

不同植物生长调节物质对南瓜组织培养及植株再生的影响

邹克琴, 张拥军*, 楼纪东, 何颖, 庞一飞 (中国计量学院生命科学院, 浙江杭州 310018)

摘要 [目的]为南瓜属植物优良品种的快速繁育、抗逆性品种的选育等提供研究基础。[方法]以“锦粟2号”南瓜叶片为外植体,用不同植物生长调节物质进行组织培养和植株再生。[结果]结果表明:试验条件下,诱导叶片分化形成愈伤组织的最佳培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;最适的芽分化培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;诱导芽生根的最佳培养基为1/2 MS+NAA 0.5 mg/L,芽生根率为100%。[结论]成功获得了“锦粟2号”南瓜的愈伤组织及再生植株。

关键词 南瓜;组织培养;植株再生

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)13-05311-02

Effect of Different Plant Growth Regulators on Tissue Culture and Plantlet Regeneration of Pumpkin

ZOU Ke-qin et al (College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018)

Abstract [Objective] The research aimed to provide foundation for the rapid propagation of superior variety and the selection of resistant variety of *Cucurbita*. [Method] The leaves of “Jinsu 2” was used as the explant and treated with different plant growth regulators in tissue culture and plantlet regeneration. [Results] The best culture for leaves callus induction was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The most suitable culture for bud rooting induction was 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L, and the percentage of rooting was 100%. [Conclusion] Tissue culture and plantlet regeneration of “Jinsu 2” was obtained successfully.

Key words Pumpkin; Tissue culture; Plantlet regeneration

南瓜属(*Cucurbita*)为葫芦科,包括30个种,其中有5个栽培种:中国南瓜(*Cucurbita moschata*)、美洲南瓜(*C. pepo*)、印度南瓜(*C. maxima*)、灰籽南瓜(*C. mixta*)及黑籽南瓜(*C. ficifolia*),每个栽培种中又有许多类型和品种^[1]。南瓜营养价值十分丰富,富含β-胡萝卜素、果胶、戊聚糖、甘露醇、腺嘌呤、葫芦巴碱、矿物质等多种营养成分,其中所含的一些药理成分对多种疾病均有疗效,特别是南瓜多糖,是预防糖尿病的活性成分,倍受国内外关注^[2-3]。笔者通过不同植物生长调节物质对南瓜组织培养和植株再生的研究,为南瓜属植物优良品种的快速繁育、抗逆性品种的选育等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 “锦粟2号”南瓜种子由湖南省瓜类研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得。选取饱满、大小一致的“锦粟2号”南瓜种子,在45℃的水浴中浸泡4h后,用70%的酒精表面消毒30s后,置于0.1%的HgCl₂溶液中消毒9min(消毒期间要不停摇动),然后用无菌水冲洗4~5次,并用无菌滤纸吸干表面水份。种子消毒之后在无菌条件下将其置于0.9%琼脂培养基(pH值5.8)上进行暗培养,发芽后转入光照培养,光照周期16h/d,光照强度2000~3000lx,整个培养期间温度为(25±1)℃。

1.2.2 愈伤组织的诱导。将“锦粟2号”南瓜刚转绿2d的子叶作为外植体诱导愈伤组织。在取用子叶时,切去基部和顶部,去掉子叶边缘,将剩下的组织横切为2,再纵切为2,每片子叶得4块约1.0cm×0.5cm的外植体,将由子叶得到的外植体正面朝上、背面朝下,接种于基本培养基MS附加不同浓度6-BA、2,4-D和NAA组合的愈伤组织诱导培养基上,培养基中蔗糖浓度为20g/L、琼脂为9g/L、pH值5.8,光照周期

12h/d,光照强度1500~2000lx,湿度60%,培养温度(25±1)℃。试验中每个组合培养基为10瓶,每瓶4个外植体,随时观察统计出愈时间,20d后统计愈伤诱导率和愈伤生长状况,试验分别在2005年3、9月与2006年3月进行,重复3次。

1.2.3 继代增殖。将愈伤组织切成黄豆大小转入基本培养基MS添加不同浓度6-BA、IBA和NAA组合的继代增殖培养基中(见表2),MS培养基中蔗糖浓度为30g/L、琼脂9g/L,每个组合培养基为10瓶,每瓶4块愈伤组织,20d后统计芽诱导率,诱导出的芽以肉眼可清晰分辨为标准。

1.2.4 根的诱导。待芽长至2cm高时转入1/2MS添加不同浓度生长素NAA的生根诱导培养基中。培养基中蔗糖浓度为20g/L、琼脂7g/L,每个组合培养基为10瓶,每瓶3~5个幼芽,15d后观察生根情况,统计生根率和平均根长。

1.2.5 组培苗的移栽。当小苗长至2cm时,便可出瓶移栽。移栽时不要伤害小根。移栽后的温度保持在23~27℃,湿度保持在100%,遮阴2周,后渐见光。4周后可移至土壤中栽培。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节物质组合对南瓜叶片外植体愈伤组织诱导的影响以“锦粟2号”南瓜叶片为外植体诱导愈伤组织的出愈时间、出愈率和生长状况结果见表1。由表1可知,A4不仅启动率高,而且诱导时间短,11d后整个叶片逐渐形成黄绿色愈伤组织,生长健康旺盛。A6~A9虽然出愈率也高,但是愈伤组织生长状况不好、愈伤组织有根形成。在植物生长调节物质组合中,6-BA 1.0mg/L和NAA 0.1mg/L及6-BA 1.0mg/L和NAA 0.5mg/L诱导外植体脱分化形成愈伤组织的效果好,其中6-BA 1.0mg/L和NAA 0.1mg/L效果最好,因此得出A4培养基对“锦粟2号”南瓜叶片脱分化形成愈伤组织的最佳培养基(图1)。

2.2 不同植物生长调节物质对芽诱导的影响不同植物生长调节物质组合对诱导愈伤组织形成芽的影响见表2。由表2可知,诱导率主要与植物生长调节物质的浓度配比有关,不含任何植物生长调节物质的MS培养基(B1)上丛生芽的诱导

基金项目 浙江省科技厅计划项目(2005C24009)。

作者简介 邹克琴(1972-),女,新疆奎屯人,博士,副教授,从事植物细胞工程研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-03-03

率为0,愈伤组织不能分化形成芽,而是逐渐变黄,褐化死亡。NAA和6-BA的组合对芽的诱导呈现明显较高的芽分化率,能形成大量丛生不定芽,生长状况良好。NAA和IBA的组合

对芽的诱导率不高,不定芽的生长缓慢,生长势比较弱,不能形成大量不定丛芽。结合芽的诱导率和生长状况,可认为B5对“锦粟2号”南瓜愈伤组织芽的诱导效果最好(见图2)。

表1 不同植物生长调节物质对诱导南瓜叶片形成愈伤组织的影响

Table 1 Effects of different plant regulators on leaf-derived callus in pumpkin

编号 No.	6-BA mg/L	NAA mg/L	2,4-D mg/L	出愈时间 Days of leaves formed callus//d	出愈率 Rate of leaves formed callus//%	20 d后生长状况 Growth status after 20 days
A1	0	0	0		0	培养材料很少生长,变黄
A2	1.0	0		16	80	有愈伤组织形成,生长缓慢
A3	1.0	0.05		11	89	有愈伤组织形成,颜色淡黄,生长较慢
A4	1.0	0.1		11	100	有愈伤组织形成,颜色淡黄,出现绿色芽点
A5	1.0	0.5		11	93	有愈伤组织形成,颜色淡黄,出现绿色芽点
A6	2.0	0		12	95	有愈伤组织形成,颜色油绿,水浸状
A7	2.0	0.05		12	95	有愈伤组织形成,质地致密较硬,愈伤有根形成
A8	2.0	0.1		12	95	有愈伤组织形成,质地致密较硬,有根形成
A9	2.0	0.5		12	99	有愈伤组织形成,颜色油绿,水浸状,有根形成
A10		0	0.5	14	30	有愈伤组织形成,生长缓慢,有根形成
A10		0.05	1.0	14	85	有愈伤组织形成,有根形成
A10		0.1	1.5	14	80	有愈伤组织形成,水浸状,有根形成
A10		0.5	2.0	14	80	有愈伤组织形成,水浸状,有根形成

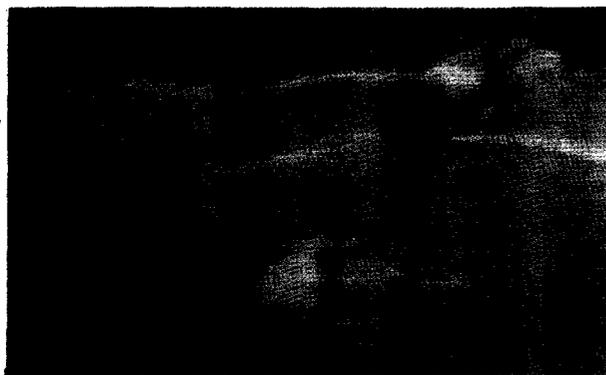


图1 “锦粟2号”南瓜在培养基A4上的愈伤组织诱导效果

Fig.1 The callus induction of pumpkin Jinsu 2 on A4 medium

表2 不同植物生长调节物质组合对芽诱导率的影响

Table 2 Effects of different plant regulators on bud induction rate

编号 No.	6-BA mg/L	NAA mg/L	IBA mg/L	接种愈伤块数 No. of inoculated callus 个	形成丛芽块数 No. of buds 个	芽分化率 Bud differentiation rate//%
B1	0	0		60	0	0
B2	1.0	0		60	15	25
B3	1.0	0.05		60	30	50
B4	1.0	0.1		60	40	66
B5	1.0	0.5		60	48	80
B6		0	1.0	60	25	42
B7		0.05	1.0	60	23	38
B8		0.1	1.0	60	23	38
B9		0.5	1.0	60	20	33

2.3 不同植物生长调节物质组合对生根诱导率的影响 当芽长至1 cm时,转移至1/2 MS添加不同浓度NAA的生根培养基中,植株的根原基就会慢慢长出根,形成完整植株。不同种类的生长素对“锦粟2号”南瓜幼芽生根的影响见表3。由表3可知,随着NAA浓度的升高,生根率逐渐上升,当NAA浓度达到0.5 mg/L时,生根率最高达100%,之后随着NAA

浓度的上升,生根率反而下降。由此可见,C4对丛生苗生根的效果最好(见图3)。



图2 南瓜愈伤组织在培养基B5上芽诱导效果

Fig.2. The bud induction of pumpkin callus on B5 medium

表3 不同植物生长调节物质组合对生根诱导率的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on root induction rate

编号 No.	NAA mg/L	接种苗数 No. of inoculated seedlings//个	平均根长 Average root length//cm	生根率 Rooting rate//%
C1	0	20	0.5	70
C2	0.05	20	1.2	90
C3	0.1	20	1.8	95
C4	0.5	20	2.2	100
C5	1.0	20	1.6	90

3 结论

该研究成功地获得了“锦粟2号”南瓜的愈伤组织及再生植株,为南瓜属植物优良种质资源的保存、优良观赏品种的快速繁殖、抗性品种的选育等提供了有力的技术保障和试验平台。

(1)在愈伤组织的诱导过程中,首先要考虑植物生长调节物质的绝对量,其次要考虑生长素和细胞分裂素浓度的比值,过大或过小都会导致诱导率低、长势差。与2,4-D和NAA

(下转第5448页)

膜上皮细胞坏死、脱落;局部肠腺上皮细胞坏死,脱落、胞核肿大,染色淡,边界不清;固有层内毛细血管充血,淋巴细胞减少。

2.3.8 肠系膜淋巴结。犬瘟热病犬的肠系膜淋巴结内毛细血管增生、集结且扩张、充血。皮质区和副皮质内没有明显界限,淋巴细胞减少,淋巴小结不仅数量减少,而且小结的体积也减小;皮质淋巴窦内几乎没有淋巴细胞,网状细胞肿大;髓索内大量淋巴细胞逸失,巨噬细胞数量增多,小静脉充血。而犬细小病毒病犬的肠系膜整个淋巴结严重充血,副皮质、髓窦内充满大量红细胞;皮质内淋巴细胞的数量减少,淋巴小结个体变小,数量减少;髓质内髓索数量减少,髓窦扩张,网状细胞肿胀脱落,巨噬细胞数量增多。

2.3.9 大脑。患犬瘟热病犬的脑膜淤血、水肿,大脑皮质部分有大小不一的卵圆形或不规则形的空泡,有卫星现象和核内包涵体现象;脑内小血管淤血。而患犬细小病毒病犬的脑膜无此现象。

3 结论与讨论

3.1 包涵体 在犬瘟热病犬脑的胶质细胞内检测到嗜酸性核内包涵体。而在犬细小病毒病的胞浆内并未发现有包涵体的存在。遇秀玲等^[6]认为 CDV 是一种泛嗜性病毒,因而在很多细胞的胞核或胞浆内可以检测到。Apple 认为,犬细小病毒的核内包涵体不一定在任何单层细胞中都能观察到,在猫肺细胞中较明显,而在其他细胞中较难看到^[7]。

3.2 肝、肾 CDV 与 CPV 感染的这 2 种病犬的肝脏均发生颗粒变性,肝细胞萎缩变小;肾脏髓质肾小管上皮细胞坏死脱落,这些器官都有不同程度的充血、出血和炎性细胞浸润,这是因为病原体在体内各组织广泛分布及其产生内毒素的致病作用所致。

3.3 淋巴结、脾脏 CDV 与 CPV 感染的这 2 种病犬均有淋

巴细胞减少、淋巴小结变小等症状,说明病毒侵入淋巴细胞,引起免疫抑制,有关这一点,徐汉坤^[8]认为,副粘病毒属的许多病毒需要淋巴样细胞来增殖,通常以生发中心表现的最明显。末梢淋巴组织的淋巴细胞的来源主要依靠自身的分裂增殖和骨髓的补给。因此,当这些细胞被犬瘟热病毒感染时,它们的代谢和功能的改变使其分裂和增殖的特性发生改变,进而引起淋巴组织的退行性变化^[9]。乔贵林等试图用肾上腺切除术来制止淋巴细胞的减少,但未获成功^[10]。田克恭通过免疫荧光发现给血貂注射犬瘟热病毒 3~4 d 后,在类淋巴小结中检出大量犬瘟热病毒抗原^[11]。

3.4 肺、肠 犬瘟热的主要病变部位在肺脏即肺呈现间质性肺炎,所以病犬在临床表现出咳嗽,肺部听诊有湿性啰音。犬细小病毒的主要病变部位在肠道,肠黏膜及肠腺上皮细胞都呈现坏死脱落,固有膜暴露,引起水、盐代谢失衡,进而在临床上表现为病犬呕吐、腹泻。

参考文献

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1996: 354.
- [2] 柏亚铎, 王晓佳, 张灿, 等. 犬瘟热病毒融合蛋白肽重复区基因的克隆表达[J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(9): 6-8.
- [3] 范泉水. 犬细小病毒免疫研究进展[J]. 云南畜牧兽医, 1994(4): 31-34.
- [4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1996: 1145-1174.
- [5] 梁士哲, 渠川玫, 魏喜仁. 犬出血性肠炎的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1982, 2(2): 172.
- [6] 遇秀玲, 郑振峰, 田克恭, 等. 犬瘟热脏器组织中的抗原定位及病理形态学观察[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(6): 7-9.
- [7] APPEL M J. Forty years of canine vaccination[J]. Adv Vet Med, 1999, 41: 309-324.
- [8] 徐汉坤. 家畜传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1983: 43-44.
- [9] 王立光, 董君艳. 犬病临床指南[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2000: 41-45.
- [10] 乔贵林. 犬瘟病毒抗体检测方法的比较研究[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(1): 26-29.
- [11] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 315-316.

(上接第 5312 页)

的组合相比, 6-BA 和 NAA 的组合诱导愈伤组织有更好的再生能力。在这些组合中, 培养基 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 对“锦粟 2 号”南瓜叶片脱分化形成愈伤组织的效果最好。

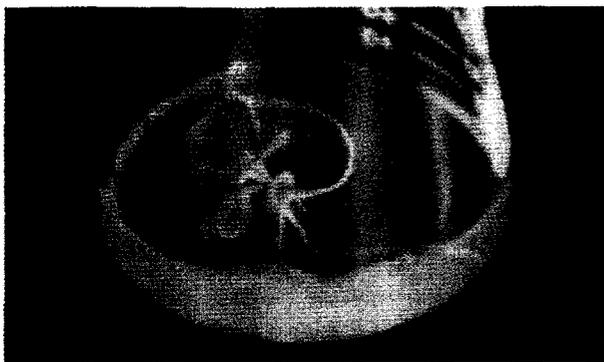


图 3 南瓜丛生芽在培养基 C4 上生根诱导效果

Fig. 3 The root induction of pumpkin from bud on No. C4 medium

(2) 在愈伤组织诱导并分化不定芽过程中, 要选择合适的植物激素浓度比值。比值不当容易出现畸形苗和玻璃化苗, 使不定芽不正常分化, 其中 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 对“锦粟 2 号”南瓜愈伤组织芽的诱导效果最好

(3) 生根培养基 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L 使南瓜苗生根率达到 100%, 根的生长量大且长势很好, 是培养根的最佳培养基。

参考文献

- [1] 刘洋, 屈淑平, 崔崇士. 南瓜营养品质与功能成分研究现状与展望[J]. 中国瓜菜, 2006(2): 27-29.
- [2] 陈智民, 王修梅. 南瓜粉降血糖、降血压作用的人体研究[J]. 江西中医药, 1994, 25(2): 50.
- [3] 熊学敏, 叶士玲. 南瓜多糖对四氧嘧啶糖尿病大鼠的降糖果作用[J]. 江西中医学院学报, 1998, 10(4): 174-175.
- [4] 李贞霞, 李新峰, 董卫华. 南瓜组织培养体系建立研究[J]. 北方园艺, 2005(3): 75-76.
- [5] 耿新丽, 赵一鹏, 秦勇金. 童观赏南瓜离体繁殖技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7): 1338-1339.
- [6] LEE Y K, CHUNG W, EZURA H. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch)[J]. Plant Science, 2003, 164: 413-418.