

# 南瓜疏松愈伤组织诱导的研究

邹克琴, 张拥军, 楼纪东, 丰金平, 曹 恬

(中国计量学院 生命科学学院 浙江 杭州 310018)

**摘 要:** 获得生长迅速, 疏松的愈伤组织是进行植物细胞悬浮培养的前提。研究以“栗冠”南瓜子叶做外植体, 在添加不同浓度的 BA 和 NAA 的 MS 固体培养基上诱导南瓜愈伤组织, 比较南瓜愈伤组织的诱导率和长势, 其中当外植体在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的培养基上培养时, 愈伤组织诱导率和长势最好。

**关键词:** 南瓜; 愈伤组织; 诱导率

**中图分类号:** S 642.603.69 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0201-03

植物细胞培养技术发展迅速, 已在许多植物的次生代谢产物开发方面发挥重大作用。与固体培养相比, 细胞悬浮培养能使细胞繁殖速度加快, 能大规模培养均一的植物细胞<sup>[1]</sup>。南瓜(*Cucurbita*)属葫芦科, 包括 30 个种, 其中包括 5 个栽培种: 中国南瓜(*Cucurbita mosochata*), 美洲南瓜(*C. pepo*), 印度南瓜(*C. maxima*), 灰籽南瓜(*C. mixta*)及黑籽南瓜(*C. fici folia*), 每个栽培种中又有许多类型和品种<sup>[1]</sup>。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、矿物质元素等多种营养成分, 其中所含的一些药理成分对多种疾病有疗效, 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<sup>[2,3]</sup>。通过对南瓜的愈伤组织诱导的研究, 旨在获得生长快, 疏松型愈伤组织, 进而为进行细胞悬浮培养生产南瓜多糖提供材料和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

“栗冠”南瓜种子由上海惠和种业有限公司提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 无菌苗的获得** 选取饱满、大小一致的南瓜种子, 在 45℃的水浴中浸泡 4 h 后, 用 70% 的酒精表面消毒 30 s, 置 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液中分别消毒 7、9、11 min, 20% NaClO 中消毒 20~30 min, 20% NaClO+0.5% 新洁尔灭消毒 15 min。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分。种子消毒之后在无菌条件下将其置于 0.9% 琼脂培养基(pH 5.8)

上进行黑暗培养, 发芽后转入光照培养, 光照周期 16 h/d, 光照强度 2 000~3 000 lx, 整个培养期间温度为(25±1)℃。

**1.2.2 愈伤组织的诱导** 将“栗冠”南瓜刚转绿 2 d 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二, 再纵切为二, 每片子叶得 4 块约 1 cm×0.5 cm 的外植体, 将由子叶得到的外植体正面朝上, 背面朝下接种于添加有不同浓度 6-BA, NAA 的 MS 培养基中, 培养基附加蔗糖 3%, 琼脂 0.9%, pH 5.8。接种之后, 放在培养箱中黑暗培养 2 d, 第 3 天转入光照培养箱, 光照周期 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx, 湿度 60%, 培养温度(25±1)℃。统计愈伤组织产生的时间、愈伤组织的长势。每个培养基编号中接种材料 60 块, 分别在 2005 年 3 月, 2005 年 9 月, 2006 年 3 月重复 3 次进行。

**1.2.3 继代培养** 25 d 后, 将优化培养基中的愈伤组织转接到相同培养基中继代培养, 每隔 25 d 转接 1 次, 每次继代时挑选生长旺盛的愈伤组织进行培养, 连续继代 5 次。

## 2 结果与分析

**2.1 不同的消毒剂、消毒时间对种子无菌萌发的影响**  
**表 1 不同的消毒剂, 消毒时间对种子无菌萌发的影响**

消毒剂	消毒时间 / min	供试种子 数/粒	萌芽 率/ %	污染 率/ %
0.1% HgCl <sub>2</sub>	7	20	99	100
0.1% HgCl <sub>2</sub>	9	20	95	20
0.1% HgCl <sub>2</sub>	11	20	50	11
20% NaClO	20	20	99	100
20% NaClO	30	20	77	50
20% NaClO+0.5% 新洁尔灭	15	20	99	25

由表 1 可见, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 9 min, 种子萌芽率高, 污染率较小、死亡率最低, 是最好的灭菌处理方法 20% NaClO+0.5% 新洁尔灭消毒 15 min, 这种消毒方法

第一作者简介: 邹克琴(1972-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物细胞工程, 现从事植物组织培养以及植物生理生化研究。E-mail: zoukeqin2005@yahoo.com.cn。  
通讯作者: 张拥军。E-mail: yjzhang@vip.163.com。  
基金项目: 浙江省科技厅计划资助项目(2005C24009)。  
收稿日期: 2007-09-18

次之。0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 7 min 和 20% NaClO 消毒处理 20 min, 造成的细菌性污染相当严重, 污染率达 100%。而消毒时间过长又抑制了种子萌发, 所以在后续的试验中, 均采用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒处理 9 min。

表 2 不同浓度 6-BA、NAA 对诱导南瓜叶片形成愈伤组织的影响

培养基	培养	6-BA	NAA	出愈率	20 d 后生长状况
编号	基	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>	/ %	
A1	MS	0	0	0	培养材料很少生长, 变黄
A2	MS	1.0	0	80	有愈伤组织形成, 生长缓慢
A3	MS	1.0	0.05	89	有愈伤组织形成, 颜色淡黄, 生长较慢
A4	MS	1.0	0.1	95	愈伤组织形成, 颜色淡黄 质地疏松
A5	MS	1.0	0.5	93	有愈伤组织形成, 颜色淡黄 愈伤有根形成
A6	MS	2.0	0	85	有愈伤组织形成, 颜色油绿, 水浸状
A7	MS	2.0	0.05	95	有愈伤组织形成 质地致密较硬, 出现绿色芽点
A8	MS	2.0	0.1	95	有愈伤组织形成 质地致密较硬 有根形成
A9	MS	2.0	0.5	100	有愈伤组织形成, 有根形成

2.2 不同浓度 6-BA、NAA 对南瓜愈伤组织诱导的影响

将切分后的南瓜子叶外植体分别接种于 A1 ~ A9 培养基中, 每种培养基接种 60 块, 从表 2 可以看出, 在 BA 一定的情况下, 随着 NAA 浓度的增加, 愈伤组织的

诱导率、质地、生长速度均发生明显的变化, 在不同配比的诱导培养基上, 大部分外植体在接种 5 ~ 7 d 后, 外植体开始拱起, 切口端膨大, 颜色变浅, 15 d 左右切口处形成颗粒状愈伤组织, 其中以 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 组合愈伤组织诱导最好, 诱导率达 95%, 颜色淡黄, 质地疏松, 适宜作细胞悬浮培养的材料。

南瓜叶片愈伤组织在继代培养物中, 继代 12 d 左右, 部分愈伤产出绿色突起, 一个半月后, 绿色突起分化出小苗, 而 MS + 1.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA 组合中, 愈伤组织长势好, 未见绿色突起和分化现象。说明随着 BA 浓度的增大, 它的促芽能力也相应的得到了提高。

2.3 南瓜愈伤组织的继代培养

将生长 25 d 的疏松愈伤组织转接到 MS + 1.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA 培养基中进行继代培养, 10 d 后再次长出新鲜的疏松型淡黄色的愈伤组织, 生长速度明显加快, 因此每隔 25 d 挑取生长旺盛的愈伤组织进行第 2 次继代, 连续继代 5 次, 观察发现愈伤组织生长旺盛, 结构疏松。

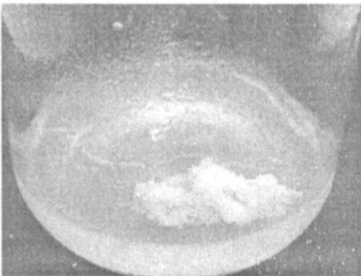


图 1 南瓜颗粒状疏松状愈伤组织



图 2 南瓜致密长根的愈伤组织



图 3 发生分化的愈伤组织

3 讨论

南瓜组织培养国内外均有报道<sup>[5-7]</sup>, 但关于南瓜愈伤组织诱导进行细胞悬浮培养方面报道很少, 在南瓜愈伤组织诱导的基础上将对其进行细胞悬浮培养, 生产次生代谢物质, 为其进行生物制药方面的开发研究打下基础。

南瓜组织培养中, 不同南瓜品种, 基因型, 同一品种不同组织和器官, 不同的激素种类和浓度对比对南瓜愈伤组织的诱导有明显的影 响, 研究以南瓜子叶为外植体, 以 MS 基本培养基附加多种植物激素组合诱导南瓜愈伤组织。试验结果表明, 当 MS + 1.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA 时, 在这种培养基上产生的愈伤组织生长速度较快, 质地疏松。再以此愈伤组织进行继代培养, 既可加速增殖, 又可提高愈伤组织的松散性, 因此, 此愈伤组织较适合作细胞悬浮培养的材料。

参考文献

[ 1 ] 吴永宏 德颐, 王丽蓉. 植物细胞的同步培养技术[ J ]. 植物生理学通讯, 1993, 29(2): 108-110.  
[ 2 ] 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.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 熊学敏, 叶士玲. 南瓜多糖对四氧嘧啶糖尿大鼠的降糖果作用[ J ]. 江西中医学院学报, 1998, 10(4): 174- 175.  
[ 5 ] 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.  
[ 6 ] 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.  
[ 7 ] 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.

# 东方百合试管正常苗与玻璃苗叶片解剖结构的比较

韦梅琴, 郑江伟  
(青海大学 农牧学院农林系 青海 西宁 810016)

**摘要:** 利用解剖学方法, 对东方百合试管正常苗和玻璃苗叶片解剖结构进行了观察比较, 结果表明: 二类苗叶都为等面叶, 其表皮均由单层细胞构成, 气孔突出, 且叶肉中通气组织发达。与试管正常苗相比, 玻璃苗的叶片厚; 叶肉组织无细胞的分化; 气孔突出明显, 表皮细胞、叶肉细胞体积膨大; 有的叶肉细胞壁发育不全, 在某些区域出现空洞, 壁的形态呈现不完整的现象; 玻璃苗叶片的维管组织呈现退化的现象。

**关键词:** 东方百合; 试管苗; 玻璃苗; 叶片; 解剖结构  
**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup> 9; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0203-03

百合 (*Lilium tenuifolium* Fisch) 属于百合科百合属。东方百合花姿奇特, 为百合中的名贵种类, 深受人们的欢迎<sup>[1]</sup>。近年来, 对东方百合离体培养的研究已有大量的报道, 但在离体培养中, 有时会出现异常现象, 如试管苗玻璃化就是常见的问题之一; 这是植物组织培养过程中特有的一种生理失调或生理病变, 由于其组织畸形, 吸收器官与光合器官功能不全, 因而很难移栽成活<sup>[2-4]</sup>。现针对东方百合离体培养中产生的试管正常苗和玻璃苗叶片进行解剖学研究, 以期能为试管植物提供解剖学资料。

## 1 材料与方法

于青海大学实验温室里选择生长健壮的东方百合—马可波罗茎尖为外植体, 接种于添加 BA、KT 的 MS 培养基中诱导培养, 经初代及继代培养获取的试管正常苗和玻璃苗的叶片, 用 FAA 固定液固定, 梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋; 切片厚度为 8~12 μm; 番

红—固绿对染; 中性树胶封片。在 Olympus-BH 显微镜下进行观察、测微和拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 东方百合正常苗的形态解剖学特征

2.1.1 形态学特征 试管正常苗高约 8 cm, 呈绿色, 由数枚叶片及其基部的小鳞茎组成。叶片无柄, 呈绿色, 较薄, 披针形, 具平行脉, 叶表光滑无毛。鳞茎呈扁球形, 由多数肥厚肉质的鳞片抱合而成, 外无皮膜。见图 1。

2.1.2 解剖学特征 正常苗叶片的中脉处厚 445.88 μm, 其余部分厚 300.95 μm。叶的上下表皮由单层细胞构成, 排列整齐, 缺少角质层, 气孔微突, 具孔下室。上表皮细胞的长为 27.45~65.70 μm, 宽为 29.79~64.35 μm, 下表皮细胞长为 27.18~42.93 μm, 宽为 26.55~46.08 μm。叶肉组织分化为等面叶, 背腹两面都有明显的栅栏组织, 厚 65.08 μm, 近方形, 细胞排列不紧密, 胞间隙大, 一般为 31.58 μm; 海绵组织厚 192.83 μm, 成不规则的圆形, 细胞排列不紧密, 胞间隙大, 具有裂隙腔, 宽为 36.08~121.56 μm, 栅栏组织与海绵组织的厚

第一作者简介: 韦梅琴(1963-), 女, 高级实验师, 从事植物学及组织培养方面的工作。E-mail: xnmwq@126.com。  
收稿日期: 2007-07-15

## Studies on Pultaceous Callus Induction in Pumpkin

ZOU Ke-qin, ZHANG Yong-jun, LOU Ji-dong, FENG Jin-ping, CAO Tian  
(College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

**Abstract:** Rapidly vegetal and pultaceous callus is the basis of plant cell suspension culture. Using the leaf blade of pumpkin as explants, added different kinds of hormones and proportions to MS medium for inducing the callus of pumpkin, then compared the induction rate, properties and growth potential. The results showed that the callus induction rate and growth potential were the highest when MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA was used.

**Key words:** Pumpkin; Callus; Induction rate