

KT 和 NAA 对黑籽南瓜器官离体再生的影响

徐恒戩

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘要:对黑籽南瓜的离体再生体系进行了初步研究。结果表明,黑籽南瓜的离体器官不定根再生比较容易,不定芽的再生较为困难,受到多种因素的影响。在 KT 与 NAA 两种激素的培养基上,不同外植体的再生能力差异明显,所有外植体都能诱导出愈伤组织,但只有子叶+胚轴的部分能够再生出不定芽,其它部分都能再生出不定根,但胚轴上的不定根很少。最佳的再生培养基是 MS+KT 2.0mg/L+NAA 0.3mg/L,可获得较高的不定芽诱导率。

关键词:黑籽南瓜;子叶;器官再生;KT;NAA

中图分类号:S 642.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0200-03

黑籽南瓜是南瓜属中蔬菜作物,食用价值不高^[1,2],但因其具有发达的根系、极好的抗冷性、抗病性^[3,4]等特点,综合性状优良,成为瓜类作物的主要砧木之一,特别在黄瓜栽培上,生产上一直应用广泛。以前对其研究较多,但多集中于栽培方面,在育种方面极为罕见。黑籽南瓜作为砧木的优越性已有许多研究,虽然已经有较好的黄瓜砧木出现^[5],然而,作为广泛应用的砧木,在生产上还未发挥重要作用。随着生产条件的变化,特别是温室大棚内的小环境变化(土壤次生盐渍化严重、新型病害发生等),发现黑籽南瓜在抗线虫方面还不理想,仅表现为耐性^[6],但在抗盐性方面还有较好的表现,优于白籽南瓜^[7],在抗病性和主要经济性状等方面综合表现最好^[8]。对黑籽南瓜进行适当的基因改良,提高其抗线虫病,成为当前急迫的问题。然而黑籽南瓜种内遗传多样性很窄^[9,10],无法满足杂交育种的要求,基因工程改良的方法成为很好的选择。目前已经报道了黑籽南瓜的茎尖培养快繁技术^[11],但未有器官离体再生的报道。总体讲,南瓜细胞与组织培养方面的研究还有很大进步空间^[12]。现就黑籽南瓜的离体再生的初步研究结果进行分析,为今后的基因改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia* Bouch):目前生产上常用的瓜类嫁接砧木,种子购自济南种子市场。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗制作 种子去皮后,采用 40℃ 温水浸种 2h 以上备用。将准备好的去皮种子,采用酒精和次氯酸钠

钠进行表面消毒,消毒后的种子接种于无菌的 1/2MS 培养基,28℃ 发芽,备用。消毒方法采用 75% 的酒精 30s,另加 5% 的次氯酸钠分别消毒 5、10、15min 三种方式,探讨适宜的消毒方法。

1.2.2 不同外植体的离体再生培养 将无菌苗切成子叶顶端、子叶中段、子叶基端、子叶基端+下胚轴、下胚轴 5 种外植体,分别接种在培养基中进行培养。其中子叶下端+下胚轴是通过下列方式获得的:将无菌苗的子叶上半部去掉,下胚轴保留 3mm 左右,从两子叶种间将下胚轴劈成两半,每一半与子叶下半部相连,然后用镊子将顶芽去掉。采用 MS 培养基为基本培养基,外加蔗糖 30g/L,琼脂粉 6.5g/L 固化,pH 值 5.8,激素采用 KT 采用 0、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/L,分别与 NAA 0.1、0.5、1.0、1.5mg/L 组成 20 个处理,以不加激素的培养基作对照,每处理每瓶接种 6 个外植体,重复 15 次。

1.2.3 器官的离体再生 采用 MS 培养基为基本培养基,外加蔗糖 30g/L,琼脂粉 6.5g/L 固化,pH 值 5.8;外植体采用子叶上部、子叶下部+下胚轴、下胚轴 3 种,分别接种于以下激素组合中。激素选择 KT 和 NAA 两种激素,根据上面的试验结果进行试验,由于无激素的培养基上不能产生不定芽,试验设该处理。KT 的浓度分别为:1、2、3mg/L;NAA 的浓度分别为:0、0.1、0.3、0.5mg/L,共组成 12 个激素处理,每处理每瓶接种 5 个外植体,重复 15 次。

2 结果与分析

2.1 无菌苗的获得

采用三种消毒方式对去皮的南瓜种子进行消毒,试验表明除了 5min 外,其它两种消毒方式都能够获得 100% 的无菌苗,但是消毒 15min 的无菌苗,生长缓慢,不整体,发芽效果不好,因此,在以后的试验中,全部采用 75% 酒精消毒 30s+5% 次氯酸钠 10min。

2.2 子叶下部+胚轴的外植体中顶芽的去除效果

作者简介:徐恒戩(1966-),男,博士,研究方向为植物生物技术。

基金项目:山东理工大学博士基金资助项目(N04041404012)。

收稿日期:2006-11-29

在进行离体再生的试验过程中,为了保证去除顶芽的影响,每次进行切苗时,随机抽取去顶芽的外植体进行镜检,在解剖显微镜下,可以清楚地看到顶芽和顶芽去除后留下的凹形痕迹,表明顶芽去除彻底。

2.3 不同外植体对不定芽再生的影响

外植体的种类是影响不定芽再生的重要因子,这在许多作物中皆有报道,黑籽南瓜也表现出同样的特性。试验表明单纯的子叶上部、中部、基部、下胚轴在 KT 与 NAA 形成的多种激素配方下,都能很好地诱导愈伤组织和生根,但是不能诱导出不定芽。在外植体接种后的几天内,可以看到外植体急速增大,4~5d 后基本稳定,并逐渐出现愈伤组织,10d 后开始出现不定根,最终没能得到不定芽。

用外植体子叶上部、子叶下部+下胚轴、下胚轴三部分进行试验,结果获得了不定芽,表 1 的结果说明黑籽南瓜的不定芽再生,以子叶下部+下胚轴为最适外植体,其它部分在该条件下无法获得不定芽;相比较而言,不定根的获得,则显得较容易,但在胚轴外植体的生根率明显较少(部分结果见表 1)。

试验中发现,KT 的添加对不定芽的发生是必需的,低浓度 KT 对外植体上不定芽发生的影响小于高浓度的 KT;然而当浓度大于 4mg/L 时,外植体玻璃化严重,影响外植体的正常生长发育。不添加激素的对照处理则没有获得任何不定芽。试验也表明,当 NAA 浓度进

一步提高到 1.0 和 1.5mg/L 时,不定芽的再生率大大下降。不定根的生长量加大。因此不宜使用较大浓度的 NAA。

表 1 不同外植体的再生能力比较

处理	外植体总数	再生芽总数	再生芽率	生根外植体总数	生根外植体率
1 子叶+胚轴	719	507	0.705	328	0.456
2 子叶顶端	277	0	0	121	0.437
3 下胚轴	258	0	0	34	0.132

2.4 KT 对离体器官再生的影响

试验结果表明,KT 对不同外植体器官再生的影响略有差异。从外植体子叶上部+胚轴的试验结果可以看出,在 NAA 浓度一定时,不定芽再生率随着 KT 浓度的变化而变化,不定芽再生率以 KT 浓度为 2mg/L 为最高,浓度过高,则不定芽发生率反而下降。

KT 对不定根的诱导则表现出不同的模式,变化趋势正好和不定芽的发生相反。随着 KT 浓度的上升,不定根发生率先降低,再升高,成“V”型变化。这表明较高的 KT 浓度也不利于不定芽的再生,但对不定根的发生抑制性能减弱(图 1)。

KT 对子叶上部和下胚轴的器官发生的影响则不同。随着 KT 浓度的增加,子叶上部外植体不定根的再生率一直明显呈下降趋势,而当 KT 浓度大于 1mg/L 时,胚轴外植体不再产生不定根(图 2)。

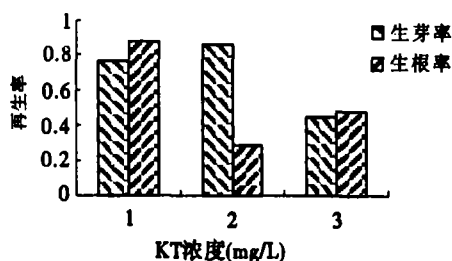


图 1 KT 对器官再生的影响

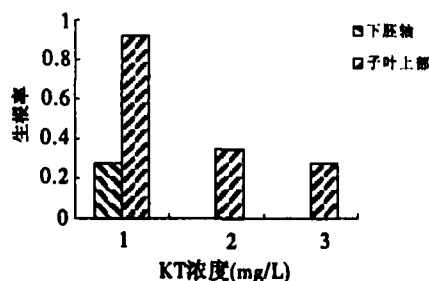


图 2 KT 对不定根再生的影响

2.5 NAA 对外植体器官再生的影响

NAA 是器官离体再生的常用生长素类激素,对黑籽南瓜的器官再生有着重要作用,对于子叶下部+胚轴外植体,在 KT 存在的条件下,NAA 是不定芽产生的必需条件,也不是不定根诱导所必需的。不定芽的诱导率,随着 NAA 浓度的提高而提高,当浓度提高到 0.3 时,不定芽发生率最高。

NAA 对不定根的发生具有很好的促进作用。不定根的诱导率也随着 NAA 浓度的变化而变化,当 NAA 浓度达到 0.1mg/L 时为最大值,然后,随着 NAA 浓度的提高,不定根的发生率呈逐渐下降趋势(图 3)。

对不同的外植体,在 KT 存在的条件下,NAA 的影响也不同。对下胚轴外植体,NAA 对其不定根的发生没有促进作用,甚至有抑制作用;对子叶上部外植体来讲,NAA 对其不定根的发生具有促进作用(图 4)。

2.6 KT 和 NAA 对器官再生的综合影响

以子叶下部+下胚轴为外植体,对 NAA 和 KT 分别在 3 个水平的试验结果,进行了不定芽再生的全面比较,不定芽的发生率以 KT 2.0+NAA 0.3 为最高,KT 2.0+NAA 0.5 次之(图 5,在横坐标上同一 NAA 浓度上的三个长柱,分别代表 3 个 KT 浓度)。但总体说来,该体系的不定芽再生率还不高。

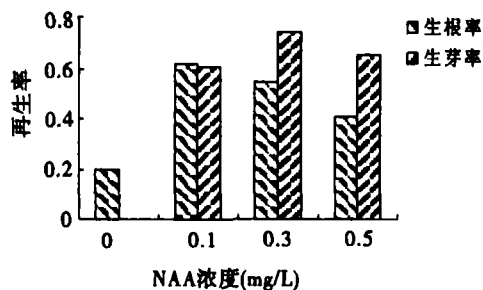


图3 NAA对器官再生的影响

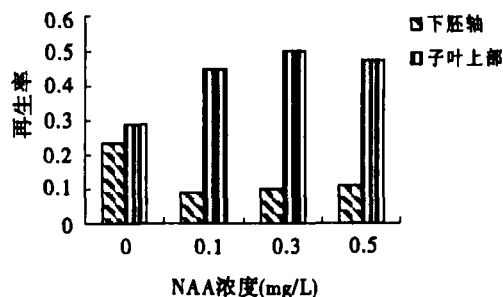


图4 NAA对不定根再生的影响

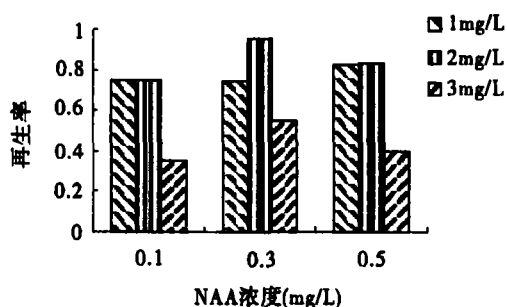


图5 不同KT和NAA组合对不定芽再生的影响

3 讨论

在葫芦科中,已经有不少的作物建立起了离体再生体系,但在南瓜属作物中还不,仅在西葫芦和笋瓜上有报道,黑籽南瓜离体再生体系的建立,对南瓜属植物的离体培养有一定的促进作用。但是目前建立的再生体系,其不定芽再生率还不高,需要进一步优化,采用更多的激素进行试验。试验中外植体的种类严重影响不定芽的再生,这与笋瓜和西葫芦的研究结果相似^[13,14],这可能是与南瓜的细胞分化有关,越接近顶端生长点的部位,其再生能力越强。然而子叶的不同部位的不定根再生能力较强,这可能与子叶内部的内激素有关。通过进一步的研究,将建立更加高效的离体再生体系。

参考文献:

[1] 蔡克华. 云南黑籽南瓜及其栽培技术[J]. 长江蔬菜, 1994, 6:9-11.

- [2] 张丽琴,杨敏杰. 黑籽南瓜的特性与栽培[M]. 云南农业科技, 1999, 2: 27,34.
- [3] 刘慧英,朱祝军,吕国华,等. 低温胁迫下西瓜嫁接苗的生理变化与耐冷性关系的研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11):1325-1329.
- [4] 于贤昌,邢禹贤,马红,等. 黄瓜嫁接苗抗冷特性研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(4):348-352.
- [5] 顾兴芳,张圣平,张思远,等. 南方根结线虫黄瓜砧木的筛选[J]. 中国蔬菜, 2006, 2: 4-8.
- [6] 刘鸣韬,徐瑞富,李新岭,等. 豫北地区黄瓜根结线虫病个体扩展动态与病原鉴定[J]. 北方园艺, 1999, 1:47-48.
- [7] 王冉,陈贵林,宋炜,等. NaCl胁迫对两种南瓜幼苗离子含量的影响[J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 31(1): 94-98.
- [8] 冯春梅,莫云彬,陈海平. 不同砧木嫁接对黄瓜抗病性及主要经济性状的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6):283-284.
- [9] 张天明,屈冬玉,王长林,等. 南瓜属4个栽培种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国蔬菜, 2006, (1): 11-14.
- [10] 刘小俊,李跃进,赵云,等. 中国黑籽南瓜种质资源遗传多态性分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42 (3):599-604.
- [11] 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, 40(4):459.
- [12] 徐恒骞. 南瓜属蔬菜细胞与组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2006, 6:127-129.
- [13] Lee Y K, Chung W I, Ezura H, et al. 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.

Effect of KT and NAA on the Regeneration of the *Cucurbita ficifolia* Bouch

XU Heng-jian

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

Abstract: *Cucurbita ficifolia* Bouch is a kind of important vegetable and stock for Cucurbits. In order to improve its property by biotechnology, the regeneration system was studied preliminarily. The results showed that the adventitious root was produced easily and the adventitious bud was difficult to generate. The different explants had different ability to regeneration in the media with KT and NAA. The callus and adventitious roots were induced in all of the explants and the hypocotyls explants had fewer adventitious roots, but the adventitious buds were only produced from the explants of lower cotyledon plus hypocotyls. The better media for adventitious buds regeneration was MS+ 30g/L sugar+6.5g/L agar+KT 2.0mg/L+ NAA 0.3g/L.

Key words: *Cucurbita ficifolia* Bouch; Cotyledon Regeneration; KT; NAA