

南瓜属蔬菜细胞与组织培养研究进展

徐恒骥

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

中图分类号:S642.103.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2006)06-0127-03

南瓜属(*Cucurbita*)蔬菜是葫芦科的重要作物,主要包括南瓜(*C. moschata* Duch)、西葫芦(*C. pepo* L.)、笋瓜(*C. maxima* Duch)和黑籽南瓜(*C. ficifolia* Bouch),除黑籽南瓜外,都是传统蔬菜,特别是中国南瓜曾是粮食短缺时期的重要补充食品,但是对南瓜属蔬菜的研究相对滞后。近几年来,随着南瓜属蔬菜在营养和保健方面^[1]、医疗方面的美好前景^[2]以及特有的观赏价值^[3]等方面的突出进展,以及含有抗病性基因资源^[4],受到越来越多的关注,在南瓜栽培和常规蔬菜育种^[5]等方面取得较大进展。但南瓜的常规育种无法满足生产需求,许多南瓜的优良基因资源得不到利用,特别是在抗性育种等方面。生物技术的快速进展,为南瓜基因资源的利用和育种提供了较好的途径,但相关研究还较少。组织与细胞培养技术是现代生物技术的重要组成部分,在多数情况下,也是进一步进行基因工程的重要基础。现对研究南瓜属蔬菜作物方面的成果进行概述,为南瓜属蔬菜的未来科研和育种提供参考。

1 南瓜属蔬菜的离体快繁和器官再生研究

器官离体再生是植物组织培养的重要内容,在黄瓜、西瓜、甜瓜、葫芦等作物上非常成功,但在南瓜方面则困难较大,进展一直缓慢。从现有的研究结果看,影响南瓜离体快繁和器官再生的因素主要有以下几个方面。

1.1 基因型

基因型是影响植物组织培养成功与否的重要因素。目前已经建立的再生体系并不多。表1列出了部分成功培养的基因型。对于许多基因型,还无法获得再生植株。在成功的基因型中,再生情况差异也较大。Abrie et al(2001)利用西葫芦和笋瓜品种获得了高效的再生植株,但有3个品种在任何培养基上都没有形成再生器官,但是,笋瓜品种 Chicago Warded 却发生了胚胎途径的再生。Hales Best 36 品种在所有的含有细胞分裂素的培养基上都能形成芽,表现了较强的基因型差异。

1.2 培养基

在组织培养和器官再生的过程中,培养基起关键作用。在器官再生时,基本培养基是以MS培养基为主要培养基,间或出现改良型MS培养基。培养基的重点在激素配方上,其中6-BA是使用频率最高的细胞分裂素类激素,诱导器官再生的有效范围在1.0~6.0 mg/L之间^[7](Lee et al, 2002; 赵建萍, 1999),在西葫芦离体培养开花上,KT1.0 mg/L为最优的激素配方^[12]。在生长素类激素中,在不同的试验中分别应用了IAA、NAA、IBA等,范围在0.05~1.0 mg/L之间。

表1 部分成功进行组织培养和器官再生的南瓜属蔬菜

基因型	组织培养目的	参考文献
“艾西丝”	快繁	
“艾西丝”	离体再生	[7]
京乐 101	植株再生	[8]
赖皮南瓜	快繁	[9]
无蔓一号南瓜	快繁	[10]
黄狼	离体再生	[11]
西葫芦	离体开花	[12]
笋瓜	离体再生	[13]
西葫	离体再生	
笋瓜	离体再生	
西葫	离体再生	[14]

1.3 外植体类型

组织培养的外植体类型是影响培养成功与否的重要因素。在现有的研究中,以快繁为目的的组培,茎尖为主要的培养外植体,月增殖系数为3.3~5^[9,10,15]。

在进行离体再生的研究中,外植体以子叶为主要类型^[7,8,13]。

子叶的不同部位,再生能力有着极大差异。取相同日龄的子叶,先横切为3,将其分为顶、中、基3部分,然后再分别切成带中脉和不带中脉2种类型,将6种不同的大小均为0.5 cm²的切块分别接种到培养基上,统计结果表明,子叶不同部位的切块均能诱导出愈伤组织,诱导率为73%~100%。但不定芽的分化结果却有显著差别:带中脉的中部、基部子叶块均有较高的不定芽诱导率,分别为37%和44%,不带中脉的基部子叶块也有一定的不定芽分化,诱导率为12%,而其他部位的子叶均未能诱导出不定芽^[8]。这表明子叶基部的细胞具有较大的再生能力。在“艾西丝”南瓜子叶作外植体离体培养中,子叶基部是唯一能诱导芽分化的部位^[7]。笋瓜、西葫芦也具有类似特点^[13,14]。

外植体的苗龄和大小也影响着器官再生的频率。在南瓜中,刚转绿的南瓜子叶是诱导愈伤的最适外植体^[11]。但在研究西葫芦的离体培养开花系统中,取西葫芦一片真叶幼苗上的子叶为外植体最为适合^[12]。笋瓜则是以4 d子叶为最好^[13];另外,外植体的大小也显著影响着不定芽的分化再生,以1/2的子叶为最好,小于1/4的子叶,芽分化率显著下降^[13]。

当一步诱导器官发生有困难时,可以对外植体进行二步

* 基金项目:山东理工大学博士基金项目,编号:4041404012

收稿日期:2006-07-10

诱导,即先诱导愈伤组织,再对愈伤组织进行不定芽分化诱导。对南瓜的胚根、胚轴和子叶分别进行愈伤组织的诱导,可以直接看出不同外植体对愈伤发生情况的影响不同。子叶是南瓜诱导愈伤的最适外植体,胚根次之,胚轴的诱导效果最差;但不同位置来源的愈伤组织之间,芽的诱导分化是否有差异,没有报道^[11]。

1.4 培养过程中的生理生化变化

在组培过程中外植体的褐化,是经常遇见的问题,关于褐化的原因尚有许多未知之处,多数归结于分类物质氧化,蛋白质在这个过程中作用则少见报道。Fujita et al 从笋瓜的愈伤组织中分离出了褐色的蛋白,分子量约 38 kd,等电点 4.6。该蛋白受到高浓度的 2,4-D(180 μ M)的诱导,经鉴定可能是硫氧还蛋白 h,但也不排除是一种新蛋白的可能性,有待进一步确定^[16]。温度在组培过程中也发挥重要作用。对离体培养的西葫芦子叶,采用 33~35 $^{\circ}$ C 的热激,有利于 BA 发挥生理效应。但这方面的研究还非常匮乏。

2 组织培养获得单倍体

单倍体在植物育种中的作用非常重要,在南瓜上发表的研究报告还很少。

2.1 花药培养

在西葫芦的花药培养中,单核期的花药为适宜时期,单倍体的发生受到蔗糖和 2,4-D 的强烈影响,而且对愈伤组织的诱导与对成苗的影响不同,较低浓度的蔗糖(90 g/L)和 2,4-D(1 mg/L)有利于愈伤组织的发生,而较高浓度(150 g/L)的蔗糖,5 mg/L 的 2,4-D 成苗率最高。

2.2 子房培养

在子房培养中,西葫芦的子房发育时期对愈伤组织诱导和植株再生非常关键,当日开花的未受精子房,愈伤诱导率最高达 14.2%,开花前 3 日的子房也能够达到 10.5% 的愈伤率,而开花后两天的子房的愈伤率迅速下降到 4.4%。预培养能极大提高愈伤率。发现在 0.8% 琼脂和 2% 蔗糖组合的芽分化培养基上,25 d 后,个别未授粉胚珠愈伤组织块有绿色芽点状突起,并有嫩芽发生,其芽诱导率最高,达 15.6%。在诱根培养基中添加高浓度的 NO_3^- 有利于不定芽根的形成,但其作用机理尚不清楚^[17]。

2.3 胚培养

通过被射线辐照的花粉诱导子房产生单倍体胚,也获得了成功。Kurtar 利用被射线辐照的花粉进行受精,获得了西葫芦的单倍体胚和植株。研究表明, γ 射线的剂量、基因型和胚胎发育时期,对植株再生有着重要影响。25 Gy 和 50 Gy 的 γ -射线对孤雌生殖具有较好的诱导效应;虽然发育成各个时期的胚胎都能形成单倍体植株,但只有 53.8% 鱼雷胚和 23.1% 心型胚可以发育成单倍体植株,与其它葫芦科植物相比还较低^[18]。胚胎挽救技术在许多作物上进行了成功的应用,是一条很有前途的育种途径。把南瓜与西葫芦的有性杂交后代进行培养,其中 Piramoita 品种的南瓜杂种,没有培养成功,但另一个品种 duda 成功了,杂种后代表现可育,取得了成功的经验^[19]。

3 体细胞胚胎发生途径获得南瓜的再生植株

在植物的离体培养再生过程中,除了器官再生途径外,胚胎发生途径是另一个重要途径,在南瓜的离体再生研究中也

有发现。

3.1 基因型和激素对胚胎发生的影响

南瓜离体培养过程中,NAA、2,4-D 都能诱导胚胎发生,但所需激素水平,较愈伤组织诱导要低。利用西葫芦的子叶诱导胚胎发生,11.6 μ M 要比 26.85 μ M 更有效;同时也受到基因型的影响,在试验的 16 个品种里,只有 7 个品种能形成胚性愈伤组织^[20]。采用 KT 对外植体进行预处理,对西葫芦的胚胎发生具有促进作用。但也有报道 2,4-D 抑制西葫芦胚胎的成熟,要得到再生的植株,就必须去掉 2,4-D,在添加 IAA 和高浓度蔗糖的培养基上进行培养^[21]。

3.2 培养基对胚胎再生的影响

同器官发生一样,胚胎发生也受到培养基成分的影响。对南瓜的研究表明,以还原态氮的 NH_4Cl 为唯一氮源时,体细胞胚将停留在球形胚阶段,直到采用含有铵态氮和硝态氮的复合氮源培养基上,球形胚才进一步发育成熟^[22]。进一步研究表明,在含有 2,4-D 和 NH_4Cl 的培养基上,细胞胚胎发生的初期,伴随着大量 DNA 的甲基化,随着胚的成熟,甲基化程度降低^[21]。这表明胚发育的停止可能是由于大量 DNA 甲基化妨碍了相关基因的表达。

4 细胞与原生质体培养

原生质体的培养与融合的研究在南瓜上较少。郭德章等(2004)采用电融合技术对黄瓜和黑籽南瓜的子叶原生质体进行了融合,并对电场条件进行了优化,得到了融合细胞的愈伤组织,但没能得到再生植株^[23]。

利用笋瓜的愈伤组织和细胞悬浮培养生产葫芦素,也获得了成功。悬浮培养的接种量、培养基的磷含量也影响着葫芦素的产量,且在一定范围内成正相关。

5 问题与展望

伴随着饮食习惯由温饱型向营养型转变,由于保健和医疗方面的作用,南瓜属蔬菜的地位将越来越重要。同其它瓜类相比,南瓜属蔬菜的研究尽管取得了一些进展,还是相对落后,细胞和组织培养的成功率相对较少,特别是国内的研究,显得更少。今后应当加强在南瓜属蔬菜的组培研究,扩大离体再生的范围;在细胞培养方面,国内还未见报道,南瓜属蔬菜所含有的一些有益物质,是否可以通过细胞培养进行大量生产,将是重要研究方面。

参考文献:

- [1] 黄黎慧,黄群,于美娟,等.南瓜营养价值与保健功能[J].中国食物与营养,2005,(9):45-47.
- [2] 卢颖,王永勤,任智捷.南瓜功能成分研究的进展及在医药领域中的应用[J].食品与药品,2005,7(7A):29-32.
- [3] 李新峰,刘振威,刘宏,等.日光温室观赏南瓜光合特性研究初报[J].中国农学通报,2005,21(6):286-287,330.
- [4] 康东木,许勇,康国斌,等.葫芦科作物抗主要病毒病研究进展[J].北京农业科学,2001,19(4):15-20.
- [5] 徐东辉,崔崇士,张耀伟.南瓜优势育种及育种规律的研究[J].东北农业大学学报,2004,35(5):612-615.
- [6] 周俊国,李新峰.南瓜的开发利用途径及育种目标[J].北方园艺,2004,(1):24-25.
- [7] 赵建萍.‘艾西丝’南瓜子叶的离体培养[J].园艺学报,1999,26(3):196-197.
- [8] 邹建,宋明,汤青林,等.观赏南瓜子叶离体培养的初步研究

山区生态果园栽培

李生杰

(黑龙江省勃利县农业技术推广中心, 154500)

所谓山区果树生态栽培是指在山区果树生产中,把果树对地理气候环境的适应性作为制定、实施果树栽培管理技术的立足点,提高水、光、气、热等资源利用率,建立起一个有机结合、相互协调、相互制约的果园生态系统,以促进果树的丰产、稳产、优质、低耗、高效,并在果树持续性生产中,促进果园生态环境的逐步优化。

根据当地的气候条件和果树栽培区划的要求,选择交通便利、近于水源、光照充足、土层深厚的低丘缓坡地段建园,一般果园的山体坡度宜在25度以下,地下水位在2 m以上,做到宜果则果,适地适树。

果树是多年生作物,一经栽植,更不能轻易更换。因此,各地在选择栽培品种时,必须结合本地的果树栽培区划,并根据当地的气候条件、自然状况、交通运输条件和不同时期的需要等,选择主栽品种和辅栽品种,更不要贪大求新、赶时髦,要根据各地的气候条件适时栽植,以免越区栽植,给生产造成不必要的损失。

根据果园规模和立地条件,在园地周围配置防护林,以协调果园生态环境。一般在相对高度较高的山体上建园,应在园地顶部保存涵养林,不宜全面开发,在园地迎风面需设置防风林带,以减轻强风对果园的侵害。

采取大穴、大肥、大苗定植,并逐年扩穴改土,以便为果树根系向深度和广度伸展创造一个疏松、肥沃的土壤环境。幼龄果园套种绿肥,培植有机肥源,这有利于提高果园光能和土地资源利用率,调节园内的生态环境,防止水土流失,改良熟化土壤。

根据果树的生长发育特性和立地条件,因树因地制宜,科学整形修剪,培养通风透光、层次分明、立体化结构的丰产树形,改变重冬剪轻夏剪的思想,采取冬季修剪和夏季修剪相结合的修剪方法。采取疏花疏果、果实套袋等技术措施,调节生长结果的关系,谨防掠夺性生产,通过促进合理挂果,以达到优质稳产的栽培目的。

改变传统清耕法,推行计划生草栽培和旱季树盘覆盖。一般在雨季前放任杂草生长,在雨季即将结束时再结合施肥压埋杂草;在雨季结束后干旱来临前的土壤湿润期采用稻草、杂草等进行树盘覆盖,以降低土温,减少土壤水分蒸发,提高土壤含水量。

根据果树的生长发育规律和需肥特性,以及肥对品质的影响和肥效的持续性等,因地因树制宜,适时适量施肥,配方施肥。注重肥料的配比使用以及有机质肥料和微量元素肥料的施用。

认真地贯彻“预防为主,综合防治”的植保方针。在综合防治中要以农业防治为基础,因地制宜,合理使用农药,利用生物防治、物理防治等综合技术措施,经济、安全、有效地控制病虫害,以达到提高苹果产量、质量,保护生态环境和人们的身体健康的目的。提倡发展禽畜养殖业,实行种养并举,通过在种果业和养殖业之间建立起良性生态循环必定会有利于促进果业生产的蓬勃发展。

[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(4):297-299.

[9] 徐祖荣、癞皮南瓜试管苗快速繁殖技术初探[J]. 江西园艺, 2003, (2):22-23.

[10] 盛玉萍, 王爱勤, 何龙飞, 等. 利用组织培养快速繁殖无蔓一号南瓜[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(3):185-188.

[11] 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.

[12] 黄作喜, 沈惠娟, 谢寅峰. 离体培养西葫芦子叶花芽分化最佳龄期的选择[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2001, 25(6):15-18.

[13] Lee Y K, Chung W I, Ezura H. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) [J]. Plant Science, 2003, 164:413-418.

[14] Ananthakrishnan G, Xia X, Elman C et al. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21:739-746.

[15] Sarowar S, Oh H Y, Hyung N I, et al. In vitro micropropagation of a *Cucurbita* interspecific hybrid cultivar a root stock plant[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 75:179-182.

[16] Fujita M, Hossain M Z. Brownish acidic protein induced in pumpkin callus by high concentration of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. Biologia Plantarum, 2003, 46(2):175-179.

[17] 陈学军, 邢国明, 陈竹军. 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株

再生[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3):165-167.

[18] Kurtarl E S, Sarn, Abak K. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Euphytica, 2002, 127: 335-344.

[19] Oliveira CB, Maluf W R, Pinto B P, et al. Resistance to papaya ringspot virus in summer squash *Cucurbita pepo* L. introgressed from an interspecific *C. pepo* × *C. moschata* cross. Euphytica, 2003, 132:211-215.

[20] Urbanek A, Zechmann B, Müller M. Plant regeneration via somatic embryogenesis in Styrian pumpkin: cytological and biochemical investigations[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 79: 329-340.

[21] Leljak - Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S A, et al. Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23:120-127.

[22] Leljak - Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S, Jelaska S. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds[J]. J Plant Physiol, 2004, 161:229-236.

[23] 郭德张, 鄢锦, 赖仲雄, 等. 不同电场条件对黄化和黑籽南瓜原生质体对称融合的影响[J]. 福建农业学报, 2004, 19(3):181-184.