诱导率和雌花数比1.25 mmol·L^{-1}时(MS培养基)的分别高8%、11枚(图3)。

3 讨论

以往的花芽分化或性别分化实验，较多地探讨了亚精胺的生理作用(黄作喜等，2005)，本实验则发现，多胺中的Spm单用时黄瓜去根苗的雌花诱导率最高可达12.3%，而对照组无雌花出现，表明Spm也具有一定的促雌作用，这与王世平等(1996)应用

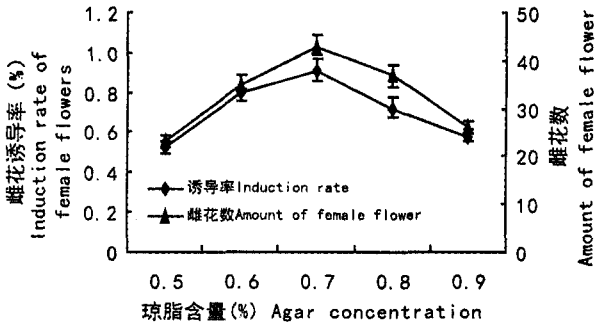

图 2　培养基琼脂含量对雌花诱导率和雌花数的影响

Fig. 2　Effects of agar concentration of medium on the induction rate of female flowers and on the amount of female flowers

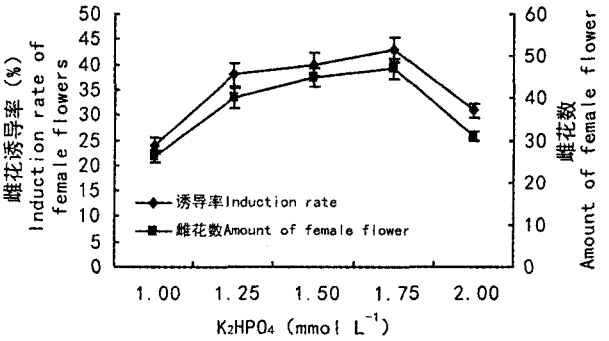

图 3　培养基 KH_2PO_4 含量水平对雌花诱导率和雌花数的影响

Fig. 3　Effects of KH_2PO_4 concentrations of medium on the induction rate of female flowers and on the amount of female flowers

多胺喷布苹果花蕾促进了雌花分化及坐果的结果相一致。曹明兰等(2005)用乙烯利处理黄瓜幼苗的实验表明，IAA 具有促雌的作用，但在本实验中当 IAA 单用时，黄瓜去根苗的雌花诱导率和雌花数均很低，当与恰当浓度的 Spm 混用时，则诱导效果迅速跃升，说明 IAA 的促雌作用需要 Spm 的协同配合。Spm、IAA 的较低浓度组合或较高浓度组合对黄瓜去根苗雌花分化的促进作用很低或无效，原因可能是高浓度组合抑制了雌花分化，而低浓度组合未达到合适的浓度要求(黄作喜等，2002)，说明恰当的浓度配比是 Spm、IAA 协同促雌的重要保证。

黄瓜是雌雄同株异花植物，整株植物的不同器官对其花芽的性别分化可能产生复杂的影响，而离体材料则更容易在激素等作用下完成定向诱导(Kaur-Sawhney 等，1993；黄作喜等，2005)。本实验(图 1)中保留根系的全苗无雌花出现，去根苗可能由于缩短了激素、营养等的运输距离或外施诱雌信号通过伤口直接地作用于地上部分，其雌花诱导效果明显。黄瓜花芽开始分化时都是中性花，以后根据发育条件才决定花的性别，当切取 8d 龄幼苗的顶芽时，其花器的性别确定已超过第 3 节位(黎炎等，2004)，故顶芽经离体培养的雌花诱导率较低。黄瓜去根去顶苗可再生成簇的不定芽，在雌花诱导条件下向雌花定向发育，因而其雌花诱导率和雌花数均高于其它外植体材料。

环境因子与植物的花芽性别分化的关系密切，如改善田间 N 素营养和水分条件可促进生长素的合成，降低赤霉素的含量，促进雌花分化(王纬等，1983；Bose 等，1977)。我们前期的研究已发现，较高的总 N 含量和 NH_4^+-N 比例对黄瓜苗的雌花诱导具有促进作用(黄作喜等，2007)，本研究则显示，较高的营养三要素中的 P、K 含量对离体黄瓜去根去顶苗的雌花诱导也具有促进作用。降低培养基的琼脂含量可以提高琼胶分子中的自由水含量，改善培养基的水分条件，有利于物质的溶解和吸收(吴清平等，2006)，促进离体黄瓜去根去顶苗的雌花分化和发育。因此，在瓜类生产实践中可于苗期、花期增施 N、P 和 K 肥及提高土壤保墒水，促进无性花向雌花的转化进而增产。

参考文献：

Bose TK, Ghosh. 1977. Effect of pholoperiod on growth and sex expression in some Cucurbits[J]. *Indian J Agr Sci*, **45**: 487－489

Cao ML(曹明兰), Wang Y(王永), Yun XF(云兴福). 2005. The activity metamorphism of the IAAO in the cucumber(黄瓜体内吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性变化)[J]. *Acta Agric Boreali Sin*(华北农学报), **20**: 33－35

Huang ZX(黄作喜), Shen HJ(沈惠娟), Xie YF(谢寅峰). 2002. The changes of endogenous hormones and polyamines of the cotyledons of *Cucurbita pepo in vitro* during floral bud differentiation(西葫芦子叶花芽分化时内源激素、多胺含量的变化)[J]. *J Nanjing Normal Univ*(南京师范大学学报), **25**(2): 28－31

Huang ZX(黄作喜), Qing DH(卿东红), Duan HG(段辉国), *et al*. 2005. Effect of kinetin(KT) on physiological and biochemical change of cotyledons of *Cucuibita pepo in vitro* during formation of floral buds(激动素在西葫芦子叶的花芽构建过程中促成的生理生化变化)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **27**(6): 663－668

Huang ZX(黄作喜), Duan HG(段辉国), Qing DH(卿东红), *et al*. 2007. A highly efficient system for induction of female flowers in derooted seedlings of *Cucumis sativus* grown on the medium(培养基上生长的黄瓜去根苗雌花高效诱导体系)[J]. *J*

(下转第 195 页 Continue on page 195)

社：1－20

高立士. 1995. "版纳傣"与"兰纳泰"历史文化比较研究[J]. 德宏教育学院报，**1**：1－5，29

高立士. 2006. 高立士傣学研究文选[C]. 昆明：云南民族出版社：1－12，227－233

黄惠焜. 1990. 傣族文化与中原文明[C]//王懿之，杨世光. 贝叶文化论. 昆明：云南人民出版社：19－48

黄惠焜. 1992. 从越人到泰人[M]. 昆明：云南人民出版社：92－114

黄惠焜. 1997. 导论——寻找"文化血型"[M]//赵世林，伍琼华. 傣族文化志. 昆明：云南民族出版社：1－5

曾君. 2008. 中国西双版纳傣族植物药与泰国兰纳植物药临床应用的比较研究[D]. 泰国清莱皇家大学传统医药学院硕士论文：295

蔡希陶. 1963. 油瓜在中国古籍中的记载及分类学问题[C]//吴征镒. 蔡希陶纪念文集. 昆明：云南科技出版社：125

詹英佩. 2007. 普洱茶原产地西双版纳[M]. 昆明：云南科技出版社：177

Conklin HC. 1954. The relation of hanunoo culture to the plant world[D]. PH. D. Dissertation, Yale University

Jin ZZ(金振洲), Ou XK(欧晓昆). 1997. The diversity features of plant community types in the tropical rain forest vegetation of Xixhuangbanna, Yunnan(西双版纳热带雨林植被的植物群落类型多样性特征)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 增刊 IX：1－30

Li QJ(李秦晋), Liu HM(刘宏茂), Xu YK(许又凯), *et al*. 2007. Changes in species numbes and causes that used as wild vegetable by Dai People in Xishuangbanna, China(西双版纳傣族利用野生蔬菜种类变化及原因分析)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **29**(4)：467－478

Fang LY (方利英), Liu HM(刘宏茂), Cui JY (崔景云), *et al*. 2006. Traditional use of wetland plants in Dai villages in Xishuangbanna, Yunnan(西双版纳傣族村寨对湿地植物的传统利用)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), **14**(4)：300－308

Pan YM(潘玉梅), Liu HM(刘宏茂), XU ZF(许再富). 2006. Study on traditional use of beverage plants in Dai Villages of Xishuangbannan, Yunnan(西双版纳傣族传统饮料植物利用的研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **28**(6)：653－664

Robbings WW. Jobn Peabody Harrington , Barbara Freire－Marreco. 1916. Ethnobotang of the Tewa lindians[J]. *Bureau of American Ethnobotang Bulletin*, 55

Wang JX(王锦秀), Liu HM (刘宏茂), Xu ZF. 2003. Folk plant taxonomic system and rapid assessmemt of regioral plant diversity——A case study in Xishuangbanna (民间植物分类系统与区域性物种多样性快速评估——以西双版纳傣族为例)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**(6)：523－527

Xu ZF(许再富), Huang YL(黄玉林). 1991. Research on plant folk nemenclature and taxonomic system of Xishuangbanna Dai Nationality (西双版纳傣族民间植物命名与分类系统研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **13**(4)：383－390

Xu ZF(许再富), Liu HM(刘宏茂). 1995. Palm leaves Buddbism Sutra Culture of Xishuangbanna Dai and plant diversity conservation(西双版纳傣族贝叶文化与植物多样性保护)[J]. *Chenese Biodiversity* (生物多样性), **3**(3)：174－179

(上接第 245 页 Continue from page 245)

Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报), **33**(2)：160－164

Jin XX(金晓霞), Qin ZW(秦智伟), Dong YL(董延龙). 2007. Progress of study on sex differentiation in cucumber(黄瓜性别分化研究进展)[J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), (2)：38－42

Kaur-Sawhney R, Tibnrcio AF, Galston AW. 1993. Spermidie and flower bud differentiation in thin layer tobacco tissue culture[J]. *Plants*, **173**：282－284

Lerkindale J, Kinght MR, 2002. Protection against heat stress-induced oxidation damage in *Arobidopsis involves* calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid[J]. *Plant Physiol*, **128**：682－695

Ni Y(黎炎), Li WJ(李文嘉). 2004. Progress of study on chemical regulation and mechanism for melon plants(瓜类性别分化的化学调控及作用机理研究进展)[J]. *Guangxi Agr Sci*(广西农业科学), **35**(3)：180－182

Shou SY(寿森炎), Wang QM(汪俏梅), 2000. Progress of study on sex differentiation in higher plants(高等植物性别分化研究进展)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **17**(6)：528－535

Wang QM(汪俏梅), Zeng GW(曾广文). 1996. Progress of study on sexual differentiation of monoecious plants *in vitro*(雌雄同株植物性别分化离体试验研究进展)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **32**(5)：385－389

Wang SP(王世平), Song CB(宋长冰), Li LC(李连朝), *et al*. 1996. Physiological function of polyamines during blossoming and fruit setting in apple(多胺在苹果开花及坐果初期的生理作用[期刊论文)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **23**(4)：319－325

Wang W(王纬), Cao ZX(曹宗巽). 1983. Recent progresses in chemical control of sex expression in higher plants(高等植物性别分化)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **1**(3)：8－11

Wu QP(吴清平), SY(孙永), Cai ZH(蔡正荷), Zhang JM(张菊梅). 2006. Review of the gelling agents for solid microbial media(固体培养基凝固剂的研究进展)[J]. *Microbiology*(微生物学通报), **33**(5)：145－149

Yamasaki, Matsuura S, Takahashi H. 2003. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants[J]. *Sex Plant Report*, **16**：103－111