

DOI:10.11937/bfyy.201522025

西葫芦茎尖离体培养和快速繁殖技术

王建书¹, 孙松松^{1,2}, 刘浩¹, 张国裕², 李海真², 张帆²

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056021; 2. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097)

摘要:以西葫芦茎尖为外植体, MS 为基本培养基, 探索了不同消毒处理、不同浓度的植物生长调节剂及其组合对西葫芦茎尖再生和快速繁殖的影响。结果表明: 西葫芦茎尖在含有 0.02% 升汞与 10% 次氯酸钠的溶液中消毒 10 min 的效果最好, 污染率降低到 6.7%, 成活率可达 91.7%; 西葫芦茎尖诱导再生芽的最好培养基处理为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.10 mg/L; 最佳的生根诱导培养基为 MS+IBA 0.30 mg/L。

关键词:西葫芦(*Cucurbita pepo* L.); 茎尖; 组织培养; 快繁

中图分类号:S 642.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0096-03

西葫芦(*Cucurbita pepo* L.) 属葫芦科南瓜属一年生蔓生草本蔬菜作物, 别名茭瓜、白瓜、番瓜等, 营养丰富、耐贮运、产量高, 在我国的种植面积逐年增加, 已成为设施蔬菜栽培面积中仅次于黄瓜的瓜类蔬菜。利用茎尖与腋芽离体培养获得再生植株可以对重要稀缺材料进行长期保存与快速繁殖, 同时避免优良性状的分离与丢失, 已经在很多作物的育种中广泛应用, 如辣椒^[1]、荸荠^[2]、观赏南瓜^[3]等。另外, 西葫芦属于雌雄同株异花植物, 茎尖离体再生体系的建立也可以避免自交纯合育种中, 由于雌雄花期不同或外界环境导致的植株坐果失败造成的育种材料丢失问题。

目前, 国内外关于西葫芦茎尖离体再生培养的研究鲜有报道。为此, 该研究探索了西葫芦茎尖消毒处理方法以及不同激素组合对茎尖再生培养的影响, 以期建立高效的西葫芦茎尖培养及快速繁殖方法, 为重要种质材料的保存扩繁提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以北京市农林科学院选育的杂交品种“京葫 33 号”为试材。基本培养基为 MS 培养基, 其中蔗糖 20 g/L, 琼脂粉 8 g/L, 并附加不同种类和浓度的植物生长调节剂 6-BA、IBA。pH 5.8~6.0, 121℃ 高压灭菌 20 min 后分装在培养瓶内。

第一作者简介:王建书(1960-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物学。E-mail: wangjianshu135@163.com.

基金项目:农业部公益性行业专项资助项目(201303112); “十一五”、“十二五”科技支撑资助项目(2011BAD35B07, 2012BAD02B03, 2012BAD50G01); 科技部“863”资助项目(2012AA100202-3)。

收稿日期:2015-07-30

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的准备 将西葫芦侧枝取下, 去掉大的叶片及多余组织, 保留 1~2 cm 长茎尖冲洗干净待用。

1.2.2 外植体消毒及接种 茎尖在 70% 酒精中灭菌 30 s 后用蒸馏水清洗 3~4 次, 在不同处理的次氯酸钠与升汞溶液(含吐温 20~30 滴/L)中消毒, 设置 12 个消毒处理(表 1)。消毒后用灭菌蒸馏水清洗 5~6 次, 接种在含有不同浓度 6-BA 及 IBA 的再生培养基上培养。培养温度 28℃, 光照强度 2 500~3 000 lx, 光照时间 16 h/d。每处理接种 20 瓶, 每瓶 3 个外植体, 5 d 后统计外植体污染结果, 15 d 后统计再生植株的生根及生长情况。

表 1 西葫芦茎尖不同消毒方法

Table 1 Vegetable manow stew tip of different disinfection methods

处理	消毒方法	处理	消毒方法
Treatment	Disinfection method	Treatment	Disinfection method
T1	5%次氯酸钠 10 min	T7	0.10%升汞+10%次氯酸钠 10 min
T2	5%次氯酸钠 15 min	T8	0.05%升汞+10%次氯酸钠 10 min
T3	10%次氯酸钠 10 min	T9	0.05%升汞+15%次氯酸钠 10 min
T4	10%次氯酸钠 15 min	T10	0.05%升汞+10%次氯酸钠 15 min
T5	15%次氯酸钠 10 min	T11	0.02%升汞+10%次氯酸钠 10 min
T6	15%次氯酸钠 15 min	T12	0.01%升汞+10%次氯酸钠 10 min

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对西葫芦茎尖消毒效果的影响

由表 2 可知, 单独使用次氯酸钠溶液对西葫芦茎尖的消毒效果很不理想, 污染率高(78.3%~100%), 特别是细菌性污染的外植体比例高, 经多次转接外植体成活率低。在次氯酸钠溶液中添加升汞后, 混合溶液的消毒效果明显提高, 污染率降低至 6.7%~13.3%, 但是随着升汞浓度的提高外植体被杀死的个数明显增加, 综合考虑以含有 0.02% 升汞和 10% 次氯酸钠的溶液进行西葫芦茎尖消毒 10 min, 效果最好, 外植体污染率降低到

表 2 不同消毒处理对西葫芦茎尖离体培养的影响

Table 2 Different disinfection treatment effects on vegetable manow stem tip *in vitro* culture

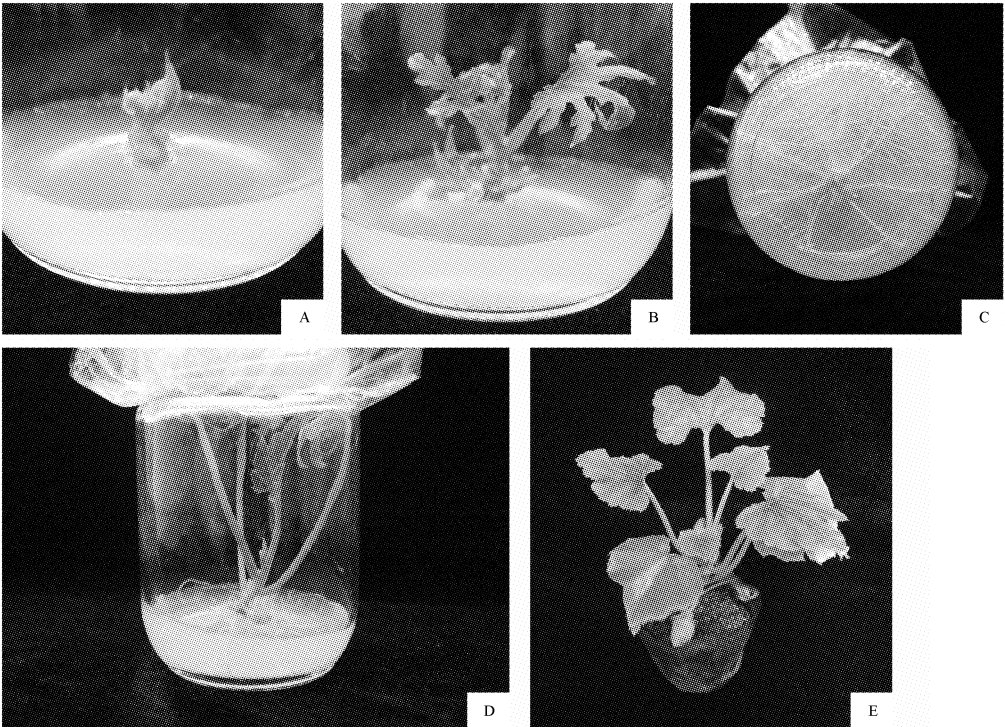
处理 Treatment	外植体数 Explant No.	消毒处理 Disinfection treatment			外植体污染数 Explantpollrtion number		污染率 Pollution rate/%	外植体杀死个数 Explant killed number	成活率 Survial rate/%
		升汞浓度 Mercuric chloride concentration/%	次氯酸钠浓度 Concentration of NaClO/%	时间 Time/min	真菌 Fungus	细菌 Bacteria			
T1	60	—	5	10	16	52	100.0	0	0
T2	60	—	5	15	18	47	100.0	0	0
T3	60	—	10	10	19	43	91.7	0	8.3
T4	60	—	10	15	11	40	86.7	0	13.3
T5	60	—	15	10	13	37	88.3	0	11.7
T6	60	—	15	15	15	41	78.3	0	21.7
T7	60	0.10	10	10	5	4	13.3	21	51.7
T8	60	0.05	10	10	7	2	11.7	12	63.3
T9	60	0.05	15	10	3	4	8.3	9	76.7
T10	60	0.05	10	15	6	3	10.0	11	71.7
T11	60	0.02	10	10	3	4	6.7	2	91.7
T12	60	0.01	10	10	5	7	11.7	0	88.3

6.7%，成活率可达 91.7%。

2.2 不同植物生长调节剂组合对西葫芦茎尖生长及增殖的影响

茎尖在空白 MS 培养基上能够进一步生长发育,但在添加 6-BA 与 NAA 的培养基上能够在外植体基部诱

导腋芽发育,形成多个不定芽(图 1、表 3)。在含有 6-BA 0.5 mg/L 和 IBA 0.10 mg/L 的处理中,诱导形成的不定芽最多,每个外植体可平均形成 2.38 个芽,而且形成的芽健壮,伸长明显,容易切割转接,是较为适宜的芽诱导增殖培养基。



注:A,培养的茎尖组织;B,培养 15 d 后叶片展开,腋芽发育;C,转至生根培养基 15 d 后长根情况;D,形成完整植株;E,移栽驯化。

Note:A,activate the stem tip tissue;B,training after 15 days leaf expansion,axillary bud development;C,the situation after 15 days in rotins medium;D,the complete plant;E,transplanting and domesticated.

图 1 西葫芦茎尖再生培养

Fig. 1 Vegetable manow stem tip regeneration

表 3 不同植物生长调节剂组合对西葫芦茎尖生长及增殖的影响

Table 3 Effect of different plant growth regulator combination on squash stem tip growth and proliferation

外植体数 Explant number	植物生长调节剂浓度 regulator concentration/(mg · L ⁻¹)	Plant growth	再生芽数 Regeneration bud number	增殖倍数 Proliferation of murige
	6-BA	IBA		
60	0.0	0.00	60	1.00
60	0.5	0.00	71	1.18
60	1.0	0.00	65	1.08
60	0.5	0.05	76	1.27
60	0.5	0.10	143	2.38
60	1.0	0.05	78	1.30
60	1.0	0.10	86	1.43

2.3 不同植物生长调节剂组合对西葫芦再生植株生根的影响

从表 4、图 1 可知,单独添加 IBA 能够很好的促进西葫芦再生植株的生根,在添加 0.30 mg/L IBA 的处理中,5 d 就可观察到不定根的发育,15 d 后能够平均形成 8.1 条根。进一步增加 IBA 浓度虽然也能形成根,但小植株基部愈伤化严重,先形成大的细胞团组织,再生根,根容易在移栽时脱落。添加 6-BA 后,根的发生受到抑

表 4 不同植物生长调节剂组合对西葫芦再生植株生根的影响

Table 4 Effect of different plant growth regular combination on rooting of squash regeneratice plants

外植体数	培养基处理 Medium processing		根率	平均生根数
Eexplant	/(mg · L ⁻¹)		Rating	The average root
number	6-BA	IBA	rate/%	number/条
60	0.5	0.10	53.3	4.3 c
60	0.5	0.05	31.6	2.7 d
60	—	0.10	100.0	6.4 b
60	—	0.30	100.0	8.1 a
60	—	0.50	100.0	7.2 a

Induction of Direct Shoot Organogenesis From Shoot Tip Explants of *Cucurbita pepo* L.

WANG Jianshu¹, SUN Songsong^{1,2}, LIU Hao¹, ZHANG Guoyu², LI Haizhen², ZHANG Fan²

(1. College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056021; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097)

Abstract: The study described an efficient *in vitro* micropropagation protocol for induction of multiple shoots from shoot tip explants of *Cucurbita pepo* L. The results showed that shoot tip explants were treated with 10% solution of sodium hypochlorite, which contain 0.02% mercury chloride (HgCl₂), for 10 minutes, the lowest contamination rate was 6.7%, the highest survive rate was 91.7%. The highest frequency (100%) of multiple shoot formation with maximum number of shoots (2.38 shoots per explants) was achieved on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 6-BA and 0.10 mg/L IBA. Shoots were rooted most effectively in 0.30 mg/L indole-3 butyric acid (IBA)-supplenmented MS medium, and all rooted shoots were successfully transplanted into soil.

Keywords: *Cucurbita pepo* L.; shoot tip; tissue culture; rapid propagation

制。生根后的小植株移栽到草炭:蛭石为 1:3 的灭菌营养土中经过驯化,成活后移栽到大田。

3 讨论

外植体材料灭菌是否成功是茎尖离体培养成活的关键因素,灭菌不充分常常导致外植体真菌和细菌的增生,最终致使接种材料死亡。西葫芦茎尖组织遍布刺毛,疏水性强,而且茎秆中空容易残留细菌,再加上小叶丛生繁杂很难以彻底清除细菌与真菌,这一直是困扰西葫芦茎尖培养快繁成功效率的瓶颈问题。课题组多次试验单独使用不同浓度的次氯酸钠(5%~30%)与升汞(0.01%~0.50%)溶液消毒均未获得成功,但发现前者对真菌杀菌效果好,而后者对细菌杀菌效果好,但 2 种灭菌溶液的相继使用,又可能因为处理时间的延长而导致茎尖死亡比例大幅提高。该研究中二者的混合溶液同时利用,既缩短了茎尖组织灭菌处理时间,又增强了杀菌能力。

在植物组织的离体培养快繁中,通常采用不定芽诱导增殖的方式以增加繁殖系数,西葫芦茎尖在空白 MS 培养基上也能进一步生长生根,但发育缓慢,而且不能促进基部腋芽发育,繁殖系数低。添加适量的细胞分裂素与生长素后植株生长健壮,能促进基部的腋芽发育形成新的植株。另外,将伸长的再生植株切段后,在增殖培养基中培养 15 d 后,能从腋芽发育成完整植株,大大提高了增殖能力。

参考文献

- [1] 杨国放,毕波,王晓峰,等.辣根茎尖的组织培养[J].安徽农业科学,2012,40(7):3889-3890.
- [2] 王碧琴.荸荠茎尖培养体系的研究[J].江西科学,2012,30(3):314-316.
- [3] 贾文庆.观赏南瓜的组织培养和快速繁殖[J].江苏农业科学,2007(1):1-3.