

# 南瓜子叶再生体系的建立

任桂红, 林 荣, 杨 东

(北华大学, 吉林 吉林 132011)

**摘 要:**以 5 个南瓜品种为试材,比较了植物生长物质、基因型、子叶切割和接种方式等因素对不定芽分化的影响。结果表明:4~5 d 无菌苗的子叶沿中脉纵切,将其中脉斜插入培养基中,分化率最高。易于诱导不定芽的南瓜品种为“绿栗”南瓜和“夷香红栗”南瓜。“夷香红栗”南瓜的不定芽诱导最适培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,不定芽分化率为 37.5%,平均芽数 2.2 个。“绿栗”南瓜最佳培养方式为在 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的培养基中培养 12 d,再转入 MS+6BA 2.0 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 上继续培养,不定芽分化率达到 52%,平均芽数 3.7 个。

**关键词:**南瓜;离体培养;植株再生  
**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)23—0133—03

植物组织培养技术目前已经成功应用于甜瓜、西瓜、黄瓜等瓜类作物<sup>[1-3]</sup>,但对南瓜的离体培养研究报道不多<sup>[4-7]</sup>。因此,现对南瓜再生体系的建立进行探讨,对开展南瓜的快速繁殖、种质资源的保存、体细胞变异育种、遗传转化系统建立和生物反应器的应用都具有十分重要的理论意义和应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用市场上销售的、本地主要栽培的南瓜种子为试验材料(表 1)。

表 1 所选南瓜品种名称及产地	
名称	产地
日本南瓜	河北青县神华种业
甜面 F1 南瓜	山西太谷绿宝种业
绿栗南瓜	河北青县大地种业
夷香红栗南瓜	山西太谷艺农种子公司
红宝石南瓜	山西太谷绿宝种业

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌苗的培养** 选取饱满、大小一致的南瓜种子,去皮,在 25℃ 的恒温水浴中浸种 5~6 h。在超净工作台上用 70%酒精消毒 30 s 后,用无菌水冲洗 1 次;0.1%升汞消毒 9 min 后,用无菌水冲洗 4~5 次;在无菌条件下将消毒的种子平放于培养基上,置于(25±2)℃、弱散射光培养箱中培养。

**1.2.2 外植体的切取和培养** 在无菌条件下选取苗龄 4~5 d 南瓜无菌苗子叶,将子叶沿中脉纵切,将子叶基部中脉处斜插入培养基。以 MS 为基本培养基,蔗糖 30 g/L, pH 6.0,用 0.7%琼脂固化。共设芽诱导培养基 9 种(表 2);芽伸长培养基 2 种, a: MS+6BA 2 mg/L, b: MS+6BA 2 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L;不定芽生根以 1/2MS 为基本培养基,分别添加 NAA(0.05、1.0 mg/L)。

表 2 诱导培养基中激素水平及浓度 mg·L <sup>-1</sup>			
编号	6-BA	NAA	GA <sub>3</sub>
①	3.0	0	—
②	3.0	0.1	—
③	3.0	0.2	—
④	3.0	0.5	—
⑤	1.0	0.1	—
⑥	2.0	0.1	—
⑦	4.0	0.1	—
⑧	3.0	0.1	0.5
⑨	3.0	0.1	1.0

**1.2.3 培养条件** 光照培养:在温度(25±2)℃、光照时间 16 h/d 的光照培养箱内培养,光照强度 1 000~2 000 lx。暗培养:在温度(25±2)℃、无光照培养箱内培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物生长调节物质对不定芽分化的影响

以“绿栗南瓜”子叶为试材,使用 9 种诱导培养基诱导不定芽,探讨 NAA、6-BA 和 GA<sub>3</sub> 在 不定芽分化中的作用。培养时间 37 d,中间转接 1 次。培养条件为光照培养。

第一作者简介:任桂红(1967-),女,硕士,副教授,现从事植物生理学的教学与科研工作。E-mail: renguihong67@126.com。  
收稿日期:2010-09-06

由表 3 可知, NAA 并非南瓜愈伤组织形成和不定芽分化所必须的, 低浓度的 NAA 可以促进胚性愈伤组织的形成和芽的分化。随 NAA 浓度升高, 愈伤组织的增殖速度加快, 形成大量白色疏松的愈伤组织, 对芽的分化有抑制作用。较高浓度的 6-BA 对芽的分化有促进作用, 可以使不定芽的分化保持较高的频率。6-BA 浓度在 3.0 mg/L 以上时, 才有不定芽的分化, 浓度在 3.0 和 4.0 mg/L 时, 分化率相同, 但是后者再生芽多畸形, 玻璃化加重, 难以发育成正常植株。此外, 当 6-BA 浓度较高时, 由于其后续效应, 常会抑制不定芽的伸长, 芽增殖后期应逐渐降低细胞分裂素浓度。在 NAA 和 6-BA 的适宜浓度下, GA<sub>3</sub> 浓度在 0.5 和 1.0 mg/L 时均抑制芽的分化。因此, 最适诱导培养基为②号培养基。

表 3 植物生长物质对不定芽分化的影响

培养基 编号	接种子叶数 / 个	分化芽子 叶数/ 个	芽分化率 / %	平均芽数 / 个	芽生长 情况
①	24	4	16. 7	2. 3	正常
②	24	9	37. 5	2. 7	正常
③	26	4	15. 4	2. 3	正常
④	26	0	0	0	—
⑤	24	0	0	0	—
⑥	24	0	0	0	—
⑦	24	9	37. 5	2. 8	细弱、畸形多
⑧	26	2	7. 7	2. 5	正常
⑨	24	2	8. 3	2	正常

2.2 基因型对不定芽分化的影响

将 5 个品种的子叶接种于诱导②号培养基培养 12 d; 分别转入 2 种芽伸长培养基继续培养 30 d 统计不定芽的分化率。培养条件均为光照培养。

表 4 基因型对不定芽分化的影响

品种	②→a		②→b	
	芽分化率/ %	平均芽数/ 个	芽分化率/ %	平均芽数/ 个
甜面 F1	21. 7	1. 6	12. 5	2. 3
绿栗	37. 5	3. 3	52	3. 7
夷香红栗	37. 5	2. 2	5	3
红宝石	0	0	16. 7	2
日本	0	0	0	0

由表 4 可知, 在 2 种诱导培养中, “甜面 F1”、“绿栗”、“夷香红栗”、“红宝石”4 个品种都有不定芽的分化, 但诱导率和不定芽数却明显不同。“绿栗”南瓜在 2 种诱导方式中, 诱导率平均芽数都最高, 其中②→b 中的诱导率达到了 52%, 平均芽数为 3. 7 个, 明显高于其它品种, “夷香红栗”和“甜面 F1”都是②→a 的诱导率较高, 分别达到了 37. 5%和 21. 7%, 但②→b 平均芽数较高, “红宝石”只是在②→b 中有芽的分化, “日本南瓜”在 2 种培养方式中均未分化不定芽。因此, “绿栗”南瓜和“夷香

红栗”比较容易诱导不定芽。

基因型对芽分化的影响和产生的愈伤组织的形态密切相关。“绿栗”南瓜的愈伤组织多为浅黄绿色、无光泽、比较紧密, 分化的不定芽数量较多; “甜面 F1”南瓜在子叶基部长出少量绿色、紧密、光亮的愈伤组织, 分化的不定芽数量少, 且不易伸长; “夷香红栗”的愈伤组织 2 种情况都有, 绿色光亮的愈伤组织也能分化出数量较多的不定芽, 但也不易伸长; “红宝石”南瓜产生白色、疏松的愈伤组织的量比较大, 分化能力低; “日本南瓜”的愈伤组织多为浅绿色表面呈颗粒状, 无芽的分化。

综合 2. 1、2. 2 中结果可看出, “绿栗”南瓜先在不含 GA<sub>3</sub> 的诱导培养基②上诱导培养, 再转入含有 GA<sub>3</sub> 的伸长培养基 b 上促进芽的生长, 分化率和不定芽数均有提高。“绿栗”南瓜的不定芽分化不同步, 先分化的幼苗在营养竞争和生长上占有明显优势, 后分化的幼苗比较细弱, 部分芽点不能形成幼苗。而 GA<sub>3</sub> 虽然抑制细胞的再分化, 但可促进已分化芽点的生长。因此, 恰当使用 GA<sub>3</sub> 可以提高分化率和成苗率。

可见, 南瓜子叶的离体再生对基因型的依赖性很强, 同时不同基因型对诱导方式和植物生长物质的要求有较大差异。因此, 选择“绿栗”南瓜在诱导培养基②上诱导芽分化, 再转入含有 GA<sub>3</sub> 的伸长培养基 b 上促进芽伸长效果最佳。

2.3 子叶切割和接种方式对不定芽分化的影响

以“绿栗”南瓜和“红宝石”南瓜子叶为试验材料, 用 4 种方法切取外植体: ①纵切: 将子叶沿中脉纵切(1/2 子叶); ②将子叶纵切再横切 1 次, 取子叶基部(1/4 子叶); ③将子叶沿中脉纵切, 再横切 2 次, 取子叶基部(1/6 子叶); ④将子叶横切取子叶基部(1/2 子叶)。接种方式为平放(子叶表面朝上)、斜立(即将子叶中脉斜插入培养基)和直立(将子叶基部插入培养基)。切割后的外植体在②号不定芽诱导培养基中诱导培养 12 d, 转入伸长培养基 b 中继续培养 30 d, 统计不定芽的分化率。

由表 5 可看出, 3 种接种方式均可诱导出不定芽, 但分化率有明显差别, “绿栗”南瓜和“红宝石”南瓜均表现出斜立> 直立> 平放。其原因可能是子叶块斜立时切口与培养基接触面积较大, 增加了对培养基营养成分的吸收, 子叶基部切口较宽, 利于不定芽的分化; 直立时子叶基部形成的愈伤组织较大, 但子叶基部切口宽度增加得少, 不利于分化; 而子叶平放时各部分生长不均匀, 出现凹凸和卷曲现象, 减少了与培养基的接触面积, 不利于营养的吸收。

表 5 子叶切割和接种方式对不定芽诱导的影响

切割、架缚方式	绿栗南瓜			红宝石南瓜		
	接种数/ 个	分化数/ 个	分化率/ %	接种数/ 个	分化数/ 个	分化率/ %
①纵切 斜立	36	13	36.1	36	5	13.9
直立	36	9	25	36	4	11.1
平放	36	7	19.4	36	2	5.6
②纵切再横切、斜立	24	6	25	24	2	8.3
③纵切再横切 2 次、斜立	24	2	8.3	24	1	4.2
④横切、直立	24	4	16.7	24	2	8.3

子叶的大小也影响再生能力,以纵切为二的子叶分化率最高,而且子叶尖端对分化也有影响。其原因可能有二方面,一是子叶代谢产生光合产物、激素等物质,促进了基部愈伤组织的分裂和分化;二是子叶合成生长素向下运输的过程中,使其从形态学上部到下部形成了生长素的浓度梯度,这种体内信号的梯度,诱导了与脱分化和再分化有关的基因的表达,对此还需要通过进一步的试验进行探究。能分化的愈伤组织大部分起源于子叶基部中脉处的切口上,因此纵切的子叶增大了切口面积,有利于愈伤组织的产生和分化。

2.4 不定芽的生根培养

南瓜幼苗生根比较容易。当分化的幼苗长到 1~2 cm,在超净工作台上切下转接到 NAA 浓度分别为 0、0.5、1.0 mg/L 的 1/2MS 培养基上培养。培养 5 d 后,幼苗基部出现白色小突起。培养 10 d 后,由小突起长成白

色的小根。在 3 种培养基上的生根率分别为 53.8 %、80 %、92.0 %。

参考文献

[ 1 ] 张志忠,吴菁华,吕柳新.西瓜高频再生系统的研究[ J ].中国农学通报,2004,20(2): 151-153.

[ 2 ] 蔡润,黄伟华,潘俊松等.甜瓜子叶离体培养直接再生不定芽的形态学和解剖学观察[ J ].武汉植物学研究 2002 20(5): 338-342.

[ 3 ] 郭德章,鄢铮,赖钟雄等.“翠秀”黄瓜子叶原生质体的高效培养及植株再生[ J ].园艺学报 2003 30(2): 227-228.

[ 4 ] 邹建.观赏南瓜子叶离体培养的初步研究[ J ].西南农业大学学报(自然科学版),2003 25(4): 298-299.

[ 5 ] 李贞霞.南瓜组织培养体系建立研究[ J ].北方园艺,2005(3): 75-76.

[ 6 ] 刘栓桃.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): 4591.

[ 7 ] 张卫华.南瓜组织培养再生体系的研究[ J ].山东农业科学,2006(6): 4-6.

Primary Establishment of Plant Regeneration System of Pumpkin

REN Gui-hong, LIN Rong, YANG Dong  
(Beihua University, Jilin Jilin 132013)

**Abstract:** Taking five species pumpkin as test materials the effect of plant growth substances, genotype, cotyledon dissection and inoculation methods adventitious bud differentiation were studied. The results showed that the best regeneration rate has been achieved in cutting the cotyledon into half longitudinally of 4~5 day old seedlings, placing the middle leaf vein in the medium. The best genotypes were ‘Luli’ and ‘Yixianghongli’ to induce the adventitious bud among pumpkin species tested. The best medium composition for adventitious bud culture was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L with adventitious bud differentiation ratio of 37.5%, producing average 2.2 buds for ‘Yixianghongli’. Whereas best medium composition for ‘Luli’ was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L for 12 days, and transferred into MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L with the adventitious bud ratio of 52%, average 3.7 buds.

**Key words:** pumpkin; *in vitro* cultivation; plant regeneration