

南瓜组织培养再生体系的研究

张卫华¹, 孙小镭¹, 王志峰¹, 曹齐卫¹, 刘文宝²

(1. 山东省农业科学院蔬菜研究所, 山东 济南 250100; 2. 山东农业科技开发总公司, 山东 济南 250100)

摘 要:以黑籽南瓜和白籽南瓜为试材, 研究了苗龄、激素配比、外植体、芽诱导时间以及基因型对再生频率的影响。结果表明, 以 3~5 天苗龄的南瓜子叶为外植体, 在 MS+6-BA 1 mg/L+Ades 20 mg/L 的诱导培养基上诱导 10 天后, 转入 MS+GA₃ 0.5 mg/L 的芽伸长培养基, 不同基因型南瓜均能获得较高的植株再生率, 每个外植体成苗数在 2.5 个以上。从接种到再生苗移栽仅需 4~5 周时间。

关键词:南瓜; 子叶; 外植体; 植株再生

中图分类号:S642.103.54 **文献标识号:**A **文章编号:**1001-4942(2006)06-0004-03

Study on the High Efficient Tissue Culture System of Pumpkin

ZHANG Wei-hua¹, SUN Xiao-lei¹, WANG Zhi-feng¹, CAO Qi-wei¹, LIU Wen-bao²

(1. Research Institute of Vegetable, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

2. Development Corporation of Agricultural Science and Technology, Jinan 250100, China)

Abstract Effects of seedling age, the hormone combination, different explants, the time of shoot induction and different genotypes on pumpkin tissue culture efficiency were studied. The results showed that: when the pumpkin cotyledons from 3~5 days seedling were induced in the medium MS+6-BA 1 mg/L+Ades 20 mg/L for about 10 days, and then transferred into shoot elongation medium, MS+GA₃ 0.5 mg/L, more plantlets could regenerate rapidly from different genotype explants. The time from cotyledon subculturing to plantlet transplanting needed only 4~5 weeks.

Key words Pumpkin; Cotyledon; Explants; Plantlet regeneration

南瓜根系较大, 吸收能力强, 生产上常被用作温室黄瓜的嫁接砧木, 为克服其不抗根腐病、黑腐病和根结线虫的缺陷, 人们试图通过基因工程的方法来加以改良。本试验以生产上常用的黑籽南瓜和白籽南瓜为试材, 建立了南瓜组织培养的再生体系, 旨在为南瓜的基因改良打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用试材为黑籽南瓜和白籽南瓜, 白籽南瓜包括青研砧木 1 号和 RF 品系。RF 品系为山东省农业科学院蔬菜研究所繁育, 其它品种从市场购得。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选籽粒饱满、大小一致的种子, 先用 55℃ 温水浸泡 1 h, 再用 75% 乙醇处理 30 s, 2% 的 NaClO 表面消毒 15 min, 无菌水洗涤 3~4 次, 撒播于用无菌水浸透的脱脂棉(A)和 1/2 MS 的固体培养基(B)上; 种子浸水后剥去种皮, 2% 的 NaClO 消毒 10 min, 无菌水冲洗后撒播于用无菌水浸透的脱脂棉(C)和 1/2 MS 的固体培养基(D)上, 30℃ 暗处理, “露白”后置于 25℃、光周期为 12 h/d 的光照培养箱内, 得到无菌苗。

1.2.2 外植体及接种方式 取不同品种不同苗龄(3~8 d)的南瓜子叶切除柄端和尖端, 余下部分横切为二, 叶面朝上平接于芽再生培养基上; 下胚轴分别取靠近子叶节和胚根的部位, 每段约 0.5 cm, 置于(25±2)℃、光周期为 12 h/d 的光照培养箱内培养。

收稿日期: 2006-08-03; 修回日期: 2006-08-31

基金项目: 山东省“三〇”工程资助项目。

作者简介: 张卫华(1970-), 女, 博士, 主要从事瓜类分子育种研究工作。

1.2.3 芽诱导、伸长及壮苗生根 芽诱导培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+ABA(0~1) mg/L+Ades(0~40) mg/L+蔗糖 3%+琼脂 0.7%~0.8%。外植体培养 10~15 天后转至 MS+GA₃ 0.5 mg/L 的芽伸长培养基上,待不定芽长至 1 cm 以上,切取不定芽于 MS+IBA 0.5 mg/L 的生根培养基上,当再生植株有大量不定根产生,打开瓶盖炼苗,2 天后进行移栽。

2 结果与分析

2.1 培养方式对无菌苗的影响

以 RF 为试材,设计了 A、B、C、D 4 种获得无菌苗的处理。从试验结果看,剥去种皮的处理 C、D,比未剥种皮的处理 A、B 发芽快,整齐度高。处理 C 在接种后 12 h 左右可见胚根露出,接种后两天即可获得无菌苗且无菌苗的利用率较高。由于水分获取的限制,处理 D 比处理 C 种子发芽和生长都稍慢,一般要延后 0.5~1 天。处理 C、D 在剥种皮、消毒以及种子播种过程中,易于受伤,同时剥皮的种子对消毒的时间要求较为严格,消毒时间延长,种子吸收消毒液过多,影响无菌苗的质量。未剥种皮的处理 A 和 B,吸水较慢,种子发芽慢,尤其是处理 B,发芽时间很不一致,整齐度差,苗子可利用率在 50% 左右。相对而言,A 处理既经济,种子出苗又快,在接种后 3 天即可获得大量整齐度和质量较高的无菌苗。

2.2 苗龄对南瓜再生的影响

以 RF 品系为试材,分别切取接种后 3、4、5、6、7、8 天的南瓜子叶进行培养。结果表明,苗龄对南瓜子叶的不定芽发生率有明显影响。接种后 3 天的子叶还未完全变绿,出芽率达 95%,接种后 4 天和 5 天的子叶出芽率与 3 天的没有明显差异,此后随着苗龄的增加,不定芽再生能力下降(图 1)。接种后 8 天的子叶虽然也能产生愈伤组织,但不定芽再生率低,仅有 30% 左右能产生不定芽。

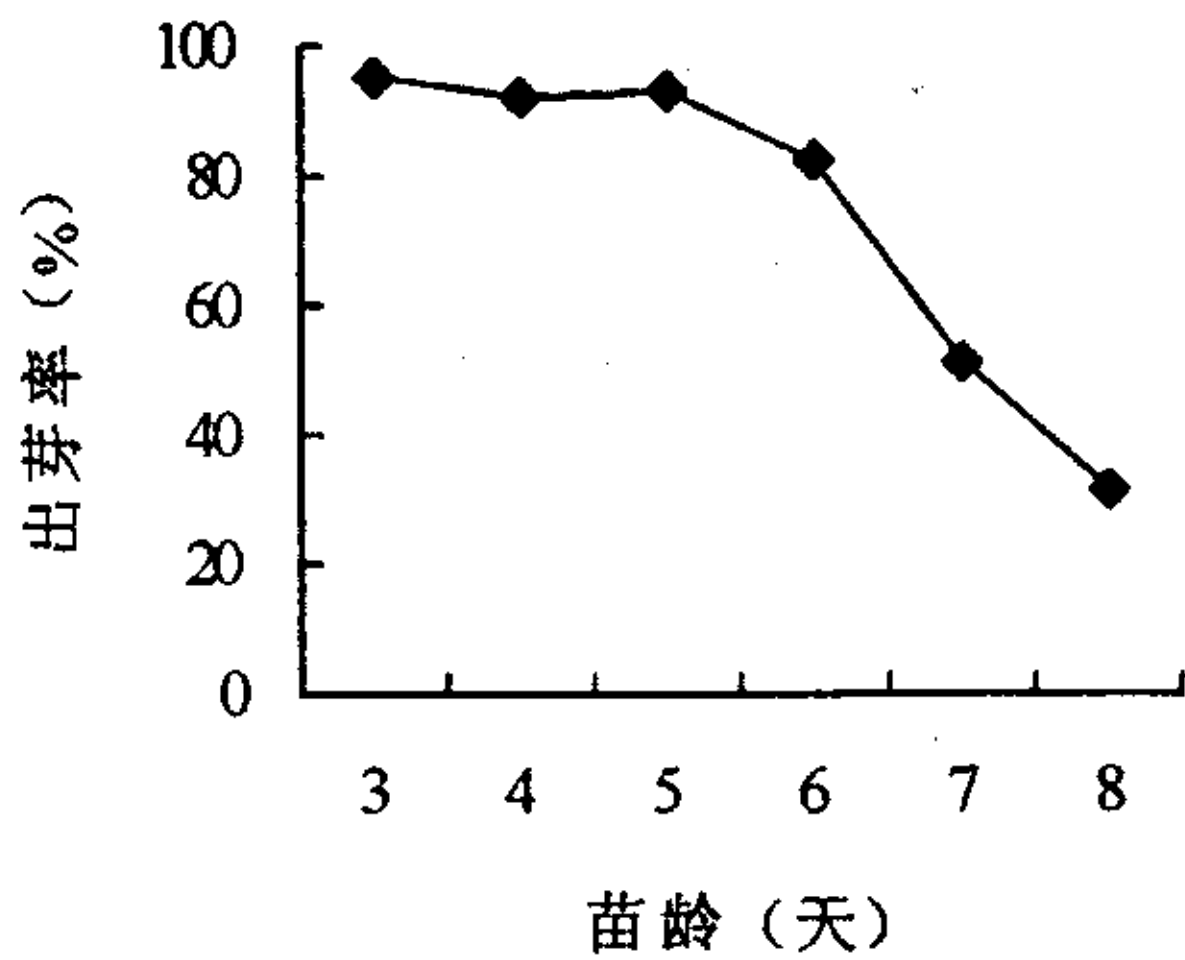


图 1 不同苗龄对南瓜 RF 品系再生的影响

2.3 不同激素配比对南瓜不定芽诱导的影响

以 RF 品系为试材,取 3 天苗龄的南瓜子叶,分别接种于 a、b、c、d 4 种芽诱导培养基上,结果表明,不同的激素配比对外植体大小、愈伤组织状态、芽诱导能力产生较大影响(表 1)。

由表 1 可见,处理 a、b、c 中外植体的增大幅度大致相当,都为接种时叶面积的 3 倍左右,不定芽均较小,但出芽率和平均每个外植体成苗数有较大差异。处理 b 的出芽率为 87%,处理 a 和 c 的出芽率分别为 60% 和 46.7%。在这 4 种处理中,d 处理表现最好,培养过程中外植体的叶面积增幅最大,为原来的 5 倍以上,不定芽出现较早且生长迅速,芽长约 1.5 cm,出芽率最高,为 97%,每个外植体的成苗数也最高,达到 2.6 个。

表 1 不同激素配比对南瓜不定芽诱导(15 天)的影响

培养基	外植体的大小	愈伤组织状态	不定芽长度(cm)	接种外植体数	出芽率 (%)	50d 成苗数	平均每个外植体成苗数(50d)
a	外植体增大为原来的 3 倍	颜色黑绿	约 0.3	30	60	20	0.67
b	外植体增大为原来的 3 倍	颜色黄绿	约 0.5	31	87	47	1.52
c	外植体增大为原来的 3 倍	颜色黄绿	约 0.2~0.3	30	46.7	14	0.47
d	外植体增大为原来的 5 倍以上	愈伤较大,黄绿色	普遍较长,最长约 1.5	29	97	76	2.62

注:外植体是子叶;培养基 a:MS+6-BA 1 mg/L+ABA 1 mg/L+Ades 40 mg/L;b:MS+6-BA 1 mg/L+ABA 1 mg/L+Ades 20 mg/L;c:MS+6-BA 1 mg/L+ABA 1 mg/L;d:MS+6-BA 1 mg/L+Ades 20 mg/L。

2.4 外植体类型对南瓜再生体系的影响

为了筛选最适于再生的外植体材料,分别切取 3 天苗龄无菌苗的子叶和下胚轴,接种于 d 培养基上培养 15 天后,结果表明,不同类型的外植体再生能力差异明显(表 2)。

表 2 外植体类型对南瓜再生体系的影响

外植体类型	接种数	有芽外植体数	成苗数 (50d)	平均每个外植体成苗数(50d)
子叶	40	37	99	2.48
下胚轴	20	0	0	0

由表 2 可见,在同样的培养条件下,南瓜子叶不定芽再生率较高,达 92.5%,出苗较多,平均每个外植体成苗数 2.48 个;而下胚轴比较难产生不定芽,接种的 20 个下胚轴均未产生再生植株,且在培养过程中,下胚轴产生的愈伤组织沙质化严

重,颜色发白,活力较低。

试验中还发现,子叶在培养中存在“极性”现象,产生的不定芽都集中在近叶柄端,远离叶柄端虽然也产生愈伤组织,但未产生不定芽。说明近叶柄端的细胞易于被诱导,脱分化和再分化比较容易,可能与这部分细胞的分化较晚有关。

2.5 基因型对南瓜再生体系的影响

切取 3 天苗龄的黑籽南瓜和白籽南瓜(青研砧木 1 号和 RF 品系)无菌苗子叶,接种于 d 培养基,分别统计其出芽外植体数和成苗数,结果见表 3。可以看出,供试的 3 个南瓜品种の出芽率和成苗率差异不大,不定芽发生率均在 90% 以上,每个外植体的成苗数均在 2.2 个以上。

表 3 基因型对南瓜再生体系的影响

品种	接种数	出芽外植体数 (12d)	平均每个外植体 成苗数(50d)
黑籽南瓜	32	30	2.50
青研砧木 1 号	32	29	2.21
RF 品系	31	29	2.58

3 小结与讨论

3.1 不同激素配比对南瓜再生体系的影响

本试验在总结前人经验^[1~8]的基础上,设计了 4 个激素配比处理,研究结果表明,ABA 和 Ades 对南瓜不定芽再生影响较大。在添加 Ades 的 a、b、d 3 个处理中,南瓜不定芽的发生率均高于不添加 Ades 的处理 c,并且未添加 ABA 的处理 d 不定芽发生率最高,说明 Ades 有利于南瓜不定芽的发生,而 ABA 对南瓜不定芽的发生有抑制作用。同时还发现 Ades 的不同浓度对南瓜不定芽产生的影响也不同,最适于南瓜不定芽发生的 Ades 浓度为 20 mg/L。

3.2 影响南瓜植株再生体系因素的探讨

除了激素配比对南瓜再生影响较大外,本试验还从无菌苗的培养方式、苗龄、外植体类型和基因型 4 个方面对南瓜的再生体系进行了研究。结果表明,将带皮的种子消毒后撒播于浸透水的脱脂棉中,发芽快且无菌苗的质量高,可提供优良的外植体材料。3~5 天苗龄的南瓜子叶对外源激素比较敏感,添加外源激素,不定芽的再生率较高,可满足后期基因转化的需要。本试验中基因型对南瓜的再生体系影响不大,可能是南瓜本身生长旺盛,再生能力较强的缘故。同时还发现,季节对南瓜的再生体系也有一定的影响。同样的培养条件下,春天南瓜子叶不定芽的发生率高于夏天和冬天,导致这一现象的原因还有待进一步研究。

参 考 文 献:

[1] 褚剑峰,郑 琪,黄伟忠. 日本迷你南瓜的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 6: 69.

[2] 李贞霞,李新峥,董卫华. 南瓜组织培养体系建立研究[J]. 北方园艺, 2005, 3: 75-76.

[3] 刘栓桃,赵智中,苗 前. 黑籽南瓜的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 4: 63.

[4] 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, 3: 43-45.

[5] 赵建萍,柏新付,蒋小满,等. 培养因子对艾西丝南瓜芽增殖及不定根形成的影响[J]. 植物学通报, 2000, 1: 84-86.

[6] 赵建萍,柏新付,蒋小满,等. 利用组培技术快繁艾西丝南瓜良种[J]. 北方园艺, 1999, 5: 17-18.

[7] 赵建萍,毕可华,蒋小满,等. 多效唑对艾西丝南瓜离体繁殖的影响(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1998, 6: 435-437.

[8] 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.

《山东农业科学》
荣获第五届全国优秀农业期刊评比一等奖

由中国农学会和中国期刊协会农业期刊分会联合举办的“第五届全国农业期刊评比”于日前揭晓。经过专家评委会评审,共有 97 种期刊获得了“全国农业期刊奖”,其中《山东农业科学》荣获技术类一等奖。