

# 瓜类嫁接亲和性研究

刘 芬<sup>1</sup>,向长萍<sup>2</sup>

(1. 遵义职业技术学院, 贵州 遵义 563000; 2. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430000)

**摘要:**为探索瓜类嫁接亲和力,以中国南瓜 57 自嫁接苗、黄瓜品种津春四号自嫁接苗以及津春四号/中国南瓜 57 嫁接苗为材料,观察嫁接后不同时期愈合部位组织结构并进行基因差异表达分析。结果表明:津春四号黄瓜自嫁接苗的愈合速度快于中国南瓜 57 自嫁接苗以及津春四号/中国南瓜 57 嫁接苗。不同时期南瓜自嫁接苗愈合部位的 cDNA-AFLP 结果分析表明,特异性带均出现在嫁接后第 6 天取样的材料中。

**关键词:**瓜类;砧木;嫁接亲和力

**中图分类号:**S642

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)11-0085-03

嫁接可实现提早收获<sup>[1]</sup>、延长生育期、提高产量的目的<sup>[2]</sup>。嫁接后能否成活,受多种因素的影响,而最重要的因素是嫁接亲和力的强弱。关于嫁接亲和性机理的研究大多停留在生理生化方面,在分子生物学方面的研究较少。该试验通过石蜡切片对瓜类嫁接后的解剖结构进行观察,并通过 cDNA-AFLP 技术对不同时期南瓜自嫁接苗愈合相关基因进行了差异表达分析,为以后的嫁接亲和性的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为黄瓜品种津春四号,由天津科润农业科技股份有限公司黄瓜研究所选育,多代自交品系中国南瓜 57,由华中农业大学瓜类研究课题组选育。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验于 2008 年 9~10 月在国家蔬菜改良分中心和教育部园艺系重点实验室进行。9 月 2 日浸种津春四号黄瓜(砧木用),9 月 5

日浸种中国南瓜 57(砧木用),9 月 10 日浸种中国南瓜 57(接穗用),9 月 12 日浸种津春四号黄瓜(接穗用),9 月 16 日采用插接法嫁接。嫁接组合包括:Z:中国南瓜 57 自嫁接苗,H:津春四号自嫁接苗,T:津春四号/中国南瓜 57 嫁接苗。9 月 17 日开始,每隔 1 d 取样 1 次,取样部位为嫁接愈合处,每次随机取 20 株,磨碎混匀后提取 RNA,取 4 株固定后制作石蜡切片观察其解剖结构。

1.2.2 RNA 提取及双链 cDNA 的合成 RNA 提取参照 TRNzol-A<sup>+</sup> 总 RNA 提取试剂盒说明书进行。双链 cDNA 的合成采用 TaKaRa 的 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒。

1.2.3 cDNA-AFLP 差异分析 cDNA-AFLP 参考 Pieter Vos 等方法进行,PCR 产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。将得到的双链 cDNA 经 *EcoR* I 和 *Taq* I 酶切后,连接接头,产物取 5  $\mu$ L 进行预扩增。预扩产物稀释 30 倍后进行选择性扩增。共采用 64 对引物对 5 个样品分别进行了差异显示分析,接头与引物见表 1。

表 1 AFLP 所用接头和预扩增引物

Table 1 Sequence of adapters and primers of pre-amplification used for AFLP

接头 Adapters	<i>EcoR</i> I -adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
		5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
	<i>Taq</i> I -adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAC-3'
		5'-TACTCAGGACTGGC-3'
预扩增引物 Preamplification primer	<i>EcoR</i> I + A	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
	<i>Taq</i> I + P	5'-GACGATGAGTCCTGACCGAC-3'

收稿日期:2014-04-29

第一作者简介:刘芬(1984-),女,湖北省荆门市人,硕士,讲师,从事蔬菜生理生态及其发生机理方面的研究。E-mail:liufenword@sohu.com。

通讯作者:向长萍(1945-),女,学士,教授,博士生导师,从事蔬菜遗传育种及技术推广工作。E-mail:chpxiang@mail.hzau.edu.cn。

1.2.4 数据处理 cDNA-AFLP 结果处理,将在凝胶上显示清晰的谱带进行记载,对于每一材料在同一位点有带则记为“1”,无带则记为“0”,记录所有的引物组合的谱带用于分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时期嫁接苗愈伤组织观察

由图 1 可知,在嫁接后第 2 和第 4 天,南瓜自嫁苗和黄瓜/南瓜嫁接苗在接口处周围零散存在着染色较深的隔膜,称为隔离层,隔离层可密封伤

口,阻止有机物和离子外渗,起到暂时保护作用。黄瓜自嫁苗在第 2 天也有隔离层的产生,但是在第 4 天时,隔离层已在局部区域被愈伤组织突破,主要是由于两侧愈伤组织分裂所形成的生长压力和愈伤组织细胞的吸收所致。第 6 天时,黄瓜自

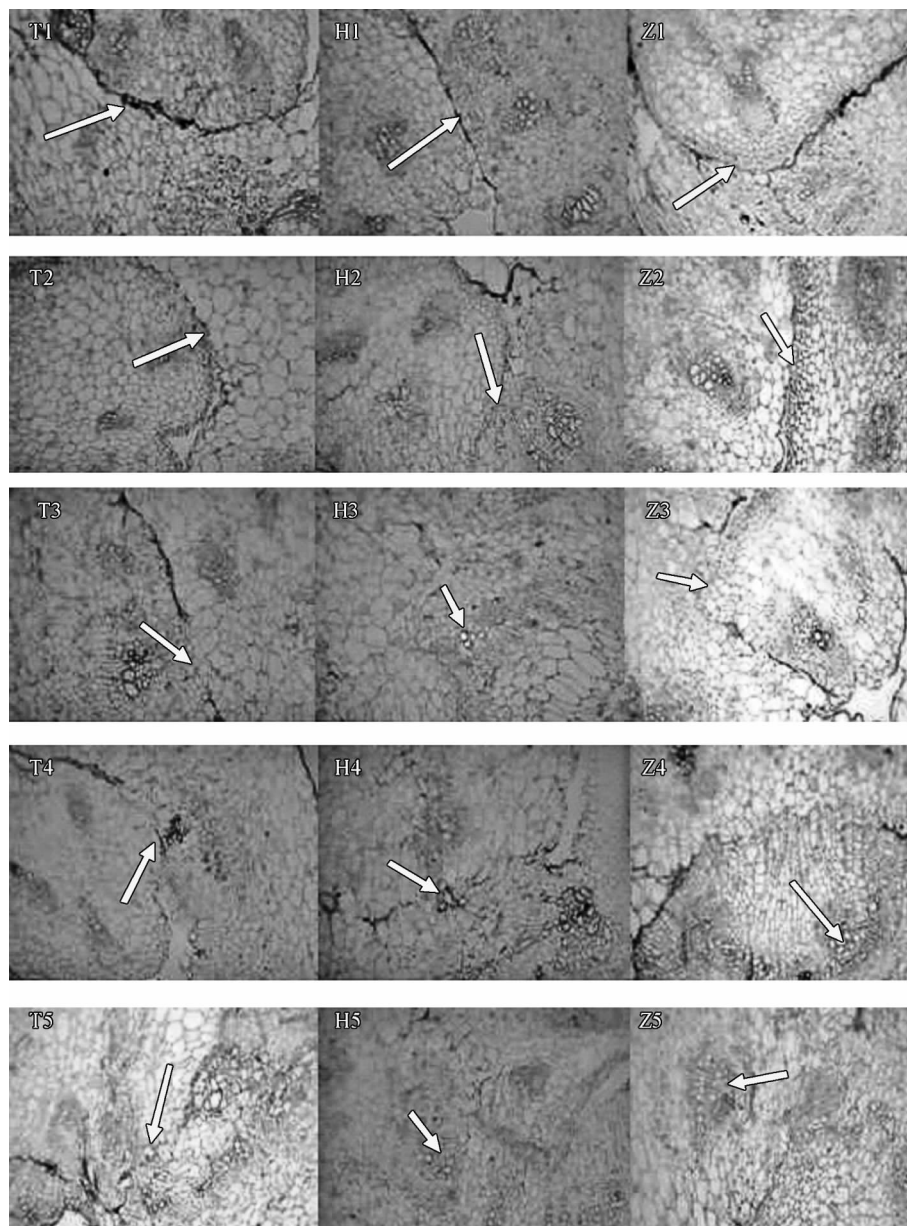


图 1 嫁接后不同砧木不同时期嫁接部位横切图(10×)

T1~T5 为津春四号/中国南瓜 57 嫁接后 2、4、6、8 和 10 d 取样;H1~H5 为津春四号自嫁苗嫁接后 2、4、6、8 和 10 d 取样;Z1~Z5 为中国南瓜 57 自嫁苗嫁接后 2、4、6、8 和 10 d 取样。

Fig. 1 Crosscut diagram of grafting position of different stocks at different stages after grafting

T1~T5: samples of Jinchun 4/Chinese pumpkin 57 after grafting for 2, 4, 6, 8 and 10 days; H1~H5: samples of self-grafted Jinchun 4 after grafting for 2, 4, 6, 8 and 10 days; Z1~Z5: samples of self-grafted Chinese pumpkin 57 after grafting for 2, 4, 6, 8 and 10 days.

嫁接产生大量愈伤组织细胞,两者愈伤组织相互嵌合,并且愈伤组织已经分化出了导管分子,而南瓜自嫁接和黄瓜/南瓜嫁接苗只是出现局部区域的隔离层被愈伤组织突破。第 8 天时,南瓜自嫁接苗和黄瓜/南瓜嫁接苗才有导管分子的分化。

## 2.2 不同时期南瓜自嫁接 cDNA-AFLP 分析

2.2.1 提取的总 RNA 所提取的 RNA 样品  $OD_{260}/OD_{280}$  值为 1.8~2.0,表明 RNA 没有蛋白质和酚类物质污染;1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果表明,28S rRNA 和 18S rRNA 带形整齐,未降解(见图 2)。以上结果表明总 RNA 质量较好,适于 cDNA 合成。

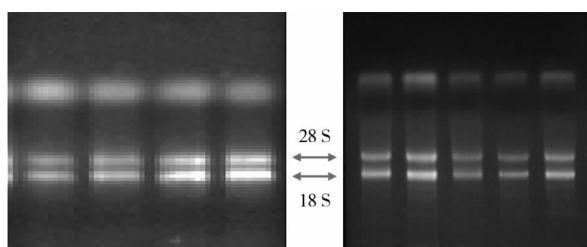


图 2 RNA 质量检测

Fig. 2 Detection on the quality of RNA

2.2.2 cDNA-AFLP 分析 该试验运用 cDNA-AFLP 技术对不同时期黄瓜自嫁接及黄瓜/南瓜嫁接苗进行了分析,但是没有获得理想的条带,可能是所选引物不合适造成的。运用 cDNA-AFLP 技术对不同时期南瓜自嫁接生长相关基因进行了差异表达分析(见图 3)。64 对引物,共扩增到 107 条差异条带,其中 32 条在第 3 次取样即嫁接第 6 天的材料中特异表达,占有差异条带数的 29.9%;16 条在第 4 次取样即嫁接第 8 天的材料

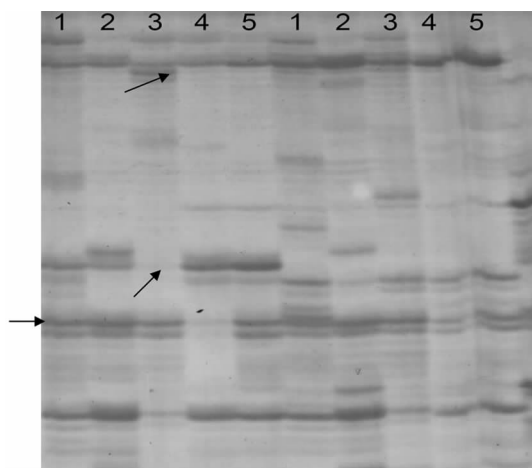


图 3 不同时期南瓜自嫁接的 mRNA 差异表达

Fig. 3 mRNA differential expression of self-grafted pumpkin at different stages

中特异表达,占有差异条带数的 15.0%。12 条在第 1 次、第 2 次取样的材料中表达,在第 3、4、5 次取样的材料中不表达,占有差异条带数的 11.2%。

## 3 结论与讨论

一般认为,嫁接后砧、穗完全愈合成活为共生体,并能长期生长且结实的组合是亲和的,否则是不亲和的。影响嫁接亲和性的因素包括光照、温度和水分等外界因子,病毒或病原体物质的侵染,接穗和砧木的解剖结构和生长特性和遗传因素等。

试验通过观察愈合部位的切片,与南瓜自嫁接苗、南瓜/黄瓜嫁接苗相比,黄瓜自嫁接苗能较快进入愈伤的形成和维管束的分化阶段,说明亲缘关系越近,嫁接亲和性越好,杨士杰<sup>[3]</sup>等研究结果接穗和砧木分类学上关系越近,嫁接成功率越高,分类学上关系越远,排斥现象越强烈的结果与该文一致。嫁接后第 6 天开始维管束的分化,可能涉及更多基因的表达。

卢善发<sup>[4]</sup>在番茄/番茄嫁接体发育过程中的过氧化物酶同工酶的分析中发现,嫁接结合部酶谱和活性变化与创伤处理不同,在嫁接后的前期,结合部同工酶快速产生。嫁接后 1、3、5 d,同工酶带比创伤处理分别多 1 条、1 条、2 条;肖桂山<sup>[5]</sup>等在黄瓜同种异体嫁接组合中发现,同愈伤处理对照相比较,在嫁接后第 2~第 10 天,嫁接体中稳定地出现了 3 种新合成的蛋白质;不同时期嫁接苗切片观察结果表明,在愈合过程中有愈伤的产生和维管束的分化<sup>[6]</sup>,说明在嫁接苗愈合过程中有一系列的差异表达的发生。该试验采用 cDNA-AFLP 技术分析不同时期嫁接苗愈伤部位差异表达,结果表明在嫁接后第 6 天取样的材料中出现较多特异性带,与石蜡切片结果一致。

## 参考文献:

- [1] 王艳飞,庞金安,马德华,等. 黄瓜嫁接栽培研究进展[J]. 北方园艺, 2002(1): 35-37.
- [2] 张红梅,金海军,余纪柱,等. 不同南瓜砧木对嫁接黄瓜生长和果实品质的影响[J]. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(3): 177-181.
- [3] 杨世杰,卢善发. 植物嫁接基础理论研究(上)[J]. 生物学通报, 1995, 30(9): 10-12.
- [4] 卢善发. 番茄/番茄嫁接体发育过程中的过氧化物酶同工酶[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 340-344.
- [5] 肖桂山,杨世杰. 黄瓜同种异体嫁接组合形成过程中特异蛋白质的产生[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 32-37.
- [6] 祖容,于泽源. 三种葡萄砧木解剖构造与嫁接植株新梢生长关系[J]. 北方园艺, 1998(10): 12-14.